(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4335310号
(P4335310)
(45)発行日　平成21年9月30日(2009.9.30)　(24)登録日　平成21年7月3日(2009.7.3)

(51)Int.Cl.　　F I
C12N 15/09 (2006.01)　　C12N 15/00 A
A61K 48/00 (2006.01)　　A61K 48/00

請求項の数 9　(全 60 頁)

(21)出願番号　特願平9-502106
(86)(22)出願日　平成8年6月6日(1996.6.6)
(65)公表番号　特表平11-507537
(43)公表日　平成11年7月6日(1999.7.6)
(86)国際出願番号　PCT/US1996/009949
(87)国際公開番号　WO1996/040964
(87)国際公開日　平成8年12月19日(1996.12.19)
審査請求日　平成15年6月6日(2003.6.6)
(31)優先権主張番号　08/484,282
(32)優先日　平成7年6月7日(1995.6.7)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　08/485,458
(32)優先日　平成7年6月7日(1995.6.7)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者
ザ　ユニバーシティ　オブ　ブリティッシュ　コロンビア
カナダ国,　ブリティッシュ　コロンビア　ブイ６ティー　１ゼット３,　バンクーバー,　アグロノミー　ロード　＃１０３－６１９０
(74)代理人
弁理士　青木　篤
(74)代理人
弁理士　石田　敬
(74)代理人
弁理士　福本　積
(74)代理人
弁理士　古賀　哲次

最終頁に続く

(54)【発明の名称】疎水性脂質－核酸複合中間体を通して調製される脂質－核酸粒子、及び遺伝子移送のための使用

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
血清安定性プラスミド－脂質粒子の調製方法であって、
（ａ）有機溶媒中にカチオン性脂質及び非カチオン性脂質を含んで成る混合物を調製し；
（ｂ）前記段階（ａ）で調製された混合物とプラスミドの水溶液を接触せしめることにより透明な単相を提供し；そして
（ｃ）前記有機溶媒を除去することによりプラスミド－脂質粒子の懸濁液を得る；
ことを含んで成り、ここで前記プラスミドが脂質二重層に封入され、そして前記粒子が血清中で安定であり、そして50～150nmのサイズを有することを特徴とする方法。
【請求項２】
前記非カチオン性脂質が、ポリエチレングリコール－脂質接合体を含んで成る請求項１に項記載の方法。
【請求項３】
前記ポリエチレングリコール－脂質接合体がPEG－セラミド接合体である請求項２に記載の方法。
【請求項４】
前記カチオン性脂質が、DODAC、DDAB、DOTAP、DOTMA、DOSPA、DOGS、DC－Chol及びそれらの組合せから成る群から選択される請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５】
前記非カチオン性脂質が、DOPE、POPC、EPC及びそれらの組合せから成る群から選択され

る請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６】
請求項１～５のいずれか１項に記載の方法により製造されるプラスミド－脂質粒子。
【請求項７】
細胞中にプラスミドをイン－ビトロで導入するための方法であって、
（ａ）請求項１～５のいずれか１項に記載の方法に従ってプラスミド－脂質粒子を調製し；そして
（ｂ）前記プラスミド－脂質粒子と前記細胞とを、前記細胞中に前記プラスミドを導入するのに十分な時間、接触せしめることを含んで成る方法。
【請求項８】
前記プラスミド－脂質粒子が、核酸、DODAC、POPC、並びにPEG－Cer－C_{20}及びPEG－Cer－C_{14}から成る群から選択されたPEG－セラミドを含んで成る
請求の範囲第７項記載の方法。
【請求項９】
前記プラスミド－脂質粒子が、プラスミド、DODAC、DOPE、並びにPEG－Cer－C_{20}及びPEG－Cer－C_{14}から成る群から選択されたPEG－セラミドを含んで成る請求の範囲第７項記載の方法。
【発明の詳細な説明】
発明の分野
本発明は、細胞中への核酸の導入のために有用である脂質－核酸粒子、及びそれの製造方法及び使用方法に関する。本発明は、細胞中へのプラスミド又はアンチセンス化合物の導入のための循環安定性の特徴付けが可能な供給ビークルを提供する。それらのビークルは、臨床使用のために安全で、安定で、且つ実用的である。
発明の背景
遺伝子欠損を修正するために遺伝的欠陥の宿主細胞中への遺伝子移送（transfer）は、これまで治療できなかった種々の医学的状態を都合良く治療するための大きな可能性を有する。現在、遺伝子を宿主細胞中に導入するための次の６種の主要な非ウィルス的方法が存在する：（ｉ）直接的なマイクロインジェクション法、（ii）リン酸カルシウム沈殿法、（iii）DEAE－デキストラン複合体法、（iv）エレクトロポレーション、（ｖ）カチオン性脂質複合体法、及び（vi）再構成されたウィルス及びビロソーム（virosome）法（Chang、など., Focus 10：88（1988）を参照のこと）。
遺伝子移送のほとんどの報告されている例は、インビトロで実施されている。インビボ遺伝子移送は、血清の相互作用、免疫クリアランス、遺伝子の酵素分解、毒性及び生体分布により複雑にされる。インビボ投与においては、選択は不可能であり、そして形質転換の適度に高い頻度が、欠損性内因性遺伝子を補足するために十分な発現を達成するためには必要である。
診療所における研究下でのインビボ遺伝子移送法は、ほとんど完全に、ウィルスベクターから成る。ウィルスベクターは、細胞膜を通して核酸を輸送する固有の能力を有し、そしていくつかは染色体中に外因性DNAを組込むことができるが、それらは制限された量のみのDNAを運ぶことができる。さらに、それらの使用は実質的な危険性をもたらす。１つのそのような危険性は、ウィルスベクターが、突然変異又は野生型ウィルスとの遺伝子交換を通して病原性遺伝子型に転じることである。
それらの制限及び危険性の観点から、他の非ウィルス基材による遺伝子移送方法が開発されて来た。それらの方法はしばしば、DNA供給のためのベクターとして、DNAの小さな環状配列であるプラスミドベクターを使用する。しかしながら、ほとんどのプラスミドは細胞内供給のために必要とされる特性を有さず、そして従って、洗練された供給システムが必要とされる。
カチオン性脂質複合体は、細胞中に非ウィルス性核酸を導入する、最とも効果的な、一般的に使用される手段である。カチオン性脂質を組込む多くの異なった配合物は市販されている。それらは次のものを包含する：LIPOFECTIN▲R▼（１，２－ジオレイルオキシ－３

－（Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアミノ）プロパンクロリド（又はDOTMA）を使用する、Eppstein、など.,アメリカ特許第4,897,355号を参照のこと）；LIPOFECTAMINE▲Ｒ▼（DOSPAを使用する、Hawley-Nelson，など.，Focus 15（3）：73（1993）を参照のこと）；及びLIPOFECTACE▲Ｒ▼（Ｎ，Ｎ－ジステアリル－Ｎ，Ｎ－ジメチル－アンモニウムブロミド（又はDDAB）を使用する、Rose、アメリカ特許第5,279,833号を参照のこと）。その他としては、実質的に同じ態様で作用するが、しかし異なった効能を有する次のカチオン性脂質を挙げることができる：１，２－ジオレオイルオキシ－３－（Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアミノ）プロパンクロリド（又はDOTAP）（Stomatatosなど.，Biochemistry 27：3917-3925（1988）；グリセロール基材の脂質（Leventisなど.，Biochem. Biophys. Acta 1023：124（1990）；リポポリアミン（Behrなど.,アメリカ特許第5,171,678号を参照のこと）及びコレステロール基材の脂質（Epandなど.，WO93/05162及びアメリカ特許第5,283,185号を参照のこと）。DOTMA及び関連する化合物が、それらの飽和類似体よりも、遺伝子移送アッセイにおいて有意により活性であることが報告されている（Felgnerなど.，WO91/16024を参照のこと）。しかしながら、DOTMA及びDOSPA基材の両配合物は、遺伝子移送をもたらすことにおけるそれらの有効性にもかかわらず、非常に高価である。他方、DDABは安価であり、そして化学物質供給者から容易に入手できるが、しかし、ほとんどの細胞系においてDOTMAよりも効果的ではない。現在の脂質システムのもう１つの欠点は、それらが静脈内注射のために適切ではないことである。

遺伝子移送に使用される脂質基材のベクターは一般的に、２種の手段のうち１つから形成されて来た。１つの方法においては、核酸が、カチオン性脂質及び中性脂質の混合物から製造される、前記もって形成されたリポソーム中に導入される。このようにして形成される複合体は不確定且つ複雑な構造を有し、そしてそのリポフェクチン効率が、血清の存在により著しく減じられる。第２の方法は、中性脂質の不在下でモノ－又はポリ－カチオン性脂質によるDNA複合体の形成を包含する。それらの複合体はしばしば、エタノールの存在下で調製され、そして水において不安定である。さらに、それらの複合体は血清により悪影響を受ける（Behr，Acc. Chem. Res. 26：274-78（1993）を参照のこと）。

キャリヤービークルの化学構造と遺伝子移送の効能との間の関係の試験は、効果的な遺伝子移送を提供する特徴が循環中でキャリヤーを不安定にすることを示唆している（Ballasなど.，Biochem. Biophys. Acta 939：8-18（1988）を参照のこと）。さらに、標的細胞の外側又はその内側での分解が問題を残している（Duzghines，Subcellular Biochemistry 11：195-286（1985）を参照のこと）。脂質基材の配合物へのDNAの封入を試みた他の研究者はそれらの問題を克服していない（Szokaなど.，Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9：467（1980）；Deamer、アメリカ特許第4,515,736号及びLegendre，Pharm. Res. 9：1235-1242（1992）を参照のこと）。

理想的には、核酸又はプラスミドのための供給ビークルは次の特徴を有するであろう：ａ）調製の容易さ、ｂ）すべてのサイズの遺伝子の遺伝子移送を可能にし、そして注入の体積を減じるために粒子当たり多量のDNAを担持することができ、ｃ）均質であり、ｄ）再現性があり、ｅ）最少の血清相互作用を伴って血清安定性であり、そして細胞外分解からDNAを保護し、そしてｆ）DNAが細胞内消化されないような手段で標的細胞をトランスフェクトすることができる。

本発明は、そのような組成物、及びそれらの調製方法及び使用方法を提供する。

発明の要約

本発明は、新規の脂質－核酸粒子を含む。本発明はまた、それらの粒子の製造方法及び使用方法も含む。

ある態様においては、粒子は、界面活性剤基材又は有機溶媒基材の系における疎水性中間複合体の形成、それに続く、前記界面活性剤又は有機溶媒の除去、により製造される。好ましい態様では荷電が中和される。

１つの態様においては、プラスミドが、被覆されたプラスミド－脂質複合体をもたらすために界面活性剤溶液中でカチオン性脂質と一緒にされる。次に、その複合体が、非カチオン性脂質と接触せしめられ、界面活性剤、プラスミド－脂質複合体及び非カチオン性脂質

の溶液が提供され、そして次に、前記界面活性剤が除去され、血清安定性プラスミド－脂質粒子の溶液が提供され、ここで前記プラスミドが脂質二重層に封入される。このようにして形成された粒子は、約50～150nmの大きさを有する。
もう１つの態様において、血清安定性のプラスミド－脂質粒子が、有機溶媒においてカチオン性脂質及び非カチオン性脂質の混合物を調製し；透明な単相を提供するために前記カチオン性及び非カチオン性脂質の混合物とプラスミドの水溶液とを接触せしめ；そしてプラスミド－脂質粒子の懸濁液を提供するために有機溶媒を除去する、ことによって形成され、ここで前記プラスミドが脂質二重層に包入され、そして前記粒子が血清中で安定であり、そして約50～150nmのサイズを有する。
脂質－核酸粒子を形成するためのもう１つの方法は：
（ａ）核酸－脂質混合物を形成するために、非カチオン性脂質及び界面活性剤の溶液と核酸とを接触せしめ；
（ｂ）前記核酸の負の電荷を中和し、そして核酸及び脂質の電荷中和された混合物を形成するために、前記核酸－脂質混合物とカチオン性脂質とを接触せしめ；そして
（ｃ）核酸が分解から保護されている脂質－核酸粒子を供給するために、前記電荷中和された混合物から前記界面活性剤を除去する；
ことを包含する。
脂質－核酸粒子を形成するための方法は：
（ａ）溶液中で核酸と多量のカチオン性脂質とを接触せしめ、ここで前記溶液が約15～35％の水及び約65～85％の有機溶媒から成り、そして前記カチオン性脂質の量が、約0.85～約2.0の＋／－電荷比を生成するのに十分であり、こうして疎水性の電荷中和された脂質－核酸複合体を供給し；
（ｂ）脂質－核酸混合物を供給するために、溶液での前記疎水性の電荷中和された脂質－核酸複合体と非カチオン性脂質とを接触せしめ；そして
（ｃ）核酸が分解から保護されている脂質－核酸粒子を供給するために、前記脂質－核酸複合体から有機溶媒を除去する；
ことを包含する。
本発明の脂質－核酸粒子は、核酸の治療用供給のために有用である。１つの態様において、前記粒子は、疎水性脂質－核酸中間体（又は複合体）を通して構成される。可溶性成分（すなわち界面活性剤又は有機溶媒）の除去の後、核酸は分解から保護されるようになる。このようにして形成された粒子は、それらが循環において安定であり、血管外部位及び標的細胞集団への接近をもたらす薬物動力学的挙動性のために必要とされるサイズのものであるので、静脈内核酸移送への使用のために適切である。
特に、特定のタンパク質の過剰生成又は過少生成を包含する疾病のインビトロ及びインビボ処理方法を提供することが本発明の目的である。それらの方法においては、所望するタンパク質をコードし、又は所望しないタンパク質の生成を阻止する核酸が脂質－核酸中に配合され、そしてその粒子がそのような処理を必要とする患者に投与される。あるいは、細胞が患者から取り出され、本発明に記載される脂質－核酸粒子によりトランスフェクトされ、そして患者中に再注入される。

【図面の簡単な説明】

図１は、DNAの“サンドイッチ－型”複合体を用いての核酸－脂質粒子－介在の遺伝子移送を示す。
図２は、脂質複合体への大きな核酸の取込みの間に通常、生じる凝集及び沈殿を示す。
図３は、本発明の一定の態様に従ってのプラスミド－脂質粒子の調製の図解表示を提供する。
図４は、封入された粒子の逆相調製及び400nmのフィルター及び200nmのフィルターを通しての押出しに続く、その封入された粒子からの^{3}Ｈ－DNAの回収率を示す。脂質組成は、POPC：DODAC：PEG－Cer－C_{20}である。PEG－CerC_{20}は10モル％で一定に維持され、そしてPOPC及びDODACはお互いに対して変更された。20mgの脂質；50μｇのプラスミドDNA（7.5kbp）。

図５は、逆相法を用いて調製された粒子からの^{3}Ｈ－DNAの回収率を示す。粒子は200nmのフィルターを通して押出され、そしてDEAE Sepharose CL－6Bアニオン交換カラム上で溶出された。報告される％回収率は、濾過後に回収される量に基づいている。脂質組成は図４における通りである。

図６は、封入された粒子の逆相調製、並びに400nmのフィルター及び200nmのフィルターを通しての押出に続く、その封入された粒子からの^{14}Ｃ－脂質の回収率を示す。脂質組成は図４における通りである。

図７は、逆相法を用いて調製された粒子からの^{14}Ｃ－脂質の回収率を示す。粒子は200nmのフィルターを通して押出され、そしてDEAE Sepharose CL－6Bアニオン交換カラム上で溶出された。報告される％回収率は、濾過後に回収された量に基づいている。脂質組成は図４における通りである。

図８は、プラスミドDNAの封入に対するDODAC濃度の効果を示す。封入効率はアニオン交換クロマトグラフィーにより測定された。小胞は、DOPE，DODAC及び10モル％のPEG－Cer－C_{20}（記号）、又はEPC，DODAC及び10モル％のPEG－Cer－C_{20}（記号）から構成された。合計の脂質及びDNAの濃度は、それぞれ10ｍモル／ml及び50μｇ／mlであった。

図９Ａ及び９Ｂは、80％マウス血清におけるインキュベーションの前（Ａ）及び後（Ｂ）において、カラムクロマトグラフィーにより評価される場合の、遊離pCMVCAT DNAに対する血清ヌクレアーゼの効果を示す。遊離^{3}Ｈ－DNA（pCMVCAT）は、HBS（pH7.4）中でSepharose CL－4Bカラム上で溶出された。

図10は、カラムクロマトグラフィーにより評価される場合、封入されたpCMVCAT DNA（逆相により調製された）に対する血清ヌクレアーゼの効果を示す。80％マウス血清において30分間インキュベートされた、封入されたpCMVプラスミドのSepharose CL－4Bカラムプロフィール。（Ａ）外部DNAは、血清中でのインキュベーションの前、イオン交換クロマトグラフィーにより除去された。（Ｂ）外部DNAは血清中でのインキュベーションの前、除去されなかった。脂質組成は、POPC：DODAC：PEG－Cer－C_{20}であった。合計の脂質及びプラスミドの濃度は、アニオン交換クロマトグラフィー処理の前、20μモル／ml及び50μｇ／mlであった。

図11Ａ及び11Ｂは、カラムクロマトグラフィーにより評価される場合、封入されたpCMVCAT DNA（界面活性剤透析により調製された）に対する血清ヌクレアーゼの効果を示す。80％マウス血清中で30分間インキュベートされた、封入されたpCMVプラスミドのSepharose CL－4Bカラムプロフィール。（Ａ）外部DNAは、血清中でのインキュベーションの前、イオン交換クロマトグラフィーにより除去された。（Ｂ）外部DNAは血清中でのインキュベーションの前、除去されなかった。脂質組成は、DOPE：DODAC：PEG－Cer－C_{20}（84：６：10）であった。合計の脂質及びプラスミドの濃度は、アニオン交換クロマトグラフィー処理の前、10μモル／ml及び40μｇ／mlであった。

図12Ａ及び12Ｂは、DOPE：DODAC（50：50）から構成される、予備形成されたリポソームに複合体化されたプラスミド（Ａ）及びDOPE：DODAC：PEG－Cer－C_{14}粒子内に封入されたプラスミド（Ｂ）のDNアーゼＩによる消化に対する耐性を示す。プラスミドDNAが抽出され、そしてゲル上での可視化のために増幅するためにPCR（ポリメラーゼ鎖反応）にゆだねられた。遊離プラスミドが対照として使用された。レーン１：１kbのDNAマーカー；レーン２：PCR陰性対照（DNAを含まない）；レーン３：遊離プラスミドのみ；レーン４：0.05％界面活性剤（Triton X-100）中での遊離プラスミド；レーン５：界面活性剤の不在下でDNアーゼＩと共にインキュベートされた遊離プラスミド；レーン６：界面活性剤の存在下でDNアーゼＩと共にインキュベートされた遊離プラスミド；レーン７：複合体化された（Ａ）又は封入された（Ｂ）プラスミドのみ；レーン８：0.05％界面活性剤中での、複合体化された（Ａ）又は封入された（Ｂ）プラスミド；レーン９：界面活性剤の不在下でDNアーゼＩと共にインキュベートされた、複合体化された（Ａ）又は封入された（Ｂ）プラスミド；レーン10：界面活性剤の存在下でDNアーゼＩと共にインキュベートされた、複合体化された（Ａ）又は封入された（Ｂ）プラスミド。

図13は、封入効率に対するプラスミドDNA濃度の効果を示す（界面活性剤透析）。小胞は

、10μモル／mlの脂質濃度での、DOPE：DODAC：PEG－Cer（84：６：10）から構成された。

図14は、プラスミド取込みに関しての最適DODAC濃度に対するNaCl濃度の効果を示す。脂質組成は、DOPE：DODAC：PEG－Cer－C_{14}（又はPEG－Cer－C_{20}）であった。PEG－Cerは10モル％で一定に維持された。合計の脂質濃度は10μモル／mlであった。プラスミド濃度は50μｇ／mlであった。

図15は、界面活性剤透析法により調製されたプラスミド：脂質粒子のサイズ分布を示す（体積重さ分析（Volume weighted analysis））。脂質組成はDOPE：DODAC：PEG－Cer－C_{20}（84：６：10）であった。

図16は、界面活性剤透析法により調製されたプラスミド：脂質粒子のサイズ分布を示す（数重さ分析（Number weighted analysis））。脂質組成はDOPE：DODAC：PEG－Cer－C_{20}（84：６：10）であった。

図17Ａ及び17Ｂは、封入されたプラスミドを伴わないでDOPE：DODAC：PEO－Cer－C_{20}から構成されたリポソーム（Ａ）、及びプラスミド：脂質粒子（Ｂ）の電子顕微鏡写真である。小さな矢印は、約100nmの直径での空のリポソームを示す。それらは、膜二重層により取り囲まれた電子密集粒子に比較される（大きな矢印）。縮尺棒＝100nm。

図18は、ICRマウス中への注入の後、粒子（逆相法により調製された）からの^{3}Ｈ－DNA及び^{14}Ｃ－脂質のクリアランスを示す。図は、比較として、注入の後の遊離^{3}Ｈ－DNAを包含する。脂質組成は、POPC：DODAC：PEG－Cer－C_{20}である。

図19Ａ及び19Ｂは、ICRマウス中への注入の後、粒子（界面活性剤透析法により調製された）からの^{3}Ｈ－DNA及び^{14}Ｃ－脂質のクリアランスを示す。脂質組成は、（Ａ）DOPE：DODAC：PEG－Cer－C_{20}（84：６：10）、及び（Ｂ）DOPE：DODAC：PEG－Cer－C_{14}（84：６：10）であった。

図20は、マウスの肺において生じるインビボ遺伝子移送の結果を示す。脂質組成は、DOPE－DODAC－PEG－Cer－C_{20}又はDOPE：DODAC：PEG－Cer－C_{14}（84：６：10）である。

図21は、マウス肝臓において生じるインビボ遺伝子移送の結果を示す。脂質組成は、DOPE－DODAC－PEG－Cer－C_{20}又はDOPE：DODAC：PEG－Cer－C_{14}（84：６：10）である。

図22は、マウス肝臓において生じるインビボ遺伝子移送の結果を示す。脂質組成は、DOPE－DODAC－PEG－Cer－C_{20}又はDOPE：DODAC：PEG－Cer－C_{14}（84：６：10）である。

図23は、脂質－核酸複合体のBligh及びDyer抽出に続く水性相におけるβゲルプラスミドDNAの回収に対する、増加する量のLipofectin▲R▼（DOTMA／DOPE；50：50のモル比）の効果を示す。

図24Ａ及び24Ｂは、脂質－核酸複合体のBligh及びDyer抽出に続く水性（Ａ）及び有機（Ｂ）相におけるプラスミドDNAの回収に対する、増加する量のカチオン性脂質の効果を示す。

図25Ａ，25Ｂ，25Ｃ及び25Ｄは、Bligh及びDyer抽出に続き、水性（Ａ及びＣ）及び有機（Ｂ及びＤ）画分からのプラスミドDNAの回収率を電荷比（＋／－）の関数として示す。

図26及び26Ｂは、TO－PRO－１色素インターカレーションによりアッセイされる、ポリ－Ｌ－リシン及びDODACによるDNA縮合を示す。縮合状態は、Bligh及びDyer単相（Ａ）及び100mMのOGP（Ｂ）において評価された。

図27は、脂質－核酸複合体（プラスミド／DODAC）のBligh及びDyer抽出に続く水性及び有機相からのプラスミドDNAの回収に対する増量のOGPの効果を示す。

図28は、脂質－核酸複合体のBligh及びDyer抽出に続く水性相からのプラスミドDNAの回収に対する増加する量のNaClの効果を示す。

図29Ａ及び29Ｂは、プラスミドDNAの電気泳動移動度に対するポリ－Ｌ－リシン及びDODACの効果を示す。

図30は、界面活性剤透析を用いて脂質－核酸粒子を調製するためのプロトコールを示す。

図31及び31Ｂは、β－galプラスミド／DODAC／ESMから調製された典型的な脂質－核酸複合体混合物のQELS結果を示す棒グラフである。

図32は、TO－PRO－１色素インターカレーションを用いての、脂質－核酸複合体におけるD

NA縮合の螢光分光評価を示す棒グラフである。その結果は、DODAC／ESMにおけるβ－galプラスミドが縮合され、そして脂質による色素インターカレーションに対して保護され、そしてOGPが粒子を縮合し得ないことを示す。
図33は、DNアーゼＩによる消化に続く脂質－核酸複合体から抽出物されるDNAの電気泳動の結果を示す。複合体内のDNAはDNアーゼＩ消化から保護され、ところが複合体化されていないDNAは保護されない。
図34は、β－gal酵素活性によりアッセイされる場合、β－galプラスミド／DODAC／ESMを用いてのCHO細胞リポフェクションの結果を示す。
図35Ａ及び35Ｂは、100mM（Ａ）又は20mM（Ｂ）のｎ－オクチルβ－Ｄ－グルコピラノシド（OGP）の存在下で核酸－脂質粒子の調製の間、600nmでの90°光散乱により測定されるサンプル濁り度の変化を示す。
図36は、90°光散乱により測定される場合のOGPにおける予備形成されたDODAC（●）及びSM（■）小胞の溶解性を示す。使用される脂質の濃度は、200μＭ（実線）及び800μＭ（点線）であった。
図37Ａ，37Ｂ及び37Ｃは、pCMVβ／DODAC／SM（２：１の電荷比、１：１のDODAC／SMのモル比）から構成され、そして透析の前（●）及び後（■）で20mMのOGPを用いて調製された核酸－脂質粒子配合物について、固体粒子分析態様で作動するQELSにより決定される容積－重量粒子サイズ分布を示す。透析後の同じ核酸－脂質粒子配合物がまた、電子顕微鏡により試験された（Ｂ、負の染色及びＣ、凍結－破壊）。縮尺棒＝100nm。
図38Ａ及び38Ｂは、100mM及び20mMのOGP（2.1の電荷比及び１：１のSM／DODACの比）で調製され、そしてOGPの不在（Ａ）及び存在（Ｂ）下でDNアーゼＩ感度について試験される配合物から単離されるDNAのアガロースゲル電気泳動を示す。パネルＡ：分子量標準（レーン１）、添加される脂質又はDNアーゼＩの不在下でのpCMVβ（レーン２）、DNアーゼと共にインキュベーションした後のpCMVβ（レーン３）、DNアーゼＩの不在（レーン４）及び存在（レーン５）下でのインキュベーションに続いて100mMのOGPを用いて調製された、透析された核酸－脂質粒子配合物から単離されたDNA、及び20mMのOGPを用いて調製され、そしてDNアーゼＩの不在（レーン６）及び存在（レーン７）下でのインキュベーションに続いて透析された粒子から単離されたDNA。パネルＢにおける最初の３つのレーンは、パネルＡにおけるレーンと同じであるが、但しpCMVβはDNアーゼＩの不在（レーン２）及び存在（レーン３）下で20mMのOGPを用いてインキュベートされた。20mMのOGP下で調製された配合物から単離されたDNA（界面活性剤除去の前）が、20mMのOGPにおいてDNアーゼＩの不在（レーン４）及び存在（レーン５）下でインキュベートされた。
図39Ａ，39Ｂ及び39Ｃは、100mMのOGPを用いて調製され、続いて透析された、pCMVβ／SM／DODACから構成される核酸－脂質粒子配合物（１：１のSM／DODACモル比及び１：１～８：１の電荷比）を用いてインビボチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞リポフェクションを示す。（Ａ）βガラクトシダーゼリポフェクションに対する電荷比の影響。（Ｂ）４：１の電荷比を用いて調製された配合物についてのウェル当たりの減じられたβ－ガラクトシダーゼ、活性により測定されるような粒子誘発された毒性。（Ｃ）中性脂質としてSM（実線の棒）又はDOPE（斜線の棒）を用いて調製された核酸－脂質粒子（４：１の電荷比、及び１：１のDODAC／中性脂肪のモル比）により達成されるβ－ガラクトシダーゼリポフェクション。
図40は、新規の脂質－DNA粒子の生成に関与する中間体を記載するモデルである。
図41Ａ，41Ｂ及び41Ｃは、異なったカチオン性脂質を用いての界面活性剤透析法による脂質小胞におけるプラスミドDNAの封入化を示す。
図42Ａ，42Ｂ及び42Ｃは、異なったカチオン性脂質により調製された、プラスミド含有小胞の安定性を示す。
図43は、透析法によるイオ化可能な脂質AL－１（pka＝6.6）によるプラスミドDNAの封入化を示す。
図44及び45は、pH4.8でAL－１により形成されたプラスミド含有小胞の安定性及びpH7.5で血清ヌクレアーゼによる分解からの封入されたDNAの保護を示す。

図46は、7.5％のDODAC及びDOPEによる透析法による封入化効率に対するPEG－セラミド濃度の効果を示す。

発明の詳細な説明

内　容

Ｉ．用語解説
II．一般解説
III．発明の態様
Ａ．脂質－核酸粒子及びその性質
Ｂ．脂質－核酸粒子の配合法
Ｃ．医薬製剤
Ｄ．遺伝子移送のための脂質－核酸粒子の投与
IV．例
Ｖ．結論

Ｉ．用語解説

次の略語が本明細書に使用される：CHO、チャイニーズハムスター卵巣；Ｂ16、ネズミ黒色腫細胞系；DC－Chol，３β－（Ｎ－（Ｎ’，Ｎ’－ジメチルアミノエタン）カルバモイル）コレステロール（Gao、など.，Biochem. Biophys. Res. Comm. 179：280-285（1991）を参照のこと）；DDAB，Ｎ，Ｎ－ジステアリル－Ｎ，Ｎ－ジメチルアンモニウムブロミド；DMRIE，Ｎ－（１，２－ジミリスチルオキシプロプ－３－イル）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ－ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド；DODAC，Ｎ，Ｎ－ジオレイル－Ｎ，Ｎ－ジメチルアンモニウムクロリド；DOGS、ジヘパテデシルアミドグリシルスペルミジン；DOPE，１，２－sn－ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン；DOSPA，Ｎ－（１－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル）－Ｎ－（２－（スペルミンカルボキサミド）エチル）－Ｎ，Ｎ－ジメチルアンモニウムトリフルオロアセテート；DOTAP，Ｎ－（１－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド；DOTMA，Ｎ－（１－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド；EPC、卵ホスファチジルコリン；ESM、卵スフィンゴミエリン；RT、室温；TBE、トリス－ボレート－EDTA（トリス－ボレート中89mM及びEDTA中２mM）；HEPES，４－（２－ヒドロキシエチル）－１－ピペラジンエタンスルホン酸；HBS，HEPES緩衝溶液（150mMのNaCl及び20mMのHEPES）；PEG－Cer－C_{20}，１－Ｏ－（２’－（ω－メトキシポリエチレングリコール）スクシノイル）－２－Ｎ－アラキドイル－スフィンゴシン；PEG－Cer－C_{14}，１－Ｏ－（２’－（ω－メトキシポリエチレングリコール）シクシノイル）－２－Ｎ－ミリストイル－スフィンゴシン；PBS、リン酸緩衝溶液；EGTA、エチレンビス（オキシエチレンニトリロ）－四酢酸；OGP，ｎ－オクチルβ－Ｄ－グリコピラノシド（Sigma Chemical Co.，St. Louis，MO）；POPC、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（Northern Lipids，Vancouver，BC）；QELS、準弾性（quasielastic）光散乱；TBE，２mMのEDTA中89mMのトリス－ボレート；及びEDTA、エチレンジアミン四酢酸（Fisher Scientific，Fair Lawn，NJ）。

用語“アシル”とは、ヒドロキシル基の除去により有機酸から生成される基を意味する。アシル基の例は、アセチル、ペンタノイル、パルミトイル、ステアロイル、ミリストイル、カプロイル及びエレオイルを包含する。

本明細書において使用される場合、“医薬的に許容できるアニオン”とは、医薬製剤において非素性塩を提供する有機及び無機酸のアニオンを意味する。そのようなアニオンの例は、クロリド、ブロミド、スルフェート、ホスフェート、アセテート、ベンゾエート、シトレート、グルタメート及びラクテートを包含する。医薬的に許容できる塩の調製は、Bergeなど.，J. Pharm. Sci. 66：1-19（1977）（引用により本明細書に組込まれる）に記載される。

用語“脂質”とは、脂質材料の疎水性部分が二重層の方に向き、そして疎水性部分が水性相の方に向くよう二重層を形成することができるいづれかの脂肪酸誘導体を意味する。両親媒性脂質は、主要な脂質小胞構造要素として必要である。親水性特徴は、ホスホト、カ

ルボキシル、スルファト、アミノ、スルフヒドリル、ニトロ、及び他の同様の基に由来する。疎水性は、長い鎖の飽和及び不飽和脂肪炭化水素基、及び１又は複数の芳香族、脂環式、又は複素環式基により置換されるそのような基（但し、それらだけには限定されない）を包含する基の包含により付与される。好ましい脂質はホスホグリセリド及びスフィンゴ脂質であり、それらの代表的な例として、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸、パルミトイルオレオイル　ホスファチジルコリン、リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイル　ホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルコリン、ジステアロイル　ホスファチジルコリン、又はジリノレオイルホスファチジルコリンが使用され得る。リンを欠いている他の化合物、たとえばスフィンゴ脂質及びグリコスフィンゴ脂質ファミリーもまた、脂質として命名されるグループ内にある。さらに、上記で記載された両親媒性脂質は、他の脂質、たとえばトリグリセリド及びびステロールと共に混合され得る。

用語“中性”とは、荷電されていない形、又は中性両性イオン形で存在する多くの脂質種のいづれかを言及する。そのような脂質は、たとえばジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、セラミド、スフィンゴマイエリン、セファリン及びセレブロシドを包含する。

用語“非イオン性脂質”とは、上記のようないづれかの中性脂質及びアニオン性脂質を意味する。アニオン性脂質の例は、カルジオリピン、ジアシルホスファチジルセリン及びジアシルホスファチジン酸を包含する。

用語“カチオン性脂質”とは、生理的なpHで正味の陽性電荷を担持する多くの脂質種のいづれかを意味する。そのような脂質は、DODAC，DOTMA，DDAB，DOTAP，DC－Chol及びDMRIEを包含するが、但しそれらだけには限定されない。さらに、多くの市販のカチオン性脂質の調製物が入手でき、そして本発明において使用され得る。それらは、たとえば、LIPOFECTIN▲Ｒ▼（GIBCO／BRL，Grand Island，New York，USA）からの、DOTMA及びDOPEを含んで成る市販のカチオン性リポソーム）；LIPOFECTAMINE▲Ｒ▼（GIBCO／BRLからのDOSPA及びDOPEを含んで成る市販のカチオン性リポソーム）；及びTRANSFECTAM▲Ｒ▼（Promega Corp.，Madison，Wisconsin，USAからの、DOGSを含んで成る市販のカチオン性脂質）を包含する。

用語“核酸”とは、一本鎖又は二本鎖形でのデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドポリマーを意味する。特にことわらない限り、用語核酸は、遺伝子、DNA，cDNA，RNA及びmRNAと交換可能的に使用される。その用語は特に、リボザイム；核酸クローニング及び／又は発現ベクター、たとえばプラスミド；遺伝子操作されたウィルスゲノム；発現カセット、及び哺乳類（特にヒト）源からの染色体を包含する。

用語“遺伝子移送”、“トランスフェクション”及び“形質転換”とは、本明細書において交換可能的に使用され、そして細胞中へのポリアニオン性材料、特に核酸の導入を意味する。用語“リポフェクション”とは、脂質－基材の複合体を用いてのそのような材料の導入を意味する。ポリアニオン性材料は、細胞中への侵入の後、遺伝子発現を促進するために発現ベクターに連結されるDNA又はRNAの形で存在することができる。従って、本発明において使用されるポリアニオン性材料は、構造タンパク質、受容体及びホルモン、並びに転写及び翻訳調節要素（すなわち、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター及びシグナル配列）及びベクターのためのコード配列を有するDNAを包含することを意味する。発現ベクター中に特定の核酸を組込む方法は、当業者に良く知られており、そしてたとえば、Sambrookなど.，Molecular Cloning：A Laboratory Manual（2nd ed.），Vols. 1-3，Cold Spring Harbor Laboratory，(1989）又はCurrent Protocols in Molecular Biology，F. Ausubelなど.，ed. Greene Publishing and Wiley-Interscience，New York（1987）（両者とも、引用により本明細書に組込まれる）に詳細に記載される。

“発現ベクター”、“クローニングベクター”又は“ベクター”は、選択された宿主細胞において複製できる核酸分子（たとえばプラスミド）である。発現ベクターは自主的に複製することができ、又はそれらは、当業界において良く知られている方法により、宿主細

胞のゲノム中に挿入されることによって複製することができる。自律複製するベクターは、選択された宿主細胞において機能する複製又は自律複製配列（ARS）の起点を有するであろう。しばしば、ベクターは、１つよりも多くの宿主細胞において、たとえばクローニング及び構成のためにＥ．コリにおいて、及び発現のための哺乳類細胞において有用であることが所望される。

DNA及びDNA複合体に適用されるような用語“疎水性”とは、水溶液においてよりも有機溶媒において実質的により可溶性である複合体を意味する。より具体的には、疎水性DNA及びDNA複合体は、有機溶媒、たとえばクロロホルム／メタノール混合物において少なくとも50％溶解でき、そして好ましくは、そのような有機溶媒において90％以上、溶解できる複合体である。

II．一般情報

リポソームの使用を包含する遺伝子移送技法は、当業界においてこれまで記載されている（アメリカ特許第5,049,386号；第4,946,787号及び第4,897,355号）。一般的なリポフェクションプロトコールはまた、次の文献にも記載される：Behrなど．（1989）Proc. Natl. Acad. Sci.（U.S.A.）86：6982；Demeneixなど．（1991）Int. J. Dev. Biol. 35：481；Loefflerなど．（1990）J. Neurochem. 54；1812；Bennettなど．（1992）Mol. Pharmacol. 41：1023；Bertlingなど．（1991）Biotechnol. Appl. Biochem. 13：390；Felgnerなど．（1987）Proc. Natl. Acad. Sci.（U.S.A.）84：7413；Felgner and Ringold（1989）Nature 337：387；Gareisなど．（1991）Cell. Mol. Biol. 37：191；Jarnaginなど．（1992）Nucleic Acids Res. 20：4205；Jiaoなど．（1992）Exp. Neurol. 115：400；Limなど．（1991）Circulation 83：2007；Maloneなど．（1989）Proc. Natl. Acad. Sci.（U.S.A.）86：6077；Powellなど．（1992）Eur. J. Vasc. Surg. 6：130；Strauss and Jaenisch（1992）EMBO J. 11：417；及びLeventis and Silvius（1990）Biochim. Biophys. Acta 1023：124。リポフェクション試薬は市販されている（たとえば、“トランスフェクタン”及び“リポフェクチン”）。核酸の効果的なリポフェクチンのために適切であるカチオン性及び中性脂質は、Felgnerの脂質を包含する（WO91/17424；WO91/16024）。さらに、中性及びカチオン性脂質の組合せは、動物細胞のリポフェクションでひじょうに効果的であることが示されており、そして種々の細胞系において広範囲の有効性を示した（Roseなど．（1991）Bio Techniques 10：520。上記のリポフェクションプロトコールは、本発明への使用のために適合され得、そして従って、前述の文献はそれらの全体を組込まれる。

III．発明の態様

Ａ．脂質－核酸粒子、及びその性質

１つの観点において、本発明は、カチオン性脂質及び核酸から実質的に成る新規の脂質－核酸複合体を供給する。

１．脂質成分

種々の適切なカチオン性脂質が、単独で又は１又は複数の他のカチオン性脂質種又は中性脂質種と組み合せて、本発明において使用され得る。

本発明において有用なカチオン性脂質は、生理学的pHで正味の正の電荷を担持する次の多くの脂質種のいづれかであり得る：DODAC，DOTMA，DDAB，DOTAP，DOSPA，DOGS，DC－Chol及びDMRIE、又はそれらの組合せ。本発明においてまた有用である多くのそれらの脂質及び関連する類似体は、同時係属出願USSN 08/316,399号；アメリカ特許第5,208,036号；第5,264,618号；第5,279,833号及び第5,283,185号に記載されており、それらの開示は引用により本明細書に組込まれる。さらに、多くの市販のカチオン性脂質調製物が入手でき、そして本発明において使用され得る。それらは、たとえばLIPOFECTIN▲R▼（GIBCO／BRL，Grand Island，New York，USA）からの、DOTMA及びDOPEを含んで成る市販のカチオン性リポソーム）；LIPOFECTAMINE▲R▼（GIBCO／BRLからのDOSPA及びDOPEを含んで成る市販のカチオン性リポソーム）；及びTRANSFECTAM▲R▼（Promega Corp.，Madison，Wisconsin，USAからの、DOGSを含んで成る市販のカチオン性脂質）を包含する。

本発明において使用される非カチオン性脂質は、安定した複合体を生成することができる、種々の中性の荷電されていない両性イオン又はアニオン性脂質のいづれかであり得る。

それらは好ましくは中性であり、但し、それらは他方では、正に又は負に荷電され得る。本発明において有用な非カチオン性脂質の例は次のものを包含する：リン脂質関連の材料、たとえばレシチン、ホスファチジルエタノールアミン、リソレシチン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリン、セファリン、カルジオリピン、ホスファチジン酸、セレブロシド、ジセチルホスフェート、ジオレオイルホスファチジルコリン（DOPC）、ジパルミトイル－ホスファチジルコリン（DPPC）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（DOPG）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（DPPG）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（DOPE）、パルミトイルオレオイル－ホスファチジルコリン（POPC）、パルミトイルオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（POPE）及びジオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン－４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシレート（DOPE－mal）。追加の非リン酸含有脂質は、たとえばステアリルアミン、ドデシルアミン、ヘキサデシルアミン、アセチルパルミテート、グリセロールリシノレート、ヘキサデシルステアレート、イソプロピルミリステート、両性アクリル酸ポリマー、トリエタノールアミン－ラウリルスルフェート、アルキル－アリールスルフェートポリエチルオキシル化脂肪酸アミド、ジオクタデシルジメチルアンモニウムブロミド及び同様のもの、ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、セラミド、スフィンゴミエリン、セファリン、及びセレブロシドである。他の脂質、たとえばリゾホスファチジルコリン及びリゾホスファチジルエタノールアミンが存在することができる。非カチオン性脂質はまた、同時係属出願USSN 08/316,429号（引用により本明細書に組込まれる）に記載されるように、ポリエチレングリコール基材のポリマー、たとえばPEG 2000, PEG 5000及びリン脂質又はセラミドに連結されるポリエチレングリコールを包含する。好ましい態様において、非カチオン性脂質は、ジアシルホスファチジルコリン（たとえばジオレオイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン及びジリノレオイルホスファチジルコリン）、ジアシルホスファチジルエタノールアミン（たとえば、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン及びパルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン）、セラミド又はスフィンゴミエリンである。それらの脂質中のアシル基は、好ましくは、C_{10}－C_{24}の炭素鎖を有する脂肪酸に由来するアシル基である。より好ましくは、アシル基は、ラウロイル、ミリストイル、パルミトイル、ステアロイル又はオレオイルである。特に好ましい態様において、非カチオン性脂質は、１，２－sn－ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン又は卵スフィンゴミエリン（ESM）であろう。

２．核酸成分

本発明はプラスミドの使用に関して例において記載されるけれども、当業者は、本明細書に記載される方法は他の大きな核酸又はオリゴヌクレオチドに同等に適用できることを理解するであろう。

本発明において有用である核酸（たとえば複合体及び粒子の両者）は、典型的には、10～100,000個のヌクレオチド残基を有するヌクレオチドポリマーである。典型的には、核酸は、細胞タンパク質の発現を修復し、又は増強するために対象に対して投与される。さらに、核酸は、相補的核酸の存在又は不在に関する臨床診断を提供するためにラベル（たとえば、放射性ラベル、螢光ラベル又は比色ラベル）を担持することができる。従って、核酸又はヌクレオチドポリマーは、核酸、たとえばゲノムDNA, cDNA, mRNA又はオリゴヌクレオチド含有核酸類似体、たとえばSteinなど, Science 261：1004-1011（1993）及びアメリカ特許第5,264,423号及び第5,276,019号（これらの開示は引用により本明細書に組込まれる）に記載されるアンチセンス誘導体のポリマーであり得る。さらに、核酸は、転写及び翻訳調節配列、たとえばプロモーター配列及びエンハンサー配列をコードすることができる。

ヌクレオチドポリマーは、一本鎖DNAもしくはRNA、又は二本鎖DNAもしくはDNA－RNAハイブリッドであり得る。二本鎖DNAの例は、構造遺伝子、制御及び終結領域を含む遺伝子、並びに自己複製系、たとえばプラスミドDNAを包含する。

一本鎖核酸は、アンチセンスオリゴヌクレオチド（DNA及びRNAに対して相補的である）、リボザイム及び三重体形成性オリゴヌクレオチドを包含する。安定性を高めるためには、いくつかの一本鎖核酸は好ましくは、適切な非ホスホジエステル結合、たとえばホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレネート又はＯ－アルキルホスホトリエステル結合により置換されたいくつかの又はすべてのヌクレオチド結合を有することができる。

本発明において使用される核酸はまた、変性が１もしくは複数の糖成分、及び／又は１もしくは複数のピリミジンもしくはプリン塩基において行なわれているそれらの核酸である。糖変性の例は、ハロゲン、アルキル基、アミン、アシド基、又はエーテル又はエステルとして官能価された基による１又は複数のヒドロキシル基の置換を包含する。さらに、完全な糖が、立体的且つ電子的に類似する構造体、たとえばアザー糖及び炭素環式糖類似体により置換され得る。プリン又はピリミジン塩基成分の変性は、たとえばアルキル化されたプリン及びピリミジン、アシル化されたプリン又はピリミジン、又は当業者に知られている他の複素環式置換基を包含する。

複数の遺伝子配列もまた、本発明の方法において使用され得る。従って、異なったタンパク質についての配列が、１つの鎖又はプラスミド上に位置することができる。非コード配列もまた、それらが適切な発現を達成するために必要である程度に存在することができる。

本発明の方法において使用される核酸は、天然源から単離され、ATCC又はGenBankライブラリーのような源から得られ、又は合成法により調製され得る。合成核酸は、種々の溶液又は固相法により調製され得る。一般的には、固相合成が好ましい。ホスフィットートリエステル、ホスホトリエステル、及びＨ－ホスホネート化学による核酸の固相合成についての方法の詳細な説明は広く入手できる。たとえば次のものを参照のこと：Itakura、アメリカ特許第4,401,796号；Caruthersなど.,アメリカ特許第4,458,066号及び第4,500,707号；Beaucage, など., Tetrahedron Lett., 22：1859-1862（1981）；Matteucci,など., J. Am. Chem. Soc., 103：3185-3191（1981）；Caruthers, など., Genetic Engineering, 4：1-17（1982）；Iones, chapter 2, Atkinson, など., chapter 3, 及びSproat, など., chapter 4, in Oligonucleotide Synthesis：A Pracrical Approach, Gait（ed.）, IRL Press, Washington D. C.（1984）；Froehler, など., Tetrahedron Lett., 27：469-472（1986）；Froehler, など., Nucleic Acids Res., 14：5399-5407（1986）；Sinha, など., Tetrahedron Lett., 24：5843-5846（1983）；及びSinha,など., Nucl. Acids Res., 12：4539-4557（1984）（それらは引用により本明細書に組込まれる）。

ａ．細胞における遺伝子の導入及び発現のためのベクター

本発明の重要な観点は、インビトロ及びインビボで細胞中に選択された遺伝子を導入し、続いて宿主細胞においてその選択された遺伝子を発現するためへの本明細書に提供される脂質－核酸粒子の使用である。従って、粒子における核酸は、宿主細胞において発現され得るベクターを特別に包含する。プロモーター、エンハンサー、ストレス又は化学的－調節されたプロモーター、抗生物質感受性又は栄養物感受性領域、及び治療タンパク質をコードする配列が、必要に応じ包含され得る。

手短に要約すれば、天然又は合成核酸の発現は典型的には、対象の核酸をプロモーター（構成的であるか又は誘導的のいづれかである）に作用可能に連結し、前記構造体を発現ベクター中に組込み、そして前記ベクターを適切な宿主細胞中に導入することによって達成される。典型的なベクターは、転写及び翻訳ターミネーター、転写及び翻訳開始配列、及び特定の核酸の発現の調節のために有用なプロモーターを含む。ベクターは場合によっては、少なくとも１つの独立したターミネーター配列を含む遺伝子発現カセット、真核生物又は原核生物、又は両者において前記カセットの発現を可能にする配列（たとえばシャトルベクター）及び原核及び真核システムの両者のための選択マーカーを含んで成る。ベクターは、原核生物、真核生物又は好ましくは両者においての複製及び組込みのために適切である。たとえば、次の文献を参照のこと：Giliman and Smith（1979）, Gene, 8：81-97；Robertsなど.（1987）, Nature, 328：731-734；Berger and Kimmel, Guide to Molec

ular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, volume 152, Academic Press, Inc., San Diego, CA（Berger）；Sambrookなど.（1989）, MOLECULAR CLONING-A LABORATORY MANUAL（2nd ed.）Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, N. Y.,（Sambrook）；and F. M. Ausubelなど., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc.,（1994 Supplement）（Ausubel）。生物学的試薬及び実験装置の製造業者からの製品情報はまた、既知の生物学的方法に有用な情報を提供する。そのような製造業者は次のものを包含する：SIGMA Chemical Compony（Stait Louis, MO）, R & D Systems（Minneapolis, MN）, Pharmacia LKB Biotechnology（Piscataway, NJ）, CLONTECH Laboratories, Inc.（Palo Alto, CA）, Chem Genes Corp., Aldrich Chemical Company（Milwaukee, WI）, Glen Research, Inc., GIBCO BRL Life Technologies, Inc.（Gaithersberg, MD）, Fluka Chemica-Biochemika Analytika（Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland）、及びApplied Biosystems（Foster Cily, CA）、並びに、当業者に知られている多くの他の市販源。

外来性核酸が操作可能的に連結されるベクターが、それらの核酸を宿主細胞中に導入し、そしてそれらの複製及び／又は発現を仲介するために使用され得る。“クリーニングベクター”は、外来性核酸を複製し、そして増幅し、そして特定の外来性核酸－含有ベクターのクローンを得るために有用である。“発現ベクター”は、外来性核酸の発現を仲介する。いくつかのベクターは、クリーニング及び発現ベクターである。

一般的に、細胞中に外来性遺伝子を輸送するために使用される特定のベクターは特に臨界的ではない。選択された宿主細胞における発現のために使用される従来のベクターのいづれでも使用され得る。

発現ベクターは典型的には、真核細胞中での外来性遺伝子の発現のために必要とされる要素のすべてを含む真核転写単位又は“発現カセット”を含んで成る。典型的な発現カセットは、所望のタンパク質、及び転写体の効果的なポリアデニル化のために必要とされるシグナルをコードするDNA配列に作用可能に結合されるプロモーターを含む。

真核プロモーターは典型的には、２種のタイプの認識配列、すなわちTATAボックス及び上流のプロモーター要素を含む。転写開始部位の25～30塩基対上流に位置するTATAボックスは、RNA合成を開始するためにRNAポリメラーゼを方向付けることに関与していると思われる。他の上流のプロモーター要素は、転写が開始される速度を決定する。

エンハンサー要素は、連結された相同又は非相同プロモーターからの1,000倍までの転写を刺激することができる。エンハンサーは、転写開始部位から下流又は上流に配置される場合、活性である。ウィルスに由来する多くのエンハンサー要素は、広い宿主範囲を有し、そして種々の組織において活性である。たとえば、SV40初期遺伝子エンハンサーは、多くの細胞タイプのために適切である。本発明のために適切な他のエンハンサー／プロモーターの組合せは、ポリオーマウィルス、ヒト又はネズミサイトメガロウィルスに由来するもの、すなわちレトロウィルス、たとえばネズミ白血病ウィルス、ネズミ又はラウス肉腫ウィルス及びHIVからの長期反復体を包含する。Enhancers and Eukaryotic Expression, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. 1983（引用により本明細書に組込まれる）を参照のこと。

プロモーター配列の他に、発現カセットはまた、効果的な終結を提供するために構造遺伝子の下流に転写終結領域も含むべきである。その終結領域は、プロモーター配列と同じ源から得られ、又は異なった源から得られる。

選択された構造遺伝子によりコードされるmRNAが効果的に翻訳される予定である場合、ポリアデニル化配列もまた、通常、ベクター構造体に付加される。２種の明確な配列要素、すなわち、ポリアデニル化部位から下流に位置する、GU又はUに富む配列及び11～30個のヌクレオチド上流に位置する６個のヌクレオチドAAUAAAの高く保存された配列が、正確且つ効果的なポリアデニル化のために必要とされる。本発明のために適切である終結及びポリアデニル化シグナルは、SV40に由来するシグナル、又は発現ベクター上にすでに存在する遺伝子の部分的ゲノムコピーを包含する。

すでに記載された要素の他に、本発明の発現ベクターは典型的には、クローン化された核酸の発現レベルを高め、又はトランスダクトされたDNAを担持する細胞の同定を促進するよう意図された他の特別な要素を含むことができる。たとえば、多くの動物ウィルスは、許容できる細胞型におけるウィルスゲノムの染色体外複製を促進するDNA配列を含む。それらのウィルスレプリコンを担持するプラスミドは、適切な因子が、プラスミド上に担持されるか又は宿主細胞ゲノムを有する遺伝子により供給される限りエピソーム的に複製される。

本発明の発現ベクターは典型的には、細菌におけるベクターのクローニングを促進する原核配列、及び真核細胞、たとえば哺乳類細胞においてのみ発現される１又は複数の真核転写単位の両者を含むであろう。原核配列は好ましくは、それらが真核細胞におけるDNAの複製を妨害しないよう選択される。

選択された遺伝子は、DNA配列がベクター中に機能的に挿入される場合に通常、発現される。“機能的に挿入される”とは、それが適切なリーディングフレーム及び配向で挿入され、そして適切な調節要素に作用可能に連結されることを意味する。典型的には、遺伝子はプロモーターから下流に挿入され、そして停止コドンが続き、但し、所望により、ハイブリッドタンパク質としての生成及びそれに続く開裂が使用され得る。

真核ウィルス、たとえばレトロウィルスからの調節要素を含む発現ベクターが典型的には使用される。SV40ベクターは、pSVT７及びpMT２を包含する。ウシ乳頭腫ウィルスに由来するベクターはpBV－１MTHAを包含し、そしてエプスタイン－バールウィルスに由来するベクターは、pHEBO及びp205を包含する。他の典型的なベクターは、pMSG，pAV009／A^+，pMTO10／A^+，pMAMneo－５、バキュロウィルスpDSVE、及びSV－40初期プロモーター、SV－40後期プロモーター、メタロチオネインプロモーター、ネズミ乳頭腫ウィルスプロモーター、ラウス肉腫ウィルスプロモーター、ポリヒドリンプロモーター又は真核細胞における発現のために効果的であることが示された他のプロモーターの指図下でタンパク質の発現を可能にするいづれか他のベクターを包含する。

種々のベクターが使用され得るが、ウィルスベクター、たとえばレトロウィルスベクターが、そのレトロウィルスベクターが標的細胞をトラスフェクトし、そして標的細胞ゲノム中に組込む高い効率のために、真核細胞を変性するために有用であることが注目されるべきである。さらに、レトロウィルスベクターを有するレトロウィルスは、広範囲の種類の組織から細胞を感染することができる。

上記レトロウィルスベクターの他に、細胞は、アデノ－関連ウィルスベクターによりリポフェクトされ得る。たとえば、Methods in Enzymology，Vol. 185，Academic Press，Inc.，San Diego，CA（D. V. Goeddel，ed.）（1990）又はM. Krieger（1990），Gene Transfer and Expression-A Laboratory Manual，Stockton Press，New York，NYを参照のこと。アデノ関連ウィルス（AAV）は、生産的な感染を達成するために、ヘルパーウィルス、たとえばアデノウィルス又はヘルペスウィルスを必要とする。ヘルパーウィルス機能の不在下で、AAVは宿主細胞のゲノム中に組込まれるが（部位特異的に）、しかしその組込まれたAAVゲノムは病原性効果を有さない。この組込み段階は、宿主が適切な環境条件（たとえば、溶解性ヘルパーウィルス）に暴露されるまで（これに基づいて、それは溶解性生活環に再侵入する）、遺伝的に損なわれていないAAVゲノムの維持を可能にする。Samulski（1993），Current Opinion in Genetic and Development，3：74-80及びそこに引用される文献は、AAV生活環の全体像を提供する。また、AAVベクターの全体像のためには、次の文献も参照のこと：Westなど.（1987），Virology，160：38-47；Carterなど（1989）、アメリカ特許第4,797,368号、Carterなど.（1993），WO93/24641；Kotin（1994），Human Gene Therapy，5：793-801；Muzyczka（1994），J. Clin. Invest.，94：1351 and Samulski、前記。

組換えワクシニアを生成するよう企画されたプラスミド、たとえばpGS62（Lang ford，C. L. など.（1986），Mol. Cell. Biol.，6：3191-3199）がまた使用され得る。このプラスミドは、外来性核酸の挿入のためのクローニング部位、挿入された核酸の合成を指図するためのワクシニアのP7.5プロモーター、及び外来性核酸の両端に接するワクシニアTK

遺伝子から成る。
どのベクターが使用されても、一般的にベクターは、対象の遺伝子を発現形で含むよう遺伝子的に構築される。選択される特定の遺伝子は、その意図される処理に依存するであろう。そのような対象の遺伝子の例は下記セクションＤ．３．“遺伝子の機能的コピーの挿入”に及びこの明細書を通して記載されている。
ベクターはさらに通常、核酸増幅をもたらす選択マーカー、たとえばナトリウムカリウムATPアーゼ、チミジンキナーゼ、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ、ヒグロマイシンＢホスホトランスフェラーゼ、キサンチン－グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ、CAD（カルバミルリン酸シンターゼ、アスパラギン酸トランスカルバミラーゼ及びジヒドロオロターゼ）、アデノシンデアミナーゼ、ジヒドロフォレートレダクターゼ及びアスパラギンシンターゼ、及びウアバイン選択を含んで成る。他方、ポリヒドリンプロモーター又は他の強いバキュロウィルスプロモーターの指図下でのコード配列と共に、昆虫細胞におけるバキュロウィルスベクターを用いるが、核酸増幅を包含しない高収率発現システムもまた適切である。
プラスミド以外の核酸が使用される場合、その核酸は、核酸類似体、たとえばStein、など., Science 261：1004－1011（1993）及びアメリカ特許第5,264,423号及び第5,276,019号（これらの開示引用により本明細書に組込まれる）により記載されるアンチセンス誘導体を含むことができる。
Ｂ．粒子の製造方法
１つの態様において、本発明は、新規の疎水性核酸－脂質中間複合体を通して生成される脂質－核酸粒子を提供する。その複合体は好ましくは、電荷－中和される。界面活性剤基材又は有機溶媒基材のシステムにおけるそれらの複合体の操作は、核酸が保護される粒子形成を導びくことができる。
脂質－核酸配合物は、予備形成されたカチオン性リポソームと核酸とを組合すことによって形成され得る（アメリカ特許第4,897,355号、第5,264,618号、第5,279,833号及び第5,283,185号を参照のこと）。そのような方法においては、核酸がリポソームのカチオン性表面電荷に引きよせられ、そして得られる複合体はリポソーム－被覆された“サンドイッチ型”のものであると思われる。結果として、核酸又はプラスミドの一部は、血清に暴露されたまま存続し、そして酵素、たとえばDNアーゼＩにより分解され得る。他は、形成の間、リポソームの内部に核酸又はプラスミドを導入することを試みた。それらの方法は典型的には、カチオン性脂質－核酸複合体の溶液における凝集をもたらす（図２を参照のこと）。予備形成されたリポソーム中へのプラスミドの受動的な負荷はまた、十分にはわかっていない。最終的に、形成されたリポソーム－プラスミド複合体は典型的には、200～400nmのサイズであり、そして従って、より小さなサイズの複合体又は粒子よりも一層急速に循環からクリアランスされる。
本発明は、プラスミドが脂質二重層に封入され、そして分解から保護されている血清－安定性プラスミド－脂質粒子を調製するための方法を提供する。さらに、本発明において形成される粒子は好ましくは、生理学的pHで、中性であり、又は負に荷電される。インビボ適用のためには、中性粒子が好都合であり、そしてインビトロ適用のためには、粒子はより好ましくは負に荷電される。これは、核酸がカチオン性脂質に封入され得る正に荷電されたリポソーム配合物よりも減じられた凝集のさらなる利点を提供する。
本発明の方法により製造される粒子は約50～約150nmのサイズを有し、そして大部分の粒子は約65～85nmである。前記粒子は、界面活性剤透析法、又は成分の混合の間、単相を提供するために有機溶媒を用いる逆相法の変法により形成され得る。いづれか特定の形成機構により結合されることを意図するものではないが、図３は、プラスミド－脂質粒子の形成への界面活性剤透析アプローチを示す。図３に関しては、プラスミド又は他の大きな核酸が、被覆されたプラスミド複合体を形成するためにカチオン性脂質の界面活性剤溶液と接触せしめられる。それらの被覆されたプラスミドは凝集し、そして沈殿することができる。しかしながら、界面活性剤の存在は、この凝集を減じ、そしてプラスミドが脂質二重層に封入されている粒子を形成するために、被覆されたプラスミドと過剰の脂質（特に、

非カチオン性脂質）との反応を可能にする。上記のように、それらの粒子は、その粒子の脂質二重層により封入される水性媒体がほとんど、又はまったく存在しないことにおいて、及びサイズ的に、従来のリポソーム（典型的には200～400nmである）とは異なる。有機溶媒を用いてのプラスミド－脂質粒子の形成について下記に記載される方法は、類似するスケムを有する。

いくつかの態様において、粒子は界面活性剤透析を用いて形成される。従って、本発明は、血清－安定性プラスミド－脂質粒子の調製方法を提供し、ここで前記方法は、

（ａ）被覆されたプラスミド－脂質複合体を形成するために、界面活性剤溶液中でプラスミドとカチオン性脂質とを組合せ；

（ｂ）プラスミド－脂質複合体及び非カチオン性脂質を含んで成る界面活性剤溶液を形成するために、前記被覆されたプラスミド－脂質複合体と非カチオン性脂質とを接触せしめ；そして

（ｃ）血清安定性プラスミド－脂質粒子の溶液を供給するために、段階（ｂ）の界面活性剤溶液を透析することを含んで成り、ここで前記プラスミドが脂質二重層に封入され、そして前記粒子が血清安定性であり、そして約50～約150nmのサイズを有することを特徴とする。

被覆されたプラスミド－脂質複合体の初期溶液は、界面活性剤中でプラスミドとカチオン性脂質とを組み合わすことによって形成される。

それらの態様においては、前記界面活性剤溶液は好ましくは、15～300nM、より好ましくは20～50mMの臨界ミセル濃度を有する中性界面活性剤の水溶液である。適切な界面活性剤の例は、たとえば次のものを包含する：Ｎ，Ｎ’－（（オクタノイルイミノ）－ビス－（トリメチレン））－ビス－（Ｄ－グルコンアミド）（BIGCHAP）；BRIJ35；Deoxy－BIGCHAP；ドデシルポリ（エチレングリコール）エーテル；Tween 20；Tween40；Tween 60；Tween 80；Tween 85；Mega8；Mega9；Zwittergent▲Ｒ▼3－08；Zwittergent▲Ｒ▼3－10；Triton X－405；ヘキシル－、ヘプチル－、オクチル－、及びノニル－β－Ｄ－グルコピラノシド；及びヘプチルチオグルコピラノシド；そしてオクチルβ－Ｄ－グルコピラノシド及びTween－20が最とも好ましい。界面活性剤溶液における界面活性剤の濃度は、典型的には、約100mM～約２Ｍ、好ましくは約200mM～約1.5Mである。

カチオン性脂質及びプラスミドは典型的には、約１：１～約20：１の電荷比（＋／－）、好ましくは約１：１～約12：１の比で、そしてより好ましくは約２：１～約６：１の比での電荷比を生成するために組み合わされるであろう。さらに、溶液中のプラスミドの全体の濃度は典型的には、約25μｇ／ml～約１mg／ml、好ましくは約25μｇ／ml～約200μｇ／ml、及びより好ましくは約50μｇ／ml～約100μｇ／mlであろう。界面活性剤中のプラスミド及びカチオン性脂質の組合せは、典型的には、被覆された複合体が形成するのに十分な時間、室温で維持される。他方、プラスミド及びカチオン性脂質は、界面活性剤溶液中で組合され、そして約37℃までの温度に暖められ得る。特に温度に対して感受性であるプラスミドに関しては、被覆された複合体が、典型的には、約４℃以下の低温で形成され得る。

次に、被覆されたプラスミド－脂質複合体の界面活性剤溶液が、非カチオン性脂質と接触せしめられ、プラスミド－脂質複合体及び非カチオン性脂質の界面活性剤溶液が供給される。この段階において有用である非カチオン性脂質は、ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、セラミド、スフィンゴミエリン、セファリン、カルジオリピン、及びセレブロシドを包含する。好ましい態様においては、非カチオン性脂質は、ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、セラミド又はスフィンゴミエリンである。それらの脂質におけるアシル基は好ましくは、C_{10}－C_{24}炭素鎖を有する脂肪酸に由来するアシル基である。より好ましくは、アシル基は、ラウロイル、ミリストイル、パルミトイル、ステアロイル、又はオレオイルである。特に好ましい態様において、非カチオン性脂質は、１，２－sn－ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（DOPE）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（POPC）又は卵ホスファチジルコリン（EPC）であろう。最とも好ましい態様において、プラスミ

ド－脂質粒子は、インビボで増強された性質を有するフソゲン性（fusogenic）粒子であり、そして非カチオン性脂質はDOPEであろう。他の好ましい態様においては、非カチオン性脂質は、ポリエチレングリコール基材のポリマー、たとえば同時係属出願USSN 08/316,429（引用により本明細書に組込まれる）に記載されるような、セラミドに接合される、PEG 2000，PEG 5000及びポリエチレングリコールをさらに含んで成る。

本発明において使用される非カチオン性脂質の量は典型的には、プラスミド50μｇに対して合計脂質約２～約20mgである。好ましくは、合計脂質の量は、プラスミド50μｇ当たり約５～約10mgである。

プラスミド－脂質複合体及び非カチオン性脂質の界面活性剤溶液の形成に続いて、界面活性剤は、好ましくは透析により除去される。界面活性剤の除去は、約50nm～約150nmのサイズを有する血清安定性プラスミド－脂質粒子を提供するプラスミドを取り囲む脂質二重層の形成をもたらす。このようにして形成された粒子は、凝集せず、そして任意には、均質な粒度を達成するためにサイズ分けされる。

血清－安定性プラスミド－脂質粒子は、リポソームを分離するために利用できるいづれかの方法により分類され得る。分類は、粒子サイズの所望するサイズ範囲及び比較的狭い分布を達成するために実施され得る。

いくつかの技法が、所望するサイズに粒子を分類するために利用できる。リポソームのために使用され、そして本発明の粒子に均等に適用できる１つのサイジング法は、アメリカ特許第4,737,323号（これは引用により本明細書に組込まれる）に記載される。槽又はプローブ音波処理による粒子懸濁液の音波処理は、約50nm以下のサイズの粒子への連続的なサイズ減少を生成する。均質化は、大きな粒子をより小さな粒子に断片化する剪断エネルギーに依存するもう１つの方法である。典型的な均質化法においては、粒子は、典型的には約60～80nmの選択された粒子サイズが観察されるまで、標準のエマルジョンホモジナイザーにより再循環される。両方法において、粒子サイズの分布は、従来のレーザー光粒子サイズ識別、又はQELSによりモニターされ得る。

小さな孔のポリカーボネート膜又は非対称セラミック膜を通しての粒子の押出しまた、比較的十分に定義されたサイズ分布に粒子サイズを減じるための効果的な方法でもある。典型的には、懸濁液が、所望する粒子サイズ分布が達成されるまで、１又はそれ以上の回数、前記膜を通して循環される。粒子は、サイズの徐々の減少を達成するために、連続的に小さな孔の膜を通して押出される。

もう１つのグループの態様においては、本発明は、血清安定性プラスミド－脂質粒子の調製方法を提供し、ここで前記方法は、

（ａ）有機溶媒中にカチオン性脂質及び非カチオン性脂質を含んで成る混合物を調製し；

（ｂ）透明な単層を提供するために、前記段階（ａ）の混合物と核酸の水溶液を接触せしめ；そして

（ｃ）プラスミド－脂質粒子の懸濁液を供給するために、前記有機溶媒を除去することを含んで成り、ここで前記プラスミドが脂質二重層に封入され、そして前記粒子が血清において安定し、そして約50～約150nmのサイズを有することを特徴とする。

このグループの態様において有用である、プラスミド（又は核酸）、カチオン性脂質及び非カチオン性脂質は、前記界面活性剤透析について記載される通りである。

有機溶媒の選択は、典型的には、溶媒極性の考慮、及び溶媒が粒子形成の後の段階で除去され得ることの容易性を包含するであろう。安定化剤としても使用される有機溶媒は、プラスミド及び脂質の透明な単相を供給するために十分な量で存在する。適切な溶媒は、クロロホルム、ジクロロメタン、ジエチルエーテル、シクロヘキサン、シクロペンタン、ベンゼン、トルエン、メタノール、又は他の脂肪族アルコール、たとえばプロパノール、イソプロパノール、ブタノール、tert－ブタノール、イソブタノール、ペンタノール及びヘキサノールを包含する。複数の溶媒の組合せもまた、本発明において使用され得る。

プラスミドと、カチオン性及び非カチオン性脂質の有機溶媒との接触は、典型的には水溶液であるプラスミドの第１溶液と脂質の第２有機溶液とを一緒に混合することによって達成される。当業者は、この混合が多くの方法のいづれかにより、たとえば機械手段により

、たとえば振盪ミキサーを用いることによって行なえることを理解するであろう。
プラスミドが脂質の有機溶液と接触せしめられた後、有機溶媒が除去され、従って、血清安定性のプラスミド－脂質粒子の水性懸濁液が形成される。有機溶媒を除去するために使用される方法は典型的には、減圧下での蒸発、又は混合物を通しての不活性ガス（たとえば、窒素又はアルゴン）流を吹きつけることを包含するであろう。
このようにして形成された血清安定性プラスミド－脂質粒子は典型的には、約50nm～150nmにサイジングされるであろう。粒子のサイズのさらなる減少又は均質性を達成するために、サイジングが上記のようにして行なわれ得る。
他の態様においては、前記方法は、本発明の組成物を用いて細胞の形質転換をもたらすために有用である非脂質性ポリカチオンを添加することをさらに含んで成る。適切な非脂質ポリカチオンの例は、ヘキサジメトリンブロミド（Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin, USAから商品名POLYBRENE▲R▼として売られている）、又はヘキキサジメトリンの他の塩を包含する。他の適切なポリカチオンは、たとえば、ポリ－Ｌ－オルニチン、ポリ－Ｌ－アルギニン、ポリ－Ｌ－リジン、ポリ－Ｄ－リジン、ポリアリルアミン及びポリエチレンイミンを包含する。
他の態様において、本発明のプラスミド－脂質粒子に使用されるポリオキシエチレン接合体は、接合グループ（すなわち、ホスファチジン酸又はホスファチジルエタノールアミン）と適切に官能価されたポリオキシエチレン誘導体とを組合すことによって調製され得る。たとえば、ホスファチジルエタノールアミン－ポリオキシエチレン接合体を供給するために、ホスファチジルエタノールアミンがポリオキシエチレンピス（ｐ－トルエンスルホネート）と共に組合され得る。Woodleなど、Biochim. Biophys. Acta 1105：193-200（1992）（引用により本明細書に組込まれる）を参照のこと。
ある態様においては、脂質－核酸複合体の形成は、単相システム（たとえばブライ－ダイアー単相、又は水性及び有機溶媒の類似する混合物）、又は適切な混合を伴っての二層システムのいづれかにおいて行なわれ得る。
複合体の形成が単相システムにおいて行なわれる場合、カチオン性脂質及び核酸が単相混合物の体積で個々に溶解される。２つの溶液の組合せは、複合体が形成する単一混合物を提供する。他方、複合体は、カチオン性脂質が核酸（水性相において存在する）に結合し、そして有機相にそれを引き寄せる２相混合物で形成することができる。
特定の形成理論により拘束されることを意図するものではないが、図１は、疎水性（有機物溶解性）脂質－核酸複合体の形成をもたらす、DNAへの一カチオン性脂質の結合のためのモデルを提供する。この図においては、カチオン性脂質がまずDNAに結合して、DNAが縮合されていない複合体を形成する。この複合体は、有機相又は単相において溶解でき、そしてDNAは縮合されないまま存続する。他の脂質の添加及び溶媒の除去、及び水和化に基づいて、複合体が粒子を形成する（下記により詳しく記載されている）。
もう１つの態様においては、本発明は脂質－核酸粒子の調製方法を提供し、ここで前記方法は、
（ａ）核酸－脂質混合物を形成するために、非カチオン性脂質及び界面活性剤を含んで成る溶液と核酸とを接触せしめ；
（ｂ）前記核酸の負の電荷の部分を中和し、そして核酸及び脂質の電荷中和された混合物を形成するために、前記核酸－脂質混合物とカチオン性脂質とを接触せしめ；そして
（ｃ）前記核酸が分解から保護されている脂質－核酸粒子を供給するために、前記電荷中和された混合物から界面活性剤を除去する；
ことを含んで成る。
例示の特定の観点により制限されるものではないが、図30は、界面活性剤透析を用いての粒子の１つの形成方法を提供する。この図においては、界面活性剤水溶液（OGP）中のDNAが、界面活性剤水溶液中の非カチオン性脂質（ESM）と共に組合され、そして約30分間のアニーリングを可能にする。界面活性剤中、カチオン性脂質（DODAC）の前もって音波処理された混合物を添加し、そしてその得られる混合物が３日間、透析され、界面活性剤が除去され、そしてそれにより、脂質－核酸粒子が形成される。そのような粒子の動力学的

形成のために、カチオン性脂質及び非カチオン性脂質の添加の順序が逆にされ、又は脂質が同時に添加され得ることを当業者は理解するであろう。さらに、多価カチオンにより核酸をそれが現在、アニオンを結合するように、被覆することは可能である。

１つのグループの態様においては、非カチオン性脂質及び界面活性剤の溶液は、水溶液である。核酸と非カチオン性脂質及び界面活性剤の溶液との接触は典型的には、核酸の第１溶液及び脂質及び界面活性剤の第２溶液を一緒に混合することによって達成される。当業者は、この混合が多くの方法のいづれか、たとえば機械的手段、たとえば振盪ミキサーを用いることにより生じることを、理解するであろう。好ましくは、核酸溶液はまた、界面活性剤溶液でもある。本発明の方法に使用される非カチオン性脂質の量は典型的には、使用されるカチオン性脂質の量に基づいて決定され、そして典型的には、カチオン性脂質の量の約0.2～５倍、好ましくは、使用されるカチオン性脂質の量の約0.5～２倍である。

このようにして形成された核酸－脂質混合物はカチオン性脂質と接触せしめられ、存在する核酸（又は他のポリアニオン性材料）に関連する負の電荷の一部が中和される。使用されるカチオン性脂質の量は典型的に、核酸の負の電荷の少なくとも50％を中和するのに十分な量であろう。好ましくは、負の電荷は少なくとも70％中和され、より好ましくは少なくとも90％中和される。本発明において有用であるカチオン性脂質は、たとえばDODAC，DOTMA，DDAB，DOTAP，DC－Chol及びDMRIEを包含する。それらの脂質及び関連する類似体は、同時継続出願第08/316,399号；アメリカ特許第5,208,036号、第5,264,618号、第5,279,833号及び第5,283,185号に記載されており、それらの開示は引用により本明細書に組込まれる。さらに、カチオン性脂質の多くの市販の調製物が入手され得、そして本発明において使用され得る。それらはたとえば次のものを包含する：LIPOFECTIN▲Ｒ▼（GIBCO／BRL，Grand Island，New York，USAから、DOTMA及びDOPEを含んで成るカチオン性リポソームとして市販されている）；LIPOFECTAMINE▲Ｒ▼（GIBCO／BRLから、DOSPA及びDOPEを含んで成るカチオン性リポソームとして市販されている）；及びTRANSFECTAM▲Ｒ▼（Promega Corp.，Madison，Wisconsin，USAから、エタノール中、DOGSを含んで成るカチオン性脂質として市販されている）。

カチオン性脂質と核酸－脂質混合物との接触は、多くの技法のいづれかにより、好ましくはカチオン性脂質の溶液、及び核酸－脂質混合物を含む溶液を一緒に混合することによって達成され得る。２種の溶液の混合（又はいづれか他の態様での接触）に基づいて、核酸に関連する負の電荷の一部が中和される。それにもかかわらず、核酸は縮合されない状態で存続し、そして疎水性特性を得る。

カチオン性脂質が核酸－脂質混合物と接触せしめられた後、界面活性剤（又は界面活性剤及び有機溶媒の組合せ）が除去され、従って、脂質－核酸粒子が形成される。界面活性剤を除去するために使用される方法は典型的には、透析を包含する。有機溶媒が存在する場合、除去は典型的には、減圧下での蒸発により又は混合物を通して不活性ガス（たとえば、窒素又はアルゴン）流を吹き込むことによって達成される。

このようにして形成された粒子は典型的には、約100nm～数ミクロンにサイズ分類されるであろう。粒子におけるさらなるサイズの減少又は均質性を達成するためには、脂質－核酸粒子は音波処理され、濾過され、又はリポソーム配合に使用され、そして当業者に知られている他のサイズ分け技法にゆだねられ得る。

他の態様においては、前記方法は、本発明の組成物を用いて細胞のリポフェクションに効果を与えるために有用である非脂質ポリカチオン物質を添加することをさらに含んで成る。適切な非脂質ポリカチオン物質の例は次のものである：ヘキサジメトリンブロミド（Aldrich Chemical Co.，Milwaukee，Wisconsin，USAから、商品名POLYBRENE▲Ｒ▼として市販されている）又はヘキサジメトリンの他の塩。他の適切なポリカチオン物質は次のものである：ポリ－Ｌ－オルニチン、ポリ－Ｌ－チルギニン、ポリ－Ｌ－リシン、ポリ－Ｄ－リシン、ポリアリルアミン及びポリエチレンイミン。それらの塩の添加は好ましくは、粒子が形成された後である。

もう１つの態様において、本発明は脂質－核酸粒子の調製方法を提供し、ここで前記方法は、

（ａ）溶液において核酸と多量のカチオン性脂質とを接触せしめ、ここで前記溶液が約15～35％の水及び約65～85％の有機溶媒から成り、そして前記カチオン性脂質の量が、約0.85～約2.0の＋／－電荷比を生成するのに十分であり、疎水性の電荷中和された脂質－核酸複合体を供給し；
（ｂ）脂質－核酸混合物を供給するために、溶液での前記疎水性の電荷中和された脂質－核酸複合体と非カチオン性脂質とを接触せしめ；そして
（ｃ）核酸が分解から保護されている脂質－核酸粒子を供給するために、前記脂質－核酸複合体から有機溶媒を除去することを含んで成る。
本発明のこの観点において有用である、核酸、非カチオン性脂質、カチオン性脂質及び有機溶媒は、界面活性剤を使用する上記方法について記載されるものと同じである。１つのグループの態様において、段階（ａ）の溶液は単相である。もう１つのグループの態様において、段階（ａ）の溶液は２相である。
好ましい態様において、カチオン性脂質は、DODAC，DDAB，DOTMA，DOSPA，DMRIE，DOGS又はそれらの組合せである。他の好ましい態様において、非カチオン性脂質は、ESM，DOPE、ポリエチレングリコール基材のポリマー（たとえば、PEG 2000，PEG 5000，PEG－変性リン脂質又はPEG－変性セラミド）又はそれらの組合せである。さらに他の好ましい態様において、有機溶媒は、メタノール、クロロホルム、塩化メチレン、エタノール、ジエチルエーテル又はそれらの組合せである。
特に好ましい態様においては、核酸はプラスミドであり；カチオン性脂質はDODAC，DDAB，DOTMA，DOSPA，DMRIE，DOGS又はそれらの組合せであり；非カチオン性脂質はESM，DOPE、ポリエチレングリコール基材のポリマー又はそれらの組合せであり；そして有機溶媒はメタノール、クロロホルム、塩化メチレン、エタノール、ジエチルエーテル又はそれらの組合せである。
上記のように、核酸とカチオン性脂質との接触は、典型的には、核酸の第１溶液及び脂質の第２溶液を一緒に、好ましくは機械的手段により、たとえば振盪ミキサーを用いることによって混合することにより達成される。得られる混合物は、上記本発明の１つの観点について記載されるような複合体を含む。次に、それらの複合体は、非カチオン性脂質の添加及び有機溶媒の除去により、粒子に転換される。非カチオン性脂質の添加は典型的には、前記複合体を含む混合物に非カチオン性脂質の溶液を単純に添加することによって達成される。逆添加もまた使用され得る。有機溶媒の続く除去は、当業者に知られており、且つ上記にまた記載される方法により達成され得る。
本発明のこの観点に使用される非カチオン性脂質の量は、典型的には、前記電荷中和された脂質－核酸複合体を供給するために使用されるカチオン性脂質の量（モルに基づく）の約0.2～５倍の量である。好ましくは、その量は、使用されるカチオン性脂質の量の0.5～２倍である。
さらにもう１つの観点においては、本発明は、上記方法により調製される脂質－核酸粒子を供給する。それらの態様においては、脂質－核酸粒子は、正味の電荷中性であり、又はより高い遺伝子リポフェクション活性を有する粒子を供給する全体の電荷を担持する。好ましくは、前記粒子の核酸成分は、所望するタンパク質をコードし、又は所望しないタンパク質の生成を阻止する核酸である。特に好ましい態様において、核酸はプラスミドであり、非カチオン性脂質は卵スフィンゴミエリンであり、そしてカチオン性脂質はDODACである。
上記のように、脂質－核酸粒子は、インビトロ又はインビボで、細胞のリポフェクションのために有用である。従って、本発明は、もう１つの態様において、細胞中に核酸を導入するための方法を提供し、ここで前記方法は、
（ａ）上記方法に従って脂質－核酸粒子を調製し；そして
（ｂ）細胞中に前記核酸を導入するのに十分な時間、前記脂質－核酸粒子と前記細胞とを接触せしめることを含んで成る。
下記により詳細に論ぜられるが、好ましい態様は、脂質－核酸粒子がプラスミド、DODAC及びESMを含んで成るものである。

ビリオン粒子のパッケージングのためのサイズの制限のために、ウィルスゲノム中に比較的小さい非ウィルス核酸配列を組込むことができるだけのウィルス基材の遺伝子療法ベクターとは異なって、本発明の脂質－核酸複合体は、大きな（たとえば50～5,000kb）の外因性核酸を移送するために使用され得る。本発明のこの観点は特に好都合である。なぜならば、100kbを越える遺伝子療法範囲のための標的である多くの遺伝子（たとえばアミロイド前駆体タンパク質（APP）遺伝子、ハンティングトン無踏病遺伝子）及び大きな相同の標的構造体又はトランスジーンが治療のために必要とされるからである。

細胞は、受容体－認識トランスフェクション複合体と前記細胞とを接触せしめることによって、高い効率で且つ細胞型特異性を伴って、外因性核酸によりリポフェクトされ得、ここで前記複合体は、（１）外因性核酸、（２）ポリカチオンに共有結合される受容体－リガンドタンパク質（“rlp”）、及び（３）カチオン性又は中性脂質を含んで成る。ポリカチオン－結合の受容体－認識タンパク質及び適切なカチオン性（又は中性）脂質の組合せが核酸をトランスフェクトするために使用され得、そしてその組合せが、受容体－認識タンパク質により付与される細胞型標的化特異性を保持し、そしてまた、カチオン性脂質、中性脂質又はリポポリアミンの包含により、一部付与される高い効率のトランスフェクションを示すことが見出された。

外因性核酸は典型的には、dsDNA，ssDNA，ssRNA，dsRNAであり；最とも典型的には、外因性核酸はdsDNA、たとえばクローニングベクター、たとえばプラスミド又はウィルスゲノムにおけるクローン化されたDNA配列である。外因性核酸の複数種が、トランスフェクション複合体において、たとえば結合されていない核酸配列の同時トランスフェクションのために、又はインビボ相同組換え混合（shuftling）を達成するために組合され得る。ときどき、外因性核酸は、トランスフェクション複合体を組込む細胞において自主的に複製することができず、そして一時的に発現されるか又は相同組換え又は非相同組込みにより宿主細胞染色体中に安定して組込まれる。しばしば、少なくとも１つの選択可能マーカー（たとえば、neo^R発現カセット）は、外因性核酸を組込んでいる細胞の選択を促進するために外因性核酸に包含される。典型的には、外因性核酸は、外因性核酸を組込んでいる標的細胞において発現されるポリペプチドをコードする構造遺伝子を含んで成り、そして前記構造遺伝子は通常、適切なcis－作用性調節要素（たとえば、プロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化部位）に操作可能的に連結されている。遺伝子療法は、種々の手段で行なわれ得るけれども、典型的な受容体－認識リポフェクション複合体は、少なくとも１つの転写単位を含んで成る核酸を含んで成る。

本発明の脂質－核酸粒子は、核酸の種類の他に、受容体－認識分子（rlm）、たとえばタンパク質を含むよう企画され得る。そのrlmは、核酸－脂質粒子を含んで成る脂質に共有結合され得る。前記粒子上でのその存在は、粒子が標的細胞と接触し、そして侵入する効率及び特異性を高める。たとえば、適切なrlmは、たとえばエンドサイトーシス及び／又は膜融合の方法によりrlm－ポリカチオン接合体を含んで成るトランスフェクション複合体のインターナリゼーションを仲介する標的細胞の細胞表面受容体に結合する非免疫グロブリンタンパク質である。追加の適切なrlm種は典型的には、ポリペプチド部分（たとえば、付着分子、たとえばICAM－１，ICAM－２，ELAM－１，VCAM－１）を含んで成る天然に存在する生理学的リガンドである。真核細胞上のウィルス受容体に結合し、そしてウィルスインターナリゼーションを仲介するウィルスタンパク質（たとえば、不穂糖タンパク質）はまた、rlm－ポリカチオン接合体を形成するためのrlm種としても使用され得る。例としてはまた、細胞表面受容体に結合し、そしてインターナリゼーション及び／又は膜融合を導びくウィルス糖タンパク質、HSV－１のgB，gC，gD，gE，gH及びgIビリオン糖タンパク質及びHIV－１のgp120を挙げることができる。

天然に存在するタンパク質のフラグメント及び類似体、及び十分な長さの成熟タンパク質は、本発明のトランスフェクション複合体を形成することにおいて、rlm種として使用され得る。たとえば、標的細胞への結合を仲介する、付着分子又はビリオン付着タンパク質の一部を含んで成る、フラグメント、類似体、及び融合タンパク質はrlm種として使用され得るが、しかし細胞付着及び／又は膜融合のために必須ではない天然に存在する十分な

長さのタンパク質の他の部分を含んで成るものは不適切である。従って、たとえば、ビリオン糖タンパク質の細胞質末端ペプチド部分は通常、排除され、そしてその得られるタンパク質は適切なrlmとして作用することができる。
選択されたrlmは、特定の標的細胞型により変化するであろう。肝細胞に対する特異的標的化のためには、アシアロ糖タンパク質（ガラクトース末端）は、rlm種として好ましい。アシアロ糖タンパク質の例は、アシアロオロソムコイド、アシアロフェツュイン及び脱シアル酸化された水疱性口内炎ウィルスビリオンタンパク質を包含する。それらは、末端シアル酸及び末端から２番目のガラクトース残基を有するそれらの糖タンパク質の化学的又は酵素的脱シアル酸化により形成され得る。他方、選択的に肝細胞を標的化するリポフェクション複合体を形成するために適切なrlm種は、還元性ラクトースアミン化により、非ガラクトース担持のタンパク質にラクトース又は他のガラクトース末端炭水化物（たとえばアラビノガラクタン）をカップリングすることによって創造され得る。肝細胞標的化のための他の有用なガラクトース末端炭水化物は、天然の糖タンパク質から得られた炭水化物樹状物、特に、末端ガラクトース残基を含むか又は末端ガラクトース残基を暴露するよう酵素的に処理され得るトリ－及びテトラ－触角状構造体を包含する。マクロファージ、内皮細胞又はリンパ球を標的化するためには、マンノース又はマンノース－６－ホスフェートを含んで成るrlm種、又はそれらの末端炭水化物構造を含んで成る複合体炭水化物が使用され得る。
種々の異なった細胞表面受容体が哺乳類細胞の表面上に存在するので、非肝細胞への核酸の細胞特異的標的化は、種々のrlm種を含んで成るリポフェクション複合体を包含することができる。たとえば、トランスフェリンは、トランスフェリン受容体を発現する細胞に対して受容体－認識トランスフェクション複合体を形成するための適切なrlmとして使用される。他の受容体リガンド、たとえばポリペプチドホルモン（たとえば、成長ホルモン、PDGF，FGF，EGF，インスリン，IL－２，IL－4，等）が、同種受容体を発現する細胞に受容体－認識トランスフェクション複合体を局在化するために使用され得る。
核酸－脂質粒子は、複数のrlm種を含むことができる。ときどき、膜融合活性を有する剤（たとえば、インフルエンザウィルス赤血球凝集素、HIV－１のgB及びgD）は、rlm－ポリカチオン複合体を形成するためのrlmとして、単独で、又は他のrlm種、典型的には、膜融合活性を欠いているそれらの種と組合して、使用される。
それらのトランスフェクション方法は一般的に次の段階：（１）外来性核酸から実質的に成る核酸－脂質－rlm粒子、予備決定された細胞表面受容体に結合する非免疫グロブリン受容体－認識分子に結合されるポリカチオンから実質的に成るポリカチオン接合体、及び中性又はカチオン性脂質から実質的に成る脂質成分（任意には、第四アンモニウム界面活性剤及び／又はリポポリアミンを含む）を形成し、そして（２）前記予備決定された細胞表面受容体を発現する細胞と、前記受容体－認識トランスフェクション複合体を含んで成る組成物とを、前記細胞中への前記外来性核酸の取り込みを可能にする生理学的トランスフェクション条件下で接触せしめることを含んで成る。他の態様においては、rlmがポリカチオンに、共有結合により、ときどき架橋剤を通しての共有結合により、又はペプチド結合により結合される。
全体の粒子電荷は、それが血液からの粒子クリアランスに影響を及ぼすので、粒子の重要な性質である。拡張された循環半減期を有する粒子は典型的には、治療及び診断用途のために所望される。たとえば、血流において８，12又は24時間、維持され得る粒子が特に好ましい。負に荷電されたリポソーム及び粒子は、典型的には、細網内皮系統により、一層急速に摂取され（Juliano，Biochem. Biophys. Res. Commun. 63：651（1975））、そして従って、血流において短い半減期を有する。

Ｃ．医薬製剤

本発明の核酸－脂質粒子は、単独で、又は投与の経路及び標準の医薬実施に従って選択された生理学的に許容できるキャリヤー（たとえば生理食塩水又はリン酸緩衝液）と混合して、投与され得る。一般的に、通常の塩溶液が、医療的に許容できるキャリヤーとして使用されるであろう。他の適切なキャリヤーは、たとえば水、緩衝水、0.4％塩溶液、0.3％

グリシン、及び増強された安定性のための糖タンパク質、たとえばアルブミン、リポタンパク質、グロブリン、等を含む同様のものを包含する。
医薬キャリヤーは一般的に、粒子形成に続いて添加される。従って、粒子が形成された後、その粒子は医薬的に許容できるキャリヤー、たとえば通常の塩溶液中に希釈され得る。医薬配合物における粒子の濃度は、広く変化し、すなわち約0.05重量％、通常、少なくとも約２～５重量％～10～30重量％であり、そして選択される投与の特定の態様に従って、流体体積、粘度、等により主として選択されるであろう。たとえば、濃度は、処理に関連する流体負荷を低めるために高められ得る。これは、アテローム硬化症－関連のうっ血性心不全又は重度の高血圧症を有する患者において特に所望される。他方、刺激性脂質から構成される粒子は、投与の部位で炎症を低める低濃度に希釈され得る。ポリエチレングリコール（PEG）、PEG－セラミド、又は変性された（たとえば、ガングリオシドG_{M1}－変性された）脂質を粒子に含むことがしばしば所望される。そのような成分の添加は、粒子の凝集を妨げ、そして循環生命を高め、そして標的組織への脂質－核酸粒子の供給を高める手段を提供する。典型的には、粒子におけるPEG，PEG－セラミド又はG_{M1}－変性された脂質の濃度は、約１～15％であろう。
医薬組成物は、従来の良く知られている滅菌技法により滅菌され得る。水溶液が使用のために包装され、又は無菌条件下で濾過され、そして凍結乾燥され、そして凍結乾燥された調製物が投与の前、無菌水溶液と共に組合される。組成物は、生理学的状態に近づくために必要とされるような医薬的に許容できる補助物質、たとえばpH調整及び緩衝剤、張度調整剤及び同様のもの、例えば酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、及び塩化カルシウムを含むことができる。さらに、粒子懸濁液は、貯蔵に基づく遊離基及び脂質－過酸化性損傷に対して脂質を保護する脂質－保護剤を含むことができる。親油性遊離基消光物質、たとえばアルファトコフェロール及び水溶性鉄－特異的キレート剤、たとえばフェリオキサミンが適切である。
それらの用途のもう１つの例においては、脂質－核酸粒子が、広範囲の局所投与形、たとえばゲル、オイル、エマルジョン及び同様のもの（但し、これらだけには限定されない）中に導入され得る。たとえば、核酸－脂質粒子を含む緩衝液が配合され、そして局所用クリーム、ペースト、軟膏、ゲル、ローション及び同様のものとして投与され得る。
本発明はまた、キット形での脂質－核酸粒子を供給する。このキットは典型的には、キット中の種々の要素を保持するために区画化された容器から成る。キットは、本発明の組成物を、好ましくは脱水形で、含み、そしてそれらの再水和化及び投与についての説明書も含む。さらに他の態様においては、粒子及び／又は前記粒子を含んで成る組成物は、粒子の表面に結合される標的化成分を有するであろう。脂質（たとえば、本発明の粒子に使用されるもの）に標的化成分（たとえば抗体、タンパク質）を結合する方法は、当業者に知られている。

D．脂質－核酸粒子配合物の投与

本発明の血清安定性核酸－脂質粒子は、細胞中への核酸の導入のために有用である。従って、本発明はまた、細胞中に核酸（たとえば、プラスミド）を導入するための方法を提供する。その方法は、まず、上記のようにして粒子を形成し、次にトランスフェクションが生じる十分な時間、細胞と粒子とを接触せしめることによって、インビトロ又はインビボで実施される。
本発明の核酸－脂質粒子は、それらが混合され又は接触せしめられるほとんどの細胞型に吸着され得る。吸着後すぐに、粒子は、細胞の一部によりエンドサイトーシスされ、脂質と細胞膜とを交換し、又は細胞と融合することができる。粒子の核酸部分の移送又は導入は、それらの経路のいづれか１つを通して生じることができる。特に、融合が生じる場合、粒子膜が細胞膜中に組込まれ、そして粒子の内容物が細胞内流体と組合う。

１．インビトロ遺伝子移送

インビトロ適用のためには、核酸は、植物又は動物起源、脊椎動物又は無脊椎動物、及びいづれかの組織の培養物において増殖されたいづれかの細胞に供給される。好ましい態様においては、細胞は動物細胞、より好ましくは哺乳類細胞、及び最とも好ましくはヒト細

胞であろう。
細胞と脂質－核酸粒子との間の接触は、インビトロで実施される場合、生物学的に適合する培地において起こる。粒子の濃度は、特定の適用に依存して広く変化するが、しかし一般的には、約１μモル～約10mモルである。核酸－脂質粒子による細胞の処理は一般的に、生理学的温度（約37℃）で、約１～48時間、好ましくは約２～４時間、実施される。
１つのグループの好ましい態様においては、脂質－核酸粒子懸濁液が、約10^3～約10^5個の細胞／ml、より好ましくは約２×10^4個の細胞／mlの細胞密度を有する、プレート化された60～80％集密的細胞に添加される。細胞に添加される懸濁液の濃度は好ましくは、約0.01～0.2μｇ／ml、より好ましくは約0.1μｇ／mlの濃度である。

２．インビボ遺伝子移送

他方、本発明の組成物はまた、当業者に知られている方法を用いて、インビボ遺伝子移送のためにも使用され得る。特に、Zhuなど., Science 261：209-211（1993）（引用により本明細書に組込まれる）は、DOTMA－DOPE複合体を用いてのサイトメガロウィルス（CMV）－クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）発現プラスミドの静脈内供給を記載する。Hydeなど., Nature 362：250-256（1993）（引用により本明細書に組込まれる）は、リポソームを用いて、マウス肺における気道の上皮及び肺胞へのノウ胞性繊維症トランスメンブラン伝導性調節（CFTR）遺伝子の供給を記載する。Brighamなど., Am. J. Med. Sci. 298：278-281（1989）（引用により本明細書に組込まれる）は、細胞内酵素クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）をコードする機能的原核遺伝子によるマウスの肺のインビボトランスフェクションを記載する。
インビボ投与のためには、医薬組成物は好ましくは、非経的に、すなわち動脈内、静脈性、腹腔内、皮下又は筋肉内投与される。より好ましくは、医薬組成物は、ボーラス注射により静脈的又は腹腔内投与される。たとえば、Stadlerなど.,アメリカ特許第5,286,634号（引用により本明細書に組込まれる）を参照のこと。細胞内核酸供給はまた、Straubringer, など., Methods in Enzymology, Academic Press, New York. 101：512-527（1983）；Mannino, など., Biotechniques 6：682-690（1988）；Nicolau,など., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 6：239-271（1989）、及びBehr, Acc. Chem. Res. 26：274-278（1993）にも論じられている。脂質基材の治療剤を投与するさらなる他の方法は、たとえばRahmanなど.,アメリカ特許第3,993,754号；Sears、アメリカ特許第4,145,410号；Papahadjopoulosなど.,アメリカ特許第4,235,871号；Schneider,アメリカ特許第4,224,179号；Lenkなど.,アメリカ特許第4,522,803号；及びFountainなど.,アメリカ特許第4,588,578号に記載されている。
ある態様においては、医薬製剤は、組織へのその製剤の直接的な適用により標的組織と接触せしめられ得る。適用は、局所的な“開放”又は“閉鎖”方法により行なわれ得る。“局部的”とは、環境に暴露される組織、たとえば皮膚、口腔咽頭部、外耳道及び同様のものへの医薬製剤の直接的な適用を意味する。“開放”方法は、患者の皮膚を切開し、そして医薬製剤が適用される基礎をなす組織を直接的に可視化することを包含するそれらの方法である。これは一般的に、手術方法、たとえば肺に近づくための開胸、腹部内蔵に近づくための側腹切開、又は標的組織に近づくための他の直接的な手術により達成される。“開鎖”方法は、内部標的組織が直接的に可視化されないが、しかし皮膚における小さな傷口を通しての装置の挿入により接近される侵入方法である。たとえば、製剤は、針洗浄により腹膜に投与され得る。同様に、医薬製剤は、腰部穿刺、続いて、脊椎麻酔又は脊髄のメトリガマイドイメージングのために通常、実施されるような、患者の適切な位置決定の間、注入により髄膜又は脊髄に投与され得る。他方、その製剤は、内視鏡装置を通して投与され得る。
脂質－核酸粒子はまた、肺へのエアゾール吸入により（Brigham,など., Am, J. Sci. 298（4）：278-281（1989））、又は疾病の部位での直接的な注入により（Culver, Human Gene. Therapy, MaryAnn Liebert, Inc., Publishers, New York, pp. 70-71（1994）、投与され得る。
本発明の方法は、種々の宿主において実施され得る。好ましい宿主は、哺乳類種、たとえ

ばヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、羊及び同様のものを包含する。
投与される粒子の量は、脂質に対する核酸の割合；使用される特定の核酸；診断される疾病状態；患者の年齢、体重及び状態；及び臨床医の判断に依存するが、しかし、一般的には、kg体重当たり約0.01～約50mg；好ましくは、約0.1～約５mg／kg体重、又は注射当たり約10^8～10^{10}個の粒子であろう。
３．遺伝子の機能的コピーの挿入
遺伝子治療のいくつかの方法は、宿主染色体中に遺伝子の機能的コピーを組込むことによって、内因性遺伝子の欠陥を補足するよう作用する。挿入された遺伝子は宿主DNAと共に複製し、そして欠陥遺伝子を補足するレベルで発現される。このアプローチによる処理により補正され得る疾病は、ときどき、劣性突然変異により特徴づけられる。すなわち、内因性遺伝子の両コピーは、徴候の出現のためには不完全であるべきである。そのような疾病は、ノウ胞性繊維症、鎌状赤血球貧血、β－サラセミア、フェニルケトン尿症、ガラクトース血症、Wilson病、ヘモクロマトーシス、重度の組合された免疫欠損疾患、α－１－アンチトリプシン欠損症、白皮症、アルカプトン尿症、リソソーム貯蔵疾患、Ehlers－Danlos症候、血友病、グルコース－６－サン酸デビトロゲナーゼ欠損症、無ガンマグロブリン血症、尿崩症、Lesch－Nyhan症候、筋ジストロフィー、Wiskotl－Aldrich症候、Fabry病、脆Ｘ－症候及び同様の疾病を包含する。他の劣性突然変異は当業界において知られており、そしてそれらを処理するためへの本発明の方法の使用は、本明細書において企画されている。
上記遺伝子欠陥を補足するために外因性機能的遺伝子を導入するためのいくつかの方法が存在する。１つの方法においては、細胞が、その疾病を有する患者から除去され、そして脂質－ベクター複合体とインビトロで接触せしめられる。細胞が、疾病症候が明白である組織型から除去されるべきである。細胞が複製できる場合、そして使用されるベクターが選択マーカーを含む場合、マーカーをインターナライズし、そして発現する細胞が選択され得る。特に、選択が行なわれない場合、細胞中への遺伝子移送の頻度は高く、たとえば少なくとも１，５，10，25又は50％の細胞であることは重要である。
細胞ゲノム中へのベクターの組込みの後、及び任意には、選択の後、細胞は患者中に再導入される。この適用、及び下記に論ぜられる他のもの（優性突然変異を正すための特定部位組換えを除く）においては、脂質－核酸粒子により供給される遺伝子が、補足される欠陥遺伝子により支配されるのと同じ部位に供給されることは必要ではない。
他方、脂質－ベクター複合体は、医薬組成物として、患者中に直接的に導入され得る。前記複合体は、治療的有効量で、処理される遺伝子疾患により影響される組織に供給される。この及び他の方法においては、治療的有効量は、疾病の徴候及びその合併症を治癒し、又は少なくとも部分的に阻止するのに十分な量である。上記病状の処理のための本発明の組成物の有効量は、多くの異なった要因、たとえば投与の手段、標的部位、患者の生理学的状態、及び投与される他の薬物に依存して変化するであろう。従って、処理用量は、安全性及び効能を最適化するために滴定される必要があろう。患者当たり約10ng～１ｇ，100ng～100mg，１μｇ～10mg又は30～300μｇのDNAの範囲の用量が典型的であろう。投与の経路は、経口、鼻腔、骨、静脈内、皮下及び筋肉内経路を包含する。
核酸－脂質複合体はまた、生殖系の変更を達成するために胚幹細胞又は複合体をトランスフェクトするためにも使用され得る。Jaenisch, Science, 240, 1468-1474（1988）；Gordonなど.（1984）Methods Enzymol. 101, 414；Hoganなど., Manipulation of the Mouse Embryo：A Laborarory Manual, C.S.H.L. N. Y.（1986）；及びHammerなど.,（1985）Nature 315, 680；Gandoltiなど.（1987）J. Reprod. Fert. 81, 23-28；Rexroadなど.（1988）J. Anim. Sci. 66, 947-953及びEyestoneなど.（1989）J. Reprod. Fert. 85, 715-720；Camousなど.（1984）J. Reprod. Fert. 72, 779-785；Heymanなど.（1987）Theriogenology 27, 5968を参照のこと。しかしながら、それらの方法は、ヒト胚を操作することにおいて倫理的及び規則的な制約のためにヒト処理よりも獣医学用途のために、現在より適切である。
例として、ノウ胞性繊維症（CF）は、白人集団において高い発生率を有する致命的な劣性

遺伝子疾患である。この疾病を担当する遺伝子は、Riordanなど，Science 245，1059-1065（1989）により単離された。それは、上皮細胞膜を通しての塩化物イオン（Cl^-）の移送に関与するノウ胞性繊維症トランスメンブラン伝導性レギュレーター（CFTR）と呼ばれるタンパク質をコードする。遺伝子における突然変異は、上皮細胞におけるCl^-分泌の欠陥を引き起こし、種々の臨床学的出現を導びく。CFは多くの徴候、たとえば増大された外分泌腺分泌、膵臓欠陥、腸閉鎖、及び脂肪の吸収不良を有するが、死亡をもたらす最とも重度の要因は、慢性肺疾患である。従って、CF患者を処理するためには、機能的CFTR遺伝子生成物のためのコード配列を含むベクターが、脂質及び場合によっては、医薬賦形剤と複合体化され、そしてそのベクター脂質組成物が肺に達するよう鼻腔投与を通して患者中に導入される。ベクター脂質複合体の用量は好ましくは、約10^8～10^{10}個の粒子である。

もう１つの例として、α又γグロビン遺伝子の欠陥（McDonagh & Nienhuis in Hematology of Infancy and Childhood（eds. Nethan & Oski，Saunders，PA，1992），pp. 783-879）は、前記遺伝子の機能的コピーを含む核酸－脂質複合体による造血幹細胞のex vivo処理により補足され得る。その遺伝子は幹細胞中に組込み、次に患者中に再導入される。ファンコニ貧血補足グループＣ（Fanconi Amemia Complemant Group C）を担当する遺伝子における欠陥は、類似する手段により処理され得る（Walshなど.，J. Clin. Invest. 94，1440-1448（1994）を参照のこと）。

他の適用は、癌細胞又は癌になる危険性の細胞への腫瘍サプレッサー遺伝子の機能的コピーの導入を包含する。内因性腫瘍サプレッサー遺伝子の１つの又は両コピーの欠陥を有する個人は特に、癌進行の危険性がある。たとえば、Li－Fraumeni徴候は、個人が変異体ｐ53対立遺伝子を受ける遺伝的な状態であり、種々の癌の早い開始をもたらす（Harris，Science 262，1980-1981（1993）；Frebourgなど.，PNAS 89，6413-6417（1992）；Malkinなど.，Science 250，1233（1990））。癌細胞又は癌になる危険性の細胞における腫瘍サプレッサー遺伝子の発現は、癌状態の細胞増殖及び他の症状発現を妨げ、阻止し、そして／又は逆転するのに効果的である。本発明への使用のための適切な腫瘍サプレッサー遺伝子は次のものを包含する：ｐ53など.，Gene 70，245-252（1988））、APC，DCC，Rb，WT１及びNF１（Marx，Science 260，751-752（1993）；Marshall，Cell 64，313-326（1991））。腫瘍サプレッサー遺伝子の機能的コピーを担持する脂質－核酸複合体は通常、作用の意図された部位に最とも近い経路によりインビボ投与される。たとえば、皮膚癌は、局部投与により処理され、そして白血病は静脈内投与により処理され得る。

４．遺伝子発現の抑制

本発明の核酸－脂質複合体を用いての遺伝子療法は、病原性微生物、たとえばHIVにより感染された又は感染される危険性のある、患者又は細胞の予防又は治療処置のためにも使用され得る。ウィルス複製を妨げるために標的遺伝子の機能を阻止するアンチセンス分子の有効性は、多くの異なったシステムで示されている（Friedmanなど.，Nature 335，452-54（1988），Malimなど.，Cell 58，205-14（1989）& Tronoなど.，Cell 59，113-20（1989））。使用されるベクターは、病原性微生物からのゲノムのセグメントに対して相補的である、アンチセンス転写体をコードするDNAセグメントを包含する。前記セグメントは好ましくは、微生物の生活環において不可欠な役割を演じ、そしてまた、微生物に対してユニークであるべきである（又は、治療を受ける患者の天然のゲノムには少なくとも不在である）。たとえば、HIVウィルスに対する阻害のための適切な部位は、TAR，REV又はnefを含む（Chatlerjeeなど.，Science 258，1485-1488（992））。Revは、核からのスプライスされていないHIV pre mRNAの輸送を促進する調節RNA結合タンパク質である（Malimなど.，Nature 338，254（1989））。Tatは、５’側フランキングmRNAにおける認識配列を結合することによって機能する転写活性化因子であると思われる（Karn & Graeble，Trends Genet. 8，365（1992））。核酸－脂質複合体は、治療的有効量で、ex vivo又は静脈内注射により、白血球又は造血幹細胞中に導入される。処置は、HIV個人に対して、又はHIVによりすでに感染されている個人に対して予防的に行なわれ得る。

類似する方法が、付着性タンパク質をコードする内因性受容体細胞遺伝子の発現を抑制するために使用される。付着タンパク質の抑制は、所望しない炎症応答を阻止することにお

いて有用である。選択されたベクターに存在するアンチセンスセグメントにより抑制され得る付着タンパク質は、インテグリン、セレクチン、及び免疫グロブリン（Ig）スーパーファミリーメンバーを包含する（Springer, Nature 346, 425-433（1990）；Osborn, Cell 62, 3（1990）；Hynes, Cell 69, 11（1992）を参照のこと）。インテグリンは、一般的に短い細胞質ドメインを有する、α鎖（120－180kDa）及びβ鎖（90－110kDa）から成るヘテロダイマー性トランスメンブラン糖タンパク質である。３種の既知のインテグリン、LFA－１，Mac－１及びＰ150，95は、CD11ａ，CD11ｂ及びCD11ｃと称する異なったαサブユニット、及びCD18と称する通常のβサブユニットを有する。LFA－１（$\alpha_1\beta_1$）は、リンパ球、顆粒球及び単球上に発現され、そしてICAM－１と称する、Ig－ファミリーメンバーの逆－受容体に優先的に結合する。ICAM－１は、多くの細胞、たとえば白血球及び内皮細胞上に発現され、そしてサイトカイン、たとえばTNF及びIL－１により血管内皮上でアップ－レギュレートされる。Mac－１（$\alpha_M\beta_2$）は、好中球及び単球上に分布され、そしてまた、ICAM－１（及びたぶんICAM－２）にも結合する。第３のβ２インテグリン、すなわちＰ150，95（$\alpha_X\beta_2$）はまた、好中球及び単球上に見出される。セレクチンは、Ｌ－セレクチン、Ｅ－セレクチン、及びＰ－セレクチンから成る。

５．形質転換されるべき細胞

本発明の組成物及び方法は、広範囲の種類の細胞型をインビボ及びインビトロで処理するために使用される。それらの中で、造血前駆体（幹）細胞が遺伝子療法のために最ともしばしば標的化される。他の細胞は、大部分の標的化された細胞が非分裂性であるか又は遅い分裂性であるものを包含する。それらは、たとえば繊維芽細胞、表皮ケラチン細胞、内皮細胞、骨格及び平滑筋細胞、骨芽細胞、ニューロン、休止リンパ球、最終的に分化された細胞、遅い又は非循環性一次細胞、柔組織細胞、リンパ球、上皮細胞、骨細胞、等を包含する。前記方法及び組成物は、広範囲の種類の脊椎動物、たとえば哺乳類の細胞、及び獣医学的重要なもの、たとえばイヌ、ネコ、ウマ、ウシ、羊、ヤギ、ネズミ、ウサギ、ブタ、等の細胞、並びにヒト細胞集団と共に使用され得る。

細胞の組織培養が必要とされる程度まで、それは当業界において知られている。Freshney（1994）（Culture of Animal Cell, A Manual of Basic Technique, third Edition Wiley-Liss, New York），Kuchlerなど.,（1977）（Biochemical Methods in Cell Culture and Virology, Kuchler, R. J., Dowden, Hutchinson and Ross, Inc.）及びそこに引用される文献は、細胞の培養についての一般的なガイドを提供する。培養された細胞系は、しばしば単層の形で存在するが、但し、細胞懸濁液もまた使用される。

遺伝子療法は、標的細胞への治療遺伝子の効果的供給に依存する。遺伝子療法のために標的化されて来たほとんどの体細胞、たとえば造血細胞、皮膚繊維芽細胞及び表皮ケラチン細胞、肝細胞、内皮細胞、筋細胞及びリンパ球は通常、非分裂性である。遺伝子療法のために最とも広く使用されるレトロウィルスベクターは、不運なことには、効果的なトランスグクションのためには細胞分裂を必要とする（Millerなど., Mol. Cell. Biol. 10：4239-4242（1990））。これはまた、他の遺伝子療法ベクター、たとえばアデノ関連ベクターに関しても真実である（Russellなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91：8915-8919（1994）；Alexanderなど., J. Virol. 68：8282-8287（1994）；Srirastrava, Blood Cells 20：531-538（1994））。最近、HIV基材のベクターは、非分裂性細胞（CITE）をトランスフェクトするものとして報告されている。それにもかかわらず、多くの遺伝子療法のための好ましい標的である大部分の幹細胞は通常、増殖しない。従って、トランスダクションの効率はしばしば、比較的低く、そして遺伝子生成物は治療的又は予防的に有効な量で発現されない。これは、遺伝子移送の前又はその間、幹細胞の増殖の刺激（たとえば、成長因子により処理により）、５－フルオロウラシルによる予備処理、サイトカインの存在下での感染、及び幹細胞が感染の間、分裂する傾向を高めるためにベクター感染期間の拡張のような技法の開発に研究者を向けるが、しかしそれらの技法は限定された効果しか有さない。

６．外来性核酸の検出

与えられた細胞が対象の遺伝子をコードする核酸構造体によりトランスダクトされた後、

細胞又は細胞系が遺伝子生成物を発現することを検出し、そして構築された細胞における遺伝子生成物の発現のレベルを評価することは重要である。これは、遺伝子生成物をコードする核酸の検出を必要とする。

核酸及びタンパク質は、当業者に良く知られている多くの手段のいづれかにより検出され、そして定量化される。これらは、分析生化学方法、たとえば、分光光度計、ラジオグラフィー、電気泳動、細管電気泳動、高性能液体クロマトグラフィー（HPLC）、薄層クロマトグラフィー（TLC）、超拡散クロマトグラフィー、及び同様のもの、及び種々の免疫学的方法、たとえば流体又はゲル沈降反応、免疫拡散（単一又は二重）、免疫電気泳動、ラジオイムノアッセイ（RIA）、酵素結合の免疫吸着アッセイ（ELISA）、免疫螢光アッセイ、及び同様のものを包含する。核酸の検出は、良く知られている方法、たとえばサザン分析、ノザン分析、ゲル電気泳動、PCR、放射性ラベリング、シンチレーションカウンティング、及びアフィニティークロマトグラフィーにより行なわれる。

核酸ハイブリダイゼーション形式の選択は臨界ではない。種々の核酸ハイブリダイゼーション形式が当業者に知られている。たとえば、通常の形式は、サンドイッチアッセイ、及び競争又は置換アッセイを包含する。ハイブリダイゼーション技法は一般的に、“Nucleic Acid Hybridization, A, Practical Approach,”Ed. Hames, B. D. and Higgins, S. J., IRL Press, 1985に記載されている。

ハイブリダイゼーションアッセイの感度は、検出される標的核酸を増幅する核酸増幅システムの使用を通して増強され得る。分子プローブとしての使用のための配列を増幅し、又は続くサブクローニングのための核酸フラグメントを生成するために適切なインビトロ増幅技法は知られている。そのようなインビトロ増幅方法、たとえばポリメラーゼ鎖反応（PCR）、リガーゼ鎖反応（LCR）、Ｑβ－リプリカーゼ増幅及び他のRNAポリメラーゼ仲介の技法（たとえば、NASBA）を通して当業者を方向付けするのに十分な技法の例は、次の文献に見出される：Berger, Sambrook and Ausubel, as well as Mullisなど.,（1987），アメリカ特許第4,683,202号；PCR Protocols A Guide to Methods and Applications（Innisなど., eds）Academic Press Inc. San Diego, CA（1990）（Innis）；Arnheim & Levinson（October 1, 1990），C & EN 36-47；The Journal Of NIH Research（1991），3：81-94；（Kwohなど.,（1989），Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86：1173；Guatelliなど.（1990），Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87：1874；Lomellなど.（1989），J. Clin. Chem., 35：1826；Landegrenなど.,（1988），Science, 241：1077-1080；Van Brunt（1990），Biotechnology, 8：291-294；Wu and Wallace（1989），Gene, 4：560；Barringerなど.（1990），Gene, 89：117、及びSooknanan and Malek（1995），Biotechnology, 13：563-564。インビトロ増幅された核酸をクローニングするための改良された方法は、Wallaceなど.,アメリカ特許第5,426,039号に記載されている。文献に最近記載されている他の方法は、核酸配列に基づく増幅（NASBA™, Congene, Mississauga, Ontario）及びQ Beta Replicaseシステムである。それらのシステムは、PCR又はLCRプライマーが、選択配列が存在している場合のみ、拡張され、又は連結されるように企画されている変異体を直接的に固定するために使用され得る。他方、選択配列は一般的に、たとえば非特異的PCRプライマー及び突然変異を示す特異的配列について後でプローブされる増幅された標的領域を用いて、増幅される。

たとえばインビトロ増幅方法において、プローブとしての使用のための、遺伝子プローブとして又はイヒビター成分としての使用のためのオリゴヌクレオチドは、Beaucage and Caruthers（1981），Tetrahedron Letts. 22（20）：1859-1862により記載される固相ホスホラミジットトリエステル法に従って、たとえばNeedham-Van Devanterなど.（1984），Nucleic Acids Res., 12：6159-6168に記載されるような自動合成機を用いて、化学的に合成される。オリゴヌクレオチドの精製は、必要な場合、典型的には、Pearson and Regnier（1983），J. Chrom., 255：137-149に記載されるような、活性アクリルアミドゲル電気泳動又はアニオン交換HPLCにより行なわれる。合成オリゴヌクレオチドの配列は、Maxam and Gilbert（1980），Grossman and Moldave（eds.）Academic Press, New York, Methods in Enzymology, 65：499-560の化学分解法を用いて確証され得る。

遺伝子の発現レベルを決定するための他の手段は、現場ハイブリダイゼーションである。現場ハイブリダイゼーションアッセイは良く知られており、そして一般的には、Angererなど.（1987），Methods Enzymol.，152：649-660に記載されている。現場ハイブリダイゼーションアッセイにおいては、細胞が固体支持体、典型的にはガラススライドに固定される。DNAがプローブされる場合、細胞は加熱又はアルカリにより変性される。次に、細胞は、ラベルされる特定のプローブのアニーリングを可能にする適度な温度でハイブリダイゼーション溶液と接触せしめられる。プローブは好ましくは、放射性同位体又は螢光レポーターによりラベルされる。

７．外来性遺伝子生成物の検出

生成物を生成する対象の遺伝子の発現は、種々の方法により検出され又は定量化され得る。好ましい方法は、特異的抗体の使用を包含する。

ポリクローナル及びモノクローナル抗体の生成方法は当業者に知られている。たとえば次の文献を参照のこと：Coligan（1991），Current Protocols IN IMMUNOLOGY，Wiley/Greene，NY；and Harlow and Lane（1989），ANTIBODIES：A LABORATORY MANUAL，Cold Spring Harbor Press，NY；Stitesなど.（eds.）BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY（4th ed.）Lange Medical Publications，Los Altos，CA、及びそこに引用される文献；Goding（1986），MONOCLONAL ANTIBODIES：PRINCIPLES AND PRACTICE（2d ed.）Academic Press，New York，NY；及びKohler and Milstein（1975），Nature，256：495-497。そのような技法は、ファージ又は類似するベクターにおける組換え抗体のライブラリーからの抗体の選択による抗体調製を包含する。Huseなど.（1989），Science，246：1275-1281；及びWardなど.（1989），Nature，341：544-546を参照のこと。特異的モノクローナル及びポリクローナル抗体及び抗血清は通常、少なくとも約0.1mM、より通常には少なくとも約１μＭ、好ましくは少なくとも約0.1μＭ又はそれ以上、及び最とも典型的且つ好ましくは0.01μＭ又はそれ以上のK_Dを伴って結合するであろう。

サンプルにおける所望するポリペプチド（たとえば、ペプチド、転写体又は酵素消化生成物）の存在は、ウェスターンブロット分析を用いて、検出され、そして定量化され得る。その技法は一般的に、分子量に基づいてゲル電気泳動によりサンル生成物を分離し、その分離されたタンパク質を適切な固体支持体（たとえば、ニトロセルロースフィルター、ナイロンフィルター、又は誘導されたナイロンフィルター）に移送し、そして分析物タンパク質に特異的に結合するラベリング抗体と共に前記サンプルをインキュベートすることを含んで成る。そのラベリング抗体は、固体支持体上の分析物に特異的に結合する。それらの抗体は、直接的にラベルされ、又は他方では、ラベリング剤、たとえばラベリング抗体に特異的に結合する抗体（たとえばラベルされた羊抗－マウス抗体、ここで分析物に対する抗体はネズミ抗体である）を用いて検出される。

VII．例

次の例は例示目的のためにのみ提供され、そして本発明を限定するものではない。それらの例の個々において、用語“DNA”又は“プラスミド”とは、プラスミドpCMV（pCMV４－CAT）を言及する。

Ａ．材料

トランスフェクト剤、リポフェクチン（Lipofectin）及びリポフェクタミン（Lipofectamine）は、Gibco／BRL（Grand Island，New York，USA）から購入された。トランスフェクタム（Tronstectam）試薬は、Promega Corp.（Madison，Wisconsin，USA）から購入された。モノカチオン性脂質DDAB、塩化カルシウム、Ｌ－リシン（遊離塩基）、ポリＬ－リシン臭化水素（平均分子量52,000）、ｎ－オクチル－Ｄ－グルコピラノシド（OGP）及びDNアーゼＩは、Sigma Chemical Company（St. Louis，Missouri，USA）から得られた。TO－RPO－１（チアゾールオレンジモノマー）は、Molecular Probes Inc.，Eugene，Oregon，USAから得られた。Ｅ．コリ－ガラクトシダーゼ（－gal）、すなわち7.2kbのプラスミドDNAレポーター遺伝子をコードするプラスミドpCMV（Gen Bank受託番号UO2451）は、Clontech Laboratories，Palo Alto，California，USAから得られた。β－gal DNAは、標準の技法（Sambrookなど.，Molecular Cloning，A Laboratory Manual，Second Ed.，Cold Spri

ng Harbor, New York（1989））を用いて増幅され、そして精製された。卵スフィンゴマイエリン（SM）及び１，２－ジオレオイル－sn－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（DOPE）は、Avanti Polar Lipds（Alabaster, AL）から購入された。Ｎ，Ｎ－ジオレオイル－Ｎ，Ｎ－ジメチルアンモニウムクロリド（DODAC）は、INEX Pharmaceuticals Corp.（Vancouver, B. C.）のSteven Ansellにより合成され、そして供給された。TO－PRO－１は、Molecular Probes Inc.（Engone, OR）から購入された。透析膜（SPECTRA/POR, mwco：12,000-14,000）は、Fisher Scientific（Ottawa, ON）から購入された。使用される他のすべての化学物質は、試薬品種であり、そして使用されるすべての溶媒はHPLC品種であった。放射性ラベルされたDNAはトレーサーとして使用され、そして細菌の増殖の間、プラスミド中に^{3}Ｈ－dUTPを組込むことによって生成され、約50,000dpm/ｇ DNAの比活性をもたらす。それらの例において使用されるすべての他の化学物質は、試薬品種のものであり、そして使用されるすべての溶媒はHPLC品種のものであった。滅菌蒸留水がすべての実験を通して使用された。すべての材料は、さらなる精製を伴わないで、使用された。

Ｂ．方法

ブライ－ダイアー抽出法

非カチオン性脂質、カチオン性脂質及びDNAを、混合の前、クロロホルム：メタノール：水の溶液（１：2.1：１）に溶解した。この溶媒及び水の混合物は、ブライ－ダイアー単相（Bligh and Dyer, Can. J. Biochem. Physiol. 37：91-97（1959））の調製に使用されるものと同等である。典型的には、DNAを添加し、溶液において10ｇ／mlの最終濃度を達成し、ここで脂質は種々の濃度で添加された。微量の^{3}Ｈ－プラスミドDNAを添加し、10ｇのラベルされていないDNA当たり、2000～4000dpmが存在した。反応混合物を、合計１mlの体積で、室温で30分間インキュベートした。続いて、ブライ－ダイアー単相を、水及びクロロホルム（それぞれ250ｌ）の添加により２つの相システムに分けた。サンプルを振盪することによって混合し、そして低部有機相及び上部水性相の分離を、室温で５分間、2000rpmでの遠心分離により促進せしめた。水性相を除去し、そしてシンチレーションカウンチングのために保持した。溶媒相を、窒素ガス流を用いて乾燥せしめ、そして得られるフィルム状物を、SOLVABLE可溶化剤（Dupont NEN, Boston, Massachusetts, USA）に再懸濁し、そして50℃で１時間、インキュベートした。この最後の段階は、シンチレーションカクテルのみの添加が複合体を解離するのに十分ではないので、乾燥されたDNA／脂質複合体を溶解するために必要であった。PICOFLUORシンチレーション剤（Canberra Packard, Meriden, Connecticut, USA）をすべてのサンプルに添加し、そして放射能（^{3}Ｈ－DNA）を、Packard TR 1900シンチレーションカウンター（Canberra Packard）を用いて測定した。

電荷中和された脂質－核酸複合体の安定性を評価するアッセイを、種々の濃度のNaCl及びOGPの存在下で行なった。手短に言えば、カチオン性脂質－核酸複合体を、プラスミドの100％が有機相において回収されることが予測される条件下で調製した。次に、NaCl又はOGPを単相システムに添加し、そしてインキュベーションを室温で15分間、行なった。ブライ－ダイアー抽出を、上記のようにして行なった。プラスミドへのカルシウム、Ｌ－リシン、及びポリ－Ｌ－リシンの結合を、上記方法の変法を用いて評価した。それらの非脂質カチオン性材料を、種々の濃度で無菌蒸留水に溶解し、そして250ｌの最終体積で、プラスミド（水において10ｇ／mlの最終濃度）と共に室温で30分間インキュベートした。反応体積を、クロロホルム：メタノール（１：2.1）の溶液により１mlに調整し、単相を生成した。次に、ブライ－ダイアー抽出を、記載のようにして行なった。

色素インターカレーションアッセイ

螢光色素TO－PRO－１を用いて、電荷中和された脂質－核酸複合体におけるプラスミドの縮合の状態を評価した。TO－PRO－１は、より通常のインターカレーター臭化エチジウムに比較して、プラスミド中へのその安定したインターカレーション、及び螢光検出におけるその高い感度のために、この研究に使用された（Hirons, など., Lytometry 15：129-140（1994）を参照のこと）。プラスミドを、ブライ－ダイアー単相又は100mMのOGPのいづれかに溶解した。ポリ－Ｌ－リシン又はDODACを、プラスミド10ｇに１：１の電荷比で添

加した。

アガロースゲル電気泳動

プラスミド及びポリ－Ｌ－リシンを含む複合体を、100mMのOGPの存在下で、10ｇ／mlの核酸濃度及び１：１の電荷比で形成した。カチオン性脂質DODAC及びプラスミドを含む複合体を、10ｇ／mlのプラスミド濃度及び高まる濃度のDODAC（10～320ｎモル／ml）で形成した。混合物を、0.8％のアガロースゲル上に負荷する前、室温で30分間インキュベートした。電気泳動を、標準技法に従ってTBE緩衝液において行なった（Sambrookなど., Molecular Cloning：A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, New York（1989））。核酸を、UVトランスイルミネーションによる写真により、臭化エチジウムによるゲルの染色後（0.5ｇ／ml, 20分）、可視化した。

DNアーゼＩアッセイ

DNAに対するカチオン性脂質の保護効果を評価するために、OGPの存在下で形成された複合体を、DNアーゼＩと共にインキュベートした。予備形成された電荷中和された脂質－核酸複合体（プラスミド／DODAC；１：１の電荷比）を、DNアーゼＩと共に、プラスミドのみが37℃で10分間の分解に対して敏感である濃度で混合した。反応を、25mMのEDTAの添加により停止せしめ、そしてサンプルを150mMのNaClの存在下でブライ－ダイアー方法を用いて抽出した。それらの条件下で、電荷中和された脂質－核酸複合体は解離し、そしてプラスミドが水性画分において効果的に回収され得る。このDNAを、３Ｍの酢酸ナトリウム（pH5.2）１／10体積及び95％ Etor 12.5体積により沈殿せしめ、そして14,000ｇで30分間、４℃での遠心分離により回収した。DNAペレットを、無菌蒸留水に再懸濁し、そして0.8％のアガロースゲル上での電気泳動にゆだねた。

例１

この例は、逆相法又は界面活性剤透析法のいづれかを用いての脂質粒子によるプラスミドの封入を示す。

逆相法

pCMV４－CATプラスミドを、約10mg又は20mgの脂質を用いて構成された脂質粒子に封した。その封入法は、取り込みのために従来の逆相法の変法を包含した。一般的に、１：2.1のモル％比でのクロロホルム：メタノール1.050mlを、２μｌの^{14}Ｃ－コレステリルヘキサデシルエーテル（6.66μｌ／μCi）を含む脂質フィルムに添加した。これに、続いて、220μｌの水及び33μｌの^{3}Ｈ－pCMVCATプラスミド（158,000dpm／μｌ；1.5mg／ml）を添加した。この組合せは、透明な単相を提供した。クロロホルム及びほとんどのメタノールを、振盪しながら、窒素滴下で除去した。いくつかの場合、封入されたプラスミドのその得られる懸濁液250μｌを、水１mlにより希釈し、そして１つの400nmのフィルターに５度、押出し、続いて１つの200nmのフィルターに５度、押出した。得られる小胞のサイズは直径約150～200nmであった。押出しの前のリポソームのサイズは、脂質組成に依存してひじょうに異なった。

界面活性剤透析法

pCMVCATを、１Ｍのｎ－オクチル－β－Ｄ－グルコピラノシド100μｌ及び水400μｌにおいて、室温で30分間、種々のDODAC濃度でのDODACと共にインキュベートした。得られるプラスミド：DODAC混合物を、１Ｍのｎ－オクチル－β－Ｄ－グルコピラノシド100μｌ中、^{14}Ｃ－コレステリルヘキサデシルエーテル（6.66μｌ／μCi）１μｌを含む脂質約10mgの懸濁液に添加した。その懸濁液を、7.4のpHで、HBSに対して一晩、透析した。その得られる封入されたプラスミドは、さらなる分類を伴わないで使用され得た。

例２

この例は、アニオン交換クロマトグラフィーを用いての外部媒体からのプラスミド“保護”のレベルを示す。

外部媒体からのプラスミドの封入又は保護の程度を、次の通りにして、アニオン交換クロマトグラフィーにより評価した：個々のサンプル50μｌアリコートを、DEAE Sepharose CL－6Bカラム上で溶離し、そして画分を、シンチレーションカウンティングにより^{3}Ｈ－プラスミド及び^{14}Ｃ－脂質の両者について評価した。いづれかの暴露される負の電荷、たと

えばDNA分子上に存在するそれらの電荷が、アニオン交換カラムに結合し、そして^{14}Ｃ－脂質と共に溶出しないであろう。“保護された”又は“暴露されていない”、負の電荷を有するDNAは、アニオン交換樹脂に結合せず、そして^{14}Ｃ－脂質と共に溶出するであろう。他方、プラスミドDNAは、指示色素、Pico Green▲R▼を用いて測定された。

逆相法

図４は、アニオン交換クロマトグラフィーにより測定される場合、配合物に存在するDODACの量と、400nmのフィルター及び200nmのフィルターを通しての押出しの後、POPC：DODAC：PEG－Cer－C_{20}（20mgの合計脂質）組成物についての封入効率との間の関係を記載する結果を示す。脂質は10％のPEG－Cer－C_{20}から構成され、そして残る％は、POPC及びDODACに寄与した。回収される％プラスミドの上昇が、DODAC濃度の上昇に対応して観察された。プラスミドはDODACの不在下で回収されなかったが、ところが1.5モル％のDODAC濃度で、90％のプラスミドが、200nmのフィルターを通しての押出しの後、回収された。200nmのフィルターを通しての押出しから回収されるプラスミドのほぼ100％がアニオン交換クロマトグラフィーにより回収され（図５）、これは、回収されたプラスミドのすべてが封入されたことを示唆する。これは、約70％の全体の封入効率に対応した。押出し及びアニオン交換クロマトグラフィーの後の脂質回収率は、400nmのフィルターを通しての押出しの後、90％であり、そして200nmのフィルターを通しての押出しの後、70％であった（図６を参照のこと）。200nmのフィルターを通しての押出しの後に回収された70％の脂質のうち、ほぼ100％がアニオン交換クロマトグラフィー処理の後に回収された（図７）。押出し及びアニオン交換クロマトグラフィー処理後の脂質及びプラスミドの回収率はほぼ同一であった。表１は、いくつかの異なった脂質組成を用いての封入効率を示す。広範囲の脂質組成が使用され得ることは明確である。PEG－Cerは、それらの脂質組成の多くにおいて必要ではないと思われることを注目することはまた興味あることである。

表１．改良された逆相法によるプラスミドDNA 封入化のいくつかの例。

データは、少なくとも70％の脂質がアニオン交換クロマトグラフィーにより回収される場合のみ示される。

逆相

脂質組成	％封入
EPC-DODAC (98.9:1.1)	98％
DOPE : EPC : DODAC (10:88.9:1.1)	24％
DOPE : EPC : DODAC (20:78.9:1.1)	13％
DOPE : EPC : DODAC (40:58.9:1.1)	16％
DOPE : EPC : DODAC-(10:85.5:4.5)	78％
DOPE : EPC : DODAC (15:80.5:4.5)	67％
DOPE : SM : EPC : DODAC (15:40:40:5)	53％
DOPE : SM : EPC : DODAC (20:37.5:37.5:5)	37％
DOPE : EPC : DODAC : PEG－Cer －C8 (25:64:1:10)	83％
DOPE : EPC : DODAC : PEG－Cer －C8 (50:39:1:10)	90％

透析法

図８は、アニオン交換クロマトグラフィーにより測定される場合、配合物に存在するDODACの量と、DOPE：DODAC；PEG－Cer－C_{20}（84：６：10）についての封入化効率との間の関係を記載する結果を示す。表２は、いくつかの異なった脂質組成を用いての封入化効率を示す。広範囲の種類の脂質組成が使用され得ることは明らかである。PEG－Cerはそれらの脂質組成に必要であると思われることは注目すべきである。

表２．界面活性剤透析法によるプラスミドDNA 封入化のいくつかの例。

データは、少なくとも70％の脂質がアニオン交換クロマトグラフィーにより回収される場合のみ示される。

界面活性剤透析

脂 質 組 成	%封入率	DNAの量	注 解
DOPE:DODAC:PEG-CER-C_{14} (79:6:15)	64%	50μg-400 μg/10μモルの脂質	150mM のNaClに対して透析された
DOPE:DODAC:PEG-CER-C_{14} (84:6:10)	60%	50μg-400 μg/10μモルの脂質	150mM のNaClに対して透析された
DOPE:DODAC:PEG-CER-C_{30} (84:6:10)	52%	50μg-400 μg/10μモルの脂質	150mM のNaClに対して透析された
DOPE:DODAC:EPC: PEG-CER-C_{14} (59:6:20:15)	20%	50μg-400 μg/10μモルの脂質	150mM のNaClに対して透析された
DOPE:DODAC:DOPC: PEG-CER-C_{14} (74:6:10:10)	36%	50μg-400 μg/10μモルの脂質	150mM のNaClに対して透析された
DOPE:DODAC:DOPC: PEG-CER-C_{14} (64:6:20:10)	17%	50μg-400 μg/10μモルの脂質	150mM のNaClに対して透析された
DOPE:DODAC:PEC:Chol:PEG-CER-C_{14} (41:9:20:20:10)	57%	50μg-400 μg/10μモルの脂質	150mM のNaClに対して透析された
DOPE:DODAC:PEC:Chol:PEG-CER-C_{14} (51:9:20:10:10)	50%	50μg-400 μg/10μモルの脂質	150mM のNaClに対して透析された
DOPE:DODAC:PEG-C_{14} (80:10:10)	22.5%	50μg-400 μg/10μモルの脂質	150mM のNaClに対して透析された
DOPE:DODAC:PEG-C_{14} (79:11:10)	22.7%	50μg-400 μg/10μモルの脂質	300mM のNaClに対して透析された
DOPE:DODAC:PEG-C_{30} (89.4:0.6:10)	57%	50μg/10μモルの脂質	300mM のNaClに対して透析された
DOPE:DODAC:PEG-CER-C_{14} (*87:3:10)	51%	50μg/10μモルの脂質	50mMのNaClに対して透析された*

＊ 例６を参照のこと。

例３

この例は、例１の方法により調製されたプラスミド：脂質粒子を用いて達成される血清安定性を示す。

プラスミド－脂質粒子の血清安定性を確立するために、例１の逆相及び透析法に従って調製された粒子混合物のアリコートを、80％マウス血清（Cedar Lane）において37℃で30分間、インキュベートした。インキュベーションの前、脂質関連プラスミドを、DEAE Sepharose CL－6Bカラムに通し、封入されていないプラスミドを除去した。インキュベーションに続いて、そのインキュベーション混合物のアリコートを、Sepharose CL－4Bカラム上でHBSにより溶離した。

対照として、遊離^{3}Ｈ－pCMVCAT 1.5mgを、Sepharose CL－4Bカラム上でHBS（pH7.4）により溶離した（図９Ａを参照のこと）。比較のために、遊離^{3}Ｈ－pCMVCAT 1.5mgを、マウス血清500μｌと共に37℃で30分間インキュベートし、そして同じ態様で溶離した（図９Ｂ）。図９Ａにおいては、遊離プラスミドがカラムのボイド体積に溶離し、ところが図９Ｂにおいては、血清においてインキュベートされたプラスミドは包含される体積に溶離し、これはプラスミドが血清酵素により消化されたことを示唆することを注目すべきである。

逆相により調製されたプラスミド－脂質粒子の血清安定性

プラスミド－脂質粒子の安定性を、マウス血清（Cedar Lane）500μｌにおいて、前記粒子50μｌを37℃で15分間インキュベートすることによって評価した。そのインキュベーション混合物の500μｌアリコートを、Sepharose CL－4Bカラム上でHBSにより溶離した（図10）。ボイド体積へのプラスミド及び脂質の同時移動は、プラスミドの分解が生じなかったことを強く示唆する。血清分解されたプラスミド又は脂質は、画35近くで、ピークとして検出されるべきである（図９Ｂにおける対照の結果を参照のこと）。

透析により調製されたプラスミド－脂質粒子の血清安定性

粒子懸濁液50μｌアリコートを、マウス血清500μｌと共に、37℃で30分間インキュベートし、そして上記のようにして、Sepharose CL－4Bカラム上で溶離した。図11は、血清におけるインキュベーションの後のサンプルの溶離プロフィールを示す。図11Ａに見られるように、プラスミドの94％がボイド体積に回収され、これは、アニオン交換クロマトグラフィーから回収されたプラスミドの実質的にすべてが封入されたことを示唆する。

この実験が封入に影響を及ぼし、そして配合物における脂質による血清ヌクレアーゼの阻害に影響を及ぼさないことを示すために、アニオン交換クロマトグラフィーにより処理されていない封入されたプラスミドDNA配合物を、マウス血清と共に30分間インキュベートした（図11Ｂ）。封入されたプラスミドDNAの47％が包含された体積に溶離され、そして53％がカラムのボイド体積に溶離された。アニオン交換クロマトグラフィーにより測定されるような取込み効率は55％であった。

例４

この例は、DNアーゼＩ消化に対するプラスミド：脂質粒子のインビトロ耐性を示す。プラスミドDNAへのDOPE－DODAC（50：50）小胞の添加により形成される複合体を、封入された配合物（DOPE：DODAC：PEG－Cer－C_{14}；84：６：10）に比較した。サンプルをDNアーゼＩと共にインキュベートし、PCR（ポリメラーゼ鎖反応）により増幅し、そしてアガロースゲル上で走行せしめた。DNAバンドを臭化エチジウムにより可視化した。複合体は界面活性剤の不在下で（レーン９）、DNアーゼＩにおいて安定しておらず（図12Ａ）、そして封入されたプラスミド（図12Ｂ）は、安定していた（レーン９）。

例５

この例は、封入効率に対するプラスミド濃度の依存性を示す。

pCMVCATプラスミドを、例１に記載されるようにして、界面活性剤透析により脂質粒子に封入した。封入は、試験されたすべての濃度について約50％～60％であった（図13）。封入効率は、研究された範囲にわたってプラスミド濃度に無関係であった。

例６

この例は、NaCl濃度に対する取込みのための最適DODAC濃度の依存性を示す。

取込みのための最適DODAC濃度は、脂質組成に依存するのみならず、また、透析緩衝液のNaCl濃度にも依存することが見出された。pCMVCATプラスミドを、例１に記載のようにして、界面活性剤透析により脂質粒子に封入した。図14は、異なったNaCl濃度でのpCMVCATプラスミドの封入のための最適DODAC濃度を示す。膜において必要とされるDODACの量が、透

析の間、NaCl濃度を単に変えることによって、予測できる態様で調節され得ることが注目される。

例７

この例は、Nicomp Submicron Particle Sizer（Model 370）を用いて準弾性光散乱により測定されるようなプラスミド－脂質粒子のサイズ分布を示す。

界面活性剤透析

プラスミド－脂質粒子を、例１に記載のようにして界面活性剤透析により調製した。脂質組成は、DOPE：DODAC：PEO－Cer－C_{20}であった。粒子を、Nicomp Submicron Sizerを用いてサイズ分けした。図15は、体積重量測定を示し、そして図16は数重量測定を示す。

例８

この例は、低温電子顕微鏡により測定されるようなプラスミド－脂質粒子のサイズ分布及び構造を示す。

低温電子顕微鏡は、リポソーム形状を研究するために通常使用されて来た比較的安全な技法である。リポソームは、比較的電子密集性のリン酸末端基のためにガラス状の氷層において認識できる。同じことがDNAに適用できる。なぜならば、DNAは多くのリン酸基から成るからである。

低温電子顕微鏡は、前に記載されるようにして実施された（Chakrabartiなど., 1992；Wheelerなど., 1994）。プラスミドDNAを含む小胞は、分画遠心により配合物から富化された。配合物の500μｌアリコートを、超遠心分離において、60,000×ｇで90分間、遠心分離した。その上清液をデカントし、そしてペレットをHBS 100mlに再懸濁した。その懸濁液の液滴を700メッシュの全グリッド上に配置し、Whatman No. 50のフィルター紙により後ろからブロットし、薄層を形成し、そしてReichart Jung Universal Cryo Fixationシステム（Reichart Corp）において液体窒素により冷却された液体エタン中に沈めることによってガラス状にした。グリッドを、Gatan 126コールドステージを備えたZeiss 10C STEM電子顕微鏡に移した。前記ステージ及びアンチコンタミネーターを、液体窒素により、それぞれ120Ｋ及び115Ｋに維持した。薄いガラス状の氷の領域を、60kVの加速電圧により観察した。

図17Ａは、封入されたプラスミドDNA配合物の低温電子顕微鏡写真である。この調製のためには、400μｇのプラスミドDNAを使用した。脂質組成はDOPE：DODAC：PEG－Cer－C_{14}（84：６：10）であった。小さな矢印は、直径約100nmの空のリポソームを示す。それらを、電子密集中心を含む脂質粒子（大きな矢印）に比較する。それらの電子密集中心は、たぶんプラスミドDNAに対応する。それらの構造体は、DNAの不在下で製造された配合物に見出されなかった（図17Ｂ）。

例９

この例は、マウスにおけるプラスミド：脂質粒子の血液クリアランスを示す。

逆相

封入されたプラスミド血液クリアランスを、時間に対する％回収された量の関数として、３匹のICRマウスにおいて試験した。遊離^{3}Ｈ－プラスミドの％回収率を、対照として類似する時間にわたってプロットした（図18を参照のこと）。封入されたプラスミドは、^{3}Ｈ－プラスミドのクリアランス速度よりも遅いクリアランス速度を示す。さらに、プラスミド：脂質の比は、実験の間にわたって実質的に変化せず、このことは、プラスミドのクリアランス速度が脂質キャリヤー自体のクリアランス速度に関連していることを示唆する。

界面活性剤透析

DOPE：DODAC：PEG－Cer－C_{14}又はDOPE：DODAC：PEG－Cer－C_{20}（84：６：10，モル％）に封入されたpCMVCATのフソゲン粒子を次の通りにして調製した：

pCMVCAT（50μｇ）（42μｌの^{3}Ｈ－pCMVCAT；108dpm／ml，1.19mg／ml）を、１ＭのOGP 100μｌ及び水400μｌ下でDODACと共に室温で30分間インキュベートした。このDNA：DODAC複合体混合物を、DOPE－PEG－Cer－C_{14}又はDOPE：PEG－Cer－C_{20}の懸濁液に添加し、そして粒子を例１に記載のようにして（界面活性剤透析）、構成した。血液クリアランス研究のためのプラスミド：脂質粒子は、１ＭのOGP 100μｌ及び水400μｌ中、^{14}Ｃ－コレス

テリルヘキサデシルエーテル（CHE）（6.66μｌ／μCi）0.75μｌを含んだ。
DOPE：DODAC：PEG－Cer－C_{14}及びDOPE：DODAC：PEG－Cer－C_{20}（84：６：10）に封入されたpCMVCATのクリアランス
外部の“封入された”DNAを、マウス中への注入の前、DEAE Sepharose CL－6Bを用いてアニオン交換クロマトグラフィーにより除去した。封入効率は、PEG－Cer－C_{20}を含むシステムのためには約42％であり、そしてPEG－Cer－C_{14}を含むシステムのためには60％であった。
３匹の雌のICRマウス（20～25ｇ）からなる３つのグループのマウスに、プラスミド：脂質粒子により封入されたDNA 200μｌを注射した。１つのグループのマウスを殺し、そして血液を３つの時点のそれぞれで採血した（１，２及び５時間）。血漿を、0.5mlのEDTA被覆されたTainer管において遠心分離により完全な血液から分離した。個々のマウスからの血漿の200μｌアリコートを、シンチレーションカウンティングにより、^{3}Ｈ－DNA及び^{14}Ｃ－脂質について分析した。
図19Ａは、DOPE：DODAC：PEG－Cer－C_{20}（84：６：10）から構成される粒子に封入されたDNAのクリアランスを示す。DNA及び脂質は、DOPE：DODAC：PEG－Cer－C_{14}組成が使用される場合よりも循環からよりも急速にクリアランスされなかった。脂質及びDNAの50％近くが、２時間後、存在する。有意な量のDNA及び脂質が、５時間後、存在した。注入されたDNA及び脂質の量は、それぞれ1.8μｇ及び855μｇであった。
図19Ｂは、DOPE：DODAC：PEG－Cer－C_{14}（84：６，モル％）から構成される粒子に封入されたDNAのクリアランスを示す。DNA及び脂質の両者は循環から急速にクリアランスされ、脂質のわずか約20％及びDNAの10％が、１時間後、血漿に存在する。注入されたDNA及び脂質の量は、それぞれ2.7μｇ及び912μｇであった。
例10
この例は、組織培養におてい増殖されたBHK細胞のインビトロトランスフェクションを示す。
例11
この例は、マウスにおける組織のインビボトランスフェクションを示す。
肺、肝臓及び脾臓におけるインビボトランスフェクション
四匹のICRマウスから成る３つのグループのマウスの尾の静脈を通して、例７に記載のようにして調製された、DOPE：DODAC：PEG－Cer－C_{14}（84：６：10）又はDOPE：DODAC：PEG－Cer－C_{20}から成る脂質粒子に封入されたpCMVCATを注入した。マウスを２，４及び８日後に殺し、そして肺、肝臓及び脾臓を、Deigh, Anal. Biochem., 156：251-256（1986）の変法に従って、CAT活性についてアッセイした。注入されるプラスミドの量は、PEG－Cer－C_{14}を含む粒子については2.6μｇであり、そしてPEG－Cer－C_{20}を含む粒子については1.5μｇであった。
図20は、肺において達成されたインビボトランスフェクションの結果を示す。この図から見出され得るように、DOPE：DODAC：PEG－Cer－C_{14}により処理は４日までのトランスフェクション（CAT活性に基づく）をもたらした。DOPE：DODAC：PEG－Cer－C_{20}（全体的に低いCAT活性レベルをもたらす）は、８日間にわたって、比較的一定のレベルの酵素活性を付与した。
図21は、肝臓において達成されたトランスフェクションの結果を示す。両配合物に関して、トランスフェクション（及びCAT活性）は、４日で最大に達した。
図22は、脾臓において達成されたトランスフェクションの結果を示し、ここで最大のトランスフェクションは、両配合物に関して、２日後に生じることが見出された。
図12－18は、電荷中和された脂質－核酸中間複合体の形成及び特徴化を示し、ここで核酸は疎水性特徴を採用する。それらの例の個々において、用語“DNA”又は“プラスミド”とは、プラスミドpCMVβを言及する。例19及び20は、細胞のトランスフェクションのために適切である脂質－核酸粒子の調製及び特徴化を示す。例21～23は、それらの脂質－核酸粒子の血清安定性及びトランスフェクション能力を示す。
例12

この例は、疎水性電荷中和された脂質－核酸複合体の形成をもたらすことにおける、カチオン性脂質及び非カチオン性脂質の比較を提供する。
LIPOFECTIN▲R▼は、DOTMA及びDOPE（50：50のモル比，Felgnerなど.，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84：7413-7417（1987）を参照のこと）から構成される、音波処理された単層小胞から成る。リポソームを水において調製し、そして１mg／mlの合成脂質濃度で供給する。DNA（10μｇ）を、例２に記載されるようにして、水においてリポソームと共に混合し、０～160ｎモルの合計脂質を提供した。混合物の個々を、ブライ－ダイアー法を用いて抽出した。驚くべき事には、LIPOFECTIN▲R▼の存在下で、水性相から回収されたDNAにおいて濃度依存性低下が存在した（図23を参照のこと）。DNA 10μｇへの合計脂質80ｎモルの添加は、水性相からのDNAの95％以上の損失をもたらした。この効果は、卵ホスファチジルコリン／DOPE（50：50のモル比）から調製されたリポソームを用いて達成され得なかった。従って、形成し、そして有機相中に引き込まれる疎水性複合体は、その複合体に存在するカチオン性脂質の結果である。

例13

この例は、有機溶媒中に分割する疎水性の電荷中和された脂質－核酸複合体を形成することにおけるいくつかのカチオン性脂質の比較を提供する。
精製されたれ一価カチオン性脂質（DOTMA，DDAB及びDODAC）をそれぞれ、ブライ－ダイアー単相溶媒システムにおけるDNAに添加した。その得られる混合物を、水及びクロロホルムの添加により２つの相にそれぞれ分けた。プラスミドDNAレベルを、上記のようにして、水性相及び有機相において決定した。結果は図24に示されており、そして図23に示される結果と矛盾しない。特に、水性相からDNAのカチオン性脂質依存性損失が見出された（図24Ａ）。水性／有機界面で沈殿された材料の見える証拠は存在せず、そしてその界面を包含するよう集められたサンプル中のDNAの定量化は、評価できるDNAレベルを説明することはできなかった（結果は示されていない）。DNAは、有機相に定量的に移行されたことが見出された（図24Ｂ）。さらに、単相におけるDNAの95％以上が、40ｎモルの一価のカチオン性脂質が添加される場合に、その有機相から回収され得た。この値は、80ｎモルのLIPOFECTIN▲R▼（50モル％のDOTMA）が水性相からのDNAの完全な損失をもたらす図23に示される結果と同一である。図24に示される結果は、３種の異なった一価のカチオン性脂質が、使用される条件下で類似する態様で挙動することを示唆する。

例14

この例は、有機溶媒中に分離するDNAに対する多価カチオン性脂質及びカチオン性非脂質種の影響を示す。
LIPOFECTAMINE▲R▼（DOSPA：DOPE，75：25のモル比）及びTRANSFECTAM▲R▼（100％ DOGS）を、例13に記載のようにして、予備形成されたリポソームとしてDNA（10μｇ）に添加した。リポソームは、スペルミンに由来する末端基を含む、そしてpH＜７で、それぞれ５及び４の正の電荷を示す。予測されるように、有意に低い量のそれらの脂質（モルに基づいて計算された）が、有機相中に分離するDNAを仲介するために必要とされる（図24を参照のこと）。有機相中へのDNAの完全な分離は、約10ｎモルのDOSPA及びDOGSの添加の後に達成された。
前の研究は、DNAが、そのDNAリン酸の電荷が少なくとも90％中和される場合、小さなトロイド又は棒状形の構造体に濃縮することを示した（Wilsonなど.，Biochemistry 18：2192-2196（1979）を参照のこと）。従って、図24に示されるデータは、カチオン／リン酸電荷比の関数として表わされた（図25Ａ及び25Ｂ）。比較のために、非脂質基材の一価（リシン）、二価（カルシウム）及び多価（ポリ－Ｌ－リシン）カチオンの添加の後に得られる結果が包含される（図25Ｃ及び25Ｄ）。図25に示される結果は、一価のカチオン性脂質に関しては、99％以上のDNAが、１以上の＋／－電荷比が達成される場合、有機相中に分離することを示す。類似する結果が、多価脂質のDOSPA及びDOGSが使用される場合に観察されたが、但しわずかに高い電荷比が十分なDNA移行を仲介するためには必要とされた。しかしながら、有機相中に分離するDNA、単純な電荷の中和の結果として生じなかった。DNAが非脂質カチオンと４までの及び４以上の電荷比で混合される場合、DNAの大部分は水

性相において一定不変的に回収された。

例15

この例は、例12～14に記載されるようにして形成された、疎水性の電荷中和された脂質－核酸複合体が、縮合されていない（保護されていない）形状で核酸を供給することを示す。

疎水性の電荷中和された脂質－核酸複合体の評価を、その複合体における核酸への小さな蛍光プローブの結合する能力を評価することによって実施した。この評価は、臭化エチジウムを用いてのアプローチに類似する（Gershonなど., Biochemistry 32：7143-7151（1993）を参照のこと）。TO－PRO－１は、より感受性の、膜不透過性の、核酸をインターカレートする色素であり、そして従って、DNA結合のより厳格な試験を提供する。DNAを、ブライ－ダイアー単相において一価のカチオン性脂質又はポリ－Ｌ－リシンのいづれかと共に混合した（図26Ａ）。次に、TO－PRO－１を添加し、１μＭの最終濃度にし、そして蛍光を533nmで測定した（509nmでのプローブの励起）。DNAの不在下で、蛍光は観察されなかった。しかしながら、プラスミドDNAが添加される場合（10μｇ／ml）、533nmでの蛍光が600倍以上、上昇した。TO－PRO－１がDNA／ポリ－１－リシン混合物に添加される場合、蛍光は観察されなかった。これは、電荷の中和化のために縮合された状態でのDNAの存在と矛盾しない。劇的な対比、すなわち疎水性の電荷中和された脂質－核酸複合体（プラスミド／DODAC複合体）へのTO－PRO－１の添加においては、TO－PRO－１結合は排除されなかった。この結果は、疎水性複合体内のDNAが縮合した構造体として存在しない概念と矛盾しない。図26Ｂは、TO－PRO－１が、100mMのOGP（非イオン性界面活性剤）の存在下データ、ポリ－Ｌ－リシン、又はカチオン性脂質DODACのいづれかと混合されたプラスミドDNAに添加される場合、類似する結果が得られることを示す。

例16

この例は、界面活性剤溶液における、疎水性の電荷中和された脂質－核酸複合体の安定性（図27）及び添加される塩の存在下での不安定性（図28）を示す。

プラスミドDNA（10μｇ）を、例12に記載されるようにして、ブライ－ダイアー単相において40ｎモルのDODACと共に混合した。OGPを添加し、20mM（１mlにおいて20μモル）までの濃度を達成し、その後、サンプルを２つの相に分離した。この濃度は、単相システムを破壊しないで、OGPの２Ｍ原液から添加され得る最大量であった。OGP濃度にもかかわらず、99％以上のDNAが有機相中に分離し、これは疎水性の電荷中和された複合体の安定性を示す。

疎水性の電荷中和された脂質－核酸複合体の安定性に対するNaClの濃度上昇の効果をまた評価した。図28に示されるように、DNAへの一価のカチオン性脂質の結合が、１μモルのNaClの存在下で完全に阻害された。このレベルで、Na^+は、添加されるカチオン性脂質の量に対して25モル過剰で存在する。予測されるように、DNAと多価脂質DOSPAとの間の複合体は、NaClの存在下でより安定していた。実際、DOSPAに対して300倍のモル過剰でのNa^+の添加は、水性相中への添加中和された脂質－核酸複合体の分離を引き起こさなかった。

例17

この例は、アガロースゲル電気泳動によるDNA移動に対するカチオン性脂質結合性の影響を示す。

図29Ａは、ポリ－Ｌ－リシン縮合されたDNA対照のゲル移動度に比較して、OGPの存在下で製造された、電荷中和された脂質－核酸複合体のゲル移動度特徴を示す。レーン２は、非脂質基材のDNA／ポリ－Ｌ－リシン複合体がアガロースゲルにおいて有意に減じられた移動度を示すことを示す。この結果は、カチオン性リボソームにより縮合されたDNAが適用される電界内で移動しない高分子構造体を採用することを示している研究と矛盾しない（Bertlingなど., Biotechnol. Appl. Biochem. 13：390-405（1991）を参照のこと）。この効果は、電荷の中和の結果、及び／又は分子サイズの上昇の結果であり得る。対照的に、DNAが例12の条件下でカチオン性脂質と共に混合される場合、DNAの移動が変更された徴候は存在しない（図29Ａ、レーン３－５を参照のこと）。それらの研究は、本発明の方法を用いてのDNAへのカチオン性脂質の結合がDNAの縮合をもたらさないことを示唆するさら

なる証拠を提供する。しかしながら、DNA移動度の変化が、カチオン性脂質濃度が２つのカチオン性脂質：DNAリン酸の電荷比以上に上昇する場合に観察された（レーン６～８を参照のこと）。たとえば、320ｎモルのDODACの添加は、ゲル中に移動するDNAの低下及びゲルの上部近くへの少ない割合のDNAの移動をもたらした。これは、DNAの縮合が過剰のカチオン性脂質により達成され得ることを示す。

例18

この例は、酵素消化からプラスミドDNAを保護するカチオン性脂質の能力を示す。

酵素消化からプラスミドDNAを保護するカチオン性脂質の能力を決定するために、脂質－核酸複合体のDNアーゼＩ仲介の分解性をまた、アガローズゲル電気泳動を用いて評価した（図29Ｂを参照のこと）。それらの実験においては、OGP溶液中、プラスミドを、小さなDNAフラグメントを生成するために十分な量のDNアーゼＩと共に、37℃で10分間のインキュベーションの後、混合した（レーン２）。レーン１は、対照としての消化されていないプラスミドを示す。同一の条件下で、複合体（非カチオン性脂質DODACにより複合体化されたプラスミド）は、DNアーゼＩの酵素活性に対して保護されなかった（レーン４）。DNアーゼＩの不在下で複合体から抽出されたDNA（レーン３）は、損なわれていないDNAを示す。これは、脂質－核酸複合体における核酸が縮合されていない状態で存在し、そして分解に対して敏感であるさらなる証拠を提供する。

例19

この例は、β－gal，DODAC及びESMの脂質－核酸粒子の調製を示す。

カチオン性脂質DODAC、非カチオン性脂質ESM、及び核酸β－galプラスミドを、“逆順序の方策”（図30を参照のこと）の界面活性剤透析法を用いて次の通りに配合した：

DNA（200mMの水性OGP 200μｌ中、10μｇ）、DODAC（OGP 400μｌ中、160ｎモル）及びESM（OGP 400μｌ中、160ｎモル）の個々の溶液を調製した。ESM及びDODAC溶液を、10～20パルスの低い力でそれぞれ音波処理した。次に、DNA溶液を、ESM溶液に添加し、そしてその混合物を、室温で0.5時間インキュベートした。DODAC溶液を、DNA／ESM混合物に、遅い速度でかきまぜながらゆっくりと添加した。得られる混合物（１ml）を、SPECTRA／POR，mwco：14～14,000透析管（Fisher Scientific）に配置し、そして滅菌蒸留水２ｌに対し、６回変えながら、36時間にわたって透析した。形成される複合体のサイズ分布を、準弾性光散乱（QELS）技法（632.8nmの波長で作動するNicomp 370粒子分類機）を用いて決定した。図31は、２種の粒子集団が観察され、１つのグループは50～150nmで分類され、そして第２のグループは500～1000nmで分類されたことを示す。個々相対数は、使用される非カチオン性脂質のタイプ、２種の脂質成分の量及び濃度、及びDNA／脂質比に依存した。混合物の相体体積の約20～40％が、合計の粒子数の90％以上を占める小さなサイズの複合体であった。

例20

この例は、脂質－核酸粒子におけるDNAの縮合の状態を示す。

螢光色素（TO－PRO－１）を用いて、脂質－核酸粒子におけるDNAの縮合の状態を評価した。脂質－核酸粒子（例19に示されるプロトコールにより調製されたプラスミドDNA ２μｇを含む）の200μｌアリコートを、100mMのOGP １mlに希釈した。TO－PRO－１を添加し、最終濃度を１μＭにした。螢光を測定するために、分光螢光測定を、509nmの励起波長及び533nmの発光波長を有するLuminescence Spectrometer 50Ｂ（Perkin Elmer Ltd.，Buckinghamshire，Englandを用いて行なった。結果は図32に与えられており、ここで値は、任意螢光単位として示される。図32に示されるように、DODAC／ESMを含む脂質－核酸複合体におけるプラスミドDNAは、その脂質成分により縮合され、又は保護される。さらに、界面活性剤は、前記複合体を溶解し、DNAを縮合解除することができる（図32を参照のこと）。

DODAC／DOPEを含む脂質－核酸粒子におけるDNAは、４：１の脂質／DNA電荷比（＋／－）でTO－PRO－１に一部、接近するが、しかしながら、８：１の比で、DNAは脂質成分により完全に保護される。この結果は、核酸（DNA）が、より低い電荷比で一部、縮合され、そしてより高い比で、完全に縮合されることを示唆する（図32）。

例21

この例は、リン酸緩衝溶液及び血清含有媒体における脂質－核酸粒子の安定性を示す。

脂質－核酸粒子配合物を、例19に記載される方法に従って調製した。その配合物（中性脂質としてESM又はDOPEのいづれかを用いる）の一部を、PBS（140mMのNaCl，10mMのNa_2HPO_4）又は血清含有媒体と共に組合し、そして37℃で２時間インキュベートした。得られる複合体を単離し、そしてQ ELSサイズを結果のいづれかの変化又はトランスフェクション効率について試験した。その配合物のいづれかに対しても、差異は見出されず、このことは、複合体がナトリウム又は血清成分のいづれによっても破壊されなかったことを示唆する。PBSと共に10日間インキュベートされた１つの部分もまた、ひじょうに良好なトランスフェクション効率を示した。

例22

この例は、脂質－核酸粒子により付与されるDNAのDNアーゼＩに対する保護を示す。

10μｇのDNA，160ｎモルのDODAC及び160ｎモルのESMから成る、合計体積１mlの脂質－核酸粒子配合物を、例19に記載される方法に従って調製した。DNアーゼＩによる消化に対するこの配合物におけるDNAの感受性を、OGPの存在下でDNアーゼＩと共にその配合物を混合することによって評価した（１：１の電荷比）。DNアーゼＩのレベルは、37℃で10分以内は、複合体解除されたDNAを分解するそのレベルに等しかった。反応を、25mMのEDTAの添加により、10分後に停止した。DNAをブライ－ダイアー抽出法を用いて、150mMのNaClの存在下で抽出した。それらの条件下で、カチオン性脂質／DNA複合体は解離し、そしてその得られるDNAを、水性画分から効果的に回収することができる。このDNAを、１／10体積の３Ｍの酢酸ナトリウム（pH5.2）及び2.5体積の95％エタノールにより沈殿せしめ、そして14,000ｇで、４℃で30分間の遠心分離により回収した。DNAペレットを無菌蒸留水に再懸濁し、そして0.8％のアガロースゲル（Gibco，BRL）上での電気泳動にゆだねた。図33に示されるように、ESMを含む複合体は、DNアーゼＩ分解からのDNAの保護を付与する。

例23

この例は、例19の方法により調製された脂質－核酸粒子を用いてのCHO又はＢ16細胞系のインビトロトランスフェクションを示す。

インビトロトランスフェクションを、Chinese Hamster卵巣（CHO）又はネズミ黒色腫（Ｂ16）細胞系のいづれかの50％集密的増殖物を含む96－ウェル細胞培養プレート（Costar，Cambridge，Massachusetts，USA）を用いて行なった。適切な量（約６～50μｌ）の脂質－核酸粒子配合物（10μｇのDNA／ml）を、10％血清を含む培地と共に予備混合し、最終体積を150μｌにした。細胞を囲む培地を、注射器を用いて除去し、そして10％血清含有培地における脂質－核酸粒子により交換した。細胞及び複合体をさらに48時間、37℃でインキュベートした。トランスフェクション効率を、β－gal染色又は酵素アッセイを用いて評価した。結果は図34に示される。

そのトランスフェクション研究は、ESM－含有複合体及びDOPE含有複合体による卓越したトランスフェクション効率を示した（示されていない）。３：１～４：１のカチオン性脂質：DNAの電荷比が、最良のインビトロトランスフェクション結果を付与した。

例24

この例は、100mM（Ａ）又は20mM（Ｂ）のｎ－オクチル－β－Ｄ－グルコピラノシド（OGP）の存在下で、下記のようにして調製された核酸：脂質粒子の性質を示す。

このプロトコールは、OGP中、pCMVβ DNAの溶液の調製物及び脂質－界面活性剤混合されたミセルを包含する。DODAC及び中性脂質を、DNA溶液を希釈するために使用される同じ濃度のOGPに溶解した。脂質が完全に溶解されたことを確かめるために、混合物を50℃に５分間、加熱し、そして激しく撹拌した。中性の脂質を有するか又は有さない個々の溶液を調製した。含まれる中性脂質が存在しない場合、DNAをDODAC溶液に添加し、続いて、軽く撹拌し、そして次に、室温で30分間インキュベートした。中性脂質が存在する場合、DNAを含む界面活性剤溶液を、中性脂質を含む界面活性剤溶液と共に混合した。この混合物を室温で30分間インキュベートし、そして次に、カチオン性脂質DODACを含む界面活性剤溶液に添加した。界面活性剤を除去するために、混合物を透析用バッグに移し、そして無菌

水（６度交換する）に対して72時間、透析した。個々のサンプルの体積は、１ml以下であった。
核酸－脂質粒子配合物を、600nm（2.5nmのスリット幅）での90°光散乱強度の変化を測定することによって評価した。この波長が使用されたのは、界面活性剤ミセルのみからの光散乱は無視でき、従って、核酸－脂質粒子の形成がモニターされ得るからである。この技法をまた使用して、DODAC又はSMの予備形成されたリポソームを溶解するOGPの能力について評価した。多重層リポソームを、粉末化された脂質を60℃で蒸留水に水和化することによって、1.0mMの最終脂質濃度で調製した。脂質懸濁液を、プローブ音波処理機（Sonilier Cell Disrapter 350, Branson Sonic Power Co., Danbury, CN）を用いて５分間、音波処理し（100ワット、90％の能力サイクル、20KHz）、均質懸濁液を生成した。脂質溶解測定のために、前記脂質懸濁液のアリコートを、蒸留水により希釈し、0.2～1.0mMの最終脂質濃度にした。この脂質懸濁液を200mMのOGPにより滴定し、そしてピペットで取ることにより十分に混合した。光散乱強度を、Luminescence Sepctrometer 50Ｂ（Perkin Elmer）を用いて室温で測定した。
100mMのOGPにおいては、DNAがSMの存在及び不在下でDODAC／OGP混合されたミセル溶液に添加される場合に観察される溶液の濁りの有意な変化は存在しなかった。３時間の透析の後、その溶液は濁り、そして光散乱が上昇し、高められた粒子サイズ及び／又は凝集の影響をもたらした。4.5時間後、光散乱の低下が、SMの不在下で調製されたシステムに関して観察され、これは大きな見える凝集体の形成の結果である。サンプルが20mMのOGP、すなわち添加される脂質の不在下でOGPの臨界ミセル濃度に近い濃度でのOGP下で調製される場合（図35Ｂ）、光の散乱は、DNAがDODAC／OGPミセルに添加される時点で上昇した。この濁り度の上昇は、スフェロイド状の混合されたミセルの自発的粒子形成の徴候である。従って、脂質小胞が、界面活性剤濃度が20mMに等しいか又はそれ以上である条件下で、形成する見込みはない。20mMのOGPの存在下での核酸－脂質粒子形成は、たぶん、カチオン性リポソームのDNA－仲介凝集のためではない。核酸－脂質粒子形成は、水との脂質アシル鎖の接触を最少にする構造を採用する疎水性脂質－DNA複合体の結果であると思われる。
自発的に又は界面活性剤の除去に続いて形成される核酸－脂質粒子の物理的特徴は、表３及び図37に要約されている。評価されるパラメーターは次のものを包含する：（ｉ）Q ELS及び電子顕微鏡により評価されるような粒子サイズ、（ii）凝集／フロキュレーションの観察される程度、及び（iii）TO－PRO－１、すなわちDNAに結合される場合、螢光を発するインターカレート剤の結合の評価。
核酸－脂質粒子形成はDNAへのカチオン性脂質の結合に依存すると思われるので、粒子特徴は、カチオン性脂質：アニオン性リン酸の電荷比が１：１～８：１である条件下で評価された。粒子形成が界面活性剤の除去に続いて生じた（すなわち、脂質及びDNAの混合物が100mMのOGP下で調製された）条件下で、その得られる粒子は大きく（＞2000nm）、そして凝集された（表３）。この凝集する傾向は、電荷比に依存した。
核酸－脂質粒子の形成の後、DNAは、TO－PRO－１インターカレーションの影響を受けない構造体であると仮定され、すなわちこのことは、DNAが縮合されたことを示唆する。約1.0の縮合指数は、DNAがポリリシンの添加により縮合される場合に得られる指数に等しいことが注目されるべきである（Reimerなど., 1995）。
低い界面活性剤濃度（20mMのOGP）が自発的な核酸－脂質粒子形成を促進するために使用される場合、界面活性剤除去の機能としての粒子サイズ又は凝集状態の有意な変化は存在しなかった。但し、粒子サイズの有意な上昇が観察される、１：１及び1.5：１の電荷比での場合を除く（表32）。
図37Ａに示されるように、Q ELSデータは、２：１の電荷比を用いて調製されたサンプルに関して、粒子は均質であり、そして59±38nmの平均直径を伴ってガウス分析に適合することを示唆した。
この結果は、陰性染色電子顕微鏡を用いて行なわれた観察に矛盾しない（図37Ｂ）。核酸－脂質粒子を、２種の方法を用いて電子顕微鏡（EM）により評価した。第１は、サンプル

を、ニッケルグリッド上に濃縮された核酸－脂質粒子配合物（３mMの脂質）の液滴を配置することによって、陰性染色EMのために調製した。１分後、サンプルを、フィルター紙を用いて注意して引き出し、そして2.5％モリブデン酸アンモニウム溶液により染色した。その染色されたサンプルをすぐに試験し、そして80Kvで作動するCarl Zeiss EMIOCR電子顕微鏡を用いて写真を取った。第２においては、核酸－脂質粒子を、フリーズ－フラクチャーEMのために調製し、ここで、濃縮された核酸－脂質粒子配合物（15mMの脂質）のサンプルを、グリセロール（25％，ｖ／ｖ）と共に混合し、フレオンスラッシにおいて凍結し、そしてBalzers BAF 400D装置を用いてフリーズ－フラクチャーにゆだねた。顕微鏡写真を、JEOL Model JEM－1200 EX電子顕微鏡を用いて得た。

前記粒子のフリーズ－フラクチャー電子顕微鏡分析から得られたデータ（図37Ｃ）は、同じ濃度（15mMまでの合計脂質）にもかかわらず、膜二重層構造体に典型的なフラクチャー表面を示すフリーズ－フラクチャーレプリカ上に少数の領域が単に存在したことを示唆した。その代わり、多くの突出物がそのレプリカ上に検出された。これは、リポソームよりもむしろ粒子がここに記載の方法を用いて形成されたことの示唆と矛盾しない。

DNAは、自発的粒子形成に続いてTO－PRO－１に接近しやすく、そして0.05以下の縮合指数が典型的には、界面活性剤の除去の前、測定された。この結果は、思いがけないことであり、そして粒子形成はDNAが縮合されるかどうかのインジケーターではないことを示唆する。界面活性剤の除去の後、TO－PRO－１インターカレーションは観察されず、そしてその得られるDNA縮合指数は高かった（約1.0）（表３）。

表３．透析の前及び後、20mM及び 100mMのOGP を用いて調製されたpCMVβ／DODAC ／SMにより形成された脂質－DNA 粒子の特徴

（カチオン／アニオン[a]）	平均直径±SD（nm）[b] 透析の前	透析の後	凝集状態[c]	結合指数[d]
100mm OGP				
1：1	ND*	>2000	++	0.759
2：1	ND	>2000	+	0.927
4：1	ND	>2000	+	0.974
8：1	ND	>2000	++	0.991
20mm OGP				
1：1	71.2±37.0	192±110	-	0.875
1.5：1	63.1±33.8	119±76	--	0.875
2：1	60.8±33.3	58.6±37.8	--	0.991
4：1	56.7±32.0	55.9±32.6	--	0.994
8：1	64.6±33.4	66.4±35.4	--	0.989

a：カチオン性脂質：DNA リン酸基の電荷比。

b：平均直径は、“方法”に記載されるようなQ ELS 技法を用いて測定された。粒子サイズを評価するために使用される装置は、平均粒子サイズが 1.0μm以下である条件下でのみ促進される。透析の後の配合物の凝集状態は、サンプルの眼での検査を通して定性的

に評価され、そして次のように評価された；＋＋：サンプルの混合後５分以内に溶液から沈降する大きな凝集体；＋：存在する小さな～中ぐらいの凝集体、但しその溶液は均等な“不透明”な外観を保持する；－：顕微鏡により見ない限り、明白な凝集体は存在しない；－－：凝集体が存在しないし、そしてQ ELS により評価される場合、均質である。

ｃ：NID ：粒子が形成されなかったので検出できなかった。

ｄ：DNA 縮合指数、すなわち脂質結合の存在及び不在下でDNA に結合するTO－PRO －１の割合は、“方法”に記載されるようにして決定された。

ｅ：NID ；粒子が形成されなかったので検出できず。

DNA安定性アッセイ

DNAに対する脂質の保護効果を評価するために、１μｇのpCMVβ DNAを含む配合物100μｌを、緩衝液（0.05Mのトリス－HCl，pH8.0，0.01Mの$MgSO_4$，0.1mMのジチオトレイトール）又は20mMのOGPの存在下で、0.67単位のDNアーゼＩと共に37℃で20分間インキュベートした。酵素反応を、0.5MのEDTA，５μｌ及び５MのNaCl ３μｌの添加により停止せしめた。DNAを、改良されたブライ－ダイアー抽出方法を用いて抽出した（Reimerなど.，1995）。それらの条件下で、脂質及びDNAが解離し、そしてその得られるDNAを、水性相から効果的に回収した。DNAを、１／10体積の酢酸ナトリウム（pH5.2）及び2.5体積の95％エタノールにより－20℃で30分間、沈殿せしめ、そしてマイクロ遠心分離機（Eppendorf）により12,000×ｇで30分間、４℃での遠心分離により回収した。DNAペレットを、10μｌの無菌蒸留水に再懸濁し、そしてTBE緩衝液（89mMのトリス－ボレート、２mMのEDTA，pH8.0）中、0.8％アガロースゲル上での電気泳動にゆだねた。

DNA－カチオン性脂質複合体形成の結果として生成される核酸－脂質粒子の特徴をさらに定義づけるために、核酸－脂質粒子におけるDNAがDNアーゼＩのエンドヌクレアーゼ活性に対して保護されたかどうかについて評価した。これは、インビトロ及びインビボDNA移送のためのそれらのシステムを開発する上で、重要な特徴である。図38Ａに示される結果は、界面活性剤の除去の後、粒子内のDNAがDNアーゼＩの存在下で損なわれないまま存続していることを示す（レーン５及び７）。興味あることには、20mMのOGPの存在下で自発的に形成された粒子内のDNAは、界面活性を除去しない場合でさえ、DNアーゼＩの存在下で損なわれないまま存続した（図38Ｂ、レーン５）。

例25

この例は、例24に記載されるようにして調製された核酸－脂質粒子がインビトロでのプラスミド供給システムとして有用であることを示す。

CHO細胞（American Type Tissue Calture，Rockville，MD）を、５％ウシ胎児血清（FBS）により補充されたαMEM（Costar，Cambridge，MA）を含む96ウェル培養プレートにウェル当たり２×10^4個の細胞でプレートした。細胞を、37℃及び５％ CO_2のインキュベーターにおいて24時間、増殖し、そしてトランスフェクションの時点で40～50％の集密度であった。培地を細胞から除去し、その後、0.3～1.2μｇのDNA、及び10％ FBSにより補充されたαMEM 75μｌを含む核酸－脂質粒子配合物25μｌから調製された希釈核酸－脂質粒子配合物100μｌを添加した。細胞を37℃で４時間インキュベートし、その後、100μｇ／mlゲンタマイシンスルフェートを含むαMEM（10％ FBS）100μｌを添加した。細胞を37℃で

２日間さらにインキュベートし、そして次に、α－ガラクトシダーゼ活性についてアッセイした。培地を個々のウェルから除去し、そして細胞溶解緩衝液（0.1%Triton X-100，250mMのNa_2HPO_4，pH8.0）30μｌを添加した。続いて、ウシ血清アルブミン（リン酸緩衝液（pH8.0）中、0.5%）50μｌを個々のウェルに添加し、続いて、150μｌのクロラムフェノールレッドガラクトピラノシド（GPRG，60mMのNa_2HPO_4，１mMの$MgSO_4$，10mMのKCl，50mMのβ－メルカプトエタノールの溶液中、１mg／ml）を添加した。590nmでの吸光度を、種々の時点で、Titertek Multiscan Type 310 Cマイクロタイタープレートリーダー（Flow Laboratories，Mississauga，ONT）上で読み取り、そして得られる光学密度を、個々のプレートのために得られた標準曲線を用いてmU βーガラクトシダーゼに転換した。すべてのアッセイを、プレート当たり少なくとも３個のウェルで評価し、そして値を、平均±標準偏差として報告する。

100mMのOGPを用いて調製された核酸－脂質粒子を用いてのChinese Hamster Orary（CHO）細胞トランスフェクション研究が、図39に示されており、そして遺伝子移送の最終生成物として酵素生成（β－ガラクトシダーゼ活性）により評価される。2000nm以上であるそれらのシステムのみが、細胞をトランスフェクトことにおいて効果的であった。カチオン脂質：DNA分子リン酸（電荷）比として高められたそれらのシステムについてのトランスフェクション効率は、１：１から４：１に高まった（図39Ａ）。しかしながら、予備形成されたリポソーム－DNA凝集体に関する結果とは異なって（たとえば、Jarnaginなど.，1992を参照のこと）、トランスフェクションは血清の存在により影響されなかった。

粒子誘発された細胞毒性データが、核酸－脂質粒子配合物の上昇する量を伴って酵素活性／ウェルの低下として図39Ｂに示される。

予備形成されたリポソーム－DNA凝集体と核酸－脂質粒子との間の有意な差異は、最適なトランスフェクションのために必要とされるヘルパー脂質としてDOPEの使用に関与する（Felgner & Ringold，1989；Smithなど.，1993；Farhoodなど.，1995）。図39Ｃに示されるように、DODAC及びSMにより界面活性剤透析法を用いて調製された大きな粒子が、DODAC及びDOPEを用いて調製された粒子よりも、CHO細胞をインビトロでトランスフェクトすることにおいてより効果的であった。

例26

この例は、異なったカチオン性脂質を用いての界面活性剤透析法による脂質小胞へのプラスミドDNAの封入を例示する。この透析法は、DODAC（例１）について前に記載された通りである。異なったモル%の種々のカチオン性脂質により取込まれたプラスミドの量を、DEAE Sepharoseクロマトグラフィーにより決定した（例２に記載される）。その取込み効率は、約50～60%のプラスミドDNAにより試験されたすべてのカチオン性脂質に関して類似していた。最適なプラスミド封入化のために配合物に必要とされるカチオン性脂質の濃度は、図41（ａ）において、DOTMA，DSDAC及びDODMA－ANに関して6.5%；図41（ｂ）において、DODAC及びDMRIEに関して８%；図41（ｃ）において、DC cholに関して９%であった。

例27

この例は、異なったカチオン性脂質により調製されたプラスミド小胞の安定性を示す。血清ヌクレアーゼからのプラスミドの血清安定性及び保護を、例３に記載される方法により決定した。安定性及び保護は、異なったカチオン性脂質により得られたすべての調製物に関して類似した。例として、DODAC、図42（ａ）；DOTMA、図42（ｂ）；及びDSDAC、図42（ｃ）、を含む調製物のための溶離プロフィールを、マウス血清において37℃で30分間、インキュベートした後に付与した。

例28

この例は、透析法（例１に記載されるような）によっての、イオン化可能な脂質AL－１（pKa＝6.6）によるプラスミドDNAの封入を示す。AL－１は、酸性pHで正の電荷を有し、そして７以上のpHで中性である。異なった濃度のAL－１を、それぞれ、pH4.8及び7.5で、脂質配合物に使用した。封入されたDNAの量を、Pico Greenアッセイを用いて決定した。封入されていないDNAを、まず、アニオン交換クロマトグラフィーにより除去し、そして取

込まれたDNAを、界面活性剤における脂質小胞の可溶化の後、Pico Greenにより決定した。DODACを用いてのプラスミドDNAの封入を、比較として示す。pH4.8で、プラスミドDNAの約75％の最大封入率が、pH7.5でのDODAC配合物に類似する８％のAL－１により達成された。しかしながら、DNA取込みは、pH7.5でAL－１により得られなかった（図43）。これは、DNA取込みのために正しい荷電された脂質の必要性を明確に示す。

例29

この例は、pH4.8でAL－１により形成された、プラスミド含有小胞の安定性及びpH7.5で、血清ヌクレアーゼによる分解からの封入されたDNAの保護を示す。^{3}Ｈ－DNA及び^{14}Ｃ－CHE（コレステリルヘキサデシルエーテル）を用いて、DNA及び脂質をそれぞれ、追跡した。pH4.8で、AL－１により形成された小胞を、pH7.5で、37℃で1.5時間、マウス血清と共にインキュベートした。封入されなかったDNAは、血清インキュベーションのために使用される調製においては除去されなかった。血清におけるインキュベーションの後、小胞をSepharose CL6Bカラム上で分離した。異なった画分における脂質及びDNAを放射能により検出した（図44）。DNAの約60％が、血清ヌクレアーゼから保護された。pH7.5でAL－１により形成された小胞が血清においてインキュベートされる場合、実質的にすべてのDNAが分解され、そして脂質から分離されるフラグメントとして溶離された。

例30

例30は、7.5％のDODAC及びDOPEを用いての透析法による封入効率に対するPEG－セラミド濃度の効果を示す。異なったPEG－Ｃ14濃度を有する種々の配合物における取込まれていないDNAを、DEAE Sepharose CL6Bクロマトグラフィーにより分離した。回収されたDNA及び脂質は、％ PEG－Ｃ14の関数として示されている。最良の取込みが、10モル％のPEG－Ｃ14により得られた（図46）。しかしながら、つい最近の実験は、10～15モル％の範囲での最適な取込みを示した（データは示されていない）。

VII．結論

上記で論ぜられたように、本発明は、新規の脂質－核酸複合体及びそれらを製造するための方法を含んで成る。多くの態様においては、疎水性DNA中間体が単離され得、そしてそのDNAは、色素結合剤及びDNアーゼ感度により測定されるような非縮合形で存在する。それらの複合体は、他の脂質－核酸粒子の調製に使用され得る。

さらなる態様において、本発明は、インビトロ及びインビボでの細胞のトランスフェクションのために有用である、血清安定性の核酸－脂質粒子の調製方法を提供する。

種々の核酸粒子の調製及び使用のために記載される方法は、適切なカチオン性脂質により複合体化される場合、親油性状態で存在することができるいづれかの核酸により使用され得る。いくつかの構造体の例は次のものを包含する：アデノシンデアミナーゼをコードする構造体、家族性高コレステロール血症のための低密度リポタンパク質受容体、ノウ胞性繊維症のためのCFTR遺伝子、Gaucher病のためのガラクトセレブロシダーゼ及びDuchenneの筋ジストロフィーのための筋肉細胞中へのダイストロフィン又はウトロピンを包含する。

本明細書に言及されるすべての出版物、特許及び特許出願は、引用により本明細書中に取込まれる。

前述の発明は、より明確に理解するために例示的及び例的にいくらか詳細に記載されて来たが、本発明の範囲内で一定の変更及び修飾を行なえることは明白であろう。

【図１】

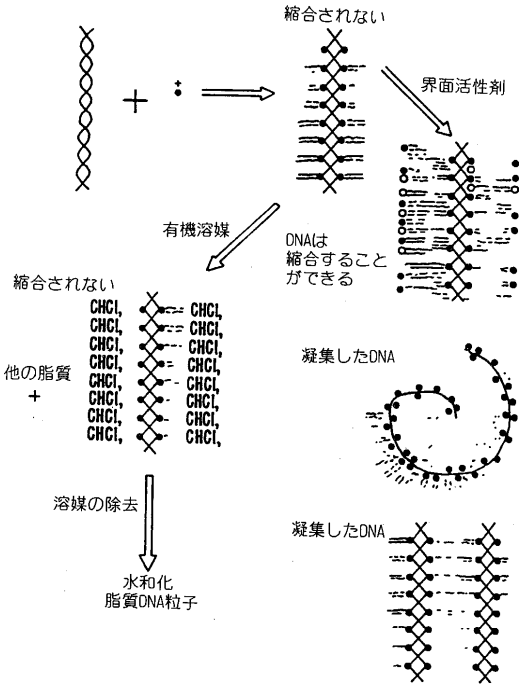


FIG. 1.

【図２】

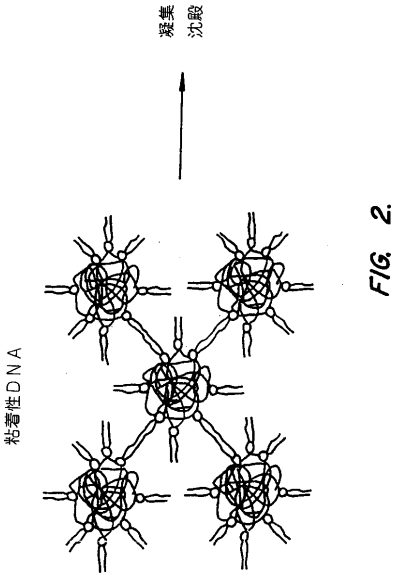


FIG. 2.

【図３】

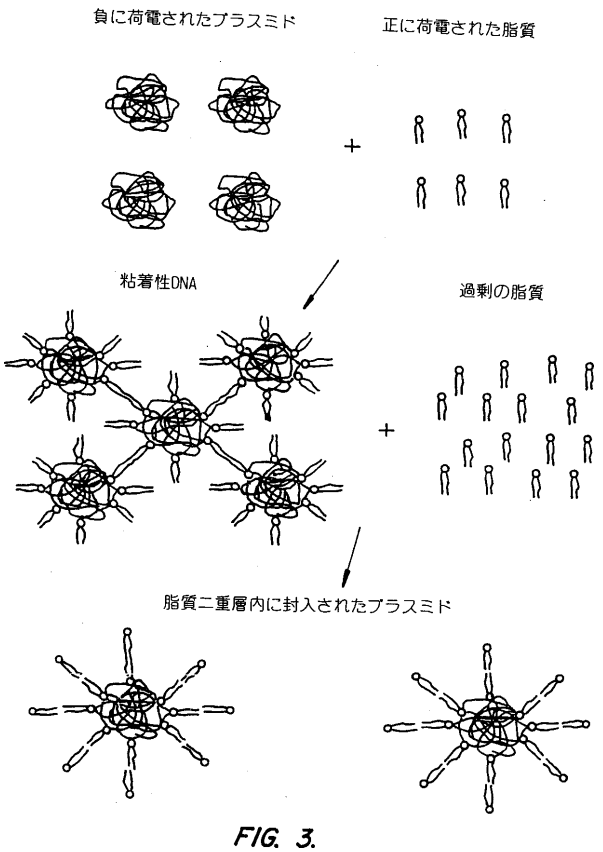


FIG. 3.

【図４】

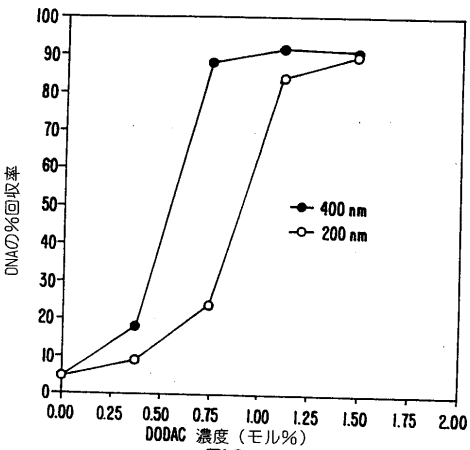


FIG. 4.

【図５】

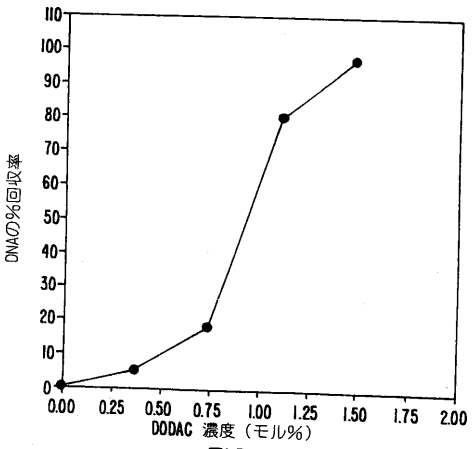


FIG. 5.

【図６】

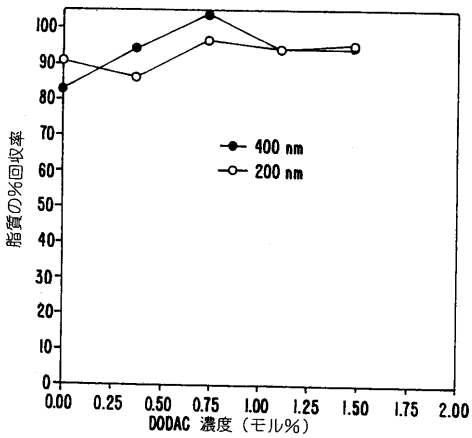


FIG. 6.

【図７】

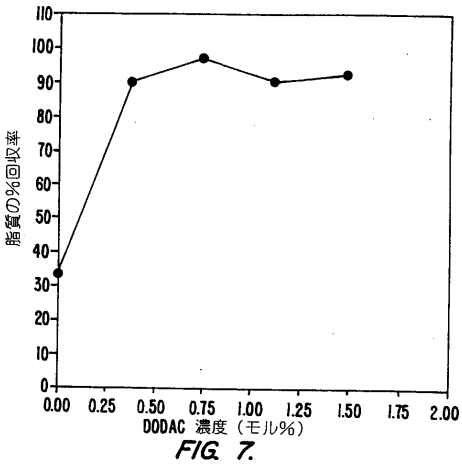


FIG. 7.

【図８】

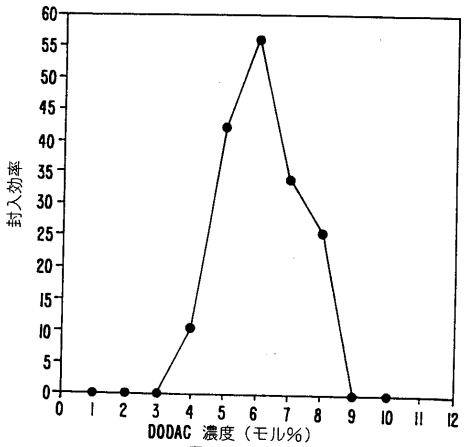


FIG. 8.

【図１０】

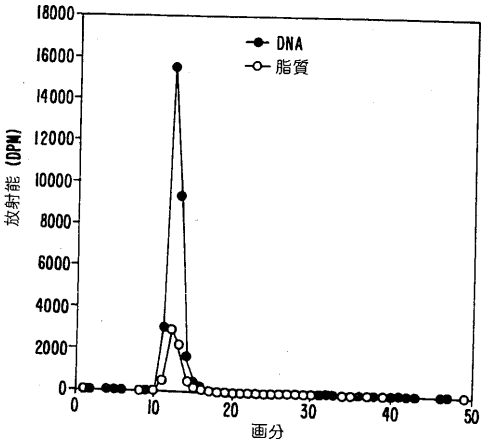


FIG. 10.

【図９Ａ】

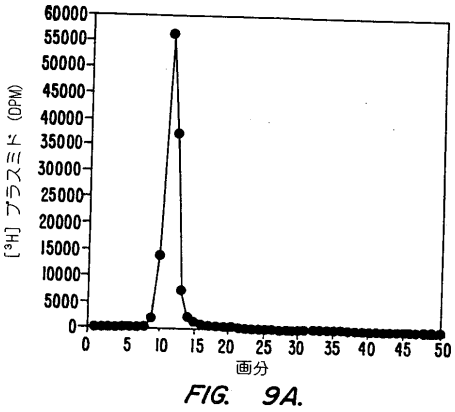


FIG. 9A.

【図１１Ｂ】

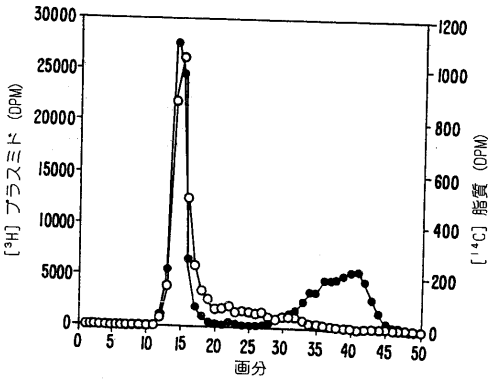


FIG. 11B.

【図１２Ａ】

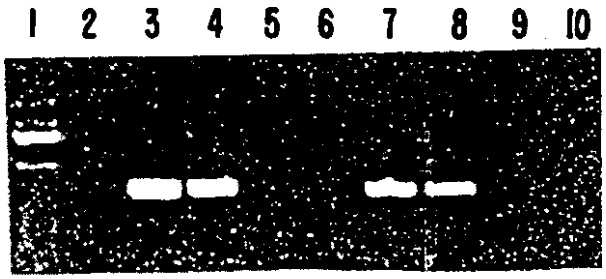


FIG. 12A.

【図９Ｂ】

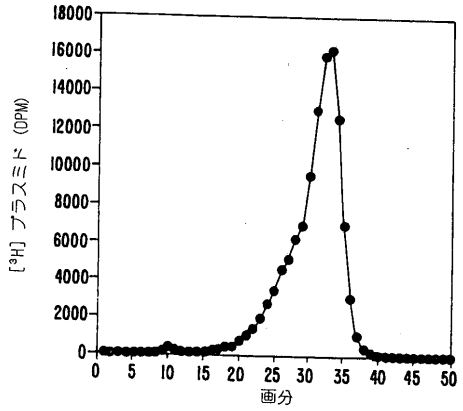


FIG. 9B.

【図１１Ａ】

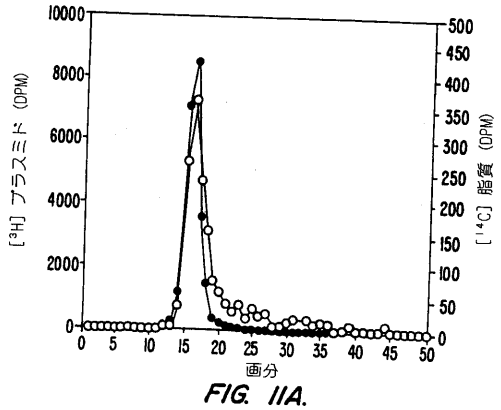


FIG. 11A.

【図１２Ｂ】

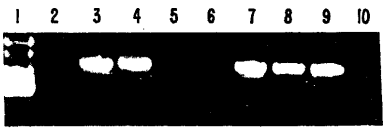


FIG. 12B.

【図１３】

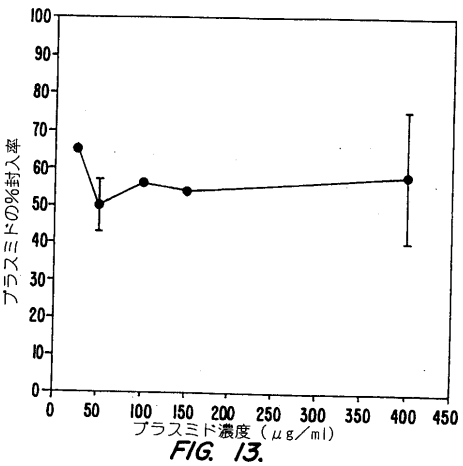


FIG. 13.

【図１４】

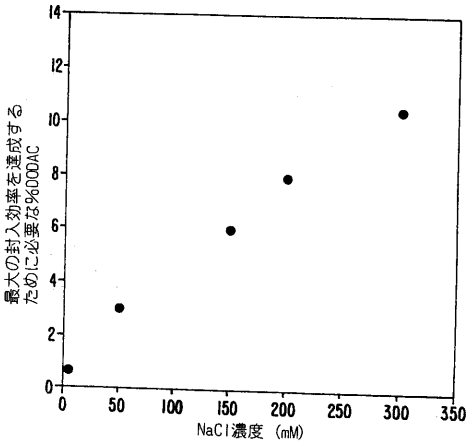


FIG. 14.

【図１５】

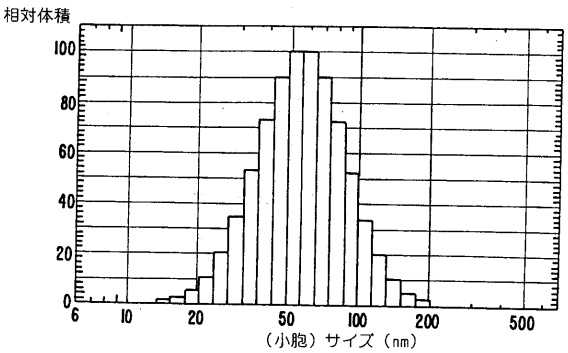


FIG. 15.

【図１６】

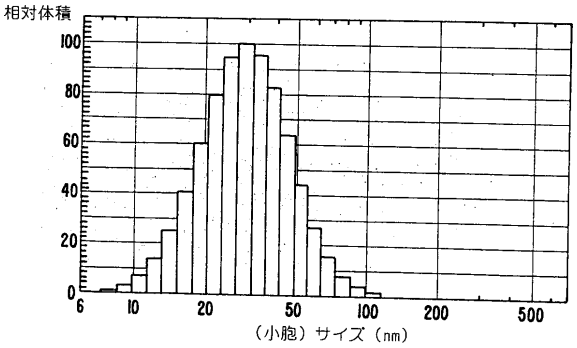


FIG. 16.

【図１７Ａ】

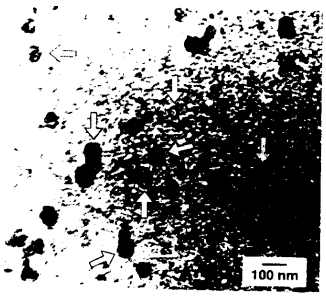


FIG. 17A.

【図１７Ｂ】

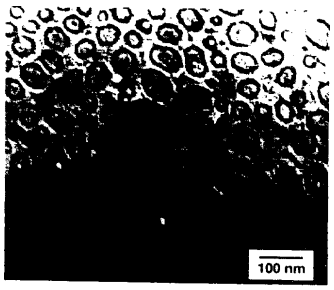


FIG. 17B.

【図１８】

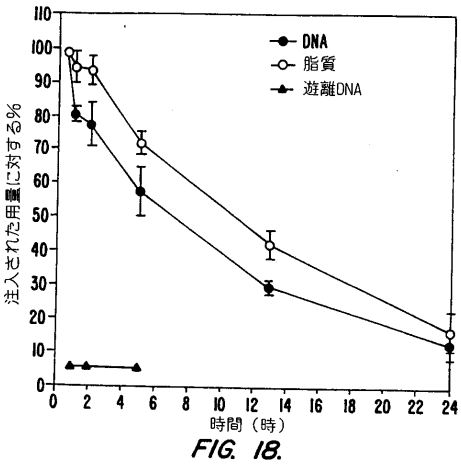


FIG. 18.

【図２０】

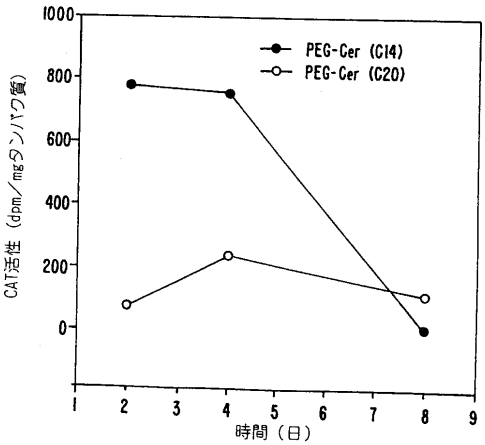


FIG. 20.

【図１９Ａ】

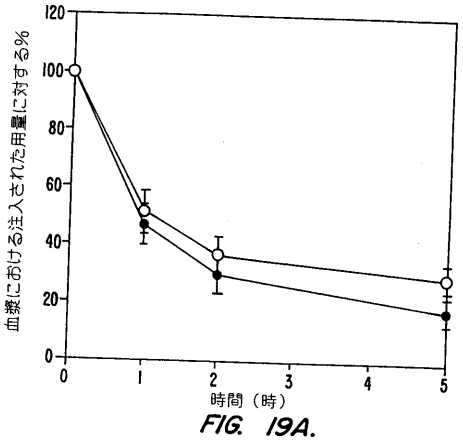


FIG. 19A.

【図１９Ｂ】

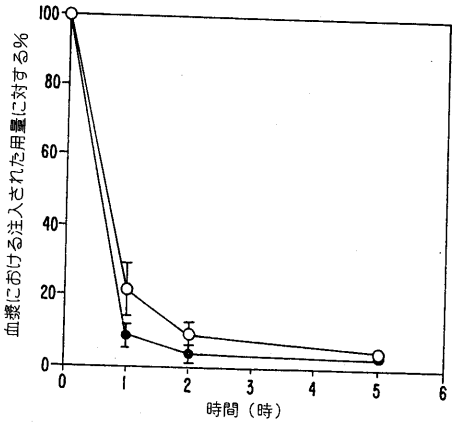


FIG. 19B.

【図２１】

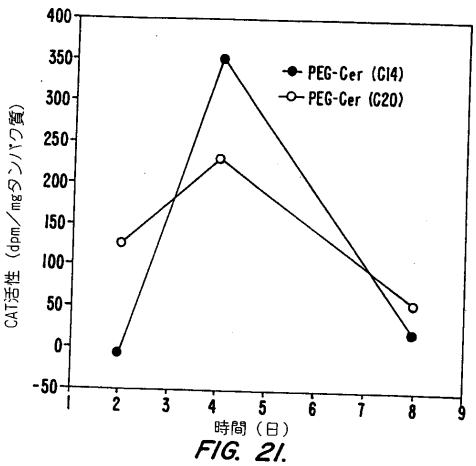


FIG. 21.

【図２２】

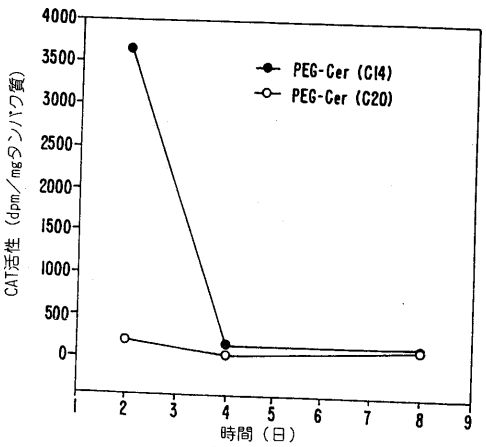


FIG. 22.

【図２３】

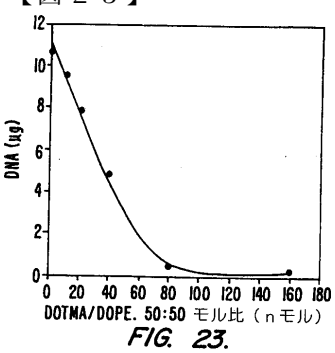


FIG. 23.

【図２４Ａ】

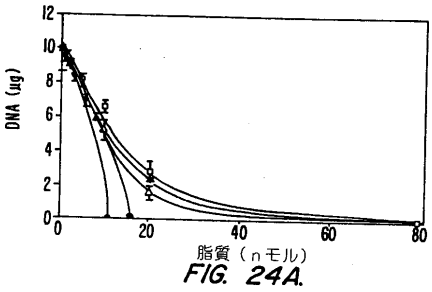


FIG. 24A.

【図２４Ｂ】

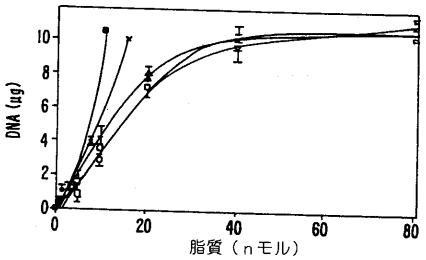


FIG. 24B.

【図２５Ａ】

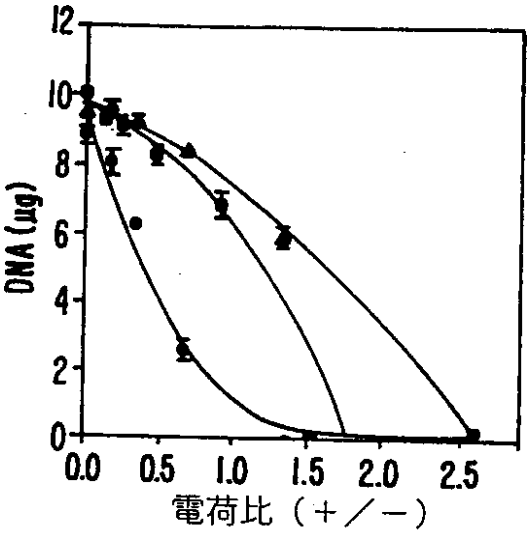


FIG. 25A.

【図２５Ｂ】

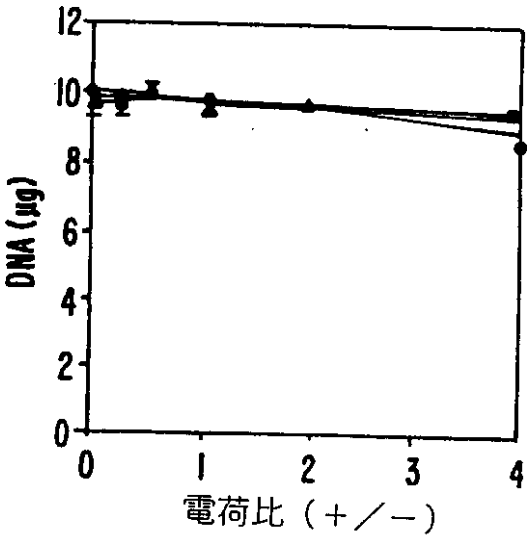


FIG. 25B.

【図２５Ｃ】

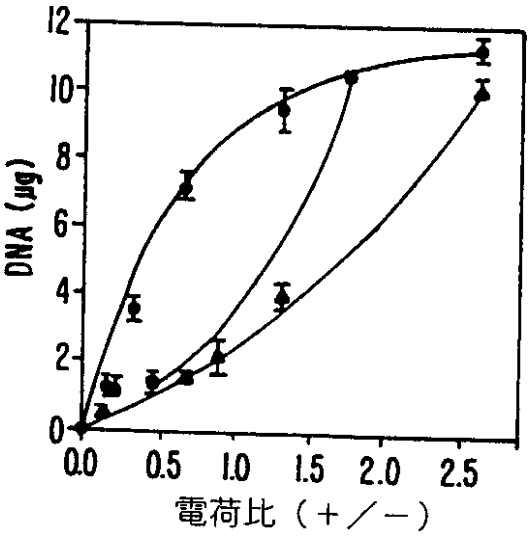


FIG. 25C.

【図２５Ｄ】

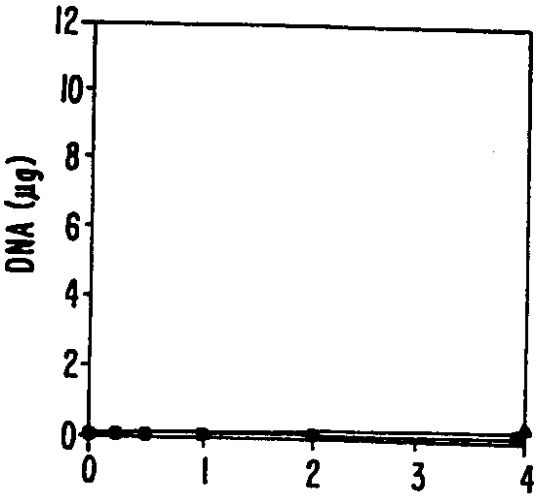


FIG. 25D.

【図２６Ａ】

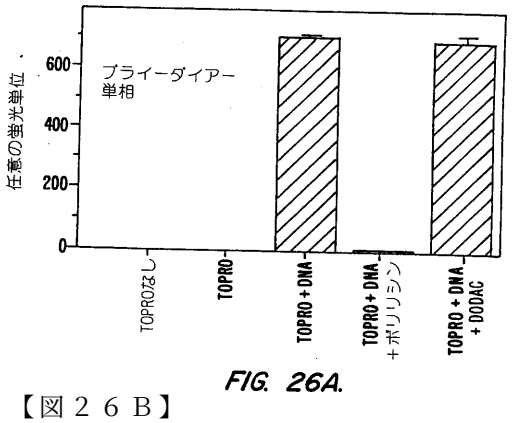


FIG. 26A.

【図２６Ｂ】

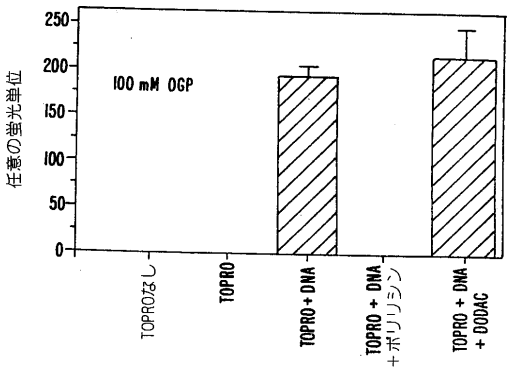


FIG. 26B.

【図２７】

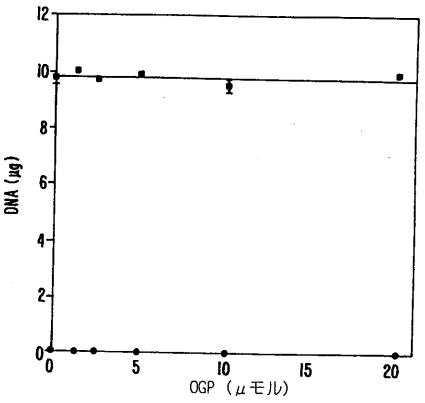


FIG. 27.

【図２８】

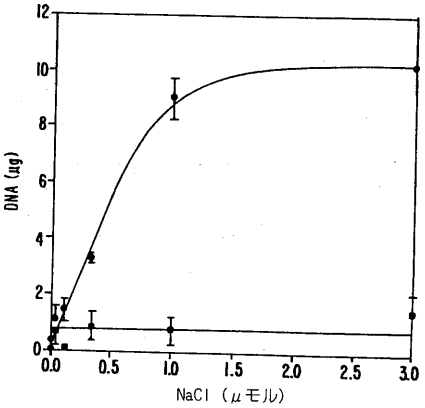


FIG. 28.

【図２９Ａ】

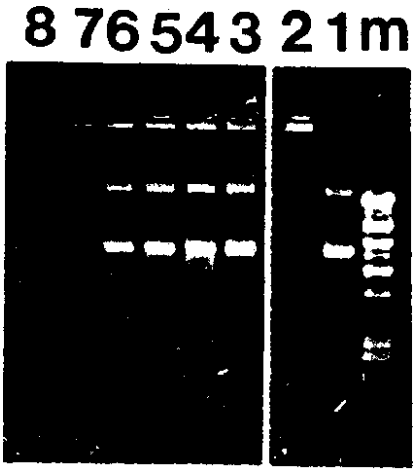


FIG. 29A.

【図２９Ｂ】

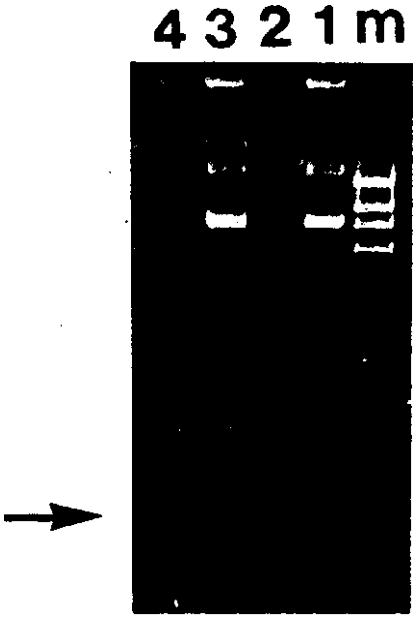


FIG. 29B.

【図３０】

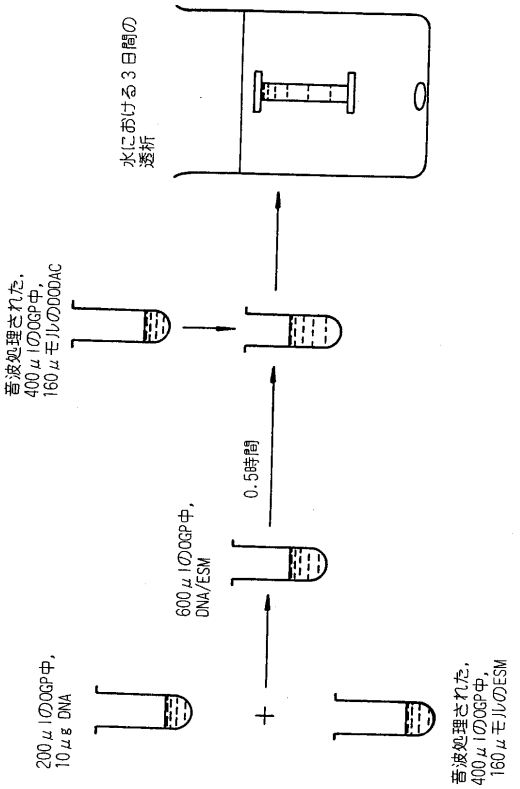


FIG. 30.

【図３１Ａ】

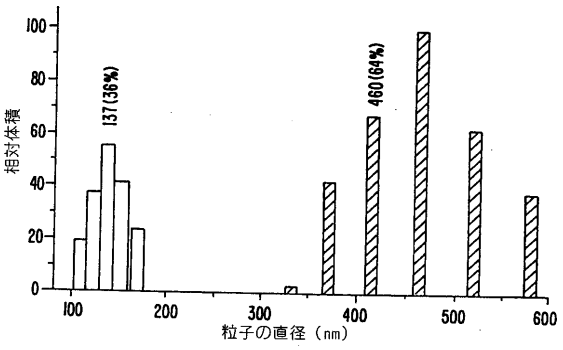


FIG. 31A.

【図３１Ｂ】

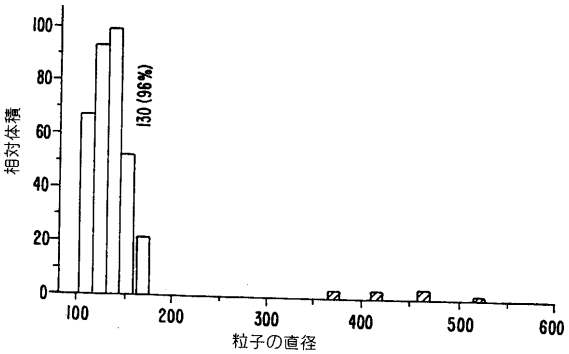


FIG. 31B.

【図３２】

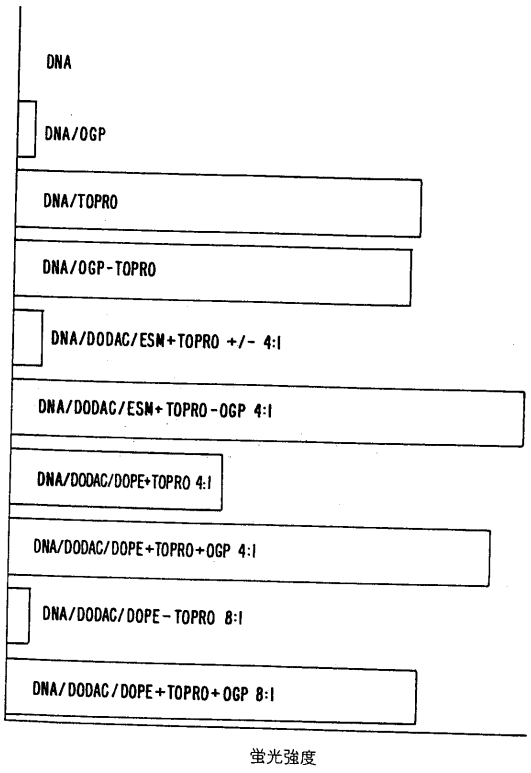


FIG. 32.

【図３３】

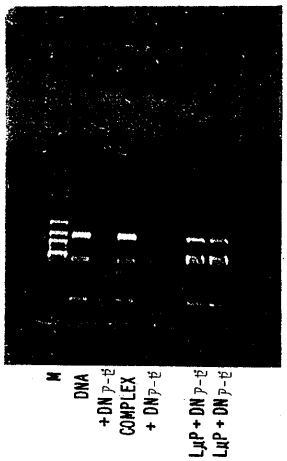


FIG. 33.

【図３４】

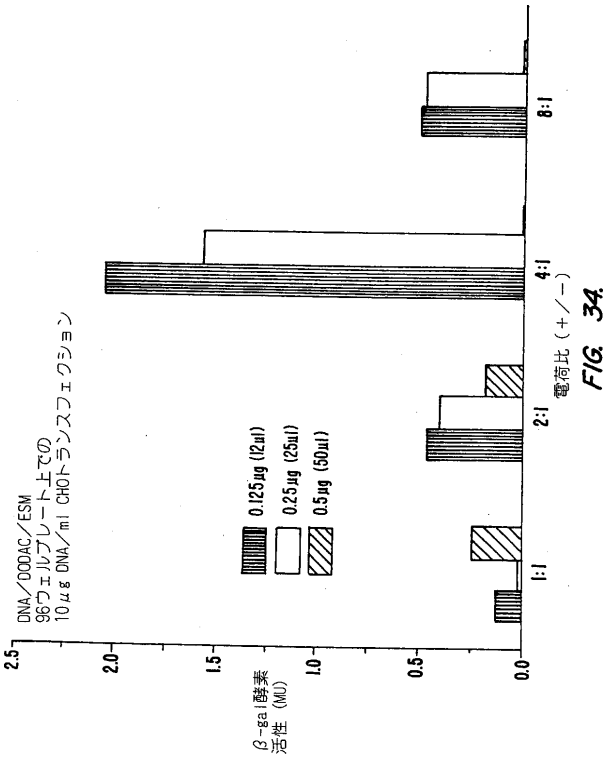


FIG. 34.

【図３５Ａ】

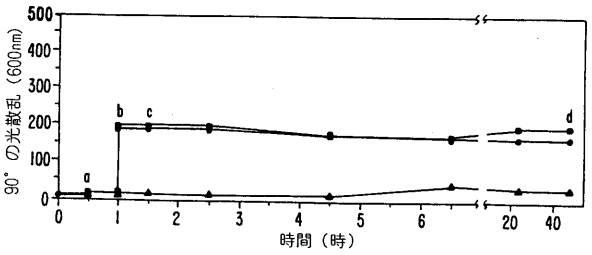


FIG. 35A.

【図３５Ｂ】

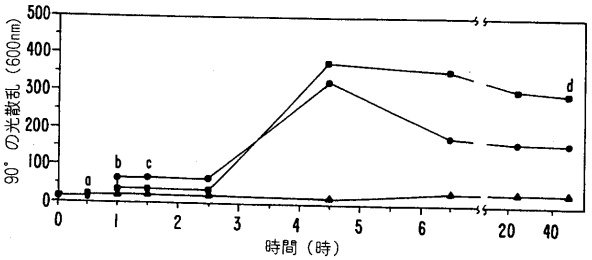


FIG. 35B.

【図３６】

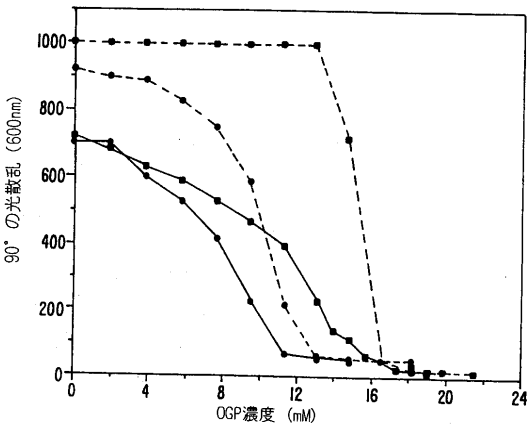


FIG. 36.

【図３７Ａ】

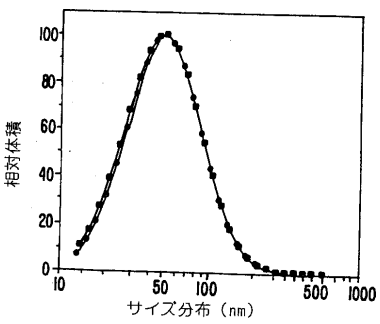


FIG. 37A.

【図３８Ａ】

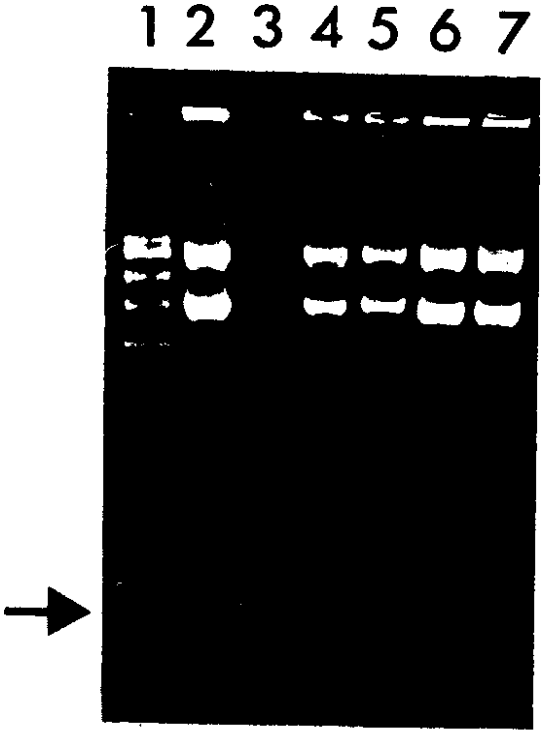


FIG. 38A.

【図３８Ｂ】

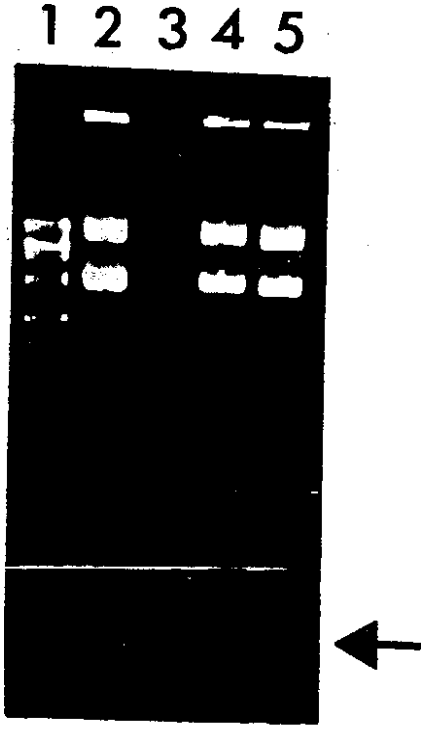


FIG. 38B.

【図３７Ｂ】

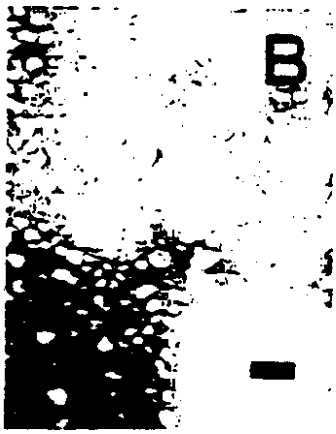


Figure 37B

【図３７Ｃ】

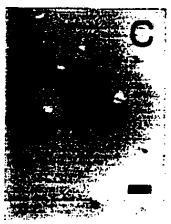


Figure 37C

【図３９Ａ】

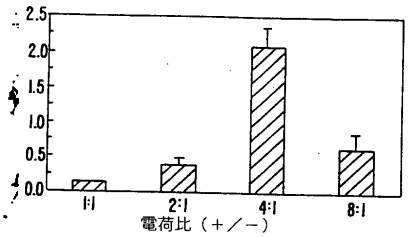


FIG. 39A.

【図３９Ｂ】

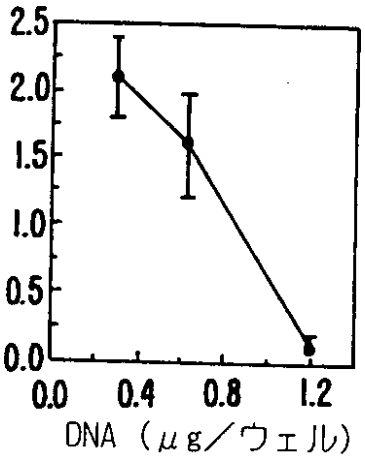


FIG. 39B.

【図３９Ｃ】

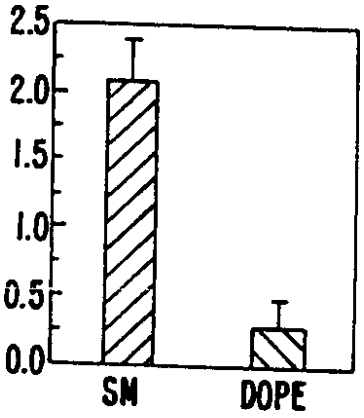
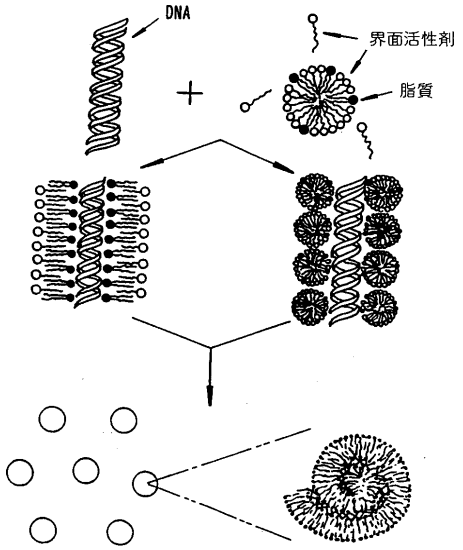


FIG. 39C.

【図４０】



DNA-脂質粒子の形成

FIG. 40.

【図４１Ａ】

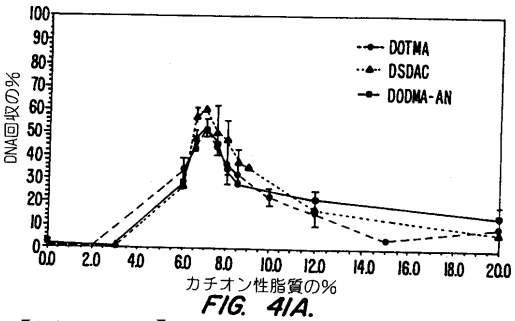


FIG. 41A.

【図４１Ｂ】

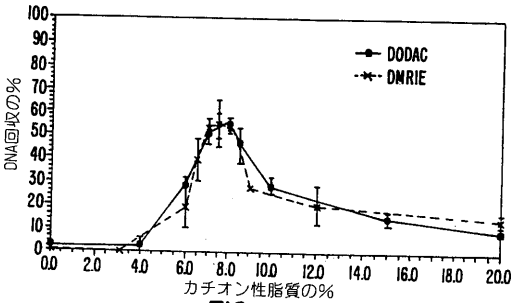


FIG. 41B.

【図４１Ｃ】

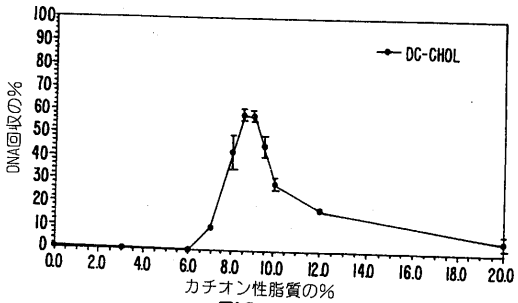


FIG. 41C.

【図４２Ａ】

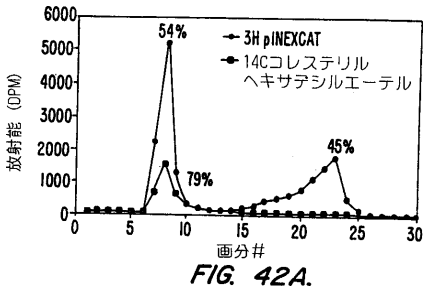


FIG. 42A.

【図４２Ｂ】

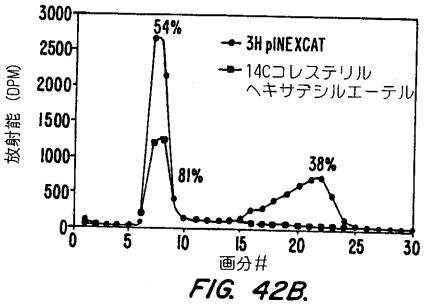


FIG. 42B.

【図４２Ｃ】

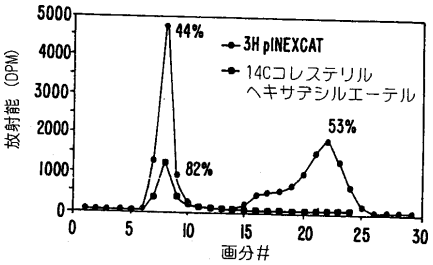


FIG. 42C.

【図４３】

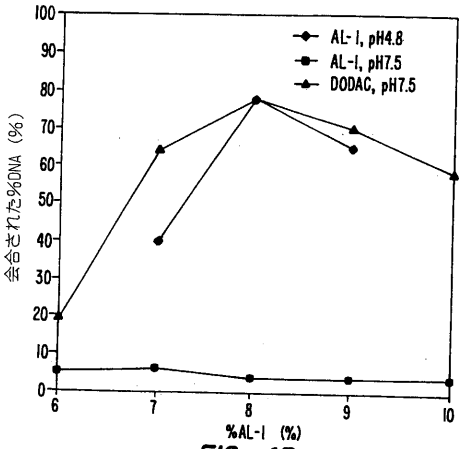


FIG. 43.

【図４４】

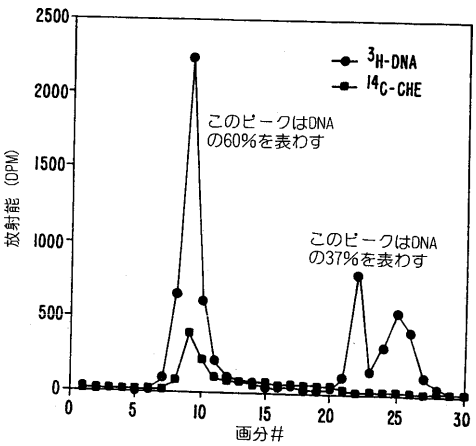


FIG. 44.

【図４５】

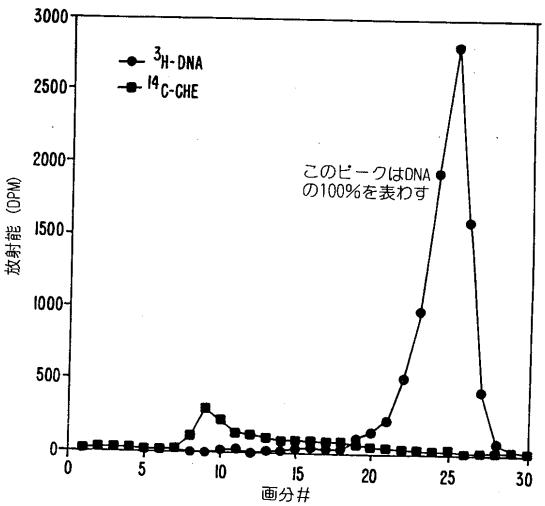


FIG. 45.

【図４６】

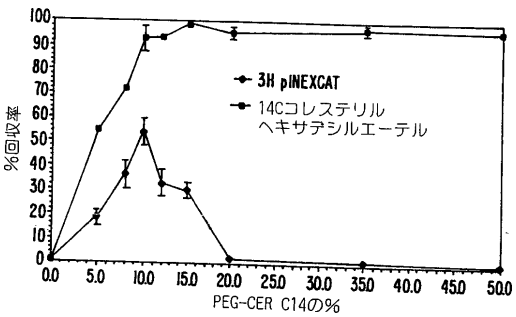


FIG. 46.

フロントページの続き

(74)代理人
弁理士 中村 和広
(72)発明者 ウェーラー, ジェフリー ジェイ.
カナダ国, ブリティッシュ コロンビア ブイ６ピー ２ワイ８, バンクーバー, ウエスト セブンティース アベニュ ３０６－１３４０
(72)発明者 バリー, マーセル ビー.
カナダ国, ブリティッシュ コロンビア ブイ０エヌ １ジー０, ボーウェン アイランド, ハーディング ロード エスピーシー １１
(72)発明者 ザン, ユアン－ペン
カナダ国, ブリティッシュ コロンビア ブイ５ティー ２ビー８, バンクーバー, イースト イレブンス アベニュ ４０ スイート １０５
(72)発明者 レイマー, ドロシー エル.
カナダ国, ブリティッシュ コロンビア ブイ５ティー ４ジェイ４, バンクーバー, イースト トウェルフス アベニュ ５５ スイート ２０２
(72)発明者 ホープ, マイケル
カナダ国, ブリティッシュ コロンビア ブイ６アール ２ケー２, バンクーバー, ウエスト イレブンス アベニュ ３５５０
(72)発明者 クリス, ピーター アール.
カナダ国, ブリティッシュ コロンビア ブイ６アール １エイチ４, バンクーバー, ウエスト ファースト アベニュ ３７３２
(72)発明者 シェラー, ペーター
カナダ国, ブリティッシュ コロンビア ブイ６エイチ ２ティー５, バンクーバー, バーチ ストリート ２６６４, アパートメント ３０１

審査官 松田 芳子

(56)参考文献 国際公開第９５／００２６９８（WO, Ａ１）
国際公開第９３／０１２７５６（WO, Ａ１）
米国特許第０５２７９８３３（ＵＳ, Ａ）
J. Biol. Chem., 1994, Vol.269, No.4, p.2550-61

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12N 15/09