

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-515479

(P2018-515479A)

(43) 公表日 平成30年6月14日 (2018.6.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 C 0 7 6
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/711 (2006.01)	A 6 1 K 31/711	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/7115 (2006.01)	A 6 1 K 31/7115	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 50 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-556986 (P2017-556986)	(71) 出願人	515166314
(86) (22) 出願日	平成28年5月5日 (2016.5.5)		イッサム リサーチ ディベロップメント
(85) 翻訳文提出日	平成29年12月13日 (2017.12.13)		カンパニー オブ ザ ヘブライ ユニ
(86) 国際出願番号	PCT/IL2016/050477		バーシティー オブ エルサレム リミテ
(87) 国際公開番号	W02016/178233		ッド
(87) 国際公開日	平成28年11月10日 (2016.11.10)		Y ISSUM RESEARCH DEV
(31) 優先権主張番号	238643		E LOPMENT COMPANY OF
(32) 優先日	平成27年5月5日 (2015.5.5)		T H E H E B R E W U N I V E R S
(33) 優先権主張国	イスラエル (IL)		T Y O F J E R U S A L E M L T D
			.
			イスラエル国 9139002 エルサレ
			ム, キバトラム, エドモンド ジュー,
			サフラキャンパス, ハイテックパーク
		(74) 代理人	110001302
			特許業務法人北青山インターナショナル
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸-カチオン性ポリマー組成物、並びにその作製方法及び使用方法

(57) 【要約】

核酸、カチオン性ポリマー、及び炭水化物を含有する凍結乾燥前組成物が本明細書にて提供される。また、凍結乾燥された組成物、及び再構成された組成物、並びにその作製方法、患者の腫瘍を治療するためのその使用方法も提供される。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

核酸、カチオン性ポリマー、及び炭水化物溶液を含み、前記核酸及び前記カチオン性ポリマーが、複合体を形成し、前記炭水化物対前記核酸 - ポリマー複合体の重量 / 重量比が、50 から 1000 である組成物。

【請求項 2】

凍結乾燥前の形態又は凍結乾燥された形態である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記複合体が、前記少なくとも 1 つの核酸及び少なくとも 1 つのカチオン性ポリマーを含むナノ粒子の形態である、請求項 1 又は 2 に記載の組成物。

10

【請求項 4】

前記ナノ粒子が、約 40 から約 90 nm のサイズである、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記比が、500 未満である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記比が、250 未満である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 7】

少なくとも 1 つの核酸が、少なくとも 1 つの核酸含有材料である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記核酸が、DNA 又は RNA である、請求項 1 に記載の組成物。

20

【請求項 9】

前記核酸が、DNA 又は RNA の塩基類似体である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記塩基類似体が、4 - アセチルシトシン、8 - ヒドロキシ - N6 - メチルアデノシン、アジリジニルシトシン、シュードイソシトシン、5 - (カルボキシヒドロキシル - メチル) ウラシル、5 - フルオロウラシル、5 - プロモウラシル、5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - チオウラシル、5 - カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、N6 - イソペンテニルアデニン、1 - メチルアデニン、1 - メチルシュードウラシル、1 - メチルグアニン、1 - メチルイノシン、2, 2 - ジメチルグアニン、2 - メチルアデニン、2 - メチルグアニン、3 - メチルシトシン、5 - メチルシトシン、N6 - メチルアデニン、7 - メチルグアニン、5 - メチルアミノメチルウラシル、5 - メトキシ - アミノメチル - 2 - チオウラシル、5' - メトキシカルボニルメチルウラシル、5 - メトキシウラシル、2 - メチルチオ - N6 - イソペンテニルアデニン、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸、オキシプトキソシン、シュードウラシル、クエオシン、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸、クエオシン、2 - チオシトシン、及び 2, 6 - ジアミノプリンから選択される、請求項 1 に記載の組成物。

30

【請求項 11】

前記核酸が、プラスミドである、請求項 1 に記載の組成物。

40

【請求項 12】

前記プラスミド核酸が、DNA、shRNA、siRNA、及びオリゴヌクレオチドから選択される、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記プラスミドが、H19 制御配列を有する、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 14】

前記 H19 配列が、H19 プロモーター、H19 エンハンサー、並びに前記 H19 プロモーター及び H19 エンハンサーの両方から選択される、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 15】

50

前記 H 1 9 制御配列が、前記 H 1 9 プロモーター及エンハンサーを含み、前記異種配列が、 β -ガラクトシダーゼ、ジフテリア毒素、シュードモナス毒素、リシン、コレラ毒素、網膜芽細胞腫遺伝子、p 5 3、単純ヘルペスウィルスチミジンキナーゼ、水痘帯状疱疹ウィルスチミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、ニトロレダクターゼ、チトクロム p - 4 5 0 2 B 1、チミジンホスホリラーゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、アルカリホスファターゼ、カルボキシペプチダーゼ A 及び G 2、リナマラーゼ、 β -ラクタマーゼ、並びにキサンチンオキシダーゼから成る群より選択されるタンパク質をコードする、請求項 1 4 に記載の組成物。

【請求項 1 6】

前記制御配列が、I G F - 2 P 4 プロモーター又は I G F - 2 P 3 プロモーターである、請求項 1 3 に記載の組成物。

10

【請求項 1 7】

前記 H 1 9 エンハンサーが、前記異種配列に対して 3' 側にある、請求項 1 3 に記載の組成物。

【請求項 1 8】

前記異種配列が、 β -ガラクトシダーゼ；ジフテリア毒素；シュードモナス毒素；リシン；コレラ毒素；網膜芽細胞腫遺伝子；p 5 3；単純ヘルペスウィルスチミジンキナーゼ；水痘帯状疱疹ウィルスチミジンキナーゼ；シトシンデアミナーゼ；ニトロレダクターゼ；チトクロム p - 4 5 0 2 B 1；チミジンホスホリラーゼ；プリンヌクレオシドホスホリラーゼ；アルカリホスファターゼ；カルボキシペプチダーゼ A 及び G 2；リナマラーゼ； β -ラクタマーゼ；キサンチンオキシダーゼのコード配列；並びに c d k 2、c d k 8、c d k 2 1、c d c 2 5 A、c y c l i n D 1、c y c l i n E、c y c l i n A、c d k 4、発癌性形態の p 5 3、c - f o s、c - j u n、K r - r a s、及び H e r 2 / n e u から成る群より選択される遺伝子をコードする配列と特異的にハイブリダイズするアンチセンス配列から選択され、前記異種配列は、c d k 2、c d k 8、c d k 2 1、c d c 2 5 A、c y c l i n D 1、c y c l i n E、c y c l i n A、c d k 4、発癌性形態の p 5 3、c - f o s、c - j u n、K r - r a s、及び H e r 2 / n e u から成る群より選択される遺伝子をコードする R N A を特異的に開裂するリボザイムをコードしてもよい、請求項 1 7 に記載の組成物。

20

【請求項 1 9】

少なくとも 1 つの炭水化物が、一般式 $(C H_2 O)_n$ を有し、サッカリド、ポリサッカリド、及びオリゴサッカリドから選択される化合物である、請求項 1 に記載の組成物。

30

【請求項 2 0】

前記少なくとも 1 つの炭水化物が、モノ -、ジ -、トリ -、及びオリゴ - サッカリド、並びにポリサッカリドから選択される、請求項 1 9 に記載の組成物。

【請求項 2 1】

前記少なくとも 1 つの炭水化物が、グリコーゲン、セルロース、及びデンプンから選択される、請求項 2 0 に記載の組成物。

【請求項 2 2】

前記少なくとも 1 つの炭水化物が、モノサッカリドから選択される、請求項 1 9 に記載の組成物。

40

【請求項 2 3】

前記モノサッカリドが、グルコース、フルクトース、マンノース、キシロース、アラビノース、及びガラクトースから選択される、請求項 2 2 に記載の組成物。

【請求項 2 4】

前記少なくとも 1 つの炭水化物が、ジサッカリドから選択される、請求項 1 9 に記載の組成物。

【請求項 2 5】

前記ジサッカリドが、トレハロース、スクロース、セロビオース、マルトース、及びラクトースから選択される、請求項 2 4 に記載の組成物。

50

【請求項 26】

前記少なくとも 1 つの炭水化物が、オリゴサッカリドから選択される、請求項 19 に記載の組成物。

【請求項 27】

前記オリゴサッカリドが、ラフィノース、スタキオース、及びマルトデキストリンから選択される、請求項 26 に記載の組成物。

【請求項 28】

前記少なくとも 1 つの炭水化物が、トレハロース、グルコース、スクロース、ラクトース、マンニトール、ソルビトール、ラフィノース、PVP、及びデキストロースから選択される、請求項 19 に記載の組成物。

10

【請求項 29】

前記少なくとも 1 つの炭水化物が、グルコース又はスクロースではない、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 30】

前記少なくとも 1 つの炭水化物が、モノサッカリド及びジサッカリドから選択される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 31】

前記少なくとも 1 つの炭水化物が、トレハロースである、請求項 1 又は 19 又は 25 に記載の組成物。

【請求項 32】

前記少なくとも 1 つのカチオン性ポリマーが、親水性又は両親媒性のカチオン性ポリマーである、請求項 1 に記載の組成物。

20

【請求項 33】

前記カチオン性ポリマーが、一級、二級、三級、及び / 又は四級アミン基を含有するポリマーから選択される、請求項 32 に記載の組成物。

【請求項 34】

前記少なくとも 1 つのカチオン性ポリマーが、ポリエチレンイミン、ポリアリルアミン、ポリエーテルアミン、ポリビニルピリジン、正に帯電した官能基を有するポリサッカリド、ポリアミノ酸、ポリ-L-ヒスチジン、ポリ-D-リジン、ポリ-DL-リジン、ポリ-L-リジン、ポリ-e-CBZ-O-リジン、ポリ-e-CBZ-DL-リジン、ポリ-e-CBZ-L-リジン、ポリ-OL-オルニチン、ポリ-L-オルニチン、ポリ-DELT A-CBZ-DL-オルニチン、ポリ-L-アルギニン、ポリ-DL-アラニン-ポリ-L-リジン、ポリ(L-フェニルアラニン、L-グルタミン酸)-ポリ-DL-アラニン-ポリ-L-リジン、ポリ(L-チロシン、L-グルタミン酸)-ポリ-DL-アラニン-ポリ-L-リジン、L-アルギニンとトリプトファン、チロシン、又はセリンとのコポリマー、D-グルタミン酸とD-リジンのコポリマー、L-グルタミン酸とリジン、オルニチン、又はリジン及びオルニチンの混合物とのコポリマー、並びにポリ-(L-グルタミン酸)から選択される、請求項 33 に記載の組成物。

30

【請求項 35】

前記少なくとも 1 つのカチオン性ポリマーが、ポリエチレンイミン(PEI)である、請求項 34 に記載の組成物。

40

【請求項 36】

前記少なくとも 1 つのカチオン性ポリマーが、直鎖状ポリエチレンイミン(PEI)である、請求項 35 に記載の組成物。

【請求項 37】

前記 PEI のアミン基の前記核酸のリン酸基のモル数に対するモル比が、2 から 10 である、請求項 32 に記載の組成物。

【請求項 38】

前記組成物が、核酸 / 炭水化物溶液をカチオン性ポリマー / 炭水化物溶液に、前記少な

50

くとも１つの核酸と前記少なくとも１つのカチオン性ポリマーとの間の複合体の形成が可能となる条件下で添加することによって作製される、請求項１から３７のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項３９】

前記核酸／炭水化物溶液及び前記カチオン性ポリマー／炭水化物溶液が、各々別々に、独立して作製される、請求項３８に記載の組成物。

【請求項４０】

前記作製方法が：

（ａ）少なくとも１つの核酸及び少なくとも１つの炭水化物の溶液を得ること；

（ｂ）少なくとも１つのカチオン性ポリマー及び少なくとも１つの炭水化物の溶液を得ること；

（ｃ）前記核酸／炭水化物溶液を前記カチオン性ポリマー／炭水化物溶液に、前記少なくとも１つの核酸と前記少なくとも１つのカチオン性ポリマーとの間の複合体の形成が可能となる条件下で添加すること；並びに

（ｄ）所望に応じて、前記混合された核酸／カチオン性ポリマー／炭水化物溶液を凍結乾燥して、凍結乾燥された組成物を形成することを含む、請求項３８に記載の組成物。

【請求項４１】

前記方法が、前記核酸／炭水化物溶液を形成する工程、及び前記カチオン性ポリマー／炭水化物溶液を形成する工程をさらに含む、請求項４０に記載の組成物。

【請求項４２】

前記方法が：

（ａ）ある量の前記少なくとも１つの核酸を、第一の量の前記少なくとも１つの炭水化物と混合して、核酸／炭水化物溶液を形成すること；及び

（ｂ）ある量の前記少なくとも１つのカチオン性ポリマーを、第二の量の前記少なくとも１つの炭水化物と混合して、カチオン性ポリマー／炭水化物溶液を形成することを含む、請求項４０に記載の組成物。

【請求項４３】

前記核酸／炭水化物溶液の前記カチオン性ポリマー／炭水化物溶液への前記添加が、室温で行われる、請求項３８に記載の組成物。

【請求項４４】

凍結乾燥される、請求項１から４３のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項４５】

少なくとも１つの核酸、少なくとも１つのカチオン性ポリマー、及び少なくとも１つの炭水化物を含む組成物を作製するための方法であって、前記方法は、核酸／炭水化物溶液をカチオン性ポリマー／炭水化物溶液に、前記少なくとも１つの核酸と前記少なくとも１つのカチオン性ポリマーとの間の複合体の形成が可能となる条件下で添加することを含む、方法。

【請求項４６】

前記核酸／炭水化物溶液及び前記カチオン性ポリマー／炭水化物溶液が、各々別々に、独立して作製される、請求項４５に記載の方法。

【請求項４７】

（ａ）少なくとも１つの核酸及び少なくとも１つの炭水化物の溶液を得ること；

（ｂ）少なくとも１つのカチオン性ポリマー及び少なくとも１つの炭水化物の溶液を得ること；

（ｃ）前記核酸／炭水化物溶液を前記カチオン性ポリマー／炭水化物溶液に、前記少なくとも１つの核酸と前記少なくとも１つのカチオン性ポリマーとの間の複合体の形成が可能となる条件下で添加すること；並びに

（ｄ）所望に応じて、前記混合された核酸／カチオン性ポリマー／炭水化物溶液を凍結乾燥して、凍結乾燥された組成物を形成すること

を含む、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記核酸 / 炭水化物溶液を形成する工程、及び前記カチオン性ポリマー / 炭水化物溶液を形成する工程をさらに含む、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 9】

(a) ある量の前記少なくとも 1 つの核酸を、第一の量の前記少なくとも 1 つの炭水化物と混合して、核酸 / 炭水化物溶液を形成すること；及び

(b) ある量の前記少なくとも 1 つのカチオン性ポリマーを、第二の量の前記少なくとも 1 つの炭水化物と混合して、カチオン性ポリマー / 炭水化物溶液を形成することを含む、請求項 4 5 に記載の方法。

10

【請求項 5 0】

前記少なくとも 1 つの核酸と前記少なくとも 1 つのカチオン性ポリマーとの間の前記複合体が、材料ナノ粒子に形成され、各ナノ粒子は、ナノメートルのサイズである、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 1】

各ナノ粒子が、前記少なくとも 1 つの核酸及び前記少なくとも 1 つのカチオン性ポリマーを含む、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記ナノ粒子が、約 4 0 から約 9 0 n m のサイズである、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記核酸 / 炭水化物溶液の前記カチオン性ポリマー / 炭水化物溶液への前記添加が、室温で行われる、請求項 4 5 に記載の方法。

20

【請求項 5 4】

前記添加が、一定の速度及び一定の混合下である、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記少なくとも 1 つの炭水化物の前記少なくとも 1 つの核酸に対する比が、1, 0 0 0 未満、又は 9 5 0 未満、又は 9 0 0 未満、又は 8 5 0 未満、又は 8 0 0 未満、又は 7 5 0 未満、又は 7 0 0 未満、又は 6 5 0 未満、又は 6 0 0 未満、又は 5 5 0 未満、又は 5 0 0 未満、又は 4 5 0 未満、又は 4 0 0 未満、又は 3 5 0 未満、又は 3 0 0 未満、又は 2 5 0 未満、又は 2 0 0 未満、又は 1 5 0 未満、又は 1 0 0 未満である、請求項 4 5 に記載の方法。

30

【請求項 5 6】

前記比が、5 0 0 未満である、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記比が、2 5 0 未満である、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記組成物を凍結乾燥する工程をさらに含む、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 5 9】

少なくとも 1 つの核酸が、少なくとも 1 つの核酸含有材料である、請求項 4 5 に記載の方法。

40

【請求項 6 0】

前記核酸が、DNA 又は RNA である、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記核酸が、DNA 又は RNA の塩基類似体である、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記塩基類似体が、4 - アセチルシトシン、8 - ヒドロキシ - N 6 - メチルアデノシン、アジリジニルシトシン、シュードイソシトシン、5 - (カルボキシヒドロキシル - メチル) ウラシル、5 - フルオロウラシル、5 - プロモウラシル、5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - チオウラシル、5 - カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、N 6 - イソペンテニルアデニン、1 - メチルアデニン、1 - メチルシ

50

ユードウラシル、1 - メチルグアニン、1 - メチルイノシン、2 , 2 - ジメチルグアニン、2 - メチルアデニン、2 - メチルグアニン、3 - メチルシトシン、5 - メチルシトシン、N 6 - メチルアデニン、7 - メチルグアニン、5 - メチルアミノメチルウラシル、5 - メトキシ - アミノメチル - 2 - チオウラシル、5 ' - メトキシカルボニルメチルウラシル、5 - メトキシウラシル、2 - メチルチオ - N 6 - イソペンテニルアデニン、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸、オキシプトキソシン、シュードウラシル、クエオシン、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸、クエオシン、2 - チオシトシン、及び 2 , 6 - ジアミノプリンから選択される、請求項 6 1 に記載の方法。

10

【請求項 6 3】

前記核酸が、プラスミドである、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記プラスミド核酸が、DNA、shRNA、siRNA、及びオリゴヌクレオチドから選択される、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記プラスミドが、H 1 9 制御配列を有する、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記 H 1 9 配列が、H 1 9 プロモーター、H 1 9 エンハンサー、並びに前記 H 1 9 プロモーター及び H 1 9 エンハンサーの両方から選択される、請求項 6 5 に記載の方法。

20

【請求項 6 7】

前記 H 1 9 制御配列が、前記 H 1 9 プロモーター及エンハンサーを含み、前記異種配列が、β - ガラクトシダーゼ、ジフテリア毒素、シュードモナス毒素、リシン、コレラ毒素、網膜芽細胞腫遺伝子、p 5 3、単純ヘルペスウィルスチミジンキナーゼ、水痘帯状疱疹ウィルスチミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、ニトロレダクターゼ、チトクロム p - 4 5 0 2 B 1、チミジンホスホリラーゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、アルカリホスファターゼ、カルボキシペプチダーゼ A 及び G 2、リナマラーゼ、β - ラクタマーゼ、並びにキサンチンオキシダーゼから成る群より選択されるタンパク質をコードする、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記制御配列が、IGF - 2 P 4 プロモーター又は IGF - 2 P 3 プロモーターである、請求項 6 5 に記載の方法。

30

【請求項 6 9】

前記 H 1 9 エンハンサーが、前記異種配列に対して 3 ' 側にある、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記異種配列が、β - ガラクトシダーゼ；ジフテリア毒素；シュードモナス毒素；リシン；コレラ毒素；網膜芽細胞腫遺伝子；p 5 3；単純ヘルペスウィルスチミジンキナーゼ；水痘帯状疱疹ウィルスチミジンキナーゼ；シトシンデアミナーゼ；ニトロレダクターゼ；チトクロム p - 4 5 0 2 B 1；チミジンホスホリラーゼ；プリンヌクレオシドホスホリラーゼ；アルカリホスファターゼ；カルボキシペプチダーゼ A 及び G 2；リナマラーゼ；β - ラクタマーゼ；キサンチンオキシダーゼのコード配列；並びに c d k 2、c d k 8、c d k 2 1、c d c 2 5 A、c y c l i n D 1、c y c l i n E、c y c l i n A、c d k 4、発癌性形態の p 5 3、c - f o s、c - j u n、K r - r a s、及び H e r 2 / n e u から成る群より選択される遺伝子をコードする配列と特異的にハイブリダイズするアンチセンス配列から選択され、前記異種配列は、c d k 2、c d k 8、c d k 2 1、c d c 2 5 A、c y c l i n D 1、c y c l i n E、c y c l i n A、c d k 4、発癌性形態の p 5 3、c - f o s、c - j u n、K r - r a s、及び H e r 2 / n e u から成る群より選択される遺伝子をコードする RNA を特異的に開裂するリボザイムをコードしてもよい、請求項 6 9 に記載の方法。

40

50

【請求項 7 1】

少なくとも 1 つの炭水化物が、一般式 $(CH_2O)_n$ を有し、サッカリド、ポリサッカリド、及びオリゴサッカリドから選択される化合物である、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記少なくとも 1 つの炭水化物が、モノ - 、ジ - 、トリ - 、及びオリゴ - サッカリド、並びにポリサッカリドから選択される、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記少なくとも 1 つの炭水化物が、グリコーゲン、セルロース、及びデンプンから選択される、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記少なくとも 1 つの炭水化物が、モノサッカリドから選択される、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 7 5】

前記モノサッカリドが、グルコース、フルクトース、マンノース、キシロース、アラビノース、及びガラクトースから選択される、請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記少なくとも 1 つの炭水化物が、ジサッカリドから選択される、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記ジサッカリドが、トレハロース、スクロース、セロビオース、マルトース、及びラクトースから選択される、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記少なくとも 1 つの炭水化物が、オリゴサッカリドから選択される、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 7 9】

前記オリゴサッカリドが、ラフィノース、スタキオース、及びマルトデキストリンから選択される、請求項 7 8 に記載の方法。

【請求項 8 0】

前記少なくとも 1 つの炭水化物が、トレハロース、グルコース、スクロース、ラクトース、マンニトール、ソルビトール、ラフィノース、PVP、及びデキストロースから選択される、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 8 1】

前記少なくとも 1 つの炭水化物が、グルコース又はスクロースではない、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 8 2】

前記少なくとも 1 つの炭水化物が、モノサッカリド及びジサッカリドから選択される、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 8 3】

前記少なくとも 1 つの炭水化物が、トレハロースである、請求項 8 2 に記載の方法。

【請求項 8 4】

前記少なくとも 1 つのカチオン性ポリマーが、親水性又は両親媒性のカチオン性ポリマーである、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記カチオン性ポリマーが、一級、二級、三級、及び / 又は四級アミン基を含有するポリマーから選択される、請求項 8 4 に記載の方法。

【請求項 8 6】

前記少なくとも 1 つのカチオン性ポリマーが、ポリエチレンイミン、ポリアリルアミン、ポリエーテルアミン、ポリビニルピリジン、正に帯電した官能基を有するポリサッカリド、ポリアミノ酸、ポリ - L - ヒスチジン、ポリ - D - リジン、ポリ - DL - リジン、ポリ - L - リジン、ポリ - e - CBZ - O - リジン、ポリ - e - CBZ - DL - リジン、ポ

10

20

30

40

50

リ - e - C B Z - L - リジン、ポリ - O L - オルニチン、ポリ - L - オルニチン、ポリ - D E L T A - C B Z - D L - オルニチン、ポリ - L - アルギニン、ポリ - D L - アラニン - ポリ - L - リジン、ポリ (- L - ヒスチジン、L - グルタミン酸) - ポリ - D L - アラニン - ポリ - L - リジン、ポリ (L - フェニルアラニン、L - グルタミン酸) - ポリ - D L - アラニン - ポリ - L - リジン、ポリ (L - チロシン、L - グルタミン酸) - ポリ - D L - アラニン - ポリ - L - リジン、L - アルギニンとトリプトファン、チロシン、又はセリンとのコポリマー、D - グルタミン酸とD - リジンとのコポリマー、L - グルタミン酸とリジン、オルニチン、又はリジン及びオルニチンの混合物とのコポリマー、並びにポリ - (L - グルタミン酸) から選択される、請求項 8 5 に記載の方法。

【請求項 8 7】

10

前記少なくとも 1 つのカチオン性ポリマーが、ポリエチレンイミン (P E I) である、請求項 8 6 に記載の方法。

【請求項 8 8】

前記少なくとも 1 つのカチオン性ポリマーが、直鎖状ポリエチレンイミン (P E I) である、請求項 8 7 に記載の方法。

【請求項 8 9】

前記 P E I のアミン基の前記核酸のリン酸基のモル数に対するモル比が、2 から 1 0 である、請求項 8 7 に記載の方法。

【請求項 9 0】

前記少なくとも 1 つの核酸が、プラスミドであり、前記少なくとも 1 つのカチオン性ポリマーが、P E I であり、少なくとも 1 つの炭水化物が、トレハロースである、請求項 4 5 に記載の方法。

20

【請求項 9 1】

前記少なくとも 1 つの核酸及び前記少なくとも 1 つのカチオン性ポリマーが、複合体を形成し、前記炭水化物対前記核酸 - ポリマー複合体の重量 / 重量比が、5 0 から 1 0 0 0 である、請求項 9 0 に記載の方法。

【請求項 9 2】

前記少なくとも 1 つの核酸が、プラスミドであり、前記少なくとも 1 つのカチオン性ポリマーが、P E I であり、少なくとも 1 つの炭水化物が、トレハロースである、請求項 1 に記載の組成物。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、腫瘍細胞生物学、遺伝子治療法、及び癌治療の分野全般に関する。より詳細には、本発明は、凍結乾燥することができる核酸及びカチオン性ポリマーの組成物、並びにその作製方法及び使用方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

患者の細胞への治療的送達によって疾患を治療するための薬物としての D N A プラスミドの使用は、これまで治療不能と見なされてきた広範囲にわたる病態に対する新規な薬剤の開発における来るべき技術の 1 つである。

40

【0 0 0 3】

身体内でのヌクレアーゼ分解を克服することによって細胞内部への機能性 D N A プラスミドの効果的な送達を達成するために、核酸分子は、「ベクター」内に組み込まれるべきである。

【0 0 0 4】

遺伝子治療法に関するほとんどの初期の研究は、ウィルス媒介ベクターの開発が焦点であったが、非ウィルス系トランスフェクタントが、安全で効果的である可能性のある遺伝子治療法での送達方法として開発されてきた。

【0 0 0 5】

50

ウィルス系ベクターと比較して、このような非ウィルス系送達システムは、低い毒性及び免疫原性、ヌクレアーゼに対する耐性、及び改善された安全プロファイルを含むいくつかの利点を示す。

【 0 0 0 6 】

そのような非ウィルス系送達システムの限定されない例としては、トランスフェクションプロセスの過程での分解からDNAを保護することができる新たに作り出されたりポプレックス及び/又はポリプレックスなどの新規な分子が挙げられる。

【 0 0 0 7 】

リポプレックスを形成するためには、プラスミドDNAは、組織化された構造を有するカチオン性脂質（例：ミセル又はリボソーム）で覆われる。負に帯電したDNA及び正に帯電した脂質によるこのようなカチオン性脂質複合体は、細胞膜との相互作用も起こし、それによって、リポプレックスのエンドサイトーシスが発生する。続いて、リポプレックス中のDNAが、細胞質中に放出される。

10

【 0 0 0 8 】

ポリプレックスは、DNAとポリマーとの複合体である。典型的には、ポリプレックスは、カチオン性ポリマーを用い、それが、ポリアニオン性DNAと相互作用し、複合体形成する。

【 0 0 0 9 】

開発されてきた広範囲に及ぶ非ウィルス系ベクターの中でも、カチオン性ポリマーの直鎖状ポリエチレンアミン（PEI）（その全内容が参照により本明細書に援用される米国特許第6,013,240号参照）は、プラスミド送達においていくつかの利点を示しており（Pathak et al., Biotechnol. J. 4:1559-1572 (2009); Kasper et al. Journal of Controlled Release 151:246-255 (2011)参照）、臨床試験で用いられている（Gofrit et al., The Journal of Urology 191(6):1697-1702 (2014); Abraham et al., The Journal of Urology 180(6):2379-2383 (2008)参照）。したがって、PEIは、非ウィルス系ベクターの「至適基準」と見なされている（Pathak et al., Biotechnol. J. 4:1559-1572 (2009); Kasper et al. Journal of Controlled Release 151:246-255(2011)参照）。

20

【 0 0 1 0 】

直鎖状ポリエチレンイミン（LPEI）とDNAプラスミドとをベースとするポリプレックスは、広範な様々なトランスフェクタントと比較したトランスフェクション効率という点での有利な性質で知られている。しかし、水溶液中でのそのような複合体の安定性は、限定的であり、投与前に新たに複合体を作製する必要があることは、特に高DNA濃度溶液において、バッチ間の変動のリスクを高める。そのような条件下では、このような複合体の再現性及び品質の制御を、医薬品で求められる程度まで保証することはできない。

30

【 0 0 1 1 】

先行技術

[1] 米国特許第6,013,240号

[2] Pathak et al., Biotechnol. J. 4:1559-1572 (2009)

[3] Kasper et al. Journal of Controlled Release 151:246-255 (2011)

[4] Gofrit et al., The Journal of Urology 191(6):1697-1702 (2014)

40

[5] Abraham et al., The Journal of Urology 180(6):2379-2383 (2008)

[6] Pathak et al., Biotechnol. J. 4:1559-1572 (2009)

[7] 国際出願PCT/IL1998/000486（国際公開第1999/018195号）

[8] 国際出願PCT/IL2008/001405（国際公開第2009/053982号）

[9] 国際出願PCT/IL2006/001110（国際公開第2007/034487号）

[10] 国際出願PCT/IL2006/000785（米国特許第8,067,573号）

50

[1 1] 国際出願 P C T / I L 2 0 0 8 / 0 0 0 0 7 1 (米国特許第 7 , 9 2 8 , 0 8 3 号)

[1 2] Brus et al., Journal of Controlled Release 95:119-131 (2004)

[1 3] Kasper et al., European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 77:182-185(2011)

[1 4] Julia Christina Kasper, Doctoral Thesis “Lyophilization of Nucleic Acid Nanoparticles-Formulation Development, Stabilization Mechanisms, and Process Monitoring” (2012)

【発明の概要】

【 0 0 1 2 】

10

したがって、本技術分野において、より効率的であり、工業的に有用な規模に容易にスケール変更可能である核酸 - カチオン性ポリマー組成物を作製する方法が求められている。

【 0 0 1 3 】

本明細書で開示される本発明の発明者らは、核酸、カチオン性ポリマー、及び炭水化物を含有し、水溶液中での安定性がはるかに改善され、本技術分野にて公知の類似の組成物に対する非常に優れた代替品を提供する凍結乾燥前、凍結乾燥された、及び再構成された組成物 / 配合物を作製するための独特の方法を開発した。本発明の方法、並びにそれによって作製された組成物は、精密に作製され、安全であり、工業的なスケール変更が可能である治療用途のための複合体の必要性に対する解決策を提供する。

20

【 0 0 1 4 】

本発明の方法により、配合物のいずれの成分の構造、完全性、安定性、及び生物学的利用度にも悪影響を与えることなく、凍結乾燥された又は凍結乾燥前配合物に製剤することができる安定で、精密な投与が可能であり、均一な組成物 / 配合物の工業的な製造が可能となる。

【 0 0 1 5 】

したがって、第一の態様では、本発明は、少なくとも 1 つの核酸、少なくとも 1 つのカチオン性ポリマー、及び少なくとも 1 つの炭水化物を含む組成物を作製するための方法を提供し、その方法は、核酸 / 炭水化物溶液をカチオン性ポリマー / 炭水化物溶液中に、少なくとも 1 つの核酸と少なくとも 1 つのカチオン性ポリマーとの間の複合体の形成が可能となる条件下で添加することを含む。

30

【 0 0 1 6 】

ある実施形態では、核酸 / 炭水化物溶液及びカチオン性ポリマー / 炭水化物溶液は、各々別々に、独立して作製されてよい。溶液の各々は、記載されるように、混合を行うかなり前に、混合と同時に、又は混合と異なる時点で作製されてよい。

【 0 0 1 7 】

ある実施形態では、この方法は、2 つの溶液の各々を入手すること、及び核酸 / 炭水化物溶液をカチオン性ポリマー / 炭水化物溶液中に、その逆ではなく、少なくとも 1 つの核酸と少なくとも 1 つのカチオン性ポリマーとの間の複合体の形成が可能となる条件下で添加して、本発明の組成物を得ることを含む。

40

【 0 0 1 8 】

ある実施形態では、この方法は：

(a) 少なくとも 1 つの核酸及び少なくとも 1 つの炭水化物の溶液を得ること；

(b) 少なくとも 1 つのカチオン性ポリマー及び少なくとも 1 つの炭水化物の溶液を得ること；

(c) 核酸 / 炭水化物溶液をカチオン性ポリマー / 炭水化物溶液に、少なくとも 1 つの核酸と少なくとも 1 つのカチオン性ポリマーとの間の複合体の形成が可能となる条件下で添加すること；並びに

(d) 所望に応じて、混合された核酸 / カチオン性ポリマー / 炭水化物溶液を凍結乾燥して、凍結乾燥された組成物を形成すること

50

を含む。

【0019】

ある実施形態では、この方法は、核酸／炭水化物溶液を作製する工程、及びカチオン性ポリマー／炭水化物溶液を作製するための別の工程を含む。

【0020】

ある実施形態では、この方法は、したがって：

(a) ある量の少なくとも1つの核酸を、第一の量の少なくとも1つの炭水化物と混合して、核酸／炭水化物溶液を形成すること；及び

(b) ある量の少なくとも1つのカチオン性ポリマーを、第二の量の少なくとも1つの炭水化物と混合して、カチオン性ポリマー／炭水化物溶液を形成すること

を含む。

【0021】

上記で記載したように、少なくとも1つの炭水化物は、本発明の方法において、別個のバッチ又は分量で用いられる。第一のバッチ若しくは分量、又は第一の量は、少なくとも1つの核酸と混合され、第二のバッチ若しくは分量、又は第二の量は、少なくとも1つのカチオン性ポリマーと混合される。第一又は第二の量は、複合体を形成し、安定で、所望に応じて固体であってもよい製品を提供することを可能とするのに十分な最少量の少なくとも1つの炭水化物となるように決定され、選択される。

【0022】

本明細書で用いられる場合、本発明の組成物又は配合物は、少なくとも1つの核酸と少なくとも1つのカチオン性ポリマーとの間の複合体を含み、組成物の安定性及び独特さは、このことに起因する。「複合体」、「ポリプレックス」、「ポリプレックス配合物」、「ポリプレックス組成物」、「組成物」などの用語は、本明細書において交換可能に用いられ、本発明の組成物／配合物を、そのいずれかの特定の成分ではなく、全体として意味する。

【0023】

本明細書で例示されるように、工程(a)及び(b)の溶液の各々は、他方に対して独立して作製されてよく、使用前に保存されていてもよい。溶液の各々は、工程(c)に示される通りに互いに対して添加される、すなわち、核酸／炭水化物溶液をカチオン性ポリマー／炭水化物溶液に添加し、その逆ではない限りにおいて、上記で説明したように、順に作製されても、又は他のいかなる順序で作製されてもよい。この溶液の一方を他方へ特定の決まった順序で添加することにより、少なくとも1つの核酸と少なくとも1つのカチオン性ポリマーとの間の独特で安定な複合体の容易な形成が可能となり、溶液が逆方向に添加されると、複合体を大量に形成することができない。

【0024】

説明したように、この組成物成分の一方を他方に対して添加し、その逆ではないことにより、炭水化物材料の量を低減することもでき、したがって、組成物中の少なくとも1つの核酸の相対量を増加することができる。言い換えると、少なくとも1つの炭水化物の量を低減することができることにより、組成物中の少なくとも1つの核酸の量を維持しながら、少なくとも1つの炭水化物の少なくとも1つの核酸に対する比を、1桁又は2桁分減少させることができる。

【0025】

少なくとも1つの核酸と少なくとも1つのカチオン性ポリマーとの間の複合体は、材料ナノ粒子に形成され、ここで、各ナノ粒子は、ナノメートルのサイズであり(ナノ粒子が球形状である場合、直径がナノメートルであり、又はナノ粒子が球形状でない場合、軸線がナノメートルである)、各々は、少なくとも1つの核酸、少なくとも1つのカチオン性ポリマー、及び所望に応じて含まれていてよい少量の少なくとも1つの炭水化物を含む。凍結乾燥前組成物中の形成されたナノ粒子は、凍結乾燥された組成物中にも、さらには再構成された配合物中にも存在し、凍結乾燥前組成物中では、約40から約50nmのサイズであり、一方再構成された組成物中では、ナノ粒子サイズは、約80から約90nmの

10

20

30

40

50

範囲内である。以下で詳細に述べるように、高い濃度が用いられる程、大きいナノ粒子が得られる。

【 0 0 2 6 】

核酸 / 炭水化物溶液のカチオン性ポリマー / 炭水化物溶液中への添加は、とりわけ、用いられる特定の成分、組成物の体積、及び他のパラメーターに応じて、室温で、又は所望されるいかなる温度で行われてもよい。ある実施形態では、添加は、一定の速度及び一定の混合下で行われて、核酸 / カチオン性ポリマー混合溶液が形成される。ある実施形態では、速度は、作製される各体積に対して改変され、適切な一定速度の決定は、本技術分野における通常レベルの技術の範囲内である。

【 0 0 2 7 】

ある実施形態では、上記で記載した添加は、少量作製の場合は、2 から 7 m l / 分の速度で行われ、又は 1 リットル作製の場合は、8 0 m l / 分であってもよく、又は作製されるべき組成物 / 配合物若しくは製剤の体積に応じて変動（増加又は減少）してもよい。これらよりも大きい速度が用いられてもよい。

【 0 0 2 8 】

例えば、1 リットルの溶液中に合計 0 . 4 g の場合、核酸、例えば初期濃度 4 m g / m l のプラスミドの 1 0 0 m l を含有するポリプレックスの 1 リットルが用いられる。1 リットルの溶液は、1 0 0 g の炭水化物、例えばトレハロースを含有する。したがって、この例では、1 リットル溶液中のトレハロース重量の 1 リットル溶液中の D N A 重量に対する比は、1 0 0 / 0 . 4 又は 2 5 0 である。

【 0 0 2 9 】

別の例では、核酸の量は、約 2 . 5 m l から約 1 0 0 m l であり、1 0 重量 / 体積 % のトレハロース溶液の第一の有効量は、約 1 0 m l から約 4 0 0 m l である。加えて（又は別の選択肢として）、カチオン性ポリマーの量は、約 1 . 2 m l から約 4 8 m l であり、1 0 重量 / 体積 % のトレハロース溶液の第二の有効量は、約 1 1 . 3 m l から約 4 5 2 m l である。

【 0 0 3 0 】

理解され得るように、様々な体積の本発明の組成物又は溶液が作製されてよく、例えば、約 2 5 m l から約 1 0 0 0 m l であり；2 5、5 0、7 5、1 0 0、1 2 5、1 5 0、1 7 5、2 0 0、2 2 5、2 5 0、2 7 5、3 0 0、3 2 5、3 5 0、3 7 5、4 0 0、4 2 5、4 5 0、4 7 5、5 0 0、5 2 5、5 5 0、5 7 5、6 0 0、6 2 5、6 5 0、6 7 5、7 0 0、7 2 5、7 5 0、7 7 5、8 0 0、8 2 5、8 5 0、8 7 5、9 0 0、9 2 5、9 5 0、9 7 5、又は 1 0 0 0 m l などである。これよりも大きい体積、又は小さい体積、又は中間の体積が作製されてもよい。

【 0 0 3 1 】

当業者であれば、本明細書で述べる方法が、1 0 0 0 m l よりも非常に大きい体積、例えば、1 0 0 0、1 5 0 0、2 0 0 0、2 5 0 0、3 0 0 0、3 5 0 0、4 0 0 0、4 5 0 0、5 0 0 0、5 5 0 0、6 0 0 0、6 5 0 0、7 0 0 0、7 5 0 0、8 0 0 0、8 5 0 0、9 0 0 0、9 5 0 0、1 0 0 0 0 m l、又はそれ以上の核酸 / カチオン性ポリマー混合溶液を形成するために、容易に改変可能であることは認識される。

【 0 0 3 2 】

本技術分野の組成物の多くとは異なり、核酸 / カチオン性ポリマー溶液を含む本発明の方法に従って作製された組成物は、均一な懸濁液を形成する。本明細書で用いられる場合、本発明の「組成物」、「配合物」、「製剤」は、液体の形態、例えば、溶液、懸濁液、若しくは分散液であってよく、又は所望に応じて凍結乾燥されていてよい固体の形態であってもよい。ある実施形態では、組成物が液体組成物である場合、それは、水懸濁液の形態である。ある実施形態では、液体組成物は、全体として、組成物の成分のいずれか 1 つの量が完全に又は部分的に可溶性である懸濁液の形態であってよい。ある実施形態では、組成物が固体の形態である場合、それは、凍結乾燥された組成物である。

【 0 0 3 3 】

本発明の方法は、凍結乾燥された組成物を得る目的で、本発明の組成物を凍結乾燥する工程を所望に応じて含んでよい。凍結乾燥された組成物は、使用の直前に再構成されてよい。

【0034】

したがって、本発明に従う方法は、凍結乾燥工程を含んでいなくてもよく、その場合、得られる組成物又は配合物は、凍結乾燥前組成物又は配合物である。凍結乾燥工程が必要であるか、又は所望される場合、組成物は、湿潤組成物を凍結乾燥するための本技術分野で公知の条件下などで処理されてよい。

【0035】

ある実施形態では、本発明の方法は、溶液を0未満の温度で凍結することを含む凍結乾燥サイクルを含む。ある実施形態では、温度は、-50から0、-45から0、-40から0、-35から0である。ある実施形態では、凍結乾燥は、約-45±5の温度で達成される。

10

【0036】

ある実施形態では、本発明の方法は、少なくとも12時間、少なくとも20時間、少なくとも24時間、少なくとも30時間、少なくとも36時間、少なくとも48時間、少なくとも52時間、少なくとも60時間、少なくとも66時間、少なくとも72時間にわたって溶液を凍結することを含む凍結乾燥サイクルを含む。

【0037】

ある実施形態では、溶液は、少なくとも24から72時間凍結乾燥される。

20

【0038】

ある実施形態では、本発明の方法は、約-45±5の温度で、少なくとも12時間、少なくとも20時間、少なくとも24時間、少なくとも30時間、少なくとも36時間、少なくとも48時間、少なくとも52時間、少なくとも60時間、少なくとも66時間、少なくとも72時間にわたって溶液を凍結することを含む凍結乾燥サイクルを含む。

【0039】

凍結乾燥された組成物は、本技術分野で公知のいかなる方法を用いて再構成されて、再構成された組成物が作製されてもよい。例えば、それは、適切な体積の二回蒸留水DDW又は注射用IV水を添加することによって再構成されてよい。典型的には、凍結乾燥された組成物に添加される体積は、凍結乾燥前にバイアルに最初に添加された体積である。

30

【0040】

本明細書で述べる方法に従って作製された凍結乾燥前組成物におけるナノ粒子は、約40から50nmの範囲であり、一方再構成された組成物におけるナノ粒子は、約80から約90nmの範囲である。

【0041】

核酸とカチオン性ポリマーとの間で形成される複合体は、炭水化物対複合体中核酸-カチオン性ポリマーの重量/重量比が、とりわけ、組成物を形成するために用いられる特定の炭水化物及び核酸に応じて変動し得るようなものであってよい。ある実施形態では、比は、50から5000である。

【0042】

ある実施形態では、比は、50から4000である。ある実施形態では、比は、50から3000である。ある実施形態では、比は、50から2000である。ある実施形態では、比は、50から1000である。ある実施形態では、比は、50から500である。

40

【0043】

ある実施形態では、比は、約50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300、305、310、315、320、325、330、335、340、

50

345、350、355、360、365、370、375、380、385、390、
395、400、405、410、415、420、425、430、435、440、
445、450、455、460、465、470、475、480、485、490、
495、又は500である。

【0044】

ある実施形態では、比は、約950、955、960、965、970、975、980、985、990、995、1000、1005、1010、1015、1020、1025、1030、1035、1040、1045、1050、1055、1060、1065、1070、1075、1080、1085、1090、1095、2000、2005、2010、2015、2020、2025、2030、2035、2040、2045、2050、2055、2060、2065、2070、2075、2080、2085、2090、2095、3000、3005、3010、3015、3020、3025、3030、3035、3040、3045、3050、3055、3060、3065、3070、3075、3080、3085、3090、3095、4000、4005、4010、4015、4020、4025、4030、4035、4040、4045、4050、4055、4060、4065、4070、4075、4080、4085、4090、4095、又は5000である。

10

【0045】

ある実施形態では、比は、約125、又は250、又は500、又は1000である。

【0046】

ある実施形態では、比は、1000未満である。ある実施形態では、比は、125又は500である。

20

【0047】

別の態様では、本発明は、本発明の方法から誘導される製品を提供する。

【0048】

別の態様では、本発明は、少なくとも1つの核酸、少なくとも1つのカチオン性ポリマー、及び少なくとも1つの炭水化物を含む凍結乾燥された組成物を提供し、ここで、少なくとも1つの核酸及び少なくとも1つのカチオン性ポリマーは、少なくとも1つの炭水化物の核酸 - カチオン性ポリマーに対する重量 / 重量比が50から5000であるように、複合体を形成する。

30

【0049】

本発明の製品、本発明の方法によって作製されたもの、及び他の方法によって作製され、それ自体が新規であるものは、少なくとも1つの核酸、少なくとも1つのカチオン性ポリマー、及び少なくとも1つの炭水化物を含む凍結乾燥前、凍結乾燥された、及び再構成された組成物又は溶液であってよく、ここで、少なくとも1つの核酸及び少なくとも1つのカチオン性ポリマーは、少なくとも1つの炭水化物の核酸 - カチオン性ポリマーに対する重量 / 重量比が50から5000であるように、複合体を形成する。

【0050】

「凍結乾燥前組成物」などの用語は、本明細書で述べる方法に従って作製された中間体を意味する。具体的には、凍結乾燥前組成物は、核酸がポリマーに添加される「逆の」順序で作製される。そのような「凍結乾燥前組成物」は、核酸（例：DNA）、ポリマー（例：PEI）、及び炭水化物溶液（例：トレハロース）を含む。

40

【0051】

「凍結乾燥された組成物」などの用語は、乾燥材料（すなわち、凍結乾燥後の凍結乾燥前組成物）を意味する。

【0052】

「再構成された組成物」などの用語は、凍結乾燥された組成物及び再構成のために用いられる液体キャリア（例：DDW又は注射用IV水）を意味する。典型的には、再構成された組成物は、医師によって、例えば患者に投与する前に医師によって再構成される。

【0053】

50

ある実施形態では、組成物は、水を例とする液体媒体も含む凍結乾燥前組成物又は溶液である。ある実施形態では、凍結乾燥された組成物は、水を含まない乾燥組成物である。

【0054】

本明細書で述べる凍結乾燥された組成物は、アモルファス粉末である。凍結乾燥前組成物及び再構成された組成物（すなわち、注射用水による再構成後）の色は、僅かな乳白色のままである（すなわち、分解の徴候を示していない）。

【0055】

さらに、凍結乾燥前組成物は、長期間にわたる保存のために、凍結乾燥された組成物を作製する目的の本技術分野で公知の、又は本明細書で述べるいかなる凍結乾燥法を用いて凍結乾燥されてもよい。凍結乾燥後、凍結乾燥された組成物は、少なくとも12ヶ月の保存期間を有する（例：少なくとも12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24ヶ月、又はそれ以上）。

【0056】

凍結乾燥された組成物は、使用前に、再構成された組成物を提供する目的の本技術分野で公知の、又は本明細書で述べるいかなる方法を用いて再構成されてもよい。再構成後、再構成された組成物の色は、僅かな乳白色のままである（すなわち、分解の徴候を示していない）。

【0057】

本発明の組成物又は配合物に製剤され得る少なくとも1つの核酸は、DNA又はRNAを含むいかなる核酸含有分子であってもよい。「核酸」の用語は、4-アセチルシトシン、8-ヒドロキシ-N6-メチルアデノシン、アジリジニルシトシン、シュードイソシトシン、5-(カルボキシヒドロキシル-メチル)ウラシル、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルアデニン、1-メチルシュードウラシル、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシ-アミノメチル-2-チオウラシル、5'-メトキシカルボニルメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、オキシプトキソシン、シュードウラシル、クエオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸、クエオシン、2-チオシトシン、及び2,6-ジアミノプリンなど、DNA及びRNAの公知の塩基類似体のいずれを含む配列も包含する。

【0058】

ある実施形態では、核酸は、プラスミド、すなわち、細胞毒性遺伝子産物をコードする異種配列と作動可能に連結された制御配列を含有するポリヌクレオチドであり、ここで、制御配列は、癌細胞中で特異的に発現されるゲノムインプリント遺伝子由来である。

【0059】

ある実施形態では、「プラスミド」の用語は、本明細書で用いられる場合、定められるように、いずれの核酸（すなわち、DNA、shRNA、siRNA、オリゴヌクレオチドなど）をも意味することを意図している。

【0060】

ある実施形態では、少なくとも1つの核酸は、参照により本明細書に援用される国際出願PCT/IL1998/000486（国際公開第1999/018195号）又はそれから派生したいずれかの米国特許出願に挙げられているプラスミドである。

【0061】

ある実施形態では、少なくとも1つの核酸は、参照により本明細書に援用される国際出願PCT/IL2008/001405（国際公開第2009/053982号）又はそ

10

20

30

40

50

れから派生したいずれかの米国特許出願に挙げられているプラスミドである。

【0062】

ある実施形態では、少なくとも1つの核酸は、参照により本明細書に援用される国際出願 PCT / IL 2006 / 001110 (国際公開第2007 / 034487号) 又はそれから派生したいずれかの米国特許出願に挙げられているプラスミドである。

【0063】

ある実施形態では、少なくとも1つの核酸は、参照により本明細書に援用される国際出願 PCT / IL 2006 / 000785 (米国特許第8,067,573号) 又はそれから派生したいずれかの米国特許出願に挙げられているプラスミドである。

【0064】

ある実施形態では、少なくとも1つの核酸は、参照により本明細書に援用される国際出願 PCT / IL 2008 / 000071 (米国特許第7,928,083号) 又はそれから派生したいずれかの米国特許出願に挙げられているプラスミドである。

【0065】

ある実施形態では、プラスミド中の制御配列は、H19制御配列であってよい(例: H19プロモーター、H19エンハンサー、又はH19プロモーター及びH19エンハンサーの両方)。例えば、H19制御配列は、H19プロモーター及びエンハンサーを含んでよく、異種配列は、β-ガラクトシダーゼ、ジフテリア毒素、シュードモナス毒素、リシン、コレラ毒素、網膜芽細胞腫遺伝子、p53、単純ヘルペスウィルスチミジンキナーゼ、水痘帯状疱疹ウィルスチミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、ニトロレダクターゼ、チトクロム p-450 2B1、チミジンホスホリラーゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、アルカリホスファターゼ、カルボキシペプチダーゼA及びG2、リナマラーゼ、β-ラクタマーゼ、並びにキサンチンオキシダーゼから成る群より選択されるタンパク質をコードする。

【0066】

他の実施形態では、制御配列は、IGF-2 P4プロモーター又はIGF-2 P3プロモーターである。

【0067】

本明細書で述べる方法での使用に適するプラスミドは、細胞毒性遺伝子産物をコードする異種配列と作動可能に連結された制御配列を含有するポリヌクレオチドを含んでよく、ここで、制御配列は、癌細胞中で特異的に発現されるゲノムインプリント遺伝子由来である。

【0068】

制御配列は、H19制御配列(例: H19プロモーター、H19エンハンサー、又はH19プロモーター及びH19エンハンサーの両方)、IGF-2 P4プロモーター、又はIGF-2 P3プロモーターであってよい。例えば、H19制御配列は、H19プロモーター及びエンハンサーであってよく、異種配列は、β-ガラクトシダーゼ、ジフテリア毒素、シュードモナス毒素、リシン、コレラ毒素、網膜芽細胞腫遺伝子、p53、単純ヘルペスウィルスチミジンキナーゼ、水痘帯状疱疹ウィルスチミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、ニトロレダクターゼ、チトクロム p-450 2B1、チミジンホスホリラーゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、アルカリホスファターゼ、カルボキシペプチダーゼA及びG2、リナマラーゼ、β-ラクタマーゼ、並びにキサンチンオキシダーゼから成る群より選択されるタンパク質をコードする。H19エンハンサーは、異種配列に対して3'側に配置されてよい。

【0069】

当業者であれば、異種配列が以下のいずれか1つ以上: β-ガラクトシダーゼ; ジフテリア毒素; シュードモナス毒素; リシン; コレラ毒素; 網膜芽細胞腫遺伝子; p53; 単純ヘルペスウィルスチミジンキナーゼ; 水痘帯状疱疹ウィルスチミジンキナーゼ; シトシンデアミナーゼ; ニトロレダクターゼ; チトクロム p-450 2B1; チミジンホスホリラーゼ; プリンヌクレオシドホスホリラーゼ; アルカリホスファターゼ; カルボキシペ

10

20

30

40

50

プチダーゼ A 及び G 2 ; リナマラーゼ ; β - ラクタマーゼ ; キサンチンオキシダーゼのコード配列 ; 並びに c d k 2 、 c d k 8 、 c d k 2 1 、 c d c 2 5 A 、 c y c l i n D 1 、 c y c l i n E 、 c y c l i n A 、 c d k 4 、 発癌性形態の p 5 3 、 c - f o s 、 c - j u n 、 K r - r a s 、 及び H e r 2 / n e u から成る群より選択される遺伝子をコードする配列と特異的にハイブリダイズするアンチセンス配列、から選択されてよいことは認識される。異種配列は、c d k 2 、 c d k 8 、 c d k 2 1 、 c d c 2 5 A 、 c y c l i n D 1 、 c y c l i n E 、 c y c l i n A 、 c d k 4 、 発癌性形態の p 5 3 、 c - f o s 、 c - j u n 、 K r - r a s 、 及び H e r 2 / n e u から成る群より選択される遺伝子をコードする RNA を特異的に開裂するリボザイムをコードしてもよい。

【 0 0 7 0 】

10

本明細書で述べる凍結乾燥前組成物及び再構成された組成物中の核酸濃度は、0 . 1 m g / m L から 0 . 8 m g / m L (例 : 0 . 1 、 0 . 2 、 0 . 3 、 0 . 4 、 0 . 5 、 0 . 6 、 0 . 7 、 若しくは 0 . 8 m g / m L) 、又はそれより低くてもよい。この核酸濃度は、先行技術の組成物で見られる核酸充填量 (すなわち、約 0 . 0 1 ~ 0 . 0 5 m g / m L) よりもおよそ 8 から 4 0 倍高い。本明細書で述べる凍結乾燥前組成物及び再構成された組成物では、核酸及び P E I の両方が、トレハロース溶液中に希釈されている。

【 0 0 7 1 】

本発明の方法及び配合物で用いられる少なくとも 1 つの炭水化物は、本技術分野で公知のいかなる炭水化物材料であってもよい。本明細書で用いられる場合、「炭水化物」は、炭水化物化学の技術分野で公知であるように、一般式 $(C H_2 O)_n$ を有するいずれの化合物をも含むことを意図しており、「サッカリド」、「ポリサッカリド」、「オリゴサッカリド」、及び「糖」の用語と交換可能に用いられてよい。

20

【 0 0 7 2 】

炭水化物は、モノ - 、ジ - 、トリ - 、及びオリゴ - サッカリド、さらにはグリコーゲン、セルロース、及びデンプンなどのポリサッカリドのいずれか 1 つであってよい。

【 0 0 7 3 】

ある実施形態では、少なくとも 1 つの炭水化物は、グルコース、フルクトース、マンノース、キシロース、アラビノース、ガラクトースなどのモノサッカリド ; トレハロース、スクロース、セロビオース、マルトース、ラクトースなどのジサッカリド ; ラフィノース、スタキオース、マルトデキストリンなどのオリゴサッカリド ; セルロース、ヘミセルロース、デンプンなどのポリサッカリドから選択される。

30

【 0 0 7 4 】

ある実施形態では、少なくとも 1 つの炭水化物は、トレハロース、グルコース、スクロース、ラクトース、マンニトール、ソルビトール、ラフィノース、P V P 、及びデキストロースから選択される。

【 0 0 7 5 】

ある実施形態では、少なくとも 1 つの炭水化物は、グルコース又はスクロースではない。

【 0 0 7 6 】

ある実施形態では、少なくとも 1 つの炭水化物は、モノサッカリド又はジサッカリドである。

40

【 0 0 7 7 】

ある実施形態では、少なくとも 1 つの炭水化物は、トレハロースである。

【 0 0 7 8 】

「カチオン性ポリマー」の用語は、カチオン性基及び / 又はイオン化されてカチオン性基となることのできる基を含む、天然、合成、又は半合成のいずれのポリマーであってもよい。カチオン性ポリマーは、親水性又は両親媒性であってよい。ある実施形態では、カチオン性ポリマーは、一級、二級、三級、及び / 又は四級アミン基を含有するポリマーから選択される。アミン基は、主ポリマー鎖の一部であってよく、又は主鎖上のペンダント基であってもよく、又は主鎖に接続された 1 つ以上の側基を介して主鎖と結合されていて

50

もよい。

【 0 0 7 9 】

ある実施形態では、少なくとも1つのカチオン性ポリマーは、ポリエチレンイミン、ポリアリルアミン、ポリエーテルアミン、ポリビニルピリジン、正に帯電した官能基を有するポリサッカリド、ポリアミノ酸、ポリ-L-ヒスチジン、ポリ-D-リジン、ポリ-DL-リジン、ポリ-L-リジン、ポリ-e-CBZ-O-リジン、ポリ-e-CBZ-DL-リジン、ポリ-e-CBZ-L-リジン、ポリ-OL-オルニチン、ポリ-L-オルニチン、ポリ-DELT A-CBZ-DL-オルニチン、ポリ-L-アルギニン、ポリ-DL-アラニン-ポリ-L-リジン、ポリ(-L-ヒスチジン、L-グルタミン酸)-ポリ-DL-アラニン-ポリ-L-リジン、ポリ(L-フェニルアラニン、L-グルタミン酸)-ポリ-DL-アラニン-ポリ-L-リジン、ポリ(L-チロシン、L-グルタミン酸)-ポリ-DL-アラニン-ポリ-L-リジン、L-アルギニンとトリプトファン、チロシン、又はセリンとのコポリマー、D-グルタミン酸とD-リジンとのコポリマー、L-グルタミン酸とリジン、オルニチン、又はリジン及びオルニチンの混合物とのコポリマー、並びにポリ-(L-グルタミン酸)から選択される。

10

【 0 0 8 0 】

ある実施形態では、少なくとも1つのカチオン性ポリマーは、ポリエチレンイミン(PEI)である。

【 0 0 8 1 】

理論に束縛されるものではないが、本明細書で述べる凍結乾燥前組成物、凍結乾燥された組成物、及び再構成された組成物において、3つの成分(すなわち、プラスミド、カチオン性ポリマー、及び炭水化物)と一緒に組み合わせられて、新規な材料形態が提供されるものと考えられる。対照的に、先行技術の組成物では、炭水化物は、既に形成された複合体に添加され、単に凍結保護剤及び安定化剤の両方として働くだけであり、そのため、本発明の組成物と比較して、より高い比率が必要とされる。したがって、本明細書で述べる組成物中での炭水化物の核酸に対する比は、先行技術で用いられる比よりも、およそ約40から約400倍低い。

20

【 0 0 8 2 】

ある実施形態では、PEIのアミン基のモル数の核酸のリン酸基のモル数に対する比は、2から10である(例: 2、3、4、5、6、7、8、9、10、又は6から8)。

30

【 0 0 8 3 】

ある実施形態では、組成物は、ヒスチジン及び/又は塩化ナトリウムを含有しない。

【 0 0 8 4 】

このような組成物では、正に帯電したPEI及び負に帯電した核酸が、炭水化物(例: トレハロース)の存在下でナノ粒子を形成する。凍結乾燥前溶液におけるナノ粒子は、約40から約50nmの範囲であり(例: 約40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、又は50nm)、再構成品におけるナノ粒子は、約80から約90nmの範囲である(例: 約80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、又は90nm)。

【 0 0 8 5 】

一般的に述べると、とりわけ、ナノ粒子を成す正に帯電したPEI及び負に帯電した核酸に応じて、ナノ粒子のサイズは、40nmから約500nmの間で変動し得る。したがって、ナノ粒子は、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300、305、310、315、320、325、330、335、340、345、350、355、360、365、370、375、380、385、390、395、400、405、410、415、420、425、430、435、440

40

50

、445、450、455、460、465、470、475、480、485、490、495、及び500から選択されるサイズを有してよい。

【0086】

本発明はさらに、本明細書で開示される配合物も考慮する。

【0087】

さらに、本発明に従う組成物、配合物、及び製剤の使用も考慮される。ある実施形態では、本発明に従う組成物、配合物、及び製剤は、医療での使用のために製剤されてよい。したがって、本発明は、さらに、医薬組成物、配合物、及び製剤も提供する。

【0088】

本発明は、本発明に従う組成物、配合物、又は製剤の医薬の作製における使用も提供する。

10

【0089】

ある実施形態では、医薬は、本発明に従って用いられる1つ以上の核酸によって治療可能である疾患又は障害に罹患している対象の治療方法で使用するためのものである。

【0090】

ある実施形態では、1つ以上の核酸によって治療可能である疾患又は障害は、増殖性の疾患及び障害から選択される。

【0091】

ある実施形態では、疾患は、関節リウマチである。

【0092】

したがって、少なくとも1つの増殖性疾患若しくは障害を治療又は予防する方法、及び関節リウマチを治療又は予防する方法も提供される。

20

【0093】

少なくとも1つの増殖性疾患又は障害は、癌の中から選択されてよい。したがって、本発明は、さらに、患者における腫瘍の治療又は予防での使用も考慮する。本発明に従う治療の概略的方法は、凍結乾燥された組成物を得ること、及びその組成物を、例えば二回蒸留水（DDW）又は注射用IV水を用いて再構成して、有効量の組成物とすること、及び再構成された組成物を対象に投与することを含んでよい。

【0094】

ある実施形態では、増殖性疾患が癌である場合、それは、膀胱癌、肝細胞癌、肝芽腫（hepatoblastoma）、横紋筋肉腫（rhabdomyosarcoma）、卵巣癌、子宮頸癌、肺癌、乳癌、頭頸部扁平上皮癌、食道癌、甲状腺癌、星状細胞腫、神経節芽腫、及び神経芽細胞腫から成る群より選択されてよい。

30

【0095】

1つの実施形態では、膀胱癌は、筋層非浸潤性膀胱癌であり、組成物は、膀胱内投与、静脈内投与、腫瘍内投与されるか、又は本技術分野で公知の適切な他のいかなる方法を用いて投与されてもよい。

【0096】

特に定めのない限り、本明細書で用いられるすべての技術的及び科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書で述べるものと類似する又は同等の方法及び材料が、本発明の実践又は試験に用いられてよいが、以下では、適切な方法及び材料について記載する。本明細書で言及するすべての刊行物、特許出願、特許、及び他の参考文献は、その全体が参照により本明細書に援用される。矛盾が生じる場合、定義を含む本明細書が優先する。加えて、材料、方法、及び例は、単なる実例であり、限定することを意図するものではない。

40

【0097】

本発明の他の特徴及び利点は、以下の詳細な記述及び請求項から明らかとなるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0098】

50

本明細書で開示される主題をより良く理解する目的で、及びそれを実際実施することのできる方法を例示する目的で、実施形態を、単なる限定されない例として、添付の図面を参照しながらここで記載する。

【0099】

【図1】図1A - 図1Bは、凍結乾燥前（凍結乾燥前組成物、図1A）及び再構成後（再構成された、図1B）の溶液の効力を実証するアッセイを示すグラフである。Luc 4 = 効力なし（ベースライン；最大発光；すべての細胞が生存）；Comp = 従来の製剤における効力；Rev = 本発明の新規な作製方法における効力；及びUsual = 新たな組成物

【図2】図2は、サンプルの電気泳動の結果を示す。Lane 1は、マーカーであり；Lane 2は、プラスミドBC - 819であり；Lane 3は、5% グルコース中のBC - 819 / in vivo - jet PEI（登録商標）組成物であり（標準的作製）；Lane 4は、トレハロース中の組成物であり（逆プロトコル）；Lane 5は、DDWによる再構成後の凍結乾燥された組成物であり（再構成された組成物）；Lane 6は、5% トレハロース中のBC - 819 / in vivo - jet PEI（登録商標）組成物である。

【図3】図3は、本明細書で述べる標準的方法及び逆方法の両方を用いて作製されたPEI / BC - 819組成物の粒子の体積によるサイズ分布を示すグラフである。

【図4】図4は、本明細書で述べる標準的方法及び逆方法の両方を用いて作製されたPEI / BC - 819組成物の粒子のゼータ電位分布を示すグラフである。

【図5】図5は、以下の例3で述べる分光光度測定試験の結果を示すグラフである。

【図6】図6は、以下の例3で述べる方法を用いたさらなるサンプルの電気泳動の結果を示す。Lane 1は、ラダーであり；Lane 2は、BC - 819プラスミドであり；Lane 3は、グルコース溶液中の組成物である（標準的プロトコル）；Lane 4は、トレハロース中の組成物であり（逆プロトコル）；Lane 5は、再水和後の凍結乾燥されたポリプレックス（再構成された組成物）；及びLane 6は、トレハロース溶液中の組成物である。

【図7】図7A - 図7Bは、グルコース組成物（図7A）及びトレハロース組成物（図7B）の外観を示すTEM写真である。

【図8】図8は、組成物の析出後のサンプルを示すTEM写真である。

【図9】図9A - 図9Bは、透過型電子顕微鏡観察（TEM）の結果を示す写真である。

【図10】図10は、5% グルコースコントロールと比較して、先行技術の組成物又は再構成された凍結乾燥組成物の注射を3回受けたヌードマウス中のHCT - 116細胞の腫瘍進行を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0100】

本明細書で用いられる場合、「グルコースポリプレックス」、「グルコース組成物」などの用語は、ポリサッカリドとしてトレハロースではなくグルコースを用いて作製された先行技術の組成物を意味する。同様に、「標準的ポリプレックス製剤」、「標準的組成物」などの用語は、ポリマーをプラスミドに添加することによって（すなわち、「逆ではない」順序で）作製された先行技術の組成物を意味する。

【0101】

本明細書で用いられる場合、「凝集」、「凝集物」などの用語は、許容可能であると見なされる最大粒子サイズよりも大きいサイズを有する粒子を意味する。許容可能な最大粒子サイズを特定するために、光散乱の異なる測定値を提供し、標準的作製法と新規作製法とを比較して、何らかの相違があるかどうかを調べる。

【0102】

異種コード配列の腫瘍細胞特異的発現を指向するために用いることのできる制御配列は、本技術分野にて公知である。例えば、上流H19プロモーター領域及び／又は下流H19エンハンサー領域を含むH19制御配列は、その全体が参照により本明細書に援用され

る米国特許第 6, 0 8 7, 1 6 4 号に記載されている。ヒト H 1 9 遺伝子の下流エンハンサー領域が、所望に応じて、腫瘍細胞特異的発現のレベルを高める目的で、H 1 9 プロモーター / 異種遺伝子コンストラクトに付加されてもよい。

【 0 1 0 3 】

米国特許第 6, 0 8 7, 1 6 4 号には、H 1 9 エンハンサー又はその活性断片と組み合わせた I G F - 2 P 3 及び P 4 プロモーターの使用についても記載されている。

【 0 1 0 4 】

当業者であれば、H 1 9 発現癌細胞（例：例を挙げると、膀胱癌細胞）を例とする適切な宿主細胞中での異種コード配列の腫瘍特異的発現を指向する目的で、癌細胞中で発現されるゲノムインプリント遺伝子及び非インプリント遺伝子からの制御配列を用いることができる。腫瘍特異的発現を指向する能力を維持するいかなる変化された制御配列も、さらなる使用のための組換え発現ベクター中に組み込まれてよい。

【 0 1 0 5 】

毒性の遺伝子産物、毒性の可能性のある遺伝子産物、及び抗増殖性又は細胞増殖抑制性遺伝子産物をコードする遺伝子など、広範な様々な異種遺伝子が、これらの制御配列の制御下で発現可能である。酵素（例：C A T、ベータ - ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ）、緑色蛍光タンパク質などの蛍光タンパク質、又は抗原マーカーを含むマーカー遺伝子も発現可能である。

【 0 1 0 6 】

細胞毒性遺伝子産物は、広くは、毒素及びアポトーシス誘導剤の両方を含むとして定義される。加えて、細胞毒性遺伝子産物は、プロドラッグを細胞毒性産物に変換する薬物代謝酵素も含む。本発明の方法で用いられてよい細胞毒性遺伝子産物の例は、ジフテリア毒素、シュドモナス毒素、リシン、コレラ毒素、P E 4 0、並びに網膜芽細胞腫遺伝子及び p 5 3 などの腫瘍抑制遺伝子を含む。加えて、細胞アポトーシスを誘導するアポトーシスペプチドをコードする配列も用いられてよい。そのようはアポトーシスペプチドとしては、アルツハイマー病の A ベータペプチド（LaFerla et al., Nat. Genet. 9:21-30 (1995) 参照）、心房性ナトリウム利尿ペプチド（Wu et al., J. Biol. Chem. 272:14860-14866 (1997) 参照）、カルシトニン遺伝子関連ペプチド（Sakuta et al., J. Neuroimmunol. 67:103-109 (1996) 参照）、並びに公知の又は発見されることになる他のアポトーシスペプチドが挙げられる。

【 0 1 0 7 】

プロドラッグを細胞毒性産物に変換する薬物代謝酵素としては、チミジンキナーゼ（単純ヘルペスウイルス又は水痘帯状疱疹ウイルス由来）、シトシンデアミナーゼ、ニトロレダクターゼ、チトクロム p - 4 5 0 2 B 1、チミジンホスホリラーゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、アルカリホスファターゼ、カルボキシペプチダーゼ A 及び G 2、リナマラーゼ、ベータ - ラクタマーゼ、並びにキサンチンオキシダーゼが挙げられる（背景については、Rigg and Sikora, Mol. Med. Today, pp. 359-366 (August 1997) 参照）。

【 0 1 0 8 】

加えて、アンチセンス、アンチジーン、又はアプタマーオリゴヌクレオチドも、発現コンストラクトを用いて癌細胞へ送達され得る。リボザイム又は一本鎖 R N A も、癌細胞中で発現されて、対象とする特定の遺伝子の発現を阻害し得る。これらのアンチセンス又はリボザイム分子の標的遺伝子は、細胞の維持又は癌細胞表現型の維持に必須である遺伝子産物をコードする遺伝子であるべきである。そのような標的遺伝子としては、これらに限定されないが、c d k 2、c d k 8、c d k 2 1、c d c 2 5 A、サイクリン D 1、サイクリン E、サイクリン A、及び c d k 4 が挙げられる。

【 0 1 0 9 】

例えば、内在性遺伝子の発現を下方制御する目的で、癌細胞中で発現されるインプリント遺伝子又は I G F - 1 プロモーターからの制御配列の制御下、p 5 3、c - f o s、c - j u n、K r - r a s、及び / 又は H e r 2 / n e u の癌遺伝子形態の転写物に対して特異的なアンチセンス R N A 又はリボザイムを発現するベクターが細胞に導入される。H

10

20

30

40

50

19を発現し、H19制御配列を活性化し得る（又はIGF-1、IGF-2 P3、若しくはP4プロモーターを特異的に活性化する）腫瘍細胞が、アンチセンスRNA又はリボザイムRNAの発現において特異的に標的とされ得る。

【0110】

アンチセンスの手法は、標的mRNAに対して相補的であるオリゴヌクレオチド（この場合はmRNA）の設計を含む。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、相補的な標的mRNA転写物と結合し、翻訳を阻止する。完全な相補性は必要とされない。本明細書中で言及される場合、RNAの一部に対して「相補的」である配列とは、そのRNAにハイブリダイズして安定な二重鎖を形成可能であるのに十分な相補性を有する配列を意味する。ハイブリダイズする能力は、相補性の度合い及びアンチセンス核酸の長さの両方に依存する。一般的に、ハイブリダイズする核酸が長いほど、RNAとの塩基のミスマッチをより多く含有する可能性があるが、それでも安定な二重鎖（又は場合によっては三重鎖）を形成する。当業者であれば、二重鎖の融点を決定するための標準的な手順を用いることで、ミスマッチの許容可能な度合いを確認することができる。

10

【0111】

標的メッセージの5'末端、例えば、5'側非翻訳配列からAUG開始コドンを含むまでに対して相補的であるオリゴヌクレオチドは、翻訳の阻害において最も効果的に作用するはずである。しかし、mRNAの3'側非翻訳配列に対して相補的である配列も、mRNAの翻訳の阻害に効果的であることが最近示された。全般については、Wagner, R., Nature 372:333-335 (1994)を参照されたい。したがって、内在性遺伝子の翻訳を阻害するために、標的遺伝子転写物の5'又は3'側非翻訳非コード領域のいずれかに対して相補的であるオリゴヌクレオチドが、アンチセンス手法で用いられ得る。mRNAの5'側非翻訳領域に対して相補的であるオリゴヌクレオチドは、AUG開始コドンの相補体を含むべきである。mRNAコード領域に対して相補的であるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、効果のより低い翻訳阻害物質であるが、本発明に従って用いられ得る。標的mRNAの5'側、3'側、又はコード領域のいずれとハイブリダイズするように設計されるかどうかに関わらず、アンチセンス核酸は、少なくとも6ヌクレオチドの長さであるべきであり、好ましくは、6から約50ヌクレオチドの範囲の長さのオリゴヌクレオチドである。例えば、オリゴヌクレオチドは、少なくとも10ヌクレオチド、少なくとも17ヌクレオチド、少なくとも25ヌクレオチド、又は少なくとも50ヌクレオチドである。

20

30

【0112】

必須標的遺伝子を触媒的に開裂するように設計されたりボザイム分子も、標的mRNAの翻訳の阻止に用いられ得る（例えば、1990年10月4日公開のPCT国際出願公開第90/11364号；Sarver et al., Science 247:1222-1225 (1990)参照）。リボザイムが、癌細胞増殖において必須のタンパク質をコードする遺伝子転写物に対して特異的である場合、そのようなリボザイムは、癌性の細胞表現型を逆転させ得る。標的mRNAの破壊には、mRNAを部位特異的認識配列で開裂するリボザイムが用いられ得るが、ハンマーヘッド型リボザイムを用いることが好ましい。ハンマーヘッド型リボザイムは、標的mRNAと相補的な塩基対を形成する隣接領域によって決定される位置でmRNAを開裂する。唯一の必要条件は、標的mRNAが以下の2塩基の配列：5'-UG-3'を有することである。ハンマーヘッド型リボザイムの構築及び作製は、本技術分野において公知であり、Haseloff and Gerlach, Nature, 334:585-591 (1988)に、より詳細に記載されている。好ましくは、リボザイムは、開裂認識部位が標的mRNAの5'末端近傍に位置するように、すなわち、効率を高め、非機能性mRNA転写物の細胞内蓄積を最小限に抑えるように遺伝子操作される。

40

【0113】

リボザイムはまた、テトラヒメナ・サーモフィラ（*Tetrahymena thermophila*）に天然に存在し（IVS又はL-19 IVS RNAとして知られる）、Thomas Cech及び共同研究者らによって広く報告されたものなどのRNAエンドリボヌクレアーゼも含む（Zaug et al., Science, 224:574-578 (1984)；Zaug and Cech, Science, 231:47

50

0-475 (1986) ; Zaug et al., Nature, 324:429-433 (1986) ; U n i v e r s i t y P a t e n t s I n c . による国際特許出願公開第 8 8 / 0 4 3 0 0 号 ; Been and Cech, Cell, 47:207-216 (1986)) (以降、「C e c h 型リボザイム」と称する)。C e c h 型リボザイムは、標的 R N A 配列とハイブリダイズし、その後に標的 R N A の開裂を起こす 8 塩基対の活性部位を有する。

【 0 1 1 4 】

本技術分野にて公知のいずれのプラスミドも、本発明の方法及び組成物に用いられてよい。限定されない例として、プラスミド B C - 8 1 9 及び B C - 8 2 1 (B i o C a n c e l l 、イスラエル) が用いられてよい。これらのプラスミドは、その全体が参照により本明細書に援用される米国特許第 6 , 0 8 7 , 1 6 4 号及び米国特許出願公開第 2 0 1 0 0 2 5 6 2 2 5 号により詳細に記載されている。

10

【 0 1 1 5 】

インプリント遺伝子の発現を再活性化する細胞は、異種遺伝子に作動可能に連結されたそのようなインプリント遺伝子制御領域を含有する発現コンストラクトを特異的に活性化することもできる。そのような細胞、特に腫瘍細胞は、本発明の遺伝子治療法における適切な標的である。腫瘍及び細胞株の両方における H 1 9 、並びに I G F - 2 P 3 及び P 4 の特異的な発現は、R N A 分析の技術、i n s i t u ハイブリダイゼーション及びレポーター遺伝子コンストラクトを用いて特定され得る。加えて、活性化された I G F - 1 遺伝子発現を伴う腫瘍細胞も、同様にして特定され得るものであり、I G F - 1 プロモーターを用いて異種遺伝子の発現を指向する遺伝子治療法において標的とされ得る。

20

【 0 1 1 6 】

活性化された H 1 9 発現を伴う代表的な腫瘍型は、以下の通りである：

A . 小児の固形腫瘍

- 1 . ウィルムス腫瘍
- 2 . 肝芽腫
- 3 . 胎児性横紋筋肉腫

B . 胚細胞性腫瘍及び絨毛性腫瘍

- 1 . 精巣胚細胞腫瘍
- 2 . 未成熟卵巣奇形腫
- 3 . 仙尾骨腫瘍
- 4 . 絨毛癌
- 5 . 胎盤部絨毛性腫瘍

30

C . 成人上皮性腫瘍

- 1 . 膀胱癌
- 2 . 肝細胞癌
- 3 . 卵巣癌
- 4 . 子宮頸癌
- 5 . 肺癌
- 6 . 乳癌
- 7 . 頭頸部扁平上皮癌
- 8 . 食道癌
- 9 . 甲状腺癌

40

D . 神経性腫瘍

- 1 . 星状細胞腫
- 2 . 神経節芽腫
- 3 . 神経芽細胞腫

【 0 1 1 7 】

これらの癌のいずれも、本発明の方法によって治療可能である。実際、H 1 9 発現を活性化するいずれの腫瘍も、本発明の方法で治療され得る。加えて、I G F - 1 、並びに I G F - 2 P 3 及び P 4 プロモーターを活性化する腫瘍も、本発明の方法によって治療可

50

能である。例えば、IGF-2 P3及びP4プロモーターは、ウィルス腫瘍、横紋筋肉腫、神経芽細胞腫、及び肝芽腫などの小児腫瘍中で活性化される。

【0118】

治療法

本発明はまた、癌及び過剰増殖性疾患を治療するための治療法での使用のための異種遺伝子に作動可能に連結された制御領域を含有するポリヌクレオチドの使用も包含する。治療目的のために、本発明の発現コンストラクトは、生物学的に有効ないかなるキャリア中で投与されてもよく、例えば、ヌクレオチドコンストラクトを生体内で細胞へ有効に送達することのできるいずれの配合物又は組成物であってもよい。

【0119】

ウィルス導入法に加えて、非ウィルス法も、動物の組織中での所望される異種遺伝子の指向された発現を引き起こすために用いられてよい。遺伝子導入のほとんどの非ウィルス法は、哺乳類細胞が高分子の取り込み及び細胞内輸送のために用いている通常メカニズムに依存している。ある実施形態では、本発明の非ウィルス遺伝子送達システムは、標的とする細胞による対象の発現コンストラクトの取り込みのためのエンドサイトーシス経路に依存している。このタイプの代表的な遺伝子送達システムとしては、例えばポリプレックスが挙げられる。

【0120】

ポリプレックス形成及び凍結乾燥

本明細書で述べるように、カチオン性ポリマーは、細胞及び組織への効率的な核酸（例：DNA、shRNA、siRNA、オリゴヌクレオチドなど）の送達を媒介する目的で、プラスミドを例とする核酸と組み合わせたトランスフェクション試薬として用いられ得る。組成物は、核酸がカチオン性ポリマーと複合体を形成した場合に形成される。

【0121】

当業者であれば、例えば、脂質、リポソーム、コレステロール、ポリエチレングリコール（PEG）、ミセル、ヒアルロン酸、タンパク質、乳化剤、界面活性剤、ウィルス系ベクター、及び／又は標的指向化部分などの本技術分野において一般的に用いられる他の添加剤も、本発明の組成物に用いられてよいことは認識される。

【0122】

しかし、ある実施形態では、ポリプレックス配合物（例：凍結乾燥前組成物）は、核酸、カチオン性ポリマー、糖、及び所望に応じて含まれてよい緩衝剤しか含有していない。対照的に、本技術分野で用いられる他の配合物は、例えばヒスチジンなどの他の成分を含有する。

【0123】

ポリプレックス形成に用いるための1つの代表的なカチオン性ポリマーは、ポリエチレンイミン（PEI）である（参照により援用される米国特許第6,013,240号参照）。例えば、直鎖状ポリエチレンイミン（in vivo-jet PEI（登録商標）、Polypplus-transfection S.A.、フランス）が用いられてよい。in vivo-jet PEI（登録商標）は、窒素残基で表される150 mMの溶液である。別の選択肢として、直鎖状PEIは、市販の分岐鎖状PEIの加水分解によって、又は本技術分野において公知の他のいかなる方法によって作製されてもよい。

【0124】

当業者であれば、カチオン性ポリマー／核酸組成物中でのイオンバランスが極めて重要であること、及び効果的な細胞への進入のために、組成物がカチオン性であるべきことは認識される。N/P比は、核酸のリン酸基あたりのカチオン性ポリマー中の窒素残基数として定義される。好ましくは、生体内核酸送達のために、N/P比は、2～10である（例：6～8）。N/P比の決定は、本技術分野における通常の技術レベルの範囲内である。

【0125】

核酸-PEI組成物（例：凍結乾燥前組成物）は、PEI、プラスミドDNA、及び炭

10

20

30

40

50

水化物の混合の過程で形成されるナノ粒子を含有する。混合されると、カチオン性ポリマーの正電荷とプラスミドの負電荷がナノ粒子を形成する。

【0126】

適切ないかなる送達経路が用いられてもよく、例えば：静脈内（IV）、腹腔内（IP）、腫瘍内、皮下、局所、くも膜下腔内、皮内、硝子体内、皮内、皮質内、精巣内、動脈内、膀胱内（例：膀胱中へ）、門脈内（intraportea）、脳内、後眼窩注射、鼻腔内などである。ある実施形態では、遺伝子送達媒体は、カテーテルによって導入されてよい（米国特許第5,328,470号参照）。細胞又は組織中への核酸の送達は、器内、生体内、生体外、又は *in situ* で行われてよい。

【0127】

以下の例1で概説されるように、標準的なポリプレックス形成は、5% デキストロース溶液で希釈されたトランスフェクション試薬（例：*in vivo*-jet PEI（登録商標））を、5% デキストロース溶液で希釈されたDNAプラスミド（例：BC-819プラスミド）中へ導入し、続いて激しく混合することによって達成される。プラスミド/カチオン性ポリマー組成物を作製するためのこの標準的なプロセスは、非常に感受性が高く、正しい順序で行われない場合、析出を起こし易い。さらに、得られたポリプレックス組成物は、不安定であり得、室温で3時間後には、黄色味がかかった色が観察される。加えて、標準的なプロトコルで作製される場合、プロセスを逆転させてプラスミドをトランスフェクション試薬へ添加するこれまでの試みでは、ナノ粒子が形成される結果とはなかった。さらに、これらの溶液は、マイクロ体積に限定されており、凍結乾燥を達成するために、凍結保護剤のナノ粒子に対する高い比率が必要である。

【0128】

したがって、大スケールでの作製のために、並びに予測可能な品質及び再水和時の安定性の向上が確保される明確で安定な溶液又は凍結乾燥された組成物の長期保存のために、スケールアップすることのできるポリプレックス形成の方法が求められている。

【0129】

いくつかのこれまでの研究では、DNAプラスミド/LPEI組成物を、高濃度の凍結乾燥保護剤の存在下で凍結乾燥し（すなわち、炭水化物/DNAプラスミドの高い重量/重量比）、その初期品質を維持することができることが示されている（Brus et al., Journal of Controlled Release 95:119-131 (2004)参照）。PEIを用いた場合、糖/DNAの比が7500の場合に複合体が保護されたと報告されている。さらに、カチオン性脂質-DNA（LPEIではない）では、250の比が必要であった。しかし、Brus et al. で用いられた凍結乾燥プロセスは、大スケールでは再現性がない。さらに、これらの研究で用いられた高濃度の凍結乾燥保護剤は、生体内では許容されない可能性があり、したがって、臨床研究での使用に適さない可能性のある最終製品が得られ得る。

【0130】

実際、本発明の発明者らは、驚くべきことに、凍結乾燥プロセスにおいて、非常により低い炭水化物（糖）対核酸比を用いることが可能であり、それによって、低減された炭水化物対核酸比を有する組成物が得られる結果となることを見出した。理論に束縛されるものではないが、本発明者らは、本明細書で述べる組成物の3つの成分（DNA、Jet-PEI、及び炭水化物）が組み合わせられて、容易に凍結乾燥することのできる新規な化学要素が形成されたものと考えている。したがって、必要な炭水化物の濃度が、非常に低くなる。

【0131】

このようなより低い濃度は、生体内での適用において許容され易い。例えば、ヒトの血液のモル浸透圧濃度の正常な生理学的範囲は、およそ280から310 mOsmol/Lであるが、グルコースで作製された組成物の場合は、250であり、膀胱に用いるためのトレハロースでの組成物の場合は、280である。したがって、膀胱用に作製されている溶液は、僅かに低浸透圧であるが、それは、膀胱内投与されている。IV製剤の場合、濃度は、300までのDNA/トレハロース比まで増加されることになる。

【 0 1 3 2 】

これらの研究はまた、大体積のポリプレックス溶液を作製するという困難な側面も提起しており、この目的を達成するためのマイクロミキサーシステムによる方法の開発が報告されている (Kasper et al., European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 77:182-185(2011))。しかし、マイクロミキサーシステムは、工業的スケールに持つていくためには、依然としてスケールアップのための開発が必要である。

【 0 1 3 3 】

以下の例 3 では、5 % トレハロース溶液の存在下での、H 1 9 遺伝子制御配列の制御下でジフテリア毒素 A 鎖 (D T A) を発現する非ウイルス系ベクター B C - 8 1 9、及び in vivo - jet P E I (登録商標) から構成される凍結乾燥前組成物の作製について述べる。

10

【 0 1 3 4 】

B C - 8 1 9 (H 1 9 - D T A としても知られる) 及び B C - 8 2 1 プラスミド (H 1 9 - D T A - P 4 - I G F 2 としても知られる) が、H 1 9 (B C - 8 1 9 の場合) 又は H 1 9 及び I G F 2 P 4 (B C - 8 2 1 の場合) 制御エレメントの制御下で D T A の発現を駆動して、選択的に癌細胞を標的化する新規な D N A ベースの治療法を癌の治療に用いることは、すでに報告されている (Ohana et al., International Journal of Cancer 98(5):645-650 (2002); Ohana et al., The Journal of Gene Medicine 7(3):366-374 (2005); Abraham et al., The Journal of Urology 180(6):2379-2383 (2008) 参照)。これらの治療法は、結腸から肝臓への転移、膀胱癌、膵臓癌、及び卵巣癌の治療において良好な結果を示した (Ohana et al., The Journal of Gene Medicine 7(3):366-374 (2005); Mizrahi et al., Journal of Translational Medicine 7:69 (2009); Ohana et al., Gene Therapy and Molecular Biology 8:181-192 (2004); Scaiewicz et al., Journal of Oncology 178:174 (2010); Sorin et al., International Journal of Oncology 39(6):1407-12 (2011); Abraham et al., The Journal of Urology 180(6):2379-2383 (2008) 参照)。

20

【 0 1 3 5 】

これらの膀胱癌臨床試験では、B C - 8 1 9 が、in vivo - jet P E I (登録商標) との複合体として (N / P = 6)、最終体積 5 0 m l の 5 % グルコース中 0 . 4 m g / m l の最終濃度で投与される。

30

【 0 1 3 6 】

しかし、成分混合における推奨事項の厳密さ及びこの濃度で形成される組成物の相対的な不安定性により、良好な品質の組成物の作製は、依然として課題である (Kasper et al., European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 77:182-185(2011) 参照)。

【 0 1 3 7 】

以下の例 1 で述べるように、患者のベッドサイドで、プラスミド及び P E I 溶液はいずれも別々に、5 重量 / 体積 % グルコース溶液中に希釈され、次に非常に素早くプラスミド溶液に添加される。このプロトコルからのいかなる逸脱も、組成物の品質の低下、又はさらに悪いことには、析出にさえ繋がり得る。したがって、組成物の作製は、各用量の投与において、高い技能を持つスタッフの関与が必要である。加えて、得られたポリプレックス溶液は、保存期間が短い。

40

【 0 1 3 8 】

したがって、再現性のある良好な品質のポリプレックスの投与を確保する最適な方法は、少なくとも 2 4 ヶ月の保存期間を有するすぐに使用できる製品 (例: 凍結乾燥された組成物) を薬局へ提供することである。この製品は、使用前に水による簡便な再構成が必要である。

【 0 1 3 9 】

本明細書で述べる方法により、組成物溶液を、所望される濃度の体積で、例えばトレハロース溶液として作製することが可能となり、それは続いて治療用量で凍結乾燥するこ

50

とができる。

【0140】

作製の過程で用いられる最終トレハロース濃度は、安定な組成物の形成を可能とする等張性環境を提供し、生体内に投与される場合、新たに作製された溶液と同様に許容される。

【0141】

安定な凍結乾燥前組成物溶液の形成は、凍結乾燥プロセスを確実に成功させるために極めて重要である。

【0142】

この方法を用いることはまた、両成分を混合する順序を逆転させることにより、大体積のポリプレックスを作製する際の技術的限界を克服することも可能とする。ここで、凍結乾燥させることができる比較的高濃度の等張性で安定な凍結乾燥前組成物溶液の作製が、製品を変更することなく達成された。

【0143】

この方法は、工業的製造へスケールアップすることができるプラスミド - L P E I (直鎖状 P E I) 組成物の作製における画期的な進歩であり、容易に保存することができ、患者への投与前に均一な作製が可能である安定な製品を提供するものである。

【0144】

標準的なポリプレックス形成方法の限界を克服するために、本明細書では、核酸 (例: B C - 8 19 プラスミド)、カチオン性ポリマー (例: *in vivo* - j e t P E I (登録商標))、及び炭水化物 (例: トレハロース) が逆の順序 (標準的なプロトコルと比較して) で混合される凍結乾燥前組成物溶液形成方法が提供される。この方法は、本明細書にて、「逆方法 (reverse process)」、「逆方法 (reverse method)」、及び / 又は「逆ポリプレックス形成」と交換可能に称される。この方法では、プラスミドが、トランスフェクション試薬へ、形成された組成物溶液の連続的な混合を伴うゆっくりであり制御された方法で添加される。重要なことには、凍結乾燥前組成物溶液は、核酸、L P E I、及び炭水化物から構成されて、良好な凍結乾燥製品が確保される非常に安定な新規な化学要素 (N C E) を形成する。

【0145】

得られる凍結乾燥された組成物は、P E I、DNA プラスミド、及びトレハロースの 3 つの成分しか含有していない。さらに、組成物は、もはや複合体形成された P E I / プラスミドと定義されるものではない。そうではなく、それは、異なる化学構造を有するアモルファス粉末である。

【0146】

本明細書で述べる逆方法に従って作製された組成物では、炭水化物対核酸 - ポリマー組成物比が、本技術分野で公知である他のポリプレックス形成法を用いた場合に見られるよりも非常に低い。

【0147】

凍結乾燥は、加熱が媒介する蒸発を行わない溶解された化合物の脱水プロセスである。凍結乾燥プロセスでは、溶液は凍結され、低圧力環境に付され、その環境下では、水の昇華プロセスが促進され、溶解された化合物に対する損傷は、ゼロから最小限である。

【0148】

逆プロトコルを用いてカチオン性ポリマーが核酸と複合体形成されると、それは、本明細書で述べる、又は本技術分野で公知のいかなる凍結乾燥法に従って凍結乾燥されてもよい。本発明以前は、トレハロース、マンニトール、又はスクロースを 10 から 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ の濃度でポリプレックスに添加すると、凍結乾燥後に効率の低下が見られた (Brus e t al., Journal of Controlled Release 95 (2004) 119-131 参照)。

【0149】

凍結乾燥された組成物は、使用まで凍結乾燥された形態で保存して、患者への注射前に再構成 (例: D D W により) することができる。凍結乾燥された組成物は、3 か月を超え

10

20

30

40

50

る保存期間を有する（すなわち、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24ヶ月超、又はそれ以上）。

【0150】

再構成後、組成物の外観は、逆作製法に従って新たに作製された組成物溶液に類似しており、析出は見られない。同様に、再構成されたサンプルは、標準的な作製方法又は新規な作製方法のいずれとも相違を示さない。重要なことには、ポリプレックス溶液中の核酸濃度は、凍結乾燥プロセスによる影響を受けない。

【0151】

先行技術の方法によって新たに作製された複合体では、50～500nmの範囲の粒子が得られた。逆順序での凍結乾燥前溶液の作製では、40～50nmの範囲の粒子が得られた。凍結乾燥後の再構成されたサンプル（逆順序を用いた）では、80～90nmの範囲の粒子が得られた。したがって、再構成後、ナノ粒子のサイズは、新たな組成物と同等であった。対照的に、Kasper et al.に記載されるように、低DNA濃度の複合体のためにマイクロミキサーを用いて作製した場合、得られた粒子は、65～170nmの範囲であった。

10

【0152】

室温で3時間後、先行技術の方法（グルコースを用いて作製）によって新たに作製された組成物は、分解の徴候を示した（すなわち、僅かに黄色味がかった色）。対照的に、逆作製法に従って作製された再構成されたサンプル及び溶液（トレハロース中の凍結乾燥前の場合）はいずれも、視認可能な分解の徴候を示さず、色は僅かに乳白色であった。室温で24時間後、先行技術の方法（グルコースを用いて作製）によって新たに作製された組成物は、黄色であったが、逆作製法に従って作製された再構成されたサンプル及び溶液（トレハロース中の凍結乾燥前）は、視認可能な分解の徴候を示さず、色は僅かに乳白色のままであった。

20

【0153】

したがって、逆作製法を凍結乾燥と組み合わせて用いることにより、標準的なプロセスに付随する問題の多くが解決されるはずである。

【0154】

例えば、患者のベッドサイドで、医師は、凍結乾燥された組成物を使用前に再構成するために、凍結乾燥された粉末（凍結乾燥された組成物）を注射用IV水に溶解する必要があるだけであり、それによって、作製及び投与が単純化される。さらに、その安定性の改善が期待されることから、凍結乾燥された粉末の輸送がより容易となる。加えて、凍結乾燥された製品の特性は、元の含水（すなわち、凍結乾燥されていない状態の）プラスミドと同等である。

30

【0155】

本明細書で述べる逆ポリプレックス製剤法（トレハロース中の凍結乾燥前組成物）は、「Lyophilization of Nucleic Acid Nanoparticles-Formulation Development, Stabilization Mechanisms, and Process Monitoring」と題するJulia Christina Kasperの2012年の博士論文に記載される方法とも異なる。Kasperは、安定なポリプレックス溶液を作製するための明確な方法の必要性を認識しており、ポリプレックスの凍結乾燥を試みた場合に一般的に見られるナノ粒子の凝集が、凍結乾燥の凍結工程で現れることを理解していた。

40

【0156】

これらの課題を克服するために、Kasperは、ポリプレックスを作製するための異なる方法を開発した。本明細書で述べる逆プロトコル（トレハロース中での凍結乾燥前）と比較したこの方法の概要を表1に示す。

【0157】

	Kasper	逆プロトコル
プラスミド	pCMVluc (市販品) https://www.addgene.org/45968/	BC-819 (BioCancell, イスラエル)
プラスミド希釈のための緩衝液	10 mM ヒスチジン緩衝液 pH 6.0	Tris EDTA pH 8.0
PEI 希釈のための緩衝液	10 mM ヒスチジン緩衝液 pH 6.0	注射用水 (WFI)
PEI	分岐鎖状 PEI を社内で加水分解	<i>In vivo</i> -jetPEI®
N/P 比	6	6
作製体積	0.5 ml	1 l
作製方法	マイクロミキサー(この方法は、 より大体積のための開発が 依然として必要)	トレハロース溶液に希釈した プラスミドを、トレハロース溶液に 希釈した PEI へ、500rpm で 攪拌しながら 3-5 ml/分 の速度で 添加

10

表1

【 0 1 5 8 】

20

以下の表 2 は、Kasper のポリプレックス作製及び凍結乾燥プロトコルと本明細書で述べる逆ポリプレックス作製及び凍結乾燥法との技術的態様の比較を示す。

【 0 1 5 9 】

	Kasper	逆プロトコル + 凍結乾燥
プラスミド	pCMVluc (市販品) https://www.addgene.org/45968/	BC-819 (BioCancell, イスラエル)
プラスミド希釈のための緩衝液	10 mM ヒスチジン緩衝液 pH 6.0	Tris EDTA pH 8.0
PEI 希釈のための緩衝液	HBG 緩衝液 pH7.4 (5% グルコース 20mM Hepes) 又は 10 mM ヒスチジン緩衝液 pH 6.0	WFI
PEI	分岐鎖状 PEI を社内で加水分解	<i>In vivo</i> -jetPEI®
トレハロース添加	10 mM ヒスチジン緩衝液 pH 6.0 に混合し、 1:1 でポリプレックスに添加	5% でプラスミド及び PEI の 両方と混合
N/P 比	6	6
作製方法	マイクロミキサー(この方法は、 より大体積のための開発が 依然として必要)	トレハロース溶液に希釈した プラスミドを、トレハロース溶液に 希釈した PEI へ、500rpm で 攪拌しながら 3-5 ml/分 の速度で 添加
最終プラスミド濃度	0.1 mg/ml	0.4 mg/ml
最終溶液体積	0.5 ml から 5ml まで	1 l
溶液の DSC 試験	あり	あり
凍結乾燥機	凍結乾燥機 Lyostar II, SP Scientific, Stone Ridge 米国	凍結乾燥機 LyoBeta 25 Telstar スペイン
安定性	2-8 C, 20 C, 40 C で 6 週間	現時点で 2-8 C で 2 週間

30

40

表2

【 0 1 6 0 】

50

Kasperは、安定な組成物を作製することの重要性、及び凍結乾燥プロセスの凍結工程の影響についても記載している。以下の表3は、Kasperの研究室でのKasperのポリプレックス作製及び凍結乾燥と本明細書で述べる逆ポリプレックス作製及び凍結乾燥法との技術的態様の概要を示す。

【0161】

	Kasper	BioCancell
プラスミド	pCMVluc (市販品) https://www.addgene.org/45968/	BC-819 (BioCancell, イスラエル)
プラスミド希釈のための緩衝液	10 mM ヒスチジン緩衝液 pH 6.0	Tris EDTA pH 8.0
PEI 希釈のための緩衝液	10 mM ヒスチジン緩衝液 pH 6.0	WFI
PEI	分岐鎖状PEIを社内で加水分解	Polyplus (市販品)
炭水化物添加	スクロースを10 mM ヒスチジン緩衝液 pH 6.0 に混合し、 1:1でポリプレックスに添加	IV 注射用水中のトレハロースを 5%でプラスミド及びPEIの 両方と混合
炭水化物/DNA 比	1200 から14000	125
N/P 比	6	6
作製方法	マイクロミキサー(この方法は、 より大体積のための開発が 依然として必要)	トレハロース溶液に希釈した プラスミドを、トレハロース溶液に 希釈したPEIへ、500rpmで 攪拌しながら3-5 ml/分の速度で 添加
最終プラスミド濃度	0.01 mg/ml 及び 0.05 mg/ml	0.4 mg/ml
最終溶液体積	0.5 ml	1 l
乾燥前の凍結方法	棚冷却対「標準的」減圧	棚冷却
棚冷却凍結法での凍結速度	-1 C から -5 C/分で -45 Cまで	-1 C / 分で -45 C まで
粒子サイズ	DLS (65 から 170 nm)	DLS (80-90 nm)
安定性	2-8 C, 20 C, 40 C で6週間	現時点で2-8 C で2週間

表3

【0162】

Kasperに記載されているように、ポリプレックスのサイズは、凍結乾燥による影響を受け、粒子サイズは、スクロース対プラスミドDNA比が増加するほど、良好に保存される。

【0163】

具体的には、Kasperの教示によると、0.05 mg/mlのDNA溶液は、少なくとも2800のスクロース/DNA比で安定化可能である。Kasperによると、安定化剤/DNA比は、完全な安定化を達成するために極めて重要である。限界比は、凍結方法に依存する。

【0164】

対照的に、本明細書で述べる逆ポリプレックス、凍結乾燥、及び再構成の方法では、粒子の凝集は見られない。加えて、これらの方法で用いられるトレハロース対核酸の比は、125及び250であり、Kasperに記載の比よりも非常に低い。

【0165】

加えて、本明細書で述べる逆方法で作製される凍結乾燥前溶液は、約40～50 nmのサイズ範囲の組成物(例：凍結乾燥前組成物又はポリプレックス)という結果となる。再

構成後、再構成された組成物は、約 80 ~ 90 nm の粒子サイズを有していた。対照的に、Kasper に記載のマイクロミキサーでは、凍結乾燥前で、65 ~ 170 nm のサイズ範囲を有するポリプレックスという結果となった。さらに、Kasper の報告では、凍結乾燥後、ポリプレックスの z 径が僅かに増加した。さらに、Kasper の教示によると、凍結フェーズの過程での粒子の動きを避けるのに十分に高い粘度である限りにおいて、賦形剤の選択はそれほど重要ではない。棚冷却法は、組成物を凍結するための検査した他のいずれの方法よりもストレスが少ない。

【0166】

したがって、Kasper は、プラスミド DNA も siRNA も、制限なしに良好に凍結乾燥はされなかったと結論付けている。例えば、第一の凍結 - 解凍実験では、粒子サイズを維持するために、高濃度の一般的に用いられるジサッカリドであるスクロース又はトレハロースが必要であり、これらは、等張性レベルを大きく超えており、それによって、安定化剤対ポリプレックスの限界比の必須条件 (約 4000) が示唆されている。実際、Kasper では、ラクトスクロース、ヒドロキシプロピルベータデクス (HP - b - CD)、又はポビドン (PVP) などのより高分子量の賦形剤が、凍結及び乾燥の過程で低浸透圧での十分な粒子安定化のために有益であった。14% ラクトスクロース、10% HP - b - CD / 6.5% スクロース、又は 10% PVP / 6.3% スクロースによる等張性配合物を用いると、ポリプレックスサイズは、凍結乾燥及び 40 まででの 6 週間にわたる保存後、過去の実験と比較してはるかに良好に保存された (< 170 nm)。

【0167】

したがって、ラクトスクロース又は CD / スクロース配合物を用いることによって、Kasper は、pDNA / LPEI ポリプレックスを、サイズが僅かに増加するだけであり、生物学的活性は保存された状態で凍結乾燥可能であることを示した。

【0168】

さらに、Kasper は、組成物を作製する目的で彼らが開発したマイクロミキサー装置についても記載している (Kasper 2012、図 4 - 1 参照)。この装置を用いることで、LPEI 及びプラスミドの溶液を T コネクターの接合部で混合することによって、5 ml までの体積でプラスミド - LPEI 組成物が作製された。混合速度は、装置へ溶液を注入するシリンジを用いて制御された。

【0169】

この方法で良好に作製可能であった組成物は、N / P 比 = 6 (LPEI 窒素 (N) 対 DNA リン酸 (P) のモル比; ポリプレックス濃度を示し、サンプルのプラスミド DNA 濃度を意味する) で LPEI を含む $50 \mu\text{g} / \text{ml}$ までであった。しかし、より高いプラスミド濃度の溶液 (特に、 $400 \mu\text{g} / \text{ml}$ 溶液) は、ナノ粒子のサイズが大きい不安定な組成物が得られる結果となった。

【0170】

さらに、Kasper の方法では、プラスミド及び LPEI の両方が、10 mM ヒスチジン緩衝液 pH 6 に混合されており、組成物溶液は、凍結乾燥プロセスの過程でそれを安定化させる目的で、さらなる高濃度の賦形剤が必要であった。具体的には、Kasper の炭水化物 / DNA 比は、1200 から 14000 であった。

【0171】

対照的に、本明細書で述べる逆方法は、ピンチパドルタービン (pinch paddle turbine) を有する標準的な混合容器で行われる。この逆方法は、再現性のある良好な品質を有するポリプレックス溶液 (すなわち、凍結乾燥前組成物) の大スケールでの作製を確保する方法を提供する。

【0172】

具体的には、上記で記載したように、高品質の凍結乾燥前組成物を確保するには、混合順序が極めて重要である。ここで、LPEI 溶液及びプラスミドは、各々、5% トレハロース溶液と混合される。PEI 溶液は、次に、混合容器中に投入され、攪拌しながら、プラスミド溶液が LPEI へ添加される。

10

20

30

40

50

【0173】

驚くべきことに、負に帯電したプラスミド溶液を、強く正に帯電したLPEI溶液へ、トレハロースの存在下で投入することにより、ナノ粒子サイズが小さく（約50nm）、高い安定性の均一な凍結乾燥前組成物溶液が得られる結果となる。

【0174】

この方法により、N/P比=6（LPEI窒素（N）対DNAリン酸（P）のモル比；ポリプレックス濃度を示し、サンプルのプラスミドDNA濃度を意味する）で*in vivo*-jetPEI（登録商標）と複合体形成したDNAの濃度400μg/mlで1000mlの溶液が得られた。炭水化物（トレハロース）/DNAの比は、125である。

【0175】

得られた溶液は、次に、100mlバイアルに充填され、凍結乾燥されて、凍結乾燥された組成物が作製されてよい。1つの限定されない例では、バイアルは、実験用凍結乾燥機Lyobeta 25中で、-45℃での少なくとも4時間にわたる凍結工程、少なくとも41時間、好ましくは、少なくとも80時間、より好ましくは、少なくとも140時間（例：少なくとも41、50、60、70、80、90、100、110、120、130、又は140時間）の25℃での一次乾燥、及び少なくとも8時間の二次乾燥を含み、乾燥圧力はいずれも0.150mbである凍結乾燥サイクルに掛けられた。

【0176】

当業者であれば、凍結乾燥された組成物は、適切ないかなる方法を用いて再構成されて、再構成された組成物が形成されてもよいことは認識される。

【0177】

これまでのところ、Kasperの装置は、比較的高濃度で良好な品質（低い粒子サイズ、安定な組成物など）である組成物溶液を大体積で作製することはできていない。対照的に、本明細書で述べる逆ポリプレックス形成法は、単純であり、比較的高濃度の高品質で安定な凍結乾燥前組成物溶液が、凍結乾燥プロセスに掛けられる間に組成物を保護するための賦形剤の必要なく得られる結果となる。

【0178】

治療エンドポイント及び用量

当業者であれば、医師又は患者の観点から、癌病状に伴う望ましくない症状（例：疼痛、過敏性、体重減少など）の実質的にいかなる軽減又は防止も望ましいことは理解される。加えて、腫瘍の質量又は成長速度のいかなる低減も望ましく、さらには腫瘍の病理組織学的所見の改善も望ましい。したがって、本明細書で用いられる場合、本明細書で用いられる「治療」、「治療的使用」、又は「医薬的使用」の用語は、疾患状態若しくは症状を治療するか、又はそうでなければ、疾患若しくはその他の望ましくない症状の進行をいかなる形であっても防止、妨害、遅延、若しくは逆行させる請求される組成物のあらゆる使用を意味するものとする。

【0179】

有効な用量及び治療プロトコルは、従来手段によって決定されてよく、実験動物での低用量から開始し、続いて効果をモニタリングしながら用量を増やし、体系的に投与レジメンも変化させる。動物実験、好ましくは哺乳動物実験が、体重1キログラムあたりの生物活性剤の最大耐用量又はMTDを決定するために一般的に用いられる。当業者であれば、効果、及びヒトを含む他の種への毒性を回避するための用量の外挿による推定を、通常から行っている。

【0180】

効果についてのヒトでの試験が行われる前に、患者での第I相臨床試験が、安全な用量を確立する補助となる。ある対象に対する最適用量を決定する際、数多くの因子が医師によって考慮され得る。これらの中でも主要なものは、選択された異種遺伝子産物の毒性及び半減期である。さらなる因子としては、患者のサイズ、患者の年齢、患者の全体的状態、治療される特定の癌疾患、疾患の重篤度、患者における他の薬物の存在、遺伝子産物の生体内活性などが挙げられる。試験用量は、動物実験の結果及び臨床文献を考慮した後に

10

20

30

40

50

選択されることになる。

【 0 1 8 1 】

細胞毒性剤をコードする異種遺伝子に作動可能に連結された H 1 9 制御領域又は I G F - 2 P 3 若しくは P 4 プロモーター領域を含有するアデノウイルス系ベクターのヒトでの有効用量の例は、米国特許第 6 , 0 8 7 , 1 6 4 号に提供されている。

【 0 1 8 2 】

対象における癌病状の治療に用いる場合、本発明は、その態様の 1 つとして、核酸、カチオン性ポリマー、炭水化物（例：トレハロース）溶液を含有する（すなわち、凍結乾燥された組成物）滅菌充填バイアル若しくはアンプルの形態のキット又はパッケージも提供する。1 つの実施形態では、キットは、本明細書で述べる逆方法によって作製された凍結乾燥された形態のポリプレックス溶液を、単位用量又は複数用量のいずれかの量で含有し、ここで、パッケージには、再構成された組成物を形成するための再構成及び癌の治療のためのその内容物の使用を説明するラベルが組み込まれている。

10

【 0 1 8 3 】

本発明について記載してきたが、以下の例は、限定ではなく説明のために提供される。

【 実施例 】

【 0 1 8 4 】

例 1 : 現行のポリプレックス作製方法

ポリプレックス作製の現行の方法では、プラスミド (B C - 8 1 9) 及びカチオン性ポリマー (P E I) は、2 つの成分として別々に供給される。B C - 8 1 9 (以前は D T A - H 1 9 として知られていた) は、4 m g / m L の濃度で 5 . 3 m L を含有するバイアルとして提供され、ポリエチレンジイミン (P E I) は、1 5 0 m M の滅菌溶液の 2 . 6 m L を含有するバイアルとして提供される。

20

【 0 1 8 5 】

表 4 作製及び投与:

工程 A	1 つの BC-819 バイアル及び 1 つの PEI バイアルを冷凍庫から取り出し、室温で 15 分間解凍する。	
工程 B	BC-819 の取り扱い	PEI の取り扱い
	1. 滅菌デキストロース 5% 溶液から、20 cc シリンジを用いて 15 mL を抜き取り、空の 50 mL ガラス瓶に入れる。	2. 滅菌デキストロース 5% 溶液から、20 cc シリンジを用いて 17.6 mL を抜き取り、空の 20 mL ガラス瓶に入れる。
	2. 5 cc シリンジを用いて BC-819 の 5 mL を抜き取り、デキストロースを入れた 50 mL ガラス瓶に添加し、最終体積を 20 mL とする。	3. 5 cc シリンジを用いて PEI の 2.4 mL を抜き取り、デキストロースを含有する 20 mL 瓶に添加し、最終体積を 20 mL とする。
	使用済み BC-819 バイアルは廃棄しない。	使用済み PEI バイアルは廃棄しない。
工程 C	1. PEI を含有する小さい方のバイアルの内容物を、20 cc シリンジを用いて、BC-819 を含有する大きい方のバイアルへ移し、10 秒間撹拌する。 常にこの順序で操作することが重要である (PEI を BC-819 へ添加する)。 2. 混合物を、常温で少なくとも 15 分間、しかし 1 時間を超えずに静置する (この工程は、PEI が BC-819 と結合するために重要である)。 3. 最終工程は、滅菌デキストロース 5% を用いて溶液を合計で 50 mL とすることであり、これは、以下の 2 つの方法のうち的一方で行われてよい。 a. 20 cc のシリンジを用いて、10 mL の 5% 滅菌デキストロースを、BC-819/PEI 組成物を含有するバイアルに添加し、合計体積を 50 mL とするか、又は b. 50 mL シリンジに 10 mL の 5% 滅菌デキストロースを充填し、BC-819/PEI の混合物の 40 mL をこのシリンジに吸い取って合計体積を 50 mL とする。	
工程 D	BC-819/PEI (50 mL) を、フォーリーカテーテルを用いた膀胱内注入によって投与する。患者は、薬物を膀胱内に約 2 時間保持することを求められる。	

30

40

【 0 1 8 6 】

50

例 2：凍結乾燥プロトコル

このプロトコルの目的は、BC-819 プラスミド及び *in vivo*-jetPEI (登録商標) (ポリエチレンイミン) を含有するすぐに使用できる凍結乾燥された組成物を作製することである。このプロトコルでは、BC-819/*in vivo*-jetPEI (登録商標) 組成物は、実際には、患者のベッドサイドで作製される。

【0187】

重要なことには、プロトコル作製からのいかなる逸脱も、治療結果に影響を与え得る不良な組成物品質をもたらす結果となり得る。

【0188】

この凍結乾燥された組成物の使用は、治療の質の偏りのリスクを低減する。

10

【0189】

材料及び装置：

材料

【0190】

内容
BC-819 溶液
<i>in vivo</i> -jetPEI® 溶液
5% 滅菌トレハロース溶液
70% エタノール
ラテックスグローブ
5mL 滅菌ピペット
10 mL 滅菌ピペット
15 ml ポリプロピレン管
125 ml ポリプロピレンカップ
プラスチックビーカー
凍結乾燥機用のガラス器具+アダプター
乾燥機 + 乾燥剤

20

表5

30

【0191】

装置

【0192】

内容
マグネティックスターラー
125ml ポリプロピレンカップの底の50%を覆う磁石
ボルテックス
冷凍庫
凍結乾燥機
タイマー
ピペットエイド
ラミナーフローフード

40

表6

【0193】

安全要求事項

この手順を行う間は、ラテックス又はニトリルグローブ及び清浄な実験用白衣を着用するべきである。試験を必要とするいくつかの材料は、生物災害を引き起こす可能性があり

50

得るため、適切に廃棄されるべきである。

【0194】

手順：

器内細胞培養での使用のために作製される溶液はすべて、無菌状態のラミナーフローフード中で作製されるべきである。

【0195】

1. 作製

a. BC-819のバイアル1つ及びin vivo-jet PEI（登録商標）のバイアル1つを解凍する。

b. 50 mlのポリプロピレン管中で、2.5 mlのBC-819を、10 mlの5 % トレハロース溶液と混合する。 10

c. 125 mlのポリプロピレンカップ中で、1.2 mlのin vivo-jet PEI（登録商標）を、11.3 mlの5 % トレハロース溶液と混合し、スターラーを入れる。

d. in vivo-jet PEI（登録商標）/トレハロース溶液を含有するカップを、マグネティックプレート上に置き、運転する。

e. BC-819/トレハロース溶液を、in vivo-jet PEI（登録商標）/トレハロース溶液へ、2 ml/分の速度で滴下する。

f. さらに3分間、マグネティックプレート上で組成物を形成させる。

g. 凍結乾燥用に作られたガラス器具へこの溶液を移す。 20

h. 形成された組成物を、 $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫に48時間移す。

i. 瓶を、氷を充填したプラスチック容器に移す。

j. 瓶を凍結乾燥機に接続し、氷を取り換えながら72時間運転する。

k. 得られた粉末は、再構成まで乾燥器中に保管する。

【0196】

2. 25 mlの滅菌二回蒸留水（DDW）を添加することによって粉末を再構成する。再構成された溶液は、析出をまったく示さないはずである。外観は、僅かに乳白色である。再構成された溶液は、効力アッセイで検査する（図1A及び1B参照）。

【0197】

例3：安定化されたBC819プラスミド-ポリエチレンイミン組成物の開発 30

材料：

BC-819は、過去に方向された通りに作製し（Ohana et al., International Journal of Cancer 98(5) (2002) 645-650; Ohana et al., The Journal of Gene Medicine 7(3) (2005) 366-374参照）、Altheaの施設（San Diego、米国）で大量に作製した。in vivo-jet PEI（登録商標）は、Polypilus（Strasbourg、フランス）から購入した。

【0198】

100 mlのガラスバイアル、プロモブチルストッパー、及びシーラーは、Schott（ドイツ）から購入した。

【0199】

方法：

小スケールでの組成物作製：

TE緩衝液中の4 mg/ml BC-819溶液の5 mlを、20 mlの5 % トレハロース溶液に添加した。

【0200】

2.4 mlのin vivo-jet PEI（登録商標）を、22.6 mlの5 % トレハロース溶液に添加した。次に、このプラスミド溶液を、攪拌しながらPEI溶液に添加して、両成分を完全に均一化させた。この溶液を、1時間未満、室温でインキュベートした。この方法により、N/P比=6（LPEI窒素（N）対DNAリン酸（P）モル比）でin vivo-jet PEI（登録商標）と複合体形成した0.4 mg/ml D 50

NAの溶液50mlを得た。示されるポリプレックス濃度は、サンプルのプラスミドDNA濃度を意味する。

【0201】

中スケールでの組成物作製：

TE緩衝液中の4mg/ml BC-819溶液の100mlを、400mlの5%トレハロース溶液に添加した。48mlのin vivo-jetPEI（登録商標）を、452mlの5%トレハロース溶液に添加した。次に、このプラスミド溶液を、攪拌しながらPEI溶液に添加して、両成分を完全に均一化させた。この溶液を、1時間未満、室温でインキュベートした。この方法により、N/P比=6（LPEI窒素（N）対DNAリン酸（P）モル比）でin vivo-jetPEI（登録商標）と複合体形成した0.4mg/ml DNAの溶液1000mlを得た。示されるポリプレックス濃度は、サンプルのプラスミドDNA濃度を意味する。

10

【0202】

ポリプレックス溶液をバイアルに充填し、以下で述べるように凍結乾燥する。

【0203】

溶液の作製は、標準的プロトコルと比較した逆の順序で行う。この逆ポリプレックス作製プロトコルは、装置の開発をまったく必要とせず、いかなる工業的施設においても容易にスケールアップすることができる。

【0204】

凍結乾燥：

20

凍結乾燥前組成物溶液を、上記で述べた通りに新たに作製し、凍結乾燥プロセス用の100mlバイアルに移した。

【0205】

瓶のサンプルを、実験用凍結乾燥機LyoBeta 25中、-45℃での少なくとも4時間にわたる凍結工程、25℃で少なくとも41時間の一次乾燥、及び少なくとも8時間の二次乾燥を含み、乾燥圧力はいずれも0.150mbである凍結乾燥サイクルに掛けた。

【0206】

粒子サイズ特定：

30

サンプルのz平均粒子径は、Malvern instruments（Herrenberg、ドイツ）製のzetasisizer（nano-s）を用い、角度180°、波長633nm、25（粘度、屈折率）で測定した。

【0207】

ゼータ電位特定：

サンプルのゼータ電位は、Malvern instruments（Herrenberg、ドイツ）製のzetasisizer（nano-s）を用いて特定した。

【0208】

分光光度測定 / 濁度

nanodrop（ThermoScientific nanodrop 2000分光光度計）を用いて試験を行い、サンプルは、260nmで溶液中のDNA濃度を評価し、600nmで溶液の濁度を評価することで検査した。

40

【0209】

溶液のスペクトルは、200から400nmの範囲とした（図5参照）。

【0210】

電気泳動ゲル：

サンプルを、1%アガロースゲルへローディングし、100mVで1時間行った。この試験では、in vivo-jetPEI（登録商標）と複合体形成していないいずれのDNAプラスミドも、又はいずれの分解も認識する（図6参照）。

【0211】

TEM（形状及びサイズ、又は原子間力顕微鏡）：

50

サンプルを、Formvarコーティングした銅グリッドに吸着させた。グリッドを、1%（重量/体積）酢酸ウラニルで染色し、空気乾燥させた。サンプルを、MegaView II CCDカメラ及びAnalysis（登録商標）バージョン3.0ソフトウェア（SoftImaging System GmbH、Munstar、ドイツ）を備えたTecnai 12 TEM 100kV（Phillips、Eindhoven、オランダ）で観察した。

【0212】

サンプルを検査して、溶液中又は乾燥製品中のポリプレックスの形状を評価した。

【0213】

溶液のpH：

10

溶液のpHは、pHメーター（mettler Toledo、スイス）を用いて検査した。

【0214】

浸透圧測定：

サンプルの浸透圧測定は、fiske（登録商標）微量浸透圧計モデル201（Advanced Instruments, Inc、Norwood、MA）を用いて試験した。

【0215】

トランスフェクション：

20

水含有量/LOD：

生体内効力評価：

安定性：

【0216】

結果：

サンプルは、その元の体積量のろ過済み二回蒸留水（DDW）での再水和後直ちに溶解し、以下の試験で用いる前に、5分間インキュベートした。

【0217】

溶液	平均サイズ (d.nm)
先行技術の方法（5% グルコース中）	45.6
凍結乾燥前溶液（トレハロース中での逆作製） 0.4 mg/ml	35.7
凍結乾燥された粉末の再構成後 0.4 mg/ml	49.01
凍結乾燥された粉末の再構成後 0.8 mg/ml	264.9

30

表7 粒子サイズ特定：

【0218】

図3に示されるように、凍結乾燥後に得られた組成物は、トレハロース又はグルコース溶液で新たに作製された組成物と大きな相違は示していない。新たに作製した時点で、グルコース溶液は、50から240nmのサイズ範囲を示した。

40

【0219】

溶液	ゼータ電位 (mV)
先行技術の方法 (5% グルコース中)	113
凍結乾燥前溶液 (トレハロース中での逆作製) 0.4 mg/ml	110
凍結乾燥された粉末の再構成後 0.4 mg/ml	116
凍結乾燥された粉末の再構成後 0.8 mg/ml	125

表8 ゼータ電位特定

10

【 0 2 2 0 】

分光光度測定：

以下の表 9 及び図 5 に示されるように、再水和された溶液中の DNA 濃度は、トレハロース又はグルコース中で新たに作製された溶液と比較した場合、大きな相違は示していない。

【 0 2 2 1 】

サンプルID	核酸濃度	単位	A260	A280	260/280	260/230	種類	ファクター
1	483.2	ng/μl	9.663	6.105	1.58	1.75	DNA	50
1	485.1	ng/μl	9.703	6.145	1.58	1.75	DNA	50
1	483.5	ng/μl	9.67	6.13	1.58	1.75	DNA	50
2	472.3	ng/μl	9.446	5.757	1.64	1.88	DNA	50
2	472.2	ng/μl	9.444	5.73	1.65	1.88	DNA	50
2	473.3	ng/μl	9.465	5.751	1.65	1.88	DNA	50
3	446.4	ng/μl	8.929	5.561	1.61	1.81	DNA	50
3	446.6	ng/μl	8.933	5.558	1.61	1.81	DNA	50
3	447.7	ng/μl	8.954	5.568	1.61	1.81	DNA	50

20

30

表9 1: 先行技術の方法 (5% グルコース中). 2: 凍結乾燥前溶液 (トレハロース中での逆作製) 0.4 mg/ml. 3: 凍結乾燥された粉末の再構成後 0.4 mg/ml.

【 0 2 2 2 】

TEM (形状及びサイズ、又は原子間力顕微鏡)：

観察したサンプルは、グルコース中又はトレハロース中での比較の場合、相違を示していない (図 7 A ~ B 参照)。図 8 は、析出後のサンプルを示す。

40

【 0 2 2 3 】

溶液の pH：

5 % グルコース又はトレハロースで作製したサンプルはすべて、凍結乾燥の前後で約 pH 3 . 0 であった。

【 0 2 2 4 】

浸透圧測定：

【 0 2 2 5 】

溶液	浸透圧計 (mosm/kg)
5% グルコース溶液	274
5% トレハロース溶液	147
先行技術の方法 (5% グルコース中)	240
5% トレハロース中での先行技術の方法	135
凍結乾燥前溶液 (トレハロース中での逆作製) 0.4 mg/ml	138

表10

【 0 2 2 6 】

10

トランスフェクション：

水含有量 / L O D：

第一サイクル後に乾燥製品で試験した水含有量は、2 . 4 %であった。

【 0 2 2 7 】

生体内効力評価：

安定性：

【 0 2 2 8 】

結論：

結論として、この研究の結果は、比較的高濃度の B C - 8 1 9 / i n v i v o - j e t P E I (登録商標) ポリプレックスを、工業的スケールへ容易に移行することのできる技術を用いて大スケールで作製することができることを実証するものである。

20

【 0 2 2 9 】

作製された組成物の品質により、追加の賦形剤の必要なく、B C - 8 1 9 / i n v i v o - j e t P E I (登録商標) の凍結乾燥が可能となる。

【 0 2 3 0 】

予備実験の結果から、凍結乾燥されたポリプレックスは、ベッドサイドで作製される組成物の必要とされる特徴を、追加の利点と共に保持していることが示され、5 Cで2週間保存された乾燥製品は、再現性のあるポリプレックスのサイズ、再現性のあるゼータ電位、及び再水和後の製品の安定性を示した。

【 0 2 3 1 】

30

したがって、組成物は、すぐに再構成できる凍結乾燥された粉末として臨床試験サイトに提供することができる。この新規な配合物により、臨床使用のための再現性のある投与が確保される。

【 0 2 3 2 】

例 4：異なる溶液の安定性の試験

特定の所定の時間間隔で(すなわち、作製/再構成から1時間以内、3時間、3日間、1週間)、異なる溶液の安定性を調べるための実験を行った。具体的には、(5% グルコース中(先行技術での作製)、トレハロース中で新たに作製(凍結乾燥前(逆作製法))、及び凍結乾燥物から再構成されたトレハロース中(10 mlの注射用IV水で再構成)の3つの複合体溶液を試験し、以下のパラメーター：ナノサイザー(nanosizer)、ゼータ電位、浸透圧計、pHメーター、ネガティブ染色による透過型電子顕微鏡(TEM)、nanodrop-DNA濃度、600 nmでの濁度、及びゲル電気泳動について比較した。

40

【 0 2 3 3 】

これらの試験に加えて、乾燥製品に対して以下の試験：走査型電子顕微鏡(SEM)、原子間力顕微鏡(AFM)、カールフィッシャー、低温TEM、及びx線も行う予定である。

【 0 2 3 4 】

外観

先行技術の作製(グルコースサンプル)では、室温で3時間後に黄色に変色したが、凍

50

結乾燥前（トレハロース中での逆方法）及び再構成された凍結乾燥製品は、外観の変化を示さなかった。

【 0 2 3 5 】

T E M

透過型電子顕微鏡（T E M）の結果を図 9 A に示す。一行目の 3 つの写真は、3 つの異なる時間点での標準的な作製に従って作製した複合体（小さい黒い点）を示す。1 週間後には見られる黒い点の数が少なくなっており、このことから、複合体の分解が示唆される。

【 0 2 3 6 】

二行目の 3 つの写真は、3 つの時間点での凍結乾燥前サンプル（逆作製）を示す。黒い点の減少は見られない。

10

【 0 2 3 7 】

そして、一番下の行の 3 つの写真は、3 つの時間点での再構成製品を示す。やはり、黒い点の減少は見られない。

【 0 2 3 8 】

図 9 B は、トレハロース中での析出複合体を示す。

【 0 2 3 9 】

p H メーター

以下の表 1 1 は、観察された p H 値の範囲を示す。

【 0 2 4 0 】

20

サンプル 時間	1 時間	3-5 時間	3 日間	1 週間
再構成後 (lyo IV)	2.94-2.96	2.93-2.97	2.97-3.00	2.92-3.03
凍結乾燥前 (treh iv)	2.9-2.99	2.88-3.01	2.85-3.03	2.96-3.00
先行技術の作製 (glu bag)	2.86-2.98	2.84-2.99	2.86-2.93	2.83-2.9

表 11

【 0 2 4 1 】

これらの結果は、溶液間で、及び様々な時間間隔間で、p H の変化がないことを示している。

30

【 0 2 4 2 】

モル浸透圧濃度 (m o s m / k g)

モル浸透圧濃度は、液体から固体粒子の濃度を評価するために測定する。以下の表 1 2 は、観察された値の範囲を示す。

【 0 2 4 3 】

サンプル 時間	1 時間	3-5 時間	3 日間	1 週間
再構成後 (lyo IV)	99-120	102-122	118-120	97-125
凍結乾燥前 (treh iv)	132-134	130-137	129-163	134-165
先行技術の作製 (glu bag)	243-247	241-250	241-247	239-253

表 12

40

【 0 2 4 4 】

溶液	5% グルコース	5%トレハロース
浸透圧計 (mosm/l)	280	135
Mw(gr/mol)	180.16	378.33

表13

【 0 2 4 5 】

上記の結果は、トレハロース中の新たな溶液と凍結乾燥物との間で相違が見られないことを示している。グルコース中の複合体は、より高いモル浸透圧濃度を示している。膀胱に投与した際のこの相違が示唆することを調べ、理解するための実験を行う予定である。

【 0 2 4 6 】

10

ナノサイズ (d . n m)

D L S 法は、成分の粘度及び屈折率を考慮に入れて、粒子サイズを決定する。以下の表 1 4 は、観察された値の範囲 (n m) を示す。

【 0 2 4 7 】

サンプル 時間	1 時間	3-5 時間	3 日間	1 週間
再構成後 (lyo IV)	81.25-90.3	74.42-91.75	87.28-91.95	92.19-105.3
凍結乾燥前 (treh iv)	41.39-51.58	42.69-51	42.94-54.46	48.93-55.47
先行技術の作製 (glu bag)	51.29-94	48.78-90.33	58.71-74.03	57.79-68.92

表14

20

【 0 2 4 8 】

これらの結果は、各溶液において、粒子サイズに経時での大きな変化がないことを示している。

【 0 2 4 9 】

ゼータ電位 (m V)

ゼータ電位は、コロイド分散体中の界面動電位であり、系の安定性の指標である。以下の表 1 5 は、観察された値の範囲を示す。

30

【 0 2 5 0 】

サンプル 時間	1 時間	3-5 時間	3 日間	1 週間
再構成後 (lyo IV)	64.9-66.9	61.9-67.2	64.6-67.1	64.3-66.7
凍結乾燥前 (treh iv)	59.7-68	59-66.9	61.4-63.4	63.8-65.2
先行技術の作製 (glu bag)	68.4-71.4	66.6-70.8	65.2-66.9	66.3-69.6

表15

40

【 0 2 5 1 】

ゼータ電位 (mV)	コロイドの安定性挙動
0 から ± 5	迅速な凝結又は凝集
± 10 から ± 30	初期段階の不安定性
± 30 から ± 40	中程度の安定性
± 40 から ± 60	良好な安定性
± 61 超	非常に優れた安定性

表16

50

【 0 2 5 2 】

これらの結果は、溶液が測定を行った時間にわたって安定性を示したこと、及び検査したすべてのサンプルの間で相違がないことを示している。

【 0 2 5 3 】

DNA濃度 (ng / μ l)

以下の表 1 6 は、観察された値の範囲を示す。

【 0 2 5 4 】

サンプル 時間	1 時間	3-5時間	3 日間	1 週間
再構成後 (lyo IV)	455-459.4	438.4-441.1	424.5-457.4	435.6-440.1
凍結乾燥前 (treh iv)	455.7-466.6	459-464.1	458.1-467.8	452.1-463.6
先行技術の作製 (glu bag)	456.6-477.4	461.8-475.6	442-507.4	481.3-491.5

表16

10

【 0 2 5 5 】

これらの結果は、DNA濃度が、経時で正常な範囲内に維持されていることを示している。低下は見られなかった。

20

【 0 2 5 6 】

濁度 (細胞 / ml)

以下の表 1 7 は、観察された値の範囲を示す (6 0 0 nmでの吸収) 。

【 0 2 5 7 】

サンプル 時間	1 時間	3-5時間	3 日間	1 週間
再構成後 (lyo IV)	0.01-0.014	0.009-0.012	0.009-0.012	0.011-0.014
凍結乾燥前 (treh iv)	0.004-0.009	0.004-0.009	0.006-0.008	0.004-0.007
先行技術の作製 (glu bag)	0.005-0.01	0.009-0.016	0.007-0.012	0.009-0.014

表17

30

【 0 2 5 8 】

経時での溶液中の濁度は、測定できなかった。濁度を測定するために、さらなる実験を行う予定である。

【 0 2 5 9 】

2 5 0 から 6 0 0 nmのスペクトル

観察された時間にわたって、グルコース中で作製された複合体は、約 3 8 0 nm (紫色) で吸収を示した。この吸収を引き起こした残留化合物が何かを特定するためのさらなる実験を行う予定である。

40

【 0 2 6 0 】

例 5 : 生体内試験

2 0 0 万個の HCT - 1 1 6 細胞を、胸腺欠損ヌードマウスの背中側に注射した。腫瘍が治療すべきサイズに到達したところで、マウスに、5 % グルコース (コントロール) に対して先行技術サンプル又は再構成サンプルの 3 回の注射を施した。結果を図 1 0 に示す。

【 図 1 】

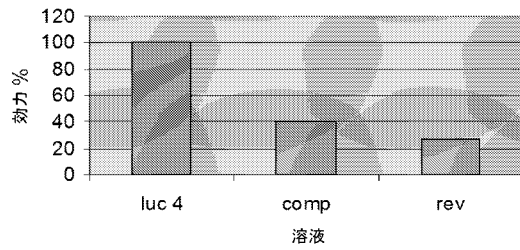


Fig. 1A

【 図 2 】



Fig. 2

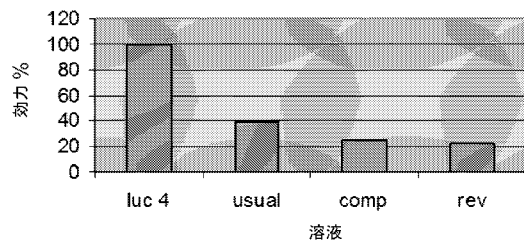


Fig. 1B

【 図 3 】

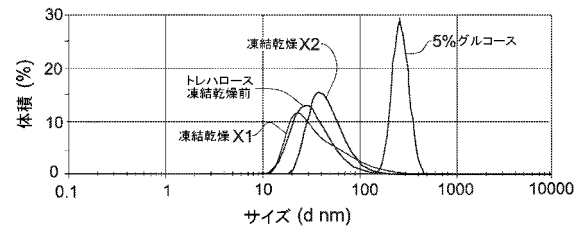


Fig. 3

【 図 4 】

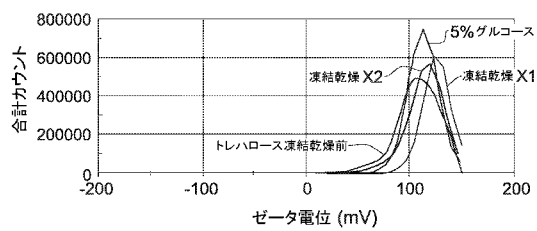


Fig. 4

【 図 6 】

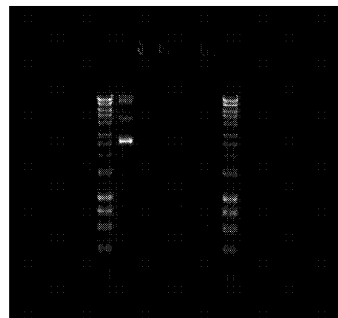


Fig. 6

【 図 5 】

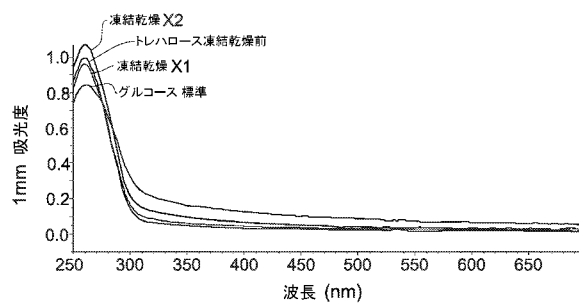


Fig. 5

【 図 7 A 】

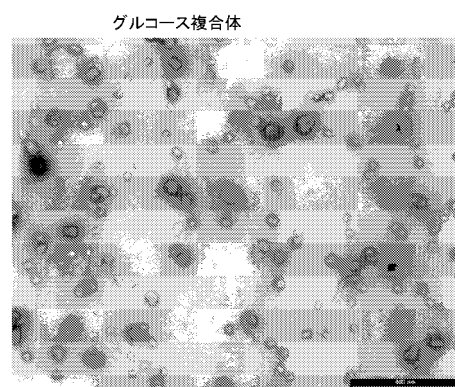


Fig. 7A

【図 7 B】

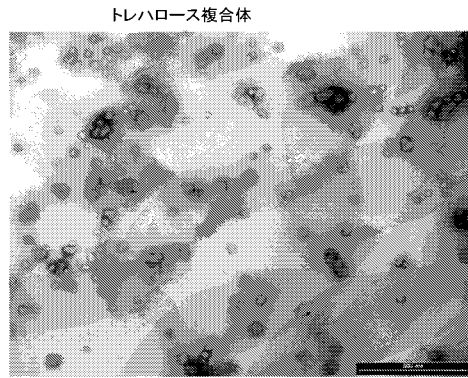


Fig. 7B

【図 8】

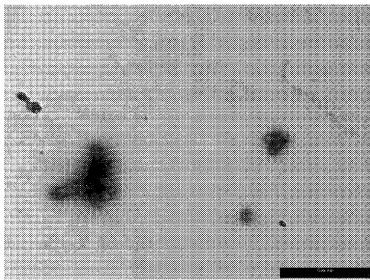


Fig. 8

【図 9 B】

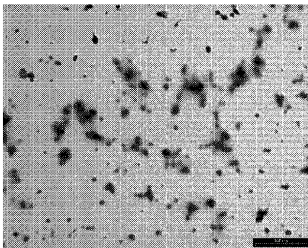
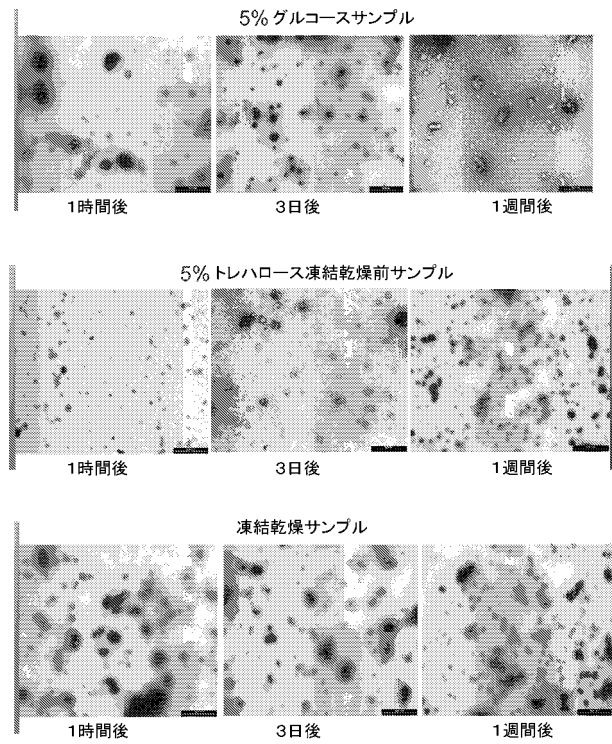


Fig. 9B

【図 9 A】

Fig. 9A



【図 10】

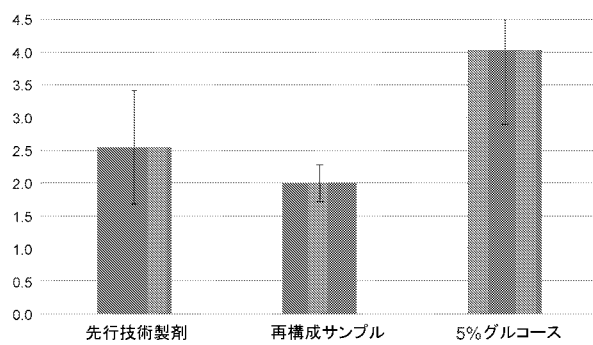


Fig. 10

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IL2016/050477

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K9/19 A61K48/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2009/042829 A1 (MATAR MAJED [US] ET AL) 12 February 2009 (2009-02-12) page 1, paragraph 7 - page 2, paragraph 10 page 2, paragraphs 23,24 page 2, paragraph 30 - page 3, paragraph 30 page 5, paragraphs 49,50,53,54 page 6, paragraph 58 page 7, paragraph 66-69 page 8; examples 1,1A page 9 - page 10; example 7 ----- -/-	1-92

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 August 2016

Date of mailing of the international search report

02/09/2016

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gómez Gallardo, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IL2016/050477

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2004/142474 A1 (MAHATO RAM I [US] ET AL) 22 July 2004 (2004-07-22) page 2, paragraph 14-19 page 4, paragraph 47 - page 5, paragraph 47 page 6, paragraph 61 page 7, paragraphs 64,67 page 10 - page 11; example 13 -----	45-54, 58-90
X	US 2012/083037 A1 (WENDORFF JOACHIM H [DE] ET AL) 5 April 2012 (2012-04-05) page 1, paragraphs 13,18 page 2, paragraphs 22,26-30 page 3, paragraph 35-42 page 3, paragraph 62 - page 4, paragraph 70 claims 1-25 -----	1-37,44, 92
X	WO 2010/028093 A2 (SENECO TECHNOLOGIES INC [US]) 11 March 2010 (2010-03-11) page 38 - page 41; example 7 page 41 - page 44; example 9 page 57 - page 58; example 19 -----	1-37,44, 92
X	BRUS C ET AL: "Stabilization of oligonucleotide-polyethylenimine complexes by freeze-drying: physicochemical and biological characterization", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 95, no. 1, 20 February 2004 (2004-02-20), pages 119-131, XP004487821, ISSN: 0168-3659, DOI: 10.1016/J.JCONREL.2003.10.021 cited in the application abstract page 121, left-hand column, paragraph 2 - page 121, right-hand column, paragraph 1 ----- -/--	1-37,44, 92

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IL2016/050477

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CORINNA PFEIFER ET AL: "Dry powder aerosols of polyethylenimine (PEI)-based gene vectors mediate efficient gene delivery to the lung", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, vol. 154, no. 1, 1 August 2011 (2011-08-01), pages 69-76, XP055296657, NL ISSN: 0168-3659, DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.05.006 abstract page 70, right-hand column, paragraph 3-5 page 71, right-hand column, last paragraph - page 72, right-hand column, paragraph 2 page 72; figure 1 page 73; figure 4 -----	1-37,44, 92
X	MARION D.C. MOLINA ET AL: "Maintenance of nonviral vector particle size during the freezing step of the lyophilization process is insufficient for preservation of activity: Insight from other structural indicators", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, vol. 90, no. 8, 1 October 2001 (2001-10-01), pages 1445-1455, XP055003833, ISSN: 0022-3549, DOI: 10.1002/jps.1096 page 1447, right-hand column, paragraphs 2,3 page 1450; figure 4 -----	1-4, 7-37,44, 92
A	SIDI A A ET AL: "Phase I/II Marker Lesion Study of Intravesical BC-819 DNA Plasmid in H19 Over Expressing Superficial Bladder Cancer Refractory to Bacillus Calmette-Guerin", JOURNAL OF UROLOGY, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, BALTIMORE, MD, US, vol. 180, no. 6, 1 December 2008 (2008-12-01), pages 2379-2383, XP025977444, ISSN: 0022-5347, DOI: 10.1016/J.JURO.2008.08.006 [retrieved on 2008-10-31] cited in the application abstract page 2380, left-hand column, paragraph 3 -----	1-92

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IL2016/050477

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2009042829 A1	12-02-2009	US 2009042829 A1	12-02-2009
		US 2013065942 A1	14-03-2013
US 2004142474 A1	22-07-2004	AU 2003297850 A1	14-07-2005
		CA 2539169 A1	07-07-2005
		CN 1893924 A	10-01-2007
		EP 1680085 A1	19-07-2006
		JP 2007521247 A	02-08-2007
		KR 20060088896 A	07-08-2006
		US 2004142474 A1	22-07-2004
		WO 2005060934 A1	07-07-2005
US 2012083037 A1	05-04-2012	DE 102009006606 A1	05-08-2010
		EP 2391389 A1	07-12-2011
		US 2012083037 A1	05-04-2012
		WO 2010086406 A1	05-08-2010
WO 2010028093 A2	11-03-2010	AR 073274 A1	28-10-2010
		AU 2009288092 A1	11-03-2010
		CA 2735823 A1	11-03-2010
		CN 102202693 A	28-09-2011
		EP 2331142 A2	15-06-2011
		JP 2012501650 A	26-01-2012
		TW 201023898 A	01-07-2010
		WO 2010028093 A2	11-03-2010

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 K 48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00		
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00		
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1	
A 6 1 P 19/02	(2006.01)	A 6 1 P 19/02		
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5	
A 6 1 K 9/14	(2006.01)	A 6 1 K 9/14		
A 6 1 K 47/26	(2006.01)	A 6 1 K 47/26		
A 6 1 K 47/38	(2006.01)	A 6 1 K 47/38		
A 6 1 K 47/36	(2006.01)	A 6 1 K 47/36		
A 6 1 K 47/34	(2017.01)	A 6 1 K 47/34		
A 6 1 K 47/32	(2006.01)	A 6 1 K 47/32		

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(72)発明者 ホックバーク , アブラハム

イスラエル国 7 4 0 3 7 6 7 ネスジオナ , チョーセンストリート 1 2 / 1 1

(72)発明者 ガルーラ , ジェニファー

イスラエル国 9 6 9 2 9 1 4 エルサレム , ヨセフシュリムストリート 8 , フラット 3 4

F ターム(参考) 4C076 AA29 AA95 CC04 CC07 CC27 DD67 EE02 EE16 EE17 EE25
 EE26 EE30 EE31 EE38 EE41 FF34 GG06
 4C084 AA13 MA05 MA41 MA43 MA44 NA13 ZB151 ZB21 ZB261
 4C086 AA10 EA16 MA03 MA05 MA41 MA43 MA44 NA13 ZB15 ZB21
 ZB26