

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2007年4月26日 (26.04.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/046356 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 31/7105 (2006.01) A61K 47/44 (2006.01)
A61K 47/18 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61K 47/28 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/320617
- (22) 国際出願日: 2006年10月17日 (17.10.2006)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2005-303497
2005年10月18日 (18.10.2005) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 大塚製薬株式会社 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1018535 東京都千代田区神田司町2丁目9番地 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 豊福 秀一 (TOY-OBUKU, Hidekazu) [JP/JP]; 〒7710182 徳島県徳島市川内町平石夷野224-18 大塚製薬株式会社内 Tokushima (JP). 宮尾 英男 (MIYAO, Hideo) [JP/JP]; 〒7710182 徳島県徳島市川内町平石夷野224-18 大塚製薬株式会社内 Tokushima (JP). 佐藤 正子 (SATO, Masako) [JP/JP]; 〒7710192 徳島県徳島市川内町加賀須野463-10 大塚製薬株式会社内 Tokushima (JP). 関口 和生 (SEKIGUCHI, Kazuo)
- (54) Title: CARRIER COMPOSITION FOR NUCLEIC ACID TRANSPORT
- (54) 発明の名称: 核酸送達用キャリアー組成物
- (57) Abstract: Disclosed is a carrier composition for nucleic acid transport, which can protect a nucleic acid (e.g., siRNA) from decomposition and transport the nucleic acid into a cell with good efficiency when the carrier composition is administered to an animal cell or a living organism and has low toxicity. Also disclosed is a nucleic acid transport composition which comprises the carrier composition and a nucleic acid. The carrier composition can be prepared by mixing (A) a cationic lipid having a sterol nucleus with (B) a cationic lipid of a quaternary ammonium salt type. The nucleic acid transport composition can be prepared by mixing the carrier composition with a nucleic acid.
- (57) 要約: 本発明の目的は、siRNA等の核酸を動物由来細胞又は生物に投与した場合に、核酸を分解から保護して効率的に細胞内へ送達させることができ、低毒性な核酸送達用キャリアー組成物、及び該キャリアー組成物と核酸を含有する核酸送達用組成物を提供することである。(A)ステロイド核を有するカチオン性脂質、及び(B)第4級アンモニウム塩型のカチオン性脂質を組み合わせることで配合して核酸送達用キャリアー組成物を調製する。また、当該核酸送達用キャリアー組成物と核酸を混合して、核酸送達用組成物を調製する。
- (74) 代理人: 三枝 英二, 外(SAEGUSA, Eiji et al.); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜TNKビル Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

WO 2007/046356 A1

明 細 書

核酸送達用キャリアー組成物

技術分野

[0001] 本発明は、核酸を動物由来細胞又は生物に投与した場合に、核酸を分解から保護し、効率的に細胞内へ送達させることができる、低毒性で安全性が高い核酸送達用キャリアー組成物、及び核酸送達用組成物に関する。

背景技術

[0002] 近年のバイオテクノロジーの発展により、細胞内で生理活性機能を発揮する核酸が種々明らかにされている。例えば、siRNA (small interfering RNA) は、細胞に存在する標的遺伝子のmRNAの分解を惹起し、標的遺伝子の発現を阻害すること (RNA interference, RNA干渉) が知られている。このRNA干渉による標的遺伝子の発現阻害機能は、特定の遺伝子又は遺伝子群の異常な発現が原因となって生じる疾患症状を軽減乃至治療する上で有用であり、siRNAは治療薬としての開発が期待されている。しかしながらsiRNAを初めとする核酸を治療薬等として利用するためには、標的細胞内でsiRNAの機能を発揮することが重要であり、このためには核酸を標的細胞内に効率的に送達させる技術を確立することが必要不可欠である。

[0003] 外来性核酸分子あるいは遺伝子を細胞内に送達する技術として、レトロウイルス、アデノウイルスおよびヘルペスウイルス等を含む多数のウイルスが、ヒトにおける難治性疾患治療のために利用されている。しかしながら、感染性、免疫反応性、生産性等の問題により治療には困難さが伴っていた。このためウイルス由来の問題点を克服し、かつ核酸分子を細胞内に送達するための非ウイルス性キャリアーの開発が行われてきた。

[0004] これまでに、siRNA等の核酸の細胞内への送達を促進する非ウイルス性核酸送達用キャリアーとして、例えば特許文献1には、特定構造のカチオン性脂質が報告されている。しかしながら、特許文献1で報告されているカチオン性脂質では、培養細胞又は生体に投与した場合には毒性を示すという欠点があった。また、特許文献2には、比較的毒性が低くsiRNAを細胞内に送達可能なキャリアー組成物として、両親媒性

化合物及びポリカチオンを含む組成物が開示されている。しかしながら、特許文献2に報告されている組成物でも、十分量のsiRNAを細胞内に導入する場合には、細胞に及ぼす毒性の点で依然として問題があった。

[0005] このような従来技術を背景として、低毒性であり、siRNAを初めとする核酸を効率的に細胞内へ送達させることができる核酸送達用キャリアー組成物の開発が切望されていた。

特許文献1:特表2002-529439号公報

特許文献2:特表2005-508394号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0006] そこで、本発明は、上記従来技術の課題を解決することを目的とする。具体的には、本発明の目的は、siRNA等の核酸を動物由来細胞又は生物に投与した場合に、核酸を分解から保護して効率的に細胞内へ送達させることができ、低毒性で高い安全性を示す核酸送達用キャリアー組成物、並びに該キャリアー組成物と核酸を含有する核酸送達用組成物を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者等は、上記課題を解決すべく鋭意検討したところ、(A)ステロイド核を有するカチオン性脂質、及び(B)第4級アンモニウム塩型のカチオン性脂質を組み合わせる組成物は、毒性が低く、しかも核酸を分解から保護して効率的に細胞内へ送達させることができ、核酸送達用キャリアーとして有用であることを見出した。本発明は、これらの知見に基づいて、更に検討を重ねることによって完成したものである。

[0008] 即ち、本発明は、下記に掲げる態様の発明を提供する:

項1. (A)ステロイド核を有するカチオン性脂質、及び(B)第4級アンモニウム塩型のカチオン性脂質を含有することを特徴とする、核酸送達用キャリアー組成物。

項2. 更に(C)油性基材を含有する、項1に記載の核酸送達用キャリアー組成物。

項3. (A)成分が、 3β -[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、及び/又は 3β -[N',N',N'-トリメチルアミノエタン]ヨウ化コレステロールであ

る、項1に記載の核酸送達用キャリアー組成物。

項4. (B)成分が、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロマイド塩、ジオレオイルトリメチルアンモニウムプロパン、及びN-(1-(2,3-ビス(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塩酸塩よりなる群から選択される少なくとも1種である、項1に記載の核酸送達用キャリアー組成物。

項5. (A)成分100重量部に対して、(B)成分が10~200重量部の割合で含まれる、項1に記載の核酸送達用キャリアー組成物。

項6. siRNA送達用キャリアーである、項1に記載の核酸送達用キャリアー組成物。

項7. 核酸、及び項1乃至5のいずれかに記載の核酸送達用キャリアー組成物を含む、核酸送達用組成物。

項8. 核酸がsiRNAである、項7に記載の核酸送達用組成物。

項9. 項7に記載の核酸送達用組成物を細胞に接触させることにより、核酸を細胞内に導入させることを特徴とする、核酸導入方法。

項10. (A)ステロイド核を有するカチオン性脂質、及び(B)第4級アンモニウム塩型のカチオン性脂質の、核酸送達用キャリアー組成物の製造のための使用。

発明の効果

[0009] 本発明の核酸送達用キャリアー組成物及び核酸送達用組成物によれば、下記の優れた効果が得られる。

(1)細胞内に効率的に核酸を送達して、細胞内で核酸の機能を有効に発揮させることができる。

(2)生体内や培養液中で核酸の分解を抑制できる。

(3)毒性が低く、安全性が高い。

[0010] 従って、上記核酸送達用キャリアー組成物及び核酸送達用組成物は、核酸の導入による各種疾患の治療、特に、低分子化合物等では治療困難な難治性疾患治療に有用である。

[0011] また、本発明の核酸送達用組成物は、凍結乾燥処理が可能であるので、凍結乾燥状態で保存できるという利点もある。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]試験例1において、各種被験試料を用いて細胞を処理した後に、細胞の核酸由来の蛍光像を、蛍光顕微鏡により観察した結果を示す図である。

[図2]試験例2において、各種被験試料を用いて細胞を処理した後に、細胞のルシフェラーゼ活性を測定した結果を示す図である。

[図3]試験例3において、ラットの肺におけるneprilysin (NEP)活性を測定した結果を示す図である。

[図4]試験例4において、各種被験試料で処理した後の生細胞数の測定結果を示す図である。

[図5]試験例5において、ラットの肺組織切片をヘマトキシリン－エオシンで染色した結果を示す図である。図中、ヘマトキシリンが核・リボソーム等を青藍色に染色しており、エオシンが細胞質・繊維・赤血球を赤色に染色している。

発明を実施するための最良の形態

[0013] 以下、本発明を詳細に説明する。

核酸送達用キャリアー

本発明の核酸送達用キャリアー組成物は、(A)ステロイド核を有するカチオン性脂質、及び(B)第4級アンモニウム塩型のカチオン性脂質を含有することを特徴とするものである。

[0014] 本発明の核酸送達用キャリアー組成物は、核酸を細胞内に送達(導入)するための核酸のキャリアーとして使用される。

[0015] 本発明の核酸送達用キャリアー組成物が適用される核酸は、細胞内への送達が必要とされているものであれば、その種類や構造については特に制限されない。当該核酸の具体例として、siRNA、mRNA、tRNA、rRNA、cDNA、miRNA (マイクロRNA)、リボザイム、アンチセンスオリゴ、デコイオリゴヌクレオチド、プラスミドDNA、ペプチド核酸、三重鎖形成性オリゴヌクレオチド (Triplex Forming Oligonucleotide, TFO)、遺伝子等が例示される。中でも、特に、本発明の核酸送達用キャリアー組成物は、siRNAの細胞内への送達用として有用である。本発明の核酸送達用キャリアーが適用される核酸は、ヒト、動物、植物、細菌、ウイルス等に由来するものであってもよく、また化学合成により製されたものであってもよい。更に、これらの核酸は、1本鎖、2本鎖、3

本鎖のいずれでもよく、更にその分子量についても特に制限されない。また、本発明において、核酸は化学、酵素又はペプチドで修飾されたものであってもよい。本発明において、核酸は、1種のを単独で使用してもよく、また2種以上のものを適宜組み合わせ使用してもよい。

- [0016] 本発明の核酸送達用キャリアー組成物に使用されるステロイド核を有するカチオン性脂質(以下、「(A)成分」と表記することもある)とは、ステロイド核(ペルヒドロシクロペンタフェナントレン環; $C_{17}H_{28}$)を有し、カチオン性を示す脂質である。本発明に使用されるステロイド核を有するカチオン性脂質としては、薬理的に許容されることを限度として特に制限されないが、具体例としては、 3β -[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)、 3β -[N',N',N'-トリメチルアミノエタン]ヨウ化コレステロール(TC-Chol)、ビス(グアニジウム)-トレン-コレステロース(BGTC)、N-コレステリルオキシカルボニル-3,7-ジアザノナン-1,9-ジアミン、 β -アラニン-ジエタールアミン-コレステロール、 N^4 -スペルミンコレステリルカルバメート(GL-67; N^4 -spermine cholesteryl carbamate)、N[N^4 -3-アミノプロピルスペルミジン]コレステリルカルバメート(GL-78; N[N^4 -3-aminopropylspermidine] cholesteryl carbamate)、 N^4 -スペルミンコレステリルカルボキシアミド(GL-90; N^4 -spermine cholesteryl carboxamide)、N1,N8-ビス(アルギニックカルボキシアミド)- N^4 -スペルミジンコレステリルカルバメート(GL-95; N^1,N^8 -Bis(arginine carboxamide)- N^4 -spermidine cholesteryl carbamate)、N-[N^1,N^4,N^8 -トリス(3-アミノプロピル)スペルミジン]コレステリルカルバメート(GL-96; N-[N^1,N^4,N^8 -Tris(3-aminopropyl)spermidine]cholesteryl carbamate)等のコレステロール誘導体(コレステロール骨格を有するカチオン性脂質);スクアラミン(Squalamine)、3a, 7a, 12a-トリス(3-アミノプロポキシ)- 5β -コラン-24-(N,N-ビス(3-アミノプロピル)アミン(3a, 7a, 12a-Tris(3-aminopropoxy)- 5β -cholan-24-(N,N-bis(3-aminopropyl)amine)、3a, 7a, 12a-トリス(3-アミノプロポキシ)- 5β -コラン-24-(N-(N-(3-アミノプロピル))-3-アミノプロピル)-アミン(3a, 7a, 12a-Tris(3-aminopropoxy)-5b-cholan-24-(N-(N-(3-aminopropyl))-3-aminopropyl)-amine)、3a, 7a, 12a-トリス(3-アジドプロポキシ)- 5β -コラン-24-(N,N-ビス(2-シアノエチル)アミン)(3a, 7a, 12a-Tris(3-azidopropoxy)-5b-cholan-24-(N,N-bis(2-cyanoethyl)amine))、3a, 7a, 12a-トリス(3-アジドプロポキシ-

シ)-5 β -コラン-24-(N-(ベンジルオキシカルボニル)-N-(ヒドロキシプロピル)-アミン)(3a, 7a, 12a-Tris(3-azidopropoxy)-5 β -cholan-24-(N-(benzyloxycarbonyl)-N-(3-hydroxypropyl)-amine))等のステロイドが結合しているカチオン性脂質;アンブレラー-スペルミン複合体(Umbrella-spermine conjugates)等のコール酸が結合しているカチオン性脂質;ステロールグリコシドが結合しているカチオン性脂質;ステロイドサポニンが結合しているカチオン性脂質等が例示される。これらのステロイド核を有するカチオン性単純脂質は、1種単独で使用してもよく、また2種以上を任意に組み合わせて使用してもよい。

- [0017] ステロイド核を有するカチオン性脂質として、好ましくはコレステロール誘導體(コレステロール骨格を有するカチオン性脂質)が挙げられ、更に好ましくは、3 β -[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、及び3 β -[N',N',N'-トリメチルアミノエタン]ヨウ化コレステロール(TC-Chol)が挙げられる。
- [0018] 本発明の核酸送達用キャリアー組成物に使用される第4級アンモニウム塩型のカチオン性脂質(以下、「(B)成分」と表記することもある)としては、薬理的に許容されることを限度として特に制限されない。その具体例としては、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロマイド塩(DDAB)、1,2-ジミリストール-3-トリメチルアンモニウムプロパン、1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン(DOTAP)、1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウムプロパンメチル硫酸塩、1,2-ジパルミトイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン、1,2-ジステアロイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン、N-(1-(2,3-ビス(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塩酸塩(DOTMA)、ジミリストールオキシプロピルジメチルヒドロキシエチルアンモニウムブロマイド塩(DMR IE)、ジオレオイルオキシプロピルジメチルヒドロキシエチルアンモニウムブロマイド(DORIE)、ジメチルジドデシルアンモニウムブロマイド、N-(α -トリメチルアンモニオアセチル)-ジドデシル-D-グルタミン塩酸塩、N-(α -トリメチルアンモニオアセチル)-O, O'-ビス-(1H, 1H, 2H, 2H-パーフルオロデシル)-L-グルタミン塩酸塩、O, O'-ジドデカノイル-N-(α -トリメチルアンモニオアセチル)ジエタノールアミン塩酸塩、メチルアリルジドデシルアンモニウムブロマイド、N-[p-(w-トリメチルアンモニオブチルオキシ)-ベンゾイル]-ジドデシル-L-グルタミン塩酸塩、9-(w-トリメチルアンモニオブチル)-3, 6-

ビス(ドデカノイル)カルバゾールブロマイド、ジメチルジオクタデシルアンモニウム塩酸塩、N-w-トリメチルアンモニオデカノイル-ジヘキサデシル-D-グルタミンブロマイド、N-(p-(w-トリメチルアンモニオヘキシルオキシ)-ベンゾイル)-ジテトラデシル-L-グルタミンブロマイド、p-(w-トリメチルアンモニオデシルオキシ)-p'-オクチルオキシアゾベンゼンブロマイド塩 (MC-1-0810)、p-(w-(b-ヒドロキシエチル)ジメチル-アンモニオ-デシルオキシ)-p'-オクチルオキシアゾベンゼンブロマイド塩 (MC-3-0810)、O,O',O''-トリドデカノイル-N-(w-トリメチル-アンモニオデカノイル)-トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンブロマイド塩(TC-1-12)、1,2-ジラウリル-グリセロ-3-エチルフォスフォコリン、1,2-ジミリストイル-グリセロ-3-エチルフォスフォコリン、1,2-ジパルミトイル-グリセロ-3-エチルフォスフォコリン、1,2-ジステアロイル-グリセロ-3-エチルフォスフォコリン、1,2-ジオレオイル-グリセロ-3-エチルフォスフォコリン、1-パルミトイル-2-オレオイル-グリセロ-3-エチルフォスフォコリン等が例示される。これらの第4級アンモニウム塩型のカチオン性脂質は、1種単独で使用してもよく、また2種以上を任意に組み合わせで使用してもよい。

[0019] これらの第4級アンモニウム塩型のカチオン性脂質の中で、好ましくは、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロマイド塩(DDAB)、ジオレオイルトリメチルアンモニウムプロパン(DOTAP)、N-(1-(2,3-ビス(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塩酸塩(DOTMA)、O,O'-ジドデカノイル-N-(a-トリメチルアンモニオアセチル)ジエタノールアミン塩酸塩(DC-6-12, n=12; 及びDC-6-14, n=14)、p-(w-(b-ヒドロキシエチル)ジメチル-アンモニオ-デシルオキシ)-p'-オクチルオキシアゾベンゼンブロマイド塩(MC-3-0810)、及びO,O',O''-トリドデカノイル-N-(w-トリメチル-アンモニオデカノイル)-トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンブロマイド塩(TC-1-12)が挙げられ、更に好ましくは、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロマイド塩(DDAB)、ジオレオイルトリメチルアンモニウムプロパン(DOTAP)、N-(1-(2,3-ビス(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塩酸塩(DOTMA)が挙げられる。

[0020] また、本発明の核酸送達用キャリアー組成物において、(A)成分と(B)成分の配合比率については、特に制限されないが、核酸を細胞内により効率的に送達するという観点からは、(A)成分100重量部に対して、(B)成分が10~200重量部、好ましくは30

～150重量部、更に好ましくは75～125重量部が例示される。また、本発明の核酸送達用キャリアーの総量に対する(A)成分と(B)成分の合計量としては、例えば10～100重量%、好ましくは20～80重量%、更に好ましくは40～70重量%が挙げられる。

[0021] 本発明の核酸送達用キャリアー組成物は、上記(A)及び(B)成分に加えて、更に油性基剤(以下、(C)成分ということもある)を含んでいても良い。油性基剤を配合して、その特性を利用することによって、核酸送達用キャリアー組成物による核酸の導入効率の制御が可能になる。例えば、油性基剤を配合して核酸送達用キャリアー組成物の比重を調整することにより、細胞と核酸送達用キャリアー組成物の接触性を制御し、*in vitro*での導入効率を改善することが可能になる。また、例えば、油性基剤として温度感受性機能を有するものを配合することによって、所定の温度条件下で核酸キャリアーのコアを崩壊させて細胞表面での揺らぎを誘引し、核酸の導入効率を向上させることが可能になる。更に、例えば、油性基剤として外部刺激崩壊性を有するものを配合することによって、外部刺激により核酸キャリアー組成物のコアを崩壊させて細胞表面での揺らぎを誘引し、核酸の導入効率を向上させることが可能になる。

[0022] 本発明の核酸送達用キャリアー組成物に配合される油性基材としては、例えば、パーフルオロカーボン、パーフルオロペンタン、パーフルオロオクチルブロマイド、パーフルオロヘキサン、パーフルオロトリブチルアミン、大豆油、精製大豆油、ダイズ硬化油、大豆油不けん化物、スクアレン、ひまし油、チョウジ油、トリオレイン酸ソルビタン、テレピン油、サフラワー油、サフラワー油脂肪酸、オレイン酸、ヤシ油、ナタネ油、フェーゼル油、オリーブ油、アマニ油、ゴマ油、クロロフィル油、ハズ油、ベルガモット油、シーダー油、オレンジ油、ウイキョウ油、ユーカリ油、トウモロコシ油、ラベンダー油、マヨナラ油、レモン油、綿実油、やし油、卵黄油、ローズ油、パインオイル、アルモンド油、ラッカセイ油、ツバキ油、樟脳白油、カミツレ油、ケイヒ油、ハッカ油、エステル化トウモロコシ油、ショウキョウ油、ローマカミツレ油、蛇油、スペアミント油、ヒマワリ油、カカオ脂、小麦胚芽油、チンク油、硬化油、水素添加植物油、軽質流動パラフィン、流動パラフィン、中鎖脂肪酸トリグリセライド、ミンク油、トウヒ油、ポリオキシエチレンヒマシ油、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油10、ポリオキシエ

チレン硬化ヒマシ油100、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油20、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油40、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油5、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油50、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、ポリオキシル35ヒマシ油、プロセス油等が挙げられる。これらの油性基剤の内、パーフルオロペンタンには温度感受性があり、29.5°Cで沸騰によりガス化する特性がある。また、パーフルオロヘキサン、パーフルオロオクチルブロマイド、及びパーフルオロトリブチルアミンには、外部刺激崩壊性があり、超音波照射による刺激等の外部からの刺激により、キャリアー組成物のコアにキャビテーションを発生させて崩壊させるという特性がある。

[0023] 当該油性基剤を含有する場合、該油性基剤の割合としては、本発明の効果を妨げない限り特に制限されないが、上記(A)成分及び(B)成分の総量100重量部に対して、該油性基材が0.1~50重量部、好ましくは1~30重量部、更に好ましくは5~20重量部となる割合が例示される。

[0024] 更に、本発明の核酸送達用キャリアー組成物には、必要に応じて膜融合性脂質(ヘルパー脂質)を含んでいてもよい。かかる膜融合性脂質を含有することにより、細胞内への核酸の送達効率を一層向上させることが可能になる。このような膜融合性脂質としては、例えば、ジオレオイルフォスファチジルエタノールアミン、ジオレオイルフォスファチジルコリン、トランスフォスファチジルフォスファチジルエタノールアミン、1,2-ビス(10,12-トリコサジノイル)-フォスフォエタノールアミン、1,2-ジエライドイルフォスフォエタノールアミン、1,2-ジヘキサデシルフォスフォエタノールアミン、1,2-ジヘキサノイルフォスフォエタノールアミン、1,2-ジラウロイルフォスフォエタノールアミン、1,2-ジリノレオイルフォスフォエタノールアミン、1,2-ジミリストイルフォスフォエタノールアミン、1,2-ジオレオイルフォスフォエタノールアミン、1,2-ジパルミトレオイルフォスフォエタノールアミン、1,2-ジパルミトイルフォスフォエタノールアミン、1,2-ジフィタノイルフォスフォエタノールアミン、1,2-ジステアロイルフォスフォエタノールアミン、1-パルミトイル-2-オレオイルフォスフォエタノールアミン、1-パルミトイル-2-(10,12-トリコサジノイル)フォスフォエタノールアミン、1,2-ジオレオイルフォスフォエタノールアミン-N-カプロイルアミン、1,2-ジパルミトイルフォスフォエタノールアミン-N-カプロイルアミン、1,2-ジオレオイルフォスフォエタノールアミン-N,N-ジメチル、1,2-ジパルミトイルフォス

フォエタノールアミン-N,N-ジメチル、1,2-ジパルミトイルフォスフォエタノールアミン-N-ドデカノイル、1,2-ジオレオイルフォスフォエタノールアミン-N-ドデカノイル、1,2-ジオレオイルフォスフォエタノールアミン-N-ドデカニルアミン、1,2-ジパルミトイルフォスフォエタノールアミン-N-ドデカニルアミン、1,2-ジオレオイルフォスフォエタノールアミン-N-グルタリル、1,2-ジパルミトイルフォスフォエタノールアミン-N-グルタリル、1,2-ジオレオイルフォスフォエタノールアミン-N-ラクトース、1,2-ジオレオイルフォスフォエタノールアミン-N-[4(p-マレイミドメチル)サイクロヘキサン-カルボン酸塩、ジパルミトリルフォスフォエタノールアミン-N-[4(p-マレイミドメチル)サイクロヘキサン-カルボン酸塩、1,2-ジパルミトイルフォスフォエタノールアミン-N-[4(p-マレイミドフェニル)ブチラミド、1,2-ジオレオイルフォスフォエタノールアミン-N-[4(p-マレイミドフェニル)酪酸塩]、1,2-ジオレオイルフォスフォエタノールアミン-N-メチル、ジパルミトイルフォスフォエタノールアミン-N-メチル、1,2-ジオレオイルフォスフォエタノールアミン-N-[3-(2-ピリジジルジチオ)プロピオン酸塩、1,2-ジパルミトイルフォスフォエタノールアミン-N-[3-(2-ピリジジルジチオ)プロピオン酸塩、1,2-ジオレオイルフォスフォエタノールアミン-N-(サクシニル)、1,2-ジパルミトイルフォスフォエタノールアミン-N-(サクシニル)等が挙げられる。中でも、ジオレオイルフォスファチジルエタノールアミンは、本発明の核酸送達用キャリアー組成物において好適に使用される。

[0025] 当該膜融合性脂質を含有する場合、該膜融合性脂質の割合としては、本発明の効果を妨げない限り特に制限されないが、上記(A)成分及び(B)成分の総量100重量部に対して、該膜融合性脂質が1~500重量部、好ましくは10~250重量部、更に好ましくは25~100重量部となる割合が例示される。

[0026] 本発明の核酸送達用キャリアー組成物は、使用形態に応じて、等張化剤、賦形剤、希釈剤、増粘剤、安定化剤、緩衝剤、保存剤等の種々の添加剤を含有することができる。これらの添加剤の配合量は、核酸送達用キャリアーの使用形態に応じて適宜設定することができる。

[0027] 本発明の核酸送達用キャリアー組成物は、上記(A)成分、(B)成分、及び必要に応じて他成分を混合することによって製造される。

[0028] 核酸送達用組成物

本発明の核酸送達用組成物は、上記の核酸送達用キャリアー組成物と核酸を含有するものであり、該核酸送達用組成物中で、核酸は核酸送達用キャリアー組成物の配合成分とイオン結合若しくは疎水結合により複合体を形成しており、核酸の細胞内への送達率が向上している。

[0029] 本発明の核酸送達用組成物は、上記の核酸送達用キャリアー組成物と核酸とを混合する、又は、核酸及び上記の核酸送達用キャリアー組成物の配合成分を任意の順で混合することによって製造される。

[0030] 本発明の核酸送達用組成物において、核酸と核酸送達用キャリアー組成物との配合比率としては、使用する核酸や核酸送達用キャリアーの種類や核酸の送達対象となる細胞の種類等によって異なるが、例えば、核酸送達用キャリアー組成物に含まれる(A)及び(B)成分の総量100重量部に対して、核酸が0.1～300重量部、好ましくは1～100重量部、更に好ましくは2.5～50重量部となる割合が挙げられる。

[0031] また、核酸送達用組成物に含まれる(A)及び(B)成分の合計量としては、該組成物の総量に対して、例えば10～90重量%、好ましくは30～80重量%、更に好ましくは50～70重量%が挙げられる。

[0032] 本発明の核酸送達用組成物は、使用形態に応じて、等張化剤、賦形剤、希釈剤、増粘剤、安定化剤、緩衝剤、保存剤等の種々の添加剤を含有することができる。これらの添加剤の配合量は、核酸送達用組成物の使用形態に応じて適宜設定することができる。

[0033] 本発明において、核酸が送達される細胞としては、培養細胞、生体から抽出した細胞（株化した細胞を含む）、生体内に存在する細胞等が挙げられる。

[0034] 本発明の核酸送達用組成物の使用態様としては、当該核酸送達用組成物が核酸導入対象となる細胞に接触するように適用される限り特に制限されない。例えば、生体内の細胞に核酸を送達する場合であれば、例えば、組織への直接注入；静脈、皮下、筋肉、腹腔、眼内、消化器官内、歯内等への注射；鼻腔、口腔、肺等への吸入投与；経口投与；皮膚を介した経皮投与；及び口腔粘膜、膈粘膜、眼粘膜、直腸粘膜、子宮粘膜を介した経粘膜投与等が例示される。また、培養細胞や生体から抽出した細胞に核酸を送達する場合であれば、培養時にあらかじめ核酸送達用組成物を

存在させた状態で細胞を培養する方法が例示される。なお、培養細胞や生体から抽出した細胞に核酸を送達する場合、血清の存在下でも核酸の細胞内への送達が可能である。

実施例

[0035] 以下、実施例等に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらによって限定されるものではない。

[0036] 実施例1

下記組成の核酸送達用キャリアー組成物を調製した。

[0037]	ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロマイド塩	0.9 μ g
	3 β -[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	0.9 μ g
	ジオレオイルフォスファチジルエタノールアミン	0.9 μ g
	グリセロール	40.5 μ g
	精製水	2 μ l
	<u>OPTI-MEM培地 (Invitrogen社製)</u>	<u>適量</u>
	総量	50 μ l

[0038] 実施例2

まず、下記組成の核酸含有液を調製した。

[0039]	siRNA	2 pmol
	<u>OPTI-MEM培地 (Invitrogen社製)</u>	<u>適量</u>
	総量	50 μ l

次いで、上記で得られた核酸送達用キャリアー組成物50 μ lと核酸含有液50 μ lを混合し、20分間室温でインキュベートすることにより、siRNA送達用組成物を調製した。

実施例3

下記組成の核酸送達用キャリアー組成物を調製した。

[0040]	ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロマイド塩	0.5 mg
	3 β -[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	0.5 mg
	ジオレオイルフォスファチジルエタノールアミン	0.5 mg

スクロース	88.9 mg
精製水	適量
総量	1.0 ml

[0041] 実施例4

下記組成の核酸送達用キャリアー組成物を調製した。

[0042] ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロマイド塩	0.5 mg
3β-[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	0.5 mg
ジオレオイルフォスファチジルエタノールアミン	0.5 mg
精製水	適量
総量	1.0 ml

[0043] 試験例1

実施例2のsiRNA送達用組成物の細胞内へのsiRNAの送達性を評価するために、A549細胞（ヒト肺癌由来の細胞株；大日本製薬社製）をモデル細胞として以下の試験を行った。なお、本試験において、siRNAは、蛍光標識したGL3-siRNA（ホタルルシフェラーゼに対するsiRNA；Dharmacon社, Boulder, CO, USA；sense:5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT、antisense:5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT）を用いた。

[0044] まず、DMEM培地(Dulbecco-Minimum Essential Medium)を用いて 1.2×10^5 個/mlの濃度に調整したA549細胞を、24-ウェルプレートに1ウェル当たり 6.0×10^4 個の細胞が入るように細胞をシードした。次いで、表1に示す被験試料500 μlを各ウェルに添加し、37°C、5%CO₂条件下で24時間インキュベートした。その後、細胞の核酸由来の蛍光像を、蛍光顕微鏡（Olympus IX 71 fluorescence microscope；Olympus, Tokyo, Japan）を用いて観察し、細胞内へのsiRNAの送達性を評価した。

[0045] [表1]

被験試料		組成
No	図 1 中の表示	
1	核酸送達用キャリア 一組成物 + siRNA	実施例 2 の核酸送達用組成物
2	LFA2000 + siRNA	LFA2000 (Lipofectamine2000 ; Invitrogen 社製) (1.0 mg/mL)、 及び siRNA (20pmol/ml) を含有する OPTI-MEM 培地
3	NeoPhectin + siRNA	NeoPhectin (NeoPharm 社製) (1.0 mg/mL)、siRNA (20pmol/ml) を含有する OPTI-MEM 培地
4	siRNA	siRNA (20 pmol/ml) を含有する OPTI-MEM 培地

[0046] 得られた結果を図1に示す。単に、siRNAのみを添加した場合には、細胞内に蛍光が観察されなかった。一方、実施例2の核酸送達用組成物を使用した場合、又は公知の細胞送達用キャリアー (LFA2000やNeoPhectin)と共にsiRNAを添加した場合には、細胞内で蛍光が観察された。特に、実施例2の核酸送達用組成物を用いた場合には強い蛍光が細胞内で観察された。このことから、本発明の核酸送達用組成物は、優れた核酸送達能を有していることが確認された。

[0047] 試験例2

標的遺伝子のタンパク質レベルでの抑制を評価するために、ルシフェラーゼ遺伝子をコードするプラスミドを細胞に一過的に導入し、その後上記実施例2の核酸送達用組成物を添加し、ルシフェラーゼの発現量を評価した。なお、本試験において、siRNAは、GL3-siRNA (ホタルルシフェラーゼに対するsiRNA; Dharmacon社, Boulder, CO, USA; sense: 5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT、antisense: 5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT)を用いた。

[0048] 具体的には、10 mgのpGL3ルシフェラーゼ及びレニラルシフェラーゼ (Promega, Madison, WI, USA) を 5×10^6 個のA549細胞 (ヒト肺癌由来の細胞株; 大日本製薬社製) に添加し、ヌクレオフェクター (Amaxa Inc., Gaithersburg, MD, USA) を用いてエレクトロポレーションを行った。pGL3ルシフェラーゼ及びレニラルシフェラーゼを導入した細胞を、10容量%の牛胎児血清含有又は無血清のDMEM培地 (Dulbecco-Minimum Essential Medium)を用いて、 1.2×10^5 個/mlとなるように調整した後、24-ウェルプレートに1ウェル当たり 6.0×10^4 個の細胞が入るようにシードした。次いで、表2に示す

被験試料500 μ lを各ウェルに添加し、37°C、5%CO₂条件下で24時間インキュベートした。その後、定法に従ってウェル中の細胞を溶解させて細胞溶解液を得て、該細胞溶解液のルシフェラーゼの活性をDual-LuciferaseReporter Assay System (Promega, Madison, WI, USA)を用いて評価を行った。ルシフェラーゼの活性は、レニラルシフェラーゼに対するホタルルシフェラーゼの活性の比率（相対活性：%）を算出することにより行った。

[0049] [表2]

被験試料		組成
No	図2中の表示	
1	核酸送達用キャリアー組成物 + siRNA	実施例2の核酸送達用組成物
2	LFA2000 + siRNA	LFA2000 (Lipofectamine2000; Invitrogen社製) (1.0 mg/mL)、及び siRNA (20 pmol/ml) を含有する OPTI-MEM 培地
3	NeoPhectin + siRNA	NeoPhectin (NeoPharm社製) (1.0 mg/mL)、及び siRNA (20 pmol/ml) を含有する OPTI-MEM 培地
4	siRNA	siRNA (20 pmol/ml) を含有する OPTI-MEM 培地
5	LFA2000	LFA2000 (Lipofectamine2000; Invitrogen社製) (1.0 mg/mL) を含有する OPTI-MEM 培地
6	NeoPhectin	NeoPhectin (NeoPharm社製) (1.0 mg/mL) を含有する OPTI-MEM 培地
7	核酸送達用キャリアー組成物	実施例1で得られた核酸送達用キャリアー (50 容量%) を含有する OPTI-MEM 培地
8	Control	OPTI-MEM 培地

[0050] 得られた結果を図2に示す。この結果から、実施例2の核酸送達用組成物を使用することによって、培地中の血清の有無に関わらず、高効率で細胞内へのsiRNAの送達、及び細胞内での該siRNAの機能発現が可能になることが確認された。

[0051] 試験例3

本試験では、siRNAとして、Rat Neprilysin (Rat Neprilysin (NM_012608)に対するsiRNA; RNA-TEC NV社, Belgium; Sense: 5'-GCUCCAAAGCCGAAGAAGAdTdT、Antisense: 5'-UCUUCUUCGGCUUUGGAGCdTdT)を用いて、実施例3の核酸送達用キャリアー組成物の肺組織細胞内におけるsiRNAの機能性及び送達性について評価を行った。

[0052] 実施例3の核酸送達用キャリアー組成物とsiRNAを1:1の重量比で混合することにより、核酸送達用組成物を調製した。次いで、当該核酸送達用組成物を適当な担体（8.89w/v%のスクロース水溶液）に希釈した試験液0.4 mLを、体重250-320 gの雄性SDラット（SLC, Tokyo, Japan）に、IA-1B inhalation デバイス（PENNCENTURY, Philadelphia, PA, USA）を用いて吸入麻酔剤イソフルラン（大日本製薬株式会社製）による麻酔下にて経肺投与した。なお、上記試験液は、siRNAの投与量が0.04~0.12 mg/kg（ラット）となるように、核酸送達用組成物を適宜希釈して調製した。経肺投与24時間後に、エーテル麻酔シラットを背位に固定した。正中腺に沿ってラットを開腹し、腹部下大静脈より放血死させた。次いで、ラットから肺を摘出し、氷冷した生理食塩水で洗浄した。摘出した肺を用いて、モデル標的遺伝子NEP (neutral endopeptidase) のmRNA発現量及びハウスキーピング遺伝子であるGAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) のmRNA発現量を測定した。更に、摘出した肺におけるRat neprilysin (NEP)活性を測定した。これらの具体的測定方法及び結果は、以下の通りである。なお、コントロールとして、担体のみを同条件で投与した場合についても、同様に試験を行った。また、比較のために、Rat Neprilysinの代わりに、EGFP (enhanced green fluorescent protein) に対するsiRNA (Takara, Japan; Sense: 5'-GAACGGCAUCAAGGUGAACTT, Antisense: 5'-GUUCACCUUGAUGCCGUUCTT)を用いて同様に試験を行った。

[0053] <NEP mRNA 及びGAPDH mRNAの定量方法及び結果>

摘出した肺の一部から総RNAの単離・精製を、RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Germany)を用いて行った。mRNAからcDNAへの合成は、SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, California, USA)を用いて行った。調製したcDNAを用いて、リアルタイムPCR法によりモデル標的遺伝子NEP (neutral endopeptidase) のmRNA量を定量した。また、ハウスキーピング遺伝子であるGAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) mRNA量についても同様に測定を行った。Neprilysin mRNA発現抑制の評価は、GAPDH mRNAに対するNEP mRNAの比率を算出し、比較することにより行った。

[0054] この結果から、0.08 mg/kgの投与量のNeprilysin-siRNAによっても、肺におけるNep

rilysin mRNA発現は有意に抑制されていることが確認された。この用量はin vivo RNAi効果として従来報告されている用量に比べて低用量であることから、実施例3で得られた核酸送達用キャリアー組成物を使用することにより、効率的にsiRNAを肺組織の細胞内に送達できることが明らかになった。

[0055] <Rat neprilysin (NEP)活性の測定方法及び結果>

摘出した肺の一部をホモジネートし、ホモジネート中におけるRat neprilysinの活性を測定した。Rat neprilysin (NEP)活性の測定は、NEPに特異的な阻害剤であるphosphoramidon (SIGMA)の存在もしくは非存在下にて、NEPの基質であるDAGNPG (N-Dansyl-D-Ala-Gly-p-nitro-Phe-Gly; SIGMA)が一定時間にどれだけ加水分解されるかを測定し、阻害剤存在時と非存在時での分解物生成量の差からNEP活性を算出した。このとき用いるラット肺ホモジネート量は50mL、基質DAGPNGの濃度は1 mM、阻害剤存在の場合は10 mM phosphoramidonを加え、全量100 mLで反応を行った。反応は37°Cで10分間として、90°Cで10分間インキュベートすることにより反応を停止させ、このとき生じている分解物DAG (Dansyl-D-Ala-Gly)の量を測定してNEP活性を算出した。なお、分解物DAGの生成量は、この分解物の蛍光を測定することにより求め、蛍光の測定は、360 nmで励起させ535 nmの発光で測定した。

[0056] 得られた結果を図3に示す。この結果から、0.4 mg/kgの投与量のNF-siRNAによっても、肺におけるNEP活性は有意に抑制されていることが分かった。従って、この結果からも、実施例3で得られた核酸送達用キャリアー組成物を使用することにより、効率的にsiRNAを肺組織の細胞内に送達できることが確認された。

[0057] 試験例4

実施例1で得られた核酸送達用キャリアー組成物の細胞毒性について、Premix WST-1 cell proliferation assay system (Takara, Siga, Japan)を用いて評価を行った。具体的には、A549細胞(ヒト肺癌由来の細胞株;大日本製薬社製)を、DMEM培地 (Dulbecco-Minimum Essential Medium)を用いて96-ウェルプレートに、 (1×10^5) 個/mlの濃度に調整し、各ウェル当たりの細胞数が 10^4 個になるようシードした。次いで被験試料[実施例1の核酸送達キャリアー、LFA2000 (Lipofectamine2000; Invitrogen社製)、及びNeoPhectin (NeoPharm社製)]を各ウェルに2~20 μ g/mlの濃度となるように

添加した。その後、Premix WST-1溶液10 μ lを各ウェルに添加して、1時間、37°Cでインキュベートした後、各ウェルの450nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダー (Tecan, Maennedorf, Switzerland)を用いて測定した。また、コントロールとして、被験試料の代わりに、培地を添加したウェルについても同様に測定を行った。A450の吸光度は、WST-1が還元酵素により形成されるホルマゼン色素由来の吸光度を意味する。該吸光度と生細胞には直線的な関係があるため、播種した生細胞数と吸光度の検量線を作成した。得られた検量線をもとに被験試料の細胞数を求めた。

[0058] 得られた結果を図4に示す。この結果から、実施例1の核酸送達用キャリアー組成物を添加しても、細胞数が殆ど低減していないことが確認され、該核酸送達用キャリアー組成物は毒性が低く、高い安全性を備えていることが確認された。

[0059] 試験例5

体重250-320 gの雄性SDラット (SLC, Tokyo, Japan)に、PennCentury社の1A-ICデバイスを用いて、実施例4の核酸送達用キャリアー組成物500 μ gを精製水を用いて0.4 mLに希釈することにより調製した試験液をラットに経肺投与した。投与後のラットは、ケージに戻して通常の飼育条件に従って飼育した。経肺投与24時間後に、ペントバルビタール(ネンブタール, 大日本製薬株式会社) 50 mg/kg(1 mL/kg)をラットの腹腔内に投与し麻酔をかけ、ラットを背位に固定した。正中腺に沿ってラットを開腹し、腹部下大静脈より放血死させた。次いで、ラットから肺を摘出し、氷冷した生理食塩水で洗浄した。摘出した肺の組織切片を作成し、これをヘマトキシリン-エオシンを用いて染色して顕微鏡観察することにより、核酸送達用キャリアー組成物が肺組織に及ぼす毒性について評価を行った。また、比較のために、実施例4の核酸送達用キャリアー組成物の代わりに、LFA2000(Lipofectamine2000; Invitrogen社製)、又はNeoPhectin (NeoPharm社製)を使用して上記と同条件の試験を行った。但し、LFA2000を500 μ g投与するとラットは致死したため、LFA2000の投与量は250 μ gに変更して試験を行った。

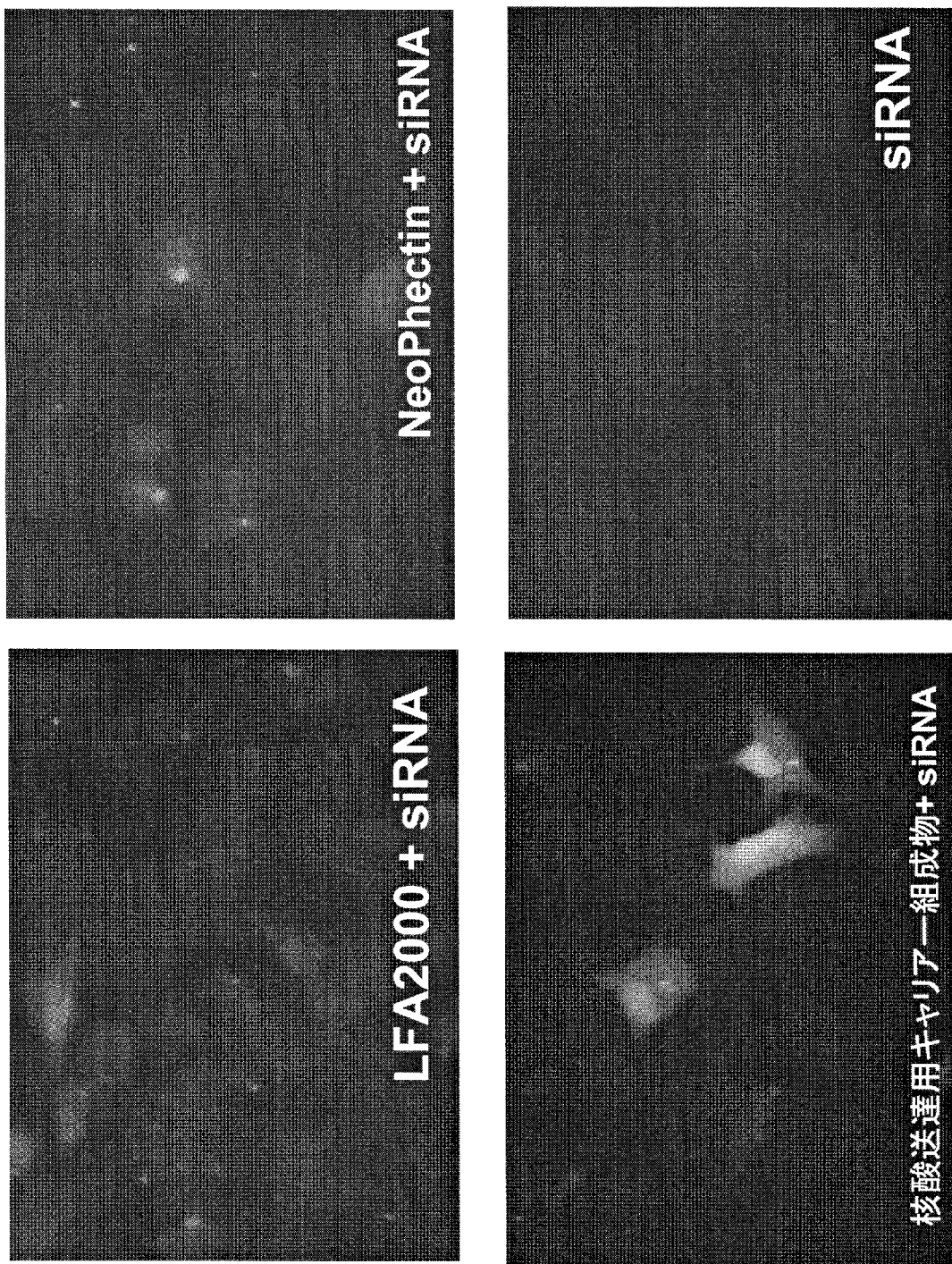
[0060] 得られた結果を図5に示す。LFA2000又はNeoPhectinを肺局所に投与すると炎症が惹起され、一部に浮腫が観察されたのに対して、実施例4の核酸送達用キャリアー組成物を投与した場合には、この炎症症状が低減されていることが確認された。この

結果から、実施例4の核酸送達用キャリアー組成物は肺局所投与後においても低毒性であり、安全性が高いことが確認された。

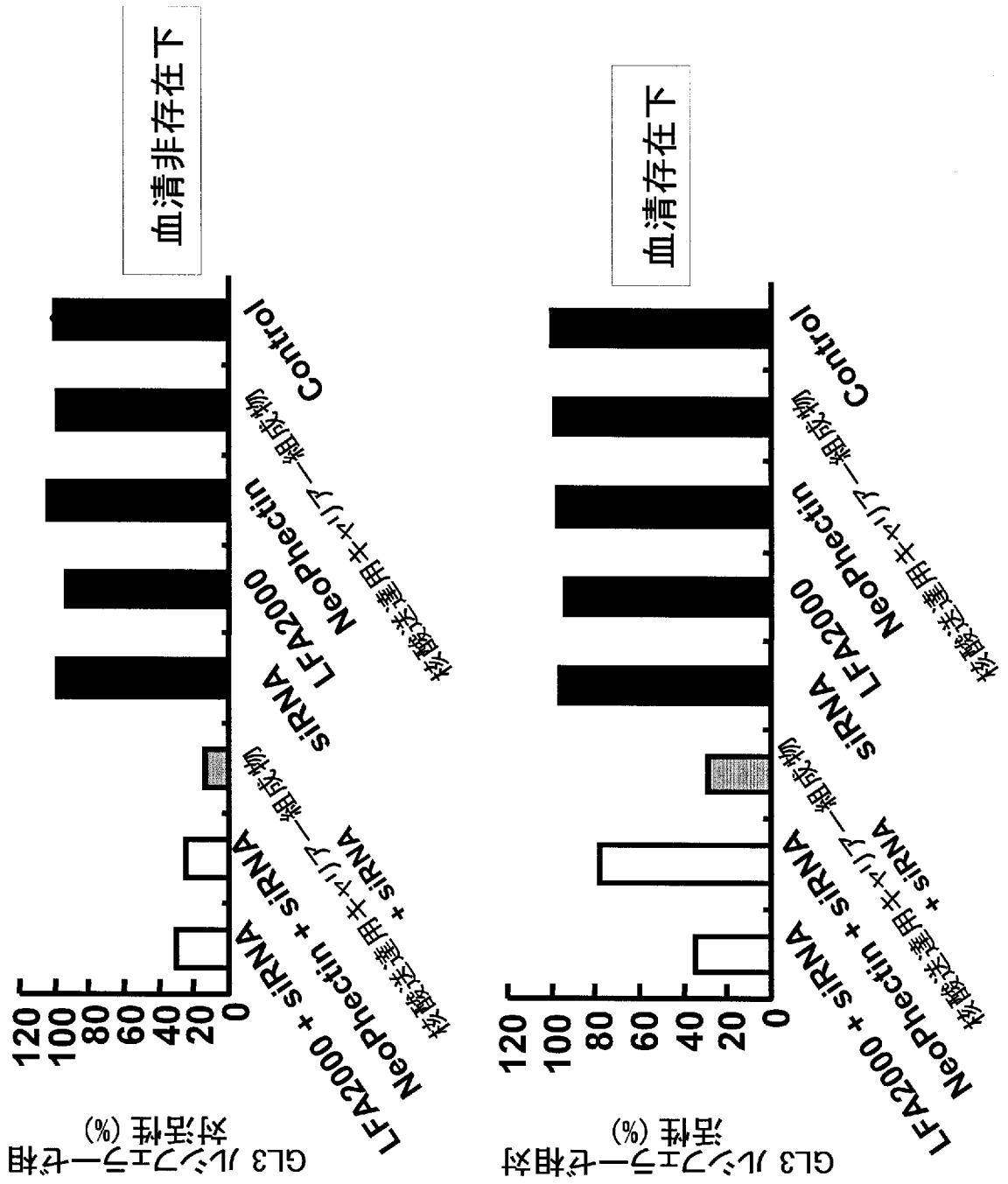
請求の範囲

- [1] (A)ステロイド核を有するカチオン性脂質、及び(B)第4級アンモニウム塩型のカチオン性脂質を含有することを特徴とする、核酸送達用キャリアー組成物。
- [2] 更に(C)油性基材を含有する、請求項1に記載の核酸送達用キャリアー組成物。
- [3] (A)成分が、 3β -[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、及び/又は 3β -[N',N',N'-トリメチルアミノエタン]ヨウ化コレステロールである、請求項1に記載の核酸送達用キャリアー組成物。
- [4] (B)成分が、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロマイド塩、ジオレオイルトリメチルアンモニウムプロパン、及びN-(1-(2,3-ビス(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塩酸塩よりなる群から選択される少なくとも1種である、請求項1に記載の核酸送達用キャリアー組成物。
- [5] (A)成分100重量部に対して、(B)成分が10~200重量部の割合で含まれる、請求項1に記載の核酸送達用キャリアー組成物。
- [6] siRNA送達用キャリアーである、請求項1に記載の核酸送達用キャリアー組成物。
- [7] 核酸、及び請求項1乃至5のいずれかに記載の核酸送達用キャリアー組成物を含有する、核酸送達用組成物。
- [8] 核酸がsiRNAである、請求項7に記載の核酸送達用組成物。
- [9] 請求項7に記載の核酸送達用組成物を細胞に接触させることにより、核酸を細胞内に導入させることを特徴とする、核酸導入方法。
- [10] (A)ステロイド核を有するカチオン性脂質、及び(B)第4級アンモニウム塩型のカチオン性脂質の、核酸送達用キャリアー組成物の製造のための使用。

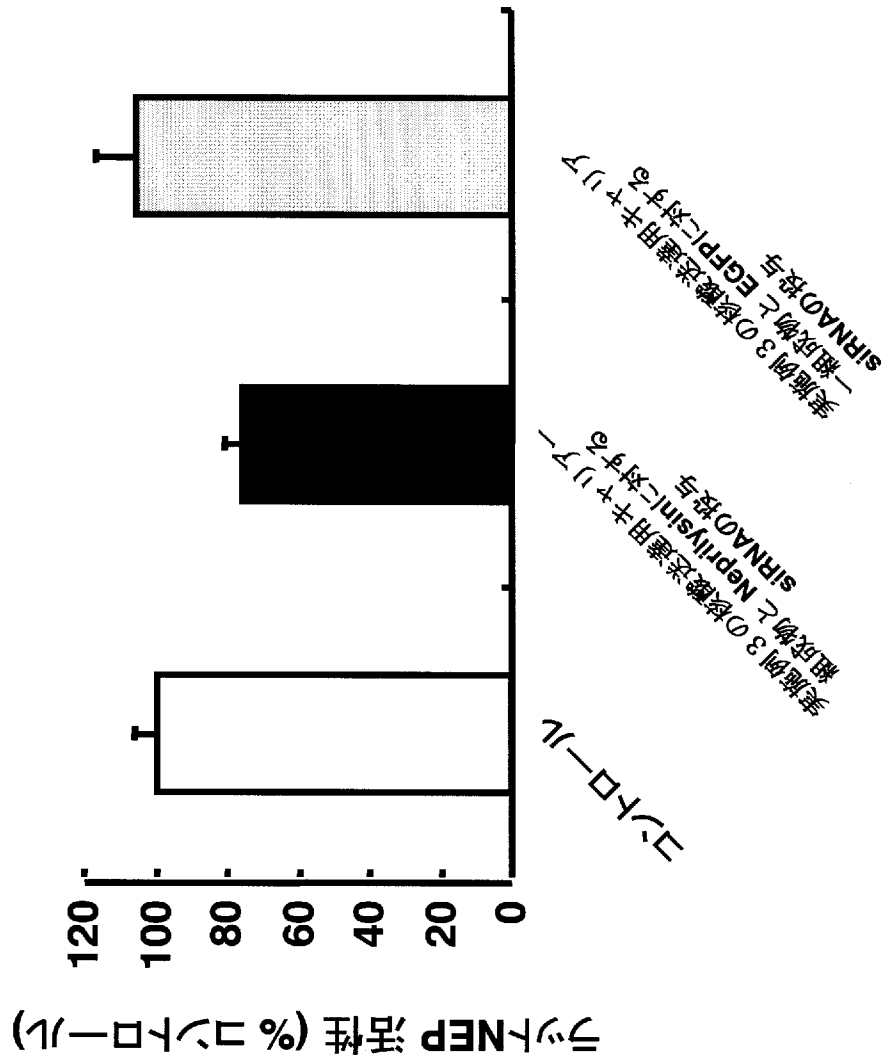
[図1]



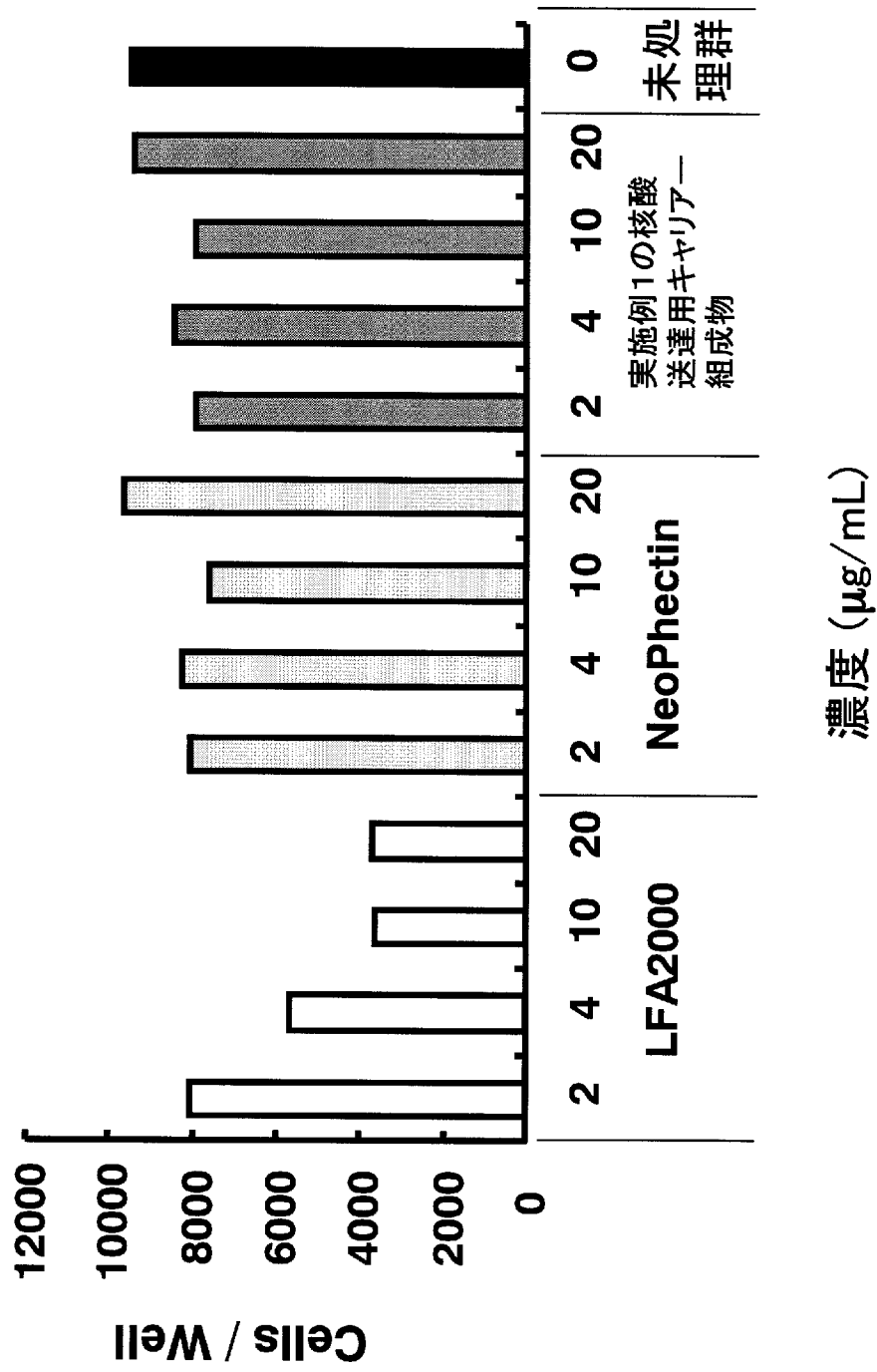
[図2]



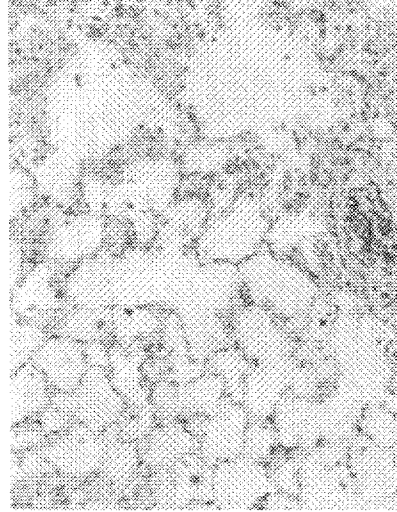
[図3]



[図4]

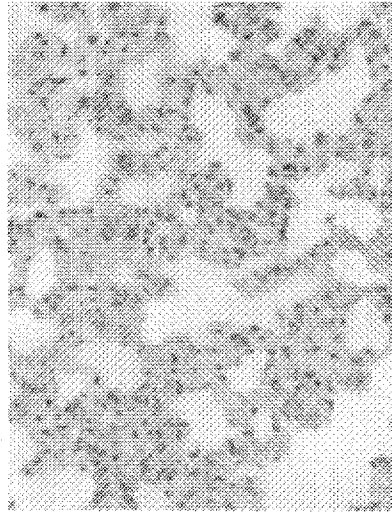


[図5]



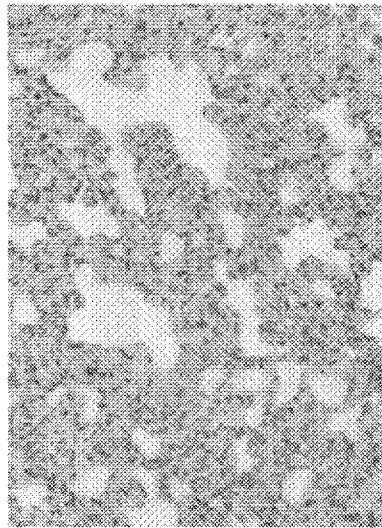
実施例4の核酸送達用キヤ
リア一組成物

投与量: 500 $\mu\text{g}/\text{rat}$



NeoPhectin

投与量: 500 $\mu\text{g}/\text{rat}$



Lipofectamine 2000

投与量: 250 $\mu\text{g}/\text{rat}$

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/320617

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/7105(2006.01)i, A61K47/18(2006.01)i, A61K47/28(2006.01)i,
A61K47/44(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)n

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)

A61K31/7105, A61K47/18, A61K47/28, A61K47/44, A61K48/00

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2007
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2007	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2007

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

Caplus (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2004/033620 A2 (INSERT THERAPEUTICS INC.), 22 April, 2004 (22.04.04), All references; particularly, page 17, line 20 to page 19, line 2 & JP 2005-527639 A & US 2003/0157030 A1 & US 2004/0063654 A1 & EP 1575976 A & CA 2465860 A & IL 161733 D & CN 1771255 A	1-8, 10
A	WO 2004/004758 A1 (LIPOXEN TECHNOLOGIES LTD.), 15 January, 2004 (15.01.04), All references; particularly, page 32 & JP 2005-535653 A & US 2005/0220858 A1 & EP 1519745 A & CN 1665529 A	1-8, 10

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 17 January, 2007 (17.01.07)	Date of mailing of the international search report 30 January, 2007 (30.01.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/320617

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99/031132 A1 (THE UNIVERSITY OF QUEENSLAND), 24 June, 1999 (24.06.99), All references & JP 2002-508394 A & US 6607729 B2 & US 6495345 B1 & US 6197312 B1 & US 2005/058660 A1 & US 2002/102276 A1 & EP 1045859 A1 & NZ 505374 A & NO 200002990 A & KR 2001033074 A & IN 200000101 P2 & HU 200100094 A2 & CZ 200002172 A3 & CN 1284965 A & BR 9814276 A & AU 747742 B & AU 9916495 A	1-8,10
A	WO 00/027795 A1 (LIFE TECHNOLOGIES INC.), 18 May, 2000 (18.05.00), All references & JP 2002-529439 A & US 2005/124069 A1 & US 2005/164972 A1 & US 2005/164391 A1 & US 2005/164971 A1 & US 2005/260597 A1 & EP 1129064 A1 & AU 200014776 A & NZ 512244 A & AU 772847 B2	1-8,10
A	TSENG, W-C. et.al., Liposome-based gene therapy. Pharmaceutical Science & Technology Today, 1998, Vol.1, No.5, p.206-213, all references	1-8,10
A	FARHOOD, H. et.al., The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. Biochim Biophys Acta. 1995 May 4, 1235(2), 289-295. all references	1-8,10
T	ESPOSITO, C. et.al., The analysis of serum effects on structure, size and toxicity of DDAB-DOPE and DC-Chol-DOPE lipoplexes contributes to explain their different t ransfection efficiency. Colloids Surf B Biointerfaces. 2006 Dec 1, 53(2), 187-192. all references	1-8,10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/320617

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 9

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

It pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of the PCT Rule 39.1(iv), to search.

2. Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
the

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. A61K31/7105(2006.01)i, A61K47/18(2006.01)i, A61K47/28(2006.01)i, A61K47/44(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)n

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. A61K31/7105, A61K47/18, A61K47/28, A61K47/44, A61K48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの
 日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2007年
 日本国実用新案登録公報 1996-2007年
 日本国登録実用新案公報 1994-2007年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 CAplus(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 2004/033620 A2 (INSERT THERAPEUTICS INC) 2004.04.22, 全文 献、特に17頁20行~19頁2行などを参照。 & JP 2005-527639 A & US 2003/0157030 A1 & US 2004/0063654 A1 & EP 1575976 A & CA 2465860 A & IL 161733 D & CN 1771255 A	1-8, 10
A	WO 2004/004758 A1 (LIPOXEN TECHNOLOGIES LTD) 2004.01.15, 全文 献、特に32頁などを参照。 & JP 2005-535653 A & US 2005/0220858 A1 & EP 1519745 A & CN 1665529 A	1-8, 10

C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日 17.01.2007	国際調査報告の発送日 30.01.2007
--------------------------	--------------------------

国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 齋藤 恵 電話番号 03-3581-1101 内線 3492	4P	9164
---	---	----	------

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 99/031132 A1 (THE UNIVERSITY OF QUEENSLAND) 1999.06.24, 全 文献を参照。 & JP 2002-508394 A & US 6607729 B2 & US 6495345 B1 & US 6197312 B1 & US 2005/058660 A1 & US 2002/102276 A1 & EP 1045859 A1 & NZ 505374 A & NO 200002990 A & KR 2001033074 A & IN 200000101 P2 & HU 200100094 A2 & CZ 200002172 A3 & CN 1284965 A & BR 9814276 A & AU 747742 B & AU 9916495 A	1-8, 10
A	WO 00/027795 A1 (LIFE TECHNOLOGIES INC) 2000.05.18, 全文献を 参照。 & JP 2002-529439 A & US 2005/124069 A1 & US 2005/164972 A1 & US 2005/164391 A1 & US 2005/164971 A1 & US 2005/260597 A1 & EP 1129064 A1 & AU 200014776 A & NZ 512244 A & AU 772847 B2	1-8, 10
A	TSENG, W-C. et.al., Liposome-based gene therapy. Pharmaceutical Science & Technology Today, 1998, Vol.1, No.5, p.206-213, 全 文献を参照。	1-8, 10
A	FARHOOD, H. et.al., The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. Biochim Biophys Acta. 1995 May 4, 1235(2), 289-295. 全文献を参照。	1-8, 10
T	ESPOSITO, C. et.al., The analysis of serum effects on structure, size and toxicity of DDAB-DOPE and DC-Chol-DOPE lipoplexes contributes to explain their different transfection efficiency. Colloids Surf B Biointerfaces. 2006 Dec 1, 53(2), 187-192. 全 文献を参照。	1-8, 10

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 9 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、治療による処置方法に関するものであって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。