

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-508012
(P2004-508012A)

(43) 公表日 平成16年3月18日(2004.3.18)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	4 B 0 2 4
A 6 1 K 9/127	A 6 1 K 9/127	4 C 0 7 6
A 6 1 K 47/04	A 6 1 K 47/04	4 C 0 8 4
A 6 1 K 47/18	A 6 1 K 47/18	
A 6 1 K 47/44	A 6 1 K 47/44	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 198 頁) 最終頁に続く	

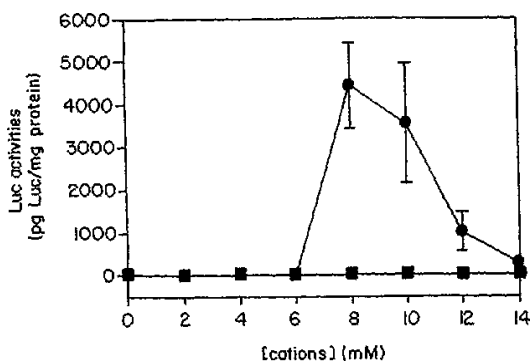
(21) 出願番号	特願2001-577996 (P2001-577996)	(71) 出願人	399016651 ザ ユニバーシティ オブ ブリティッシュ コロンビア カナダ国 プイ6ティー 1ゼット3, ブ リティッシュ コロンビア, パンクーバー 、 インダストリー リアイソン オフィス 、 ルーム 331, アイアールシー ビル ディング, ヘルス サイエンシーズ モー ル 2194
(86) (22) 出願日	平成13年4月20日 (2001. 4. 20)	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敬
(85) 翻訳文提出日	平成14年10月21日 (2002. 10. 21)	(74) 代理人	100092624 弁理士 鶴田 準一
(86) 国際出願番号	PCT/CA2001/000555	(74) 代理人	100117019 弁理士 渡辺 陽一
(87) 国際公開番号	W02001/080900		
(87) 国際公開日	平成13年11月1日 (2001. 11. 1)		
(31) 優先権主張番号	PCT/CA00/00451		
(32) 優先日	平成12年4月20日 (2000. 4. 20)		
(33) 優先権主張国	カナダ (CA)		
(31) 優先権主張番号	09/553, 639		
(32) 優先日	平成12年4月20日 (2000. 4. 20)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/227, 949		
(32) 優先日	平成12年8月25日 (2000. 8. 25)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エンドソーム膜不安定剤を用いたS P L P媒介性トランスフェクションの強化方法

(57) 【要約】

本発明は、細胞に核酸を送達するための新規のそして意外にも有効な方法を提供する。これらの方法は、エンドソーム膜不安定剤 (例えばカルシウム) の存在が、S P L Pまたは「安定化プラスミド - 脂質粒子」として処方されるプラスミドのトランスフェクション効率の劇的増大をもたらす、という発見に基づいている。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞中に核酸を導入するための核酸 - 脂質粒子組成物であって、前記粒子が陽イオン性脂質、粒子の凝集を抑制する複合脂質、核酸およびエンドソーム膜不安定剤を含む組成物。

【請求項 2】

前記エンドソーム膜不安定剤が前記核酸 - 脂質粒子の外側に存在する請求項 1 記載の核酸 - 脂質粒子組成物。

【請求項 3】

前記エンドソーム膜不安定剤が前記核酸 - 脂質粒子の外側および内側の両方に存在する請求項 1 記載の核酸 - 脂質粒子組成物。

10

【請求項 4】

前記エンドソーム膜不安定剤が Ca^{++} イオンである請求項 1 記載の核酸 - 脂質粒子組成物。

【請求項 5】

Ca^{++} イオンの濃度が約 0.1 mM ~ 100 mM である請求項 4 記載の核酸 - 脂質粒子組成物。

【請求項 6】

Ca^{++} イオンの濃度が約 1 mM ~ 20 mM である請求項 5 記載の核酸 - 脂質粒子組成物。

【請求項 7】

前記粒子が約 150 nm 未満の中央値直径を有する請求項 1 記載の核酸 - 脂質粒子組成物。

20

【請求項 8】

前記陽イオン性脂質が N, N - ジオレイル - N, N - ジメチルアンモニウムクロリド (DODAC)、N, N - ジステアリル - N, N - ジメチルアンモニウムブロミド (DDAB)、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 (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) および N, N - ジメチル - 2, 3 - ジオレイルオキシ)プロピルアミン (DODMA) ならびにそれらの組合せからなる群から選択される一員である請求項 1 記載の核酸 - 脂質粒子組成物。

30

【請求項 9】

前記粒子が付加的非陽イオン性脂質をさらに含む請求項 1 記載の核酸 - 脂質粒子組成物。

【請求項 10】

前記非陽イオン性脂質が DOPE、POPC および EPC からなる群から選択される請求項 9 記載の核酸 - 脂質粒子組成物。

【請求項 11】

前記粒子が Ca^{++} イオンキレート化を促進する官能基を含む請求項 1 記載の核酸 - 脂質粒子組成物。

【請求項 12】

粒子の凝集を抑制する前記複合脂質が、次式：

40



I

(式中、A は脂質部分であり、
W は親水性ポリマーであり、そして
Y はポリ陽イオン性部分である)

を有する請求項 1 記載の核酸 - 脂質粒子組成物。

【請求項 13】

W が PEG、ポリアミド、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリ乳酸 / ポリグリコール酸コポリマーおよびそれらの組合せからなる群から選択されるポリマーであり、前記ポリマーが約 250 ~ 約 7000 ダルトンの分子量を有する請求項 12 記載の核酸 - 脂質粒子組成物。

50

【請求項 14】

Y が選定 pH で少なくとも 4 の正電荷を有する請求項 12 記載の核酸 - 脂質粒子組成物。

【請求項 15】

Y がリシン、アルギニン、アスパラギン、グルタミン、それらの誘導体およびそれらの組合せからなる群から選択される一成員である請求項 12 記載の核酸 - 脂質粒子組成物。

【請求項 16】

A がジアシルグリセロリル部分、ジアルキルグリセロリル部分、N - N - ジアルキルアミノ部分、1, 2 - ジアシルオキシ - 3 - アミノプロパン部分および 1, 2 - ジアルキル - 3 - アミノプロパン部分からなる群から選択される一成員である請求項 12 記載の核酸 - 脂質粒子組成物。

10

【請求項 17】

W が PEG である請求項 12 記載の核酸 - 脂質粒子組成物。

【請求項 18】

W がポリアミドポリマーである請求項 12 記載の核酸 - 脂質粒子組成物。

【請求項 19】

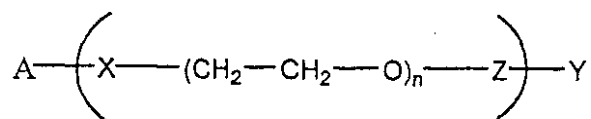
W が約 250 ~ 約 2000 ダルトンの分子量を有する請求項 12 記載の核酸 - 脂質粒子組成物。

【請求項 20】

式 I I :

【化 1】

20



II

(式中、X は単一結合、または少なくとも 1 つのエチレンオキシド単位に前記脂質を共有結合する官能基からなる群から選択される一成員であり、

30

Z は単一結合、または陽イオン性基に前記少なくとも 1 つのエチレンオキシド単位を共有結合する官能基からなる群から選択される一成員であり、そして

n は約 6 ~ 約 50 の値を有する整数である)

の一般構造を有する請求項 17 記載の核酸 - 脂質粒子組成物。

【請求項 21】

X が単一結合、ホスファチジルエタノールアミノ、ホスファチジルエタノールアミド、ホスホロ、ホスホ、ホスホエタノールアミノ、ホスホエタノールアミド、カルボニル、カルバメート、カルボキシル、カルボネート、アミド、チオアミド、酸素、硫黄および NR (ここで、R は水素またはアルキル基である) からなる群から選択される一成員である請求項 20 記載の核酸 - 脂質粒子組成物。

40

【請求項 22】

Z が単一結合、ホスファチジルエタノールアミノ、ホスファチジルエタノールアミド、ホスホロ、ホスホ、ホスホエタノールアミノ、ホスホエタノールアミド、カルボニル、カルバメート、カルボキシル、カルボネート、アミド、チオアミド、酸素、硫黄および NR (ここで、R は水素またはアルキル基である) からなる群から選択される一成員である請求項 20 記載の核酸 - 脂質粒子組成物。

【請求項 23】

A がジアシルグリセロリル部分であり、

X がホスホエタノールアミドであり、

Z が NR (ここで R は水素原子である) であり、そして

50

Y が約 1 ~ 約 10 個の塩基性アミノ酸またはそれらの誘導体からなる群から選択される一成員である

請求項 20 記載の核酸 - 脂質粒子組成物。

【請求項 24】

A が 2 つの脂肪アシル鎖を有するジアシルグリセロリル部分であり、各アシル鎖が別々に 2 ~ 30 炭素長であり、そして飽和されているかまたは種々の程度の飽和を有する請求項 23 記載の核酸 - 脂質粒子組成物。

【請求項 25】

Y がリシン、アルギニン、アスパラギン、グルタミン、それらの誘導体およびそれらの組合せからなる群から選択される一成員である請求項 23 記載の核酸 - 脂質粒子組成物。

10

【請求項 26】

A が 2 つの脂肪アシル鎖を有するジアシルグリセロリル部分であり、各アシル鎖が飽和 C - 18 炭素鎖であり、そして

Y が 4 つのリシン残基またはそれらの誘導体を有する陽イオン性基である

請求項 23 記載の核酸 - 脂質粒子組成物。

【請求項 27】

粒子の凝集を抑制する前記複合脂質が PEG - 脂質である請求項 1 記載の核酸 - 脂質粒子組成物。

【請求項 28】

前記 PEG - 脂質が PEG - セラミドである請求項 27 記載の核酸 - 脂質粒子組成物。

20

【請求項 29】

前記 PEG - セラミドのセラミドが約 8 ~ 約 20 個の炭素原子を有する脂肪酸基を含む請求項 28 記載の核酸 - 脂質粒子組成物。

【請求項 30】

前記 PEG - 脂質が PEG - ホスファチジルエタノールアミンである請求項 28 記載の核酸 - 脂質粒子組成物。

【請求項 31】

粒子の凝集を抑制する前記複合脂質が A T T A - 脂質である請求項 1 記載の核酸 - 脂質粒子組成物。

【請求項 32】

前記核酸がプラスミド、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびリボザイムからなる群から選択される請求項 1 記載の核酸 - 脂質粒子組成物。

30

【請求項 33】

細胞中への核酸の導入方法であって、以下の：

前記細胞を核酸 - 脂質粒子組成物と接触させ、前記粒子が陽イオン性脂質、粒子の凝集を抑制する複合脂質、および核酸ならびにエンドソーム膜不安定剤を含むことを包含する方法。

【請求項 34】

前記エンドソーム膜不安定剤が前記核酸 - 脂質粒子の外側に存在する請求項 33 記載の細胞中への核酸の導入方法。

40

【請求項 35】

前記エンドソーム膜不安定剤が Ca^{++} イオンである請求項 33 記載の細胞中への核酸の導入方法。

【請求項 36】

Ca^{++} イオンの濃度が約 0.1 mM ~ 100 mM である請求項 35 記載の細胞中への核酸の導入方法。

【請求項 37】

Ca^{++} イオンの濃度が約 1 mM ~ 20 mM である請求項 36 記載の細胞中への核酸の導入方法。

【請求項 38】

50

前記粒子が約 150 nm 未満の中央値直径を有する請求項 33 記載の細胞中への核酸の導入方法。

【請求項 39】

前記陽イオン性脂質が N, N - ジオレイル - N, N - ジメチルアンモニウムクロリド (DODAC)、N, N - ジステアリル - N, N - ジメチルアンモニウムブロミド (DDAB)、N - (1 - (2, 3 - ジオレオイルオキシ)プロピル) - N, N, N - トリメチルアンモニウムクロリド (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) および N, N - ジメチル - 2, 3 - ジオレイルオキシ)プロピルアミン (DODMA) ならびにそれらの組合せからなる群から選択される一成員である請求項 33 記載の細胞中への核酸の導入方法。

10

【請求項 40】

前記粒子が付加的非陽イオン性脂質をさらに含む請求項 33 記載の細胞中への核酸の導入方法。

【請求項 41】

前記非陽イオン性脂質が DOPE、POPC および EPC からなる群から選択される請求項 40 記載の細胞中への核酸の導入方法。

【請求項 42】

前記粒子が Ca⁺⁺ イオンキレート化を促進する官能基を含む請求項 33 記載の細胞中への核酸の導入方法。

【請求項 43】

粒子の凝集を抑制する前記複合脂質が、次式：



I

(式中、A は脂質部分であり、
W は親水性ポリマーであり、そして
Y はポリ陽イオン性部分である)

を有する請求項 33 記載の細胞中への核酸の導入方法。

20

【請求項 44】

W が PEG、ポリアミド、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリ乳酸/ポリグリコール酸コポリマーおよびそれらの組合せからなる群から選択されるポリマーであり、前記ポリマーが約 250 ~ 約 7000 ダルトンの分子量を有する請求項 43 記載の細胞中への核酸の導入方法。

30

【請求項 45】

Y が選定 pH で少なくとも 4 の正電荷を有する請求項 43 記載の細胞中への核酸の導入方法。

【請求項 46】

Y が リシン、アルギニン、アスパラギン、グルタミン、それらの誘導体およびそれらの組合せからなる群から選択される一成員である請求項 43 記載の細胞中への核酸の導入方法。

【請求項 47】

A が ジアシルグリセロリル部分、ジアルキルグリセロリル部分、N - N - ジアルキルアミノ部分、1, 2 - ジアシルオキシ - 3 - アミノプロパン部分および 1, 2 - ジアルキル - 3 - アミノプロパン部分からなる群から選択される一成員である請求項 43 記載の細胞中への核酸の導入方法。

40

【請求項 48】

W が PEG である請求項 43 記載の細胞中への核酸の導入方法。

【請求項 49】

W が ポリアミドポリマーである請求項 43 記載の細胞中への核酸の導入方法。

【請求項 50】

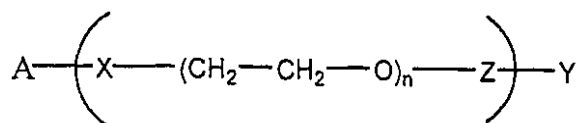
W が 約 250 ~ 約 2000 ダルトンの分子量を有する請求項 43 記載の細胞中への核酸の導入方法。

50

【請求項 5 1】

式 I I :

【化 2】



II

10

(式中、Xは単一結合、または少なくとも1つのエチレンオキシド単位に前記脂質を共有結合する官能基からなる群から選択される一成員であり、
Zは単一結合、または陽イオン性基に前記少なくとも1つのエチレンオキシド単位を共有結合する官能基からなる群から選択される一成員であり、そして
nは約6～約50の値を有する整数である)

の一般構造を有する請求項48記載の細胞中への核酸の導入方法。

【請求項 5 2】

Xが単一結合、ホスファチジルエタノールアミノ、ホスファチジルエタノールアミド、ホスホロ、ホスホ、ホスホエタノールアミノ、ホスホエタノールアミド、カルボニル、カルバメート、カルボキシル、カルボネート、アミド、チオアミド、酸素、硫黄およびNR(ここで、Rは水素またはアルキル基である)からなる群から選択される一成員である請求項51記載の細胞中への核酸の導入方法。

20

【請求項 5 3】

Zが単一結合、ホスファチジルエタノールアミノ、ホスファチジルエタノールアミド、ホスホロ、ホスホ、ホスホエタノールアミノ、ホスホエタノールアミド、カルボニル、カルバメート、カルボキシル、カルボネート、アミド、チオアミド、酸素、硫黄およびNR(ここで、Rは水素またはアルキル基である)からなる群から選択される一成員である請求項51記載の細胞中への核酸の導入方法。

30

【請求項 5 4】

Aがジアシルグリセロリル部分であり、

Xがホスホエタノールアミドであり、

ZがNR(ここでRは水素原子である)であり、そして

Yが約1～約10個の塩基性アミノ酸またはそれらの誘導体からなる群から選択される一成員である

請求項51記載の細胞中への核酸の導入方法。

【請求項 5 5】

Aが2つの脂肪アシル鎖を有するジアシルグリセロリル部分であり、各アシル鎖が別々に2～30炭素長であり、そして飽和されているかまたは種々の程度の飽和を有する請求項54記載の細胞中への核酸の導入方法。

40

【請求項 5 6】

Yがリシン、アルギニン、アスパラギン、グルタミン、それらの誘導体およびそれらの組合せからなる群から選択される一成員である請求項54記載の細胞中への核酸の導入方法。

【請求項 5 7】

Aが2つの脂肪アシル鎖を有するジアシルグリセロリル部分であり、各アシル鎖が飽和C-18炭素鎖であり、そして

Yが4つのリシン残基またはそれらの誘導体を有する陽イオン性基である

請求項54記載の細胞中への核酸の導入方法。

50

【請求項 58】

粒子の凝集を抑制する前記複合脂質が PEG - 脂質である請求項 33 記載の細胞中への核酸の導入方法。

【請求項 59】

前記 PEG - 脂質が PEG - セラミドである請求項 58 記載の細胞中への核酸の導入方法。

【請求項 60】

前記 PEG - セラミドのセラミドが約 8 ~ 約 20 個の炭素原子を有する脂肪酸基を含む請求項 59 記載の細胞中への核酸の導入方法。

【請求項 61】

前記 PEG - 脂質が PEG - ホスファチジルエタノールアミンである請求項 59 記載の細胞中への核酸の導入方法。

【請求項 62】

粒子の凝集を抑制する前記複合脂質が ATTA - 脂質である請求項 33 記載の細胞中への核酸の導入方法。

【請求項 63】

前記核酸がプラスミド、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびリボザイムからなる群から選択される請求項 33 記載の細胞中への核酸の導入方法。

【請求項 64】

脂質二重層中の H_{II} 相構造の誘導方法であって、前記脂質二重層をエンドソーム膜不安定剤と接触させ、それにより脂質二重層中に H_{II} 相構造を誘導することを包含する方法。

【請求項 65】

前記脂質二重層が DOPC : DOPE : DOPS : Chol を含む請求項 64 記載の H_{II} 相構造の誘導方法。

【請求項 66】

前記エンドソーム膜不安定剤が Ca^{++} イオンである請求項 64 記載の H_{II} 相構造の誘導方法。

【請求項 67】

Ca^{++} イオンが低レベルの陽イオン性脂質と協力して作用して、 H_{II} 相形成を誘発する請求項 66 記載の H_{II} 相構造の誘導方法。

【請求項 68】

細胞中に核酸を導入するための核酸 - 脂質粒子組成物の使用であって、前記粒子が陽イオン性脂質、粒子の凝集を抑制する複合脂質、核酸およびエンドソーム膜不安定剤を含む使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の背景

臨床的に有用である遺伝子療法には、有効かつ安全な遺伝子送達系が必要とされる。ウイルスベクターは、相対的に効率的な遺伝子送達系であるが、しかし野生型への逆戻りの可能性ならびに免疫応答問題といった種々の制限を蒙る。その結果、非ウイルス性遺伝子送達系が注目増大を受け入れつつある (Worgall, et al., Human Gene Therapy 8: 37 - 44 (1997); Peeters, et al., Human Gene Therapy 7: 1693 - 1699 (1996); Ye, et al., Gene Therapy 1: 192 - 200 (1994); Hope, et al., Molecular Membrane Biology 15: 1 - 14 (1998))。プラスミド DNA - 陽イオン性リポソーム複合体は一般に、最も一般的に用いられる非ウイルス性遺伝子送達ビヒクルである (Felgner, Scientific American 276: 102 - 106 (1997); Chonn, et al., Current Opinion in Biotechnology 50

10

20

30

40

50

y 6 : 6 9 8 - 7 0 8 (1 9 9 5)) 。 し か し な が ら 複 合 体 は 、 全 身 適 用 に 適 さ ない 十 分 に 特 定 さ れ て い ない 大 型 の 系 で あり 、 可 成 り の 有 毒 副 作 用 を 引 き 出 す (H a r r i s o n , e t a l . , B i o t e c h n i q u e s 1 9 : 8 1 6 - 8 2 3 (1 9 9 5) ; H u a n g , e t a l . , N a t u r e B i o t e c h n o l o g y 1 5 : 6 2 0 - 6 2 1 (1 9 9 7) ; T e m p l e t o n , e t a l . , N a t u r e B i o t e c h n o l o g y 1 5 : 6 4 7 - 6 5 2 (1 9 9 7) ; H o f l a n d , e t a l . , P h a r m a c e u t i c a l R e s e a r c h 1 4 : 7 4 2 - 7 4 9 (1 9 9 7)) 。

【0002】

近年の研究は、プラスミドDNAが、二重層脂質小胞内に封入された単一プラスミドからなる小(直径約70 nm)「安定化プラスミド-脂質粒子」(SPLP)中に封入され得る(Wheeler, et al., Gene Therapy 6:271-281 (1999))。これらのSPLPは、典型的には、「フソゲニック」脂質ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)、低レベルの陽イオン性脂質を含有し、ポリ(エチレングリコール)(PEG)コーティングの存在により水性媒質中で安定化される。SPLPは、それらが静脈内(i.v.)注射後に循環寿命延長を示し、遠位腫瘍部位での血管透過性強化のためにこのような領域で選択的に集積し、そしてこれらの腫瘍部位で導入遺伝子発現を媒介し得るので、全身性用途を有する。ルシフェラーゼマーカー遺伝子を含有するSPLPのi.v.注射後に腫瘍で観察される導入遺伝子発現のレベルは、プラスミドDNA-陽イオン性リポソーム複合体(リポプレックス)または裸DNAを用いて達成され得るレベルより優っている。いくつかの用途における最適治療利益のためには、依然として発現レベルの改良が必要とされ得る(例えばMonck, et al., J. Drug Target. 7:439-452 (2000)参照)。

【0003】

陽イオン性ポリ(エチレングリコール)(PEG)脂質またはCPLは、正電荷を付与するために脂質二重層中への挿入のために設計された(Chen, et al., Bioconj. Chem. 11:433-437 (2000)参照)。例えば1つまたはそれ以上の遠位正電荷を含有するPEGに結合されたジステアロイル-PE(DSP)含有CPLが合成され、そして*in vitro*細胞結合およびリポソームの取込み強化を促進することが示された(Chen, et al., Bioconj. Chem. 11:433-7 (2000))。

【0004】

したがって、細胞中に核酸を導入するための新規の且つより効率的な方法に対する当業界における強い必要性が依然として存在する。本発明は、このおよびその他の必要性を取り扱う。

【0005】

発明の要約

本発明は、細胞に核酸を送達するための有効な組成物、方法および使用を提供する。本発明の組成物および方法は、脂質処方物中のエンドソーム膜不安定剤の存在がトランスフェクション効率の劇的増大をもたらすという意外な発見に基づいている。本発明の組成物および方法は*in vitro*または*in vivo*で用いられ得るし、哺乳類細胞(例えばヒト)を含めた任意の細胞型のトランスフェクション効率を増大するために用いられ得る。

【0006】

このようなものとして、一実施態様において、本発明は、陽イオン性脂質、粒子の凝集を抑制する複合脂質、核酸およびエンドソーム膜不安定剤を含む細胞中に核酸を導入するための核酸-脂質粒子組成物を提供する。好ましい局面では、核酸-脂質粒子は、「安定化プラスミド-脂質粒子」(SPLP)である。典型的にはSPLPは直径150 nm未満であり、二重層脂質小胞内に封入された単一プラスミドを含む。凝集を抑制する複合脂質は、典型的には親水性ポリマーを含む。好ましい実施態様では、親水性ポリマーは、約

250～約7000ダルトンの分子量を有するPEGまたはポリアミド（例えばATTA）である。エンドソーム膜不安定剤は、粒子の内側、粒子の外側、または粒子の内側と外側の両方に存在し得る。好ましくは、エンドソーム膜不安定剤はCa⁺⁺イオンである。ある種の局面では、Ca⁺⁺イオンの濃度は約0.1mM～約100mMである。

【0007】

ある種の実施態様では、凝集を抑制する複合脂質は、「陽イオン性ポリマー脂質」（CPL）である。好ましい局面では、CPLは次式：

A - W - Y

I

を有し、式I中、Aは脂質部分であり、Wは親水性ポリマーであり、そしてYはポリ陽イオン性部分である。ある種の好ましい実施態様では、Yはリシン、アルギニン、アスパラギン、グルタミンおよびそれらの組合せから選択される。

10

【0008】

別の実施態様では、本発明は、細胞中への核酸の導入方法であって、細胞を核酸-脂質粒子組成物と接触させることを包含する方法であり、粒子が陽イオン性脂質、粒子の凝集を抑制する複合脂質、核酸およびエンドソーム膜不安定剤を含む方法を提供する。エンドソーム膜不安定剤は、粒子の内側、粒子の外側、または粒子の内側と外側の両方に存在し得る。ある種の実施態様では、エンドソーム膜不安定剤は、粒子の前に、粒子の後に、同時にまたはそれらの組合せで細胞を接触させる。

【0009】

さらに別の実施態様では、本発明は、脂質二重層中のH_{II}相構造の誘導方法であって、脂質二重層をエンドソーム膜不安定剤と接触させ、それにより脂質二重層中にH_{II}相構造を誘導することを包含する方法を提供する。ある種の局面では、エンドソーム膜不安定剤（例えばCa⁺⁺イオン）は、低レベルの陽イオン性脂質と相乗的にまたは付加的に作用して、H_{II}相形成を誘導し得る。

20

【0010】

本発明の組成物、方法および使用は、多数の利益を提供する。例えばエンドソーム膜不安定剤の存在は、核酸のトランスフェクション効率の劇的増大をもたらす。トランスフェクション効率を増大することにより、細胞内の遺伝子産物の量は、大いに増大される。さらに本発明の組成物および方法はin vitroまたはin vivoで用いられ得るし、ヒトを含めた任意の細胞型のトランスフェクション効率を増大するために用いられ得る。

30

【0011】

本発明のこれらのおよびその他の利点、目的および実施態様を、以下の図面および詳細な説明と一緒にさらさら詳細に説明する。

【0012】

本発明の詳細な説明および好ましい実施態様

I. 序論

本発明は、細胞に核酸を送達するための新規の且つ以外にも有効な組成物および方法を提供する。これらの組成物および方法は、エンドソーム膜不安定剤（例えばカルシウム）の存在が、SPLPまたは「安定化核酸（例えばプラスミド）-脂質粒子」として処方される核酸（例えばプラスミド）のトランスフェクション効率の劇的増大をもたらす、という

40

【0013】

本明細書中で用いる場合、「エンドソーム膜不安定剤」（EMD）という用語は、エンドソーム膜の崩壊または不安定化を促し、それによりそれらの内容物の放出を強化すると考えられる作用物質（単数または複数）を指す。エンドソームは、典型的には選択的透過性膜により細胞の残りのものから単離される別個の細胞内区画である。適切なEMDとしては、一価金属イオン、例えばK⁺、Na⁺、二価金属イオン、例えばMg²⁺、Ca²⁺、Mn²⁺、Co²⁺、および陽イオン性脂質との金属イオンの組合せが挙げられるが、これらに限定されない。最も好ましいEMDはCa²⁺イオンであって、この場合、Ca

50

Ca^{2+} イオンを含有する S P L P に関しては、 Ca^{2+} イオンの非存在下での S P L P より約 10^6 倍高いトランスフェクション効率が観察される。

【0014】

本発明の方法は *in vitro* または *in vivo* で用いられ得るし、哺乳類細胞を含めた任意の細胞型のトランスフェクション効率を増大するために用いられ得る。例えば *in vitro* トランスフェクションに関しては、エンドソーム膜不安定剤（例えばカルシウム）がトランスフェクション培地に付加され得る。例えば広範囲のカルシウム濃度のいずれか、例えば $0.1\text{ mM} \sim$ 約 100 mM の範囲の濃度が用いられ得る。好ましくは約 $1\text{ mM} \sim$ 約 20 mM 、最も好ましくは約 $8 \sim$ 約 10 mM が用いられる。一実施態様では、エンドソーム膜不安定剤（例えばカルシウム）は、トランスフェクション培地中への S P L P の希釈後に所望の最終濃度を生じる高濃度で先ず S P L P に付加される。他の実施態様では、エンドソーム膜不安定剤（例えばカルシウム）は、細胞中へのトランスフェクションの時点で S P L P に付加される。エンドソーム膜不安定剤は S P L P と同時投与され得るし、それは S P L P の投与前に投与され得るし、あるいはそれは S P L P の投与後に投与され得る。

10

【0015】

In vivo では、トランスフェクションの部位でのエンドソーム膜不安定剤（例えばカルシウム）濃度の局所的増大を生じる任意の方法が用いられ得る。例えば粒子は、エンドソーム膜不安定剤を混入するよう処方され得るし、粒子は投与前に高エンドソーム膜不安定剤（例えばカルシウム）濃度を含有する溶液中に浸漬され得るし、あるいは粒子は高エンドソーム膜不安定剤（例えばカルシウム）濃度を含有する緩衝液または処方物中に投与され得る。このような方法は、粒子の局所的送達のために、例えば腫瘍内注入のために特に用いられ、この場合、例えばカルシウムイオンの同時投与は局所的高カルシウム濃度を生じ、それにより送達の部位またはその付近への粒子のトランスフェクション強化をもたらし得る。さらにエンドソーム膜不安定剤は S P L P と同時投与され得るし、それは S P L P の投与前に投与され得るし、あるいはそれは S P L P の投与後に投与され得る。

20

【0016】

ある種の *in vivo* または *in vitro* 実施態様では、S P L P は、例えばエンドソーム膜不安定剤をキレート化するためのキレート化分子、例えばエンドソーム膜不安定剤キレート化剤で誘導される脂質をそれらの表面に包含し、それにより粒子の全身送達後でさえ、局所的高エンドソーム膜不安定剤濃度の生成を可能にするよう処方される。例えばある種の *in vivo* または *in vitro* 実施態様では、粒子は、その表面にカルシウムキレート化分子、例えばカルシウムキレート化剤で誘導される脂質を含み、それにより粒子の全身送達後でさえ局所的高カルシウム濃度の生成を可能にするよう処方される。

30

【0017】

任意の S P L P 粒子を用いて本発明を実行し得る。例えば広範囲の濃度の陽イオン性およびその他の脂質のいずれかを含む S P L P が用いられ得る。同様に、S P L P は、広範囲な種々の陽イオン性およびその他の脂質のいずれかを含み得る。S P L P は、任意の供給源からの、そして任意のポリヌクレオチド配列を含む任意のプラスミドを用いて調製され得るし、ならびに多数の方法のいずれかを用いて調製され得る。

40

【0018】

本発明は、S P L P - C P L と呼ばれる陽イオン性 P E G 脂質を含有する S P L P も提供する。好ましい実施態様では、4つの正電荷を有する P E G 脂質を含む S P L P - C P L₄ が用いられる。S P L P および S P L P - C P L は、多数の官能基のいずれかを含むよう誘導され得るし、その例としては、カルシウムキレート化剤、細胞または組織特異的ターゲティング分子、標識等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0019】

本発明で用いるための適切な S P L P および S P L P - C P L、ならびに S P L P および S P L P - C P L の製造および使用方法は、例えば米国特許出願 60 / 130, 151 お

50

よび 09/553, 639 に、ならびに PCT 国際出願 PCT/CA00/00451 に教示されている（これらの教示内容は各々、参照により本明細書中に含まれる）。

【0020】

II. 定義

「脂質」という用語は、有機化合物の一群を指し、その例としては脂肪酸のエステルが挙げられ（これらに限定されない）、そして水中で不溶性であるが、しかし多数の有機溶媒中では可溶性であることを特徴とする。それらは通常は少なくとも3つのクラスに分類される：（1）脂肪および油ならびに蠟を含む「単純脂質」；（2）リン脂質および糖脂質を含む「複合脂質」；（3）ステロイドのような「誘導脂質」。

【0021】

「小胞形成脂質」という用語は、疎水性部分および極性頭基を有し、そしてほとんどのリン脂質により例示されるように、単独で、水中で二重層小胞中に自発的に生成され得る任意の両親媒性脂質を含むよう意図される。

「小胞採用脂質」という用語は、他の両親媒性脂質と組合せて脂質二重層中に安定的に組み入れられ、二重層膜の内部疎水性領域と接触する疎水性部分および膜の外部極性表面に向けて配向されたその極性頭基部分を有する任意の両親媒性脂質を包含するよう意図される。小胞採用脂質としては、独力で、非ラメラ相を採用する傾向があり、さらに二重層安定化構成成分の存在下で二重層構造を想定し得る脂質が挙げられる。典型的例は、DOPPE（ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン）である。二重層安定化構成成分としては、SPLPの凝集を抑制する複合脂質、ポリアミドオリゴマー（例えばATT A-脂質誘導体）、ペプチド、タンパク質、洗剤、脂質誘導体、PEG-脂質誘導体、例えばホスファチジルエタノールアミンに結合されたPEG、およびセラミドに接合されたPEGが挙げられるが、これらに限定されない（米国特許第08/485,608号、現在は米国特許第5,885,613号（この記載内容は、参照により本明細書中に含まれる）参照）。

【0022】

「両親媒性脂質」という用語は、一部は、脂質物質の疎水性部分が疎水性相中に配向するが、一方親水性部分は水性層に向けて配向する任意の適切な物質を指す。両親媒性脂質は、通常は脂質小胞の主要構成成分である。親水性特徴は、極性または荷電基、例えば炭水化物、ホスファト、カルボン酸、スルファト、アミノ、スルフヒドリル、ニトロ、ヒドロキシ基等の存在に由来する。疎水性は、非極性基の含入により付与され、その例としては、長鎖飽和および不飽和脂肪族炭化水素基、ならびに1つまたはそれ以上の芳香族、脂環式または複素環式基（単数または複数）により置換されるこのような基が挙げられるが、これらに限定されない。両親媒性化合物の例としては、リン脂質、アミノ脂質およびスフィンゴ脂質が挙げられるが、これらに限定されない。リン脂質の代表例としては、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、リソホスファチジルコリン、リソ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またはジリノレオイルホスファチジルコリンが挙げられるが、これらに限定されない。リンを欠くその他の化合物、例えばスフィンゴ脂質、糖スフィンゴ脂質ファミリー、ジアシルグリセロールおよび - アシルオキシ酸も、両親媒性脂質と呼ばれる基内である。さらに前記の両親媒性脂質は、他の脂質、例えばトリグリセリドおよびステロールと混合され得る。

【0023】

「中性脂質」という用語は、選定pHで非荷電または中性両イオン性形態で存在する多数の脂質種のいずれかを指す。生理学的pHでは、このような脂質としては、例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、スフィンゴミエリン、セファリン、コレステロール、セレブロシドおよびジアシルグリセロールが挙げられる。

10

20

30

40

50

【0024】

「疎水性脂質」という用語は、非極性基を有する化合物を指し、それらの基の例としては長鎖飽和および不飽和脂肪族炭化水素基、ならびに1つまたはそれ以上の芳香族、脂環式または複素環式基（単数または複数）により任意に置換されるこのような基が挙げられるが、これらに限定されない。適切な例としては、ジアシルグリセロール、ジアルキルグリセロール、N-N-ジアルキルアミノ、1,2-ジアシルオキシ-3-アミノプロパンおよび1,2-ジアルキル-3-アミノプロパンが上げられるが、これらに限定されない。

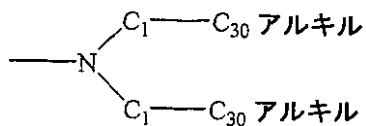
【0025】

「ジアシルグリセロリル」という用語は、別々に2~30個の、エステル結合によりグリセロールの1-および2-位置に結合された炭素原子を有する2-脂肪アシル鎖 R^1 および R^2 を意味する。アシル基は飽和され得るか、または種々の程度の不飽和を有し得る。「ジアルキルグリセロリル」という用語は、エーテル結合によりグリセロールの1-および2-位置に結合された2つの $C_{1} \sim C_{30}$ のアルキル鎖を意味する。

【0026】

「N-N-ジアルキルアミノ」という用語は、以下の：

【化3】

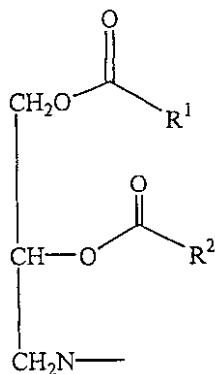


を意味する。

【0027】

「1,2-ジアシルオキシ-3-アミノプロパン」という用語は、エステル結合によりプロパンの1-および2-位置に結合された2-脂肪アシル鎖 $C_{1} \sim C_{30}$ を意味する。アシル基は飽和され得るか、または種々の程度の不飽和を有し得る。プロパン分子の3-位置は、結合された-NH-基を有する。1,2-ジアシルオキシ-3-アミノプロパンは、以下の一般式を有する：

【化4】



【0028】

「1,2-ジアルキル-3-アミノプロパン」という用語は、エーテル結合によりプロパンの1-および2-位置に結合された2-アルキル鎖（ $C_{1} \sim C_{30}$ ）を意味する。プロパン分子の3-位置は、結合された-NH-基を有する。1,2-ジアシル-3-アミノ

10

20

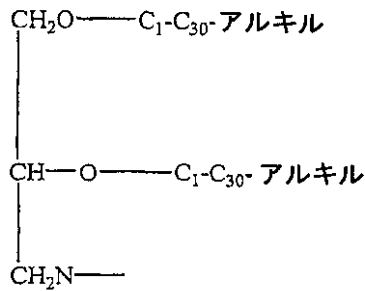
30

40

50

プロパンは、以下の一般式を有する：

【化5】



10

「非陽イオン性脂質」という用語は、前記の任意の中性脂質ならびに陰イオン性脂質を指す。陰イオン性脂質の例としては、ホスファチジルグリセロール、カルジオリピン、ジアシルホスファチジルセリン、ジアシルホスファチジン酸、N-ドデカノイルホスファチジルエタノールアミン、N-スクシニルホスファチジルエタノールアミン、N-グルタリルホスファチジルエタノールアミン、リソホスファチジルグリセロールおよび中性脂質と連結されるその他の陰イオン性改質基が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0029】

「陽イオン性脂質」という用語は、選定pHで、例えば生理学的pHで、正味正電荷を保有する多数の脂質種のいずれかを指す。このような脂質としては、N, N-ジオレイル-N, N-ジメチルアンモニウムクロリド(「DODAC」)、N-(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, N-ジステアリル-N, N-ジメチルアンモニウムブロミド(「DDAB」)、N-(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(「DOTAP」)、3-(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(「DC-Chol」)およびN-(1,2-ジミリスチルオキシプロブ-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(「DMRIE」)が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、本発明に用いられ得る陽イオン性脂質の多数の市販調製物が利用可能である。これらとしては、例えばLIPOFECTIN(登録商標)(DOTMAおよび1,2-ジオレイル-sn-3-ホスホエタノールアミン(「DOPE」)を含む市販陽イオン性リポソーム(Gibco/BRL, Grand Island, New York, USA)); LIPOFECTAMINE(登録商標)(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(「DOSPA」)および(「DOPE」)を含む市販陽イオン性リポソーム(Gibco/BRL)); ならびにTRANSFECTAM(登録商標)(エタノール中のジオクタデシルアミドグリシルカルボキサミド(「DOGS」)を含む市販陽イオン性脂質(Promega Corp., Madison, Wisconsin, USA))が挙げられる。以下の脂質は陽イオン性であり、生理学的pH以下で正電荷を有する：DODAP、DODMA、DMDMA等。

30

40

【0030】

「フソゲニック」という用語は、細胞の膜と融合するリポソーム、SPLPまたはその他の薬剤送達系の能力を指す。膜は、形質膜または細胞小器官周囲の膜、例えばエンドソーム、核等であり得る。フソゲネシスは、このような膜とのリポソームの融合である。

「デンドリマー」という用語は、多世代を有する分枝鎖ポリマーとの関連を包含する。デンドリマーでは、各世代は多分枝点を作り出す。

【0031】

「リガンド」という用語は、反応性官能基を伴う任意の分子、化合物または装置を包含し

50

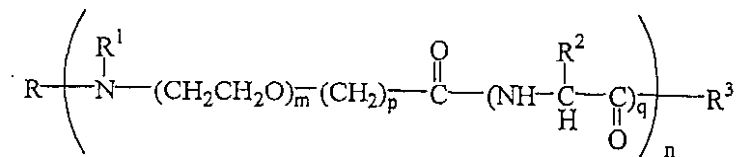
、例としては、脂質、両イオン性脂質、担体化合物、キレート化部分、生親和性化合物、バイオマテリアル、バイオポリマー、バイオメディカル装置、分析的検出可能化合物、治療的活性化合物、酵素、ペプチド、タンパク質、抗体、免疫刺激剤、放射能標識、フルオロゲン、ビオチン、薬剤、ハプテン、DNA、RNA、多糖、リポソーム、ウイルス、ミセル、免疫グロブリン、官能基、ターゲティング剤または毒素が挙げられる。前記の一覧は例証であって、網羅的であるよう意図されない。

【0032】

「ATTA」または「ポリアミド」という用語は、米国特許出願第09/218,988号(1998年12月22日提出)に開示された化合物を指すが、これらに限定されない。これらの化合物としては、次式：

10

【化6】



(式中、Rは水素、アルキルおよびアシルからなる群から選択される一成員であり；R¹は水素およびアルキルからなる群から選択される一成員であり；あるいは任意にRおよびR¹ならびにそれらが結合される窒素は、アジド部分を形成し；R²は水素、任意置換アルキル、任意置換アリールおよびアミノ酸の側鎖から選択される群の一成員であり；R³は水素、ハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、メルカプト、ヒドラジノ、アミノおよびNR⁴R⁵(ここでR⁴およびR⁵は別々に水素またはアルキルである)からなる群から選択される一成員であり；nは4~80であり；mは2~6であり；そしてqは0または1である)を有する化合物が挙げられる。その他のポリアミドが本発明の化合物中に用いられ得ることは、当業者には明らかである。

20

【0033】

本明細書中で用いる場合、「アルキル」という用語は、分枝または非分枝炭化水素鎖、例えばメチル、エチル、n-プロピル、イソ-プロピル、n-ブチル、sec-ブチル、イソ-ブチル、tert-ブチル、オクタ-デシルおよび2-メチルペンチルを意味する。これらの基は、このような鎖に一般的に結合される1つまたはそれ以上の官能基、例えばヒドロキシル、プロモ、フルオロ、クロロ、ヨード、メルカプトまたはチオ、シアノ、アルキルチオ、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、カルボキシル、カルバルコイル、アルキル、アルケニル、ニトロ、アミノ、アルコキシ、アミド等で任意に置換されて、アルキル基、例えばトリフルオロメチル、3-ヒドロキシヘキシル、2-カルボキシプロピル、2-フルオロエチル、カルボキシメチル、シアノブチル等を生成し得る。

30

【0034】

「アルキレン」という用語は、前記のような二価アルキル、例えばメチレン(-CH₂-)、プロピレン(-CH₂CH₂CH₂-)、クロロエチレン(-CHClCH₂-)、2-チオブテン(-CH₂CH(SH)CH₂CH₂-)、1-プロモ-3-ヒドロキシル-4-メチルペンテン(-CHBrCH₂CH(OH)CH(CH₃)CH₂-)等を指す。

40

【0035】

「アルケニル」という用語は、1つまたはそれ以上の炭素-炭素二重結合を含有する分枝または非分枝炭化水素鎖を意味する。

「アルキニル」という用語は、1つまたはそれ以上の炭素-炭素三重結合を含有する分枝または非分枝単価水素鎖を意味する。

「アリール」という用語は、例えばフェニル、ナフチル、インデニル等のような好ましく

50

は約 6 ~ 14 個の炭素原子を有する少なくとも 1 つの芳香族環を形成し、そしてこのような鎖に一般的に結合される 1 つまたはそれ以上の官能基、例えばヒドロキシル、ブromo、フルオロ、クロロ、ヨード、メルカプトまたはチオ、シアノ、シアノアミド、アルキルチオ、複素環式、アリール、ヘテロアリール、カルボキシル、カルバルコイル、アルキル、アルケニル、ニトロ、アミノ、アルコキシル、アミド等で置換されてアリール基、例えばビフェニル、ヨードビフェニル、メトキシビフェニル、アントリル、ブromoフェニル、ヨードフェニル、クロロフェニル、ヒドロキシフェニル、メトキシフェニル、ホルミルフェニル、アセチルフェニル、トリフルオロメチルチオフェニル、トリフルオロメトキシフェニル、アルキルチオフェニル、トリアルキルアンモニウムフェニル、アミドフェニル、チアゾリルフェニル、オキサゾリルフェニル、イミダゾリルフェニル、イミダゾリルメチルフェニル等を形成する炭素原子の鎖を意味する。

10

【0036】

「アシル」という用語は、 $-C(O)R$ 基（ここで R は前記のようなアルキルまたはアリールである）、例えばホルミル、アセチル、プロピオニルまたはブチリルを意味する。

「アルコキシ」という用語は、 $-OR-$ （ここで R はアルキルである）を意味する。

【0037】

「アミド」という用語は、アミド結合： $-C(O)NR-$ （ここで R は水素またはアルキルである）を意味する。

「アミノ」という用語は、アミン結合： $-NR-$ （ここで R は水素またはアルキルまたは末端 NH_2 である）を意味する。

20

「カルボキシル」という用語は、基 $-C(O)O-$ を意味し、そして「カルボニル」という用語は基 $-C(O)-$ を意味する。

【0038】

「カルボネート」という用語は、基 $-OC(O)O-$ を示す。

「カルバメート」という用語は、基 $-NHC(O)O-$ を意味し、そして「尿素」という用語は基 $-NHC(O)NH-$ を意味する。

「ホスホロ」という用語は、基 $-OP(O)(OH)O-$ を意味する。

「塩基性アミノ酸」という用語は、選定 pH で、例えば生理学的 pH で正味正電荷を有する天然アミノ酸ならびに合成アミノ酸および/またはアミノ酸模倣物を指す。この群としては、リシン、アルギニン、アスパラギン、グルタミン、ヒスチジン等が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0039】

「ホスホリルエタノールアミノ」という用語は、基 $-OP(O)(OH)OCH_2CH_2NH-$ を意味する。

「ホスホリルエタノールアミド」という用語は、基 $-OP(O)(OH)OCH_2CH_2NHC(O)-$ を意味する。

「ホスホ」という用語は、5 価リン部分 $-P(O)(OH)O-$ を意味する。

【0040】

「ホスホエタノールアミノ」という用語は、基 $-P(O)(OH)OCH_2CH_2NH-$ を意味する。

40

「ホスホエタノールアミド」という用語は、基 $-P(O)(OH)OCH_2CH_2NHC(O)-$ を意味する。

「エチレンオキシド単位」という用語は、基 $-OCH_2CH_2-$ を意味する。

【0041】

「CPL」という用語は、陽イオン性ポリマー脂質、例えば陽イオン性 PEG 脂質を指す。好ましい CPL は、式 I および II の化合物である。このような CPL は、米国特許出願第 09/553,639 号（2000 年 4 月 20 日提出）および PCT 特許出願第 CA 00/00451 号（2000 年 4 月 20 日提出。これは 2000 年 10 月 26 日に WO 00/62813 として公開された）に開示されている。

【0042】

50

「d - D S P E - C P L - M」という用語は、1つの正電荷を有するD S P E - C P Lを指す「C P L 1」という用語に包含される。d - D S P E - C P L - M中の「d - 」は、C P Lが蛍光ダンシル基を含有することを示す。C P Lがダンシル部分なしで合成され得ることは糖業者には明らかであり、したがって「D S P E - C P L - M」という用語は前記の「C P L 1」という用語に包含される。

【0043】

「d - D S P E - C P L - D」という用語は、2つの正電荷を有するD S P E - C P Lを指す「C P L 2」という用語に包含される。

「d - D S P E - C P L - T 1」という用語は、3つの正電荷を有するD S P E - C P Lを指す「C P L 3」という用語に包含される。

10

「d - D S P E - C P L - Q 1」という用語は、4つの正電荷を有するD S P E - C P Lを指す「C P L 4 a」という用語に包含される。

【0044】

「d - D S P E - C P L - Q 5」あるいはD S P E - P E G Q u a d 5あるいはD S P E - C P L - 4という用語はすべて、4つの正電荷を有するD S P E - C P Lを指す「C P L 4 (またはC P L 4 b)」という用語に包含される。頭基領域を修飾することにより、1つ(モノまたはM)、2つ(ジまたはD)、3つ(トリまたはT)および4つ(クアドまたはQ)の正電荷を含有するC P Lが合成された。種々のQ u a d C P Lが合成され、それゆえこれらはQ 1 ~ Q 5と番号を付けられる。

【0045】

略語「H B S」は、H e p e s - 緩衝化食塩水を指し、「R h o - P E」はローダミン - ホスファチジルエタノールアミンを指し、そして「L U V」は「大型単一ラメラ小胞」を指す。

20

【0046】

I I . 核酸 - 脂質粒子 (S P L P) およびその特性

核酸 - 脂質粒子あるいはS P L Pは、典型的には陽イオン性脂質および核酸を含む。このようなS P L Pは、好ましくは非陽イオン性脂質および二重層安定化構成成分も含み、さらに好ましくはS P L Pの凝集を抑制する複合脂質も含む。本発明のS P L Pは、約150 nm未満の平均直径を有し、そして実質的に非毒性である。さらに核酸は、本発明のS P L P中に存在する場合、ヌクレアーゼによる分解に対して水性溶液に耐性である。このようなS P L Pは、米国特許第5,976,567号およびP C T特許公告W O 96 / 40964に非常に詳細に開示されている(これらの教示内容はともに、参照により本明細書中に含まれる)。

30

【0047】

A . S P L P 構成成分

種々の適切な陽イオン性脂質が、単独で、あるいは1つまたはそれ以上のその他の陽イオン性脂質種または中性脂質種と組合せて、本発明に用いられ得る。

本発明において有用である陽イオン性脂質は、生理学的pHで正味正電荷を保有する多数の脂質種のいずれか、例えばD O D A C、D O T M A、D D A B、D O T A P、D O S P A、D O G S、D C - C h o lおよびD M R I Eまたはそれらの組合せであり得る。多数のこれらの脂質および関連類似体(これらも本発明において有用である)は、同時係属中U S S N 08 / 316,399、米国特許第5,208,036号、第5,264,618号、第5,279,833号および第5,283,185号に記載されている(これらの記載内容は、参照により本明細書中に含まれる)。さらに陽イオン性脂質の多数の市販調製物が利用可能であり、本発明に用いられ得る。これらとしては、例えばL I P O F E C T I N (登録商標)(D O T M AおよびD O P Eを含む市販陽イオン性リポソーム(G i b c o / B R L, G r a n d I s l a n d, N e w Y o r k, U S A)); L I P O F E C T A M I N E (登録商標)(D O S P AおよびD O P Eを含む市販陽イオン性リポソーム(G i b c o / B R L)); ならびにT R A N S F E C T A M (登録商標)(D O G Sを含む市販陽イオン性脂質(P r o m e g a C o r p., M a d i s o n,

40

50

Wisconsin, USA))が挙げられる。

【0048】

本発明に用いられる非陽イオン性脂質は、安定複合体を生成し得る種々の中性非荷電性両イオン性または陰イオン性脂質のいずれかであり得る。それらは好ましくは中性であるが、しかしそれらは代替的に正または負に荷電され得る。本発明に有用な非陽イオン性脂質の例としては、リン脂質関連物質、例えばレシチン、ホスファチジルエタノールアミン、リソレシチン、リソ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、カルジオシピン、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
10
ジグリセロール(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)およびジオレオイル-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)が挙げられる。付加的非リン含有脂質は、例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オレエート、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-アリアルスルフェートポリエチルオキシル
20
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等、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、セファリンおよびセレブロシドである。その他の脂質、例えばリソホスファチジルコリンおよびリソホスファチジルエタノールアミンが存在し得る。非陽イオン性脂質としては、同時係属中US 5,831,429(この記載内容は、参照により本明細書中に含まれる)に記載されたようなポリエチレングリコール-ベースポリマー、例えばPEG 2000、PEG 5000、およびリン脂質とまたはセラミドと接合されたポリエチレングリコール(PEG-Cerと呼ばれる)が挙げられる。

【0049】

好ましい実施態様では、非陽イオン性脂質は、ジアシルホスファチジルコリン(例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およびジリノレ
30
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(例えばジオレオイルホスファチジルエタノールアミンおよ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)、セラミドまたはスフィンゴミエリンである。これらの脂質中のアシル基は、好ましくはC₁₀~C₂₄の炭素鎖を有する脂肪酸由来のアシル基である。さらに好ましくは、アシル基はラウロイル、ミリストイル、パルミトイル、ステアロイルまたはオレオイルである。特に好ましい実施態様では、非陽イオン性脂質は1,2-sn-ジオレオイルホスファチジルエタノールアミンまたは卵スフィンゴミエリン(ESM)である。

【0050】

一実施態様では、SPLPはさらに、二重層安定化構成成分(BSC)を含む。適切なBSCとしては、ポリアミドオリゴマー、ペプチド、タンパク質、洗剤、脂質誘導体、PEG-脂質、例えばホスファチジルエタノールアミンに結合されたPEGおよびセラミドに
40
結合されたPEG、が挙げられるが、これらに限定されない(米国特許第5,885,613号(この記載内容は、参照により本明細書中に含まれる)参照)。好ましくは二重層安定化構成成分は、PEG-脂質またはATTA-脂質である。本発明の好ましい実施態様では、BSCは、SPLPの凝集を抑制する複合脂質である。適切な複合脂質としては、PEG-脂質複合体、ATTA-脂質複合体、陽イオン性ポリマー-脂質複合体(CPL)またはそれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の好ましい実施態様では、SPLPはPEG-脂質複合体またはATTA-脂質複合体を、CPLと一緒に含む。

【0051】

本発明に用いられるCPLは、以下の構造的特徴を有する：(1)脂質二重層中にCPLを混入するための脂質アンカー、例えば疎水性脂質；(2)陽イオン性頭基に脂質アンカーを連結するための親水性スペーサー、例えばポリエチレングリコール；ならびに(3)陽子化可能陽イオン性頭基を生成するためのポリ陽イオン性部分、例えば天然アミノ酸。このようなものとして、本発明は、式I：

A - W - Y

I

(式中、A、WおよびYは以下の通りである)

の化合物を提供する。

【0052】

式Iに関しては、「A」は脂質部分、例えば、脂質アンカーとして作用する両性脂質、中性脂質または疎水性脂質である。適切な脂質例としては、小胞形成脂質または小胞採用脂質が挙げられ、そしてその例としてはジアシルグリセロリル、ジアルキルグリセロリル、N - N - ジアルキルアミノ、1, 2 - ジアシルオキシ - 3 - アミノプロパンおよび1, 2 - ジアルキル - 3 - アミノプロパンが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0053】

「W」は、ポリマーまたはオリゴマー、例えば親水性ポリマーまたはオリゴマーである。好ましくは親水性ポリマーは、非免疫原性であるかまたは低固有免疫原性を保有する生適合性ポリマーである。あるいは親水性ポリマーは、適切なアジュバントとともに用いられる場合には、弱抗原性であり得る。適切な非免疫原性ポリマーとしては、PEG、ポリアミド、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリ乳酸/ポリグリコール酸コポリマーおよびそれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい実施態様では、ポリマーは約250～約7000ダルトンの分子量を有する。

20

【0054】

「Y」は、ポリ陽イオン性部分である。ポリ陽イオン性部分という用語は、選定pHで、好ましくは生理学的pHで、正電荷を、好ましくは少なくとも2つの正電荷を有する化合物、誘導体または官能基を指す。適切なポリ陽イオン性部分としては、塩基性アミノ酸およびそれらの誘導体、例えばアルギニン、アスパラギン、グルタミン、リシンおよびヒスチジン；スペルミン；スペルミジン；陽イオン性デンドリマー；ポリアミン；ポリアミン糖；およびアミノ多糖が挙げられる。ポリ陽イオン性部分は、線状、例えば線状テトラリン、分枝鎖またはデンドリマー構造であり得る。ポリ陽イオン性部分は、約2～約15の正電荷を、好ましくは約2～約12の正電荷を、さらに好ましくは約2～約8の正電荷を、選定pH値で有する。どのポリ陽イオン性部分を用いるかの選択は、所望されるリポソーム用途の種類によって決定され得る。

30

【0055】

ポリ陽イオン性部分上の電荷は、全リポソーム部分周囲に分布されるか、あるいはそれらは、リポソーム部分のある特定領域において別個の濃度の電荷密度で、例えば電荷スパイクであり得る。電荷密度がリポソーム上に分布される場合、電荷密度は均等に分布されるかまたは非均等に分布され得る。ポリ陽イオン性部分の電荷分布の変動はすべて、本発明に包含される。

40

【0056】

脂質「A」および非免疫原性ポリマー「W」は、種々の方法により、好ましくは共有結合により結合され得る。当業者に既知の方法は、「A」および「W」の共有結合のために用いられ得る。適切な結合としては、アミド、アミン、カルボキシル、カルボネート、カルバメート、エステルおよびヒドラゾン結合が挙げられるが、これらに限定されない。「A」および「W」は結合を実施するための相補的官能基を有さなければならない、ということは当業者に明らかである。脂質上の1つおよびポリマー上の1つのこれら2つの基の反応は、所望の結合を提供する。例えば脂質がジアシルグリセロールであり、そして末端ヒドロキシルが例えばNH₂およびDCCで活性化されて活性エステルを生成し、次にアミノ基を含有するポリマーと、例えばポリアミドと反応させられる場合(米国特許出願第0

50

9 / 2 1 8 , 9 8 8 号 (1 9 9 8 年 1 2 月 2 2 日 提 出) 参 照) 、 ア ミ ド 結 合 は 2 つ の 基 の 間 に 形 成 さ れ る 。

【 0 0 5 7 】

ある種の実施態様では、「W」は「Y」と結合され、好ましくは共有結合される。「A」および「W」に関する場合と同様に、「W」の「Y」との結合は、一方はポリマー上そして他方はポリ陽イオン性部分上の官能基の相補的反応性により生成され得る。例えば「W」上のアミン官能基は、活性化カルボキシル基、例えばアシルクロリドまたはNHSエステルと反応されて、アミンを生成し得る。反応性基の適切な選択により、所望の結合が得られる。その他の活性化カルボキシル基としては、カルボン酸、カルボキシレートエステル、カルボン酸ハリドおよびその他の活性化形態のカルボン酸、例えば反応性無水物が挙げられるが、これらに限定されない。反応性酸ハリドとしては、例えば酸塩化物、酸臭化物および酸フッ化物が挙げられる。

10

【 0 0 5 8 】

ある場合には、ポリ陽イオン性部分は、結合されたりガンド、例えばカルシウムを錯化するためのターゲッティングリガンドまたはキレート化部分を有する。好ましくは、リガンドが結合された後、陽イオン性部分は正電荷を保持する。ある場合には、結合されるリガンドは正電荷を有する。適切なリガンドとしては、反応性官能基を有する化合物または装置（これらに限定されない）が挙げられ、その例としては、脂質、両性脂質、担体化合物、生親和性化合物、バイオマテリアル、バイオポリマー、バイオメディカル装置、分析的検出可能化合物、治療的活性化化合物、酵素、ペプチド、タンパク質、抗体、免疫刺激剤、放射能標識、フルオロゲン、ビオチン、薬剤、ハプテン、DNA、RNA、多糖、リボソーム、ウイルス、ミセル、免疫グロブリン、官能基、その他のターゲッティング部分または毒素が挙げられる。エンドソーム膜不安定剤をキレート化または錯化するための適切なキレート化部分をいかに記載する。

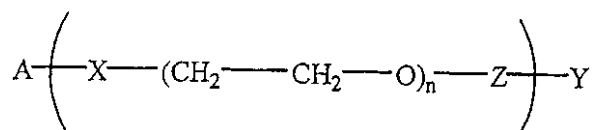
20

【 0 0 5 9 】

ある種の好ましい実施態様では、その他の部分が式Iの化合物中に組み入れられて、式IIの化合物を生成する：

【 0 0 6 0 】

【 化 7 】



II

30

式II中で、「A」は脂質部分、例えば両性脂質、中性脂質または疎水性脂質部分である。適切な脂質例としては、ジアシルグリセロリル、ジアルキルグリセロリル、N-N-ジアルキルアミノ、1,2-ジアシルオキシ-3-アミノプロパンおよび1,2-ジアルキル-3-アミノプロパンが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【 0 0 6 1 】

式II中で、「X」は単一結合、あるいは脂質を少なくとも1つのエチレンオキシド単位に共有結合する官能基である。適切な官能基としては、ホスファチジルエタノールアミノ、ホスファチジルエタノールアミド、ホスホロ、ホスホ、ホスホエタノールアミノ、ホスホエタノールアミド、カルボニル、カルバメート、カルボキシル、カルボネート、アミド、チオアミド、酸素、NR（ここで、Rは水素またはアルキル基である）および硫黄が挙げられるが、これらに限定されない。ある場合には、脂質「A」は、単一結合によりエチレンオキシドに直接結合される。エチレンオキシド単位の数は、約1～約160、好まし

50

くは約 6 ~ 約 50 の範囲であり得る。

【0062】

式 I I 中、「Z」は単一結合、あるいはエチレンオキシド単位をポリ陽イオン性部分と共有結合する官能基である。適切な官能基としては、ホスホ、ホスホエタノールアミノ、ホスホエタノールアミド、カルボニル、カルバメート、カルボキシル、アミド、チオアミド、NR（ここで、R は水素原子またはアルキル基からなる群から選択される一員である）が挙げられるが、これらに限定されない。ある種の実施態様では、末端エチレンオキシド単位は、ポリ陽イオン性部分に直接結合される。

【0063】

式 I I 中、「Y」は式 I と関連して前記したようなポリ陽イオン性部分である。式 I I 中で、指数「n」は約 6 ~ 約 160 の範囲の整数値である。 10

例示的实施態様では、式 I I の化合物は、図 21 に略記したように一般化手法を用いて合成され得る。図 21 は、本発明の特定の一実施態様を説明し、したがって単なる実例であって、本明細書中の特許請求の範囲を限定すべきでない。明らかに、図 21 に説明された反応模式図になされ得る多数のその他の変更、代替事項および修正を当業者は認識する。図 21 に関しては、クロロホルム溶液中の脂質、例えば DSP および塩基、例えばトリエチルアミンの溶液が (t - B o c - N H - P E G ₃₄₀₀ - C O₂ N H S) に付加され、溶液は周囲温度で攪拌される。次に溶液は窒素流下で濃縮、乾燥される。次に、クロマトグラフィーを用いて脂質が消失するまで、ジエチルエーテルを用いたクロロホルム混合溶液の反復沈降により、残渣が精製される。精製 CPL 複合物は溶媒中に溶解され、その後 T F A が付加されて、溶液は室温で攪拌される。溶液は、窒素流下で再び濃縮され得る。次にジエチルエーテルを用いた混合物の反復沈降により残渣が精製されて、脂質 - P E G - N H₂、例えば D S P E - P E G - N H₂ あるいは 1 つの陽子化可能陽イオン性頭基を有する D S P E - C P L - 1 を生じる。次に、本明細書中で前記したようなホスフェートおよびフルオレサミン検定により、ホスホリル - 脂質アンカーおよび遠位第一級アミンの比が測定され得る。 20

【0064】

この例示的实施態様では、陽子化可能アミノ基の数は、ポリ陽イオン性部分を作製するために増大され得る。化学量論的量の例えば N₁, N₂ - ジ - t - B o c - L - リシン N - ヒドロキシスクシニドを増分的に付加することにより、ポリ陽イオン性部分は約 2 ~ 約 16 の正電荷から増大し得る。前記のように、正電荷は、任意数の適切なポリ陽イオン性部分、例えばリシン、アルギニン、アスパラギン、グルタミン、ヒスチジン、ポリアミンおよびそれらの誘導体または組合せを用いて組入れられ得る。本発明の合成方法を用いて、陽イオン基、例えばアミノ基の数は、CPL 合成中に容易に制御され得る。 30

【0065】

さらに上で説明したように、エンドソーム膜不安定剤は、核酸 - 脂質粒子中に組み入れられ得る。このような実施態様では、エンドソーム膜不安定剤は、多数の異なる投入技法のいずれかを用いて核酸 - 脂質粒子中に投入され得る（実施例 I および I I 参照）。例示的投入方法は、例えば米国特許第 4,885,172 号、米国特許第 5,059,421 号および米国特許第 5,171,578 号（これらの記載内容は、参照により本明細書中に含まれる）に開示されている。さらに、特に好ましいイオノフォア媒介性投入方法は、米国特許第 5,837,282 号（この記載内容は、参照により本明細書中に含まれる）に開示され特許請求されている。 40

【0066】

さらに前記のように、エンドソーム膜不安定剤をキレート化するのに適したキレート化部分が CPL のような SPLP の脂質構成成分のいずれかに付着、連結または結合され得る。本発明の好ましい実施態様では、キレート化部分は、金属キレート化剤である。金属キレート化剤、例えばエチレンジアミン四酢酸 (E D T A)、ジエチレントリアミン五酢酸 (D T P A)、エチレンビス (オキシエチレンニトリロ) - 四酢酸 (E G T A)、1,4,7,10 - テトラアザシクロドデカン - N, N', N'', N''' - 四酢酸、トランス - 50

1, 2 - シクロヘキシレンジアミン - N, N, N', N' - 四酢酸、N⁶ - カルボキシメチル - N³, N⁹ - [2, 3 - ジヒドロキシ - N - メチルプロピルカルバモイルメチル] - 3, 6, 9 - トリアザウンデカンジオン酸、N⁶ - カルボキシメチル - N³, N⁹ - ビス (メチルカルバモイルメチル) - 3, 6, 9 - トリアザウンデカンジオン酸、N³, N⁶ - ビス (カルボキシメチル) - N⁹ - 3 - オキサペンタメチレン - カルバモイルメチル - 3, 6, 9 - トリアザウンデカンジオン酸または N³, N⁶ - ビス (カルボキシメチル) - N⁹ - [3, 3 - ビス (ジヒドロキシホスホリル) - 3 - ヒドロキシプロピル - カルバモイルメチル] - 3, 6, 9 - トリアザウンデカンジオン酸、金属イオン輸送タンパク質、金属イオン封鎖剤、金属キレートリガンド等を用いて、エンドソーム膜不安定剤をキレート化し得る。さらに、米国特許第 5, 876, 695 号 (この記載内容は、参照により本明細書中に含まれる) に開示された金属キレート化剤も用いられ得る。本発明の組成物および方法に用いるのに適したその他のキレート化剤は、当業者に既知である。

10

【0067】

2. 核酸構成成分

本発明はプラスミドの使用に関して実施例に記載されているが、しかし本明細書中に記載した方法は他のより大きい核酸またはオリゴヌクレオチドに等しく適用可能である、と当業者は理解する。このようなものとして、適切な核酸としては、プラスミド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイムならびにその他のポリ - およびオリゴ - ヌクレオチドが挙げられるが、これらに限定されない。

【0068】

本発明で有用な核酸 (複合体および粒子の両方を含む) は、典型的には 10 ~ 100, 000 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の修復または強化のために被験者に投与されるものである。さらに核酸は、相補的核酸の存在または非存在に関する臨床的診断を提供するための標識 (例えば放射能標識、蛍光標識または比色定量的標識) を保有し得る。したがって核酸またはヌクレオチドポリマーは、Stein, et al., Science 261: 1004 - 1011 (1993) による再検討に、ならびに米国特許第 5, 264, 423 号および第 5, 276, 019 号 (これらの記載内容は、参照により本明細書中に含まれる) に記載された核酸類似体、例えばアンチセンス誘導体を含むゲノム DNA、cDNA、mRNA またはオリゴヌクレオチドを包含する核酸のポリマーであり得る。さらに核酸は、転写および翻訳調節配列、例えばプロモーター配列およびエンハンサー配列をコードし得る。

20

30

【0069】

ヌクレオチドポリマーは、一本鎖 DNA または RNA、あるいは二本鎖 DNA または DNA - RNA ハイブリッドであり得る。二本鎖 DNA の例としては、構造遺伝子、制御および終結領域を含む遺伝子、ならびに自己複製計、例えばプラスミド DNA が挙げられる。一本鎖核酸としては、アンチセンスオリゴヌクレオチド (DNA および RNA と相補的)、リボザイムおよび三重鎖形成オリゴヌクレオチドが挙げられる。安定性を増大するために、いくつかの一本鎖化核酸は、好ましくは、安定非ホスホジエステル結合で置換されるヌクレオチド結合、例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または O - アルキルホスホトリエステル結合のいくつかまたはすべてを有する。

40

【0070】

本発明に用いられる核酸としては、1 つまたはそれ以上の糖部分においておよび / または 1 つまたはそれ以上のピリミジンまたはプリン塩基において修飾が成された核酸も挙げられる。糖修飾の例としては、ハロゲン、アルキル基、アミン、アジド基による 1 つまたはそれ以上のヒドロキシル基の置換を包含し、あるいはエーテルまたはエステルとして機能化される。さらに全糖は、立体的および電子的に類似の構造で、例えばアザ - 糖および炭素環式糖類似体で置換され得る。プリンまたはピリミジン塩基部分の修飾としては、例えばアルキル化プリンおよびピリミジン、アシル化プリンまたはピリミジン、あるいは当業者に既知のその他の複素環式置換基が挙げられる。

50

【0071】

多遺伝子配列も、本発明の方法に用いられ得る。したがって異なるタンパク質に関する配列は、ある鎖またはプラスミド上に置かれ得る。非コード配列も、適切な発現を達成するのに必要な程度に存在する。

本発明の方法に用いられる核酸は、天然供給源から単離され、ATCCまたはGenBankライブラリーのような供給源から得られ、あるいは合成法により調製され得る。合成核酸は、種々の溶液または固相法により調製され得る。一般に、固相合成法が好ましい。ホスフィット-トリエステル、ホスホトリエステルおよびH-ホスホネート化学による核酸の固相合成のための手法の詳細な説明は、広範に利用可能である(例えば米国特許第4,401,796号(Itakura);米国特許第4,458,066号および第4,500,707号(Caruthers等);Beaucage, et al., Tetrahedron Lett., 22:1859-1862(1981);Matteucci, et al., J. Am. Chem. Soc., 103:3185-3191(1981);Caruthers, et al., Genetic Engineering, 4:1-17(1982);Jones, chapter 2, Atkinson, et al., chapter 3, and Sproat, et al., chapter 4, in Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, Gait(ed.), IRL Press, Washington D.C.(1984);Froehler, et al., Tetrahedron Lett., 27:469-472(1986);Froehler, et al., Nucleic Acids Res., 14:5399-5407(1986);Sinha, et al., Tetrahedron Lett., 24:5843-5846(1983);およびSinha, et al., Nucleic Acids Res., 12:4539-4557(1984)参照)(これらの記載内容は、参照により本明細書中に含まれる)。

10

20

【0072】

a. 細胞中の遺伝子の導入および発現のためのベクター

本発明の重要な局面は、*in vitro*および*in vivo*で選定遺伝子を導入し、その後宿主細胞中で選定遺伝子を発現するための本明細書中で提供される脂質-核酸粒子の使用である。したがって粒子中の核酸は、宿主細胞中で発現され得るベクターを特定の

30

【0073】

要約すると、天然または合成核酸の発現は、典型的には、プロモーター(構成的または誘導可能的)に当該核酸を操作可能的に連結し、発現ベクター中に構築物を組入れ、そして適切な宿主細胞中にベクターを導入することにより達成される。典型的ベクターは、転写および翻訳ターミネーター、転写および翻訳開始配列、ならびに特定核酸の発現の調節に有用なプロモーターを含有する。ベクターは、任意に、少なくとも1つの個々のターミネーター配列、真核生物または原核生物またはその両方でのカセットの複製を可能にする配列(例えばシャトルベクター)、ならびに原核生物および真核生物系の両方のための選択マーカーを含有する遺伝子発現カセットを含む。ベクターは、原核生物、真核生物または好ましくはその両方における複製および組込みに適している(Giliman and Smith(1979), Gene, 8:81-97; Roberts et al.(1987), Nature, 328:731-734; Berger and Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, volume 152, Academic Press, Inc., San Diego, CA(Berger); Sambrook et al.(1989), Molecular Cloning - A Laboratory Manual, (2nd ed.) Vol. 1-3, Cold Spr

40

50

ing Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, N.Y., (Sambrook); および F.M. Ausubel et al., Current protocols in Molecular Biology, eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1994 Supplement) (Ausubel) 参照)。生物学的試薬および実験装置のメーカーからの製品情報は、既知の生物学的方法に有用な情報も提供する。このようなメーカーとしては、SIGMA chemical company (Saint 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. (Gaithersburg, MD)、Fluka Chemica-Biochemika Analytika (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland) および Applied Biosystems (Foster City, CA)、ならびに当業者に既知の多数のその他の市販供給元が挙げられる。

10

【0074】

20

外来核酸が操作可能的に連結されるベクターは、これらの核酸を宿主細胞中に導入し、それらの複製および/または発現を媒介するために用いられ得る。「クローニングベクター」は、外来核酸を複製し、増幅するために、そして特定の外来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、外来核酸の発現を媒介する。いくつかのベクターは、クローニングおよび発現ベクターの両方である。

【0075】

概して、細胞中に外来遺伝子を輸送するために用いられる特定ベクターは、特に重要であるというわけではない。選定宿主細胞中での発現のために用いられる慣用的ベクターのいずれかが用いられ得る。

発現ベクターは、典型的には真核生物転写単位または真核生物細胞中での外因性遺伝子の発現に必要とされるすべての素子を含む。「発現カセット」を含む。典型的発現カセットは、所望のタンパク質をコードするDNA配列と操作可能的に連結されるプロモーターおよび転写体の効率的ポリアデニル化に必要とされるシグナルを含む。

30

【0076】

真核生物プロモーターは、典型的には2つの型の認識配列、即ちTATAボックスおよび上流プロモーター素子を含む。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合成を開始するのにRNAポリメラーゼを向けるのに関与すると考えられる。その他の上流プロモーター素子は、転写が開始される速度を確定する。

【0077】

エンハンサー素子は、連結された同種または異種プロモーターから1,000倍まで転写を刺激し得る。エンハンサーは、転写開始部位から下流または上流に置かれる場合に、活性である。ウイルスに由来する多数のエンハンサー素子は広範な宿主範囲を有し、種々の組織中で活性である。例えばSV40初期遺伝子エンハンサーは、多数の細胞型に適している。本発明に適しているその他のエンハンサー/プロモーターの組合せとしては、ポリオマウイルス、ヒトまたはネズミサイトメガロウイルス由来のもの、種々のレトロウイルス、例えばネズミ白血病ウイルス、ネズミまたはラウス肉腫ウイルスおよびHIVからの長期反復が挙げられる(Enhancers and Eukaryotic Expression, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1983参照)(この記載内容は、参照により本明細書中に含まれる)。

40

50

【0078】

プロモーター配列のほかに、発現カセットは、効率的終結を提供するための構造遺伝子の下流の転写終結領域も含有すべきである。終結領域は、プロモーター配列と同一供給源から得られるし、あるいは異なる供給源から得られる。

選定構造遺伝子によりコードされるmRNAが効率的に翻訳されるものである場合、ポリアデニル化配列も一般にベクター構築物に付加される。2つの別個の配列素子は、正確且つ効率的ポリアデニル化のために必要とされる。富GUまたはU配列はポリアデニル化部位から下流に位置し、そして6つのヌクレオチドAAUAAAの高保存配列は、11~30ヌクレオチド上流に位置する。本発明に適した終結およびポリアデニル化シグナルとしては、SV40由来のもの、または発現ベクター上にすでに存在する遺伝子の部分ゲノムコピーが挙げられる。

10

【0079】

既述の素子のほかに、本発明の発現ベクターは、典型的には、クローン化核酸の発現のレベルを増大するよう、または形質導入化DNAを保有する細胞の同定を促すよう意図されたその他の特殊素子を含有し得る。例えば多数の動物ウイルスは、許容細胞型におけるウイルスゲノムの染色体外複製を促すDNA配列を含有する。これらのウイルスレプリコンを保有するプラスミドは、適切な因子がプラスミド上にまたは宿主のゲノムとともに保有される遺伝子により提供される限り、エピソーム的に複製される。

【0080】

本発明の発現ベクターは、典型的には、細菌中でのベクターのクローニングを促進する原核生物配列、ならびに真核生物細胞、例えば哺乳類細胞中でのみ発現される1つまたはそれ以上の真核生物転写単位をもとに含有する。原核生物配列は、好ましくはそれらが真核生物細胞中でのDNAの複製を妨げないよう選択される。

20

【0081】

選定遺伝子は、普通は、DNA配列がベクター中に機能的に挿入される場合に発現される。「機能的に挿入される」とは、それが適正リーディングフレームおよび配向で挿入され、そして適正調節素子と操作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後に続くが、しかしハイブリッドタンパク質としての生成とその後の切断が、所望により用いられ得る。

【0082】

レトロウイルスのような真核生物ウイルスからの調節素子を含有する発現ベクターが、典型的には用いられる。SV40ベクターとしては、pSVT7およびpMT2が挙げられる。ウシパピローマウイルス由来のベクターとしてはpBV-1MTHAが挙げられるし、エプスタインバーウイルス由来のベクターとしては、pHEBOおよびp205が挙げられる。その他のベクターの例としては、pMSG、pAV009/A⁺、pMTO10/A⁺、pMAMneo-5、バキュロウイルスpDSVE、ならびに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、ネズミ乳癌ウイルスプロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、ポリヘドリンプロモーターまたは真核生物細胞中での発現に有効であることが示されたその他のプロモーターの指令下でタンパク質の発現を可能にする任意のその他のベクターが挙げられる。

30

40

【0083】

種々のベクターが用いられ得るが、しかし、ウイルスベクター、例えばレトロウイルスベクターは、標的細胞をトランスフェクトし、そして標的細胞中にゲノムを組入れる高効率性のために、真核生物細胞を修飾するために有用である、ということに留意すべきである。さらに、レトロウイルスベクターを保有するレトロウイルスは、広範な種々の組織からの細胞を感染し得る。

【0084】

前記のレトロウイルスベクターのほかに、細胞はアデノ随伴ウイルスベクターを用いてリポフェクトされ得る(例えばMethods in Enzymology, Vol. 185, Academic Press, Inc., San Diego, CA (D.V

50

. Goeddel, ed.) (1990) または M. Krieger (1990), Gene Transfer and Expression - A Laboratory Manual, Stockton Press, New York, NY 参照) (これらの記載内容は、参照により本明細書中に含まれる)。アデノ随伴ウイルス (AAV) は、生産的感染を達成するためにヘルパーウイルス、例えばアデノウイルスまたはヘルペスウイルスを必要とする。ヘルパーウイルス機能の非存在下では AAV は宿主細胞のゲノムに一体化する (部位特異的に) が、しかし一体化 AAV ゲノムは病原性作用を有さない。一体化過程は、宿主が適切な環境条件 (例えば溶解性ヘルパーウイルス) に曝されるまで、AAV ゲノムを遺伝的に無傷に保持させて、その時点でそれは溶解性生活環に再入する。Samulski (1993), Current Opinion in Genetic and Development, 3: 74-80 ならびにその中に引用された参考文献は、AAV 生活環の概要を提供する。AAV ベクターの概要に関しては、West et al. (1987), Virology, 160: 38-47; 米国特許第 4, 797, 368 号 (Carter 等 (1989)); WO 93/24641 (Carter 等 (1993)); Kotin (1994), Human Gene Therapy, 5: 793-801; Muzyczka (1994), J. Clin. Invest., 94: 1351 および Samulski (上記) も参照されたい。

【0085】

組換えワクシニアを産生するために設計されたプラスミド、例えば pGS62 (Langford, C. L. et al. (1986), Mol. Cell. Biol., 6: 3191-3199) も用いられ得る。このプラスミドは、外来核酸の挿入のためのクローニング部位、挿入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、および外来核酸の両端と側面を接するワクシニア TK 遺伝子から成る。

【0086】

どのようなベクターが用いられようと、一般にベクターは、当該遺伝子産物をコードする当該遺伝子を発現可能形態で含有するよう遺伝子工学処理される。適切な種類の遺伝子産物としては、細胞傷害性 / 自殺遺伝子、免疫モジュレーター、細胞受容体リガンド、腫瘍サプレッサーおよび抗血管新生遺伝子が挙げられるが、これらに限定されない。選択される特定遺伝子は、意図される目的または治療によっている。このような当該遺伝子の例は、以下にならびに明細書全体に記載されている。細胞傷害性 / 自殺遺伝子は、細胞を殺害し、アポトーシスを引き起こし、または細胞周期中に細胞を休止させ得る遺伝子である。このような遺伝子としては、免疫毒素のための遺伝子、チミジンキナーゼ、シトクローム P450 2B1、デオキシチジンキナーゼまたはシトシンデアミナーゼが挙げられるが、これらに限定されない。アシクロビルおよびガンシクロビル (チミジンキナーゼのための)、シクロホスファミド (シトクローム P450 2B1 のための)、5-フルオロシトシン (シトシンデアミナーゼのための) のような作用物質は、典型的には本発明の脂質-核酸組成物とともに (例えば同時にまたは非同時的に) 全身投与されて、所望の細胞傷害性または細胞増殖抑制性作用を達成する。免疫モジュレーター遺伝子は、1つまたはそれ以上の免疫応答を調整する遺伝子である。免疫モジュレーター遺伝子の例としては、サイトカイン、例えば増殖因子 (例えば TGF- α 、TGF- β 、EGF、FGF、IGF、NGF、PDGF、CGF、GM-CSF、SCF 等)、インターロイキン (例えば IL-2、IL-12、IL-15、IL-20 等)、インターフェロン (例えば IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 等) および TNF が挙げられる。細胞受容体リガンドとしては、細胞表面受容体 (例えばインスリン受容体、EPO 受容体、G-タンパク質結合受容体、チロシンキナーゼ活性を有する受容体、サイトカイン受容体、増殖因子受容体等) と結合し、受容体が関与する生理学的経路 (例えばグルコースレベル調整、血球発達、有糸分裂誘発等) を調整し (例えば抑制し、活性化する等) 得るリガンドが挙げられる。細胞受容体リガンドの例としては、サイトカイン、増殖因子、インターロイキン、インターフェロン、エリスロポイエチン (EPO)、インスリン、グルカゴン、G-タンパク質結合受容体リガンド等が挙げられる。腫瘍サプレッサー遺伝子は、細胞、特に腫瘍細胞の増

殖を抑制し得る遺伝子である。したがって腫瘍細胞へのこれらの遺伝子の送達は、癌の治療に有用である。腫瘍抑制遺伝子としては、p53 (Lamb et al., Mol. Cell. Biol. 6:1379-1385 (1986), Ewen et al., Science 255:85-87 (1992), Ewen et al. (1991) Cell 66:1155-1164およびHu et al., EMBO J. 9:1147-1155 (1990)), RB1 (Toguchida et al. (1993) Genomics 17:535-543), WT1 (Hastie, N.D., Curr. Opin. Genet. Dev. 3:408-413 (1993)), NF1 (Trofatter et al., Cell 72:791-800 (1993), Cawthon et al., Cell 62:193-201 (1990)), VHL (Latif et al., Science 260:1317-1320 (1993))およびAPC (Gorden et al., Cell 66:589-600 (1991))が挙げられるが、これらに限定されない。抗血管新生遺伝子は、新血管形成を抑制し得る。これらの遺伝子は、新血管形成が疾患の病理学的発達に一役を演じる癌を治療するために特に有用である。抗血管新生遺伝子の例としては、エンドスタチン(例えば米国特許第6,174,861号参照)およびアンジオスタチン(例えば米国特許第5,639,725号参照)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0087】

ベクターはさらに通常は、核酸増幅、例えばナトリウム、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(カルバミルホスフェートシンターゼ、アスパルテートトランスカルバミラーゼおよ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およびアスパラギンシンターゼおよびウアバイン選択を生じる選択可能マーカールを含む。あるいは、昆虫細胞におけるバキュロウイルスベクターの使用、ポリヘドリンプロモーターまたはその他の強力バキュロウイルスプロモーターの指図下でのコード配列の使用のような核酸増幅を包含しない高収率発現系も適している。

【0088】

プラスミド以外の核酸が用いられる場合、核酸は、Stein, et al., Science 261:1004-1011 (1993)による再検討に、ならびに米国特許第5,264,423号および第5,276,019号(これらの記載内容は、参照により本明細書中に含まれる)に記載された核酸類似体、例えばアンチセンス誘導体を含むし得る。

ビリオン粒子をパッケージングするためのサイズ制限のために、ウイルスゲノム中に相対的に小型の非ウイルス核酸配列を取り入れ得るだけであるウイルスベースの遺伝子療法ベクターと違って、本発明の脂質-核酸複合体は、細胞中に大型(例えば50~5,000キロ塩基)外因性核酸を移すために用いられ得る。リポフェクションのこの局面は、遺伝子療法のための標的であり得る多数の遺伝子が100キロ塩基以上に及び(例えばアミロイド前駆体タンパク質(APP)遺伝子、ハンチントン舞踏病遺伝子)、そして大型相同ターゲット構築物または導入遺伝子が治療に必要であり得るため、特に有益である。

【0089】

細胞は、(1)外因性核酸、(2)ポリ陽イオンと共有結合される受容体-リガンドタンパク質(「rlp」)および(3)陽イオン性または中性脂質を含む受容体認識トランスフェクション複合体と細胞を接触することにより、高効率でそして細胞型特異性により、外因性核酸でリポフェクトされ得る。ポリ陽イオン結合受容体認識タンパク質および適切な陽イオン性(または中性)脂質の組合せが核酸をトランスフェクトするために用いられ得るといふこと、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ターゲット特異性を保持し、そして陽イオン性脂質、中性脂質またはリポポリアミンの含入により一部付与される高効率トランスフェクションも示すといふことが判明した。

【0090】

外因性核酸は、典型的には *dsDNA*、*ssDNA*、*ssRNA*、*dsRNA* であり、最も典型的には外因性核酸は、プラスミドまたはウイルスゲノムのようなクローニングベクター中の *dsDNA*、例えばクローン化 *DNA* 配列である。多種の外因性核酸が、例えば非結合核酸配列の同時トランスフェクションのために、または *in vivo* 相同組換えシャッフリングを成し遂げるために、トランスフェクション複合体中に併合され得る。しばしば外因性核酸（単数または複数）は、トランスフェクション複合体を組入れる細胞中で自律的複製ができず、そして相同組換えまたは非相同組込みにより宿主細胞染色体中で一時的に発現されるか、または安定的に組み込まれる。しばしば少なくとも1つの選択可能マーカー（例えば *neo*（登録商標）発現カセット）が外因性核酸（単数または複数）中に含入されて、外因性核酸（単数または複数）を組入れた細胞の選択を促す。典型的には、外因性核酸は、外因性核酸を組入れた標的細胞中で発現されるポリペプチドをコードする構造遺伝子を含み、そして構造遺伝子は通常は適切なシス-作用調節因子（例えばプロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化部位）と操作可能的に連結される。遺伝子療法は種々の方法で実施され得るが、しかし典型的受容体-認識リポフェクション複合体は、少なくとも1つの転写単位を含む核酸を含む。

10

【0091】

本発明の脂質核酸粒子は、核酸の種のほかに、受容体認識分子（*rlm*）、例えばタンパク質を含有するよう設計され得る。*rlm*は、核酸-脂質粒子を含む脂質と共有結合され得る。粒子上のその存在は効率および特異性を増大し、粒子は標的細胞と接触し、進入する。例えば適切な *rlm*は、例えばエンドサイトーシスおよび/または膜融合の過程により *rlm*-ポリ陽イオン複合体を含む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媒介する標的細胞の細胞表面受容体と結合する非免疫グロブリンタンパク質である。付加的適切な *rlm*種は、典型的には、ポリペプチドタンパク質（例えば接着分子、例えば *ICAM-1*、*ICAM-2*、*ELAM-1*、*VCAM-1*）を含む天然生理学的リガンドである。真核生物細胞上のウイルス受容体と結合し、ウイルスインターナリゼーションを媒介するウイルスタンパク質（例えばスパイク糖タンパク質）は、*rlm*-ポリ陽イオン複合体を形成するための *rlm*種としても用いられ得る。例としては、細胞表面受容体と結合し、インターナリゼーションおよび/または膜融合をもたらすウイルス糖タンパク質、例えば *HSV-1* の *gB*、*gC*、*gD*、*gE*、*gH* および *gI* ビリオン糖タンパク質、ならびに *HIV-1* の *gp120* も挙げられる。

20

30

【0092】

天然タンパク質の断片および類似体が、ならびに本発明のトランスフェクション複合体を形成するに際しての *rlm*種としての全長成熟タンパク質が用いられ得る。例えば標的細胞との付着を媒介する接着分子またはビリオン付着タンパク質の一部を含む断片、類似体および融合タンパク質は、細胞付着および/または膜融合に不可欠でない天然全長タンパク質の他の部分を伴わずに *rlm*種として用いられ得る。したがって、例えばビリオン糖タンパク質の細胞質尾ペプチド部分は通常は、省かれ得るし、その結果生じるタンパク質は依然として適切な *rlm*として役立ち得る。

【0093】

選択される *rlm*は、特定標的細胞型に伴って変わる。肝細胞に対する特異的ターゲッティングのためには、アシアロ糖タンパク質（ガラクトース末端性）は、*rlm*種として選択される。アシアロ糖タンパク質の例としては、アシアロオロソムコイド、アシアロフェツインおよびデシアルル化水疱性口内炎ウイルスビリオンタンパク質が挙げられる。これらは、末端シアル酸およびペヌルチメートガラクトース残基を保有する糖タンパク質の化学的または酵素的デシアルル化により生成される。あるいは、肝細胞を選択的に標的にするリポフェクション複合体を生成するのに適した *rlm*種は、還元的ラクトース化によりラクトースまたはその他のガラクトース末端炭水化物（例えばアラビノガラクトン）を非ガラクトース保有タンパク質と結合することにより作製され得る。肝細胞ターゲッティングのためのその他の有用なガラクトース末端炭水化物としては、天然糖タンパク質から得

40

50

られる炭水化物樹、特に末端ガラクトース残基を含有し、または末端ガラクトース残基を曝露するよう酵素的に処理され得るトリ - およびテトラ - 触角状構造が挙げられる。マクロファージ、内皮細胞またはリンパ球をターゲティングするためには、マンノースまたはマンノース - 6 - ホスフェートを含む r 1 m 種、あるいはこれらの末端炭水化物構造を含む複合炭水化物が用いられ得る。

【 0 0 9 4 】

種々の異なる細胞表面受容体が哺乳類細胞の表面に存在するため、非肝臓細胞への核酸の細胞特異的ターゲティングは、種々の r 1 m 種を含むリポフェクション複合体を包含し得る。例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 r 1 m として用いられ得る。その他の受容体リガンド、例えばポリペプチドホルモン（例えば成長ホルモン、PDGF、FGF、EGF、インスリン、IL - 2、IL - 4 等）は、コグネイト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用いられ得る。

10

【 0 0 9 5 】

核酸 - 脂質粒子は、多 r 1 m 種を含み得る。しばしば、膜融合活性を有する作用物質（例えばインフルエンザウイルスヘマグルチニン、HSV - 1 g B および g D）は、単独で、またはその他の r 1 m 種と、典型的には膜融合活性を欠くものと組合せて、r 1 m - ポリ陽イオン複合体を形成するための r 1 m として用いられる。

【 0 0 9 6 】

これらのトランスフェクション法は一般に、(1) 本質的に外因性核酸、予定細胞表面受容体と結合する非免疫グロブリン受容体認識分子と連結されるポリ陽イオンで本質的に構成されるポリ陽イオン複合体、および本質的に中性または陽イオン性脂質からなる脂質構成成分（任意に第四級アンモニウム洗剤および/またはリポポリアミンを含む）からなる核酸 - 脂質粒子を生成し、そして(2) 予定細胞表面受容体を発現する細胞を、前記細胞中への外因性核酸の取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、受容体認識トランスフェクション複合体と接触させる過程を包含する。代替的实施態様では、r 1 m は、共有結合により、しばしば架橋剤による共有結合により、またはペプチド結合により、ポリ陽イオンに結合される。

20

【 0 0 9 7 】

I I I . S P L P および S P L P - C P L の調製ならびにサイジング
一実施態様では、本発明は、疎水性核酸 - 脂質中間物質複合体により生成される脂質 - 核酸粒子を提供する。複合体は、好ましくは電荷中和される。洗剤ベースのまたは有機溶媒ベースの系におけるこれらの複合体の操作は、核酸が保護される粒子形成をもたらし得る。

30

【 0 0 9 8 】

本発明は、プラスミドまたはその他の核酸が脂質二重層中に封入され、分解から保護される血清安定性プラスミド - 脂質粒子の製造方法を提供する。さらに、本発明において生成される粒子は、好ましくは生理学的 pH で中性であるかまたは負に荷電される。In vivo 適用のためには、中性粒子が有益であるが、一方、in vitro 用途に関しては、粒子は、より好ましくは、負に荷電される。これは、核酸が陽イオン性脂質中に封入され得る正荷電リポソーム処方物全体での凝集低減というさらなる利点を提供する。

40

【 0 0 9 9 】

本発明の方法により作製される粒子は、約 5 0 ~ 約 1 5 0 n m のサイズを有し、大多数の粒子は約 6 5 ~ 8 5 n m である。粒子は、洗剤透析法により、または構成成分の混合中に単一相を提供するために有機溶媒を利用する逆相法の変法により生成され得る。生成の任意の特定メカニズムに縛られることなく、プラスミドまたはその他の核酸は、陽イオン性脂質の洗剤溶液と接触されて、被覆プラスミド複合体を生成する。これらの被覆プラスミドは、凝集し、沈降し得る。しかしながら洗剤の存在は、この凝集を低減し、そして被覆プラスミドを余分量の脂質（典型的には非陽イオン性脂質）と反応させて、プラスミドまたはその他の核酸が脂質二重層中に封入される粒子を生成する。有機溶媒を用いてプ

50

ラスミド - 脂質粒子の生成に関して以下に記載される方法は、類似の模式図に従う。

【0100】

いくつかの実施態様では、粒子は洗剤透析を用いて生成される。したがって本発明は、血清安定性プラスミド - 脂質粒子の製造方法であって、以下の：

(a) 洗剤溶液中でプラスミドを陽イオン性脂質と併合して、被覆プラスミド - 脂質複合体を形成し、

(b) 非陽イオン性脂質を被覆プラスミド - 脂質複合体と接触させて、プラスミド - 脂質複合体および非陽イオン性脂質を含む洗剤溶液を生成し、そして

(c) 過程(b)の洗剤溶液を透析して、血清安定性プラスミド - 脂質粒子の溶液を提供するが、この場合、プラスミドは脂質二重層中に封入され、そして粒子は血清安定性であり、約50 ~ 約150 nmのサイズを有する

10

ことを包含する方法を提供する。被覆プラスミド - 脂質複合体の初期溶液は、洗剤溶液中でプラスミドを陽イオン性脂質と併合することにより生成される。

【0101】

これらの実施態様では、洗剤溶液は、好ましくは15 ~ 300 mM、さらに好ましくは20 ~ 50 mMの臨界ミセル濃度を有する中性洗剤の水性溶液である。適切な洗剤の例としては、例えば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); BRIJ 35; デオキシ - BIGCHAP; ドデシルポリ(エチレングリコール)エーテル; Tween 20; Tween 40; Tween 60; Tween 80; Tween 85; Mega 8; Mega 9; Zwittergent (登録商標) 3 - 08; Zwittergent (登録商標) 3 - 10; トリトンX - 405; ヘキシル - 、ヘプチル - 、オクチル - およびノニル - D - グルコピラノシド; およびヘプチルチオグルコピラノシドが挙げられ、オクチル - D - グルコピラノシドおよびTween - 20が最も好ましい。洗剤溶液中の洗剤の濃度は、典型的には約100 mM ~ 約2 M、好ましくは約200 mM ~ 約1.5 Mである。

20

【0102】

陽イオン性脂質およびプラスミドは、典型的には併合されて、約1 : 1 ~ 約20 : 1の、好ましくは約1 : 1 ~ 約12 : 1の、さらに好ましくは約2 : 1 ~ 約6 : 1の電荷比(+ / -)を生じる。さらに溶液中のプラスミドの全体的濃度は、典型的には約25 μg / mL ~ 約1 mg / mL、好ましくは約25 μg / mL ~ 約200 mg / mL、さらに好ましくは約50 μg / mL ~ 約100 mg / mLである。洗剤溶液中のプラスミドおよび陽イオン性脂質の組合せは、典型的には室温で、被覆複合体が生成するのに十分な時間、保持される。あるいはプラスミドおよび陽イオン性脂質は洗剤溶液中で併合され、約37 °Cまでの温度に温められ得る。温度に対して特に感受性であるプラスミドに関しては、被覆複合体は、低温で、典型的には約4 °C以下で生成され得る。

30

【0103】

好ましい実施態様では、生成されるSPLP中の核酸対脂質比(質量 / 質量比)は、約0.01 ~ 約0.08の範囲である。精製過程が典型的には非封入核酸ならびに空のリボソームを除去するために、出発物質の比もこの範囲内である。別の好ましい実施態様では、SPLP調製は、核酸約400 μg / 総脂質10 mgまたは約0.01 ~ 約0.08の、さらに好ましくは約0.04の核酸対脂質比を用い、これは総脂質1.25 mg / 核酸50 μgに相当する。

40

【0104】

被覆プラスミド - 脂質複合体の洗剤溶液は次に、非陽イオン性脂質と接触されて、プラスミド - 脂質複合体および非陽イオン性脂質の洗剤溶液を提供する。この過程で有用である非陽イオン性脂質としては、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、カルジオリピンおよびセレプロシドが挙げられる。好ましい実施態様では、非陽イオン性脂質は、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、セラミドまたはスフィンゴミエリンである。これらの脂質中のアシル基は、好ましくはC₁₀ ~ C₂₄の炭素鎖を有

50

する脂肪酸由来のアシル基である。さらに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、ステアロイルまたはオレオイルである。特に好ましい実施態様では、非陽イオン性脂質は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)または卵ホスファチジルコリン(EPC)である。最も好ましい実施態様では、プラスミド-脂質粒子は、*in vivo*で特性強化を示すフソゲン性粒子であり、非陽イオン性脂質はDOPEである。その他の好ましい実施態様では、非陽イオン性脂質はさらに、同時係属中USSN08/316, 429(この記載内容は、参照により本明細書中に含まれる)に記載されたようなルベースのポリマー、例えばPEG2000、PEG5000およびセラミドに接合されたポリエチレングリコールを含む。

10

【0105】

本発明の方法に用いられる非陽イオン性脂質の量は、典型的にはプラスミド50 μ gに対して総脂質約2~約20mgである。好ましくは、総脂質の量は、約5~約10mg/プラスミド50 μ gである。

プラスミド-脂質複合体および非陽イオン性脂質の洗剤溶液の生成語、洗剤は、好ましくは透析により除去される。洗剤の除去は、プラスミドを取り囲む脂質-二重層の形成を生じて、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。このように生成された粒子は凝集せず、任意にサイズ調整されて均一粒子サイズを達成する。

【0106】

血清安定性プラスミド-脂質粒子は、リポソームのサイジングに利用可能な方法のいずれかによりサイズ調整され得る。サイジングは、所望のサイズ範囲および粒子サイズの相対的に狭い分布を達成するために実行され得る。

粒子を所望のサイズにサイジングするために、いくつかの技法が利用可能である。リポソームのために用いられる、そして本発明の粒子にも等しく適用可能である一サイジング方法は、米国特許第4,737,323号に記載されている(この記載内容は、参照により本明細書中に含まれる)。浴また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未満のサイズの粒子への漸次サイズ低減を生じる。均質化は、大型粒子から小型粒子に断片かするためにエネルギーを剪断することによる別の方法である。典型的均質化手法では、粒子は、選定粒子サイズ、典型的には約60~80nmが観察されるまで、標準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、粒子サイズ分布は、慣用的レーザー光線粒子サイズ識別またはQELSによりモニタリングされ得る。

20

30

【0107】

小孔ポリカルボネート膜または不斉セラミック膜による粒子の押出しも、相対的に良好に限定されたサイズ分布に粒子サイズを低減するための有効な方法である。典型的には懸濁液は、所望の粒子サイズ分布が達成されるまで、1つまたはそれ以上の回数、膜を通して循環される。粒子は、連続的小孔膜を通して押出されて、サイズの漸次低減を達成し得る。

【0108】

別の群の実施態様では、本発明は、血清安定性プラスミド-脂質粒子の製造方法であって、以下の：

40

(a)有機溶媒中に陽イオン性脂質および非陽イオン性脂質を含む混合物を調製し、
(b)核酸の水性溶液を過程(a)の前記混合物と接触させて、透明単一相を提供し、そして
(c)前記有機溶媒を除去してプラスミド-脂質粒子の懸濁液を提供するが、この場合、前記プラスミドは脂質二重層中に封入され、そして粒子は血清中で安定であり、約50~約150nmのサイズを有することを包含する方法を提供する。

【0109】

この群の実施態様において有用であるプラスミド(または核酸)、陽イオン性脂質および

50

非陽イオン性脂質は、前記の洗剤透析方法に関して記載されたのと同様である。

有機溶媒の選択は、典型的には溶媒極性、ならびに溶媒が粒子形成の後期段階で除去され得る容易性についての考察を包含する。可溶化剤としても用いられる有機溶媒は、プラスミドおよび脂質の透明単一相混合物を提供するのに十分な量である。適切な溶媒としては、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、メタノールまたはその他の脂肪族アルコール、例えばプロパノール、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、ペンタノールおよびヘキサノールが挙げられる。2つまたはそれ以上の溶媒の組合せも、本発明で用いられ得る。

【0110】

プラスミドと、陽イオン性および非陽イオン性脂質の有機溶液との接触は、典型的には水性溶液であるプラスミドの一次溶液および脂質の二次有機溶液と一緒に混合することにより成し遂げられる。この混合は、任意数の方法により、例えば機械的手段により、例えば渦巻ミキサーを用いることにより起こり得る、と当業者は理解する。

【0111】

プラスミドが脂質の有機溶媒と接触された後、有機溶媒は除去され、したがって血清安定性プラスミド-脂質粒子の水性懸濁液を生成する。有機溶媒を除去するために用いられる方法は、典型的には低圧での蒸発、または混合物全体の不活性ガス（例えば窒素またはアルゴン）流の吹込みを包含する。

このように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にサイズ調整される。さらなるサイズ低減または粒子中のサイズの均質化を達成するために、サイジングは前記と同様に実行され得る。

【0112】

その他の実施態様では、本方法はさらに、本発明の組成物を用いて細胞の形質転換を実行するのに有用である非脂質ポリ陽イオンを付加することを包含する。適切な非脂質ポリ陽イオンの例としては、ヘキサジメチリンブロミド（商標名ポリブレンPOLYBRENE（登録商標）でAldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin, USAから販売されている）またはヘキサジメチリンのその他の塩が挙げられる。その他の適切なポリ陽イオンとしては、例えばポリ-L-オルニチン、ポリ-L-アルギニン、ポリ-L-リシン、ポリ-D-リシン、ポリアリルアミンおよびポリエチレンイミンの塩が挙げられる。

【0113】

その他の実施態様では、本発明のプラスミド-脂質粒子中に用いられるポリオキシエチレン複合体は、接合基（即ちホスファチジン酸またはホスファチジルエタノールアミン）を適切に官能化されたポリオキシエチレン誘導体と組合せることにより調製され得る。例えばホスファチジルエタノールアミンは、ポリオキシエチレンビス（p-トルエンスルホネート）と併合されて、ホスファチジルエタノールアミン-ポリオキシエチレン複合体を提供する（Woodle, et al., Biochim. Biophys. Acta 1105:193-200 (1992)（この記載内容は、参照により本明細書中に含まれる）参照）。

【0114】

ある種の実施態様では、脂質-核酸複合体の生成は、単一相系（例えばBlighおよびDyer単一相または水性および有機溶媒の同様の混合物）で、または適切な混合による二相系で実行され得る。

複合体の生成が単一相系で実行される場合、陽イオン性脂質および核酸は各々単一相混合物の容積中に溶解される。2つの溶液の組合せは、複合体が生成する単一混合物を提供する。あるいは複合体は、陽イオン性脂質が核酸（水性相中に存在する）と結合し、それを有機相に「引き寄せる」二相混合物中に生成し得る。

【0115】

別の実施態様では、本発明は脂質-核酸粒子の製造方法であって、以下の：

10

20

30

40

50

(a) 非陽イオン性脂質および洗剤を含む溶液と核酸を接触させて核酸 - 脂質混合物を生成し、

(b) 核酸 - 脂質混合物と陽イオン性脂質を接触させて核酸の負電荷の一部を中和し、そして核酸および脂質の電荷中和混合物を生成し、そして

(c) 電荷中和混合物から洗剤を除去して、核酸が分解から保護される脂質 - 核酸粒子を提供する

ことを包含する方法を提供する。

【 0 1 1 6 】

一群の実施態様では、非陽イオン性脂質および洗剤の溶液は水性溶液である。核酸と非陽イオン性脂質および洗剤の溶液との接触は、典型的には核酸の一次溶液ならびに脂質および洗剤の二次溶液と一緒に混合することにより成し遂げられる。この混合は、任意数の方法により、例えば機械的手段により、例えば渦巻ミキサーを用いることにより起こり得る、と当業者は理解する。好ましくは核酸溶液は洗剤溶液でもある。本発明の方法に用いられる非陽イオン性脂質の量は、典型的には用いられる陽イオン性脂質の量に基づいて決定され、典型的には陽イオン性脂質の量の約 0 . 2 ~ 5 倍、好ましくは用いられる陽イオン性脂質の量の約 0 . 5 ~ 2 倍である。

10

【 0 1 1 7 】

このようにして生成される核酸 - 脂質混合物は、陽イオン性脂質と接触されて、存在する核酸（またはその他のポリ陰イオン性物質）に関連する負電荷の一部を中和する。用いられる陽イオン性脂質の量は、典型的には核酸の負電荷の少なくとも 5 0 % を中和するのに十分な量である。好ましくは負電荷は、少なくとも 7 0 % 中和され、さらに好ましくは少なくとも 9 0 % 中和される。本発明において有用である陽イオン性脂質としては、例えば D O D A C、D O T M A、D D A B、D O T A P、D C - C h o l および D M R I E が挙げられる。これらの脂質および関連類似体は、同時係属中 U S S N 0 8 / 3 1 6 , 3 9 9、米国特許第 5 , 2 0 8 , 0 3 6 号、第 5 , 2 6 4 , 6 1 8 号、第 5 , 2 7 9 , 8 3 3 号および第 5 , 2 8 3 , 1 8 5 号に記載されている（これらの記載内容は、参照により本明細書中に含まれる）。さらに陽イオン性脂質の多数の市販調製物が利用可能であり、本発明に用いられ得る。これらとしては、例えば L I P O F E C T I N（登録商標）（D O T M A および D O P E を含む市販陽イオン性リポソーム（G i b c o / B R L , G r a n d I s l a n d , N e w Y o r k , U S A））；L I P O F E C T A M I N E（登録商標）（D O S P A および D O P E を含む市販陽イオン性リポソーム（G i b c o / B R L））；ならびに T R A N S F E C T A M（登録商標）（D O G S を含む市販陽イオン性脂質（P r o m e g a C o r p . , M a d i s o n , W i s c o n s i n , U S A））が挙げられる。

20

30

【 0 1 1 8 】

陽イオン性脂質と核酸 - 脂質混合物の接触は、多数の技法のいずれかにより、好ましくは陽イオン性脂質の溶液および核酸 - 脂質混合物を含有する溶液と一緒に混合することにより成し遂げられ得る。2つの溶液の混合（または任意のその他の方法での接触）時に、核酸に関連した負電荷の一部が中和される。それにもかかわらず、核酸は依然として非縮合状態であり、親水性特徴を獲得する。

40

【 0 1 1 9 】

陽イオン性脂質が核酸 - 脂質混合物と接触された後、洗剤（または洗剤および有機溶媒の組合せ）が除去され、このようにして脂質 - 核酸粒子を形成する。洗剤を除去するために用いられる方法は、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での蒸発により、または混合物全体に不活性ガス（例えば窒素またはアルゴン）流を吹き込むことにより成し遂げられる。

【 0 1 2 0 】

このように生成された粒子は、典型的には約 1 0 0 n m ~ 数ミクロンにサイズ調整される。粒子におけるさらなるサイズ低減または粒子の均質性を達成するために、脂質 - 核酸粒子は音波処理され、濾過され、あるいはリポソーム処方物で用いられ、当業者に既知であ

50

るその他のサイジング技法を施される。

その他の実施態様では、方法はさらに、本発明の組成物を用いて細胞のリポフェクションを実行するのに有用である非脂質ポリ陽イオンを付加することを包含する。適切な非脂質ポリ陽イオンの例としては、ヘキサジメチリンプロミド（商標名ポリブレンPOLYBRENNE（登録商標）でAldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin, USAから販売されている）またはヘキサジメチリンのその他の塩が挙げられる。その他の適切なポリ陽イオンとしては、例えばポリ-L-オルニチン、ポリ-L-アルギニン、ポリ-L-リシン、ポリ-D-リシン、ポリアリルアミンおよびポリエチレンイミンの塩が挙げられる。これらの塩の付加は、好ましくは粒子が形成された後である。

10

【0121】

別の局面では、本発明は、脂質-核酸粒子の製造方法であって、以下の：

(a) ある量の陽イオン性脂質を溶液中で核酸と接触させる。溶液は約15~35%の水および約65~85%の有機溶媒を含み、そして陽イオン性脂質の量は、約0.85~2.0の+/マイナス電荷比を生じて、疎水性電荷中和脂質-核酸複合体を提供するのに十分な量であり、

(b) 溶液中の疎水性電荷中和脂質-核酸複合体を非陽イオン性脂質と接触させて、脂質-核酸混合物を提供し、そして

(c) 脂質-核酸混合物から有機溶媒を除去して、核酸が分解から保護される脂質-核酸粒子を提供する

20

ことを包含する方法を提供する。

【0122】

本発明のこの局面において有用である核酸、非陽イオン性脂質、陽イオン性脂質および有機溶媒は、洗剤を用いた前記の方法に関して記載されたものと同一である。実施態様の一群では、過程(a)の溶液は単一相である。実施態様の別の群では、過程(a)の溶液は二相である。

好ましい実施態様では、陽イオン性脂質は、DODAC、DDAB、DOTMA、DOSPA、DMRIE、DOGSまたはそれらの組合せである。その他の好ましい実施態様では、非陽イオン性脂質はESM、DOPE、ポリエチレングリコールベースのポリマー（例えばPEG2000、PEG5000、PEG改質リン脂質またはPEG改質セラミド）またはそれらの組合せである。さらにその他の好ましい実施態様では、有機溶媒はメタノール、クロロホルム、メチレンクロリド、エタノール、ジエチルエーテルまたはそれらの組合せである。

30

【0123】

特に好ましい実施態様では、核酸はプラスミドであり、陽イオン性脂質はDODAC、DDAB、DOTMA、DOSPA、DMRIE、DOGSまたはそれらの組合せであり、非陽イオン性脂質はESM、DOPE、ポリエチレングリコールベースのポリマーまた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、メチレンクロリド、エタノール、ジエチルエーテルまたはそれらの組合せである。

【0124】

前記のように、陽イオン性脂質との核酸の接触は、典型的には核酸の一次溶液および脂質の二次溶液を一緒に混合することにより、好ましくは機械的手段により、例えば渦巻ミキサーを用いることにより成し遂げられ得る。その結果生じる混合物は、前記の本発明の一局面に関して記載されたような複合体を含有する。これらの複合体は次に、非陽イオン性脂質の付加および有機溶媒の除去により、粒子に転化される。非陽イオン性脂質の付加は、典型的には、複合体を含有する混合物に非陽イオン性脂質の溶液を単に付加することにより成し遂げられる。逆付加も用いられ得る。有機溶媒のその後の除去は、当業者に既知のそして前記の方法により成し遂げられ得る。

40

【0125】

本発明の方法のこの局面に用いられる非陽イオン性脂質の量は、典型的には、電荷中和脂

50

質 - 核酸複合体を提供するために用いられた陽イオン性脂質の量の約 0.2 ~ 5 倍の量である。好ましくはその量は、用いられた陽イオン性脂質の量の 0.5 ~ 2 倍である。

さらに別の局面では、本発明は、前記の方法により調製される脂質 - 核酸粒子を提供する。これらの実施態様では、脂質 - 核酸粒子は、正味電荷中性であるか、または粒子により大きい遺伝子リポフェクション活性を提供する全体的伝家を保有する。好ましくは、粒子の核酸構成成分は、所望のタンパク質をコードするか、または望ましくないタンパク質の産生を遮断する核酸である。特に好ましい実施態様では、核酸はプラスミドであり、非陽イオン性脂質は卵スフィンゴミエリンであり、そして陽イオン性脂質は D O D A C である。

【0126】

S P L P - C P L (C P L 含有 S P L P) の製造のための種々の一般的な方法が、本明細書中で考察されている。2つの一般的な技法としては、「後挿入」技法、即ち例えば予備生成 S P L P 中への C P L の挿入、ならびに C P L が例えば S P L P 生成過程中に脂質混合物中に含入される「標準」技法が挙げられる。後挿入技法は、主として S P L P 二重層膜の外側面に C P L を有する S P L P を生じ、一方標準技法は内および外面の両方に C P L を有する S P L P を提供する。

【0127】

特に「後挿入」は、S P L P を生成し (任意の方法により) 、そして適切な条件 (好ましくは 60 °C で 2 ~ 3 時間) 下で、C P L の存在下で予備生成 S P L P をインキュベートすることを包含する。60 ~ 80 % の C P L がレシピエント小胞の外葉片中に挿入されて、約 5 ~ 10 mol % まで (総脂質と比較して) の最終濃度を生じる。本方法は特に、リン脂質 (コレステロールを含有し得る) から作られる小胞に、そして P E G - 脂質 (例えば P E G - セラミド) を含有する小胞に有用である。

【0128】

「標準」技法の一例では、本発明の C P L - S P L P は、押出しにより生成され得る。この実施態様では、C P L を含む脂質のすべてがクロロホルム中に同時溶解され、これは次に窒素中およびその後の高真空下で除去される。脂質混合物は適切な緩衝液中で水和され、100 nm の孔サイズを有する2つのポリカーボネートフィルターを通して押出される。その結果生じる S P L P は、内および外面の両方に C P L を含有する。さらに別の標準技法では、C P L - S P L P の生成は、例えば米国特許第 5, 976, 567 号および第 5, 981, 501 号 (これらの記載内容は、参照により本明細書中に含まれる) で考察されたような洗剤透析またはエタノール透析法を用いて成し遂げられ得る。

【0129】

I V . 医薬調製物

本発明の核酸 - 脂質粒子は、単独で、または投与経路および標準製薬業務にしたがって選択される生理学的に許容可能な担体 (例えば生理食塩水またはリン酸塩緩衝液) との混合物中で投与され得る。一般に、生理食塩水は、医薬上許容可能な担体として用いられる。その他の適切な担体としては、例えば水、緩衝化水、0.4 % 食塩水、0.3 % グリシン等が挙げられ、安定性強化のための糖タンパク質、例えばアルブミン、リポタンパク質、グロブリン等を含む。

【0130】

医薬担体は一般に、粒子形成後に付加される。したがって粒子が形成された後、粒子は医薬上許容可能な担体、例えば生理食塩水中に希釈され得る。

医薬処方物中の粒子の濃度は、選択される特定投与方式にしたがって、広範に、即ち約 0.05 重量% 未満から、通常は約または少なくとも約 2 ~ 5 重量%、そして 10 ~ 30 重量% まで変わり得るし、そして主として流体容積、粘度等により選択される。例えば濃度は、治療に関連した流体負荷を下げるために増大され得る。これは、アテローム硬化症関連うっ血性心不全または重症高血圧患者において特に望ましい。あるいは刺激性脂質から成る粒子は、投与部位での炎症を低減するために低濃度に希釈され得る。

【0131】

10

20

30

40

50

前記のように、PEG-脂質複合体、例えばPEG-セラミドまたはPEG-PE、ガングリオシド G_M 、改質脂質またはATA-脂質を粒子に含入するのがしばしば望ましい。このような構成成分の付加は、粒子凝集を防止し、循環寿命を増大し、そして標的組織への脂質-核酸粒子の送達を増大するための手段を提供する。典型的には、粒子中の構成成分の濃度は、約1~20%、さらに好ましくは約3~10%である。

【0132】

医薬組成物は、慣用的な周知の滅菌技法により滅菌され得る。水性溶液は、使用のために包装されまたは無菌条件下で濾過されて、凍結乾燥され、凍結乾燥調製物は投与前に滅菌水性溶液と併合される。組成物は、生理学的条件に近づけるために必要な場合には医薬上許容可能な補助物質、例えばpH調整剤および緩衝剤、張度調整剤等、例えば酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウムおよび塩化カルシウムを含有し得る。さらに粒子懸濁液は、貯蔵時のフリーラジカルおよび脂質-過酸化物質損害に対して脂質を防護する脂質保護剤を含み得る。親油性フリーラジカル消滅剤、例えばアルファトコフェロール、および水溶性鉄特異的キレート化剤、例えばフェリオキサミンが適している。

10

【0133】

それらの使用の別の例では、脂質-核酸粒子は、広範囲の局所投与形態、例えばゲル、油、エマルジョン（これらに限定されない）中に組入れられる。例えば核酸-脂質粒子を含有する懸濁液が処方され、局所的クリーム、ペースト、軟膏、ゲル、ローション等として投与され得る。

20

本発明は、キット形態の脂質-核酸粒子も提供し得る。キットは、典型的には、脂質-核酸粒子の種々の素子およびエンドソーム膜不安定剤（例えばカルシウムイオン）を保持するために区画化される容器から成る。キットは、好ましくは脱水形態で、それらの再水および投与のための使用説明書とともに本発明の組成物を含入する。さらにその他の実施態様では、粒子および/または粒子を含む組成物は、粒子の表面に付着されるターゲティング部分を有する。脂質（例えば本発明の粒子中に用いられるもの）にターゲティング部分（例えば抗体、タンパク質）を付着させる方法は、当業者には既知である。

【0134】

V. 脂質-核酸粒子処方物の投与

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に有用である。したがって本発明は、細胞中への核酸（例えばプラスミド）の導入方法も提供する。本方法は、前記のように粒子を先ず生成し、次にトランスフェクションが起こるのに十分な時間の間細胞と粒子を接触することにより、*in vitro*または*in vivo*で実行される。

30

【0135】

本発明の核酸-脂質粒子は、それらが混合されるかまたは接触されるほとんどすべての細胞型に吸着され得る。一旦吸着されれば、粒子は細胞の一部によりエンドサイトースされ、脂質を細胞膜と交換し、または細胞と融合する。粒子の核酸部分の移入または組入れは、これらの経路のいずれかにより起こり得る。特に融合が起こると、粒子膜は細胞膜に組み込まれ、粒子の内容物は細胞内流体と併合する。

【0136】

1. *In vitro* 遺伝子移入

in vitro 適用に関しては、核酸の送達は植物または動物起源であれ、脊椎動物または無脊椎動物であれ、いかなる組織または型であれ、培養中で増殖する任意の細胞に対してであり得る。好ましい実施態様では、細胞は動物細胞、さらに好ましくは哺乳類細胞、最も好ましくはヒト細胞である。

40

【0137】

細胞および脂質-核酸粒子間の接触は、*in vitro*で実行される場合、生物学的適合培地中で起こる。粒子の濃度は特定用途によって広範囲に変わるが、しかし一般に、約1 μmol ~ 約10 mmol である。核酸-脂質粒子による細胞の治療は一般に、生理学的温度（約37 $^{\circ}\text{C}$ ）で、約1~48時間、好ましくは約2~4時間の間実行される。

50

【0138】

好ましい実施態様の一群では、脂質-核酸粒子懸濁液は、約 10^3 ~約 10^5 細胞/mL、さらに好ましくは 2×10^4 細胞/mLの細胞密度を有する60~80%集密プレート化細胞に付加される。細胞に付加される懸濁液の濃度は、好ましくは約0.01~0.2 $\mu\text{g/mL}$ 、さらに好ましくは約0.1 $\mu\text{g/mL}$ である。

2. *In vivo* 遺伝子移入

あるいは本発明の組成物は、当業者に既知の方法を用いた*in vivo* 遺伝子移入のためにも用いられ得る。特にZhu, et al., Science 261: 209-211 (1993) (この記載内容は、参照により本明細書中に含まれる)は、DOTMA-DOPE複合体を用いたサイトメガロウイルス(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送達を記載する。Hyde, et al., Nature 362: 250-256 (1993) (この記載内容は、参照により本明細書中に含まれる)は、リポソームを用いた、マウスの気道の上皮への、ならびに肺の肺胞への囊胞性繊維症膜貫通コンダクタンス調節物質(CFTR)遺伝子の送達を記載する。Brigham, et al., Am. J. Med. Sci. 298: 278-281 (1989) (この記載内容は、参照により本明細書中に含まれる)は、細胞ない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)をコードする機能性原核生物遺伝子によるマウスの肺の*in vivo* トランスフェクションを記載する。

【0139】

In vivo 投与に関しては、医薬組成物は、好ましくは非経口的に、即ち関節内、静脈内、腹腔内、皮下または筋肉内に投与される。さらに好ましくは、医薬組成物は、ボラス注射により、静脈内にまたは腹腔内に投与される(例えば米国特許第5,286,634号(Stadler等)参照)(この記載内容は、参照により本明細書中に含まれる)。細胞内核酸送達は、Straubinger, et al., METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, New York. 101: 512-527 (1983); Mannino, et al., Biotechniques 6: 682-690 (1988); Nicolau, et al., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 6: 239-271 (1989)およびBehr, Acc. Chem. Res. 26: 274-278 (1993)でも考察された。脂質ベースの治療薬のさらにその他の投与方法は、例えば米国特許第3,993,754号(Rahman等)、米国特許第4,145,410号(Sears)、米国特許第4,235,871号(Papahadjopoulos等)、米国特許第4,224,179号(Schneider)、米国特許第4,522,803号(Lenk等)および米国特許第4,588,578号(Fountain等)に記載されている。

【0140】

ある種の実施態様では、医薬調製物は、組織への調製物の直接適用により標的組織と接触され得る。適用は、局所的「開放」または「閉鎖」手法によりなされ得る。「局所的」とは、環境に曝露された組織、例えば皮膚、口腔咽頭部、外耳道等への医薬調製物の直接適用を意味する。「開放」手法は、患者の皮膚を切開し、医薬調製物が適用される下層組織を可視化することを包含する手法である。これは一般に、外科的手法により、例えば肺にアクセスするための開胸術、腹部内臓にアクセスするための側腹切開術、または標的組織へのその他の直接的外科的アプローチにより成し遂げられる。「閉鎖」手法は、内部標的組織が直接可視化されないが、しかし皮膚における小創傷を通して器機を挿入することによりアクセスされる侵襲性手法である。例えば調製物は、針洗浄により腹膜に投与され得る。同様に、医薬調製物は、脊髄麻酔または脊髄のメトラザミド画像形成のために一般に実行されるような腰椎穿刺中の注入とその後の患者の適切な位置調節により髄膜または脊髄に投与され得る。あるいは調製物は、内視鏡装置を通して投与され得る。

【0141】

10

20

30

40

50

脂質 - 核酸粒子は、肺に吸入されるエアロゾル中 (Brigham, et al., Am. J. Med. Sci. 298: 278 - 281 (1989) 参照) でも、または疾患部位での直接注入 (Culver, HUMAN GENE THERAPY, Mary Ann Liebert, Inc., Publishers, New York. Pp. 70 - 71 (1994)) によっても投与され得る。

本発明の方法は、種々の宿主において実施され得る。好ましい宿主としては、哺乳類、例えばヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、畜牛、ウマ、ヒツジ等が挙げられる。

【0142】

投与される粒子の量は、核酸対脂質の比、用いられる特定の核酸、診断されている疾患状態、患者の年齢、体重および症状、ならびに臨床医の判断によって異なるが、しかし一般的には約 0.01 ~ 約 50 mg / 体重 1 kg、好ましくは約 0.1 ~ 約 5 mg / 体重 1 kg、または約 10^8 ~ 10^{10} 粒子 / 注射である。

10

3. 遺伝子の機能性コピーの挿入

遺伝子療法の一つの方法は、宿主染色体中に遺伝子の機能性コピーを組み込むことにより、内因性遺伝子中の欠陥を補償するのに役立つ。挿入遺伝子は宿主 DNA を用いて複製され、欠陥遺伝子を補償するレベルで発現される。このアプローチによる治療に対して改善可能な疾患はしばしば、劣性突然変異により特性化される。即ち内因性遺伝子の両コピーは、症状が現れるのを欠いているに違いない。このような疾患としては、嚢胞性繊維症、鎌状赤血球貧血、サラセミア、フェニルケトン尿症、ガラクトース血症、ウィルソン病、ヘモクロマトーシス、重症複合型免疫欠損病、 α -1-アンチトリプシン欠損症、白子症、アルカプトン尿症、リソソーム蓄積症、エーレルス - ダンロー症候群、血友病、グルコース - 6 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ欠損、無ガンマグロブリン血症、尿崩症、レッシュ - ナイハン症候群、筋ジストロフィー、ヴィスコット - オールドリッチ症候群、ファブリー病、脆弱 X 症候群等が挙げられる。その他の劣性突然変異は当業界で既知であり、それらを治療するための本発明の方法の使用が本明細書中で意図される。

20

【0143】

前記の遺伝子欠陥を補償するために外因性機能性遺伝子を導入するためのいくつかの方法が存在する。一アプローチにおいては、疾患に罹患している患者から細胞が取り出され、*in vitro* で脂質 - ベクター複合体と接触させられる。細胞は、疾患症状が明示される組織型から取り出されるべきである。細胞が複製できない場合、用いられるベクターは選択マーカーであり、マーカーをインターナライズおよび発現した細胞が選択され得る。特に選択が実施されない場合、細胞中への遺伝子の移入の頻度が高い、例えば細胞の少なくとも約 1、5、10、25 または 50 % であることが重要である。

30

【0144】

細胞ゲノム中へのベクターの取込み、そして任意に選択後、細胞は患者に再導入される。この適用、そして以下で考察されるその他のもの (優性突然変異を矯正するための部位特異的組換えを除く) においては、補償されつつある欠陥遺伝子に占められているのと同じ部位に、脂質 - 核酸粒子により供給される遺伝子が送達される必要はない。

【0145】

あるいは脂質 - ベクター複合体は、医薬組成物として患者に直接導入され得る。複合体は、治療的有効用量で、治療中の遺伝性障害に罹患した組織 (単数または複数) に送達される。このおよびその他の方法において、治療的有効用量とは、疾患およびその合併症の症状を治癒するかまたは少なくとも部分的に阻止するのに十分な量である。前記の症状の治療のための本発明の組成物の有効用量は、多数の異なる因子、例えば投与手段、標的部位、患者の生理学的状態および投与されるその他の薬剤によって変わる。したがって治療投与量は、安全性および効力を最適にするために滴定される必要がある。約 10 ng ~ 1 g、100 ng ~ 100 mg、1 μ g ~ 10 mg、または 30 ~ 300 μ g DNA / 患者が典型的である。投与経路としては、口腔、鼻、胃、静脈内、皮内および筋内等が挙げられる。

40

【0146】

50

核酸-脂質複合体は、生殖系列変更を達成するために、胚性幹細胞または接合子を移入するためにも用いられ得る (Jaenisch, Science, 240:1468-1474 (1988); Gordon et al., Methods Enzymol. 101, 414 (1984); Hogan et al., Manipulation of the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, C.S.H.L. N.Y. (1986); および Hammer et al., Nature 315:680 (1985); Gandolfi et al., J. Reprod. Fert. 81:23-28 (1987); Rexroad et al., J. Anim. Sci. 66:947-953 (1988) および Eyestone et al., J. Reprod. Fert. 85:715-720 (1989); Camous et al., J. Reprod. Fert. 72:779-785 (1984); Heyman et al., Theriogenology 27:5968 (1987) 参照)。しかしながらこれらの方法は、目下、ヒト胚を操作する場合の倫理的および調節的束縛のために、ヒト治療よりも獣医学的適用により適している。

【0147】

一例として、嚢胞性繊維症 (CF) は、通常は、白色人種集団において高発生率を有する致死性劣性遺伝病である。この疾患に關与する遺伝子は、Riordan et al., 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素イオン (Cl^-) の移入に關与する嚢胞性繊維症膜貫通コンダクタンス調節物質 (CFTR) と呼ばれるタンパク質をコードする。遺伝子の突然変異は、上皮細胞における Cl^- 分泌の欠損を引き起こして、種々の臨床的症候発現をもたらす。CF は、外分泌腺分泌濃化、膵不全、腸閉塞および脂肪の吸収不良を含めた多数の症状を有するが、しかし死亡率に影響を及ぼす最も重篤な因子は慢性肺疾患である。したがって CF 患者を治療するために、機能性 CFTR 遺伝子産物に關するコード配列を含有するベクターは、脂質と、任意に製剤賦形剤と複合されて、ベクター-脂質組成物が肺に達するよう、鼻投与により患者に導入され得る。ベクター-脂質複合体の用量は、好ましくは約 $10^8 \sim 10^{10}$ 粒子である。

【0148】

別の例として、または グロブリン遺伝子の欠陥 (McDonagh & Nienhuis in Hematology of Infancy and Childhood (eds. Nathan & Oski, Saunders, PA, 1992) at pp. 783-879 参照) は、遺伝子の機能性コピーを含有する核酸-脂質複合体による造血性幹細胞の *ex vivo* 治療により補償され得る。遺伝子は幹細胞中に融合し、これは次に患者に再導入される。ファンコニー貧血補体 C 群に關与する遺伝子の欠陥は、類似戦略により治療され得る (Walsh et al., J. Clin. Invest. 94:1440-1448 (1994) 参照)。

【0149】

その他の用途としては、癌細胞または癌になる危険性のある細胞中への腫瘍抑制遺伝子の機能性コピーの導入が挙げられる。内因性腫瘍抑制遺伝子の一方または両方のコピーにおける欠陥を有する個体は、特に癌を発症する危険性がある。例えばリー-フラウメニ癌症候群は、個体が突然変異対 p53 対立遺伝子を受容して、種々の癌の初期開始を生じる遺伝性症状である (Harris, Science 262:1980-1981 (1993); Frebourg et al., PNAS 89:6413-6417 (1992); Malkin et al., Science 250:1233 (1990))。癌細胞または癌になる危険性のある細胞中での腫瘍抑制遺伝子の発現は、細胞増殖およびその他の癌状態の症状発現を予防し、阻止しおよび/または逆転するのに有効である。本発明に用いるための適切な腫瘍抑制遺伝子としては、p53 (Buchman et al., Gene 70:245-252 (1988))、APC、DCC、Rb、WT1 および NF1 (Marx, Science 260:751-752 (1993); Marshall, Cell 64:313-326 (1991)) が挙げられる。腫瘍抑制

遺伝子の機能性コピーを保有する脂質 - 核酸複合体は、通常は、意図された作用部位に最も近位の経路により *in vivo* で投与される。例えば皮膚癌は局所投与により、そして白血病は静脈内投与により治療され得る。

【0150】

4. 遺伝子発現の抑制

本発明の核酸 - 脂質複合体を用いる遺伝子療法の方法は、病原性微生物、例えば HIV に感染したまたは感染する危険性のある患者または細胞の予防的または治療的処置のためにも用いられ得る。妨害ウイルス複製の標的遺伝子機能を遮断する場合のアンチセンス分子の有効性は、多数の異なる系において実証されている (Friedman et al., Nature 335: 452 - 54 (1988), Malim et al., Cell 58: 205 - 14 (1989) & Trono et al., Cell 59: 113 - 20 (1989))。用いられるベクターとしては、アンチセンス転写体をコードする DNA セグメントが挙げられるが、これは病原性微生物からのゲノムのセグメントと相補的である。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るべきであり、そして微生物に独特でもある (または少なくとも療法を施されている患者の天然ゲノムのゲノムからは少なくとも存在しない) 必要がある。例えば HIV ウイルス上の抑制のための適切な部位としては、TAR、REV または nef が挙げられる (Chatterjee et al., Science 258: 1485 - 1488 (1992))。Rev は、核からの非スプライス化 HIV pre mRNA の輸送を促す調節 RNA 結合タンパク質である (Malim et al., Nature 338: 254 (1989))。Tat は、5' フランキング mRNA 中の認識配列を結合することにより機能する転写アクチベーターであると考えられる (Karn & Graeble, Trends Genet. 8: 365 (1992))。核酸 - 脂質複合体は、治療的有效用量で、*ex vivo* に、または静脈内注射により、白血球または造血性幹細胞中に導入される。治療は、HIV⁻ ヒトに予防的に、または HIV にすでに感染したヒトに投与され得る。

【0151】

接着タンパク質をコードする内因性レシピエント細胞遺伝子の発現を抑制するために、同様の方法が用いられる。接着タンパク質発現の抑制は、望ましくない炎症応答を未然に防ぐのに有用である。選定ベクター中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接着タンパク質としては、インテグリン、セレクチンおよび免疫グロブリン (Ig) スーパーファミリー成員が挙げられる (Springer, Nature 346: 425 - 433 (1990); Osborn, Cell 62: 3 (1990); Hynes, Cell 69: 11 (1992) 参照)。インテグリンは、一般に短細胞質ドメインを有する鎖 (120 ~ 180 kDa) および鎖 (90 ~ 110 kDa) から成るヘテロ二量体膜貫通糖タンパク質である。3つの既知のインテグリン LFA-1、Mac-1 および P150, 95 は、CD11a、CD11b および CD11c と呼ばれる異なるアルファサブユニット、ならびに CD18 と呼ばれる共通のベータサブユニットを有する。LFA-1 ($\alpha_L \beta_2$) は、リンパ球、顆粒球および単球上で発現され、主に ICAM-1 と呼ばれる Ig-ファミリー成員対向受容体と (そしておそらくは小程度に ICAM-2 と) 結合する。ICAM-1 は、多数の細胞、例えば白血球および内皮細胞上で発現され、そしてサイトカイン、例えば TNF および IL-1 により血管内皮上で上向き調節される。Mac-1 ($\alpha_M \beta_2$) は好中球および単球上に分布され、ICAM-1 (そしておそらくは ICAM-2) とも結合する。第三 $\alpha_X \beta_2$ インテグリンである P150, 95 ($\alpha_X \beta_2$) も、好中球および単球上に見出される。セレクチンは、L-セレクチン、E-セレクチンおよび P-セレクチンから成る。

【0152】

5. 形質転換される細胞

本発明の組成物および方法は、広範な種々の細胞型を *in vivo* および *in vitro* で処理するために用いられる。これらの中で最もしばしば遺伝子療法のために標的化さ

10

20

30

40

50

れるものは、造血性前駆体（幹）細胞である。その他の細胞としては、標的化細胞の一部が非分裂中であるかまたはゆっくり分裂しているものが挙げられる。これらの例としては、繊維芽細胞、ケラチノサイト、内皮細胞、骨格筋および平滑筋細胞、骨芽細胞、ニューロン、静止リンパ球、最終分化細胞、緩徐または非周期変化一次細胞、実質細胞、リンパ系細胞、上皮細胞、骨細胞等が挙げられる。本方法および組成物は、広範な種々の脊椎動物、例えば哺乳類、ヒト細胞集団のほかに、特に獣医学的に重要なもの、例えばイヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ネズミ、ウサギ、ブタ等の細胞とともに用いられ得る。

【0153】

細胞の組織培養が必要とされ得る程度に、それは当業界で周知である。Freshney (1994) (Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, third edition Wiley-Liss, New York)、Kuchler et al. (1977) Biochemical Methods in Cell Culture and Virology, Kuchler, R. J., Dowden, Hutchinson and Ross, Inc., ならびにそこに引用された参考文献は、細胞の培養に対する一般的指針を提供する。培養細胞系はしばしば、細胞の単一層の形態であるが、しかし細胞懸濁液も用いられ得る。

【0154】

遺伝子療法は、標的細胞への治療用遺伝子の効率的送達によっている。遺伝子療法のために標的化されたほとんどの体細胞、例えば造血細胞、皮膚繊維芽細胞およびケラチノサイト、肝細胞、内皮細胞、筋肉細胞およびリンパ球は、普通は非分裂製である。遺伝子療法のために最も広範に用いられるベクターであるレトロウイルスベクターは、残念ながら、有効な形質導入のためには細胞分裂を要する (Miller et al., Mol. Cell Biol. 10: 4239-4242 (1990))。これは、他の遺伝子療法ベクター、例えばアデノ随伴ベクターに関しても言えることである (Russell et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 8915-8919 (1994); Alexander et al., J. Virol. 68: 8282-8287 (1994); Srivastava, Blood Cell 20: 531-538 (1994))。近年、HIVベースのベクターは、非分裂細胞をトランスフェクトすることが報告された。それにもかかわらず、多数の遺伝子療法処置のための好ましい標的である大多数の幹細胞は、普通は増殖中でない。したがって形質導入の効率はしばしば相対的に低く、遺伝子産物は治療的または予防的有効量で発現され得ない。このために、遺伝子移入前または移入中の幹細胞の刺激 (例えば増殖因子を用いた処置による)、5-フルオロウラシルによる前処理、サイトカインの存在下での感染、ならびに幹細胞が感染中に分裂する見込みを増大するためのベクター感染期間の延長といった技術を研究者が開発するに至ったが、しかしこれらによりかなえられた成功は限定されていた。

【0155】

6. 外来核酸の検出

当該遺伝子をコードする核酸構築物で既定の細胞が形質導入された後、どの細胞または細胞株が遺伝子産物を発現したかを検出すること、そして工学処理細胞中の遺伝子産物の発現のレベルを査定することは、重要である。これは、遺伝子産物をコードする核酸の検出を必要とする。

【0156】

当業者に周知の多数の手段のいずれかにより、本明細書中で核酸およびタンパク質が検出され、定量される。これらの例としては、分析的生化学的方法、例えば分光測光法、放射線撮影、電気泳動、毛管電気泳動、高速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等、ならびに種々の免疫学的方法、例えば流体またはゲル沈降素反応、免疫拡散 (単一または二重)、免疫電気泳動、ラジ

オイムノアッセイ (RIA)、酵素結合イムノソルベント検定法 (ELISA)、免疫蛍光検定等が挙げられる。核酸の検出は、周知の方法、例えばサザン分析、ノーザン分析、ゲル電気泳動、PCR、放射能標識、シンチレーション計数およびアフィニティークロマトグラフィーにより行われる。

【0157】

核酸ハイブリダイゼーションフォーマットの選択は重要ではない。種々の核酸ハイブリダイゼーションフォーマットが当業者に既知である。例えば一般的フォーマットとしては、サンドイッチ検定および競合または置換検定が挙げられる。ハイブリダイゼーション技法は一般に、"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。 10

【0158】

ハイブリダイゼーション検定の感度は、検出中の標的核酸を増加させる核酸増幅系の使用により強化され得る。分子プローブとして用いるために、またはその後のサブクロニングのための核酸断片を生成するために配列を増幅するのに適した *in vitro* 増幅技法が既知である。このような *in vitro* 増幅方法により技術者を指図するのに十分な技法の例、例えばポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、リガーゼ連鎖反応 (LCR)、Q-レプリカーゼ増幅およびその他のRNAポリメラーゼ媒介性技法 (例えばNASBA) は、Berger、SambrookおよびAusubelならびにMullis et al. (1987)、米国特許第4,683,202号; PCR Protocols A Guide to Methods and Applications (Innis et al. eds) Academic Press Inc. San Diego, CA (1990) (Innis); Arnheim & Levinson (October 1, 1990), C&EN 36-47; The Journal Of NIH Research, 3:81-94 (1991); (Kwoh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:1173 (1989); Guatelli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:1874 (1990); Lomell et al., J. Clin. Chem. 35:1826 (1989); Landegren et al., Science, 241:1077-1080 (1988); Van Brunt, Biotechnology, 8:291-294 (1990); Wu and Wallace, Gene, 4:560 (1989); Barringer et al., Gene, 89:117 (1990) および Sooknanan and Malek, Biotechnology, 13:563-564 (1995)に見出される。*In vitro* 増幅核酸の改良型クロニング方法は、米国特許第5,426,039号 (Wallace等)に記載されている。当業界で近年記載されたその他の方法は、核酸配列ベースの増幅 (NASBA (登録商標)、Cangene, Mississauga, Ontario) およびQベータレプリカーゼ系である。これらの系は、選択配列が存在する場合にのみPCRまたはLCRプライマーが延長または結繋されるよう設計される突然変異体を直接同定するために用いられ得る。あるいは選択配列は一般に、例えば非特異的PCRプライマーを用いて増幅され、増幅標的領域は、突然変異を示す特異的配列に関して後にプローブされ得る。 20 30 40

【0159】

例えば *in vitro* 増幅法において、プローブとして用いるための、遺伝子プローブとして用いるための、または阻害剤構成成分としてのオリゴヌクレオチドは、典型的には、例えばNeedham-Vandevanter et al., Nucleic Acids Res., 12:6159-6168 (1984)に記載されたような自動合成機を用いて、Beaucage and Caruthers, Tetrahedron Lett., 22(20):1859-1862 (1981)により記載された固相ホスホラミダイトリエステル法にしたがって化学的に合成される。オリゴヌクレオチドの 40 50

精製は、必要な場合には、典型的にはネイティブアクリルアミドゲル電気泳動により、または Pearson and Regnier, J. Chrom., 255:137-149 (1983) に記載されたように陰イオン交換 HPLC により実施される。合成オリゴヌクレオチドの配列は、Maxam and Gilbert (1980) in Grossman and Moldave (eds.) Academic Press, New York, Methods in Enzymology, 65:499-560 の化学分解法を用いて立証され得る。

【0160】

遺伝子の発現レベルを確定するための代替的手段は、*in situ* ハイブリダイゼーションである。In situ ハイブリダイゼーション検定は周知であり、Angerer et al., Methods Enzymol., 152:649-660 (1987) に一般的に記載されている。In situ ハイブリダイゼーション検定では、細胞は固体支持体、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、細胞は熱またはアルカリにより変性される。細胞は次に、中等度温度でハイブリダイゼーション溶液と接触されて、標識される特異的プローブのアニールングを可能にする。プローブは、好ましくは放射性同位元素または蛍光レポーターにより標識される。

10

【0161】

7. 外来遺伝子産物の検出

生成物を産生するための当該遺伝子の発現は、種々の方法により検出されるかまたは定量され得る。好ましい方法は、特異的抗体の使用を包含する。

20

ポリクローナルおよびモノクローナル抗体の産生方法は、当業者に既知である（例えば Coligan (1991), CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY; および Harlow and Lane (1989), ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Press, NY; Stites et al. (eds.) BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY (4th ed.) Lange Medical Publications, Los Atlos, CA およびそこに引用された参考文献; Goding (1986), MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (2nd ed.) Academic Press, New York, NY; および Kohler and Milstein, Nature, 256:495-497 (1975) 参照)。このような技法としては、ファージまたは類似の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 et al., Science, 246:1275-1281 (1989) および Ward et al., Nature, 341:544-546 (1989) 参照)。特異的モノクローナルおよびポリクローナル抗体および抗血清は、通常は少なくとも約 1 mM の、さらに通常は少なくとも約 1 μ M、好ましくは少なくとも約 1 μ M またはそれ以上で、最も典型的にはそして好ましくは、0.1 μ M またはそれ以上の K_D で結合する。

30

【0162】

試料中の所望のポリペプチド（例えばペプチド、転写体または酵素消化産物）の存在は、ウエスタンブロット分析を用いて検出され得る。本技法は一般に、分子量に基づいたゲル電気泳動により試料産物を分離し、分離タンパク質を適切な固体支持体（例えばニトロセルロースフィルター、ナイロンフィルターまたは誘導ナイロンフィルター）に移し、そして分析物タンパク質と特異的に結合する標識抗体とともに試料をインキュベートすることを包含する。標識抗体は、固体支持体上の分析物と特異的に結合する。これらの抗体は直接標識されるか、あるいは標識抗体と特異的に結合する標識剤、例えば抗体（例えば標識化ヒツジ抗マウス抗体。この場合、分析物に対する抗体はネズミ抗体である）を用いてその後検出される。

40

【0163】

V. 実施例

50

実施例 I : SPLP のトランスフェクション能力に及ぼすカルシウムの作用

A . 材料と方法

1 . 材料。N , N - ジオレイル - N , N - ジメチルアンモニウムクロリド (DODAC) は S . Ansell 博士から入手し、そして 1 - O - (2 - (- メトキシ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 - CerC₂₀) は、Z . Wang 博士 (Inex Pharmaceuticals Corporation , Burnaby , BC) が合成した。1 , 2 - ジオレオイル - sn - 3 - ホスホエタノールアミン (DOPE) および 1 , 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DOPC) は、Northern Lipids (Vancouver , BC) から入手した。1 , 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - (ホスホ - L - セリン) (DOPS) および 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 - N - (リスサミンローダミン B スルホニル) (Rh - DOPE) は、Avanti Polar Lipids (Alabaster , AL) から購入した。コレステロール (Chol)、オクチルグルコピラノシド (OGP)、HEPES、MgCl₂ および NaCl は、Sigma Chemical Co . (St Louis , Mo) から入手した。DEAE セファロース CL - 6 B 陰イオン交換カラムおよびセファロース CL - 4 B サイジングカラム物質は、Sigma Chemical Co . (St Louis , Mo) から入手した。ルシフェラーゼ検定キットは、Promega Corp . (Madison , WI) から購入した。ピコグリーン dsDNA 検出試薬は、Molecular Probes (Eugene , OR) から入手した。ヒト CMV 極初期プロモーター - エンハンサー素子の制御下でルシフェラーゼレポーター遺伝子をコードするプラスミド DNA (pCMV Luc) は、Inex Pharmaceuticals Corporation (Burnaby , BC) から入手した。ウシハムスター腎臓 (BHK) 細胞は、アメリカ培養細胞コレクション American Tissue Culture Collection (ATCC CCL - 10 , Rockville , MD) から入手し、10 % ウシ胎仔血清 (FBS)、100 U/ml のペニシリンおよび 100 μg/ml のストレプトマイシンを補充したダルベッコの変法イーグル培地 (DMEM) 中で培養した。5 . 0 % CO₂ を含有スル湿潤化大気中で 37 °C で単一層として BHK 細胞を保持した。

【 0 1 6 4 】

2 . SPLP の調製。いくつかの修正を加えて、Wheeler , et al . , Gene Therapy 6 : 271 - 281 (1999) に記載されたように SPLP を調製した。要するに、総量 10 μmol の DODAC、DOPE、PEG - CerC₂₀ (7 : 83 : 10 ; mol / mol / mol) をクロロホルム中に溶解し、窒素ガス流下で乾燥した。高真空下で 2 時間、残留溶媒を除去した。その結果生じた脂質フィルムを、連続攪拌しながら、0 . 2 M OGP を含有する HBS 緩衝液 (20 mM HEPES および 150 mM NaCl、pH 7 . 5) 1 ml 中で水和させた。プラスミド DNA (400 μg/ml) を水和脂質に付加し、混合物を HBS 緩衝液に対して 36 ~ 48 時間透析し、2 回、緩衝液を取り換えた。DEAE 陰イオン交換クロマトグラフィーにより非封入プラスミドを除去し、前記のように (Mok , et al . , Biochimica et Biophysica Acta 1419 : 137 - 150 (1999)) スクロース密度勾配を用いて空脂質小胞を除去した。高 DODAC 含量処方物 (DODAC / DOPE / PEG - CerC₂₀、14 : 76 : 10 , mol / mol / mol) のために、前記のように (Zhang , et al . , Gene Therapy 6 : 1438 - 1447 (1999)) 30 mM クエン酸ナトリウムを含有する HBS 緩衝液中で、SPLP を先ず調製した。前記のピコグリーン検定 (Zhang , et al . , Gene Therapy 6 : 1438 - 1447 (1999)) を用いてプラスミド閉じ込めに関して SPLP を特性化し、準弾性光散乱を用いてサイズ調整した。

【 0 1 6 5 】

3 . Ca²⁺ の存在下でのトランスフェクション。トランスフェクション前に、1 × 1

0.4 細胞 / 96 ウエルプレート 1 ウエルの密度で BHK 細胞を一夜プレート化した。CaCl₂ ストック溶液を dH₂O 中に調製し、濾過することにより滅菌した。SPLP 中に封入されたプラスミド DNA $0.5 \mu\text{g}$ をトランスフェクションのウエル当たりで用いた。実験に必要な場合、先ず適切な濃度の Ca に SPLP を付加し、その後、培地を混合物に付加して、 $100 \mu\text{l}$ / ウエルの最終トランスフェクション容積を得た。細胞に適用されるトランスフェクション培地の最終容積に関して、Ca²⁺ 濃度を算定した。最終容積は、 20 容積% の Ca²⁺ および SPLP 混合物ならびに 80 容積% の培地を含有した。前記のように (Wheeler, et al., Gene Therapy 6: 271-281 (1999)) 遺伝子に関する検定の前に、細胞をトランスフェクション複合体とともに適切な時間インキュベートした。Mibrio BCA タンパク質検定試薬キット (Pierce, Illinois) を用いて確定された総細胞タンパク質に対して、相対的ルシフェラーゼ活性を標準化した。

10

【0166】

4. 細胞脂質取込みの確定。 実験前日に、 1×10^5 細胞 / 12 ウエルプレート 1 ウエルで BHK 細胞をプレート化した。脂質処方物中に混入した $0.5 \text{ mol} \%$ Rh-DOP E を用いて、SPLP を調製した。漸増濃度の Ca²⁺ ($0 \sim 14 \text{ mM}$) と混合した SPLP を、完全培地中に 80 nmol の脂質量で細胞に付加した (最終容積 1 ml)。37 で $4, 8$ および 24 時間インキュベーション後、細胞を PBS で洗浄し、 250 mM リン酸塩緩衝液 (pH 8.0) 中に 0.1% TX-100 を含有する緩衝液の付加により溶解した。それぞれ 10 および 10 nm のスリット幅で 560 nm の e_x および 590 nm の e_m を用いてパーキン-エルマー発光分光光度計で、溶解物のローダミン蛍光を測定した。溶解物蛍光を脂質標準の蛍光と比較することにより脂質取込みを確定し、それを総細胞タンパク質に対して標準化した。細胞内 SPLP 局在化を確定するために、蛍光顕微鏡を用いた。細胞を、 $4 \text{ mol} \%$ Rh-DOP で標識した小胞でトランスフェクトした。蛍光顕微鏡下での分析の前に、トランスフェクション培地を完全培地と取り換えた。以下の明細で Omega Optical s (Brattleboro, VT) からのローダミンフィルターを用いて、Axiovert 100 ツァイス蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss Jena GmbH) で蛍光顕微鏡写真を撮った: $e_x = 560 \pm 20 \text{ nm}$ 、 600 nm LP および DC 590 nm 。

20

【0167】

5. ³¹P NMR 分光測定。 $3.8 \mu\text{s}$ 60° パルスおよび 1.5 s 反復時間を用いて、 81.02 MHz で広帯域分離に関して、ソリッドステート ³¹P NMR スペクトルを記録した。自由誘導減衰 (FID) を $2500 \sim 300$ スキャン上で集積し、 50 Hz 線拡大によりフーリエ変換した。リン脂質混合物 ($25 \mu\text{mol}$ の総リン脂質) を 2 ml の緩衝液 (20 mM HEPES 緩衝液、pH 7.4) 中での回転混合により分散させた。 200 mM CaCl₂ ストックのアリコートが付加することにより、漸増濃度の Ca²⁺ を小胞中で滴定した。3 サイクルの凍結-解凍を実施することにより、Ca²⁺ 平衡を保証した。Bruker 可変温度ユニットにより温度を 25 に維持した。リン酸 / D₂O の混合物を、すべての ³¹P NMR スペクトル中での化学シフトに関する参照として用いた。

30

40

【0168】

6. プラスミド DNA の細胞内プロセッシング。 実験前日に、BHK 細胞を 3×10^5 細胞 / 6 ウエルプレート 1 ウエルで BHK 細胞をプレート化した。SPLP 中に封入された $2.5 \mu\text{g}$ プラスミド DNA を、Ca²⁺ の非存在下または存在下 (8 mM) で、 $2, 4$ および 8 時間、細胞とともにインキュベートした。適切な時点で、細胞を PBS で洗浄し、外部 SPLP をトリプシン処理により除去した。遠心分離によりトリプシン処理細胞をペレット化し、細胞を再懸濁して、等張緩衝液 (250 mM スクロース、 3 mM MgCl₂、 50 mM HEPES、pH 7.2) で洗浄した。その後、 $1 \text{ mg} / \text{ml}$ でプロナーゼ E (Sigma) を含有する溶解緩衝液 (10 mM トリス、pH 7.5 、 0.5% SDS、 1 mM EDTA) $250 \mu\text{l}$ とともに 37 で一夜インキュベートすることにより、ペ

50

レット化細胞を溶解した。DNA (ゲノムDNAおよび送達プラスミドDNA) を前記のように抽出した (Sambrook et al., In Molecular Cloning: A Laboratory Manual I, 1.21-1.52 (1989). Cold Spring Harbor, New York, C. Nolan, editor. Cold Spring Harbor Laboratory)。260nmでの吸光度を測定することにより、DNA回収を確定した。各試料からの6 μ gの総DNAを、一組のpCMVLuc標準(0~5pg)を用いてナイロン移送膜(Amersham)上でドットプロットさせるか、または1%アガロースゲルに負荷して、60Vで2時間、サザン分析のためにサイズ分別した。両プロットを、³²P Quick Prime ³²P キット(Pharmacia Biotech)を用いてPstI切断-pCMVLucプラスミドで調製したP-標識化プラスミドDNAプローブと、68 $^{\circ}$ Cで一晩ハイブリダイズした。0.1%SDSを含有する2XSSCでプロットを3回洗浄し、次にPhosphoImagerスクリーン上で曝露し、これをその後走査した(Molecular Dynamics-PhosphoImagerTMSI)。

10

20

30

40

50

【0169】

7. SPLP内へのCa²⁺の閉じ込め。SPLP(DODAC/DOPE/PEG-CerC20/Rd-DOPE、10:79.5:10:0.5, mol/mol/mol)を最初に、クエン酸塩緩衝液(150mMクエン酸ナトリウムおよび150mMクエン酸)中でpH4で調製した。HBS緩衝液(pH7.5)で平衡させたDEAE陰イオン交換クロマトグラフィーにより非封入プラスミドを除去し、前記のように(Mok, et al., Biochimica et Biophysica Acta 1419:137-150 (1999))スクロース密度勾配を用いて空脂質小胞を除去した。2.5mM CaCl₂ およびイオノフォアA23187(0.1 μ g/ μ mol脂質)とともに室温で30秒間、DNA負荷小胞をインキュベートすることにより、Ca²⁺負荷を実施した。緩衝液を2回取り換えて、HBS緩衝液中での透析により、非負荷Ca²⁺およびイオノフォアを除去した。CaCl標準曲線(0~50nmol)に対する膜非透過性吸収剤指示薬Asenazo III(10mMHEPES緩衝液、pH7中で0.1mM)を用いることにより、TX-100(0.2%)の非存在下および存在下で内部Ca²⁺濃度を測定した。650nmでの吸光度を、Ca²⁺存在の指標として測定した。前記のピコグリーン検定(Zhang, et al., Gene Therapy 6:1438-1447 (1999))を用いてプラスミド閉じ込めに関してSPLPを特性化し、準弾性光散乱を用いてサイズ調整した。Ca²⁺の内部濃度は、~175mMであることが判明した。

【0170】

8. CPLの挿入。CPL挿入前に、多少の修正を加えて、前節に記載したようにSPLPを調製した。全体で10 μ molのDODAC、DOPE、PEG-CerC₂₀およびRd-DOPE(7:82.5:10:0.5; mol/mol/mol/mol)を含有するSPLPを、連続攪拌しながら、0.2MOGPを含有するHBS緩衝液(20mMHEPESおよび150mMNaCl、pH7.5)1ml中で水和させた。プラスミドDNA(400 μ g/ml)を水和脂質に付加し、混合物をHBS緩衝液に対して36~48時間透析し、2回、緩衝液を取り換えた。DEAE陰イオン交換クロマトグラフィーにより非封入プラスミドを除去した。ダンシル蛍光マーカで標識したメタノール中のCPLストックをSPLPに付加して、所望のモル比を得た(小胞脂質に関しては4mol%CPLまで)。CPLおよびSPLPを60 $^{\circ}$ Cで3時間までの間インキュベートし、氷上で室温に冷却した。スクロース密度勾配を用いて、空脂質小胞および非挿入CPLをとともに除去した。パーキン-エルマー発光分光光度計を用いて、CPLの挿入レベルを定量した。要するに、スクロース密度勾配前の初期ダンシル/ローダミン(D/R_i)蛍光比および単離CPL-SPLPの最終D/R(D/R_f)比を測定した。ローダミン蛍光は λ_{ex} = 560 nmおよび λ_{em} = 590 nmで検定したが、一方、ダンシル蛍光は λ_{ex} = 340 nmおよび λ_{em} = 510 nmで検定し、10および10 nmの

スリット幅を用いた。挿入%は、以下のように算定した：

$$\text{挿入\%} = ([D/R]_f) * 100 / (D/R)_i$$

前記のピコグリーン検定 (Zhang et al., 1999) を用いてプラスミド閉込めに関して CPL-SPLP をさらに特性化し、そして準弾性光散乱を用いてサイズ調整した。

【0171】

B. 結果

1. SPLPのトランスフェクション能力はCa²⁺の存在下で劇的に強化される。 SPLP、特に PEG-CerC₂₀ により安定化された SPLP は *in vitro* でより低レベルのトランスフェクションを示し得る、ということを経験的研究は示している (Wheeler, et al., Gene Therapy 6: 271-281 (1999); Mok, et al., Biochimica et Biophysica Acta 1419: 137-150 (1999))。ここでは、SPLPのトランスフェクション能力に及ぼすCa²⁺の作用を調べた。洗剤透析法を用いて、DOPE/DODAC/PEG-CerC₂₀ (84:6:10; mol/mol/mol) 脂質混合物および pCMVLuc から調製した SPLP を、前記の材料と方法に記載したように空小胞および非封入プラスミドから精製した。次に適量の CaCl₂ を SPLP 調製物に付加して、BHK細胞への適用前に培地中に希釈後、所望のCa²⁺濃度を得た。BHK細胞および SPLP を一緒に24時間インキュベートし、その後、トランスフェクト化細胞をルシフェラーゼ発現に関して検定した。

【0172】

図1に示したように、Ca²⁺の存在は、ルシフェラーゼ発現レベルの劇的増強を生じ、最適Ca²⁺濃度では SPLP トランスフェクション能力の~600倍の増大を観察した。トランスフェクションにおけるこのCa²⁺媒介性増大は、プラスミドDNA-陽イオン性脂質複合体に関して前に観察されたものより、SPLP系に関しては有意に大きい。SPLPトランスフェクション能力を刺激するために必要な最適Ca²⁺濃度は、8~10mMの範囲で、プラスミドDNA-陽イオン性脂質複合体のトランスフェクション能力の最適刺激に必要な量(5~25mM)より多少低かった。さらにSPLPのトランスフェクション能力を刺激するCa²⁺の能力は、非常に特異的であった。図1に示したように、MgCl₂ または NaCl を CaCl₂ の代わりに用いた場合、トランスフェクション能力の増強は観察されなかった。

【0173】

2. SPLPはCa²⁺の存在下で安定である。 PEG-CerC₂₀ を伴う SPLP は、*in vivo* での循環時間延長を示し、外部ヌクレアーゼから封入プラスミドを保護し、そして細胞と容易に相互作用する高安定系である (Wheeler, et al., Gene Therapy 6: 271-281 (1999); Mok, et al., Biochimica et Biophysica Acta 1419: 137-150 (1999); Monck, et al., J. Drug Targ. 7: 439-452 (2000))。したがって、Ca²⁺の存在下での SPLP のトランスフェクション特性強化が、細胞取込み強化をもたらす SPLP の不安定化または凝集のためでなかったことを実証するのは重要であった。サイズの変化を検出するために準弾性光散乱 (QELS) を用いて、そして DNA 漏出を検出するためにピコグリーンフルオロフォア検定を用いて、Ca²⁺の存在下での SPLP の安定性を調べた。QELS 実験のために、CaCl₂ を SPLP 懸濁液に付加して、50mM という高い濃度を達成した。SPLP サイズまたはサイズ分布の変化は観察されなかった。プラスミド放出実験に関しては、8mM Ca²⁺の存在下または非存在下で10% FBS を含有する HBS 緩衝液中で37度で、SPLP をインキュベートした。ピコグリーン検定を用いて24時間に亘って、プラスミド放出を検定した。プラスミド放出は観察されなかった。

【0174】

3. Ca²⁺はSPLPの細胞取込みに影響を及ぼさない。 プラスミドDNA-陽イオン

性脂質複合体のトランスフェクション活性を強化する Ca^{2+} の能力は、 Ca^{2+} の存在下での細胞中への複合体の取込みの増大に寄与した (Lam, et al., *Biochim Biophys Acta* 1463: 279 - 290 (2000))。この点では、複合体と比較した場合の SPLP の低トランスフェクション能力は、少なくとも一部は、SPLP の極低レベルの細胞取込みから生じる (Mok, et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1419: 137 - 150 (1999))。したがって、細胞への SPLP 取込みを増大することにより Ca^{2+} が SPLP トランスフェクション能力を刺激するか否かを確定することは、興味深いことであった。0.5 mol % Rh - D O P E を含有する SPLP を用いて、前記の材料と方法に記載したように、12 mM までの Ca^{2+} の存在下で BHK 細胞中への SPLP 取込みを測定した。SPLP を細胞とともに 4、8 および 24 時間インキュベートし、細胞内脂質のレベルを測定した。細胞増殖を説明するために、各時点での脂質取込みを総細胞タンパク質に対して標準化した。図 2 に示したように、試験した Ca^{2+} の濃度の範囲全体で SPLP のトランスフェクション能力が数百倍まで変化した場合でも、 Ca^{2+} は SPLP の細胞取込みを有意に増大しない、ということの結果を示している。

10

20

30

40

50

【0175】

4. 蛍光試験は Ca^{2+} 存在下での SPLP 取込み後のエンドソーム不安定化強化を示す。 SPLP の取込みが Ca^{2+} の付加により刺激されないという事実は、トランスフェクションの Ca^{2+} 依存性強化が蓄積された SPLP のより効率的利用から生じなければならない、ということを示唆する。1つの可能性は、 Ca^{2+} が SPLP の取込み後にエンドソームの不安定化を多少促し、したがってプラスミドの細胞内送達を強化する、というものである。蛍光的標識化脂質を含有する小胞の取込み語のエンドソーム不安定化は、細胞内蛍光として蛍光顕微鏡により検出され得るが、一方、安定エンドソーム中への取込みは局在化「小斑点」出現を生じる、ということを経験的研究は示している (Felgner, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7413 - 7417 (1987))。SPLP の細胞分布を可視化し得るために、高レベルの Rh - D O P E (4 mol %) を小胞処方物とともに混入した。このような Rh - 標識化 SPLP を、10 mM Ca^{2+} の存在下および非存在下で BHK 細胞上でインキュベートし、蛍光顕微鏡により 8 時間目に細胞形態を検査した。前節で認められた SPLP 取り込みの定量的測定値と一致して、 Ca^{2+} の非存在下または存在下で、同様レベルのローダミン蛍光を検出した。しかしながら、図 3 に示したように、蛍光顕微鏡で検出した場合の細胞の外観は、 Ca^{2+} の存在下または非存在下においてまったく異なった。多少の小斑点構造は観察されるが、しかし蛍光標識 SPLP を含有する BHK 細胞は、 Ca^{2+} が含まれた場合に、より拡散性のパターンを示した。 Ca^{2+} の非存在下では、蛍光パターンは、エンドソーム区画中の SPLP 保持と一致して、高小斑点性であった。

【0176】

5. プラスミド DNA の細胞内プロセッシング。 先の蛍光顕微鏡結果は、 Ca^{2+} がエンドソーム区画を不安定化することによりトランスフェクションを強化し、したがって SPLP 関連プラスミドの細胞質送達を強化する、ということを示唆する。SPLP プラスミドが Ca^{2+} の存在下でより容易にエンドソームから逃れ得る場合、それはリソソーム経路での分解を回避し、より無傷な細胞内プラスミド DNA が存在する。ドットプロット検定を用いて、プラスミド DNA の細胞内送達を測定し、サザンプロット分析を用いてプラスミドの組込みを検査した。8 mM Ca^{2+} の非存在下または存在下で 2、4 および 8 時間、細胞を SPLP とともにインキュベートした。異なる系に関する無傷細胞内プラスミド DNA のレベルを、前記の材料と方法に記載したような細胞からの DNA の単離後に比較し、結果を図 4 に示す。図 4 A に示したように、 Ca^{2+} の存在下で細胞を SPLP でトランスフェクトすると、BHK 中の無傷プラスミドの量は、8 時間インキュベーション期間後に約 10 倍に増大した。これは、 Ca^{2+} の存在下で調製された SPLP でトランスフェクトした細胞中により多くの無傷プラスミド DNA が存在することを示したサザン分析にも反映されている (図 4 B)。無傷プラスミド DNA のこのようなレベル強化は、C

Ca^{2+} の代わりに Mg を用いた場合には観察されなかったが、このことは、 Ca^{2+} の特異性を実証する (図 4 B)。

【0177】

6. Ca^{2+} はエンドソーム膜を不安定化する能力と一致した方法で二重層脂質構造を不安定化する。陰イオン性脂質と併合して、非二重層 (H_{II} 相) 構造を誘導することにより二重層膜を不安定化するイオン対を生成することにより、陽イオン性脂質が高分子、例えばプラスミド DNA の細胞内送達を刺激する、ということを近年の研究は示唆する。この点では、非二重層ヘキサゴナル H_{II} 相構造を誘導することにより、不飽和 PE と組合せて酸性脂質、例えばホスファチジルセリン (PS) を含有する脂質二重層を Ca^{2+} が不安定化し得る、ということが周知である (Hope, et al., FEBS Letters 107:323-326 (1976); Tilcock, et al., Biochimica et Biophysica Acta 641:189-201 (1981))。ホスファチジルコリン (PC) およびコレステロールを含有する関連系において H_{II} 相構造を Ca^{2+} が誘導し得る、ということも示されている。例えば DOPC / DOPE / DOPS / コレステロール (1:1:1:3; モル比) の混合物への付加も、二重層をヘキサゴナル H_{II} 相遷移に誘導する (Tilcock, et al., Biochemistry 23:2696-2703 (1984))。したがって、SPLP 中の陽イオン性脂質と協力して作用することにより、 Ca^{2+} が SPLP トランスフェクションを刺激して、エンドソーム膜の脂質二重層を不安定化するということが可能である。

10

20

【0178】

この可能性を調べるために、DOPC / DOPE / DOPS / Chol (1:1:1:3; モル比) から成る MLV の Ca^{2+} 依存性多型性を、 ^{31}P NMR を用いて、少量の DODAC の非存在下および存在下で調べた。二重層組織化におけるリン脂質は非対称 ^{31}P NMR 線形状を生じ、低視野肩および高視野ピークを有するが、一方、ヘキサゴナル H_{II} 相中のリン脂質は、2つのより狭いものの一因子である逆非対称を生じる (Cullis, et al., Biochimica et Biophysica Acta 559:399-420 (1979))。図 5 A に示したように、DODAC の非存在下で、 Ca^{2+} は、0.5:1 の Ca^{2+} 対 DOPS 比での ^{31}P NMR により報告されているように、二重層からヘキサゴナル H_{II} 相への遷移を刺激し得る。あるいは、少量の DODAC (DOPC / DOPE / DOPS / コレステロール / DODAC; 1:1:1:3:0.25; モル比) を含有する MLV においては、主に H_{II} 相構造を誘導するためには、0.25:1 の Ca^{2+} 対 DOPS 比のみが必要である (図 5 B)。狭中央ピークは、小ラメラ構造から、または構成成分リン脂質が等方性運動平均化を経る立方体相のような非二重層構造中の脂質から生じ得る。

30

【0179】

7. 外部 Ca^{2+} は SPLP トランスフェクション能力を強化するために必要とされる。最終組の実験を実行して、SPLP 内に封入された Ca^{2+} が導入遺伝子発現を刺激し得るか否かを確定した。他所に詳述されているように (Felgner, et al., Journal of Biological Chemistry 269:2550-2561 (1994))、 Ca^{2+} は、 Ca^{2+} イオノフォア A23187 が存在する場合、pH 勾配 (内側酸性) に応答して、大型単一ラメラ小胞 (LUV) 中に負荷される。200 mM という高い内部 Ca^{2+} 濃度が達成され得る。前記の材料と方法に記載したように、SPLP はクエン酸塩緩衝液の存在下で pH 4 で容易に調製され、次に、洗剤透析手法後に外部 pH が pH 7.5 に挙げられる。外部 CaCl_2 およびイオノフォアの付加は次に、SPLP 中への Ca^{2+} の負荷を生じて、~175 mM の内部濃度を達成する。図 6 に示したように、封入 Ca^{2+} の存在は SPLP トランスフェクション能力の強化を生じるが、しかし Ca^{2+} の外部レベルはトランスフェクション過程を刺激するのに主要な役割を演じる、と思われる。

40

【0180】

50

8. 改良型SPLP系に及ぼすCa²⁺の作用。SPLPの一制限は、小胞上の限定陽イオン性脂質およびPEGの存在の結果、系が細胞に最適に取込まれない、という点である (Mok, et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1419:137-150 (1999))。正電荷を増大するための簡単な一方法は、陽イオン性含量を増大することによる (Zhang, et al., *Gene Therapy* 6:1438-1447 (1999))。しかしながらSPLPに伴って増大するトランスフェクション効率はDODAC濃度を増大し、したがってこのような系はより低いDNA封入に屈従した。近年、陽イオン性ポリ(エチレングリコール)脂質複合体(CPL)として既知の陽イオン性脂質の新規の種類が合成された (Chen, et al., *Bioconj. Chem.* 11:433-437 (2000))。本試験に用いられる典型的CPLは、疎水性セラミドアンカーを含有し、これは、4つのリシン残基から作られる陽イオン性頭基に連結される親水性PEGスペーサーに結合される。その表面に挿入されるSPLPw/CPLは、リポソームおよび細胞形質膜間の相互作用強化を示す、ということが示されている (Chen, et al., *Bioconj. Chem.* 11:433-437 (2000))。 10

【0181】

CPL-SPLP系に及ぼすCa²⁺の影響を調べるために、実験を実行した。より高いDODAC含量(14mol%)を含有するSPLPも含まれた。CPL-SPLP調製のために、前記の洗剤透析法を用いてプラスミドDNAをリポソーム中に負荷し、そして特性化挿入法を用いて予備生成SPLP中にCPLを挿入した。CPLを挿入して、最終4mol%挿入効率を得たが、このレベルは最適細胞結合および取り込みを提供することが示されている。Ca²⁺を8mMでSPLPおよびCPL-SPLP調製物に付加して、BHK細胞に適用する前に培地中に希釈した。BHK細胞をトランスフェクトリポソームと一緒にインキュベーション後24時間で、ルシフェラーゼに関して検定することにより、遺伝子発現を確定した。図7に示したように、それぞれ高DODAC含量またはCPLを含有するSPLPに関して、トランスフェクションの~2000倍増および10⁵倍増を検出した。 20

【0182】

C. 考察
本実施例は、Ca²⁺が*in vitro*でのSPLPトランスフェクション能力の大強化を生じることを実証する。 30

Ca²⁺がSPLPのトランスフェクション能力を刺激するメカニズムは、いくつかの観察を説明しなければならない。第一に、トランスフェクション強化は、Ca²⁺存在下の無傷プラスミドの高細胞内レベルに起因すると思われる。これらの高レベルのプラスミドは、しかしながら、細胞中へのSPLPの取込み増大から生じると考えられる。第二に、本過程は、蛍光標識SPLPの取込み語の細胞の「小斑点」外観の低減を伴う。最後に、本作用はCa²⁺特異的である。最初の2つの観察は明らかに、SPLPのエンドサイトーシス後のBHK細胞のエンドソーム不安定化強化と一致する。したがって残存する問題は、Ca²⁺が特異的方法でこの不安定化をいかにして促し得るか、ということである。この点に関して、エンドソームが不安定化されてそれらの内容物の放出を強化する方法に関するコンセンサスは目下示されていないが、しかしながら多数の先導的観察がなされている。これらの中で主なものは、陽イオン性脂質が高分子、例えばプラスミドおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドの細胞内送達を劇的に強化し得るという (Bennett, et al., *Mol. Pharmacol.* 41:1023-1033 (1992)); Barron, et al., *Gene Therapy* 6:1179-1183 (1999))、そしてこの過程が、エンドソーム膜を不安定化し、したがってエンドソーム内容物の細胞内放出を促す陽イオン性脂質の能力によっていると考えられる (Wattiaux, et al., *FEBS Letters* 417:119-202 (1997)); Xu, et al., *Biochemistry* 35:5616-5623 (1996))という観察である。陽イオン性脂質は、一般的特性として、非二重層ヘキサ 40 50

ゴナル H_{II} 相構造を形成するために陰イオン性脂質と併合する能力を示すということ、近年の研究は示して、陽イオン性脂質がエンドソームを不安定化するメカニズムがエンドソーム膜の二重層組織化を崩壊する能力によっているということを提唱した。同様に、 Ca^{2+} が二重層組織化を崩壊し、 H_{II} 相構造を誘導する場合、細胞内送達における同様の強化が予測され得る。

【0183】

Ca^{2+} は陰イオン性脂質を含有する従来の二重層脂質系中に H_{II} 相構造を誘導し得るという、そして、他の陽イオン、例えば Mg^{2+} は H_{II} 相構造を誘導し得ないし、同様の作用を生じるために高濃度を要しないので、この作用は Ca^{2+} 特異的であるということの証拠が認められる(Tilcock, et al., Biochemistry 23: 2696 - 2703 (1984))。本発明の実施例に示されているように、 Ca^{2+} はDOPC:DOPE:DOPS:Cholから成る二重層中に H_{II} 相構造を誘導し得るし、そして低レベルの陽イオン性脂質DODACと相乗的に作用して、 H_{II} 相形成を誘発し得る。モデル膜行動をエンドソーム内側の行動と直接関連付けることは難しいが、しかし新規の酸性脂質(リソピスホスファチジン酸;LBPA)の生成のためにそれらが「初期」から「後期」に動くので、エンドソームの陰イオン性脂質含量は増大するという、そしてLBPAと陽イオン性脂質、例えばDODACの混合物が H_{II} 相を採用する、ということが既知である。したがってこれらの結果は、 Ca^{2+} が陽イオン性脂質と共働してエンドソーム不安定化を促すことによりトランスフェクションを強化する、という理論を支持する。このような提案は、LBPAへの Ca^{2+} の付加が H_{II} 層の形成を生じるという観察とも一致する。その他の研究者は、リン酸カルシウム(CaP_i)媒介性トランスフェクション中のエンドソーム放出の媒介に(Loyter, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 422 - 426 (1982); Orrantia, et al., Experimental Cell Research 190: 170 - 174 (1990))、ならびにポリ陽イオン媒介性遺伝子移入に(Bottger, et al., Biochimica et Biophysica Acta 1395: 78 - 87 (1998); Haberland, et al., Biochimica et Biophysica Acta 1445: 21 - 30 (1999))、 Ca^{2+} が一役を演じる、ということを示唆する。

【0184】

本試験の意外な局面は、前に報告されたプラスミドDNA-陽イオン性脂質複合体のトランスフェクション特性に及ぼす Ca^{2+} の影響(Lam, et al., Biochim Biophys Acta 1463: 279 - 290 (2000))と、SPLPに関して本明細書中に報告された結果との間の不一致に関する。特に従来の研究は、 Ca^{2+} が複合体のトランスフェクション能力を20倍まで強化し得るということ、そしてこれがエンドソーム放出強化というよりむしろ、細胞中への複合体の取込み強化に寄与するという事実を実証した。意外な局面は、 Ca^{2+} 存在下でのSPLPのトランスフェクション能力増大は細胞によるSPLPの取込み増大に関連しないが、一方 Ca^{2+} は脂質およびプラスミドの両方の取り込みにより立証されるような複合体の取込みの少なくとも2倍増を引き起こしたということである(Lam, et al., Biochim Biophys Acta 1463: 279 - 290 (2000))。この不一致は、複合体と比較した場合のSPLPの非常に異なる物理的特性に関連すると思われる。複合体は、高(等モル)レベルの陽イオン性脂質を含有する大型の正荷電系であり、一方、SPLPは小型の安定した、本質的に中性の小胞であり、低レベルの陽イオン性脂質を含有するPEGコーティングを有する。複合体と比較した場合のSPLP中の低レベルの陽イオン性脂質は、SPLP中に存在する陽イオン性脂質がエンドソーム中のすべての利用可能な陰イオン性脂質と併合するのに不十分で、したがって最大不安定化を達成するためには Ca^{2+} の付加的存在を要するので、 Ca^{2+} に対する感度増大に直接的に関連し得る。

【0185】

考察の最終トピックは、本明細書に示された結果を、*in vivo*でのトランスフェク

ション能力強化を示すSPLPの生成に拡張することに関する。他所で強調されているように(Wheeler, et al., Gene Therapy 6: 271 - 281 (1999); Zhang, et al., Gene Therapy 6: 1438 - 1447 (1999))、SPLP送達の好ましい方法は、全身性適用によるものであり、この場合、疾患部位、例えば腫瘍部位での長期循環寿命および蓄積が必要とされる。本発明の結果は、トランスフェクション強化を生じるために、 Ca^{2+} が好ましくはSPLPの外側にあることを示唆する。これを達成するために、SPLPへの Ca^{2+} キレート化剤の付着による漸増表面 Ca^{2+} 濃度を指す戦略は、*in vivo*トランスフェクション強化を生じる必要がある。さらに例えば高濃度のカルシウムとともにSPLPの局所的(例えば腫瘍内)送達により、あるいはトランスフェクションの所望部位へのカルシウムの局所送達と組合せたSPLPの全身性送達により、トランスフェクションの部位で、カルシウム濃度の局所的増大が生じ得る。

【0186】

実施例II：陽イオン性PEGを含有する安定化プラスミド-脂質粒子はトランスフェクション能力強化を示す

A. 材料と方法

1. 材料。DOPEは、Northern Lipids (Vancouver, BC)から入手した。Rh-DOPEおよびピコグリーンは、Molecular Probes (Eugene, OR)から入手した。DODACは合成し、且つInex Pharmaceuticals (Vancouver, BC)のS. Ansell博士から入手した。PEG-CerC₂₀は、他所に示されたように合成し(Webb, et al., Biochim. Biophys. Acta 1372: 272 - 282 (1998))、且つZ. Wang博士(Inex Pharmaceuticals Corporation, Burnaby, BC)により提供された。pCMVLucプラスミドは、ヒトCMV初期プロモーターの制御下でPhotinus pyralisルシフェラーゼ遺伝子をコードし、P. Tam博士(Inex Pharmaceuticals Corporation, Burnaby, BC)により提供された。pCMVGFPプラスミドは、Aequorea victoriaからのグリーン蛍光タンパク質に関する遺伝子を含有し、P. Tam博士(Inex Pharmaceuticals Corporation, Burnaby, BC)により提供された。DEAE-セファロースCL-6B、セファロースCL-4B、オクチル-D-ガラクトシドおよびHEPESは、Sigma-Aldrich (Oakville, ON)から入手した。リポフェクチンは、Gibco BRL (Burlington, ON)から入手した。BHK細胞は、R. MacGillivray博士(Department of Biochemistry and Molecular Biology, UBC)から入手した。

【0187】

2. SPLP-CPL₄の調製。それぞれ非封入プラスミドおよび空小胞を除去するために陰イオン交換(DEAE-セファロースCL-6B)クロマトグラフィーおよびスクロース密度勾配遠心分離による精製を用いて、Wheeler, et al. (Gene Therapy 6: 271 - 281 (1999))の方法にしたがって、DOPE:DODAC:PEG-CerC₂₀(84:6:10)からなり、プラスミドpCMVLuc(またはpCMVGFP)を含有するSPLPを調製した。脂質フィルムを生成する前に、83.5:10:6:0.5(DOPE:DODAC:PEG-CerC₂₀:Rh-PE)のモル比でCHCl₃中に他の構成成分脂質とともにRh-PEを溶解することにより、Rh-PEを含有するSPLPを調製した。

【0188】

別記しない限り、Hepes緩衝化食塩水(HBS)、pH7.5中で60で2~3時間、CPL₄(12.5、19および30nmol)とともにSPLP(500nmol脂質)をインキュベートすることにより、予備生成SPLP中にCPL₄を挿入した。H

B S 中で平衡させたセファロース C L - 4 B カラム上でのゲル濾過クロマトグラフィーにより、非組入れ C P L₄ を除去した。分画 (1 m l) を収集し、C P L₄、リン脂質および D N A 含量に関して検定した。3 つの構成成分すべてを含有する分画をプールし、濃縮した。それぞれ 1 0 および 2 0 n m の励起および発光スリット幅を有するパーキン - エルマー L S 5 2 発光分光光度計を用いて、 $e_x = 340$ n m での励起後、 $e_m = 510$ n m でのダンシル標識化 C P L の蛍光により、C P L₄ 含量を確定した。標準曲線は、H B S 中のダンシル化 C P L のストック溶液から得た。R h - P E を含有する S P L P に関しては、それぞれ 1 0 および 2 0 n m の励起および発光スリット幅を用いて、 $e_x = 560$ n m での励起後、 $e_m = 590$ n m で測定される R h 標識の蛍光から、リン脂質含量を確定した。R h 標識を含有しない S P L P に関しては、B l i g h a n d D y e r (C a n . J . B i o c h e m . P h y s i o l . 3 7 : 9 1 1 - 9 1 7 (1 9 5 9)) による脂質抽出後、F i s k e - S u b b a r o w (J . B i o l . C h e m . 6 6 : 3 7 5 - 4 0 0 (1 9 2 5)) の方法を用いて、リン脂質を測定した。前記のようなピコグリーン検定キット (M o k , e t a l . , B i o c h i m i c a e t B i o p h y s i c a A c t a 1 4 1 9 : 1 3 7 - 1 5 0 (1 9 9 9)) を用いて、プラスミドでなを確定した。

10

20

30

40

50

【 0 1 8 9 】

R h - P E 含有系に関しては、セファロースカラムの前にダンシル体ローダミン比をカラム後の比で割って 1 0 0 % を掛けることにより、C P L₄ の組入れを確定した。その他の系に関しては、C P L₄ 含量を総脂質含量で割って 1 0 0 を掛けることにより、組入れを確定した。

攪拌しながら 2 5 μ L の D O P E : D O D A C (0 . 8 m M) とともに 8 8 μ g / m L プラスミド D N A (p C M V L u c または p C M V G F P) 2 5 μ L を付加し、その後、細胞に付加する前に、室温で 3 0 分間インキュベートすることにより、1 . 5 : 1 (負対正) の電荷非で、リポプレックスを調製した。リポフェクチンリポプレックスを同様に調製した。

【 0 1 9 0 】

小胞方式で操作する N i c o m p モデル 2 7 0 サブミクロン整粒器を用いて、準弾性光散乱 (Q E L S) 試験を実施した。W h e e l e r 等 (上記) が記載したのと同様に、凍結 - 割断電子顕微鏡試験を実施した。

5 0 % マウス血清とともに S P L P 系をインキュベート後、フェノール : クロロホルム抽出を用いて、サザン分析用の D N A を抽出した。その結果生じた D N A を次に、1 % アガロースゲルを通して電気泳動処理し、ナイロン膜 (A m e r s h a m) に移して、サザン分析を施した。膜を、最新プロトコールによりルシフェラーゼ遺伝子からの無作為プライム化^{3 2} P - 標識 P v u I I 制限断片に曝露した。P h o s p h o r i m a g e r^{T M} S I (M o l e c u l a r D y n a m i c s) を用いてハイブリダイゼーション強度を定量した。データを、非消化 D N A に関して既定量の無傷 D N A に変換した。

【 0 1 9 1 】

N o r t h e r n L i p i d s , I n c . , V a n c o u v e r , B . C . により実施された H P L C 分析により、P E G - C e r C_{2 0} および D O P E のレベルを確定した。

3 . 取込みおよびトランスフェクション試験。すべての取込みおよびトランスフェクション試験に関してトランスフェクション前に、 1×10^4 細胞 / 9 6 ウエルプレート 1 ウエルの密度で B H K 細胞を一夜プレート化、形質転換化 B H K 細胞株 (t k⁻) を用いた。S P L P の細胞取込みを確定するために、1 2 ウエルプレートの各ウエルに 1×10^5 B H K 細胞を植え付けて、5 % C O₂ 中で 3 7 °C で、2 m l の完全培地 (1 0 % F B S を含有する D M E M) 中で一夜インキュベートした。4 0 m M C a C l₂ を含有する培地中の S P L P、S P L P - C P L₄、または 2 0 0 μ L の容積中の D O P E : D O D A C リポプレックスを、2 0 μ m の最終脂質用量で 8 0 0 μ L の完全培地と混合し、細胞に付加した。プラスミド D N A 濃度は、S P L P 系およびリポプレックスに関してはそれぞれ 1

・ $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ および $2.2 \mu\text{g}/\text{mL}$ に相当した。細胞を 37°C で指定時間インキュベートし、PBSで2回洗浄して、 $600 \mu\text{L}$ の溶解緩衝液 (PBS中の 0.1% トリトンX-100) で溶解した。それぞれ 10 および 10 nm のスリット幅で、 560 nm の e_x および 600 nm の e_m を用いて、ローダミン蛍光を確定した。 530 nm の発光物フィルターも用いた。溶解物中の蛍光を脂質標準の蛍光と比較することにより脂質取込みを確定し、それをBCAタンパク質検定 (Pierce, Rockford, IL) により確定される細胞数に対して標準化した。指示された場合、以下の明細でOmega Optical (Brattleboro, VT) からのローダミンフィルターを用いて、Axiovert 100 ツァイス蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss Jena GmbH) を用いて蛍光顕微鏡写真を撮った：励起 560 ± 20 / 二色性フィルター 590 / ロングパス発光 600 。 10

【0192】

以下の例外を伴って、前記と同様に、脂質取込みに及ぼす Ca^{2+} および Mg^{2+} の作用を調べた。 1 mL の完全培地中の 24 ウエルプレート中に、BHK細胞 (5×10^4 / ウエル) を植え付けて、 37°C で一夜インキュベートした。SPLP-CPL₄ (40 nmol) を総容積 $100 \mu\text{L}$ 中の CaCl_2 または MgCl_2 と混合した。完全培地 ($400 \mu\text{L}$) を SPLP-CPL₄ に付加して、最終陽イオン濃度を $4 \sim 14 \text{ mM}$ とした。次にこの混合物を細胞に付加し、 37°C で4時間インキュベートした。次に細胞をPBSで2回洗浄して、 $600 \mu\text{L}$ の溶解緩衝液 (PBS中の 0.1% トリトンX-100) で溶解した。 20

【0193】

別記しない限り、 $5\% \text{ CO}_2$ 中で 37°C で一夜のインキュベーション前に、 $150 \mu\text{L}$ 完全培地中の 96 ウエルプレートの各ウエル中にプレート化した 1×10^4 BHK細胞を用いて、トランスフェクション試験を実施した。 $20 \mu\text{L}$ HBS (SPLP) または 40 mM CaCl_2 含有する HBS (SPLP-CPL₄) 中の $0.5 \mu\text{g}$ の pCMVLuc に対応する SPLP および SPLP-CPL₄ を $80 \mu\text{L}$ の完全培地に付加して、プラスミド濃度を $5.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ とした。4時間のトランスフェクション時間ならびに24時間の総インキュベーション時間をルーチンに用いた。トランスフェクション時間は、細胞がプラスミド含有粒子とともにインキュベートされる時間と定義され、一方、総インキュベーション時間は、トランスフェクション時間 (この後、トランスフェクション培地が取り換えられる) + その後の、細胞が導入遺伝子発現に関して検定される前にインキュベートされる時間である。24時間後、 $100 \mu\text{L}$ の溶解緩衝液を用いて細胞を溶解し、 $40 \mu\text{L}$ の溶解物を 96 ウエル発光プレートに移した。ルシフェラーゼ反応キット (Promega, Madison, WI)、ルシフェラーゼ標準 (Boehringer-Mannheim) および ML3200 微小滴定プレート発光系 (Molecular Dynamics, Chantilly, VA) を用いて、ルシフェラーゼ活性を確定した。BCAタンパク質検定 (Pierce, Rockford, IL) により確定される細胞数に対して、活性を標準化した。 30

【0194】

トランスフェクション時間経過試験は、pCMVLucを含有するSPLP、SPLP-CPL₄ ならびにリポフェクチン (Gibco BRL, Burlington, ON) およびDOPE/DODACリポプレックスを包含した。前記と同様にリポプレックスを調製した。4、8および24時間のトランスフェクション時間後、トランスフェクション培地を除去し、4および8時間トランスフェクションの場合には、24時間の総インキュベーション時間の間、完全培地に取り換えた。24時間目に、全細胞を溶解し、前記と同様にルシフェラーゼ活性およびタンパク質含量 (BCA検定) に関して検定した。 40

【0195】

pCMVGFPを含有するSPLP-CPL₄、DOPE:DODACリポプレックスおよびリポフェクチンリポプレックスをpCMVLucに関して記載したのと同様に調製した。 $5.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ のプラスミドDNA用量で前記と同様に、トランスフェクションを 50

実施した。24および48時間試料をインキュベーション後、トランスフェクション培地を除去し、細胞を洗浄して、新鮮な培地を細胞に付加した。次に、ツァイス蛍光顕微鏡下で、細胞を観察した。以下の明細で、フルオレセインフィルター(Omega Optical)を用いて、GFPを発現する細胞の数を計数した：励起 475 ± 20 / 二色性フィルター 500 / 発光 535 ± 22.5 。トランスフェクション効率は、GFPを発現する細胞のパーセンテージとして表した。

【0196】

B. 結果

1. 陽イオン性PEG脂質は予備生成SPLP中に挿入され得る。 SPLPは、リボプレックスより低い細胞中への取込みおよびより低いトランスフェクション能力を示す、ということを経験的研究は示している(Mok, et al., Biochimica et Biophysica Acta 1419: 137-150 (1999))。表面関連陽イオン性PEG脂質(CPL)、特にPEG分子の末端に4つの電荷を含有するもの(CPL₄; 構造に関しては、図8A参照)は、細胞中へのLUVの取込みを劇的に強化し得る。さらにCPLは、簡単なインキュベーションプロトコルを用いて、SPLPと同様に脂質組成物とともに予備生成LUV中に挿入され得る。したがって、SPLP中にCPL₄を挿入するために同様の手法が開発され得るか、否かを調べた。6mol%の陽イオン性脂質N,N-ジオレイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロリド(DODAC)、84mol%の「フソゲニック」ヘルパー脂質ジレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)およびセラミド(Cer)アンカーに結合されたPEG₂₀₀₀から成る10mol%の安定化脂質(PEG-Cer)を含有する脂質混合物から、Wheeler, et al. (Gene Therapy 6: 271-281 (1999))の洗剤透析手法により、pCMVLucを含有するSPLPを調製した。PEG-Cerのセラミドアンカーは、商法から容易に交換せず、したがって高安定性SPLP系に寄与するCアシル鎖(PEG-CerC₂₀)を含有した(Wheeler, et al., Gene Therapy 6: 271-281 (1999))。洗剤透析法は、1プラスミド/小胞、遊離プラスミドおよび空小胞を含有するSPLPの混合物を生成した。他所に記載されているように(Wheeler, et al., Gene Therapy 6: 271-281 (1999))、それぞれDEAEカラムクロマトグラフィーおよび密度遠心分離により、遊離プラスミドおよび空小胞を除去することにより、SPLPを精製した。

【0197】

予備生成SPLP中へのCPL₄の後挿入に関する手法は、図8Bに説明されている。精製SPLPを、60°Cで3時間まで、CPL₄(~5mol%)とともにインキュベートし、次にカラムクロマトグラフィーにより非組入れCPL₄から分離した。図9に示したように、これは、利用可能な80%までのCPL₄のSPLPとの会合を生じ、これはSPLP-CPL₄系中の総脂質の4mol%に対応する。

【0198】

2. SPLP-CPL₄はCPL₄の挿入後に凝集し、二価陽イオンの付加後に脱凝集する。 CPLを含有するLUVは凝集する傾向があり、そしてこの凝集は培地のイオン強度を増大することにより抑制され得る、ということを経験的研究は示している。SPLP-CPL₄も凝集を受けやすく、そしてこの凝集はNaCl、CaCl₂またはMgCl₂をSPLP-CPL₄処方物に付加することにより逆転され得る、ということが判明した。この作用は、図10に説明されており、これは、準弾性光散乱(QELS)により測定される粒子の平均直径の標準偏差における変化によりモニタリングした場合のSPLP-CPL₄の凝集に及ぼすCaCl₂およびMgCl₂の付加の影響を示している。両陽イオンに関しては、標準偏差は陽イオン濃度の増大に伴って低減し、最適脱凝集は約30mMより上で起こる。この行動は、凍結-割断電子顕微鏡によっても可視化され得る。図11Aに示したように、SPLPの凍結-割断電子顕微鏡写真は小単一分散粒子を明示するが、一方、CaCl₂の非存在下で調製されたSPLP-CPL₄は高度に凝集される(図1

1 B)。図 1 1 C に示したように、40 mM CaCl₂ の付加は、この凝集を逆転して、SPLP 調製物と同様に単一分散粒子を生成する。

【0199】

QELS および凍結切断電子顕微鏡を用いて、CaCl₂ 存在下での SPLP および SPLP-CPL₄ のサイズを比較した。QELS 試験は、SPLP および SPLP-CPL₄ の平均直径がそれぞれ 80 ± 19 nm および 76 ± 15 nm であることを明示し、一方凍結切断試験は、68 ± 11 nm および 64 ± 14 nm の直径を示した。SPLP 直径に関するこれらの値は、従来の研究と密接に一致する (Wheeler, et al. (Gene Therapy 6: 271 - 281 (1999)))。

【0200】

3. PEG-CerC₂₀ 含量および SPLP-CPL₄ の安定性。CPL₄ が挿入されて、4 mol% という高いレベルの総 SPLP 脂質を達成し得るという観察は、SPLP-CPL₄ の外側単一層中の CPL₄ のレベルが 8 mol% であることを示す。PEG-CerC₂₀ の初期濃度が 10 mol% であるとする、これは、SPLP-CPL₄ の外側単一層中の PEG-脂質の総レベルが約 18 mol% になることを示唆する。これらのレベルは、脂質小胞中に通常組み入れられ得る PEG-脂質のレベルより高く (Woodle, et al., Biochim. Biophys. Acta 1113: 171 - 199 (1992))、CPL₄ として取り換えられる外側単一層中の PEG-CerC₂₀ のいくつかは挿入されたという可能性を生じる。これは、HPLC を用いて CPL₄ の挿入の前および後に SPLP に関して PEG-CerC₂₀ 対-DOPE の比を測定することにより調べた。前記のように CPL₄ を SPLP 中に挿入した。非組み入れ物質の除去後の分析は、4 mol% CPL₄ (総 SPLP 脂質に対して標準化) が SPLP 中に挿入されたことを確定した。CPL₄ の挿入前は、PEG-CerC₂₀ 対-DOPE 比は 0.091 で、7.6 mol% の PEG-CerC₂₀ 含量に対応し、DOPE が脂質含量の 84 mol% を構成すると想定された。CPL₄ の挿入後、PEG-CerC₂₀ 対-DOPE 比は 0.072 であると判明し、6.0 mol% の PEG-CerC₂₀ 含量を示した。CPL₄ の挿入中に SPLP から失われる PEG-CerC₂₀ のすべてが外側単一層から失われると仮定すると、これは、挿入過程に外側単一層の PEG-CerC₂₀ 含量画 7.6 mol% から 4.4 mol% に低減することを示す。SPLP-CPL₄ の外側単一膜中の総 PEG-脂質含量は、次に外側単一層脂質の 12.4 mol% であると概算し得る。

【0201】

50% マウス血清中で 4 時間までのインキュベーション後の SPLP および SPLP-CPL₄ の安定性は、図 1 2 で説明されている。すべての場合、封入プラスミド DNA は血清分解から完全に保護された。これに対比して、リポプレックス中のプラスミドの本質的に完全な分解が、血清中でインキュベーションの 30 分以内に観察された。

【0202】

4. SPLP-CPL₄ は BHK 細胞中への取込み強化およびトランスフェクション能力の劇的強化を示す。次の組の実験は、BHK 細胞中への SPLP の取込みに及ぼす組入れ CPL の影響およびその結果生じる SPLP-CPL₄ 系のトランスフェクション能力を確定することを目指した。4 mol% までの CPL₄ を含有する SPLP を 40 mM CaCl₂ の存在下で調製し、BHK 細胞に付加し (最終 CaCl₂ 濃度 8 mM)、種々の時間の間インキュベートした。次に、前記の材料と方法に示したように、会合 SPLP-CPL₄ に関して細胞を検定した。図 1 3 A に示したように、CPL₄ を含有しない SPLP の取込みは、8 時間のインキュベーション後でさえ最小であるが、しかし 3 mol% またはそれ以上のレベルの CPL₄ を含有する SPLP に関しては、取込みは劇的に改善される。例えば 4 mol% の CPL₄ を含有する SPLP は、CPL の非存在下での SPLP に関して達成された値の約 50 倍より高い蓄積レベルを 8 時間で示す。この取込み強化は、図 1 3 B に可視的に説明されており、これはローダミン標識化 SPLP および SPLP-CPL₄ とともに 4 時間インキュベーション後の BHK 細胞の蛍光顕微鏡写真を示し

10

20

30

40

50

ている。前期の材料と方法に記載されたトランスフェクションプロトコルを用いて、SPLP、SPLP-CP₄ およびプラスミドDNA-陽イオン性リポソームリポブックス(DODAC/DOPE; 1:1)のトランスフェクション特性を調べた。このプロトコルは、SPLPまたはリポブックスとともにBHK細胞を4時間(トランスフェクション時間)インキュベートし、その後培地を取り換えて、さらにインキュベートして導入遺伝子発現を最大にすることを包含する。総インキュベーション時間(トランスフェクション時間+培地交換後のインキュベーションの時間)を24時間で一定に保持した。図14に示したように、漸増量のCP₄の存在は、SPLP系に関するトランスフェクション能力の劇的増大を生じた。4mol%CP₄を含有するSPLP-CP₄は、SPLPを用いて達成されたよりも多少高い 3×10^3 のルシフェラーゼ発現レベルを示した。

【0203】

5. Ca^{2+} はSPLP-CP₄のトランスフェクション活性に必要とされる。上記の実施例1は、SPLPのトランスフェクション能力が Ca^{2+} の存在に対して高度に感受性であることを実証しており、この場合、 ~ 10 mMの Ca^{2+} の存在がトランスフェクション能力を数百倍に強化する。したがって、SPLP-CP₄のトランスフェクション活性に及ぼす Ca^{2+} の影響を確定することは興味深いことであった。4mol%CP₄を含有するSPLPをBHK細胞とともに48時間、種々の量のMgCl₂およびCaCl₂の存在下でインキュベートし、ルシフェラーゼ活性を確定した。図15に示したように、トランスフェクション活性は主に、トランスフェクション培地中の Ca^{2+} の存在によっていた。10 mMの最適CaCl₂濃度では、SPLP-CP₄は、対応する量のMgCl₂が存在した場合よりも 10^5 倍より高いトランスフェクション能力を示した。

【0204】

Ca^{2+} またはMg²⁺の存在下でのSPLP-CP₄の異なるトランスフェクション特性が細胞中への取込みの差により説明され得るか否かを調べるために、MgCl₂またはCaCl₂の存在下で4時間インキュベーション後に、BHK細胞中へのSPLP-CP₄の蓄積をモニタリングした。図16に示したように、BHK細胞中へのSPLP-CP₄の取込みは、 Ca^{2+} およびMg²⁺の両方に関して同一である。 Ca^{2+} またはMg²⁺取り込みは、おそらくはBHK細胞の表面の負荷電CP₄結合部位が覆われるために、二価陽イオンの濃度が増大するとわずかに低減する、ということが留意され得る。これらの結果は、 Ca^{2+} がSPLPの細胞取込みにほとんど影響を及ぼさないことを示す従来の研究と一致する。

【0205】

SPLP-CP₄は、リポブックスのトランスフェクション能力に匹敵するかまたはそれ以上であるトランスフェクション能力を*in vitro*で示す。図14に示したデータは、4時間の間BHK細胞に適用した場合に、SPLP-CP₄より ~ 100 倍高いレベルの遺伝子発現をDOPE/DODACリポブックスが生じることを示す。SPLP-CP₄が安定系であるとする、取り込みは長時間にわたっておそらくは継続し得る。したがってSPLP-CP₄またはリポブックスが4、8および24時間のトランスフェクション時間の間、BHK細胞に適用された場合に達成されるトランスフェクションレベルを調べた。2つの型のリポブックス、即ちDOPE:DODAC(1:1)リポブックス(電荷比1.5)、ならびにトランスフェクション試薬リポフェクチンを用いて生成され、電荷比1.5のDOPE/DOTMA(1:1)リポブックスから成るリポブックスを用いた。図17に示したように、SPLP-CP₄の能力はトランスフェクション時間の増大に伴って顕著に増大し、これは、SPLP-CP₄系の取込み率がトランスフェクションに関する限定因子であり得ることを示唆する。トランスフェクション期間直後にルシフェラーゼ発現に関して細胞が検定される24時間トランスフェクション時間に関しては、トランスフェクションレベルはリポフェクチンまたはDOPE/DODACリポブックスにより達成されるものに匹敵する。

【0206】

さらなる実験を実施して、SPLP-CPL₄ およびリポプレックスを用いた24および48時間のトランスフェクション時間後のトランスフェクションレベルを確定したが、この場合、ルシフェラーゼ活性はトランスフェクション期間直後に検定した。図18Aに示したように、リポフェクチン(DOPE:DOTMA)リポプレックスの活性は24時間後に~2000 ngルシフェラーゼ/細胞タンパク質1gに横ばいになった。同様の結果が、DOPE:DODACリポプレックスに関して得られた。これに対比して、SPLP-CPL₄ 処方物の活性は、インキュベーション時間が増大すると、増大し続けて、48時間で4000 ng/細胞タンパク質1mgに対応するルシフェラーゼ発現レベルに達した。この活性は、SPLP(Ca²⁺非存在下)に関して観察されたよりも約10⁶倍高く、リポフェクチンリポプレックスにより達成されたレベルのほぼ2倍であった。

【0207】

6. SPLP-CPL₄ は非毒性且つ効率的トランスフェクション剤である。リポプレックスが細胞に対して毒性であり得る、ということは周知である。SPLP-CPL₄ は低レベルの陽イオン性脂質を含有し、おそらくはリポプレックスより低毒性である。それぞれSPLP-CPL₄ およびリポプレックスに関して約80 μmおよび45 μMの総脂質量に対応する、5.0 μg/mLのプラスミドに対応するSPLP-CPL₄ およびリポプレックスのレベルに24および48時間曝露後の細胞生存可能性を確定することにより、SPLP-CPL₄ およびリポプレックスの毒性を検定した。図18Bに示したように、SPLP-CPL₄ は補ドン度毒性を示さなかったが、一方リポプレックスは高毒性であった。細胞生存率は、リポフェクチンリポプレックスとともに48時間インキュベーション語には30%に過ぎなかったが、一方、SPLP-CPL₄ とともに48時間インキュベーション後には~95%の細胞が生育可能であった。

【0208】

SPLP-CPL₄ によりトランスフェクトされた細胞の割合により示されるようなトランスフェクションの効率を確定するための試験も実施した。グリーン蛍光タンパク質(GFP)遺伝子を含有するプラスミドを用いて、トランスフェクト化細胞の割合を確定した。蛍光顕微鏡により、GFP発現を検出した。図19Aおよび19Bに示したように、24時間で約35%の細胞、そして48時間で50%の細胞がSPLP-CPL₄ によりトランスフェクトされ、見かけの細胞死は認められなかった。これに対比して、リポフェクチンリポプレックスは、35%未満の最大トランスフェクション効率を示し、24時間トランスフェクション時間語の細胞生存率は~50%に過ぎなかった(図19C)。同様の低トランスフェクション効率および高毒性は、DOPE:DODACリポプレックスを用いても観察された。

【0209】

C. 考察

これらの結果は、SPLP中へのCPL₄ の組入れがBHK細胞中への取込み改善を生じ、そしてCa²⁺が存在する場合のSPLPのトランスフェクション能力を劇的に強化することを実証する。興味深い3つの点が認められる。第一は、SPLP-CPL₄ 系の化学組成および構造、ならびにSPLPの栄養機能およびトランスフェクション能力を改質するための後挿入手法の一般性に関する。第二は、SPLPの取込み強化、Ca²⁺の存在および観察されるトランスフェクション活性の間の関連に関する。最後に、SPLP-CPL₄ 系の特性をリポプレックスと比較するのは興味深い。これらの領域の各々を、以下で順次取り扱う。

【0210】

ここに示された結果は、60 μmでのインキュベーションを含めた簡単な方法を用いて、陽イオン性PEG脂質CPL₄ が予備生成SPLP中に挿入され得ることを実証する。例えばSPLP外側単一層中の総脂質の約8mol%に相当するレベルにCPL₄ を挿入する能力は、同様のインキュベーションプロトコールを用いてPEG-PEが予備生成LUV中に挿入されて、循環寿命延長を示す系を生じ得ることを実証する他の研究者の結果と一

致する (Uster, et al., FEBS Lett. 386:243-246 (1996))。それは、SPLP系と同様に脂質組成物を含有する予備生成LUV中にCPL₄が挿入され得ることを示す従来の結果とも一致する。外側単一層中で達成されるPEG-脂質の総レベル(12.4mol%)は、LUV中へのPEG-脂質の組入れの最大レベルが一般に7~10mol%である場合より高い(Woodle, et al., Biochim. Biophys. Acta 1113:171-199 (1992))。しかしながら、PEG-脂質は、溶解作用が観察される前に15mol%という高いレベルまでLUV中に組入れられうる、と多数の著者が報告している(Edwards, et al., Biophys. J. 73:258-266 (1997); Kenworthy, et al., Biophys. J. 68:1903-1920 (1995); Hristova, et al., Macromolecules 28:7693-7699 (1995))。これらは、構造変化(球から円板への)が、12mol%より高いPEG-PEレベルでジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)リポソームに関してのみ観察され、溶解作用は15mol%より上で観察された冷却電子顕微鏡試験を包含する(Edwards, et al., Biophys. J. 73:258-266 (1997))。同様に、X線試験は、非二重層ミセル構造が15mol%より上のPEG-脂質レベルに関して観察されるだけであることを示す(Kenworthy, et al., Biophys. J. 68:1903-1920 (1995); Hristova, et al., Macromolecules 28:7693-7699 (1995))。

【0211】

SPLP-CPL₄系がCPL₄の挿入後に凝集する傾向は、CPL₄を含有するLUVも凝集する従来の観察と一致する。この凝集の理由は一般に理解されていないが、しかし2つの一般的指摘がなされ得る。第一に、相互作用はおそらくは、高イオン強度での凝集が抑制されるとすると、小胞間の静電的相互作用によるものと思われる。第二に、凝集は後挿入過程それ自体の結果ではなく、そういうものとして、凝集はCPL₄を含有するLUVに関して観察され、この場合、CPL₄はLUVが生成された脂質混合物中に存在した。陽イオン性頭基は、リン脂質ホスフェート基のレベルで対向する膜と相互作用する、ということもあり得る。あるいは、凝集現象は、ストレプタビジンのようなタンパク質を結合し得る配座を採用するPEGコーティングの能力に関連し得る(Sheth, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:8399-8404 (1997))。

【0212】

考察の第二点は、CPL₄がSPLP系のトランスフェクション能力を増大するメカニズムに関する。リポプレックス系に含入される陽イオン性脂質は細胞中への取込みを刺激する場合に直接的役割を演じる(Miller, et al., Biochemistry 37:12875-12883 (1998))ということ、そしてこの取り込みがリポプレックス上の正電荷のために起こる(van der Woude, et al., Biochim. Biophys. Acta 1240:34-40 (1995))ということ、を多数の研究が示している。細胞表面のヘパリンスルホン化プロテオグリカンはこの過程において主要な役割を演じる、ということが示唆された(Misllick, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:12349-12354 (1996); Mounkes, et al., J. Biol. Chem. 273:26164-26170 (1998))。CPL₄の付加後のSPLPの取込み強化は、Ca²⁺の類似の付加的存在によるものであり得るが、トランスフェクション能力の増大はCa²⁺の付加的存在に大いによっている。実施例Iは、Ca²⁺の存在が~600倍のSPLPトランスフェクション能力の増大を生じ得ることを、そしてこの増大が、取込み増大に起因するというよりむしろ、取込み後のエンドソーム膜の不安定化に役立つCa²⁺の能力に起因することを示す。したがって、SPLPを上回るSPLP-CPL₄に関するトランスフェクション能力の観察された改善は、Ca²⁺の存在により

エンドソーム膜を不安定化する能力増強と結び付けられたCPL₄により媒介される取り込みの改善に起因すると言える。この点に関しては、SPLP-CPL₄ (Ca²⁺存在下)のトランスフェクション能力は、Ca²⁺非存在下でのSPLPのトランスフェクション能力と比較して、~10⁴ (図14)の一因子により増大される。これは、4mol% CPLの存在により約50倍に(図13A、4時間インキュベーション)、Ca²⁺の存在による~600の一因子を掛けたBHK細胞中へのSPLPの取り込み増大により説明され得る。

【0213】

最後の考察領域は、他の非ウイルスベクターを上回るSPLP-CPLの利点に関するもので、これは、SPLP-CPL₄系の十分に限定されたモジュール性、ならびに毒性および能力問題を包含する。第一に、不良限定数のプラスミド/粒子を含有する大型、不均質、不安定系である他の非ウイルス系、例えばリポプレックスに対比して、SPLP-CPL₄は、1プラスミド/粒子を含有する小型で、均質な、安定系である(Wheeler, et al., Gene Therapy 6:271-281(1999))。重要な点は、SPLPが、モジュール様式で構築され得る、SPLP-CPL₄のようなより洗練された系の基本構成成分である点である。例えばCPLの陽イオン性基の代わりに特異的ターゲティングリガンドを含有するPEG-脂質の後挿入は、特定の細胞および組織に対して特異的に標的化されるSPLPを生じる必要がある。毒性に関しては、SPLP-CPL₄は、リポプレックスよりも、組織培養中のBHK細胞に対して顕著に低毒性である。これはおそらく、リポプレックスと比較した場合、SPLP中に含入される低比率の陽イオン性脂質に関連する。最後に、CPL₄またはCa²⁺を伴わないSPLPは、プラスミドDNA-陽イオン性脂質複合体または裸プラスミドDNAのトランスフェクション特性よりもすでに優れている全身投与後の*in vivo*トランスフェクション特性を示す。ここに示した結果は、細胞中へのSPLP取込みを促すリガンドの使用により、そしてCa²⁺濃度の局所的増大をもたらす方法により、さらに有意の利益が予測され得ることを示唆する。

【0214】

要するに、ここに示した結果は、陽イオン性PEG脂質がSPLP中に後挿入されて、*in vitro*でBHK細胞中への取り込み改善を示す十分限定されたSPLP-CPL₄系を生じ得ることを実証する。Ca²⁺の存在下では、SPLP-CPL₄系は、Ca²⁺の非存在下でのSPLPと比較した場合、10⁶倍まで増大されるトランスフェクション能力を生じる。これらの結果は、細胞中への取込み後、SPLP系が非毒性、高トランスフェクション効力存在であることを示し、そしてエンドサイトーシスを受ける細胞表面リガンドに対して標的化されるSPLPが*in vivo*でのトランスフェクション能力の有意の強化をもたらすことを示す。

【0215】

本明細書中に記載された実施例および実施態様は説明のためだけのものであり、そしてそれにかんがみて種々の修正または変更が当業者に示唆され、本出願の精神および範囲内に、ならびに添付の特許請求の範囲内に含まれるものである、と理解されるべきである。本明細書中に引用された出版物、特許および特許出願はすべて、それらの記載内容が参照により本明細書中に含まれる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

SPLPトランスフェクションに及ぼすCa²⁺の作用および特異性。漸増濃度のCaCl₂ (○)、MgCl₂ (黒四角)またはNaCl (黒三角) (0~14mM)を、細胞へのそれらの付加前にSPLP中で滴定した。SPLP (DODAC/DOPE/PEG-CerC20; 7:83:10 mol/mol/mol)小胞中に封入された0.5 μgのpCMVLucプラスミドを用いて、1 x 10⁴細胞/96ウエルプレートの1ウエルでプレート化された細胞をトランスフェクトした。実施例Iの材料と方法に記載したように細胞をSPLPとともに24時間インキュベートし、Luc活性を測定した。実

10

20

30

40

50

験はすべて、三重反復試験で実施した。

【図2】

SPLPの細胞取込みに及ぼす Ca^{2+} の作用。0.5 mol% Rd-標識化DOPE (DODAC/DOPE/PEG-CerC20/Rh-DOPE; 7:82.5:10:0.5 mol/mol/mol/mol)を含有するSPLPを用いて、細胞脂質取込みをモニタリングした。 Ca^{2+} (0~14 mM)の存在下で調製された80 nmolの脂質小胞を、適切な時間まで、細胞上でインキュベートした。実施例Iの材料と方法に記載したように4時間()、8時間(黒四角)または24時間(黒三角)でのRd蛍光を測定することにより、脂質取込みレベルを確定した。実験はすべて、三重反復試験で実施した。

10

【図3】

SPLPの細胞局在化。4 mol% Rh-DOPE標識化小胞100 nmolを、カルシウム(10 mM)の非存在下(A)または存在下(B)で細胞(1×10^5 細胞/12ウエルプレートの1ウエルでプレート化)上でインキュベートした。8時間時点で、トランスフェクト培地を完全DMEM培地と置き換えて、蛍光顕微鏡を用いて細胞を検査した。以下の明細でOmega Opticals (Brattleboro, VT)からのローダミンフィルターを用いて、Axiovert 100ツァイス蛍光顕微鏡(Carl Zeiss Jena GmbH)で蛍光顕微鏡写真を撮った： $e_x = 560 \pm 20$ nm、600 nm LPおよびDC590 nm。

20

【図4】

プラスミドDNAの細胞内プロセッシングは、Caの存在の影響を受けた。実施例Iの材料と方法に記載したように、2.5 μ g プラスミドDNAを含有するSPLPを用いて、8 mM Ca^{2+} の非存在下()または存在下(黒四角)でBHK細胞をトランスフェクトした。適切な時点(2時間、4時間および8時間)で、細胞からDNAを抽出し、特異的 ^{32}P -標識化プラスミドDNAプローブとのハイブリダイゼーションにより細胞内DNAを検出した。(A)材料と方法に記載したようなドットプロット分析により確定されるプラスミドDNA取込みのレベル。(B)サザンプロット分析により確定される細胞内プラスミドDNAの完全性。レーン1および11: pCMV Luc対照; レーン2、5、8および12; 非トランスフェクト化対照; レーン3、6、9および13: SPLPでトランスフェクトされた細胞; レーン4、7、10および14: SPLPおよび8 mM Ca^{2+} でトランスフェクトされた細胞; ならびにレーン15: SPLPおよび8 mM Mg^{2+} でトランスフェクトされた細胞。実験はすべて、三重反復試験で実施した。

30

【図5】

$CaCl_2$ の存在下での種々のモデル膜の ^{31}P NMRスペクトル。(A) Ca^{2+} を、0:1~0.5:1(モル比)の範囲の Ca^{2+} /DOPS比で小胞(DOPE/DOPS/DOPC/Chol、1:1:1:3)中で滴定した。(B) Ca^{2+} を、0:1~0.25:1(モル比)の範囲の Ca^{2+} /DOPS比で小胞(DOPE/DOPS/DOPC/Chol/DODAC、1:1:1:3:0.25)中で滴定した。3サイクルの凍結-解凍により、脂質二重層を横断する陽イオンの平衡を保証した。スペクトルを同一ピーク高に釣り合いを取った。実施例Iの材料と方法に記載したように実験を実行した。

40

【図6】

トランスフェクションに及ぼす Ca^{2+} 含有SPLPの作用。材料と方法に記載したように、pH勾配の存在下でA23187を用いて Ca^{2+} を負荷した。漸増濃度の Ca^{2+} (0~14 mM)を、DMEM希釈前にSPLP(黒四角)および Ca^{2+} 含有SPLP()の両方に付加した。SPLP中に封入された0.5 μ gのpCMV Lucプラスミドを用いて、 1×10^4 細胞/96ウエルプレートの1ウエルでプレート化された細胞をトランスフェクトした。実施例Iの材料と方法に記載したようにLuc活性を測定した。実験はすべて、三重反復試験で実施した。

【図7】

50

改良型 S P L P 系に及ぼす Ca^{2+} の作用。より高い D O D A C 含量 (1 4 m o l %) または C P L (4 m o l %) を含有する S P L P を用いて、8 m M C a の存在下 (斜線バー) または非存在下 (白バー) で細胞をトランスフェクトした。0 . 5 μ g の p C M V L u c を、各トランスフェクション実験における各処方物中に用いた。実施例 I の材料と方法に略記したように、L u c 発現に関して検定する前に、細胞を小胞に 2 4 時間曝露した。実験は三重反復試験で実施した。

【図 8】

S P L P - C P L₄ の生成。A . ダンシル化 C P L₄ の構造。C P L₄ は、脂質アンカー、D S P E に結合された P E G_{3 4 0 0} 分子の末端に 4 つの正電荷を保有する。B . 予備生成 S P L P 中への C P L₄ の挿入のためのプロトコール。S P L P および C P L₄ を 6 0 で 3 時間一緒にインキュベートし、セファロース C L - 4 B カラムクロマトグラフィーを用いて非混入 C P L₄ を除去する。さらなる詳細に関しては、実施例 I I の材料と方法を参照されたい。

10

【図 9】

6 0 での S P L P 中への C P L₄ の挿入に関する時間経過。ダンシル化 C P L₄ (0 . 3 μ m o l) を、1 . 5 m L の総容積中に 3 6 0 μ g の p C M V L u c を含有する 6 μ m o l の D O P E : P E G - C e r C_{2 0} : D O D A C : R h - P E (8 3 . 5 : 1 0 : 6 : 0 . 5 ; m o l %) から成る S P L P に付加し、6 0 でインキュベートした。混合物のアリコート (2 5 0 μ L) を指示された時点で採取して、セファロース C L - 4 B カラムクロマトグラフィーを用いて非取込み C P L₄ を除去した。実施例 I I の材料と方法に記載したように、C P L₄ 混入を確定した。

20

【図 1 0】

C P L₄ の後挿入の S P L P の脱凝集に及ぼす陽イオン濃度の作用。実施例 I I の材料と方法に記載したように、S P L P を調製し、4 m o l % C P L₄ を挿入した。漸増濃度の Ca^{2+} () および Mg^{2+} (黒四角) の存在下での S P L P - C P L₄ の平均直径および平均直径の標準偏差を、Q E L S により確定した。5 0 0 m M ストック溶液からの C a C l₂ または M g C l₂ を S P L P - C P L₄ に付加した (4 0 0 l 中 1 8 0 n m o l) 。 Ca^{2+} または Mg^{2+} の付加は、約 3 0 m M の陽イオン濃度での平均直径の標準偏差の低減により示されるように、より単分散性調製物を生じる。

30

【図 1 1】

(A) S P L P 、 (B) S P L P - C P L₄ および (C) 4 0 m M C a C l₂ の存在下での S P L P - C P L₄ の凍結 - 切断電子顕微鏡写真。S P L P - C P L₄ は実施例 I I の材料と方法に記載したように調製され、そして 4 m o l % C P L₄ を含有した。プレート A のバーは、2 0 0 n m に相当する。

【図 1 2】

封入プラスミドのサザン分析により検定した場合の S P L P - C P L₄ の血清安定性。図 9 に対する凡例に示したように S P L P を調製し、後挿入プロトコールを用いて 4 m o l % の C P L₄ を挿入した。5 0 % マウス血清の存在下で 3 7 で指示時間の間、5 μ g p C M V L u c を含有する S P L P - C P L₄ をインキュベートし、1 μ g のプラスミド D N A に対応する混合物のアリコートを取り出し、プラスミド D N A を抽出し、材料と方法に記載したようにサザン分析に付した。レーン 1 ~ 4 は、それぞれ 0、1、2 および 4 時間インキュベーション時間後の裸プラスミド D N A の行動を示し；レーン 5 ~ 8 は、0、1、2 および 4 時間インキュベーション時間後の S P L P から抽出されたプラスミドの行動を示し；そしてレーン 9 ~ 1 2 は 0、1、2 および 4 時間インキュベーション時間後の 4 m o l % C P L₄ を含有する S P L P から抽出されたプラスミド D N A の行動を示す。

40

【図 1 3 A】

B H K 細胞中への S P L P - C P L₄ の取込みに及ぼす S P L P 中に混入された C P L₄ の量の影響。0 ()、2 (黒四角)、3 (黒三角) または 4 () m o l % C P L₄ を含有する S P L P の取込みを調べた；比較のために、D O P E : D O D A C リポプレックス () の取込みを示す。S P L P 中への C P L₄ の挿入およびリポブラックスの調製を

50

、実施例 I I の材料と方法に記載したように実施した。S P L P - C P L₄ 培地は、凝集を防止するために 40 m M の C a C l₂ を含有し、B H K 細胞の付加は、8 m M への C a C l₂ 濃度の希釈を生じた。取込みプロトコールは、10 % F B S を含有する D M E M 中の 10⁵ B H K 細胞を伴う S P L P - C P L₄ のインキュベーションを包含した。インキュベーション後、細胞を溶解し、実施例 I I の材料と方法に記載したようにローダミン - P E の取込みを測定した。

【図 13 B】

4 時間インキュベーション後の S P L P (パネル I) および 4 m o l % C P L₄ を含有する S P L P (パネル I I) の取込み後の B H K の蛍光顕微鏡写真。左の顕微鏡写真は位相差方式で、そして右の写真は (ローダミン) 蛍光方式で撮影した。

10

【図 14】

種々の量の C P L₄ を含有する S P L P によるトランスフェクション後の B H K 細胞中のルシフェラーゼ発現。後挿入法を用いて 2、3 および 4 m o l % C P L₄ を含有する S P L P を調製した。実施例 I I の材料と方法に記載したように、4 時間のトランスフェクション時間および 24 時間の完全インキュベーション時間を用いて、5.0 μ g / m L p C M V L を含有する S P L P、S P L P - C P L₄ および D O P E : D O D A C (1 : 1) リポプレックスで B H K 細胞 (10⁴) をトランスフェクトした。培地での希釈および B H K 細胞への付加後の S P L P - C P L 含有系中の C a C l₂ 濃度は 8 m M であった。トランスフェクション後、材料と方法に記載したように細胞を溶解し、ルシフェラーゼおよび B C A 検定を実施した。

20

【図 15】

S P L P - C P L₄ のトランスフェクション能力に及ぼす C a²⁺ () および M g²⁺ (黒四角) の影響。実施例 I I の材料と方法に記載したように、後挿入法により、4 m o l % C P L₄ を含有する S P L P - C P L₄ を調製した。漸増濃度の C a C l₂ または M g C l₂ を S P L P - C P L₄ (5.0 μ g p C M V L u c / m L) に付加し、B H K 細胞に移して、10 % F B S を含有する D M E M 中で 48 時間インキュベートした。次に細胞を溶解し、実施例 I I の材料と方法に記載したように、ルシフェラーゼ活性およびタンパク質含量を測定した。

【図 16】

B H K 細胞による S P L P - C P L₄ の取込みに及ぼす C a²⁺ () および M g²⁺ (黒四角) の作用。図 8 に関して示したように陽イオン濃度の増大により S P L P - C P L₄ を調製し、10 % F B S を含有する D M E M 中で 4 時間、B H K 細胞 (~ 80 m 脂質 および ~ 5.0 μ g p C M V L u c / m L / ウエル) とともにインキュベートした。次に細胞を溶解し、実施例 I I の材料と方法に記載したように、S P L P - C P L₄ 含量 (R h - P E 脂質標識により示されるような) および細胞タンパク質を測定した。

30

【図 17】

S P L P、S P L P - C P L₄ およびリポプレックスに関するトランスフェクション時間の関数としての B H K 細胞中のルシフェラーゼ発現。後挿入法により、4 m o l % C P L₄ を含有する S P L P - C P L₄ を調製した。D M E M および 10 % F B S 中の B H K 細胞を、4、8 および 24 時間のトランスフェクション時間および 24 時間の総インキュベーション時間を用いて、S P L P、S P L P - C P L₄ およびリポプレックス (5.0 μ g / m L p C M V L) とともにインキュベートした。次に、ルシフェラーゼ活性およびタンパク質含量に関して細胞を検定した。S P L P - C P L₄ ()、S P L P (黒逆三角)、D O P E : D O D A C リポプレックス (黒四角) およびリポフェクチンリポプレックス () でのトランスフェクション後のルシフェラーゼ活性を、トランスフェクション時間の関数としてプロットした。リポプレックスを、1.5 : 1 の投入比で調製した。

40

【図 18】

A . B H K 細胞によるトランスフェクション時間延長後の 4 m o l % C P L₄ を含有する S P L P - C P L₄ () およびリポフェクチンリポプレックス () のトランスフェクション能力。S P L P - C P L₄ およびリポプレックスを、図 10 に示したように生成し

50

た。10% FBSを含有するDMEM中で24および48時間、BHK細胞をトランスフェクトしたが、SPLP-CP_{L4}およびリポフェクチンリポプレックス(投入比1.5:1)は5.0 μg/pCMVLuc 1 mLを含有した。トランスフェクション後、細胞溶解物中で、ルシフェラーゼ発現レベルおよび細胞タンパク質レベルを測定した。溶解物中のタンパク質含量に関してルシフェラーゼ活性を正規化し、トランスフェクション時間の一関数としてプロットした。

B. 細胞溶解物中のタンパク質濃度に基づいた細胞生存により検定した場合のトランスフェクション時間の一関数としての4 mol% CP_{L4}を含有するSPLP-CP_{L4}()およびリポフェクチンリポプレックス()の毒性。

【図19】

10

GFPをコードするプラスミドを含有するSPLP-CP_{L4}およびリポプレックスでトランスフェクトされるBHK細胞の蛍光および位相差顕微鏡写真。細胞を、SPLP-CP_{L4}で24時間(A1、A2)および48時間(B1、B2)、ならびにリポフェクチンで24時間(C1、C2)トランスフェクトした。実施例IIの材料と方法に記載したように、pCMVGFPを用いてSPLPおよびリポプレックスを調製した。4 mol% CP_{L4}を含有するSPLP-CP_{L4}は後挿入法により調製され、CaCl₂を含有して、トランスフェクション培地中に8 mM CaCl₂濃度を生じた。24および48時間のトランスフェクション時間の間、10% FBSを含有するDMEM中でSPLP-CP_{L4}またはリポフェクチン(5.0 μg/mL)とともにBHK細胞(10⁵)をインキュベートし、トランスフェクション期間直後に検査した。

20

【図20】

陽イオン性リポプレックスにより媒介される細胞膜の崩壊に関するメカニズム。標的細胞との結合(過程1)およびその細胞中へのエンドサイトーシス(過程2)後、陽イオン性リポプレックスを後期エンドソーム区画に移す(過程3)。陽イオン性脂質はエンドソーム膜の脱安定化を誘導して、エンドソーム膜とのリポプレックスの融合(過程4)、あるいは非二重層相へのエンドソーム膜の完全リモデリング(過程5)をもたらす。

【図21】

種々の量の負荷ヘッド基(a.) Et₃N/CHCl₃; (b.) TFA/CHCl₃; c. EtN/CHCl₃、N-ジ-t-Boc-L-リシンN-ヒドロキシスクシニドエステルを有する陽イオン性PEG-脂質複合体の調製のための合成模式図。

30

【 図 1 】

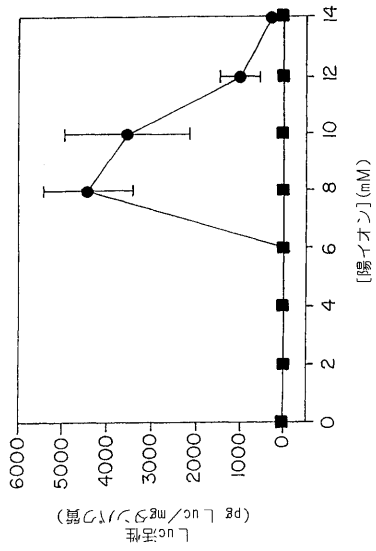


FIG. 1.

【 図 2 】

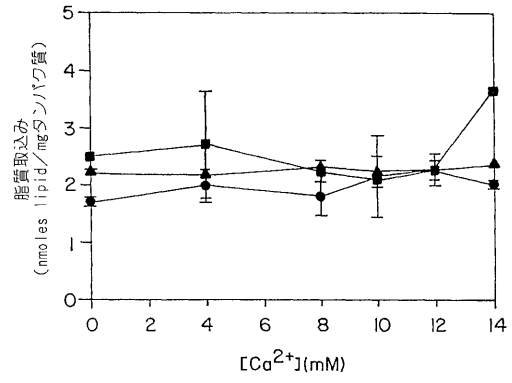


FIG. 2.

【 図 4 A 】

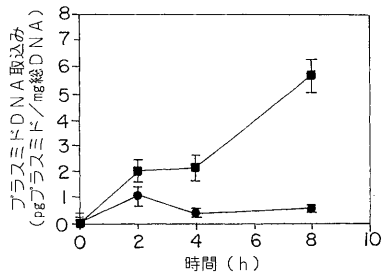


FIG. 4A.

【 図 6 】

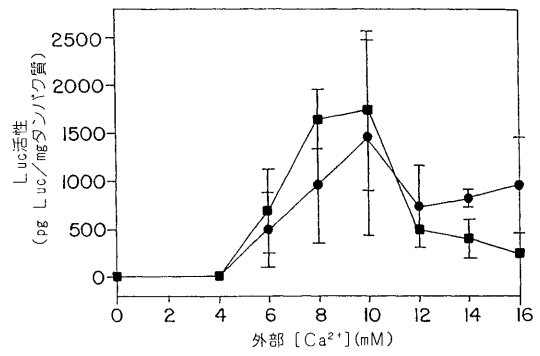


FIG. 6.

【 図 7 】

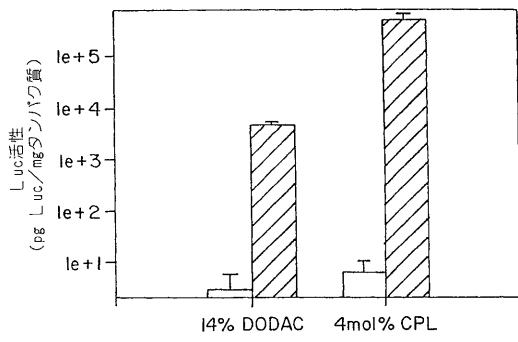


FIG. 7.

【 図 8 】

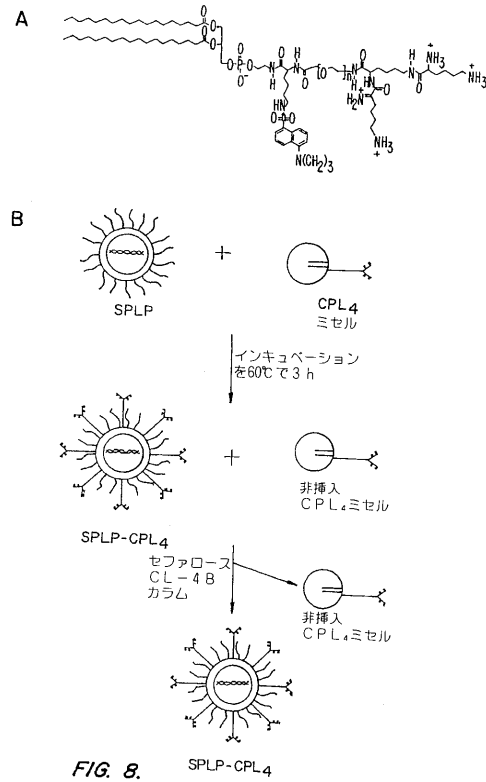


FIG. 8.

【 図 9 】

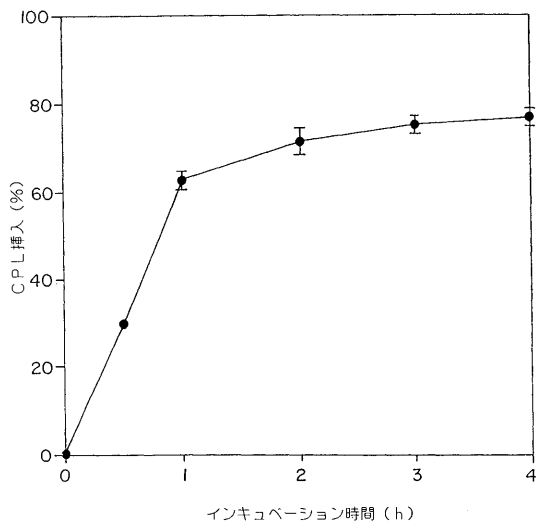


FIG. 9.

【 図 10 】

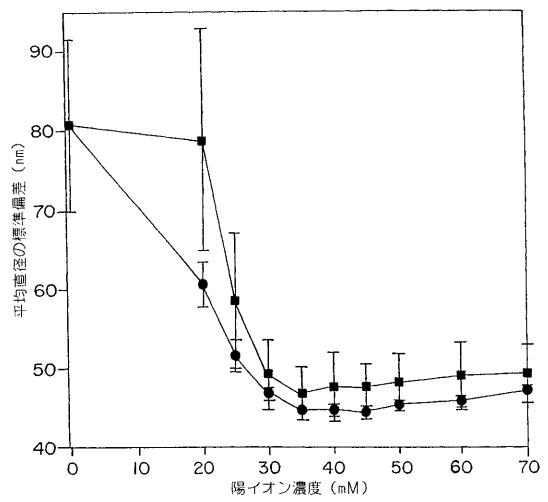


FIG. 10.

【 図 1 2 】

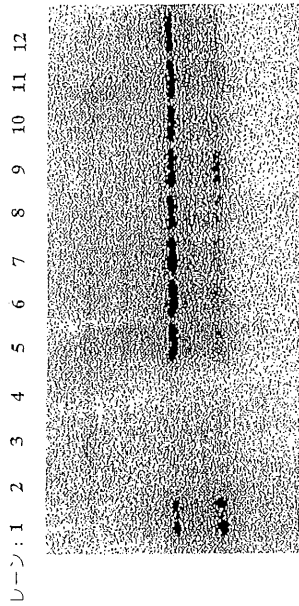


FIG. 12.

【 図 1 3 A 】

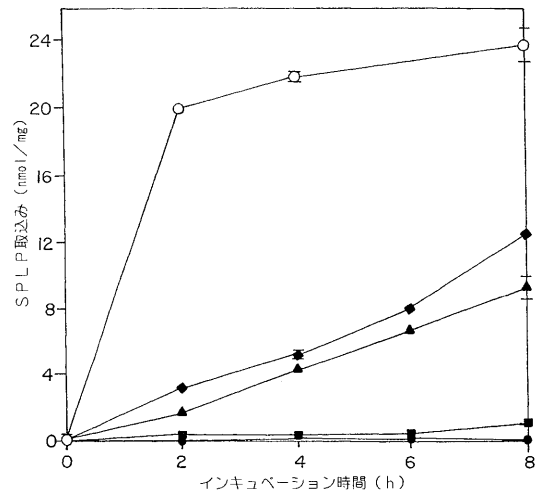


FIG. 13A.

【 図 1 4 】

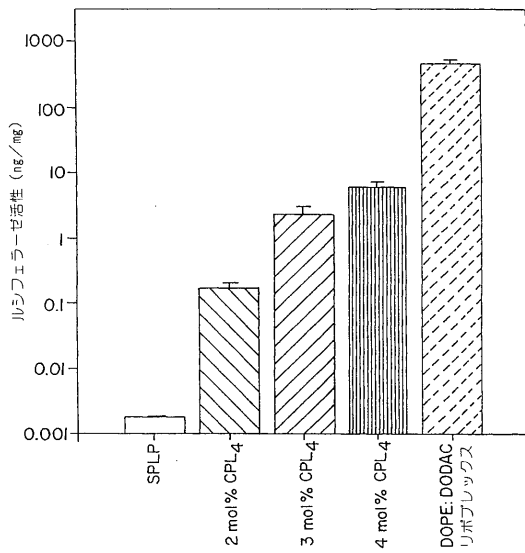


FIG. 14.

【 図 1 5 】

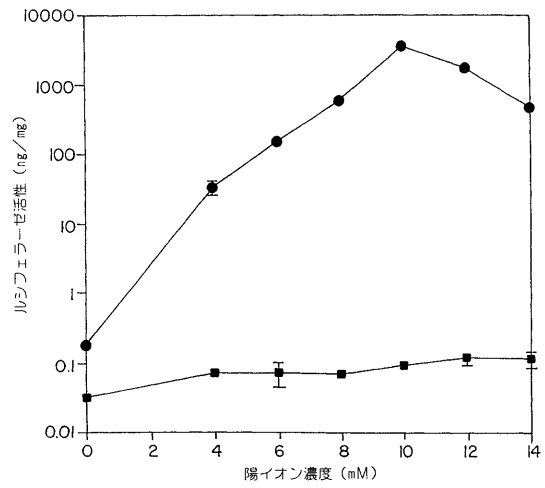


FIG. 15.

【 図 1 6 】

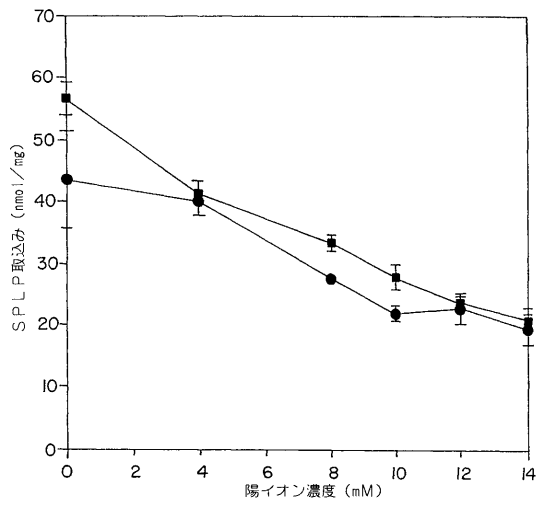


FIG. 16.

【 図 1 7 】

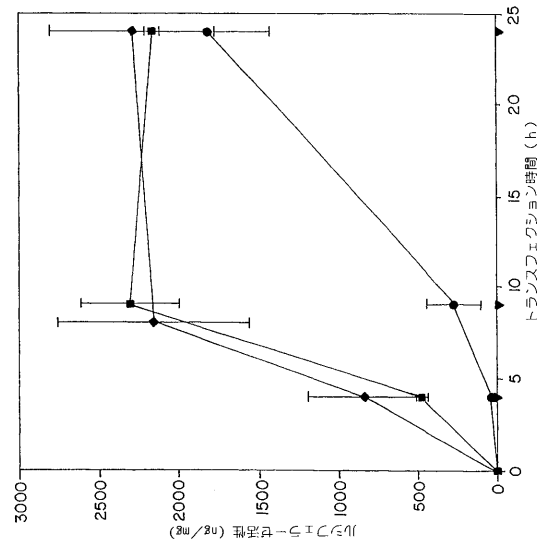


FIG. 17.

【 図 1 8 A 】

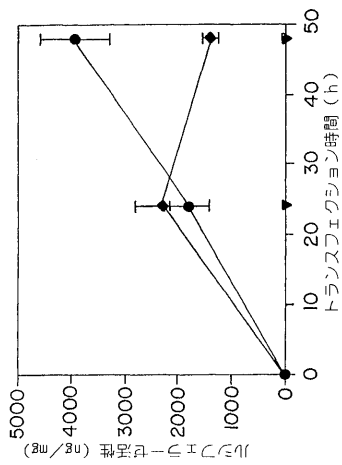


FIG. 18A.

【 図 1 8 B 】

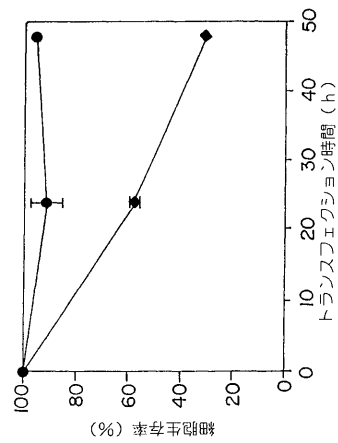


FIG. 18B.

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
1 November 2001 (01.11.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/80900 A2

(51) International Patent Classification: A61K 47/48

[CA/CA], 718 West 61st Avenue, Vancouver, British Columbia V6P 2B5 (CA). PALMER, Lorne, R. [CA/CA]; 1950 West 8th Avenue, Apt. 209, Vancouver, British Columbia V6J 1W3 (CA). CULLIS, Pieter, R. [CA/CA]; 3272 West 1st Avenue, Vancouver, British Columbia V6R 1H4 (CA).

(21) International Application Number: PCT/CA01/00555

(22) International Filing Date: 20 April 2001 (20.04.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
PCT/CA00/00451 20 April 2000 (20.04.2000) CA
09/553,639 20 April 2000 (20.04.2000) US
60/227,949 25 August 2000 (25.08.2000) US

(74) Agent: FETHERSTONHAUGH & CO., Box 11560, Vancouver Centre, 650 West Georgia Street, Suite 2200, Vancouver, British Columbia V6B 4N8 (CA).

(71) Applicant (for all designated States except US): THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA [CA/CA]; University Industry Liaison Office, IRC Building, Room 331, 2194 Health Sciences Mall, Vancouver, British Columbia V6T 1Z3 (CA).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TI, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

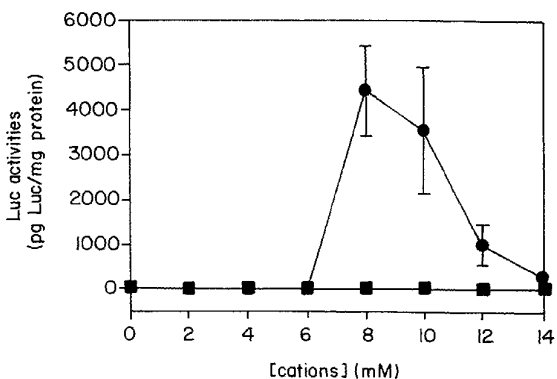
(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): LAM, Angela, M., I.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European

[Continued on next page]

(54) Title: METHODS OF ENHANCING SPLP-MEDIATED TRANSFECTION USING ENDOSOMAL MEMBRANE DESTABILIZERS

WO 01/80900 A2



(57) Abstract: The present invention provides novel and surprisingly effective methods for delivering nucleic acids to cells. These methods are based upon the discovery that the presence of endosomal membrane destabilizers (e.g., calcium) leads to a dramatic increase in the transfection efficiency of plasmids formulated as SPLP, or "stabilized plasmid-lipid particles."

WO 01/80900 A2



patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). *For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

Published:
— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

WO 01/80900

PCT/CA01/00555

**METHODS OF ENHANCING SPLP-MEDIATED TRANSFECTION
USING ENDOSOMAL MEMBRANE DESTABILIZERS**

CROSS-REFERENCES TO RELATED APPLICATIONS

This patent application claims the benefit of U.S. Provisional Patent Application No. 60/227,949, which was filed August 25, 2000, U.S. Patent Application No. 09/553,639, which was filed April 20, 2000, and PCT Patent Application No. CA 00/00451, which was filed April 20, 2000, the teachings of both of which are incorporated herein by
5 reference.

BACKGROUND OF THE INVENTION

An effective and safe gene delivery system is required for gene therapy to be clinically useful. Viral vectors are relatively efficient gene delivery systems, but suffer from a variety of limitations, such as the potential for reversion to the wild type as well as immune
10 response concerns. As a result, nonviral gene delivery systems are receiving increasing attention (Worgall, *et al.*, *Human Gene Therapy* 8:37-44 (1997); Peeters, *et al.*, *Human Gene Therapy* 7:1693-1699 (1996); Yei, *et al.*, *Gene Therapy* 1:192-200 (1994); Hope, *et al.*, *Molecular Membrane Biology* 15:1-14 (1998)). Plasmid DNA-cationic liposome complexes are currently the most commonly employed nonviral gene delivery vehicles (Felgner,
15 *Scientific American* 276:102-106 (1997); Chonn, *et al.*, *Current Opinion in Biotechnology* 6:698-708 (1995)). However, complexes are large, poorly defined systems that are not suited for systemic applications and can elicit considerable toxic side effects (Harrison, *et al.*, *Biotechniques* 19:816-823 (1995); Huang, *et al.*, *Nature Biotechnology* 15:620-621 (1997); Templeton, *et al.*, *Nature Biotechnology* 15:647-652 (1997); Hofland, *et al.*, *Pharmaceutical
20 Research* 14:742-749 (1997)).

Recent work has shown that plasmid DNA can be encapsulated in small (~70 nm diameter) "stabilized plasmid-lipid particles" (SPLP) that consist of a single plasmid encapsulated within a bilayer lipid vesicle (Wheeler, *et al.*, *Gene Therapy* 6:271-281 (1999)). These SPLPs typically contain the "fusogenic" lipid dioleoylphosphatidylethanolamine
25 (DOPE), low levels of cationic lipid, and are stabilized in aqueous media by the presence of a poly(ethylene glycol) (PEG) coating. SPLP have systemic application as they exhibit extended circulation lifetimes following intravenous (i.v.) injection, accumulate preferentially at distal tumour sites due to the enhanced vascular permeability in such regions, and can

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
mediate transgene expression at these tumour sites. The levels of transgene expression
observed at the tumour site following i.v. injection of SPLP containing the luciferase marker
gene are superior to the levels that can be achieved employing plasmid DNA-cationic
liposome complexes (lipoplexes) or naked DNA. Still, improved levels of expression may be
5 required for optimal therapeutic benefit in some applications (*see, e.g., Monck, et al., J. Drug
Targ. 7:439-452 (2000)*).

Cationic poly(ethylene glycol) (PEG) lipids, or CPLs, have been designed for
insertion into lipid bilayers to impart a positive charge(*see, Chen, et al., Bioconj. Chem.*
11:433-437 (2000)). For example, CPL containing distearoyl-PE (DSPE) coupled to PEG
10 containing one or more distal positive charges were synthesized, and shown to promote
enhanced *in vitro* cellular binding and uptake of liposomes (Chen, *et al., Bioconj. Chem.*
11:433-7 (2000)).

Thus, there remains a strong need in the art for novel and more efficient
methods for introducing nucleic acids into cells. The present invention addresses this and
15 other needs.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides effective compositions, methods and uses for
delivering nucleic acids to cells. The inventive compositions and methods are based upon the
surprising discovery that the presence of an endosomal membrane destabilizer in a lipid
20 formulation leads to a dramatic increase in transfection efficiency. The present compositions
and methods can be used *in vitro* or *in vivo*, and can be used to increase the transfection
efficiency of any cell type, including mammalian cells (*e.g., human*).

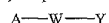
As such, in one embodiment, the present invention provides a nucleic acid-
lipid particle composition for introducing a nucleic acid into a cell comprising: a cationic
25 lipid, a conjugated lipid that inhibits aggregation of particles, a nucleic acid and an
endosomal membrane destabilizer. In preferred aspects, the nucleic acid-lipid particles are
"stabilized plasmid-lipid particles" (SPLP). Typically, SPLP are less than 150 nm in
diameter and comprise a single plasmid encapsulated within a bilayer lipid vesicle. The
conjugated lipid that inhibits aggregation typically comprises a hydrophilic polymer. In
30 preferred embodiments, the hydrophilic polymer is a PEG or polyamide (*e.g., ATTA*) having
a molecular weight of about 250 to about 7000 daltons. The endosomal membrane
destabilizer can be inside the particle, outside the particle, or both inside and outside the

WO 01/80900

PCT/CA01/00555

particle. Preferably, the endosomal membrane destabilizer is Ca^{++} ion. In certain aspects, the concentration of Ca^{++} ion is from about 0.1 mM to about 100 mM.

In certain embodiments, the conjugated lipid that inhibits aggregation is a "cationic polymer lipid" (CPL). In preferred aspects, the CPL has the formula



5

I

In Formula I, A is a lipid moiety, W is a hydrophilic polymer; and Y is a polycationic moiety. In certain preferred embodiments, Y is selected from lysine, arginine, asparagine, glutamine, and combinations thereof.

In another embodiment, the present invention provides a method for introducing a nucleic acid into a cell, comprising contacting the cell with a nucleic acid-lipid particle composition, wherein the particle comprises a cationic lipid, a conjugated lipid that inhibits aggregation of particles, a nucleic acid; and an endosomal membrane destabilizer. The endosomal membrane destabilizer can be inside the particle, outside the particle, or both inside and outside the particle. In certain embodiments, the endosomal membrane destabilizer contacts the cell before the particle, after the particle, simultaneously or combinations thereof.

In still another embodiment, the present invention provides a method for inducing H_{II} phase structure in a lipid bilayer, comprising contacting the lipid bilayer with an endosomal membrane destabilizer, thereby inducing H_{II} phase structure in the lipid bilayer. In certain aspects, the endosomal membrane destabilizer (e.g., Ca^{++} ion) acts synergistically or additively with low levels of the cationic lipid to trigger H_{II} phase formation.

The present compositions, methods and uses offer numerous advantages. For example, the presence of an endosomal membrane destabilizer leads to a dramatic increase in the transfection efficiency of nucleic acids. By increasing transfection efficiency, the amount of gene product within the cell is greatly increased. Moreover, the present compositions and methods can be used *in vitro* or *in vivo*, and can be used to increase the transfection efficiency of any cell type, including human.

These and other advantages, objects and embodiments of the present invention, will be described in more detail in conjunction with the following figures and the detailed description.

30

WO 01/80900

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

PCT/CA01/00555

Figure 1. Effect and specificity of Ca^{2+} on SPLP transfection. Increasing concentrations of CaCl_2 (●), MgCl_2 (■), or NaCl (▲) (0 to 14 mM) were titrated into SPLP prior to their addition to cells. 0.5 μg of pCMVLuc plasmid encapsulated in SPLP

5 (DODAC/DOPE/PEG-CerC20; 7:83:10 mol/mol/mol) vesicles was used to transfect cells plated at 1×10^4 cells/well of 96-well plates. Cells were incubated with SPLP for 24 h, and Luc activity was measured as described in Materials and Methods, ExampI I. All experiments were performed in triplicate.

Figure 2. Effect of Ca^{2+} on the cellular uptake of SPLP. SPLP containing 0.5 mol% Rd-labeled DOPE (DODAC/DOPE/PEG-CerC20/Rh-DOPE; 7:82.5:10:0.5 mol/mol/mol/mol) were employed to monitor cellular lipid uptake. 80 nmoles of lipid vesicles prepared in the presence of Ca^{2+} (0 to 14 mM) were incubated on cells until the appropriate time periods. Levels of lipid uptake were determined by measuring Rd fluorescence at 4 h (●), 8 h (■), or 24 h (▲) as described in Materials and Methods,

15 Example I. All experiments were performed in triplicate.

Figure 3. Fluorescence micrographs of the cellular localization of SPLP. 100 nmoles of 4 mol% Rh-DOPE labeled vesicles were incubated on cells (plated at 1×10^5 cells per well of a 12-well plate) in the absence (A) or presence (B) of calcium (10 mM). At 8 h time point, transfecting media was replaced with complete DMEM media and cells were

20 examined using fluorescence microscopy. Fluorescence micrographs were taken on an Axiocvert 100 Zeiss Fluorescence microscope (Carl Zeiss Jena GmbH) using a rhodamine filter from Omega Optical (Brattleboro, VT) with the following specifications, $\lambda_{\text{ex}}=560 \pm 20$ nm, 600 nm LP, and DC 590 nm.

Figure 4. Intracellular processing of plasmid DNA was affected by the presence of Ca^{2+} . SPLP containing 2.5 μg plasmid DNA was used to transfect BHK cells in the absence (●) or presence (■) of 8 mM Ca^{2+} as described in Materials and Methods, Example I. At appropriate time points (2 h, 4 h, and 8 h), DNA was extracted from the cells and intracellular DNA was detected by hybridization to a specific ^{32}P -labeled plasmid DNA probe. (A) Levels of plasmid DNA uptake determined by dot blot analysis as described in

30 Materials and Methods. (B) Integrity of intracellular plasmid DNA determined by Southern blot analysis. Lanes 1 and 11: pCMVLuc control; lanes 2, 5, 8 and 12: untransfected control; lanes 3, 6, 9 and 13: cells transfected with SPLP; lanes 4, 7, 10 and 14: cells

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
 transfected with SPLP and 8 mM Ca^{2+} ; and lane 15: cells transfected with SPLP and 8 mM
 Mg^{2+} . All experiments were performed in triplicate.

Figure 5. ^{31}P NMR spectra of various model membrane systems in the presence of CaCl_2 . (A) Ca^{2+} was titrated into the vesicles (DOPE/DOPS/DOPC/Chol, 1:1:1:3) at Ca^{2+} /DOPS ratios ranging from 0:1 to 0.5:1 (molar ratios). (B) Ca^{2+} was titrated into the vesicles (DOPE/DOPS/DOPC/Chol/DODAC, 1:1:1:3:0.25) at Ca^{2+} /DOPS ratios ranging from 0:1 to 0.25:1 (molar ratios). Equilibration of the cations across the lipid bilayers was ensured by three cycles of freeze-thawing. Spectra have been scaled to the same peak height. Experiments were carried out as described in Materials and Methods, Example I.

Figure 6. Effect of Ca^{2+} -containing SPLP on transfection. Ca^{2+} was loaded employing A23187 in the presence of a pH gradient as described in Materials and Methods. Increasing concentrations of Ca^{2+} (0 to 14 mM) were added to both SPLP (■) and Ca^{2+} -containing SPLP (●) prior to DMEM dilution. 0.5 μg of pCMVLuc plasmid encapsulated in SPLP were used to transfect cells plated at 1×10^4 cells/well of 96-well plates. Luc activity was measured as described in Materials and Methods, Example I. All experiments were performed in triplicate.

Figure 7. Effect of Ca^{2+} on improved SPLP systems. SPLP containing higher DODAC content (14 mol%) or CPL (4 mol%) were used to transfect cells in the presence (dashed bars) or absence (open bars) of 8 mM Ca^{2+} . 0.5 μg of pCMVLuc was used in each formulation in each transfection experiment. Cells were exposed to the vesicles for 24 h before assaying for Luc expression, as outlined in Materials and Methods, Example I. Experiments were performed in triplicate.

Figure 8. Production of SPLP-CPL₄. A. Structure of dansylated CPL₄. CPL₄ possesses four positive charges at the end of a PEG₃₄₀₀ molecule attached to a lipid anchor, DSPE. B. Protocol for insertion of CPL₄ into preformed SPLP. The SPLP and CPL₄ are incubated together at 60°C for 3 h, and unincorporated CPL₄ is removed using Sepharose CL-4B column chromatography. For further details see Materials and Methods, Example II.

Figure 9. Time course for the insertion of CPL₄ into SPLP at 60°C. Dansylated CPL₄ (0.3 μmol) was added to SPLP composed of 6 μmol DOPE:PEG-CerC₂₀:DODAC:Rh-PE (83.5:10:6:0.5; mol%) containing 360 μg pCMVLuc in a total volume of 1.5 mL and incubated at 60°C. Aliquots (250 μL) of the mixture were taken at the times indicated and unincorporated CPL₄ was removed employing Sepharose CL-4B column

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
chromatography. CPL₄ incorporation was determined as described in Materials and Methods,
Example II.

Figure 10. Effect of cation concentration on the de-aggregation of SPLP following insertion of CPL₄. SPLP were prepared and 4 mol% CPL₄ was inserted as described in Materials and Methods, Example II. The mean diameter and standard deviation of the mean diameter of the SPLP-CPL₄ in the presence of increasing concentrations of Ca²⁺ (●) and Mg²⁺ (■) was determined by QELS. CaCl₂ or MgCl₂ from 500 mM stock solutions was added to SPLP-CPL₄ (180 nmol in 400 μL). The addition of Ca²⁺ or Mg²⁺ results in a more monodisperse preparation as indicated by a reduction in the standard deviation of the mean diameter at cation concentrations above 30 mM.

Figure 11. Freeze-fracture electron micrographs of (A) SPLP, (B) SPLP-CPL₄ and (C) SPLP-CPL₄ in the presence of 40 mM CaCl₂. The SPLP-CPL₄ were prepared as described in Materials and Methods, Example II, and contained 4 mol% CPL₄. The bar in plate A corresponds to 200 nm.

Figure 12. Serum stability of SPLP-CPL₄ as assayed by Southern analysis of encapsulated plasmid. SPLP were prepared as indicated in the legend to Figure 9 and 4 mol% of CPL₄ inserted using the post-insertion protocol. SPLP-CPL₄ containing 5 μg pCMVLuc were incubated in the presence of 50% mouse serum at 37°C for the times indicated, an aliquot of the mixture corresponding to 1 μg of plasmid DNA was removed and plasmid DNA was extracted and subjected to Southern analysis, as described in the Materials and Methods. Lanes 1-4 indicate the behaviour of naked plasmid DNA following 0, 1, 2, and 4 h incubation times respectively; lanes 5-8 indicate the behaviour of plasmid extracted from SPLP following 0, 1, 2, and 4 h incubation times; and lanes 9-12 show the behaviour of plasmid DNA extracted from SPLP containing 4 mol% CPL₄ following 0, 1, 2, and 4 h incubation times.

Figure 13A. Influence of the amount of CPL₄ incorporated into SPLP on the uptake of SPLP-CPL₄ into BHK cells. Uptake of SPLP containing 0 (●), 2 (■), 3 (▲), or 4 (◆) mol% CPL₄ was investigated; the uptake of DOPE:DODAC lipoplexes (○) is given for comparison. The insertion of CPL₄ into SPLP and the preparation of lipoplexes was performed as described in Materials and Methods, Example II. The SPLP-CPL₄ media contained 40 mM CaCl₂ to prevent aggregation, addition to the BHK cells resulted in dilution of the CaCl₂ concentration to 8 mM. The uptake protocol involved incubation of SPLP-CPL₄ (20 μM total lipid) with 10⁵ BHK cells in DMEM containing 10% FBS. Following

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
incubation, the cells were lysed and uptake of rhodamine-PE was measured as described in Materials and Methods, Example II. **B.** Fluorescence micrographs of BHK cells following uptake of SPLP (Panel I) and SPLP containing 4 mol% CPL₄ (Panel II) following a 4 h incubation. The micrographs on the left were taken in the phase contrast mode and those on the right in the (rhodamine) fluorescence mode.

Figure 14. Luciferase expression in BHK cells following transfection by SPLP containing various amounts of CPL₄. SPLP containing 2, 3 and 4 mol% CPL₄ were prepared employing the post-insertion process. BHK cells (10⁶) were transfected with SPLP, SPLP-CPL₄ and DOPE:DODAC (1:1) lipoplexes containing 5.0 µg/mL pCMVLuc using a transfection time of 4 h and a complete incubation time of 24 h, as described in Materials and Methods, Example II. The CaCl₂ concentration in the SPLP-CPL₄-containing systems following dilution with media and addition to the BHK cells was 8 mM. After transfection the cells were lysed and the luciferase and BCA assays performed as described in Materials and Methods.

Figure 15. Influence of Ca²⁺ (●) and Mg²⁺ (■) on the transfection potency of SPLP-CPL₄. SPLP-CPL₄ containing 4 mol% CPL₄ were prepared by the post-insertion process as described in Materials and Methods, Example II. Increasing concentrations of CaCl₂ or MgCl₂ were added to the SPLP-CPL₄ (5.0 µg pCMVLuc/mL), transferred to BHK cells and incubated for 48 h in DMEM containing 10% FBS. The cells were then lysed and the luciferase activity and protein content were measured as described in Materials and Methods, Example II.

Figure 16. Effect of Ca²⁺ (●) and Mg²⁺ (■) on the uptake of SPLP-CPL₄ by BHK cells. SPLP-CPL₄ were prepared with increasing cation concentrations as indicated for Figure 8 and incubated with BHK cells (~80 µM lipid and ~5.0 µg pCMVLuc/mL per well) for 4 h in DMEM containing 10% FBS. The cells were then lysed and the SPLP-CPL₄ content (as indicated by the Rh-PE lipid label) and cellular protein measured as described in Materials and Methods, Example II.

Figure 17. Luciferase expression in BHK cells as a function of transfection time for SPLP, SPLP-CPL₄ and lipoplexes. SPLP-CPL₄ containing 4 mol% CPL₄ were prepared by the post-insertion process. BHK cells in DMEM and 10% FBS were incubated with SPLP, SPLP-CPL₄ and lipoplexes (5.0 µg/mL pCMVLuc) employing transfection times of 4, 8 and 24 h and total incubation times of 24 h. The final CaCl₂ concentration following addition of media was 8 mM. The cells were then assayed for luciferase activity and protein

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
 content. Luciferase activity following transfection with SPLP-CPL₄ (●), SPLP (▼),
 DOPE:DODAC lipoplexes (■), and Lipofectin lipoplexes (◆) is plotted as a function of
 transfection time. Lipoplexes were prepared at a charge ratio of 1.5:1.

Figure 18A. The transfection potency of SPLP-CPL₄ (●) containing 4 mol%
 5 CPL₄ and Lipofectin lipoplexes (◆) following extended transfection times with BHK
 cells. SPLP-CPL₄ and lipoplexes were generated as indicated for Figure 10. BHK cells were
 transfected in DMEM containing 10% FBS for 24 and 48 h with SPLP-CPL₄ and Lipofectin
 lipoplexes (charge ratio of 1.5:1) containing 5.0 µg/mL pCMVLuc. Following transfection
 the luciferase expression levels and cell protein levels were determined in the cell lysate. The
 10 luciferase activity was normalized for protein content in the lysate and plotted as a function
 of transfection time. **B.** The toxicity of SPLP-CPL₄ (●) containing 4 mol% CPL₄ and
 Lipofectin lipoplexes (◆) as a function of transfection time, as assayed by cell survival based
 on the protein concentration in the cell lysate.

Figure 19. Fluorescence and phase contrast micrographs of BHK cells
 15 transfected with SPLP-CPL₄ and lipoplexes containing a plasmid coding for GFP. Cells were
 transfected with SPLP-CPL₄ for 24 h (A1, A2) and 48 h (B1, B2) and with lipofectin for 24 h
 (C1, C2). SPLP and lipoplexes were prepared with pCMVGFP as described in Materials and
 Methods, Example II. SPLP-CPL₄ containing 4 mol% CPL was prepared by the post-
 insertion process and contained CaCl₂, resulting in an 8 mM CaCl₂ concentration in the
 20 transfection medium. BHK cells (10⁵) were incubated with SPLP-CPL₄ or Lipofectin (5.0
 µg/mL) in DMEM containing 10% FBS for the 24 and 48 h transfection times and examined
 immediately after the transfection period.

Figure 20. Mechanism for disruption of cellular membranes mediated by
 cationic lipoplexes. Following binding (Step 1) and endocytosis (Step 2) into a target cell,
 25 cationic lipoplexes are transferred to late endosomal compartments (Step 3). Cationic lipids
 induce destabilization of the endosomal membrane leading to fusion (Step 4) of the lipoplex
 with the endosomal membrane, or complete remodeling of the endosomal membrane into a
 nonbilayer phase (Step 5).

Figure 21. A synthetic scheme for the preparation of cationic-PEG-lipid
 30 conjugates having varying amount of charged head groups (a.) Et₃N/CHCl₃; (b.) TFA
 /CHCl₃; c. Et₃N / CHCl₃ Na, N ϵ -di-t-Boc-L-Lysine N-hydroxysuccinide ester.

I. Introduction

The present invention provides novel and surprisingly effective compositions and methods for delivering nucleic acids to cells. These compositions and methods are based upon the discovery that the presence of an endosomal membrane destabilizer (*e.g.*, calcium) leads to a dramatic increase in the transfection efficiency of nucleic acids (*e.g.*, plasmids) formulated as SPLP or "stabilized nucleic acid (*e.g.*, plasmid)-lipid particles." Typically, SPLP are less than about 150 nm in diameter (more preferably about 70 nm in diameter) and consist of a single plasmid encapsulated within a bilayer lipid vesicle.

As used herein, the term "endosomal membrane destabilizer" (EMD) refers to an agent(s) that is believed to facilitate the disruption or destabilization of the endosomal membrane thereby enhancing the release of their contents. Endosomes are typically distinct intracellular compartments isolated from the rest of the cell by a selectively permeable membrane. Suitable EMDs include, but are not limited to, monovalent metal ions such as K^+ , Na^+ , divalent metal ions such as Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , and combinations of the metal ions with cationic lipids. The most preferred EMD is Ca^{2+} ion wherein approximately 10^6 times higher transfection efficiency is observed for SPLPs containing Ca^{2+} ions than SPLPs in the absence of Ca^{2+} ions.

The present methods can be used *in vitro* or *in vivo*, and can be used to increase the transfection efficiency of any cell type, including mammalian cells. For example, for *in vitro* transfection, an endosomal membrane destabilizer (*e.g.*, calcium) can be added to the transfection medium. For instance, any of a wide range of calcium concentrations can be used, ranging, for example, from 0.1 mM to 100 mM. Preferably, from about 1 mM to about 20 mM is used, most preferably from about 8 to about 10 mM. In one embodiment, the endosomal membrane destabilizer (*e.g.*, calcium) is first added to the SPLP at a high concentration which will give rise to a desired final concentration following the dilution of the SPLP into the transfection medium. In other embodiments, the endosomal membrane destabilizer (*e.g.*, calcium) is added to the SPLP at the time of transfection into the cells. The endosomal membrane destabilizer can be co-administered with the SPLP, it can be administered prior to the administration of the SPLP or it can be administered after the administration of the SPLP.

In vivo, any method can be used that will result in a local increase of the endosomal membrane destabilizer (*e.g.*, calcium) concentration at the site of transfection.

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
For example, particles can be formulated to incorporate the endosomal membrane

destabilizer, particles can be soaked in a solution containing a high endosomal membrane
destabilizer (*e.g.*, calcium) concentration prior to administration, or the particles can be
administered in a buffer or formulation containing a high endosomal membrane destabilizer
5 (*e.g.*, calcium) concentration. Such methods are especially useful for the local delivery of
particles, *e.g.*, intratumoral injection, where the co-administration of, *e.g.*, calcium ions, can
produce a locally high calcium concentration, thereby leading to enhanced transfection of the
particles into cells at or near the site of delivery. Again, the endosomal membrane
destabilizer can be co-administered with the SPLP, it can be administered prior to the
10 administration of the SPLP or it can be administered after the administration of the SPLP.

In certain *in vivo* or *in vitro* embodiments, the SPLP are formulated to include
on their surface chelating molecules for chelating the endosomal membrane destabilizer, *e.g.*,
lipids derivatized with a endosomal membrane destabilizer chelator, thereby allowing the
generation of a locally high endosomal membrane destabilizer concentration even following
15 systemic delivery of the particles. For instance, in certain *in vivo* or *in vitro* embodiments,
particles are formulated to include calcium chelating molecules on the surface, *e.g.*, lipids
derivatized with a calcium chelator, thereby allowing the generation of a locally high calcium
concentration even following systemic delivery of the particles.

Any SPLP particle can be used to practice the present invention. For example,
20 SPLP comprising any of a broad range of concentrations of cationic and other lipids can be
used. Similarly, the SPLP can comprise any of a wide variety of cationic and other lipids.
The SPLP can be prepared with any plasmid, from any source and comprising any
polynucleotide sequence, and can be prepared using any of a large number of methods.

The present invention also provides SPLP containing cationic PEG lipids,
25 called SPLP-CPL. In a preferred embodiment, SPLP-CPL₄ is used, comprising a PEG lipid
having four positive charges. SPLP and SPLP-CPL can be derivatized to include any of a
number of functional groups, including, but not limited to, calcium chelators, cell or tissue-
specific targeting molecules, labels, and others.

Suitable SPLP and SPLP-CPL for use in the present invention, and methods of
30 making and using SPLP and SPLP-CPL, are taught, *e.g.*, in U.S. Application Nos. 60/130,151
and 09/553,639, as well as in PCT International Application PCT/CA00/00451, the teachings
of each of which is incorporated herein in its entirety by reference.

WO 01/80900
II. Definitions

PCT/CA01/00555

The term "lipid" refers to a group of organic compounds that include, but are not limited to, esters of fatty acids and are characterized by being insoluble in water, but soluble in many organic solvents. They are usually divided into at least three classes: (1) "simple lipids" which include fats and oils as well as waxes; (2) "compound lipids" which include phospholipids and glycolipids; (3) "derived lipids" such as steroids.

The term "vesicle-forming lipid" is intended to include any amphipathic lipid having a hydrophobic moiety and a polar head group, and which by itself can form spontaneously into bilayer vesicles in water, as exemplified by most phospholipids.

The term "vesicle-adopting lipid" is intended to include any amphipathic lipid which is stably incorporated into lipid bilayers in combination with other amphipathic lipids, with its hydrophobic moiety in contact with the interior, hydrophobic region of the bilayer membrane, and its polar head group moiety oriented toward the exterior, polar surface of the membrane. Vesicle-adopting lipids include lipids that on their own tend to adopt a nonlamellar phase, yet which are capable of assuming a bilayer structure in the presence of a bilayer-stabilizing component. A typical example is DOPE (dioleoylphosphatidylethanolamine). Bilayer stabilizing components include, but are not limited to, conjugated lipids that inhibit aggregation of the SPLPs, polyamide oligomers (*e.g.*, ATTA-lipid derivatives), peptides, proteins, detergents, lipid-derivatives, PEG-lipid derivatives such as PEG coupled to phosphatidylethanolamines, and PEG conjugated to ceramides (*see*, U.S. Application Serial No. 08/485,608, now U.S. Patent No. 5,885,613, which is incorporated herein by reference).

The term "amphipathic lipid" refers, in part, to any suitable material wherein the hydrophobic portion of the lipid material orients into a hydrophobic phase, while the hydrophilic portion orients toward the aqueous phase. Amphipathic lipids are usually the major component of a lipid vesicle. Hydrophilic characteristics derive from the presence of polar or charged groups such as carbohydrates, phosphato, carboxylic, sulfato, amino, sulfhydryl, nitro, hydroxy and other like groups. Hydrophobicity can be conferred by the inclusion of apolar groups that include, but are not limited to, long chain saturated and unsaturated aliphatic hydrocarbon groups and such groups substituted by one or more aromatic, cycloaliphatic or heterocyclic group(s). Examples of amphipathic compounds include, but are not limited to, phospholipids, aminolipids and sphingolipids. Representative examples of phospholipids include, but are not limited to, phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine, phosphatidylinositol, phosphatidic acid,

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
 palmitoyl/oleoyl phosphatidylcholine, lysophosphatidylcholine,

lysophosphatidylethanolamine, dipalmitoylphosphatidylcholine, dioleoylphosphatidylcholine, distearoylphosphatidylcholine or dilinoleoylphosphatidylcholine. Other compounds lacking in phosphorus, such as sphingolipid, glycosphingolipid families, diacylglycerols and β -acyloxyacids, are also within the group designated as amphipathic lipids. Additionally, the amphipathic lipid described above can be mixed with other lipids including triglycerides and sterols.

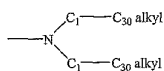
The term "neutral lipid" refers to any of a number of lipid species that exist either in an uncharged or neutral zwitterionic form at a selected pH. At physiological pH, such lipids include, for example, diacylphosphatidylcholine, diacylphosphatidylethanolamine, ceramide, sphingomyelin, cephalin, cholesterol, cerebroside and diacylglycerols.

The term "hydrophobic lipid" refers to compounds having apolar groups that include, but are not limited to, long chain saturated and unsaturated aliphatic hydrocarbon groups and such groups optionally substituted by one or more aromatic, cycloaliphatic or heterocyclic group(s). Suitable examples include, but are not limited to, diacylglycerol, dialkylglycerol, N-N-dialkylamino, 1,2-diacyloxy-3-aminopropane and 1,2-dialkyl-3-aminopropane.

The term "diacylglycerolyl" denotes 2-fatty acyl chains, R^1 and R^2 having independently between 2 and 30 carbons bonded to the 1- and 2-position of glycerol by ester linkages. The acyl groups can be saturated or have varying degrees of unsaturation.

The term "dialkylglycerolyl" denotes two C_1 - C_{30} alkyl chains bonded to the 1- and 2-position of glycerol by ether linkages.

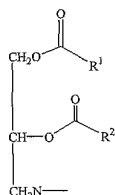
The term "N-N-dialkylamino" denotes



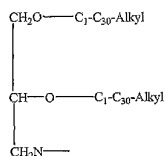
The term "1,2-diacyloxy-3-aminopropane" denotes 2-fatty acyl chains C_1 - C_{30} bonded to the 1- and 2-position of propane by an ester linkage. The acyl groups can be saturated or have varying degrees of unsaturation. The 3-position of the propane molecule has a -NH- group attached. 1,2-diacyloxy-3-aminopropanes have the following general formula:

WO 01/80900

PCT/CA01/00555



The term "1,2-dialkyl-3-aminopropane" denotes 2-alkyl chains (C₁-C₃₀) bonded to the 1- and 2-position of propane by an ether linkage. The 3-position of the propane molecule has a -NH- group attached. 1,2-dialkyl-3-aminopropanes have the following general formula:



The term "noncationic lipid" refers to any neutral lipid as described above as well as anionic lipids. Examples of anionic lipids include, but are not limited to, phosphatidylglycerol, cardiolipin, diacylphosphatidylserine, diacylphosphatidic acid, N-dodecanoyl phosphatidylethanolamines, N-succinyl phosphatidylethanolamines, N-glutarylphosphatidylethanolamines, lysophosphatidylglycerols, and other anionic modifying groups joined to neutral lipids.

The term "cationic lipid" refers to any of a number of lipid species that carry a net positive charge at a selected pH, such as physiological pH. Such lipids include, but are not limited to, N,N-dioleoyl-N,N-dimethylammonium chloride ("DODAC"); N-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylammonium chloride ("DOTMA"); N,N-distearyl-N,N-dimethylammonium bromide ("DDAB"); N-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylammonium chloride ("DOTAP"); 3-(N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl)cholesterol ("DC-Chol") and N-(1,2-dimyristyloxyprop-3-yl)-N,N-dimethyl-N-hydroxyethyl ammonium bromide ("DMRIE"). Additionally, a number of commercial preparations of cationic lipids are available which can be used in the present invention. These include, for example, LIPOFECTIN[®] (commercially available cationic liposomes

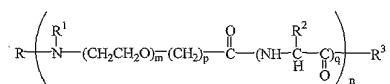
WO 01/80900 PCT/CA01/00555
 comprising DOTMA and 1,2-dioleoyl-*sn*-3-phosphoethanolamine ("DOPE"), from
 GIBCO/BRL, Grand Island, New York, USA); LIPOFECTAMINE® (commercially
 available cationic liposomes comprising N-(1-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-N-(2-
 (sperminecarboxamido)ethyl)-N,N-dimethylammonium trifluoroacetate ("DOSPA")
 5 and ("DOPE"), from GIBCO/BRL); and TRANSFECTAM® (commercially available cationic
 lipids comprising dioctadecylamidoglycyl carboxyspermine ("DOGS") in ethanol from
 Promega Corp., Madison, Wisconsin, USA). The following lipids are cationic and have a
 positive charge at below physiological pH: DODAP, DODMA, DMDMA and the like.

The term "fusogenic" refers to the ability of a liposome, an SPLP or other
 10 drug delivery system to fuse with membranes of a cell. The membranes can be either the
 plasma membrane or membranes surrounding organelles, e.g., endosome, nucleus, etc.
 Fusogenesis is the fusion of a liposome to such a membrane.

The term "dendrimer" includes reference to branched polymers that possess
 multiple generations. In dendrimers, each generation creates multiple branch points.

15 The term "ligand" includes any molecule, compound or device with a reactive
 functional group and includes lipids, amphipathic lipids, carrier compounds, chelating
 moieties, bioaffinity compounds, biomaterials, biopolymers, biomedical devices, analytically
 detectable compounds, therapeutically active compounds, enzymes, peptides, proteins,
 antibodies, immune stimulators, radiolabels, fluorogens, biotin, drugs, haptens, DNA, RNA,
 20 polysaccharides, liposomes, virosomes, micelles, immunoglobulins, functional groups,
 targeting agents, or toxins. The foregoing list is illustrative and not intended to be
 exhaustive.

The term "ATTA" or "polyamide" refers to, but is not limited to, compounds
 disclosed in U.S. Patent Application No. 09/218,988, filed December 22, 1998. These
 25 compounds include a compound having the formula



wherein: R is a member selected from the group consisting of hydrogen, alkyl and acyl; R¹ is
 a member selected from the group consisting of hydrogen and alkyl; or optionally, R and R¹
 and the nitrogen to which they are bound form an azido moiety; R² is a member of the group
 30 selected from hydrogen, optionally substituted alkyl, optionally substituted aryl and a side
 chain of an amino acid; R³ is a member selected from the group consisting of hydrogen,

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
 halogen, hydroxy, alkoxy, mercapto, hydrazino, amino and NR^4R^5 , wherein R^4 and R^5 are independently hydrogen or alkyl; n is 4 to 80; m is 2 to 6; p is 1 to 4; and q is 0 or 1. It will be apparent to those of skill in the art that other polyamides can be used in the compounds of the present invention.

5 As used herein, the term "alkyl" denotes branched or unbranched hydrocarbon chains, such as, methyl, ethyl, n-propyl, iso-propyl, n-butyl, sec-butyl, iso-butyl, tertbutyl, octa-decyl and 2-methylpentyl. These groups can be optionally substituted with one or more functional groups which are attached commonly to such chains, such as, hydroxyl, bromo, fluoro, chloro, iodo, mercapto or thio, cyano, alkylthio, heterocyclyl, aryl, heteroaryl,
 10 carboxyl, carbalkoyl, alkyl, alkenyl, nitro, amino, alkoxy, amido, and the like to form alkyl groups such as trifluoromethyl, 3-hydroxyhexyl, 2-carboxypropyl, 2-fluoroethyl, carboxymethyl, cyanobutyl and the like.

The term "alkylene" refers to a divalent alkyl as defined above, such as methylene ($-\text{CH}_2-$), propylene ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), chloroethylene ($-\text{CHClCH}_2-$), 2-thiobutene ($-\text{CH}_2\text{CH}(\text{SH})\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1-bromo-3-hydroxy-4-methylpentene
 15 ($-\text{CHBrCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$), and the like.

The term "alkenyl" denotes branched or unbranched hydrocarbon chains containing one or more carbon-carbon double bonds.

The term "alkynyl" refers to branched or unbranched hydrocarbon chains
 20 containing one or more carbon-carbon triple bonds.

The term "aryl" denotes a chain of carbon atoms which form at least one aromatic ring having preferably between about 6-14 carbon atoms, such as phenyl, naphthyl, indenyl, and the like, and which may be substituted with one or more functional groups which are attached commonly to such chains, such as hydroxyl, bromo, fluoro, chloro, iodo,
 25 mercapto or thio, cyano, cyanoamido, alkylthio, heterocycle, aryl, heteroaryl, carboxyl, carbalkoyl, alkyl, alkenyl, nitro, amino, alkoxy, amido, and the like to form aryl groups such as biphenyl, iodobiphenyl, methoxybiphenyl, anthryl, bromophenyl, iodophenyl, chlorophenyl, hydroxyphenyl, methoxyphenyl, formylphenyl, acetylphenyl, trifluoromethylthiophenyl, trifluoromethoxyphenyl, alkylthiophenyl,
 30 trialkylammoniumphenyl, amidophenyl, thiazolyphenyl, oxazolyphenyl, imidazolyphenyl, imidazolymethylphenyl, and the like.

The term "acyl" denotes the $-\text{C}(\text{O})\text{R}$ group, wherein R is alkyl or aryl as defined above, such as formyl, acetyl, propionyl, or butyryl.

The term "alkoxy" denotes $-\text{OR}-$, wherein R is alkyl.

- WO 01/80900 PCT/CA01/00555
 The term "amido" denotes an amide linkage: $-C(O)NR-$ (wherein R is hydrogen or alkyl).
- The term "amino" denotes an amine linkage: $-NR-$, wherein R is hydrogen or alkyl or a terminal NH_2 .
- 5 The term "carboxyl" denotes the group $-C(O)O-$, and the term "carbonyl" denotes the group $-C(O)-$.
- The term "carbonate" indicates the group $-OC(O)O-$.
- The term "carbamate" denotes the group $-NHC(O)O-$, and the term "urea" denotes the group $-NHC(O)NH-$.
- 10 The term "phosphoro" denotes the group $-OP(O)(OH)O-$.
- The term "basic amino acid" refers to naturally-occurring amino acids as well as synthetic amino acids and/or or amino acid mimetics having a net positive charge at a selected pH, such as physiological pH. This group includes, but is not limited to, lysine, arginine, asparagine, glutamine, histidine and the like.
- 15 The term "phosphorylethanolamino" denotes the group $-OP(O)(OH)OCH_2CH_2NH-$.
- The term "phosphorylethanolamido" denotes the group $-OP(O)(OH)OCH_2CH_2NHC(O)-$.
- The term "phospho" denotes a pentavalent phosphorous moiety $-P(O)(OH)O-$.
- 20 The term "phosphoethanolamino" denotes the group $-P(O)(OH)OCH_2CH_2NH-$.
- The term "phosphoethanolamido" denotes the group $-P(O)(OH)OCH_2CH_2NHC(O)-$.
- The term "ethylene oxide unit" denotes the group $-OCH_2CH_2-$.
- 25 The term "CPL" refers to a cationic-polymer-lipid, e.g., cationic-PEG-lipid. Preferred CPLs are compounds of Formulae I and II. Such CPLs are disclosed in U.S. Patent Application No. 09/553,639, which was filed April 20, 2000, and PCT Patent Application No. CA 00/00451, which was filed April 20, 2000 and which published as WO 00/62813 on October 26, 2000.
- 30 The term "d-DSPE-CPL-M" is encompassed by the term "CPL1" which refers to a DSPE-CPL having one positive charge. The "d-" in d-DSPE-CPL-M indicates that the CPL contains a fluorescent dansyl group. It will be apparent to those of skill in the art that a CPL can be synthesized without the dansyl moiety, and thus the term "DSPE-CPL-M" is encompassed by in the term "CPL1" as defined above.

WO 01/80900 The term "d-DSPE-CPL-D" is encompassed by the term "CPL2" which refers to DSPE-CPL having two positive charges. PCT/CA01/00555

The term "d-DSPE-CPL-T1" is encompassed by the term "CPL3" which refers to DSPE-CPL having three positive charges.

5 The term "d-DSPE-CPL-Q1" is encompassed by the term "CPL4a" which refers to DSPE-CPL having four positive charges.

The term "d-DSPE-CPL-Q5," or, alternatively, DSPE-PEGQuad5, or, alternatively, DSPE-CPL-4, are all encompassed by the term "CPL4 (or CPL4b)" which refer to a DSPE-CPL having four positive charges. By modifying the headgroup region, CPLs were synthesized which contained 1 (mono, or M), 2 (di, or D), 3 (tri, or T), and 4 (quad, or Q) positive charges. Various Quad CPLs were synthesized, hence these are numbered Q1 through Q5.

The abbreviations "HBS" refers to Hepes-buffered saline, "Rho-PE" refers to rhodamine-phosphatidylethanolamine, and "LUVs" refers to "large unilamellar vesicles."

15 II. Nucleic Acid-Lipid Particles (SPLPs) and Properties Thereof

The nucleic acid-lipid particles or, alternatively, SPLPs typically comprise cationic lipid and nucleic acids. Such SPLPs also preferably comprise noncationic lipid and a bilayer stabilizing component or, more preferably, a conjugated lipid that inhibits aggregation of the SPLPs. The SPLPs of the present invention have a mean diameter of less than about 20 150 nm and are substantially nontoxic. In addition, the nucleic acids when present in the SPLPs of the present invention are resistant to aqueous solution to degradation with a nuclease. Such SPLPs are disclosed in great detail in U.S. Patent No. 5,976,567 and PCT Patent Publication No. WO 96/40964, the teachings of both of which are incorporated herein by reference.

25 A. SPLP Components

Various suitable cationic lipids may be used in the present invention, either alone or in combination with one or more other cationic lipid species or neutral lipid species.

Cationic lipids which are useful in the present invention can be any of a number of lipid species which carry a net positive charge at physiological pH, for example:

30 DODAC, DOTMA, DDAB, DOTAP, DOSPA, DOGS, DC-Chol and DMRIE, or combinations thereof. A number of these lipids and related analogs, which are also useful in the present invention, have been described in co-pending USSN 08/316,399; U.S. Patent Nos.

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
5,208,036, 5,264,618, 5,279,833 and 5,283,185, the disclosures of which are incorporated
herein by reference. Additionally, a number of commercial preparations of cationic lipids are
available and can be used in the present invention. These include, for example,
LIPOFECTIN® (commercially available cationic liposomes comprising DOTMA and DOPE,
5 from GIBCO/BRL, Grand Island, New York, USA); LIPOFECTAMINE® (commercially
available cationic liposomes comprising DOSPA and DOPE, from GIBCO/BRL); and
TRANSFECTAM® (commercially available cationic liposomes comprising DOGS from
Promega Corp., Madison, Wisconsin, USA).

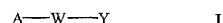
The noncationic lipids used in the present invention can be any of a variety of
10 neutral uncharged, zwitterionic or anionic lipids capable of producing a stable complex.
They are preferably neutral, although they can alternatively be positively or negatively
charged. Examples of noncationic lipids useful in the present invention include:
phospholipid-related materials, such as lecithin, phosphatidylethanolamine, lysolecithin,
lysophosphatidylethanolamine, phosphatidylserine, phosphatidylinositol, sphingomyelin,
15 cephalin, cardiolipin, phosphatidic acid, cerebrosides, dicetylphosphate,
dioleoylphosphatidylcholine (DOPC), dipalmitoyl-phosphatidylcholine (DPPC),
dioleoylphosphatidylglycerol (DOPG), dipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPG), dioleoyl-
phosphatidylethanolamine (DOPE), palmitoyloleoyl-phosphatidylcholine (POPC),
palmitoyloleoyl-phosphatidylethanolamine (POPE) and dioleoyl-phosphatidylethanolamine
20 4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexane-1-carboxylate (DOPE-mal). Additional
nonphosphorous containing lipids are, *e.g.*, stearylamine, dodecylamine, hexadecylamine,
acetyl palmitate, glycerolricinoleate, hexadecyl stearate, isopropyl myristate, amphoteric
acrylic polymers, triethanolamine-lauryl sulfate, alkyl-aryl sulfate polyethoxylated fatty
acid amides, dioctadecyldimethyl ammonium bromide and the like,
25 diacylphosphatidylcholine, diacylphosphatidylethanolamine, ceramide, sphingomyelin,
cephalin, and cerebrosides. Other lipids such as lysophosphatidylcholine and
lysophosphatidylethanolamine may be present. Noncationic lipids also include polyethylene
glycol-based polymers such as PEG 2000, PEG 5000 and polyethylene glycol conjugated to
phospholipids or to ceramides (referred to as PEG-Cer), as described in co-pending USSN
30 08/316,429, incorporated herein by reference.

In preferred embodiments, the noncationic lipids are
diacylphosphatidylcholine (*e.g.*, dioleoylphosphatidylcholine,
dipalmitoylphosphatidylcholine and dilinoleoylphosphatidylcholine),
diacylphosphatidylethanolamine (*e.g.*, dioleoylphosphatidylethanolamine and

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
 palmitoyloleoylphosphatidylethanolamine), ceramide or sphingomyelin. The acyl groups in these lipids are preferably acyl groups derived from fatty acids having C₁₀-C₂₄ carbon chains. More preferably the acyl groups are lauroyl, myristoyl, palmitoyl, stearoyl or oleoyl. In particularly preferred embodiments, the noncationic lipid will be 1,2-*sn*-
 5 dioleoylphosphatidylethanolamine, or egg sphingomyelin (ESM).

In one embodiment, the SPLP further comprises a bilayer stabilizing component (BSC). Suitable BSCs include, but are not limited to, polyamide oligomers, peptides, proteins, detergents, lipid-derivatives, PEG-lipids such as PEG coupled to phosphatidylethanolamine, and PEG conjugated to ceramides (*see*, U.S. Patent No.
 10 5,885,613, which is incorporated herein by reference). Preferably, the bilayer stabilizing component is a PEG-lipid, or an ATTA-lipid. In a presently preferred embodiment, the BSC is a conjugated lipid that inhibits aggregation of the SPLPs. Suitable conjugated lipids include, but are not limited to PEG-lipid conjugates, ATTA-lipid conjugates, cationic-polymer-lipid conjugates (CPLs) or mixtures thereof. In a presently preferred embodiment,
 15 the SPLPs comprise either a PEG-lipid conjugate or an ATTA-lipid conjugate together with a CPL.

The CPLs used in the present invention have the following architectural features: (1) a lipid anchor, such as a hydrophobic lipid, for incorporating the CPLs into the lipid bilayer; (2) a hydrophilic spacer, such as a polyethylene glycol, for linking the lipid
 20 anchor to a cationic head group; and (3) a polycationic moiety, such as a naturally occurring amino acid, to produce a protonizable cationic head group. As such, the present invention provides a compound of Formula I:



wherein A, W and Y are as follows.

25 With reference to Formula I, "A" is a lipid moiety such as an amphipathic lipid, a neutral lipid or a hydrophobic lipid that acts as a lipid anchor. Suitable lipid examples include vesicle-forming lipids or vesicle adopting lipids and include, but are not limited to, diacylglycerols, dialkylglycerols, N-N-dialkylaminos, 1,2-diacyloxy-3-aminopropanes and 1,2-dialkyl-3-aminopropanes.

30 "W" is a polymer or an oligomer, such as a hydrophilic polymer or oligomer. Preferably, the hydrophilic polymer is a biocompatible polymer that is nonimmunogenic or possesses low inherent immunogenicity. Alternatively, the hydrophilic polymer can be

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
weakly antigenic if used with appropriate adjuvants. Suitable nonimmunogenic polymers include, but are not limited to, PEG, polyamides, polylactic acid, polyglycolic acid, polylactic acid/polyglycolic acid copolymers and combinations thereof. In a preferred embodiment, the polymer has a molecular weight of about 250 to about 7000 daltons.

5 "Y" is a polycationic moiety. The term polycationic moiety refers to a compound, derivative, or functional group having a positive charge, preferably at least 2 positive charges at a selected pH, preferably physiological pH. Suitable polycationic moieties include basic amino acids and their derivatives such as arginine, asparagine, glutamine, lysine and histidine; spermine; spermidine; cationic dendrimers; polyamines; 10 polyamine sugars; and amino polysaccharides. The polycationic moieties can be linear, such as linear tetralysine, branched or dendrimeric in structure. Polycationic moieties have between about 2 to about 15 positive charges, preferably between about 2 to about 12 positive charges, and more preferably between about 2 to about 8 positive charges at selected pH values. The selection of which polycationic moiety to employ may be determined by the type 15 of liposome application which is desired.

The charges on the polycationic moieties can be either distributed around the entire liposome moiety, or alternatively, they can be a discrete concentration of charge density in one particular area of the liposome moiety *e.g.*, a charge spike. If the charge density is distributed on the liposome, the charge density can be equally distributed or 20 unequally distributed. All variations of charge distribution of the polycationic moiety are encompassed by the present invention.

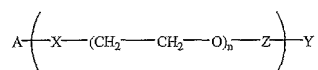
The lipid "A," and the nonimmunogenic polymer "W," can be attached by various methods and preferably, by covalent attachment. Methods known to those of skill in the art can be used for the covalent attachment of "A" and "W." Suitable linkages include, 25 but are not limited to, amide, amine, carboxyl, carbonate, carbamate, ester and hydrazone linkages. It will be apparent to those skilled in the art that "A" and "W" must have complementary functional groups to effectuate the linkage. The reaction of these two groups, one on the lipid and the other on the polymer, will provide the desired linkage. For example, when the lipid is a diacylglycerol and the terminal hydroxyl is activated, for instance with 30 NHS and DCC, to form an active ester, and is then reacted with a polymer which contains an amino group, such as with a polyamide (*see*, U.S. patent Application No. 09/218,988, filed December 22, 1998), an amide bond will form between the two groups.

In certain embodiments, "W" is bound, preferably covalently bound, to "Y". As with "A" and "W", a covalent attachment of "W" to "Y" can be generated by

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
 complementary reactivity of functional groups, one on the polymer and the other on the polycationic moiety. For example, an amine functional group on "W" can be reacted with an activated carboxyl group, such as an acyl chloride or NHS ester, to form an amide. By suitable choice of reactive groups, the desired coupling can be obtained. Other activated carboxyl groups include, but are not limited to, a carboxylic acid, a carboxylate ester, a carboxylic acid halide and other activated forms of carboxylic acids, such as a reactive anhydride. Reactive acid halides include for example, acid chlorides, acid bromides, and acid fluorides.

In certain instances, the polycationic moiety can have a ligand attached, such as a targeting ligand or a chelating moiety for complexing calcium. Preferably, after the ligand is attached, the cationic moiety maintains a positive charge. In certain instances, the ligand that is attached has a positive charge. Suitable ligands include, but are not limited to, a compound or device with a reactive functional group and include lipids, amphipathic lipids, carrier compounds, bioaffinity compounds, biomaterials, biopolymers, biomedical devices, analytically detectable compounds, therapeutically active compounds, enzymes, peptides, proteins, antibodies, immune stimulators, radiolabels, fluorogens, biotin, drugs, haptens, DNA, RNA, polysaccharides, liposomes, virosomes, micelles, immunoglobulins, functional groups, other targeting moieties, or toxins. Suitable chelating moieties for chelating or complexing the endosomal membrane destabilizer are described below.

In certain preferred embodiments, other moieties are incorporated into the compounds of Formula I to form the compounds of Formula II:



II

In Formula II, "A" is a lipid moiety such as, an amphipathic lipid, a neutral lipid or a hydrophobic lipid moiety. Suitable lipid examples include, but are not limited to, diacylglycerolyl, dialkylglycerolyl, N-N-dialkylamino, 1,2-diacyloxy-3-aminopropane and 1,2-dialkyl-3-aminopropane.

In Formula II, "X" is a single bond or a functional group that covalently attaches the lipid to at least one ethylene oxide unit. Suitable functional groups include, but are not limited to, phosphatidylethanolamino, phosphatidylethanolamido, phosphoro, phospho, phosphoethanolamino, phosphoethanolamido, carbonyl, carbamate, carboxyl, carbonate, amido, thioamido, oxygen, NR wherein R is a hydrogen or alkyl group and sulfur.

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
In certain instances, the lipid "A" is directly attached to the ethylene oxide unit by a single bond. The number of ethylene oxide units can range from about 1 to about 160 and preferably from about 6 to about 50.

5 In Formula II, "Z" is a single bound or a functional group that covalently attaches the ethylene oxide unit to the polycationic moiety. Suitable functional groups include, but are not limited to, phospho, phosphoethanolamino, phosphoethanolamido, carbonyl, carbamate, carboxyl, amido, thioamido, NR wherein R is a member selected from the group consisting of hydrogen atom or alkyl group. In certain embodiments, the terminal ethylene oxide unit is directly attached to the polycationic moiety.

10 In Formula II, "Y" is a polycationic moiety as described above in connection with Formula I. In Formula II, the index "n" is an integer ranging in value from about 6 to about 160.

In an illustrative embodiment, compounds of Formula II can be synthesized using a generalized procedure as outlined in **Figure 21**. **Figure 21** illustrates one particular embodiment of the present invention and thus, is merely an example that should not limit the scope of the claims herein. Clearly, one of ordinary skill in the art will recognize many other variations, alternatives, and modifications that can be made to the reaction scheme illustrated in **Figure 21**. With reference to **Figure 21**, a solution of a lipid, such as DSPE, and a base, such as triethylamine in a chloroform solution is added to (t-Boc-NH-PEG₃₄₀₀-CO₂NHS), and the solution is stirred at ambient temperature. The solution is then concentrated under a nitrogen stream to dryness. The residue is then purified by repeated precipitation of the chloroform mixture solution with diethyl ether until disappearance of the lipid using chromatography. The purified CPL conjugate is dissolved in a solvent, followed by addition of TFA, and the solution is stirred at room temperature. The solution can again be concentrated under a nitrogen stream. The residue is then purified by repeated precipitation of the mixture with diethyl ether to offer a lipid-PEG-NH₂, such as a DSPE-PEG-NH₂ or, alternatively, DSPE-CPL-1 with one protonizable cationic head group. The ratio of the phosphoryl-lipid anchor and the distal primary amine can then be measured by phosphate and flourescamine assays as described herein.

25
30 In this illustrative embodiment, the number of protonizable amino groups can be increased to create a polycationic moiety. By incrementally adding stoichiometric amounts of, for example, a N α ,N ϵ -di-t-Boc-L-Lysine N-hydroxysuccinide ester, the polycationic moiety can be increase from about 2 to about 16 positive charges. As describe

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
 previously, the positive charges can be incorporated using any number of suitable

polycationic moieties such as lysine, arginine, asparagine, glutamine, histidine, polyamines and derivatives or combinations thereof. Using the synthesis methods of the present invention, the number of cationic groups, such as amino groups, can be readily controlled during the CPL synthesis.

In addition, as explained above, the endosomal membrane destabilizer can be incorporated into the nucleic acid-lipid particle. In such embodiments, the endosomal membrane destabilizer can be loaded into the nucleic-acid lipid particle using any of a number of different loading techniques (*see*, Examples I and II). Exemplar loading methods are disclosed, for example, in U.S. Patent No. 4,885,172, U.S. Patent No. 5,059,421, and U.S. Patent No. 5,171,578, the teachings of which are incorporated herein by reference. In addition, a particularly preferred ionophore-mediated loading process is disclosed and claimed in U.S. Patent No. 5,837,282, the teachings of which are incorporated herein by reference.

Moreover, as explained above, a chelating moiety suitable for chelating the endosomal membrane destabilizer can be attached, linked or coupled to any of the lipid components of the SPLP, such as the CPL. In a presently preferred embodiment, the chelating moiety is a metal chelator. Metal chelators, such as ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA), ethylenebis(oxyethylenitrilo)-tetraacetic acid (EGTA), 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid, trans-1,2-cyclohexylenediamine-N,N',N''-tetraacetic acid, N⁶-carboxymethyl-N³, N⁹-[2,3-dihydroxy-N-methylpropylcarbamoylmethyl]-3,6,9-triazaundecanedioic acid, N⁶-carboxymethyl-N³, N⁹-bis (methylcarbamoylmethyl)-3,6,9-triazaundecanedioic acid, N³, N⁹-bis (carboxymethyl)-N⁶-3-oxapentamethylene-carbamoylmethyl-3,6,9-triazaundecanedioic acid or N³, N⁶-bis (carboxymethyl)-N⁹[3,3-bis (dihydroxyphosphoryl)-3-hydroxypropyl-carbamoylmethyl]-3,6,9-triazaundecanedioic acid, metal ion transporters, metal ion transport proteins, metal sequestrers, metal chelate ligands, and the like can be used to chelate the endosomal membrane destabilizer. In addition, the metal chelators disclosed in U.S. Patent No. 5,876,695, which is incorporated herein by reference, can also be used.

Other chelators suitable for use in the compositions and methods of the present invention will be known to those of skill in the art.

2. Nucleic Acid Component

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
While the invention is described in the examples with reference to the use of

plasmids, one of skill in the art will understand that the methods described herein are equally applicable to other larger nucleic acids or oligonucleotides. As such, suitable nucleic acids include, but are not limited to, plasmids, antisense oligonucleotides, ribozymes as well as
5 other poly- and oligo-nucleotides.

The nucleic acids which are useful in the present invention (including both the complexes and particles) are typically nucleotide polymers having from 10 to 100,000 nucleotide residues. Typically, the nucleic acids are to be administered to a subject for the purpose of repairing or enhancing the expression of a cellular protein. Additionally, the
10 nucleic acid can carry a label (*e.g.*, radioactive label, fluorescent label or colorimetric label) for the purpose of providing clinical diagnosis relating to the presence or absence of complementary nucleic acids. Accordingly, the nucleic acids, or nucleotide polymers, can be polymers of nucleic acids including genomic DNA, cDNA, mRNA or oligonucleotides containing nucleic acid analogs, for example, the antisense derivatives described in a review
15 by Stein, *et al.*, *Science* **261**:1004-1011 (1993) and in U.S. Patent Nos. 5,264,423 and 5,276,019, the disclosures of which are incorporated herein by reference. Still further, the nucleic acids may encode transcriptional and translational regulatory sequences including promoter sequences and enhancer sequences.

The nucleotide polymers can be single-stranded DNA or RNA, or double-stranded DNA or DNA-RNA hybrids. Examples of double-stranded DNA include structural genes, genes including control and termination regions, and self-replicating systems such as plasmid DNA.

Single-stranded nucleic acids include antisense oligonucleotides (complementary to DNA and RNA), ribozymes and triplex-forming oligonucleotides. In
25 order to increase stability, some single-stranded nucleic acids will preferably have some or all of the nucleotide linkages substituted with stable, nonphosphodiester linkages, including, for example, phosphorothioate, phosphorodithioate, phosphoroselenate, or O-alkyl phosphotriester linkages.

The nucleic acids used in the present invention will also include those nucleic acids in which modifications have been made in one or more sugar moieties and/or in one or more of the pyrimidine or purine bases. Examples of sugar modifications include
30 replacement of one or more hydroxyl groups with halogens, alkyl groups, amines, azido groups or functionalized as ethers or esters. Additionally, the entire sugar may be replaced with sterically and electronically similar structures, including aza-sugars and carbocyclic

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
sugar analogs. Modifications in the purine or pyrimidine base moiety include, for example, alkylated purines and pyrimidines, acylated purines or pyrimidines, or other heterocyclic substitutes known to those of skill in the art.

Multiple genetic sequences can be also used in the present methods. Thus, the sequences for different proteins may be located on one strand or plasmid. Nonencoding sequences may be also be present, to the extent that they are necessary to achieve appropriate expression.

The nucleic acids used in the present method can be isolated from natural sources, obtained from such sources as ATCC or GenBank libraries or prepared by synthetic methods. Synthetic nucleic acids can be prepared by a variety of solution or solid phase methods. Generally, solid phase synthesis is preferred. Detailed descriptions of the procedures for solid phase synthesis of nucleic acids by phosphite-triester, phosphotriester, and H-phosphonate chemistries are widely available. See, for example, Hakura, U.S. Patent No. 4,401,796; Caruthers, *et al.*, U.S. Patent Nos. 4,458,066 and 4,500,707; Beaucage, *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, **22**:1859-1862 (1981); Matteucci, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**:3185-3191 (1981); Caruthers, *et al.*, *Genetic Engineering*, **4**:1-17 (1982); Jones, chapter 2, Atkinson, *et al.*, chapter 3, and Sproat, *et al.*, chapter 4, in *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, Gait (ed.), IRL Press, Washington D.C. (1984); Froehler, *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, **27**:469-472 (1986); Froehler, *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **14**:5399-5407 (1986); Sinha, *et al. Tetrahedron Lett.*, **24**:5843-5846 (1983); and Sinha, *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, **12**:4539-4557 (1984) which are incorporated herein by reference.

a. Vectors for introduction and expression of genes in cells

An important aspect of this invention is the use of the lipid-nucleic acid particles provided herein to introduce selected genes into cells *in vitro* and *in vivo*, followed by expression of the selected gene in the host cell. Thus, the nucleic acids in the particles specifically encompass vectors that are capable of being expressed in a host cell. Promoter, enhancer, stress or chemically-regulated promoters, antibiotic-sensitive or nutrient-sensitive regions, as well as therapeutic protein encoding sequences, may be included as required.

In brief summary, the expression of natural or synthetic nucleic acids is typically achieved by operably linking a nucleic acid of interest to a promoter (which is either constitutive or inducible), incorporating the construct into an expression vector, and introducing the vector into a suitable host cell. Typical vectors contain transcription and translation terminators, transcription and translation initiation sequences, and promoters

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
useful for regulation of the expression of the particular nucleic acid. The vectors optionally
comprise generic expression cassettes containing at least one independent terminator
sequence, sequences permitting replication of the cassette in eukaryotes, or prokaryotes, or
both, (e.g., shuttle vectors) and selection markers for both prokaryotic and eukaryotic
5 systems. Vectors are suitable for replication and integration in prokaryotes, eukaryotes, or
preferably both. See, Gilman and Smith (1979), *Gene*, 8: 81-97; Roberts *et al.* (1987),
Nature, 328: 731-734; Berger and Kimmel, *Guide to Molecular Cloning Techniques*,
Methods in Enzymology, volume 152, Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger);
Sambrook *et al.* (1989), *MOLECULAR CLONING - A LABORATORY MANUAL* (2nd ed.) Vol. 1-
10 3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, N.Y., (Sambrook); and F.M.
Ausubel *et al.*, *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, eds., Current Protocols, a
joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1994
Supplement) (Ausubel). Product information from manufacturers of biological reagents and
experimental equipment also provide information useful in known biological methods. Such
15 manufacturers include the SIGMA chemical company (Saint 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), and
20 Applied Biosystems (Foster City, CA), as well as many other commercial sources known to
one of skill.

Vectors to which foreign nucleic acids are operably linked may be used to
introduce these nucleic acids into host cells and mediate their replication and/or expression.
"Cloning vectors" are useful for replicating and amplifying the foreign nucleic acids and
25 obtaining clones of specific foreign nucleic acid-containing vectors. "Expression vectors"
mediate the expression of the foreign nucleic acid. Some vectors are both cloning and
expression vectors.

In general, the particular vector used to transport a foreign gene into the cell is
not particularly critical. Any of the conventional vectors used for expression in the chosen
30 host cell may be used.

An expression vector typically comprises a eukaryotic transcription unit or
"expression cassette" that contains all the elements required for the expression of exogenous
genes in eukaryotic cells. A typical expression cassette contains a promoter operably linked

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
to the DNA sequence encoding a desired protein and signals required for efficient
polyadenylation of the transcript.

Eukaryotic promoters typically contain two types of recognition sequences,
the TATA box and upstream promoter elements. The TATA box, located 25-30 base pairs
5 upstream of the transcription initiation site, is thought to be involved in directing RNA
polymerase to begin RNA synthesis. The other upstream promoter elements determine the
rate at which transcription is initiated.

Enhancer elements can stimulate transcription up to 1,000 fold from linked
homologous or heterologous promoters. Enhancers are active when placed downstream or
10 upstream from the transcription initiation site. Many enhancer elements derived from viruses
have a broad host range and are active in a variety of tissues. For example, the SV40 early
gene enhancer is suitable for many cell types. Other enhancer/promoter combinations that
are suitable for the present invention include those derived from polyoma virus, human or
murine cytomegalovirus, the long term repeat from various retroviruses such as murine
15 leukemia virus, murine or Rous sarcoma virus and HIV. See, *Enhancers and Eukaryotic
Expression*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1983, which is incorporated
herein by reference.

In addition to a promoter sequence, the expression cassette should also contain
a transcription termination region downstream of the structural gene to provide for efficient
20 termination. The termination region may be obtained from the same source as the promoter
sequence or may be obtained from a different source.

If the mRNA encoded by the selected structural gene is to be efficiently
translated, polyadenylation sequences are also commonly added to the vector construct. Two
distinct sequence elements are required for accurate and efficient polyadenylation: GU or U
25 rich sequences located downstream from the polyadenylation site and a highly conserved
sequence of six nucleotides, AAUAAA, located 11-30 nucleotides upstream. Termination
and polyadenylation signals that are suitable for the present invention include those derived
from SV40, or a partial genomic copy of a gene already resident on the expression vector.

In addition to the elements already described, the expression vector of the
30 present invention may typically contain other specialized elements intended to increase the
level of expression of cloned nucleic acids or to facilitate the identification of cells that carry
the transduced DNA. For instance, a number of animal viruses contain DNA sequences that
promote the extra chromosomal replication of the viral genome in permissive cell types.
Plasmids bearing these viral replicons are replicated episomally as long as the appropriate

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
factors are provided by genes either carried on the plasmid or with the genome of the host cell.

5 The expression vectors of the present invention will typically contain both prokaryotic sequences that facilitate the cloning of the vector in bacteria as well as one or more eukaryotic transcription units that are expressed only in eukaryotic cells, such as mammalian cells. The prokaryotic sequences are preferably chosen such that they do not interfere with the replication of the DNA in eukaryotic cells.

10 Selected genes are normally be expressed when the DNA sequence is functionally inserted into a vector. "Functionally inserted" means that it is inserted in proper reading frame and orientation and operably linked to proper regulatory elements. Typically, a gene will be inserted downstream from a promoter and will be followed by a stop codon, although production as a hybrid protein followed by cleavage may be used, if desired.

15 Expression vectors containing regulatory elements from eukaryotic viruses such as retroviruses are typically used. SV40 vectors include pSVT7 and pMT2. Vectors derived from bovine papilloma virus include pBV-1MTHA, and vectors derived from Epstein Bar virus include pHEBO, and p2O5. Other exemplary vectors include pMSG, pAV009/A⁺, pMTO10/A⁺, pMAMneo-5, baculovirus pDSVE, and any other vector allowing expression of proteins under the direction of the SV-40 early promoter, SV-40 later promoter, metallothionin promoter, murine mammary tumor virus promoter, Rous sarcoma virus promoter, polyhedrin promoter, or other promoters shown effective for expression in eukaryotic cells.

20 While a variety of vectors may be used, it should be noted that viral vectors such as retroviral vectors are useful for modifying eukaryotic cells because of the high efficiency with which the retroviral vectors transfect target cells and integrate into the target cell genome. Additionally, the retroviruses harboring the retroviral vector are capable of infecting cells from a wide variety of tissues.

25 In addition to the retroviral vectors mentioned above, cells may be lipofected with adeno-associated viral vectors. See, e.g., *Methods in Enzymology*, Vol. 185, Academic Press, Inc., San Diego, CA (D.V. Goeddel, ed.) (1990) or M. Krieger (1990), *Gene Transfer and Expression -- A Laboratory Manual*, Stockton Press, New York, NY, and the references cited therein. Adeno associated viruses (AAVs) require helper viruses such as adenovirus or herpes virus to achieve productive infection. In the absence of helper virus functions, AAV integrates (site-specifically) into a host cell's genome, but the integrated AAV genome has no pathogenic effect. The integration step allows the AAV genome to remain genetically intact

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
until the host is exposed to the appropriate environmental conditions (e.g., a lytic helper virus), whereupon it re-enters the lytic life-cycle. Samulski (1993), *Current Opinion in Genetic and Development*, 3: 74-80, and the references cited therein provides an overview of the AAV life cycle. See also West et al. (1987), *Virology*, 160: 38-47; Carter et al. (1989), U.S. Patent No. 4,797,368; Carter et al. (1993), WO 93/24641; Kotin (1994), *Human Gene Therapy*, 5: 793-801; Muzyczka (1994), *J. Clin. Invest.*, 94: 1351 and Samulski, *supra*, for an overview of AAV vectors.

Plasmids designed for producing recombinant vaccinia, such as pGS62, (Langford, C. L. et al. (1986), *Mol. Cell. Biol.*, 6:3191-3199) may also be used. This plasmid consists of a cloning site for insertion of foreign nucleic acids, the P7.5 promoter of vaccinia to direct synthesis of the inserted nucleic acid, and the vaccinia TK gene flanking both ends of the foreign nucleic acid.

Whatever the vector is used, generally the vector is genetically engineered to contain, in expressible form, a gene of interest that encodes a gene product of interest. Suitable classes of gene products include, but are not limited to, cytotoxic/suicide genes, immunomodulators, cell receptor ligands, tumor suppressors, and anti-angiogenic genes. The particular gene selected will depend on the intended purpose or treatment. Examples of such genes of interest are described below and throughout the specification. Cytotoxic/suicide genes are those genes that are capable of killing cells, causing apoptosis, or arresting cells in the cell cycle. Such genes include, but are not limited to, genes for immunotoxins, thymidine kinase, a cytochrome P450 2B1, a deoxycytidine kinase, or a cytosine deaminase. Agents such as acyclovir and ganciclovir (for thymidine kinase), cyclophosphamide (for cytochrome P450 2B1), 5-fluorocytosine (for cytosine deaminase), are typically administered systemically in conjunction (e.g., simulatenously or nonsimulatenously) with the lipid-nucleic compositions of the present invention to achieve the desired cytotoxic or cytostatic effect. Immunomodulator genes are genes that modulate one or more immune responses. Examples of immunomodulator genes include cytokines such as growth factors (e.g., TGF- α , TGF- β , EGF, PGF, IGF, NGF, PDGF, CGF, GM-CSF, SCF, etc.), interleukins (e.g., IL-2, IL-12, IL-15, IL-20, etc.), interferons (e.g., IFN- α , IFN- β , IFN- γ , etc.) and TNF. Cell receptor ligands include ligands that are able to bind to cell surface receptors (e.g., insulin receptor, EPO receptor, G-protein coupled receptors, receptors with tyrosine kinase activity, cytokine receptors, growth factor receptors, etc.), to modulate (e.g., inhibit, activate, etc.) the physiological pathway that the receptor is involved in (e.g., glucose level modulation, blood cell development, mitogenesis, etc.). Examples of cell receptor ligands include cytokines,

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
growth factors, interleukins, interferons, erythropoietin (EPO), insulin, glucagon, G-protein
coupled receptor ligands, etc.). Tumor suppressor genes are genes that are able to inhibit the
growth of a cell, particularly tumor cells. Thus, delivery of these genes to tumor cells is
useful in the treatment of cancers. Tumor suppressor genes include, but are not limited to,
5 p53 (Lamb *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 6:1379-1385 (1986), Ewen *et al.*, *Science* 255:85-87
(1992), Ewen *et al.* (1991) *Cell* 66:1155-1164, and Hu *et al.*, *EMBO J.* 9:1147-1155 (1990)),
RB1 (Toguchida *et al.* (1993) *Genomics* 17:535-543), WT1 (Hastie, N. D., *Curr. Opin.*
Genet. Dev. 3:408-413 (1993)), NF1 (Trafatter *et al.*, *Cell* 72:791-800 (1993), Cawthon *et al.*,
10 *Cell* 62:193-201 (1990)), VHL (Latif *et al.*, *Science* 260:1317-1320 (1993)) and APC
(Gorden *et al.*, *Cell* 66:589-600 (1991)). Anti-angiogenic genes are able to inhibit
angiogenesis. These genes are particularly useful for treating those cancers in which
angiogenesis plays a role in the pathological development of the disease. Examples of anti-
angiogenic genes include, but are not limited to, endostatin (see e.g., U.S. Patent No.
6,174,861) and angiostatin (see, e.g., U.S. Patent No. 5,639,725).

15 The vectors further usually comprise selectable markers which result in
nucleic acid amplification such as the sodium, potassium ATPase, thymidine kinase,
aminoglycoside phosphotransferase, hygromycin B phosphotransferase, xanthine-guanine
phosphoribosyl transferase, CAD (carbamyl phosphate synthetase, aspartate
transcarbamylase, and dihydroorotase), adenosine deaminase, dihydrofolate reductase, and
20 asparagine synthetase and ouabain selection. Alternatively, high yield expression systems
not involving nucleic acid amplification are also suitable, such as using a baculovirus vector
in insect cells, with the encoding sequence under the direction of the polyhedrin promoter or
other strong baculovirus promoters.

When nucleic acids other than plasmids are used the nucleic acids can contain
25 nucleic acid analogs, for example, the antisense derivatives described in a review by Stein, *et*
al., *Science* 261:1004-1011 (1993) and in U.S. Patent Nos. 5,264,423 and 5,276,019, the
disclosures of which are incorporated herein by reference.

Unlike viral-based gene therapy vectors which can only incorporate a
relatively small nonviral nucleic acid sequence into the viral genome because of size
30 limitations for packaging virion particles, the lipid-nucleic acid complexes of the present
invention may be used to transfer large (e.g., 50-5,000 kilobase) exogenous nucleic acids into
cells. This aspect of lipofection is particularly advantageous since many genes which may be
targets for gene therapy span over 100 kilobases (e.g., amyloid precursor protein (APP) gene,

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
Huntington's chorea gene) and large homologous targeting constructs or transgenes may be required for therapy.

Cells can be lipofected with an exogenous nucleic acid at high efficiency and with cell type specificity by contacting the cells with a receptor-recognition transfection complex comprising: (1) an exogenous nucleic acid, (2) a receptor-ligand protein ("rlp") which is covalently linked to a polycation, and (3) a cationic or neutral lipid. It has been found that a combination of a polycation-linked receptor-recognition protein and a suitable cationic (or neutral) lipid can be used to transfect nucleic acids, and that the combination retains cell type targeting specificity conferred by the receptor-recognition protein and also exhibits high efficiency transfection conferred, in part, by the inclusion of a cationic lipid, neutral lipid, or lipopolyamine.

The exogenous nucleic acid is typically dsDNA, ssDNA, ssRNA, dsRNA; most typically the exogenous nucleic acid is dsDNA such as a cloned DNA sequence in a cloning vector such as a plasmid or viral genome. Multiple species of exogenous nucleic acid may be combined in a transfection complex, such as for co-transfection of unlinked nucleic acid sequences or to accomplish *in vivo* homologous recombination shuffling. Frequently, the exogenous nucleic acid(s) are not capable of autonomous replication in cells which incorporate the transfection complex, and are either transiently expressed or are stably integrated into a host cell chromosome by homologous recombination or nonhomologous integration. Often at least one selectable marker (*e.g.*, a *neo^R* expression cassette) is included in the exogenous nucleic acid(s) to facilitate selection of cells which have incorporated the exogenous nucleic acid(s). Typically, an exogenous nucleic acid comprises a structural gene encoding a polypeptide to be expressed in a target cell which has incorporated the exogenous nucleic acid, and the structural gene usually is operably linked to appropriate cis-acting regulatory elements (*e.g.*, promoter, enhancer, polyadenylation site). Although gene therapy may be performed in a variety of ways, a typical receptor-recognition lipofection complex comprises a nucleic acid which comprises at least one transcriptional unit.

The lipid nucleic acid particles of the invention can be designed to contain, in addition to the species of nucleic acid, a receptor-recognition molecule (rlm), such as a protein. The rlm can be covalently bound to lipids that comprise the nucleic acid-lipid particle. Its presence on the particle increases the efficiency and specificity with the particle contacts and enters target cells. For example, a suitable rlm is a nonimmunoglobulin protein that binds to a cell surface receptor of a target cell which mediates internalization of a transfection complex comprising the rlm-polycation conjugate by, for example, the process of

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
endocytosis and/or membrane fusion. Additional suitable rlm species typically are naturally-occurring physiological ligands which comprise a polypeptide portion (*e.g.*, adhesion molecules such as ICAM-1, ICAM-2, ELAM-1, VCAM-1). Viral proteins (*e.g.*, spike glycoproteins) which bind to viral receptors on eukaryotic cells and mediate virus

5 internalization may also be used as rlm species for forming rlm-polycation conjugates. Examples also include viral glycoproteins which attach to cell surface receptors and lead to internalization and/or membrane fusion include the gB, gC, gD, gE, gH, and gI virion glycoproteins of HSV-1, and gp120 of HIV-1.

Fragments and analogs of naturally-occurring proteins may be used as well as
10 full-length mature proteins as rlm species in forming transfection complexes of the invention. For example, fragments, analogs, and fusion proteins comprising a portion of an adhesion molecule or virion attachment protein which mediates attachment to a target cell may be used as rlm species without other portions of the naturally-occurring full-length protein that are not essential for cell attachment and/or membrane fusion. Thus, for example, a cytoplasmic tail
15 peptide portion of a virion glycoprotein usually may be omitted and the resultant protein may still serve as a suitable rlm.

The rlm selected will vary with the particular target cell type. For specific targeting to hepatocytes, asialoglycoproteins (galactose-terminal) are preferred as rlm species. Examples of asialoglycoproteins include asialoorosomucoid, asialofetuin, and
20 desialylated vesicular stomatitis virus virion proteins. These can be formed by chemical or enzymatic desialylation of those glycoproteins that possess terminal sialic acid and penultimate galactose residues. Alternatively, rlm species suitable for forming lipofection complexes that selectively target hepatocytes may be created by coupling lactose or other galactose-terminal carbohydrates (*e.g.*, arabinogalactan) to nongalactose-bearing proteins by
25 reductive lactosamination. Other useful galactose-terminal carbohydrates for hepatocyte targeting include carbohydrate trees obtained from natural glycoproteins, especially tri- and tetra-antennary structures that contain either terminal galactose residues or that can be enzymatically treated to expose terminal galactose residues. For targeting macrophages, endothelial cells, or lymphocytes, rlm species comprising mannose or mannose-6-phosphate,
30 or complex carbohydrates comprising these terminal carbohydrate structures may be used.

Since a variety of different cell surface receptors exist on the surfaces of mammalian cells, cell-specific targeting of nucleic acids to nonhepatic cells can involve lipofection complexes that comprise various rlm species. For example, transferrin can be used as a suitable rlm for forming receptor-recognition transfection complexes to cells

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
expressing transferrin receptors. Other receptor ligands such as polypeptide hormones (e.g., growth hormone, PDGF, FGF, EGF, insulin, IL-2, IL-4, etc.) may be used to localize receptor-recognition transfection complexes to cells expressing the cognate receptor.

The nucleic acid-lipid particles may comprise multiple rlm species.

- 5 Frequently, an agent having membrane fusion activity (e.g., influenza virus hemagglutinin, HSV-1 gB and gD) is used as an rlm for forming rlm-polycation complexes, either alone or in combination with other rlm species, typically with those which lack membrane fusion activity.

These transfection methods generally comprise the steps of: (1) forming a
10 nucleic acid-lipid-rlm particle consisting essentially of an exogenous nucleic acid, a polycation conjugate consisting essentially of a polycation linked to a nonimmunoglobulin receptor-recognition molecule that binds to a predetermined cell surface receptor, and a lipid component consisting essentially of a neutral or cationic lipid (optionally including a quaternary ammonium detergent and/or a lipopolyamine), and (2) contacting cells expressing
15 the predetermined cell surface receptor with a composition comprising the receptor-recognition transfection complex under physiological transfection conditions which permit uptake of the exogenous nucleic acid into said cells. In alternative embodiments, the rlm is attached to the polycation by covalent linkage, frequently by covalent linkage through a crosslinking agent or by peptide linkage.

20 III. Preparation of SPLPs and SPLP-CPLs and Sizing

In one embodiment, the present invention provides lipid-nucleic acid particles produced via hydrophobic nucleic acid-lipid intermediate complexes. The complexes are preferably charge-neutralized. Manipulation of these complexes in either detergent-based or organic solvent-based systems can lead to particle formation in which the nucleic acid is
25 protected.

The present invention provides a method of preparing serum-stable plasmid-lipid particles in which the plasmid or other nucleic acid is encapsulated in a lipid bilayer and is protected from degradation. Additionally, the particles formed in the present invention are preferably neutral or negatively-charged at physiological pH. For *in vivo* applications,
30 neutral particles are advantageous, while for *in vitro* applications the particles are more preferably negatively charged. This provides the further advantage of reduced aggregation over the positively-charged liposome formulations in which a nucleic acid can be encapsulated in cationic lipids.

WO 01/80900

PCT/CA01/00555

The particles made by the methods of this invention have a size of about 50 to about 150 nm, with a majority of the particles being about 65 to 85 nm. The particles can be formed by either a detergent dialysis method or by a modification of a reverse-phase method which utilizes organic solvents to provide a single phase during mixing of the components.

- 5 Without intending to be bound by any particular mechanism of formation, a plasmid or other nucleic acid is contacted with a detergent solution of cationic lipids to form a coated plasmid complex. These coated plasmids can aggregate and precipitate. However, the presence of a detergent reduces this aggregation and allows the coated plasmids to react with excess lipids (typically, noncationic lipids) to form particles in which the plasmid or other nucleic acid is
10 encapsulated in a lipid bilayer. The methods described below for the formation of plasmid-lipid particles using organic solvents follow a similar scheme.

In some embodiments, the particles are formed using detergent dialysis. Thus, the present invention provides a method for the preparation of serum-stable plasmid-lipid particles, comprising:

- 15 (a) combining a plasmid with cationic lipids in a detergent solution to form a coated plasmid-lipid complex;
(b) contacting noncationic lipids with the coated plasmid-lipid complex to form a detergent solution comprising a plasmid-lipid complex and noncationic lipids; and
20 (c) dialyzing the detergent solution of step (b) to provide a solution of serum-stable plasmid-lipid particles, wherein the plasmid is encapsulated in a lipid bilayer and the particles are serum-stable and have a size of from about 50 to about 150 nm.

An initial solution of coated plasmid-lipid complexes is formed by combining the plasmid
25 with the cationic lipids in a detergent solution.

In these embodiments, the detergent solution is preferably an aqueous solution of a neutral detergent having a critical micelle concentration of 15-300 mM, more preferably 20-50 mM. Examples of suitable detergents include, for example, N,N'-((octanoylimino)-bis(trimethylene))-bis-(D-gluconamide) (BIGCHAP); BRIJ 35; Deoxy-BIGCHAP;
30 dodecylpoly(ethylene glycol) ether; Tween 20; Tween 40; Tween 60; Tween 80; Tween 85; Mega 8; Mega 9; Zwittergent[®] 3-08; Zwittergent[®] 3-10; Triton X-405; hexyl-, heptyl-, octyl- and nonyl- β -D-glucopyranoside; and heptylthioglucopyranoside; with octyl β -D-glucopyranoside and Tween-20 being the most preferred. The concentration of detergent in

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
the detergent solution is typically about 100 mM to about 2 M, preferably from about 200
mM to about 1.5 M.

The cationic lipids and plasmid will typically be combined to produce a charge ratio (+/-) of about 1:1 to about 20:1, preferably in a ratio of about 1:1 to about 12:1, and more preferably in a ratio of about 2:1 to about 6:1. Additionally, the overall concentration of plasmid in solution will typically be from about 25 µg/mL to about 1 mg/mL, preferably from about 25 µg/mL to about 200 µg/mL, and more preferably from about 50 µg/mL to about 100 µg/mL. The combination of plasmids and cationic lipids in detergent solution is kept, typically at room temperature, for a period of time which is sufficient for the coated complexes to form. Alternatively, the plasmids and cationic lipids can be combined in the detergent solution and warmed to temperatures of up to about 37°C. For plasmids which are particularly sensitive to temperature, the coated complexes can be formed at lower temperatures, typically down to about 4°C.

In a preferred embodiment, the nucleic acid to lipid ratios (mass/mass ratios) in a formed SPLP will range from about 0.01 to about 0.08. The ratio of the starting materials also falls within this range because the purification step typically removes the unencapsulated nucleic acid as well as the empty liposomes. In another preferred embodiment, the SPLP preparation uses about 400 µg nucleic acid per 10 mg total lipid or a nucleic acid to lipid ratio of about 0.01 to about 0.08 and, more preferably, about 0.04, which corresponds to 1.25 mg of total lipid per 50 µg of nucleic acid.

The detergent solution of the coated plasmid-lipid complexes is then contacted with noncationic lipids to provide a detergent solution of plasmid-lipid complexes and noncationic lipids. The noncationic lipids which are useful in this step include, diacylphosphatidylcholine, diacylphosphatidylethanolamine, ceramide, sphingomyelin, cephalin, cardiolipin, and cerebroside. In preferred embodiments, the noncationic lipids are diacylphosphatidylcholine, diacylphosphatidylethanolamine, ceramide or sphingomyelin. The acyl groups in these lipids are preferably acyl groups derived from fatty acids having C₁₀-C₂₄ carbon chains. More preferably the acyl groups are lauroyl, myristoyl, palmitoyl, stearoyl or oleoyl. In particularly preferred embodiments, the noncationic lipid will be 1,2-*sn*-dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE), palmitoyl oleoyl phosphatidylcholine (POPC) or egg phosphatidylcholine (EPC). In the most preferred embodiments, the plasmid-lipid particles will be fusogenic particles with enhanced properties *in vivo* and the noncationic lipid will be DOPE. In other preferred embodiments, the noncationic lipids will further comprise

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
polyethylene glycol-based polymers such as PEG 2000, PEG 5000 and polyethylene glycol
conjugated to ceramides, as described in co-pending USSN 08/316,429, incorporated herein
by reference.

The amount of noncationic lipid which is used in the present methods is
5 typically about 2 to about 20 mg of total lipids to 50 µg of plasmid. Preferably the amount of
total lipid is from about 5 to about 10 mg per 50 µg of plasmid.

Following formation of the detergent solution of plasmid-lipid complexes and
noncationic lipids, the detergent is removed, preferably by dialysis. The removal of the
detergent results in the formation of a lipid-bilayer which surrounds the plasmid providing
10 serum-stable plasmid-lipid particles which have a size of from about 50 nm to about 150 nm.
The particles thus formed do not aggregate and are optionally sized to achieve a uniform
particle size.

The serum-stable plasmid-lipid particles can be sized by any of the methods
available for sizing liposomes. The sizing may be conducted in order to achieve a desired
15 size range and relatively narrow distribution of particle sizes.

Several techniques are available for sizing the particles to a desired size. One
sizing method, used for liposomes and equally applicable to the present particles is described
in U.S. Patent No. 4,737,323, incorporated herein by reference. Sonicating a particle
suspension either by bath or probe sonication produces a progressive size reduction down to
20 particles of less than about 50 nm in size. Homogenization is another method which relies on
shearing energy to fragment larger particles into smaller ones. In a typical homogenization
procedure, particles are recirculated through a standard emulsion homogenizer until selected
particle sizes, typically between about 60 and 80 nm, are observed. In both methods, the
particle size distribution can be monitored by conventional laser-beam particle size
25 discrimination, or QELS.

Extrusion of the particles through a small-pore polycarbonate membrane or an
asymmetric ceramic membrane is also an effective method for reducing particle sizes to a
relatively well-defined size distribution. Typically, the suspension is cycled through the
membrane one or more times until the desired particle size distribution is achieved. The
30 particles may be extruded through successively smaller-pore membranes, to achieve a gradual
reduction in size.

In another group of embodiments, the present invention provides a method for
the preparation of serum-stable plasmid-lipid particles, comprising;

WO 01/80900 PCT/CA01/00555

- (a) preparing a mixture comprising cationic lipids and noncationic lipids in an organic solvent;
- (b) contacting an aqueous solution of nucleic acid with said mixture in step (a) to provide a clear single phase; and
- 5 (c) removing said organic solvent to provide a suspension of plasmid-lipid particles, wherein said plasmid is encapsulated in a lipid bilayer, and said particles are stable in serum and have a size of from about 50 to about 150 nm.

The plasmids (or nucleic acids), cationic lipids and noncationic lipids which are useful in this group of embodiments are as described for the detergent dialysis methods

10 above.

The selection of an organic solvent will typically involve consideration of solvent polarity and the ease with which the solvent can be removed at the later stages of particle formation. The organic solvent, which is also used as a solubilizing agent, is in an amount sufficient to provide a clear single phase mixture of plasmid and lipids. Suitable

15 solvents include chloroform, dichloromethane, diethylether, cyclohexane, cyclopentane, benzene, toluene, methanol, or other aliphatic alcohols such as propanol, isopropanol, butanol, tert-butanol, iso-butanol, pentanol and hexanol. Combinations of two or more solvents may also be used in the present invention.

Contacting the plasmid with the organic solution of cationic and noncationic

20 lipids is accomplished by mixing together a first solution of plasmid, which is typically an aqueous solution and a second organic solution of the lipids. One of skill in the art will understand that this mixing can take place by any number of methods, for example by mechanical means such as by using vortex mixers.

After the plasmid has been contacted with the organic solution of lipids, the

25 organic solvent is removed, thus forming an aqueous suspension of serum-stable plasmid-lipid particles. The methods used to remove the organic solvent will typically involve evaporation at reduced pressures or blowing a stream of inert gas (*e.g.*, nitrogen or argon) across the mixture.

The serum-stable plasmid-lipid particles thus formed will typically be sized

30 from about 50 nm to 150 nm. To achieve further size reduction or homogeneity of size in the particles, sizing can be conducted as described above.

In other embodiments, the methods will further comprise adding nonlipid polycations which are useful to effect the transformation of cells using the present compositions. Examples of suitable nonlipid polycations include, hexadimethrine bromide

WO 01/80900 (sold under the brandname POLYBRENE[®], from Aldrich Chemical Co., Milwaukee, PCT/CA01/00555 Wisconsin, USA) or other salts of hexadimethrine. Other suitable polycations include, for example, salts of poly-L-ornithine, poly-L-arginine, poly-L-lysine, poly-D-lysine, polyallylamine and polyethyleneimine.

5 In other embodiments, the polyoxyethylene conjugates which are used in the plasmid-lipid particles of the present invention can be prepared by combining the conjugating group (*i.e.* phosphatidic acid or phosphatidylethanolamine) with an appropriately functionalized polyoxyethylene derivative. For example, phosphatidylethanolamine can be combined with polyoxyethylene bis(*p*-toluenesulfonate) to provide a
10 phosphatidylethanolamine-polyoxyethylene conjugate. See, Woodle, *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **1105**:193-200 (1992), incorporated herein by reference.

In certain embodiments, the formation of the lipid-nucleic acid complexes can be carried out either in a monophasic system (*e.g.*, a Bligh and Dyer monophasic or similar mixture of aqueous and organic solvents) or in a two phase system with suitable mixing.

15 When formation of the complexes is carried out in a monophasic system, the cationic lipids and nucleic acids are each dissolved in a volume of the monophasic mixture. Combination of the two solutions provides a single mixture in which the complexes form. Alternatively, the complexes can form in two-phase mixtures in which the cationic lipids bind to the nucleic acid (which is present in the aqueous phase), and "pull" it in to the organic
20 phase.

In another embodiment, the present invention provides a method for the preparation of lipid-nucleic acid particles, comprising:

- (a) contacting nucleic acids with a solution comprising noncationic lipids and a detergent to form a nucleic acid-lipid mixture;
- 25 (b) contacting cationic lipids with the nucleic acid-lipid mixture to neutralize a portion of the negative charge of the nucleic acids and form a charge-neutralized mixture of nucleic acids and lipids; and
- (c) removing the detergent from the charge-neutralized mixture to provide the lipid-nucleic acid particles in which the nucleic acids are protected from degradation.

30 In one group of embodiments, the solution of noncationic lipids and detergent is an aqueous solution. Contacting the nucleic acids with the solution of noncationic lipids and detergent is typically accomplished by mixing together a first solution of nucleic acids and a second solution of the lipids and detergent. One of skill in the art will understand that this mixing can take place by any number of methods, for example by mechanical means

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
such as by using vortex mixers. Preferably, the nucleic acid solution is also a detergent
solution. The amount of noncationic lipid which is used in the present method is typically
determined based on the amount of cationic lipid used, and is typically of from about 0.2 to 5
times the amount of cationic lipid, preferably about 0.5 to 2 times the amount of cationic lipid
5 used.

The nucleic acid-lipid mixture thus formed is contacted with cationic lipids to
neutralize a portion of the negative charge which is associated with the nucleic acids (or other
polyanionic materials) present. The amount of cationic lipids used will typically be sufficient
to neutralize at least 50% of the negative charge of the nucleic acid. Preferably, the negative
10 charge will be at least 70% neutralized, more preferably at least 90% neutralized. Cationic
lipids which are useful in the present invention, include, for example, DODAC, DOTMA,
DDAB, DOTAP, DC-Chol and DMRIE. These lipids and related analogs have been
described in co-pending USSN 08/316,399; U.S. Patent Nos. 5,208,036, 5,264,618, 5,279,833
and 5,283,185, the disclosures of which are incorporated herein by reference. Additionally, a
15 number of commercial preparations of cationic lipids are available and can be used in the
present invention. These include, for example, LIPOFECTIN® (commercially available
cationic liposomes comprising DOTMA and DOPE, from GIBCO/BRL, Grand Island, New
York, USA); LIPOFECTAMINE® (commercially available cationic liposomes comprising
DOSPA and DOPE, from GIBCO/BRL); and TRANSFECTAM® (commercially available
20 cationic lipids comprising DOGS in ethanol from Promega Corp., Madison, Wisconsin,
USA).

Contacting the cationic lipids with the nucleic acid-lipid mixture can be
accomplished by any of a number of techniques, preferably by mixing together a solution of
the cationic lipid and a solution containing the nucleic acid-lipid mixture. Upon mixing the
25 two solutions (or contacting in any other manner), a portion of the negative charge associated
with the nucleic acid is neutralized. Nevertheless, the nucleic acid remains in an
uncondensed state and acquires hydrophilic characteristics.

After the cationic lipids have been contacted with the nucleic acid-lipid
mixture, the detergent (or combination of detergent and organic solvent) is removed, thus
30 forming the lipid-nucleic acid particles. The methods used to remove the detergent will
typically involve dialysis. When organic solvents are present, removal is typically
accomplished by evaporation at reduced pressures or by blowing a stream of inert gas (*e.g.*,
nitrogen or argon) across the mixture.

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
The particles thus formed will typically be sized from about 100 nm to several microns. To achieve further size reduction or homogeneity of size in the particles, the lipid-nucleic acid particles can be sonicated, filtered or subjected to other sizing techniques which are used in liposomal formulations and are known to those of skill in the art.

5 In other embodiments, the methods will further comprise adding nonlipid polycations which are useful to effect the lipofection of cells using the present compositions. Examples of suitable nonlipid polycations include, hexadimethrine bromide (sold under the brandname POLYBRENE[®], from Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin, USA) or other salts of hexadimethrine. Other suitable polycations include, for example, salts of poly-10 L-ornithine, poly-L-arginine, poly-L-lysine, poly-D-lysine, polyallylamine and polyethyleneimine. Addition of these salts is preferably after the particles have been formed.

In another aspect, the present invention provides methods for the preparation of lipid-nucleic acid particles, comprising:

- 15 (a) contacting an amount of cationic lipids with nucleic acids in a solution; the solution comprising of from about 15-35% water and about 65-85% organic solvent and the amount of cationic lipids being sufficient to produce a +/- charge ratio of from about 0.85 to about 2.0, to provide a hydrophobic, charge-neutralized lipid-nucleic acid complex;
- (b) contacting the hydrophobic, charge-neutralized lipid-nucleic acid complex in solution with noncationic lipids, to provide a lipid-nucleic acid mixture; and
- 20 (c) removing the organic solvents from the lipid-nucleic acid mixture to provide lipid-nucleic acid particles in which the nucleic acids are protected from degradation.

The nucleic acids, noncationic lipids, cationic lipids and organic solvents which are useful in this aspect of the invention are the same as those described for the methods above which used detergents. In one group of embodiments, the solution of step (a) 25 is a monophasic. In another group of embodiments, the solution of step (a) is two-phase.

In preferred embodiments, the cationic lipids are DODAC, DDAB, DOTMA, DOSPA, DMRIE, DOGS or combinations thereof. In other preferred embodiments, the noncationic lipids are ESM, DOPE, polyethylene glycol-based polymers (*e.g.*, PEG 2000, PEG 5000, PEG-modified phospholipids or PEG-modified ceramides) or combinations 30 thereof. In still other preferred embodiments, the organic solvents are methanol, chloroform, methylene chloride, ethanol, diethyl ether or combinations thereof.

In a particularly preferred embodiment, the nucleic acid is a plasmid; the cationic lipid is DODAC, DDAB, DOTMA, DOSPA, DMRIE, DOGS or combinations thereof; the noncationic lipid is ESM, DOPE, polyethylene glycol-based polymers or

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
combinations thereof; and the organic solvent is methanol, chloroform, methylene chloride,
ethanol, diethyl ether or combinations thereof.

As above, contacting the nucleic acids with the cationic lipids is typically
accomplished by mixing together a first solution of nucleic acids and a second solution of the
5 lipids, preferably by mechanical means such as by using vortex mixers. The resulting
mixture contains complexes as described for one aspect of the invention above. These
complexes are then converted to particles by the addition of noncationic lipids and the
removal of the organic solvent. The addition of the noncationic lipids is typically
accomplished by simply adding a solution of the noncationic lipids to the mixture containing
10 the complexes. A reverse addition can also be used. Subsequent removal of organic solvents
can be accomplished by methods known to those of skill in the art and also described above.

The amount of noncationic lipids which is used in this aspect of the invention
is typically an amount of from about 0.2 to 5 times the amount (on a mole basis) of cationic
lipids which was used to provide the charge-neutralized lipid-nucleic acid complex.
15 Preferably, the amount is from 0.5 to 2 times the amount of cationic lipids used.

In yet another aspect, the present invention provides lipid-nucleic acid
particles which are prepared by the methods described above. In these embodiments, the
lipid-nucleic acid particles are either net charge neutral or carry an overall charge which
provides the particles with greater gene lipofection activity. Preferably, the nucleic acid
20 component of the particles is a nucleic acid which encodes a desired protein or blocks the
production of an undesired protein. In particularly preferred embodiments, the nucleic acid is
a plasmid, the noncationic lipid is egg sphingomyelin and the cationic lipid is DODAC.

A variety of general methods for making SPLP-CPLs (CPL-containing
SPLPs) are discussed herein. Two general techniques include "post-insertion" technique, that
25 is, insertion of a CPL into for example, a pre-formed SPLP, and the "standard" technique,
wherein the CPL is included in the lipid mixture during for example, the SPLP formation
steps. The post-insertion technique results in SPLPs having CPLs mainly in the external face
of the SPLP bilayer membrane, whereas standard techniques provide SPLPs having CPLs on
both internal and external faces.

30 In particular, "post-insertion" involves forming SPLPs (by any method), and
incubating the pre-formed SPLPs in the presence of CPL under appropriate conditions
(preferably 2-3 hours at 60°C). Between 60-80% of the CPL can be inserted into the external
leaflet of the recipient vesicle, giving final concentrations up to about 5 to 10 mol % (relative

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
to total lipid). The method is especially useful for vesicles made from phospholipids (which can contain cholesterol) and also for vesicles containing PEG-lipids (such as PEG-Ceramide).

In an example of a "standard" technique, the CPL-SPLPs of the present invention can be formed by extrusion. In this embodiment, all of the lipids including the CPL, are co-dissolved in chloroform, which is then removed under nitrogen followed by high vacuum. The lipid mixture is hydrated in an appropriate buffer, and extruded through two polycarbonate filters with a pore size of 100 nm. The resulting SPLPs contain CPL on both of the internal and external faces. In yet another standard technique, the formation of CPL-SPLPs can be accomplished using a detergent dialysis or ethanol dialysis method, for example, as discussed in U.S. Patent Nos. 5,976,567 and 5,981,501, both of which are incorporated herein by reference.

IV. Pharmaceutical Preparations

The nucleic acid-lipid particles of the present invention can be administered either alone or in mixture with a physiologically-acceptable carrier (such as physiological saline or phosphate buffer) selected in accordance with the route of administration and standard pharmaceutical practice. Generally, normal saline will be employed as the pharmaceutically acceptable carrier. Other suitable carriers include, *e.g.*, water, buffered water, 0.4% saline, 0.3% glycine, and the like, including glycoproteins for enhanced stability, such as albumin, lipoprotein, globulin, *etc.*

The pharmaceutical carrier is generally added following particle formation. Thus, after the particle is formed, the particle can be diluted into pharmaceutically acceptable carriers such as normal saline.

The concentration of particles in the pharmaceutical formulations can vary widely, *i.e.*, from less than about 0.05%, usually at or at least about 2-5% to as much as 10 to 30% by weight and will be selected primarily by fluid volumes, viscosities, *etc.*, in accordance with the particular mode of administration selected. For example, the concentration may be increased to lower the fluid load associated with treatment. This may be particularly desirable in patients having atherosclerosis-associated congestive heart failure or severe hypertension. Alternatively, particles composed of irritating lipids may be diluted to low concentrations to lessen inflammation at the site of administration.

As described above, it is often desirable to include PEG-lipid conjugates, such as PEG-ceramides or PEG-PE, ganglioside G_{M1}-modified lipids or ATTA-lipids to the particles. Addition of such components prevents particle aggregation and provides a means

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
for increasing circulation lifetime and increasing the delivery of the lipid-nucleic acid particles to the target tissues. Typically, the concentration of the component in the particle will be about 1-20 % and, more preferably from about 3-10 %.

5 The pharmaceutical compositions may be sterilized by conventional, well known sterilization techniques. Aqueous solutions can be packaged for use or filtered under aseptic conditions and lyophilized, the lyophilized preparation being combined with a sterile aqueous solution prior to administration. The compositions can contain pharmaceutically acceptable auxiliary substances as required to approximate physiological conditions, such as pH adjusting and buffering agents, tonicity adjusting agents and the like, for example, sodium acetate, sodium lactate, sodium chloride, potassium chloride, and calcium chloride.
10 Additionally, the particle suspension may include lipid-protective agents which protect lipids against free-radical and lipid-peroxidative damages on storage. Lipophilic free-radical quenchers, such as α -tocopherol and water-soluble iron-specific chelators, such as ferrioxamine, are suitable.

15 In another example of their use, lipid-nucleic acid particles can be incorporated into a broad range of topical dosage forms including but not limited to gels, oils, emulsions and the like. For instance, the suspension containing the nucleic acid-lipid particles can be formulated and administered as topical creams, pastes, ointments, gels, lotions and the like.

20 The present invention also provides lipid-nucleic acid particles in kit form. The kit will typically be comprised of a container which is compartmentalized for holding the various elements of the lipid-nucleic acid particles and the endosomal membrane destabilizer (e.g., calcium ions). The kit will contain the compositions of the present inventions, preferably in dehydrated form, with instructions for their rehydration and administration. In
25 still other embodiments, the particles and/or compositions comprising the particles will have a targeting moiety attached to the surface of the particle. Methods of attaching targeting moieties (e.g., antibodies, proteins) to lipids (such as those used in the present particles) are known to those of skill in the art.

V. Administration of Lipid-Nucleic Acid Particle Formulations

30 The serum-stable nucleic acid-lipid particles of the present invention are useful for the introduction of nucleic acids into cells. Accordingly, the present invention also provides methods for introducing a nucleic acids (e.g., a plasmid) into a cell. The methods

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
are carried out *in vitro* or *in vivo* by first forming the particles as described above, then contacting the particles with the cells for a period of time sufficient for transfection to occur.

The nucleic acid-lipid particles of the present invention can be adsorbed to almost any cell type with which they are mixed or contacted. Once adsorbed, the particles can either be endocytosed by a portion of the cells, exchange lipids with cell membranes, or fuse with the cells. Transfer or incorporation of the nucleic acid portion of the particle can take place via any one of these pathways. In particular, when fusion takes place, the particle membrane is integrated into the cell membrane and the contents of the particle combine with the intracellular fluid.

10 **1. *In vitro* gene transfer**

For *in vitro* applications, the delivery of nucleic acids can be to any cell grown in culture, whether of plant or animal origin, vertebrate or invertebrate, and of any tissue or type. In preferred embodiments, the cells will be animal cells, more preferably mammalian cells, and most preferably human cells.

15 Contact between the cells and the lipid-nucleic acid particles, when carried out *in vitro*, takes place in a biologically compatible medium. The concentration of particles varies widely depending on the particular application, but is generally between about 1 μmol and about 10 mmol. Treatment of the cells with the nucleic acid-lipid particles is generally carried out at physiological temperatures (about 37° C) for periods of time of from about 1 to 20 48 hours, preferably of from about 2 to 4 hours.

In one group of preferred embodiments, a lipid-nucleic acid particle suspension is added to 60-80% confluent plated cells having a cell density of from about 10^3 to about 10^5 cells/mL, more preferably about 2×10^4 cells/mL. The concentration of the suspension added to the cells is preferably of from about 0.01 to 0.2 $\mu\text{g/mL}$, more preferably 25 about 0.1 $\mu\text{g/mL}$.

2. *In vivo* gene transfer

Alternatively, the compositions of the present invention can also be used for the *in vivo* gene transfer, using methods which are known to those of skill in the art. In particular, Zhu, *et al.*, *Science* 261:209-211 (1993), incorporated herein by reference, 30 describes the intravenous delivery of cytomegalovirus (CMV)-chloramphenicol acetyltransferase (CAT) expression plasmid using DOTMA-DOPE complexes. Hyde, *et al.*, *Nature* 362:250-256 (1993), incorporated herein by reference, describes the delivery of the

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene to epithelia of the airway
and to alveoli in the lung of mice, using liposomes. Brigham, *et al.*, *Am. J. Med. Sci.*
298:278-281 (1989), incorporated herein by reference, describes the *in vivo* transfection of
lungs of mice with a functioning prokaryotic gene encoding the intracellular enzyme
5 chloramphenicol acetyltransferase (CAT).

For *in vivo* administration, the pharmaceutical compositions are preferably
administered parenterally, *i.e.*, intraarticularly, intravenously, intraperitoneally,
subcutaneously, or intramuscularly. More preferably, the pharmaceutical compositions are
administered intravenously or intraperitoneally by a bolus injection. For example, see
10 Stadler, *et al.*, U.S. Patent No. 5,286,634, which is incorporated herein by reference.
Intracellular nucleic acid delivery has also been discussed in Straubinger, *et al.*, *METHODS*
IN ENZYMOLOGY, Academic Press, New York. 101:512-527 (1983); Mannino, *et al.*,
Biotechniques 6:682-690 (1988); Nicolau, *et al.*, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*
6:239-271 (1989), and Behr, *Acc. Chem. Res.* 26:274-278 (1993). Still other methods of
15 administering lipid-based therapeutics are described in, for example, Rahman *et al.*, U.S.
Patent No. 3,993,754; Sears, U.S. Patent No. 4,145,410; Papahadjopoulos *et al.*, U.S. Patent
No. 4,235,871; Schneider, U.S. Patent No. 4,224,179; Lenk *et al.*, U.S. Patent No. 4,522,803;
and Fountain *et al.*, U.S. Patent No. 4,588,578.

In certain embodiments, the pharmaceutical preparations may be contacted
20 with the target tissue by direct application of the preparation to the tissue. The application
may be made by topical, "open" or "closed" procedures. By "topical", it is meant the direct
application of the pharmaceutical preparation to a tissue exposed to the environment, such as
the skin, oropharynx, external auditory canal, and the like. "Open" procedures are those
procedures which include incising the skin of a patient and directly visualizing the underlying
25 tissue to which the pharmaceutical preparations are applied. This is generally accomplished
by a surgical procedure, such as a thoracotomy to access the lungs, abdominal laparotomy to
access abdominal viscera, or other direct surgical approach to the target tissue. "Closed"
procedures are invasive procedures in which the internal target tissues are not directly
visualized, but accessed via inserting instruments through small wounds in the skin. For
30 example, the preparations may be administered to the peritoneum by needle lavage.
Likewise, the pharmaceutical preparations may be administered to the meninges or spinal
cord by infusion during a lumbar puncture followed by appropriate positioning of the patient
as commonly practiced for spinal anesthesia or metrazamide imaging of the spinal cord.
Alternatively, the preparations may be administered through endoscopic devices.

WO 01/80900

PCT/CA01/00555

The lipid-nucleic acid particles can also be administered in an aerosol inhaled into the lungs (see, Brigham, *et al.*, *Am. J. Sci.* **298**(4):278-281 (1989)) or by direct injection at the site of disease (Culver, HUMAN GENE THERAPY, MaryAnn Liebert, Inc., Publishers, New York, pp.70-71 (1994)).

5 The methods of the present invention may be practiced in a variety of hosts. Preferred hosts include mammalian species, such as humans, nonhuman primates, dogs, cats, cattle, horses, sheep, and the like.

The amount of particles administered will depend upon the the ratio of nucleic acid to lipid; the particular nucleic acid used, the disease state being diagnosed; the age, weight, and condition of the patient and the judgement of the clinician; but will generally be between about 0.01 and about 50 mg per kilogram of body weight; preferably between about 0.1 and about 5 mg/kg of body weight or about 10^8 - 10^{10} particles per injection.

3. Insertion of Functional Copy of a Gene

Some methods of gene therapy serve to compensate for a defect in an endogenous gene by integrating a functional copy of the gene into the host chromosome. The inserted gene replicates with the host DNA and is expressed at a level to compensate for the defective gene. Diseases amenable to treatment by this approach are often characterized by recessive mutations. That is, both copies of an endogenous gene must be defective for symptoms to appear. Such diseases include cystic fibrosis, sickle cell anemia, β -thalassemia, phenylketonuria, galactosemia, Wilson's disease, hemochromatosis, severe combined immunodeficiency disease, alpha-1-antitrypsin deficiency, albinism, alkaptonuria, lysosomal storage diseases, Ehlers-Danlos syndrome, hemophilia, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, agammaglobulinemia, diabetes insipidus, Lesch-Nyhan syndrome, muscular dystrophy, Wiskott-Aldrich syndrome, Fabry's disease, fragile X-syndrome, and the like.

15
20
25

Other recessive mutations are known in the art, and the use of the methods of the present invention to treat them is contemplated herein.

There are several methods for introducing an exogenous functional gene to compensate for the above genetic defects. In one approach, cells are removed from a patient suffering from the disease and contacted with a lipid-vector complex *in vitro*. Cells should be removed from a tissue type in which disease symptoms are manifested. If the cells are capable of replication, and the vector used includes a selective marker, cells having internalized and expressed the marker can be selected. Particularly if selection is not

30

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
performed, it is important that the frequency of gene transfer into cells be high, for example,
at least about 1, 5, 10, 25 or 50% of cells.

After integration of the vector into the cellular genome, and optionally,
selection, cells are reintroduced into the patient. In this application, and others discussed
5 below (except site-specific recombination to correct dominant mutations), it is not necessary
that the gene supplied by the lipid-nucleic acid particle be delivered to the same site as is
occupied by the defective gene for which it is compensating.

Alternatively, the lipid-vector complex can be introduced directly into a
patient as a pharmaceutical composition. The complex is delivered to the tissue(s) affected
10 by the genetic disorder being treated in a therapeutically effective dose. In this and other
methods, a therapeutically effective dose is an amount sufficient to cure, or at least partially
arrest, the symptoms of the disease and its complications. Effective doses of the
compositions of the present invention, for the treatment of the above described conditions
will vary depending upon many different factors, including means of administration, target
15 site, physiological state of the patient, and other medicaments administered. Thus, treatment
dosages will need to be titrated to optimize safety and efficacy. Doses ranging from about 10
ng to 1 g, 100 ng to 100 mg, 1 µg to 10 mg, or 30-300 µg DNA per patient are typical.
Routes of administration include oral, nasal, gastric, intravenous, intradermal and
intramuscular.

20 The nucleic acid-lipid complexes can also be used to transfect embryonic stem
cells or zygotes to achieve germline alterations. See Jaenisch, *Science*, 240:1468-1474
(1988); Gordon *et al.*, *Methods Enzymol.* 101, 414 (1984); Hogan *et al.*, *Manipulation of the
Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, C.S.H.L. N.Y. (1986); and Hammer *et al.*, *Nature*
315:680 (1985); Gandolfi *et al.*, *J. Reprod. Fert.* 81:23-28 (1987); Rexroad *et al.*, *J. Anim.*
25 *Sci.* 66:947-953 (1988) and Eyestone *et al.*, *J. Reprod. Fert.* 85:715-720 (1989); Camous *et al.*,
J. Reprod. Fert. 72:779-785 (1984); Heyman *et al.*, *Theriogenology* 27:5968 (1987).
However, these methods are presently more suitable for veterinary applications than human
treatment due to ethical and regulatory constraints in manipulating human embryos.

As an example, cystic fibrosis (CF) is a usually fatal recessive genetic disease,
30 having a high incidence in Caucasian populations. The gene responsible for this disease was
isolated by Riordan *et al.*, *Science* 245:1059-1065 (1989). It encodes a protein called the
cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) which is involved in the
transfer of chloride ions (Cl⁻) through epithelial cell membranes. Mutations in the gene cause
defects of Cl⁻ secretion in epithelial cells leading to the various clinical manifestations.

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
Although CF has a number of symptoms including thickened exocrine gland secretions, pancreatic deficiency, intestinal blockage and malabsorption of fat, the most serious factor affecting mortality is chronic lung disease. Accordingly, to treat a CF patient, a vector containing a coding sequence for a functional CFTR gene product can be complexed with lipid, and optionally, a pharmaceutical excipient and introduced into the patient via nasal administration so that the vector-lipid composition reaches the lungs. The dose of vector-lipid complex is preferably about 10^8 - 10^{10} particles.

As another example, defects in the α or γ globin genes (see McDonagh & Nienhuis in *Hematology of Infancy and Childhood* (eds. Nathan & Oski, Saunders, PA, 1992) at pp. 783-879) can be compensated for by *ex vivo* treatment of hemopoietic stem cells with an nucleic acid-lipid complex containing a functional copy of the gene. The gene integrates into the stem cells which are then reintroduced into the patient. Defects in the gene responsible for Fanconi Anemia Complement Group C can be treated by an analogous strategy (see Walsh *et al.*, *J. Clin. Invest.* 94:1440-1448 (1994)).

Other applications include the introduction of a functional copy of a tumor suppressor gene into cancerous cell or cells at risk of becoming cancerous. Individuals having defects in one or both copies of an endogenous tumor suppressor gene are particularly at risk of developing cancers. For example, Li-Fraumeni syndrome is a hereditary condition in which individuals receive mutant p53 alleles, resulting in the early onset of various cancers (Harris, *Science* 262:1980-1981 (1993) Frebourg *et al.*, *PNAS* 89:6413-6417 (1992); Malkin *et al.*, *Science* 250:1233 (1990)). Expression of a tumor suppressor gene in a cancerous cell or a cell at risk of becoming cancerous is effective to prevent, arrest and/or reverse cellular proliferation and other manifestations of the cancerous state. Suitable tumor suppressor genes for use in the invention include p53 (Buchman *et al.*, *Gene* 70:245-252 (1988)), APC, DCC, Rb, WT1, and NF1 (Marx, *Science* 260:751-752 (1993); Marshall, *Cell* 64:313-326 (1991)). Lipid-nucleic acid complexes bearing a functional copy of a tumor suppressor gene are usually administered *in vivo* by the route most proximal to the intended site of action. For example, skin cancers can be treated by topical administration and leukemia by intravenous administration.

30 4. Suppression of Gene Expression

Methods of gene therapy using the nucleic acid-lipid complexes of the invention can also be used for prophylactic or therapeutic treatment of patients or cells, infected with or at risk of being infected with, a pathogenic microorganism, such as HIV.

WO 01/80900

PCT/CA01/00555

The effectiveness of antisense molecules in blocking target gene functions of impeding virus replication has been demonstrated in a number of different systems (Friedman *et al.*, *Nature* 335:452-54 (1988), Malim *et al.*, *Cell* 58:205-14 (1989) & Trono *et al.*, *Cell* 59:113-20 (1989)). The vector used includes a DNA segment encoding an antisense transcript, which is
 5 complementary to a segment of the genome from the pathogenic microorganism. The segment should preferably play an essential role in the lifecycle of the microorganism, and should also be unique to the microorganism (or at least absent from the genome of the natural genome of a patient undergoing therapy). For example, suitable sites for inhibition on the HIV virus includes TAR, REV or nef (Chatterjee *et al.*, *Science* 258:1485-1488 (1992)). Rev
 10 is a regulatory RNA binding protein that facilitates the export of unspliced HIV pre mRNA from the nucleus. Malim *et al.*, *Nature* 338:254 (1989). Tat is thought to be a transcriptional activator that functions by binding a recognition sequence in 5' flanking mRNA. Karn & Graeble, *Trends Genet.* 8:365 (1992). The nucleic acid-lipid complex is introduced into leukocytes or hemopoietic stem cells, either *ex vivo* or by intravenous injection in a
 15 therapeutically effective dose. The treatment can be administered prophylactically to HIV persons, or to persons already infected with HIV.

Analogous methods are used for suppressing expression of endogenous recipient cell genes encoding adhesion proteins. Suppression of adhesion protein expression in useful in aborting undesirable inflammatory responses. Adhesion proteins that can be
 20 suppressed by antisense segments present in selected vectors include integrins, selectins, and immunoglobulin (Ig) superfamily members (see Springer, *Nature* 346:425-433 (1990). Osborn, *Cell* 62:3 (1990); Hynes, *Cell* 69:11 (1992)). Integrins are heterodimeric transmembrane glycoproteins consisting of an α chain (120-180 kDa) and a β chain (90-110 kDa), generally having short cytoplasmic domains. The three known integrins, LFA-1, Mac-
 25 1 and P150,95, have different alpha subunits, designated CD11a, CD11b and CD11c, and a common beta subunit designated CD18. LFA-1 ($\alpha_1\beta_2$) is expressed on lymphocytes, granulocyte and monocytes, and binds predominantly to an Ig-family member counter-receptor termed ICAM-1 (and perhaps to a lesser extent ICAM-2). ICAM-1 is expressed on many cells, including leukocytes and endothelial cells, and is up-regulated on vascular
 30 endothelium by cytokines such as TNF and IL-1. Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$) is distributed on neutrophils and monocytes, and also binds to ICAM-1 (and possibly ICAM-2). The third β_2 integrin, P150,95 ($\alpha_x\beta_2$), is also found on neutrophils and monocytes. The selectins consist of L-selectin, E-selectin and P-selectin.

WO 01/80900

PCT/CA01/00555

5. Cells to be transformed

The compositions and methods of the present invention are used to treat a wide variety of cell types, *in vivo* and *in vitro*. Among those most often targeted for gene therapy are hematopoietic precursor (stem) cells. Other cells include those of which a proportion of the targeted cells are nondividing or slow dividing. These include, for example, fibroblasts, keratinocytes, endothelial cells, skeletal and smooth muscle cells, osteoblasts, neurons, quiescent lymphocytes, terminally differentiated cells, slow or noncycling primary cells, parenchymal cells, lymphoid cells, epithelial cells, bone cells, etc. The methods and compositions can be employed with cells of a wide variety of vertebrates, including mammals, and especially those of veterinary importance, e.g. canine, feline, equine, bovine, ovine, caprine, rodent, lagomorph, swine, etc., in addition to human cell populations.

To the extent that tissue culture of cells may be required, it is well known in the art. Freshney (1994) (*Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, third edition* Wiley-Liss, New York), Kuchler *et al.* (1977) *Biochemical Methods in Cell Culture and Virology*, Kuchler, R.J., Dowden, Hutchinson and Ross, Inc., and the references cited therein provides a general guide to the culture of cells. Cultured cell systems often will be in the form of monolayers of cells, although cell suspensions are also used.

Gene therapy relies on the efficient delivery of therapeutic genes to target cells. Most of the somatic cells that have been targeted for gene therapy, e.g., hematopoietic cells, skin fibroblasts and keratinocytes, hepatocytes, endothelial cells, muscle cells and lymphocytes, are normally nondividing. Retroviral vectors, which are the most widely used vectors for gene therapy, unfortunately require cell division for effective transduction (Miller *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 10:4239-4242 (1990)). This is also true with other gene therapy vectors such as the adeno-associated vectors (Russell *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:8915-8919 (1994); Alexander *et al.*, *J. Virol.* 68:8282-8287 (1994); Srivastava, *Blood Cells* 20:531-538 (1994)). Recently, HIV-based vectors has been reported to transfect nondividing cells. Nonetheless, the majority of stem cells, a preferred target for many gene therapy treatments, are normally not proliferating. Thus, the efficiency of transduction is often relatively low, and the gene product may not be expressed in therapeutically or prophylactically effective amounts. This has led investigators to develop techniques such as stimulating the stem cells to proliferate prior to or during gene transfer (e.g., by treatment with growth factors) pretreatment with 5-fluorouracil, infection in the presence of cytokines, and extending the vector infection period to increase the likelihood that stem cells are dividing during infection, but these have met with limited success.

WO 01/80900

6. Detection of foreign nucleic acids

PCT/CA01/00555

After a given cell is transduced with a nucleic acid construct that encodes a gene of interest, it is important to detect which cells or cell lines express the gene product and to assess the level of expression of the gene product in engineered cells. This requires the
5 detection of nucleic acids that encode the gene products.

Nucleic acids and proteins are detected and quantified herein by any of a number of means well known to those of skill in the art. These include analytic biochemical methods such as spectrophotometry, radiography, electrophoresis, capillary electrophoresis, high performance liquid chromatography (HPLC), thin layer chromatography (TLC),
10 hyperdiffusion chromatography, and the like, and various immunological methods such as fluid or gel precipitin reactions, immunodiffusion (single or double), immunoelectrophoresis, radioimmunoassays (RIAs), enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs), immunofluorescent assays, and the like. The detection of nucleic acids proceeds by well known methods such as Southern analysis, northern analysis, gel electrophoresis, PCR,
15 radiolabeling, scintillation counting, and affinity chromatography.

The selection of a nucleic acid hybridization format is not critical. A variety of nucleic acid hybridization formats are known to those skilled in the art. For example, common formats include sandwich assays and competition or displacement assays.

Hybridization techniques are generally described in "*Nucleic Acid Hybridization, A Practical
20 Approach*," Ed. Hames, B.D. and Higgins, S.J., IRL Press, 1985.

The sensitivity of the hybridization assays may be enhanced through use of a nucleic acid amplification system which multiplies the target nucleic acid being detected. *In vitro* amplification techniques suitable for amplifying sequences for use as molecular probes or for generating nucleic acid fragments for subsequent subcloning are known. Examples of
25 techniques sufficient to direct persons of skill through such *in vitro* amplification methods, including the polymerase chain reaction (PCR) the ligase chain reaction (LCR), Q β -replicase amplification and other RNA polymerase mediated techniques (*e.g.*, NASBA) are found in Berger, Sambrook, and Ausubel, as well as Mullis *et al.* (1987), U.S. Patent No. 4,683,202; *PCR Protocols A Guide to Methods and Applications* (Innis *et al.* eds) Academic Press Inc.
30 San Diego, CA (1990) (Innis); Arnheim & Levinson (October 1, 1990), *C&EN* 36-47; *The Journal Of NIH Research*, 3:81-94 (1991); (Kwoh *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:1173 (1989); Guatelli *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:1874 (1990); Lomell *et al.*, *J. Clin. Chem.*, 35:1826 (1989); Landegren *et al.*, *Science*, 241:1077-1080 (1988); Van Brunt, *Biotechnology*, 8:291-294 (1990); Wu and Wallace, *Gene*, 4:560 (1989); Barringer *et al.*,

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
Gene, 89:117 (1990), and Sooknanan and Malek, *Biotechnology*, 13:563-564 (1995).

Improved methods of cloning *in vitro* amplified nucleic acids are described in Wallace *et al.*, U.S. Pat. No. 5,426,039. Other methods recently described in the art are the nucleic acid sequence based amplification (NASBA™, Cangene, Mississauga, Ontario) and Q Beta

5 Replicase systems. These systems can be used to directly identify mutants where the PCR or LCR primers are designed to be extended or ligated only when a select sequence is present. Alternatively, the select sequences can be generally amplified using, for example, nonspecific PCR primers and the amplified target region later probed for a specific sequence indicative of a mutation.

10 Oligonucleotides for use as probes, *e.g.*, in *in vitro* amplification methods, for use as gene probes, or as inhibitor components are typically synthesized chemically according to the solid phase phosphoramidite triester method described by Beaucage and Caruthers, *Tetrahedron Letts.*, 22(20):1859-1862 (1981), *e.g.*, using an automated synthesizer, as described in Needham-VanDevanter *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 12:6159-6168
15 (1984). Purification of oligonucleotides, where necessary, is typically performed by either native acrylamide gel electrophoresis or by anion-exchange HPLC as described in Pearson and Regnier, *J. Chrom.*, 255:137-149 (1983). The sequence of the synthetic oligonucleotides can be verified using the chemical degradation method of Maxam and Gilbert (1980) in Grossman and Moldave (eds.) Academic Press, New York, *Methods in Enzymology*,
20 65:499-560.

An alternative means for determining the level of expression of the gene is *in situ* hybridization. *In situ* hybridization assays are well known and are generally described in Angerer *et al.*, *Methods Enzymol.*, 152:649-660 (1987). In an *in situ* hybridization assay cells are fixed to a solid support, typically a glass slide. If DNA is to be probed, the cells are
25 denatured with heat or alkali. The cells are then contacted with a hybridization solution at a moderate temperature to permit annealing of specific probes that are labelled. The probes are preferably labelled with radioisotopes or fluorescent reporters.

7. Detection of foreign gene products

The expression of the gene of interest to produce a product may be detected or
30 quantified by a variety of methods. Preferred methods involve the use of specific antibodies.

Methods of producing polyclonal and monoclonal antibodies are known to those of skill in the art. *See, e.g.*, Coligan (1991), CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY; and Harlow and Lane (1989), ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL,

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
Cold Spring Harbor Press, NY; Stites *et al.* (eds.) BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY (4th ed.) Lange Medical Publications, Los Altos, CA, and references cited therein; Goding (1986), MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (2d ed.) Academic Press, New York, NY; and Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-497 (1975). Such techniques include
5 antibody preparation by selection of antibodies from libraries of recombinant antibodies in phage or similar vectors. See, Huse *et al.*, *Science*, 246:1275-1281 (1989); and Ward *et al.*, *Nature*, 341:544-546 (1989). Specific monoclonal and polyclonal antibodies and antisera will usually bind with a K_D of at least about .1 mM, more usually at least about 1 μ M, preferably at least about .1 μ M or better, and most typically and preferably, .01 μ M or better.

10 The presence of a desired polypeptide (including peptide, transcript, or enzymatic digestion product) in a sample may be detected and quantified using Western blot analysis. The technique generally comprises separating sample products by gel electrophoresis on the basis of molecular weight, transferring the separated proteins to a suitable solid support, (such as a nitrocellulose filter, a nylon filter, or derivatized nylon
15 filter), and incubating the sample with labeling antibodies that specifically bind to the analyte protein. The labeling antibodies specifically bind to analyte on the solid support. These antibodies are directly labeled, or alternatively are subsequently detected using labeling agents such as antibodies (*e.g.*, labeled sheep anti-mouse antibodies where the antibody to an analyte is a murine antibody) that specifically bind to the labeling antibody.

20 V. Examples

Example I: The Effect of Calcium on the Transfection Potency of SPLP

A. Materials and Methods

1. **Materials.** N,N-dioleoyl-N,N-dimethylammonium chloride (DODAC) was obtained from Dr. S. Ansell and 1-O-(2-(ω -methoxyethyleneglycol)succinoyl)-2-N-
25 arachidoylsphingosine (PEG-CerC₂₀) was synthesized by Dr. Z. Wang at Inex Pharmaceuticals Corporation (Burnaby, BC). 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) and 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) were obtained from Northern Lipids (Vancouver, BC). 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-(phospho-L-serine) (DOPS) and 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(Lissamine
30 Rhodamine B Sulfonyl) (Rh-DOPE) were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Cholesterol (Chol), octylglucopyranoside (OGP), HEPES, MgCl₂, and NaCl were

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). DEAE Sepharose CL-6B anionic-
exchange column and Sepharose CL-4B sizing column materials were obtained from Sigma
Chemical Co. (St. Louis, MO). The luciferase assay kit was purchased from Promega Corp.
(Madison, WI). Picogreen dsDNA detection reagent was obtained from Molecular Probes
5 (Eugene, OR). Plasmid DNA (pCMVLuc) coding for the luciferase reporter gene under the
control of the human CMV immediate early promoter-enhancer element was obtained from
Inex Pharmaceuticals Corporation (Burnaby, BC). Bovine hamster kidney (BHK) cells were
obtained from the American Tissue Culture Collection (ATCC CCL-10, Rockville, MD) and
cultured in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) supplement with 10% fetal bovine
10 serum (FBS), 100 U/ml of penicillin and 100 µg/ml of streptomycin. BHK cells were
maintained as a monolayer at 37°C in a humidified atmosphere containing 5.0% CO₂.

2. Preparation of SPLP. SPLP were prepared as described by Wheeler,
et al., Gene Therapy 6:271-281 (1999)) with some modifications. Briefly, a total of 10
µmoles of DODAC, DOPE, PEG-CerC₂₀ (7:83:10; mol/mol/mol) were dissolved in
15 chloroform and dried under a stream of nitrogen gas. Residual solvent was removed under
high vacuum for 2 h. The resulting lipid film was hydrated in 1 ml of HBS buffer (20 mM
HEPES and 150 mM NaCl, pH 7.5) containing 0.2 M OGP with continuous vortexing.
Plasmid DNA (400 µg/ml) was added to the hydrated lipids and the mixtures were dialysed
against HBS buffer for 36 to 48 h with 2 buffer changes. Nonencapsulated plasmid was
20 removed by DEAE anion exchange chromatography and empty lipid vesicles were removed
by employing a sucrose density gradient as previously described (Mok, *et al., Biochimica et*
Biophysica Acta 1419:137-150 (1999)). For the high DODAC content formulation
(DODAC/DOPE/PEG-CerC₂₀, 14:76:10, mol/mol/mol), SPLP were initially prepared in HBS
buffer containing 30 mM sodium citrate as described previously (Zhang, *et al., Gene Therapy*
25 6:1438-1447 (1999)). SPLP were characterized with respect to plasmid entrapment using a
previously described Picogreen assay (Zhang, *et al., Gene Therapy* 6:1438-1447 (1999)) and
sized using quasielastic light scattering.

3. Transfection in the presence of Ca²⁺. Prior to transfection, BHK
cells were plated at a density of 1 × 10⁴ cells per well in a 96-well plate overnight. 200 mM
30 CaCl₂ stock solution was prepared in dH₂O and sterilized by filtering. 0.5 µg plasmid DNA
encapsulated in SPLP was used per well of transfection. SPLP were first added to
appropriate concentrations of Ca²⁺ as required by the experiment, after which culture media

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
was added to the mixtures to obtain the final transfection volume of 100 μ l/well. Ca^{2+} concentration was calculated with respect to the final volume of the transfection medium applied to cells. The final volume contained 20% vol Ca^{2+} and SPLP mixtures and 80% vol culture media. Cells were incubated with the transfection complexes for the appropriate time
5 periods before assaying for gene expression as described previously (Wheeler, *et al.*, *Gene Therapy* 6:271-281 (1999)). Relative luciferase activity was normalized against total cellular protein determined by using the Micro BCA protein assay reagent kit (Pierce, Illinois).

4. Determination of cellular lipid uptake. BHK cells were plated at 1×10^5 cells per well of 12-well plates the day prior to the experiment. SPLP were prepared with
10 0.5 mol% Rh-DOPE incorporated into the lipid formulations. SPLP mixed with increasing concentrations of Ca^{2+} (0 to 14 mM) were added to cells at a lipid dose of 80 nmoles in complete media (1 ml final volume). After incubation at 37°C for 4, 8, and 24 h, cells were washed with PBS and lysed by the addition of buffer containing 0.1% TX-100 in 250 mM phosphate buffer (pH 8.0). Rhodamine fluorescence of the lysate was measured on a Perkin
15 Elmer Luminescence Spectrophotometer using λ_{ex} of 560 nm and λ_{em} of 590 nm with slit widths of 10 and 10 nm, respectively. Lipid uptake was determined by comparing lysate fluorescence to that of a lipid standard normalizing it to the total cellular protein. To determine the intracellular SPLP localization, fluorescence microscopy was employed. Cells were transfected with vesicles labeled with 4 mol% Rh-DOPE. The transfection media was
20 replaced with complete media prior to analysis under the fluorescence microscope. Fluorescence micrographs were taken on an Axiovert 100 Zeiss Fluorescent microscope (Carl Zeiss Jena GmbH) using a rhodamine filter from Omega Optical (Brattleboro, VT) with the following specifications, $\lambda_{\text{ex}}=560 \pm 20$ nm, 600 nm LP, and DC 590 nm.

5. ^{31}P NMR spectroscopy. Solid-state ^{31}P NMR spectra were recorded
25 with broad-band decoupling at 81.02 MHz on a Bruker MSL 200 spectrometer, using a 3.8- μ s 60° pulse and a 1.5-s repeat time. The free induction decay (FID) was accumulated over 2500-3000 scans and was Fourier transformed with 50-Hz line broadening. Phospholipid mixtures (25 μ mol of total phospholipid) were dispersed by vortex mixing in 2 ml of buffer (20 mM HEPES buffer, pH 7.4). Increasing concentrations of Ca^{2+} were titrated into the
30 vesicles by adding aliquots of 200 mM CaCl_2 stock. Ca^{2+} equilibration was ensured by performing three cycles of freeze-thawing. The temperature was maintained at 25 °C with a

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
Bruker variable temperature unit. A mixture of phosphoric acid/D₂O was used as the
reference for chemical shifts in all ³¹P NMR spectra.

6. **Intracellular processing of plasmid DNA.** BHK cells were plated at
3 x 10⁵ cells per well of 6-well plates the day prior to the experiment. 2.5 µg plasmid DNA
5 encapsulated in SPLP were incubated with cells for 2, 4, and 8 h, in the absence or presence
(8 mM) of Ca²⁺. At the appropriate time points, cells were washed with PBS and external
SPLP were removed by trypsinization. Trypsinized cells were pelleted by centrifugation and
cells were resuspended and washed with isotonic buffer (250 mM sucrose, 3 mM MgCl₂, 50
mM HEPES, pH 7.2). Subsequently, pelleted cells were lysed by incubating with 250 µl of
10 lysis buffer (10 mM Tris, pH 7.5, 0.5% SDS, 1 mM EDTA) containing Pronase E at 1 mg/ml
(Sigma) overnight at 37°C. DNA (genomic DNA and delivered plasmid DNA) were
extracted as described previously (Sambrook, *et al.*, In *Molecular Cloning: A Laboratory*
Manual I, 1.21-1.52 (1989). Cold Spring Harbor, New York, C. Nolan, editor. Cold Spring
Harbor Laboratory). DNA recovery was determined by measuring the absorbance at 260 nm.
15 6 µg of total DNA from each sample was either dot blotted onto a nylon transfer membrane
(Amersham) with a set of pCMVLuc standards (0 to 5 pg) or loaded into a 1% agarose gel
and size fractionated at 60 V for 2 h for the Southern analysis. Both blots were hybridized
overnight at 68°C to a ³²P-labeled plasmid DNA probe, which was prepared with *Pst*I cut-
pCMVLuc plasmid using the ³²P-QuickPrime™ Kit (Pharmacia Biotech). Blots were washed 3
20 times with 2x SSC containing 0.1% SDS, and were then exposed on a PhosphoImager screen
which was subsequently scanned (Molecular Dynamics – PhosphoImager™SI).

7. **Entrapment of Ca²⁺ inside SPLP.** SPLP (DODAC/DOPE/PEG-
CerC20/Rd-DOPE, 10:79.5:10:0.5, mol/mol/mol) were initially prepared in citrate buffer
(150 mM sodium citrate and 150 mM citric acid) at pH 4. Nonencapsulated plasmid was
25 removed by DEAE anion exchange chromatography equilibrated in HBS buffer (pH 7.5) and
empty lipid vesicles were removed by employing a sucrose density gradient as previously
described (Mok, *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1419:137-150 (1999)). Ca²⁺ loading
was performed by incubation of the DNA-loaded vesicles with 2.5 mM CaCl₂ and the
ionophores A23187 (0.1 µg/µmole lipids) for 30 min at room temperature. Unloaded Ca²⁺
30 and ionophores were removed by dialysis in HBS buffer with 2 buffer changes. Internal Ca²⁺
concentrations were determined in the absence and presence of TX-100 (0.2%) by employing
the membrane nonpermeant absorbant indicator Asenazo III (0.1 mM in 10 mM HEPES

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
 buffer, pH 7), against a CaCl_2 standard curves (0 to 50 nmoles). Absorbances at 650 nm were measured as an indicator of Ca^{2+} presence. SPLP were characterized with respect to plasmid entrapment using a previously described Picogreen assay (Zhang, *et al.*, *Gene Therapy* 6:1438-1447 (1999)) and sized using quasielastic light scattering. Internal concentrations of Ca^{2+} were found to be ~175 mM.

8. **Insertion of CPL.** Prior to CPL insertion, SPLP were prepared as described in the previous section with some modification. SPLP containing total of 10 μmoles of DODAC, DOPE, PEG-CerC₂₀, and Rd-DOPE (7:82.5:10:0.5; mol/mol/mol/mol) were hydrated in 1 ml of HBS buffer (20 mM HEPES and 150 mM NaCl, pH 7.5) containing 10 0.2 M OGP with continuous vortexing. Plasmid DNA (400 $\mu\text{g/ml}$) was added to the hydrated lipids and the mixtures were dialysed against HBS buffer for 36 to 48 h with 2 buffer changes. Nonencapsulated plasmid was removed by DEAE anion exchange chromatography. CPL stocks in methanol labeled with a dansyl fluorescence marker were added to the SPLP to give the desired molar ratio (up to 4 mol% CPL relative to vesicle lipid). CPL and SPLP 15 were incubated for up to 3 h at 60°C, and cooled on ice to room temperature. Both empty lipid vesicles and noninserted CPL were removed by employing a sucrose density gradient. The insertion levels of CPL were quantitated by using the Perkin Elmer Luminescence Spectrophotometer. Briefly, initial dansyl/rhodamine (D/R_i) fluorescence ratio prior to sucrose density gradient and the final D/R (D/R_f) ratio of the isolated CPL-SPLP were 20 measured. Rhodamine fluorescence was assayed at $\lambda_{\text{ex}} = 560$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 590$ nm, while dansyl fluorescence was assayed at $\lambda_{\text{ex}} = 340$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 510$ nm, with slit widths of 10 and 10 nm. The %-insertion was calculated as follows:

$$\% \text{-insertion} = ([D/R]_f) * 100 / (D/R)_i$$

CPL-SPLP were further characterized with respect to plasmid entrapment 25 using a previously described Picogreen assay (Zhang *et al.*, 1999) and sized using quasielastic light scattering.

B. Results

1. **The transfection potencies of SPLP are dramatically enhanced in the presence of Ca^{2+} .** Previous work has shown that SPLP, particularly SPLP stabilized by 30 PEG-CerC₂₀, can exhibit lower levels of transfection *in vitro* (Wheeler, *et al.*, *Gene Therapy* 6:271-281 (1999); Mok *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1419:137-150 (1999)). Here,

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
the effects of Ca^{2+} on the transfection potency of SPLP were examined. SPLP prepared from DOPE/DODAC/PEG-CerC₂₀ (84:6:10; mol:mol:mol) lipid mixture and pCMVLuc employing the detergent dialysis method were purified from empty vesicles and unencapsulated plasmid as described in the above Materials and Methods. Appropriate amounts of CaCl_2 were then added to the SPLP preparation to give rise to the desired Ca^{2+} concentrations following dilution into the media before applying to the BHK cells. The BHK cells and the SPLP were incubated together for 24 h, after which the transfected cells were assayed for luciferase expression.

As shown in **Figure 1**, the presence of Ca^{2+} resulted in dramatic enhancements in luciferase expression levels, with a ~600-fold increase in SPLP transfection potency observed at the optimal Ca^{2+} concentrations. This Ca^{2+} -mediated increase in transfection is significantly greater for the SPLP system than previously observed for plasmid DNA-cationic lipid complexes. The optimal concentrations of Ca^{2+} required for stimulating SPLP transfection potencies were in the range of 8 to 10 mM, somewhat lower than that required (5-25 mM) for optimal stimulation of the transfection potencies of plasmid DNA-cationic lipid complexes. Further, the ability of Ca^{2+} to stimulate the transfection potency of SPLP was highly specific. As shown in **Figure 1**, if MgCl_2 or NaCl was substituted for CaCl_2 no enhancement in transfection potency was observed.

2. SPLP are stable in the presence of Ca^{2+} . SPLP with PEG-CerC₂₀ are highly stable systems that exhibit extended circulation times *in vivo*, protect encapsulated plasmid from external nucleases, and do not interact readily with cells (Wheeler, *et al.*, *Gene Therapy* 6:271-281 (1999); Mok, *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1419:137-150 (1999); Monck, *et al.*, *Journal of Drug Targeting* 7:439-452 (2000)). It was therefore important to demonstrate that the enhanced transfection properties of SPLP in the presence of Ca^{2+} was not due to destabilization or aggregation of the SPLP leading to enhanced cell uptake. The stability of the SPLP in the presence of Ca^{2+} was examined employing quasi-elastic light scattering (QELS) to detect changes in size and the Picogreen fluorophore assay to detect DNA leakage. For the QELS experiments, CaCl_2 was added to the SPLP suspension to achieve concentrations as high as 50 mM. No change in the SPLP size or size distribution was observed. For the plasmid release experiments, SPLP were incubated at 37°C in HBS buffer containing 10% FBS in the presence or absence of 8 mM Ca^{2+} . Plasmid release was assayed over 24 h employing the Picogreen assay. No plasmid release was observed.

WO 01/80900 3. **Ca²⁺ does not influence the cellular uptake of SPLP.** PCT/CA01/00555

The ability of Ca²⁺ to enhance the transfection activity of plasmid DNA-cationic lipid complexes has been attributed to an increase in the uptake of the complexes into cells in the presence of Ca²⁺ (Lam, *et al.*, *Biochim Biophys Acta* 1463:279-290 (2000)). In this regard, the low transfection potencies of SPLP as compared to complexes arise, at least in part, from very low levels of cellular uptake of SPLP (Mok, *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1419:137-150 (1999)). It was therefore of interest to determine whether Ca²⁺ stimulated SPLP transfection potencies by increasing SPLP uptake into cells. SPLP containing 0.5 mol% Rh-DOPE were employed to determine SPLP uptake into BHK cells in the presence of up to 12 mM Ca²⁺ as described in the above Materials and Methods. The SPLP were incubated with cells for 4, 8, and 24 h and the levels of intracellular lipid determined. Lipid uptake at each time-point was normalized against total cell protein in order to account for cell growth. As shown in **Figure 2**, the results indicate that Ca²⁺ did not significantly increase the cellular uptake of SPLP even though the transfection potencies of the SPLP varied by several hundred-fold over the range of Ca²⁺ concentrations tested.

4. Fluorescence studies indicate enhanced endosomal destabilization following SPLP uptake in the presence of Ca²⁺. The fact that uptake of SPLP is not stimulated by addition of Ca²⁺ suggests that the Ca²⁺-dependent enhancement of transfection must arise from more efficient utilization of SPLP that are accumulated. One possibility is that Ca²⁺ somehow facilitates destabilization of endosomes following uptake of SPLP, thus enhancing intracellular delivery of plasmid. Previous work has shown that endosomal destabilization following uptake of vesicles containing fluorescently-labeled lipids can be detected by fluorescence microscopy as a diffuse intracellular fluorescence, whereas uptake into stable endosomes gives rise to a localized "punctate" appearance (Felgner, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7417 (1987)). In order to be able to visualize the cellular distribution of SPLP, a higher level of Rh-DOPE (4 mol%) was incorporated with the vesicle formulation. Such Rh-labeled SPLP were incubated on BHK cells in the presence and absence of 10 mM Ca²⁺ and the cell morphology was examined at 8 h by fluorescence microscopy. Similar levels of rhodamine fluorescence were detected in the absence or presence of Ca²⁺, in agreement with the quantitative measurements of SPLP uptake noted in the previous section. However, as shown in **Figure 3**, the appearance of the cells as detected by fluorescence microscopy was quite different in the presence or absence of Ca²⁺. Although some punctate structures are observed, BHK cells containing the fluorescently-labeled SPLP

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
exhibited a more diffuse pattern when Ca^{2+} was included. In the absence of Ca^{2+} , the
fluorescence pattern was largely punctate, consistent with SPLP retention in the endosomal
compartments.

5 **5. Intracellular processing of plasmid DNA.** The preceding fluorescent
microscopy results suggest that Ca^{2+} enhances transfection by destabilizing the endosomal
compartments, thus enhancing cytoplasmic delivery of the SPLP-associated plasmid. If
SPLP plasmid can escape from the endosome more readily in the presence of Ca^{2+} , it will
avoid breakdown in the lysosomal pathway and more intact intracellular plasmid DNA
should be present. A dot blot assay was employed to measure intracellular delivery of
10 plasmid DNA, and the integrity of the plasmid was examined by using the Southern blot
analysis. Cells were incubated with SPLP in the absence or presence of 8 mM Ca^{2+} for 2, 4,
and 8 h. The levels of intact, intracellular plasmid DNA for the different systems were
compared after isolation of DNA from the cells as described in the above Materials and
Methods, and the results are shown in Figure 4. As shown in Figure 4A, when cells were
15 transfected with the SPLP in the presence of Ca^{2+} , the amount of intact plasmid in the BHK
cells was increased by approximately 10-fold after an 8 h incubation period. This is also
reflected by a Southern analysis which showed that more intact plasmid DNA was present in
cells transfected with SPLP prepared in the presence of Ca^{2+} (Figure 4B). Such enhanced
levels of intact plasmid DNA were not observed when Mg^{2+} was substituted for Ca^{2+} ,
20 demonstrating the specificity of Ca^{2+} (Figure 4B).

6. **Ca^{2+} destabilizes bilayer lipid structures in a manner consistent
with an ability to destabilize endosomal membranes.** Recent work suggests that cationic
lipids stimulate intracellular delivery of macromolecules such as plasmid DNA by combining
with anionic lipids and forming ion pairs that destabilize bilayer membranes by inducing
25 nonbilayer (H_{II} phase) structure. In this regard, it is well known that Ca^{2+} can destabilize
lipid bilayers containing acidic lipids such as phosphatidylserine (PS) in combination with
unsaturated PEs by inducing the nonbilayer hexagonal H_{II} phase structure (Hope, *et al.*, *FEBS
Letters* 107:323-326 (1979); Tilcock, *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta* 641:189-201
(1981)). It has also been shown that Ca^{2+} can induce H_{II} phase structure in related systems
30 containing phosphatidylcholine (PC) and cholesterol. For example, addition of Ca^{2+} to
mixtures of DOPC/DOPE/DOPS/Cholesterol (1:1:1:3; molar ratios) also triggers bilayer to
hexagonal H_{II} phase transitions (Tilcock, *et al.*, *Biochemistry* 23:2696-2703 (1984)). It is

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
thus possible that Ca^{2+} stimulates SPLP transfection by acting in concert with the cationic lipid in the SPLP to destabilize the lipid bilayer of endosomal membranes.

In order to investigate this possibility, the Ca^{2+} -dependent polymorphism of MLV composed of DOPC/DOPE/DOPS/Chol (1:1:1:3; molar ratios) was investigated in the absence and presence of small amounts of DODAC employing ^{31}P NMR. Considerable previous work has shown that phospholipids in the bilayer organization give rise to asymmetric ^{31}P NMR line shapes with a low field shoulder and high field peak, whereas phospholipids in the hexagonal H_{II} phase give rise to a line shape with reversed asymmetry that is a factor of two narrower (Cullis, *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta* 559:399-420 (1979)). As shown in **Figure 5A**, in the absence of DODAC, Ca^{2+} is able to stimulate a transition from the bilayer to the hexagonal H_{II} phase as reported by ^{31}P NMR at the Ca^{2+} -to-DOPS ratio of 0.5:1. Alternatively, in MLV containing small amounts of DODAC (DOPC/DOPE/DOPS/Cholesterol/DODAC; 1:1:1:3:0.25; molar ratios), Ca^{2+} -to-DOPS ratios of only 0.25:1 are required to induce predominantly H_{II} phase structure (**Figure 5B**). The narrow central peak may arise from small lamellar structures or lipid in nonbilayer structures such as the cubic phase in which component phospholipids experience isotropic motional averaging.

7. External Ca^{2+} is required to enhance SPLP transfection potency.

A final set of experiments was conducted to determine whether Ca^{2+} encapsulated within the SPLP could stimulate transgene expression. As detailed elsewhere (Felgner, *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* 269:2550-2561 (1994)), Ca^{2+} can be loaded into large unilamellar vesicles (LUV) in response to a pH gradient (inside acidic) when the Ca^{2+} ionophore A23187 is present. Internal Ca^{2+} concentrations as high as 200 mM can be achieved. As described in the above Materials and Methods, SPLP could be readily prepared at pH 4 in the presence of a citrate buffer and then the external pH could be raised to pH 7.5 following the detergent dialysis procedure. Addition of external CaCl_2 and ionophore then resulted in loading of Ca^{2+} into the SPLP to achieve internal concentrations of ~175 mM. As shown in **Figure 6**, although the presence of encapsulated Ca^{2+} result in enhancement of SPLP transfection potency, it appears that external levels of Ca^{2+} play the dominant roles in stimulating the transfection process.

8. Effect of Ca^{2+} on improved SPLP systems.

One limitation of SPLP is that the system is not optimally taken by cells as a result of limited cationic lipid and

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
presence of PEG on the vesicles (Mok, *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1419:137-150

(1999)). One straightforward way to increase the positive charges is by increasing the cationic content (Zhang, *et al.*, *Gene Therapy* 6:1438-1447 (1999)). However, transfection efficiencies increased with SPLP increased DODAC concentrations, and such systems are thus compromised with lower DNA encapsulation. Recently, a new class of cationic lipid known as cationic poly(ethylene glycol) lipid conjugates (CPL) has been synthesized (Chen, *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 11:433-437 (2000)). A typical CPL employed in this study contains a hydrophobic ceramide anchor, which is attached to a hydrophilic PEG spacer that is linked to a cationic headgroup made of four lysine residues. It has been shown that SPLP w/ CPL inserted onto its surface show enhanced interaction between the liposomes and cell plasma membrane (Chen, *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 11:433-437 (2000)).

Experiments were carried out to determine the influence of Ca^{2+} on the CPL-SPLP system. SPLP containing higher DODAC content (14 mol%) was also included. For the CPL-SPLP preparation, plasmid DNA was loaded into liposomes using the previously described detergent dialysis method and CPL were inserted into the preformed SPLP using a characterized insertion method. CPL were inserted to obtain a final 4 mol% insertion efficiency, as this level has been shown to provide optimal cellular binding and uptake. Ca^{2+} at 8 mM was added to the SPLP and CPL-SPLP preparations, diluted into the media before applying to the BHK cells. Gene expression was determined by assaying for luciferase, 24 h after incubation of the BHK cells together with the transfecting liposomes. As shown in **Figure 7**, a ~2000-fold increase and a 10^5 -fold increase in transfection were detected for the SPLP containing either higher DODAC content or CPL, respectively.

C. Discussion

This example demonstrates that Ca^{2+} gives rise to a large enhancement of SPLP transfection potency *in vitro*.

The mechanism whereby Ca^{2+} stimulates the transfection potency of SPLP must account for several observations. First, the enhanced transfection appears to result from higher intracellular levels of intact plasmid in the presence of Ca^{2+} ; these higher levels of plasmid do not appear to arise from increased uptake of SPLP into cells, however. Second, the process is associated with a reduction in the "punctate" appearance of cells following uptake of fluorescently labeled SPLP. Finally, the effect is Ca^{2+} specific. The first two observations are clearly consistent with enhanced endosomal destabilization of the BHK cells following endocytosis of SPLP. The question thus remaining is how Ca^{2+} could promote this

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
destabilization in a specific manner. In this regard, there is presently no consensus as to how
endosomes can be destabilized to enhance release of their contents, however a number of
leading observations have been made. Chief amongst these is the observation that cationic
lipids can dramatically enhance the intracellular delivery of macromolecules such as plasmids
and antisense oligonucleotides (Bennett, *et al.*, *Mol. Pharmacol.* 41:1023-1033 (1992);
5 Barron, *et al.*, *Gene Ther.* 6:1179-1183 (1999)) and that this process appears to rely on an
ability of cationic lipids to destabilize endosomal membranes, thus facilitating intracellular
release of endosomal contents (Wattiaux, *et al.*, *FEBS Letters* 417:199-202 (1997); Xu, *et al.*,
Biochemistry 35:5616-5623 (1996)). Recent work has shown that cationic lipids exhibit as a
10 general property the ability to combine with anionic lipids to form nonbilayer hexagonal H_{II}
phase structure, leading to the proposal that the mechanism whereby cationic lipids
destabilize endosomes relies on an ability to disrupt the bilayer organization of the endosomal
membrane. In the same vein, if Ca²⁺ could disrupt bilayer organization and induce H_{II} phase
structure similar enhancements in intracellular delivery would be expected.

15 There is considerable evidence that Ca²⁺ can induce H_{II} phase structure in
previously bilayer lipid systems containing anionic lipids, and that this effect is Ca²⁺-specific,
as other cations such as Mg²⁺ either cannot induce H_{II} structure or require higher
concentrations to produce similar effects (Tilcock, *et al.*, *Biochemistry*, 23:2696-2703
(1984)). As shown in the present example, Ca²⁺ can induce H_{II} phase structure in bilayers
20 composed of DOPC:DOPE:DOPS:Chol and can act in synergy with low levels of the cationic
lipid DODAC to trigger H_{II} phase formation. While it is difficult to directly relate the model
membrane behaviour to the behaviour inside the endosome, it is known that the anionic lipid
content of endosomes increases as they move from "early" to "late" stages due to formation
of a novel acidic lipid (lysobisphosphatidic acid; LBPA) and that mixtures of LBPA with
25 cationic lipids such as DODAC adopt the H_{II} phase. These results therefore support the
theory that Ca²⁺ enhances transfection by promoting endosomal destabilization in synergy
with cationic lipid. Such a proposal is also in agreement with the observation that the
addition of Ca²⁺ to LBPA results in formation of the H_{II} phase. Other workers have
suggested that Ca²⁺ plays a role in mediating endosomal release during calcium phosphate
30 (CaP_i) mediated transfection (Loyter, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:422-426 (1982);
Orrantia, *et al.*, *Experimental Cell Research* 190:170-174 (1990)), as well as in polycation-
mediated gene transfer (Bottger, *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1395:78-87 (1998);
Haberland, *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1445:21-30 (1999)).

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
A surprising aspect of the present study concerns the discrepancy between the influence of Ca^{2+} on the transfection properties of plasmid DNA-cationic lipid complexes previously reported (Lam, *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1463:279-290 (2000)) and the results reported here for SPLP. In particular, the previous work demonstrated that Ca^{2+} could enhance the transfection potency of complexes by up to 20-fold and that this could be attributed to enhanced uptake of the complexes into the cells, rather than enhanced endosomal release. The surprising aspect is that the increased transfection potency of SPLP in the presence of Ca^{2+} could not be related to increased uptake of SPLP by the cells, whereas Ca^{2+} caused at least a 2-fold increase in uptake of complexes as evidenced by uptake of both lipid and plasmid (Lam, *et al.*, *Biochim Biophys Acta* 1463:279-290 (2000)). It is likely that this discrepancy is related to the much different physical properties of SPLP as compared to complexes. Complexes are large, positively charged systems containing high (equimolar) levels of cationic lipid, whereas SPLP are small, stable, essentially neutral vesicles with a PEG coating that contain low levels of cationic lipid. The low levels of cationic lipid in SPLP as compared to complexes may be directly related to enhanced sensitivity to Ca^{2+} , as the cationic lipid present in the SPLP may be insufficient to combine with all available anionic lipid in the endosome, thus requiring the additional presence of Ca^{2+} to achieve maximum destabilization.

The final topic of discussion concerns extension of the results presented here to generate SPLP that exhibit enhanced transfection potencies *in vivo*. As emphasized elsewhere (Wheeler, *et al.*, *Gene Therapy* 6:271-281 (1999); Zhang, *et al.*, *Gene Therapy* 6:1438-1447 (1999)), a preferred method of SPLP delivery is by systemic application, where long circulation lifetimes and accumulation at disease sites such as tumour sites is required. The present results suggest that Ca^{2+} is preferably outside the SPLP in order to give rise to enhanced transfection. To achieve this, strategies aimed at increasing surface Ca^{2+} concentrations by attachment of Ca^{2+} -chelating agents to SPLP should give rise to enhanced *in vivo* transfection. In addition, a local increase in calcium concentration can be produced at the site of transfection, *e.g.*, by local (*e.g.*, intratumoral) delivery of the SPLP along with a high concentration of calcium, or by systemic delivery of the SPLP combined with local delivery of calcium to the desired site of transfection.

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
Example II: Stabilized Plasmid-Lipid Particles Containing Cationic PEG Lipids Exhibit
Enhanced Transfection Potencies

A. Materials and Methods

1. **Materials.** DOPE was obtained from Northern Lipids Inc. (Vancouver,
5 BC). Rh-PE, and PicoGreen were obtained from Molecular Probes (Eugene, OR). DODAC
was synthesized and supplied by Dr. S. Ansell of Inex Pharmaceuticals (Vancouver, BC).
PEG-CerC₂₀ was synthesized as indicated elsewhere (Webb, *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*
1372:272-282 (1998)) and was supplied by Dr. Z. Wang of Inex Pharmaceuticals
(Vancouver, BC). The pCMVLuc plasmid encodes the *Photinus pyralis* luciferase gene
10 under the control of the human CMV early promoter and was supplied by Dr. P. Tam of Inex
Pharmaceuticals (Vancouver, BC). The pCMVGFP plasmid contains the gene for the green
fluorescent protein from *Aequorea victoria* and was supplied by Dr. P. Tam of Inex
Pharmaceuticals (Vancouver, BC). DEAE-Sepharose CL-6B, Sepharose CL-4B, octyl- β -D-
galactoside, and HEPES were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, ON). Lipofectin was
15 obtained from Gibco BRL (Burlington, ON). BHK cells were obtained from Dr. R.
MacGillivray of the Department of Biochemistry and Molecular Biology, UBC.

2. **Preparation of SPLP-CPL₄.** SPLP composed of
DOPE:DODAC:PEG-CerC₂₀ (84:6:10) and containing the plasmid pCMVLuc (or
pCMVGFP) were prepared according to the method of Wheeler, *et al.* (*Gene Therapy* 6:271-
20 281 (1999)) using purification by anion exchange (DEAE-Sepharose CL-6B)
chromatography and sucrose density gradient centrifugation to remove unencapsulated
plasmid and empty vesicles, respectively. SPLP containing Rh-PE were prepared by
dissolving Rh-PE with other component lipids in CHCl₃ at a molar ratio of 83.5:10:6:0.5
(DOPE:DODAC:PEG-CerC₂₀:Rh-PE) prior to forming the lipid film.

CPL₄ was inserted into preformed SPLP by incubating SPLP (500 nmol lipid)
with CPL₄ (12.5, 19, and 30 nmol) at 60°C for 2 to 3 h in Hepes buffered saline (HBS),
pH 7.5, unless otherwise indicated. Unincorporated CPL₄ was removed by gel filtration
chromatography on a Sepharose CL-4B column equilibrated in HBS. Fractions (1 ml) were
collected and assayed for CPL₄, phospholipid and DNA content. Fractions containing all
25 three components were pooled and concentrated. CPL₄ content was determined by the
fluorescence of the dansyl labeled CPL at $\lambda_{em} = 510$ nm following excitation at $\lambda_{ex} = 340$ nm
30 employing a Perkin Elmer LS52 Luminescence spectrophotometer with excitation and

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
emission slit widths of 10 and 20 nm, respectively. A standard curve was derived from a stock solution of dansylated CPL in HBS. For SPLP containing Rh-PE the phospholipid content was determined from the fluorescence of the Rh label measured at $\lambda_{em}=590$ nm following excitation at $\lambda_{ex}=560$ nm, using excitation and emission slit widths of 10 and 20 nm, respectively. For SPLP that did not contain the Rh label, phospholipid was determined using the method of Fiske-Subbarow (*J. Biol. Chem.* 66:375-400 (1925)) following lipid extraction according to Bligh and Dyer (*Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911-917 (1959)). Plasmid DNA was determined using the PicoGreen Assay kit (Molecular Probes, Eugene, Oregon) as previously described (Mok, *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1419:137-150 (1999)).

For the Rh-PE containing systems, the incorporation of CPL₄ was determined by dividing the dansyl to rhodamine ratio before the Sepharose column by that after the column multiplied by 100%. For the other systems, incorporation was determined by dividing the CPL₄ content by the total lipid content and multiplying by 100%.

Lipoplexes were prepared at a charge ratio of 1.5:1 (positive-to-negative) by adding 25 μ L of 88 μ g/mL plasmid DNA (pCMVLuc or pCMVGFP) with 25 μ L of DOPE:DODAC (0.8 mM) while vortexing followed by incubation at room temperature for 30 min prior to addition to cells. Lipofectin lipoplexes were similarly prepared.

Quasi-elastic light scattering (QELS) studies were conducted employing a Nicomp Model 270 Submicron Particle Sizer operating in the vesicle mode. Freeze-fracture electron microscopy studies were performed as described by Wheeler *et al.*, *supra*.

DNA for Southern analysis was extracted using a phenol:chloroform extraction following incubation of SPLP systems with 50% mouse serum. The resulting DNA was then subjected to electrophoresis through a 1% agarose gel, transferred to a nylon membrane (Amersham) and subjected to Southern analysis. The membrane was exposed to random-primed ³²P-labelled PvuII restriction fragment from the luciferase gene according to current protocols. Hybridization intensities were quantified using a Phosphorimager™ SI from Molecular Dynamics. The data were converted to give amounts of intact DNA relative to undigested DNA.

Levels of PEG-CerC₂₀ and DOPE were determined by HPLC analyses performed by Northern Lipids, Inc, Vancouver, B.C.

3. Uptake and transfection studies. A transformed BHK cell line (tk) was used for all uptake and transfection studies. To determine the cellular uptake of SPLP, 1×10^5 BHK cells were seeded in each well of a 12-well plate and incubated overnight in 2 ml

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
of complete media (DMEM containing 10% FBS) at 37°C in 5% CO₂. SPLP, SPLP-CPL₄ in
media containing 40 mM CaCl₂, or DOPE:DODAC lipoplexes in a volume of 200 μL were
mixed with 800 μL of complete media at a final lipid dose of 20 μM and was added to the
cells. Plasmid DNA concentrations corresponded to 1.4 μg/mL and 2.2 μg/mL for the SPLP
5 systems and the lipoplexes, respectively. Cells were incubated at 37°C for indicated periods,
washed twice with PBS and lysed with 600 μL of lysis buffer (0.1% Triton X-100 in PBS).
Rhodamine fluorescence was determined using a λ_{exc} of 560 nm and a λ_{em} of 600 nm with slit
widths of 10 and 20 nm, respectively. An emission filter of 530 nm was also used. Lipid
uptake was determined by comparison of the fluorescence in the lysate to that of a lipid
10 standard and normalized to the cell number as determined by the BCA protein assay (Pierce,
Rockford, IL). Where indicated, fluorescence micrographs were obtained using an Axiovert
100 Zeiss Fluorescent microscope (Carl Zeiss Jena GmbH) using a rhodamine filter from
Omega Optical (Brattleboro, VT) with the following specifications: excitation
560±20/dichroic filter 590/long pass emission 600.

15 The effect of Ca²⁺ and Mg²⁺ on lipid uptake was determined as described
above with the following exceptions. BHK cells (5×10⁴ per well) were seeded in a 24-well
plate in 1 mL of complete media and incubated overnight at 37°C. SPLP-CPL₄ (40 nmol)
were mixed with CaCl₂ or MgCl₂ in a total volume of 100 μL. Complete media (400 μL) was
added to the SPLP-CPL₄ resulting in final cation concentrations of 4 to 14 mM. This mixture
20 was then added to the cells and incubated for 4 h at 37°C. Cells were then washed twice with
PBS and lysed in 600 μL of lysis buffer (0.1% Triton X-100 in PBS).

Unless otherwise indicated, transfection studies were performed employing
1×10⁴ BHK cells plated in each well of a 96-well plate in 150 μL complete media prior to
overnight incubation at 37°C in 5% CO₂. SPLP and SPLP-CPL₄ corresponding to 0.5 μg of
25 pCMVLuc in 20 μL HBS (SPLP), or HBS containing 40 mM CaCl₂ (SPLP-CPL₄) were
added to 80 μL of complete media for a plasmid concentration of 5.0 μg/mL. A transfection
time of 4 h with a total incubation time of 24 h was used routinely. The transfection time is
defined as the time the cells are incubated with the plasmid-containing particles whereas the
total incubation time is the transfection time (after which the transfection media is replaced)
30 plus the subsequent time the cells are incubated for prior to assaying for transgene
expression. After 24 h, the cells were lysed with 100 μL of lysis buffer, and 40 μL of the
lysate was transferred to a 96-well luminescence plate. Luciferase activity was determined
using a Luciferase reaction kit (Promega, Madison, WI), a luciferase standard (Boehringer-

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
Mannheim), and a ML3200 microtiter plate luminometer from Molecular Dynamics
(Chantilly, VA). Activity was normalized to the number of cells as determined by the BCA
protein assay (Pierce, Rockford, IL).

The transfection time course study included SPLP, SPLP-CPL, and Lipofectin
5 (Gibco BRL, Burlington, ON) and DOPE/DODAC lipoplexes containing pCMVLuc. The
lipoplexes were prepared as described earlier. After transfection times of 4, 8, and 24 h the
transfection media was removed and in the case of the 4 and 8 h transfections, was replaced
with complete media for a total incubation time of 24 h. At 24 h, all cells were lysed and
assayed for luciferase activity and protein content (BCA assay), as described above.
10 SPLP-CPL₄, DOPE:DODAC lipoplexes and Lipofectin lipoplexes containing
pCMVGFP were prepared as described for pCMVLuc. The transfections were performed as
described above at a plasmid DNA dose of 5.0 µg/mL. Following incubation of the samples
for 24 and 48 h, the transfection media was removed, the cells were washed, and fresh media
was added to the cells. The cells were then viewed under a Zeiss fluorescence microscope.
15 The number of cells expressing GFP were counted using a fluorescein filter (Omega
Opticals) with the following specifications: excitation 475±20/dichroic filter 500/emission
535±22.5. The transfection efficiency was expressed as percentage of cells expressing GFP.

B. Results

1. Cationic PEG lipids can be inserted into preformed SPLP.

20 Previous work has shown that SPLP exhibit lower uptake into cells and lower transfection
potencies than lipoplexes (Mok, *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1419:137-150 (1999)). It has
also been shown that surface-associated cationic PEG lipids (CPL), particularly those
containing four charges at the end of the PEG molecule (CPL₄; for structure see **Figure 8A**),
can dramatically enhance the uptake of LUV into cells. Further, CPL can be inserted into
25 preformed LUV with lipid compositions similar to SPLP employing a straightforward
incubation protocol. It was thus examined whether a similar procedure could be developed to
insert CPL₄ into SPLP. SPLP containing pCMVLuc were prepared by the detergent dialysis
procedure of Wheeler *et al.* (*Gene Therapy* 6:271-281 (1999)) from a lipid mixture
containing 6 mol% of the cationic lipid N,N-dioleoyl-N,N-dimethyl ammonium chloride
30 (DODAC), 84 mol% of the "fusogenic" helper lipid dioleoyl phosphatidylethanolamine
(DOPE) and 10 mol% of a stabilizing lipid consisting of PEG₂₀₀₀ attached to a ceramide
(Cer) anchor (PEG-Cer). The ceramide anchor of the PEG-Cer contained a C₂₀ acyl chain
(PEG-Cer₂₀) that does not readily exchange out of the vesicle, thus contributing to a highly

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
stable SPLP system (Wheeler, *et al.*, *Gene Therapy* 6:271-281 (1999)). The detergent dialysis procedure results in the formation of a mixture of SPLP containing one plasmid per vesicle, free plasmid, and empty vesicles. SPLP were purified by removing free plasmid and empty vesicles by DEAE column chromatography and density centrifugation, respectively, as described elsewhere (Wheeler, *et al.*, *Gene Therapy* 6:271-281 (1999)).

The procedure for post-insertion of CPL₄ into the preformed SPLP is illustrated in **Figure 8B**. Purified SPLP were incubated with CPL₄ (~5 mol%) at 60°C for up to 3 h and then separated from nonincorporated CPL₄ by column chromatography. As shown in **Figure 9**, this resulted in association of up to 80% of the available CPL₄ with the SPLP, corresponding to 4 mol% of the total lipid in the SPLP-CPL₄ system.

2. SPLP-CPL₄ aggregate following insertion of CPL₄ and de-aggregate following addition of divalent cations. Previous work has shown that LUV containing CPL tend to aggregate and that this aggregation can be inhibited by increasing the ionic strength of the medium. It was found that SPLP-CPL₄ were also susceptible to aggregation, and that this aggregation could be reversed by adding NaCl, CaCl₂ or MgCl₂ to the SPLP-CPL₄ formulation. This effect is illustrated in **Figure 10** which shows the effect of the addition of CaCl₂ and MgCl₂ on aggregation of SPLP-CPL₄ as monitored by the change in the standard deviation of the mean diameter of the particles measured by quasi-elastic light scattering (QELS). For both cations the standard deviation decreased with increasing cation concentration with optimal de-aggregation occurring above 30 mM. This behaviour could also be visualized by freeze-fracture electron microscopy. As shown in **Figure 11A**, freeze-fracture micrographs of SPLP reveal small monodisperse particles, whereas SPLP-CPL₄ prepared in the absence of CaCl₂ are highly aggregated (**Figure 11B**). As shown in **Figure 11C**, the addition of 40 mM CaCl₂ reverses this aggregation to produce monodisperse particles similar to the SPLP preparation.

The sizes of SPLP and SPLP-CPL₄ in the presence of CaCl₂ were compared using QELS and freeze-fracture electron microscopy. QELS studies revealed the mean diameter of SPLP and SPLP-CPL₄ to be 80 ± 19 nm and 76 ± 15 nm, respectively, whereas the freeze-fracture studies indicated diameters of 68 ± 11 nm and 64 ± 14 nm. These values for SPLP diameters are in close agreement with previous studies (Wheeler, *et al.*, *Gene Therapy* 6:271-281 (1999)).

WO 01/80900, PCT/CA01/00555
3. **PEG-CerC₂₀ content and stability of SPLP-CPL₄.** The observation

that CPL₄ can be inserted to achieve levels as high as 4 mol% of the total SPLP lipid indicates that the level of CPL₄ in the outer monolayer of the SPLP-CPL₄ is 8 mol%. Given that the initial concentration of PEG-CerC₂₀ is 10 mol%, this suggests that the total levels of PEG-lipids in the outer monolayer of the SPLP-CPL₄ can approach 18 mol%. These levels are higher than the levels of PEG-lipids that can usually be incorporated into lipid vesicles (Woodle, *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1113:171-199 (1992)) leading to the possibility that some of the PEG-CerC₂₀ in the outer monolayer exchanged out as CPL₄ was inserted. This was examined by measuring the ratio of PEG-CerC₂₀-to-DOPE for the SPLP before and after insertion of CPL₄ employing HPLC. CPL₄ was inserted into SPLP as described previously. Analysis following removal of nonincorporated material determined that 4 mol% CPL₄ (normalized to the total SPLP lipid) was inserted into the SPLP. Prior to insertion of the CPL₄ the PEG-CerC₂₀-to-DOPE ratio was 0.091, corresponding to a PEG-CerC₂₀ content of 7.6 mol%, assuming that the DOPE constituted 84 mol% of the lipid content. Following insertion of the CPL₄ the PEG-CerC₂₀-to-DOPE ratio was found to be 0.072, indicating a PEG-CerC₂₀ content of 6.0 mol%. Assuming that all of the PEG-CerC₂₀ lost from the SPLP during insertion of the CPL₄ is lost from the outer monolayer, this indicates that the PEG-CerC₂₀ content of the outer monolayer decreases from 7.6 mol% to 4.4 mol% during the insertion process. The total PEG-lipid content in the outer monolayer of the SPLP-CPL₄ can then be estimated to be 12.4 mol% of the outer monolayer lipid.

The stability of SPLP and SPLP-CPL₄ following incubation in 50% mouse serum for up to 4 h is illustrated in Figure 12. In all cases, the encapsulated plasmid DNA was fully protected from serum degradation. In contrast, essentially complete degradation of the plasmid in lipoplexes was observed within 30 min of incubation in serum.

4. **SPLP-CPL₄ exhibit enhanced uptake into BHK cells and dramatically enhanced transfection potency.** The next set of experiments was aimed at determining the influence of incorporated CPL₄ on the uptake of SPLP into BHK cells and the resulting transfection potency of the SPLP-CPL₄ system. SPLP containing up to 4 mol% CPL₄ were prepared in the presence of 40 mM CaCl₂ and were added to BHK cells (final CaCl₂ concentration 8 mM) and incubated for varying times. The cells were then assayed for associated SPLP-CPL₄ as indicated in the above Materials and Methods. As shown in Figure 13A, while uptake of SPLP that contain no CPL₄ is minimal even after 8 h of incubation, uptake is dramatically improved for SPLP containing 3 mol% or higher levels of CPL₄. For

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
example, SPLP containing 4 mol% CPL₄ exhibit accumulation levels at 8 h that are approximately 50-fold higher than achieved for SPLP in the absence of CPL. This enhanced uptake is visually illustrated in **Figure 13B**, which shows fluorescence micrographs of BHK cells following incubation with rhodamine-labeled SPLP and SPLP-CPL₄ for 4 h.

5 The transfection properties of SPLP, SPLP-CPL₄ and plasmid DNA-cationic liposome lipoplexes (DODAC/DOPE; 1:1) were examined using the transfection protocol described in the above Materials and Methods. This protocol involves incubation of BHK cells with SPLP or lipoplexes for 4 h (the transfection time) followed by replacement of media and further incubation to maximize transgene expression. The total incubation time
10 (transfection time plus time of incubation following the media change) was kept constant at 24 h. As shown in **Figure 14**, the presence of increasing amounts of CPL₄ resulted in dramatic increases in the transfection potency for the SPLP system. SPLP-CPL₄ containing 4 mol% CPL₄ exhibited luciferase expression levels some 3×10^3 higher than achieved with SPLP.

15 **5. Ca²⁺ is required for transfection activity of SPLP-CPL₄.**

Example 1, *supra*, demonstrates that the transfection potency of SPLP is highly sensitive to the presence of Ca²⁺, where the presence of ~10 mM Ca²⁺ enhances transfection potency several hundred-fold. It was therefore of interest to determine the influence of Ca²⁺ on the transfection activity of SPLP-CPL₄. SPLP containing 4 mol% CPL₄ were incubated with
20 BHK cells for 48 h in the presence of varying amounts of MgCl₂ and CaCl₂, and the luciferase activities were determined. As shown in **Figure 15**, the transfection activity was primarily dependent on the presence of Ca²⁺ in the transfection medium. At the optimum CaCl₂ concentration of 10 mM, SPLP-CPL₄ exhibited transfection potencies that were more than 10³ times higher than if the corresponding amount of MgCl₂ was present.

25 In order to determine whether the different transfection properties of SPLP-CPL₄ in the presence of Ca²⁺ or Mg²⁺ could be accounted for by differences in uptake into cells, the accumulation of SPLP-CPL₄ into BHK cells was monitored following a 4 h incubation in the presence of MgCl₂ or CaCl₂. As shown in **Figure 16**, uptake of SPLP-CPL₄ into BHK cells is the same for both Ca²⁺ and Mg²⁺. It may be noted that SPLP-CPL₄ uptake
30 decreases slightly as the concentration of divalent cations increases, likely due to the shielding of the negatively charged CPL₄ binding sites on the surface of BHK cells. These results are consistent with a previous study indicating that Ca²⁺ has little effect on the cellular uptake of SPLP.

WO 01/80900

PCT/CA01/00555

SPLP-CPL₄ exhibit transfection potencies *in vitro* that are comparable to or greater than the transfection potencies of lipoplexes. The data presented in Figure 14 indicate that DOPE/DODAC lipoplexes yield ~100-fold higher levels of gene expression than SPLP-CPL₄ when applied to BHK cells for a period of 4 h. Given that SPLP-CPL₄ are stable systems, uptake can conceivably continue over extended time periods. The transfection levels achieved when SPLP-CPL₄ or the lipoplexes were applied to BHK cells for transfection times of 4, 8 and 24 h were thus examined. Two types of lipoplexes were used, namely DOPE:DODAC (1:1) lipoplexes (charge ratio 1.5) and lipoplexes generated using the transfection reagent Lipofectin, consisting of DOPE:DOTMA (1:1) lipoplexes at a charge ratio of 1.5. As shown in Figure 17, the potency of SPLP-CPL₄ increases markedly with increased transfection times, suggesting that the rate of uptake of the SPLP-CPL₄ system may be a limiting factor for transfection. For the 24 h transfection time, where the cells are assayed for luciferase expression immediately after the transfection period, transfection levels are comparable to those achieved by Lipofectin or the DOPE/DODAC lipoplexes.

Further experiments were conducted to determine transfection levels after transfection times of 24 and 48 h with SPLP-CPL₄ and lipoplexes where luciferase activities were assayed immediately following the transfection period. As shown in Figure 18A the activity of Lipofectin (DOPE:DOTMA) lipoplexes leveled off at ~2000 ng luciferase per mg of cell protein after 24 h. Similar results were obtained for the DOPE:DODAC lipoplexes. In contrast, the activity of the SPLP-CPL₄ formulation continued to increase as the incubation time was increased, achieving luciferase expression levels corresponding to 4000 ng per mg of cell protein at 48 h. This activity is approximately 10⁶ times higher than observed for SPLP (in the absence of Ca²⁺) and almost double the levels that can be achieved by Lipofectin lipoplexes.

6. SPLP-CPL₄ are nontoxic and efficient transfection agents. It is well known that lipoplexes can be toxic to cells. The SPLP-CPL₄ contain low levels of cationic lipid and are potentially less toxic than lipoplexes. The toxicities of SPLP-CPL₄ and lipoplexes were assayed by determining cell viability following a 24 h and 48 h exposure to levels of SPLP-CPL₄ and lipoplexes corresponding to 5.0 µg/mL plasmid, corresponding to total lipid doses of approximately 80 µM and 45 µM for SPLP-CPL₄ and lipoplexes, respectively. As shown in Figure 18B, SPLP-CPL₄ exhibited little toxicity, whereas lipoplexes were highly toxic. Cell survival was only 30% after a 48 h incubation with

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
Lipofectin lipoplexes, whereas ~95% of the cells were viable following a 48 h incubation with SPLP-CPL₄.

Studies were also conducted to determine the efficiency of transfection as indicated by the proportion of cells transfected by SPLP-CPL₄. The proportion of transfected cells was determined by employing plasmid containing the green fluorescent protein (GFP) gene. GFP expression was detected by fluorescence microscopy. As shown in **Figures 19A and 19B**, approximately 35% of the cells at 24 h and 50% at 48 h were transfected by SPLP-CPL₄, with no apparent cell death. In contrast, Lipofectin lipoplexes exhibit maximum transfection efficiencies of less than 35% and only ~50% cell survival after the 24 h transfection period (**Figure 19C**). Similar low transfection efficiencies and high toxicities were also seen with DOPE:DODAC lipoplexes.

C. Discussion

These results demonstrate that the incorporation of CPL₄ into SPLP results in improved uptake into BHK cells and dramatically enhanced transfection potencies of SPLP when Ca²⁺ is present. There are three points of interest. The first concerns the chemical composition and structure of the SPLP-CPL₄ system and the generality of the post-insertion procedure for modifying the tropism and transfection potency of SPLP. The second concerns the relation between enhanced uptake of SPLP, the presence of Ca²⁺ and the transfection activities observed. Finally, it is of interest to compare the properties of the SPLP-CPL₄ system with lipoplexes. Each of these areas is addressed below in turn.

The results presented here demonstrate that the cationic PEG lipid CPL₄ can be inserted into preformed SPLP employing a simple process involving incubation at 60°C. The ability to insert CPL₄ to levels corresponding, for example, to about 8 mol% of the total lipid in the SPLP outer monolayer is consistent with results of other workers demonstrating that PEG-PE can be inserted into preformed LUV employing a similar incubation protocol, resulting in systems exhibiting extended circulation lifetimes (Uster, *et al.*, *FEBS Lett.* 386:243-246 (1996)). It is also consistent with previous results showing that CPL₄ can be inserted into preformed LUV with a lipid composition similar to the SPLP system. The total levels of PEG-lipids achieved in the outer monolayer (12.4 mol%) are high given that maximum levels of incorporation of PEG-lipids into LUV are commonly 7-10 mol% (Woodle, *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1113:171-199 (1992)). However, a number of authors have reported that PEG-lipids can be incorporated into LUV to levels as high as 15 mol% before lytic effects are observed (Edwards, *et al.*, *Biophys. J.* 73:258-266 (1997);

WO 01/80900

PCT/CA01/00555

Kenworthy, *et al.*, *Biophys. J.* 68:1903-1920 (1995); Hristova, *et al.*, *Macromolecules* 28:7693-7699 (1995)). These include cryo-electron microscopy studies which indicate that structural changes (from spheres to discs) are only observed for distearoylphosphatidylcholine (DSPC) liposomes at PEG-PE levels above 12 mol%, with lytic effects observed above 15 mol% (Edwards, *et al.*, *Biophys. J.* 73:258-266 (1997)). Similarly, X-ray studies indicate that nonbilayer micellar structures are only observed for PEG-lipid levels above 15 mol% (Kenworthy, *et al.*, *Biophys. J.* 68:1903-1920 (1995); Hristova, *et al.*, *Macromolecules* 28:7693-7699 (1995)).

The tendency for the SPLP-CPL₄ system to aggregate following insertion of the CPL₄ is consistent with previous observations that LUV containing CPL₄ also aggregate. The reason for this aggregation is not currently understood, although two general points can be made. First, the interaction is likely due to electrostatic interactions between vesicles given the inhibition of aggregation at higher ionic strengths. Second, the aggregation is not a consequence of the post-insertion process itself as such aggregation is also observed for LUV containing CPL₄, where the CPL₄ was present in the lipid mixture from which the LUV were formed. It is possible that the cationic headgroup interacts with opposed membranes at the level of the phospholipid phosphate group. Alternatively, the aggregation phenomenon may be related to the ability of PEG coatings to adopt a conformation that is able to bind proteins such as streptavidin (Sheth, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:8399-8404 (1997)).

The second point of discussion concerns the mechanism whereby CPL₄ increases the transfection potency of the SPLP system. A number of studies have indicated that the cationic lipids contained in lipoplex systems play a direct role in stimulating uptake into cells (Miller, *et al.*, *Biochemistry* 37:12875-12883 (1998)) and that this uptake arises due to the positive charge on the lipoplexes (van der Woude, *et al.*, *Biochim Biophys Acta* 1240:34-40 (1995)). It has been suggested that heparin sulfonated proteoglycans on the cell surface play a primary role in this process (Mislick, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:12349-12354 (1996); Mounkes, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 273:26164-26170 (1998)). Enhanced uptake of SPLP following addition of the CPL₄ could be due to similar mechanisms, although the increase in transfection potency is largely dependent on the additional presence of Ca²⁺. Example I shows that the presence of Ca²⁺ results in an increase in SPLP transfection potency of ~600 fold, and that this increase results from an ability of Ca²⁺ to assist in destabilizing the endosomal membrane following uptake, rather than from an increase in uptake. It is therefore possible that the observed improvements in transfection potency for SPLP-CPL₄ over SPLP result from improvements in uptake mediated by the

WO 01/80900 PCT/CA01/00555
CPL₄ coupled with enhanced abilities to destabilize the endosomal membrane due to the presence of Ca²⁺. In this regard, the transfection potency of SPLP-CPL₄ (in the presence of Ca²⁺) is increased by a factor of ~10⁴ (Figure 14) in comparison to the transfection potency of SPLP in the absence of Ca²⁺. This could be accounted for by an increase in uptake of SPLP into BHK cells by approximately 50-fold due to the presence of 4 mol% CPL₄ (Figure 13A, 4 h incubation) multiplied by a factor of ~600 due to the presence of Ca²⁺.

The final area of discussion concerns the advantages of the SPLP-CPL₄ system over other nonviral vectors, which include the well-defined modular nature of the SPLP-CPL₄ system as well as toxicity and potency issues. First, SPLP-CPL₄ are small, homogeneous, stable systems containing one plasmid per particle (Wheeler, *et al.*, *Gene Therapy* 6:271-281 (1999)), in contrast with other nonviral systems such as lipoplexes, which are large, heterogeneous, unstable systems containing ill-defined numbers of plasmids per particle. An important point is that SPLP are basic components of more sophisticated systems, such as SPLP-CPL₄, that can be constructed in a modular fashion. For example, post-insertion of PEG-lipids containing specific targeting ligands in place of the cationic groups of CPL should result in SPLP that are specifically targeted to particular cells and tissues. With regard to toxicity, SPLP-CPL₄ are markedly less toxic to BHK cells in tissue culture than are lipoplexes. This is presumably related to the low proportions of cationic lipid contained in SPLP as compared to lipoplexes. Finally, SPLP without CPL₄ or Ca²⁺ exhibit transfection properties *in vivo* following systemic administration that are already superior to the transfection properties of plasmid DNA-cationic lipid complexes or naked plasmid DNA. The results presented here suggest that further significant gains can be expected through the use of ligands that encourage SPLP uptake into cells and methods leading to local increases in Ca²⁺ concentrations.

In summary, the results presented here demonstrate that a cationic PEG lipid can be post-inserted into SPLP, resulting in well-defined SPLP-CPL₄ systems that exhibit improved uptake into BHK cells *in vitro*. In the presence of Ca²⁺ SPLP-CPL₄ systems give rise to transfection potencies that are increased by up to 10⁶-fold as compared to SPLP in the absence of Ca²⁺. These results indicate that the SPLP system is a nontoxic, highly transfection potent entity following uptake into cells and indicates that SPLP targeted to cell-surface ligands that undergo endocytosis should lead to significant enhancement of transfection potency *in vivo*.

WO 01/80900

PCT/CA01/00555

It is understood that the examples and embodiments described herein are for illustrative purposes only and that various modifications or changes in light thereof will be suggested to persons skilled in the art and are to be included within the spirit and purview of this application and scope of the appended claims. All publications, patents, and patent
5 applications cited herein are hereby incorporated by reference in their entirety for all purposes.

WO 01/80900
WHAT IS CLAIMED IS:

PCT/CA01/00555

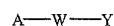
- 1 1. A nucleic acid-lipid particle composition for introducing a nucleic acid
2 into a cell, said particle comprising: a cationic lipid, a conjugated lipid that inhibits
3 aggregation of particles, a nucleic acid and an endosomal membrane destabilizer.
- 1 2. The nucleic acid-lipid particle composition of claim 1, wherein said
2 endosomal membrane destabilizer is outside said nucleic acid-lipid particle.
- 1 3. The nucleic acid-lipid particle composition of claim 1, wherein said
2 endosomal membrane destabilizer is both outside and inside said nucleic acid-lipid particle.
- 1 4. The nucleic acid-lipid particle composition of claim 1, wherein said
2 endosomal membrane destabilizer is Ca^{++} ion.
- 1 5. The nucleic acid-lipid particle composition of claim 4, wherein the
2 concentration of Ca^{++} ion is from about 0.1 mM to about 100 mM.
- 1 6. The nucleic acid-lipid particle composition of claim 5, wherein the
2 concentration of Ca^{++} ion is from about 1 mM to about 20 mM.
- 1 7. The nucleic acid-lipid particle composition of claim 1, wherein said
2 particle has a median diameter of less than about 150 nm.
- 1 8. The nucleic acid-lipid particle composition of claim 1, wherein said
2 cationic lipid is a member selected from the group consisting of N,N-dioleyl-N,N-
3 dimethylammonium chloride (DODAC), N,N-distearyl-N,N-dimethylammonium bromide
4 (DDAB), N-(1-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylammonium chloride (DOTAP), N-
5 (1-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylammonium chloride (DOTMA), and N,N-
6 dimethyl-2,3-dioleoyloxypropylamine (DODMA), and combinations thereof.
- 1 9. The nucleic acid-lipid particle composition of claim 1, wherein said
2 particle further comprises an additional noncationic lipid.
- 1 10. The nucleic acid-lipid particle composition of claim 9, wherein said
2 noncationic lipid is selected from the group consisting of DOPE, POPC, and EPC.

WO 01/80900

PCT/CA01/00555

1 11. The nucleic acid-lipid particle composition of claim 1, wherein said
2 particle comprises a functional group that facilitates Ca⁺⁺ ion chelation.

1 12. The nucleic acid-lipid particle composition of claim 1, wherein said
2 conjugated lipid that inhibits aggregation of particles has the formula



I

3
4 wherein: A is a lipid moiety;
5 W is a hydrophilic polymer; and
6 Y is a polycationic moiety.

1 13. The nucleic acid-lipid particle composition of claim 12, wherein W is a
2 polymer selected from the group consisting of PEG, polyamide, polylactic acid, polyglycolic
3 acid, polylactic acid/polyglycolic acid copolymers and combinations thereof, said polymer
4 having a molecular weight of about 250 to about 7000 daltons.

1 14. The nucleic acid-lipid particle composition of claim 12, wherein Y has
2 at least 4 positive charges at a selected pH.

1 15. The nucleic acid-lipid particle composition of claim 12, wherein Y is a
2 member selected from the group consisting of lysine, arginine, asparagine, glutamine,
3 derivatives thereof and combinations thereof.

1 16. The nucleic acid-lipid particle composition of claim 12, wherein A is a
2 member selected from the group consisting of a diacylglycerol moiety, a dialkylglycerol
3 moiety, a N,N-dialkylamino moiety, a 1,2-diacyloxy-3-aminopropane moiety and a 1,2-
4 dialkyl-3-aminopropane moiety.

1 17. The nucleic acid-lipid particle composition of claim 12, wherein W is
2 PEG.

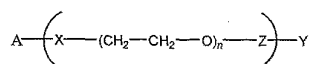
1 18. The nucleic acid-lipid particle composition of claim 12, wherein W is a
2 polyamide polymer.

1 19. The nucleic acid-lipid particle composition of claim 12, wherein W has
2 a molecular weight of about 250 to about 2000 daltons.

WO 01/80900

PCT/CA01/00555

1 20. The nucleic acid-lipid particle composition of claim 17, having the
2 general structure of Formula II:



II

3
4 wherein

5 X is a member selected from the group consisting of a single bond or a
6 functional group covalently attaching said lipid to at least one ethylene oxide unit;

7 Z is a member selected from the group consisting of a single bond or a
8 functional group covalently attaching said at least one ethylene oxide unit to a cationic group;
9 and

10 n is an integer having a value of between about 6 to about 50.

1 21. The nucleic acid-lipid particle composition of claim 20, wherein

2 X is a member selected from the group consisting of a single bond,
3 phosphatidylethanolamino, phosphatidylethanolamido, phosphoro, phospho,
4 phosphoethanolamino, phosphoethanolamido, carbonyl, carbamate, carboxyl, carbonate,
5 amido, thioamido, oxygen, sulfur and NR, wherein R is a hydrogen or alkyl group.

1 22. The nucleic acid-lipid particle composition of claim 20, wherein

2 Z is a member selected from the group consisting of a single bond,
3 phosphatidylethanolamino, phosphatidylethanolamido, phosphoro, phospho,
4 phosphoethanolamino, phosphoethanolamido, carbonyl, carbamate, carboxyl, carbonate,
5 amido, thioamido, oxygen, sulfur and NR, wherein R is a hydrogen or alkyl group.

1 23. The nucleic acid-lipid particle composition of claim 20, wherein

2 A is a diacylglycerol moiety;
3 X is phosphoethanolamido;
4 Z is NR, wherein R is a hydrogen atom; and
5 Y is a member selected from the group consisting of about 1 to about 10 basic
6 amino acids or derivatives thereof.

1 24. The nucleic acid-lipid particle composition of claim 23, wherein

- WO 01/80900 PCT/CA01/00555
- 2 A is a diacylglycerol moiety having 2 fatty acyl chains, wherein each acyl
3 chain is independently between 2 and 30 carbons in length and is either saturated or has
4 varying degrees of saturation.
- 1 25. The nucleic acid-lipid particle composition of claim 23, wherein
2 Y is a member selected from the group consisting of lysine, arginine,
3 asparagine, glutamine, derivatives thereof and combinations thereof.
- 1 26. The nucleic acid-lipid particle composition of claim 23, wherein
2 A is a diacylglycerol moiety having 2 fatty acyl chains, wherein each acyl
3 chain is a saturated C-18 carbon chain; and
4 Y is a cationic group having 4 lysine residues or derivatives thereof.
- 1 27. The nucleic acid-lipid particle composition of claim 1, wherein said
2 conjugated lipid that inhibits aggregation of particles is a PEG-lipid.
- 1 28. The nucleic acid-lipid particle composition of claim 27, wherein said
2 PEG-lipid is PEG-ceramide.
- 1 29. The nucleic acid-lipid particle composition of claim 28, wherein the
2 ceramide of said PEG-ceramide comprises a fatty acid group having about 8 to about 20
3 carbon atoms.
- 1 30. The nucleic acid-lipid particle composition of claim 28, wherein said
2 PEG-lipid is PEG-phosphatidylethanolamine.
- 1 31. The nucleic acid-lipid particle composition of claim 1, wherein said
2 conjugated lipid that inhibits aggregation of particles is an ATTA-lipid.
- 1 32. The nucleic acid-lipid particle composition of claim 1, wherein said
2 nucleic acid is selected from the group consisting of a plasmid, an antisense oligonucleotide,
3 and a ribozyme.
- 1 33. A method of introducing a nucleic acid into a cell, said method
2 comprising:
3 contacting said cell with a nucleic acid-lipid particle composition, said particle
4 comprising a cationic lipid, a conjugated lipid that inhibits aggregation of particles, and a
5 nucleic acid; and an endosomal membrane destabilizer.

WO 01/80900

PCT/CA01/00555

1 34. The method of introducing a nucleic acid into a cell of claim 33,
2 wherein said endosomal membrane destabilizer is outside said nucleic acid-lipid particle.

1 35. The method of introducing a nucleic acid into a cell of claim 33,
2 wherein said endosomal membrane destabilizer is Ca^{++} ion.

1 36. The method of introducing a nucleic acid into a cell of claim 35,
2 wherein the concentration of Ca^{++} ion is from about 0.1 mM to about 100 mM.

1 37. The method of introducing a nucleic acid into a cell of claim 36,
2 wherein the concentration of Ca^{++} ion is from about 1 mM to about 20 mM.

1 38. The method of introducing a nucleic acid into a cell of claim 33,
2 wherein said particle has a median diameter of less than about 150 nm.

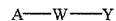
1 39. The method of introducing a nucleic acid into a cell of claim 33,
2 wherein said cationic lipid is a member selected from the group consisting of N,N-dioleoyl-
3 N,N-dimethylammonium chloride (DODAC), N,N-distearyl-N,N-dimethylammonium
4 bromide (DDAB), N-(1-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylammonium chloride
5 (DOTAP), N-(1-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylammonium chloride (DOTMA),
6 and N,N-dimethyl-2,3-dioleoyloxypropylamine (DODMA), and combinations thereof.

1 40. The method of introducing a nucleic acid into a cell of claim 33,
2 wherein said particle further comprises an additional noncationic lipid.

1 41. The method of introducing a nucleic acid into a cell of claim 40,
2 wherein said noncationic lipid is selected from the group consisting of DOPE, POPC, and
3 EPC.

1 42. The method of introducing a nucleic acid into a cell of claim 33,
2 wherein said particle comprises a functional group that facilitates Ca^{++} ion chelation.

1 43. The method of introducing a nucleic acid into a cell of claim 33,
2 wherein said conjugated lipid that inhibits aggregation of particles has the formula



3

I

WO 01/80900

PCT/CA01/00555

4 wherein: A is a lipid moiety;
 5 W is a hydrophilic polymer; and
 6 Y is a polycationic moiety.

1 44. The method of introducing a nucleic acid into a cell of claim 43,
 2 wherein W is a polymer selected from the group consisting of PEG, polyamide, polylactic
 3 acid, polyglycolic acid, polylactic acid/polyglycolic acid copolymers and combinations
 4 thereof, said polymer having a molecular weight of about 250 to about 7000 daltons.

1 45. The method of introducing a nucleic acid into a cell of claim 43,
 2 wherein Y has at least 4 positive charges at a selected pH.

1 46. The method of introducing a nucleic acid into a cell of claim 43,
 2 wherein Y is a member selected from the group consisting of lysine, arginine, asparagine,
 3 glutamine, derivatives thereof and combinations thereof.

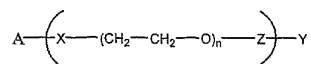
1 47. The method of introducing a nucleic acid into a cell of claim 43,
 2 wherein A is a member selected from the group consisting of a diacylglycerol moiety, a
 3 dialkylglycerol moiety, a N-N-dialkylamino moiety, a 1,2-diacyloxy-3-aminopropane
 4 moiety and a 1,2-dialkyl-3-aminopropane moiety.

1 48. The method of introducing a nucleic acid into a cell of claim 43,
 2 wherein W is PEG.

1 49. The method of introducing a nucleic acid into a cell of claim 43,
 2 wherein W is a polyamide polymer.

1 50. The method of introducing a nucleic acid into a cell of claim 43,
 2 wherein W has a molecular weight of about 250 to about 2000 daltons.

1 51. The method of introducing a nucleic acid into a cell of claim 48,
 2 having the general structure of Formula II:



II

3
 4 wherein

WO 01/80900

PCT/CA01/00555

5 X is a member selected from the group consisting of a single bond or a
6 functional group covalently attaching said lipid to at least one ethylene oxide unit;
7 Z is a member selected from the group consisting of a single bond or a
8 functional group covalently attaching said at least one ethylene oxide unit to a cationic group;
9 and
10 n is an integer having a value of between about 6 to about 50.

1 52. The method of introducing a nucleic acid into a cell of claim 51,
2 wherein

3 X is a member selected from the group consisting of a single bond,
4 phosphatidylethanolamino, phosphatidylethanolamido, phosphoro, phospho,
5 phosphoethanolamino, phosphoethanolamido, carbonyl, carbamate, carboxyl, carbonate,
6 amido, thioamido, oxygen, sulfur and NR, wherein R is a hydrogen or alkyl group.

1 53. The method of introducing a nucleic acid into a cell of claim 51,
2 wherein

3 Z is a member selected from the group consisting of a single bond,
4 phosphatidylethanolamino, phosphatidylethanolamido, phosphoro, phospho,
5 phosphoethanolamino, phosphoethanolamido, carbonyl, carbamate, carboxyl, carbonate,
6 amido, thioamido, oxygen, sulfur and NR, wherein R is a hydrogen or alkyl group.

1 54. The method of introducing a nucleic acid into a cell of claim 51,
2 wherein

3 A is a diacylglycerol moiety;
4 X is phosphoethanolamido;
5 Z is NR, wherein R is a hydrogen atom; and
6 Y is a member selected from the group consisting of about 1 to about 10 basic
7 amino acids or derivatives thereof.

1 55. The method of introducing a nucleic acid into a cell of claim 54,
2 wherein

3 A is a diacylglycerol moiety having 2 fatty acyl chains, wherein each acyl
4 chain is independently between 2 and 30 carbons in length and is either saturated or has
5 varying degrees of saturation.

WO 01/80900

PCT/CA01/00555

- 1 56. The method of introducing a nucleic acid into a cell of claim 54,
2 wherein
3 Y is a member selected from the group consisting of lysine, arginine,
4 asparagine, glutamine, derivatives thereof and combinations thereof.
- 1 57. The method of introducing a nucleic acid into a cell of claim 54,
2 wherein
3 A is a diacylglycerol moiety having 2 fatty acyl chains, wherein each acyl
4 chain is a saturated C-18 carbon chain; and
5 Y is a cationic group having 4 lysine residues or derivatives thereof.
- 1 58. The method of introducing a nucleic acid into a cell of claim 33,
2 wherein said conjugated lipid that inhibits aggregation of particles is a PEG-lipid.
- 1 59. The method of introducing a nucleic acid into a cell of claim 58,
2 wherein said PEG-lipid is PEG-ceramide.
- 1 60. The method of introducing a nucleic acid into a cell of claim 59,
2 wherein the ceramide of said PEG-ceramide comprises a fatty acid group having about 8 to
3 about 20 carbon atoms.
- 1 61. The method of introducing a nucleic acid into a cell of claim 59,
2 wherein said PEG-lipid is PEG-phosphatidylethanolamine.
- 1 62. The method of introducing a nucleic acid into a cell of claim 33,
2 wherein said conjugated lipid that inhibits aggregation of particles is an ATTA-lipid.
- 1 63. The method of introducing a nucleic acid into a cell of claim 33,
2 wherein said nucleic acid is selected from the group consisting of a plasmid, an antisense
3 oligonucleotide, and a ribozyme.
- 1 64. A method for inducing H_{II} phase structure in a lipid bilayer, said
2 method comprising: contacting said lipid bilayer with an endosomal membrane destabilizer,
3 thereby inducing H_{II} phase structure in a lipid bilayer.
- 1 65. The method for inducing H_{II} phase structure of claim 64, wherein said
2 lipid bilayer comprises DOPC:DOPE:DOPS:Chol.

WO 01/80900

PCT/CA01/00555

1 66. The method for inducing H_{II} phase structure of claim 64, wherein said
2 endosomal membrane destabilizer is Ca^{++} ion.

1 67. The method for inducing H_{II} phase structure of claim 66, wherein Ca^{++}
2 ion acts in concert with low levels of the cationic lipid to trigger H_{II} phase formation.

1 68. Use of nucleic acid-lipid particle composition for introducing a nucleic
2 acid into a cell, said particle comprising: a cationic lipid, a conjugated lipid that inhibits
3 aggregation of particles, a nucleic acid and an endosomal membrane destabilizer.

1

WO 01/80900

PCT/CA01/00555

1/23

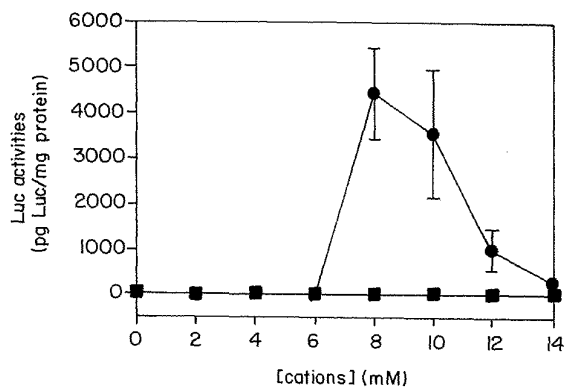


FIG. 1.

WO 01/80900

PCT/CA01/00555

2/23

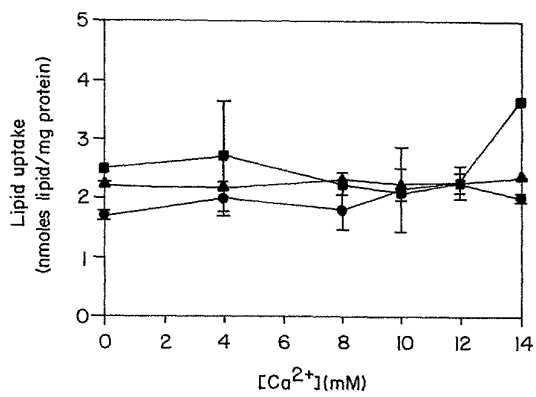


FIG. 2.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/80900

PCT/CA01/00555

3/23

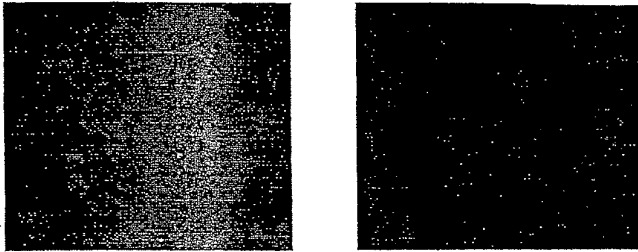


FIG. 3.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/80900

PCT/CA01/00555

4/23

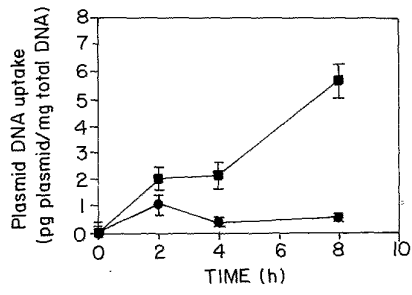


FIG. 4A.

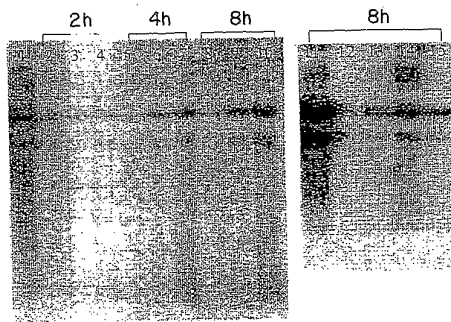


FIG. 4B.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

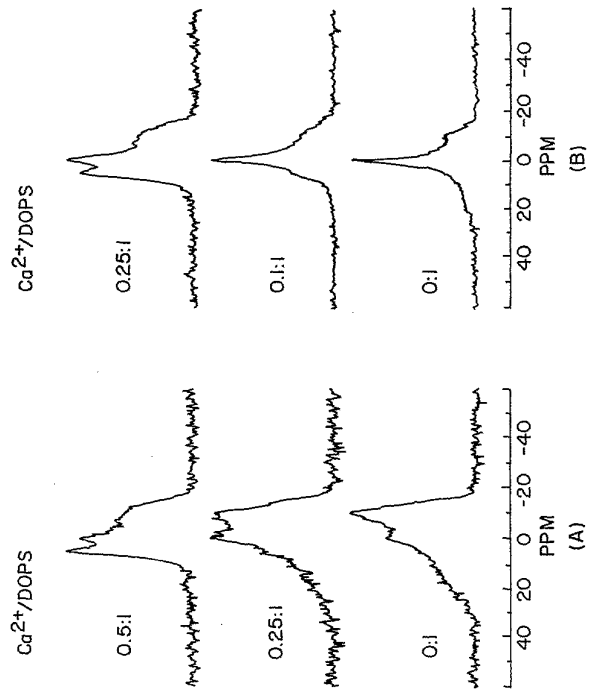


FIG. 5.

6/23

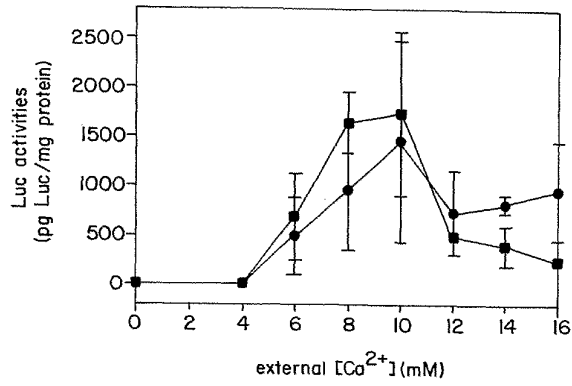


FIG. 6.

7/23

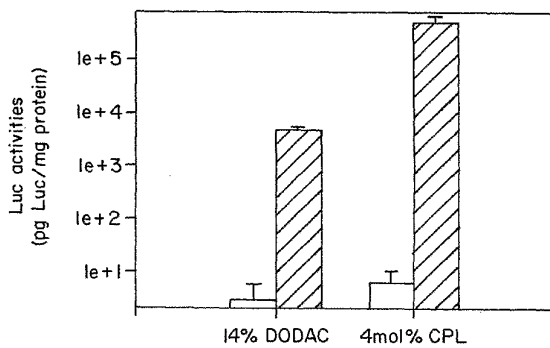
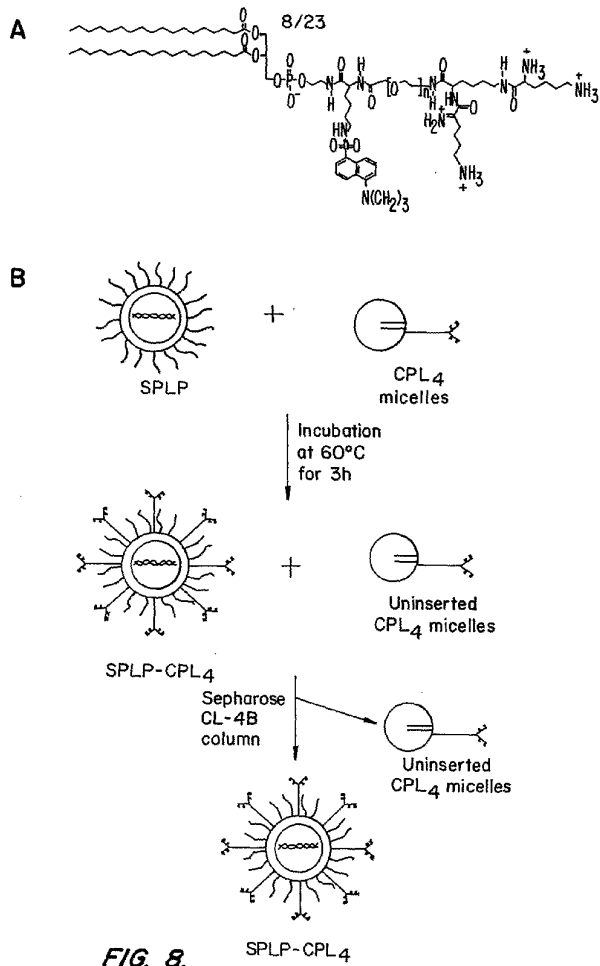


FIG. 7.

WO 01/80900

PCT/CA01/00555



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

9/23

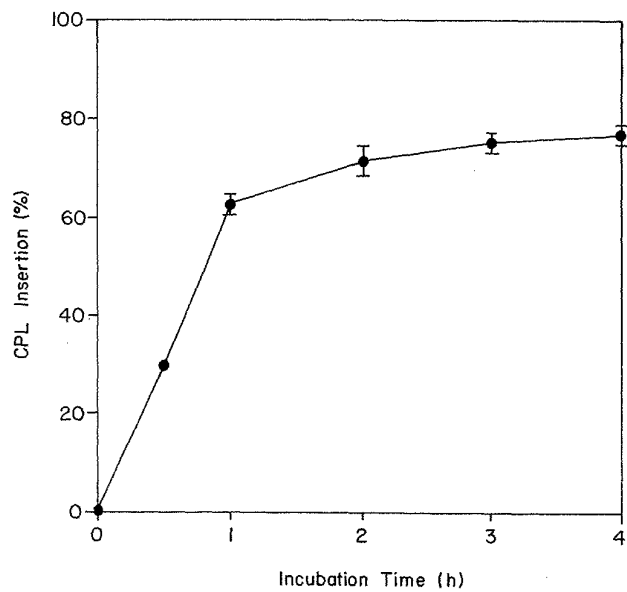


FIG. 9.

WO 01/80900

PCT/CA01/00555

10/23

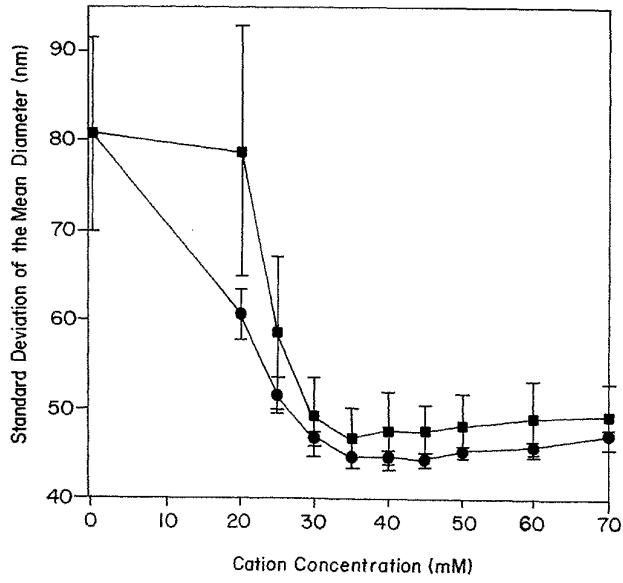


FIG. 10.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/80900

PCT/CA01/00555

11/23

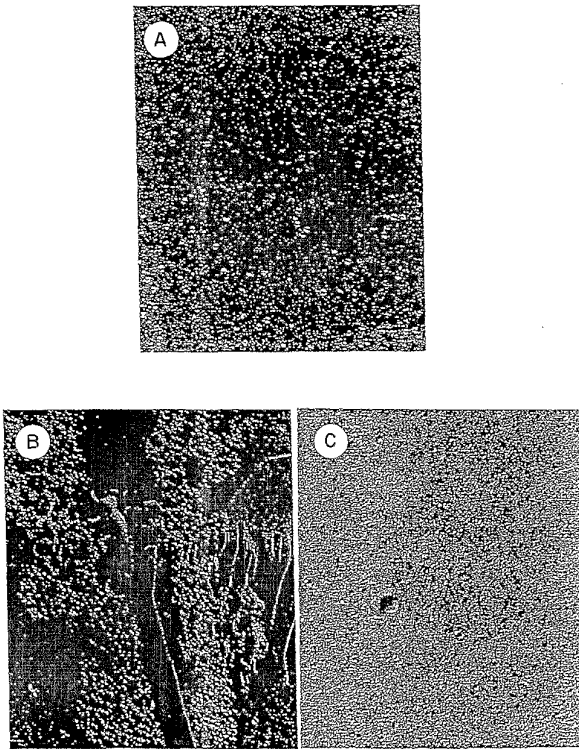


FIG. 11.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/80900

PCT/CA01/00555

12/23

Lane: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

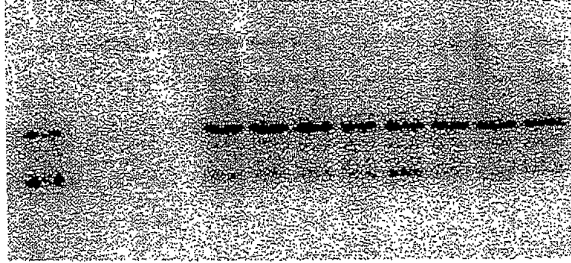


FIG. 12.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

13/23

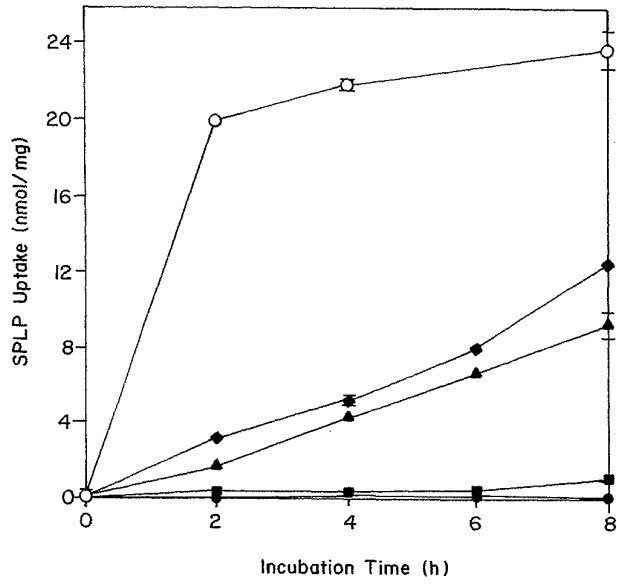


FIG. 13A.

WO 01/80900

PCT/CA01/00555

14/23

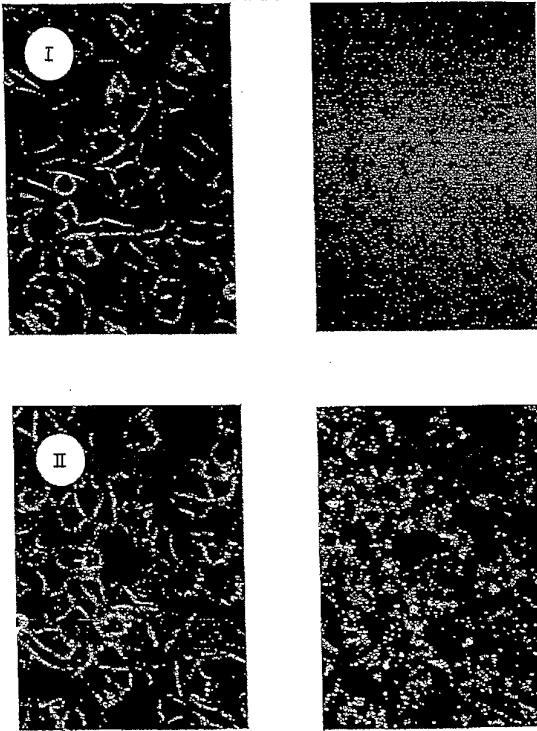


FIG. 13B.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

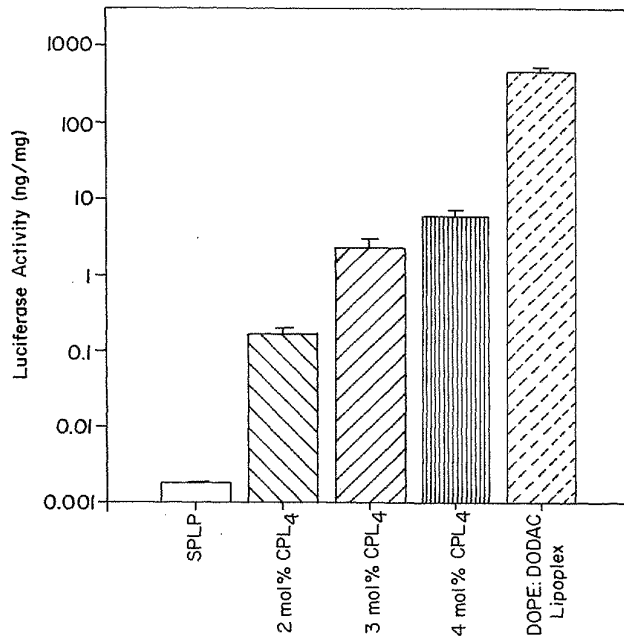


FIG. 14.

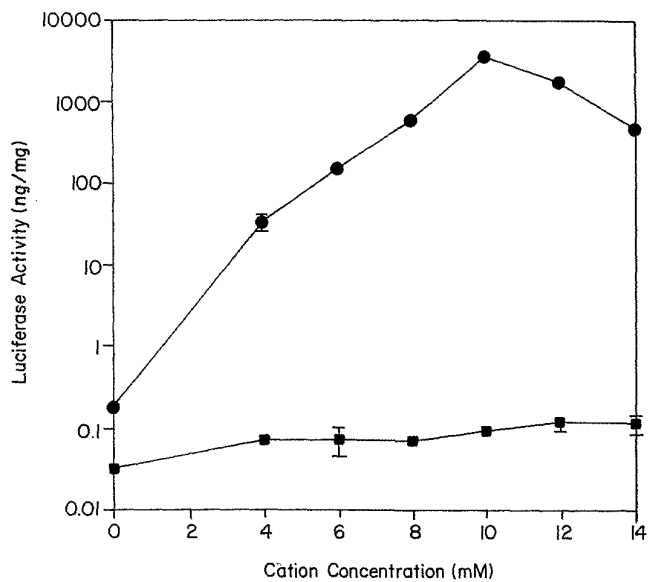


FIG. 15.

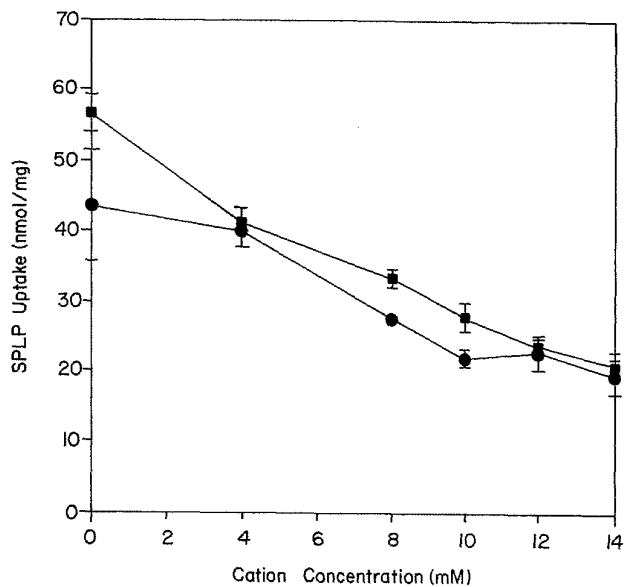


FIG. 16.

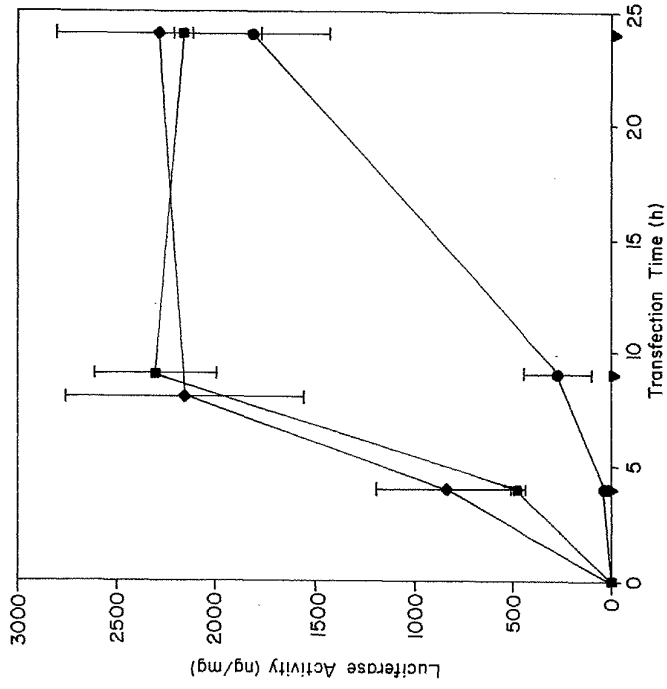
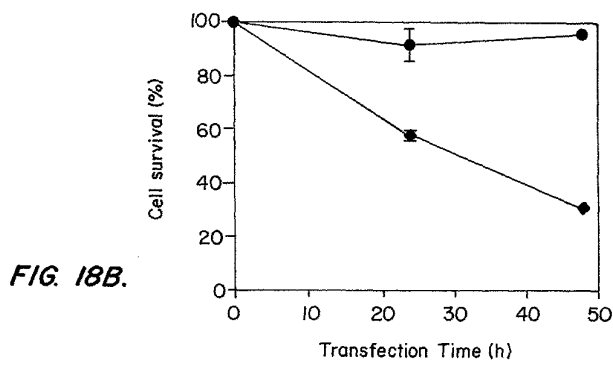
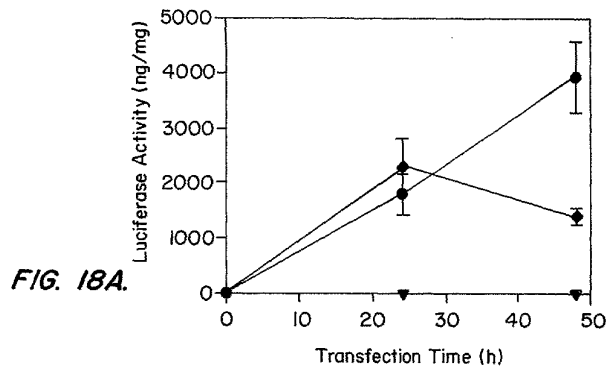


FIG. 17.

WO 01/80900

PCT/CA01/00555

19/23



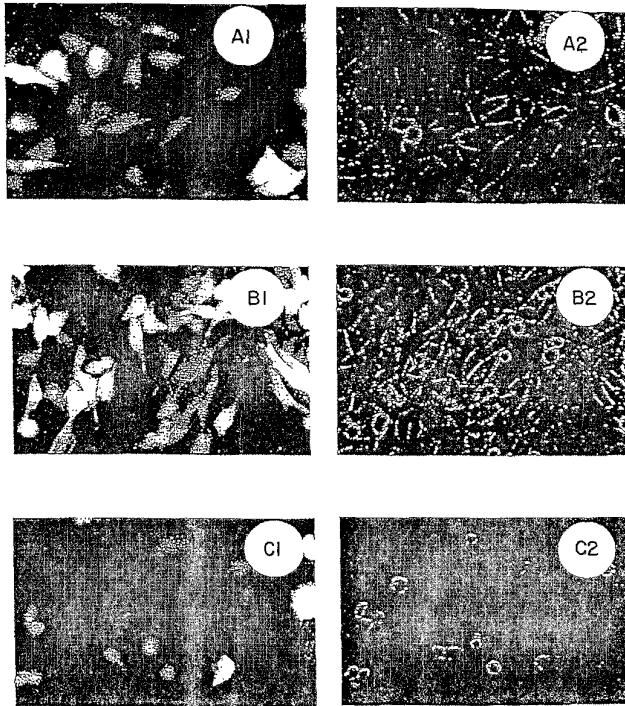


FIG. 19.
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

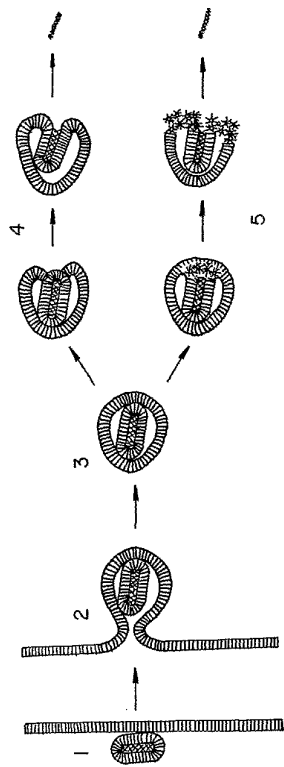


FIG. 20.

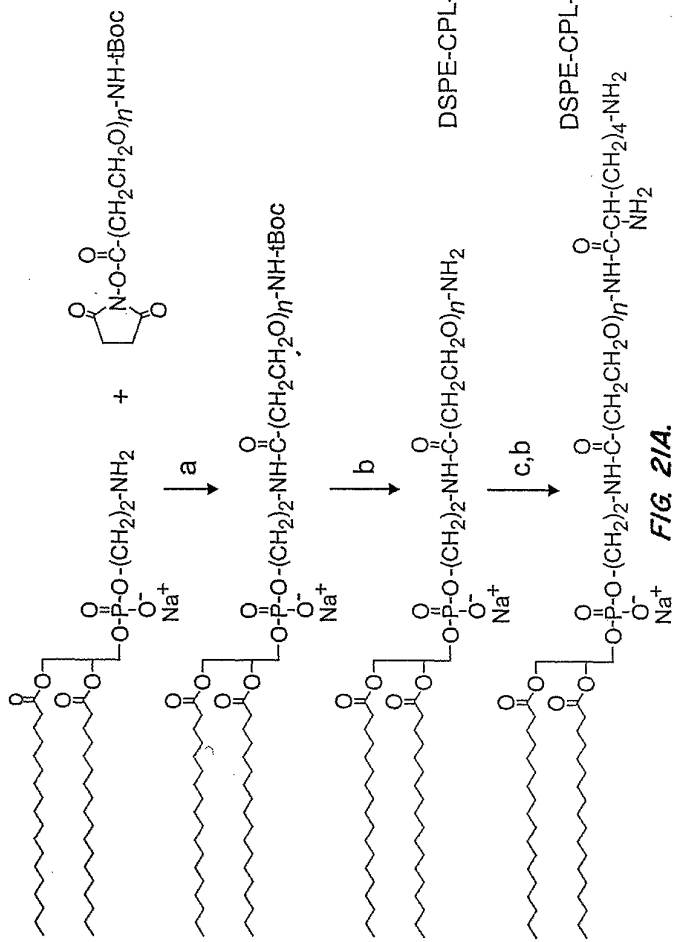
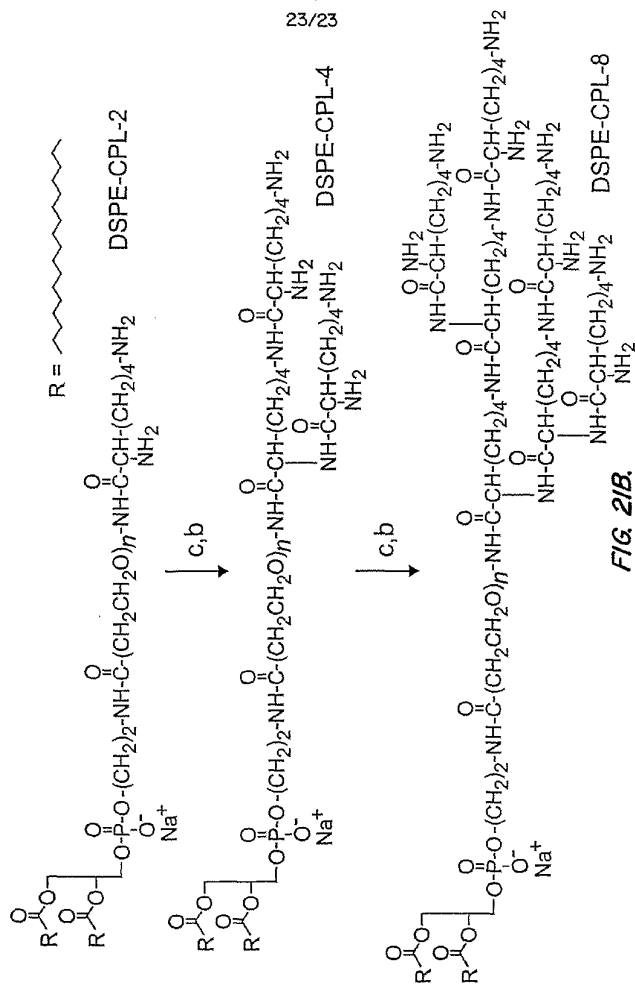


FIG 21A.



【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
1 November 2001 (01.11.2001)

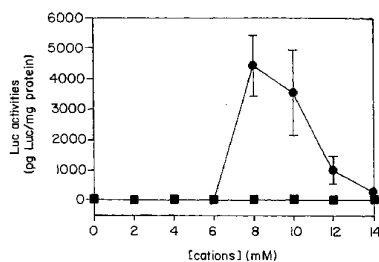
PCT

(10) International Publication Number
WO 01/080900 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 15/88, A61K 47/48, 9/127, A61P 43/00
- (21) International Application Number: PCT/CA01/00555
- (22) International Filing Date: 20 April 2001 (20.04.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
PCT/CA01/00451 20 April 2000 (20.04.2000) CA
09/553,639 20 April 2000 (20.04.2000) US
50/227,949 25 August 2000 (25.08.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA [CA/CA]; University Industry Liaison Office, IRC Building, Room 331, 2194 Health Sciences Mall, Vancouver, British Columbia V6T 1Z3 (CA).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): LAM, Angela, M., I. [CA/CA]; 718 West 61st Avenue, Vancouver, British Columbia V6P 2B5 (CA). PALMER, Lorne, R. [CA/CA]; 1950 West 8th Avenue, Apt. 209, Vancouver, British Columbia V6L 1W3 (CA). CULLIS, Pieter, R. [CA/CA]; 3272 West 1st Avenue, Vancouver, British Columbia V6R 1H4 (CA).
- (74) Agent: FETHERSTONHAUGH & CO.; Box 11560, Vancouver Centre, 650 West Georgia Street, Suite 2200, Vancouver, British Columbia V6B 4N8 (CA).
- (81) Designated States (national): AH, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SI, SG, SJ, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

[Continued on next page]

(54) Title: ENHANCED STABILISED PLASMID-LIPID PARTICLE-MEDIATED TRANSFECTION USING ENDOSOMAL MEMBRANE



(57) Abstract: The present invention provides effective compositions, methods and uses for delivering nucleic acids to cells. The inventive compositions and methods are based upon the surprising discovery that the presence of an endosomal membrane destabiliser in a lipid formulation leads to a dramatic increase in transfection efficiency. The present compositions and methods can be used *in vitro* or *in vivo*, and can be used to increase the transfection efficiency of any cell type, including mammalian cells (e.g., humans). In certain embodiments, the conjugated lipid that inhibits aggregation is a "cationic polymer lipid" (CPL). In preferred aspects, the CPL has the formula (I). In formula (I), A is a lipid moiety, W is a hydrophilic polymer,

and Y is a polycationic moiety. In certain preferred embodiments, Y is selected from lysine, arginine, asparagine, glutamine, and combinations thereof. In another embodiment, the present invention provides a method for introducing a nucleic acid into a cell, comprising contacting the cell with a nucleic acid-lipid particle composition, wherein the particle comprises a cationic lipid, a conjugated lipid that inhibits aggregation of particles, a nucleic acid, and an endosomal membrane destabilizer. The endosomal membrane destabilizer can be inside the particle, outside the particle, or both inside and outside the particle. In certain embodiments, the endosomal membrane destabilizer contacts the cell before the particle, after the particle, simultaneously or combinations thereof. In still another embodiment, the present invention provides a method for inducing H_{II} phase structure in a lipid bilayer, comprising contacting the lipid bilayer with an endosomal membrane destabilizer, thereby inducing H_{II} phase structure in the lipid bilayer. In certain aspects, the endosomal membrane destabilizer (e.g., Ca^{2+}) acts synergistically or additively with low levels of the cationic lipid to trigger H_{II} phase formation.

WO 01/080900 A3

WO 01/080900 A3



(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KI, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(88) Date of publication of the international search report:
24 April 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

Published:

— with international search report

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
1 November 2001 (01.11.2001)

PCT

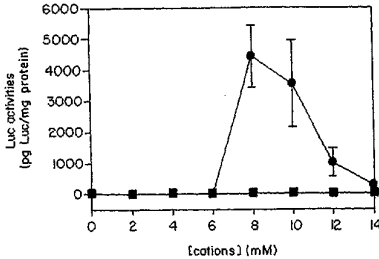
(10) International Publication Number
WO 01/080900 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 15/88, A61K 47/48, 9/127, A61P 43/00
- (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): LAM, Angela, M., I. [CA/CA]; 718 West 61st Avenue, Vancouver, British Columbia V6P 2B5 (CA). PALMER, Lorne, R. [CA/CA]; 1950 West 8th Avenue, Apt. 209, Vancouver, British Columbia V6J 1W3 (CA). CULLIS, Pieter, R. [CA/CA]; 3272 West 1st Avenue, Vancouver, British Columbia V6R 1H4 (CA).
- (21) International Application Number: PCT/CA01/00555
- (22) International Filing Date: 20 April 2001 (20.04.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: PCT/CA00/00451 20 April 2000 (20.04.2000) CA 09/553,639 20 April 2000 (20.04.2000) US 60/227,949 25 August 2000 (25.08.2000) US
- (74) Agent: FETHERSTONHAUGH & CO.; Box 11560, Vancouver Centre, 650 West Georgia Street, Suite 2200, Vancouver, British Columbia V6B 4N8 (CA).
- (71) Applicant (for all designated States except US): THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA [CA/CA]; University Industry Liaison Office, IRC Building, Room 331, 2194 Health Sciences Mall, Vancouver, British Columbia V6T 1Z3 (CA).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

[Continued on next page]

(54) Title: ENHANCED STABILISED PLASMID-LIPID PARTICLE-MEDIATED TRANSFECTION USING ENDOSOMAL MEMBRANE

(L)60300931053



(57) Abstract: The present invention provides effective compositions, methods and uses for delivering nucleic acids to cells. The inventive compositions and methods are based upon the surprising discovery that the presence of an endosomal membrane destabilizer in a lipid formulation leads to a dramatic increase in transfection efficiency. The present compositions and methods can be used *in vitro* or *in vivo*, and can be used to increase the transfection efficiency of any cell type, including mammalian cells (e.g., humans). In certain embodiments, the conjugated lipid that inhibits aggregation is a "cationic polymer lipid" (CPL). In preferred aspects, the CPL has the formula (I). In formula (I), A is a lipid moiety, W is a hydrophilic polymer,

and Y is a polycationic moiety. In certain preferred embodiments, Y is selected from lysine, arginine, asparagine, glutamine, and combinations thereof. In another embodiment, the present invention provides a method for introducing a nucleic acid into a cell, comprising contacting the cell with a nucleic acid-lipid particle composition, wherein the particle comprises a cationic lipid, a conjugated lipid that inhibits aggregation of particles, a nucleic acid; and an endosomal membrane destabilizer. The endosomal membrane destabilizer can be inside the particle, outside the particle, or both inside and outside the particle. In certain embodiments, the endosomal membrane destabilizer contacts the cell before the particle, after the particle, simultaneously or combinations thereof. In still another embodiment, the present invention provides a method for inducing H₂ phase structure in a lipid bilayer, comprising contacting the lipid bilayer with an endosomal membrane destabilizer, thereby inducing H₂ phase structure in the lipid bilayer. In certain aspects, the endosomal membrane destabilizer (e.g., Ca²⁺ ion) acts synergistically or additively with low levels of the cationic lipid to trigger H₂ phase formation.

WO 01/080900 A3



WO 01/080900 A3



21

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(88) Date of publication of the international search report: 24 April 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

Published:
— with international search report

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Interr. Application No. PCT/CA 01/00555
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/88 A61K47/48 A61K9/127 A61P43/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the lists searched		
Electronic data bases consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, INSPEC, PAJ, WPI Data, CANCERLIT, DISSERTATION ABS, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X, L	WO 00 62813 A (UNIV BRITISH COLUMBIA ;CHEN TAO (CA); CULLIS PIETER R (CA); FENSKE) 26 October 2000 (2000-10-26) cited in the application L: Priority the whole document --- -/--	1-68
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
E earlier document but published on or after the international filing date		*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*S* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
19 October 2001	07/11/2001	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentstrasse 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Dullaart, A	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/CA 01/00555

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EL OUAHABI A ET AL: "The role of endosome destabilizing activity in the gene transfer process mediated by cationic lipids." FEBS LETTERS, SEP 8 1997, VOL. 414, NO. 2, PAGE(S) 187-192, XP001030569 ISSN: 0014-5793 abstract page 187, paragraph INTRODUCTION figure 1 table 1 page 191, paragraph DISCUSSION -page 192 ---	1-68
X	DATABASE DISSERTATION ABSTRACTS 'Online! DRUMMOND, DARYL CLARK: "NOVEL "CAGED" LIPOSOMES COMPOSED OF REVERSIBLY MODIFIED PH- AND PHOTO-SENSITIVE AMINOPHOSPHOLIPIDS" retrieved from DIALOG, accession no. 01632822 Database accession no. AAD98-25443 XP002180733 abstract & DISSERTATION ABSTRACTS INTERNATIONAL, VOLUME 59, SECTION B, NO. 2, PAGE: 673. ABSTRACT OF THESIS (PH.D.), 1997, INDIANA UNIVERSITY, 315 PAGES, ---	1-68
X	WO 97 38010 A (UNIV BRITISH COLUMBIA ;MONCK MYRNA (CA); CHOI LEWIS S L (CA); CULL) 16 October 1997 (1997-10-16) examples ---	1-68
X	US 5 885 613 A (HOLLAND JOHN W ET AL) 23 March 1999 (1999-03-23) figure 16 column 21, paragraph G -column 22, line 62 column 23, paragraph K ---	1-68
Y	ZALIPSKY S ET AL: "LONG CIRCULATING, CATIONIC LIPOSOMES CONTAINING AMINO-PEG-PHOSPHATIDYLETHANOLAMINE" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 353, 1994, pages 71-74, XP002920144 ISSN: 0014-5793 page 72; figure 1 page 73; figure 2; table 1 --- -/--	1-68

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/CA 01/00555

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHEN TAO ET AL: "Fluorescent-labeled poly(ethylene glycol) lipid conjugates with distal cationic headgroups." BIOCONJUGATE CHEMISTRY, 'Online! vol. 11, no. 3, May 2000 (2000-05), pages 433-437, XP002157295 ISSN: 1043-1802 Retrieved from the Internet: <URL:http://pubs.acs.org/CHECKCCIP-979559877/1subscribe/journals/bcches/asap/pdf/bc990171x.pdf> 'retrieved on 2000-03-30! cited in the application the whole document ---	1-68
Y	WO 98 16202 A (SEQUUS PHARM INC) 23 April 1998 (1998-04-23) figure 10A ---	1-68
Y	BHATTACHARYA S V ET AL: "Synthesis of novel cationic lipids with oxyethylene spacers at the linkages between hydrocarbon chains and pseudoglyceryl backbone" TETRAHEDRON LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 40, no. 46, 12 November 1999 (1999-11-12), pages 8167-8171, XP004180445 ISSN: 0040-4039 schemes ---	1-68
Y	ANWER K ET AL: "OPTIMIZATION OF CATIONIC LIPID/DNA COMPLEXES FOR SYSTEMIC GENE TRANSFER TO TUMOR LESIONS" JOURNAL OF DRUG TARGETING, HARWOOD ACADEMIC PUBLISHERS GMBH, DE, vol. 8, no. 2, 2000, pages 125-135, XP000951678 ISSN: 1061-186X page 126, right-hand column -page 128, right-hand column, line 2 ---	1-68
Y	MORI A ET AL: "STABILIZATION AND REGULATED FUSION OF LIPOSOMES CONTAINING A CATIONIC LIPID USING AMPHIPATHIC POLYETHYLENEGLYCOL DERIVATIVES" JOURNAL OF LIPOSOME RESEARCH, US, MARCEL DEKKER, NEW YORK, vol. 8, no. 2, 1 May 1998 (1998-05-01), pages 195-211, XP000752693 ISSN: 0898-2104 page 197 -page 198 page 202, last paragraph -page 203 figures --- -/--	1-68

Form PCT/ISA/210 (with/amendment of second sheet) July 1999

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr	of Application No
PC1/CA	01/00555

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99 65461 A (GENZYME CORP) 23 December 1999 (1999-12-23) examples claims ---	1-68
Y	WO 99 05094 A (REYNOLDS MARK ;HAEBERLI PETER (US); KARPEISKY ALEX (US); MIN JOHN) 4 February 1999 (1999-02-04) examples claims ---	1-68
Y	WO 99 05303 A (INEX PHARMACEUTICALS CORP., ET AL.) 4 February 1999 (1999-02-04) examples claims ---	1-68
Y	WO 98 51285 A (GENZYME CORP) 19 November 1998 (1998-11-19) examples 4,5 claims ---	1-68
Y	WO 98 46208 A (UNIV MICHIGAN) 22 October 1998 (1998-10-22) page 28; table 1 ---	1-68
Y	WO 96 40964 A (INEX PHARMACEUTICALS CORP ;WHEELER JEFFERY J (CA); BALLY MARCEL B) 19 December 1996 (1996-12-19) figures 3,4,32 ---	1-68
Y	WO 00 06120 A (KOREA INST SCIENCE TECHNOLOGY ;KWON ICK CHAN (KR); CHUNG HESSON (K) 10 February 2000 (2000-02-10) examples 13-20 ---	1-68
P,Y	WO 00 43043 A (CHANG ESTHER H ;UNIV GEORGETOWN (US); XU LIANG (US)) 27 July 2000 (2000-07-27) example 7 ---	1-68
P,Y	WO 01 05373 A (INEX PHARMACEUTICALS CORP ;KNOPOV VICTOR (CA); CULLIS PIETER R (CA) 25 January 2001 (2001-01-25) example 6 --- -/--	1-68

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Intern
 Application No
 PCT/CA 01/00555

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	FENSKE A D B, ET AL.: "Cationic poly(ethyleneglycol) lipids incorporated into pre-formed vesicles enhance binding and uptake to BHK cells" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. BIOMEMBRANES, AMSTERDAM, NL, vol. 1512, no. 2, 6 June 2001 (2001-06-06), pages 259-272, XP004245512 ISSN: 0005-2736 the whole document	1-68
Y	CA 2 271 582 A (SEMPLÉ S C ET AL.) 14 November 1999 (1999-11-14) examples	1-68
Y	DATABASE DISSERTATION ABSTRACTS 'Online! HAFEZ, ISMAIL MAHMOUD: "Lipid polymorphism and intracellular delivery" retrieved from DIALOG, accession no. 01790720 Database accession no. AADAA-INQ56555 XP002180734 abstract & DISSERTATION ABSTRACTS INTERNATIONAL, VOLUME 61, SECTION B, NO. 12, PAGE: 6350. ABSTRACT OF THESIS (PH.D.), 2000, THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA (CANADA), 106 PAGES,	1-68
X	UDUEHI AN ET AL: "Cationic lipid-mediated transfection of differentiated Caco-2 cells: a filter culture model of gene delivery to a polarized epithelium." PHARMACEUTICAL RESEARCH, DEC 1999, VOL. 16, NO. 12, PAGE(S) 1805-11, XP001030630 page 1810, right-hand column, paragraph 3	1-68
X	PEDROSO DE LIMA M.C. ET AL: "Gene delivery mediated by cationic liposomes: From biophysical aspects to enhancement of transfection" MOLECULAR MEMBRANE BIOLOGY, 1999, VOL. 16, NO. 1, PAGE(S) 103-109, XP001030617 abstract page 103, paragraph INTRODUCTION -page 104 figures; tables page 108	1-68

Form PCT/ISA/216 (continuation of second sheet) (July 1992)

International Application No. PCT/CA 01 00555

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1-68 in part

Present claims 1-68 relate to a nucleic acid - lipid particle composition or to a methods in which this composition is used, where the components of the nucleic acid - lipid particle composition are defined by reference to their activities ("endosomal membrane destabilizer") rather than by clear structural definitions.

Other components have been defined by reference to a desirable characteristic or property, namely "that inhibits aggregation of particles". Thus, the claims cover all compounds having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible.

Moreover, the definition of the remaining component in these claims relate to an extremely large number of possible compounds ("a cationic lipid"). Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the cationic lipids claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible.

Finally, although it is appreciated, that the invention does not reside in the specific nucleic acid to be introduced into a cell, the remaining components of the nucleic acid - lipid particle composition are not fully defined in any of the claims. Thus, none of the claims can form the basis of a meaningful search.

Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to the nucleic acid - lipid particle composition described in the examples.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 Information on patent family members

 Internl of Application No
 PCT/CA 01/00555

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0062813	A 26-10-2000	AU 4096200 A WO 0062813 A2	02-11-2000 26-10-2000
WO 9738010	A 16-10-1997	AU 2284697 A CA 2252055 A1 WO 9738010 A2 EP 0910576 A2	29-10-1997 16-10-1997 16-10-1997 28-04-1999
US 5885613	A 23-03-1999	NONE	
WO 9816202	A 23-04-1998	AU 715063 B2 AU 4987897 A BR 9712230 A EP 0932391 A2 JP 2001504093 T WO 9816202 A2 US 6056973 A US 6224903 B1 US 5891468 A	13-01-2000 11-05-1998 25-01-2000 04-08-1999 27-03-2001 23-04-1998 02-05-2000 01-05-2001 06-04-1999
WO 9965461	A 23-12-1999	AU 4698499 A EP 1085857 A2 WO 9965461 A2	05-01-2000 28-03-2001 23-12-1999
WO 9905094	A 04-02-1999	AU 8505798 A EP 1019365 A1 WO 9905094 A1	16-02-1999 19-07-2000 04-02-1999
WO 9905303	A 04-02-1999	AU 8428998 A WO 9905303 A1 US 6110745 A	16-02-1999 04-02-1999 29-08-2000
WO 9851285	A 19-11-1998	AU 7490098 A WO 9851285 A2	08-12-1998 19-11-1998
WO 9846208	A 22-10-1998	WO 9846208 A1	22-10-1998
WO 9640964	A 19-12-1996	US 5705385 A US 5981501 A AU 723163 B2 AU 6330796 A CA 2222328 A1 EP 0832271 A2 JP 11507537 T WO 9640964 A2 US 5976567 A	06-01-1998 09-11-1999 17-08-2000 30-12-1996 19-12-1996 01-04-1998 06-07-1999 19-12-1996 02-11-1999
WO 0006120	A 10-02-2000	AU 5068999 A EP 1100464 A1 WO 0006120 A1	21-02-2000 23-05-2001 10-02-2000
WO 0043043	A 27-07-2000	AU 2620000 A EP 1144012 A1 WO 0043043 A1	07-08-2000 17-10-2001 27-07-2000
WO 0105373	A 25-01-2001	AU 6256100 A AU 6256200 A WO 0105373 A1	05-02-2001 05-02-2001 25-01-2001

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/CA 01/00555

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0105373	A	WO 0105374 A1	25-01-2001
CA 2271582	A	NONE	

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		PCT/CA 01/00555
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EL OUAHABI A ET AL: "The role of endosome destabilizing activity in the gene transfer process mediated by cationic lipids." FEBS LETTERS, SEP 8 1997, VOL. 414, NO. 2, PAGE(S) 187-192, XP001030569 ISSN: 0014-5793 abstract page 187, paragraph INTRODUCTION figure 1 table 1 page 191, paragraph DISCUSSION -page 192	1-68
X	DATABASE DISSERTATION ABSTRACTS 'Online! DRUMMOND, DARYL CLARK: "NOVEL "CAGED" LIPOSOMES COMPOSED OF REVERSIBLY MODIFIED PH- AND PHOTO-SENSITIVE AMINOPHOSPHOLIPIDS" retrieved from DIALOG, accession no. 01632822 Database accession no. AAD98-25443 XP002180733 abstract & DISSERTATION ABSTRACTS INTERNATIONAL, VOLUME 59, SECTION B, NO. 2, PAGE: 673. ABSTRACT OF THESIS (PH.D.), 1997, INDIANA UNIVERSITY, 315 PAGES,	1-68
X	WO 97 38010 A (UNIV BRITISH COLUMBIA ;MONCK MYRNA (CA); CHOI LEWIS S L (CA); CULL) 16 October 1997 (1997-10-16) examples	1-68
X	US 5 885 613 A (HOLLAND JOHN W ET AL) 23 March 1999 (1999-03-23) figure 16 column 21, paragraph G -column 22, line 62 column 23, paragraph K	1-68
Y	ZALIPSKY S ET AL: "LONG CIRCULATING, CATIONIC LIPOSOMES CONTAINING AMINO-PEG-PHOSPHATIDYLETHANOLAMINE" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 353, 1994, pages 71-74, XP002920144 ISSN: 0014-5793 page 72; figure 1 page 73; figure 2; table 1 ----- -/-	1-68

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

International Application No
 PCT/CA 01/00555

3

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHEN TAO ET AL: "Fluorescent-labeled poly(ethylene glycol) lipid conjugates with distal cationic headgroups." BIOCONJUGATE CHEMISTRY, "Online!" vol. 11, no. 3, May 2000 (2000-05), pages 433-437, XP002157295 ISSN: 1043-1802 Retrieved from the Internet: <URL:http://pubs.acs.org/CHEKCCIP-979559877/subscribe/journals/bcches/asap/pdf/bc990171x.pdf> 'retrieved on 2000-03-30! cited in the application the whole document ---	1-68
Y	WO 98 16202 A (SEQUIUS PHARM INC) 23 April 1998 (1998-04-23) figure 10A ---	1-68
Y	BHATTACHARYA S V ET AL: "Synthesis of novel cationic lipids with oxyethylene spacers at the linkages between hydrocarbon chains and pseudoglycerol backbone" TETRAHEDRON LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 40, no. 46, 12 November 1999 (1999-11-12), pages 8167-8171, XP004180445 ISSN: 0040-4039 schemes ---	1-68
Y	ANNER K ET AL: "OPTIMIZATION OF CATIONIC LIPID/DNA COMPLEXES FOR SYSTEMIC GENE TRANSFER TO TUMOR LESIONS" JOURNAL OF DRUG TARGETING, HARWOOD ACADEMIC PUBLISHERS GMBH, DE, vol. 8, no. 2, 2000, pages 125-135, XP000951678 ISSN: 1061-186X page 126, right-hand column -page 128, right-hand column, line 2 ---	1-68
Y	MORI A ET AL: "STABILIZATION AND REGULATED FUSION OF LIPOSOMES CONTAINING A CATIONIC LIPID USING AMPHIPATHIC POLYETHYLENEGLYCOL DERIVATIVES" JOURNAL OF LIPOSOME RESEARCH, US, MARCEL DEKKER, NEW YORK, vol. 8, no. 2, 1 May 1998 (1998-05-01), pages 195-211, XP000752693 ISSN: 0898-2104 page 197 -page 198 page 202, last paragraph -page 203 figures --- -/--	1-68

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		International Application No. PCT/CA 01/00555
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99 65461 A (GENZYME CORP) 23 December 1999 (1999-12-23) examples claims	1-68
Y	WO 99 05094 A (REYNOLDS MARK ;HAEBERLI PETER (US); KARPEISKY ALEX (US); MIN JOHN) 4 February 1999 (1999-02-04) examples claims	1-68
Y	WO 99 05303 A (INEX PHARMACEUTICALS CORP., ET AL.) 4 February 1999 (1999-02-04) examples claims	1-68
Y	WO 98 51285 A (GENZYME CORP) 19 November 1998 (1998-11-19) examples 4,5 claims	1-68
Y	WO 98 46208 A (UNIV MICHIGAN) 22 October 1998 (1998-10-22) page 28; table 1	1-68
Y	WO 96 40964 A (INEX PHARMACEUTICALS CORP ;WHEELER JEFFERY J (CA); BALLY MARCEL B) 19 December 1996 (1996-12-19) figures 3,4,32	1-68
Y	WO 00 06120 A (KOREA INST SCIENCE TECHNOLOGY ;KWON ICK CHAN (KR); CHUNG HESSON (K) 10 February 2000 (2000-02-10) examples 13-20	1-68
P,Y	WO 00 43043 A (CHANG ESTHER H ;UNIV GEORGETOWN (US); XU LIANG (US)) 27 July 2000 (2000-07-27) example 7	1-68
P,Y	WO 01 05373 A (INEX PHARMACEUTICALS CORP ;KNOPOV VICTOR (CA); CULLIS PIETER R (CA) 25 January 2001 (2001-01-25) example 6	1-68

	-/-	

PCT/CA 01/00555		
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	FENSKE A D B, ET AL.: "Cationic poly(ethyleneglycol) lipids incorporated into pre-formed vesicles enhance binding and uptake to BHK cells" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. BIOMEMBRANES, AMSTERDAM, NL, vol. 1512, no. 2, 6 June 2001 (2001-06-06), pages 259-272, XP004245512 ISSN: 0005-2736 the whole document	1-68
Y	CA 2 271 582 A (SEMPLE S C ET AL.) 14 November 1999 (1999-11-14) examples	1-68
Y	DATABASE DISSERTATION ABSTRACTS 'Online! HAFEZ, ISMAIL MAHMOUD: "Lipid polymorphism and intracellular delivery" retrieved from DIALOG, accession no. 01790720 Database accession no. AADAA-INQ56555 XP002180734 abstract & DISSERTATION ABSTRACTS INTERNATIONAL, VOLUME 61, SECTION B, NO. 12, PAGE: 6350. ABSTRACT OF THESIS (PH.D.), 2000, THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA (CANADA), 106 PAGES,	1-68
X	UDUEHI AN ET AL: "Cationic lipid-mediated transfection of differentiated Caco-2 cells: a filter culture model of gene delivery to a polarized epithelium." PHARMACEUTICAL RESEARCH, DEC 1999, VOL. 16, NO. 12, PAGE(S) 1805-11, XP001030630 page 1810, right-hand column, paragraph 3	1-68
X	PEDROSO DE LIMA M.C. ET AL: "Gene delivery mediated by cationic liposomes: From biophysical aspects to enhancement of transfection" MOLECULAR MEMBRANE BIOLOGY, 1999, VOL. 16, NO. 1, PAGE(S) 103-109, XP001030617 abstract page 103, paragraph INTRODUCTION -page 104 figures; tables page 108	1-68

Form PCT/CA/21a (continuation of second sheet) (July 1999)

6

International Application No. PCT/CA 01 00555

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1-68 in part

Present claims 1-68 relate to a nucleic acid - lipid particle composition or to a methods in which this composition is used, where the components of the nucleic acid - lipid particle composition are defined by reference to their activities ("endosomal membrane destabilizer") rather than by clear structural definitions.

Other components have been defined by reference to a desirable characteristic or property, namely "that inhibits aggregation of particles". Thus, the claims cover all compounds having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible.

Moreover, the definition of the remaining component in these claims relate to an extremely large number of possible compounds ("a cationic lipid"). Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the cationic lipids claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible.

Finally, although it is appreciated, that the invention does not reside in the specific nucleic acid to be introduced into a cell, the remaining components of the nucleic acid - lipid particle composition are not fully defined in any of the claims. Thus, none of the claims can form the basis of a meaningful search.

Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to the nucleic acid - lipid particle composition described in the examples.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

Information on patent family members		PCT/CA 01/00555			
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 0062813	A	26-10-2000	AU	4096200 A	02-11-2000
			WO	0062813 A2	26-10-2000
WO 9738010	A	16-10-1997	AU	2284697 A	29-10-1997
			CA	2252055 A1	16-10-1997
			WO	9738010 A2	16-10-1997
			EP	0910576 A2	28-04-1999
US 5885613	A	23-03-1999	NONE		
WO 9816202	A	23-04-1998	AU	715063 B2	13-01-2000
			AU	4987897 A	11-05-1998
			BR	9712230 A	25-01-2000
			EP	0932391 A2	04-08-1999
			JP	2001504093 T	27-03-2001
			WO	9816202 A2	23-04-1998
			US	6056973 A	02-05-2000
			US	6224903 B1	01-05-2001
			US	5891468 A	06-04-1999
WO 9965461	A	23-12-1999	AU	4698499 A	05-01-2000
			EP	1085857 A2	28-03-2001
			WO	9965461 A2	23-12-1999
WO 9905094	A	04-02-1999	AU	8505798 A	16-02-1999
			EP	1019365 A1	19-07-2000
			WO	9905094 A1	04-02-1999
WO 9905303	A	04-02-1999	AU	8428998 A	16-02-1999
			WO	9905303 A1	04-02-1999
			US	6110745 A	29-08-2000
WO 9851285	A	19-11-1998	AU	7490098 A	08-12-1998
			WO	9851285 A2	19-11-1998
WO 9846208	A	22-10-1998	WO	9846208 A1	22-10-1998
WO 9640964	A	19-12-1996	US	5705385 A	06-01-1998
			US	5981501 A	09-11-1999
			AU	723163 B2	17-08-2000
			AU	6330796 A	30-12-1996
			CA	2222328 A1	19-12-1996
			EP	0832271 A2	01-04-1998
			JP	11507537 T	06-07-1999
			WO	9640964 A2	19-12-1996
			US	5976567 A	02-11-1999
WO 0006120	A	10-02-2000	AU	5068999 A	21-02-2000
			EP	1100464 A1	23-05-2001
			WO	0006120 A1	10-02-2000
WO 0043043	A	27-07-2000	AU	2620000 A	07-08-2000
			EP	1144012 A1	17-10-2001
			WO	0043043 A1	27-07-2000
WO 0105373	A	25-01-2001	AU	6256100 A	05-02-2001
			AU	6256200 A	05-02-2001
			WO	0105373 A1	25-01-2001

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

81

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0105373	A	WO	0105374 A1	25-01-2001
CA 2271582	A	NONE		

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁷ F I テーマコード(参考)
 A 6 1 K 48/00 A 6 1 K 48/00

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(74) 代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(74) 代理人 100081330

弁理士 樋口 外治

(72) 発明者 ラム, アンジェラ エム. アイ.

カナダ国, プリティッシュコロンビア ブイ6ピー 2ピー5, バンクーバー, ウエスト シック
 スティファースト アベニュー 718

(72) 発明者 パルマー, ローン アール.

カナダ国, プリティッシュコロンビア ブイ6ジェイ 1ダブリュ3, バンクーバー, ウエスト
 エイス アベニュー 1950, アpartment 209

(72) 発明者 カリス, ピーター アール.

カナダ国, プ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 アベニュー 3272

F ターム(参考) 4B024 AA01 CA06 CA09 DA02 EA04 GA11 HA17

4C076 AA19 CC26 DD19 DD22 DD63 EE23 EE24 EE26

4C084 AA13 NA11