

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5117648号
(P5117648)

(45) 発行日 平成25年1月16日(2013.1.16)

(24) 登録日 平成24年10月26日(2012.10.26)

(51) Int.Cl.

F 1

C08G 85/00	(2006.01)	C08G 85/00
A61K 9/127	(2006.01)	A61K 9/127
A61K 31/439	(2006.01)	A61K 31/439
A61K 31/7028	(2006.01)	A61K 31/7028
A61K 31/711	(2006.01)	A61K 31/711

請求項の数 49 (全 94 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-611949 (P2000-611949)
 (86) (22) 出願日 平成12年4月20日 (2000.4.20)
 (65) 公表番号 特表2002-542341 (P2002-542341A)
 (43) 公表日 平成14年12月10日 (2002.12.10)
 (86) 國際出願番号 PCT/CA2000/000451
 (87) 國際公開番号 WO2000/062813
 (87) 國際公開日 平成12年10月26日 (2000.10.26)
 審査請求日 平成19年4月10日 (2007.4.10)
 (31) 優先権主張番号 60/130,151
 (32) 優先日 平成11年4月20日 (1999.4.20)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 300066874
 ザ・ユニバーシティ・オブ・ブリティッシュ
 ュ・コロンビア
 カナダ国 V6T 1Z3 ブリティッシュ
 ュ・コロンビア、バンクーバー、アグロノ
 ミー・ロード 103-6190、ユニバ
 ーシティー・インダストリー・リエゾン・オ
 フィス
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕季

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】カチオン性PEG脂質および使用方法。

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

式 I :

【化1】

A—W—Y

I

10

の一般式を有する結合体であって、ここで：

Aは、ジアルキルグリセロールイル部分、ジアルキルグリセロールイル部分、N-N-ジアルキルアミノ部分、1,2-ジアルキルオキシ-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脂質部分であり；

W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これらの組合せからなる群から選択される親水性ポリマーであって、該ポリマーが250~7000ダルトンの分子量を有し；そして

Yは、2~15の正電荷を有するポリカチオン性部分であって、かつ少なくとも1つの塩基性アミノ酸またはその誘導体を含むポリカチオン性部分である、結合体。

【請求項2】

20

前記親水性ポリマーが、非免疫原性であるか、または弱い免疫原性である、請求項1に記載の結合体。

【請求項3】

Yが、2～8の正電荷を有するポリカチオン性部分である、請求項1または2に記載の結合体。

【請求項4】

Yが、選択されたpHで、少なくとも4つの正電荷を有する、請求項1または2に記載の結合体。

【請求項5】

Yが、選択されたpHで、少なくとも8つの正電荷を有する、請求項1または2に記載の結合体。

10

【請求項6】

Yが、リジン、アルギニン、アスパラギン、グルタミン、これらの誘導体およびこれらの組合せからなる群から選択されるメンバーである、請求項1～5のいずれか一項に記載の結合体。

【請求項7】

WがPEGである、請求項1～6のいずれか一項に記載の結合体。

【請求項8】

Wがポリアミドポリマーである、請求項1～6のいずれか一項に記載の結合体。

【請求項9】

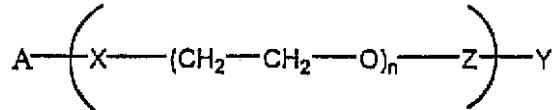
Wが250～2000ダルトンの分子量を有する、請求項1～8のいずれか一項に記載の結合体。

20

【請求項10】

式II：

【化2】



30

II

の一般式を有する請求項1～7のいずれかに記載の結合体であって、ここで、

Aは、ジアシルグリセロールイル部分、ジアルキルグリセロールイル部分、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脂質部分であり；

Xは、単結合、または前記脂質を少なくとも1つのエチレンオキシドユニットに共有結合する官能基からなる群から選択されるメンバーであり；

Yは、2～15の正電荷を有するポリカチオン性部分であって、かつ少なくとも1つの塩基性アミノ酸またはその誘導体を含むポリカチオン性部分であり；

40

Zは、単結合、または該少なくとも1つのエチレンオキシドユニットをカチオン性基に共有結合する官能基からなる群から選択されるメンバーであり；そして

nは、6～50の間の値を有する整数である、結合体。

【請求項11】

請求項10に記載の結合体であって、ここで、

Xは、単結合、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、カーボネート、アミド、チオアミド、酸素、硫黄およびNRからなる群から選択されるメンバーであり、ここで、Rは水素またはアルキル基である、結合体。

50

【請求項 1 2】

請求項 1 0 または 1 1 に記載の結合体であって、
Z は、単結合、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、および N R からなる群から選択さ
れるメンバーであり、ここで、R は水素またはアルキル基である、結合体。

【請求項 1 3】

請求項 1 0 に記載の結合体であって、ここで、
A はジアシルグリセロールイル部分であり；
X はホスホエタノールアミドであり；
Z は N R であり、ここで R は水素原子であり；そして
Y は、1 ~ 1 0 の塩基性アミノ酸またはその誘導体からなる群から選択されるメンバーで
ある、結合体。

10

【請求項 1 4】

請求項 1 3 に記載の結合体であって、Y が、2 ~ 8 の塩基性アミノ酸またはその誘導体
からなる群より選択されるメンバーである、結合体。

【請求項 1 5】

請求項 1 3 または 1 4 に記載の結合体であって、ここで、
A は 2 つの脂肪族アシル鎖を有するジアシルグリセロールイル部分であり、ここで、各ア
シル鎖は、独立して 2 ~ 3 0 の間の炭素長であり、そして飽和されているか、または変化
する飽和度を有するかのいずれかである、結合体。

20

【請求項 1 6】

請求項 1 3 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の結合体であって、ここで、
Y は、リジン、アルギニン、アスパラギン、グルタミン、これらの誘導体およびこれらの
組合せからなる群から選択されるメンバーである、結合体。

【請求項 1 7】

請求項 1 3 に記載の結合体であって、ここで、
A は、2 つの脂肪族アシル鎖を有するジアシルグリセロールイル部分であって、ここで、
各アシル鎖は飽和した C - 1 8 炭素鎖であり；そして
Y は、4 つのリジン残基またはその誘導体を有するカチオン性基である、結合体。

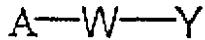
【請求項 1 8】

30

脂質ベースの薬物処方物であって、該処方物は、以下：

(a) 式 I :

【化 3】



I

の一般式を有する結合体であって、ここで、

40

A は、ジアシルグリセロールイル部分、ジアルキルグリセロールイル部分、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脂質部分であり；

W 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これらの組合せからなる群から選択される親水性ポリマーであって
、該ポリマーが 2 5 0 ~ 7 0 0 0 ダルトンの分子量を有し；

Y は、2 ~ 1 5 の正電荷を有するポリカチオン性部分であって、かつ少なくとも 1 つの
塩基性アミノ酸またはその誘導体を含むポリカチオン性部分である、結合体；

(b) 生物活性剤；および

(c) 第 2 脂質、

50

を含む、処方物。

【請求項 19】

Wが非免疫原性または弱い免疫原性である、請求項18に記載の処方物。

【請求項 20】

Yが2~8の正電荷を有するポリカチオン性部分である、請求項18または19に記載の処方物。

【請求項 21】

WがPEGである、請求項18~20のいずれか一項に記載の処方物。

【請求項 22】

前記PEGが250~3000の分子量を有する、請求項21に記載の処方物。

10

【請求項 23】

前記PEGが250~1000の分子量を有する、請求項21に記載の処方物。

【請求項 24】

前記第2脂質がPEG脂質であり、そしてWが該PEG脂質のPEGよりも小さな分子量を有する、請求項21~23のいずれか一項に記載の処方物。

【請求項 25】

前記第2脂質がPEG₃₄₀₀脂質であり、そして前記式Iの結合体が以下の式：

$$A - PEG_{1000} - Y$$

を有する、請求項21に記載の処方物。

20

【請求項 26】

前記第2脂質がPEG₂₀₀₀脂質であり、そして前記式Iの結合体が以下の式：

$$A - PEG_{1000} - Y$$

を有する、請求項21に記載の処方物。

【請求項 27】

前記第2脂質がPEG脂質であり、そしてWが該PEG脂質のPEGより大きな分子量を有する、請求項21~23のいずれか一項に記載の処方物。

【請求項 28】

前記第2脂質がPEG₁₀₀₀脂質であり、そして前記式Iの結合体が以下の式：

$$A - PEG_{3400} - Y$$

を有する、請求項21に記載の処方物。

30

【請求項 29】

前記第2脂質がPEG₁₀₀₀脂質であり、そして前記式Iの結合体が以下の式：

$$A - PEG_{2000} - Y$$

を有する、請求項21に記載の処方物。

【請求項 30】

前記生物活性剤が、抗腫瘍薬を含む、請求項18~23のいずれか一項に記載の処方物。

【請求項 31】

請求項30に記載の処方物であって、ここで、前記抗腫瘍薬が、アクチノマイシンD、ビンクリスチン、ビンプラスチン、シスチンアラビノシド、アントラサイクリン、アルキル化剤、白金化合物、代謝拮抗物質、ヌクレオシドアナログ、メトトレキサート、プリンアナログ、およびピリミジンアナログからなる群から選択されるメンバーである、処方物。

40

【請求項 32】

前記生物活性剤が核酸を含む、請求項18~23のいずれか一項に記載の処方物。

【請求項 33】

前記生物活性剤が、遺伝子構築物またはオリゴヌクレオチドである、請求項32に記載の処方物。

【請求項 34】

50

二層構造の安定化成分をさらに含む、請求項 18～33 のいずれか一項に記載の処方物。

【請求項 35】

前記二層構造の安定化成分がPEG脂質であり、ここで、該PEG脂質のPEGが、前記ポリマーWよりも大きな分子量を有する、請求項34に記載の処方物。

【請求項 36】

前記二層構造の安定化成分がATTA脂質であり、ここで、該ATTA脂質のATTAが、前記親水性ポリマーよりも大きな分子量を有する、請求項34に記載の処方物。

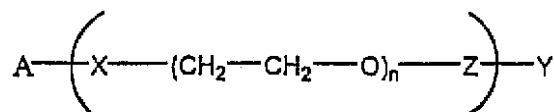
【請求項 37】

脂質ベースの薬物処方物であって、該処方物は、以下：

10

(a) 式II：

【化4】



II

の一般式を有する結合体であって、ここで

20

Aは、ジアシルグリセロールイル部分、ジアルキルグリセロールイル部分、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脂質部分であり；

Xは、単結合、または該疎水性脂質を少なくとも1つのエチレンオキシドユニットもしくは単結合に共有結合する官能基からなる群から選択されるメンバーであり；

Yは、2～15の正電荷を有するポリカチオン性部分であって、かつ少なくとも1つの塩基性アミノ酸またはその誘導体を含むポリカチオン性部分であり；

Zは、単結合、または該少なくとも1つのエチレンオキシドユニットをカチオン性ヘッド基または単結合に共有結合する官能基からなる群から選択されるメンバーであり；そしてnは、6～50の範囲の整数である、結合体；

30

(b) 生物活性剤；および

(c) 第2脂質、

を含む、処方物。

【請求項 38】

請求項37に記載の処方物であって、ここで、

Xは、単結合、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、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、カーボネート、アミド、チオアミド、酸素、硫黄、NRからなる群から選択されるメンバーであり、ここで、Rは、水素アルキル基である、処方物。

【請求項 39】

請求項37または38に記載の処方物であって、ここで、

40

Zは、単結合、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、アミノ基、NRからなる群から選択されるメンバーであり、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メンバーである、処方物。

【請求項 40】

請求項18～39のいずれか一項に記載の処方物であって、ここで、該処方物が、リボソーム、ミセル、ビロゾーム、脂質-核酸粒子、核酸複合体およびこれらの混合物からなる群から選択されるメンバーの形態である、処方物。

【請求項 41】

50

前記脂質ベースの薬物処方物がリポソームである、請求項 4 0 に記載の処方物。

【請求項 4 2】

請求項 4 1 に記載の処方物であって、ここで、前記脂質ベースの薬物処方物が、0.05 ~ 0.5 ミクロンの範囲の平均サイズを有するリポソームであって、ここで、前記生物活性剤が遺伝子構築物またはオリゴヌクレオチドである、処方物。

【請求項 4 3】

脂質ベースの薬物処方物の細胞内送達を増加するための組成物であって、該組成物は、該脂質ベースの薬物処方物に組み入れるのに適切な請求項 1 に記載の結合体を含み、ここで、請求項 1 に記載の結合体を有さない処方物と比較して、該脂質ベースの薬物処方物の細胞内送達が増加する、組成物。

10

【請求項 4 4】

前記送達がインビボである、請求項 4 3 に記載の組成物。

【請求項 4 5】

前記増加が少なくとも 10 倍である、請求項 4 3 に記載の組成物。

【請求項 4 6】

非経口投与される脂質ベースの薬物処方物の一部である薬物の、標的細胞への送達を増加するための組成物であって、該組成物は、0.1 ~ 20 モルパーセントの請求項 1 に記載の結合体を含む、組成物。

【請求項 4 7】

哺乳動物に生物活性剤を投与するための組成物であって、該組成物は、以下：

20

小胞形成脂質または小胞取り込み脂質あるいはこれらの混合物、および 0.1 ~ 20 モルパーセントの間の請求項 1 に記載の結合体、ならびに薬学的に受容可能な量の生物活性剤を含む脂質ベースの薬物処方物の懸濁液を含む、組成物。

【請求項 4 8】

脂質ベースの薬物処方物によって、インビトロで細胞をトランスフェクトする方法であって、該方法は、以下：

該細胞に、0.1 ~ 20 モルパーセントの請求項 1 に記載の結合体を有する脂質ベースの薬物処方物を、インビトロで接触させる工程、
を包含する、方法。

【請求項 4 9】

30

脂質ベースの薬物処方物によるインビトロでの細胞のトランスフェクトを増加する方法であって、該方法は、以下：

該細胞を、0.1 ~ 20 モルパーセントの請求項 1 に記載の結合体を有する脂質ベースの薬物処方物と、インビトロで接触させる工程であって、ここで、該脂質ベースの処方物のトランスフェクション効率が、請求項 1 に記載の結合体を有さない脂質ベースの薬物処方物と比較して、増加されている、工程を包含する、方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(関連出願)

本願は、1999年4月20日出願の米国仮特許出願番号 60/130,151 号に対して優先権を主張し、この教示は、本明細書中において全ての目的のためにそれらの全体を通して参考として援用される。

40

【0002】

(発明の分野)

本発明は、カチオン性脂質結合体に関し、より詳細にはカチオン性ポリマー脂質結合体、および 1 つ以上の生理活性薬剤を含むその脂質ベースの薬物処方物に関する。

【0003】

(発明の背景)

遺伝子送達および遺伝子治療のための現在のベクターは、ウイルスベースの系および非ウイルスベースの系から構成される。脂質ベースの非ウイルス系は、カチオン性脂質プラス

50

ミドDNA複合体を含む。これらの系の制限として、血清中の複合体の大きなサイズ、毒性、および不安定性が挙げられる。不運にも、上記の欠点はこれらの複合体のための適用を制限する。

【0004】

研究者らは、系統的な送達のために使用され得る長期循環ステルスリポソームの設計に多大な努力を捧げてきた (Papahadjopoulos, D. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 11460-11464 (1991); Klibanov, A. L. ら、J. Liposome Res., 2: 321 (1992); Woodle, M. C. ら、Biochim. Biophys. Acta., 1113: 171 (1992); Torchilin, V. P. ら、In: Stealth Liposomes. D. Lasic, F. Martin. 編、CRC Press, Boca Raton, FL, 51~62頁 (1995); Allen, T. M. ら、Biochim. Biophys. Acta., 1237: 99-108 (1995) および Zalipsky, S. ら、J. Controlled Release, 39: 153-161 (1996) を参考のこと)。特定の例において、処方に依存して、ステルスリポソームは、しばしば細胞摂取を容易にする点で比較的不十分であり、従って治療効率が低下する。

【0005】

概して、インビボのリポソームの寿命の分子機構は、親水性ポリマー表面バリアから生じる立体障害に起因し得る。この親水性ポリマーバリアは、血液からの高分子の吸収速度を抑制するかまたは減少し、そしてリポソームと血液成分との間の静電的かつ疎水性の相互作用を立体的に阻害する。従って、ステルスリポソームの寿命は親水性ポリマーの挿入によって増加されるが、ステルスリポソームの細胞摂取はしばしば不十分である。

【0006】

過去10年にわたって、カチオン性脂質を有するリポソーム系がインビトロにおいて高度に有効なトランスフェクション薬剤であることが明らかになってきた (Felgner, P. L. ら、Nature 337: 387-388 (1989); Felgner, P. L. ら、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 84: 7413-7417 (1987))。カチオン性リポソームのプラスミドDNAへの付加は、インビトロにおいて優れたトランスフェクション特性を有する大きなDNA-脂質複合体を生じるが、これは、細網内皮系 (RES) の細胞による循環からのそれらの迅速なクリアランスに起因して、インビボでは有効ではない。遺伝子を細胞に全身送達し得る非ウイルス性脂質ベース系の必要性は、安定したプラスミド-脂質粒子 (SPLP) の最近の開発を導く (Wheeler, J. J. ら、Gene Therapy 6: 271-281 (1999))。これらの粒子は、小さく (約70nm)、プラスミドベクターの單一コピーを含み、ポリ (エチレングリコール) (PEG) の表面コーティングから生じるステルス特性を有し、そして血清ヌクレアーゼによる分解からDNAを保護する。

【0007】

リポソームおよび/またはそれらの内容物の細胞内送達の向上は、薬物送達系の次の世代の開発における主な残存する問題の1つを表す。インビボで (従来のまたは遺伝的な) 薬物の送達を最適化するために、リポソームと細胞との相互作用を増大するための一般的方法が開発される必要がある。今日まで、試みは、抗体 (例えば、Meyer, O. ら、Journal of Biological Chemistry 273: 15621-15627 (1998); Kao, G. Y. ら、Cancer Gene Therapy 3: 250-256 (1996); Hansen, C. B. ら、Biochemical and Biophysical Acta 1239: 133-144 (1995) を参考のこと)、ビタミン- (Gabizon, A. ら、Bioconjugate Chemistry 10: 289-298 (1999); Lee, R. J. ら、Journal of Biological Chemistry 269: 3198-3204 (1994))

994) ; Reddy, J. A. ら、Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 15: 587-627 (1998) ; Holladay, S. R. ら、Biochimica et Biophysica Acta 1426: 195-204 (1999) ; Wang, S. ら、Journal of Controlled Release 53: 39-48 (1998) を参照のこと)、オリゴペプチド - (Zalipsky, S. ら、Bioconjugate Chemistry 6: 705-708 (1995) ; Zalipsky, S. ら、Bioconjugate Chemistry 8: 111-118 (1997)) のようなリポソーム表面上の特異的標的化情報の使用、または特定の膜タンパク質またはレセプターに特異的なオリゴサッカリド構築物の使用を含む。不運なことに、これらの方法は、インビトロな結果が期待されるにも関わらず、この目的を達成するのに成功していない。組織に対するリポソームの特異的な標的化は、研究の重要な領域を残す一方、他のアプローチはまた、リポソームキャリアの効果の有意な改良を提供する。

[0 0 0 8]

上記の点で、当該分野において必要とされるものは、細胞性摂取の増加と結びついた寿命の増加を伴う脂質ベースの薬物処方物である。本発明は、このおよび他の必要性を満足する。

〔 0 0 0 9 〕

(発明の要旨)

特定の局面において、本発明は、トランスフェクション効率を向上するために、安定化されたプラスミド脂質粒子に組み込まれ得るかまたは挿入され得る新規な結合体に関する。本発明の結合体は、二分子膜脂質粒子に結合体を係留するための脂質アンカーを有し、ここで、この脂質アンカーはPEG部分のような非免疫原性ポリマーに結合され、ここで非免疫原性ポリマーは、次いで正に荷電した部分のようなポリカチオン性部分に結合される。このように、本発明は、以下：

[0 0 1 0]

【化 6】

10

20

30



の式 I の化合物を提供する。

【 0 0 1 1 】

式 Iにおいて、「A」は非免疫原性ポリマーに結合した脂質部分である。式 Iの「W」は、非免疫原性ポリマーであり、そして式 Iの「Y」は、ポリカチオン性部分である。

1 実施形態において、Yは約1～約10個の塩基性アミノ酸であるか、またはそれらの誘導体である。別の実施形態において、Yは、リジン、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み合わせからなる群から選択されるメンバーである。なお別の実施形態において、Yは、4個のリジン残基を有するカチオン性基またはそれらの誘導体である。

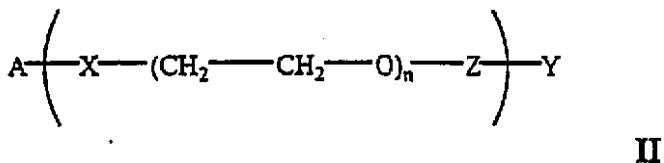
40

[0 0 1 2]

特定の好みしい実施形態において、式 I の化合物は、以下：

【 0 0 1 3 】

【化7】



の式 II の一般的構造を有する化合物を生じる基を含む。

【0014】

式 II において、「A」は、疎水性脂質のような脂質である。式 II において、「X」は少なくとも 1 つのエチレンオキシドユニット、すなわち、(- C H ₂ - C H ₂ - O -) に脂質を共有結合する単結合または官能基である。式 II において、「Z」は、カチオン性基に少なくとも 1 つのエチレンオキシドユニットを共有結合する単結合または官能基である。式 II において、「Y」はポリカチオン性部分である。式 II において、添え字「n」は、約 6 ~ 約 160 の範囲の整数である。 10

【0015】

他の局面において、本発明は、以下：

(a) 式 I を有する化合物（ここで、A、W、およびYは定義されている）；

A - W - Y I

(b) 生理活性剤；および 20

(c) 第 2 の脂質、

を含む、脂質ベースの薬物に関する。

【0016】

特定の実施形態において、脂質ベースの薬物処方物は、リポソーム、ミセル、ビロソーム、脂質 - 核酸粒子、核酸凝集体およびそれらの混合物の形態にある。特定の他の実施形態において、生理活性剤は治療用核酸または他の薬物である。 30

【0017】

なお他の局面において、本発明は、脂質ベースの薬物送達系の細胞内送達を増加するための方法に関し、この方法は脂質ベースの薬物送達系に式 I または II の化合物を組み込む工程であって、これによって脂質ベースの薬物送達系の細胞内送達を増加する工程を包含する。 30

【0018】

本発明のさらなる局面および利点は、以下の詳細な記載および添付の図面と共に読まれると明らかとなる。

【0019】

（定義）

用語「脂質」は、脂肪酸のエステルを含むがこれらに限定されず、水に不溶であるが多くの有機溶媒に可溶であることによって特徴付けられる有機化合物をいう。それらは、通常、以下の少なくとも 3 つのクラスに分割される：(1) 脂肪および油を含む「単純な脂質」ならびにワックス；(2) リン脂質および糖脂質を含む「化合物脂質」；(3) ステロイドのような「誘導体化された脂質」。 40

【0020】

用語「ベシクル形成脂質」は、疎水性部分および極性ヘッド基を有する任意の両親媒性脂質を含むことが意図され、それ自体、ほとんどのリン脂質によって例示されるように、水中で二分子膜ベシクルに自発的に形成し得る。

【0021】

用語「ベシクル適合性脂質」は、他の両親媒性脂質と脂質二分子膜に安定に組み込まれる任意の両親媒性脂質を含むことが意図され、ここで、その疎水性部分は二分子膜の内部の疎水領域と接触し、そしてその極性ヘッド基部分は膜の外側の極性表面に向かって配向される。ベシクル適合性脂質は、脂質自体が非ラメラ相に適合する傾向があり、そしてそれ 50

が二分子膜安定化成分の存在下で二分子膜構造を想定し得る脂質を含む。代表的な例は、D O P E (ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン)である。二分子膜安定化成分として、ポリアミドオリゴマー、ペプチド、タンパク質、界面活性剤、脂質誘導体、P E G - 脂質誘導体 (ホスファチジルエタノールアミンに結合したP E G)、およびセラミドに結合したP E Gが挙げられるが、これらに限定されない (米国出願第08/485,608号、現在米国特許第5,885,613号を参照のこと。これらは本明細書中において参考として援用される)。

【0022】

用語「両親媒性脂質」は、一部、脂質物質の疎水性部分が疎水性相内に配向する一方で、親水性部分が水相に向かって配向する、任意の適切な物質をいう。両親媒性脂質は、通常、脂質ベシクルの主な成分である。親水性特性は、極性基または荷電した基 (例えば、糖、ホスファト、カルボキシル、スルファト、アミノ、スルフヒドリル、ニトロ、ヒドロキシ、および他の同様の基)の存在に由来する。疎水性は、非極性基の含有によって付与され、この非極性基として長鎖の飽和脂肪族炭化水素基および長鎖の不飽和脂肪族炭化水素基が挙げられるが、これらに限定されず、このような基は、1つ以上の芳香族基、環式脂肪族基、または複素環式基によって置換される。両親媒性化合物の例として、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。リン脂質の代表的な例として、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン、リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン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。リンを有しない他の化合物 (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) もまた、両親媒性脂質として表される群に入る。さらに、上記の両親媒性脂質は、トリグリセリドおよびステロールを含む他の脂質と混合され得る。

【0023】

用語「中性脂質」は、選択されたpHで荷電されていない形態かまたは中性の双性イオン形態のいずれかで存在する多数の脂質種のいずれかをいう。生理学的pHにおいて、このような脂質として、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。

【0024】

用語「疎水性脂質」は、非極性基を有する化合物をいい、この非極性基として、長鎖の飽和脂肪族炭化水素基および長鎖の不飽和脂肪族炭化水素基が挙げられるが、これらに限定されず、このような基は、必要に応じて、1つ以上の芳香族基、環式脂肪族基または複素環式基によって置換される。適切な例として、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 - ディアシルオキシ - 3 - アミノプロパンおよび1,2 - ディアルキル - 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。

【0025】

用語「ジアシルグリセロリル」は、2 - 脂肪アシル鎖を示し、R¹およびR²は、独立して、エステル結合によってグリセロールの1位および2位に結合された2 ~ 30個の炭素原子を有する。アシル基は、飽和され得るか、または異なる不飽和度を有し得る。ジアシルグリセロール基は、以下：

【0026】

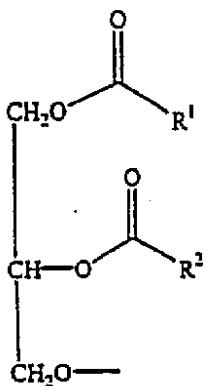
【化8】

10

20

30

40



10

の一般式を有する。

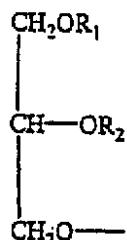
【0027】

用語「ジアルキルグリセロリル」は、エステル結合によってグリセロールの1位および2位に結合された2つのC₁~C₃₀アルキル鎖を示す。ジアルキルグリセロール基は、以下：

【0028】

【化9】

20



30

の一般式を有する。

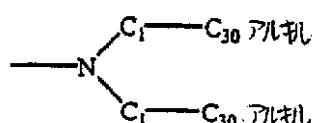
【0029】

用語「N-N-ジアルキルアミノ」は、以下：

【0030】

【化10】

40



を示す。

【0031】

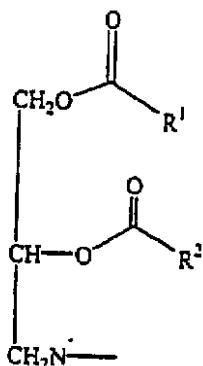
用語「1,2-ジアシルオキシ-3-アミノプロパン」は、エステル結合によってプロパンの1位および2位に結合した2-脂肪アシル鎖C₁~C₃₀を示す。アシル基は、飽和さ

50

れ得るか、または異なる不飽和度を有し得る。プロパン分子の3位に-NH-が結合される。1,2-ジアシルオキシ-3-アミノプロパンは、以下：

【0032】

【化11】



10

の一般式を有する。

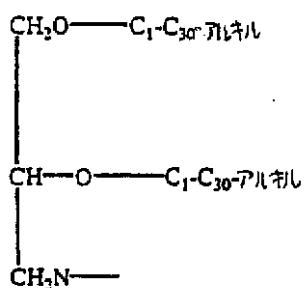
【0033】

用語「1,2-ジアルキル-3-アミノプロパン」は、エステル結合によってプロパンの1位および2位に結合した2-アルキル鎖(C₁~C₃₀)を示す。このプロパン分子の3位に-NH-基が結合される。1,2-ジアルキル-3-アミノプロパンは、以下：

20

【0034】

【化12】



30

を有する。

【0035】

用語「非カチオン性脂質」は、上記のような任意の中性脂質およびアニオン性脂質をいう。アニオン性脂質の例として、ホスファチジルグリセロール、カルジノリピン(cardiolipin)、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、リゾホスファチジルグリセロール、および中性脂質に結合した他のアニオン性修飾基が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0036】

用語「カチオン性脂質」は、生理学的pHのような選択されたpHで賞味の正の電荷を有する多数の脂質種のいずれかをいう。このような脂質として、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プロミド(「DDAB」)；N-(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(

50

「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、多数のカチオン性脂質の市販の調製物は入手可能であり、本発明で使用され得る。これらとして、例えば、LIPOFECTIN(登録商標)(DOTMAおよび1,2-ジオレオイル-sn-3-ホスホエタノールアミン(「DOPA」)を含む、USA、New York、Grand Island、GIBCO/BRLから市販される、カチオン性リポソーム)；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(「DOPA」)を含有する、GIBCO/BRLから市販されるカチオン性リポソーム)；および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シスペルミン(「DOS」)を含む、Promega Corp., Madison, Wisconsin, USAから市販されるカチオン性脂質)が挙げられるが、これらに限定されない。以下の脂質は、カチオン性であり、生理学的pH未満で正の電荷を有する：DODAP、DODMA、DMDMAなど。

【0037】

用語「フゾジェニック(fusogenic)」は、リポソームまたは他の薬物送達系が細胞の膜と融合する能力をいう。膜は、血漿膜またはオルガネラの周りの膜(例えば、エンドゾーム、核など)のいずれかであり得る。フゾジェネシス(fusogenesis)は、リポソームのこののような膜への融合である。

【0038】

用語「デンドリマー」は、複数の世代を有する分枝状ポリマーに対する基準を含む。デンドリマーの各世代は、複数の分岐点を形成する。

【0039】

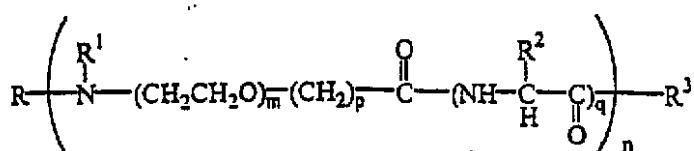
用語「リガンド」は、反応性官能基を有する任意の分子、化合物またはデバイスを含み、リガンドとして、脂質、両親媒性脂質、キャリア化合物、バイオアフィニティー化合物、医用材料、生体高分子、医用デバイス、分析的に検出可能な化合物、治療的に活性な化合物、酵素、ペプチド、タンパク質、抗体、免疫刺激物質、放射標識、フルオロゲン(fluorogen)、ビオチン、薬物、ハプテン、DNA、RNA、多糖、リポソーム、ビロソーム、ミセル、免疫グロブリン、官能基、標的化薬剤、または毒素が挙げられる。上記の列挙は、例示的なものであり、排他的であることが意図されない。

【0040】

用語「ATTAA」または「ポリアミド」は、1998年12月22日出願の米国特許出願第09/218,988号に開示される化合物をいうが、これらに限定されない。これらの化合物として、以下：

【0041】

【化13】



の式を有する化合物が挙げられ、ここで、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メンバであり；R¹は、水素およびアルキルからなる群から選択されるメンバであり；または、必要に応じて、RおよびR¹および窒素が結合して、アジド部分を形

10

20

30

40

50

成し；R²は、水素、必要に応じて置換アルキル、必要に応じて置換アリールおよびアミノ酸の側鎖からなる群から選択されるメンバであり；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N R⁴ R⁵からなる群から選択されるメンバであり、ここでR⁴およびR⁵は独立して水素またはアルキルであり；nは、4～80であり；mは、2～6であり；pは、1～4であり；そしてqは、0または1である。他のポリアミドが本発明の化合物に使用され得ることは当業者に明らかである。

【0042】

本明細書中に使用されるように、用語「アルキル」は、分枝または非分枝の炭化水素鎖を示し、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-メチルペンチルである。これらの基は、必要に応じて、このような鎖に通常結合される1つ以上の官能基（例えば、ヒドロキシ、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、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、アミドなど）で置換され得、例えば、トリフルオロメチル、3-ヒドロキシヘキシル、2-カルボキシルプロピル、2-フルオロエチル、カルボキシメチル、シアノブチルなどのようなアルキル基を形成する。

【0043】

用語「アルキレン」は、上で定義されたような二価アルキルをいい、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-ブロモ-3-ヒドロキシ-4-メチルペンテン（-CHBrCH₂CH(OH)CH(CH₃)CH₂-）などである。

【0044】

用語「アルケニル」は、1つ以上の炭素-炭素二重結合を含む分枝または非分枝の炭化水素鎖をいう。

【0045】

用語「アルキニル」は、1つ以上の炭素-炭素三重結合を含む分枝または非分枝の炭化水素鎖をいう。

【0046】

用語「アリール」は、例えば、フェニル、ナフチル、インデニルなどのような好ましくは約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する炭素原子の鎖を示し、これらは、このような鎖に通常結合される1個以上の官能基（ヒドロキシ、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、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、アミドなど）で置換され得、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、ブロモフェニル、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など）を形成する。

【0047】

用語「アシル」は、-C(O)R基を示し、ここで、Rは上で定義されるアルキルまたはアリールであり、例えば、ホルミル、アセチル、プロピオニル、またはブチリールが挙げられる。

【0048】

用語「アルコキシ」は、-OR-を示し、ここでRはアルキルである。

【0049】

用語「アミド」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）を示す。

10

20

30

40

50

【0050】

用語「アミノ」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NH₂である）を示す。

【0051】

用語「カルボキシ」は、基-C(=O)O-を示し、そして用語「カルボニル」は、基-C(=O)-を示す。

【0052】

用語「カルボネート」は、基-OOC(=O)O-を示す。

【0053】

用語「カルバメート」は、基-NHC(=O)O-を示し、そして用語「尿素」は、基-NHC(=O)NH-を示す。 10

【0054】

用語「ホスホロ」は、基-OP(=O)(OH)O-を示す。

【0055】

用語「塩基性アミノ酸」は、生理学的pHのような選択されたpHで賞味の正電荷を有する、天然に存在するアミノ酸、および合成アミノ酸および/またはアミノ酸模倣物をいう。この基として、リジン、アルギニン、アスパラギン、グルタミン、ヒスチジンなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【0056】

用語「ホスホリルエタノールアミノ」は、基-OP(=O)(OH)OCH₂CH₂NH-を示す。 20

【0057】

用語「ホスホリルエタノールアミド」は、基-OP(=O)(OH)OCH₂CH₂NHC(=O)-を示す。

【0058】

用語「ホスホ」は、五価のリン部分-P(=O)(OH)O-を示す。

【0059】

用語「ホスホエタノールアミノ」は、基-P(=O)(OH)OCH₂CH₂NH-を示す。

【0060】

用語「ホスホエタノールアミド」は、基-P(=O)(OH)OCH₂CH₂NHC(=O)-を示す。 30

【0061】

用語「エチレンオキシドユニット」は、基-OCH₂CH₂-を示す。

【0062】

用語「CPL」は、カチオン性-ポリマー-脂質（例えば、カチオン性-P EG-脂質）をいう。好ましいCPLは、式IおよびIIの化合物である。

【0063】

用語「d-DSPe-CPL-M」は、1つの正電荷を有するDSPe-CPLをいう用語「CPL1」によって包含される。d-DSPe-CPL-M中の「d」は、CPLが蛍光ダンシル基を含むことを示す。ダンシル部分を含まないCPLが合成され得ることは当業者に明らかであり、従って、用語「DSPe-CPL-M」は、上で定義される用語「CPL1」によって包含される。 40

【0064】

用語「d-DSPe-CPL-D」は、2つの正電荷を有するDSPe-CPLをいう用語「CPL2」によって包含される。

【0065】

用語「d-DSPe-CPL-T1」は、3つの正電荷を有するDSPe-CPLをいう用語「CPL3」によって包含される。

【0066】

用語「d-DSPe-CPL-Q1」は、4つの正電荷を有するDSPe-CPLをいう 50

用語「CPL4a」によって包含される。

【0067】

用語「d-DSPe-CPL-Q5」、またはDSPe-PeGQuad5、またはDSPe-CPL-4は全て、5つの正電荷を有するDSPe-CPLをいう用語「CPL4（またはCPL4b）」によって包含される。ヘッド基領域を改変することによって、1（モノ、またはM）、2（ジ、またはD）、3（トリ、またはT）、および4（クアド、またはQ）の正電荷を含むCPLが合成された。種々のQuad CPLが合成され、従って、これらはQ1からQ5と番号付けされる。

【0068】

略称「HBS」は、Hepes緩衝生理食塩水をいい、「Rhō-PE」は、ローダミン-ホスファチジルエタノールアミンをいい、そして「LUV」は「巨大単層ラメラベシクル」をいう。

10

【0069】

（発明の詳細な説明および好ましい実施形態）

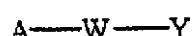
（A. 化合物および合成）

特定の局面において、本発明は、カチオン性ポリマー脂質結合体（CPL）、例えば、特に細胞摂取を向上するための従来のステルスリポソームに組み込まれ得る遠位カチオン性ポリ（エチレングリコール）脂質結合体を提供する。本発明のCPLは、以下の構築の特徴を有する：（1）脂質二分子膜内にCPLを組み込むための疎水性脂質のような脂質アンカー；（2）カチオン性ヘッド基に脂質アンカーを連結するための、ポリエチレングリコールのような親水性スペーサー；および（3）プロトン化可能なカチオン性ヘッド基を生成するための、天然に存在するアミノ酸のようなポリカチオン性部分。このように、本発明は、以下：

20

【0070】

【化14】



I

30

の式Iの化合物を提供し、ここで、A、W、およびYは前で定義される通りである。

【0071】

式Iを参照して、「A」は脂質アンカーとして作用する両親媒性脂質、中性脂質または疎水性脂質のような脂質部分である。適切な脂質の例として、ベシクル形成脂質またはベシクル適合性脂質が挙げられ、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

【0072】

「W」は、親水性のポリマーまたはオリゴマーのようなポリマーまたはオリゴマーである。好ましくは、この親水性ポリマーは、非免疫原性であるかまたは低い固有の免疫原性を有する生体適合性ポリマーである。あるいは、親水性ポリマーは、適切な補助剤と共に使用される場合、抗原性が弱くなり得る。適切な非免疫原性ポリマーとして、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み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい実施形態において、このポリマーは約250～約7000ダルトンの分子量を有する。

【0073】

「Y」は、ポリカチオン性部分である。用語「ポリカチオン性部分」は、選択されたpH

50

(好ましくは、生理学的 pH) で正電荷 (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、または官能基をいう。適切なポリカチオン性部分として、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、リジンおよびヒスチジン；スペルミン；スペルミジン；カチ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。このポリカチオン性部分は、直鎖 (例えば、直鎖テトラリジン)、分枝または樹枝状の構造であり得る。ポリカチオン性部分は、約 2 ~ 約 15 の正電荷、好ましくは約 2 ~ 約 12 の正電荷、そしてより好ましくは、約 2 ~ 8 の正電荷を、選択された pH 値において有する。どのポリカチオン性部分が使用されるかとの選択は、所望されるリポソーム適用の型によって決定され得る。

【0074】

10

ポリカチオン性部分の電荷は、リポソーム部分全体の周りに分布され得るか、あるいは、それらはリポソーム部分の 1 つの特定の領域内の別個の濃度の電荷密度 (例えば、電荷スパイク (charge spike)) であり得る。この電荷密度がリポソーム状に分布される場合、この電荷密度は、均等に、または不均等に分布され得る。ポリカチオン性部分の電荷分布の全てのバリエーションは、本発明によって包含される。

【0075】

脂質「A」および非免疫原性ポリマー「W」は、種々の方法によって、好ましくは共有結合によって結合され得る。当業者に公知の方法は、「A」と「W」との共有結合のために使用され得る。適切な結合として、アミド、アミン、カルボキシ、カルボネート、カルバメート、エステルおよびヒドロ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」は結合を達成するための相補的な官能基でなければならないことは当業者にとって明らかである。これらの 2 つの基の反応 (一方は脂質上、他方はポリマー上) は、所望される結合を提供する。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 N H S および D C C で活性化される場合、活性エステルを形成し、次いで、アミノ基を含むポリマー (例えば、ポリアミド) と反応され (1998 年 12 月 22 日出願の米国特許出願第 09/218,988 号を参照のこと)、アミド結合は 2 つの基間に形成される。

20

【0076】

特定の実施形態において、「W」は、「Y」に結合され、好ましくは共有結合される。「A」および「W」の場合のように、「W」および「Y」の共有結合は、官能基の相補的反応性によって生成され得、一方はポリマー上で、他方はポリカチオン性部分上である。例えば、「W」のアミン官能基は、活性化されたカルボキシル基 (例えば、塩化アシルまたは N H S エステル) と反応され得、アミドを形成する。反応基の適切な選択によって、所望されるカップリングが得られ得る。他の活性化されたカルボキシル基として、カルボン酸、カルボキシレートエステル、カルボン酸ハロゲン化物およびカルボン酸の他の活性化された形態 (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。反応性酸ハロゲン化物として、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が、これらに限定されない。

30

【0077】

特定の例において、ポリカチオン性部分は、標的化リガンドのようなりガンドを結合し得る。好ましくは、このリガンドが結合した後、カチオン性部分は正電荷を維持する。特定の例において、結合されたリガンドは、正電荷を有する。適切なリガンドとして、反応性官能基を有する化合物またはデバイスが挙げられ、これらに限定されず、例えば、脂質、両親媒性脂質、キャリア化合物、バイオアフィニティー化合物、医用材料、生体高分子、医用デバイス、分析検出可能な化合物、治療的に活性な化合物、酵素、ペプチド、タンパク質、抗体、免疫刺激物質、放射標識、フルオロゲン (f l u o r o g e n)、ビオチン、薬物、ハプテン、D N A、R N A、多糖、リポソーム、ビロソーム、ミセル、免疫グロブリン、官能基、他の標的化薬剤、または毒素が挙げられる。

40

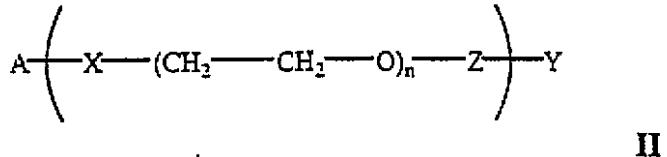
【0078】

特定の好ましい実施形態において、他の部分は、式 I の化合物内に組み込まれ、以下：

50

【0079】

【化15】



10

の式IIの化合物を形成する。式IIにおいて、「A」は、両親媒性脂質、中性脂質または疎水性脂質部分のような脂質部分である。適切な脂質の例として、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。

【0080】

式IIにおいて、「X」は、少なくとも1つのエチレンオキシドユニットに脂質を共有結合する単結合または官能基である。適切な官能基として、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、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および硫黄である）が挙げられるが、これらに限定されない。特定の例において、脂質「A」は単結合によってエチレンオキシドユニットに直接結合される。エチレンオキシドユニットの数は、約1～約160、好ましくは約6～約50の範囲であり得る。

20

【0081】

式IIにおいて、「Z」は、ポリカチオン性部分にエチレンオキシドユニットを共有結合する単結合または官能基である。適切な官能基として、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メンバである）が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、末端エチレンオキシドユニットは、ポリカチオン性部分に直接結合される。

30

【0082】

式IIにおいて、「Y」は、式Iと組み合わせて、上で定義されるようなポリカチオン性部分である。式IIにおいて、添え字「n」は、約6～約160の範囲の整数である。

【0083】

例示の実施形態において、式IIの化合物は、図2に概説されるような一般化された手順を使用して合成され得る。図2は、本発明の1つの特定の実施形態を示し、従って、単なる例にすぎず、本明細書中の特許請求の範囲を制限するべきではない。明らかに、当業者は、図2に例示される反応スキームで生成され得る多くの他の変形物、代替物、および改変物を理解する。図2を参照して、クロロホルム中の脂質（例えば、DSPE）および塩基（例えば、トリエチルアミン）の溶液は、(t-Boc-NH-PEG₃₄₀₀-CO₂NH₂）に加えられ、この溶液は周囲の温度で攪拌される。次いで、この溶液を窒素流下で乾燥するまで濃縮した。次いで、この残渣を、クロマトグラフィーを使用して脂質が消失するまで、ジエチルエーテルによるクロロホルム混合溶液の繰り返した沈殿によって、精製した。精製したCPL結合体を溶媒に溶解し、次いでTFAを加え、この溶液を室温で攪拌した。この溶液を再び窒素流下で濃縮した。次いでこの残渣をジエチルエーテルによる混合物の繰り返した沈殿によって精製し、脂質-NH₂ (DSPE-PEG-NH₂、あるいは1つのプロトン化可能なカチオン性ヘッド基を有するDSPE-CPL-1)を得た。次いで、ホスホリル-脂質アンカーと遠位一級アミンとの比は、本明細書中に記載されるようなホスフェートおよびフルオレスカミンアッセイによって測定され得

40

50

る。

【0084】

この例示の実施形態において、プロトン化可能なアミノ基の数は、増加され、ポリカチオン性部分を生成し得る。例えば、化学量論的な量の N , N - ジ - t - B o c - L - リジン N - ヒドロキシスクニドエステルを漸増的に添加することによって、ポリカチオン性部分は約 2 から約 16 まで正電荷を増加し得る。前に記載されるように、正電荷は、任意の数の適切なポリカチオン性部分（例えば、リジン、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み合わせ）に組み込まれ得る。本発明の合成方法を使用して、カチオン性基（例えば、アミノ基）の数は、CPL 合成の間、容易に制御され得る。

10

【0085】

（B. 脂質ベースの薬物処方物）

特定の局面において、本発明は、以下：

（a）式 I の一般式：

【0086】

【化16】



20

を有する化合物（ここで A、W および Y は、上記の定義の通りである）；（b）生体活性剤；および必要に応じて（c）第 2 の脂質、を含む脂質ベースの薬物処方物を提供する。好ましい実施形態において、本発明の脂質ベースの薬物処方物は、第 2 の脂質（例えば、PEG - 脂質誘導体）を含む。

【0087】

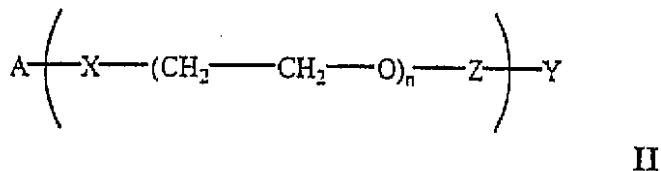
特定の好ましい実施形態において、本発明の第 2 の脂質ベースの薬物処方物は、以下：

30

（a）式 II：

【0088】

【化17】



40

の化合物（ここで A、X、Z、Y および n は、上記に定義されている）；（b）生体活性剤；ならびに必要に応じて、（c）第 2 の脂質を含む。好ましい実施形態において、本発明の脂質ベースの薬物処方物は、第 2 の脂質（例えば、PEG - 脂質誘導体）を含む。

【0089】

CPL が調製された後に、それらは、種々の様式で利用され得る。この様式としては、例えば、脂質ベースの薬物処方物が挙げられる。この局面において、脂質ベースの処方物は、リポソーム、ミセル、ヴィロソーム（virosome）、脂質 - 核酸粒子、核酸凝集体、および 1 以上の生体活性剤を取り込み得るかまたは捕捉し得る他の形態であり得る。

特定の局面において、本発明の脂質ベースの薬物処方物は、第 2 の脂質を含む。

50

【0090】

式IおよびIIの化合物は、脂質ベースの処方物（例えば、1997年10月10日に出願された「Methods for Encapsulating Nucleic Acids in Lipid Bilayers」という表題の同時係属米国特許出願第08/454,641号、同第08/485,458号、同第08/660,025号、同第08/484,282号、同第60/055,094号、同第08/856,374号、同第60/053,813号および同第60/063,473号（代理人書類番号016303-004800）、米国特許第5,703,055号、米国特許出願第09/218,988号（1998年12月22日に出願）（これらの全ての教示は、全ての目的のためにそれらの全体において本明細書中に参考として援用される）に記載されるもの）において使用され得る。本明細書は、種々のリポソーム型、およびリポソーム中にCPLを組み込む種々の方法を示しており、これらの全ては、本願発明の広範な方法および組成物の例である。10

【0091】

種々の脂質ベースの薬物処方物の形成に使用される脂質成分およびCPLは、部分的に、用いられる送達系の型に依存する。例えば、リポソームが使用される場合、CPLに使用される脂質は、一般に、種々の小胞形成脂質または小胞適合脂質（代表的には、適切に機能化されたリン脂質およびステロール（例えば、ホスファチジルエタノールアミン（PE）、ホスファチジルセリン（PS）、ホスファチジルイノシトール（PI）、ホスファチジルグリセロール（PG）、ホスファチジン酸（PA）など）を含む）から選択される。20 対照的に、ミセルが用いられる場合、CPLに使用される脂質は、一般に、ステリルアミン、アルキルアミン、C₈~C₂₂アルカン酸、リゾリン脂質（lysophospholipid）、界面活性剤などから選択される。アシル鎖が、長さにおいて変動され得、そして飽和され得るか、または種々の不飽和度に処理し得ることは、当業者には容易に明らかである。アシル鎖がより飽和すると、膜はより堅くなる。より高い不飽和度は、小胞膜により流動性を付与する。同様に、本発明の薬物送達系を構成する他の脂質成分（例えば、脂質、カチオン性脂質、中性脂質、非カチオン性脂質など）は、用いられる薬物送達系に依存して変動する。種々の薬物送達系に適切な脂質は、当業者に容易に明らかである。

【0092】

脂質ベースの薬物処方物が、細胞中のいくつかのタンパク質の産生を誘導またはブロックすることが意図される治療用遺伝子またはオリゴヌクレオチドを送達するために使用される場合、カチオン性脂質が、処方物（例えば、リポソーム、ミセル、脂質-核酸粒子など）に含まれ得る。核酸は、負に荷電され、そして正に荷電した実体と組み合わされて、処方物および細胞性送達に適切な脂質複合体を形成し得る。30

【0093】

本明細書中に使用される場合、「カチオン性脂質」は、一般に、（リポソーム中に組み込まれた場合に）リポソーム膜にまたはリポソーム膜付近に位置したカチオン性ヘッド基を有する脂質をいう。CPLは、特定の場合には、この膜から有意な距離でカチオン性電荷を配置する効果を有するポリマー「W」によってカチオン性脂質から区別される。40

【0094】

適切なカチオン性脂質の例としては、DC-Chol（Gaoら、Biochem. Biophys. Res. Comm. 179: 280~285（1991）を参照のこと）；D DAM；DMRIE；DODAC（米国特許出願第08/316,399号（1994年9月30日出願（本明細書中に参考として援用される）；DOGS；DOSPA；DOTAP；およびDOTMAが挙げられるがこれらに限定されない。ここで好ましい実施形態において、N,N-ジオレオイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロリドは、ホスファチジルエタノールアミンと組み合わせて使用される。

【0095】

さらに、遺伝子送達およびオリゴヌクレオチド送達のための脂質ベースキャリアの生成に有用な他のカチオン性脂質は、LIPOFECTIN（米国特許第4,897,355号50

；同第4，946，787号；および同第5，208，036号（Eppsteinらに
対して発行））ならびにLIPOFETACE（米国特許第5，279，883号（Rose
に対して発行））である。両方の薬剤、および他のトランスフェクトカチオン性脂質が
、Life Technologies, Inc. Gaithersburg, Marylandから入手可能である。

【0096】

1つの好ましい実施形態において、本発明のCPLリポソームは、全身送達適用のために
最適化される。特定の適用において、CPLのポリマーの長さは、ステルス（stealth）
リポソームのために使用される通常の中性PEG鎖（M.W. 2000～5000
ダルトン）よりも短い。この場合において、CPLにおけるより短いポリマーは、約25
0～約3000ダルトンであり、そしてより好ましくは、約1000～約2000ダルトン
である。この実施形態において、第2の脂質は、例えば、PEG₃₄₀₀-脂質であり、そ
して式Iの化合物は、例えば、A-PEG₁₀₀₀-Yである（図17Cを参照のこと）。 10

【0097】

任意の特定の理論により拘束されることなく、より短いポリマーが使用される場合には、
CPLの遠位の電荷は、通常のPEG排除障壁内に隠され、それによってリポソーム表面
から正電荷を遠ざけつつ、同時に、長い循環寿命の保持を可能にすると考えられる。この
実施形態は、リポソームと標的細胞との間の相互作用を増強する。小胞循環および細胞性
取り込みを調節するために使用される、CPLにおける異なるサイズのポリマー（例えば
、PEG鎖）および中性PEG脂質の使用は、薬物キャリアとしてステルスリポソームの
新たな生成を可能にする。最適化されたポリマーの長さは、特定の条件（例えば、インビ
トロ適用またはインビボ適用、局所投与または全身投与、および異なる脂質処方物）とと
もに変動し得ると考えられる。 20

【0098】

別の実施形態において、CPLにおけるポリマーの長さは、ステルスリポソームに使用さ
れる通常の中性PEG鎖よりも大きなMWを有する。この場合において、第2の脂質は、
例えば、PEG₁₀₀₀-脂質であり、そして式Iの化合物は、例えば、A-PEG₃₄₀₀-Y
の式を有する（図17Bを参照のこと）。

【0099】

特定の処方物および適用において、CPLの型（すなわち、ポリマー鎖の長さ、および1
分子あたりのカチオン性電荷の量、ならびに処方物中のこのようなCPLの量）（例えば
、SPLP）が、クリアランス特性の最良のバランスを得るために最適化され得る。特定
の場合には、長鎖CPLおよびより高レベルのこのようなCPLは、トランスフェクション
を増加させるために好ましい。他の場合において、処方物中に取り込まれる短鎖CPL
は、動物でのより長い循環寿命のために最適化される。 30

【0100】

本発明の1つの実施形態において、フゾジエニックリポソームまたはヴィロソームが、提
供される。本発明のCPLが、種々の型のフゾゲニックリポソームおよびヴィロソームに
有利に取り込まれ得ることは、当業者に容易に明らかである。このようなフゾゲニックリ
ポソームおよびヴィロソームは、疾患部位または標的部位でフゾジエニックになるよう
に設計され得る。当業者は、リポソームまたはヴィロソームがフゾジエニックになる場合を
制御するために、多数の変動性が使用され得ることを容易に理解する。このような変動性
としては、例えば、リポソームまたはヴィロソームの組成、pH、温度、酵素、補因子、
イオンなどが挙げられる。 40

【0101】

1つの実施形態において、フゾジエニックリポソームとしては、非層状相を採用し得る脂
質、二重層安定化成分（例えば、PEG-脂質誘導体）の存在下で二重層構造をなお想定
し得る脂質；および二重層構造中の脂質を安定化するために、脂質と可逆的に結合した二
重層安定化成分が挙げられる。このようなフゾゲニックリポソームは、有利である。なぜ
なら、それらがフゾジエニックになる速度は、予め決定され得ないだけではなく、数分か
50

ら数十時間の時間スケールにわたって必要に応じて変動され得るからである。例えば、二重層安定化成分の組成および濃度を制御することによって、BSCがインビボでリポソームから交換する速度、次いでリポソームがフゾジエニックになる速度を制御し得ることが見出されている（米国特許第5,885,613号を参照のこと）。例えば、脂質のアシル鎖の長さを制御することによって、BSCがインビボでリポソームから交換する速度、次いでリポソームがフゾジエニックになる速度を制御し得ることが見出されている。特に、より短いアシル鎖（例えば、C-8）が、より長いアシル鎖（例えば、C-20）よりもこのリポソームからすぐに交換することが発見されている。あるいは、BSCの組成および濃度を制御することによって、BSCが分解される（すなわち、内因性システム（例えば、血清中の内因性酵素）によって破壊される）速度、次いでリポソームがフゾジエニックになる速度を制御し得る。
10

【0102】

組織化されたアセンブリにおける脂質の多型性の挙動は、動的な分子形状の概念に関して質的に説明され得る（例えば、Cullisら、「Membrane Fusion」（Wilschut, J. およびD. Hoekstra（編）、Marcel Dekker, Inc., New York (1991)を参照のこと）。極性ヘッド基の有効断面領域および膜内に埋め込まれた疎水性領域が同様である場合、この脂質は、円柱状の形状を有し、そして二重層のコンホメーションを採用する傾向がある。疎水性成分に対して小さい極性ヘッド基を有する錯体形状の脂質（例えば、不飽和ホスファチジルエタノールアミン）は、非二重層相（例えば、反転したミセルまたは逆六方晶系相（*inverse hexagonal phase*）（H））を好む。それらの疎水性ドメインに対して大きなヘッド基を有する脂質（例えば、リゾリン脂質）は、反転した錯体形状を有し、そして水溶液中でミセルを形成する傾向がある。従って、混合脂質系の相優先度は、全ての成分の正味の動的分子形状に対する寄与に依存する。それ自体、錯体形状および反転した錯体形状の脂質の組合せは、孤立したいずれかの脂質ができない条件下で二重層コンホメーションを採用し得る（MaddenおよびCullis, *Biochim. Biophys. Acta*, 684: 149~153 (1982)を参照のこと）。
20

【0103】

より形式的なモデルは、固有の湾曲仮説に基づく（例えば、Kirkら、*Biochemistry*, 23: 1093~1102 (1984)を参照のこと）。このモデルは、2つの反対の力（*opposing force*）に関するリン脂質多型を説明する。弾力的に緩んだ单層を生じる湾曲のその固有半径または平衡半径（ R_o ）を曲げ（*curl*）かつ採用する脂質单層の天然の傾向は、生じる炭化水素パッキング制約により妨害される。湾曲の固有半径を減少させる因子（例えば、二重結合が導入される場合に、炭化水素鎖により占められる容量の増加）は、H相形成を促進する傾向がある。逆に、ヘッド基のサイズの増大は、 R_o を増加させ、そして二重相の形成または安定化を促進する。反転した脂質円柱の間の間隙を満たし得る非極性脂質の導入はまた、H相の形成を促進する（Grunerら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3665~3669 (1989)；Sjolondら、*Biochemistry*, 28: 1323~1329 (1989)を参照のこと）。
30

【0104】

そのような、1つの実施形態において、本発明のフゾジエニックリポソームを形成するために使用され得る脂質は、生理学的条件下または特定の生理学的条件下（例えば、カルシウムイオンの存在下）で非層状相を採用するが、BSCの存在下で二重層構造を想定し得るものである。このような脂質としては、ホスファチジルエタノールアミン、セラミド、糖脂質、またはそれらの混合物が挙げられるがそれらに限定されない。生理学的条件下で非層状相を採用することが当業者に公知である他の脂質もまた、使用され得る。さらに、他の脂質が、種々の非生理学的变化（例えば、pHまたはイオン濃度の変化（例えば、カルシウムイオンの存在下）を含む）によって非層状相を採用するように誘導され得、それによって、それらはまた、本発明のフゾジエニックリポソームを形成するために使用され
40
50

得ることが当業者に容易に理解される。ここで好ましい実施形態において、フゾジエニックリポソームは、ホスファチジルエタノールアミンから調製される。ホスファチジルエタノールアミンは、飽和でも不飽和でもよい。ここで好ましい実施形態において、ホスファチジルエタノールアミンは、不飽和である。同様に好ましい実施形態において、フゾジエニックリポソームは、ホスファチジルエタノールアミン（飽和または不飽和）およびホスファチジルセリンの混合物から調製される。別の同様に好ましい実施形態において、フゾジエニックリポソームは、ホスファチジルエタノールアミン（飽和または不飽和）およびカチオン性脂質の混合物から調製される。

【0105】

1つの実施形態において、本発明の脂質ベースの薬物処方物は、二重層安定化成分（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、界面活性剤、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したPEG）、およびセラミドに結合体化したPEG（米国特許第5,885,613号（これは、本明細書中に参考として援用される）を参照のこと）が挙げられるがこれらに限定されない。好ましくは、二重層安定化成分は、PEG-脂質またはATTA-脂質である。本明細書中に議論されるように、特定の好ましい例では、BSCのPEGまたはATTAは、CPLのポリマー「W」と比較してより大きな分子量を有する。他の場合において、BSCは、ポリマーの「W」と比較してより小さな分子量を有する。本発明は、全てのこのようなバリエーションを含む。

【0106】

本発明に従って、生理学的条件下で非層状相を採用する脂質は、それ自体二重層を形成するか、または相補的な動的形状の構造のいずれかであるBSCによって二重層構造において安定化され得る。非二重層形成脂質は、それがBSCと結合している場合（すなわち、BSCの存在下）のみに、二重層構造において安定化される。適切なBSCの選択において、BSCは、リポソームから移入し得るか、または内因性システムによって化学的に改変され得、その結果、時間とともに、二重層構造中の脂質を安定化するその能力を失うことが好ましい。リポソーム安定性が失われるか、または減少する場合のみに、標的細胞の原形質膜とのリポソームの融合が、生じ得る。従って、BSC-脂質は、脂質と「可逆的に結合」し、そしてそれが脂質と結合している場合のみには、そうでなければ非層状相を採用する条件下で二重層構造を採用するように制約された脂質と「可逆的に結合」している。それ自体、本発明のBSC-脂質は、二重層構造中の脂質を安定化し得、なおそれらは、リポソームから交換し得るか、または種々の内因性システムによって化学的に改変され得、その結果、時間とともに、それらは、二重層構造中の脂質を安定化するそれらの能力を失い、それによってリポソームがフゾジエニックになることを可能にする。

【0107】

代表的には、CPLは、本発明の脂質ベースの処方物に、約0.05モルパーセント～約50モルパーセントの範囲の濃度にて存在する。ここで好ましい実施形態において、CPLは、0.05モルパーセント～約25モルパーセントの範囲の濃度で存在する。さらにより好ましい実施形態において、CPLは、0.05モルパーセント～約15モルパーセントの範囲の濃度で存在する。当業者は、CPLの濃度が、用いられるCPLおよびリポソームがフゾジエニックになるべき速度に依存して変動され得ることを理解する。

【0108】

本発明の1つの実施形態において、リポソームは、コレステロールを含む。コレステロールを含まないリポソームがインビボで使用される場合、それらは、血漿リポタンパク質および細胞膜からコレステロールを吸着する傾向を有することが決定されている。含まれる場合、コレステロールは、一般に、0.2モルパーセント～約50モルパーセントの範囲の濃度で存在し、そしてより好ましくは、約35モルパーセント～約45モルパーセントの範囲の濃度で存在する。

【0109】

（C.CPL-リポソームの調製）

10

20

30

40

50

CPL含有リポソーム（すなわち「CPL-リポソーム」）を作製するための種々の一般的な方法が、本明細書中に議論される。

【0110】

2つの一般的な技術としては、「挿入後」（すなわち、例えば、予め形成されたリポソーム小胞中のCPLの挿入）、および「標準的」技術（ここでCPLが、例えば、リポソーム形成工程の間に脂質混合物に含まれる）が挙げられる。挿入後技術は、リポソーム二重層膜の外面に主にCPLを有するリポソームを生じ、一方、標準的技術は、内面および外面の両方にCPLを有するリポソームを提供する。

【0111】

特に、「挿入後」は、小胞を（任意の方法によって）形成する工程、および適切な条件（通常、60で2～3時間）の下でCPLの存在下で予め形成された小胞をインキュベートする工程を包含する。60～80%の間のCPLが、レシピエント小胞の外部リーフレットに挿入され得、7モルパーセントまでの最終濃度（総脂質と比べて）を生じる。この方法は、リン脂質（これは、コレステロールを含み得る）から作製された小胞に特に有用であり、そしてまた、PEG-脂質（例えば、PEG-セラミド）を含む小胞にもまた特に有用である。

【0112】

「標準的」技術の例において、本発明のCPL-LUVは、押し出しによって形成され得る。この実施形態において、CPLを含む全ての脂質は、クロロホルム中に一緒に溶解され、これは次いで、窒素続いで高い減圧下で除去される。この脂質混合物は、適切な緩衝液において水和され、そして100nm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し出される。得られる小胞は、内面および外面の両方にCPLを含む。なお別の標準的な技術において、CPL-LUVの形成は、例えば、米国特許第5,976,567号および同第5,981,501号（これらの両方は、本明細書中に参考として援用される）に議論されるように、界面活性剤での透析方法またはエタノールでの透析方法を使用して達成され得る。押し出し方法および界面活性剤での透析方法は、実施例の節に詳細に説明されている。

【0113】

（D. リポソームの調製およびサイズ分け）

種々の方法が、例えば、Szokaら、Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467 (1980)、米国特許第4,186,183号、同第4,217,344号、同第4,235,871号、同第4,261,975号、同第4,485,054号、同第4,501,728号、同第4,774,085号、同第4,837,028号、同第4,946,787号、PCT公開番号WO91/17424、DeamerおよびBangham, Biochim. Biophys. Acta, 443:629～634 (1976)；Fraleyら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3348～3352 (1979)；Hopeら, Biochim. Biophys. Acta, 812:55～65 (1985)；Mayerら, Biochim. Biophys. Acta, 858:161～168 (1986)；Williamsら, Proc. Natl. Acad. Sci. 85:242～246 (1988)、テキストLiposomes, Marc J. Ostro編, Marcel Dekker, Inc., New York, 1983, 第1章およびHopeら, Chem. Phys. Lip. 40:89 (1986)（これらの全ては、本明細書中に参考として援用される）に記載されるように、リポソームの調製およびサイズ分けのために利用可能である。適切な方法としては、超音波処理、押し出し、高圧力/ホモジナイゼーション、微小流動（microfluidization）、界面活性剤での透析、小リポソーム小胞のカルシウム誘導性融合、およびエーテル注入方法（これらの全ては、当該分野で周知である）が挙げられるがこれらに限定されない。1つの方法は、均質なサイズの多層状小胞を生成する。この方法において、小胞形成脂質は、適切な有機溶媒または溶媒系に溶解され、そして減圧または不活性な気体の下で乾燥されて、薄い脂質膜を形成する。所望される場合、このフィ

10

20

30

40

50

ルムは、適切な溶媒（例えば、三級ブタノール）中に再溶解され得、次いで凍結乾燥されて、より容易に水和した粉末様形態である、より均質な脂質混合物を形成する。このフィルムは、緩衝水溶液で覆われ、そして代表的には、15～60分の時間にわたり攪拌して、水和される。得られる多層小胞のサイズ分布は、脂質をより激しい攪拌条件下で水和することによってか、または可溶化界面活性剤（例えば、デオキシコール酸塩）を添加することによって、より小さなサイズに変化され得る。

【0114】

小孔ポリカーボネート膜または非対称セラミック膜を通すリポソームの押出しは、比較的に十分に規定されたサイズ分布へとリポソームのサイズを減少させるための効果的な方法である。代表的には、この懸濁物は、所望のリポソームのサイズ分布が達成されるまで膜を1回以上膜を通してサイクル化される。このリポソームは、リポソームサイズの緩やかな減少を達成するために、より小さな孔の膜に連続して通すことによって押出され得る。本発明における使用については、約0.05ミクロン～約0.40ミクロンの範囲のサイズを有するリポソームが、好ましい。

10

【0115】

（E. 薬物送達ビヒクルとしてのリポソームの使用）

本発明の脂質ベースの薬物処方物および組成物（例えば、リポソーム、ミセル、脂質-核酸粒子、ヴィロソームなど）は、生体活性剤（例えば、治療剤、予防剤および診断剤）の全身送達または局所送達に有用である。このような送達系は、例えば、以下の同時係属米国特許出願第08/454,641号、同第08/485,458号、同第08/660,025号、同第08/484,282号、同第60/055,094号、同第08/856,374号、同第60/053,813号および同第60/063,473号（これらの全ての教示は、本明細書中に参考として援用される）により詳細に記載されている。

20

【0116】

以下の議論は、一般に、リポソームをいう；しかし、これと同じ議論が、本発明の他の薬物送達系（例えば、ミセル、ヴィロソーム、脂質-核酸粒子など）に十分に適用可能であることは、当業者に容易に理解される。

【0117】

治療剤の送達については、この組成物は、治療剤を充填され得、そして処置を必要とする被験体に投与され得る。本発明の方法を使用して投与される治療剤は、処置または予防されるべき疾患に対して適切な処置であるように選択される種々の薬物のいずれかであり得る。しばしば、薬物は、抗新形成剤（例えば、ビンクリスチン、ドキソルビシン、ミトザントロン、カンプトテシン（campotethacin）、シスプラチニン、ブレオマイシン、シクロホスファミド、メトトレキサート、ストレプトゾシンなど）である。特に好ましい抗腫瘍剤としては、例えば、アクチノマイシンD、ビンクリスチン、ビンプラスチン、システィンアラビノシド、アントラサイクリン、アルキル化剤、白金化合物、抗代謝物、ならびにヌクレオシドアナログ（例えば、メトトレキサート、ならびにプリンアナログおよびピリミジンアナログ）が挙げられる。抗感染剤を、本発明の方法によって特定の組織に送達することもまた、所望され得る。本発明の組成物はまた、他の薬物（局所麻酔薬（ジブカインおよびクロルプロマジン）；-アドレナリン作用性プロッカー（例えば、プロプラノロール、チモロールおよびラベトロール（labetolol））；抗高血圧薬（例えば、クロニジンおよびヒドララジン）；抗うつ薬（例えば、イミプラミン、アミトリプチリン、およびドキセピム（doxepim））；抗痙攣薬（例えば、フェニトイント；抗ヒスタミン薬（例えば、ジフェンヒドラミン、クロルフェニラミンおよびプロメタジン）；抗生素質/抗菌剤（例えば、ゲンタマイシン、シプロフロキサシンおよびセフオキシチン）；抗真菌剤（例えば、ミコナゾール、テルコナゾール（terconazole）、エコナゾール、イソコナゾール、ブタコナゾール、クロトリマゾール、イトラコナゾール、ナイスタチン、ナフチフィンおよびアムホテリシンB）；駆虫剤、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、免疫調節剤、神経伝達物質アンタゴニスト、抗線内障剤、ビタミン、麻酔薬、ならびに画像化剤を含むがこれらに限定されない）の選択的な送達のため

30

40

50

に使用され得る。

【0118】

上記のように、カチオン性脂質は、細胞内でいくつかのタンパク質の産生を誘導またはブロックすることが意図される治療用遺伝子またはオリゴヌクレオチドの送達において使用され得る。核酸は、負に荷電され、そして正に荷電した実体と組み合わされて、脂質複合体または十分にカプセル化された安定なプラスミド・脂質粒子を形成し得る。

【0119】

特に有用なアンチセンスオリゴヌクレオチドは、c-my c、bcr-abl、c-my b、ICAM-1、C-erb B-2 および BCL-2 のような標的に指向される。

【0120】

本発明のCPLはまた、ペプチド、核酸、プラスミドDNA、小染色体およびリボザイムの送達において有用である。

【0121】

本発明のCPLの別の臨床的用途は、動物およびヒトの両方の免疫のためのアジュvantとしてである。タンパク質抗原（例えば、ジフテリア毒素、コレラ毒素、寄生虫抗原、ウイルス抗原、免疫グロブリン、酵素および組織適合性抗原）が、免疫目的のために、本発明のCPLを含むリポソーム中に取り込まれ得るか、または本発明のCPLを含むリポソーム上に結合し得る。

【0122】

本発明のCPLを含むリポソームはまた、免疫応答を刺激するために、適切なリンパ器官に標的化されるワクチンのためのキャリアとして特に有用である。

【0123】

本発明のCPLを含むリポソームはまた、マクロファージに選択的に免疫抑制剤または免疫刺激剤を送達するためにベクターとして使用され得る。特に、マクロファージ活性を抑制するために有用であるグルココルチコイドおよびマクロファージを活性化するリンホカインは、本発明のリポソームを使用して送達され得る。

【0124】

本発明のCPLを含み、かつ標的分子を含むリポソームは、細胞を刺激または抑制するために使用され得る。例えば、特定の抗原を取り込んでいるリポソームは、その抗原を特異的に結合する表面抗体を提示するB細胞集団を刺激するために使用され得る。リポソーム表面上に増殖因子またはリンホカインを取り込むリポソームは、これらの因子に対して適切なレセプターを発現する細胞の刺激に指向され得る。このアプローチを使用して、骨髄細胞が、癌の患者の処置の一部として増殖させるために刺激され得る。

【0125】

リポソームカプセル化抗体は、薬物の過剰用量を処置するために使用され得る。肝臓に送達されるカプセル化抗体を有するリポソームの傾向は、血液循環からの物質（例えば、毒性因子）の除去において治療上の有利な点を有する。カプセル化されていない、ジゴキシンに対する抗体は、薬物の血管内保持を引き起こすが、カプセル化された抗体は、ジゴキシンの脾臓および肝臓での取り込みの増加ならびに排出速度の増加を引き起こすことが、実証されている。

【0126】

本発明のCPLを含むリポソームはまた、抗原を欠く細胞の原形質膜に脂質抗原またはタンパク質抗原を導入するためのキャリアとしての有用性を見出す。例えば、組織適合性抗原またはウイルス抗原は、ウイルス感染細胞または腫瘍細胞の表面に導入されて、免疫系によるこれらの細胞の認識および殺傷を促進し得る。

【0127】

さらに、本発明のCPLを含むリポソームは、任意の生成物（例えば、治療剤、診断剤、標識または他の化合物）（PEG誘導体化リポソーム中に現在処方されるものを含む）を送達するために使用され得る。

【0128】

10

20

30

40

50

特定の実施形態において、細胞型または組織に特異的な標的化部分を使用して、本発明のリポソームを標的とすることが所望される。種々の標的化部分（例えば、リガンド、細胞表面レセプター、糖タンパク質、ビタミン（例えば、リボフラビン）およびモノクローナル抗体）を使用する、リポソームの標的化は、以前に記載されている（例えば、米国特許第4,957,773号および同第4,603,044号（これらの教示は、本明細書中に参考として援用される）を参照のこと）。標的化部分は、タンパク質全体またはそのフラグメントを含み得る。

【0129】

いくつかの場合、リポソームの診断標的化は、標的の細胞または組織を処置するためにその後に使用され得る。例えば、毒素が標的化リポソームに結合される場合には、毒素は、標的とされる細胞（例えば、新形成細胞）の破壊に効果的である。

10

【0130】

別の局面において、本発明は、脂質ベースの薬物処方物の細胞内送達を増加させるための方法を提供する。この方法は、脂質ベースの薬物処方物中に、式IまたはIIの化合物を組み込み、それによって式IまたはIIの化合物を含まない処方物と比較して、脂質ベースの薬物処方物の細胞内送達を増加させる工程を包含する。式IまたはIIの化合物は、細胞内送達を、約10倍～約100倍、および好ましくは約10倍～約1000000倍に増加する。

【0131】

別の局面において、本発明は、非経口で投与された脂質ベースの薬物処方物の血液循環時間を増加させる方法を提供する。この方法は、脂質ベースの薬物処方物中に、約0.1～20モルパーセントの式IまたはIIの化合物を取り込ませる工程を包含する。

20

【0132】

他の局面において、本発明は、脂質ベースの薬物処方物を細胞にトランスフェクトする方法を提供する。この方法は、約0.1～20モルパーセントの式IまたはIIの化合物を有する脂質ベースの薬物処方物と細胞とを接触させる工程を包含する。さらに、脂質ベースの薬物処方物による細胞のトランスフェクションを増加させるための方法は、約0.1～20モルパーセントの式IまたはIIの化合物を有する脂質ベースの薬物処方物と細胞とを接触させ、それによって式IまたはIIの化合物を含まない脂質ベースの薬物処方物のトランスフェクション効率と比較して、脂質ベースの薬物処方物のトランスフェクション効率を、増加させる工程を包含する。

30

【0133】

（G. 診断剤としてのリポソームの使用）

本発明のCPLを使用して調製される、脂質ベースの薬物処方物または組成物（例えば、リポソーム）は、種々の疾患状態（腫瘍、炎症性関節、病変などを含む）の診断画像化を容易にするマーカーで標識され得る。代表的には、これらの標識は、放射性マーカーであるが、蛍光標識もまた使用され得る。照射放射性同位体が、特に有利である。なぜなら、それらは、シンチレーションウェルカウンターで容易に計測され得、計測前に組織ホモジネーションを必要とせず、そして 線カメラで画像化され得るからである。

【0134】

40

線または陽電子を放射する放射性同位体（例えば、線放射性としては、⁹⁹Tc、²⁴Na、⁵¹Cr、⁵⁹Fe、⁶⁷Ga、⁸⁶Rb、¹¹¹In、¹²⁵Iおよび¹⁹⁵Pt、ならびに例えば、陽電子放射性としては、⁶⁸Ga、⁸²Rb、²²Na、⁷⁵Br、¹²²Iおよび¹⁸F）が、代表的には使用される。

【0135】

リポソームはまた、インビオ診断の目的のために、磁気共鳴画像化（MRI）または電子スピン共鳴（ESR）の使用を通じてのように、常磁性同位体で標識され得る。例えば、米国特許第4,728,575号（この教示は、本明細書中に参考として援用される）を参照のこと。

【0136】

50

(H. リポソームの充填および投与)

以下の議論は、一般に、リポソームをいう；しかし、これと同じ議論が、本発明の他の薬物送達系（例えば、ミセル、ヴィロソーム、脂質-核酸粒子など）に十分に適用可能であることが、当業者に容易に明らかである。従来の薬物をリポソーム中に充填する方法としては、例えば、カプセル化技術、二重層への充填および膜貫通能充填方法が挙げられる。

【0137】

1つのカプセル化技術において、薬物およびリポソーム成分は、有機溶媒中に溶解され、この溶液中で、全ての種が混和性であり、そして乾燥フィルムに濃縮される。次いで、緩衝液が、この乾燥フィルムに添加され、そして小胞壁に取り込まれた薬物を有するリポソームが、形成される。あるいは、この薬物は、緩衝液中に置かれ得、そして脂質成分のみの乾燥フィルムに添加され得る。この様式において、この薬物は、リポソームの水性内部中にカプセル化される。このリポソームの形成に使用される緩衝液は、例えば、等張性生理学的食塩水、リン酸緩衝化生理食塩水、または他の低張度緩衝液の任意の生物学的に適合性の緩衝溶液であり得る。一般には、この薬物は、約0.01ng/mL～約50mg/mLの量にて存在する。水性内部または膜中に取り込まれた薬物を有する、次いで、得られるリポソームは、必要に応じて、上記のようにサイズ分けされる。

【0138】

膜貫通能充填は、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（この内容は、本明細書中に参考として援用される）に詳細に記載されている。簡潔には、膜貫通能充填方法は、適切な水性媒体中に溶解された場合に、荷電した状態で存在し得る、本質的に任意の従来の薬物とともに使用され得る。好ましくは、この薬物は、比較的に脂溶性であり、その結果、これは、リポソーム膜中に分配される。リポソームまたはタンパク質-リポソーム複合体の二重層を横切る膜貫通能が生成され、そして薬物が、膜貫通能によってリポソーム中に充填される。膜貫通能は、1以上の荷電種（例えば、Na⁺、K⁺および/またはH⁺）の膜を横切る濃度勾配を作製することによって生成される。この濃度勾配は、異なる内部媒体および外部媒体を有するリポソームを產生することによって生成され、そして付随するプロトン勾配を有する。次いで、薬物の蓄積が、Henderson-Hasselbach方程式によって推定される様式で生じ得る。

【0139】

本発明のリポソーム組成物は、標準的な方法に従って被験体に投与され得る。好ましくは、リポソーム組成物の薬学的組成物は、非経口的（すなわち、腹腔内、静脈内、皮下または筋肉内）で投与される。より好ましくは、この薬学的組成物は、定常的な注入によって静脈内に投与される。本発明の使用に適切な処方物は、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 第17版(1985)に見出される。この薬学的組成物は、例えば、種々の状態を診断するために、または疾患状態を処置するために使用され得る。疾患としては、慢性関節リウマチと関連する炎症、虚血後の白血球媒介性組織損傷（再灌流、傷害）、急性白血病媒介性肺傷害（例えば、成人呼吸促進症候群）、敗血症性ショック、ならびに急性炎症および慢性炎症（アトピー性皮膚炎および乾癬を含む）が挙げられるがこれらに限定されない。さらに、種々の新形成および腫瘍転移が、処置され得る。

【0140】

好ましくは、薬学的組成物が、静脈内に投与される。従って、本発明は、受容可能なキャリア、好ましくは水性キャリア中に再懸濁したリポソームの溶液を含む、静脈内投与のための組成物を提供する。種々の水性キャリア（例えば、水、緩衝化水、0.9%等張性生理学的食塩水など）が、使用され得る。これらの組成物は、従来の周知の滅菌技術によって滅菌され得るか、または滅菌濾過され得る。得られる水溶液は、それ自体、使用のために包装され得るか、または凍結乾燥され得、この凍結乾燥された調製物は、投与前に滅菌水溶液と組み合わされる。この組成物は、生理学的条件下に近づけるために必要とされる

10

20

30

40

50

場合には、薬学的に受容可能な補助物質（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、塩化カルシウム、ソルビタンモノラウレート、トリエタノールアミンオレートなどのようなpH調節剤および緩衝化剤、張度調節剤、潤滑剤など）を含み得る。

【0141】

薬学的処方物中の活性成分の濃度は、広範に（約0.05重量%未満、通常は、または少なくとも約2~5重量%から10~30重量%程度まで）変動し得、そして選択される投与の特定の様式に従って、流体の容量、粘度などによって主に選択される。診断については、投与される組成物の量は、使用される特定の標識（すなわち、放射性同位体、蛍光標識など）に依存しする。この疾患状態は、診断され、そして臨床医が判定する。

10

【0142】

以下の実施例は、本発明を例示するために示されるが、本発明を制限するために示されない。

【0143】

（実施例）

（I. 実施例I）

（A. 一般的な概説）

遠位カチオン性ポリ（エチレングリコール）-脂質結合体（CPL）を設計し、合成し、そして細胞性取り込みを増強するために従来のリポソームおよびステルスリポソーム中に取り込ませた。本発明のアプローチは、不活性な化合物、非毒性化合物または天然に存在する化合物のいずれかを、CPL合成のための成分として使用する。CPLを、以下の構築上の特性を備えるように合成した：1) リポソーム二重層中にCPLを取り込むためのDSPEの疎水性脂質アンカー；2) カチオン性ヘッド基に脂質アンカーを連結するためのポリエチレングリコールの親水性スペーサー；および3) 天然に存在するアミノ酸（L-リジン）を使用してプロトン化可能なカチオン性ヘッド基を生成した。多くの荷電アミノ基は、CPL合成の間に制御され得る。DSPE-CPLは、水和押出し（hydration-extrusion）方法によりリポソーム二重層にほとんど定量的に取り込まれることが実証された。かなり驚くべきことに、インビトロモデルにおいて、好ましくは4以上の電荷を有する、遠位で正に荷電したポリマー結合体を保有するリポソームが、宿主細胞表面に効率的に結合し、そして哺乳動物細胞における細胞性取り込み増強することが、初めて確認された。

20

【0144】

（B. 材料および方法）

（1. 略語）DSPE（ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン）；DSPC（1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン；DSPE-P EG₂₀₀₀（1,2-ジステアロイル-3-ホスファチジルエタノールアミン-P EG₂₀₀₀）；TFA（トリフルオロ酢酸）；CPL（カチオン性ポリ（エチレングリコール）-脂質結合体）；DSPE-CPL（カチオン性ポリエチレングリコール）-DSPE結合体）；DSPE-CPL-1（1つの正電荷を有するDSPE-CPL）；DSPE-CPL-2（2つの正電荷を有するDSPE-CPL）；DSPE-CPL-4（4つの正電荷を有するDSPE-CPL）；DSPE-CPL-8（8つの正電荷を有するDSPE-CPL）；Rh-PE（またはRh o - PE）（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-（リサミンローダミンBスルホニル）。

30

【0145】

（2. 化学物質）t-Boc-NH-P EG₃₄₀₀CO₂NHSを、Shearwater Polymers, Inc (Huntsville, AL) から入手した。N,N-ジ-t-Boc-L-リジンN-ヒドロキシスクシニドエステル、トリエチルアミンおよびコレステロールを、Sigma-Aldrich Canada Ltd (Oakville, ON) から入手した。トリフルオロ酢酸、エチルエーテルおよびクロロホルムを、Fischer Scientific (Fair Lawn, NJ) から入手した。

40

50

1, 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミンおよび 1, 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリンを、 Avanti Polar Lipids, Inc (Alabaster, AL) から入手した。1, 2 - ジステアロイル - 3 - ホスファチジルエタノールアミン - PEG₂₀₀₀を、 Genzyme (Cambridge, MA) から入手した。

【0146】

(3. DSPE - CPL - 1 の合成) 45 にて、 DSPE (121 mg, 161 mmol) および Et₃N (200 μL) の CHCl₃ (2 mL) 中に、 t - Boc - NH - PEG₃₄₀₀ - CO₂NHS (500 mg, 147 μmol (2 mL 乾燥 CHCl₃ 中)) を加えて、そしてこの溶液を、周囲温度にて 3 時間攪拌した。この溶液を、窒素流の下で濃縮して乾燥させた。この残渣を、 TLC 上の DSPE スポットが消失するまで、ジエチルエーテルを含むクロロホルム混合溶液にて繰り返し沈殿させることによって精製した。この精製 DSPE - PEG 結合体を、 2 mL CHCl₃ に溶解して、続いて 2 mL の TFA を添加して、そしてこの反応溶液を、室温で 4 時間攪拌した。この溶液を再度、窒素流の下で濃縮して乾燥させた。この残渣を、ジエチルエーテルを含むクロロホルム混合溶液で繰り返し沈殿させることによって精製して、プロトン化可能な 1 つのカチオン性ヘッド基を有する DSPE - CPL - 1 として DSPE - PEG - NH₂を得た (収量 500 mg (120 μmol, 80%); R_f 0.4 (CHCl₃ / MeOH, 9/1, v/v)) ; ホスホリル - 脂質アンカーおよび遠位一級アミンの比率を、ホスフェートおよびフルオレスカミンアッセイならびに¹H NMR によって測定した。

【0147】

(4. DSPE - CPL - 2、 DSPE - CPL - 4 および DSPE - CPL - 8 の合成についての一般的な手順 (模式については図 2 を参照のこと)) DSPE - CPL - 1 (250 mg, 60 μmol) および Et₃N (200 μL) の CHCl₃ (2 mL) 溶液に、 N,N - デ - t - Boc - L - リジン N - ヒドロキシスクシニドエステル (50 mg, 113 mol (2 mL 乾燥 CHCl₃ 中)) を添加して、そしてこの溶液を、周囲温度で 3 時間攪拌した。ニンヒドリン可視化による TLC 上の陽性のアミン活性スポットの消失により、この反応が終了したことが示された。この溶液を、窒素流の下で濃縮して乾燥させた。この残渣を、 TLC 上の t - Boc - リジンスポットが消失するまで、ジエチルエーテルを含むクロロホルム混合溶液にて繰り返し沈殿させることによって精製した。この精製 DSPE - PEG 結合体を、 2 mL CHCl₃ に溶解して、続いて 2 mL の TFA を添加して、そしてこの反応溶液を、室温で 4 時間攪拌した。この溶液を再度、窒素流の下で濃縮して乾燥させた。この残渣を、ジエチルエーテルを含むクロロホルム混合溶液で繰り返し沈殿させることによって精製して、 DSPE - CPL 2 を得た (収量 250 mg (57 μmol, 95%); R_f 0.4 (CHCl₃ / MeOH, 9/1, v/v)) ; ホスホリル - 脂質アンカーおよび遠位一級アミンの比率を、ホスフェートおよびフルオレスカミンアッセイによって測定した。 DSPE - CPL - 4 および DSPE - CPL - 8 を、同様の様式で合成した。

【0148】

(5. 大きな単層小胞の調製) 大きな単層小胞 (LUV) を、 Hope らにより記載されるように (Hope, M. J. ら (1985) Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochim. Biophys. Acta.* 812, 55 ~ 65 を参照のこと)、押出しによって調製した。クロロホルム中に微量の Rh - PE を含む、 DSPE - CPL (表 3 に示されるような) を含むか、または含まない適切な量の脂質混合物 (DSPC / Chol, 60 : 40 mol/mol) を、窒素気体流の下で乾燥させ、均質な脂質フィルムを形成させた。次いで、微量の溶媒を、減圧下で一晩除去した。この脂質フィルムを、ボルテックスにより混

10

20

30

40

50

合することによって、HPTS (50 mM) を含むかまたは含まないHBS緩衝液 (pH 9.5) 中で水和させた。得られた多層小胞 (MLV) を、押し出しデバイス (Lipex Biomembranes, Inc., Vancouver, BC, Canada) を用いて2つの積み重なった100 nmポリカーボネットフィルター (Nuclepore) を通じて65で10回押し出した。取り込まれていないDSPE-CPLおよびいくつかの場合には捕捉されていない遊離HPTSを、HBS緩衝液で平衡化した1.1×20 cm Sepharose CL-6Bカラム (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) を使用してクロマトグラフィーによって除去した。

【0149】

10

(6. リポソームのサイズの決定) リポソームのサイズを、Nicomp 370サブミクロン粒子サイザー (submicron particle sizer) (Santa Barbara, CA) を使用して、準弾性 (quasi-elastic) 光散乱 (QELS) により決定した。

【0150】

(C. 結果および考察)

本実施例は、遠位で正に荷電したカチオン性ポリマー脂質結合体 (CPL) を取り込んだリポソームの細胞性取り込みを増強するために、CPLを合成し、そしてその効率を評価するために実施された。本発明のアプローチは、CPL合成のための化合物として、不活性で非毒性かつ天然に存在する化合物 (例えば、アミノ酸) を使用する。いくつかのCPLを、以下の構築上の特性を有するように設計した: 1) リポソーム二重層中にCPLを取り込むためのDSPEの疎水性脂質アンカー; 2) カチオン性ヘッド基に脂質アンカーを連結するためのポリエチレングリコールの親水性スペーサー; および3) カチオン性ヘッド基。さらに、カチオン性基の量および性質を、最終的な適用に従って変化し得る。本実施例では、天然に存在するアミノ酸であるL-リジンを使用して、プロトン化可能なアミノ基を生成した。アミノ基の数を、CPL合成の間に制御し得る。

20

【0151】

これらの化合物の分析において、これらの細胞取り込みエンハンサーにおける構造-機能の関係を、同定し得る。最初の工程として、異なる量の電荷を有する種々のこれらのCPLを、取り込みを増強するそれらの能力についてスクリーニングした (図5~7を参照のこと)。さらに、合成されたCPLの物理化学特性およびこれらのCPLがリポソーム二重層に取り込まれる能力もまた、研究した (表1~3および図5~7を参照のこと)。インビトロモデルにおいて、これらの遠位で荷電したポリマー結合体は、哺乳動物細胞においてリポソーム取り込みを有意に増強することが確認された。

30

【0152】

【表1】

表1. カチオン性CPLの物理化学特性

サンプル	NH ₂ /Pの比率
DSPE-CPL-1	0.98
DSPE-CPL-2	2.05
DSPE-CPL-4	3.96
DSPE-CPL-8	7.88

40

【0153】

【表2】

表2. CPL-リポソームについてのpH勾配

サンプル	脂質の組成	Δ pH
1	DSPC/Ch (60:40)	1.84
2	DSPC/Ch/CPL-4 (57.5:40:2.5)	1.11
3	DSPC/Ch/CPL-8 (57.5:40:2.5)	0.85
4	DSPC/Ch/PEG-PE (54:40:6)	1.59
5	DSPC/Ch/PEG-PE/CPL-4 (54:40:2:4)	1.01
6	DSPC/Ch/PEG-PE/CPL-8 (54:40:2:4)	1.13

【0154】

【表3】

表3. CPLを取り込んだリポソームおよびそれらの特性

脂質の組成	サイズ (nm)	CPLの取り込み (%)
1, DSPC/Ch(60:40)	110	-
2, DSPC/Ch/CPL-1(57.5:40:2.5)	120	98.5
3, DSPC/Ch/CPL-2(57.5:40:2.5)	122	94.5
4, DSPC/Ch/CPL-4(57.5:40:2.5)	122	98.1
5, DSPC/Ch/CPL-8(57.5:40:2.5)	122	97.6
6, DSPC/Ch/CPL-1(55:40:5)	120	98.5
7, DSPC/Ch/CPL-2(55:40:5)	122	94.5
8, DSPC/Ch/CPL-4(55:40:5)	122	98.1
9, DSPC/Ch/CPL-8(55:40:5)	122	97.6
10, DSPC/Ch/PEG-PE(54:40:6)	128	-
11, DSPC/Ch/PEG-PE/CPL-1(54:40:2:4)	130	96.7
12, DSPC/Ch/PEG-PE/CPL-2(54:40:2:4)	130	101
13, DSPC/Ch/PEG-PE/CPL-4(54:40:2:4)	130	104
14, DSPC/Ch/PEG-PE/CPL-8(54:40:2:4)	130	110
15, DSPC/Ch(60:40)	110	-
16, DSPC/Ch/CPL-4(57.5:40:2.5)	120	98.5
17, DSPC/Ch/CPL-8(57.5:40:2.5)	122	94.5
18, DSPC/Ch/PEG-PE(54:40:6)	128	-
19, DSPC/Ch/PEG-PE/CPL-4(54:40:2:4)	130	96.7
20, DSPC/Ch/PEG-PE/CPL-8(54:40:2:4)	130	101

(II. 実施例II)

本実施例は、CPL₄を含むLUVが界面活性剤での透析方法によって形成され得ることを例示する。

【0155】

LUVは、DOPPE、DODAC、PEG-Cer-C20、およびCPL₄[3.4K](またはCPL₄[1K])を含む。最初の脂質(4mol%)を含むCPLを含有する2つの調製物を、作製した。

【0156】

【表4】

10

20

30

40

表4

脂質	モル%
DODAC	6
DOPE	79.5
CPL ₄	4
PC-C20	10
Rho-PE	0.5

10

上記の脂質を、クロロホルム中に一緒に溶解した。次いで、これを、窒素下で、続いて高い減圧下で2時間、除去した。次いで、乾燥脂質混合物（合計10μmol）を、83μLの1M OG Pおよび1mL Hepes緩衝化生理食塩水（20mM Hepes 150mM NaCl pH 7.5）中で、全ての脂質が界面活性剤溶液中に溶解するまで、ボルテックスしながら60で水和させた。

【0157】

この脂質-界面活性剤混合物を、Slide-A-Lyzer透析カセットに移して、そして少なくとも2LのHBSに対して48時間透析した（ここでそのときに、緩衝液を少なくとも2回交換した）。透析による界面活性剤の除去は、LUVの形成を生じた。全てのCPLが透析後にLUV中に取り込まれたか否かを決定するために、この脂質サンプルを、Sepharose CL-4Bカラムにて分画した（図8Aおよび8Bを参照のこと）。この分画プロフィールは、CPL₄[3.4K]またはCPL₄[1K]のいずれかとともに形成されたLUVを示す。

20

【0158】

LUV画分（画分7~10）におけるCPLの最終濃度を、初期のおよび最終的なダンシル/ローダミンの比率から、およびLUVピークに存在する全体的なダンシルおよびローダミンの蛍光の割合の見積もりから評価した。本質的に同一の結果を得た。

【0159】

初期のCPL濃度の増大の効果を試験するために、以下の割合を有するサンプルを作製した：

30

【0160】

【表5】

表5

脂質	モル%
DODAC	6
DOPE	71.5
CPL4	12
PC-C20	10
· Rho-PE	0.5

40

このサンプルの画分についてのカラムプロフィールを、図8Cに示す。全ての3つのサンプルについての結果を、以下に示す：

【0161】

【表6】

表6

サンプル	最初のCPLモル%	挿入%	最終的なCPLモル%
図8A	4	64.6	2.6
図8B	4	82.8	3.3
図8C	12	50.9	6.1

10

(結論) CPL₄を含むLUVを、界面活性剤での透析により形成し得る。全てのCPL₄が、小胞中に取り込まれるわけではなく、そして取り込まれる割合は、初期のCPL/脂質のモル比が増加するに従って減少する。本発明の場合には、4 mol% CPLで開始すると、約3 mol%が、LUVに取り込まれた。12 mol%の初期CPL含量については、6 mol%の最終的な含量が達成された。CPL₄[1K]の挙動が、CPL₄[3.4K]の挙動と非常に類似することに留意する価値がある。これはまた、挿入後研究でも当てはまる。特定の場合では、親水性スペーサーの理想的な長さにより、代表的には、リポソームの増大した循環寿命に対してステルス特性を提供するように使用されている通常の中性PEGよりも短い距離にて、リポソーム表面からカチオン性基が伸びることが可能される。

20

【0162】

(III. 実施例III)

(A. 総論)

本実施例では、予め形成された小胞中に正に荷電した脂質分子を取り込ませることによって、リポソームと細胞との間の静電的誘引力が増加することに関する非特異的標的化アプローチが、記載される。このアプローチは、BHK細胞において、インビトロでの細胞結合/取り込みにおいて劇的な増加を導く。この方法論は、中性小胞に、および脂質ベースの遺伝子キャリアの構築に使用される脂質から構成される小胞において機能することが実証される。従って、本明細書中に概略されるアプローチは、従来の薬物送達から遺伝子治療の範囲にある多くの適用を有する。

30

【0163】

(B. 材料および方法)

(1. 材料) 1,2-ジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)、1,2-ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)、および1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-(リサミンローダミンBスルホニル)(ローダミン-PE)を、Avanti Polar Lipidsから入手した。コレステロールを、Sigma Chemical Co.から入手した。DODACおよびPEG Cer C20、PEG Cer C14およびPEG Cer C8は、Inex Pharmaceuticalsから惜しみなく与えられた贈り物であった。

40

【0164】

(2. カチオン性PEG脂質の合成) : CPLの合成の詳細を、本明細書中で記載する。2つの型のCPLを、合成し、これは、分子の脂質アンカー(anchor)部分において異なる。1つにおいて、このアンカーは、ジステアロイルグリセロール(DSG)であり、一方で他方のアンカーは、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(DSPE)を含む。この分子は、アンカー部分からなり、これにPEG₃₄₀₀鎖が結合される。PEG鎖の末端において、荷電した「ヘッド基」が結合され、しばしば、一緒に結合されたリジン残基で作成される。ヘッド基領域を修飾ことによって、CPLを、合成し、これは、1(モノまたはM)、2(ジまたはD)、3(トリまたはT)および4(クオードまたはQ)正電荷を含有した。いくらかの異なるクオードCPLを合成し、それ故に、これらに、Q1~Q5と番号をつけた。これらの化合物を記載するためを選択された命名法は、

50

脂質アンカーの型をおよびヘッド基（例えば、d - D S P E - C P L - Q 5 ）の同一性を特定化する。この低い場合の「d」は、ダンシル化誘導体を示す。

【0165】

(3. 界面活性剤透析法によるベシクルの調製) 一般的に、ベシクルは、界面活性剤方法を用いて形成された (Wheeler, J. J. ら (1999) *Stabilized plasmid-lipid particles: construction and characterization. Gene Therapy* 6, 271 - 281 (この教示は、本明細書中で参考として援用される))。実施例 II に記載されるような脂質を、適切な比でクロロホルム中で相互溶解し、その後、このクロロホルムを、窒素流のもとで除去しあつ高真空下で 2 時間配置した。次いで、非イオン性界面活性剤オクチルグルコピラノシド (OGP) のアリコート (水中 1 M) を乾燥脂質フィルムを得るまで添加し、60 にて頻繁に渦をたてて 10 ~ 20 分間インキュベートした。これに、続いて、20 mM HEPES 150 mM NaCl (pH 7.5) を添加し、さらに温め、そしてすべての脂質が分散しあつ透明な溶液が得られるまで渦をたてた。脂質の 20 mg について、0.125 mL の OGP および 1 mL の HBS を使用した。次いで、この脂質 - 界面活性剤溶液 (1 ~ 2 mL) を Slide - A - Lyzer 透析膜 (3 mL 容量) に移し、そして室温にて HBS に対して 48 時間かけて徹底的に透析した。一般的に、HBS の全量 8 ~ 10 L をサンプル容量 1 ~ 8 mL に対して使用した (2 L の 4 ~ 5 变化)。

【0166】

DOPC および DOPC / Chol (55 : 45) のベシクルを、前述で記載の通りの押出によって調製された (Hope, M. J. ら (1985) *Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. Biochim. Biophys. Acta* 812, 55 - 65)。

【0167】

(4. カチオン性 PEG 脂質の予め形成されたベシクルへの挿入) カチオン性 PEG 脂質 (CPL) を、HBS 中または少ない場合において、メタノール中でミセル溶液として貯蔵した。CPL およびベシクルを合わせ、所望のモル比 (ベシクル脂質に対して 11.6 mol %までの CPL) を得、そして所望の温度で所与時間インキュベートした。たいていの挿入について、標準条件は、60 にて 3 時間のインキュベートを含む。挿入の後、このサンプルを氷上で冷却し、そして CPL - LUV を HBS 中で平衡になった Sephadex CL - 4B のカラム (1.5 cm x 15 cm) を通過させることによって遊離 CPL から単離した。図 16 は、SPLP (類似の手順) についての挿入プロトコルを図示する。

【0168】

CPL の挿入レベルを、蛍光によって測定した。すべての場合において、このベシクルは、0.25 mol % ローダミン - PE または 0.5 mol % のローダミン - PE のいずれかを含有し、そして CPL は、ダンシル基を含有した。CPL および脂質を組み合わせた後、15 μL のアリコート (最初のフラクション) を、分析のために傍らに置いた。次いで、ベシクルに挿入された CPL の量を、最初のダンシル / ローダミン (D / R) 蛍光比を測定し、そして単離された CPL - LUV の D / R 比を測定することによって定量化した。蛍光パラメータ：ローダミンアッセイについて、励起波長は 560 nm であり、そして発光波長は、590 nm であった。ダンシルアッセイについて、励起波長は、340 nm であり、そして発光波長は、510 nm であった。一般的に、励起および発光スリット幅は、それぞれ 10 および 20 nm であった。このアッセイを、以下のように実施した：最初のサンプル (2 ~ 3 μL) または CPL - LUV (20 ~ 40 μL) のアリコートに、30 μL の 10 % Triton X - 100 を添加し、続いて、2 mL の HBS を添加した。ダンシルおよびローダミン標識の両方の蛍光レベルを、410 nm の発光フィルタ

10

20

30

40

50

ーを用いて上記のパラメータあたりとして、波長プログラムを用いて連続的に読んだ。%挿入を以下のように計算した：

【0169】

【化18】

$$\% \text{ 挿入 } = ([D/R]_{\text{CPL-LUV}}) * 100 / [D/R]_{\text{初期}}$$

10

(5. 脂質濃度の測定)：挿入後、細胞結合研究のために各サンプルの脂質濃度を知ることが必要である。これを、蛍光によってすばやく行い得る。界面活性剤透析の後、各サンプルの脂質濃度を、標準ホスフェートアッセイ (Fiske, C. H. および Subbarow, Y. (1995) The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66, 375-400) を用いて測定した。次いで、アリコートを、およそ 3 mM まで希釈した。このサンプルのローダミン蛍光を比較することによって、この脂質濃度は、公知であり、CPL-LUV は、そのストックから調製され、CPL-LUV 濃度の決定を可能にする。LUV の脂質濃度を、標準ホスフェートアッセイを用いて測定した。CPL 挿入の後、脂質濃度をローダミン蛍光から細胞結合研究のために評価した。

20

【0170】

(6. BHK 細胞による CPL 含有 LUV の摂取) よりも 10⁵ BHK 細胞を、(1) CPL なし、(2) 8% DSPE-CPL-D、(3) 7% DSPE-CPL-T1、または(4) 4% DSPE-CPL-Q5 のいずれかを含有する 20 nmol の DOPPE/DODAC/PEG Cer C20 (84/6/10) LUV で、PBS/CMG 培地においてインキュベートした。インキュベーションを 4 および 37 にて 1、2、4 および 6 時間実行し、前者は細胞結合の評価を所与しそして後者は、結合および摂取の評価を所与した。2 つの値の違いを考慮することによって、37 での脂質摂取の評価を得た。各時点において、細胞を破裂させ、そして脂質およびタンパク質についてアッセイした。脂質濃度を、ローダミン蛍光から測定する一方で、タンパク質を BCA アッセイを用いて決定した。脂質濃度をローダミン蛍光を用いて測定する一方で、タンパク質を Pierce から得た BCA アッセイキットを用いて決定した。

30

【0171】

(C. 結果および議論)

(1. 挿入プロトコルの発達) ミセル凝集体からベシクルまでのペグ化脂質の移動は、以前に記載されてきた (Uster, P. S. ら (1996) Insertion of poly(ethylene glycol) derivatized phospholipid into preformed liposomes results in prolonged in vivo circulation time. *FEBS Letters* 386, 243-246; Zalipsky, S ら (1997) poly(ethylene glycol)-grafted liposomes with oligopeptide or oligosaccharide ligands appended to the termini of the polymer chains. *Bioconjugate Chem.* 8, 111-118 を参照のこと)。この概念を DSPE-CPL を用いて試験した。これを DOPCLUV について

40

50

て図9(A)中に実証する。ダンシルおよびローダミン標識の相互溶出は、LUVにおけるCPLの組み込みを実証する。この場合において、CPLの84%は、LUVに組み込まれ、従って、遊離のCPLのトレースのみが、CPL-LUVフラクションの跡を引くと観測された。これは、より明確には、図8(B)中に示され、ここで、DSPE-CPL-Q5は、DOPE/DODAC/PEGCerC20(84/6/10)で構成されるより複雑に正に帯電したベシクルに挿入した。ここで、およそ9mLsにおける2つの蛍光標識の相互溶出は、CPLのベシクルへの70%挿入を実証する。広範なピークにおける遊離のCPL溶出物は、16mLsに中心があり、ベシクルのピークから分離され、CPL-LUVの簡単な単離を可能にする。一旦挿入されると、DSPE-CPL-Q5を、維持し、そしてベシクルから交換しない。図9(B)からのCPL-LUVフラクションを、Sephadose CL-4Bのカラム上で再溶出した。図9(C)に示されるように、CPLのすべては、LUVと一緒に残る。

【0172】

インキュベーション温度および挿入プロセスにおける時間の効果は、図10中に示される。DSPE-CPL-Q1を、室温、40および60にてDOPE/DODAC/PEGCerC20(84/6/10)の存在下で、1、3、および6時間で回収されたアリコートを用いてインキュベートした。最も高い挿入レベルを、60で達成し、従って、これをその後の挿入において使用した。わずかにより高い挿入を、6時間にて得、本発明者らは、3時間を選択しサンプル分解を最小にした。

【0173】

時間および温度は別にして、最終のCPL挿入レベルにおける最も良好な蛍光を有するパラメータは、最初のCPL/脂質比である。約70%挿入を想定することにより、1、2、4、6、8および12mol%CPLを含有するCPL-LUVを達成する目的で、一連のインキュベーションを0.011~0.14の間で変化するCPL/脂質モル比で実行した。これらの結果を図11中に示し、ここで、挿入レベルは、最初のCPL/脂質比の0.95までほぼ70%残っており、これより上は、CPL/脂質=0.14について50%に落ちる。

【0174】

同様の結果を、他のベシクルシステム(DOPE/DODAC/PEGCerC14およびDOPE/DODAC/PEGCerC8を含む)について得た。一般的に、DODA-C含有サンプルで得た挿入レベルは、最初のCPL/脂質<0.1について70~80%の範囲であった。この挿入レベルがカチオン性脂質の存在によって行われるか否かを理解するために、いくらかの実験をDOPC含有中性ベシクルにおいて実行した。実験した組成物は、以下：(1)DOPC、(2)DOPC/Chol、(3)DOPC/PEGCerC20、および(4)DOPC/Chol/PEGCerC20であった。この結果(図12中に示される)は、DSPE-CPL-Q1について、挿入しない何かが中性システムにおいて：45~65%の間で達成したことを明らかにする。これは、負に帯電したDSPEアンカーと膜表面との間の減少した引力に起因し得る。それにもかかわらず、結果は、有意な挿入が中性ベシクルおよび正ベシクルの両方について達成され得ることを実証する。

【0175】

図13中に示される、DSPE-CPL-Q5についての挿入レベルはまた、Q1(70~84%)よりもより高いことが示されるべきである。これらのシステムにおいて、Q1およびQ5 CPLの異なる性質の理由のためである。以前の実験においては、それらは、非常に類似の挙動を示した。Q5のこの特定のバッチを、メタノール中で調製し、この溶媒中で、脂質は、より良好な貯蔵安定性を示し得る。本明細書中で説明される場合、インキュベーション混合物におけるメタノールの存在は、より高い挿入へ導くことを見出した。

【0176】

多くの挿入を、Q5およびQ1に加えて他のCPLを用いて実行した。これらの結果を、

10

20

30

40

50

表7および8(図23および24)中にまとめ、ここで、いくらかの組成物依存傾向が確かめら得る。第1に、同じ傾向が、図11の上に示され、Q5は、異なる電荷を有する幾らかのCPLについて維持する。CPL/脂質の最初の比を増大するが、挿入されたCPLの百分率は、減少する。T1、Q1およびQ5インキュベーション(CPL/脂質=0.022~0.024)を参照すると、%挿入は、76~80%の範囲である。しかし、CPL/脂質=0.086~0.095について、%挿入の範囲は、62~68%に減少する。

【0177】

別の傾向が、図13中に示される。最初のCPL/脂質比>0.04について、わずかなCPL-Q1が、より短い鎖PEGのいずれかを含有するLUVよりもPEG-Cer-C20を含有するLUVに挿入される。PEGアンカーの型の存在することに加えて、PEG-Cer-C20含量が、4~10mol%に増大される場合、CPL-Q5の挿入レベルは、71~62%になる。

10

【0178】

当業者は容易に理解するけれども、脂質アンカーは、変化され得、そして挿入レベルは、脂質アンカーとして使用される脂質に依存して変化し得る。例えば、幾らかの実験をDSG(ジステアロイルグリセロール)アンカーを含有するCPLを用いて実行した：すべての場合において、挿入レベルは、より低く、DSPEアンカーを含有するCPLにおいてよりも17~40%であった。本発明の方法およびアッセイを用いて、当業者は適切な脂質アンカーを用意に同定し得る。

20

【0179】

CPL挿入後の起こり得る凝集を調べるために、準弾性光散乱(QELS)を使用して、粒子直径における挿入の効果を実験した。DOPE/DODAC/PEG/Cer-C20ベシクルは、 119 ± 39 nmの直径を有すると見出した。1.8mol%のCPL4bの挿入後、およそ 135 ± 42 nmまでの直径のわずかな増大を観測したが、平均直径および標準偏差の両方は、7mol%のCPLまで一定のままであった。 120 nm~ 135 nmの増大は、わずかにより大きい直径がより長いCPL-PEG鎖の存在を生じることを反映し得るか、またはベシクル凝集の少量を示し得る。これらの2つの間の可能性を区別するために、CPL-LUVを、ローダミンフィルターを用いて蛍光顕微鏡によって実験した。コントロールLUVが凝集の兆候を示さない一方で、有意なレベルを、CPL-LUVについて観測した。しかし、40 mM CaCl_2 の添加により、この効果は完全に妨げられると見出した。

30

【0180】

Materials & Methodsに記載される通りに、PBS/CMG上でインキュベートされたBHK細胞上の種々にCPL-LUVの摂取についての評価を得た。このデータは、図15中に示され、CPLにおける正電荷の存在は、BHK細胞による摂取の有意な増大へ導き得ることを明らかにした。DOPE/DODAC/PEG Cer C20で構成されるLUV(従ってネット正電荷を示す)は、BHK細胞上の摂取をほとんど示さなかった。8mol%のDSPE-CPL-Dを含有するLUVは、同様の低い摂取値を示した。摂取は、7mol%のDSPE-CPL-T1の存在によりほんのわずかに増大された。しかし、摂取におけるわずかな増大は、ほんの4.1mol%で存在するDSPE-CPL-Q5について実現された。幾らかの点をこのデータからまとめることができる。LUV表面からのいくらかの距離において存在する正電荷の増大は、摂取の増大へ導くことが明らかになる一方で、増大された細胞結合における役割を果たす総電荷単独ではない。DSPE-CPL-DサンプルおよびDSPE-CPL-Q5サンプルに存在する正電荷の量は、およそ等しいが、そして前者は、後者と比べて結合をほとんど示さない。DSPE-CPL-T1サンプルは、DSPE-CPL-Q5サンプルより大きい正電荷を有し、そしてさらに1/3摂取のみを示す。CPL分子の遠位末端における十分な正電荷密度の局在化は、細胞との相互作用を確実にする際に重要なパラメータである。好ましい

40

50

実施形態において、少なくとも4つの電荷を使用して、有効な細胞結合を達成する。

【0181】

BHK細胞へのLUVの結合におけるCPL挿入の劇的な効果は、蛍光顕微鏡を用いて最も明確に視覚化される。CPLの不在下で、DOPE/DODAC/PEG-Cer-C20で構成され、そしてローダミン-PEを含有するベシクルは、細胞への結合をほとんど示さない。3mol% CPL4bの組み込みは、高レベルのベシクル結合および摂取へ導く。多くの脂質は、細胞表面に結合すると思われるけれども、いくらかの小さな点状構造が示され、ベシクルの摂取がまた、生じていることを示す。注意すべき重要な点は、細胞がCPL-LUVの存在下でインキュベーション後正常に出現することである。反対に、DNAカチオン性脂質錯体は、公知であり、有意な毒性を示す。

10

【0182】

リポソーム薬物送達において主要なハードルまたは残りのハードルの1つは、キャリアシステムの内容物が摂取され、そして特定の標的細胞によって利用されることを確実にする方法の問題である。リポソームの細胞摂取は、細胞表面における吸収または結合、続いてエンドサイトーシスを含むと、今や考えられる。従って、細胞結合を妨害する要因は、低レベルの細胞内送達へ導く。これは、親水性ポリマー（例えば、PEG）の表面層で覆われる「ステルス」または長循環性のリポソームについて特に重要である。長循環性の寿命（血清タンパク質との相互作用を妨げる滅菌バリアの形成）を示す、非常に特徴的なPEGコーティングはまた、細胞との相互作用を最小にする。他方では、表面結合を増強する要因は、増大した細胞摂取へ導くと予期され得る。1つのアプローチは、膜レセプターに特異的な分子をリポソーム表面に付着させることを含む。起こり得る候補としては、オリゴペプチド（Zalipskyら、Bioconjugate Chemistry 6, 705-708 (1995)；Zalipskyら、Bioconjugate Chemistry 8, 111-118 (1997)を参照のこと）オリゴ糖（Zalipskyら、Bioconjugate Chemistry 8, 111-118 (1997)を参照のこと）、葉酸（Gabizonら、Bioconjugate Chemistry 10, 289-298 (1999)；Leeら、Journal of Biological Chemistry 269, 3198-3204 (1994)；Reddyら、Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier System 15, 587-627 (1998)；Wangら、Journal of Controlled Release, 53, 39-48 (1998)を参照のこと）、リボフラビン（Holladayら、Biochimica et Biophysica Acta 1426, 195-204 (1999)を参照のこと）、または抗体（Mayerら、Journal of Biological Chemistry 273, 15621-15627 (1998)；kaoら、Cancer Gene Therapy 3, 250-256 (1996)；Hansenら、Biochimica et Biophysica Acta 1239, 133-144 (1995)を参照のこと）が挙げられる。代替のアプローチは、リポソームの電荷特徴づけを修飾することである。リポソームにおける、負電荷（Millerら、Biochemistry 37, 12875-12883 (1998)；Allenら、Biochimica et Biophysica Acta 1061, 56-64 (1991)；Leeら、Biochemistry 32, 889-899 (1993)；Leeら、Biochimica et Biophysica Acta 1103, 185-197 (1992)を参照のこと）または正電荷（Millerら、Biochemistry 37, 12875-12883 (1998)を参照のこと）のいずれかの封入が、増強された細胞摂取へ導き得ることは、周知である。カチオン性DNA-脂質複合体（有効なインビトロトランスフェクト薬剤（Felgnerら、Nature 337, 387-388 (1989)；Felgnerら、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 84, 7413-7415 (1987)を参照のこと））

20

30

40

50

7 (1 9 8 7) ; Kao ら、Cancer Gene Therapy 3 2 5 0 - 2 5 6 (1 9 9 6) ; Felgner ら、Annals of the New York Academy of Sciences 772, 126 - 139 (1 9 9 5) ; Arnagin ら、Nucleic Acid Research 20, 4205 - 4 2 1 1 (1 9 9 2) を参照のこと)) は、エンドサイトーシスを介して摂取される。

【 0 1 8 3 】

本実施例は、リポソームと細胞との相互作用を増強するための新規のアプローチ、細胞内送達を可能にする非ウイルス性システムの発展における必要な工程を記載する。このアプローチは、新規のカチオン性 PEG 脂質を予め形成されたリポソームへ挿入し、細胞相互作用に含まれる正電荷が、ベシクル表面からいくらか離れて位置するカチオン性ベシクルに導くことを含む。このプロセスは、DOPPE、カチオン性脂質 DODAC, および PEG - Cer - C20 で構成される立体的に安定化した LUV への CPL の挿入について、図 16 中に例示される。この脂質組成物は、2 つの理由のために研究に選択される。第 1 に、それは、正に帯電した DODAC (Wheeler ら、Gene Therapy 6, 271 - 281 (1 9 9 9) が存在するという長所によって、小さな小胞構造内のプラスミド DNA の有効な包括を可能にし、従って、遺伝子送達システム (以下参照) としての潜在性を有する。第 2 に、この組成物は、PEG 脂質を含む多くの立体的に安定化した薬物送達システムの代表である。CPL の挿入は、表面 PEG 層上の正電荷の局在化へ導き、それによって CPL と細胞表面との間の静電気的相互作用を可能にする。これは、従来のリポソームおよび PEG 含有リポソームの両方について細胞相互作用の増加に導く。

【 0 1 8 4 】

CPL は、DSPPE の結合体、ダンシル - リジン部分、親水性ポリマー PEG₃₄₀₀、およびモノまたは多価カチオン性ヘッド基である。PEG は、スペーサーとして機能し、脂質アンカーおよびベシクル表面から帯電したヘッド基を分離する。様々な中性およびカチオン性 LUV のミセル CPL を用いるインキュベーションは、外部ベシクル単層 (図 23 および 24 中の表を参照のこと) における CPL の 6 ~ 7 mol % (総ベシクル脂質に比較して) までの取り込みを生じた。この挿入の有効性は、かなり高く、そして 70 ~ 80 % の添加された CPL が LUV に取りこまれる (図 23 および 24 中の表を参照のこと)。CPL 挿入レベルに影響を与える最も重要な要因は、インキュベーション温度 (図 10) および最初の CPL / 脂質比 (図 11) だった。リポソームの組成物は、最終の CPL レベルをより低い程度まで影響を及ぼすことが見出された (図 23 および 24 中の表を参照のこと)。挿入後、CPL - LUV は、ゲル排除クロマトグラフィーによって遊離 CPL から有効に分離され得る。同様な挿入レベルは、すべての CPL について得られ、ヘッド基電荷は、分子あたり 1 ~ 4 電荷の範囲である。この認識により、ベシクルが調製され、これは、合理的な正確さを有する CPL の所望のレベルを含有する。

【 0 1 8 5 】

高い挿入レベル (7 mol %) は、10 mol % PEG - Cer - C20 と同程度含有するベシクルについて達成され得る。PEG - Cer の一部が、挿入プロセスの間失われる事が起こり得る。なぜなら、PEG - Cer が循環の間ベシクルから交換するためである。これは、最も高い挿入レベルが PEG - Cer - C8 で達成され、交換するための最も良好な潜在性を有する理由を説明し得る。しかし、CPL 4 の挿入の前後での HPLC による、PEG - Cer - C20 を含有する LUV および SPLP の分析は、PEG - Cer - C20 のわずかな消失を明らかにする (約 10 mol % ~ 8 mol %)。

【 0 1 8 6 】

図 15 中に示されるように、DOPPE / DODAC / PEG - Cer - C20 で構成されるカチオン性 LUV は、BHK 細胞上でインキュベートされる場合、ほとんど摂取をしません。正に帯電したベシクルは、いくらかの細胞株への結合の増強を示すけれども、これは、リポソーム表面上の PEG の存在によって弱められる (Miller ら、Bioc hemistry 37, 12875 - 12883 (1 9 9 8) を参照のこと)。明らか

に、これらのシステムについて、6 mol %の正に帯電したDODACの存在は、6時間後の低摂取レベルのみへ導く。およそ7 mol %のジカチオン性CPLの組み込みは、摂取の際にほとんど効果を有さず、およそ7 mol %のトリカチオン性CPLの存在下でわずかに改善された。最も良好な結果を、CPL4b(4正電荷を有する)(4 mol %において)について得た。6時間のインキュベーションにおいて、10倍の摂取の増加は、出発ベシクルに比較して観測された。いくかの要点は、このデータからまとめられ得る。第1は、LUV表面からいくらか距離をおいた正に帯電した基の存在が細胞摂取の有意な増大へ導き得る。この場合において、CPL(P EG MW = 3400)の正電荷は、PEG(MW = 2000)の表面コーティングの上に位置し、従って、細胞との相互作用について利用可能である。しかし、細胞結合を増強する際に役割を果たすものは、総電荷単独ではない。CPL₂およびCPL_{4b}サンプル中に存在する正電荷の量は、およそ等しいが、前者は、後者と比較して、ほとんど摂取を示さない。CPL₃サンプルは、CPL_{4b}サンプルより大きい正電荷を有するが、1/3の摂取のみしか示さない。CPL分子の遠位末端における十分な正電荷密度の局在は、細胞との相互作用を確実にする際に重要なパラメータであると、思われる。少なくとも4つの電荷は、有効な細胞結合が起こるために必要であると思われる。10

【0187】

CPLの従来のCPLおよび立体的に安定なCPLへの挿入について記載されるプロトコルは、インビトロ適用を使用する方法論を実証するために理想的である。両方の場合において、添加された正電荷は、表面から物理的に離れており、そして細胞との相互作用に利用可能である。これは、血清タンパク質および細胞(例えば、マクロファージ)との最小の相互作用のために設計されるポリマーで覆われたベシクルについて特に重要である。しかし、このシステムは、インビトロ適用については理想的でなく、ここで、間隔を減少するために最初にCPL電荷を隠すかまたは選別し、そして選択された組織においてベシクルの集積を可能にすることが、望ましくあり得る。従って、代替の実施形態は、CPLにおけるより短いPEGスペーサーまたはPEG-Cer分子におけるより長いPEG鎖を使用する。PEG-Cer分子は、循環の間粒子から交換することが公知であり(We b bら、Biochimica et Biophysica Acta 1372, 272-282(1998)を参照のこと)、細胞相互作用に曝されたCPLを残す。20

【0188】

上述のように、本研究において使用されたカチオン性リポソームは、融合誘導脂質(DOPC)、カチオン性脂質(DODAC)および安定化脂質(PEG-Cer-C20)で構成され、後者は、ベシクルに対して長循環性の適正を所与する。この脂質組成物は、安定化されたプラスミド脂質粒子(SPLP)として公知である新規のクラスの脂質ベースのDNAキャリアシステムの後、モデル化された(Wheelerら、Gene Therapy 6, 271-281(1999)を参照のこと)。SPLPは、遺伝子送達システムとして潜在性をカプセル化する小粒子(70 nm)である。リポソーム表面上のPEGコーティングの存在は、長循環特性を与え、そして血清ヌクレアーゼによる分解からプラスミドを保護する。従って、SPLPは、全身性インビオ遺伝子治療適用について現実的な潜在性を有する第1のキャリアシステムを表す。本明細書中で記載されたアプローチは、細胞結合および摂取を増大させることによってこれらの粒子のトランスフェクト潜在性を非常に増強し、これは、プラスミドの細胞内送達の増加へ導く。従来の処方物におけるCPLの封入(例えば、抗癌薬物)はまた、効果の増加へ導く。30

【0189】

(IV. 実施例IV)

(A. 概要)

本実施例は、細胞のインビオトランスフェクトについて、安定なプラスミド-脂質粒子に組み込まれたCPLを使用する。

【0190】

BHK細胞におけるこれらの粒子の8時間までのインキュベーションは、2~4 mol %40

50

に増加された挿入されたCPLの量として摂取における増加を生じる。SPLPシステムのトランスフェクトは、トランスフェクト培地における15mL CaCl₂でのCPLの添加により増大する。SPLP単独は、4時間および9時間のトランスフェクトにおいて非常に低いトランスフェクトを示し、続いて新鮮な培地における24時間の完全なインキュベーションを示した。培地における15mM CaCl₂の最終濃度のSPLPへの添加は、BHK細胞におけるトランスフェクトを両方の時点において10倍まで増大した。15mM CaCl₂の存在により、SPLP + 2%、3%および4%CPLは、両方の時点においてSPLP単独の回数よりも2000~5000回多くトランスフェクトする。4mol%のCPLは、トランスフェクトにおいて最も良好な増大を示す：およそ4500回より多い、続いて、3%次いで2%のCPLサンプルである。従って、SPLPにおけるCPL、DSPE-Quad5の存在は、摂取およびトランスフェクトの両方において、複合体と比較したレベルまたはこれより上のレベルまで増大する。
10

【0191】

(B. 材料および方法)

1. DSPE-Quad5の合成：ダンシル化DSPE-Quad5(CPL)を、Chenら(2000)に記載される通りに発明者らの研究において調製した。

【0192】

2. DSPE-Quad5のSPLLPへの組み込み：Inex Pharmaceuticals, Inc.は、SPLPを供給した。CPLのSPLPへの組み込みを、SPLPを用いてHBS中で2~3時間のCPLのインキュベーションによって行った。ついで、生じた混合物を、HBS、75mM CaCl₂, pH 7.5で平衡にしたSeph aroose CL-4Bカラムを通過させ、組み込まれたCPLを用いてSPLPから組み込まれてないCPLを取り除いた。フラクション(1mL)を収集し、そしてCPL(ダンシルアッセイ)、リン脂質およびDNA(PicoGreenアッセイ)についてアッセイした。最終サンプルは、CPLの2、3または4mol%を含有するように調製された。このダンシルアッセイは、BBSにおけるダンシル化CPLの0.5~2.5mol%の標準曲線を調製し、そしてサンプル中のCPLの濃度を決定することを含む。リン脂質は、Bligh-Dyer抽出技術(Bligh & Dyer, 1952)を用いて脂質を抽出し、次いで、抽出の有機相についてFiske-Subarrowアッセイを実施することによってSPLPから抽出した。PicoGreenアッセイは、DNA標準曲線を使用してPicoGreenおよびTriton X-100の存在下でサンプルを比較することによって実施した。CPLの最終%挿入を、CPL濃度を脂質濃度で割ることによって決定した。
20

【0193】

CPLをSPLPに挿入するための最適な時間を、0.5mol%Rh-ESPEを用いて調製したSPLPを使用して、決定した。15nmolのダンシル化CPL(DSPE-Quad5)を、200nmolの標識したSPLPと混合し、そしてそしてこのサンプルを、60度種々の時点にわたって(0.5、1、2、3、および4時間)インキュベートした。これらの時点で、サンプルを水浴から除き、そしてセファロースCL-4Bカラムに通した。主要な画分をこのカラムから収集し、そしてダンシル対ローダミンの蛍光比を測定した。ローダミン蛍光について使用したパラメータは、560nmの_{ex}および600nmの_{em}であり、そしてダンシル蛍光については、340nmの_{ex}および510nmの_{em}であった。これらの両方に対する励起スリット幅および発光スリット幅は、それぞれ10nmおよび20nmであった。ダンシル/ローダミン比を、カラム前のサンプル対カラム後のサンプルについて比較することにより、各時点における挿入の%を決定した。
40

【0194】

3. CPL-SPLPのQELS：これらの粒子の直径を、Nicompartic le Sizerを使用して決定した。

【0195】

4. フリーズフラクチャーEM：フリーズフラクチャーEMを、K. Wongにより記載される方法により、2%、3%、および4%のCPLサンプルについて、実施した。

【0196】

5. 粒子の血清安定性：これらのCPL-SPLP内のDNAの安定性を、6 μgのプラスミドDNA(pLuc)を含むサンプル(25 μL)を種々の時間にわたって(0、1、2、および4時間)、50%マウス血清(25 μL)中37でインキュベートすることにより、決定した。0時点を除く各時点において、11 μLの混合物を除去し、水を使用して容量を45 μLとし、そしてこれらのサンプルを氷上に置いた。次いで、1容量のフェノール：クロロホルム(1:1)を使用して、DNAをこの脂質から抽出した。微小遠心管中の20分間の遠心分離に続いて、上部の水相を除去した。0時点は、血清の添加および抽出の実施の前に、5.5 μLのサンプルを除去することにより得た。次いで、20 μLの水相を、2 μLの負荷緩衝液と混合し、そしてこのサンプルを、TAE緩衝液中1%アガロースゲル上で泳動した。1時間後、このゲルを透視器に載せ、そして写真を撮影した。

【0197】

6. 脂質取り込み研究：取り込み研究のために、 1×10^5 のBHK細胞を、12ウェルプレート上で一晩、2 mLの完全培地(DMEM+10%FBS)中37、5%CO₂で、増殖させた。次いで、0.5%ローダミン-DSPeを含む20 nmolの2、3、および4 mol% CPL-SPLPサンプルを、HBS+75 mM CaCl₂と混合し、最終容量を200 μLとし、そしてこれを、細胞の上部に添加し、続いて800 μLの完全培地を添加した。これを、細胞の上部で2、4、6、および8時間インキュベートし、この時点で、細胞をPBSで3回洗浄し、そして600 μLのPBS中0.1% Triton X-100(pH 8.0)で溶解した。次いで、この溶解物のローダミン蛍光を、560 nmの_{ex}および600 nmの_{em}を使用し、それぞれ10 nmおよび20 nmのスリット幅を使用して、蛍光計で測定した。430 nmの発光フィルタもまた使用した。1.0 mLのマイクロキュベットを使用した。脂質取り込みを、この蛍光を脂質標準(5 nmol)の蛍光と比較することにより、決定した。次いで、BCAアッセイを使用して50 μLの溶解物中のタンパク質を測定することにより、存在する細胞の量についてこの値を標準化した。

【0198】

蛍光顕微鏡写真を、Zeiss蛍光顕微鏡で撮影した。

【0199】

7. トランスフェクション研究：インビトロでのトランスフェクション研究のために、 5×10^4 のBHK細胞を、完全培地の中で24ウェルプレート中でプレートした。これらを、5%CO₂中37で一晩インキュベートした。2.5 μgのDNAを含む、SPLP、SPLP+75 mM CaCl₂、DOPE: DODAC(1:1)/DNA複合体、およびCPL-SPLP系(2、3、および4 mol% CPL)を、HBSまたはHBS+75 mM CaCl₂を使用して100 μLにし、そして細胞上に配置した。次いで、400 μLの完全培地を、これに添加した。4時間目および9時間目に、トランスフェクション培地を除去し、そしてペニシリンおよびストレプトマイシンを含む完全培地と交換して、24時間のトランスフェクションを完了した。このトランスフェクション期間の終了時に、細胞を、Triton X-100を含む溶解緩衝液で溶解した。この溶解に続いて、10~20 μLの溶解液を96ウェル発光プレートに移した。このプレート上のサンプルの発光を、Luciferase反応キットおよびプレートルミノメーターを使用して、測定した。ルシフェラーゼ活性を、ルシフェラーゼ標準曲線の使用により、決定し、そして10~20 μLのこの溶解液についてのBCAアッセイを用いてタンパク質を測定することにより、細胞の数に対して標準化した。

【0200】

(C. 結果および考察)

図18AおよびBは、SPLP系の取り込みおよびトランスフェクションが、複合体より

10

20

30

40

50

10⁵倍のオーダーで低いことを示す。

【0201】

CPL、DSPE-Quad5を、以下の研究に使用する。この構造を図16Aに示す。この分子は、PEG₃₄₀₀分子の末端に4つの正電荷を有し、この分子は、脂質DSPEに共有結合している。このCPSLの、SPLPと同じ組成物の空のリポソームへの取り込みは、上記実施例に先に記載されている。

【0202】

SPLPへのCPLの取り込みは、ほんの数工程を包含する。これらの工程を、図16Bに示す。

【0203】

DSPE-Quad5を、DOPE:PEG-CerC20:DODAC(84:10:6)を含むSPLPに、種々の濃度(2~4mol%から)のCPLで組み込んだ。種々のCPL百分率についての組込み効率は、最初の70%と80%との間であった。CPLを保有するSPLPを、組み込まれていないCPLから分離するために、ゲル濾過クロマトグラフィーを実施した。3% DSPE-Quad5についての代表的なカラムプロファイルを、図19Aに示す。CPL、脂質、およびDNAを全て、単一のピークで同時にカラムから溶出した。しかし、より遅い段階で溶出した、小量の組み込まれていないCPLが存在した。組み込まれたCPLが組み込まれたままであることを示すために、このサンプルをカラムから再溶出する(図19A)。図19Bに見られ得るように、CPLは、カラムのより遅い画分には溶出されず、このことは、CPLが脂質と会合したままであることを示す。

10

【0204】

CPLの挿入のための最適なインキュベーション期間を決定するために、60での時間経過を実施した(図20)。この図から、最適な挿入が、2時間と3時間との間で起こることが決定され得る。

【0205】

CPLを含むこれらの粒子の直径が、QELSにより、109nmの直径を有するSPLPと比較すると125nmであることを決定した。CPLの非存在下でのSPLPと比較したこれらの粒子の構造を観察するために、フリーズフラクチャーEMを実施した。

【0206】

20

種々の量のCPLの存在下および非存在下での、SPLPの血清安定性を、アッセイした(データは示さない)。遊離DNAを、50%マウス血清とともに、1時間のみインキュベートすることにより、これは完全に分解する。CPL-SPLPの血清安定性は、SPLP系についての安定性と類似していた。このことは、CPL-SPLP中のDNAが、CPLを含まないSPLP系におけるDNAと同様に、保護されることを示す。

【0207】

この研究の主要な目的は、CPLSを使用して、SPLP系の取り込みおよびトランスフェクションの両方を増加させることである。図21は、DSPE-Quad5の存在下(2、3、または4mol%)および非存在下(0%)での、ローダミン標識したSPLPの取り込みの時間経過を示す。4%の系の取り込みは3%の系より高く、3%の系の取り込みは2%の系より高く、そして3つ全ては、CPLを含まない系よりずっと高い。図22は、同じ処方の4時間および9時間の時点を示す。

30

【0208】

(V. 実施例V)

この実施例は、安定化したアンチセンス脂質粒子(「SALP」)へのCPLの取り込みを示す。

【0209】

(A. 材料および結果)

ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)を、Northern Lipids(Vancouver, Canada)から購入した。1,2-ジオレイルオキシ-3-

40

50

ジメチルアンモニウムプロパン (DODAP または AL-1) を、Dr. Steven Ansell (Inex Pharmaceuticals) が合成したか、あるいは Avanti Polar Lipids から購入した。コレステロールを、Sigma Chemical Company (St. Louis, Missouri, USA) から購入した。PEG-セラミドを、Inex Pharmaceuticals Corp. の Dr. Zhao Wang が、PCT WO96/40964 (本明細書中に参考として援用される) に記載される手順を使用して、合成した。^[3H]-CHE または ^[14C]-CHE を、NEN (Boston, Massachusetts, USA) から購入した。全ての脂質は、>99%で純粋であった。エタノール (95%)、メタノール、クロロホルム、クエン酸、HEPES および NaCl を全て、市販の供給源から購入した。脂質ストック溶液を、95%エタノール中 20 mg/mL で調製した (PEG-セラミドを、50 mg/mL で調製した)。

【0210】

SALP を、PCT 特許出願番号 WO98/51278 (1998年11月19日公開、本明細書中に参考として援用される) に記載される方法に従って、最初に調製した。J. J. Wheeler ら (1999)、Gene Therapy, 6, 271-281 もまた参考のこと。簡単に言えば、配列 5' T AAC GTT GAG GGG CAT 3' (配列番号 1) を有する ^[3H]-ホスホロチオエートオリゴデオキシヌクレオチド Inx-6295 (ヒト c-myc) の 16 マー (300 mM クエン酸緩衝液 (pH 3.80) 中) を 65 ℃ に昇温させ、そして絶えず攪拌しながら脂質 (エタノール中) をゆっくりと添加した (DSPC : CHOL : DODAP : PEG-CerC14 ; 25 : 45 : 20 : 10 モル比)。この混合物の得られた容量は 1.0 mL であり、そして 13 mmol の全脂質、2 mg のアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチド、および 38% (v/v) のエタノールを含有した。このアンチセンス-脂質混合物を、5 サイクルの凍結 (液体窒素) および融解 (65 ℃) に共し、そして引き続いて、サーモバレル取付け具を備える加圧押し出し器装置 (Lipex Biomembranes) を使用して、3 つ重ねた 100 nm フィルター (Poretics) に 10 回通した。押し出しの間の温度および圧力は、それぞれ 65 ℃ および 300 ~ 400 psi (窒素) であった。押出した調製物を、1.0 mL の 300 mM クエン酸 (pH 3.8) で希釈し、エタノール含有量を 20% に低下させた。押出したサンプルを、数リットルの 300 mM クエン酸緩衝液 (pH 3.8) に対して 3 ~ 4 時間透析し (12000 ~ 14000 MWカットオフ; Spectrapor)、過剰のエタノールを除去した。サンプルを引き続いて、HEPES 緩衝化生理食塩水 (HBS) (pH 7.5) に対して 12 ~ 18 時間透析し、DODAP を中和し、そしてベシクルの表面に会合したあらゆるアンチセンスを放出した。カプセル化を、カラム前およびカラム後の ^[3H]-アンチセンスおよび ^[14C]-脂質の比を分析すること、または全カラム前およびカラム後の ^[3H]-アンチセンスおよび ^[14C]-脂質の放射能を決定することのいずれかにより、評価した。

【0211】

SALP を調製した後に、CPL を組み込んだ。約 5 μmol の SALP を、3 ~ 10 mmol 1% の CPL (すなわち、0.15 ~ 0.5 μmol CPL) と混合した。CPL を、HBS 中またはメタノール中のミセル溶液として貯蔵した。CPL をメタノールに添加した場合には、最終メタノール濃度は 3 ~ 4% であった。この混合物を、室温または 40 ℃ で一晩インキュベートした。組み込まれなかった CPL を、カラム分離 (HBS で平衡化したセファロース CL-4B, 75 mM CaCl₂ (pH 7.5)) により、SALP 調製物から除去した。組み込み効率は、34% と 60%との間であった。他の有機溶媒が組み込み効率を改善し得ることが、予測される。

【0212】

(V I. 実施例 V I)

(A. 一般的概説)

本実施例においては、遠位が正に荷電したカチオン性ポリ (エチレングリコール) 脂質複

10

20

30

40

50

合体（CPL）を合成し、そしてCPLを取り込んだリポソームの細胞取り込みの増強におけるこれらの効力について、評価した。リポソーム表面に結合した、遠位が荷電したポリマー複合体は、インピトロで哺乳動物細胞へのリポソーム取り込みを増強することが、確認された。

【0213】

(B. 方法)

(臨界ミセル濃度 (CMC) の決定)

CPLのCMCを、 BritoおよびVaz (Brito, R. M. M. およびVaz, W. L. C. (1986) Determination of the critical micelle concentration of surfactants using the fluorescent probe N-phenyl-1-naphthylamine. Anal. Biochem. 152, 250-255を参照のこと)により以前に報告されたように、NPNアッセイを使用して決定した。一連の異なる濃度のCPLを、HBS緩衝液 (25 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.4) 中で調製した。5 μMのNPN (95%エタノール中のストックNPN溶液から)を、上記CPL溶液に添加した。この混合物の、室温で30分間のインキュベートに続いて、 $\text{em} = 410 \text{ nm}$ での蛍光強度を、 $\text{ex} = 356 \text{ nm}$ を使用して、Perkin Elmer LS 50 Luminescence Spectrometerで、測定した。

【0214】

20

(C. 結果)

(インピトロでのCPL-LUVの取り込み増強。従来のCPL-リポソームの細胞取り込み。)

CPL含有リポソームのインピトロでの細胞取り込みを、新生ハムスター腎臓 (BHK) 細胞において研究した。リポソームに会合した蛍光脂質マーカー (Rh-PE) を、脂質取り込みについてのマーカーとして使用した。図26および27に示すように、CPL₄は、コントロールサンプル (CPLなし) と比較して、PBS-CMGおよび血清含有培地の両方を使用して、細胞取り込みを有意に増強させる。CPL-LUVの時間依存性取り込みは、3時間後に最大に達する。図6は、4時間のインキュベーション後の、様々なCPL含有ベシクルの細胞取り込みを要約する。コントロールと比較して、減少した細胞取り込みがCPL₁について、中程度の増加がCPL₂ (2倍) について、そして大きな増加が、CPL₄およびCPL₈の両方について、観察された。CPL₄およびCPL₈から得られた類似の程度の増加は、CPLにおける4つの電荷密度が、最大に増強された細胞取り込みについての要求を満足することを示す。

30

【0215】

(VII. 実施例VII)

(A. 一般的概説)

本実施例は、リポソームと細胞との間の静電引力を増加させることにより、非特異的な標的化を増強するよう設計された、新たなクラスのカチオン性脂質の合成を記載する。

【0216】

40

(B. 材料および試薬)

tBoc-NH-PEG₃₄₀₀-CO₂-NHSを、Shearwater Polymers (Huntsville, AL) から入手した。

【0217】

【化19】

N_α, N_ε-ジ-tert-Butyl-L-リジン-N-ヒドロキシスクシンイミド
エステル、N_ε-ダンシル-L-リジン、

N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)、およびN,N'-ジシクロヘキシル-カルボジイミド(DCC)を、Sigma-Aldrich Canada(Oakville、ON)から購入した。1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)および1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DSPE)を、Northern Lipids(Vancouver、BC)から入手した。フルオレサミンおよびローダミン-DSPE(Rh-PE)を、Molecular Probes(Eugene、OR)から入手した。コレステロール(Chol)を、Sigma Aldrich Canada(Oakville、ON)から入手した。トリフルオロ酢酸、ジエチルエーテル、メタノール、トリエチルアミン、およびクロロホルムを、Fisher Scientific(Vancouver、BC)から入手した。全ての試薬を、さらに精製することなく使用した。

【0218】

(1. 一般的方法)

全ての反応を、16×100mmのガラス試験管内で実施した。¹H NMRスペクトルを、200MHzで作動するBruker MSL 200分光計を使用して得た。重水素化クロロホルム(CDCl₃)を、NMR実験の溶媒として使用した。プロトンの化学シフト(δ)を、CHCl₃を7.24ppmに設定して参照した。シグナルが合理的に分解された場合には、これらの強度を積分して、プロトンの数の推定を可能にした。交換可能なアミノ基プロトンの化学シフト(7~8ppmの間に観察される)は、与えていない。これらのピークを、D₂O交換によるこれらの除去に基づいて、帰属した。

【0219】

リンおよびフルオレサミンアッセイを実施して、各CPLにおけるホスフェートあたりの一級アミンの比を、以下のように確認した。

【0220】

CPLのホスフェート濃度を、Fiske-Subbarowリンアッセイ(Fiske, C.H.、およびSubbarow, Y. (1995) The colorimetric determination of phosphorous. J. Biol. Chem. 66, 375-400を参照のこと)を使用して、決定した。CPL中の一級アミン濃度を、蛍光團であるフルオレサミンを使用して、決定した。アセトン中のフルオレサミン溶液(0.6mg/mL)を調製した。HBS中のCPL溶液のアリコート(2~4μL)を、200mMホウ酸ナトリウム(pH 8.0)を用いて250μLにした。この混合物に、50Lのフルオレサミン溶液を、ボルテックスしながら滴下し、続いて1700μLの水を添加した。この溶液の蛍光を、Perkin-Elmer LS50 Luminescence Spectrometerを使用して、397nmの_{ex}および475nmの_{em}、ならびに10nmの励起スリット幅および発光スリット幅を用いて測定した。このCPLの一級アミン濃度を、リジン標準曲線から決定した。

【0221】

【化20】

tert-Butyl-NH-PEG₃₄₀₀-CO₂-(N_ε-ダンシル)リジン(1)。

3mLの乾燥クロロホルム中のtert-Butyl-NH-PEG₃₄₀₀-CO₂-NHS(500mg、147μmol)を、1mLのメタノールおよび200μLのトリエチルアミン中の

10

20

40

50

【0222】

【化21】

N_ε-ダンシル-L-リジン (65mg, 171μmol)

の溶液にゆっくりと添加した。この反応混合物を室温で3時間攪拌した後に、溶媒をN₂気流下で除去し、そして減圧下でさらに乾燥した。粗生成物を、最初に最小量のクロロホルムに昇温させながら溶解し、次いで10mLのジエチルエーテルの添加により沈殿させることにより、洗浄した。ボルテックスしながら、このエーテルを添加した。1の沈殿を、冷却により加速した。次いで、沈殿物を遠心分離によりペレット化し、そしてエーテルを処分した。このクロロホルム/エーテルによる洗浄および沈殿の手順を繰り返した。次いで、乾燥した固体を4mLのクロロホルムに溶解し、そして氷浴中で15分間冷却した。この冷却した溶液が透明である場合には、メタノール(2mL)を添加した。沈殿(過剰のダンシルリジン)が生じた場合には、これをメタノールの添加の前に濾別した。このクロロホルム/メタノール溶液を、1.2mLの0.1M HClで洗浄した。クロロホルム相を抽出し、乾燥し、そして固体を6mLのクロロホルム/メタノール(2:1 v/v)に溶解し、そして1.2mLの蒸留水で洗浄した。クロロホルム相を抽出し、粘性的ペーストに乾燥し、そして

【0223】

【化22】

10

20

t Boc-NH-PEG-CO₂-(N_ε-ダンシル)リジン(1)

を10mLのエーテルで沈殿させた。遠心分離およびエーテルの除去の後に、乾燥生成物は、淡黄色の固体である。収量: 520mg (93%)。TLC(シリカゲル)クロロホルム/メタノール(85:15 v/v): R_f 0.56。¹H NMR(CDCl₃): 1.08(t)、1.40(s, 1H)、2.66(s, 1H)、2.86(s, 8H)、3.27(q)、3.50(t)、3.60(s, 309H)、3.96(t)、4.19(m [ブロード])、5.03(s [ブロード], 1H)、5.22(t, 1H)、5.43(d, 1H)、7.16(d, 1H)、7.51(q, 2H)、8.19(d, 1H)、8.27(d)、8.50(d, 1H) ppm。

【0224】

ダンシル化CPL₁-tBoc(3)。最初に、

【0225】

【化23】

30

t Boc-NH-PEG₃₄₀₀-CO₂-(N_ε-ダンシル)リジン-**NHS(2)**

40

を以下のように調製した。2mLの乾燥クロロホルム中の

【0226】

【化24】

t Boc-NH-PEG₃₄₀₀-CO₂-(N_ε-ダンシル)リジン(1)**(500mg, 132μmol)**

50

およびNHS (31.5 mg、274 μ mol) の溶液を、1 mLの乾燥クロロホルムに溶解したDCC (42.8 mg、207 μ mol) に添加した。この反応混合物を室温で2時間攪拌した。副生成物であるジシクロヘキシリウレア (DCU) を、綿栓を備えたPasteurピペットを使用して濾過した。

【0227】

【化25】

t Boc-NH-PEG₃₄₀₀-CO₂-(N_ε-ダンシル) リジン-NHS (2)

10

を含む濾液を、2 mLの乾燥クロロホルムおよび200 μ Lのトリエチルアミン中のD SPE (120.6 mg、161 μ mol) の溶液にゆっくりと添加した。乾燥クロロホルムおよびトリエチルアミンへの、D SPEの溶解は、65 $^{\circ}$ への昇温を必要とした。この反応混合物を室温で3時間攪拌した後に、これを乾燥し、そしてクロロホルム/エーテルで洗浄し、そしてニンヒドリンで可視化される、TLCでのD SPEの消失まで、先に記載したように沈殿させた。この過剰のD SPEの除去は、少なくとも3回の洗浄を必要とした。生成物であるダンシル化CPL₁-t Boc (3) を、クロロホルム/メタノール (2:1) に溶解し、希HClおよび水で洗浄し、そして(1)に関して記載したように、エーテルを使用して沈殿させた。収量: 575 mg (96%)。TLC (シリカゲル) クロロホルム/メタノール (85:15) R_f 0.58。¹H NMR (CDCl₃): 0.85 (t, 4H)、1.22 (s, 48H)、1.41 (s, 10H)、1.55 (t)、2.27 (m [ブロード], 6H)、2.90 (m [ブロード], 6H)、3.04 (s, 8H)、3.27 (q)、3.61 (s, 275H)、4.14 (m [ブロード])、4.32 (d)、4.38 (d)、5.05 (s [ブロード])、5.23 (s [ブロード])、5.58 (m [ブロード])、7.37 (d, 1H)、7.49 (s [ブロード], 1H)、7.59 (t, 2H)、8.24 (d, 1H)、8.50 (d, 1H)、8.59 (d, 1H) ppm。

20

【0228】

ダンシル化CPL₁ (4)。トリフルオロ酢酸 (TFA) (2 mL) を、2 mLのクロロホルム中のダンシル化CPL₁-t Boc (3) (550 mg、121 μ mol) の溶液に添加し、そして室温で4時間攪拌した。この溶液を粘性のペーストに濃縮し、そしてクロロホルム/エーテルで3回洗浄した。エーテルの除去後、この固体を6 mLのクロロホルム/メタノール (2:1) に溶解し、そして1.2 mLの5%重炭酸ナトリウムで洗浄した。クロロホルム相を抽出し、乾燥し、そして6 mLのクロロホルム/メタノール (2:1) に溶解し、そして1.2 mLの蒸留水で洗浄した。クロロホルム相を粘性のペーストに濃縮し、そして精製したCPL₁ (4) をクロロホルム/エーテルでの洗浄および減圧乾燥により得た。収量: 535 mg (97%)。TLC (シリカ) クロロホルム/メタノール/水 (65:25:4) R_f 0.76。¹H NMR (CDCl₃)。0.85 (t, 4H)、1.22 (s, 46H)、1.54 (m [ブロード], 8H)、2.23 (t, 6H)、2.84 (s, 9H)、3.16 (m [ブロード], 3H)、3.26 (t, 3H)、3.61 (s, 263H)、3.98 (q)、4.17 (t)、4.33 (d)、4.38 (d)、5.19 (s [ブロード])、5.93 (d, 1H)、7.13 (d, 1H)、7.46 (t, 1H)、7.52 (t, 1H)、8.15 (d, 1H)、8.43 (t, 2H) ppm。

30

【0229】

ダンシル化CPL₂-t Boc (5)。

【0230】

【化26】

40

N_{α}, N_{ϵ} -ジ- $t\text{Boc-L-リジン-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル}$ (105mg, 236 μmol)

の、2mLの乾燥クロロホルム中の溶液を、ダンシル化CPL₁(4)(510mg, 112 μmol)の、2mLクロロホルム(200 μL トリエチルアミンを含む)中の溶液にゆっくりと添加し、そして室温で3時間攪拌した。この反応の完了は、TLCでのニンヒドリン試験により可視化される、一级アミンの消失により、示された。この反応混合物を粘性のペーストに濃縮し、そして過剰の

10

【0231】

【化27】

N_{α}, N_{ϵ} -ジ- $t\text{Boc-L-リジン-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル}$

の消失がTSCにより確認されるまで、クロロホルム/エーテルで洗浄した(約3回)。この生成物を6mLのクロロホルム/メタノール(2:1)に溶解し、そして1.2mLの0.1M HClで洗浄した。クロロホルム相を抽出し、乾燥し、6mLのクロロホルム/メタノール(2:1)に溶解し、そして1.2mLの蒸留水で洗浄した。クロロホルム相を粘性のペーストに濃縮し、そして精製した化合物を、クロロホルム/エーテルでの洗浄および減圧乾燥により得た。収量: 510mg(96%)。TLC(シリカゲル)クロロホルム/メタノール(85:15)R_f 0.58。¹H NMR(CDC1₃)。0.85(t, 3H)、1.22(s, 44H)、1.41(s, 20H)、1.56(m [ブロード])、1.78(m [ブロード])、2.27(m, 5H)、2.88(s)、2.91(s)、2.97(s)、3.06(s, 7H)、3.26(t)、3.44(t)、3.62(s, 252H)、3.97(t)、4.05(d)、4.13(m)、4.33(d)、4.38(d)、4.68(s [ブロード])、5.22(s [ブロード])、5.51(s [ブロード])、6.57(t [ブロード], 1H)、7.39(d, 1H)、7.51(s [ブロード], 1H)、7.60(t, 2H)、8.26(d, 1H)、8.53(d, 1H)、8.61(d, 1H) ppm。

20

【0232】

ダンシル化CPL₂(6)。CPL₂(6)の合成は、ダンシル化CPL₂-tBoc(5)(490mg, 103 μmol)の脱保護による、CPL₁(4)の合成と同じであった。収量: 478mg(97%)。TLC(シリカ)クロロホルム/メタノール/水(65:25:4)R_f 0.63。¹H NMR(CDC1₃)。0.85(t, 3H)、1.22(s, 42H)、1.55(m, 10H)、1.93(s [ブロード], 4H)、2.24(t, 5H)、2.85(s, 8H)、3.26(t, 3H)、3.61(s, 271H)、3.95(q)、4.17(s)、4.34(s)、5.18(s [ブロード], 1H)、6.31(d, 1H)、6.89(s, 1H)、7.10(d, 1H)、7.49(m, 1H)、8.15(d, 1H)、8.34(d, 1H)、8.47(d, 2H) ppm。

30

【0233】

ダンシル化CPL₄-tBoc(7)。CPL₄-tBoc(7)の合成は、

【0234】

【化28】

40

**N_α, N_ε-ジ- t B o c - L - リジン- N - ヒドロキシスクシンイミド
エステル (170mg, 383μmol)**

とダンシル化 CPL₂ (6) (455mg, 95μmol)との反応による、CPL₂- t B o c (5)の合成と同じであった。収量: 475mg (96%)。TLC (シリカゲル)クロロホルム/メタノール (85:15) R_f 0.58。¹H NMR (CDCl₃)。

0.85 (t, 3H)、1.22 (s, 43H)、1.40 (s, 39H)、1.71 (m [ブロード], 6H)、2.27 (m, 5H)、2.88 (s)、2.90 (s)、2.95 (s)、3.05 (s, 10H)、3.25 (t, 3H)、3.43 (s)、3.61 (s, 262H)、3.97 (t)、4.05 (d)、4.15 (m)、4.32 (d)、4.37 (d)、4.51 (s [ブロード])、4.75 (s [ブロード])、4.90 (s [ブロード])、5.23 (t [ブロード], 1H)、5.52 (s [ブロード])、5.80 (s [ブロード], 1H)、7.15 (m [ブロード], 1H)、7.38 (d, 1H)、7.50 (s, 1H)、7.59 (t, 2H)、8.25 (d, 1H)、8.51 (d, 1H)、8.60 (d, 1H) ppm。

【0235】

ダンシル化 CPL₄ (8)。CPL₄ (8)の合成は、ダンシル化 CPL₄- t B o c (7) (450mg, 86μmol)の脱保護による、CPL₁ (4)の合成と同じであった。収量: 440mg (97%)。TLC (シリカ)クロロホルム/メタノール/水 (65:25:4) R_f 0.19。¹H NMR (CDCl₃)。0.85 (t)、1.22 (s)、1.53 (m [ブロード])、2.34 (m [ブロード])、2.86 (s)、3.26 (t)、3.62 (s)、3.87 (s [ブロード])、3.97 (t)、4.17 (s [ブロード])、4.33 (d)、5.18 (s [ブロード])、7.15 (d)、7.43 (s)、7.51 (t)、8.15 (d)、8.32 (d)、8.48 (d)、9.05 (s [ブロード]) ppm。

【0236】

ダンシル化 CPL₈- t B o c (9)。CPL₈- t B o c (9)の合成は、

【0237】

【化29】

**N_α, N_ε-ジ- t B o c - L - リジン- N - ヒドロキシスクシンイミド
エステル (70mg, 158μmol)**

とダンシル化 CPL₄ (8) (100mg, 19μmol)との反応による、CPL₂- t B o c (5)の合成と同じであった。収量: 112mg (96%)。TLC (シリカゲル)クロロホルム/メタノール (85:15) R_f 0.58。¹H NMR (CDCl₃)。

0.84 (t, 3H)、1.08 (s)、1.21 (s, 39H)、1.39 (s, 75H)、1.66 (m [ブロード])、2.26 (m, 4H)、2.89 (s, 4H)、3.06 (s, 11H)、3.25 (t, 3H)、3.43 (s)、3.49 (s)、3.60 (s, 248H)、3.96 (t)、4.04 (d)、4.12 (t)、4.31 (d)、4.36 (m)、5.19 (m [ブロード])、6.77 (m [ブロード], 1H)、6.91 (s [ブロード], 1H)、7.24 (CHCl₃)、7.41 (d)、7.50 (s [ブロード])、7.60 (t)、8.25 (d, 1H)、8.53 (d, 1H)、8.63 (d, 1H) ppm。

【0238】

ダンシル化 CPL₈ (10)。CPL₈ (8)の合成は、ダンシル化 CPL₈- t B o c (9) (50mg, 8μmol)の脱保護による、CPL₁ (4)の合成と同じであった。

20

30

40

50

収量: 4.8 mg (9.6%)。TLC (シリカ) クロロホルム/メタノール/水 (6.5:2.5:4) R_f 0.13。¹H NMR (CDCl₃)。0.85 (t, 3H)、1.22 (s, 3.4H)、1.52 (s [ブロード])、2.23 (s [ブロード])、2.86 (d)、3.27 (d)、3.61 (s, 2.74H)、3.96 (t)、4.18 (m [ブロード])、7.14 (s [ブロード])、7.24 (CHCl₃)、7.50 (m [ブロード])、8.12~8.27 (s [ブロード])、8.47 (m [ブロード]) ppm。

【0239】

(C. 結果および考察)

CPLを、図29に概説するように、アミンおよびNHS活性化カーボネート基が関与する、繰り返しカップリング反応工程により、合成した。これは、以下からなる:(a)親水性PEGスペーサーにダンシル蛍光標識を組み込む工程、(b)DSPEアンカーのカップリング、および(c)脂質へのカチオン性ヘッド基の付着。ヘテロ二官能性PEGポリマーであるtBOC-NH-PEG₃₄₀₀-CO₂-NHS (MW 3400)を、2つの理由から選択した。第一に、これは市販されていた。第二に、これはエーテルに不溶であり、このことは、その誘導体1~10の精製の非常に好都合な手段を提供した。他の試薬を過剰に使用して、PEGポリマーのその誘導体への完全な転換を確実にした。過剰の試薬はエーテルに可溶であり、従って精製の間にエーテル中で洗浄することにより、除去され得た。

【0240】

ダンシルリジンの-NH基の、PEGのNHS活性化カーボネートとのカップリングによる、蛍光標識である

【0241】

【化30】

N_ε-ダンシルリジン

のPEGポリマーへの組み込みは、リジン誘導体1を与えた。DSPEアンカーを、中間体2(これは、NHSおよびDCCを使用した1のエステル化により形成した)を介してカップリングさせた。得られたPEG脂質3を、tBOCを除去することにより脱保護して、1価の正電荷を有するCPL₁を形成した。他のCPLの正電荷は、リジンのアミノ基が有する。ここで、NHS活性化リジンおよびジ-tBOC保護リジンを、CPL₁の遊離アミノ官能基に付着させて、中間体5を形成し、これは、脱保護の際に、2価の正電荷を有するCPL₂をえた。中間体7を経る、2つのリジン残基の、CPL₂のアミノ基への付着は、4価の正電荷を有するCPL₄をえた。このように、8価の正電荷を有するCPL₈を、4つのリジン残基をヘッド基として付着させて、合成した。見られ得るように、これは、非ウイルス薬物送達適用のために特に興味深い、多価のCPLを合成する非常に好都合な手段を提供する。

【0242】

図29の、精製した中間体およびCPLの構造は、¹H NMR分光分析および化学分析により確認した。¹H NMRスペクトルは、PEG、tBOCおよびDSPEのアシル鎖の良好に分解された共鳴を、それぞれ約3.61、1.41および1.21 ppmに示し、そしてダンシル部分の共鳴(7.1~8.5 ppmに芳香族プロトン; 2.8~3.0 ppmにメチルプロトン)を示した。前者3つのピークの積分したシグナル強度から、tBOC/PEGまたはtBOC/DSPEの比は、CPL₁-tBOC、CPL₂-tBOC、CPL₄-tBOC、およびCPL₈-tBOCについてそれぞれ1.0、2.1、4.0、および8.1であることがわかった。各tBOCはアミノ基に付着しているので、これは、CPL₁に対する各CPLのヘッド基におけるアミノ基の数を与える。この本

10

20

30

40

50

質的に同一の結果を、PEGおよびD SPEの両方に対するt Bocの比を使用して得た。これは、ヘッド基に対する正しい割合での脂質およびポリマーの存在を実証する。t Boc保護基の完全な切断を、t BocのNMRピークおよび化学分析の損失により確認した。これは、フルオレサミンおよびリンアッセイを使用することにより、CPLの各々における一級アミン対ホスフェートの比を示した。CPL₁、CPL₂、CPL₄、およびCPL₈についてのアミン/ホスフェートの比は、それぞれ1.0、2.2、3.7、および8.0であることがわかった。これらは、それぞれのCPLのアミノ基が有する正電荷の予測した数に良好に対応した。

【0243】

本明細書中に記載のCPLは、それらの有用性を他のカチオン性脂質に対して増加させ得る、いくつかの特質を有する。第一に、リン脂質アンカーは、CPLのリポソーム系への効率的な取り込みを容易に可能にする。第二に、ダンシル標識は、蛍光技術を使用する、二重層中のCPLの正確かつ好都合な定量を可能にする。最後に、CPL中のカチオン性ヘッド基の原子価が、リジン残基を使用して、容易に改変され得る。

10

【0244】

(VIII. 実施例VIII)

(A. 一般的概要)

蛍光性のカチオン性ポリ(エチレングリコール)(MW 1000)脂質接合(CPL)¹の合成を記載する。この手順は、以前に詳細に記載したPEG3400の手順に非常に類似している。しかし、低分子量のPEG誘導体は、エーテルに可溶性でなくともよく、そして従って、以前のようなエーテル洗浄によって容易に精製され得ない。この合成手順は、図29において要約されるものと類似である。

20

【0245】

(B. 略語)

t Boc、tert-ブチロキシカルボニル；t Boc-NH-PEG₁₀₀₀-CO₂-NH₂、t Bocで保護され、そしてNHS活性化したPEG₁₀₀₀；CPL、カチオン性ポリ(エチレングリコール)脂質接合体；CPL₁、1つの正電荷を有するCPL；CPL₂、2つの正電荷を有するCPL；CPL₄、4つの正電荷を有するCPL；DCC、N,N'-ジシクロヘキシル-カルボジイミド；DCU、ジシクロヘキシル尿素；NHS、N-ヒドロキシスクシンイミド；ジ-t Boc-リジン-NHS、

30

【0246】

【化31】

N_α, N_ε-ジ-t Boc-L-リジン-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル

; D SPE、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン；PEG₁₀₀₀、1000の平均MWを有するポリ(エチレングリコール)；TFA、トリフルオロ酢酸。

40

【0247】

(C. 物質および試薬)

t Boc-NH-PEG₁₀₀₀-CO₂-NHSを、Shearwater Polymer^{rs}(Huntsville, AL)から得た。

【0248】

【化32】

N_{α}, N_{ϵ} -ジ- t B o c - L - リジン - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル、
 N_{ϵ} -ダンシル - L - リジン

、 N - ヒドロキシスクシンイミド (N H S) 、および N, N' - ジシクロヘキシル - カルボジイミド (D C C) を、 Sigma - Aldrich Canada (Oakville , ON) から購入した。 1 , 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (D S P E) を、 Northern Lipids (Vancouver , BC) から得た。 フルオレスカミンを、 Molecular Probes (Eugene , OR) から得た。 トリフルオロ酢酸、ジエチルエーテル、メタノール、トリエチルアミン、およびクロロホルムを、 Fisher Scientific (Vancouver , BC) から得た。 他の全ての試薬を、さらなる精製なしで使用した。

【 0 2 4 9 】

【 化 3 3 】

t B o c - N H - P E G₁₀₀₀ - C O₂ - (N_{ϵ} -ダンシル) リジン (1)

3 m L の乾燥クロロホルム中の t B o c - N H - P E G₁₀₀₀ - C O₂ - N H S (5 0 0 m g 、 5 0 0 μ m o l) を、 1 . 5 m L のメタノールおよび 3 0 0 μ L のトリエチルアミン中の

【 0 2 5 0 】

【 化 3 4 】

N_{ϵ} -ダンシル - L - リジン

(2 0 0 m g 、 5 3 6 μ m o l) の溶液にゆっくりと添加した。 この反応混合物を室温で 3 時間攪拌した後、溶媒を N₂ 流下で除去し、そして真空下で乾燥させた。 この粗生成物を 6 m L のクロロホルム / メタノール (2 : 1 v / v) 中に溶解させ、 1 . 2 m L の 0 . 5 M H C l で 1 回、そして 1 . 2 m L の蒸留水で 2 回洗浄した。 このクロロホルム相を抽出し、密なペーストまで乾燥し、そして

【 0 2 5 1 】

【 化 3 5 】

t B o c - N H - P E G - C O₂ - (N_{ϵ} -ダンシル) リジン (1)

を、单黄色固体として得た。 収量 : 6 0 0 m g (9 5 %)。 T L C (シリカゲル) クロロホルム / メタノール (8 5 : 1 5 v / v) : R f 0 . 5 0 。

【 0 2 5 2 】

ダンシル化 C P L₁ - t B o c (3)。 最初に、

【 0 2 5 3 】

【 化 3 6 】

t B o c - N H - P E G₁₀₀₀ - C O₂ - (N_ε-ダンシル) リジン - N H S (2)

を、以下のように調製した。2 m L の乾燥クロロホルム中の

【0254】

【化37】

t B o c - N H - P E G₁₀₀₀ - C O₂ - (N_ε-ダンシル) リジン (1)

(600 m g、474 μ m o l) およびN H S (113 m g、982 μ m o l) の溶液を、1 m L の乾燥クロロホルム中に溶解したD C C (150 m g、728 μ m o l) に添加した。この反応混合物を、室温で5時間攪拌した。副生成物のジシクロヘキシル尿素 (D C U) を、パストールピペットを使用して綿栓で濾過した。

【0255】

【化38】

t B o c - N H - P E G₁₀₀₀ - C O₂ - (N_ε-ダンシル) リジン - N H S (2)

を含むこの濾液を、3 m L の乾燥クロロホルムおよび300 μ L のトリエチルアミン中のD S P E (365 m g、488 μ m o l) の溶液にゆっくりと添加した。乾燥クロロホルムおよびトリエチルアミン中へのD S P E の溶解は、65までの加温を必要とした。この反応混合物を室温で一晩攪拌した後、ある程度の沈殿物 (未反応のD S P E) を除去するためにこれを濾過し、そして粘稠性ペーストまで乾燥させた。このペーストを、クロロホルム / メタノール (2 : 1) に溶解させ、従来通り希釈したH C 1 および水で洗浄した。この生成物、ダンシル化されたC P L - *t* B o c (3) を、溶媒の除去および10 m L のエーテルを用いる沈殿の後に得た。収量: 900 m g (96%)。T L C (シリカゲル) クロロホルム / メタノール (85 : 15) R f 0.58。

【0256】

ダンシル化C P L₁ (4)。3 m L のトリフルオロ酢酸 (T F A) を、3 m L のクロロホルム中のダンシル化C P L₁ - *t* B o c (3) (900 m g、456 μ m o l) の溶液に添加し、そして室温で4時間攪拌した。この溶液を、密なペーストまで濃縮し、そしてクロロホルム / エーテルで3回洗浄した。エーテルの除去後、この固体を、6 m L のクロロホルム / メタノール (2 : 1) 中に溶解させ、そして1.2 m L の5%炭酸水素ナトリウムで2回、および1.2 m L の蒸留水で2回洗浄した。クロロホルム相を、密なペーストまで濃縮し、そしてクロロホルム / エーテル洗浄および真空乾燥を通して、精製したC P L₁ (4) を得た。収量: 750 m g (88%)。T L C (シリカ) クロロホルム / メタノール / 水 (65 : 25 : 4) R f 0.72。

【0257】

ダンシル化C P L₂ - *t* B o c (5)。3 m L のクロロホルム中の

【0258】

【化39】

10

20

30

40

N_α, N_ε-ジ-*t* B o c - L-リジン- N-ヒドロキシスクシンイミドエステル

(350 mg、789 mol) の溶液を、300 μL のトリエチルアミンを含む3 mL のクロロホルム中のダンシル化CPL₁(4) (750 mg、400 pmol) に徐々に添加し、そして室温で3時間攪拌した。この反応の完了を、TLC上のニンヒドリンアッセイによる一级アミンの消失によって示した。この反応混合物を、密なペーストまで濃縮し、6 mL のクロロホルム / メタノール(2:1)中に再溶解させ、そして1.2 mL の0.5 M HClで1回、1.2 mL の蒸留水で4回洗浄した。クロロホルム相を抽出し、そして乾燥させた。さらなる精製は行わなかった。収量：700 mg (81%)。TLC (シリカゲル) クロロホルム / メタノール(85:15) Rf 0.58。

【0259】

ダンシル化CPL₂(6)。CPL₂(6)の合成は、ダンシル化CPL₂-*t* B o c(5) (700 mg、318 μmol) の脱保護によって、CPL₁(4)の合成と同様であった。収量：650 mg (92%)。TLC (シリカ) クロロホルム / メタノール / 水(65:25:4) Rf 0.63。

【0260】

ダンシル化CPL₄-*t* B o c(7)。CPL₄-*t* B o c(7)の合成は、

【0261】

【化40】

N_α, N_ε-ジ-*t* B o c - L-リジン- N-ヒドロキシスクシンイミドエステル

(500 mg、1127 μmol) のダンシル化CPL₂(6) (650 mg、292 μmol) での反応によって、CPL₂-*t* B o c(5)の合成と同様であった。希釈したHClおよび水での洗浄に加えて、CPL₄を生成するための脱保護前のCPL₄-*t* B o cを精製するためのさらなる試みは行わなかった。収量：800 mg (粗製)。TLC (シリカゲル) クロロホルム / メタノール(85:15) Rf 0.58 (ダンシルピークのみ)。

【0262】

ダンシル化CPL₄(8)。CPL₄(8)の合成は、ダンシル化CPL₄-*t* B o c(7) (800 mg) の脱保護によって、CPL₁(4)の合成と同様であった。最終生成物を、60、70~230 メッシュのシリカゲルおよびクロロホルム / メタノール / アンモニア溶液(65:25:4 v/v)を使用するカラムクロマトグラフィーによって精製した。収量：300 mg (38%)。TLC (シリカ) クロロホルム / メタノール / 水(65:25:4) Rf 0.15。

【0263】

(IX. 実施例 IX)

(A. 一般的概要)

ここで、本発明者らは、CPL₄が、予め形成されたSPLPに挿入され得、そして得られたSPLP-CPL₄が、BHK細胞において改良された取り込みおよび顕著に改良されたインビトロトランスフェクション力値を示すことを示す。これらの結果は、SPLP系が、内因的に高度に強力なトランスフェクションベクターであることを証明する。

【0264】

(B. 物質および方法)

(1. SPLP、SPLP-CPL₄、および複合体の調製)

10

20

30

40

50

(i) S P L P : D O P E : D O D A C : P E G - C e r C₂₀ (84 : 6 : 10) からなり、そしてプラスミドpL uc (改变されたマーカー遺伝子発現ルシフェラーゼ)を含むS P L Pは、INEX Pharmaceuticals Inc. から提供された。

【0265】

(ii) S P L P - C P L₄ : ダンシル化C P L₄を、本発明者らの研究室で調製し、そしてS P L P内に以下のように取り込んだ : 500 nmolの用量の脂質のS P L Pを、異なる量のC P L₄ (12.5、19、および30 nmol)と共に、60で2~3時間、H e p e s 緩衝生理食塩水、p H 7.5 (H B S) 中でインキュベートし、それぞれ2、3、および4 mol%の最終取り込みに達した。H B S 中で平衡化されたS e p h a r o s e 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って、S P L P - C P Lを、取り込まれていないC P Lから分離した。画分 (1 mL) を集め、そしてC P L、リン脂質およびD N A 含有量についてアッセイした。3つ全てを含む画分をプールし、そしてトランスフェクションおよび取り込み研究における使用のために濃縮した。このカラムからのサンプルは、非常に凝集性であった。この系を脱凝集するために、C a C l₂またはM g C l₂の添加が必要とされる。脱凝集のためのカチオンの最適量を決定するための実験を、方法において後で記載する。

【0266】

C P L アッセイ : C P Lの存在を、それぞれ10および20 nmの励起および発光スリット幅で、_{ex} = 340 nmおよび_{em} = 510 nmを使用するPerkin Elmer LS 52 ルミネセンス分光光度計で、C P Lにおけるダンシル基の蛍光を測定することで決定した。ダンシルの蛍光を、H B S 中のダンシル化C P Lの標準曲線を使用して、定量した。

【0267】

リン脂質アッセイ : リン脂質を、B l i g h - D y e r 技術を使用して、S P L Pから脂質を最初に抽出することによって決定し、次いでF i s k e - S u b b a r o w法 (B l i g h E G, D y e r W J A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol 1959; 37: 911-917; およびF iske C H, Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorous. J Biol Chem 1925; 66: 375-400を参照のこと)に従って、有機相中のホスフェートを測定した。

【0268】

D N A アッセイ : D N A 含有量を、以前に記載したP i c o G r e e n A s s a y キット (M o l e c u l a r P r o b e s, Eugene, Oregon) を使用して測定した (M o k K W C, L a m A M I, C u l l i s P R. S t a b i l i z e d p l a s m i d - l i p i d p a r t i c l e s : f a c t o r s i n f l u e n c i n g p l a m i d e n t r a p m e n t a n d t r a n s f e c t i o n p r o p e r t i e s. B i o c h i m B i o p h y s A c t a 1999; 1419: 137-150を参照のこと)。

【0269】

(iii) 複合体 : 複合体を、25 μLのD O P E : D O D A C (0.8 mM) (INEXによって親切に提供された)を25 μLの88 μg / mLのpL uc (やはりINEXによって提供された)で混合し、続いて30分間のインキュベーションによって、細胞への添加の前に装填比1.5 : 1 + v e / - v e で調製した。

【0270】

(2. 最適挿入時間の決定および脂質取り込み実験のための、0.5 mol%のR h - P Eを含むS P L Pの調製)

S P L Pを、W h e e l e r ら (W h e e l e r ら、G e n e T h e r a p y ; 6 : 271 - 281 (1999)を参照のこと)による記載のように、少しの改変を伴って調製した。脂質D O P E、P E G - C e r C₂₀、D O D A C、およびローダミン - D O P E (50

R h - P E) (すべて C H C l₃ にストック) を、 (83.5 : 10 : 6 : 0.5) のモル比で一緒に混合し、そして C H C l₃ を完全にエバポレートした。得られた脂質フィルムを、20 mM のオクチルグルコピラノシド (OGP) 中に溶解させ、そして 200 pg / mL のプラスミド DNA を添加し、1 mL の全容量にした。OGP を、このサンプルから透析バッグに透析し、48 時間かけて緩衝液 (HBS) を 2 回交換した。得られたサンプルを、D E A E セファロースカラムに通し、そして溶出物を、以前に記載したような不連続のショ糖勾配に供した (Gabizon A, Papahadjopoulos D. Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85: 6949 - 6953 を参照のこと)。得られたローダミン標識 S P L P は、~60 g / mol の DNA / 脂質比を有した。

【0271】

(3. S P L P への C P L₄ の挿入のための、最適インキュベーション時間の決定) S P L P の C P L₄ への最適な挿入のために必要とされる時間を決定するために、5 mol % の C P L₄ (0.3 nmol) を、6 nmol の S P L P (0.5 mol % の R h - P E を含む) と、全容量 1.5 mL で混合し、そして 60 °C の水浴中でインキュベートした。(30 分、1 時間、2 時間、3 時間、および 4 時間) の時点で、250 μL の混合物を、HBS で平衡化したセファロース CL - 4 B カラムに流した。蛍光性ダンシルを有する画分を合わせ、そしてこのダンシルの蛍光を、上記のパラメータを使用して測定し、一方、ローダミンの蛍光を、それぞれ、10 および 20 nm の励起および発光スリット幅で、_{ex} = 560 nm, _{em} = 590 nm を使用して測定した。これらの測定はまた、カラムの前の最初の溶液の小画分で行った。ダンシル / ローダミン比を、最初および最後のサンプルについて計算し、挿入された最初の 5 % のパーセンテージを決定した。

【0272】

(4. C a C l₂ および M g C l₂ を用いる S P L P - C P L₄ の脱凝集)

上記に示されるように、S P L P - C P L₄ の調製は、粒子の凝集を生じる。この系の脱凝集のために、イオン強度の増加が必要とされる。これは、増加した量の C a C l₂ または M g C l₂ (500 mM ストック溶液) の、S P L P - C P L₄ の溶液への添加によって達成される。N i c o m p チューブにおいて、60 μL の S P L P - C P L₄ (3 mM の脂質) に、360 μL の HBS を添加した。次いで、S P L P - C P L₄ (0 mM のカチオン) の平均直径 ± 標準偏差を、N i c o m p M o d e l 270 S u b m i c r o n P a r t i c l e S i z e r を使用する Q E L S によって決定した。次いで、この塩 (C a C l₂ または M g C l₂) を添加し、20 mM ~ 70 mM の濃度にした。各々の間隔で、平均直径 ± 標準偏差を、Q E L S により決定した。この粒子の平均直径は、[カチオン] の増加によりほとんど変化しなかったが、Q E L S G a u s s i a n 分散は広くなつた。従つて、標準偏差を、脱凝集の基準として使用した。

【0273】

(5. S P L P - C P L₄ および S P L P のサイズ決定)

Wheeler ら (Wheeler J J ら、S t a b i l i z e d p l a s m i d - l i p i d p a r t i c l e s : c o n s t r u c t i o n a n d c h a r a c t e r i z a t i o n . G e n e T h e r a p y 1999; 6: 271 - 281 を参照のこと) に従つて、S P L P - C P L₄ (C a C l₂ を含まない)、S P L P - C P L₄ + 40 mM C a C l₂、および S P L P について凍結破断 EM を行った。S P L P - C P L₄ は、4 mol % の C P L₄ を含んだ。S P L P - C P L₄ の顕微鏡写真 (C a C l₂ の存在または不在下で) を、凝集における C a²⁺ の視覚的効果を示すために、比較した。S P L P - C P L₄ + 40 mM C a C l₂ および S P L P の小胞の直径を、N i c o m p M o d e l 270 S u b m i c r o n P a r t i c l e S i z e r を使用する Q E S L によって分析した。

【0274】

10

20

30

30

40

50

(6. S P L P - C P L₄粒子の血清安定性)

種々の%のCPLを含むSPLP-CPLの血清安定性を、この粒子をマウス血清と、50%vの最終血清濃度に混合することによって決定した。次いで、これらの混合物を、37で0、1、2、または4時間インキュベートした。これらの時点で、約1μgのプラスミドDNAを含む混合物の容量を取り除き、そしてこのDNAを、フェノール：クロロホルム抽出を使用して、脂質およびタンパク質から抽出した。次いで、得られたDNA溶液を、1%のアガロースゲル上で電気泳動し、続いてこのDNAをニトロセルロースに移し、そしてサザンプロットを行った。

【0275】

(7. SPLP-CPL₄の脂質分析)

CPL₄の挿入の間の、SPLPからのPEG-CerC₂₀の損失を決定するために、B1igh-Dyer抽出によって、SPLPサンプルおよびSPLP-CPL₄サンプルについて脂質を抽出した。次いで、この混合物をHPLCに通し、そしてNorthern Lipids, Inc (Vancouver, BC)によってDOPEおよびPEG-CerC₂₀についてアッセイした。SPLP-CPLについてのDOPE:PEG-CerC₂₀比を、SPLPについての比と比較し、そしてSPLPの外側単層におけるPEG化された(PEGylated)脂質の量を決定した。

【0276】

(8. 取り込み研究)

全てのインビトロ実験について、使用された細胞は形質転換されたBHK細胞株(tk-)であった。取り込み研究について、1×10⁵のBHK細胞を、12-ウェルプレート上、37で、5%のCO₂中、2mLの完全培地(DMEM+10%FBS)中で一晩増殖させた。SPLP、SPLP-CPL₄+40mM CaCl₂、またはDOPE:ODAC複合体(200μL)(この各々は、脂質マーカーとして0.5mol%のRh-PEを含む)を、800μLの完全培地で混合し、そしてこの混合物を20μLの脂質用量で細胞の頂部に添加した。37で、2、4、6、または8時間インキュベートした後、この細胞をPBSで洗浄し、そして600μLの溶解緩衝液(PBS中の0.1%のTriton X-100)でリソスした。この溶解物のローダミン蛍光を、Perkin-Elmer LS52発光分光計上、1.0mLのマイクロキュベット中で、それぞれ10および20nmのスリット幅で560nmの_{ex}および600nmの_{em}を使用して、測定した。430nmの発光フィルタもまた使用した。脂質の取り込みを、溶解物における蛍光を、標準脂質およびBCAプロテインアッセイ(Pierce, Rockford, IL)によって決定された細胞の量に対して規格化された脂質の蛍光と比較することによって、決定した。示される場合、蛍光の顕微鏡写真を、Axiovert 100 Zeiss蛍光性顕微鏡(Carl Zeiss Jena GmbH)で、Omega Opticals(Brattleboro, VT)からのローダミンフィルターを使用して、以下の仕様で得た。_{ex}=560±20nm、600nm LP、およびDC 590nm。

【0277】

(9. 脂質の結合および取り込みにおける、カチオンの型および濃度の効果)

この取り込み実験を、上記の同様のSPLP-CPL₄(0.5mol%のRh-PEを含む)で行った。5×10⁴のBHK細胞を、24-ウェルプレート中の1mLの完全培地中に、一晩プレートした。SPLP-CPL₄(40nmol)を、20mM~70mMの種々の初期濃度でのCaCl₂またはMgCl₂と、100μLの全容量で混合した。これに、400μLの完全培地を添加し、4mM~14mMの最終[カチオン]を生じた。次いで、この混合物を、細胞の頂部に添加し、そしてこの細胞を4時間インキュベートした。この細胞をインキュベートした後、この細胞を、PBSで2回洗浄し、そして600μLの溶解緩衝液(PBS中の0.1%のTriton X-100)を添加した。上記のように、ローダミン蛍光を測定し、そして脂質取り込みを、得られた蛍光を既知量の脂質を含む標準サンプルの蛍光と比較して決定した。次いで、得られた値を、BCAプロ

10

20

30

40

50

テインアッセイキットを使用してタンパク質含有量を測定することによって、細胞数に対して規格化した。

【0278】

(10. トランスフェクション研究)

1 × 10⁴のBHK細胞を、150 μLの完全培地中の96 - ウエルプレートにプレートし、そして37、5%のCO₂中で一晩インキュベートした。SPLPおよびSPLP - CPL (2と4 mol%の間のCPLを含む)を、0.5 μgのDNAを、20 μLの全容量で、HBS (SPLP) またはHBS + 40 mMのCaCl₂ (SPLP - CPL₄)を使用して送達するために調製し、そして90 μLの完全培地に添加した。サンプルを、この細胞と共に4時間インキュベートした。次いで、このトランスフェクション培地を、24時間のインキュベーションの完了のために、完全培地に置換した。次いで、細胞を100 μLの溶解緩衝液でリーンスし、そして40 μLの溶解物を、96 - ウエル発光プレートに移した。ルシフェラーゼ活性を、ルシフェラーゼ反応キット (Promega, Madison, WI)、ルシフェラーゼ標準物質 (Boehringer-Manheim)、およびMolecular Dynamics (Chantilly, VA)からのML3200マイクロタイタープレートル照度計を使用して決定した。活性を、BCAプロテインアッセイ (Pierce, Rockford, IL) によって測定した細胞の数について規格化した。上記の取り込みおよびトランスフェクション実験から、SPLP - CPL₄中の4 mol%のCPL₄が、最適な結果を与えることを決定した。従って、実験の残りを、4 mol%のCPL₄を含むSPLP - CPL₄を用いて行った。

10

20

【0279】

(11. SPLP - CPL対SPLPおよび複合体のトランスフェクションの時間経過)サンプルおよび細胞を、上記のトランスフェクション研究について記載したように調製し、そして一緒に37でインキュベートした。同様に、pLucを含むリポフェクチン (Gibco BRL,) 複合体を、1.5 : 1の充填比で調製した。4、9、および24時間でトランスフェクション培地を除去し、そして、4および9時間のトランスフェクションの場合、24時間のインキュベートの完了のために完全培地に置換した。24時間で、全ての細胞を溶解させ、そして上記のように、ルシフェラーゼ活性およびタンパク質含有量 (BCAアッセイ)についてアッセイした。

【0280】

30

(12. SPLP - CPL₄のトランスフェクション力価および毒性)

BHK細胞を、SPLP、SPLP - CPL₄ + 40 mMのCaCl₂、およびリポフェクチン複合体と共に、24時間または48時間インキュベートした。インキュベートの後、この細胞を即座に溶解させ、そしてルシフェラーゼ活性を測定し、そしてこれを上記のように、存在するタンパク質の数に対して規格化した。

【0281】

上記の時点での、細胞生存の大まかな測定の場合、24および48時間の細胞溶解の後のタンパク質濃度を、測定し、そしてSPLP - CPL₄ + 40 mMのCaCl₂およびリポフェクチン複合体について比較した。

【0282】

40

(13. BHK細胞のトランスフェクションにおけるCa²⁺およびMg²⁺の効果の比較)

細胞を、上記のようにプレートし、そして使用した。CaCl₂またはMgCl₂のいずれかを20 mM ~ 70 mMの濃度で有するSPLP - CPL₄ (5.0 μg/mL)を、20 μLの容量に合わせ、そして完全培地と混合し、4 mM ~ 14 mMの最終 [カチオン] を生じた。細胞の48時間のインキュベートに続いて、この細胞を洗浄およびリーンスし、そして上記のようにルシフェラーゼ活性およびタンパク質含有量について測定した。

【0283】

(14. SPLP - CPL₄のトランスフェクション効率の測定)

SPLP - CPLのトランスフェクション効率を、界面活性剤透析手順を使用して、GF

50

P (緑色蛍光タンパク質)を発現するカプセル化されたpEGFP (Inexによって親切に提供された)を含むSPLP-CPL₄を調製することによって測定した (Wheelerら、前出を参照のこと)。400 μg/mLのpEGFPを、10 mMのDOPA : PEG-CerC20 : DODAC (84 : 10 : 6)にカプセル化し、続いて4 mol %のCPL₄を挿入した。pEGFPを含むDOPA : DODAC複合体およびリポフェクチン複合体をまた、1.5 : 1の充填比で調製した。トランスフェクトを、以前に記載したように、5.0 μg/mLのDNA用量で行った。サンプルの24および48時間のインキュベートに続いて、トランスフェクション培地を除去し、細胞を洗浄し、そしてこの細胞に新たな培地を添加した。次いで、この細胞をZeiss蛍光顕微鏡で見た。フレーム内の全細胞数を計測した：次いで、以下の仕様で、フルオレセインフィルター (0 mega Opticals)を使用して、GFPを発現する細胞の数を計測した。_{ex} = 470 ± 20 nm, _{em} = 535 ± 22.5 nm、およびDC ~ 500 nm。トランスフェクションの効率は、GFPを発現する細胞の数を、全細胞数で除算したものである。

【0284】

(C. 結果および考察)

(1. CPL₄の挿入後のSPLP-CPL₄凝集体および2価カチオンの添加後の脱凝集)

CPLを含むLUVは凝集する傾向があり、そしてこの凝集は、培地のイオン強度の増加によって阻害され得る。SPLP-CPL₄もまた凝集に対して感受性であり、そしてこの凝集は、SPLP-CPL₄処方物にNaCl、CaCl₂またはMgCl₂を添加することによって無効となり得ることが見出された。この効果は、図31に示され、これは擬弾性光散乱 (QELS) によって測定された粒子の平均直径の標準偏差における変化によってモニターされる、SPLP-CPL₄の凝集におけるCaCl₂およびMgCl₂の添加の効果を示す。両方のカチオンについて、標準偏差は減少し、カチオン濃度は増加し、30 ~ 40 mMで最適な脱凝集が起きた。この挙動はまた、凍結破断電子顕微鏡検査法によって可視化され得る。SPLPの凍結破断顕微鏡写真は、小さな単分散粒子を示すが、CaCl₂の非存在下におけるSPLP-CPL₄の調製は、高度に凝集性である。40 mMのCaCl₂の添加はこの凝集を無効にし、SPLP調製と同様の単分散粒子を生成する。サンプル調製および電子顕微鏡検査法の詳細については、Wheelerら、Gene Therapy; 6 : 271 - 281 (1999) を参照のこと。

【0285】

CaCl₂の存在下でのSPLPおよびSPLP-CPL₄のサイズを、QELSおよび凍結破断電子顕微鏡検査法を使用して比較した。QELS研究は、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であることを示したが、凍結破断研究は、68 ± 11 nmおよび64 ± 14 nmの直径を示した。SPLPについてのこれらの値は、以前の研究と近接して一致する。

【0286】

(2. CSPLP-CPL₄の化学的組成および安定性)

SPLP-CPL₄およびSPLPの脂質組成物を、以下の表9に示す：

【0287】

【表7】

10

20

30

40

表 9

CPL₄挿入後のSPLPからのPEG-CerC₂₀の損失

	[DOPE] (mM)	[PEG-CerC ₂₀] (mM)	DOPE:PEG-C ₂₀	% PEG-CerC ₂₀ (挿入後)
	0.786	0.0714±0.0004	11.0±0.1 (81.6:7.4; mol)	79.7±0.9%
SPLP-CPL ₄	0.790±0.007	0.0572±0.0003	13.8±0.1 (81.6:x; mol)	(x=5.9±0.1mol %)

SPLP自体の分析によって、DOPE:PEG-CerC₂₀のモル比は11.0(±0.1):1であった。これは、DOPE:PEG-CerC₂₀:DODACの(81.6:10.9:7.4)の系に対応する。この結果より、79.7±0.9%のPEG-CerC₂₀が、CPL₄の挿入後に残っている。これは、5.9±0.1%のPEG-CerC₂₀の最終mol%に対応する。これは、約1.5±0.1mol%のPEG-CerC₂₀が、CPL₄の挿入の間に置換されたことを意味する。内部リーフレットおよび外部リーフレット上で、同じ量のPEG-CerC₂₀が、最初に7.4mol%で存在すると本発明者らが想定する場合、外部リーフレットは、挿入の後に4.4±0.1mol%のPEG-CerC₂₀を有する。本発明者らは4.5mol%のCPL₄をSPLPに挿入したため(外部リーフレットに9.0mol%)、外部リーフレットにおいて合計で13.4±0.1mol%の全PEGが生じる。

【0288】

50%マウス血清中で、4時間までのSPLPおよびSPLP-CPL₄の安定性。全ての場合において、DNAは、血清分解から完全に保護された。

【0289】

(3.SPLP-CPL₄は、BHK細胞への増大した取り込みおよび劇的に増大したトランسفエクション力値を示す。)

実験の次のセットは、組み込まれたCPL₄の、BHK細胞へのSPLPの取り込みにおける影響、および得られたSPLP-CPL₄系のトランسفエクション力値の決定を目的とした。4mol%までのCPL₄を含むSPLPを、40mMのCaCl₂の存在下で調製し、そしてこれをBHK細胞に添加し(最終CaCl₂濃度は8mM)、そして種々の時間でインキュベートした。次いで、この細胞を、方法において示したように、関連したSPLP-CPL₄についてアッセイした。図32に示されるように、CPL₄を含まないSPLPの取り込みは、8時間のインキュベートの後であっても最小であるが、取り込みは、3mol%またはそれ以上のレベルのCPL₄を含むSPLPについては劇的に改善される。例えば、4mol%のCPL₄を含むSPLPは、8時間で蓄積レベル(accumulation levels)を示し、これは、SPLPについての活性化よりも約50倍高い。この増大した取り込みは、ローダミン標識されたSPLPおよびSPLP-CPL₄を4時間インキュベートした後に、BHK細胞の蛍光顕微鏡写真を使用して、視覚的に検出され得る。4mol%のCPL₄の存在は、細胞付随SPLPの改善されたレベルを明らかに生じる。

【0290】

SPLP、SPLP-CPL₄およびプラスミドDNAカチオン性脂質複合体(DODA C/DOPE; 1:1; 1.5:1 +ve/-ve c.r.)のトランسفエクション特性を、複合体について一般に使用されるインキュベーションプロトコルを使用して検

10

20

30

40

50

査した。これは、 10^4 のBHK細胞を、SPLP、SPLP-CPL₄および0.5 μgのpCMVLucを含む複合体で4時間インキュベートし、続いてSPLP、SPLP-CPL₄または細胞に付隨していない複合体の除去、培地の置換、さらに20時間のインキュベート、次いでルシフェラーゼ活性についてのアッセイからなる。SPLP-CPL₄調製物は、インキュベーション培地中に7mMのCaCl₂を含んだ。図33に示されるように、CPL₄の存在は、SPLP系のトランスフェクション力価において劇的な増加を生じた。4mol%のCPL₄を含むSPLP-CPL₄は、SPLPでの活性化よりもおよそ 3×10^3 高いルシフェラーゼ発現レベルを示した(Mokら、Biophys Acta, 1419: 137-150 (1999)を参照のこと)。

【0291】

(4.Ca²⁺は、SPLP-CPL₄のトランスフェクション活性について必要とされる)

SPLP-CPL₄のトランスフェクション活性におけるCa²⁺の影響の決定が目的である。4mol%のCPL₄を含むSPLPを、0~14mMのMgCl₂およびCaCl₂の存在下で、BHK細胞と共に48時間インキュベートし、次いでルシフェラーゼ活性を決定した。図34に示されるように、トランスフェクション活性は、トランスフェクション培地におけるCa²⁺の存在によって影響される。10mMの最適なCaCl₂濃度で、SPLP-CPL₄は、MgCl₂が存在する場合よりも 10^4 より高いトランスフェクション力価を示した。

【0292】

0~14mMのMgCl₂およびCaCl₂の存在下でのインキュベートに続いて、BHK細胞へのSPLP-CPL₄の取り込みをモニターした。図35に示されるように、BHK細胞によって取り込まれるSPLP-CPL₄の量は、Mg²⁺およびCa²⁺を含む培地の両方について同じである。SPLP-CPL₄の取り込みは、2価のカチオンの濃度の上昇に伴って減少し、これは恐らく、BHK細胞表面上の、CPL₄に対する陰電荷結合部位の防護により生じる。

【0293】

(5.SPLP-CPL₄は、複合体を用いて達成したものと比較し得るか、またはこれより大きなインビトロトランスフェクション力価を示す。)

図33に示される結果は、SPLP-CPL₄よりも~100倍高いレベルのトランスフェクションを引き起こす複合体は、BHK細胞との固定された4時間のインキュベート時間によって得られ、続いて20時間の保持時間によって最大の発現に達することを示す。SPLP-CPL₄が安定な系である場合、BHK細胞への取り込みは長時間続くようである。このトランスフェクションレベルは、SPLP-CPL₄および複合体のBHK細胞でのインキュベートの時間が8および24時間に延長され、続いて、それぞれ16および0時間の保持時間がなされた場合に達成された。2つの型のプラスミドDNA-カチオン性脂質複合体を使用し、(すなわち、DOPE:DODAC(1:1)複合体(1.5:1, c.r.))、そして複合体を、市販のトランスフェクション試薬リポフェクチン(DOPE/DOTMA[1:1]複合体, 1.5:1 c.r.)を使用して得た。図36に示されるように、SPLP-CPL₄のトランスフェクション力価はインキュベート時間の増加と共に著しく増加し、4時間のインキュベート時間によって達したトランスフェクションについての制限因子が、SPLP-CPL₄系の取り込みの速度であることを示唆する。24時間のインキュベート時間で到達した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複合体によって到達したものに匹敵する。

【0294】

24および48時間のインキュベート時間の後のトランスフェクションレベルを決定するためにさらなる実験を行い、このインキュベート時間の直後にルシフェラーゼ活性についてアッセイした。図37Aに示されるように、リポフェクチン(DOPE/DOTMA; 1:1)複合体の活性を、~2000nm/mgで24時間後に安定させた。対照的に、インキュベート時間の増加に伴ってSPLP-CPL₄処方物の活性の増加を続け、48

10

20

30

40

50

時間で 4 0 0 0 n g / m g 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⁺の非存在下で) について観察されたものより約 10⁶倍高く、そしてリポフェクチン複合体によって達成され得るレベルのほぼ 2 倍であった。同様の結果を、DOPPE:DODAC 複合体について得た。

【0295】

(6. SPLP-CPL₄は、非毒性かつ効率的なトランスフェクト剤である)
プラスミドDNA-カチオン性脂質複合体が、細胞に対して毒性であることは周知である。このSPLP-CPL₄は低レベルのカチオン性脂質を含み、そして複合体よりも潜在的に低毒性である。SPLP-CPL₄および複合体の毒性を、0.5 μg のプラスミドおよび~30 nmol の全脂質に対応するレベルのSPLP-CPL₄および複合体に 4 10 時間曝露した後、細胞の生存度を決定することによってアッセイした。図37Bに示されるように、SPLP-CPL₄は、あつたとしてもほとんど毒性を示さない。細胞の生存は、リポフェクチン複合体で 48 時間インキュベートした後はわずかに 30 % であったが、SPLP-CPL₄で 48 時間インキュベートした後は 95 % の細胞が生存した。

【0296】

ベクターによってトランスフェクトされる細胞の割合によって示されるトランスフェクションの効率はまた、重要なパラメーターである。トランスフェクトされる細胞の割合を、緑色蛍光性タンパク質 (GFP) を保有するプラスミドを使用して推定した。蛍光顕微鏡を使用して、細胞内の蛍光性タンパク質の発現によってトランスフェクトを検出した。図37Aおよび38Bに示されるように、24時間で約 35 % の細胞、および 48 時間で 5 20 % の細胞が、見かけ上の細胞死なく SPLP-CPL₄によってトランスフェクトされた。対照的に、リポフェクチン複合体は、35 % 未満の最大トランスフェクション効率を示し、そして 24 時間のトランスフェクション時間後には 50 % の細胞のみが生存した。DOPPE:DODAC 複合体でもまた、同様の低いトランスフェクション効率および高い毒性が見られた。

【0297】

この研究の結果は、CPL₄のSPLPへの組み込みが、BHK 細胞への改善された取り込みおよび Ca²⁺が存在する場合に劇的に増大した SPLP のトランスフェクション力値を生じることを実証する。興味深い 3 つの点が存在する。第 1 は、SPLP-CPL₄系の化学的組成および構造、ならびに SPLP の栄養価値およびトランスフェクション力値の改変のための前挿入手順の一般性に関連する。第 2 は、増大した SPLP の取り込み、Ca²⁺の存在および観察されたトランスフェクション活性の間の関係に 30 関連する。最後に、プラスミドDNA-カチオン性脂質複合体を有する SPLP-CPL₄系の性質の比較が目的である。

【0298】

第 2 の考察の点は、CPL₄が SPLP 系のトランスフェクション力値を増加させる機構に関連する。明らかに、CPL₄の存在が SPLP の BHK 細胞への取り込みを増加させるが、トランスフェクション力値における増加は、ほぼ全般的に追加の Ca²⁺の存在に依存する。8 時間のインキュベートの後、4 mol % の CPL₄の存在が、BHK 細胞への SPLP の取り込みを約 50 倍増加させ、一方で、(Ca²⁺の存在下での) トランスフェクション力値を~10⁴の倍率だけ増加することが注目され得る。SPLP に関して行われた以前の研究は、Ca²⁺の存在が~600 のトランスフェクション力値の最大増加を生じ、この力値における増加が、Ca²⁺の、それ自体の取り込みにおける増加よりも、取り込みの後のエンドソーム膜の不安定化を補助する能力から生じることを示した。同様に、このことは SPLP-CPL₄系についての、SPLP 系を超えるトランスフェクション力値における改善は、取り込みにおける CPL₄依存性増加の、取り込み後の細胞内送達における Ca²⁺依存性の改善による乗算に起因することを示唆する。

【0299】

最後の議論の領域は、他の非ウイルスベクターより優れた SPLP-CPL₄系の利点を考慮し、これには、SPLP-CPL₄系の十分に規定されたモジュラー性質、ならびに

10

20

30

40

50

毒性および潜在力の問題が挙げられる。第一に、1粒子あたり1つのプラスミドを含む、小さな均一な安定な系として十分に特徴付けられる、SPLP-CPL₄の性質は、1つの複合体あたり十分には規定されていない数のプラスミドを含む、大きな不均一な不安定な系である、プラスミドDNA-カチオン性脂質複合体のような非ウイルス系と、対照的である。重要な点は、SPLPが、より複雑な系（例えば、SPLP-CPL₄）の基本的な構成要素であり、モジュラーの様式で構築され得ることである。例えば、CPLのカチオン性基の代わりに特異的な標的リガンドを含むPEG-脂質の後の挿入は、特定の細胞および組織に特異的に標的とされるSPLPを生じるべきである。毒性に関して、SPLP-CPL₄は、組織培養において、BHK細胞に対する毒性が顕著により低いことが明らかである。このことは恐らく、SPLPに含まれるカチオン性脂質の割合が、複合体と比較して低いことに関連する。SPLP-CPL₄のトランスフェクション能力および効率は、複合体を用いて達成され得るレベルに明らかに匹敵する。この知見は、関与する複合体によるトランスフェクションのモデルを提唱することが、注目されるべきである。
10

【0300】

本実施例において、市販の複合体系（例えば、リポフェクチン）と比較したSPLP-CPL₄の優れた点を実証した。従って、高いトランスフェクション効力を有するがウイルスに関する問題を何も有さない合成ウイルスが、開発された。これらの陳述を確証するために、多くの点が挙げられ得る。第一点は、電荷の位置付けを考慮する。複合体においては、電荷は脂質二重層の表面に位置するが、SPLP-CPL₄は、リポソーム表面から大きく離れ、リポソームを囲む保護的なPEGコーティングの上に局在化する、ベシクル表面上に電荷を有する。複合体の場合には、リポソーム表面に結合するタンパク質は、RESのマクロファージによる認識およびクリアランスを引き起こし得る（Chonnら、J Biol Chem; 267: 18759-18765 (1992)を参照のこと）。SPLP-CPL₄においては、二重層の表面の電荷はPEGコーティングにより保護されており、その結果、これが生じない。しかし、SPLP-CPL₄の電荷は、リポソームと細胞との会合を可能にし、最終的な取り込みおよびトランスフェクションを生じる。
20

【0301】

複合体と比較した、SPLP-CPL₄の大きさおよび血清安定性は、特にウイルス系の能力に接近することが望まれる場合に、効果的な遺伝子送達系のための重要なパラメータである。SPLP-CPL₄は、本明細書において、複合体（これは頻繁に、直徑がミクロンのオーダーである）と比較して、比較的小さな大きさ（約100nm）であることが示された。この小さな大きさは、より大きな開窓を有する部位（例えば、腫瘍、および炎症部位）での蓄積を可能にするべきである（Kohnら、Lab Invest; 67: 596-607 (1992)を参照のこと）。先に記載したように、SPLP-CPL₄中のDNAは、外部環境から保護されている（すなわち、血清中のDNaseによる分解を引き起こしにくい）ことが示されたのに対し、複合体中のDNAは、DNaseに感受性である（Wheelerら、Gene Therapy; 6: 271-281 (1999)を参照のこと）。

【0302】

ウイルス（Hermonatら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 81: 6466-6470 (1984)；Lebkowskiら、Mol. Cell Biol; 8: 3988-3996 (1988)；Keirら、J. Neurovirol. 3: 322-330 (1997)を参照のこと）および脂質/DNA複合体（Felgnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 84: 7413-7417 (1987)；Felgnerら、J. Biol. Chem; 269: 2550-61 (1994)；Hoflandら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 93: 7305-7309 (1996)；Bebookら、J. Pharm. Exp. Ther.; 279: 1462-1469 (1996)；Gaoら、Gene Therapy; 2: 710-722 (1995)を参照のこと）は、インビトロでの高いトランスフ
40
30
40
50

エクション能力を有することが示された。従って、これは、ウイルス品質に達するべきである場合には、SPLP-CPL₄系が、これらの高いトランスフェクションを達成し得るべきであることを説明する。このことは、BHK細胞上のSPLP-CPL₄系により実際に達成され、トランスフェクションレベルは、市販の複合体系（すなわち、リポフェクチン）より2高い因子に達した。このことは、少量のトランスフェクションのみを示したSPLPより非常に大きな改善である。

【0303】

遺伝薬物の効率的な全身送達およびトランスフェクションは、上記利点に起因して、このSPLP-CPL₄系を使用して、達成される。SPLP-CPL₄を用いるインピトロでの非常に高いトランスフェクションが、達成された。さらに、CPL上上の正電荷の位置が、PEG/CerのPEGが最初にこれをマスクする位置である系である。このことは、より短いPEG部分を有するDSP-E-PEG-CPL₄の合成により、達成される。これは、疾患部位におけるその蓄積、引き続くPEG-Cerの制御された放出を可能にし、正電荷を周囲の細胞に曝露する。

【0304】

（実施例X）

本実施例は、長鎖CPL対短鎖CPLによる、BKH細胞のトランスフェクション速度を示す。

【0305】

上記からの合成方法を使用して、CPL(PEG 3.4k)およびCPL(PEG 1k)を生成し、そして各々を、上記のようにPEG-₂₀₀₀-Cer C20を含む別個のSPLP系に挿入した。図38は、PEG 3.4kを有するCPL対PEG 1kを有するCPLのトランスフェクション速度を示す。CPL中の短鎖PEGは、長鎖CPLによるトランスフェクションと比較して、約4の因子の減少を生じる。いかなる特定の理論にも束縛されることなく、長鎖CPL(PEG₃₄₀₀)は表面の上に突き出るのに対し、短鎖CPL(PEG₁₀₀₀)はSPLPの表面に埋没する（マスクされる）と考えられる。短鎖CPLの減少したインピトロでのトランスフェクションは、これがインピボでの循環を改善したことを明らかに提唱する。

【0306】

（実施例XⅠ）

本実施例は、CPLP8が、LUVへの挿入に関してCPLP4と同様に挙動すること、およびCPL8-LUV系を用いてトランスフェクションが達成され得ることを示す。

【0307】

【表8】

10

20

30

表10
SPLP およびLUVににおけるCPL₈の挿入

SPLP	初期 mol % CPL ₈	% 挿入	最終 mol % CPL ₈
	1.11	97%	1.07
	1.39	85%	1.19
	1.67	95%	1.60
	1.94	87%	1.70
LUV	初期 mol % CPL ₈	% 挿入	最終 mol % CPL ₈
	1.05	79%	0.82
	1.39	71%	0.99
	1.74	76%	1.32
	2.11	89%	1.88

10

20

CPL₈の、LUVおよびSPLPへの挿入は、CPL₄の挿入に関して観察されたものと非常に類似している。BHK細胞上のこれらの粒子のトランスフェクションおよび取り込みに関して、種々の結果が得られ、CPL₈は、あるときにはCPL₄より良好に機能し、そして他のときにはその逆である。

【0308】

(実施例XII)

マウス線維芽細胞腫細胞株Neuro-2a (ATCC-CCL-131)を使用する、このインピトロでの実施例において、SPLP-CPL4 [1k]を使用して、種々のCa²⁺濃度に対する遺伝子発現を決定し、そして標準的なSPLP (PEG-CerC20

10% ; CPL4 [1k] 4% ; および他の成分 ; DNA : 脂質の比 = 0.05)を使用する遺伝子発現と比較する。

30

【0309】

5 × 10⁴細胞 / ウェルを、1mLの完全培地(可欠アミノ酸およびハンクス緩衝塩溶液を含むMEM (Eagle) (10% FBSを含む))中で24ウェルプレート内にプレート化する。プレートを、5.0% CO₂で37℃で一晩インキュベートする。以下に記載する各群に、500μLのトランスフェクション培地を添加して、3倍にする。

【0310】

【表9】

表 11

ウェル-番	SPLP + SPLP-CPL (μ g)	[Ca ²⁺] (250 mM) (μ L)	完全培地 (μ L)
A (0 mM Ca ²⁺)	2.5	0	1980
B (2 mM Ca ²⁺)	2.5	48	1932
C (4 mM Ca ²⁺)	2.5	96	1884
D (6 mM Ca ²⁺)	2.5	144	1836
E (8 mM Ca ²⁺)	2.5	192	1788
F (10 mM Ca ²⁺)	2.5	240	1740
G (12 mM Ca ²⁺)	2.5	288	1692
H (14 mM Ca ²⁺)	2.5	336	1644

10

20

1 ウェルあたり 2 . 5 μ g の D N A を、完全にカプセル化した S P L P 中 (全溶液 0 . 5 m L) で添加する。プレートを 8 時間インキュベートする。トランスフェクション培地を除去する。1 m L の完全培地を戻して添加する。細胞を、37 、 5 . 0 % C O₂ でさらに 24 時間インキュベートする。

【 0 3 1 1 】

分析のために、培地を細胞から除去し、そしてこれらの細胞を P B S で 2 回洗浄し、次いで -70 で凍結させる。細胞を、150 ~ 200 μ L の 1 × C C L R で溶解する；次いでプレートシェーカーで 5 分間振盪する。20 μ L の溶解物を、96 ウェル発光プレートに移す。プレートを読み取って、ルシフェラーゼ活性を決定する。

【 0 3 1 2 】

この結果を図 3 9 に示す。この図に見られるように、S P L P + 4 m o l % C P L 4 - 1 k は、N e u r o - 2 a 細胞において、S P L P 単独より 4 枝多い遺伝子発現を生じる。カルシウムの効果は、この実験においては有意ではないと考える。生成したルシフェラーゼの量は、2 ~ 14 mM C a 2 + で同じままである。

【 0 3 1 3 】

(実施例 X I I I)

このインビポの実施例は、C 5 7 / b 1 6 マウスにおける C P L₄ - 1 - k L U V (S P L P は、短鎖 C P L を含む) の薬物動力学および体内分布を開示する。増加した量の C P L - 4 - 1 k を含む異なる S P L P 処方物を、最適なクリアランス特性を決定するために、インビポアッセイする。

【 0 3 1 4 】

C P L₄ - 1 k S P L P を、以前のプロトコルに従って調製する。使用の前に、全てのサンプルを、投与前に実際の組成物を決定するために特徴付ける。全てのサンプルを、濃縮を行うために、希釈の前に滅菌濾過する。全てのサンプルは、滅菌クリンプトップバイアル中に提供されるべきである。全てのバイアルを、処方の日付、脂質組成、および特定の活性について標識する。³ [H] C H E を、1 μ C i / m g の脂質で組み込む。以下の処方物を作製し、そして分析する：

【 0 3 1 5 】

【 表 1 0 】

30

40

A: ³ [H]CHE-LUV	DOPE:DODAC:PEGC20::84:6:10
B: ³ [H]CHE-LUV	DOPE:DODAC:PEGC20::84:6:10 + 1 mol% CPL-4-1k
C: ³ [H]CHE-LUV	DOPE:DODAC:PEGC20::84:6:10 + 2 mol% CPL-4-1k
D: ³ [H]CHE-LUV	DOPE:DODAC:PEGC20::84:6:10 + 3 mol% CPL-4-1k
E: ³ [H]CHE-LUV	DOPE:DODAC:PEGC20::84:6:10 + 4 mol% CPL-4-1k

10

実験は、100匹のC57 / b16マウス、雌、18 - 23gを使用し、この全てをHarlan Sprague Dawleyから購入した。全ての動物をグループ当たり4匹で、25グループで収容した。

【0316】

【表11】

表 12

グループ	マウス	処理	時点	アセト
A	4	A:DOPE:DODAC:PEGC20:84:6:10	15 分	PK
B	4	A: DOPE:DODAC:PEGC20:84:6:10	1 時間	PK
C	4	A: DOPE:DODAC:PEGC20:84:6:10	4 時間	PK
D	4	A: DOPE:DODAC:PEGC20:84:6:10	8 時間	PK
E	4	A: DOPE:DODAC:PEGC20:84:6:10	24 時間	PK
F	4	B: DOPE:DODAC:PEGC20:84:6:10 + 1 mol % CPL-4-1k	15 分	PK
G	4	B: DOPE:DODAC:PEGC20:84:6:10 + 1 mol % CPL-4-1k	1 時間	PK
H	4	B: DOPE:DODAC:PEGC20:84:6:10 + 1 mol % CPL-4-1k	4 時間	PK
I	4	B: DOPE:DODAC:PEGC20:84:6:10 + 1 mol % CPL-4-1k	8 時間	PK
J	4	B: DOPE:DODAC:PEGC20:84:6:10 + 1 mol % CPL-4-1k	24 時間	PK
K	4	C: DOPE:DODAC:PEGC20:84:6:10 + 2 mol % CPL-4-1k	15 分	PK
L	4	C: DOPE:DODAC:PEGC20:84:6:10 + 2 mol % CPL-4-1k	1 時間	PK
M	4	C: DOPE:DODAC:PEGC20:84:6:10 + 2 mol % CPL-4-1k	4 時間	PK
N	4	C: DOPE:DODAC:PEGC20:84:6:10 + 2 mol % CPL-4-1k	8 時間	PK
O	4	C: DOPE:DODAC:PEGC20:84:6:10 + 2 mol % CPL-4-1k	24 時間	PK
P	4	D: DOPE:DODAC:PEGC20:84:6:10 + 3 mol % CPL-4-1k	15 分	PK
Q	4	D: DOPE:DODAC:PEGC20:84:6:10 + 3 mol % CPL-4-1k	1 時間	PK
R	4	D: DOPE:DODAC:PEGC20:84:6:10 + 3 mol % CPL-4-1k	4 時間	PK
S	4	D: DOPE:DODAC:PEGC20:84:6:10 + 3 mol % CPL-4-1k	8 時間	PK
T	4	D: DOPE:DODAC:PEGC20:84:6:10 + 3 mol % CPL-4-1k	24 時間	PK
U	4	E: DOPE:DODAC:PEGC20:84:6:10 + 4 mol % CPL-4-1k	15 分	PK
V	4	E: DOPE:DODAC:PEGC20:84:6:10 + 4 mol % CPL-4-1k	1 時間	PK
W	4	E: DOPE:DODAC:PEGC20:84:6:10 + 4 mol % CPL-4-1k	4 時間	PK
X	4	E: DOPE:DODAC:PEGC20:84:6:10 + 4 mol % CPL-4-1k	8 時間	PK
Y	4	E: DOPE:DODAC:PEGC20:84:6:10 + 4 mol % CPL-4-1k	24 時間	PK

マウスを、合計 200 μ l の体積での尾静脈への静注によって投与された³ [H] C H E - L U V で、処理した。マウスは、1つの処置のみを受けた。示した時点で、マウスを秤量し、屠殺し、そして血液を心臓穿刺によって集め、次いで³ [H] C H E について評価した。処方物は、十分に許容的であると予想された。マウスを、保証された動物看護プロトコルに従って処理した。処置に関連する苦痛の徴候を示した任意のマウスを、飼育器で自由に行動させて終了した。全てのマウスを、CO₂吸入、続いて頸部の脱臼によって終了した。血液からの³ [H] C H E の測定を、標準的プロトコルに従って決定した。

【 0 3 1 7 】

C P L₄の短鎖を含むS P L Pのインビボ薬物動力学を、図 40 に図示する。S P L PにおけるC P L₄の量の増加が、血液からのクリアランスの速度を増加する傾向があることが観察される。1 mol % の組み込まれたC P L₄は、C P L₄を有さないS P L Pと同様のクリアランス結果を与える。より多い量のC P L₄の組み込みは、血液からのS P L P

10

20

30

40

50

のクリアランスの速度を増加する傾向にある。SPLP-CPL₄ [1k] (1%)は、6~7時間のt_{1/2}で、最良の血漿クリアランス特性を示す。1mol%より多いものは、より速くにきれいにした。

【0318】

本明細書中で開示される結果は、SPLP技術のさらなる改良点を示す。特に、これらの結果から、CPLの型（すなわち、ポリマー鎖の長さ；および1分子当たりのカチオン電荷量）ならびにSPLP中のこのようなCPLの量が、増大したトランスフェクション能力を伴う、インビポクリアランス特性の最良の釣り合いが最適化されなければならないことが明らかである。インビトロのデータは、長鎖CPLを示し、そしてより高いレベルのこのようなCPLは、トランスフェクションを増加するために好ましい。しかし、SPLP対脂質複合体の以前の比較に見られるように、インビトロで最も良く作用する脂質処方物は、インビポで最も適しているわけではない。本明細書中のインビポの結果は、約1%で組み込まれる短鎖CPLが、動物における循環の生存期間について最適化されることを実証する。

10

【0319】

本明細書中に記載される実施例および実施形態は、例示の目的のみであり、そしてその見地における種々の改変または変化が当業者に示唆され、そして本出願の精神および範囲ならびに添付の特許請求の範囲内に含まれることが理解される。本明細書中で列挙される全ての刊行物、特許および特許出願は、ここでその全ての目的についてその全体において参考として援用される。

20

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、カチオン性ポリマー脂質(CPL)結合体の構造的設計を示す。

【図2a】 図2は、種々の量の荷電したヘッド基を有するカチオン性PEG-脂質結合体の調製のための合成スキームを示す。(a.) Et₃N / CHCl₃ ; (b.) TFA / CHCl₃ ; (c.) Et₃N / CHCl₃ Na, N -ジ-t-Boc-L-リジンN -ヒドロキシスクシニドエステル。

【図2b】 図2は、種々の量の荷電したヘッド基を有するカチオン性PEG-脂質結合体の調製のための合成スキームを示す。(a.) Et₃N / CHCl₃ ; (b.) TFA / CHCl₃ ; (c.) Et₃N / CHCl₃ Na, N -ジ-t-Boc-L-リジンN -ヒドロキシスクシニドエステル。

30

【図3】 図3は、CPLを組み込んだリポソームを示す。巨大単層ラメラベシクル(LUV)は、CPL(それぞれ、CPL1、CPL2、CPL4、およびCPL8)の組み込まれた異なる例を有する。

【図4】 図4は、リポソーム膜の内側リーフレットと外側リーフレットとの間のDSP-E-CPL-4の分布を示す。CPL-4-LUV(DSPC/Chol/DSPE-CPL-4, 55:40:5モル%)は、本明細書中で定義される押出し法によって調製した。外側リーフレットCPLの分布をフルオレスカミンアッセイによって定量した。外側リーフレットCPLの場合、以下のアッセイを使用した。適切な量のCPL-4-LUVを1Mボレート緩衝液(pH 8.5)で希釈し、氷水中で冷却した。20μlの10% Triton X-100を上記サンプル溶液に添加し、膜を可溶化した。次いで、追加の20μlの冷却したフルオロスカミンエタノール溶液(10mg/ml)を加え、次いで測定した。

40

【図5】 図5は、PBS-CMG中のBHK細胞内のCPL-4-LUVの細胞摂取研究を示す。コントロールはLUV(DSPC/Chol, 60:40)であり、そしてCPL-4-LUV(DSPC/Ch/DSPE-CPL-4, 55:40:5)を本明細書中で定義されるような押出しによって調製した。

【図6】 図6は、DMEM(10%FBS含有)中のBHK細胞内のCPL-4-LUVの細胞摂取を示す。コントロールはLUV(DSPC/Chol, 60:40)を使用した。CPL-4-LUV(DSPC/Ch/DSPE-CPL-4, 55:40:5)を本明細書中で定義されるような押出しによって調製した。

50

【図7】 図7は、4時間のインキュベーション後のPBS-CMG中のBHK細胞内のCPL-リポソームの細胞摂取を示す。LUV(DSPC/Chol, 60:40)およびCPL-4-LUV(DSPC/Chol/DSPC-CPL, 55:40:5)を本明細書中で定義されるような押出しによって調製した。

【図8a】 図8は、界面活性剤透析によるCPL-LUVの調製を示す。脂質を示した比でクロロホルムに共溶解し、次いで、この溶媒を窒素ガスおよび高真空によって除去した。この脂質混合物を界面活性剤/緩衝液(HBS中OGP)に溶解し、HBSに対して2~3日間透析した。透析の間に形成されたLUVを次いで、セファロースCL-4B上に示されるように画分化した。パネルA: DOPE/DODAC/CPL4[3.4K]/PEGerC20/Rho-PE(79.5/6/4/10/0.5)の画分化；パネルB: DOPE/DODAC/CPL4[1K]/PEGerC20/Rho-PE(79.5/6/4/10/0.5)の画分化；およびパネルC: DOPE/DODAC/CPL4[3.4K]/PEGerC20/Rho-PE(71.5/6/12/10/0.5)の画分化。
10

【図8b】 図8は、界面活性剤透析によるCPL-LUVの調製を示す。脂質を示した比でクロロホルムに共溶解し、次いで、この溶媒を窒素ガスおよび高真空によって除去した。この脂質混合物を界面活性剤/緩衝液(HBS中OGP)に溶解し、HBSに対して2~3日間透析した。透析の間に形成されたLUVを次いで、セファロースCL-4B上に示されるように画分化した。パネルA: DOPE/DODAC/CPL4[3.4K]/PEGerC20/Rho-PE(79.5/6/4/10/0.5)の画分化；パネルB: DOPE/DODAC/CPL4[1K]/PEGerC20/Rho-PE(79.5/6/4/10/0.5)の画分化；およびパネルC: DOPE/DODAC/CPL4[3.4K]/PEGerC20/Rho-PE(71.5/6/12/10/0.5)の画分化。
20

【図8c】 図8は、界面活性剤透析によるCPL-LUVの調製を示す。脂質を示した比でクロロホルムに共溶解し、次いで、この溶媒を窒素ガスおよび高真空によって除去した。この脂質混合物を界面活性剤/緩衝液(HBS中OGP)に溶解し、HBSに対して2~3日間透析した。透析の間に形成されたLUVを次いで、セファロースCL-4B上に示されるように画分化した。パネルA: DOPE/DODAC/CPL4[3.4K]/PEGerC20/Rho-PE(79.5/6/4/10/0.5)の画分化；パネルB: DOPE/DODAC/CPL4[1K]/PEGerC20/Rho-PE(79.5/6/4/10/0.5)の画分化；およびパネルC: DOPE/DODAC/CPL4[3.4K]/PEGerC20/Rho-PE(71.5/6/12/10/0.5)の画分化。
30

【図9a】 図9のパネルAはDOPC-LUV(100nm)へのDSPC-CPL-Q5の挿入を示す。DOPC-LUV(2.5μmol液体)を、60で、3時間0.214μmolDSPC-CPL-Q5(全容量300μL)と共にインキュベートし、次いで、このサンプルをHEPES緩衝生理食塩水中で平衡化したセファロースCL-4Bのカラムに適用した。1mLの画分を収集し、本明細書中で定義されるようなダンシルで標識したCPLおよびローダミン-PEについてアッセイした。パネルBは、DOPE/DODAC/PEG-Cer-C20(84/6/10)から構成されるLUV(100nm)中へのDSPC-CPL-Q5の挿入を示す。LUV(5μmol液体)を、60で、3時間0.43μmolDSPC-CPL-Q5(全容量519μL)と共にインキュベートし、次いで、このサンプルをHEPES緩衝生理食塩水中で平衡化したセファロースCL-4Bのカラムに適用した。遊離CPLの溶出もまた、示され、これは、CPL-LUVの単離のための簡単な方法を示す。1mLの画分を収集し、本明細書中で定義されるようなダンシルで標識したCPLおよびローダミン-PEについてアッセイした。パネルCは、DOPE/DODAC/PEG-Cer-C20(84/6/10)から構成されるLUV(100nm)中へのDSPC-CPL-Q5の保持を示す。図9パネルBの主要なLUV画分をHEPES緩衝生理食塩水中で平衡化したセファロースCL-4Bのカラムに適用した。遊離CPLの溶出もまた、示され、これは、CPL-LUVの単離のための簡単な方法を示す。
40

4 B のカラムに再適用した。1 mL の画分を収集し、本明細書中で定義されるようなダンシルで標識した CPL およびローダミン - PE についてアッセイした。

【図 9 b】 図 9 のパネル A は DOPC LUV (100 nm) への DSPE - CPL - Q5 の挿入を示す。DOPC LUV (2.5 μmol 液体) を、60 で、3 時間 0.214 μmol DSPE - CPL - Q5 (全容量 300 μL) と共にインキュベートし、次いで、このサンプルを HEPES 緩衝生理食塩水中で平衡化したセファロース CL - 4 B のカラムに適用した。1 mL の画分を収集し、本明細書中で定義されるようなダンシルで標識した CPL およびローダミン - PE についてアッセイした。パネル B は、DOPE / DODAC / PEG - Cer - C20 (84/6/10) から構成される LUV (100 nm) 中への DSPE - CPL - Q5 の挿入を示す。LUV (5 μmol 液体) を、60 で、3 時間 0.43 μmol DSPE - CPL - Q5 (全容量 519 μL) と共にインキュベートし、次いで、このサンプルを HEPES 緩衝生理食塩水中で平衡化したセファロース CL - 4 B のカラムに適用した。遊離 CPL の溶出もまた、示され、これは、CPL - LUV の単離のための簡単な方法を示す。1 mL の画分を収集し、本明細書中で定義されるようなダンシルで標識した CPL およびローダミン - PE についてアッセイした。パネル C は、DOPE / DODAC / PEG - Cer - C20 (84/6/10) から構成される LUV (100 nm) 中への DSPE - CPL - Q5 の保持を示す。図 9 パネル B の主要な LUV 画分を HEPES 緩衝生理食塩水中で平衡化したセファロース CL - 4 B のカラムに再適用した。1 mL の画分を収集し、本明細書中で定義されるようなダンシルで標識した CPL およびローダミン - PE についてアッセイした。 20

【図 9 c】 図 9 のパネル A は DOPC LUV (100 nm) への DSPE - CPL - Q5 の挿入を示す。DOPC LUV (2.5 μmol 液体) を、60 で、3 時間 0.214 μmol DSPE - CPL - Q5 (全容量 300 μL) と共にインキュベートし、次いで、このサンプルを HEPES 緩衝生理食塩水中で平衡化したセファロース CL - 4 B のカラムに適用した。1 mL の画分を収集し、本明細書中で定義されるようなダンシルで標識した CPL およびローダミン - PE についてアッセイした。パネル B は、DOPE / DODAC / PEG - Cer - C20 (84/6/10) から構成される LUV (100 nm) 中への DSPE - CPL - Q5 の挿入を示す。LUV (5 μmol 液体) を、60 で、3 時間 0.43 μmol DSPE - CPL - Q5 (全容量 519 μL) と共にインキュベートし、次いで、このサンプルを HEPES 緩衝生理食塩水中で平衡化したセファロース CL - 4 B のカラムに適用した。遊離 CPL の溶出もまた、示され、これは、CPL - LUV の単離のための簡単な方法を示す。1 mL の画分を収集し、本明細書中で定義されるようなダンシルで標識した CPL およびローダミン - PE についてアッセイした。パネル C は、DOPE / DODAC / PEG - Cer - C20 (84/6/10) から構成される LUV (100 nm) 中への DSPE - CPL - Q5 の保持を示す。図 9 パネル B の主要な LUV 画分を HEPES 緩衝生理食塩水中で平衡化したセファロース CL - 4 B のカラムに再適用した。1 mL の画分を収集し、本明細書中で定義されるようなダンシルで標識した CPL およびローダミン - PE についてアッセイした。 30

【図 10】 図 10 は、DOPE / DODAC / PEG - Cer - C20 LUV への d - DSPE - CPL - Q1 の挿入に及ぼす時間および温度の影響を示す。3 つの温度の各々について、3 μmol 脂質を 0.17 μmol の CPL (全容量 240 μL) と合わせた。1 時間、3 時間、および 6 時間に於いて、1 μmol の脂質を抜き、氷中で冷却し、CPL の挿入を停止した。このサンプルをセファロース CL - 4 B のカラムに通し、過剰の CPL を除去し、CPL 挿入についてアッセイした。 40

【図 11】 図 11 は、最終 CPL 挿入レベルにおよぼす初期 CPL / 脂質比の影響を示す。初期 CPL / 脂質モル比は、0.011、0.024、0.047、0.071、0.095、および 0.14 であった。挿入された最終 mol % は、0.8、1.8、3.4、5.0、6.5、および 7.0 であった。右手の軸は挿入 % である。

【図 12】 図 12 は、中性ベシクル中への DSPE - CPL - Q1 および DSPE - CPL - Q5 の挿入を示す。初期 CPL / 脂質モル比は、Q1 (2.5 μmol 脂質および 50

0.21 μmol CPL)について0.065であり、Q5について0.034であった。サンプルを60度で3時間インキュベートした。DOPCおよびDOPC/Chol LUVを押し出しによって調製し、一方、他を界面活性剤透析によって調製した。本明細書中に記載されるように、Q5サンプル中の4%メタノールの存在は、このサンプルについて観察されたより高い挿入を説明すると考えられる。サンプル組成物は以下の通りであった:DOPC/Chol(55/45)、DOPC/PEG-Cer-C20(90/10)、DOPC/Chol/PEG-Cer-C20(45/45/10)。

【図13】 図13は、挿入されたCPLのモル%におよぼすPEG-Cerの鎖長の影響を示す。DOPE/DODAC/PEG-Cer-C20(84/6/10)、DOP E/DODAC/PEG-Cer-C14(84/6/10)、およびDOPE/DODAC/PEG-Cer-C8(79/6/15)から構成されるLUVを3時間60度、2~8.6モル%d-DSPE-CPL-Q1の存在下でインキュベートした。

【図14】 図14は、d-DSPE-CPL-Q5の挿入におよぼすPEG-Cer-C20含量の影響を示す。DOPE/DODAC/PEG Cer C20から構成されるベシクル(後者の脂質は4~10モル%の範囲)をCPL-Q5(初期CPL/脂質モル比=0.071)の存在下でインキュベートした。

【図15】 図15は、BHK細胞上のPBS/CMG中でインキュベートしたCPL-LUVの摂取を示す。約10⁵BHK細胞を、(1)CPL無し、(2)8%DSPE-CPL-D、(3)7%DSPE-CPL-T1、および(4)4%DSPE-CPL-Q5を含有する20nmolのDOPE/DODAC/PEG Cer C20(84/6/10)LUVと共にインキュベートした。インキュベーションを4および37度行った。前者は細胞結合の評価を与え、後者は結合および摂取の評価を与えた。2つの値の違いを考慮して、37における脂質摂取の評価を得た。

【図16a】 図16のパネルAは、CPL₄の構造を示す。パネルBは、SPLP系へのCPL₄の挿入のためのプロトコルを示す。

【図16b】 図16のパネルAは、CPL₄の構造を示す。パネルBは、SPLP系へのCPL₄の挿入のためのプロトコルを示す。

【図17a】 図17のパネルAは、DOPE/DODAC/PEG-Cer-C20 LUV(すなわち、PEG-脂質(または、「ステルス」脂質)を含有する標準リポソーム)のモデルを示す;パネルBは、CPL₄(すなわち、長鎖)が挿入された同じLUVを示す。「長鎖」は、ポリマーWが、PEG-脂質のポリマー成分と同じ長さかまたはより長い長さであることをいう。従って、CPL1の荷電した基は、外側の環境に直ぐに曝露される;そしてパネルCは、CPL₄(すなわち、短鎖)が挿入された同じLUVを示す。「短鎖」CPLは、ポリマーWが、PEG-脂質の対応するポリマーより短いことをいう。

【図17b】 図17のパネルAは、DOPE/DODAC/PEG-Cer-C20 LUV(すなわち、PEG-脂質(または、「ステルス」脂質)を含有する標準リポソーム)のモデルを示す;パネルBは、CPL₄(すなわち、長鎖)が挿入された同じLUVを示す。「長鎖」は、ポリマーWが、PEG-脂質のポリマー成分と同じ長さかまたはより長い長さであることをいう。従って、CPL1の荷電した基は、外側の環境に直ぐに曝露される;そしてパネルCは、CPL₄(すなわち、短鎖)が挿入された同じLUVを示す。「短鎖」CPLは、ポリマーWが、PEG-脂質の対応するポリマーより短いことをいう。

【図17c】 図17のパネルAは、DOPE/DODAC/PEG-Cer-C20 LUV(すなわち、PEG-脂質(または、「ステルス」脂質)を含有する標準リポソーム)のモデルを示す;パネルBは、CPL₄(すなわち、長鎖)が挿入された同じLUVを示す。「長鎖」は、ポリマーWが、PEG-脂質のポリマー成分と同じ長さかまたはより長い長さであることをいう。従って、CPL1の荷電した基は、外側の環境に直ぐに曝露される;そしてパネルCは、CPL₄(すなわち、短鎖)が挿入された同じLUVを示す。「短鎖」CPLは、ポリマーWが、PEG-脂質の対応するポリマーより短いことを

10

20

30

40

50

いう。

【図18a】 図18のパネルAは、BHK細胞上のpLucに複合体化したDOP-E:DOP-Ac(1:1)リポソーム(黒四角)と比較した、SPLP系の摂取の時間経過(黒丸)を示す。脂質濃度は20μMであった。パネルBは、4時間(黒四角)または8時間(黒四角)インキュベーション後の複合体を使用して得られるものと比較した、SPLP系を使用して得られる1.5μg/mL pLucのトランスフェクション効率を示す。

【図18b】 図18のパネルAは、BHK細胞上のpLucに複合体化したDOP-E:DOP-Ac(1:1)リポソーム(黒四角)と比較した、SPLP系の摂取の時間経過(黒丸)を示す。脂質濃度は20μMであった。パネルBは、4時間(黒四角)または8時間(黒四角)インキュベーション後の複合体を使用して得られるものと比較した、SPLP系を使用して得られる1.5μg/mL pLucのトランスフェクション効率を示す。

【図19a】 図19は、遊離CPLからのCPL-SPLPの分離について、3.5mο1%_{initial}(3mο1%_{final})CPL₄のSPLPへの挿入後のカラムプロファイルを示す。セファロースCL-4Bカラムに適用された全容量に対する脂質(黒丸)、CPL(白四角)、およびDNA(白菱形)についてのプロファイルを示す。パネルBは、パネルAからの画分#9についてのカラムプロファイルを示す。

【図19b】 図19は、遊離CPLからのCPL-SPLPの分離について、3.5mο1%_{initial}(3mο1%_{final})CPL₄のSPLPへの挿入後のカラムプロファイルを示す。セファロースCL-4Bカラムに適用された全容量に対する脂質(黒丸)、CPL(白四角)、およびDNA(白菱形)についてのプロファイルを示す。パネルBは、パネルAからの画分#9についてのカラムプロファイルを示す。

【図20】 図20は、SPLP(200nmol)へのCPL₄(15nmol)の挿入のための時間経過を示す。

【図21】 図21は、BHK細胞中に0%(黒四角)、3%(白菱形)、または4%(黒丸)CPL₄を有する20μMのSPLPの摂取についての時間経過を示す

【図22】 図22は、SPLP単独(0%CPL)と比較した、種々のmο1%のCPL₄の挿入後のSPLP(2.5μg/mL pLuc)によるBHK細胞のトランスフェクションを示す。4時間または9時間、細胞上部でサンプルをインキュベートすることによってトランスフェクションを実行し、完全な24時間のインキュベーションのために完全な媒体と交換した(図3も参照のこと)。

【図23a】 図23は、CPL挿入結果を表にする。

【図23b】 図23は、CPL挿入結果を表にする。

【図23c】 図23は、CPL挿入結果を表にする。

【図24a】 図24はまた、CPL挿入結果を表にする。

【図24b】 図24はまた、CPL挿入結果を表にする。

【図24c】 図24はまた、CPL挿入結果を表にする。

【図25a】 図25は、CPL含有リポソームの調製のためのポスト挿入法(post-insertion method)を示す。予備形成されたリポソームは、DSPC/Chol(55:45, mol:mol)から作製される。CPLを60で2時間予備形成されたリポソームと共にインキュベートした。パネルAは、ポスト挿入後のゲルfiltrationによる遊離CPLとCPL-LUVとの分離を示す。

【図25b】 図25は、CPL含有リポソームの調製のためのポスト挿入法(post-insertion method)を示す。予備形成されたリポソームは、DSPC/Chol(55:45, mol:mol)から作製される。CPLを60で2時間予備形成されたリポソームと共にインキュベートした。パネルAは、ポスト挿入後のゲルfiltrationによる遊離CPLとCPL-LUVとの分離を示す。

【図26】 図26は、DMEM(10%FBS)中のBHK細胞内にDSP-E-CPLを含有するステルスリポソームの細胞摂取を示す。コントロールLUV(DSPC/Ch)

10

20

30

40

50

0.1 / PEG - PE、56 : 40 : 4) および CPL - LUV (DSPC / Chol / PEG - PE / CPL、55.5 : 40 : 2 : 2) を本明細書中で定義されるような押出しによって調製した。

【図27】 図27は、PBS - CMG中のBHK細胞内にDSPC - CPLを含有するステルスリポソームの細胞攝取を示す。コントロールLUV (DSPC / Chol / PEG - PE、56 : 40 : 4) および CPL - LUV (DSPC / Chol / PEG - PE / CPL、55.5 : 40 : 2 : 2) を本明細書中で定義されるような押出しによって調製した。

【図28a】 図28のパネルAは、種々のCPLの化学構造であり、パネルBは種々のCPLの化学構造である。CPL₄(パネル4)は、CPL_{4b}(パネルB)と同じである。そしてパネルCは、種々のCPLの化学構造である。 10

【図28b】 図28のパネルAは、種々のCPLの化学構造であり、パネルBは種々のCPLの化学構造である。CPL₄(パネル4)は、CPL_{4b}(パネルB)と同じである。そしてパネルCは、種々のCPLの化学構造である。

【図28c】 図28のパネルAは、種々のCPLの化学構造であり、パネルBは種々のCPLの化学構造である。CPL₄(パネル4)は、CPL_{4b}(パネルB)と同じである。そしてパネルCは、種々のCPLの化学構造である。

【図28d】 図28のパネルAは、種々のCPLの化学構造であり、パネルBは種々のCPLの化学構造である。CPL₄(パネル4)は、CPL_{4b}(パネルB)と同じである。そしてパネルCは、種々のCPLの化学構造である。 20

【図29a】 図29は、本発明の化合物を生成するための合成実施形態を示す。

【図29b】 図29は、本発明の化合物を生成するための合成実施形態を示す。

【図30】 図30は、ダンシル化したCPL₄の構造を示す。CPL₄は、DSPC分子に結合されるPEG₃₄₀₀分子の末端に4つの正電荷を有する。CPL₄は、ダンシル化したりジンの組み込みによってダンシル化される。

【図31】 図31は、SPLP - CPL₄の脱凝集におよぼすカチオン濃度の影響を示す。0 mM ~ 70 mMまで、増加する[カチオン]、Ca²⁺(黒丸)およびMg²⁺(黒四角)の存在下の粒子の平均直径および標準偏差を、準弾性光散乱(QELS)を使用して測定した。Nicompチューブ中の400 mL中の約180 nmolのSPLP - CPL₄に、少量のCaCl₂またはMgCl₂(500 mMストック溶液)を加えた。異なる量のカチオンの存在下での粒子の平均直径±標準偏差の測定を、Nicomp Mode 1270(Submicron Particle Sizer)を使用して行った。この粒子の直径は、劇的に変化しないが、Gaussian分布がより広くなる。従って、標準偏差を脱凝集の基準として使用し、より小さな偏差ほどより小さな凝集を示す。 30

【図32】 図32は、種々の割合のCPL₄を含有するSPLPの攝取を示す。パネルA。0 mol % (黒丸) CPL₄、2 mol % (黒四角) CPL₄、3 mol % (黒三角) CPL₄、または4 mol % (黒菱形) CPL₄およびDOPPE:DODAC複合体(黒逆三角)を有する20 μM SPLPのBHK細胞による攝取についての時間経過。CPL₄のSPLPへの挿入および複合体の調製は、本明細書中に記載のとおりに行った。SPLP - CPL₄中のCPL₄のmol %もまた、本明細書中に記載されるとおりに決定した。BHK細胞を、1 × 10⁵細胞 / ウェルで12ウェルプレートにプレートした。200 μLのサンプル(SPLP - CPL₄または複合体 + CaCl₂を含有)に、800 μLのDMEM + 10% FBSを加えた。得られるCaCl₂濃度をもとの20%に希釈した。2時間、4時間、6時間および8時間のインキュベーション時間の後、細胞を600 mLの溶解緩衝液で溶解し、ローダミン蛍光およびBCAアッセイを、本明細書中に記載されるように溶解物について測定した(図21を参照のこと)。 40

【図33】 図33は、種々のモル%のCPL₄(2、3、および4 mol %)の挿入後の、SPLP(5.0 μg / mL pL uc)によるBHK細胞のトランスフェクションを示す。本明細書中に記載される手順を使用して、CPL₄をSPLP中に挿入した。比較として、SPLP(0 mol % CPL)およびDOPPE:DODAC(1 : 1)複合 50

体トランスフェクションもまた実施した。BHK細胞を96ウェルプレート中に 1×10^4 でプレートした。トランスフェクションを、4時間、後に24時間の完全なインキュベーション時間、サンプル[20 μ L (SPLP-CPL₄+CaCl₂) + 80 μ Lの完全な媒体]をインキュベートすることによって実施した。CaCl₂濃度を再び、もとの濃度の20%に希釈した。24時間のインキュベーション後、細胞を溶解緩衝液で溶解し、ルシフェラーゼアッセイおよびBCAアッセイを実施した(図22を参照のこと)。

【図34】図34は、BHK細胞におけるSPLP-CPL₄(5.0 μ g/mL pL uc)のトランスフェクションに及ぼす[カチオン]、Ca²⁺(黒丸)およびMg²⁺(黒四角)の影響を示す。SPLP-CPL₄+CaCl₂またはMgCl₂をD MEM+10%FBSと混合し、この混合物を96ウェルプレート内にプレートした 1×10^4 BHK細胞に適用した。完全な48時間のインキュベーション後、トランスフェクション媒体を除去し、細胞を溶解緩衝液で溶解し、ルシフェラーゼ活性およびタンパク質含量を前に記載されるように測定した。

【図35】図35は、BHK細胞における80 μ M SPLP-CPL₄の脂質結合および摂取に及ぼす[カチオン]、Ca²⁺(黒丸)およびMg²⁺(黒四角)の影響を示す。種々の濃度のカチオン(0~14 mMの最終濃度)を有するサンプルを、細胞が溶解する時間である4時間、 1×10^5 BHK細胞上でインキュベートし、そしてローダミン蛍光およびタンパク質含量を測定した。

【図36】図36は、より長い時間点におけるSPLP-CPL₄、SPLPおよび複合体(各々は5.0 μ g/mL pCMV L ucを含有する)のトランスフェクションを示す。SPLP-CPL₄(4 mol% CPL₄) + 40 mM_{initial} CaCl₂(黒丸)、SPLP(黒逆三角)、DOPPE:DODAC複合体(黒四角)、リポフェクチン複合体(黒菱形)のトランスフェクションを、 1×10^4 BHK細胞において実施した。このトランスフェクション媒体を4、8、または24時間細胞においてインキュベートし、その後にトランスフェクション媒体を完全な媒体と4時間および8時間の時間点で交換した。次いで、24時間(それぞれトランスフェクション媒体の除去後の20、16、および10時間)の全インキュベーション時間において、細胞を溶解し、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37a】図37は、リポフェクチン複合体と比較した、SPLP-CPL₄のトランスフェクション効能および毒性を示す。24時間および48時間インキュベートし、次いで即時の細胞溶解した 1×10^4 BHK細胞におけるSPLP-CPL₄+CaCl₂(黒丸)、SPLP(黒逆三角)、およびリポフェクチン(黒菱形)についてのトランスフェクション活性、およびルシフェラーゼ活性およびタンパク質含量の測定。 1×10^4 BHK細胞におけるSPLP-CPL₄+CaCl₂(黒丸)、リポフェクチン(黒菱形)、およびDOPPE/DODAC(1:1)複合体の24時間および48時間インキュベーション後の細胞生存率の測定。インキュベーション後、細胞を溶解し、BCAアッセイからのタンパク質含量をタンパク質生存率の尺度として使用した。

【図37b】図37は、リポフェクチン複合体と比較した、SPLP-CPL₄のトランスフェクション効能および毒性を示す。24時間および48時間インキュベートし、次いで即時の細胞溶解した 1×10^4 BHK細胞におけるSPLP-CPL₄+CaCl₂(黒丸)、SPLP(黒逆三角)、およびリポフェクチン(黒菱形)についてのトランスフェクション活性、およびルシフェラーゼ活性およびタンパク質含量の測定。 1×10^4 BHK細胞におけるSPLP-CPL₄+CaCl₂(黒丸)、リポフェクチン(黒菱形)、およびDOPPE/DODAC(1:1)複合体の24時間および48時間インキュベーション後の細胞生存率の測定。インキュベーション後、細胞を溶解し、BCAアッセイからのタンパク質含量をタンパク質生存率の尺度として使用した。

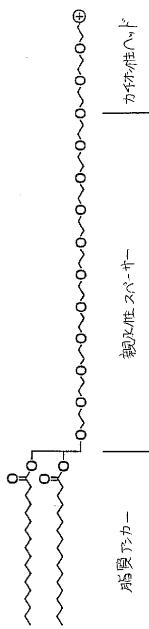
【図38】図38は、長鎖CPLおよび短鎖CPLを使用するBHK細胞のトランスフェクションを示す。CPL中の短鎖PEGの存在は、長鎖CPLによるトランスフェクションと比べて、約1/4に減少する。

【図39】図39は、Neuro-2a細胞のトランスフェクションを示す。SPLP 50

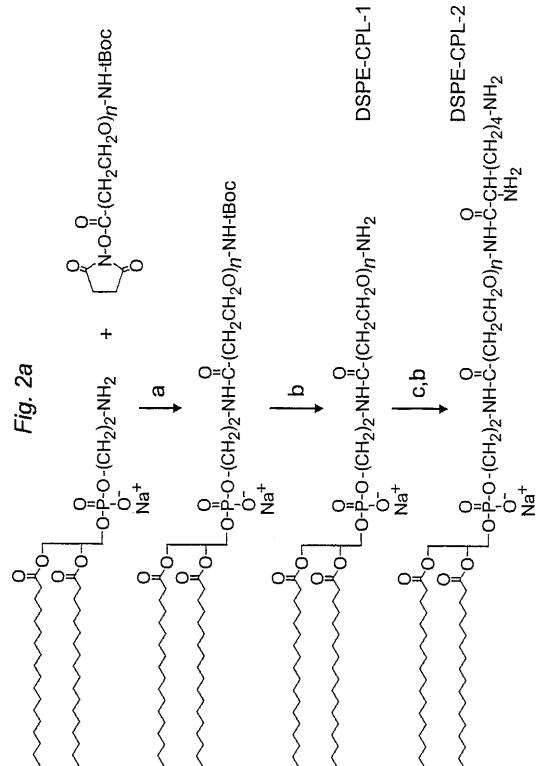
+ 4 mol % CPL4-1k は、Neuro-2a 細胞中のSPLP 単独より多い4桁の大きさの遺伝子発現を生じた。

【図40】 図40は、短鎖CPL₄を含有するSPLPのインビボ薬物動態学を示す。

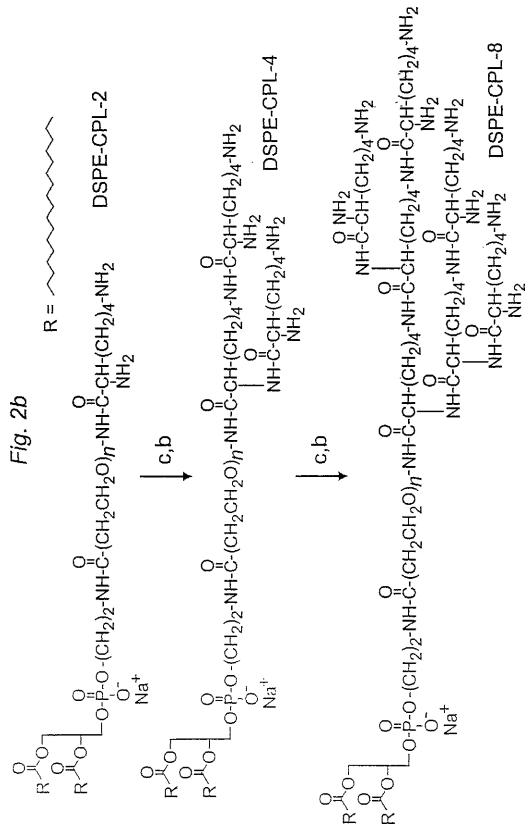
【図1】



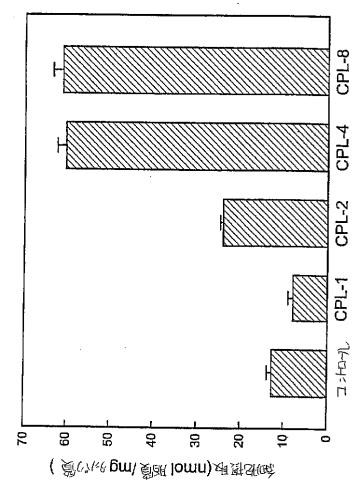
【図2a】



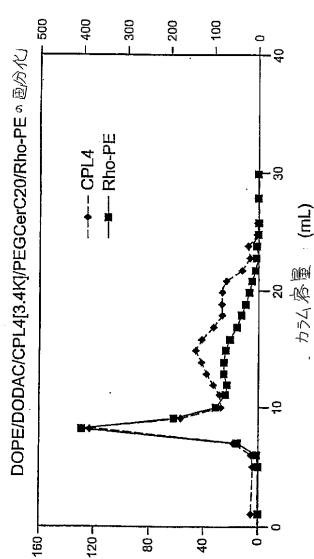
【図 2 b】



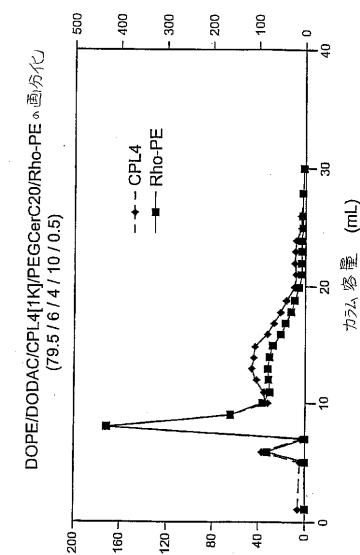
【図7】



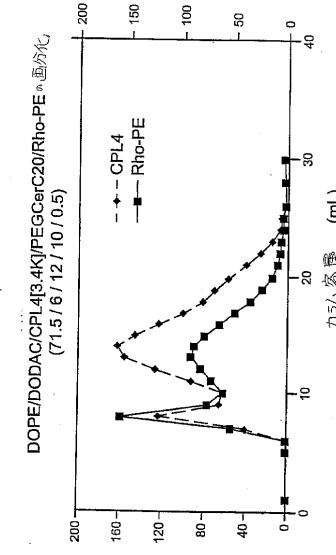
【図8 a】



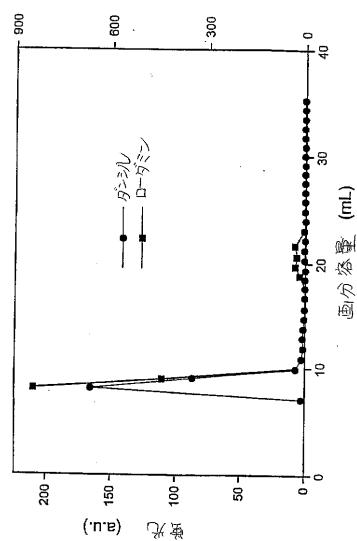
【図8 b】



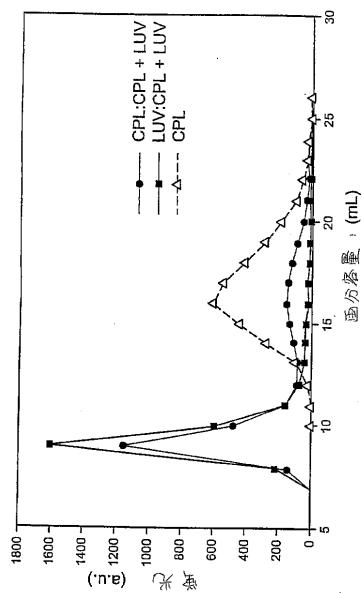
【図8 c】



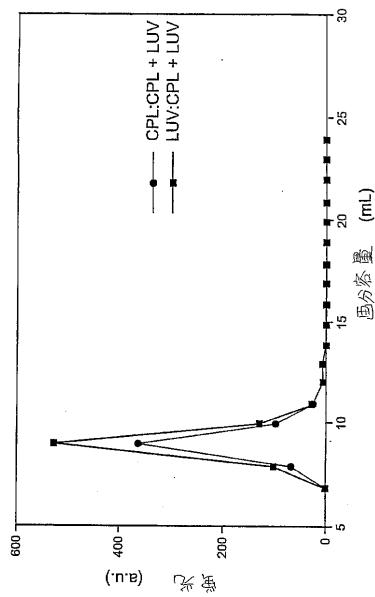
【図 9 a】



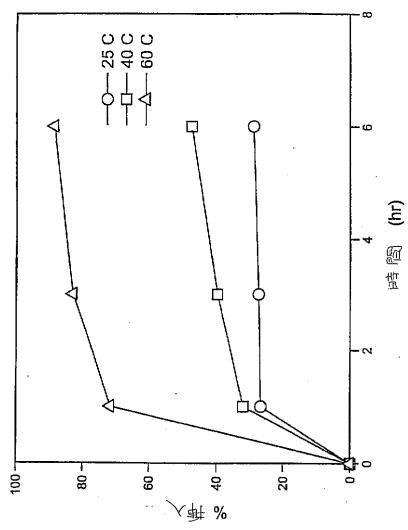
【図 9 b】



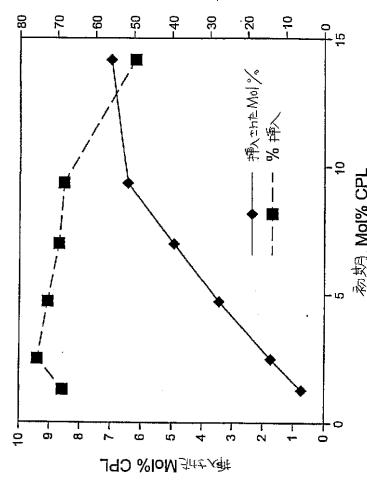
【図 9 c】



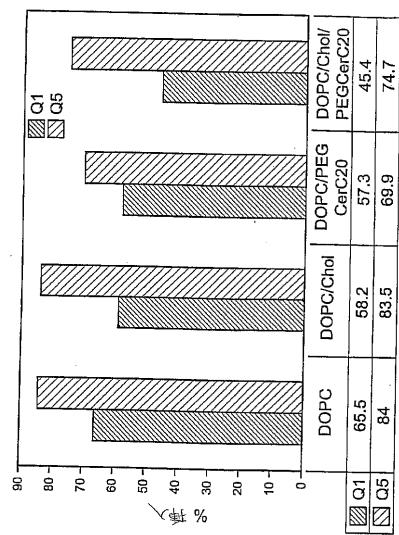
【図 10】



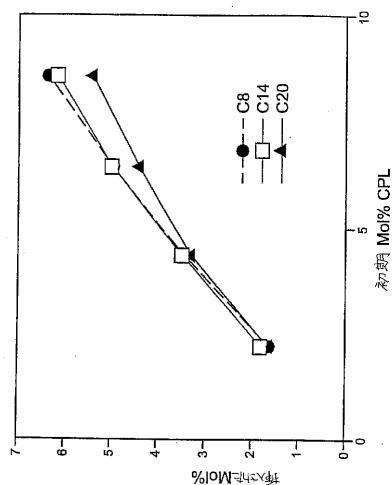
【図11】



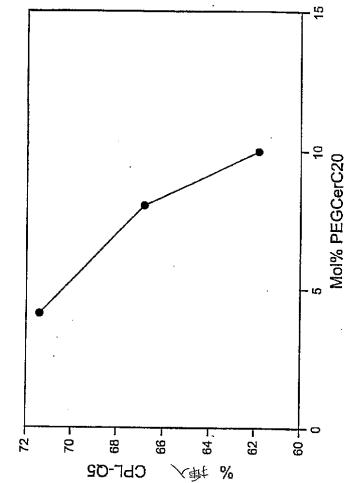
【図12】



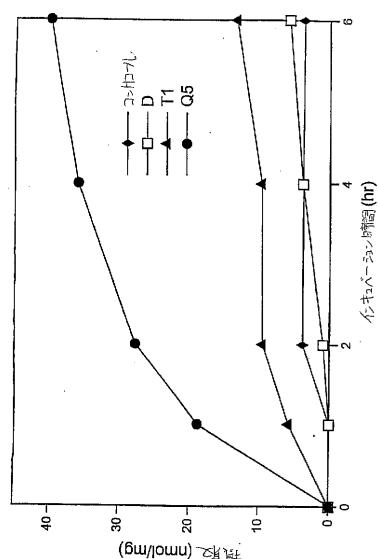
【図13】



【図14】



【図 1 5】



【図 1 6 a】

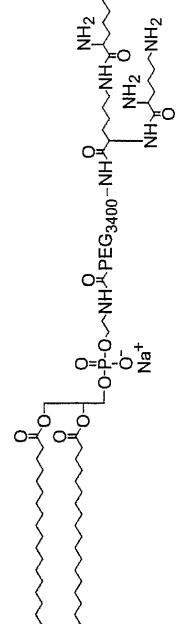
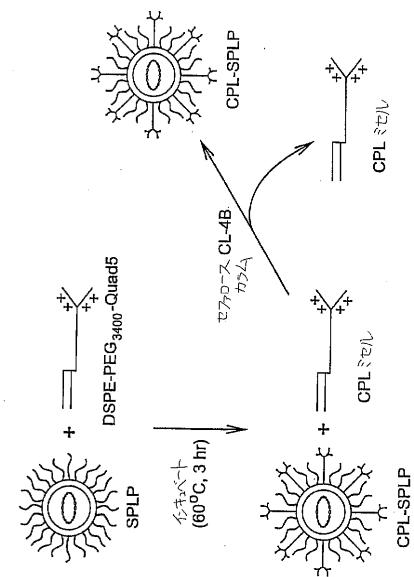


Fig. 16a

【図 1 6 b】



【図 1 7 a】

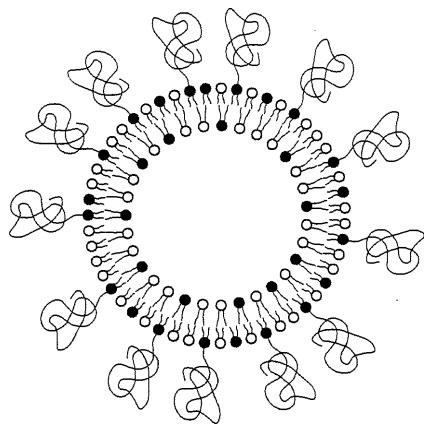
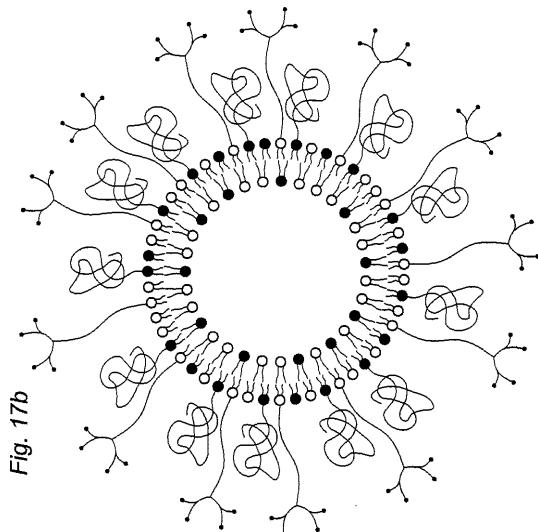
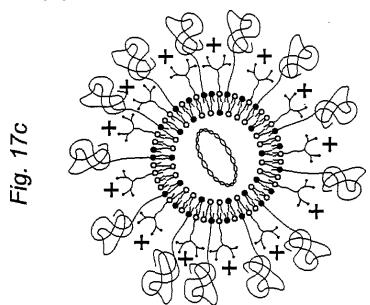


Fig. 17a

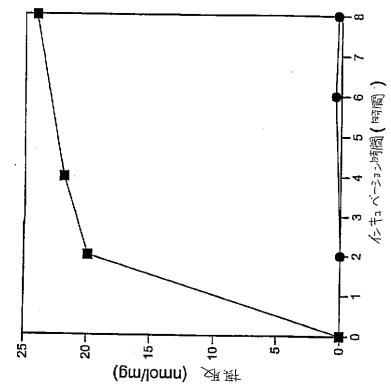
【図 17 b】



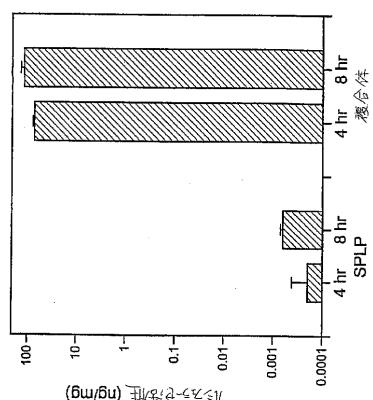
【図 17 c】



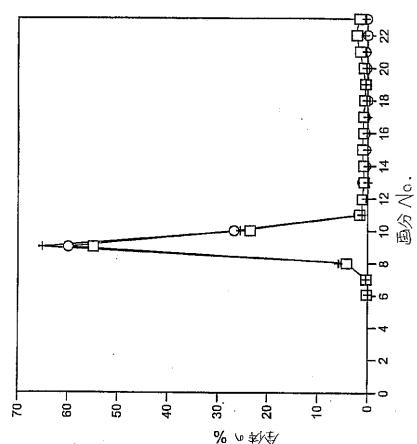
【図 18 a】



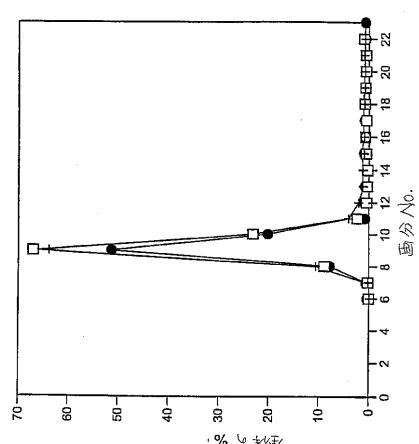
【図 18 b】



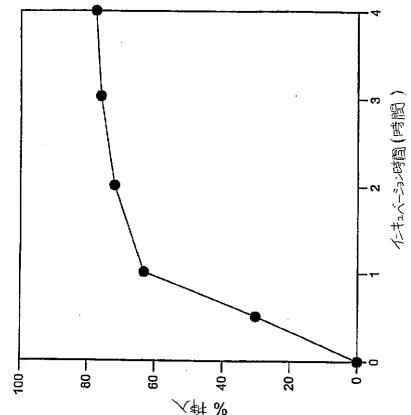
【図 19 a】



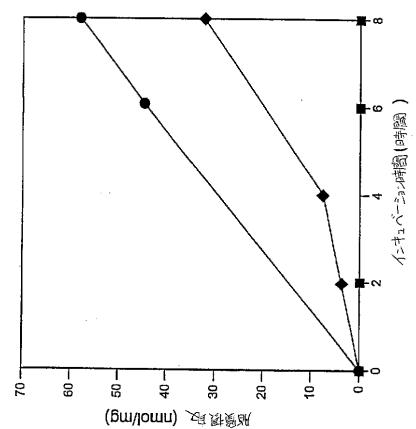
【図 19 b】



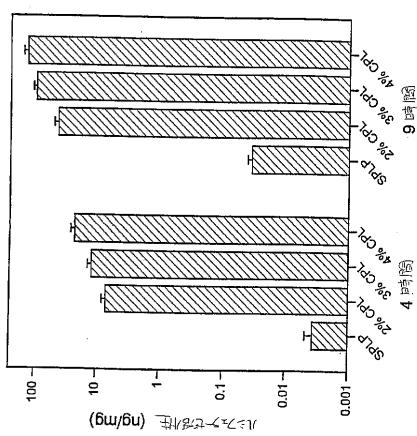
【図20】



【 図 2 1 】



【図22】



【図23a】

序號	材料組成	Mo% 組成	CPL
DBF1-102-1	DOPC/DODAC/PEG-Cer-C20	84/6/10 (0.5 Rho-PE)	d-DSPe-CPL-Q5
DBF1-102-2	DOPC/DODAC/PEG-Cer-C20	84/6/10 (0.5 Rho-PE)	d-DSG-CPL-Q5
			d-DSPe-CPL-M
			d-DSPe-CPL-D
			d-DSG-CPL-D
			d-DSPe-CPL-T1
			d-DSPe-CPL-Q5
			d-DSG-CPL-Q5
			d-DSPe-CPL-Q1
			d-DSPe-CPL-Q1+8
DBF1-124-2	DOPC/DODAC/PEG-Cer-C20	90/6/4 (0.5 Rho-PE)	d-DSPe-CPL-Q5
DBF1-124-3	DOPC/DODAC/PEG-Cer-C20	86/6/8 (0.5 Rho-PE)	d-DSPe-CPL-Q5

【図 2 3 b】

サンプル番号	脂質組成 ...	Mo%	CPL	Mo%	CPL/LUV	Mo%	CPL/LUV
DBF1207-1	DOPC/DODAC/PEG-Cer-C20	84/6/10 (0.25 Rho-PE)			d-DSPE-CPL-Q5	62	4.4
DBF1207-2	DOPC/DODAC/PEG-Cer-C14	84/6/10 (0.25 Rho-PE)			d-DSG-CPL-Q5	39	2.2
DBF1207-3	DOPC/DODAC/PEG-Cer-C8	79/6/15 (0.25 Rho-PE)				0.11	37
DBF1207-4	DOPC/DODAC/PEG-Cer-C20	84/6/10 (0.25 Rho-PE)	d-DSPE-CPL-M			0.17	36
DBF1207-5	DOPPE/DODAC/PEG-Cer-C14	84/6/10 (0.25 Rho-PE)	d-DSPE-CPL-T		d-DSPE-CPL-M	0.082	79
DBF1207-6	DOPPE/DODAC/PEG-Cer-C8	79/6/15 (0.25 Rho-PE)	d-DSPE-CPL-T		d-DSPE-CPL-D	0.070	80
DBF0201-1	DOPPE/DODAC/PEG-Cer-C14	84/6/10 (0.25 Rho-PE)	d-DSPE-CPL-Q1		d-DSG-CPL-D	0.1	24
DBF0310-1	DOPC	99.5 (0.5 Rho-PE)	d-DSPE-CPL-Q1		d-DSPE-CPL-T1	0.023	77
DBF0310-2	DOPC/Chol	54.5/45 (0.5 Rho-PE)	d-DSPE-CPL-Q5		d-DSPE-CPL-Q5	0.070	74
DBF0303-2	DOPC/PEG-Cer-C20	89.5/10 (0.5 Rho-PE)	d-DSPE-CPL-Q5		d-DSPE-CPL-Q5	0.093	62
DBF0303-4	DOPC/Chol/PEG-Cer-C20	44.5/45/10 (0.5 Rho-PE)	d-DSPE-CPL-Q5		d-DSPE-CPL-Q5	0.012	69
		d-DSPE-CPL-Q5			d-DSPE-CPL-Q5	0.024	76
		d-DSPE-CPL-Q5			d-DSPE-CPL-Q5	0.047	72
		d-DSPE-CPL-Q5			d-DSPE-CPL-Q5	0.023	79
		d-DSPE-CPL-Q5			d-DSPE-CPL-Q5	0.071	70

【図 2 3 c】

サンプル番号	CPL	Mo%	CPL/LUV	Mo%	CPL	Mo%	CPL/LUV	Mo%
DBF1102-2	d-DSPE-CPL-Q5	0.095	68	6.5	d-DSPE-CPL-Q5	0.045	78	3.5
	d-DSPE-CPL-Q5	0.14			d-DSPE-CPL-Q5	0.016	72	7.0
	d-DSPE-CPL-Q5	0.057			d-DSG-CPL-Q5	0.057	27	1.6
	d-DSPE-CPL-Q1	0.11			d-DSPE-CPL-Q1	0.17	25	2.8
	d-DSPE-CPL-Q1	0.022			d-DSPE-CPL-Q1	0.043	80	4.9
	d-DSPE-CPL-Q1	0.049			d-DSPE-CPL-Q1	0.043	78	3.4
	d-DSPE-CPL-Q1	0.049			d-DSPE-CPL-Q1	0.043	83	3.6
	d-DSPE-CPL-Q1	0.049			d-DSPE-CPL-Q1	0.065	69	4.4
	d-DSPE-CPL-Q1	0.049			d-DSPE-CPL-Q1	0.086	64	5.5
	d-DSPE-CPL-Q1	0.049			d-DSPE-CPL-Q1	0.013	75	0.95
DBF124-2	d-DSPE-CPL-Q5	0.071			DBF124-2	0.071	71	5.1
DBF124-3	d-DSPE-CPL-Q5	0.071			DBF124-3	0.071	67	4.7

【図 2 4 a】

サンプル番号	CPL	Mo%	CPL/LUV	Mo%	CPL/LUV	Mo%	CPL/LUV	Mo%
DBF1207-4	d-DSPE-CPL-M	0.05	58/62	2.9/3.1				
	d-DSPE-CPL-T	0.049	61	3.0				
DBF1207-5	d-DSPE-CPL-T	0.049	80	3.0				
DBF1207-6	d-DSPE-CPL-T	0.049	77	3.8				
	d-DSPE-CPL-Q1	0.022	75	1.6				
	d-DSPE-CPL-Q1	0.043	78	3.3				
	d-DSPE-CPL-Q1	0.065	78	5.0				
	d-DSPE-CPL-Q1	0.086	74	6.4				
DBF0201-1	d-DSPE-CPL-Q1	0.022	82	1.8				
	d-DSPE-CPL-Q1	0.043	81	3.5				
	d-DSPE-CPL-Q1	0.065	77	5.0				
	d-DSPE-CPL-Q1	0.086	72	6.2				

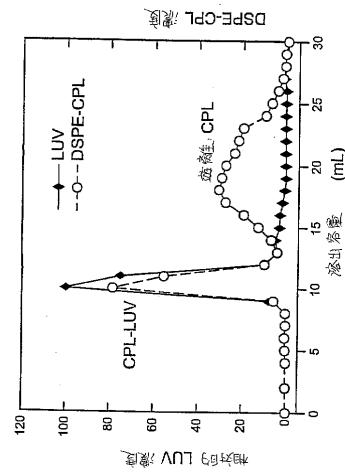
【図 2 4 b】

サンプル番号	CPL	Mo%	CPL/LUV	Mo%	CPL	Mo%	CPL/LUV	Mo%
DBF1102-2	d-DSPE-CPL-Q5	0.095	68	6.5	d-DSPE-CPL-Q5	0.045	78	3.5
	d-DSPE-CPL-Q5	0.14			d-DSPE-CPL-Q5	0.016	72	7.0
	d-DSPE-CPL-Q5	0.057			d-DSG-CPL-Q5	0.057	27	1.6
	d-DSPE-CPL-Q1	0.11			d-DSPE-CPL-Q1	0.17	25	2.8
	d-DSPE-CPL-Q1	0.022			d-DSPE-CPL-Q1	0.043	80	4.9
	d-DSPE-CPL-Q1	0.049			d-DSPE-CPL-Q1	0.043	78	3.4
	d-DSPE-CPL-Q1	0.049			d-DSPE-CPL-Q1	0.043	83	3.6
	d-DSPE-CPL-Q1	0.049			d-DSPE-CPL-Q1	0.065	69	4.4
	d-DSPE-CPL-Q1	0.049			d-DSPE-CPL-Q1	0.086	64	5.5
	d-DSPE-CPL-Q1	0.049			d-DSPE-CPL-Q1	0.013	75	0.95
DBF124-2	d-DSPE-CPL-Q5	0.071			DBF124-2	0.071	71	5.1
DBF124-3	d-DSPE-CPL-Q5	0.071			DBF124-3	0.071	67	4.7

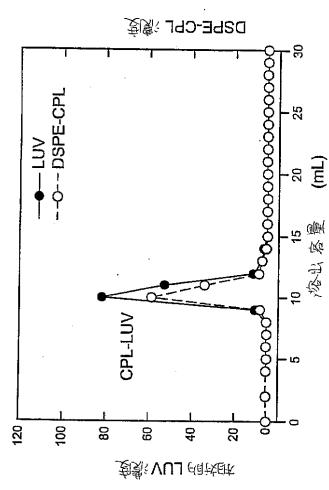
【図 2 4 c】

サンプル番号	CPL	初期LUV	%	最終Mol%
DBF0310-1	d-DSPE-CPL-Q1	0.095	65	4.2
	d-DSPE-CPL-Q5	0.034	84	2.9
DBF0310-2	d-DSPE-CPL-Q1	0.065	58	3.8
	d-DSPE-CPL-Q5	0.034	84	2.9
DBF0303-2	d-DSPE-CPL-Q1	0.095	57	3.7
	d-DSPE-CPL-Q5	0.034	70	2.4
DBF0303-4	d-DSPE-CPL-Q1	0.065	45	2.9
	d-DSPE-CPL-Q5	0.034	75	2.5

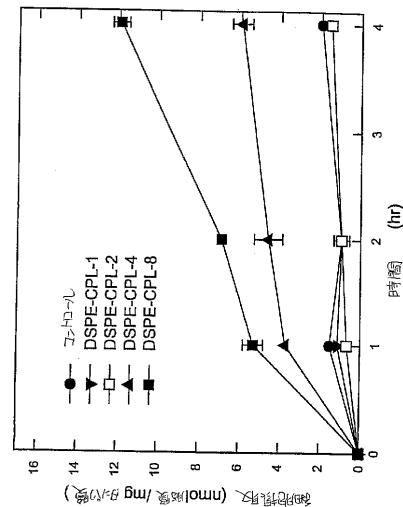
【図 2 5 a】



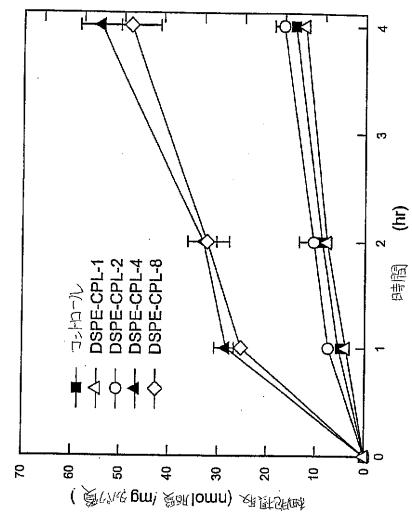
【図 2 5 b】



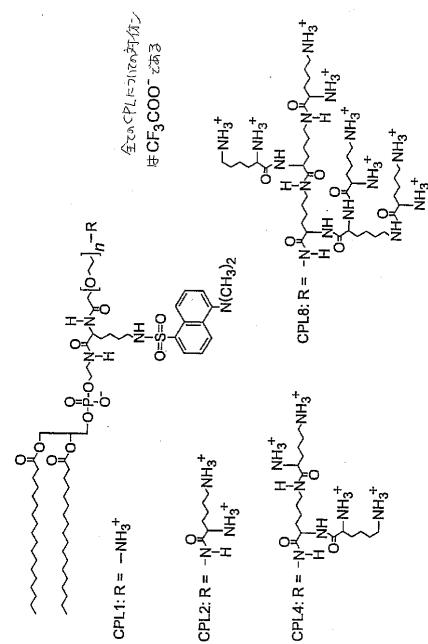
【図 2 6】



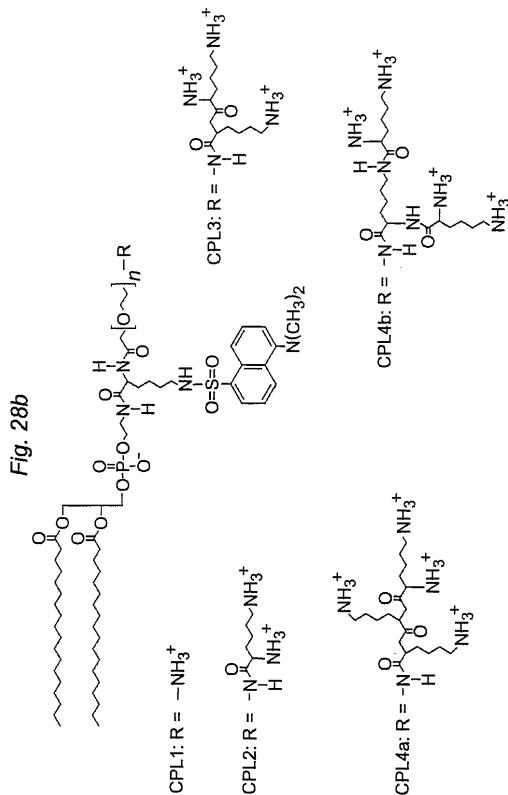
【図27】



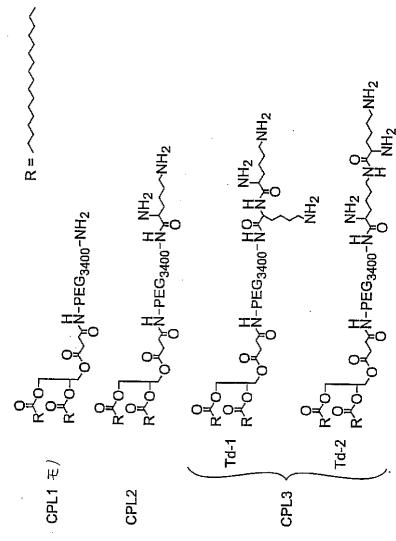
【図28 a】



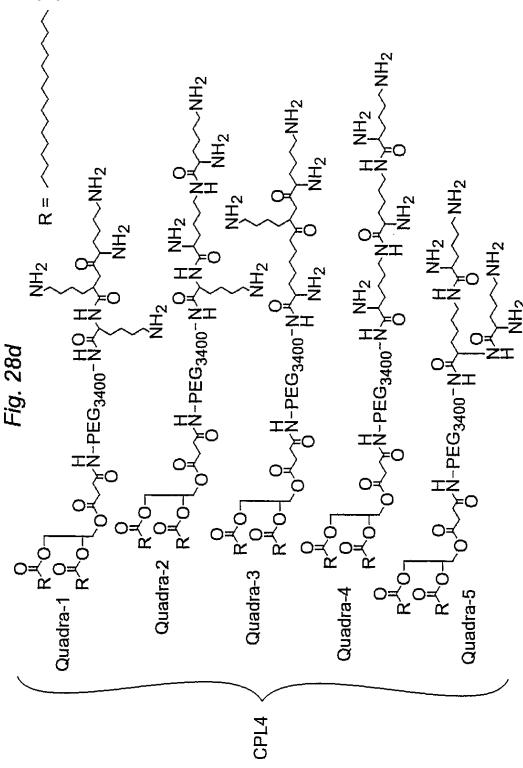
【図28 b】



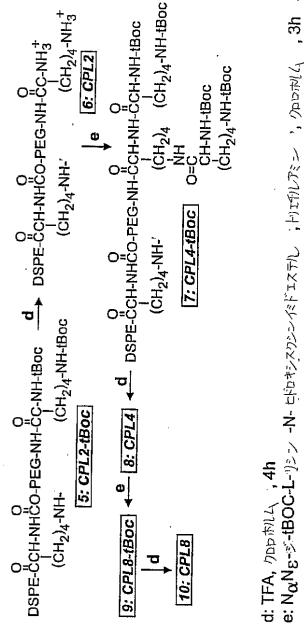
【図28 c】



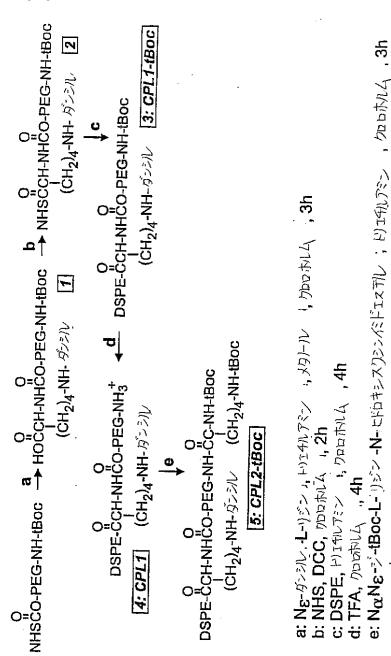
【図28d】



【図29b】



【図29a】



【図30】

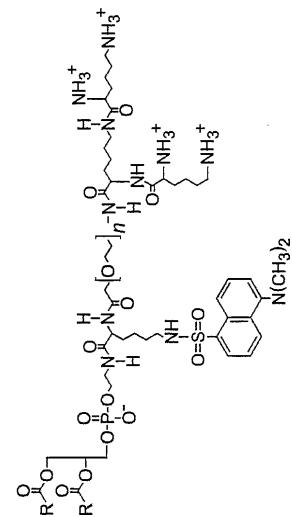
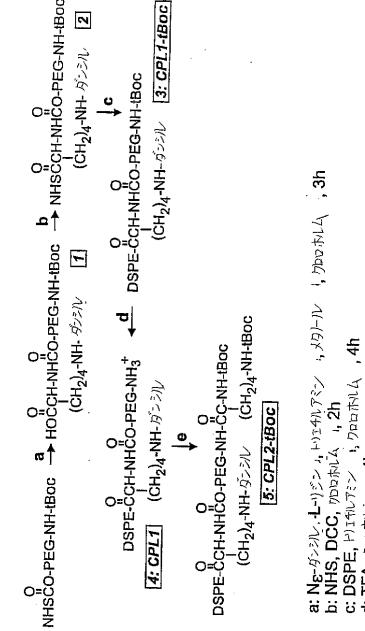
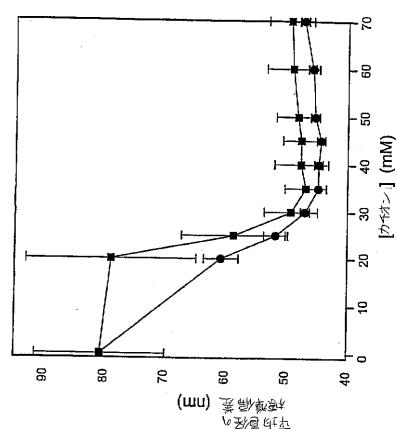


Fig. 30

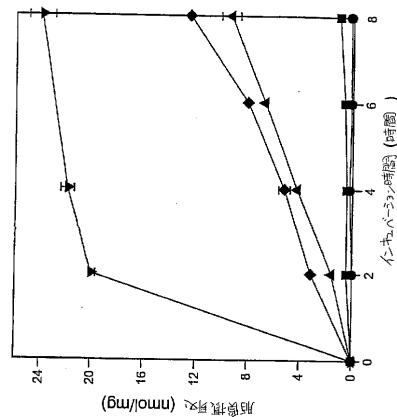
Fig. 28d



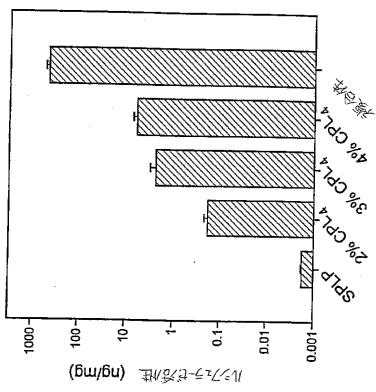
【図31】



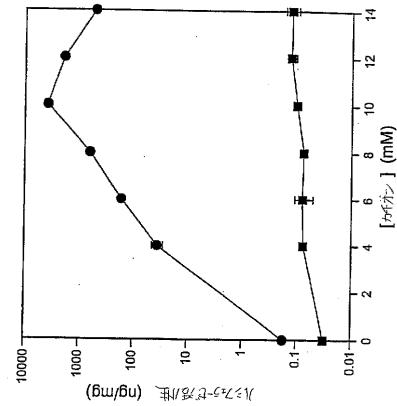
【図32】



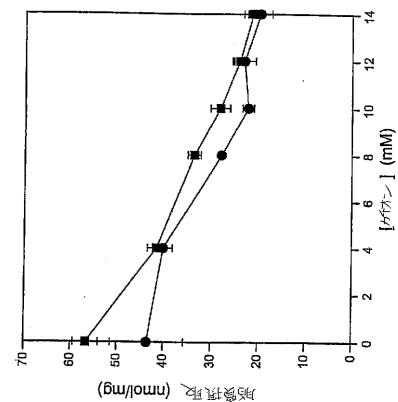
【図33】



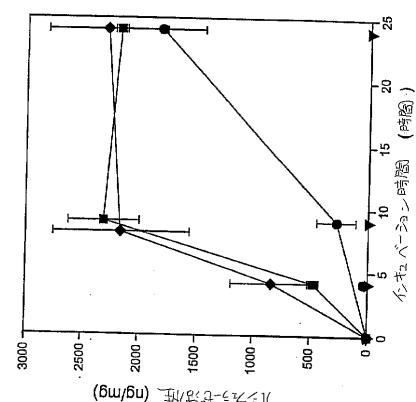
【図34】



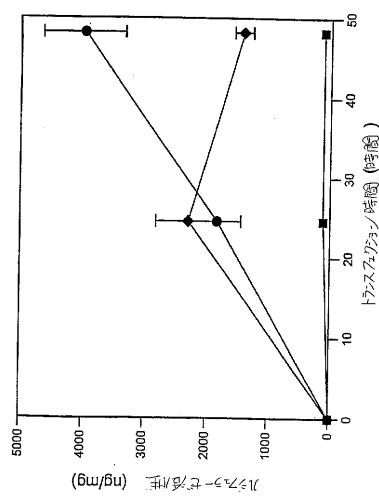
【図35】



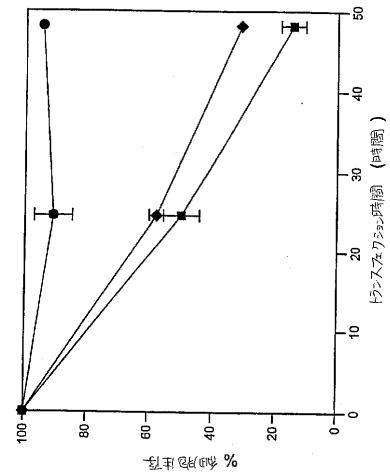
【図36】



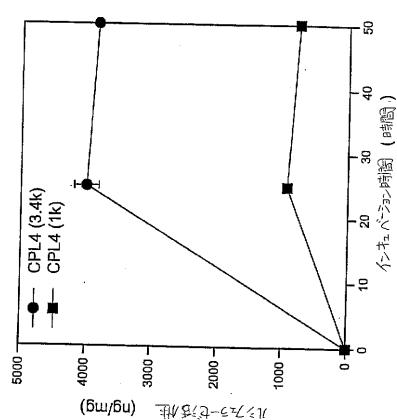
【図37a】



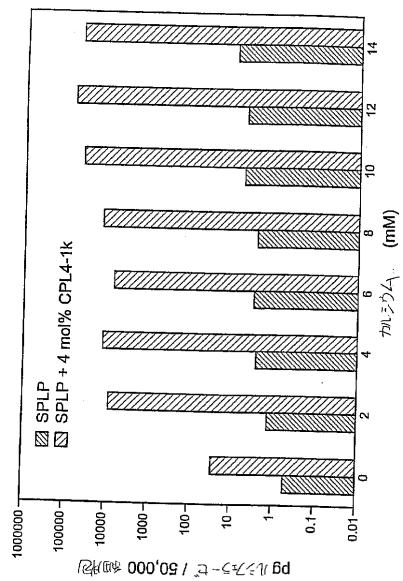
【図37b】



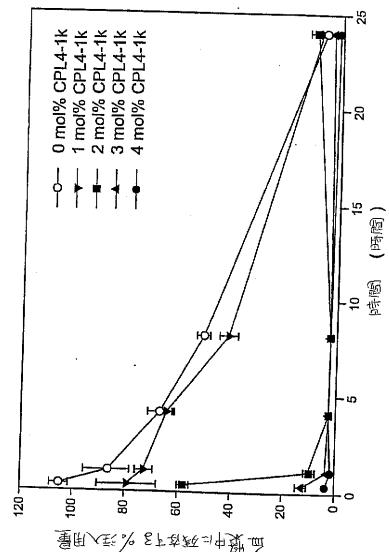
【図38】



【図39】



【図40】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
A 6 1 K 31/7135 (2006.01)	A 6 1 K 31/7135
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
C 0 7 K 4/00 (2006.01)	C 0 7 K 4/00

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 クリス, ピーター アール.

カナダ国 ブイ6アール 1エイチ4 ブリティッシュ コロンビア, バンクーバー, ウエスト ファースト アベニュー 3272

(72)発明者 チェン, タオ

カナダ国 ブイ6ワイ 1ゼット3 ブリティッシュ コロンビア, リッチモンド, マイノル ブールバード ナンバー 9- 7711

(72)発明者 フェンスケ, デビッド ビー.

カナダ国 ブイ3エス 7エル1 ブリティッシュ コロンビア, サリー, ブルックス クレスント 6080

(72)発明者 パルマー, ローン アール.

カナダ国 ブイ6ジェイ 1ダブリュー3 ブリティッシュ コロンビア, バンクーバー, ウエスト 8ティーエイチ アベニュー アパートメント 209 - 1950

(72)発明者 ウォン, キム

カナダ国 ブイ6アール 2ブイ5 ブリティッシュ コロンビア, バンクーバー, ウエスト 13ティーエイチ アベニュー 4595

審査官 佐々木 秀次

(56)参考文献 特表平11-507638 (JP, A)

特表2001-504093 (JP, A)

特表2001-503396 (JP, A)

国際公開第98/016202 (WO, A1)

国際公開第98/016201 (WO, A1)

国際公開第96/040285 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C08F,C08G,A61K

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)