



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I549691 B

(45)公告日：中華民國 105 (2016) 年 09 月 21 日

(21)申請案號：100121244

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 06 月 17 日

(51)Int. Cl. : A61K47/12 (2006.01)

A61K9/127 (2006.01)

A61K31/713 (2006.01)

A61P13/12 (2006.01)

(30)優先權：2010/06/17 日本

2010-138070

(71)申請人：日東電工股份有限公司 (日本) NITTO DENKO CORPORATION (JP)

日本

(72)發明人：新津洋司郎 NIITSU, YOSHIRO (JP)；梶原慶子 KAJIWARA, KEIKO (JP)；田中康進 TANAKA, YASUNOBU (JP)；宮崎美代乃 MIYAZAKI, MIYONO (JP)

(74)代理人：蔡坤財；李世章

(56)參考文獻：

US 2009/0105179A1

US 2010/0144659A1

WO 2010/0029760A1

審查人員：張子威

申請專利範圍項數：8 項 圖式數：3 共 44 頁

(54)名稱

腎纖維症處置劑

AGENT FOR TREATING RENAL FIBROSIS

(57)摘要

本發明是關於一種物質輸送用攜帶體、利用該攜帶體而成之腎纖維症處置劑、這些物質之製造方法、調製套組、及使用該腎纖維症處置劑而進行的腎纖維症之處置方法，其中，該物質輸送用攜帶體，含有類視色素作為標靶化劑，且為腎中的細胞外間質生成細胞用的物質輸送用攜帶體。

This invention is related to a material-transporting carrier, an agent comprising the carrier for treating renal fibrosis, manufacturing methods and kits thereof, and a method for treating renal fibrosis with the agent for treating renal fibrosis, wherein the material-transporting carrier comprises retinoid as a targeting agent, and the material-transporting carrier is used for extracellular matrix-synthesizing cells in the renal.

104年7月7日 修正本
發明專利說明書

公告本

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫；惟已有申請案號者請填寫)

※ 申請案號：100121244

※ 申請日期：2011 年 6 月 17 日

※IPC 分類：

A61K 47/12 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 31/13 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)

一、發明名稱：

腎纖維症處置劑

AGENT FOR TREATING RENAL FIBROSIS

二、中文發明摘要：

本發明是關於一種物質輸送用攜帶體、利用該攜帶體而成之腎纖維症處置劑、這些物質之製造方法、調製套組、及使用該腎纖維症處置劑而進行的腎纖維症之處置方法，其中，該物質輸送用攜帶體，含有類視色素作為標靶化劑，且為腎中的細胞外間質生成細胞用的物質輸送用攜帶體。

三、英文發明摘要：

This invention is related to a material-transporting carrier, an agent comprising the carrier for treating renal fibrosis, manufacturing methods and kits thereof, and a method for treating renal fibrosis with the agent for treating renal fibrosis, wherein the material-transporting carrier comprises retinoid as a targeting agent, and the material-transporting carrier is used for extracellular matrix-synthesizing cells in the renal.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：無。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：無。

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明是關於一種以腎中的細胞外間質生成細胞為標的之物質輸送用攜帶體(carrier)，以及利用該物質輸送用攜帶體而成之腎纖維症處置用組成物、及腎纖維症之處置方法。

【先前技術】

近年來，由於以飲食生活為中心之生活習慣的巨大變化，高血壓或糖尿病等生活習慣病的罹患率增加，伴隨於此，腎疾病甚至腎衰竭的風險也逐漸增大。

腎臟，是藉由排泄廢物或調節體液、電解質、酸鹼平衡等來維持內部環境之恆定性的重要臟器。腎臟會控制氫、鈉、鉀及矽等血液中之各種化合物的濃度，而將廢物以尿的形式排出。無論是何種程度的腎功能低下，都可能會妨礙從血液中充分地除去代謝產物的身體能力，而且也可能會破壞身體的電解質平衡。腎功能低下或不全，最嚴重的形態將有可能致死。

又，腎臟除了這樣的功能以外，也有細胞性免疫、內分泌、代謝等功能。作為內分泌器官而言，腎臟是進行：活性型維生素 D3 也就是 1,25-二羥基維生素 D3 和調節紅血球生成之紅血球生成素(erythropoietin)的生成；腎素(renin)也就是血壓調節因子的分泌和紅血球生成素的分

泌；以及激肽(kinin)、激肽釋放酶(kallikrein)、前列腺素(prostaglandin)的分泌等。

所謂的慢性腎衰竭，是指這些腎功能為不可逆地緩緩降低，以致無法維持生物恆定性的狀態。慢性腎衰竭，已知是由於糖尿病性腎病、慢性腎絲球腎炎、惡性腎硬化症、多發性囊胞腎(polycystic kidney disease)等原因而發生。全部的腎疾病都會伴隨著腎臟的纖維化，最終導致末期腎衰竭。特別是慢性的腎功能低下，因為與腎臟纖維化的惡化深切相關，所以阻礙纖維化的惡化，被認為與抑制慢性腎衰竭的惡化有關連。

一般而言，腎纖維症是一種伴隨著起因於內皮細胞之障礙的發炎反應，最終由於過剩地生成的細胞外間質而發生纖維化所引起的病症。例如，在腎絲球硬化症中，其起因在於腎絲球內皮細胞的障礙，分泌出趨化激素(Chemokine)、增殖因子等細胞激素(cytokine)，單核球、巨噬細胞四處遊走，以致發炎反應持續惡化。接著，發生腎膈細胞(mesangial cell，腎間質細胞)的活化、增殖、轉型(transformation)，並且從腎膈細胞等的細胞外間質生成細胞生成過剩量的細胞外間質而發生纖維化，最終導致腎絲球硬化症。

尤其，糖尿病性腎病是導致慢性腎衰竭的最大原因，也是糖尿病的嚴重併發症之一。糖尿病性腎病的特徵在於腎絲球間質的增生、擴大，其主要是由於第 I 型及第 IV 型膠原蛋白、纖維連接蛋白(fibronectin)、基膜素(laminin)等

ECM(細胞外基質)蛋白質的蓄積增加所致。

一旦成為重度慢性腎衰竭，即無法恢復，若不接受透析(洗腎)等治療，就會發生尿毒症。作為慢性腎衰竭的治療方法，首先是進行低蛋白質、鹽分控制等飲食療法，或是投予降壓劑以能夠不對腎絲球造成負擔。

其次，對於慢性腎衰竭，視需要而進行下述治療：補充腎臟所分泌之 1,25-二羥基維生素 D3 和紅血球生成素、或是將血壓調節也就是腎臟之重要功能保持於適當程度。

所謂的化學療法，是使用血管收縮素轉化酶抑制劑或血管收縮素 II 受體拮抗劑，以抑制腎衰竭之惡化。這些藥劑，被認為除了會降低腎絲球血壓而抑制腎衰竭之惡化以外，本身也具有腎保護作用。但是，若過度降低腎絲球血壓，則反而會降低腎絲球血流量而變成腎前性腎衰竭(prerenal failure)，所以必須慎重地投予。

作為血管收縮素轉化酶抑制劑，有：卡托普利(Captopril)、伊那拉普利(enalapril)、地拉普利(delapril)、咪達普利(imidapril)、喹那普利(quinapril)、替莫普利(temocapril)、培哚普利(perindopril erbumine)、利欣諾普(lisinopril)等，作為血管收縮素 II 受體拮抗劑，則有：洛沙坦(losartan)、鰵沙坦(valsartan)、坎地沙坦酯(candesartan cilexetil)、替米沙坦(telmisartan)、奧美沙坦酯(olmesartan medoxomil)、伊貝沙坦(irbesartan)等。

其他則有為了改善尿毒症的症狀、稍微延遲透析導入，而使用克裏美淨(Kremezin)來作為吸附腸內有害物質

的吸附碳。又，為了防止因血鉀上升所致的喘息、手腳麻痺、心律不整等，而使用聚苯乙烯磺酸鈣來作為在腸內吸附鉀質而與糞便一起排出的離子交換樹脂。

若肌酸酐也就是來自骨骼肌之代謝產物在血清中濃度達 5~7 mg/dl 以上，則需考慮腹膜透析、血液過濾、血液透析等人工透析療法或腎臟移植。但是，為了血液透析則每星期需到院 3 次，1 次需受拘束 4~5 小時等，生活上的負擔很大，而腎臟移植方面，則因腎臟捐贈者少，所以在申請者之中，能夠接受腎臟移植的患者僅為極少數。進而，開始透析後的腎衰竭患者的平均剩餘壽命，僅止於一般人口的大約一半。

在這種情況之下，對於腎纖維症治療劑的開發已投注了龐大的研究與努力。結果已有報告指出，例如以下的藥劑在腎纖維症模式動物或臨床試驗中，已經獲得某種程度的成果（非專利文獻 1），這些藥劑包含：血管收縮素轉化酶抑制劑、AT1 血管收縮素 II 受體拮抗劑、醛固酮拮抗劑、腎素抑制劑等作用於腎素-血管收縮素-醛固酮系統的藥劑；內皮素受體拮抗劑、 α 阻斷藥、 β 阻斷藥、免疫抑制劑、細胞外間質代謝抑制劑、補體抑制劑、趨化激素抑制劑、磷酸二酯酶 5 抑制劑等作用於一氧化氮系統的藥劑；NF κ B 抑制劑、Rho 抑制劑、p38 MAPK 抑制劑、PI3K γ 抑制劑、血管內皮細胞增殖因子（VEGF）抑制劑、激肽釋放酶、鬆弛素、介白素 1 受體拮抗劑、骨形成因子 7（BMP-7）、抗腫瘤壞死因子 α 抗體（Anti-TNF α ）

antibody)、抗血小板衍生生長因子 D 抗體 (Anti-PDGF-D antibody) 等。

而且，已經有許多的專利申請案，例如已經作為腎纖維症治療藥物而申請有：血管收縮素轉化酶抑制劑（專利文獻 1）、血管收縮素 II 受體拮抗劑（專利文獻 2）、轉型生長因子 β (TGF- β) 抑制劑（專利文獻 3）、胞漿素原致活劑抑制劑-1 (PAI-1) 生成抑制劑（專利文獻 4）、前列腺素受體 4 選擇性促進劑（專利文獻 5）、第 I 型膠原蛋白合成抑制劑（專利文獻 6）、硫酸軟骨素蛋白多醣硫酸轉移酶抑制劑 (chondroitin sulfate proteoglycan sulfotransferase inhibitor)（專利文獻 7）、維生素 K 環氧化物還原酶抑制劑（專利文獻 8）、糖化終產物形成抑制劑（專利文獻 9）、A2A 腺苷酸受體 2A 促進劑（專利文獻 10）、內皮素受體拮抗劑（專利文獻 11）、VEGF 抑制劑 (vascular endothelial growth factor inhibitor, 血管內皮生長因子抑制劑)（專利文獻 12）等。然而，這些藥物均仍無法滿足需求，因而謀求進一步地開發腎纖維症治療劑。

[先前技術文獻]

(專利文獻)

專利文獻 1：美國專利第 5238924 號公報

專利文獻 2：日本專利特開平 07-002667 號公報

專利文獻 3：日本專利特開 2004-043459 號公報

專利文獻 4：日本專利特開 2009-007258 號公報

專利文獻 5：日本專利特開 2001-233792 號公報

專利文獻 6：日本專利特表 2004-534760 號公報

專利文獻 7：日本專利特開 2009-292725 號公報

專利文獻 8：日本專利特開 2010-077101 號公報

專利文獻 9：日本專利特開 2009-029750 號公報

專利文獻 10：日本專利特表 2007-536241 號公報

專利文獻 11：日本專利特表 2006-519817 號公報

專利文獻 12：日本專利特開 2007-099641 號公報

專利文獻 13：國際公開第 2006/068232 號小冊子

專利文獻 14：日本專利特開 2009-221164 號公報

專利文獻 15：日本專利特開 2010-59124 號公報

非專利文獻 1：Nephrology, dialysis, transplantation 2007;

22(12): 3391-407

【發明內容】

[發明所欲解決之問題]

本發明之目的在於提供一種攜帶體，該攜帶體能夠專一地將藥物等物質輸送至腎中的細胞外間質生成細胞，以及提供一種利用該攜帶體而成之腎纖維症處置劑、以及腎纖維症之處置方法。

[解決問題之技術手段]

本發明人在探求新穎的腎纖維症治療劑之際，發現藉由投予一種在含有類視色素(retinoid)作為標靶化劑(targeting agent)的攜帶體上承載細胞外間質生成抑制劑而

成的組成物，則能有效地治療腎纖維症，而完成了本發明。

含有維生素 A 的攜帶體，雖然已知能將藥物輸送至貯藏維生素 A 的星狀細胞（專利文獻 13），且已知於該攜帶體上承載對應 HSP47 (heat shock protein 47, 熱休克蛋白質 47) 之 siRNA 而成的組成物能夠改善肝纖維化症（專利文獻 13）、肺纖維化症（專利文獻 14）及骨髓纖維化症（專利文獻 15），但對於該攜帶體與腎纖維症、腎間質組織、腎膈細胞之間的關係，則至今完全未知。

亦即，本發明是關於下述。

（1）一種物質輸送用攜帶體，用以將物質輸送至腎臟中的細胞外間質生成細胞，所述攜帶體含有類視色素 (retinoid) 來作為針對腎臟中的細胞外間質生成細胞之標靶化劑。

（2）如上述（1）之物質輸送用攜帶體，其中該類視色素包含視網醇 (retinol)。

（3）如上述（1）或（2）之物質輸送用攜帶體，其具有微脂粒 (liposome) 的形態，且類視色素與微脂粒中所含脂質的莫耳比是 8：1～1：4。

（4）一種腎纖維症處置用醫藥組成物，其中含有如上述（1）～（3）中任一項所述之物質輸送用攜帶體、及控制腎臟中的細胞外間質生成細胞的活性或增殖之藥物。

（5）如上述（4）之腎纖維症處置用醫藥組成物，其中該控制腎臟中的細胞外間質生成細胞的活性或增殖之藥物，是選自由下述所構成之群組：PAI-1 之活性或生成抑制

劑；細胞活性抑制劑；增殖阻礙劑；細胞凋亡(apoptosis)誘導劑；以及以細胞外間質構成分子或與該細胞外間質構成分子之生成或分泌有關之分子的至少 1 種為標的之 RNAi 分子、核糖酶、反義核酸、DNA/RNA 嵌合多核苷酸(chimera polynucleotide)及表現此等的載體(vector)。

(6) 如上述(4)之腎纖維症處置用醫藥組成物，其中該控制細胞外間質生成細胞的活性或增殖之藥物，是 HSP47 之阻礙劑。

(7) 如上述(4)～(6)中任一項之腎纖維症處置用醫藥組成物，其是在醫療現場或附近將藥物與攜帶體混合而成。

(8) 一種調製套組，是如上述(4)～(7)中任一項之腎纖維症處置用醫藥組成物的調製套組，其中包含 1 個以上的容器，該容器是單獨或組合地含有：控制腎中的細胞外間質生成細胞的活性或增殖之藥物；類視色素；以及視需要而定的類視色素以外之攜帶體構成物質。

(9) 一種物質輸送用攜帶體的製造方法，該攜帶體是用以將物質輸送至腎臟中的細胞外間質生成細胞，該製造方法中包含一將類視色素調配作為針對腎臟中的細胞外間質生成細胞之標靶化劑之步驟。

(10) 一種腎纖維症處置用醫藥組成物的製造方法，其中包含一分別將類視色素調配作為針對腎臟中的細胞外間質生成細胞之標靶化劑、將控制腎臟中的細胞外間質生成細胞的活性或增殖之藥物調配作為有效成分之步驟。

[功效]

本發明之腎纖維症處置用組成物的正確作用機制，雖然尚未完全闡明，但可能是類視色素作為針對纖維母細胞或肌纖維母細胞等腎中的細胞外間質生成細胞之標靶化劑而發揮機能，其藉由將例如控制腎中的細胞外間質生成細胞的活性或增殖之藥物等有效成分輸送至該細胞，而發揮抗腎纖維症的效果。

因此，藉由本發明之攜帶體，能夠有效率地將有效成分輸送至作用部位、或進一步輸送至標的細胞，所以能夠進行腎纖維症且特別是至今仍難以治療的糖尿病性腎炎等的治癒、惡化之抑制、或是發病之預防，此對於人類醫療及動物醫療的貢獻極大。

又，本發明之攜帶體，因為能夠與任意藥劑（例如，既有的腎纖維症治療藥）組合而提高其作用效率，所以也有著在製劑上的應用範圍廣泛、能簡便地進行有效的處置劑之製造等優點。

【實施方式】

本發明中，腎中的細胞外間質生成細胞，只要是存在於腎中且具有細胞外間質生成能力的細胞，則無特別限定，例如包含存在於腎中的腎膈細胞、腎小管間質細胞、外皮細胞、纖維母細胞、以纖維母細胞為先驅細胞的纖維細胞(fibrocyte)及肌纖維母細胞。存在於腎中的間質生成細

胞，並不限於來自存在於腎中的細胞，也可以包含：來自循環血液中之纖維細胞的間質生成細胞、藉由內皮-間葉細胞轉型(endothelial-mesenchymal transition)而從內皮細胞轉換而成的間質生成細胞。肌纖維母細胞，是以 α -SMA(α 平滑肌肌動蛋白， α -smooth muscle actin)的表現為特徵。在本發明中的肌纖維母細胞，是藉由使用經標記而可檢出的抗 α -SMA抗體之免疫染色等來鑑別。又，纖維母細胞雖然會表現對間葉系細胞而言具特徵性的波形蛋白(vimentin)，但因為未表現 α -SMA，所以可藉由波形蛋白與 α -SMA的雙重染色來鑑別。腎中的細胞外間質生成細胞，還能在以膠原蛋白酶及蛋白酶處理腎組織之後，將其以密度梯度離心法（例如在終濃度8%之Nycodenz^(R)中）進行分離而獲得。

本發明中之類視色素，會作為對於腎中的細胞外間質生成細胞之標靶化劑(targeting agent)而發揮功能，促進對於該細胞的專一性物質輸送。藉由類視色素來促進物質輸送的機制雖然尚未完全闡明，但可能是例如：與RBP(視網醇結合蛋白，retinol binding protein)專一地結合而成的類視色素，透過位於腎中的細胞外間質生成細胞的細胞表面上之某種受體，而被攝入該細胞。

類視色素，是具有由4個類異戊二烯(isoprenoid)單元以頭接尾(head to tail)方式連結之骨架的化合物群中的一種（參照 G. P. Moss, "Biochemical Nomenclature and Related Documents," 2nd Ed. Portland Press, pp. 247-251

(1992))，維生素 A 則定性地顯示視網醇之生物學活性，是類視色素的一般的描述子(descriptor)。作為本發明中可使用的類視色素，並無特別限定，例如可舉出：視網醇（包含全反式視網醇(all-trans-retinol)）、視網醛、視網酸(retinoic acid)（包含維 A 酸）、視網醇與脂肪酸之酯、脂肪族醇與視網酸之酯、依曲替酯、異維 A 酸、阿達帕林、依曲替酸、他扎羅汀、視網醇棕櫚酸酯等類視色素衍生物；以及芬維 A 胺（4-HPR）、蓓薩羅丁等維生素 A 類似物。

這些之中，從對腎中的細胞外間質生成細胞的專一性物質輸送效率的觀點而言，以下述為佳：視網醇、視網醛、視網酸、視網醇與脂肪酸之酯（例如乙酸視黃酯、棕櫚酸視黃酯、硬脂酸視黃酯、及月桂酸視黃酯等）、及脂肪族醇與視網酸之酯（例如視網酸乙酯等）。

類視色素的包含順式、反式的全部異性體，均涵蓋於本發明的範圍中。類視色素亦有以 1 或 2 個以上的取代基來取代而成者。本發明中之類視色素，當然可以是被單離之狀態者，亦包含了於能將其溶解或保持之介質中呈溶解或混合狀態的類視色素。

本發明之攜帶體，可以僅由這些類視色素本身所構成，也可以是藉由使類視色素結合或包含於其他攜帶體構成成分而構成。因此，本發明之攜帶體，亦可含有類視色素以外的攜帶體構成成分。作為該成分，並無特別限定，可以使用在醫藥及藥學領域中已知的任意成分，但以能包含類視色素、或是能與其結合的成分為佳。

作為此種成分，可舉出脂質，例如可舉出：甘油磷脂質 (glycerophospholipid) 等磷脂質類；神經鞘磷脂 (sphingomyelin) 等神經脂質類；膽固醇等固醇類；大豆油、罌粟子油 (poppy seed oil) 等植物油；礦物油；蛋黃卵磷脂等卵磷脂類；聚合物等，但並不限定於此。其中，以能構成微脂粒者為佳，例如：卵磷脂等天然磷脂質；二肉豆蔻磷脂醯膽鹼 (DMPC)、二棕櫚磷脂醯膽鹼 (DPPC)、二硬脂磷脂醯膽鹼 (DSPC) 等半合成磷脂質；二油醯磷脂醯乙醇胺 (DOPE)、二月桂磷脂醯膽鹼 (DLPC)、膽固醇等。

作為特佳的成分，可舉出能迴避網狀內皮系統之捕捉的成分，例如可舉出：氯化 N-(α -三甲基銨基乙醯)-二(十二烷基)-D-麩胺酸 (TMAG)、N,N',N'',N'''-四甲基-N,N',N'',N'''-四棕櫚基精胺 (spermine) (TMTPS)、2,3-二油醯氧基-N-[2(精胺羧醯胺)乙基]-N,N-二甲基-1-丙烷銨三氟乙酸酯 (DOSPA)、氯化 N-[1-(2,3-二油醯氧基)丙基]-N,N,N-三甲基銨 (DOTMA)、氯化二(十八基)二甲基銨 (DODAC)、溴化二(十二基)銨 (DDAB)、1,2-二油醯氧基-3-三甲基銨丙烷 (DOTAP)、3 β -[N-(N',N'-二甲基胺基乙烷)胺甲醯基]膽固醇 (DC-Chol)、1,2-二肉豆蔻醯氧基丙基-3-二甲基羥乙基溴化銨 (DMRIE)、氯化 O,O'-二四癸醯基-N-(α -三甲基銨基乙醯)二乙醇胺 (DC-6-14) 等陽離子性脂質。

本發明之攜帶體，也可以具有特定的立體結構。作為該結構，並無特別限定，可以舉出直鏈狀或支鏈狀的線狀

結構、薄膜狀結構、球狀結構等。因此，攜帶體並無限定，也可以具有微胞(micelle)、微脂粒、乳劑(emulsion)、微球體(microsphere)、奈米球等的任意的立體形態。

類視色素對於本發明之攜帶體的結合或包含，可以是藉由化學性及／或物理性的方法，也可以是藉由使類視色素結合或包含於攜帶體的其他構成成分。而且，類視色素對於本發明之攜帶體的結合或包含，也可以是藉由在製備該攜帶體時，將類視色素與類視色素以外的攜帶體構成成分混合而進行。本發明之攜帶體中的類視色素的量，例如可以設作 $0.01 \sim 1000 \text{ nmol}/\mu\text{l}$ ，以 $0.1 \sim 100 \text{ nmol}/\mu\text{l}$ 為佳。類視色素對於攜帶體的結合或包含，可以在使藥物等承載於該攜帶體之前進行，也可以藉由將攜帶體、類視色素及藥物等予以同時混合等來進行，或者也可以藉由將呈已承載藥物等之狀態的攜帶體與類視色素混合來進行。因此，本發明亦關於一種對腎中的細胞外間質生成細胞具專一性之製劑的製造方法，其中包含使類視色素結合於既有之任意的藥物結合攜帶體或藥物包覆攜帶體的步驟，該些既有之藥物結合攜帶體或藥物包覆攜帶體，是例如：DaunoXome^(R)、Doxil、Caelyx^(R)、Myocet^(R)等微脂粒製劑。

本發明之攜帶體的形態，只要能將所期望的物質或物體搬運至作為標的之腎中的細胞外間質生成細胞，則任何形態均可，例如，雖然並不受限定，但可採下述中任一形態：高分子微胞、微脂粒、乳劑、微球體、奈米球等。在本發明中，從輸送效率之高低、可輸送物質的選擇性之廣

度、或製劑之容易性等觀點而言，這些攜帶體形態之中以微脂粒的形態為佳，且其中又以含陽離子性脂質的陽離子性微脂粒為特佳。攜帶體為微脂粒形態的情形中，若考量類視色素對於攜帶體之結合或包含的效率性，則類視色素與類視色素以外之微脂粒構成脂質的莫耳比，以 8:1~1:4 為佳，較佳為 4:1~1:2。

若所含之類視色素是以作為標靶化劑來發揮功能的態樣而存在，則本發明之攜帶體可以是於其內部包含搬運物、或附著於搬運物之外部、或與搬運物混合。此處，所謂的作為標靶化劑來發揮功能，意思是含類視色素的攜帶體會比不含類視色素之攜帶體更迅速且／或大量地到達且／或被攝入標的細胞也就是腎中的細胞外間質生成細胞，這可以例如藉由下述方式來輕易地確認：將附著有標記、或含有標記之攜帶體，添加至標的細胞的培養物中，於規定時間之後分析標記的存在部位。在構造上，例如若類視色素最遲於到達標的細胞為止時至少部分地暴露於含攜帶體之製劑的外部，便可充分具備上述要件。此處，所謂的「製劑」，是包含後述的本發明之組成物，並進而具有形態的概念。類視色素是否暴露於製劑之外部，可藉由使製劑接觸例如視網醇結合蛋白（RBP）等會與類視色素專一地結合的物質，並調查其對製劑之結合，來進行評價。

使類視色素最遲於到達標的細胞為止時至少部分地暴露於含攜帶體之製劑的外部，例如可藉由調節類視色素與類視色素以外的攜帶體構成成分之間的調配比率等而達

成。又，攜帶體具有微脂粒等脂質結構體之形態的情形中，例如可以使用下述手法：在將類視色素以外的攜帶體構成成分與類視色素進行複合化時，先將由類視色素以外的攜帶體構成成分所構成的脂質結構體稀釋於水性溶液中，接著將其與類視色素接觸、混合等。此時，類視色素也可以是呈現溶解於溶劑之中、例如 DMSO 等有機溶劑之中的狀態。此處，所謂的脂質結構體，意思是具有任意的立體結構，例如具有線狀、薄膜狀、球狀等形狀，並含有脂質作為構成成分的結構體，並無限定，包含了微脂粒、微胞、脂質微球體、脂質奈米球、脂質乳劑等。與標記微脂粒而成者相同的標靶化劑亦可以應用於其他藥物攜帶體，例如同 Zhao and Lee, Adv Drug Deliv Rev. 2004;56(8):1193-204、Temming et al., Drug Resist Updat. 2005;8(6):381-402 等所記載。

脂質結構體可以藉由使用下述滲透壓調整劑來調整滲透壓而安定，該些滲透壓調整劑是例如鹽或蔗糖、葡萄糖、麥芽糖等糖類、或是甘油、丙二醇等多元醇等，較佳為使用蔗糖或葡萄糖等。而且，也可以藉由添加適度的鹽或緩衝液等 pH 調整劑來調整 pH。因此，脂質結構體的製造、保存等，可以在含有這些物質的介質中進行。此時，滲透壓調整劑的濃度，以調整成與血液等張為佳。例如，在蔗糖的情形中，介質中的濃度並無限定，為 3~15 重量%，以 5~12 重量%為佳，較佳為 8~10 重量%，特佳為 9 重量%；在葡萄糖的情形中，介質中的濃度並無限定，為 1~10

重量%，以 3～8 重量%為佳，較佳為 4～6 重量%，特佳為 5 重量%。

本發明，又關於一種物質輸送用攜帶體的製造方法，該攜帶體是用以將物質輸送至腎臟中的細胞外間質生成細胞，該製造方法中包含一將類視色素調配作為針對腎臟中的細胞外間質生成細胞之標靶化劑之步驟。關於類視色素的調配手法，只要是類視色素能夠在所調配的攜帶體中作為針對腎臟中的細胞外間質生成細胞之標靶化劑而發揮功能，則無特別限定，例如可使用本說明書中所述的各種手法。因此，類視色素的調配，可以藉由下述來進行：藉由化學性及／或物理性的方法使類視色素結合或包含於攜帶體的其他構成成分、或是在製備攜帶體時將類視色素與類視色素以外的攜帶體構成成分混合等。類視色素的調配量等，是如同在本發明之攜帶體的說明中所記載。

本攜帶體所輸送之物質或物體並無特別限制，以其大小是能在生物體內物理性地從投予部位移動至標的細胞所存在之病變部位者為佳。因此，本發明之攜帶體當然可搬運原子、分子、化合物、蛋白質、核酸等物質，亦可搬運載體、病毒粒子、細胞、由 1 個以上之要件所構成的藥物釋放系統、微機械(micromachine)等物體。前述物質或物體，較佳為具有給予標的細胞某些影響的性質，例如包括將標的細胞予以標記者、或是控制（例如將其增強或抑制）標的細胞的活性或增殖者。

因此，在本發明的一個態樣中，攜帶體所輸送之物是

「控制腎中的細胞外間質生成細胞的活性或增殖之藥物」。此處，所謂的腎中的細胞外間質生成細胞的活性，雖然是指腎中的細胞外間質生成細胞所顯示的分泌、攝入、遊走等各種活性，但在本發明中，典型而言意思是這些之中特別關於腎纖維症之發病、惡化及／或復發等的活性。作為該活性，例如，並不限定而可舉出下述細胞外間質成分之生成與分泌、以及這些細胞外間質成分的分解活性之抑制，該些細胞外間質成分為：PAI-1 等生理活性物質；膠原蛋白、蛋白多醣、肌糖蛋白(tenascin)、纖維連接蛋白(fibronectin)、血小板活化蛋白(thrombospondin)、造骨蛋白(osteopontin)、骨連結蛋白(osteonectin)、彈性蛋白等細胞外間質成分等。

因此，所謂的控制腎中的細胞外間質生成細胞的活性或增殖之藥物，意思是只要會直接或間接抑制有關腎纖維症之發病、惡化及／或復發之該細胞的物理性、化學性及／或生理性作用等，則任一種藥物均可，並不加以限定。這些藥物，包含了：阻礙上述生理活性物質之活性或生成的藥物、以及中和前述生理活性物質之抗體及抗體片段；抑制前述生理活性物質之表現的 RNAi 分子(例如 siRNA、shRNA、ddRNA、miRNA、piRNA、rasiRNA 等)、微脂粒、反義核酸(包含 RNA、DNA、PNA、或這些的複合物)等物質、或者顯性抑制突變體(dominant negative mutant)等具有顯性突變抑制效果的物質、或表現這些物質的載體；阻礙上述細胞外間質成分等之生成與分泌的藥物，例如，抑

制細胞外間質成分之表現的 RNAi 分子（例如 siRNA、shRNA、ddRNA、miRNA、piRNA、rasiRNA 等）、微脂粒、反義核酸（包含 RNA、DNA、PNA、或這些的複合物）等物質；或者顯性抑制突變體等具有顯性突變抑制效果的物質、表現這些物質的載體；鈉通道阻斷劑等細胞活性抑制劑；烷化劑（例如依弗醯胺 (ifosfamide)、尼莫司汀 (nimustine)、環磷醯胺、達卡巴仁 (dacarbazine)、氮芥苯丙胺酸 (melphalan)、雷莫司汀 (ranimustine) 等)；抗腫瘤性抗生物質（例如艾達魯比辛 (idarubicin)、依畢魯比辛 (epirubicin)、道諾魯比辛 (daunorubicin)、杜薩魯比辛 (doxorubicin)、畢拉魯比辛 (pirarubicin)、博來黴素、培洛黴素 (peplomycin)、邁杜蔥酮 (mitoxantrone)、絲裂黴素 C (mitomycin C) 等)；代謝拮抗劑（例如吉西他濱 (gemcitabine)、依諾他濱 (enocitabine)、阿拉伯糖基胞嘧啶 (cytarabine)、替加氟-尿嘧啶 (tegafur-uracil)、替加氟-吉莫斯特-氧酸鉀 (tegafur, gimeracil, oteracil potassium) 調配劑、氟鐵龍 (doxifluridine)、羥基脲、氟尿嘧啶、胺甲葉酸、硫醇嘌呤 (mercaptopurine) 等)；伊妥普賽、愛萊諾迪肯 (irinotecan)、溫諾平 (vinorelbine)、歐洲紫杉醇 (docetaxel)、太平洋紫杉醇 (paclitaxel)、長春新鹼、長春地辛 (vindesine)、長春花鹼 (vinblastine) 等生物鹼；卡鉑定 (carboplatin)、順鉑 (cisplatin)、奈達鉑 (nedaplatin) 等鉑錯合物之類的細胞增殖抑制劑；以及環孢黴素等細胞凋亡誘導劑。

作為阻礙細胞外間質成分之生成與分泌的藥物，並無限定，例如可舉出 HSP47，也就是在各種類型之膠原蛋白的合成過程中所共通且為細胞內輸送及分子成熟化所必須而對膠原蛋白具專一性的分子伴侶蛋白(chaperone)。

又，本發明中之「控制腎中的細胞外間質生成細胞的活性或增殖之藥物」，可以是直接或間接地促進腎中的細胞外間質生成細胞的物理性、化學性及／或生理性作用等的任一種藥物，其中該腎中的細胞外間質生成細胞的物理性、化學性及／或生理性之作用，係直接或間接地關係到抑制腎纖維症之發病、惡化及／或復發，例如 MMP(基質金屬蛋白酶，matrix metalloproteinase)(包括 MMP1、MMP2 等)、胞漿素原致活劑(PA)等的生成與分泌。作為該藥物，並無限定，例如可舉出這些物質的活化劑或表現增強劑等。本發明之攜帶體，可輸送上述藥物的 1 種或 2 種以上。

本發明所能使用的 siRNA (small interfering RNA，小干擾 RNA) 中，除了狹義的 siRNA 以外，也包含了 miRNA (micro RNA，微 RNA)、shRNA (short hairpin RNA，小髮夾 RNA)、piRNA (Piwi-interacting RNA，Piwi 交互 RNA)、rasiRNA (repeat associated siRNA，重複相關小干擾 RNA) 等雙股 RNA 及該等之變體。作為廣義之機能性小分子 RNA 的 siRNA 及表現 siRNA 的載體，例如可以依照一般教科書(實驗醫學別冊—改編 RNAi 實驗 Protocol，2004 年，羊土社出版；RNAi 實驗之原來如此 Q&A，2006 年，羊土社出版)的教示來使用。

這樣的 siRNA 設計，只要是發明所屬技術領域中具有通常知識者，即可藉由參照作為標的之基因的信使 RNA (messenger RNA) 序列及已知的 siRNA 序列，依照一般教科書（實驗醫學別冊—改編 RNAi 實驗 Protocol，2004 年，羊土社出版；RNAi 實驗之原來如此 Q&A，2006 年，羊土社出版）的教示來適當地進行。

作為本發明之攜帶體的輸送物，也並不限定，可舉出抑制腎纖維症之發病、惡化及／或復發之上述以外的藥物，例如，並不限定而可舉出：血管收縮素轉化酶抑制劑、AT1 血管收縮素 II 受體拮抗劑、醛固酮拮抗劑、內皮素受體拮抗劑、 α 阻斷藥、 β 阻斷藥、免疫抑制劑、細胞外間質代謝抑制劑、補體抑制劑、趨化激素抑制劑、TGF- β 抑制劑、磷酸二酯酶 5 抑制劑等作用於一氧化氮系統的藥劑、NF κ B 抑制劑、Rho 抑制劑、p38 MAPK 抑制劑、PI3K γ 抑制劑、激肽釋放酶、介白素 1 受體拮抗劑、BMP-7、抗腫瘤壞死因子 α 抗體、抗血小板衍生生長因子 D 抗體、胞漿素原致活劑抑制劑-1 生成抑制劑、前列腺素受體 4 選擇性促進劑、第 I 型膠原蛋白合成抑制劑、硫酸軟骨素蛋白多醣硫酸轉移酶抑制劑、維生素 K 環氧化物還原酶抑制劑、糖化終產物形成抑制劑、A2A 腺苷酸受體 2A 促進劑、內皮素受體拮抗劑、VEGF 抑制劑、ADAM (a disintegrin and metalloprotease domain，去整合素域與金屬蛋白酶域) 蛋白酶之活化劑或表現增強劑、ADAMTS (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs，含凝血酶敏感

蛋白結構的去整合素金屬蛋白酶)蛋白酶之活化劑或表現增強劑、鬆弛素或其表現增強劑等。本說明書中，表現增強劑並無限定，例如亦包含一含有載體等的基因治療劑等，該載體中含有一核酸且該核酸編碼(coding)有作為增強表現之對象的蛋白質。這些藥物亦可與後述的本發明之組成物併用。此處，所謂的「併用」，包括了實質上同時投予本發明之組成物與上述藥物，以及在同一處置期間內在時間上相隔一段時間地投予。後者的情形中，本發明之組成物可以在上述藥物之前投予，亦可在之後投予。

在本發明的一個態樣中，作為控制腎中的細胞外間質生成細胞的活性或增殖之藥物，可以舉出 HSP47 之抑制劑，例如分別針對這些物質的 siRNA。

本發明之攜帶體所輸送的物質或物體，有被標記或未被標記均可。藉由標記化，則能夠監測對標的細胞之輸送的成敗或標的細胞之增減等，因而不僅在試驗、研究層級上特別有用，在臨床層級上也很有用。標記物，可選擇發明所屬技術領域中具有通常知識者所習知的任意物，例如可選自：任意的放射性同位素、磁性物、與標記化物質結合之物質(例如抗體等)、螢光物質、螢光團(fluorophore)、化學發光物質、及酵素等。標記物可以附著於攜帶體構成成分，也可作為獨立的輸送物而承載於攜帶體。

本發明中，所謂的「腎中的細胞外間質生成細胞用」或「腎中的細胞外間質生成細胞輸送用」，意思是適合於將腎中的細胞外間質生成細胞使用作為標的細胞，包括例如

對於該細胞，能相較於其他細胞（例如正常細胞）而更迅速、更高效率且／或更大量地輸送物質。例如，本發明之攜帶體，能夠相較於其他細胞而對腎中的細胞外間質生成細胞以 1.1 倍以上、1.2 倍以上、1.3 倍以上、1.5 倍以上、2 倍以上、進而以 3 倍以上的速度及／或效率來輸送物質。

本發明，又關於一種組成物，該組成物是用以控制腎中的細胞外間質生成細胞的活性或增殖、或用以處置腎纖維症，其中包含了前述攜帶體、及前述控制腎中的細胞外間質生成細胞的活性或增殖之藥物，本發明也關於一種將前述攜帶體使用於這些組成物之製造的用途。

本發明中的腎纖維症，可以是起因於任意的間質性腎炎，並且也可以是這些間質性腎炎轉為慢性而成的腎炎，該些間質性腎炎包含了：鏈球菌腎炎；葡萄球菌腎炎；肺炎球菌腎炎；伴隨水痘、B 型肝炎、C 型肝炎、HIV 等而發生的病毒性腎炎；瘧原蟲等寄生蟲感染所致的腎炎；伴隨真菌性腎炎、黴漿菌腎炎等而發生的感染性間質性腎炎；伴隨全身性紅斑性狼瘡（狼瘡性腎炎）、全身性硬皮症（膠原病腎症）、修格連氏症候群等的膠原病而發生的間質性腎炎；紫癍性腎炎、多發性動脈炎、快速進行性腎絲球腎炎等伴隨血管免疫疾病而發生的腎炎；伴隨放射線暴露而發生的間質性腎炎；由金製劑、NSAIDs（非類固醇抗發炎藥物）、青黴胺、博來黴素等的抗癌劑、抗生物質、巴拉刈(paraquat，除草劑)等所致的藥劑性間質性腎炎；由昆蟲螫傷、花粉、漆樹科植物等所致的過敏性腎炎；澱粉樣變

性腎炎；糖尿病性腎炎；伴隨著慢性腎絲球腎炎、惡性腎硬化症、多發性囊胞腎症等而發生的腎炎；腎小管間質性腎炎；伴隨妊娠中毒症或癌症而發生的腎炎；膜增殖性腎絲球腎炎；IgA 腎炎、混合型冷凝球蛋白血症腎炎、古德巴斯德症候群(Goodpasture's syndrome)腎炎、韋格納肉芽腫(Wegener's granulomatosis)腎炎、急性間質性腎炎等特發性間質性腎炎。本發明中的腎纖維症，以包含糖尿病性腎炎、藥劑性間質性腎炎及特發性間質性腎炎所轉為慢性而成的腎炎為佳。

本發明之組成物中，只要攜帶體所含的類視色素是以作為標靶化劑來發揮功能的態樣而存在，則攜帶體可以是於其內部包含輸送物、附著於輸送物之外部、或與輸送物混合。因此，可以視投予路徑或藥物釋放方式等，來將上述組成物以適當的材料來被覆，例如以腸溶性的包覆料或經時分解性的材料來被覆，或是亦可搭配適當的藥物釋放系統。進而，本發明之組成物，也可以是鍵結了類視色素而成的微脂粒與有效成分之複合體，亦即採用 Lipoplex 的形態。又，攜帶體僅由類視色素構成的情形中，本發明之組成物亦可採用複合體的形態，該複合體是由控制腎中的細胞外間質生成細胞的活性或增殖之藥物、與類視色素所構成。

本發明之組成物，可以使用作為醫藥（亦即醫藥組成物），可以藉包括經口及非經口之兩者的各種路徑來投予，例如，並不限定而可舉出：經口、靜脈內、肌肉內、皮

下、局部、肺內、呼吸道內、氣管內、支氣管內、經鼻、直腸內、動脈內、門脈內、心室內、骨髓內、淋巴結內、淋巴管內、腦內、腦脊液腔內、腦室內、經黏膜、經皮膚、鼻內、腹腔內及子宮內等路徑，並可以適合於各投予路徑的劑型來製劑。該劑型及製劑方法，可適當採用任意的習知者（例如參照由渡邊喜照等人編輯並由南江堂於 2003 年出版的標準藥劑學）。

例如，作為適合於經口投予的劑型，並不受限定而可舉出：散劑、顆粒劑、錠劑、膠囊、液劑、懸濁劑、乳劑、膠劑、糖漿等，又，作為適合於非經口投予的劑型，則可舉出溶液性注射劑、懸濁性注射劑、乳濁性注射劑、用時調製型注射劑等注射劑。非經口投予用製劑，可以是水性或非水性之等張性無菌溶液或懸濁液的形態。

本發明又關於一種腎纖維症處置用醫藥組成物的製造方法，其中包含一分別將類視色素調配作為針對腎臟中的細胞外間質生成細胞之標靶化劑、將控制腎臟中的細胞外間質生成細胞的活性或增殖之藥物調配作為有效成分之步驟。類視色素的調配手法，只要類視色素能夠在所調配的組成物中發揮作為對腎中的細胞外間質生成細胞之標靶化劑的機能，則無特別限定，例如可使用本說明書所記載的各種手法。又，有效成分的調配手法也是同樣，只要有效成分能夠發揮規定的效果，則無特別限定，可以使用任意的習知手法。有效成分的調配，可以是與類視色素同時進行，也可以是在調配類視色素之前、或調配之後進行。例

如，組成物含有類視色素以外的攜帶體構成成分的情形中，有效成分的調配，可以是藉由混合已調配了類視色素作為標靶化劑的攜帶體、與有效成分來進行，也可以是藉由同時混合類視色素、類視色素以外的攜帶體構成成分、及有效成分來進行，或者，也可以是在類視色素以外的攜帶體構成成分中調配有效成分之後，再將其與類視色素混合來進行。

類視色素的調配量等，是如同在本發明之攜帶體的說明中所記載。又，有效成分的調配量，在以組成物投予的情形中，是能夠抑制腎纖維症之發病或復發、改善病況、減輕症狀、或者能延遲或停止惡化的量，以預防腎纖維症之發病及復發為佳，或者也可以是能夠將腎纖維症治癒的量。又，以不發生超過因投予所得之利益的不良影響的量為佳。該量為習知的量，或是可藉由使用培養細胞等的活體外(in vitro)試驗、或者在小鼠、大鼠、狗或豬等的模式動物中進行的試驗來適當地決定，這些試驗方法為發明所屬技術領域中具有通常知識者所熟知。作為腎纖維症的模式動物，例如可舉出如日本專利特開 2009-178143 號之記載。有效成分的調配量，可以根據組成物的投藥態樣而變化。例如，在 1 次投予中使用複數單位組成物的情形中，每 1 單位組成物中所調配的有效成分量，可以設為在 1 次投予中所必須的有效成分量的數分之一。該調配量的調整，可由發明所屬技術領域中具有通常知識者所適當地進行。

本發明之攜帶體或組成物，雖然可以用任一形態來給予，但從保存安定性的觀點而言，較佳為能夠於使用時調製的形態，例如能夠在醫療現場或附近，由醫師及／或藥師、護士、或其他醫務人員等進行調製的形態來提供。此時，本發明之攜帶體或組成物，是以 1 個或 2 個以上的容器來提供，該容器含有本發明之攜帶體或組成物之必須構成要素的至少一個，並且本發明之攜帶體或組成物是在使用之前，例如 24 小時前以內、較佳為 3 小時前以內、以及更佳為正要使用前調製。於調製之際，可適當地使用在調製場所中通常可獲得的試藥、溶劑、調劑器具等。

因此，本發明又關於一種攜帶體或組成物的調製套組，其中包含 1 個或 2 個以上的容器，該容器是單獨或組合地含有：類視色素、及／或輸送物、及／或類視色素以外的攜帶體構成物質，本發明亦有關於以此種套組之形態來提供的攜帶體或組成物的必要構成要素。本發明之套組，除了上述之外，亦可含有關於本發明之攜帶體及組成物之調製方法或投予方法等的指示，例如說明書、或 CD、DVD 等電子記錄媒體等。又，本發明之套組雖然亦可包含用以完成本發明之攜帶體或組成物的全部構成要素，但並不一定需含有全部的構成要素。因此，本發明之套組中，亦可不含有在醫療現場或實驗設施等通常可取得的試藥或溶劑，例如無菌水、生理食鹽水、或葡萄糖溶液等。

本發明是進而關於一種用以控制腎臟中的細胞外間質生成細胞的活性或增殖、或者用以處置腎纖維症的方法，

其中包含將前述組成物的有效量投予至所必須的對象。此處，所謂的有效量，例如關於後者(用以處置腎纖維症的方法)，可以是抑制腎纖維症之發病或復發、改善病況、減輕症狀、或者延遲或停止惡化的量，以預防腎纖維症之發病及復發為佳，或者也可以是能夠將腎纖維症治癒的量。又，以不發生超過因投予所得之利益的不良影響的量為佳。該量，可藉由使用培養細胞等的活體外試驗、或者藉由在小鼠、大鼠、狗或豬等的模式動物中進行的試驗，來適當地決定，這些試驗方法為發明所屬技術領域中具有通常知識者所熟知。又，攜帶體中所含的類視色素、及本發明之方法中所使用的藥物用量，可以是發明所屬技術領域中具有通常知識者所習知，也可以藉由上述試驗等而適當決定。作為腎纖維症的模式動物，例如可舉出如日本專利特開2009-178143號之記載。

本發明之方法中所投予的組成物之具體用量，是考慮關於需要治療之對象的各種條件才能決定，該條件係例如症狀的嚴重度、對象的一般健康狀態、年齡、體重、對象的性別、飲食、投予的時期及頻率、所併用的醫藥、對治療的反應性、及對治療的遵從性等。

投予路徑包括經口及非經口之兩者的各種路徑，例如包含：經口、靜脈內、肌肉內、皮下、局部、肺內、呼吸道內、氣管內、支氣管內、經鼻、直腸內、動脈內、門脈內、心室內、骨髓內、淋巴結內、淋巴管內、腦內、腦脊液腔內、腦室內、經黏膜、經皮膚、鼻內、腹腔內及子宮

內等路徑。

投予頻率則是依照所使用之組成物的性狀、或上述般的對象的條件而異，例如可以是 1 日多次（亦即 1 日 2、3、4 次或 5 次以上）、1 日 1 次、每數日（亦即每 2、3、4、5、6、7 日等）1 次、1 週內數次（例如 1 週內 2、3、4 次等）、每隔 1 週、每隔數週（亦即每 2、3、4 週等）。

在本發明之方法中，用語「對象」的意思是任意的生物個體，較佳為動物、更佳為哺乳動物、且更佳為人之個體。在本發明中，雖然對象可以是健康或罹患某種疾病者，但在目的為處置腎纖維症的情形中，典型而言意思是已罹患糖尿病性腎炎或腎纖維症、或是具有罹患風險的對象。例如，希望預防腎纖維症的情形中，並不限定而以已罹患糖尿病性腎炎、且特別是第 II 型糖尿病所致之糖尿病性腎炎的對象為典型例子。

又，用語「處置」，是以疾病之治癒、暫時緩解或預防等為目的，而包含了醫學上所容許之全部種類的預防性及／或治療性之介入。例如，「處置」之用語，含有腎纖維症之惡化的延緩或停止、病變之消退或消失、腎纖維症發病之預防或復發之防止等，而包含了各種目的之醫學上可容許之介入。

本發明，又關於一種對於腎中的細胞外間質生成細胞的藥物輸送方法，該方法是利用上述攜帶體。此方法並不限定，而例如含有下述步驟：使輸送物承載於上述攜帶體之步驟；以及，將已承載輸送物之攜帶體，投予或添加

至含有腎中的細胞外間質生成細胞的生物或例如培養基等介質中之步驟。這些步驟，可依循習知的任意方法、或本說明書中所記載之方法等來適當地達成。上述輸送方法，也可以與其他輸送方法例如以腎為標的之其他輸送方法等互相組合。又，上述方法包含了在活體外進行之態樣，也包含了以體內的腎中的細胞外間質生成細胞為標的之態樣。

[實施例]

以下述實施例進而詳細地說明本發明，但這些實施例僅為例示，本發明並不受其限定。

[實施例 1] 含有 siRNA 之 VA 結合微脂粒的製作

作為 siRNA，是使用具有以下序列的 siRNA。

序列名稱：Hsp47-C

5'-GGACAGGCCUGUACAACUA-dTdT-3' (正義，序列編號：1)

5'-UAGUUGUACAGGCCUGUCC-dTdT-3' (反義，序列編號：2)

作為混合前溶液，準備了 10 mM 的維生素 A(視網醇，Sigma 公司製。以下又記載為 VA。溶解於二甲基亞碲)、1 mM 的 Lipotrust SR (北海道 System Science 股份公司製。以下又記載為微脂粒或微脂粒構成脂質。溶解於無核酸酶的水中)、以及 10 µg/µl 的 siRNA (將 Hsp47-C 溶解於無核酸酶的水中)。接著，將溶解於二甲基亞碲的 VA，以 1 : 1

(mol/mol) 的比例添加至上述所調製之無核酸酶的水中之 Lipotrust SR，並以振盪器(vortex)攪拌 15 秒之後，以遮光狀態於室溫放置 5 分鐘，使其形成複合體。於此複合體中添加 siRNA 並混合，而獲得投予液 VA Liposome-siRNA Hsp47C。此投予液是每 100 μ l 中含有 75 nmol 的 VA、75 nmol 的微脂粒構成脂質、112.5 μ g 的 siRNA，此相當於 3.00 μ mol/kg 體重的 VA、3.00 μ mol/kg 體重的微脂粒構成脂質、4.5 mg/kg 體重的 siRNA。另外，VA 是暴露於微脂粒表面。

[實施例 2] 腎纖維症模式小鼠中之治療效果的探討

(1) 腎纖維症模式動物之製作

委託 Stelic 再生醫科學研究所股份公司來製作腎纖維症模式小鼠。具體而言，是對出生後 2 日齡的 C57BL6J/JcL 雄性小鼠（日本 CLEA 公司）投予 N-乙醯基- β -D-胺基葡萄糖苷酶抑制劑，至 4 週齡為止是給予飼料 CE-2（日本 CLEA 公司製）及滅菌水而飼養，滿 4 週齡而離乳後，則給予粗脂肪含量高於一般飼料的 High Fat Diet32（日本 CLEA 公司製）及滅菌水並飼養直至 12 週齡為止，而製作 STAM 小鼠。已知此模式小鼠會發生糖尿病性腎炎（參照日本專利特開 2009-178143 號），而可觀察到因糖尿病性腎炎所致的腎纖維症。

在 12 週 3 日齡時，將上述模式小鼠每 10 隻分為 1 組，而分為以下 4 組。

（第 1 組）No treatment-STAM 小鼠，處置前對照組（以下

稱為 NT-STAM(Pre)組)

(第 2 組)No treatment-STAM 小鼠組,(以下稱為 NT-STAM 組)

(第 3 組) 5%葡萄糖投予組 (以下稱為 Vehicle 組)

(第 4 組) VA Liposome-siRNA Hsp47C 投予組 (以下稱為 VL-Hsp47C 組)

(2) 投予液之投予

對於 NT-STAM(Pre)組，於分群後、治療開始前，將小鼠安樂死，以進行病況確認。對於除了 NT-STAM 組以外的上述 2 組，則於 12 週 5 日齡時起每隔 1 日、總計 10 次，將所對應之以下的投予液，藉由尾靜脈注射來進行投予。

(第 3 組) 作為溶劑對照，而使用混合了 0.75 ml/kg 體重之無核酸酶的水與 3.250 ml/kg 體重之 5%葡萄糖 (大塚製藥股份公司) 而成的投予液 (5%葡萄糖或 Vehicle)。

(第 4 組) 使用將投予液混合成每 100 μ l 中有 75 nmol 的 VA、75 nmol 的微脂粒構成脂質、112.5 μ g 的 siRNA，並以 5%葡萄糖來進行最終調整而成的投予液 (VA Liposome-siRNA Hsp47C 或 VL-Hsp47C)

將投予開始日的體重設為基準體重，當投予日的體重變化率為基準體重的 20%以內時，則以 4 ml/kg 體重的量自尾靜脈投予各投予液。當投予日的體重變化率超過了基準體重的 20%時，則之後以該體重為新的基準體重，再次設定投予量。

(3) 對於腎纖維症之改善效果的探討

於最終投予結束後第 2 日（15 週 4 日齡時），在二乙基醚麻醉下從心臟進行採血，使小鼠安樂死之後摘取腎臟。

將所摘取的腎臟，以 4%三聚甲醛-磷酸緩衝液固定之後，進行石蠟包埋而製作切片標本。為了探討對於腎纖維症的治療效果，進行天狼星紅染色（專一地將膠原蛋白染紅的纖維染色），使用多功能(all in one)螢光顯微鏡 BZ-9000（KEYENCE 股份公司），以 80 倍進行拍攝。解析時，是從腎皮質區域隨機地拍攝 20 個視野，並且用 BZ-9000 所附屬的解析軟體來進行定量。

第 1 圖是顯示各投予組中之腎皮質區域的具代表性的腎絲球顯微鏡檢驗影像。天狼星紅染色是一種對於膠原蛋白具有專一性的纖維染色，纖維化部位會染成紅色～粉紅色。顯微鏡檢驗的結果，雖然腎絲球基底膜的肥厚現象在全部組之間無法辨認出差異，但是腎膈區域（間質）及腎小管細胞周圍的纖維化方面，則 VL-Hsp47C 投予組中的纖維化程度比其他三組輕微，可辨認出腎纖維化的改善（以箭頭顯示出腎膈區域的增大部分）。又，隨機地拍攝每 1 隻小鼠的腎皮質區域的 20 個視野，計算出纖維化區域的比例。由第 2 圖所示結果可以看出，在 VL-Hsp47C 投予組中，其天狼星紅之陽性區域的比例顯著地低於 NT-STAM 及 Vehicle 等 2 組，其腎纖維化受到改善。另外，統計學之顯著差異的評價上是採用 t 檢定。

由以上的結果，可以辨認到在 VL-Hsp47C 投予組中的纖維化之改善趨勢。考慮到 siRNA 基本上是在細胞質內進

行作用，則此結果顯示出，類視色素是作為對於腎中的細胞外間質生成細胞之標靶化劑而發揮功能，藉由有效率地將藥物輸送至該細胞，而能夠抑制腎纖維症的惡化。

[實施例 3] 藉由含有 siRNA 之 VA 結合微脂粒而進行的腎之細胞外間質生成細胞中的基因抑制 (gene knockdown)

(1) 細胞的分離與回收

將顯示出類似於肝臟星狀細胞之性狀的腎中的細胞外間質生成細胞，如同以下般進行分離與回收。

首先，事先進行以下 5 種溶液的調製。將全部的溶液保存於 4°C。

- EGTA 溶液：對於 500 ml 的 HBSS (Invitrogen 14170) (Hank's 平衡鹽溶液)，添加並混合 1.19 g 的 HEPES (羥乙基哌啶乙磺酸) 與 0.1 g 的 EGTA (乙二醇四乙酸)。

- 0.02% 膠原蛋白酶溶液：對於 500 ml 的 HBSS (Invitrogen 24020)，添加並混合 1.19 g 的 HEPES、0.235 g 的 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、與 0.1 g 的膠原蛋白酶 (Yakult YK-102)。

- 0.02% 膠原蛋白酶 + 0.1% 蛋白酶溶液：對於 40 ml 的 0.02% 膠原蛋白酶，添加並混合 40 mg 的蛋白酶 (Sigma P6911-1G)。

- Hanks 溶液：對於 500 ml 的 HBSS (Invitrogen 24020)，添加並混合 0.05 g 的 MgSO_4 。

- 10% Nycodenz^(R) 溶液 (Axis-Shield 產品編號 1114542-1)：對於 500 ml 的蒸餾水，添加並混合 50 g 的 Nycodenz^(R) 使

其溶解。

將小鼠（雄性，C57BL6/J，20~30 g，6~8週齡）進行麻醉，將腹部剃毛後於正中線剖腹取出腎臟。將取出的腎臟以 30 ml 的 EGTA 溶液清洗約 3 次，以去除血液。將腎臟置入 5 ml 的 EGTA 溶液中，以剪刀將其細細地切碎。於切碎的腎臟中添加 EGTA 溶液使總量成為 30 ml，以 1300 rpm 離心 5 分鐘。離心後，去除上清液，加入 30 ml 的 0.02 % 膠原蛋白酶 + 0.1 % 蛋白酶溶液，移至錐形瓶中，於 37°C 攪拌 20 分鐘。以細胞篩 (Cell Strainer) (Falcon 352360) 過濾該攪拌液，將濾液以 1300 rpm 離心 5 分鐘。將沈澱物溶解於 Hanks 溶液，並於 Hanks 溶液中混合 10% Nycodenz^(R) 溶液使其最終濃度成為 8% Nycodenz^(R)。將混合液以 1400 xg 離心 20 分鐘。回收上清液，再進而以 1300 rpm 離心 5 分鐘。去除上清液，以 10% FBS DMEM (Sigma D6546) 再次將其懸浮，接種於 T-75 細胞培養瓶 (BD 353136)。

(2) 基因抑制實驗

1. 含有 siRNA 之 VA 結合微脂粒的製作

作為 siRNA，是使用具有以下序列的 siRNA。

序列名稱：Hsp47-C

5'-GGACAGGCCUGUACAACUA-dTdT-3' (正義，序列編號：1)

5'-UAGUUGUACAGGCCUGUCC-dTdT-3' (反義，序列編號：2)

作為混合前溶液，準備了 10 mM 的維生素 A (視網醇，

Sigma R7632，以下簡稱 VA。溶解於二甲基亞碲)、1 mM 的 Lipotrust SR (北海道 System Science 股份公司製之 N301。以下又記載為微脂粒或微脂粒構成脂質。溶解於無核酸酶的水中)、以及 10 mg/ml 的 siRNA (將 Hsp47-C 溶解於無核酸酶的水中)。接著，將溶解於二甲基亞碲的 VA，以 1 : 1 的比例添加至上述所調製之無核酸酶的水中之 Lipotrust SR，並以振盪器(vortex)攪拌 15 秒之後，以遮光狀態於室溫放置 5 分鐘，使其形成複合體。於此複合體中添加並混合 10 mg/ml 的 siRNA，而獲得 VA Liposome-siRNA Hsp47C。無 VA 的情形中，則取代 VA 而等量地添加二甲基亞碲。進行調製，使在進行對於細胞之轉染(transfection)時最終濃度成為 7.7 μ M 的 Lipotrust SR/VA、869 nM 的 siRNA。

2. 轉染實驗

作為實驗用的細胞，事先將以上述回收方法從小鼠腎臟回收的細胞外間質生成細胞，以 0.2×10^5 個/孔的細胞數，接種於 6 孔盤，以 10%FBS DMEM 於 37°C 培養 2 日。

培養 2 日之後，在轉染之前將各孔中的 10%FBS DMEM 全部去除，添加 900 μ l 新鮮的 10%FBS DMEM，於 37°C 培養 15 分鐘左右。

將 100 μ l 的上述「1.」所製作之 VA Liposome-siRNA Hsp47C 或 Liposome-siRNA Hsp47C，緩緩添加至各孔中，於 37°C 進行細胞培養(incubate) 30 分鐘之後，將各孔中的培養上清液全部去除，添加 2 ml 新鮮的 10% FBS DMEM，

於 37°C 培養 2 日。2 日之後，用 RNeasy Mini Kit (QIAGEN 74104) 從細胞中單離 RNA，以 High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Applied Biosystems 4390779) 進行 RT-PCR，而獲得 cDNA。使用所獲得的 cDNA，以 Power SYBR^(R) Green PCR Master Mix (Applied Biosystems 4368708) 進行定量 PCR，來檢驗基因抑制的效果。其結果顯示於第 3 圖。

以上的結果表示，實施例 2 所使用之針對 HSP47 基因的 siRNA，顯示出在腎之細胞外間質生成細胞中會抑制 HSP47 基因的表現，本發明之治療劑所含有的 siRNA，會專一地被腎之細胞外間質生成細胞所攝入，而在該細胞內抑制標的基因的表現，藉此而能夠抑制腎纖維症的惡化。

【圖式簡單說明】

第 1 圖是將各組小鼠的腎皮質切片藉由天狼星紅染色的腎絲球之代表性顯微鏡檢驗影像，且是使用油鏡以 800 倍之倍率來拍攝。

第 2 圖是藉由天狼星紅染色而定量並顯示出腎皮質之纖維化區域比例的圖表，此圖表是隨機地拍攝每 1 個體之小鼠的腎皮質區域的 20 個視野，計算出纖維化區域的比例 (Fibrosis area(%)) ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$) 而得。

第 3 圖是顯示小鼠腎細胞外間質生成細胞中的藉由含有 siRNA 之 VA 結合微脂粒而進行的基因抑制結果的圖表，此圖表是將回收自小鼠腎臟的細胞外間質生成細胞中的 HSP47 基因表現量，以內部對照基因的 GAPDH 表現量來修正，並將 No treatment (未處理) 設為 100%，將此時的比例 (HSP47 基因表現(%)) 加以圖表化而得，其中，VA-lip 表示 VA-liposome-siRNA Hsp47C，lip 表示 liposome-siRNA Hsp47C，VA+siRNA 表示 VA+siRNA Hsp47C，NT 表示未處理。

【主要元件符號說明】

無

PI-14465-JP Sequence Listing.txt
序列表SEQUENCE LISTING

<110> 日東電工股份有限公司
<120> 腎纖維症處置劑
<130> PCT2453ND
<150> JP2010-138070
<151> 2010-06-17
<160> 2
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Hsp47-C 正義股
<400> 1
ggacaggccu guacaacuat t 21
<210> 2
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Hsp47-C 反義股
<400> 2
uaguuguaca ggccugucct t 21

七、申請專利範圍：

公 告 本

1. 一種類視色素的用途，其係作為針對體內的腎臟中的細胞外間質生成細胞之標靶化劑，且存在於將物質輸送至上述細胞之物質輸送用攜帶體中。
2. 一種類視色素的用途，其係用來製造以體內的腎臟中的細胞外間質生成細胞為標的之腎纖維症處置用醫藥組成物，該醫藥組成物進一步含有物質輸送用攜帶體、及控制體內的腎臟中的細胞外間質生成細胞的活性或增殖之藥物。
3. 如申請專利範圍第 1 項或第 2 項所述之用途，其中該類視色素包含視網醇。
4. 如申請專利範圍第 1 項或第 2 項所述之用途，其中物質輸送用攜帶體具有微脂粒的形態，且類視色素與微脂粒中所含脂質的莫耳比是 8：1～1：4。
5. 如申請專利範圍第 2 項所述之用途，其中該控制體內的腎臟中的細胞外間質生成細胞的活性或增殖之藥物是選自由下述所構成之群組：PAI-1 之活性或生成抑制劑；細胞活性抑制劑；增殖阻礙劑；細胞凋亡誘導劑；以及以細胞外間質構成分子或與該細胞外間質構成分子之生成或分泌有關之分子的至少 1 種為標的之 RNAi 分子、核糖酶、反義核酸、DNA/RNA 嵌合多核苷酸及表現上述 RNAi 分子、核糖酶、反義核酸、DNA/RNA 嵌合多核苷酸的載體。

修正
104年12月16日

6. 如申請專利範圍第 2 項或第 5 項所述之用途，其中該控制體內的腎臟中的細胞外間質生成細胞的活性或增殖之藥物是 HSP47 之阻礙劑。

7. 如申請專利範圍第 2 項所述之用途，其中該腎纖維症處置用醫藥組成物是在醫療現場或附近將藥物與物質輸送用攜帶體混合而成。

8. 一種類視色素的用途，其係用來製造以體內的腎臟中的細胞外間質生成細胞為標的之腎纖維症處置用醫藥組成物的調製套組，該調製套組包含 1 個以上的容器，該容器是單獨或組合地含有：控制體內的腎臟中的細胞外間質生成細胞的活性或增殖之藥物；以及視需要而定的類視色素以外之攜帶體構成物質。