

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2011年1月27日(27.01.2011)

PCT

(10) 国際公開番号

WO 2011/010714 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 31/74 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C08G 69/12 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/062400
- (22) 国際出願日: 2010年7月23日(23.07.2010)
- (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:
61/227,924 2009年7月23日(23.07.2009) US
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人東京大学(The University of Tokyo) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 片岡 一則(KATAOKA, Kazunori) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 石井 篤史(ISHII, Atsushi) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 武元 宏泰(TAKEMOTO, Hiroyasu) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 中西 政崇(NAKANISHI, Masataka) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 西山 伸宏(NISHIYAMA, Nobuhiro) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 宮田 完二郎(MIYATA, Kanjiro) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 梶井 孝文(MOMII, Takafumi); 〒5300047 大阪府大阪市北区西天満6丁目1番2号 千代田ビル別館7階 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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, 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 (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, SE, SI, SK, SM, 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(条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))

(54) Title: ANIONIC POLYMER, POLYION COMPLEX USING ANIONIC POLYMER, TERNARY POLYMER COMPOSITE, AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION

(54) 発明の名称: アニオン性ポリマー、該アニオン性ポリマーを用いたポリイオンコンプレックスおよび三元系ポリマー複合体、ならびに薬学組成物

(57) Abstract: Provided are an anionic polymer, a polyion complex, and a ternary polymer composite, which are stable in a biological environment and are capable of realizing siRNA delivery without inducing an unwanted immune response. The anionic polymer contains a primary chain formed from repeating units which have carboxyl groups, and side chains which are bonded to a portion of the carboxyl groups of the primary chain and are represented by formula -A-B-X (where A is a residue having 1 or more aminoethyl bonds, B is a bond capable of being cleaved in vivo, and X is a low-molecular-weight RNA). The polyion complex contains the anionic polymer and a cationic polymer. The ternary polymer composite contains the polyion complex and a charge-conversion type polymer.

(57) 要約: 生物学的環境において安定で、かつ、所望でない免疫応答を引き起こさない siRNA 送達を実現し得るアニオン性ポリマー、ポリイオンコンプレックスおよび三元系ポリマー複合体が提供される。本発明のアニオン性ポリマーは、カルボキシル基を有する繰り返し単位で構成される主鎖と、該主鎖のカルボキシル基の1部に結合した、下記式で表される側鎖と、を含む: -A-B-X ここで、A は、1つ以上のアミノエチル結合を有する残基であり、B は、生体内で開裂し得る結合であり、X は低分子RNAである。本発明のポリイオンコンプレックスは、上記アニオン性ポリマーとカチオン性ポリマーとを含む。本発明の三元系ポリマー複合体は、上記ポリイオンコンプレックスと電荷変換型ポリマーとを含む。



WO 2011/010714 A1

明 細 書

発明の名称：

アニオン性ポリマー、該アニオン性ポリマーを用いたポリイオンコンプレックスおよび三元系ポリマー複合体、ならびに薬学組成物

技術分野

[0001] 本発明は、低分子RNAを含む側鎖がグラフトされたアニオン性ポリマー、該アニオン性ポリマーを用いたポリイオンコンプレックスおよび三元系ポリマー複合体、ならびに薬学組成物に関する。

背景技術

[0002] siRNA (small interfering RNA) とは、19～21塩基対の二本鎖RNAであり、強力かつ特異的な遺伝子発現抑制現象として知られるRNA干渉 (RNAi: RNA interference) を担う主要分子である (非特許文献1)。2001年にTuschlらによって哺乳類細胞におけるRNAiが報告されて以来 (非特許文献2)、あらゆる疾病治療への適用を目指した研究開発が活発に行われている。但し、先行する開発は目や呼吸器など患部への到達が容易な部位に対するものであり、適用範囲が限定的である。そもそも、siRNAは生理的環境にて易分解性の不安定な化学種であり、マウスに単独で静脈投与した場合には速やかに ($t_{1/2}$ = 数分) 腎排泄されることが知られている。したがって、siRNAの体内動態を改善するドラッグデリバリーシステム (DDS) は、siRNA実用化の鍵を握るものとして切望されている。

[0003] しかし、全身性のDDSは、未だ研究室レベルに留まり、実用化には程遠い。最も前衛的な成果を発表しているAlnylam及びProtiva Biotherapeuticsの両社によるSNALP (Stable Nucleic Acid Lipid Particles) の系であっても、肝臓への受動的な取り込みのため肝臓以外の組織への適用は困難である (非

特許文献3)。一方、血流中への長期滞留という点のみについては、協和発酵社による*Wrapped*

*liposome*の系が、一本鎖DNAを対象としながらも飛躍的な滞留性向上に成功したため（非特許文献4）、今後の*siRNA*への展開が大いに期待されているが、リポソームの場合、安定すぎて内部の薬剤を放出するのが困難な場合が多い。

[0004] 前述したように、*siRNA*の適用を拡大するにあたっては、*siRNA*の体内動態を改善し、血流中への*siRNA*投与を可能とする技術が極めて重要である。これまでに、プラスミドDNAやアンチセンスDNAにつき、ポリエチレングリコール-ポリリジンブロックコポリマー（PEG-PLys）を用いて当該DNAを内包したナノメートルスケールの構造体（すなわち高分子ミセル）が形成され、その有用性が報告されている（非特許文献5～8）。このような高分子ミセルは、上記ブロックコポリマー中のポリカチオン部分（PEG-PLysではポリリジン部分）と、ポリアニオンである核酸分子（DNA等）との静電相互作用による自己組織化によって形成される。形成された高分子ミセルは、ポリカチオンとポリアニオンとのポリイオンコンプレックス部分が内核様部分となり、その表層がポリエチレングリコール（PEG）で覆われたような、コア-シェル型の構造となる。そのため、当該高分子ミセルは、生体内異物認識機構や腎排泄を回避し得ることが期待される。

[0005] 本発明者等は、上記プラスミドDNAやアンチセンスDNAが*siRNA*の類縁体であることに鑑み、*siRNA*の体内動態を改善する方策として、PEG-PLysを用いて*siRNA*を内包する高分子ミセルの形成を試みた。しかしながら、実際に得られたものは、構造安定性が低く、目的のコア-シェル型のミセル構造を十分に備えるものではなく、培養がん細胞への*siRNA*送達能に極めて乏しいものであった。そのため、PEG-PLysを、*siRNA*のキャリアとして利用することは極めて困難であった。

[0006] また、アニオン性*siRNA*とポリカチオンとの間の静電相互作用により

形成されたポリオンコンプレックス（PIC）がDDSに利用されている（特許文献1および非特許文献9～11）。しかし、siRNAは、主にそのサイズが小さいこと（21塩基対）に起因して、生理学的条件において安定なミセルを形成することが困難であるので、生物学的環境におけるPICの安定化が問題となっている（非特許文献12）。安定なPICを形成するためには、多数かつ高密度のアニオン性電荷を有する長い2本鎖RNA（dsRNA）が好ましい。ポリカチオンと累積的な相互作用を生じるからである。しかし、長鎖dsRNA構造は、Toll様受容体-3（TLR3）による認識およびプロテインキナーゼR（PKR）の活性化を含む複数の経路によるIFN- α 応答を引き起こすという問題がある（非特許文献13～15）。

[0007] さらに、マイクロRNA（miRNA）も、siRNAと同じく低分子RNAであり、siRNAと同様のメカニズムで遺伝子発現を抑制し得るので、siRNAと同様にDDSに利用されることが期待されている。しかし、miRNAを用いたDDSに関しても、siRNAの場合と同じ問題がある。

[0008] 以上のように、生物学的環境において安定で、かつ、所望でない免疫応答を引き起こさない低分子RNA（例えば、siRNAおよびmiRNA）の送達手段が強く望まれている。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：国際公開第2008/062909号パンフレット

[0010] 非特許文献1：Fire A et al., Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, Nature, vol. 391, p. 744-745, 1998

非特許文献2：Sayda M et al., Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference

nce in cultured mammalian cells. , Nature, vol. 411, p. 494–498, 2001

非特許文献3: Tracy S et al. , RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. , Nature, vol. 441, p. 111–114, 2006

非特許文献4: Masahiro Yamauchi et al. , Improved formulations of Antisense oligonucleotides using wrapped liposomes. , J. Control Release, vol. 114, p. 268–275, 2006

非特許文献5: K. Kataoka et al. , Spontaneous formation of polyion complex micelles with narrow distribution from antisense oligonucleotide and cationic block copolymer in physiological saline. , Macromolecules, vol. 29, p. 8556–8557, 1996

非特許文献6: M. A. Woflert et al. , Characterization of vector for gene therapy formed by self-assembly of DNA with synthetic block copolymers. Hum. Gene Ther. , vol. 7, p. 2123–2133, 1996

非特許文献7: S. Katayose et al. , Water-soluble polyion complex associates of DNA and poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer. Bioconjug. Chem. , vol. 8, p. 702–707, 1997

非特許文献8: S. Katayose et al. , Remarkable

increase in nuclease resistance of plasmid DNA through supramolecular assembly with poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer., J. Pharm. Sci., vol. 87, p. 160-163, 1998

非特許文献9: Siomi MC. Short interfering RNA-mediated gene silencing; towards successful application in human patients. Adv Drug Deliv Rev 2009; 61: 668-671

非特許文献10: Itaka K et al., Supramolecular nanocarrier of siRNA from PEG-based block cationic polymer carrying diamine side chain with distinctive pK(a) directed to enhance intracellular gene silencing. J Am Chem Soc 2004; 126: 13612-13613

非特許文献11: Matsumoto S et al., Environment-responsive block copolymer micelles with a disulfide cross-linked core for enhanced siRNA delivery. Biomacromolecules 2009; 10: 119-127

非特許文献12: Gary DJ, Puri N, Won YY. Polymer-based siRNA delivery: Perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery. J Control Release 2007; 121: 64-73

非特許文献13: Judge A, MacLachlan I. Overcoming the innate immuneresponse to small interfering RNA. Hum Gene Ther 2008; 19: 111-124

非特許文献14: Judge AD, Sood V, Shaw JR, Fang D, McClintok K, MacLachlan I. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. Nat Biotech 2005; 23: 457-462

非特許文献15: Marques JT, Williams BRG. Activation of the mammalian immunessystem by siRNAs. Nat Rev Biotech 2005; 23: 1399-1405

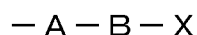
発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明はこのような問題を解決するためになされたものであり、その目的とするところは、生物学的環境において安定で、かつ、所望でない免疫応答を引き起こさない低分子RNA送達を実現し得るアニオン性ポリマー、ポリイオンコンプレックスおよび三元系ポリマー複合体を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明のアニオン性ポリマーは、カルボキシル基を有する繰り返し単位で構成される主鎖と、該主鎖のカルボキシル基の1部に結合した、下記式で表される側鎖と、を含む：



ここで、Aは、1つ以上のアミノエチル結合を有する残基であり、Bは、生体内で開裂し得る結合であり、Xは低分子RNAである。

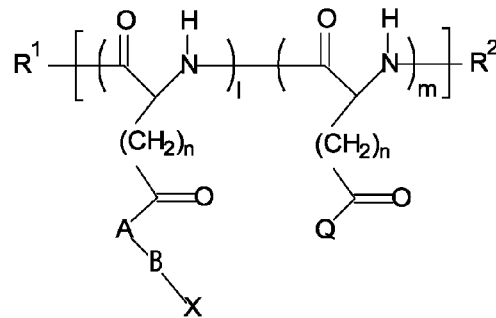
好ましい実施形態においては、上記主鎖は、カルボキシル基を有するポリ

アミノ酸、カルボキシル基を有するポリビニル、カルボキシル基を有するポリエステル、カルボキシル基を有する多糖類、カルボキシル基を有する dendrimer (カスケードポリマー) およびその組み合わせで構成される。

好ましい実施形態においては、上記生体内で開裂し得る結合は、ジスルフィド結合、アセタール結合およびヒドラゾン結合から選択される結合である。

好ましい実施形態においては、上記アニオン性ポリマーは、下記一般式 (I) で表される：

[化1]



(I)

ここで、 R^1 および R^2 は、それぞれ独立して、水素原子、あるいは非置換または置換の直鎖状または分岐状 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル基、あるいはポリエチレングリコール鎖であり、Aは、1つ以上のアミノエチル結合を有する残基であり、Bは、生体内で開裂し得る結合であり、Qは、水酸基またはアミノエチル結合が水酸基により置換されているA由来の基であり、Xは低分子RNAであり、lは1~500の整数であり、mは1~499の整数であり、nは1~5の整数であり、ただし、lとmの合計は10~500であり、lおよびmで表される繰り返し単位はランダムに配列している。

好ましい実施形態においては、上記一般式 (I) におけるAは $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-$ であり、Qは $-\text{OH}$ である。

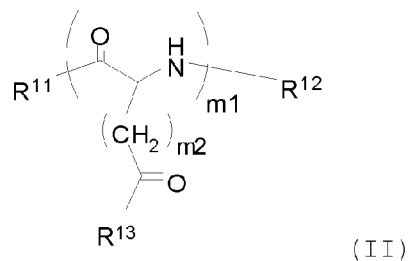
好ましい実施形態においては、上記一般式 (I) におけるlは2以上の整

数である。

本発明の別の局面によれば、ポリイオンコンプレックスが提供される。このポリイオンコンプレックスは、上記のアニオン性ポリマーと、ポリエチレンイミン、ポリアルギニン、ポリリジン、ポリー（２－〔（２－アミノエチル）アミノ〕－エチルーアスパルタミド（pAsp（DET））、ポリエチレングリコールとポリアルギニンとのブロック共重合体、ポリエチレングリコールとポリリジンとのブロック共重合体、および、ポリエチレングリコールとポリー（２－〔（２－アミノエチル）アミノ〕－エチルーアスパルタミドとのブロック共重合体（PEG-pAsp（DET））からなる群から選択されるカチオン性ポリマーと、を含む。

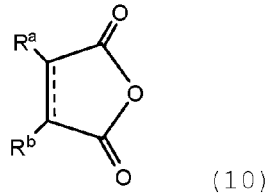
本発明のさらに別の局面によれば、三元系ポリマー複合体が提供される。この三元系ポリマー複合体は、上記のポリイオンコンプレックスと、下記一般式（I I）で表される電荷変換型ポリマーと、を含む：

[化2]



R¹¹およびR¹²は、それぞれ独立して、水素原子、あるいは非置換または置換の直鎖状または分岐状C₁～C₁₂アルキル基、あるいはポリエチレングリコール鎖であり、R¹³は、第1級アミンを有するアミン化合物由来の残基と下記式（10）で表される化合物またはその誘導体との結合体であり：

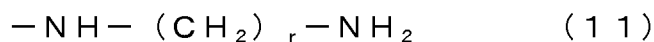
[化3]



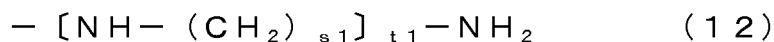
ここで、 R^a および R^b は、それぞれ独立して、水素原子、あるいは非置換または置換のアルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、アリール基、アラルキル基、アシル基、複素環基、複素環-アルキル基、水酸基、アルコキシル基またはアリールオキシ基であり、ただし、 R^a と R^b とが一緒になって、それぞれが結合している炭素原子とともに芳香族環またはシクロアルキル環を形成してもよく、 R^a および R^b が結合している炭素原子間の結合は単結合または二重結合であり、

m_1 は10～500の整数であり、 m_2 は1～5の整数である。

好ましい実施形態においては、上記第1級アミンを有するアミン化合物由来の残基は、下記式(11)または(12)で表される：



式(11)において、 r は0～5の整数であり；

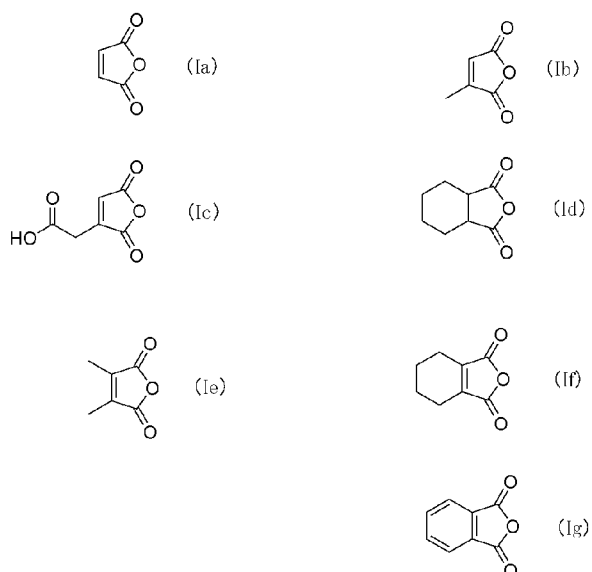


式(12)において、 s_1 は、 $[NH-(CH_2)_{s_1}]$ ユニット間でそれぞれ独立して1～5の整数であり、 t_1 は2～5の整数である。

好ましい実施形態においては、上記第1級アミンを有するアミン化合物由来の残基は、 $-NH-(CH_2)_2-NH_2$ —または $-NH-(CH_2)_2-NH-(CH_2)_2-NH_2$ である。

好ましい実施形態においては、上記式(10)で表される化合物は、下記式(Ia)～(Ig)で表される化合物から選択される少なくとも1つの化合物である：

[化4]



本発明のさらに別の局面によれば、薬学組成物が提供される。この薬学組成物は、上記のポリイオンコンプレックスと、薬学的に許容可能なキャリアとを含む。

本発明の別の薬学組成物は、上記の三元系ポリマー複合体と、薬学的に許容可能なキャリアとを含む。

発明の効果

[0013] 本発明によれば、グラフトによりポリマー側鎖に低分子RNAを導入することにより、生物学的環境において安定で、かつ、所望でない免疫応答を引き起こさない低分子RNA送達手段を実現し得るアニオン性ポリマーが得られ得る。さらに、本発明のアニオン性ポリマーから形成されるポリイオンコンプレックスは、アニオン性ポリマーへの低分子RNA導入量が多く、かつ、会合度が非常に大きいので、非常に高い低分子RNA送達能を有する。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]実施例1で得られたアニオン性ポリマーについての、ポリアクリルアミドゲル電気泳動の観察結果を示す図である。

[図2]実施例2および比較例1のポリイオンコンプレックス（PIC）の安定性を、アガロースゲル電気泳動により分析した結果を示す図である。

[図3]B16F10マウスメラノーマ細胞による実施例2のPICまたは比較例1のPICの取り込みをフローサイトメトリーで調べた結果を示すグラフである。

[図4]AおよびBは、実施例2のPICまたは比較例1のPICについてのB16F10-Luc細胞内のsiRNAの分布を、共焦点レーザー走査顕微鏡（CLSM）で観察した結果を示す画像であり；Cは、実施例2のPICまたは比較例1のPICについて、siRNAのエンドソームからの移行効率を示すグラフである。

[図5]Aは、実施例2のPICまたは比較例1のPICについて遺伝子抑制効率を示すグラフであり；Bは、実施例2のPICまたは比較例1のPICについて、MTTアッセイで細胞毒性を調べた結果を示すグラフである。

[図6]実施例3のPICまたは比較例2のPICについて遺伝子抑制効率を示すグラフである。

[図7]実施例2のPICおよび比較例1のPICを含む種々のPICについて、酵素免疫測定法（ELISA）によりインターフェロン α 産生を調べた結果を示すグラフである。

[図8]遺伝子抑制効果に対するアニオン性ポリマーの鎖長依存性を調べた結果を示すグラフである。

[図9]実施例2のPICまたは比較例1のPICについてノックダウンアッセイの結果を示すグラフである。

[図10]実施例2のPICまたは比較例1のPICについてノックダウンアッセイの結果を示すグラフである。

[図11]実施例4のPICまたは比較例3のPICについてノックダウンアッセイの結果を示すグラフである。

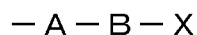
[図12]実施例5のPICについてノックダウンアッセイの結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0015] 以下、本発明の好ましい実施形態を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施形態には限定されない。また、本明細書は、本願の優先権主張の基礎となる米国仮出願61/126,077号の明細書に記載の内容を包含する。さらに、本明細書において示されるすべての文書および刊行物は、その全体が本明細書に参考として援用される。

[0016] A. アニオン性ポリマー

本発明のアニオン性ポリマーは、カルボキシル基を有する繰り返し単位で構成される主鎖と、該主鎖のカルボキシル基の1部に結合した、下記式で表される側鎖と、を含む：



ここで、Aは、1つ以上のアミノエチル結合を有する残基であり、Bは、生体内で開裂し得る結合であり、Xは低分子RNAである。

[0017] 本明細書においては、「低分子RNA」とは、鎖長（二重鎖の場合は二重鎖を構成する部分の長さ）が50塩基以下のRNAをいう。低分子RNAの代表例としては、siRNAおよびmiRNAが挙げられる。siRNAおよびmiRNAとしては、例えば、標的とする遺伝子またはポリヌクレオチドに対し、公知の方法で設計されたすべてのものを用いることができる。siRNAおよびmiRNAの鎖長（2本鎖siRNAの場合は二重鎖を構成する部分の長さ）は、好ましくは15～50塩基、より好ましくは18～30塩基であることができ、当該技術分野で公知の化合物、また、それらと同様な作用または機能を有するすべてのヌクレオチドを包含する。限定されるものでないが、siRNAおよびmiRNAの具体例は、遺伝子療法の対象となりうる遺伝子を参照して設計することができる。このような遺伝子としては、限定されるものでないが、非小細胞肺癌等に関係のあるPKC α 、悪性黒色腫等に関係のあるBCL-2、クローン病に関係のあるICAM-1、C型肝炎に関係のあるHCV、関節リュウマチもしくは乾癬に関係のあるTNF α 、喘息に関係のあるアデノシンA1受容体、卵巣癌等に関係のある

c-r a f k i n a s e、膵臓癌等に関係のあるH-r a s、冠動脈疾患に関係のあるc-m y c、大腸癌に関係のあるP K A R i a、エイズに関係のあるH I V、固形癌に関係のあるD N Aメチルトランスフェラーゼ、癌に関係のあるV E G F受容体、腎臓癌に関係のあるリボヌクレオチド還元酵素、CMV性網膜炎に関係のあるCMV I E 2、前立腺癌に関係のあるM M P-9、悪性グリオーマに関係のあるT G F β 2、多発性硬化症に関係のあるC D 4 9 d、糖尿病に関係のあるP T P-1 B、癌に関係のあるc-m y b、乳癌等に関係のあるE G F R、癌に関係のあるm d r 1、a u t o t a x i n及びG L U T-1の遺伝子を挙げることができる。アンチセンス核酸についても同様に、当該術分野で公知のものまたはそれらと同様の機能または作用を有するすべてのものを対象とすることができる。なお、本明細書の以下の部分においては、簡単のため、低分子RNAの代表例としてs i R N Aを用いる場合について記載するが、当該記載はm i R N Aおよび他の低分子RNAについても同様に適用され得ることはいうまでもない。

[0018] 上記主鎖としては、カルボキシル基を有する繰り返し単位で構成され、かつ、上記側鎖が適切に導入され得る限り、任意の適切な構成が採用され得る。上記繰り返し単位の元となるカルボキシル基含有モノマーの好ましい具体例としては、アミノ酸、ビニルモノマー、ジカルボン酸とジオール、単糖類等が挙げられる。本発明の効果が得られる限り、このようなモノマーは、単独で重合してもよく、複数のモノマーを共重合してもよい。したがって、上記主鎖の具体例としては、カルボキシル基を有するポリアミノ酸、カルボキシル基を有するポリビニル、カルボキシル基を有するポリエステル、カルボキシル基を有する多糖類、カルボキシル基を有する dendri mer（カスケードポリマー）およびその組み合わせが挙げられる。

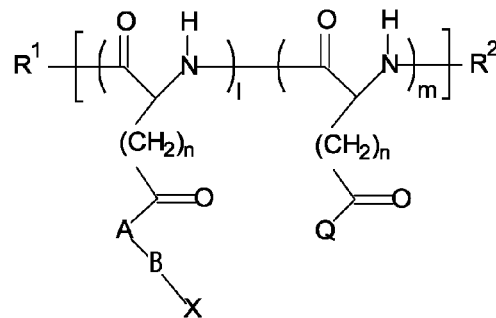
[0019] 上記生体内で開裂し得る結合としては、D D Sにおいて利用可能な任意の適切な化学結合が採用され得る。このような結合の代表例としては、ジスルフィド結合、アセタール結合、ケタール結合、ヒドラゾン結合、エノールエーテル結合、エノールエステル結合、アミド結合、イミン結合、イミニウム

結合、エナミン結合、シリルエーテル結合、シラザン結合、シリルエノールエーテル結合、ジオール結合、ジアゾ結合、エステル結合、スルホン結合、およびケイ素-炭素結合が挙げられる。好ましくは、ジスルフィド結合、アセタール結合、ヒドラゾン結合である。例えば、ジスルフィド結合（ $-S-S-$ ）は、還元的環境下において容易に開裂する。このような特性を利用することにより、細胞への高い *siRNA* 送達能を達成することができる。具体的には、生体内においては、グルタチオンの濃度差に起因して、細胞外では非還元的環境であり（約 $10 \mu M$ ）、細胞内では還元的環境である（約 $10 mM$ ）。したがって、本発明のアニオン性ポリマーを用いるポリオンコンプレックスおよび三元系ポリマー複合体（いずれも後述）は、標的細胞に達するまでは *siRNA* を内包した形態を安定して維持することができ、かつ、標的細胞に取り込まれた後は、ジスルフィド結合におけるイオウ原子間の結合が開裂することにより、*siRNA* を標的細胞内にスムーズかつ効率的に放出することができる。その結果、*RNAi* による遺伝子発現の抑制効率（ノックダウン効率）等を飛躍的に向上させることができる。また例えば、アセタール結合およびヒドラゾン結合は、細胞内外の pH の差により容易に開裂する。具体的には、生体内においては、細胞外の pH は約 7 であるのに対し、細胞内後期エンドソーム内の pH は 4~5 である。アセタール結合およびヒドラゾン結合は、細胞外では結合を維持し、細胞内後期エンドソーム内では容易に開裂する。その結果、ジスルフィド結合の場合と同様に、本発明のアニオン性ポリマーを用いるポリオンコンプレックスおよび三元系ポリマー複合体は、標的細胞に達するまでは *siRNA* を内包した形態を安定して維持することができ、かつ、標的細胞に取り込まれた後は、*siRNA* を標的細胞内にスムーズかつ効率的に放出することができる。以上のように、本発明のアニオン性ポリマーは、*siRNA* を上記特定の共有結合により固定化しているので、*siRNA* の送達手段としてのポリオンコンプレックスおよび三元系ポリマー複合体に用いる場合、生理的環境にて易分解性の不安定な化学種である *siRNA* を、標的細胞内に導入するまで極めて安

定な状態で保持することができ、しかも、細胞外から細胞内への環境変化に
 応答して効率的に s i R N A を放出する（細胞内に導入する）ことができる
 。特に、共有結合を介して複数の s i R N A を 1 つの高分子上に固定化する
 ことにより、静電相互作用により s i R N A 単体を内包する場合に比べて、
 格段に安定したポリイオンコンプレックスを形成することができる。さらに
 、ポリカルボン酸を有する繰り返し単位に、s i R N A を含む側鎖として s
 i R N A を導入することにより、s i R N A の導入量（含有量）が格段に多
 いポリイオンコンプレックスを形成することができる。以上のような効果が
 相乗的に発揮されることにより、本発明のアニオン性ポリマーを用いたポリ
 イオンコンプレックスおよび三元系ポリマー複合体は、s i R N A のインテ
 リジェントベクターとして、極めて有用性が高い。

[0020] 好ましくは、上記アニオン性ポリマーは、下記一般式（I）で表される：

[化5]



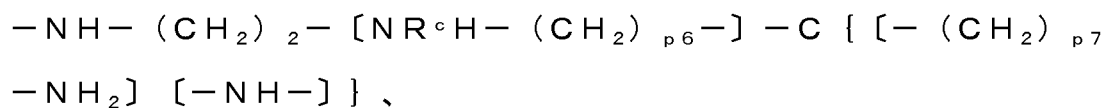
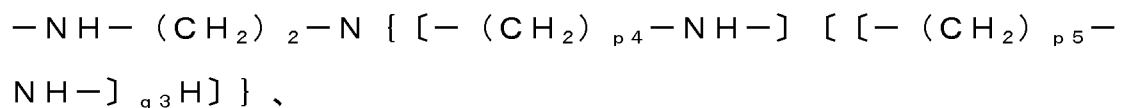
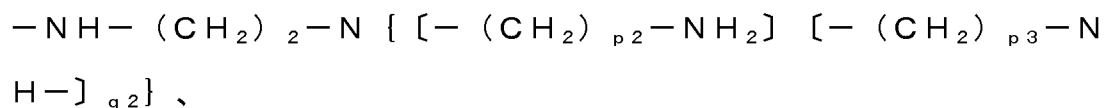
(I)

ここで、R¹およびR²は、それぞれ独立して、水素原子、あるいは非置換ま
 たは置換の直鎖状または分岐状C₁～C₁₂アルキル基、あるいはポリエチレン
 グリコール鎖であり、Aは、1つ以上のアミノエチル結合を有する残基であ
 り、Bは、生体内で開裂し得る結合であり、Qは、水酸基またはアミノエチ
 ル結合が水酸基により置換されているA由来の基であり、Xはs i R N A で
 あり、lは1～500の整数であり、mは1～499の整数であり、nは1
 ～5の整数であり、ただし、lとmの合計は10～500であり、lおよび

mで表される繰り返し単位はランダムに配列している。

[0021] 上記R¹およびR²についての上記非置換または置換の直鎖状または分岐状C₁~C₁₂アルキル基としては、代表的には、メチル基、エチル基、n-プロピル基、i s o-プロピル基、n-ブチル基、s e c-ブチル基、t e r t-ブチル基、n-ペンチル基、n-ヘキシル基、デシル基、ウンデシル基が挙げられる。置換された場合の置換基としては、アセタール化ホルミル基、シアノ基、ホルミル基、カルボキシル基、アミノ基、C₁~C₆アルコキシカルボニル基、C₂~C₇アシルアミド基、同一または異なるトリ（C₁~C₆アルキル）シロキシ基、シロキシ基およびシリルアミノ基が挙げられる。ポリエチレングリコール鎖としては分子量2000から20000の構造が挙げられる。

[0022] 本明細書においては、上記Aについての「1つ以上のアミノエチル結合を有する残基」とは、-NH-(CH₂)₂-の部分を含む残基をいう。このような残基の具体例としては、下記が挙げられる：



ここで、p₁~p₇、およびq₂~q₃は、それぞれ独立して、1~5の整数であり、q₁は0~5の整数であり、R^oは、水素原子、シス-アコニチル基またはシス-シトラコニル基である。

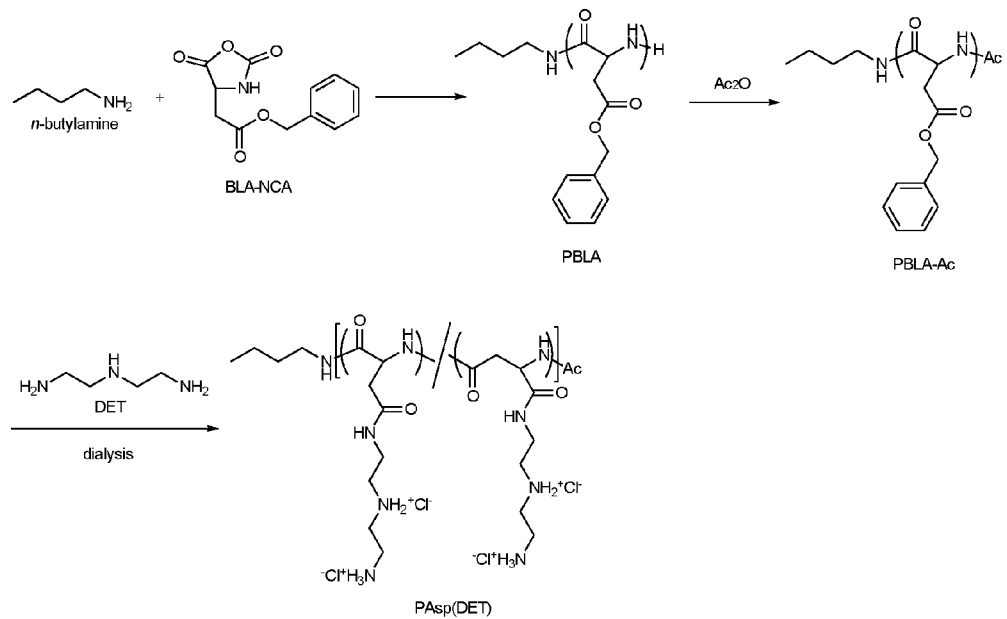
[0023] 1つの実施形態においては、上記Aは-NH-(CH₂)₂-であり、上記Qは-OHである。

[0024] 上記lとmの合計は、好ましくは50~500であり、さらに好ましくは80~220である。lは、好ましくは2以上の整数であり、さらに好まし

くは2~18の整数である。s i RNAの導入率（lとmの合計に対するlの比率に対応する）は、好ましくは3%~30%であり、さらに好ましくは3%~6%である。例えば、アニオン性ポリマーの重合度が100である場合には、ポリマー鎖1本に対して3個~30個のs i RNA分子が導入され得る。このように、本発明によれば、ポリマー鎖に複数のs i RNAを導入できるので、本発明のポリマーを用いてポリイオンコンプレックス（PIC）を形成する場合、静電相互作用によりs i RNAを内包するPICに比べて、s i RNAの含有量が格段に多くなる。その結果、s i RNAを大量に標的細胞に送達することができる。

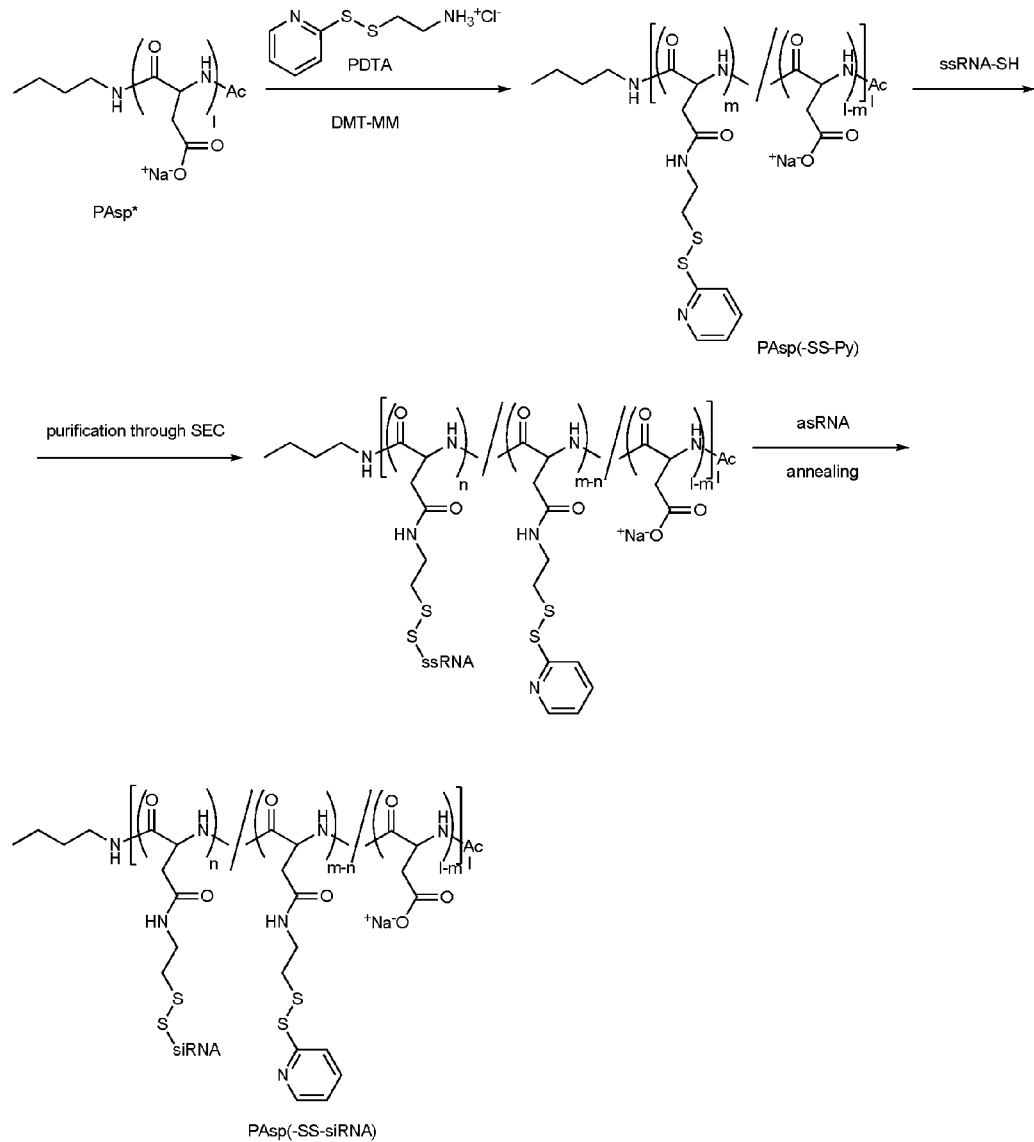
[0025] 一例として、主鎖としてポリアスパラギン酸を用い、カチオン性ポリマーとしてポリ（2-〔（2-アミノエチル）アミノ〕-エチル-アスパルタミド（pAsp（DET））を用いる場合の本発明のアニオン性ポリマーの製造方法を説明する。便宜上、pAsp（DET）の合成方法から説明する。公知の方法で合成したβ-ベンジル-L-アスパラギン酸のN-カルボキシ酸無水物（BLA-NCA）を、n-ブチルアミンにより開環重合し、ポリ（β-ベンジル-L-アスパラギン酸エステル）（PBLA）を合成する。PBLAは、代表的には、無水酢酸を用いてN末端をアセチル化することにより保護され得る（アセチル基で保護されたPBLAをPBLA-Acとも称する）。次に、ジエチレントリアミン（DET）を用いたPBLA-Acのベンジル基のアミノ加水分解により、PBLA-Acの側鎖にN-〔N-（2-アミノエチル）-2-アミノエチル〕を導入し、さらに、塩酸溶液で透析することにより、ポリ〔N-〔N-（2-アミノエチル）-2-アミノエチル〕アスパラギン酸アミド〕塩酸塩（pAsp（DET））が得られる。この反応スキームは下記の通りである。

[化6]



[0026] 次に、上記と同様にして得られたPBLAのベンジル基を脱保護し、ポリ(アスパラギン酸)ナトリウム塩(pAsp)を得る。一方、2, 2'-ジチオピリジンと2-アミノエタンチオール塩酸塩とを反応させて、2-(2-ピリジルジチオ)エチルアミン塩酸塩(PDTA)を得る。トリアジン系縮合剤DMT-MMを用いたpAsp中のカルボキシル基とPDTA中の1級アミノ基との縮合反応により、2-(2-ピリジルジチオ)エチルアミンで変性したポリ(アスパラギン酸)(pAsp(-SS-Py))を合成する。次いで、センス鎖RNA(ssRNA)を、ssRNA-SHの5'鎖末端のチオール基による置換反応によりpAsp(-SS-Py)に導入し、さらに、分子篩クロマトグラフィーで精製して、センス鎖RNAがグラフトされたpAsp[pAsp(-SS-ssRNA)]を得る。このpAsp(-SS-ssRNA)を、アンチセンス鎖RNA(asRNA)でアニールし、本発明のアニオン性ポリマーであるジスルフィド結合によりsiRNAがグラフトされたポリ(アスパラギン酸)[pAsp(-SS-siRNA)]を得る。この反応スキームは下記の通りである。

[化7]

[0027] B. ポリイオンコンプレックス

本発明のポリイオンコンプレックス（PIC）は、上記A項に記載の本発明のアニオン性ポリマーと、カチオン性ポリマーと、を含む。カチオン性ポリマーとしては、本発明のアニオン性ポリマーとPICを形成し得るかぎり、任意の適切なポリマーが採用され得る。カチオン性ポリマーの具体例としては、ポリエチレンジアミン、ポリアルギニン、ポリリジン、ポリ（2-〔2-アミノエチル〕アミノ）-エチルアスパルタミド（pAsp（DE

T))、ポリエチレングリコールとポリアルギニンとのブロック共重合体、ポリエチレングリコールとポリリジンとのブロック共重合体、および、ポリエチレングリコールとポリー(2-[(2-アミノエチル)アミノ]-エチル-アスパルタミドとのブロック共重合体(PEG-pAsp(DET))が挙げられる。

[0028] 上記PICは、上記アニオン性ポリマーと上記カチオン性ポリマーとの静電相互作用により形成される。さらに、例えばPEG-pAsp(DET)のようなPEGとカチオン性ポリマーとのジブロックコポリマーをカチオン性ポリマーとして使用した場合、カチオン鎖が静電的性質等に起因してアニオン性ポリマーとPICコアを形成し、水との親和性の高いPEG鎖がその周りを覆うシェルとなる、コア-シェル型のミセル構造を有するPICを形成する。この場合、当該コア部分にsiRNAが内包されたものとなる。

[0029] 上記PICの粒径は、目的に応じて適切に設定され得る。PICの粒径は、例えば60nm~200nmである。PICの粒径は、アニオン性ポリマーとカチオン性ポリマーとの組み合わせ、カチオン性ポリマーの分子量等を調整することにより制御することができる。

[0030] 本発明のPICは、非常に高いsiRNA会合度にて形成され得る。例えば、会合度の指標として拡散係数Dを用いると、HEPES緩衝液における本発明のPICの拡散係数Dは、対応するアニオン性ポリマー(本発明のアニオン性ポリマー)の拡散係数Dに対して、好ましくは1/10~1/20である。一方、モノマー性のsiRNAとカチオン性ポリマーとのPICの拡散係数Dは、siRNAの拡散係数Dに対して1/3程度である。このように、本発明によれば、グラフト化によってsiRNAを側鎖に導入することにより、モノマー性のsiRNAのPICに比べて格段に会合度の大きいPICを形成することができる。さらに、本発明のPICは、PICを構成するアニオン性ポリマー自体に非常に多くのsiRNAが導入されているので、上記会合度との相乗効果により、siRNAの送達量が格段に大きくなる。

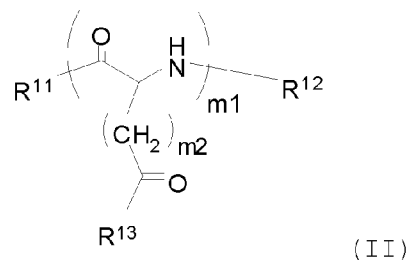
[0031] 本発明のPICは、例えばカチオン性ポリマーがpAsp (DET)である場合には、生理的条件下での安定性を向上させる観点からN/P比が2以上であることが好ましく、ポリマーによる毒性を抑制する観点からN/P比が200以下であることが好ましい。N/P比は、さらに好ましくは5~50、特に好ましくは7~30である。なお、N/P比とは、siRNAのリン酸基に対するpAsp (DET)の総アミノ基のモル比をいう。

[0032] C. 三元系ポリマー複合体

本発明の三元系ポリマー複合体は、上記B項に記載の本発明のポリイオンコンプレックス (PIC) と、電荷変換型ポリマーと、を含む。本発明に用いられる電荷変換型ポリマーは、中性条件下 (細胞外) では負電荷を帯び、酸性条件下 (細胞内後期エンドソーム内) では正電荷に変換される。したがって、本発明の三元系ポリマー複合体は、上記PICのカチオン性ポリマーと電荷変換型ポリマーとの静電相互作用により、PICから形成されたコア-シェル型ミセルの外表面が電荷変換型ポリマーで覆われた構造を有する。PICから形成されたミセルを電荷変換型ポリマーで覆うことにより、PIC単独の場合に比べて、より低毒性とより高いsiRNA送達率とを実現することができる。

[0033] 上記電荷変換型ポリマーは、下記一般式 (II) で表される：

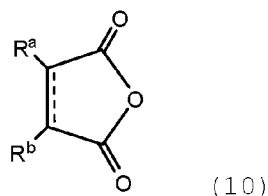
[化8]



R¹¹およびR¹²は、それぞれ独立して、水素原子、あるいは非置換または置換の直鎖状または分岐状C₁~C₁₂アルキル基、あるいはポリエチレングリコ

ール鎖であり、 R^{13} は、第1級アミンを有するアミン化合物由来の残基と下記式(10)で表される化合物またはその誘導体との結合体であり：

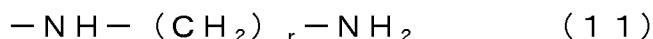
[化9]



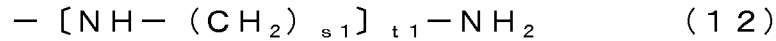
ここで、 R^a および R^b は、それぞれ独立して、水素原子、あるいは非置換または置換のアルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、アリール基、アラルキル基、アシル基、複素環基、複素環-アルキル基、水酸基、アルコキシ基またはアリーロキシ基であり、ただし、 R^a と R^b とが一緒になって、それぞれが結合している炭素原子とともに芳香族環またはシクロアルキル環を形成してもよく、 R^a および R^b が結合している炭素原子間の結合は単結合または二重結合であり、 m_1 は10～500の整数であり、 m_2 は1～5の整数である。

[0034] 上記式(10)において R^a および R^b が置換された場合の置換基としては、任意の適切な炭化水素基が挙げられる。より詳細には、炭化水素基は、飽和または不飽和の非環式炭化水素基、あるいは飽和または不飽和の環式炭化水素基であり得る。炭化水素基が非環式炭化水素基である場合には、直鎖状であってもよく分岐状であってもよい。炭化水素基の具体例としては、 C_1 ～ C_{20} アルキル基、 C_2 ～ C_{20} アルケニル基、 C_4 ～ C_{20} シクロアルキル基、 C_6 ～ C_{18} アリール基、 C_6 ～ C_{20} アラルキル基、 C_1 ～ C_{20} アルコキシ基、 C_6 ～ C_{18} アリーロキシ基が挙げられる。

[0035] 好ましくは、上記第1級アミンを有するアミン化合物由来の残基は、下記式(11)または(12)で表される：



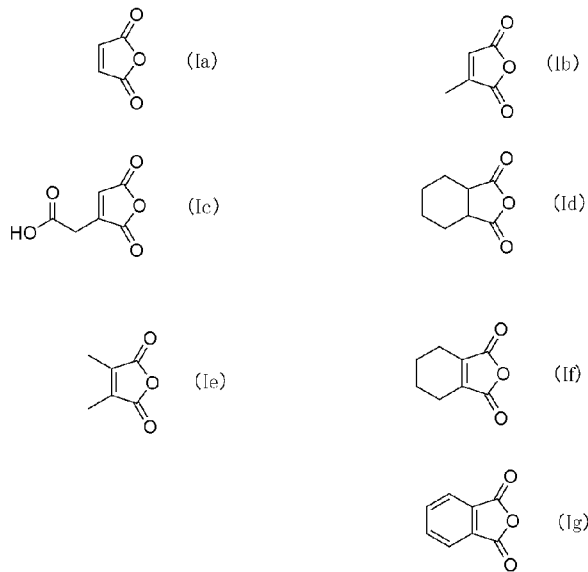
式(11)において、 r は0~5の整数であり；



式(12)において、 $s1$ は、 $[\text{NH}-(\text{CH}_2)_{s1}]$ ユニット間でそれぞれ独立して1~5の整数であり、 $t1$ は2~5の整数である。さらに好ましくは、上記第1級アミンを有するアミン化合物由来の残基は、 $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$ または $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$ である。

[0036] 好ましくは、上記式(10)で表される化合物は、下記式(Ia)~(Ig)で表される化合物から選択される少なくとも1つの化合物である：

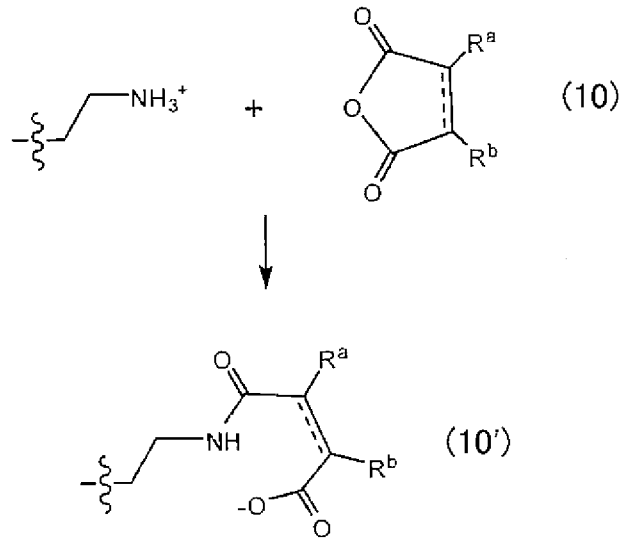
[化10]



[0037] 上記第1級アミンを有するアミン化合物由来の残基と上記式(10)で表される化合物またはその誘導体との結合体は、例えば、上記式(10)で表される化合物とアミン化合物のアミノ基とが結合(共有結合)して、下記式(10')に示されるような構造をとる。ここで、誘導体とは、上記式(10)を基本骨格として当該化合物から派生する任意の化合物をいう。例えば、上記式(Ic)で表される化合物のカルボキシル基をアルキル基としたも

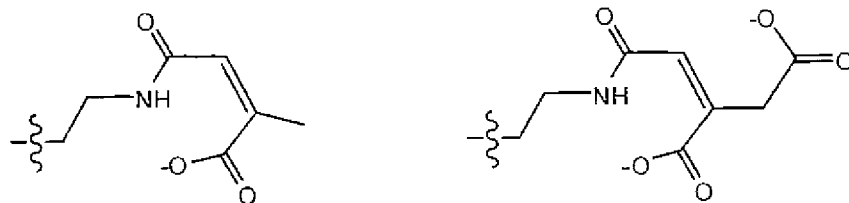
の、上記式 (I b) または (I e) で表される化合物のメチル基と他のアルキル基としたもの、上記式 (I d)、(I f) または (I g) 等で表される化合物の芳香環またはシクロアルキル環の少なくとも 1 個の炭素原子をハロゲン原子で置換したもの等が挙げられる。

[化11]



[0038] 上記結合体に関しては、例えば、上記式 (I) で表される化合物が上記式 (I b) または (I c) で表される化合物である場合、当該結合体の上記式 (10') で表される構造としては、以下のとおりである：

[化12]



[0039] D. 薬学組成物

本発明の薬学組成物は、上記B項に記載の本発明のポリオンコンプレックスと、薬学的に許容可能なキャリアとを含む。本発明の別の薬学組成物は、上記C項に記載の本発明の三元系ポリマー複合体と、薬学的に許容可能なキャリアとを含む。薬学的に許容されるキャリアとしては、目的とする投与

形式に応じて任意の適切なキャリアが採用され得る。具体例としては、希釈剤、賦形剤、精製水、脱イオン水、等張剤、pH調整剤、緩衝液、単糖、オリゴ糖、糖アルコール、ポリエチレングリコールが挙げられる。

実施例

[0040] 以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されない。以下の実施例において用いたRNA、5′鎖末端チオール化RNA、5′鎖末端Cy3標識化RNAは、北海道システム・サイエンス社により合成されたものである。RNAの配列は以下のとおりである：

(1) siScramble (チオール変性) : 5′-(HSC₆H₁₂-) UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT-3′ (センス鎖：配列番号1)、5′-ACGUGACACGUUCGGAGAA dTdT-3′ (アンチセンス鎖：配列番号2)；

(2) siLuc (チオール変性およびCy3標識化) : 5′-(HSC₆H₁₂-) CUUACGCUGAGUACUUCGA dTdT-3′ (センス鎖：配列番号3)、5′-(Cy3-) UCGAAGUACUCAGCGUAAG dTdT-3′ (アンチセンス鎖：配列番号4)。

[0041] <製造例1>

ポリ(β-ベンジル-L-アスパラギン酸エステル)の合成

β-ベンジル-L-アスパラギン酸エステル(以下、BLAと称する)のN-カルボキシ酸無水物(以下、BLA-NCAと称する)を、Bae Y, Nishiyama N, Kataoka K. In vivo antitumor activity of the folate-conjugated pH-sensitive polymeric micelle selectively releasing adriamycin in the intracellular acidic compartments. Bioconj Chem 2007;18:1131-1139に記載の手順にしたがって合成した。n-ブチルアミンにより上記BLA-NCAを開環重合し、次いで、無水酢酸を用いて開環重合体のN末端をアセチル化することにより、ポリ(β-ベンジル-L-アスパラギン酸エステル)(以下の製造例においては、N末端を保護されたものも

脱保護されたものも便宜的にPBLAと称する)を合成した。具体的には以下のとおりである:ジクロロメタン(DCM)(2.5mL)中のn-ブチルアミン(25.0 μ L、0.253mmol)を、ジメチルホルムアミド(DMF)(4.0mL)に溶解したBLA-NCA(6.9g、27.9mmol)に加え、アルゴン雰囲気下でDCM(36mL)により希釈し、次いで、35 $^{\circ}$ Cで48時間攪拌した。IRにおけるNCAのピークの消失によりモノマーが完全に消費されたのを確認した後、反応混合物に無水酢酸(100 μ L、1.06mmol)を加え、35 $^{\circ}$ Cで1時間攪拌し、PBLAの ω -末端の1級アミノ基を保護した。この溶液を過剰量のジエチルエーテルに注ぎ、PBLAを沈殿させた。回収したPBLAをDCM(500mL)に溶解し、次いで、このPBLA溶液にベンゼン(400mL)を加えた。DCMを蒸発させて除去した後、試料を凍結乾燥し、PBLAを得た(4.35g、収率63%)。分子篩クロマトグラフィー(SEC)によれば、得られたPBLAの分子量分布(M_w/M_n)は1.1であった。さらに、 1H NMRによれば、得られたPBLAの重合度は95であった。

[0042] <製造例2>

ポリ[N-{N-(2-アミノエチル)-2-アミノエチル}アスパラギン酸アミド]塩酸塩の合成

ジエチレントリアミン(DET)を用いたPBLAのベンジル基へのアミノリシスにより、PBLAの側鎖にN-{N-(2-アミノエチル)-2-アミノエチル}を導入した。具体的には以下のとおりである:DCM(5mL)およびベンゼン(20mL)の混合物から凍結乾燥したPBLA(103mg、4.95 μ m)を、アルゴン雰囲気下でNMP(10mL)に溶解した。また、DET(2.4mL、23.5mmol、PBLAのベンジル基に対して50当量)をNMP(10mL)に溶解した。次いで、このDET溶液に上記PBLA溶液を加え、アルゴン雰囲気下、0 $^{\circ}$ Cで1時間攪拌した。反応した溶液を0 $^{\circ}$ Cの1M HCl水溶液(50mL)に滴下して中和し、次いで、分画分子量が6000~8000Daの透析膜を用いて、0.

0.1 M HCl水溶液に対して24時間、さらに脱イオン水に対して24時間透析した。透析した溶液を凍結乾燥し、ポリ〔N-〔N-(2-アミノエチル)-2-アミノエチル〕アスパラギン酸アミド〕塩酸塩（以下、pAsp(DET)と称する）を得た（98.0 mg、収率79%）。¹H NMR（D₂O）により、PBLAからpAsp(DET)への定量的な変換を確認した。

[0043] <製造例3>

ポリ（アスパラギン酸）ナトリウム塩の合成

PBLA側鎖のベンジルエステル基を脱保護し、ポリ（アスパラギン酸）ナトリウム塩（以下、pAspと称する）を得た。具体的には以下のとおりである：凍結乾燥したPBLA（98.0 mg、4.71 μmol）を0.1 M NaOH水溶液（5 mL）に溶解し、次いで、空気雰囲気下、室温で1時間攪拌した。この溶液を、分画分子量が6000~8000 Daの透析膜を用いて、脱イオン水に対して48時間透析し、次いで、凍結乾燥してpAspを得た（52.3 mg、収率85%）。¹H NMR（D₂O）により、脱保護が完了したことを確認した。

[0044] <製造例4>

2-（2-ピリジルジチオ）エチルアミン塩酸塩の合成

2, 2'-ジチオジピリジン（11 g、50 mmol）を、氷酢酸（8 mL）を含むメタノール（75 mL）に溶解した。この溶液に、2-アミノエタンチオール塩酸塩（1.14 g、10 mmol）のメタノール（20 mL）溶液を、アルゴン雰囲気下で30分かけて滴下した。反応混合物を、アルゴン雰囲気下、室温でさらに24時間攪拌し、次いで減圧下で濃縮して黄色の油状物（10~15 mL）を得た。この油状物を過剰量のジエチルエーテルに滴下して沈殿させ、次いで、メタノール（20 mL）に再度溶解した。この沈殿サイクルを複数回繰り返して未反応の2, 2'-ジチオジピリジンを除去し、無色の固体として2-（2-ピリジルジチオ）エチルアミン塩酸塩（以下、PDTAと称する）を得た。¹H NMR（D₂O）により、PD

TAを同定した。

[0045] <製造例5>

2-(2-ピリジルジチオ)エチルアミンで変性したポリ(アスパラギン酸)の合成

側鎖を2-(2-ピリジルジチオ)エチルアミンで変性したポリ(アスパラギン酸) (pAsp(-SS-Py))を、pAsp中のカルボキシル基とPDTA中の1級アミノ基との縮合反応により合成した。pAsp(20.0mg、Asp残基:0.146mmol)の水(3mL)溶液を、トリアジン系縮合剤DMT-MM(8.07mg、0.0292mmol)の水(1mL)溶液と混合した。このpAsp溶液を空気雰囲気下の室温で30分間置いた後、PDTA(7.81mg、0.0350mmol)の水(1mL)溶液を加え、空気雰囲気下の室温で3時間攪拌した。生成物を、脱イオン水に対する48時間の透析(4回)(分画分子量:3500Da)により精製し、凍結乾燥により回収した(21.8mg、収率95%)。¹H NMR(D₂O)によれば、pAspのカルボキシレート側鎖に対するピリジル基の導入率は15%であった。これは、pAsp鎖1本について約14のピリジルスルフィド部分が導入されたことに相当する。

[0046] <実施例1>

ジスルフィド結合によりsiRNAがグラフトされたポリ(アスパラギン酸)の合成

センス鎖RNA(ssRNA)を、ssRNA-SHの5'鎖末端のチオール基による置換反応によりpAsp(-SS-Py)に導入し、次いで、分子篩クロマトグラフィーで精製して、未反応の生成物および2-チオピリドンを除去した。センス鎖RNAがグラフトされたpAsp[pAsp(-SS-ssRNA)]を、アンチセンス鎖RNA(asRNA)またはCy3で標識されたasRNA(Cy3-asRNA)でアニールし、最終生成物であるジスルフィド結合によりsiRNAがグラフトされたポリ(アスパラギン酸)[pAsp(-SS-siRNA)]を得た。概略的なプロトコ

ルは以下のとおりである：pA_{sp} (−SS−Py) (0.302mg、0.0200mmol) と s s RNA−SH (2.00mg、0.300mmol、ピリジル基に対して1当量) とを500mM NaClを含む10mM HEPES (pH7.3) 5mLに溶解し、空気雰囲気下の暗所で24時間攪拌した。粗生成物を分子篩クロマトグラフィー (SEC) により精製した。SECのチャートから計算したところ、ピリジジスルフィド基からジスルフィド結合を有する s s RNAへの置換度は30%であった。これは、pA_{sp}鎖1本について約4個の s s RNA分子が導入されたことに相当する。次に、AmiconUltra15 (Millipore社製、分画分子量：3000Da) を用いた遠心限外ろ過を繰り返して上記で得られた pA_{sp} (−SS−s s RNA) を脱塩し、次いで、a s RNAでアニールした。アニールは、pA_{sp} (−SS−s s RNA) と a s RNAとの混合物を暗所において95°Cで10分間加熱し、次いで、暗所で室温まで徐冷することにより行った (1.24mg、収率83%)。

上記と同様にして、pA_{sp} (−SS−s s RNA) をCy3−a s RNAでアニールして、Cy3で標識されたpA_{sp} (−SS−s i RNA) [pA_{sp} (−SS−Cy3−s i RNA)] を得た。

[0047] <実施例2>

ポリカチオン (pA_{sp} (DET)) と pA_{sp} (−SS−s i RNA) とからのポリイオンコンプレックスの調製

ポリカチオン (カチオン性ポリマー) として pA_{sp} (DET) を用い、pA_{sp} (DET) と pA_{sp} (−SS−s i RNA) とからポリイオンコンプレックス (PIC) をN/P比=20で調製した。ここで、N/P比は、s i RNAのリン酸基に対する pA_{sp} (DET) の総アミノ基のモル比である。具体的には、10mM HEPES緩衝液 (pH7.3) 中の pA_{sp} (−SS−s i RNA) 溶液 (s i RNA濃度=15μM) 20μLを、同じ緩衝液中の pA_{sp} (DET) 溶液10μLと混合し、4°Cで終夜インキュベートした (最終 s i RNA濃度=10μM)。

[0048] <実施例 3 >

ポリカチオン (PEI) と pAsp (-SS-siRNA) とからのポリイオンコンプレックスの調製

ポリカチオンとして直鎖状ポリエチレンイミン (PEI) 系の市販のトランスフェクション試薬である ExGen 500 を用いたこと以外は実施例 2 と同様にして PIC を調製した。

[0049] <実施例 4 >

ポリカチオン (PEI) と pAsp (-SS-siRNA) とからのポリイオンコンプレックスの調製

ポリカチオンとして PEI ($M_w = 22000$) を用い、N/P 比 = 6 としたこと以外は実施例 2 と同様にして PIC を調製した。

[0050] <実施例 5 >

ポリカチオン (PEG-pAsp (DET)) と pAsp (-SS-siRNA) とからのポリイオンコンプレックスの調製

ポリカチオンとして PEG-pAsp (DET) を用いたこと以外は実施例 2 と同様にして PIC を調製した。ここで、PEG-pAsp (DET) は、ポリエチレングリコール ($M_w = 12000$) と pAsp (DET) ($M_w = 20000$) とのブロック共重合体である。

[0051] <比較例 1 >

pAsp (-SS-siRNA) の代わりにモノマー性 siRNA を用いたこと以外は実施例 2 と同様にして、PIC を調製した。

[0052] <比較例 2 >

pAsp (-SS-siRNA) の代わりにモノマー性 siRNA を用いたこと以外は実施例 3 と同様にして、PIC を調製した。

[0053] <比較例 3 >

pAsp (-SS-siRNA) の代わりにモノマー性 siRNA を用いたこと以外は実施例 4 と同様にして、PIC を調製した。

[0054] <比較例 4 >

pA s p (- S S - s i R N A) の代わりにモノマー性 s i R N A を用いたこと以外は実施例 5 と同様にして、P I C を調製した。

[0055] <評価 1 >

pA s p (- S S - s i R N A) のポリアクリルアミドゲル電気泳動

実施例 1 で得られた pA s p (- S S - s i R N A) を、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (P A G E) に供した。その結果、モノマー性 s i R N A の位置にはバンドは観察されず、一方で、高分子側に複数のバンドが観察された (図 1) 。このことから、s i R N A が pA s p の側鎖に導入され、s i R N A グラフト化ポリマーが形成されたことが示唆される。この pA s p (- S S - s i R N A) 溶液に還元剤ジチオトレイトール (D T T) を添加すると、高分子側のバンドが消失し、モノマー性 s i R N A のバンドが再度出現した。このことから、還元環境下におけるジスルフィド結合の開裂により s i R N A が放出されたことがわかる。

[0056] <評価 2 >

P I C の蛍光相関分光法測定

s i R N A の代わりに C y 3 - s i R N A を用いたこと以外は比較例 1 と同様にして P I C を調製した。得られた P I C を、s i R N A 濃度が 1 0 0 n M となるまで H E P E S 緩衝液、5 0 m M の D T T を含む H E P E S 緩衝液、1 0 % F B S を含む D M E M 、または、1 0 % F B S および 5 0 m M の D T T を含む D M E M でそれぞれ希釈し、試料を作成した。D T T を含む試料については、希釈後、4 ° C で終夜インキュベートした。また、pA s p (- S S - s i R N A) の代わりに pA s p (- S S - C y 3 - s i R N A) を用いたこと以外は実施例 2 と同様にして P I C を調製した。この P I C についても上記と同様にして試料を作成した。以下、C y 3 で標識された P I C については、対応する実施例および比較例の番号に準じて、例えば「実施例 2 の標識化 P I C 」のように記載する。

上記で得られた試料について、C a r l Z e i s s 社製 L S M - 5 1 0 - M E T A を用いて蛍光相関分光法 (F C S) 測定を行った。測定は、室温

、サンプリング時間20秒で10回繰り返した。それぞれの試料について、拡散係数Dを求めた。結果を表1に示す。

[表1]

	HEPES	Culture medium
PAsp(-SS-Cy3-siRNA)	28.8 ± 0.2	33.2 ± 0.3
PAsp(-SS-Cy3-siRNA)/PAsp(DET)	2.17 ± 0.19	1.57 ± 0.05
PAsp(-SS-Cy3-siRNA)/PAsp(DET) + DTT	30.6 ± 0.3	54.8 ± 0.7
monomeric Cy3-siRNA	66.1 ± 0.8	68.4 ± 0.9
monomeric Cy3-siRNA/PAsp(DET)	24.0 ± 0.2	66.6 ± 0.8

表1から明らかなように、HEPES緩衝液中、実施例2の標識化PICの拡散係数Dは、実施例1の標識化ポリマーのDの約1/14である。一方、比較例1の標識化PICの拡散係数Dは、モノマー性Cy3-siRNAのDの約1/3にすぎない。このことから、本発明の実施例のPICでは、比較例のPICに比べて、会合度が格段に大きいことが示唆される。さらに、培地(DMEM)中の比較例1の標識化PICの拡散係数Dは、HEPES緩衝液中のDの約3倍の大きさであり、かつ、フリーのモノマー性Cy3-siRNAのD(培地中および緩衝液中のいずれも)に近い。このことは、HEPES緩衝液中で調製された比較例1の標識化PICが、高いイオン強度および血清蛋白との相互作用に起因して、培地中で崩壊していることが示唆される。一方、実施例2のPICの拡散係数Dは培地中でも緩衝液中でも同等であり、当該PICは培地中であっても安定であることが示唆される。ところが、DTTを含む還元環境下においては、実施例2のPICの培地中のDは、フリーのモノマー性Cy3-siRNAのDと同程度まで増加しており、pAsp(-SS-Cy3-siRNA)のジスルフィド結合の開裂

によりCy3-siRNAがPICから放出されたことが示唆される。

[0057] <評価3>

ポリアニオン交換反応に対するPICの安定性

0.1 μ gのモノマー性siRNAを含む比較例1のPIC溶液(2 μ L)を、ヘパリン溶液(HEPES緩衝液3 μ L中、0、0.5、1.0、1.5、2.0または2.5 μ g)と混合し、次いで、室温で30分間インキュベートした。各溶液のヘパリンの最終濃度は、それぞれ、0、0.1、0.2、0.3、0.4または0.5 μ g/ μ Lであった。0.1 μ gのpAsp(-SS-siRNA)を含む実施例2のPICについても同様にして溶液を作成した。さらに、これらのそれぞれの溶液にDTTを加えた溶液も作成した。作成したそれぞれの溶液についてPICの安定性を、アガロースゲル電気泳動により分析した。結果を図2A~図2Cに示す。実施例2のPICからsiRNAを完全に放出するには0.4 μ g/ μ Lのヘパリンが必要であり(図2B)、これは、比較例1のPICからsiRNAを完全に放出するに必要なヘパリンの量(0.2 μ g/ μ L:図2A)の2倍であった。一方、DTTの存在下においては、実施例2のPICからsiRNAを完全に放出するには0.2 μ g/ μ Lのヘパリンで十分であり(図2C)、これは、比較例1のPICからsiRNAを完全に放出するに必要なヘパリンの量と同等であった。これらの結果から、siRNAをpAsp骨格にグラフトすることにより、PICの安定性を高めることができることがわかる。その結果、酸化還元電位に応じて、本発明のPICからsiRNAをスムーズかつ選択的に放出することができる。

[0058] <評価4>

細胞によるsiRNAの取り込み

B16F10マウスメラノーマ細胞による実施例2のPICまたは比較例1のPICの取り込みをフローサイトメトリーにより調べた。具体的には以下のとおりである。ルシフェラーゼを発現するマウスメラノーマ細胞B16F10-Luc(Caliper LifeScience社)を12ウェ

ル培養プレートに播種し（20000細胞/ウェル）、次いで、10% FBSを含むDMEM（1mL/ウェル）中で24時間インキュベートした。モノマー性Cy3-siRNA、PA_{sp}（-SS-Cy3-siRNA）、またはそれらのPA_{sp}（DET）PIC（すなわち、実施例2および比較例1の標識化PIC）を各ウェルに適用した（最終siRNA濃度=100nM）。12時間後、細胞をPBSで3回洗浄し、トリプシン処理により回収した。回収した細胞を100gで遠心分離し、PBS中に再懸濁した。BD Bioscience社製、BD LSR装置を用いて蛍光強度を調べた。実施例2の標識化PICでインキュベートした細胞は、比較例1の標識化PICでインキュベートした細胞の5倍の蛍光強度を示した（図3Aおよび図3B）。この結果から、siRNAをpA_{sp}骨格にグラフトすることにより、細胞のsiRNAの取り込みが顕著に改善されることがわかる。これは、培地中であっても安定なPICが形成されることに起因すると推察される。

[0059] <評価5>

細胞内のsiRNAの分布

B16F10-Luc細胞をガラス皿に播種し（10% FBSを含むDMEM 0.2mL中に20000細胞）、24時間インキュベートした。次いで、比較例1のPICまたは実施例2のPICを各ウェルに適用し（最終siRNA濃度=100nM）、さらに12時間インキュベートした。酸性の後期エンドソームおよびリソソームをLysoTracker Greenで、細胞核をHoechst 33342で染色した後、共焦点レーザー走査顕微鏡（CLSM）観察を行った。結果を図4Aおよび図4Bに示す。図示された顕微鏡画像は、赤色および黄色の画素を有する。これらは、それぞれ、細胞質領域およびLysoTracker Greenで染色された後期エンドソーム/リソソームからのCy3信号に対応する。

実施例2のPICでインキュベートした細胞は、Cy3-siRNA由来の蛍光画素（赤色および黄色の画素として観察される）の数が、比較例1のP

ICでインキュベートした細胞よりも多かった（図4Aおよび図4B）。このことは、上記フローサイトメトリーの結果と合致している。さらに、実施例2のPICでインキュベートした細胞においては、黄色画素に比べて格段に多くの赤色画素が明確に観察される。このことから、Cy3-siRNAがエンドソームから細胞質へと効果的に移行していることが示唆される。次いで、CLSM画像における赤色画素および黄色画素の数を基にCy3-siRNAと後期エンドソーム/リソソームとの共存比を計算することにより、エンドソームから細胞質への移行効率を評価した（図4C）。共存比は、実施例2のPICで処理された細胞については約30%であり、一方、比較例1のPICで処理された細胞については約60%であった。このことから、比較例1のPICに比べて、実施例2のPICの方がより効率的にエンドソームから移行していることがわかる。実施例2のPICにおけるこのような優れたエンドソームからの移行は、効率的な細胞によるsiRNAの取り込み（上記評価4）と整合している。

[0060] <評価6>

PICの遺伝子抑制効果および細胞毒性

B16F10-Luc細胞を24ウェルプレートに播種し（10000細胞/ウェル）、10%FBSを含むDMEM（0.5mL/ウェル）中で24時間インキュベートした。次いで、モノマー性Cy3-siRNA、実施例1のアニオン性ポリマー、またはそれらのpAsp（DET）PIC（すなわち、実施例2および比較例1のPIC）を各ウェルに適用した（最終siRNA濃度=100nM）。48時間後、細胞を0.5mLのPBSで洗浄し、Promega社製の細胞培養溶解緩衝液0.2mLで溶解した。可溶化液のルシフェラーゼ活性を、Promega社製のLuciferase Assay SystemおよびBerthold Technologies社製のMithras LB 940を用いたフォトルミネセンス強度から決定した。siRNAを含まない対照ウェルに対するパーセントとして、得られたルミネセンス強度から相対発光強度単位（RLU）を計算

した。図5Aは、ルシフェラーゼ（s i L u c、標的配列）に対するs i R N Aまたはネガティブコントロール（s i S c r a m b l e、非標的配列）に対するs i R N Aを含むP I Cで48時間インキュベートした後の細胞からのR L Uを示す。実施例2のP I Cの遺伝子抑制効率は約80%であり、比較例1のP I Cの遺伝子抑制効率（約30%）よりも格段に高かった。さらに、ポリカチオンがP E Iである実施例3のP I Cおよび比較例2のP I Cについても同様の結果が得られた（図6）。このことから、本発明のアニオン性ポリマーを用いることによる効果は、ポリカチオンがp A s p（D E T）であるP I Cに限定されないことがわかる。さらに、p A s p（-S S -s i S c r a m b l e）またはモノマー性s i S c r a m b l e由来のP I Cはルシフェラーゼ発現の減少を示さず、上記遺伝子抑制が標的に特異的であることが確認された。

[0061] モノマー性s i R N A、実施例1のアニオン性ポリマー、またはそれらのp A s p（D E T） P I C（すなわち、実施例2および比較例1のP I C）の細胞毒性を、上記遺伝子抑制試験と同様の条件下のM T Tアッセイにより調べた（図5B）。その結果、実施例2のP I Cを含む調べた系はすべて、細胞生存率の有意な減少を示さなかった。

[0062] <評価7>

I F N - α 産生についての評価

上記評価6の遺伝子抑制試験と同様の条件において、モノマー性s i R N AをB 1 6 F 1 0 - L u c、p A s p（-S S -s i R N A）、p o l y（I）：p o l y（c）またはそれらのp A s p（D E T） P I Cで48時間インキュベートした（各ウェルへのp o l y（I）：p o l y（c）のトランスフェクション量=650ng（s i R N A重量と同量）、p o l y（I）：p o l y（c）／p A s p（D E T） P I CについてのN／P比=20）。次いで、各ウェルの培地100 μ Lを回収し、酵素免疫測定法（E L I S A）によりインターフェロン α 産生を評価した。p o l y（I）：p o l y（c）およびそのp A s p（D E T） P I Cはポジティブコント

ロールとして用いた。なお、poly (I) : poly (C) は、シグマアルドリッチ社から購入した。ELISA試験には、マウスインターフェロン α ELISAキット (PBL Interferon Source社製) を製造者プロトコルにしたがって用いた。結果を図7に示す。INF- α 産生に関して、非処理細胞と実施例2のPICで処理された細胞との間で違いは認められなかった。一方、poly (I) : poly (C)、特にそのpAsp (DET) PICは、明らかにINF- α 産生を刺激した。

[0063] <評価8>

遺伝子抑制効果の鎖長依存性

ExGen500をポリカチオンとして用い、当該ポリカチオンとモノマー性siRNA、pAsp₁₀₀ (-SS-siRNA) またはpAsp₂₀₀ (-SS-siRNA) とからPICを形成した。ここで、pAsp₁₀₀ (-SS-siRNA) は製造例6で得られたものであり、pAsp₂₀₀ (-SS-siRNA) は、製造例1に準じて得られた重合度195のPBLAを用い、製造例6と同様にして得られたものである。PICは、N/P比=6で、製造者プロトコルにしたがって形成した。pAsp₁₀₀ (-SS-siRNA) の1分子にはsiRNA分子が平均4個含まれており、pAsp₂₀₀ (-SS-siRNA) の1分子にはsiRNA分子が平均8個含まれている。

B16F10-Lucを発現するマウスメラノーマ細胞を24ウェルプレートに播種し(10000細胞/ウェル)、24時間インキュベートした。PICを図8に示すsiRNA濃度で各ウェルに適用し、さらに48時間インキュベートした。その後、ルシフェラーゼ活性を、評価6と同様にしてフォトルミネセンス強度から決定した。結果を図8に示す。この図から、より長いpAsp鎖を用いることにより、より効率的な遺伝子抑制効果が得られることが示唆される。

[0064] <評価9>

ノックダウンアッセイ(1)

ホタルルシフェラーゼを発現するプラスミドDNA (pGL3) およびウ

ミシイタケルシフェラーゼを発現するプラスミドDNA (pRL) を、遺伝子導入用カチオン性脂質 Lipofectamin 2000 (インビトロジェン社製) を用い、製造者プロトコルにしたがって、培養されたヒト肝癌細胞 (Huh-7) にトランスフェクトした。本評価におけるノックダウンの標的遺伝子は pGL3 であり、コントロールは pRL である。プラスミドDNA のトランスフェクションから 4 時間後、培地を新しい培地に取り替え、次いで、実施例 2 の PIC をトランスフェクトした (siRNA 濃度 = 10 ~ 50 nM)。さらに 44 時間インキュベートした後、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega 社製) を用いて、ルシフェラーゼの量を定量化した (図 9 A)。さらに、比較例 1 の PIC を用いたこと以外は上記と同様にしてルシフェラーゼの量を定量化した (図 9 B)。図 9 A から明らかなように、実施例 2 の PIC は、pRL の発現に影響を与えることなく pGL3 の発現のみを抑制した。このことから、実施例 2 の PIC は、細胞のホメオスタシスに悪影響を与えないことが示唆される。一方、図 9 B から明らかなように、比較例 1 の PIC は、pGL3 の発現を有意に抑制しなかった。

[0065] GL3 ルシフェラーゼ遺伝子の安定発現株であるマウスメラノーマ細胞 (B16F10-Luc) で、遺伝子ノックダウンアッセイを行った。コントロールとして、EGFP 配列を導入した pAsp (-SS-siEGFP) を用いた。当該細胞を、複数の N/P 比および siRNA の最終濃度が 100 nM の実施例 2 に対応する PIC または比較例 1 に対応する PIC でトランスフェクトした。トランスフェクションから 48 時間後、上記と同様にしてルシフェラーゼの量を定量化した (図 10 A および図 10 B)。図 10 A から明らかなように、実施例 2 に対応する PIC は、N/P 比が 4 以上で、GL3 の発現を顕著に抑制した。この結果から、実施例 2 に対応する PIC は、細胞毒性を示すことなく配列特異的な遺伝子ノックダウン効果を示すことがわかる。一方、図 10 B から明らかなように、比較例 1 に対応する PIC は、GL3 の発現を有意に抑制しなかった。

[0066] ノックダウンアッセイ（２）

実施例４および比較例３のPICを用いたこと以外は上記ノックダウンアッセイ（１）と同様にして試験を行った。実施例４に対応するPICについての結果を図１１Ａに、比較例３に対応するPICについての結果を図１１Ｂに示す。図１１Ａから明らかなように、実施例４に対応するPICは、pRLに比べてGL３の発現をより効果的に抑制した。一方、図１１Ｂから明らかなように、比較例３に対応するPICは、GL３の発現を特異的に抑制しなかった。

[0067] ノックダウンアッセイ（３）

実施例５のPICを用いたこと以外は上記ノックダウンアッセイ（１）と同様にして試験を行った。結果を図１２に示す。図１２から明らかなように、pAsp（-SS-siGL３）からのPICは、N/P比が４以上で大きくなるにしたがって、GL３の発現を抑制した。一方、pAsp（-SS-siEGFP）からのPICは、GL３の発現に変化がなかった。これらの結果から、本発明の実施例のPICは、低い細胞毒性で、細胞特異的な遺伝子ノックダウン効果を有することがわかる。

産業上の利用可能性

[0068] 本発明のアニオン性ポリマー、ポリイオンコンプレックス、三元系ポリマー複合体、および薬学組成物は、製薬、医療等の分野で好適に用いられ得る。

配列表フリーテキスト

[0069] 配列番号１：ネガティブコントロールに対するセンス鎖 siRNA

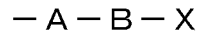
配列番号２：ネガティブコントロールに対するアンチセンス鎖 siRNA

配列番号３：ルシフェラーゼに対するセンス鎖 siRNA

配列番号４：ルシフェラーゼに対するアンチセンス鎖 siRNA

請求の範囲

[請求項1] カルボキシル基を有する繰り返し単位で構成される主鎖と、該主鎖のカルボキシル基の1部に結合した、下記式で表される側鎖と、を含む、アニオン性ポリマー：



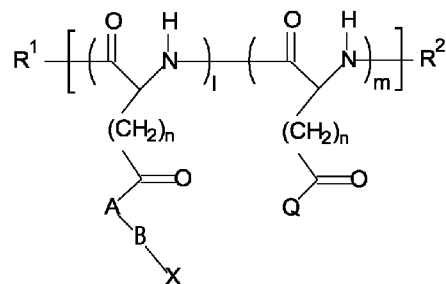
ここで、Aは、1つ以上のアミノエチル結合を有する残基であり、Bは、生体内で開裂し得る結合であり、Xは低分子RNAである。

[請求項2] 前記主鎖が、カルボキシル基を有するポリアミノ酸、カルボキシル基を有するポリビニル、カルボキシル基を有するポリエステル、カルボキシル基を有する多糖類、カルボキシル基を有する dendrimer (カスケードポリマー) およびその組み合わせで構成される、請求項1に記載のアニオン性ポリマー。

[請求項3] 前記生体内で開裂し得る結合が、ジスルフィド結合、アセタール結合およびヒドラゾン結合から選択される結合である、請求項1または2に記載のアニオン性ポリマー。

[請求項4] 下記一般式(I)で表される、請求項1から3のいずれかに記載のアニオン性ポリマー：

[化1]



(I)

ここで、R¹およびR²は、それぞれ独立して、水素原子、あるいは非置換または置換の直鎖状または分岐状C₁~C₁₂アルキル基、あるいはポリエチレングリコール鎖であり、Aは、1つ以上のアミノエチ

ル結合を有する残基であり、Bは、生体内で開裂し得る結合であり、Qは、水酸基またはアミノエチル結合が水酸基により置換されているA由来の基であり、Xは低分子RNAであり、lは1～500の整数であり、mは1～499の整数であり、nは1～5の整数であり、ただし、lとmの合計は10～500であり、lおよびmで表される繰り返し単位はランダムに配列している。

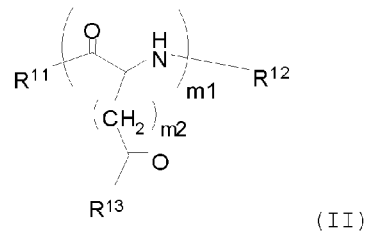
[請求項5] 前記一般式(I)におけるAが $-NH-(CH_2)_2-$ であり、Qが $-OH$ である、請求項4に記載のアニオン性ポリマー。

[請求項6] 前記一般式(I)におけるlが2以上の整数である、請求項4または5に記載のアニオン性ポリマー。

[請求項7] 請求項1から6のいずれかに記載のアニオン性ポリマーと、
 ポリエチレンイミン、ポリアルギニン、ポリリジン、ポリ(2-[(2-アミノエチル)アミノ]エチル-アスパルタミド(pAsp(DET)))、ポリエチレングリコールとポリアルギニンとのブロック共重合体、ポリエチレングリコールとポリリジンとのブロック共重合体、および、ポリエチレングリコールとポリ(2-[(2-アミノエチル)アミノ]エチル-アスパルタミド)とのブロック共重合体(PEG-pAsp(DET))からなる群から選択されるカチオン性ポリマーと
 を含む、ポリイオンコンプレックス。

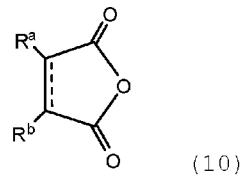
[請求項8] 請求項7に記載のポリイオンコンプレックスと、下記一般式(II)で表される電荷変換型ポリマーと、を含む、三元系ポリマー複合体
 :

[化2]



R¹¹およびR¹²は、それぞれ独立して、水素原子、あるいは非置換または置換の直鎖状または分岐状C₁～C₁₂アルキル基、あるいはポリエチレングリコール鎖であり、R¹³は、第1級アミンを有するアミン化合物由来の残基と下記式(10)で表される化合物またはその誘導体との結合体であり：

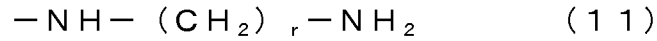
[化3]



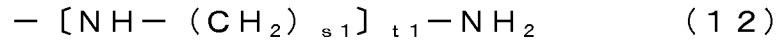
ここで、R^aおよびR^bは、それぞれ独立して、水素原子、あるいは非置換または置換のアルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、アリール基、アラルキル基、アシル基、複素環基、複素環-アルキル基、水酸基、アルコキシ基またはアリールオキシ基であり、ただし、R^aとR^bとが一緒になって、それぞれが結合している炭素原子とともに芳香族環またはシクロアルキル環を形成してもよく、R^aおよびR^bが結合している炭素原子間の結合は単結合または二重結合であり、

m₁は10～500の整数であり、m₂は1～5の整数である。

[請求項9] 前記第1級アミンを有するアミン化合物由来の残基が下記式(11)または(12)で表される、請求項8に記載の三元系ポリマー複合体:



式(11)において、 r は0~5の整数であり;

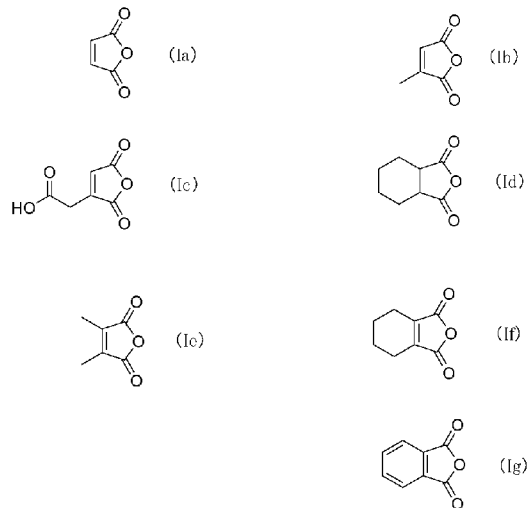


式(12)において、 $s1$ は、 $[NH-(CH_2)_{s1}]$ ユニット間でそれぞれ独立して1~5の整数であり、 $t1$ は2~5の整数である。

[請求項10] 前記第1級アミンを有するアミン化合物由来の残基が、 $-NH-(CH_2)_2-NH_2$ または $-NH-(CH_2)_2-NH-(CH_2)_2-NH_2$ である、請求項8に記載の三元系ポリマー複合体。

[請求項11] 前記式(10)で表される化合物が、下記式(Ia)~(Ig)で表される化合物から選択される少なくとも1つの化合物である、請求項8に記載の三元系ポリマー複合体:

[化4]

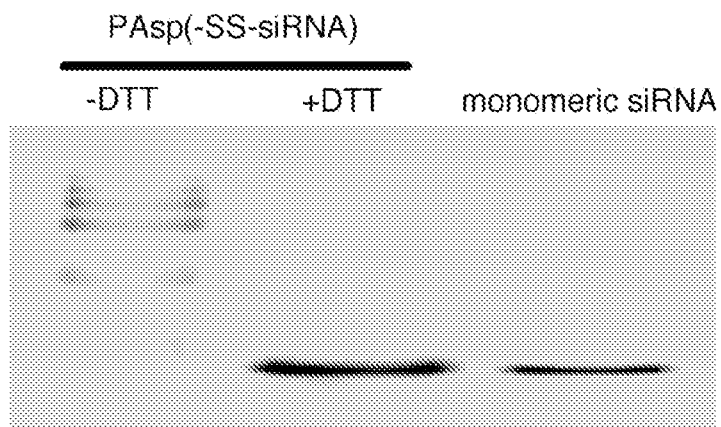


[請求項12] 請求項7に記載のポリイオンコンプレックスと、薬学的に許容可能なキャリアとを含む、薬学組成物。

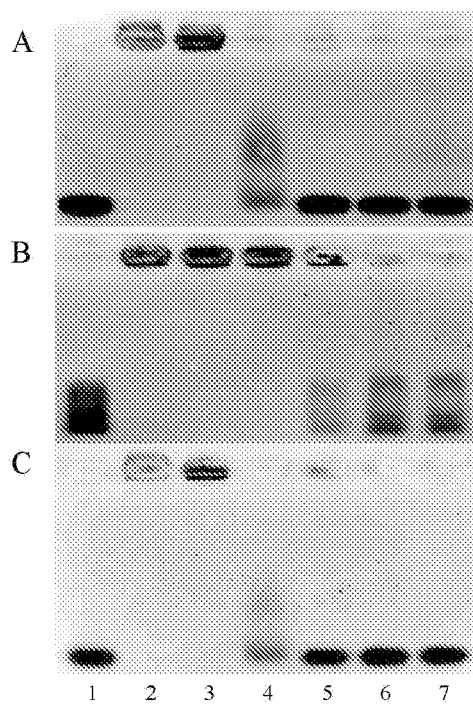
[請求項13] 請求項8から11のいずれかに記載の三元系ポリマー複合体と、薬

学的に許容可能なキャリアとを含む、薬学組成物。

[図1]

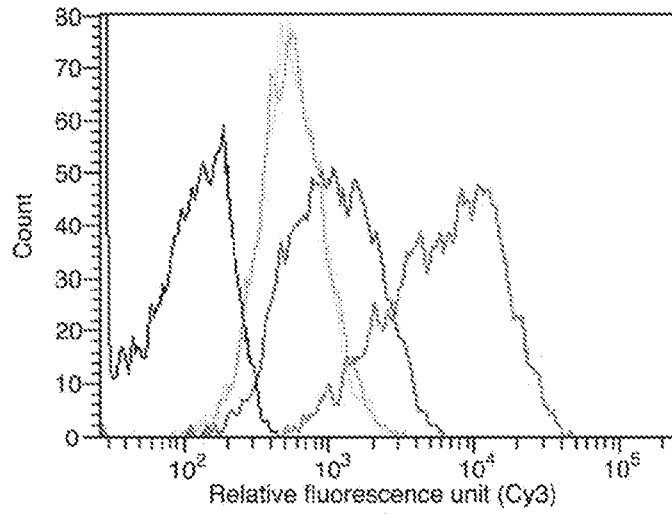


[図2]

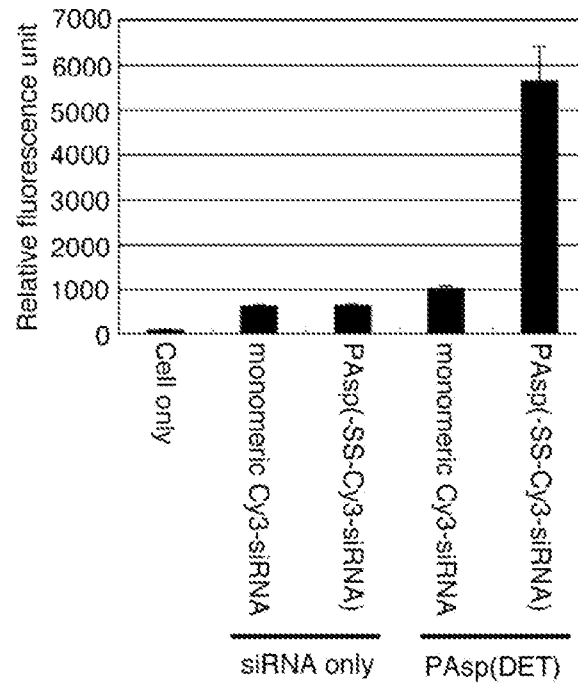


[3]

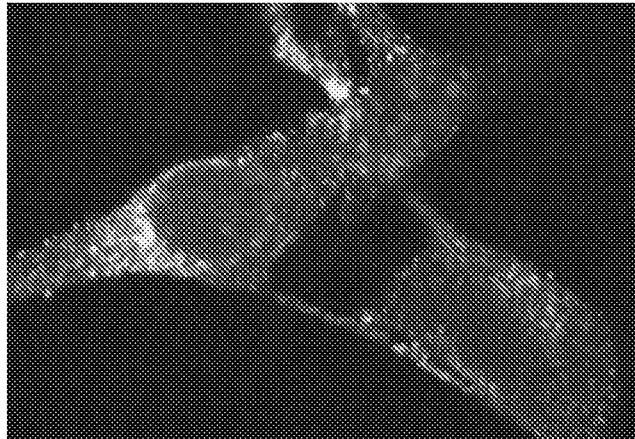
A



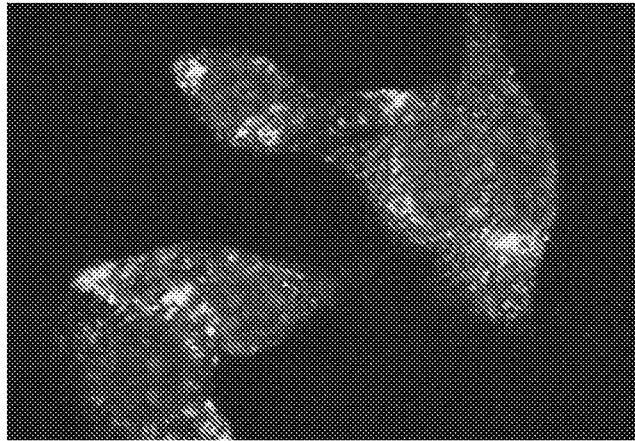
B



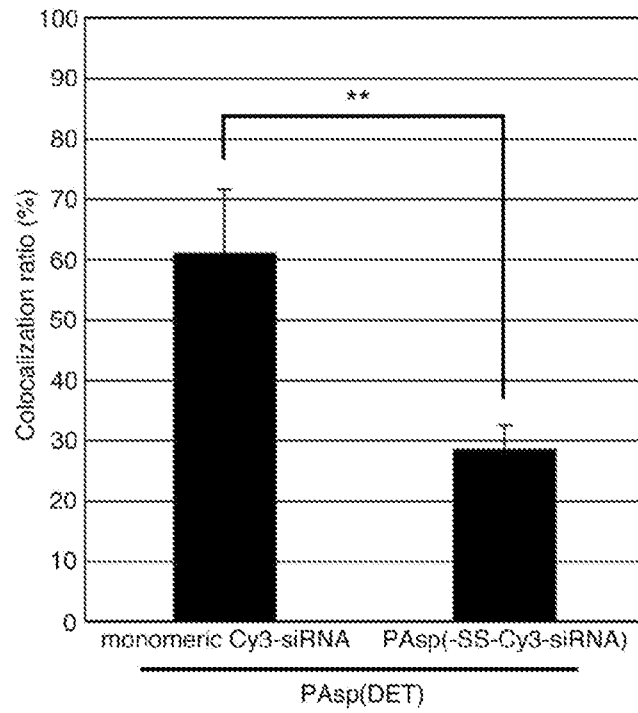
[図4]



A



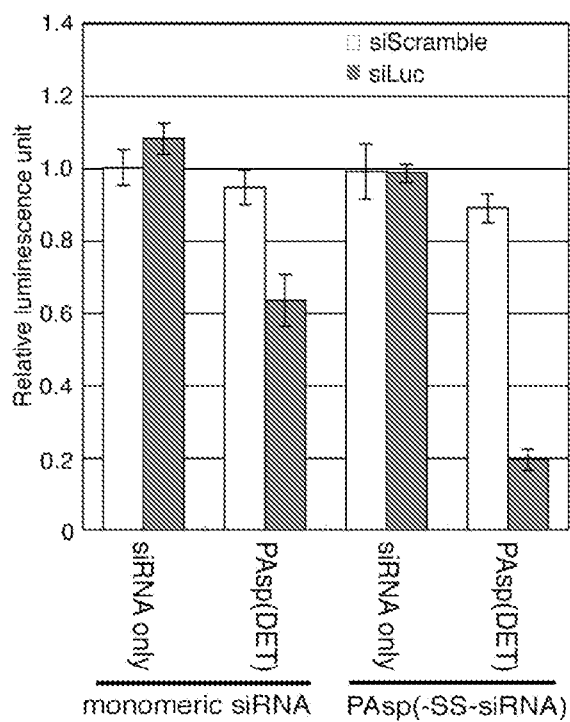
B



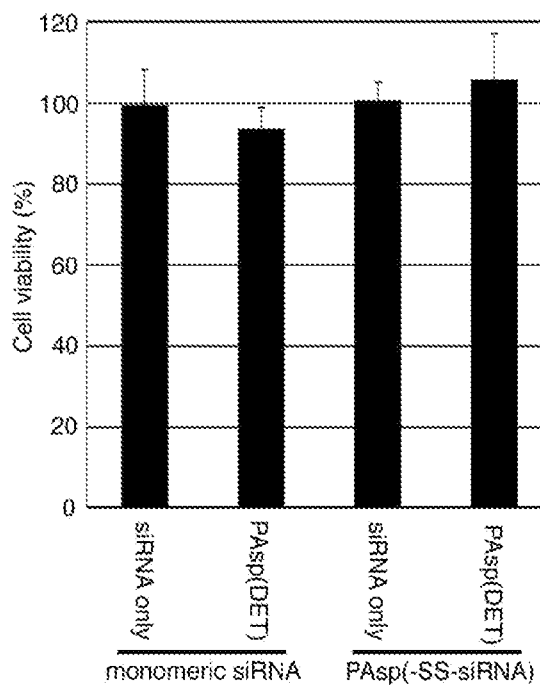
C

[5]

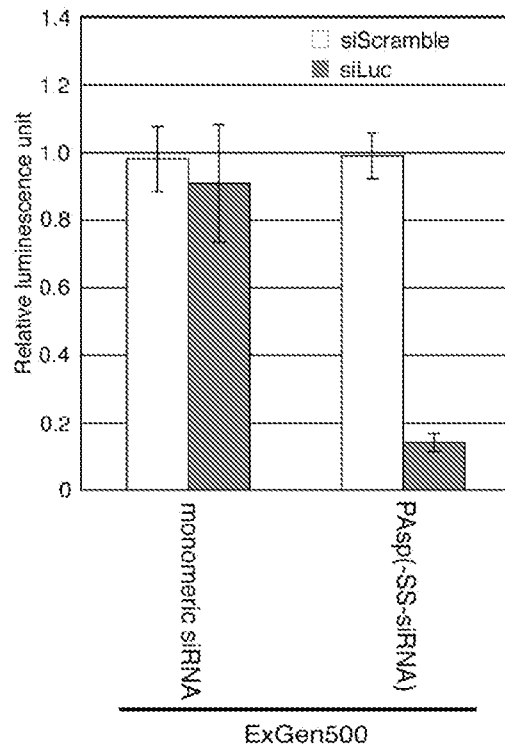
A



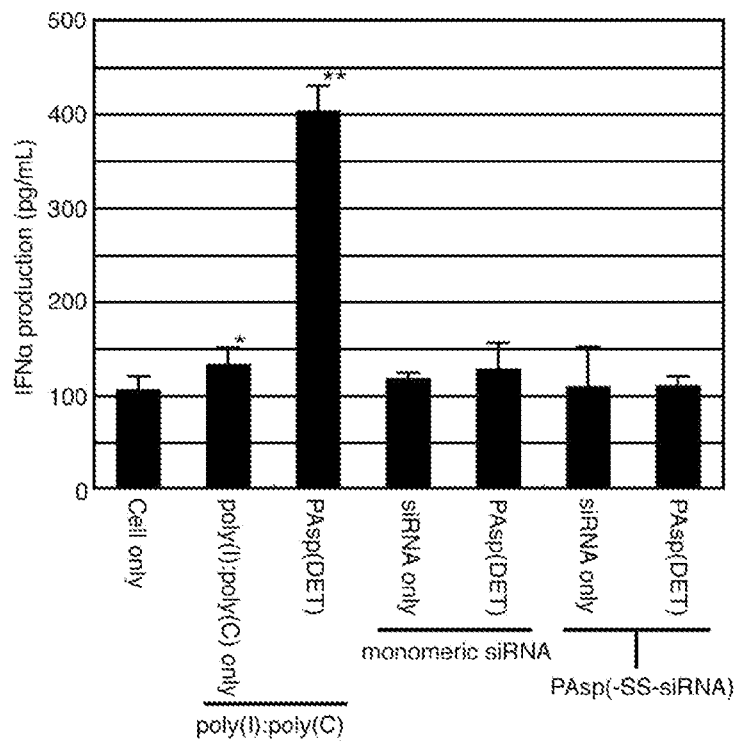
B



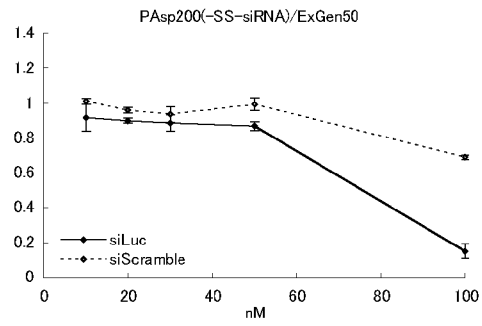
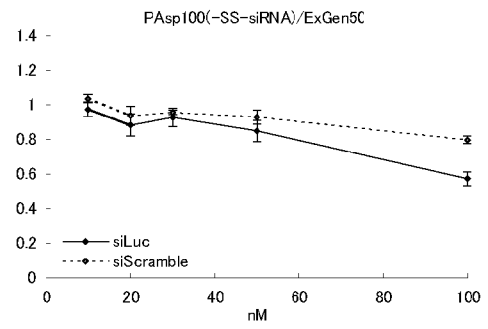
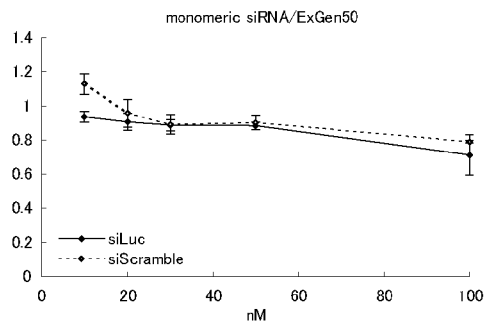
[6]



[7]



[8]



siLuc: target sequence

siScramble: non-target sequence

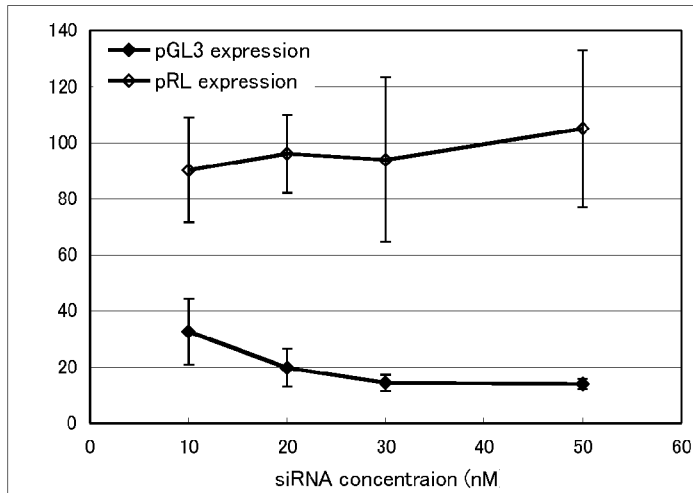
n = 4

error bar : SD

[圖9]

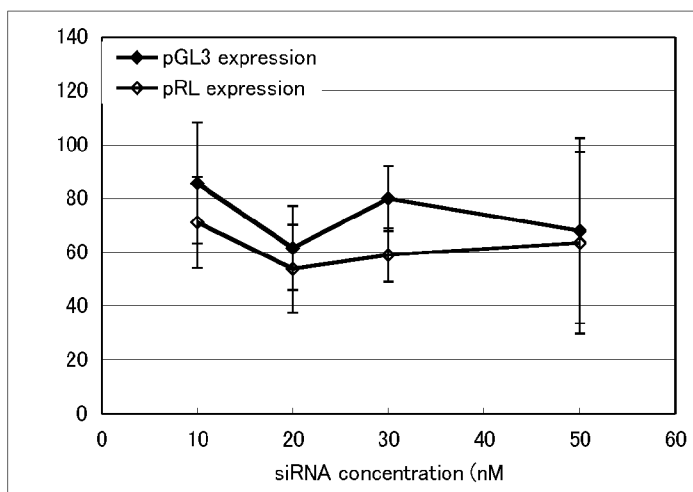
A

Knockdown assay of polyion complex prepared from PAsp(-SS-siRNA) and PAsp(DET) for Huh-7 cells.



B

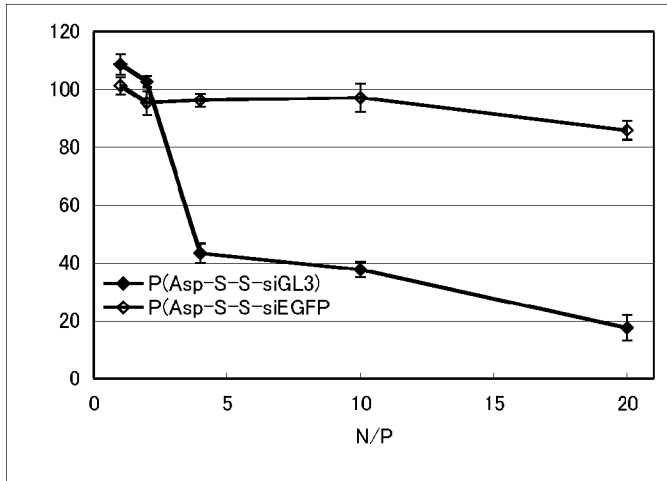
Knockdown assay of polyion complex prepared from siRNA and PAsp(DET) for Huh-7 cells.



[圖10]

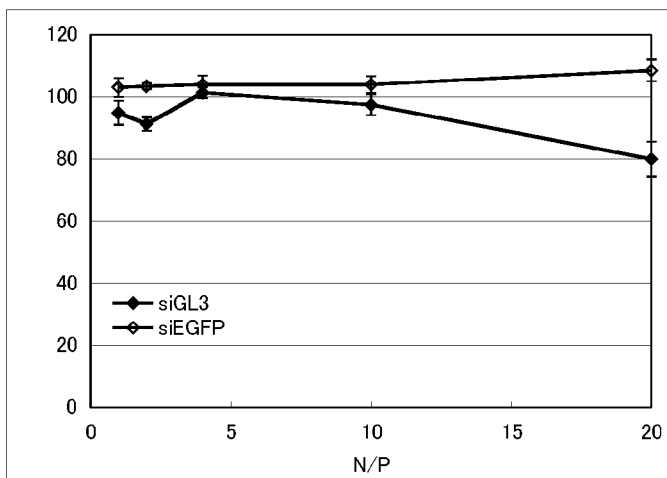
A

Knockdown assay of polyion complex prepared from PAsp(-SS-siRNA) and PAsp(DET) for B16F10-Luc cells.



B

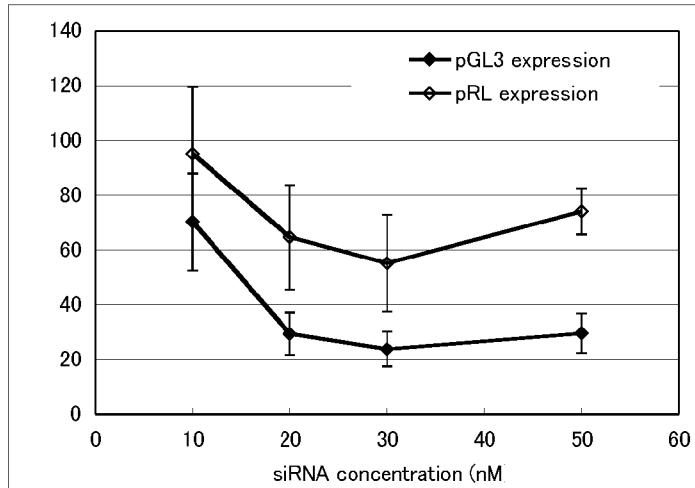
Knockdown assay of polyion complex prepared from siRNA and PAsp(DET) for B16F10-Luc cells.



[圖11]

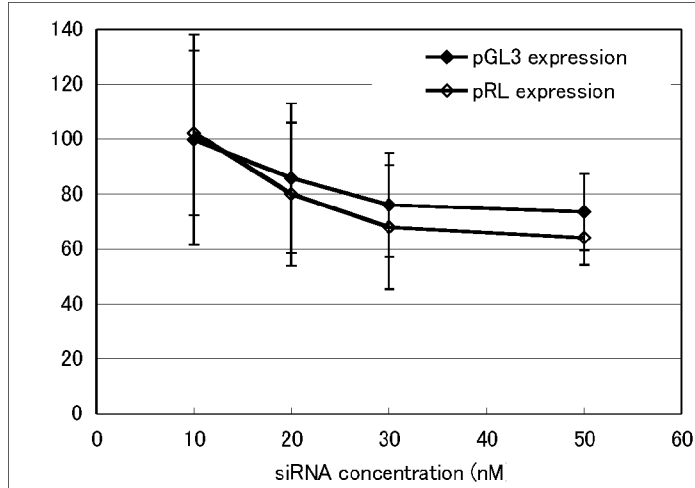
A

Knockdown assay of polyion complex prepared from PAsp(-SS-siRNA) and PEI for Huh-7 cells.



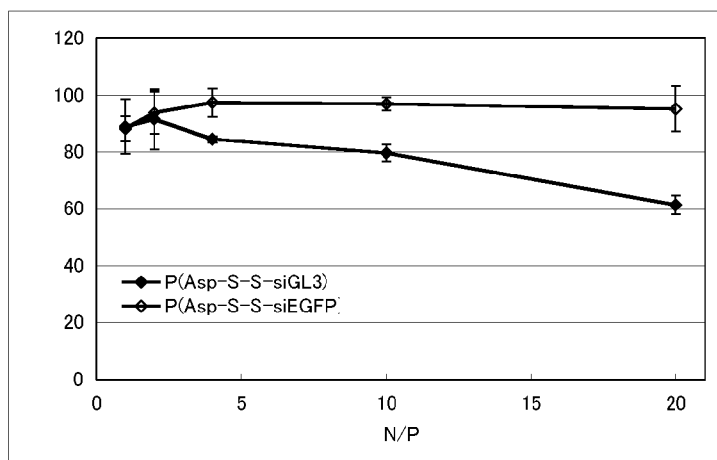
B

Knockdown assay of polyion complex prepared from siRNA and PEI for Huh-7 cells.



[圖12]

Knockdown assay of polyion complex prepared from
PAsp(-SS-siRNA) and PEG-PAsp(DET) for B16F10-Luc cells.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/062400

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K31/74(2006.01)i, C08G69/12(2006.01)i, C12N15/09(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) A61K31/74, C08G69/12, C12N15/09		
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 1996-2010 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2009/057812 A1 (The University of Tokyo), 07 May 2009 (07.05.2009), claims; page 12, line 7 to page 19, line 7 (Family: none)	1-13
A	JP 2006-056864 A (Yukio NAGASAKI), 02 March 2006 (02.03.2006), claims; paragraphs [0005] to [0016] (Family: none)	1-13
A	WO 2005/078084 A1 (Toudai TLO, Ltd.), 25 August 2005 (25.08.2005), claims; page 7, line 16 to page 17, line 11 (Family: none)	1-13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 October, 2010 (13.10.10)		Date of mailing of the international search report 26 October, 2010 (26.10.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/062400

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 2006/123631 A1 (Kyushu University), 23 November 2006 (23.11.2006), claims; paragraphs [0018] to [0021], [0030] to [0087] & JP 2008-201673 A	1-13
A	JP 2008-208055 A (Fukuoka-Ken), 11 September 2008 (11.09.2008), claims; paragraphs [0018] to [0019] (Family: none)	1-13
A	JP 2008-193977 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 28 August 2008 (28.08.2008), claims; paragraphs [0006] to [0015] (Family: none)	1-13
P,A	JP 2010-116383 A (Kabushiki Kaisha Alpha Nano Medica), 27 May 2010 (27.05.2010), claims; paragraphs [0030] to [0059] (Family: none)	1-13
P,A	JP 2010-059064 A (Nagasaki University, National University Corp.), 18 March 2010 (18.03.2010), claims; paragraphs [0009] to [0026], [0054] to [0066] (Family: none)	1-13

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K31/74(2006.01)i, C08G69/12(2006.01)i, C12N15/09(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. A61K31/74, C08G69/12, C12N15/09		
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 1971-2010年 日本国実用新案登録公報 1996-2010年 日本国登録実用新案公報 1994-2010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) CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
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 請求項の番号
A	WO 2009/057812 A1 (国立大学法人東京大学)2009.05.07, 特許請求の 範囲, 12 頁 7 行-19 頁 7 行 (ファミリーなし)	1-13
A	JP 2006-056864 A (長崎 幸夫)2006.03.02, 特許請求の範囲, 段落 [0005]-[0016] (ファミリーなし)	1-13
<input checked="" type="checkbox"/> C 欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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 「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 「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 「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) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「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 「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 「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 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 13.10.2010	国際調査報告の発送日 26.10.2010	
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) 佐々木 秀次 電話番号 03-3581-1101 内線 3452	4C 8930

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 請求項の番号
A	WO 2005/078084 A1 (株式会社東京大学T L O)2005. 08. 25, 特許請求の範囲, 7 頁 16 行-17 頁 11 行 (ファミリーなし)	1-13
A	WO 2006/123631 A1 (国立大学法人九州大学)2006. 11. 23, 特許請求の範囲, 段落[0018]-[0021], [0030]-[0087] & JP 2008-201673 A	1-13
A	JP 2008-208055 A (福岡県)2008. 09. 11, 特許請求の範囲, 段落[0018]-[0019] (ファミリーなし)	1-13
A	JP 2008-193977 A (独立行政法人産業技術総合研究所)2008. 08. 28, 特許請求の範囲, 段落[0006]-[0015] (ファミリーなし)	1-13
P, A	JP 2010-116383 A (株式会社アルファ・ナノ・メディカ)2010. 05. 27, 特許請求の範囲, 段落[0030]-[0059] (ファミリーなし)	1-13
P, A	JP 2010-059064 A (国立大学法人長崎大学)2010. 03. 18, 特許請求の範囲, 段落[0009]-[0026], [0054]-[0066] (ファミリーなし)	1-13