



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102933233 A

(43) 申请公布日 2013. 02. 13

(21) 申请号 201180027929. 8 *A61K 31/7088* (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 06. 17 *A61K 31/713* (2006. 01)

(30) 优先权数据 *A61K 45/00* (2006. 01)

2010-138070 2010. 06. 17 JP *A61K 48/00* (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日 *A61P 13/12* (2006. 01)

2012. 12. 06 *A61P 43/00* (2006. 01)

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2011/063910 2011. 06. 17

(87) PCT申请的公布数据

W02011/158933 JA 2011. 12. 22

(71) 申请人 日东电工株式会社

地址 日本大阪

(72) 发明人 新津洋司郎 梶原庆子 田中康进

宫崎美代乃

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 王灵菇 白丽

(51) Int. Cl.

A61K 47/10 (2006. 01)

A61K 9/127 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 14 页

序列表 1 页 附图 2 页

(54) 发明名称

肾纤维化处理剂

(57) 摘要

本发明涉及含有类视黄醇作为靶向剂的肾中的细胞外基质产生细胞用的物质递送载体、使用了该载体的肾纤维化处理剂、它们的制造方法、制造试剂盒、使用了该肾纤维化处理剂的肾纤维化的处理方法等。

1. 一种针对肾脏中的细胞外基质产生细胞的物质递送用载体,其含有类视黄醇作为针对肾脏中的细胞外基质产生细胞的靶向剂。

2. 根据权利要求1所述的载体,其中,类视黄醇包含视黄醇。

3. 根据权利要求1或2所述的载体,其中,所述载体具有脂质体的形态,且类视黄醇与脂质体中所含的脂质的摩尔比为8:1~1:4。

4. 一种肾纤维化处理用医药组合物,其含有权利要求1~3任一项所述的载体、和对肾脏中的细胞外基质产生细胞的活性或增殖进行控制的药物。

5. 根据权利要求4所述的医药组合物,其中,对肾脏中的细胞外基质产生细胞的活性或增殖进行控制的药物选自 PAI-1 的活性或产生抑制剂、细胞活性抑制剂、增殖抑制剂、细胞凋亡诱导剂、以及以细胞外基质构成分子或与该细胞外基质构成分子的产生或者分泌相关的分子中的至少一个为靶的 RNAi 分子、核酶、反义核酸、DNA / RNA 嵌合多核苷酸和表达它们的载体。

6. 根据权利要求4所述的医药组合物,其中,对细胞外基质产生细胞的活性或增殖进行控制的药物为 HSP47 的抑制剂。

7. 根据权利要求4~6任一项所述的医药组合物,其是在医疗的现场或其附近混合药物和载体而成的。

8. 权利要求4~7任一项所述的医药组合物的制备试剂盒,其包含1个或1个以上的容器,所述容器单独或组合地包含对肾中的细胞外基质产生细胞的活性或增殖进行控制的药物、类视黄醇、以及根据需要的除类视黄醇以外的载体构成物质。

9. 一种针对肾脏中的细胞外基质产生细胞的物质递送用载体的制造方法,其包含将类视黄醇作为针对肾脏中的细胞外基质产生细胞的靶向剂进行配合的工序。

10. 一种肾纤维化处理用医药组合物的制造方法,其包含将类视黄醇作为针对肾脏中的细胞外基质产生细胞的靶向剂、将对肾脏中的细胞外基质产生细胞的活性或增殖进行控制的药物作为有效成分分别进行配合的工序。

肾纤维化处理剂

技术领域

[0001] 本发明涉及以肾中的细胞外基质产生细胞为靶的物质递送用载体、以及使用了该物质递送用载体的肾纤维化处理用组合物和肾纤维化的处理方法。

背景技术

[0002] 近年来,随着以饮食生活为中心的生活习惯的较大变化,高血压、糖尿病等生活习惯患病率增加,与此相伴,肾疾病、甚至肾功能衰竭的危险也逐渐增大。

[0003] 肾脏是对于通过排泄废弃物、调节体液 / 电解质 / 酸碱平衡等来维持内部环境的恒常性来说重要的脏器。肾脏控制氢、钠、钾和硅等血液中各种化合物的浓度并将废弃物以尿的形式排出。无论肾功能的降低是怎样的降低,都有影响将代谢产物从血液中完全除去的身体机能的可能性,并且有破坏身体的电解质平衡的可能性。肾功能的降低或衰竭最严重的情况是可导致死亡。

[0004] 另外,肾脏除了上述功能以外,还具有细胞性免疫、内分泌、代谢等功能。作为内分泌器官的肾脏,其产生活性型维生素 D3 即 1,25 二羟基维生素 D3 或调节红细胞产生的促红细胞生成素、分泌作为血压调节因子的肾素或分泌促红细胞生成素、分泌激肽、血管舒缓素、前列腺素等。

[0005] 慢性肾功能衰竭是指这些肾功能不可逆地慢慢降低、变得无法维持生物体的恒常性的状态。慢性肾功能衰竭已知可因糖尿病性肾病、慢性肾小球肾炎、恶性肾硬化、多发性囊胞肾等原因而发生。所有的肾疾病都伴随着肾脏的纤维化,最终发展到末期肾功能衰竭。由于慢性肾功能的降低特别地与肾脏的纤维化的进展有很大关系,因此认为通过抑制纤维化的进展可抑制慢性肾功能衰竭的进展。

[0006] 通常,肾纤维化伴随着内皮细胞的损害所引起的炎症反应,是由于最终过剩地产生的细胞外基质导致发生纤维化而引起的。例如在肾小球硬化症中,以肾小球内皮细胞的损害为起因而分泌趋化因子、生长因子等细胞因子,单核细胞或巨噬细胞发生迁移,从而使得炎症反应进展。接着,发生系膜细胞的活化、增殖、转化,由系膜细胞等细胞外基质产生细胞产生过量的细胞外基质、发生纤维化,从而导致肾小球硬化症。

[0007] 特别是糖尿病性肾病是导致慢性肾功能衰竭的最大的原因,是糖尿病的严重的并发症之一。糖尿病性肾病的特征是肾小球系膜细胞的增生 / 肥大,其主要是由 I 型和 IV 型胶原、纤连蛋白、层粘连蛋白等 ECM 蛋白质的蓄积增加所导致的。

[0008] 一旦陷入重度的慢性肾功能衰竭,则不可能恢复,如果不进行透析等治疗则会变为尿毒症。作为慢性肾功能衰竭的治疗方法,首先,可进行低蛋白饮食、限制盐分等的饮食疗法、或给予用于不增加肾小球负担的降压药等。

[0009] 另外,对于慢性肾功能衰竭,根据需要还可以进行补充肾脏所分泌的 1,25 二羟基维生素 D3 或促红细胞生成素的治疗、或进行适当保持肾脏的重要功能即血压调节的治疗。

[0010] 作为化学疗法,为了抑制肾功能衰竭的进展,可使用血管紧张素转换酶抑制剂或血管紧张素 II 受体拮抗剂。认为这些药物除了降低肾小球血压、抑制肾功能衰竭的进展

外,其本身还具有肾保护作用。但是,若将肾小球血压降得过低,肾小球血流量反而会降低,从而导致肾前性肾功能衰竭,因此需要慎重地给药。

[0011] 作为血管紧张素转换酶抑制剂,有卡托普利、依那普利、地拉普利、咪达普利、喹那普利、替莫普利、培哚普利丁胺盐、赖诺普利等,作为血管紧张素 II 受体拮抗剂,有氯沙坦、缬沙坦、坎地沙坦酯、替米沙坦、奥美沙坦酯、伊贝沙坦等。

[0012] 除此之外,为了改善尿毒症的症状以使透析导入稍稍延迟,还可使用用于吸附肠内的有害物质的吸附炭,即 Kremezin。另外,为了防止血中钾升高导致的呼吸困难、手脚麻木、心律失常等,还可使用吸附肠内的钾分并将其与粪便一起排出的离子交换树脂,即聚苯乙烯磺酸钙。

[0013] 当骨骼肌来源的代谢产物肌酐在血清中的浓度达到 5 ~ 7mg / dl 以上时,需考虑腹膜透析、血液过滤、血液透析等人工透析疗法或肾脏移植。但是,为了进行血液透析,需要每周去 3 次医院、每次 4 ~ 5 小时等,在生活上存在很大负担,对于肾脏移植,由于肾脏的供体少,因此能够接受肾脏移植的患者仅仅是希望接受移植的患者中的极少数。此外,透析开始后的肾功能衰竭患者的平均预期寿命仅约为普通人口的一半。

[0014] 鉴于这种状况,在肾纤维化治疗剂的开发方面倾注了很多的研究努力。其结果是,报道了例如血管紧张素转换酶抑制剂、AT1 血管紧张素 II 受体拮抗剂、醛固酮拮抗剂、肾素抑制剂等作用于肾素—血管紧张素—醛固酮系的药物,内皮素受体拮抗剂、 α 阻断剂、 β 阻断剂、免疫抑制剂、细胞外基质代谢抑制剂、补体系抑制剂、趋化因子抑制剂、磷酸二酯酶 5 抑制剂等作用于—氧化氮系的药物,NF κ B 抑制剂、Rho 抑制剂、p38 MAPK 抑制剂、PI3K γ 抑制剂、血管内皮细胞生长因子(VEGF)抑制剂、血管舒缓素、松弛素、白细胞介素 1 受体拮抗剂、骨形成蛋白 7 (BMP - 7)、抗肿瘤坏死因子 α 抗体(Anti-TNF α antibody)、抗血小板来源生长因子 D 抗体(Anti-PDGF-D antibody)等药物在肾纤维化动物模型或临床试验中取得了某种程度的成果(非专利文献 1)。

[0015] 另外,也进行了大量的专利申请,例如将血管紧张素转换酶抑制剂(专利文献 1)、血管紧张素 II 受体拮抗剂(专利文献 2)、转化生长因子 β (TGF - β) 抑制剂(专利文献 3)、纤溶酶原激活物抑制剂 1 (PAI - 1) 产生抑制剂(专利文献 4)、前列腺素受体 4 选择性激动剂(专利文献 5)、I 型胶原合成抑制剂(专利文献 6)、硫酸软骨素蛋白聚糖硫酸转移酶抑制剂(专利文献 7)、维生素 K 环氧化物还原酶抑制剂(专利文献 8)、糖化最终产物形成抑制剂(专利文献 9)、A2A 腺苷受体 2A 激动剂(专利文献 10)、内皮素受体拮抗剂(专利文献 11)、VEGF 抑制剂(专利文献 12)等作为肾纤维化治疗药的申请。但是,这些药物仍然无法令人满意,仍然需要进一步的肾纤维化治疗剂的开发。

[0016] 现有技术文献

[0017] 专利文献

[0018] 专利文献 1 :美国专利第 5238924 号公报

[0019] 专利文献 2 :日本特开平 07-002667 号公报

[0020] 专利文献 3 :日本特开 2004-043459 号公报

[0021] 专利文献 4 :日本特开 2009-007258 号公报

[0022] 专利文献 5 :日本特开 2001-233792 号公报

[0023] 专利文献 6 :日本特表 2004-534760 号公报

- [0024] 专利文献 7 :日本特开 2009-292725 号公报
[0025] 专利文献 8 :日本特开 2010-077101 号公报
[0026] 专利文献 9 :日本特开 2009-029750 号公报
[0027] 专利文献 10 :日本特表 2007-536241 号公报
[0028] 专利文献 11 :日本特表 2006-519817 号公报
[0029] 专利文献 12 :日本特开 2007-099641 号公报
[0030] 专利文献 13 :国际公开 2006/068232 号小册子
[0031] 专利文献 14 :日本特开 2009-221164 号公报
[0032] 专利文献 15 :日本特开 2010-59124 号公报
[0033] 非专利文献
[0034] 非专利文献 1 :Nephrology, dialysis, transplantation 2007;22 (12):3391-407

发明内容

[0035] 发明欲解决的课题

[0036] 本发明的目的在于提供能够将药物等物质特异性地递送给肾中的细胞外基质产生细胞的载体、使用了该载体的肾纤维化处理剂和肾纤维化的处理方法。

[0037] 用于解决课题的方法

[0038] 本发明人等在探求新型的肾纤维化治疗剂的过程中发现,通过给予在含有类视黄醇作为靶向剂的载体上载持有细胞外基质产生抑制剂的组合物,能够有效地处理肾纤维化,从而完成了本发明。

[0039] 已知含有维生素 A 的载体向贮藏维生素 A 的星状细胞递送药物(专利文献 13),和在该载体上载持有针对 HSP47 的 siRNA 的组合物可使肝纤维化(专利文献 13)、肺纤维化(专利文献 14)和骨髓纤维化(专利文献 15)得到改善,但是到目前为止对于其与肾纤维化、肾的间质组织、系膜细胞的关系还完全不清楚。

[0040] 即,本发明涉及以下技术方案。

[0041] (1) 一种针对肾脏中的细胞外基质产生细胞的物质递送用载体,其含有类视黄醇作为针对肾脏中的细胞外基质产生细胞的靶向剂。

[0042] (2) 根据上述(1)的载体,其中,类视黄醇包含视黄醇。

[0043] (3) 根据上述(1)或(2)的载体,其中,所述载体具有脂质体的形态,且类视黄醇与脂质体中所含的脂质的摩尔比为 8:1~1:4。

[0044] (4) 一种肾纤维化处理用医药组合物,其含有上述(1)~(3)任一项的载体、和对肾脏中的细胞外基质产生细胞的活性或增殖进行控制的药物。

[0045] (5) 根据上述(4)的医药组合物,其中,对肾脏中的细胞外基质产生细胞的活性或增殖进行控制的药物选自 PAI-1 的活性或产生抑制剂、细胞活性抑制剂、增殖抑制剂、细胞凋亡诱导剂、以及以细胞外基质构成分子或与该细胞外基质构成分子的产生或者分泌相关的分子中的至少一个为靶的 RNAi 分子、核酶、反义核酸、DNA / RNA 嵌合多核苷酸和表达它们的载体(vector)。

[0046] (6) 根据上述(4)的医药组合物,其中,对细胞外基质产生细胞的活性或增殖进行控制的药物为 HSP47 的抑制剂。

[0047] (7)根据上述(4)~(6)任一项的医药组合物,其是在医疗现场或其附近混合药物和载体而成的。

[0048] (8)上述(4)~(7)任一项的医药组合物的制备试剂盒,其包含1个或1个以上的容器,所述容器单独或组合地包含对肾中的细胞外基质产生细胞的活性或增殖进行控制的药物、类视黄醇、以及根据需要的除类视黄醇以外的载体构成物质。

[0049] (9)一种针对肾脏中的细胞外基质产生细胞的物质递送用载体的制造方法,其包含将类视黄醇作为针对肾脏中的细胞外基质产生细胞的靶向剂进行配合的工序。

[0050] (10)一种肾纤维化处理用医药组合物的制造方法,其包含将类视黄醇作为针对肾脏中的细胞外基质产生细胞的靶向剂、将对肾脏中的细胞外基质产生细胞的活性或增殖进行控制的药物作为有效成分分别进行配合的工序。

[0051] 发明效果

[0052] 本发明的肾纤维化处理用组合物的准确的作用机制尚未完全弄清楚,但认为是类视黄醇作为针对成纤维细胞或肌成纤维细胞等肾中的细胞外基质产生细胞的靶向剂发挥功能,通过将有效成分例如对肾中的细胞外基质产生细胞的活性或增殖进行控制的药物等递送到这些细胞,从而起到抗肾纤维化的效果。

[0053] 因此,利用本发明的载体,由于能够将有效成分有效地递送到作用部位、甚至靶细胞,因此使肾纤维化特别是到目前为止难以治疗的糖尿病性肾炎等的治愈、进展的抑制或发病的预防成为可能,对人类的医疗和动物的医疗具有极大的贡献。

[0054] 另外,本发明的载体由于能够与任意的药物(例如已有的肾纤维化治疗药)组合而提高其作用效率,因此具有在制剂方面的应用范围广、能够简便地制造有效的处理剂的优点。

附图说明

[0055] 图1为各组小鼠的肾皮质的切片的天狼星红(sirius red)染色的肾小球的代表性镜检像。使用油浸透镜用800倍倍率拍摄。

[0056] 图2为表示利用天狼星红染色进行定量的肾皮质的纤维化区域的比例的图。对每个小鼠个体随机拍摄20个视野的肾皮质区域,算出纤维化区域的比例(纤维化面积(%))(*P < 0.05、**P < 0.01)。

[0057] 图3为表示小鼠肾细胞外基质产生细胞中利用含有siRNA的VA结合脂质体进行的基因击倒(gene knock down)的图。从小鼠肾脏回收的细胞外基质产生细胞中的HSP47基因表达量用内部对照基因的GAPDH表达量修正,将以无处理(未处理)为100%时的比例(HSP47基因表达(%))制成图。VA-lip表示VA-liposome-siRNA Hsp47C、lip表示liposome-siRNAHsp47C、VA+siRNA表示VA+siRNA Hsp47C、NT表示无处理。

具体实施方式

[0058] 本发明中,肾中的细胞外基质产生细胞只要是肾中存在的具有细胞外基质产生能力的细胞则没有特别限定,例如包括肾中存在的系膜细胞、肾小管间质细胞、周细胞、成纤维细胞、作为成纤维细胞的祖细胞的纤维细胞以及肌成纤维细胞。肾中存在的基质产生细胞并不仅仅是肾中存在的细胞来源的细胞,也可包括循环血液中的纤维细胞来源的细胞、

或通过内皮间质分化转化从内皮细胞转化的细胞。肌成纤维细胞的特征在于表达 α SMA (α 平滑肌肌动蛋白)。本发明中的肌成纤维细胞是通过使用可检测地进行了标记的抗 α SMA 抗体的免疫染色等所鉴定的细胞。另外,由于成纤维细胞表达间质系细胞特征性的波形蛋白而不表达 α SMA,因此可以通过波形蛋白和 α SMA 的双重染色等来鉴定。另外,肾中的细胞外基质产生细胞还可通过如下方法得到:将肾组织用胶原酶和蛋白酶处理,然后将其用密度梯度离心法(例如在终浓度为 8% 的 Nycodenz^(R) 中)分离。

[0059] 本发明中的类视黄醇作为针对肾中的细胞外基质产生细胞的靶向剂(targeting agent)发挥功能,其是促进针对该细胞的特异性的物质递送的物质。类视黄醇促进物质递送的机理尚未完全弄清楚,但认为例如与 RBP (视黄醇结合蛋白, retinol binding protein) 特异性地结合的类视黄醇通过位于肾中的细胞外基质产生细胞的细胞表面上的某种受体而被该细胞摄入。

[0060] 类视黄醇是具有 4 个类异戊二烯单元头对尾式地连接而成的骨架的化合物的组中的 1 员(参照 G.P.Moss, "Biochemical Nomenclature and Related Documents," 2nd Ed. Portland Press, pp. 247-251 (1992)), 维生素 A 是定性地表示视黄醇的生物学活性的类视黄醇的一般性描述因子。作为本发明中可以使用的类视黄醇,没有特别限定,可列举出例如视黄醇(包括全反式视黄醇)、视黄醛、视黄酸(包括维甲酸)、视黄醇与脂肪酸的酯、脂肪族醇与视黄酸的酯、依曲替酯、异维甲酸、阿达帕林、阿维 a、他扎罗汀、棕榈酸视黄酯等类视黄醇衍生物、以及芬维 A 胺(4-HPR)、蓓萨罗丁等维生素 A 类似物。

[0061] 其中,从针对肾中的细胞外基质产生细胞的特异性的物质递送的效率的角度出发,优选视黄醇、视黄醛、视黄酸、视黄醇与脂肪酸的酯(例如乙酸视黄酯、棕榈酸视黄酯、硬脂酸视黄酯和月桂酸视黄酯等)以及脂肪族醇与视黄酸的酯(例如视黄酸乙酯等)。

[0062] 包括类视黄醇的顺-反式在内的所有异构体都包括在本发明的范围内。类视黄醇也可以被 1 个或 2 个以上的取代基取代。本发明中的类视黄醇当然包括分离状态的类视黄醇,也包括溶解或混合于能够溶解或保持类视黄醇的介质的状态的类视黄醇。

[0063] 本发明的载体可以由这些类视黄醇本身构成,也可以通过使类视黄醇结合或包含于另外的载体构成成分来构成。因此,本发明的载体可以含有除类视黄醇以外的载体构成成分。作为该成分,没有特别限定,可以使用医药和药学领域中已知的任意成分,优选可包含类视黄醇或可与类视黄醇结合的成分。

[0064] 作为这种成分,可列举出脂质、例如甘油磷脂等磷脂、鞘磷脂等鞘脂、胆固醇等甾醇、大豆油、罂粟油等植物油、矿物油、蛋黄卵磷脂等卵磷脂类、聚合物等,但并不限于这些。其中,优选可构成脂质体的物质,例如卵磷脂等天然磷脂、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)等半合成磷脂、二油酰磷脂酰胆碱(DOPE)、二亚油酰磷脂酰胆碱(DLPC)、胆固醇等。

[0065] 作为特别优选的成分,可列举出可避免被网状内皮系统捕获的成分、例如 N-(α -三甲基胺基乙酰基)-二(十二烷基)-D-谷氨酰氯(TMAG)、N,N',N'',N'''-四甲基-N,N',N'',N'''-四棕榈基精胺(TMTPS)、2,3-二油烯氧基-N-[2(精胺甲酰胺)乙基]-N,N-二甲基-1-丙烯胺三氟乙酸酯(DOSPA)、N-[1-(2,3-二油烯氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、二(十八烷基)二甲基氯化铵(DODAC)、二(十二烷基)溴化铵(DDAB)、1,2-二油烯氧基-3-三甲基胺基丙烷(DOTAP)、3 β -[N-(N',N'-二甲基氨

基乙烷)胺基甲酰基]胆固醇(DC-Chol)、1, 2-二肉豆蔻酰氧基丙基-3-二甲基羟基乙基铵(DMRIE)、0, 0'-二(十四烷基)-N-(α -三甲基胺基乙酰基)乙二醇胺氯化物(DC-6-14)等阳离子性脂质。

[0066] 本发明中的载体可以具有特定的三维结构。作为所述结构,没有特别限定,可列举出直链状或分枝状的线状结构、膜状结构、球状结构等。因此,载体没有特别限定可具有胶束、脂质体、乳液、微球、毫微球等任意的三维形态。

[0067] 本发明的类视黄醇与载体的结合或包含也可以通过下述方法实现:利用化学和/或物理方法将类视黄醇结合或包含在载体的其他的构成成分上。或者,本发明的类视黄醇与载体的结合或包含也可以通过下述方法实现:在该载体的制作时,将类视黄醇与除类视黄醇以外的载体构成成分混合。本发明的载体上的类视黄醇的量可以设定为:例如 0.01 ~ 1000nmol / μ l、优选 0.1 ~ 100nmol / μ l。类视黄醇与载体的结合或包含也可以在使药物等载持于该载体之前进行,也可以通过将载体、类视黄醇和药物等同时混合等来进行,或者通过将处于已载持有药物等的状态的载体与类视黄醇混合等来进行。因此,本发明还涉及一种肾中的细胞外基质产生细胞特异性的制剂的制造方法,其包括将类视黄醇与已知的任意的药物结合载体或药物封入载体例如 DaunoXome (注册商标)、Doxil、Caelyx (注册商标)、Myocet (注册商标)等脂质体制剂结合的工序。

[0068] 本发明的载体的形态只要能够将所希望的物质或物体搬运到作为靶的肾中的细胞外基质产生细胞,则任何形态均可以,例如,并非是进行限定,可以采用高分子胶束、脂质体、乳胶、微球、毫微球等中的任一形态。在本发明中,从递送效率高低、能够递送的物质的选择范围宽窄和制剂的容易性等观点出发,这些载体中优选脂质体形态,其中特别优选含有阳离子性脂质的阳离子性脂质体。当载体为脂质体形态时,类视黄醇与除类视黄醇以外的脂质体构成脂质的摩尔比为:当考虑类视黄醇与载体的结合或包含的效率性时,优选为 8:1 ~ 1:4、更优选为 4:1 ~ 1:2。

[0069] 本发明的载体只要其所含的类视黄醇以作为靶向剂发挥功能的状态存在,则可以在内部含有搬运物,也可以附着存在于搬运物的外部,还可以与搬运物混合。这里,作为靶向剂发挥功能是指含有类视黄醇的载体比不含类视黄醇的载体更迅速、和/或更大量地到达和/或被摄入到靶细胞即肾中的细胞外基质产生细胞,这可以通过例如将带有标记或含有标记的载体添加到靶细胞的培养物中,然后在规定时间后分析标记的存在部位来容易地确认。从结构上来说,例如,只要使类视黄醇最迟在到达靶细胞之前,至少部分地露出到含有载体的制剂的外部,就能够满足上述条件。这里,“制剂”是包含后述的本发明的组合物、并且进一步具有形态的概念。类视黄醇是否露出到制剂的外部可以通过使制剂与和类视黄醇特异性地结合的物质、例如视黄醇结合蛋白(RBP)等接触,从而研究其对制剂的结合来进行评价。

[0070] 为了使类视黄醇最迟在到达靶细胞之前至少部分地露出到制剂的外部,可通过例如调节类视黄醇与除类视黄醇以外的载体构成成分的配合比率等来实现。另外,当载体具有脂质体等脂质结构体的形态时,可以采用下述方法:例如在除类视黄醇以外的载体构成成分与类视黄醇形成复合物时,首先将由除类视黄醇以外的载体构成成分构成的脂质结构体稀释到水性溶液中,接着使其与类视黄醇接触、混合等。此时,类视黄醇可以是溶解到溶剂、例如 DMSO 等有机溶剂的状态。这里,脂质结构体是指具有任意的三维结构例如线状、

膜状、球状等形状且含有脂质作为构成成分的结构体,并不是进行限定,包括脂质体、胶束、脂质微球、脂质毫微球、脂质乳液等。可将与通过脂质体靶向化得到的靶向剂相同的靶向剂用于其他药物载体的内容,例如记载于 Zhao and Lee, Adv Drug Deliv Rev. 2004; 56 (8): 1193-204, Temming et al., Drug Resist Updat. 2005; 8 (6): 381-402 等。

[0071] 脂质结构体可通过使用例如盐、或蔗糖、葡萄糖、麦芽糖等糖类、甘油、丙二醇等多元醇等、优选使用蔗糖或葡萄糖等渗透压调节剂来调节渗透压而稳定化。另外,可通过加入适度的盐或缓冲液等 pH 调节剂来调节 pH。因此,可在含有这些物质的介质中进行脂质结构体的制造、保存等。此时,渗透压调节剂的浓度优选调节到与血液等张。例如蔗糖的情况下,介质中的浓度并不是进行限定,可以为 3 ~ 15 重量%、优选为 5 ~ 12 重量%、更优选为 8 ~ 10 重量%、特别优选为 9 重量%,葡萄糖的情况下,介质中的浓度并不是进行限定,可以为 1 ~ 10 重量%、优选为 3 ~ 8 重量%、更优选为 4 ~ 6 重量%、特别优选为 5 重量%。

[0072] 本发明还涉及一种针对肾脏中的细胞外基质产生细胞的物质递送用载体的制造方法,其包含将类视黄醇作为针对肾脏中的细胞外基质产生细胞的靶向剂进行配合的工序。关于类视黄醇的配合方法,只要类视黄醇在所配合的载体中作为针对肾脏中的细胞外基质产生细胞的靶向剂发挥功能,则没有特别限定,例如可以采用本说明书中记载的各种方法。因此,关于类视黄醇的配合,可通过利用化学和 / 或物理方法将类视黄醇结合或包含于载体的其他构成成分,或在制作载体时将类视黄醇与除类视黄醇以外的载体构成成分混合等来进行。类视黄醇的配合量等已在有关本发明的载体的内容中叙述。

[0073] 本载体递送物质或物体并无特殊限制,优选为能够从给药部位向着靶细胞存在的病变部位在生物体内物理移动的大小。因此,本发明的载体除了可以搬运原子、分子、化合物、蛋白质、核酸等物质外,还可以搬运载体、病毒颗粒、细胞、由 1 个以上要素构成的药物释放系统、微型设备 (micromachine) 等物体。上述物质或物体优选具有对靶细胞产生某些影响的性质,包括例如对靶细胞进行标记的物质或物体,或对靶细胞的活性或增殖 (例如增强或抑制其活性或增殖) 进行控制的物质或物体。

[0074] 因此,在本发明的一个实施方式中,载体递送物质是“对肾中的细胞外基质产生细胞的活性或增殖进行控制的药物”。这里,肾中的细胞外基质产生细胞的活性是指肾中的细胞外基质产生细胞所表现出的分泌、摄入、游走等各种活性,在本发明中,典型地,其中特别是指与肾纤维化的发病、发展和 / 或复发等相关的活性。作为所述活性,例如,并不是进行限定,可列举出例如 PAI - 1 等生理活性物质、胶原、蛋白聚糖、细胞粘合物、纤连蛋白、血小板反应蛋白、骨桥蛋白、骨粘连蛋白、弹性蛋白等细胞外基质成分等的产生、分泌以及这些细胞外基质成分的分解活性的抑制等。

[0075] 因此,本说明书中,对肾中的细胞外基质产生细胞的活性或增殖进行控制的药物可以是直接或间接地抑制与肾纤维化的发病、发展和 / 或复发相关的所述细胞的物理、化学和 / 或生理作用等的任何药物,并不是进行限定,包括抑制上述生理活性物质的活性或产生的药物、以及中和所述生理活性物质的抗体和抗体片段、抑制所述生理活性物质的表达的 RNAi 分子 (例如 siRNA、shRNA、ddRNA、miRNA、piRNA、rasiRNA 等)、核酶、反义核酸 (包括 RNA、DNA、PNA 或它们的复合物) 等物质、或显性失活突变体等具有显性失活效果的物质、或表达它们的载体、抑制上述细胞外基质成分等的产生、分泌的药物,例如抑制细胞外基质成分的表达的 RNAi 分子 (例如 siRNA、shRNA、ddRNA、miRNA、piRNA、rasiRNA 等)、核酶、反义

核酸(包括 RNA、DNA、PNA 或它们的复合物)等物质、或显性失活突变体等具有显性失活效果的物质、或表达它们的载体、钠通道抑制剂等细胞活性抑制剂、烷化剂(例如异环磷酰胺、尼莫司汀、环磷酰胺、达卡巴嗪、美法仑、雷莫司汀等)、抗肿瘤性抗生素(例如依达比星、表柔比星、柔红霉素、阿霉素、吡柔比星、博来霉素、培洛霉素、米托蒽醌、丝裂霉素 C 等)、抗代谢剂(例如吉西他滨、依诺他滨、阿糖胞苷、替加氟·尿嘧啶、替加氟·吉莫斯特·氧嗪酸钾配合剂、去氧氟尿苷、羟基脲、氟尿嘧啶、氨甲喋呤、巯基嘌呤等)、依托泊甙、伊立替康、长春瑞滨、多西他赛、紫杉醇、长春新碱、长春地辛、长春碱等生物碱,和铂尔定、顺铂、奈达铂等铂络合物等细胞增殖抑制剂、以及环孢菌素等细胞凋亡诱导剂。

[0076] 作为抑制细胞外基质成分的产生 / 分泌的药物,并不是进行限定,可列举出例如作为各种类型的胶原的合成过程中共通的细胞内输送和分子成熟化所必需的胶原特异性分子伴侣的 HSP47 等。

[0077] 另外,本发明中的“对肾中的细胞外基质产生细胞的活性或增殖进行控制的药物”可以是直接或间接地与肾纤维化的发病、发展和 / 或复发的抑制相关的肾中的细胞外基质产生细胞的物理、化学和 / 或生理作用等,例如直接或间接促进 MMP (包括 MMP1、MMP2 等)、纤溶酶原激活物(PA)等的产生·分泌的任何药物。作为所述药物,并不是进行限定,例如可列举出这些物质的活化剂或表达增强剂等。本发明的载体能够递送上述药物的 1 种或 2 种以上。

[0078] 可用于本发明的 siRNA (小干扰 RNA, small interfering RNA)除了狭义的 siRNA 外,也包括 miRNA (微小 RNA, micro RNA)、shRNA (短发夹 RNA, short hairpin RNA)、piRNA (Piwi 蛋白相作用的 RNA, Piwi-interacting RNA)、rasiRNA (重复相关 siRNA, repeat associated siRNA)等双链 RNA 和它们的变体。作为广义的功能性小分子 RNA 的 siRNA 和表达 siRNA 的载体,可以按照例如普通的教科书(实验医学别册改订 RNAi 实验プロトコール 2004 年羊土社、RNAi 实验なるほど Q&A 2006 年羊土社)的教导使用。

[0079] 关于这些 siRNA 的设计,本领域技术人员可以通过参照作为靶的基因的信使 RNA 序列和已知的 siRNA 的序列,按照普通的教科书(实验医学别册改订 RNAi 实验プロトコール 2004 年羊土社、RNAi 实验なるほど Q&A 2006 年羊土社)的教导适当进行。

[0080] 作为本发明的载体的递送物,并不是进行限定,可以是抑制肾纤维化的发病、进展和 / 或复发的除上述药物以外的药物,例如并不是进行限定,可列举出血管紧张素转换酶抑制剂、AT1 血管紧张素 II 受体拮抗剂、醛固酮拮抗剂、内皮素受体拮抗剂、 α 阻断剂、 β 阻断剂、免疫抑制剂、细胞外基质代谢抑制剂、补体系抑制剂、趋化因子抑制剂、TGF- β 抑制剂、磷酸二酯酶 5 抑制剂等作用于—氧化氮系的药物、NF κ B 抑制剂、Rho 抑制剂、p38MAPK 抑制剂、PI3K γ 抑制剂、血管舒缓素、白细胞介素 1 受体拮抗剂、BMP-7、抗肿瘤坏死因子 α 抗体、抗血小板来源生长因子 D 抗体、纤溶酶原激活物抑制剂-1 产生抑制剂、前列腺素受体 4 选择性激动剂、I 型胶原合成抑制剂、硫酸软骨素蛋白聚糖硫酸转移酶抑制剂、维生素 K 环氧化物还原酶抑制剂、糖化最终产物形成抑制剂、A2A 腺苷受体 2A 激动剂、内皮素受体拮抗剂、VEGF 抑制剂、ADAM (去整合素和金属蛋白酶区域, a disintegrin and metalloprotease domain)蛋白酶的活性化剂或者表达增强剂、ADAMTS (带有血小板反应素基序的去整合素和金属蛋白酶区域, a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs)蛋白酶的活性化剂或者表达增强剂、松弛素或者其表达增强剂

等。本说明书中,表达增强剂并不是进行限定,包括例如包含编码作为表达增强对象的蛋白质的核酸的载体等的基因治疗剂等。这些药物还可以与后述的本发明的组合物并用。这里,“并用”是指将本发明的组合物与上述药物实质上同时给药、和在相同的处理期间内在时间上隔开间隔地给药。在后者的情况下,本发明的组合物可以在上述药物之前给药,也可以在上述药物之后给药。

[0081] 本发明的一个方式中,作为对肾中的细胞外基质产生细胞的活性或增殖进行控制的药物,可列举出 HSP47 的抑制剂,例如针对它们各自的 siRNA 等。

[0082] 本发明的载体递送物质或物体可以被标记也可以未被标记。通过进行标记,能够监测向靶细胞的递送是否成功、靶细胞的增减等,不仅仅在试验、研究水平特别有用,在临床水平也是有用的。标记可以选自本领域技术人员公知的任意标记,例如任意的放射性同位素、磁性体、与标记化物质结合的物质(例如抗体等)、荧光物质、荧光团、化学发光物质和酶等。标记还可以附着于载体构成成分,也可以作为独立的递送物载持在载体上。

[0083] 本发明中,“肾中的细胞外基质产生细胞用”或“肾中的细胞外基质产生细胞递送用”是指适于将肾中的细胞外基质产生细胞作为靶细胞使用,其包括例如能够向所述细胞比向其他细胞例如正常细胞更迅速、高效和/或大量地递送物质。例如,与向其他的细胞相比,本发明的载体能够以 1.1 倍以上、1.2 倍以上、1.3 倍以上、1.5 倍以上、2 倍以上、进而 3 倍以上的速度和/或效率向肾中的细胞外基质产生细胞递送物质。

[0084] 本发明还涉及含有所述载体和所述对肾中的细胞外基质产生细胞的活性或增殖进行控制的药物、并用于对肾中的细胞外基质产生细胞的活性或增殖进行控制、或用于对肾纤维化进行处理的组合物,以及所述载体在这些组合物的制造中的用途。

[0085] 本发明中的肾纤维化可由任意的间质性肾炎引起,例如链球菌肾炎、葡萄球菌肾炎、肺炎球菌肾炎,伴随着水痘、B 型肝炎、C 型肝炎、HIV 等的病毒性肾炎、由疟疾等寄生虫感染引起的肾炎、伴随着真菌性肾炎、支原体肾炎等的感染性间质性肾炎、伴随着系统性红斑狼疮(狼疮性肾炎)、系统性硬皮病(胶原性肾)、干燥综合征等胶原病的间质性肾炎、伴随着紫癜性肾炎、多动脉炎、急进性肾小球肾炎等的血管免疫疾病的肾炎、伴随着辐射照射的间质性肾炎、由金制剂、NSAIDs、青霉胺、博来霉素等抗癌剂、抗生素、百草枯等导致的药物性间质性肾炎、由昆虫的蛰伤、花粉、漆树科植物等引起的过敏性肾炎、伴随着淀粉样变性肾炎、糖尿病性肾病、慢性肾小球肾炎、恶性肾硬化、多囊性肾病等的肾炎、肾小管间质性肾炎、伴随着妊娠中毒症或癌的肾炎、膜性增殖性肾小球肾炎、IgA 肾病、混合型冷球蛋白血症肾炎、肺出血肾炎综合征肾炎、魏格纳肉芽肿病肾炎、急性间质性肾炎等特发性间质性肾炎等;因此,也包括这些间质性肾炎慢性化而导致肾纤维化。本发明中的肾纤维化优选包括糖尿病性肾炎、药物性间质性肾炎和特发性间质性肾炎慢性化而导致的肾纤维化。

[0086] 本发明的组合物中,只要载体中所含的类视黄醇以作为靶向剂发挥功能的状态存在,则载体可以在其内部含有递送物,也可以附着存在于递送物的外部,或者也可以与递送物混合。因此,根据给药途径和药物释放模式等的不同,可以将上述组合物用适当的材料例如肠溶性包衣剂或定时崩解性材料包覆,也可以组合到适当的药物释放系统中。此外,本发明的组合物也可以是结合有类视黄醇的脂质体与有效成分的复合物、即 lipoplex 的形态。另外,在载体仅由类视黄醇构成的情况下,本发明的组合物也可以是对肾中的细胞外基质产生细胞的活性或增殖进行控制的药物与类视黄醇的复合物的形态。

[0087] 本发明的组合物可以作为药物使用(即药物组合物),可以通过包括经口和非经口这二者的各种途径,例如并不是进行限定,可以通过经口、静脉内、肌肉内、皮下、局部、肺内、气道内、气管内、支气管内、经鼻、直肠内、动脉内、门静脉内、心室内、骨髓内、淋巴结内、淋巴管内、脑内、脑脊液腔、脑室内、经粘膜、经皮、鼻内、腹腔内和子宫内等途径给药,也可以制成适于各给药途径的剂型。所述剂型和制剂方法可以适当采用任意公知的剂型和制剂方法(例如参照標準薬剂学、渡辺喜照ら編、南江堂、2003 年等)。

[0088] 例如,作为适于经口给药的剂型,并不是进行限定,可列举出散剂、颗粒剂、片剂、胶囊剂、液体制剂、悬浮剂、乳剂、凝胶剂、糖浆剂等,另外,作为适于非经口给药的剂型,可列举出溶液性注射剂、悬浮性注射剂、乳液性注射剂、用时制备型注射剂等注射剂。非经口给药用制剂可以为水性或非水性的等渗性无菌溶液或悬浮液的形态。

[0089] 本发明还涉及一种肾纤维化处理用医药组合物的制造方法,其包含将类视黄醇作为针对肾脏中的细胞外基质产生细胞的靶向剂、将对肾脏中的细胞外基质产生细胞的活性或增殖进行控制的药物作为有效成分分别进行配合的工序。关于类视黄醇的配合手法,只要在所配合的组合物中类视黄醇能够作为针对肾脏中的细胞外基质产生细胞的靶向剂发挥功能,则没有特别限定,例如可采用本说明书中记载的各种手法。另外,关于有效成分的配合手法,只要有效成分能够发挥规定的效果,则没有特别限定,可以采用任意公知的手法。有效成分的配合可以与类视黄醇同时进行,也可以在配合类视黄醇前、或在配合类视黄醇后进行。例如在组合物含有除类视黄醇以外的载体构成成分的情况下,有效成分的配合可以通过将已配合有类视黄醇作为靶向剂的载体与有效成分混合等来进行,也可以将类视黄醇、除类视黄醇以外的载体构成成分和有效成分同时混合等来进行,或者也可以通过在将有效成分配合到除类视黄醇以外的载体构成成分后,将其与类视黄醇混合等来进行。

[0090] 类视黄醇的配合量等如在关于本发明的载体中已经叙述的。此外,关于有效成分的配合量,在以组合物形式给药的情况下,可以是能够抑制肾纤维化的发病或复发、改善病理状态、减轻症状、或者延缓或使其停止进展的量,优选是能够预防肾纤维化的发病和复发、或使其治愈的量。另外,优选是不会产生超过给药所带来的好处的不良影响的量。所述量是公知的,也可以通过使用了培养细胞等的体外试验或者通过小鼠、大鼠、狗或猪等动物模型的试验来适当确定,这样的试验方法对于本领域技术人员来说是熟知的。作为肾纤维化的动物模型,可列举出例如日本特开 2009-178143 中记载的动物模型。有效成分的配合量可根据组合物的给药方式的不同而变化。例如在 1 次给药中使用多个单位的组合物的情况下,1 单位组合物中配合的有效成分的量可以设定为 1 次给药所需要的有效成分的量的几分之一。该配合量的调整是本领域技术人员能够适当进行的。

[0091] 本发明的载体或组合物可以以任何形态供给,但从保存稳定性的观点出发,优选为能够用时制备的形态,例如以在医疗现场或其附近能够由医生和 / 或药剂师、护士或者其他辅助医务人员等制备的形态提供。在此情况下,本发明的载体或组合物以包含这些所必需的构成要素中的至少 1 个的 1 个或 2 个以上的容器的形式提供,在使用前,例如使用前 24 小时以内、优选为使用前 3 小时以内,更优选在即将使用前制备。制备时,在进行制备的场所,可以适当使用通常能够获得的试剂、溶剂、调剂器具等。

[0092] 因此,本发明还涉及载体或者组合物的制备试剂盒,其包括 1 个或 2 个以上的容器,所述容器单独或组合地含有类视黄醇、和 / 或递送物、和 / 或除类视黄醇以外的载体构

成物质；以及涉及以这种试剂盒的形式提供的载体或组合物的必要构成要素。本发明的试剂盒，除上述以外，还可以包含有关本发明的载体和组合物的制备方法和给药方法等的指示、例如说明书或 CD、DVD 等电子记录介质等。另外，本发明的试剂盒可以包括用于完成本发明的载体或组合物的全部构成要素，但也可以不必包括全部的构成要素。因此，本发明的试剂盒可以不包括在医疗现场、实验设施等通常能够获得的试剂或溶剂，例如无菌水、生理盐水或葡萄糖溶液等。

[0093] 本发明进一步涉及用于对肾中的控制细胞外基质产生细胞的活性或增殖进行控制或用于对肾纤维化进行处理的方法，其包含将有效量的上述组合物向需要该组合物的对象进行给药。这里，关于有效量，例如对于后者，是指抑制肾纤维化的发病和复发、改善病理状态、减轻症状或者延迟或使其停止发展的量，优选是能够预防肾纤维化的发病和复发、或使肾纤维化治愈的量。另外，优选为不会产生超过给药所带来的好处的不良影响的量。所述量可以通过使用了培养细胞等的体外试验或者通过小鼠、大鼠、狗或猪等动物模型的试验来适当确定，这样的试验方法对于本领域技术人员来说是熟知的。另外，载体中所含的类视黄醇以及本发明的方法中使用的药物的用量对于本领域技术人员也是公知的，或者可以通过上述试验等来适当确定。作为肾纤维化的动物模型，可列举出例如日本特开 2009-178143 中记载的动物模型。

[0094] 在本发明的方法中，进行给药的组合物的具体用量可以考虑与需要处理的对象相关的各种条件，例如症状的严重程度、对象的一般健康状态、年龄、体重、对象的性别、饮食、给药途径、给药的时期和频率、并用药物、对治疗的反应性以及治疗的依从性等来确定。

[0095] 作为给药途径，包括经口和非经口这二者的各种途径，例如经口、静脉内、肌肉内、皮下、局部、肺内、气道内、气管内、支气管内、经鼻、直肠内、动脉内、门静脉内、心室内、骨髓内、淋巴结内、淋巴管内、脑内、脑脊液腔、脑室内、经粘膜、经皮、鼻内、腹腔内和子宫内等途径。

[0096] 给药频率根据所用组合物的性状和上述那些对象的条件的不同而不同，例如可以 1 日多次（即 1 日 2、3、4 次或 5 次以上）、1 日 1 次、每几日（即每 2、3、4、5、6、7 日等）、1 周几次（例如 1 周 2、3、4 次等）、每周、每几周（即每 2、3、4 周等）。

[0097] 在本发明的方法中，词语“对象”是指任意的生物个体，优选为动物、更优选为哺乳动物、进一步优选为人的个体。在本发明中，对象可以是健康的，也可以患有某种疾病，但在希望对肾纤维化进行处理的情况下，典型地是指患有糖尿病性肾炎或肾纤维化、或者具有患糖尿病肾炎或肾纤维化的危险的对象。例如当希望预防肾纤维化时，并不是进行限定，典型的例子是患有糖尿病性肾炎、特别是 II 型糖尿病所引起的糖尿病性肾炎的对象。

[0098] 另外，词语“处理”定义为包括以疾病的治愈、暂时缓解或预防等为目的的医学上可容许的所有种类的预防性和 / 或治疗性干预。例如，词语“处理”的含义包括肾纤维化的进展的延缓或停止、病变的萎缩或消失、肾纤维化发病的预防或复发的防止等各种目的的医学上可容许的干预。

[0099] 本发明还涉及利用了上述载体的、针对肾中的细胞外基质产生细胞的药物递送方法。该方法包括，并不是进行限定，例如使递送物载持于上述载体的工序、和将载持了递送物的载体给予或添加到含有肾中的细胞外基质产生细胞的生物或介质、例如培养培养基等的工序。这些工序可以按照公知的任意方法或本说明书中记载的方法等来适当完成。上述

递送方法还可以与其他的递送方法、例如以肾为靶的其他递送方法等组合。另外,上述方法还包括在体外进行的方式、以及以体内的肾中的细胞外基质产生细胞为靶的方式。

[0100] 实施例

[0101] 用以下例子进一步详细地对本发明进行说明,但这些例子仅仅是示例,并不是对本发明进行限定。

[0102] 例1 含有 siRNA 的 VA 结合脂质体的制作

[0103] 作为 siRNA,使用了具有以下序列的 siRNA。

[0104] 序列名:Hsp47-C

[0105] 5'-GGACAGGCCUGUACAACUA-dTdT-3' (正义、序列号 1)

[0106] 5'-UAGUUGUACAGGCCUGUCC-dTdT-3' (反义、序列号 2)

[0107] 作为混合前溶液,准备 10mM 的维生素 A (视黄醇、Sigma。以下也记为 VA。溶解于二甲基亚砷)、1mM 的 Lipotrust SR(北海道 System Science 株式会社。以下也记为脂质体或脂质体构成脂质。溶解于无核酸酶的水)和 10 μ g / μ l 的 siRNA (将 Hsp47-C 溶解于无核酸酶的水)。接着,在上述制备的无核酸酶的水中的 Lipotrust SR 中以 1:1(mol / mol)的比例添加溶解于二甲基亚砷的 VA,用 vortex 搅拌 15 秒钟后,在遮光状态下室温放置 5 分钟,形成复合物。在该复合物中添加 siRNA 并混合,得到给药液 VALiposome-siRNA Hsp47C。该给药液每 100 μ l 含有 75nmol 的 VA、75nmol 的脂质体构成脂质、siRNA 112.5 μ g,其相当于 3.00 μ mol / kg 体重的 VA、3.00 μ mol / kg 体重的脂质体构成脂质、siRNA 4.5mg / kg 体重的 siRNA。其中,VA 露出到脂质体表面。

[0108] 例2 肾纤维化小鼠模型中的治疗效果的研究

[0109] (1) 肾纤维化动物模型的制作

[0110] 委托株式会社 Stelic 再生医科学研究所制作肾纤维化小鼠模型。具体地,将 N-乙酰基- β -D-氨基葡萄糖苷酶抑制剂给予出生后 2 日龄的 C57BL6J/JcL 雄性小鼠(日本 Clea 公司),4 周龄前给予饲料 CE-2 (日本 Clea 公司制)和灭菌水进行饲养,在满 4 周龄离乳后,给予粗脂肪含量比通常的食物高的高脂饮食(High Fat Diet32)(日本 Clea 公司)和灭菌水,饲养到 12 周龄,制作 STAM 小鼠。该小鼠模型已知患有糖尿病性肾炎(参照日本特开 2009-178143),能够观察糖尿病性肾炎所导致的肾纤维化。

[0111] 将上述小鼠模型在 12 周 3 日龄时每 10 只地分为以下 4 组。

[0112] (第 1 组)无处理-STAM 小鼠、处理前对照组(以下记为 NT-STAM (Pre) 组)

[0113] (第 2 组)无处理-STAM 小鼠组(以下记为 NT-STAM 组)

[0114] (第 3 组)5%葡萄糖给药组(以下记为 Vehicle 组)

[0115] (第 4 组)VA Liposome-siRNA Hsp47C 给药组(以下记为 VL-Hsp47C 组)

[0116] (2) 给药液的给药

[0117] 对于 NT-STAM (Pre) 组,在分组后、治疗开始前使小鼠安乐死,确认病理状态。对于除 NT-STAM 组外的上述 2 组,从 12 周 5 日龄时开始每隔 1 日通过尾静脉注射进行相应的下述给药液共计 10 次的给药。

[0118] 作为(第 3 组)溶剂对照,使用混合有无核酸酶的水 0.75ml / kg 体重和 5%葡萄糖(大塚制药株式会社)3.250ml / kg 体重的给药液(5%葡萄糖或 Vehicle)。

[0119] (第 4 组)使用按照每给药液 100 μ l、VA 为 75nmol、脂质体构成脂质为

75nmol、siRNA 为 112.5 μ g 的方式混合、并用 5% 葡萄糖进行了最终调整的给药液(VA liposome-siRNA Hsp47C 或 VL-Hsp47C)。

[0120] 将给药开始日的体重作为基准体重,当给药日的体重变化率在基准体重的 20% 以内时,通过尾静脉按照 4ml / kg 体重将各给药液给药。当超过 20% 时,之后将其体重作为新的基准体重,重新设定给药量。

[0121] (3) 对肾纤维化的改善效果的研究

[0122] 在最终给药结束后的第 2 日(15 周 4 日龄时),在二乙醚麻醉下从心脏采血,并使小鼠安乐死、摘出肾脏。

[0123] 将摘出的肾脏用 4% 多聚甲醛-磷酸缓冲液固定后,进行石蜡包埋、制作薄切标本。为了研究对肾纤维化的治疗效果,进行天狼星红染色(将胶原特异性地染红的纤维染色),使用一体化荧光显微镜 BZ-9000 (株式会社 KEYENCE),用 80 倍拍摄。关于分析,从肾皮质区域随机地拍摄 20 个视野,使用 BZ-9000 付属的分析软件进行定量。

[0124] 图 1 示出了各给药组中的肾皮质区域的代表性的肾小球的镜检像。天狼星红染色是胶原特异性的纤维染色,将纤维化部位染为红色~粉色。镜检的结果是,虽在所有组中未见肾小球基底膜的肥厚方面存在差异,但系膜细胞区域(间质)和肾小管细胞周围的纤维化在 VL-Hsp47C 给药组中比其他 3 组的纤维化的程度轻,仅为轻度,可见肾纤维化的改善(系膜细胞区域的增大用箭头表示)。另外,对于每只小鼠,随机地拍摄 20 个视野的肾皮质区域,算出纤维化区域的比例。根据图 2 所示的结果,VL-Hsp47C 给药组中,与 NT-STAM 和 Vehicle 这 2 组相比,天狼星红阳性区域的比例显著降低,可见肾纤维化的改善。其中,统计学上显著性差异的评价使用 t 检验。

[0125] 根据以上结果,VL-Hsp47C 给药组中可见纤维化的改善倾向。考虑到 siRNA 基本上是在细胞质内发挥作用,该结果显示,类视黄醇作为针对肾中的细胞外基质产生细胞的靶向剂发挥功能,通过将药物高效地递送到该细胞,能够抑制肾纤维化的进展。

[0126] 例 3 利用含有 siRNA 的 VA 结合脂质体的肾细胞外基质产生细胞中的基因击倒

[0127] (1) 细胞的分离 / 回收

[0128] 将显示与肝星状细胞类似的性状的肾中的细胞外基质产生细胞如下所述地进行分离·回收。

[0129] 首先,事先制备以下 5 种溶液。将全部溶液保存于 4℃。

[0130] •EGTA 液:在 HBSS (Invitrogen 14170)500ml 中加入 HEPES1.19g 和 EGTA0.1g 并混合。

[0131] •0.02% 胶原酶液:在 HBSS (Invitrogen 24020)500ml 中加入 HEPES1.19g、CaCl₂ 2H₂O 0.235g 和胶原酶(Yakult YK-102) 0.1g 并混合。

[0132] •0.02% 胶原酶 + 0.1% 蛋白酶液:在 0.02% 胶原酶 40ml 中加入蛋白酶(Sigma P6911-1G) 40mg 并混合。

[0133] •Hanks 液:在 HBSS (Invitrogen 24020)500ml 中加入 MgSO₄0.05g 并混合。

[0134] •10% Nycodenz^(R) 液(Axis-Shield Prod. No 1114542-1):在蒸馏水 500ml 中加入 50g Nycodenz^(R) 并混合溶解。

[0135] 对小鼠(雄性 C57BL6/J、20 ~ 30g、6 ~ 8 周龄)实施麻醉,对腹部剃毛,然后沿正中线开腹,取出肾脏。将取出的肾脏用 30ml 的 EGTA 液清洗 3 次左右以除去血液。将肾脏

放入 5ml 的 EGTA 液中,用剪刀细细剪碎。向剪碎的肾脏中加入 EGTA 液,使总量为 30ml,用 1300rpm 离心 5 分钟。除去离心后的上清,加入 0.02%胶原酶+0.1%蛋白酶液 30ml,移入三角烧瓶在 37℃下搅拌 20 分钟。用细胞过滤网(Cell Strainer)(Falcon 352360)过滤搅拌液,将滤液用 1300rpm 离心 5 分钟。将沉淀溶解于 Hanks 液,在 Hanks 液中混合 10% Nycodenz^(R)液以使终浓度为 8% Nycodenz^(R)。将混合液在 1400×g 下离心 20 分钟。回收上清,进一步以 1300rpm 离心 5 分钟。将上清除去,再悬浮于 10% FBS DMEM(Sigma D6546)中,然后播种到 T-75 烧瓶(BD 353136)中。

[0136] (2) 基因抑制实验

[0137] 1. 含有 siRNA 的 VA 结合脂质体的制作

[0138] 作为 siRNA,使用具有以下序列的 siRNA。

[0139] 序列名:Hsp47-C

[0140] 5'-GGACAGGCCUGUACAACUA-dTdT-3' (正义、序列号 1)

[0141] 5'-UAGUUGUACAGGCCUGUCC-dTdT-3' (反义、序列号 2)

[0142] 作为混合前溶液,准备 10mM 的维生素 A (视黄醇、Sigma R7632、以下简称为 VA。溶解于二甲基亚砜)、1mM 的 Lipotrust SR(北海道 SystemScience 株式会社 N301。以下也记为脂质体或脂质体构成脂质。用无核酸酶的水溶解)和 10mg / ml 的 siRNA (将 Hsp47-C 溶解于无核酸酶的水)。接着,在上述制备的无核酸酶的水中的 Lipotrust SR 中以 1:1 (mol:mol) 的比例添加溶解于二甲基亚砜的 VA 后,用 vortex 搅拌 15 秒钟,在遮光状态下室温放置 5 分钟,形成复合物。向该复合物中添加 10mg / ml 的 siRNA 并混合,得到 VA Liposome-siRNA Hsp47C。在无 VA 的情况下,等量加入二甲基亚砜以代替 VA。按照向细胞转染时终浓度 lipotrust SR/VA 为 7.7 μM、siRNA 为 869nM 的方式制备。

[0143] 2. 转染实验

[0144] 事先将作为实验用的细胞的采用上述回收方法从小鼠肾脏回收的细胞外基质产生细胞按照细胞数 0.2×10^5 个 / 孔播种到 6 孔板上,在 37℃下用 10% FBS DMEM 培养 2 日。

[0145] 培养 2 日后,在转染前将各孔的 10% FBS DMEM 完全除去,加入 900 μl 新鲜的 10% FBS DMEM,在 37℃下培养 15 分钟左右。

[0146] 将上述“1.”中制作的 VA Liposome-siRNA Hsp47C 或 Liposome-siRNAHsp47C 100 μl 缓缓加入各孔中,在 37℃下孵育 30 分钟后,将各孔的培养上清完全除去,加入新鲜的 10% FBS DMEM 2ml,在 37℃下培养 2 日。2 日后,用 RNeasy Mini Kit(QIAGEN 74104)从细胞分离 RNA,用 HighCapacity RNA-to-cDNA Master Mix(Applied Biosystems 4390779)进行 RT-PCR,得到 cDNA。使用得到的 cDNA,用 Power SYBR^(R)Green PCR Master Mix(Applied Biosystems 4368708)进行定量 PCR,从而研究基因抑制的效果。其结果示于图 3。

[0147] 以上的结果显示例 2 中使用的针对 HSP47 基因的 siRNA 抑制了肾的细胞外基质产生细胞中的 HSP47 基因的表达,并启示本发明的治疗剂中所含的 siRNA 通过被肾的细胞外基质产生细胞特异性地摄入而抑制该细胞内靶基因的表达,从而抑制了肾纤维化的进展。

[0001]

序 列 表

<110> 日东电工株式会社

<120> 肾纤维化处理剂

<130> PCT2453ND

<150> JP2010-138070

<151> 2010-06-17

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Hsp47-C sense strand

<400> 1

ggacaggccu guacaacuat t

21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Hsp47-C antisense strand

<400> 2

uaguuguaca ggccugucct t

21

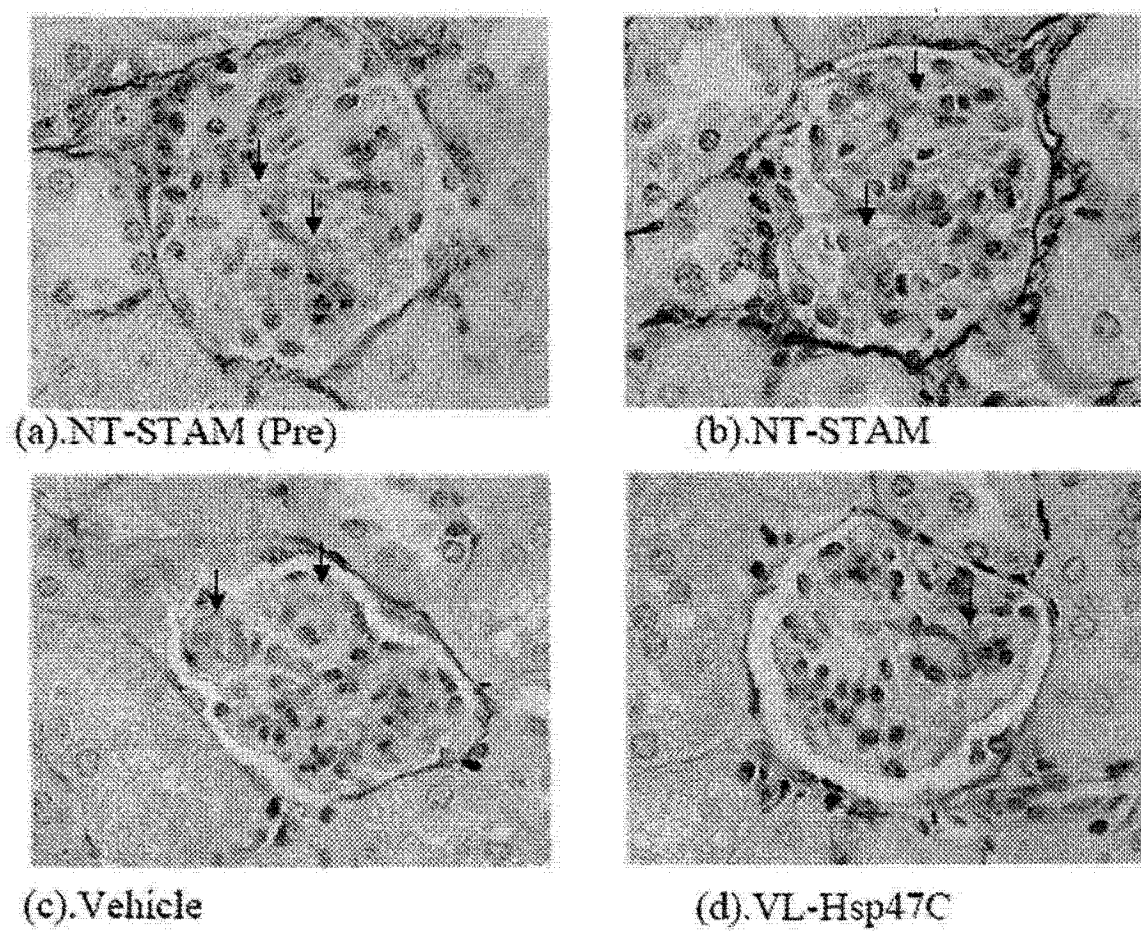


图 1

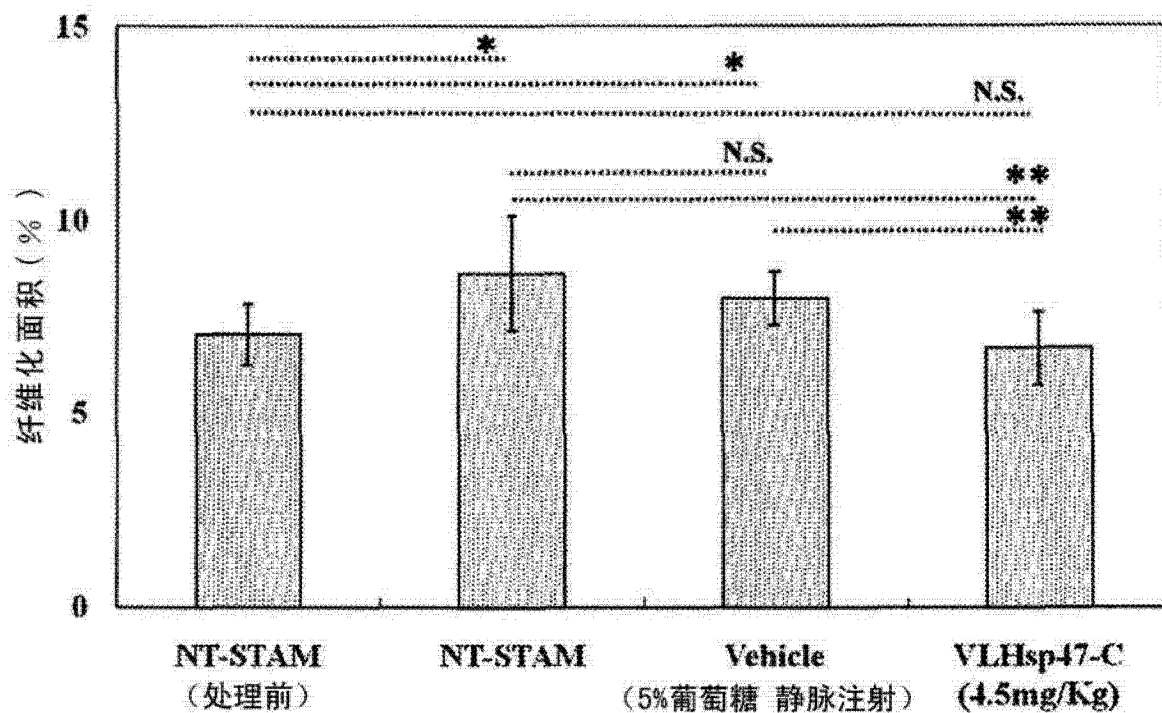


图 2

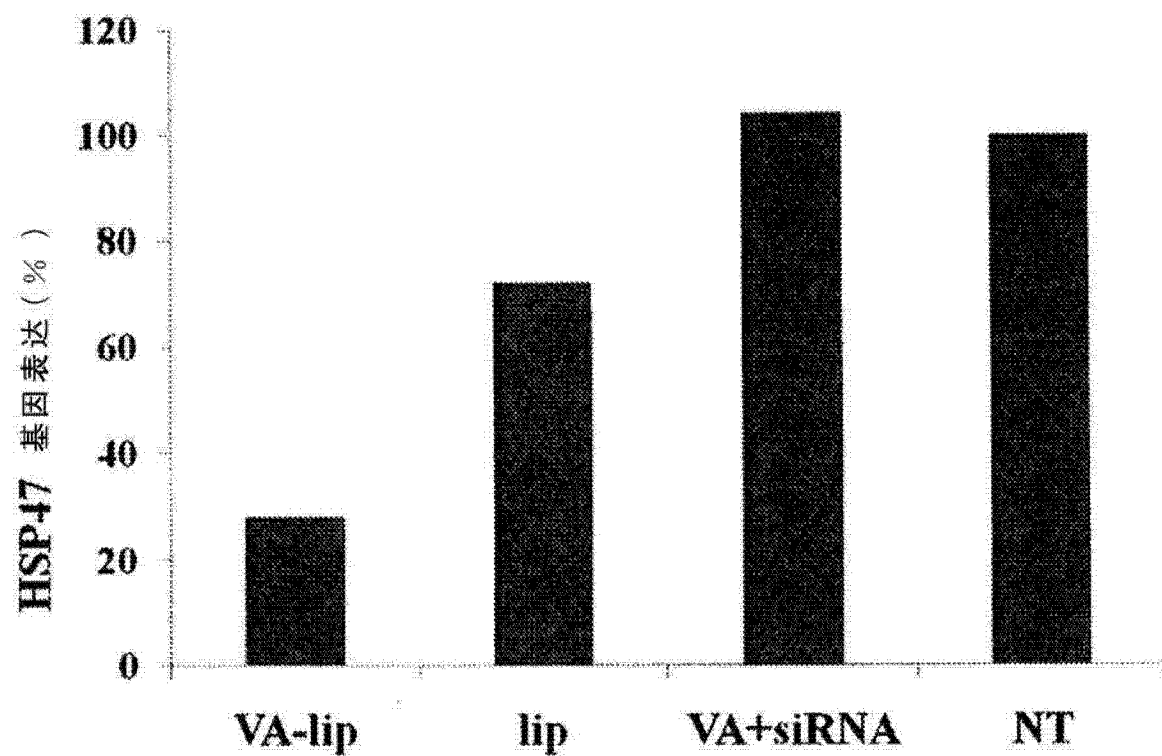


图 3