

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：95138027

※申請日期：95.10.16

※IPC 分類：A61K31/7105 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

核酸遞送用載劑組成物

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

大塚製藥股份有限公司 / OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

代表人：(中文/英文)

樋口達夫 / HIGUCHI, TATSUO

住居所或營業所地址：(中文/英文)

日本國東京都千代田區神田司町2丁目9番地

9, KANDA-TSUKASAMACHI 2-CHOME, CHIYODA-KU, TOKYO-TO, JAPAN

國籍：(中文/英文)

日本 / JAPAN

三、發明人：(共 4 人)

姓名：(中文/英文)

1. 豐福秀一 / TOYOBUKU, HIDEKAZU

2. 宮尾英男 / MIYAO, HIDEO

3. 佐藤正子 / SATO, MASAKO

4. 關口和生 / SEKIGUCHI, KAZUO

國籍：(中文/英文)

1. 日本 / JAPAN

2. 日本 / JAPAN

3. 日本 / JAPAN

4. 日本 / JAPAN

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為：。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 日本、 2005/10/18、 2005-303497

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

發明領域

本發明是有關於欲將核酸投藥於動物來源細胞或生物
5 時，可保護核酸免於分解、並可有效率地使其遞送至細胞
內之低毒性且高安全性之核酸遞送用載劑組成物、及核酸
遞送用組成物。

【先前技術】

發明背景

10 藉著近年生物技術之發展，已掌握多種可在細胞內發
揮生理活性機能之核酸。例如，已知siRNA(small interfering
RNA)可引起細胞中所存在之標的基因mRNA的分解，阻礙
標的基因之展現(RNA interference, RNA干涉)。藉該RNA干
涉所導致之標的基因展現阻礙機能，在減輕甚至治療因特
15 定基因或基因群之異常展現所產生之疾病症狀上極為有
用，故期待siRNA可開發作為治療藥。然而，為了利用以
siRNA為首之核酸作為治療藥等，在標的細胞內發揮siRNA
之機能極為重要，為此必須確立有效率地使核酸遞送到標
的細胞內之技術。

20 已有多數病毒，包含反轉錄病毒、腺病毒及皰疹病毒
等，都已用於人類之難治性疾病治療，以作為將外來性核
酸分子或基因遞送到細胞內之技術。然而，因感染性、免
疫反應性、生產性等之問題，導致治療上伴隨著困難性。
因此，正致力於用以克服病毒來源之問題點、並將核酸分

子遞送細胞內之非病毒性載劑之開發。

目前為止，促進siRNA等核酸遞送至細胞內之非病毒性核酸遞送用載劑，例如專利文獻1中，提出了特定結構之陽離子性脂質。然而，專利文獻1中所提出之陽離子性脂質，其缺點為在投藥於培養細胞或活體時會展現出毒性。又，專利文獻2中，揭示了包含兩親媒性化合物及聚陽離子之組成物，作為相較毒性低、且可將siRNA遞送至細胞內之載劑組成物，然而，專利文獻2中報告之組成物，其問題在於將充分量之siRNA導入細胞內時，仍具有危及細胞之毒性。

10 在這種習知技術背景下，亟待開發出低毒性、且可有效率地使以siRNA為首之核酸遞送到細胞內之核酸遞送用載劑組成物。

【專利文獻1】特表2002-529439號公報

【專利文獻2】特表2005-508394號公報

15 【發明內容】

發明概要

於是，本發明目的在於解決上述習知技術之課題。具體而言，本發明目的係在於提供，將siRNA等核酸投藥到動物來源細胞或生物時，可保護核酸免於分解、並可有效率地使其遞送到細胞內之低毒性且高安全性之核酸遞送用載劑組成物、及含有該載劑組成物與核酸之核酸遞送用組成物。

本發明人等為了解決上述課題而專精研究，結果發現，組合(A)具有類固醇核之陽離子性脂質、及(B)第4級銨

鹽型之陽離子性脂質並含有該(A)、(B)成分之組成物，不僅毒性低，且可保護核酸免於分解並有效率地使其遞送至細胞內，可作為核酸遞送用載劑之用。本發明即是依據該等發現，藉由進一步反覆檢討而完成者。

5 亦即，本發明提供以下所揭示之態樣之發明：

1.一種核酸遞送用載劑組成物，包含有：

(A)具有類固醇核之陽離子性脂質、及(B)第4級銨鹽型之陽離子性脂質。

10 2.如第1項之核酸遞送用載劑組成物，更含有(C)油性基材。

3.如第1項之核酸遞送用載劑組成物，其中前述(A)成分為 3β -[N-(N',N'-二甲胺基乙烷)-羰醯基]膽固醇、及/或 3β -[N',N',N'-三甲胺基乙烷]碘化膽固醇。

15 4.如第1項之核酸遞送用載劑組成物，其中前述(B)成分為選自於由二甲基雙十八烷基銨溴化鹽、二油醯基三甲基銨丙烷、及N-(1-(2,3-雙(油醯氧基)丙基)-N,N,N-三甲基銨鹽酸鹽所構成之群之至少1種。

5.如第1項之核酸遞送用載劑組成物，其中相對於(A)成分100重量份，含有10~200重量份之比例之(B)成分。

20 6.如第1項之核酸遞送用載劑組成物，係一種siRNA遞送用載劑。

7.一種核酸遞送用組成物，含有核酸、及第1~5項中任一項之核酸遞送用載劑組成物。

8.如第7項之核酸遞送用組成物，其中前述核酸為

siRNA。

9.一種核酸導入方法，其特徵在於藉由使第7項之核酸遞送用組成物接觸細胞，使核酸導入細胞內。

10.一種(A)具有類固醇核之陽離子性脂質、及(B)第4級銨鹽型之陽離子性脂質之用途，係用以製造核酸遞送用載劑組成物。

第1圖是顯示在試驗例1中，使用各種被驗試劑處理細胞後，藉由螢光顯微鏡觀察細胞之核酸來源螢光像之結果。

第2圖是顯示在試驗例2中，使用各種被驗試劑處理細胞後，測定細胞之螢光素酶活性之結果圖。

第3圖是顯示在試驗例3中，測定大鼠的肺中neprilysin(NEP)活性之結果圖。

第4圖是顯示在試驗例4中，以各種被驗試劑處理後之活細胞數之測定結果圖。

第5圖是顯示在試驗例5中，以蘇木精-曙紅將大鼠之肺組織切片染色後之結果之圖。圖中，蘇木精將核、核糖體等染色為藍色，曙紅將細胞質、纖維、紅血球染色成紅色。

依據本發明之核酸遞送用載劑組成物及核酸遞送用組成物，可得到下述優異效果。

(1)將核酸有效率地遞送至細胞內，並使核酸機能在細胞內有效發揮。

(2)抑制核酸在活體內或培養液中之分解。

(3)毒性低、安全性高。

因此，上述核酸遞送用載劑組成物及核酸遞送用組成

物，可用於藉核酸導入所進行之各種疾病治療，尤其是可用於低分子化合物等治療困難之難治性疾病之治療上。

又，本發明之核酸遞送用組成物，可凍結乾燥處理，因此也有可在凍結乾燥狀態下保存之優點。

5 圖式簡單說明

第1圖是顯示在試驗例1中，使用各種被驗試劑處理細胞後，藉由螢光顯微鏡觀察細胞之核酸來源螢光像之結果。

第2圖是顯示在試驗例2中，使用各種被驗試劑處理細胞後，測定細胞之螢光素酶活性之結果圖。

10 第3圖是顯示在試驗例3中，測定大鼠的肺中 neprilysin(NEP)活性之結果圖。

第4圖是顯示在試驗例4中，以各種被驗試劑處理後之活細胞數之測定結果圖。

15 第5圖是顯示在試驗例5中，以蘇木精-曙紅將大鼠之肺組織切片染色後之結果圖。圖中，蘇木精將核、核糖體等染色為藍色，曙紅將細胞質、纖維、紅血球染色成紅色。

【實施方式】

較佳實施例之詳細說明

以下，詳細說明本發明。

20 核酸遞送用載劑

本發明之核酸遞送用載劑組成物，其特徵在於包含有：(A)具有類固醇核之陽離子性脂質、及(B)第4級銨鹽型之陽離子性脂質。

本發明之核酸遞送用載劑組成物係作為用以將核酸遞

送(導入)入細胞內之核酸載劑之用。

適用本發明之核酸遞送用載劑組成物之核酸，只要是
需要遞送到細胞內者即可，種類或結構並無特別限制。該
核酸之具體例，可例舉siRNA、mRNA、tRNA、rRNA、
5 cDNA、miRNA(微RNA)、核糖酵素、反意寡糖
(antisenseoligo)、誘聚寡糖核苷酸(decoyoligonucleotide)、
細胞質體DNA、肽核酸、三螺旋寡核苷酸(Triplex Forming
Oligonucleotide, TFO)、基因等。其中，本發明之核酸遞送
用載劑組成物，尤其最適合用於將siRNA遞送到細胞內之用
10 途。本發明之核酸遞送用載劑組成物可適用之核酸，可為
來自於人類、動物、植物、細菌、病毒等者，亦可為藉化
學合成所製造者。甚至，該等核酸可為1股、2股、3股之任
一者皆可，甚至對其分子量也沒有特別限制。又，本發明
中，核酸可以是藉化學、酵素或胜肽修飾者。本發明中，
15 核酸可使用單獨1種，或適當組合2種以上之核酸來使用。

本發明之核酸遞送用載劑組成物中所使用之所謂具有
類固醇核之陽離子性脂質(以下亦表記為「(A)成分」)，係
指具有類固醇核(環戊烷多氫菲環； $C_{17}H_{28}$)、且表現出陽離
子性之脂質。本發明中所使用之具有類固醇核之陽離子性
20 脂質，只要以藥理學上可容許為限度即可，並無特別限定，
具體例可舉例如 3β -[N-(N',N'-二甲胺基乙烷)-胺甲醯基]
膽固醇(DC-Chol)、 3β -[N',N',N'-三甲胺基乙烷]碘化膽固
醇(TC-Chol)、雙(胍)-三(2-胺乙基)胺-類固醇
(bis(guanidium)-tren-cholesterol)(BGTC)、N-膽固醇氧基碳

醯基-3,7-二氮壬烷-1,9-二胺、 β -丙胺酸-二乙醇胺-膽固醇、 N^4 -精胺膽固醇基胺甲酸鹽 (GL-67; N^4 -spermine cholesteryl carbamate)、 N [N^4 -3-胺基丙基精三胺]膽固醇基胺甲酸鹽 (GL-78; N [N^4 -3-aminopropylspermidine]

5 cholesteryl carbamate)、 N^4 -精胺膽固醇基羧醯胺 (GL-90; N^4 -spermine cholesteryl carboxamide)、 $N^{1,8}$ -雙(筋胺羧醯胺)- N^4 -精三胺膽固醇基胺甲酸鹽 (GL-95; $N^{1,8}$ -Bis(arginine carboxamide)- N^4 -spermidine cholesteryl carbamate)、 N -[N^1, N^4, N^8 -叁(3-胺基丙基)精三胺]膽固醇基

10 胺甲酸鹽 (GL-96; N -[N^1, N^4, N^8 -Tris (3-aminopropyl) spermidine]cholesteryl carbamate)等之膽固醇衍生物(具有膽固醇骨架之陽離子性脂質)；角鯊多胺(Squalamine)、 $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -叁(3-胺基丙氧基)- 5β -膽烷-24-(N, N -二(3-胺基丙基)胺 ($3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -Tris(3-aminopropoxy)- 5β -cholan-24-

15 (N, N -bis(3-aminopropyl)amine)、 $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -叁(3-胺基丙氧基)- 5β -膽烷-24-(N -(N -(3-胺基丙基))-3-胺基丙基)-胺 ($3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -Tris (3-aminopropoxy) - 5β - cholan-24- (N - (N -

(3-aminopropyl)) -3-aminopropyl)-amine)、 $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -叁(3-疊氮丙氧基)- 5β -膽烷-24-(N, N -二(2-氮乙基)胺)($3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -Tris(3-azidopropoxy)- 5β -cholan-24-(N, N -bis(2-cyanoethyl)amine))、 $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -叁(3-疊氮丙氧基)- 5β -膽烷-24-(N -

20 (苯甲氧基碳醯基)- N -(羥丙基)-胺)($3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -Tris(3-azidopropoxy)- 5β -cholan-24-(N -(benzyloxycarbonyl)- N -(3-hydroxypropyl)-amine))等類固醇所結合之陽離子

性脂質；傘狀-精胺複合物(Umbrella-spermine conjugates)等膽酸所結合之陽離子性脂質；膽醇苷所結合之陽離子性脂質；類固醇石鹼素所結合之陽離子性脂質等。該等具有類固醇核之陽離子性單純脂質，可單獨使用1種，或任意組合2種以上來使用。

具有類固醇核之陽離子性脂質，適當者可舉膽固醇衍生物(具有膽固醇骨架之陽離子性脂質)，更適當者可舉 3β -[N-(N',N'-二甲胺基乙烷)-胺甲醯基]膽固醇、及 3β -[N',N',N'-三甲胺基乙烷]碘化膽固醇(TC-Chol)。

10 本發明之核酸遞送用載劑組成物中所使用之第4級銨鹽型之陽離子性脂質(以下亦表記為「(B)成分」)，只要以藥理學上可容許為限度即可，並無特別限定，具體例可舉例如：二甲基雙十八烷基銨溴化鹽(DDAB)、1,2-二肉荳蔻醯基-3-三甲基銨丙烷、1,2-二油醯基-3-三甲基銨丙烷
15 (DOTAP)、1,2-二油醯基-3-三甲基銨丙烷甲基硫酸鹽、1,2-二棕櫚醯基-3-三甲基銨丙烷、1,2-二硬脂醯基-3-三甲基銨丙烷、N-(1-(2,3-雙(油醯氧基)丙基)-N,N,N-三甲基銨鹽酸鹽(DOTMA)、二肉荳蔻醯氧丙基二甲基羥乙基銨溴化鹽(DMRIE)、二油醯氧基丙基二甲基羥乙基銨溴化鹽
20 (DORIE)、二甲基二十二烷基銨溴化鹽、N-(α -三甲基氨基乙醯基)-雙十二烷基-D-麩胺酸鹽酸鹽、N-(α -三甲基氨基乙醯基)-O, O'-雙-(1H, 1H, 2H, 2H-全氟癸基)-L-麩胺酸鹽酸鹽、O, O'-雙十二烷基醯基-N-(α -三甲基氨基乙醯基)二乙醇胺鹽酸鹽、甲基烯丙基雙十二烷基銨溴化鹽、N-{p-(ω -三甲基氨基

丁氧基)-苯甲醯}-雙十二烷基-L-麩胺酸鹽酸鹽、9-(ω -三甲基氨基丁基)-3,6-雙(十二烷基醯基)咪唑溴化鹽、二甲基雙十八烷基銨鹽酸鹽、N- ω -三甲基氨基癸醯基-雙十六烷基-D-麩胺酸溴化鹽、N-{p-(ω -三甲基氨基己氧基)-苯甲醯}-雙十四烷基

5 -L-麩胺酸溴化鹽、p-(ω -三甲基氨基癸氧基)-p'-辛氧基偶氮苯溴化鹽 (MC-1-0810)、p-{ ω -(β -羥乙基)二甲基-氨基-癸氧基}-p'-辛氧基偶氮苯溴化鹽 (MC-3-0810)、O,O',O''-三月桂醯基-N-(ω -三甲基-氨基癸醯基)-三(羥甲基)胺基甲烷溴化鹽(TC-1-12)、1,2-二月桂基-甘油-3-乙基磷膽醇、1,2-二肉

10 荳蔻醯基-甘油-3-乙基磷膽醇、1,2-二棕櫚醯基-甘油-3-乙基磷膽醇、1,2-二硬脂醯基-甘油-3-乙基磷膽醇、1,2-二油醯基-甘油-3-乙基磷膽醇、1-棕櫚醯基-2-油醯基-甘油-3-乙基磷膽醇等。該等第4級銨鹽型之陽離子性脂質，可單獨使用1種，或任意組合2種以上來使用。

15 該等第4級銨鹽型之陽離子性脂質中，適當者可舉二甲基雙十八烷基銨溴化鹽(DDAB)、二油醯基三甲基銨丙烷(DOTAP)、N-(1-(2,3-雙(油醯氧基)丙基)-N,N,N-三甲基銨鹽酸鹽(DOTMA)、O, O'-雙十二烷基醯基-N-(α -三甲基氨基乙醯基)二乙醇胺鹽酸鹽(DC-6-12, n=12；及DC-6-14, n=14)、

20 p-{ ω -(β -羥乙基)二甲基-氨基-癸氧基}-p'-辛氧基偶氮苯溴化鹽(MC-3-0810)、及O,O',O''-三月桂醯基-N-(ω -三甲基-氨基癸醯基)-三(羥甲基)胺基甲烷溴化鹽(TC-1-12)，更適當者可舉二甲基雙十八烷基銨溴化鹽(DDAB)、二油醯基三甲基銨丙烷(DOTAP)、N-(1-(2,3-雙(油醯氧基)丙基)-N,N,N-三甲基銨

鹽酸鹽(DOTMA)。

又，本發明之核酸遞送用載劑組成物中，關於(A)成分與(B)成分之混合比例並無特別限制，不過基於將核酸更有效率地遞送至細胞內之觀點，故相對於(A)成分100重量份，(B)成分可例舉10~200重量份，又以30~150重量份為佳，更以75~125重量份為佳。又，相對於本發明核酸遞送用載劑之總量，(A)成分與(B)成分之合計量，可舉例如10~100重量%，又以20~80重量%為佳，更以40~70重量%為佳。

10 本發明之核酸遞送用載劑組成物，除了前述(A)及(B)成分之外，更可包含油性基劑(以下亦稱(C))。藉由混合油性基劑並利用其特性，可控制由核酸遞送用載劑組成物進行之核酸導入效率。例如，藉由混合油性基劑調整核酸遞送用載劑組成物之比重，可控制細胞與核酸遞送用載劑組成物之接觸性，改善在活體(in vitro)之導入效率。又，例如，藉由混合具有溫度感受性機能者作為油性基劑，可使核酸載劑之核在預定溫度條件下崩解，誘發在細胞表面之波動，提高核酸之導入效率。甚至，例如藉由混合具有外部刺激崩解性者作為油性基劑，可藉外部刺激使核酸載劑組成物之核崩解，誘發在細胞表面之波動，提高核酸之導入效率。

本發明之核酸遞送用載劑組成物中所混合之油性基劑，可舉例如全氟碳、全氟戊烷、溴化全氟辛基、全氟己烷、全氟三丁基胺、大豆油、精製大豆油、大豆硬化油、

大豆油非皂化物、角鯊烯、蓖麻油、丁香油、山梨醇酐三油酸酯、松節油、紅花油、紅花油脂肪酸、油酸、椰子油、菜籽油、雜醇油、橄欖油、亞麻仁油、芝麻油、葉綠酸油、巴豆油、佛手柑油、雪松油、橘子油、茴香油、尤加利油、

5 玉米油、薰衣草油、馬郁蘭油、檸檬油、棉籽油、椰子油、蛋黃油、玫瑰油、松油、杏仁油、花生油、山茶花油、樟腦白油、春黃菊油、肉桂皮油、薄荷油、酯化玉米油、生薑油、羅馬春黃菊花油、蛇油、歐薄荷油、葵花籽油、可可脂、小麥胚芽油、氧化鋅(zink)油、硬化油、氫化植物油、

10 輕質流動石臘、流動石臘、中鏈脂肪酸三酸甘油酯、貂油、橙皮油、聚羥乙烯蓖麻油、聚羥乙烯硬化蓖麻油、聚羥乙烯硬化蓖麻油10、聚羥乙烯硬化蓖麻油100、聚羥乙烯硬化蓖麻油20、聚羥乙烯硬化蓖麻油40、聚羥乙烯硬化蓖麻油5、聚羥乙烯硬化蓖麻油50、聚羥乙烯硬化蓖麻油60、聚羥

15 基35蓖麻油、軟化油(process oil)等。該等油性基劑中，全氟戊烷具有溫度感受性，並具有可在29.5℃沸騰氣體化之特性。又，全氟己烷、溴化全氟辛基、及全氟三丁基胺之特性係具有外部刺激崩解性，可藉由超音波照射之刺激從外部加以刺激，藉此使載劑組成物之核產生空洞現象，使

20 其崩解。

含有該油性基劑時，該油性基劑之比例，只要在不妨礙本發明效果之限度下，並無特別限制，該油性基材之比例，相對於上述成分(A)及成分(B)，可例舉0.1~50重量份，又以1~30重量份為佳，更以5~20重量份為佳。

又，本發明之核酸遞送用載劑組成物中，亦可因應需求，而含有膜融合性脂質(輔助脂質)。藉由含有該膜融合性脂質，可使對細胞內之核酸遞送效率更進一步提升。該種膜融合性脂質，可舉例如：二油醯基磷脂醯乙醇胺、二油醯基磷脂醯膽鹼、反磷脂醯磷脂醯乙醇胺、1,2-雙(10, 12-二十三二醯基)-磷乙醇胺、1,2-二反油醯基磷乙醇胺、1,2-二棕櫚基磷乙醇胺、1,2-二己醯基磷乙醇胺、1,2-二月桂醯基磷乙醇胺、1,2-二次亞麻油醯基磷乙醇胺、1,2-二肉荳蔻醯基磷乙醇胺、1,2-二油醯基磷乙醇胺、1,2-雙十六油醯基磷乙醇胺、1,2-雙十六醯磷乙醇胺、1,2-二植烷醯基磷乙醇胺、1,2-二硬脂醯磷乙醇胺、1-十六醯-2-油醯基磷乙醇胺、1-十六醯-2-(10,12-二十三二醯基)磷乙醇胺、1,2-二油醯基磷乙醇胺-N-己醯胺、1,2-雙十六醯磷乙醇胺-N-己醯胺、1,2-二油醯基磷乙醇胺-N,N-二甲基鹽、1,2-雙十六醯磷乙醇胺-N,N-二甲基鹽、1,2-雙十六醯磷乙醇胺-N-十二烷醯、1,2-二油醯基磷乙醇胺-N-十二烷醯、1,2-二油醯基磷乙醇胺-N-十二烷基胺、1,2-雙十六醯磷乙醇胺-N-十二烷基胺、1,2-二油醯基磷乙醇胺-N-戊二醯基鹽、1,2-雙十六醯磷乙醇胺-N-戊二醯基鹽、1,2-二油醯基磷乙醇胺-N-乳糖、1,2-二油醯基磷乙醇胺-N-[4(p-順丁烯二醯亞胺甲基)環己烷-羧酸鹽、二棕櫚磷乙醇胺-N-[4(p-順丁烯二醯亞胺甲基)環己烷-羧酸鹽、1,2-二十六醯磷乙醇胺-N-[4(p-順丁烯二醯亞胺苯基)丁醯胺、1,2-二油醯基磷乙醇胺-N-[4(p-順丁烯二醯亞胺苯基)酪酸鹽]、1,2-二油醯基磷乙醇胺-N-甲基鹽、雙十六醯

磷乙醇胺-N-甲基鹽、1,2-二油醯基磷乙醇胺-N-[3-(2-吡啶基二硫)丙酸鹽、1,2-雙十六醯基磷乙醇胺-N-[3-(2-吡啶基二硫)丙酸鹽、1,2-二油醯基磷乙醇胺-N-(琥珀醯鹽)、1,2-雙十六醯基磷乙醇胺-N-(琥珀醯鹽)等。其中，二油醯基磷脂醯乙醇胺很適宜用於本發明之核酸遞送用載劑組成物中。

含有該膜融合性脂質時，該膜融合性脂質之比例，只要在不妨礙本發明效果之限度下，並無特別限制，該膜融合性脂質之比例，相對於上述(A)成分及(B)成分之總量100重量份，可例舉1~500重量份，又以10~250重量份為佳，更以25~100重量份為佳。

本發明之核酸遞送用載劑組成物，可因應使用形態，而含有等張化劑、賦形劑、稀釋劑、增黏劑、穩定化劑、緩衝劑、保存劑等各種添加劑。該等添加劑之混合比例，可因應核酸遞送用載劑組成物之使用形態適當設定。

本發明之核酸遞送用載劑組成物，可依據上述(A)成分、(B)成分及需求，藉由混合其他成分來製造。

核酸遞送用組成物

本發明之核酸遞送用組成物，係含有上述核酸遞送用載劑組成物與核酸者，該核酸遞送用組成物中，核酸係藉由核酸遞送用載劑組成物之混合成分與離子鍵或疏水鍵形成複合體，提高核酸朝細胞內之遞送率。

本發明之核酸遞送用組成物，係混合上述核酸遞送用載劑組成物與核酸、或以任意順序混合核酸及上述核酸遞送用載劑組成物之混合成分來製造。

本發明之核酸遞送用載劑組成物中，核酸與核酸遞送用載劑組成物之混合比例，依據所使用之核酸或核酸遞送用載劑之種類或作為核酸遞送對象之細胞之種類而異，例如，相對於核酸遞送用載劑組成物中所含之(A)及(B)成分之總量100重量份，而可舉核酸0.1~300重量份之比例，又以1~100重量份為佳，更以2.5~50重量份為佳。

又，核酸遞送用組成物中所含之(A)及(B)成分之合計量，例如相對於該組成物之總量，可舉10~90重量%，又以30~80重量%為佳，更以50~70重量%為佳。

10 本發明之核酸遞送用組成物，可因應使用形態，含有等張化劑、賦形劑、稀釋劑、增黏劑、穩定化劑、緩衝劑、保存劑等各種添加劑。該等添加劑之混合量，可因應核酸遞送用組成物之使用形態適當設定。

15 本發明中，核酸需遞送之細胞，可舉培養細胞、由活體萃取之細胞(包含業已株化之細胞)、存在於活體內之細胞等。

本發明之核酸遞送用組成物之使用態樣，並無特別限制，只要可使該核酸遞送用組成物接觸到作為核酸導入對象之細胞來使用即可。例如，欲將核酸遞送到活體內細胞中時，可舉例如直接注入組織內；注射到靜脈、皮下、肌肉、腹腔、眼內、消化器官內、牙齒內等；吸入投藥於鼻腔、口腔、肺等；經口投藥；經由皮膚之經皮投藥；及經由口腔黏膜、肛門黏膜、眼黏膜、直腸黏膜、子宮黏膜之經黏膜投藥等。又，若欲將核酸遞送到培養細胞或由活體萃取之細胞時，可例舉在培養時，預先在使核酸遞送用組

成物存在之狀態下培養細胞這個方法。又，若欲將核酸遞送到培養細胞或由活體萃取之細胞時，即使在血清存在下，也可將核酸遞送到細胞內。

- 以下，依據實施例等詳細說明本發明，然而本發明並不因此而受到限制。

實施例1

調製以下組成之核酸遞送用載劑組成物。

二甲基雙十八烷基銨溴化鹽	0.9 μ g
3 β -[N-(N',N'-二甲胺基乙烷)-羧醯基]膽固醇	0.9 μ g
二油醯基磷脂醯乙醇胺	0.9 μ g
甘油	40.5 μ g
精製水	2 μ l
OPTI-MEM培養基(Invitrogen社製)	適量
總量	50 μ l

實施例2

首先，調製下述組成之含核酸液。

siRNA	2 pmol
OPTI-MEM培養基(Invitrogen社製)	適量
總量	50 μ l

- 10 接著，將以上所得之核酸遞送用載劑組成物50 μ l與含核酸液50 μ l混合，在20分鐘室溫下恆溫培養，藉此調製siRNA遞送用組成物。

實施例3

調製以下組成之核酸遞送用載劑組成物。

二甲基雙十八烷基銨溴化鹽	0.5mg
3 β -[N-(N',N'-二甲胺基乙烷)-羧醯基]膽固醇	0.5mg
二油醯基磷脂醯乙醇胺	0.5mg
蔗糖	88.9mg
精製水	適量
總量	1.0ml

實施例4

調製以下組成之核酸遞送用載劑組成物。

二甲基雙十八烷基銨溴化鹽	0.5mg
3 β -[N-(N',N'-二甲胺基乙烷)-羰醯基]膽固醇	0.5mg
二油醯基磷脂醯乙醇胺	0.5mg
精製水	適量
總量	1.0ml

試驗例1

為了評價實施例2之siRNA遞送用組成物將siRNA朝細胞內之遞送性，以A549細胞(人類肺癌來源之細胞株；大日本製藥社製)作為模式細胞進行以下試驗。又，本試驗中，siRNA細胞係使用業已進行螢光標記之GL3-siRNA(對螢火蟲螢光素酶之siRNA；Dharmacon社，Boulder, CO, USA；sense：5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT、antisense：5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT)。

首先，使用DMEM培養基(Dulbecco-Minimum Essential Medium)，將濃度業已調整為 1.2×10^5 個/ml之A549細胞，種入24-井盤中，並注意使每1井含有 6.0×10^4 個細胞。接著，將表1所示之被驗樣本500 μ l添加於各井中，在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂之條件下，恆溫培養24小時。之後，使用螢光顯微鏡(Olympus IX 71 fluorescence microscope; Olympus, Tokyo, Japan)，觀察細胞之核酸來源之螢光像，評價siRNA朝細胞內之遞送性。

【表1】

被驗樣本		組成
No	第1圖中之顯示	
1	核酸遞送用載劑組成物 +siRNA	實施例2之核酸遞送用組成物
2	LFA2000 + siRNA	含有LFA2000(Lipofectamine2000；Invitrogen社製)(1.0 mg/mL)、及siRNA(20pmol/ml)之OPTI-MEM培養基
3	NeoPhectin + siRNA	含有NeoPhectin(NeoPharm社製)(1.0 mg/mL)、siRNA(20pmol/ml)之OPTI-MEM培養基
4	siRNA	含有siRNA(20 pmol/ml)之OPTI-MEM培養基

所得之結果顯示於第1圖。僅單獨添加siRNA時，細胞內觀察不到螢光。另一方面，使用實施例2之核酸遞送用組成物時，或與眾所週知之細胞遞送用載劑(LFA2000或Neophectin)一起添加siRNA時，即可在細胞內觀察到螢光。尤其是使用實施例2之核酸遞送用組成物時，可在細胞內觀察到強烈之螢光。由此可確認，本發明之核酸遞送用組成物具有優異之核酸遞送能力。

10 試驗例2

為了評價目標基因在蛋白質水平之抑制，故而將包圍螢光素酶基因之質體一瞬即過地導入細胞，之後添加上述實施例2之核酸遞送用組成物，評價螢光素酶之展現量。又，本試驗中，siRNA係使用GL3-siRNA(對螢火蟲螢光素酶之siRNA：Dharmacon社，Boulder, CO, USA；sense：5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT、antisense：5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT)。

具體而言，係將10 μ g之pGL3螢光素酶及水母螢光素酶(Promega, Madison, WI, USA)添加於5 \times 10⁶個A549細胞(人

類肺癌來源之細胞株；大日本製藥社製)中，使用核酸轉染儀(Amaxa Inc., Gaithersburg, MD, USA)，進行電蝕孔。將業已導入pGL3螢光素酶及水母螢光素酶之細胞，使用含10容量%牛胎兒血清或無血清之DMEM培養基

5 (Dulbecco-Minimum Essential Medium)，調整為 1.2×10^5 個/ml後，種入24-井盤中使其每井含有 6.0×10^4 個細胞。接著，將表2所示之被驗樣本 $500 \mu\text{l}$ 添加於各井中，在 37°C 、5% CO_2 條件下恆溫培養24小時。之後，依據定法，使井中之細胞溶解而獲得細胞溶解液，利用Dual-Luciferase Reporter

10 Assay System(Promega, Madison, WI, USA)，評價該細胞溶解液之螢光素酶活性。螢光素酶之活性係藉由計算出螢火蟲螢光素酶相對於水母螢光素酶之活性之比例(相對活性%)來進行。

15

【表2】

被驗樣本		組成
No	第2圖中之顯示	
1	核酸遞送用載劑組成物+ siRNA	實施例2之核酸遞送用組成物
2	LFA2000+ siRNA	含有LFA2000(Lipofectamine2000; Invitrogen社製)(1.0 mg/mL)、及siRNA(20pmol/ml)之OPTI-MEM培養基
3	NeoPectin+ siRNA	含有NeoPectin(NeoPharm社製)(1.0 mg/mL)、及siRNA(20pmol/ml)之OPTI-MEM培養基
4	SiRNA	含有siRNA(20 pmol/ml)之OPTI-MEM培養基
5	LFA2000	含有LFA2000(Lipofectamine2000; Invitrogen社製)(1.0 mg/mL)之OPTI-MEM培養基
6	NeoPectin	含有NeoPectin(NeoPharm社製)(1.0 mg/mL)之OPTI-MEM培養基
7	核酸遞送用載劑組成物	實施例1之核酸遞送用載劑組成物(50容量%)之OPTI-MEM培養基
8	Control	OPTI-MEM培養基

所得到之結果顯示於第2圖。從該結果可確認，藉由使用實施例2之核酸遞送用組成物，可以高效率達成對細胞內siRNA之遞送、及細胞內該siRNA之機能展現，而無關乎培養基中有無血清。

5 試驗例3

本試驗中，係使用 Rat Neprilysin (相對於 Rat Neprilysin(NM_012608) 之 siRNA ; RNA-TEC NV 社, Belgium ; Sense : 5'-GCUCCAAAGCCGAAGAAGAdTdT、Antisense : 5'-UCUUCUUCGGCUUUGGAGCdTdT) 作為
10 siRNA，針對實施例3之核酸遞送用組成物在肺組織細胞內之siRNA之機能性及遞送性進行評價。

藉由將實施例3之核酸遞送用組成物與siRNA以1:1之重量比混合，來調製核酸遞送用組成物。接著，將該核酸遞送用組成物稀釋於適當載劑(8.89w/v%之蔗糖水溶液)之
15 試驗液0.4mL，並將該業已稀釋之試驗液，使用IA-1B inhalation元件(PENNCENTURY, Philadelphia, PA, USA)，在藉吸入麻醉劑異氟醚(大日本製藥株式會社製)之麻醉下，進行經肺投藥於體重250-320g之雄性SD大鼠(SLC, Tokyo, Japan)中。又，上述試驗液係將該核酸遞送用組成物適當稀
20 釋成siRNA投藥量為0.04~0.12mg/kg(大鼠)所調製而成者。經肺投藥24小時後，進行醚麻醉並將大鼠以背位固定。沿正中線將大鼠開腹，從腹部下大靜脈放血致死。接著，從大鼠身上摘出肺，並以業已冰冷之生理食鹽水洗淨。使用該業已摘出之肺，測定模式目標基因NEP(neutral

endopeptidase) 之 mRNA 展現量以及管家基因之 GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 之 mRNA 展現量。更測定業已摘出之肺中 Rat neprilysin(NEP) 活性。該等之具體測定方法及結果係如下所述。又，亦針
5 對在相同條件下僅將載劑投藥時之情況進行同樣試驗，以作為對照組。又，為了作為比較，使用相對於 EGFP (enhanced green fluorescent protein) 之 siRNA (Takara, Japan; Sense : 5'-GAACGGCAUCAAGGUGAACTT, Antisense : 5'-GUUCACCUUGAUGCCGUUCTT) 來取代 Rat Neprilysin ,
10 進行相同試驗。

< NEP mRNA 及 GAPDH mRNA 之定量方法及結果 >

從業已摘出之肺局部，利用 RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Germany) 進行總 RNA 之離析、萃取。從 mRNA 朝 cDNA 之合成，係使用 SuperScript III First-Strand Synthesis System for
15 RT-PCR (Invitrogen, California, USA) 來進行。使用業已調製之 cDNA，藉即時 PCR 法將模式目標基因 NEP(neutral endopeptidase) 之 mRNA 量進行定量。又，就管家基因之 GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) mRNA 量也進行相同測定。Neprilysin mRNA 展現抑制之評價，係
20 藉由算出相對於 GAPDH mRNA 之 NEP mRNA 之比例並比較來進行。

根據該結果，可確認即使藉由 0.08mg/kg 之投藥量之 Neprilysin-siRNA，可有意義地抑制肺中 Neprilysin mRNA 展現。以 in vivo RNAi 效果而言，該用量相較於習知報告之

用量，屬於低用量，因此，顯然藉由使用實施例3中所得之核酸遞送用載劑組成物，可有效率地將siRNA遞送到肺組織細胞內。

< Rat neprilysin(NEP)活性之測定方法及結果 >

5 將業已摘出之肺局部進行均質處理，測定在均質中之Rat neprilysin活性。Rat neprilysin(NEP)活性之測定係，在對NEP特異性阻礙劑之phosphoramidon (SIGMA)之存在或非存在下，測定NEP之基質DAGNPG (N- Dansyl -D- Ala-Gly-p- nitro-Phe-Gly : SIGMA)在固定時間內水解了多少，
10 再根據阻礙劑存在時與非存在時，分解物生成量之差而算出NEP活性。此時所使用之大鼠肺均質量為50 μ L，基質DAGPNG之濃度係1mM，在阻礙劑存在之情況添加10mM phosphoramidon，以全量100 μ L進行反應。反應係在37°C進行10分鐘，90°C進行10分鐘恆溫，使反應停止，測定此
15 時所生成之分解物DAG (Dansyl-D-Ala-Gly)之量，以算出NEP活性。又，分解物DAG之生成量係藉由測定該分解物之螢光來求得，螢光之測定係利用由360nm激發之535nm發光來測定。

所得之結果顯示於第3圖。從該結果得知，即使藉由投
20 藥量0.4mg/kg之NF-siRNA，也可有意義地抑制肺中NEP活性。因此，根據該結果可確認，藉由使用實施例3中所得之核酸遞送用載劑組成物，可有效率地將siRNA遞送到肺組織細胞內。

試驗例4

針對實施例1中所得之核酸遞送用載劑組成物之細胞
毒性，利用Premix WST-1 cell proliferation assay system
(Takara, Siga, Japan)進行評價。具體而言，係將A549細胞(人
類肺癌來源細胞株；大日本製藥社製)，使用DMEM培養基
5 (Dulbecco-Minimum Essential Medium)，在96-井盤中，調
整為 (1×10^5) 個/ml之濃度，並播種使各井之細胞數成為 10^4
個。接著，將被驗樣本[實施例1之核酸遞送載劑、
LFA2000(Lipofectamine2000；Invitrogen社製)、及
NeoPhectin(NeoPharm社製)]添加於各井中使其濃度成為
10 $2 \sim 20 \mu\text{g/ml}$ 。之後，將Premix WST-1溶液 $10 \mu\text{l}$ 添加於各井
中，以 37°C 恆溫培養1小時後，使用微多孔盤讀取機(Tecan,
Maennedorf, Switzerland)測定各井在450nm中之消光度。
又，針對業已添加培養基取代被驗樣本之井亦進行相同測
定，以作為對照組。A450之消光度，係指WST-1由還原酵
15 素所形成之甲臍(formazan)色素所造成之消光度。由於該消
光度與活細胞為直線關係，故作成業已播種之活細胞數與
消光度之檢量線。以所得之檢量線為基礎，求得被驗樣本
之細胞數。

所得之結果顯示於第4圖。依據該結果可確認，即使添
20 加實施例1之核酸遞送用載劑組成物，細胞數幾乎沒有減
少，故可確認該核酸遞送用載劑組成物屬於毒性低、具有
高安全性。

試驗例5

以精製水將實施例4之核酸遞送用載劑組成物 $500 \mu\text{g}$

稀釋為0.4mL，藉此調製試驗液，並使用PennCentury社之1A-IC元件，將業已調製之試驗液，對體重250-320g之雄性SD大鼠(SLC, Tokyo, Japan)，進行經肺投藥。投藥後之大鼠放回籠子中，依據一般飼育條件進行飼養。在經肺投藥24
5 小時後，將戊巴比妥(寧必妥，大日本製藥株式會社)50mg/kg(1mL/kg)投藥於大鼠腹腔內施以麻醉，將大鼠以背位固定。沿正中線將大鼠開腹，從腹部下大靜脈放血致死。接著，從大鼠身上摘出肺，並以業已冰冷之生理食鹽水洗淨。作成該業已摘出之肺之組織切片，使用蘇木精-曙紅染
10 色並以顯微鏡觀察，藉此針對核酸遞送用載劑組成物對肺組織造成的毒性進行評價。又，使用LFA2000(Lipofectamine2000；Invitrogen社製)、或使用NeoPhectin(NeoPharm社製)，取代實施例4之核酸遞送用載劑組成物，進行與上述條件相同之試驗，以作為比較。唯，若LFA2000
15 投藥500 μ g，會使大鼠致死，故將LFA2000之投藥量變更為250 μ g以進行試驗。

所得之結果顯示於第5圖。將LFA2000或NeoPhectin投藥於肺局部時，會引起發炎症狀，並局部觀察到浮腫，對此，若是投藥實施例4之核酸遞送用載劑組成物，確認可
20 減低該發炎症狀。從該結果可確認，實施例4之核酸遞送用載劑組成物，即使在肺局部投藥後，仍為低毒性，故而安全性高。

【圖式簡單說明】

第1圖是顯示在試驗例1中，使用各種被驗試劑處理細

胞後，藉由螢光顯微鏡觀察細胞之核酸來源螢光像之結果。

第2圖是顯示在試驗例2中，使用各種被驗試劑處理細胞後，測定細胞之螢光素酶活性之結果圖。

第3圖是顯示在試驗例3中，測定大鼠的肺中
5 neprilysin(NEP)活性之結果圖。

第4圖是顯示在試驗例4中，以各種被驗試劑處理後之活細胞數之測定結果圖。

第5圖是顯示在試驗例5中，以蘇木精-曙紅將大鼠之肺組織切片染色後之結果圖。圖中，蘇木精將核、核糖體等染色為
10 藍色，曙紅將細胞質、纖維、紅血球染色成紅色。

【主要元件符號說明】

(無)

五、中文發明摘要：

本發明目的在於提供將siRNA核酸投藥於動物來源細胞或生物時，可保護核酸免於分解、並可有效率地使其遞送到細胞內之低毒性核酸遞送用載劑組成物、及含有該載劑組成物與核酸之核酸遞送用組成物。本發明係組合(A)具有類固醇核之陽離子性脂質、及(B)第4級銨鹽型之陽離子性脂質並將之混合，調製核酸遞送用載劑組成物。又，本發明係混合該核酸遞送用載劑組成物與核酸，調製核酸遞送用組成物。

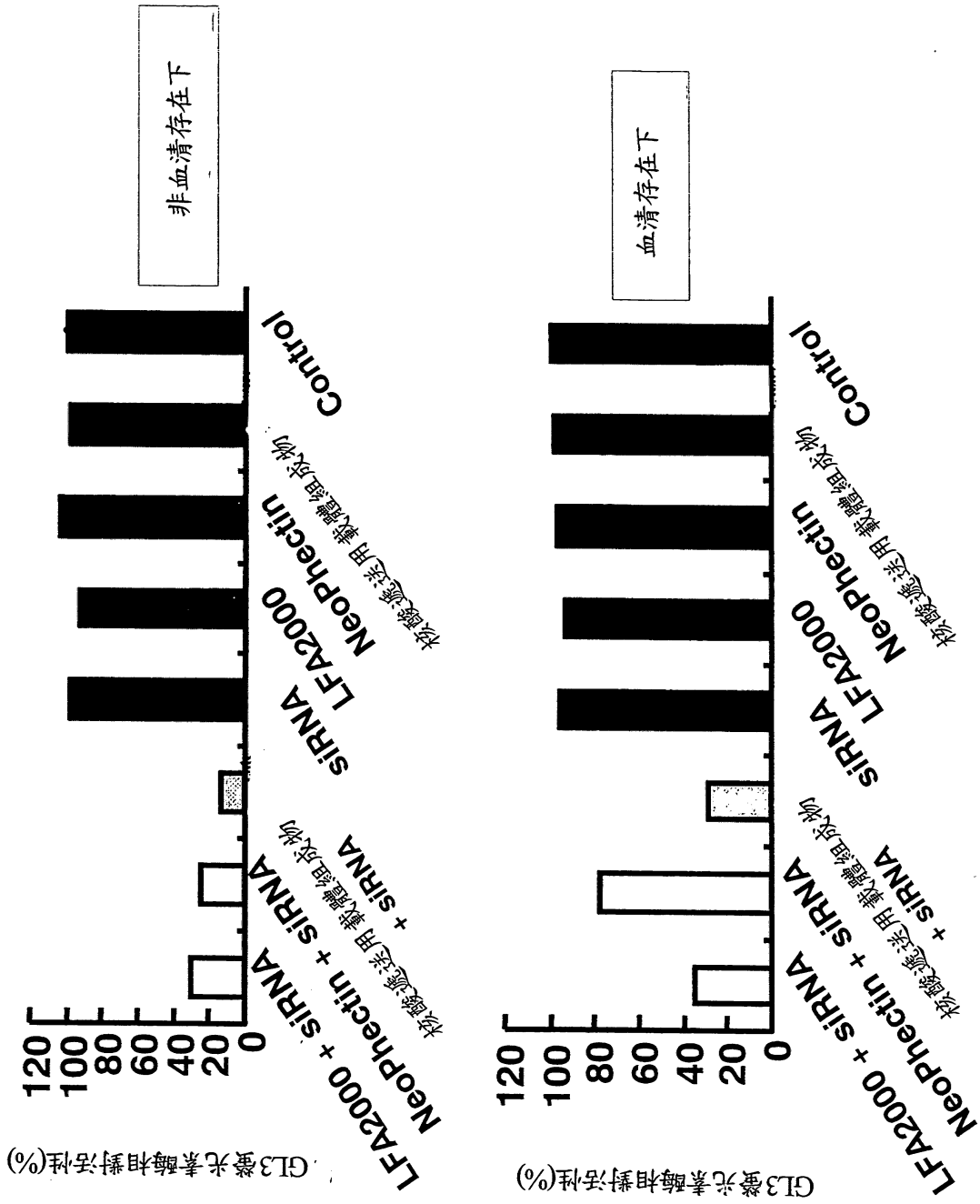
六、英文發明摘要：

十、申請專利範圍：

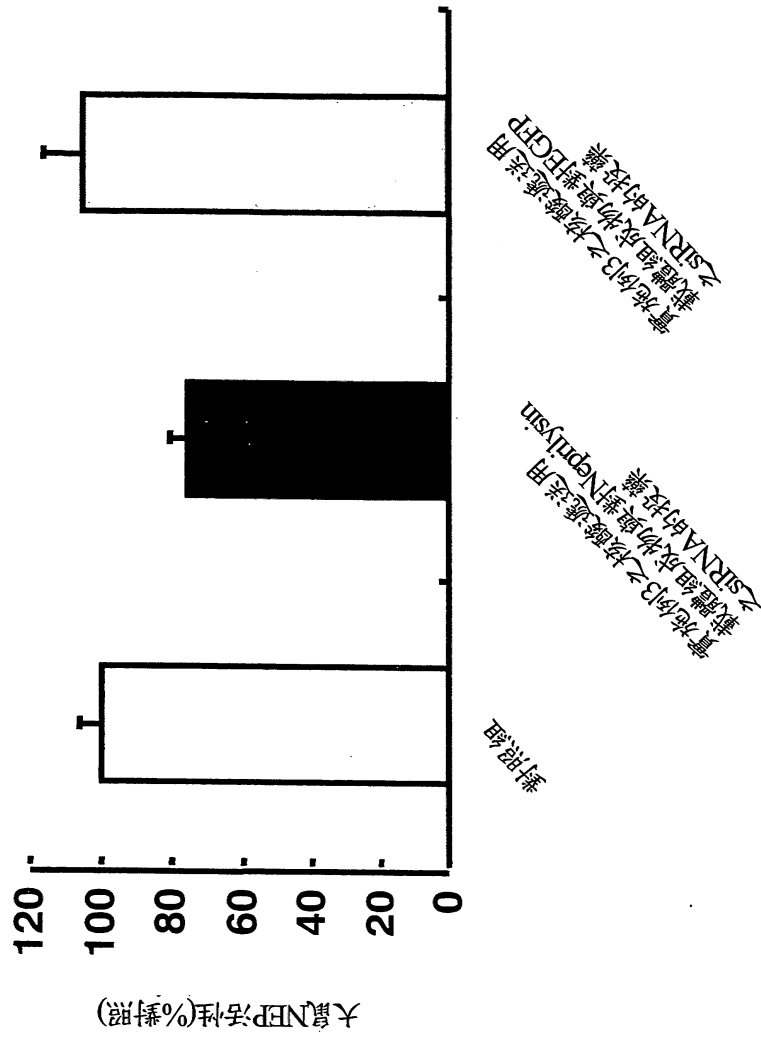
1. 一種核酸遞送用載劑組成物，包含有：
 - (A)具有類固醇核之陽離子性脂質、及(B)第4級銨鹽型之陽離子性脂質。
- 5 2. 如申請專利範圍第1項之核酸遞送用載劑組成物，更含有(C)油性基材。
3. 如申請專利範圍第1項之核酸遞送用載劑組成物，其中前述(A)成分為 3β -[N-(N',N'-二甲胺基乙烷)-羰醯基]膽固醇、及/或 3β -[N',N',N'-三甲胺基乙烷]碘化膽固醇。
- 10 4. 如申請專利範圍第1項之核酸遞送用載劑組成物，其中前述(B)成分為選自於由二甲基雙十八烷基銨溴化鹽、二油醯基三甲基銨丙烷、及N-(1-(2,3-雙(油醯氧基)丙基)-N,N,N-三甲基銨鹽酸鹽所構成之群之至少1種。
- 15 5. 如申請專利範圍第1項之核酸遞送用載劑組成物，其中相對於(A)成分100重量份，含有10~200重量份之比例之(B)成分。
6. 如申請專利範圍第1項之核酸遞送用載劑組成物，係一種siRNA遞送用載劑。
7. 一種核酸遞送用組成物，含有核酸、及申請專利範圍第1~5項中任一項之核酸遞送用載劑組成物。
- 20 8. 如申請專利範圍第7項之核酸遞送用組成物，其中前述核酸為siRNA。
9. 一種核酸導入方法，係藉由使申請專利範圍第7項之核酸遞送用組成物接觸細胞，使核酸導入細胞內。

10. 一種(A)具有類固醇核之陽離子性脂質、及(B)第4級銨鹽型之陽離子性脂質之用途，係用以製造核酸遞送用載劑組成物。

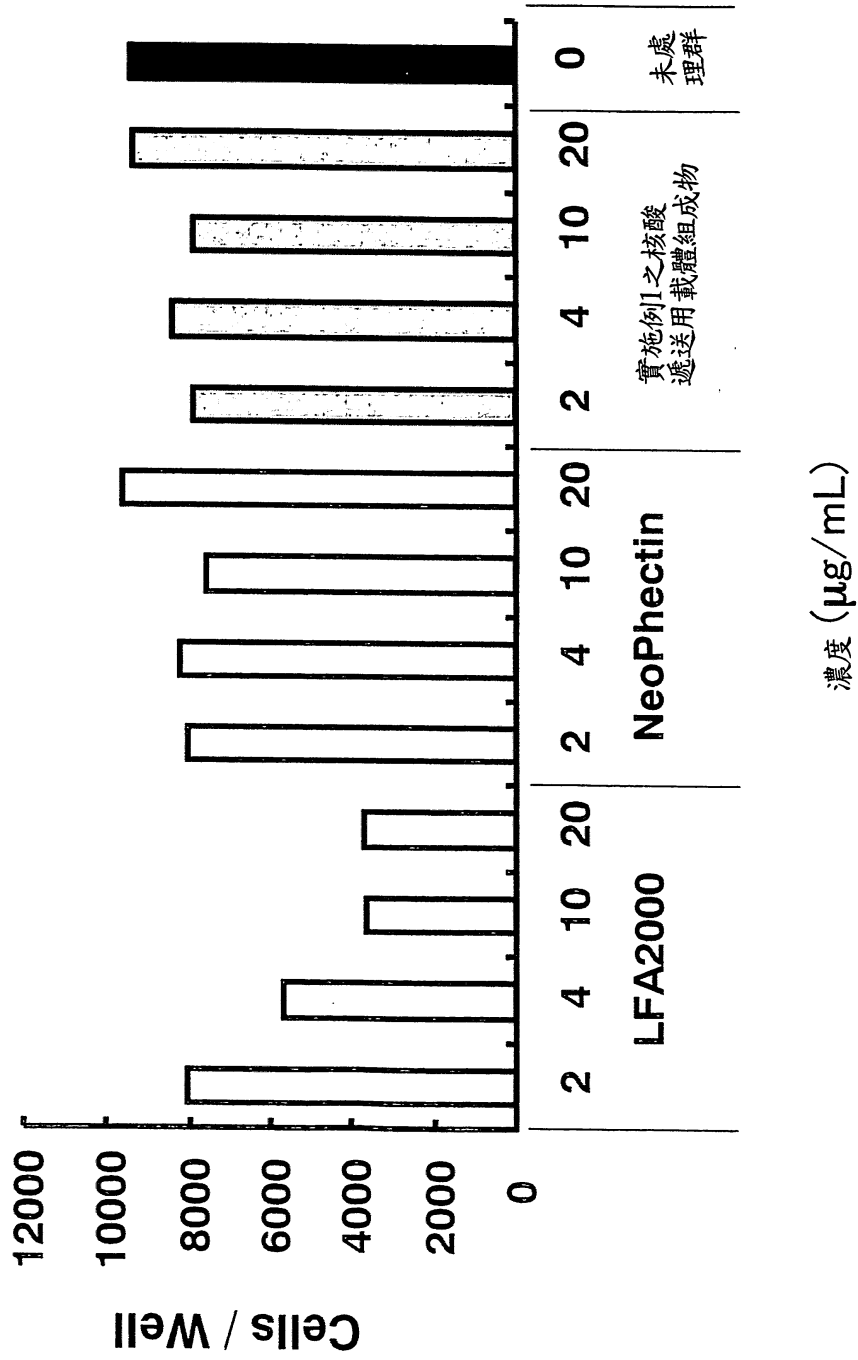
第 2 圖



第 3 圖



第 4 圖



七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(無)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：