

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2002 - 145784

(P2002 - 145784A)

(43)公開日 平成14年5月22日 (2002.5.22)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト* (参考)
A 6 1 K 31/7088		A 6 1 K 31/7088	4 B 0 2 4
A 6 1 B 8/00		A 6 1 B 8/00	4 C 0 6 0
18/00		A 6 1 F 7/00 322	4 C 0 7 6
A 6 1 F 7/00	322	A 6 1 J 3/07	4 C 0 8 4
A 6 1 J 3/07		A 6 1 K 35/76	4 C 0 8 6

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 7 数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 342838(P2000 - 342838)

(22)出願日 平成12年11月10日(2000.11.10)

(71)出願人 500520905
森下 竜一
大阪府吹田市山田丘2 - 2 大阪大学大学院
医学系研究科内

(72)発明者 森下 竜一
大阪府吹田市山田丘2 - 2 大阪大学大学院
医学系研究科内

(72)発明者 谷山 義明
大阪府吹田市山田丘2 - 2 大阪大学大学院
医学系研究科内

(74)代理人 100098110
弁理士 村山 みどり (外 1 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 生物学的活性薬剤導入組成物およびその使用方法

(57)【要約】

【課題】 直接生体内に遺伝子等を導入することができる生物学的活性薬剤導入組成物およびその使用方法を提供する。

【解決手段】 生体の特定部位に生物学的活性薬剤を送達するための組成物が、パーフルオロカーボンを含むアルブミン由来の微小気泡含有小球体を含有する。前記組成物の使用に際して、前記生物学的活性薬剤が特定部位に取り込まれるように、当該特定部位を超音波に曝露する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 生体の特定部位に生物学的活性薬剤を送達するための組成物であって、パーフルオロカーボン含有するアルブミン由来の微小気泡含有小球体を含むことを特徴とする生物学的活性薬剤導入組成物。

【請求項2】 生物学的活性薬剤が、オリゴヌクレオチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、トリプルヘリックスフォーミングオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドプローブ、ヌクレオチドベクター、ウイルスベクターおよびプラスミドからなる群より選択される少なくとも一つであることを特徴とする請求項1記載の生物学的活性薬剤導入組成物。

【請求項3】 生物学的活性薬剤が特定部位に取り込まれるように、当該特定部位を超音波に曝露することを特徴とする請求項1または2記載の生物学的活性薬剤導入組成物の使用方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、パーフルオロカーボン含有するアルブミン由来の微小気泡含有小球体を含むことを特徴とする生物学的活性薬剤導入組成物およびその使用方法に関する。

【0002】

【従来の技術】超音波診断法は、超音波の特性を利用し、生体内部での組織間距離や物質性状の識別などを、非侵襲的にリアルタイムな視覚的情報として得る診断方法である。また、操作方法が簡便で、装置が安価であるなどの長があり、心臓領域をはじめとする循環器疾患、消化器疾患、悪性腫瘍の診断・治療等において重要な役割を果たしている。超音波診断用装置は、すでにMRIやCT装置の数倍から数十倍にあたる約5万台が国内で設置されており、あらゆる地域で診断を受けることが可能となっている。このような超音波診断法に、さらに造影剤を用いることにより、画像の明瞭化が図られ、より正確な診断を行うことが可能となる。造影剤の使用により、今後、診断医学において超音波診断法が一層有用となることが予想される。

【0003】超音波はまた、種々の低分子医薬品の吸収を増加させるために用いられている。例えば、米国特許第4953565号公報および同第5007438号公報には、医薬品の経皮吸収が超音波振動によって増大することが示されている。超音波を用い、細胞内へ生理活性物質を導入する試みとしては、米国特許第5315998号公報において、医薬品を拡散および透過させるために微小気泡を含む組成物と超音波との組み合わせが示されている。また、立花ら(Drug Delivery Systemにおける超音波の応用, 日本薬理学雑誌, 114:138-141, 1999)は、超音波を用いた場合の生体内における薬物の効果の増強を示している。

【0004】一方、超音波を用いて遺伝子等の核酸医薬を細胞内に導入する試みも行われている。田畑ら(ソノテクノロジーの応用 超音波による薬物の作用増強, ケミカルエンジニアリング, 45:254-257, 2000)は、超音波を用いることにより、培養細胞に遺伝子を導入することが可能であることを示している。また、WO20000406号公報およびWO9933500号公報には、超音波を用いることにより、生体内におけるプラスミドDNAでの遺伝子発現が増強されることが示されている。また、特表2000-507931号公報においては、超音波診断に用いる造影剤を共存させることにより、超音波を用いてアンチセンス核酸の生体での取込み量が増強するとともに、培養細胞系においてはプラスミドDNAでの遺伝子発現が増強されることが示されている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】このような状況を鑑みて、本発明は、直接生体内に遺伝子等を導入することができる生物学的活性薬剤導入組成物およびその使用方法を提供することを課題とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、本来超音波診断用造影剤として用いられているパーフルオロカーボン含有するアルブミン由来の微小気泡含有小球体を含む組成物を用いることにより、超音波照射によって生体内の特定部位に遺伝子を導入できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0007】すなわち、本発明は、生体の特定部位に生物学的活性薬剤を送達するための組成物であって、パーフルオロカーボン含有するアルブミン由来の微小気泡含有小球体を含むことを特徴とする生物学的活性薬剤導入組成物である。

【0008】本発明はまた、生物学的活性薬剤が、オリゴヌクレオチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、トリプルヘリックスフォーミングオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドプローブ、ヌクレオチドベクター、ウイルスベクターおよびプラスミドからなる群より選択される少なくとも一つであることを特徴とする前記生物学的活性薬剤導入組成物である。

【0009】本発明はさらに、前記生物学的活性薬剤が特定部位に取り込まれるように、当該特定部位を超音波に曝露することを特徴とする前記生物学的活性薬剤導入組成物の使用方法である。以下、本発明を詳細に説明する。

【0010】

【発明の実施の形態】本発明の生物学的活性薬剤導入組成物は、生体へ直接遺伝子等を導入するための組成物であり、不溶性ガスであるパーフルオロカーボン含有するアルブミン由来の微小気泡含有小球体を担体として含

有する。このパーフルオロカーボンを含むアルブミン由来の微小気泡含有小球体は、本来超音波診断用造影剤として使用されているものである。

【0011】本発明の生物学的活性薬剤導入組成物に含まれる、不溶性ガスであるパーフルオロカーボンを含むアルブミン由来の微小気泡含有小球体としては、特に限定されないが、発明者の鋭意研究により、OPTISON（商標名：米国モレキュラー・バイオシステムズ・インク社製）が特に好ましく用いられることが判明している。OPTISONは、すでに超音波診断用造影剤として使用されており、その安全性が保証されているものである。

【0012】本発明の生物学的活性薬剤導入組成物に含有されることができる生物学的活性薬剤は、特に限定されないが、オリゴヌクレオチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、トリプルヘリックスフォーミングオリゴヌクレオチド(TFO)、オリゴヌクレオチドプローブ、ヌクレオチドベクター、ウイルスベクターおよびプラスミドからなる群より選択される少なくとも一つの生物学的活性薬剤を含むことが好ましい。これらの中でも特に、生理活性を有する遺伝子をコードしたプラスミドDNAが好ましく用いられる。

【0013】また、プラスミドDNAにコードされる遺伝子の生理活性は、特に限定されないが、例えば、疾患に対応する遺伝子、即ち、疾患に対して拮抗的に作用する遺伝子や疾患における欠如を補足する遺伝子が用いられる。このような遺伝子としては、例えば、サイトカイン、成長因子、抗体または抗体断片、サイトカインまたは成長因子に対するレセプター、増殖防止または増殖抑制作用を有するタンパク質、酵素、脈関係抑制剤、血栓誘発物質、および凝集抑制剤、フィブリン溶解作用を有するタンパク質、ウイルスコートタンパク質、細菌性抗原および寄生動物性抗原、腫瘍抗原、血液循環に効果を有するタンパク質、ペプチドホルモン、ならびにリボザイムおよびアンチセンスRNAのようなリボ核酸からなる群より選択される薬理活性化合物をコードする遺伝子等が挙げられる。

【0014】本発明のパーフルオロカーボンを含むアルブミン由来の微小気泡含有小球体を含む生物学的活性薬剤導入組成物は、例えば、担体としての上記OPTISONと、薬剤としてのプラスミドDNAを混合することにより得ることができる。すなわち、これらを混合することにより、パーフルオロカーボンを含むアルブミン由来の微小気泡含有小球体と生物学的活性薬剤であるプラスミドDNAとが結合若しくは近隣に存在する形態をとる。

【0015】本発明の生物学的活性薬剤導入組成物に含まれるプラスミドDNAは、コードしている遺伝子を導入したい特定部位に本発明の組成物が達した際に、当該特定部位に超音波に曝露する。超音波のエネルギーによ

り小球体の微小気泡が破裂し、特定部位に存在する細胞に安全性には影響がないレベルの衝撃を与え、細胞に遺伝子等の生物学的活性薬剤を導入することが可能となる。

【0016】よって、本発明は、本発明の生物学的活性薬剤導入組成物を投与し、生体の特定の部位に生物学的活性薬剤が取り込まれるように、認識部位（当該特定部位）を超音波に暴露する行程を含む前記生物学的活性薬剤導入組成物の使用方法を包含するものである。

【0017】なお、このような方法で遺伝子を導入することが可能な特定部位としては、特に制限はないが、例えば、脳、消化器官、血管、筋肉、または種々の疾患部位が挙げられ、特に腫瘍組織への投与は好ましい。

【0018】

【実施例】以下、実施例を示して本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらにより限定されるものではない。

【0019】〔実施例1〕 脳への遺伝子導入実験
体重350～400gのWKY系雄性ラットを、ネンプタール(0.1ml/100g)で麻酔した後、頭頂部をバリカンで剃毛、左外頸動脈にPE10チューブでカニキュレーションを行った。その後、頭頂部にジェルを貼って超音波発信用プロベを固定した。ゆっくり2分間かけて左内頸動脈に容量1mlのルシフェラーゼ遺伝子をコードしたプラスミド(pLuc)溶液、pLucとOPTISONの混合溶液またはpLucとLEVOVIST（商標名；モレキュラー・バイオシステムズ・インク社製）の超音波診断用造影剤の混合溶液を動脈注射すると同時に、連続2分間、頭蓋骨の上から2.5W/cm²または5W/cm²の超音波を照射した。24時間後に脳（大脳、中脳、小脳、延髄）を取り出し、左脳と右脳に2分してルシフェラーゼの活性を測定した。その際、OPTISONは薬物原液を、LEVOVISTは300mg/mlを使用した。

【0020】その結果、pLucの導入効率は、0.1mlのOPTISONを混合して投与し、5W/cm²の超音波を照射した場合が最も優れていた。また、pLucだけを投与して超音波を照射しなかった場合、pLucとOPTISONの混合溶液を投与して超音波を照射しなかった場合、およびpLucだけを投与して超音波を照射した場合においては、ルシフェラーゼの発現が見られなかった。さらに、本発明の組成物における担体（超音波診断用造影剤）としてLEVOVISTを用いた場合より、OPTISONを用いた場合のほうが、高い遺伝子発現を示した。遺伝子発現は、pLucを動脈注射した左脳にのみ認められた。一方、超音波照射により頭蓋骨表面の温度が最大60℃まで上昇するため、頭皮に熱傷をきたしたラットを認めた。このような熱傷は、今回用いた1MHzの高周波数超音波を40～200KHz程度の低周波数超音波に変更すれば超音波が頭

蓋骨を透過しやすくなり、その分超音波強度を下げることにより抑制できると考えられる。

【0021】〔実施例2〕 腫瘍組織への遺伝子導入実験

C57BL/6J系雄性マウスの後背部に 5×10^6 個のB16-F1を接種した。1週間後に、自殺遺伝子であるヘルペスチミジンキナーゼ遺伝子をコードしたプラスミド(pTK)溶液($1 \mu\text{g} / \mu\text{l}$)、またはpTKと50%濃度のOPTISONの混合溶液 $50 \mu\text{l}$ を腫瘍組織内に局所注射した。その後、強度10、2Hz、30秒間の超音波照射を4回行った。遺伝子導入6日後より5日間連続してガンシクロビルを $100 \text{mg} / \text{kg}$ で投与し生存日数の測定を行った。

【0022】結果を図1のグラフに示す。図1において、○はpTKとOPTISONの混合溶液投与後に超音波照射を行った系、△はpTK溶液投与後に超音波照射を行った系、□はpTKとOPTISONの混合溶液投与後に超音波照射を行わなかった系、×はpTK溶液投与後に超音波照射を行わなかった系を示す。図1の結果から、pTKとOPTISONの混合溶液投与後に超音波照射を行った系において生存日数の延長が観察され、超音波診断用造影剤であるOPTISON存在下で超音波照射を行うことにより、生体内で効率良く遺伝子導入が行われることが明らかとなった。

【0023】〔実施例3〕 骨格筋への遺伝子導入実験
体重350~400gのWKY系雄性ラットをネンブタール($0.1 \text{ml} / 100 \text{g}$)で麻酔後、頸部をバリカンで剃毛後、ジェルをはさんで超音波発信プロ-ベを固定した。前頸骨筋に $20 \mu\text{g}$ のpLucとOPTISONの混合溶液 $50 \mu\text{l}$ を筋肉注射すると同時に、1MHz、 $2.5 \text{W} / \text{cm}^2$ の超音波を照射した。24時間後に前頸骨筋を取り出してルシフェラーゼの活性を測定した。

【0024】投与した混合溶液中のOPTISON濃度を変化させて遺伝子導入効率を比較した結果、OPTISON濃度が75%の場合に最も高い遺伝子発現が観察された(図2)。また、OPTISON濃度が75%のpLuc混合溶液を投与した際、超音波照射時間の影響を検討した結果、超音波照射時間が長いほど遺伝子導入効率が向上することが示され、超音波診断用造影剤であるOPTISON存在下で超音波照射を行う優位性が示された(図3)。

【0025】〔実施例4〕 血管への遺伝子導入実験
体重350~400gのWKY系雄性ラットをネンブタール($0.1 \text{ml} / 100 \text{g}$)で麻酔後、頸部をバリカンで剃毛する。その後、頸部にジェルをはさんで超音波*

*発信プロ-ベを固定した。左外頸動脈にバルーンカテーテルを導入して血管内皮細胞に損傷を与えた場合と与えない場合のそれぞれにおいて、左外頸動脈に $50 \mu\text{g}$ のpLuc溶液またはpLucと濃度10%のOPTISONの混合溶液 $50 \mu\text{l}$ を動脈注射すると同時に、1MHz、 $2 \text{W} / \text{cm}^2$ の超音波を2分間照射した。24時間後に左外頸動脈を取り出し、ルシフェラーゼの活性を測定した。

【0026】バルーンカテーテルで血管内皮細胞に損傷を与えた場合(図4)および与えなかった場合(図5)のいずれの場合においても、pLucとOPTISONの混合溶液を投与した場合のみで高い遺伝子導入が観察され、OPTISON存在下で超音波照射を行う優位性が示された。

【0027】また、バルーンカテーテルで血管内皮細胞に損傷を与える場合、細胞増殖を抑制する効果があると考えられるがん抑制遺伝子p53をコードしたプラスミド(pP53) $100 \mu\text{g}$ と25%のOPTISONの混合溶液 $50 \mu\text{l}$ を左外頸動脈に動脈注射すると同時に、1MHz、 $2 \text{W} / \text{cm}^2$ の超音波を2分間照射した。2週間後に左外頸動脈を取り出し、動脈の内膜/中膜比を測定した。

【0028】その結果、pP53とOPTISONの混合溶液を投与した場合に動脈の内膜/中膜比が低く押さえられており(図6)、再狭窄の治療に応用できる可能性が示された。

【0029】

【発明の効果】本発明の生物学的活性薬剤導入組成物は、特定の超音波診断用造影剤を担体として用いることにより、超音波照射によって安全かつ確実に直接生体に遺伝子を導入することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】自殺遺伝子投与後の生存日数を示すグラフである。

【図2】前頸骨筋における遺伝子発現に対するOPTISONの濃度の影響を示すグラフである。

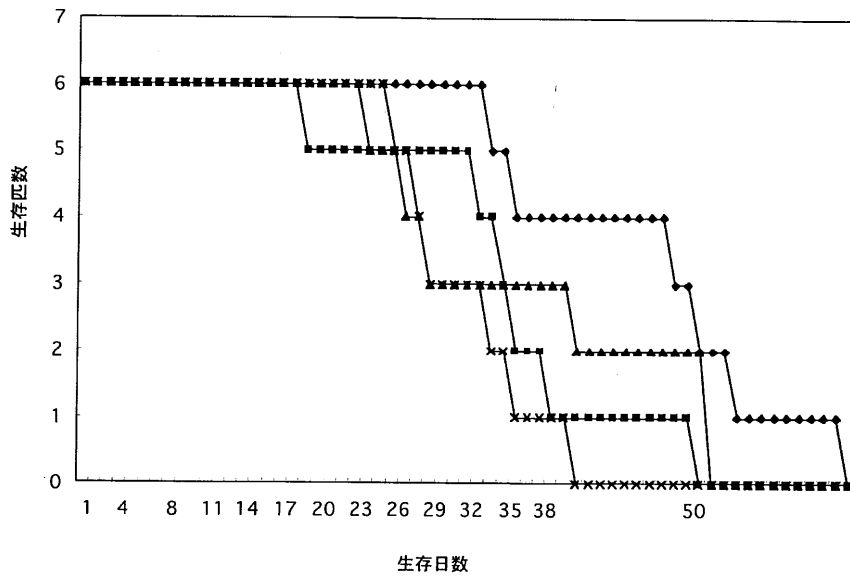
【図3】前頸骨筋における遺伝子発現に対する超音波照射時間の影響を示すグラフである。

【図4】バルーンカテーテルによる血管障害後の血管平滑筋に対する遺伝子導入を示すグラフである。

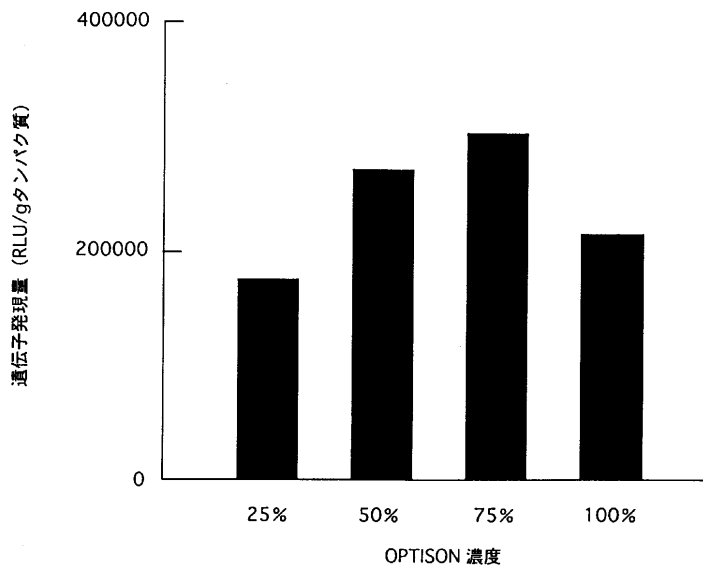
【図5】バルーンカテーテルによる血管障害が無い状態での血管内皮細胞に対する遺伝子導入を示すグラフである。

【図6】バルーンカテーテルによる血管障害後の動脈の内膜/中膜比に対する遺伝子導入の効果を示すグラフである。

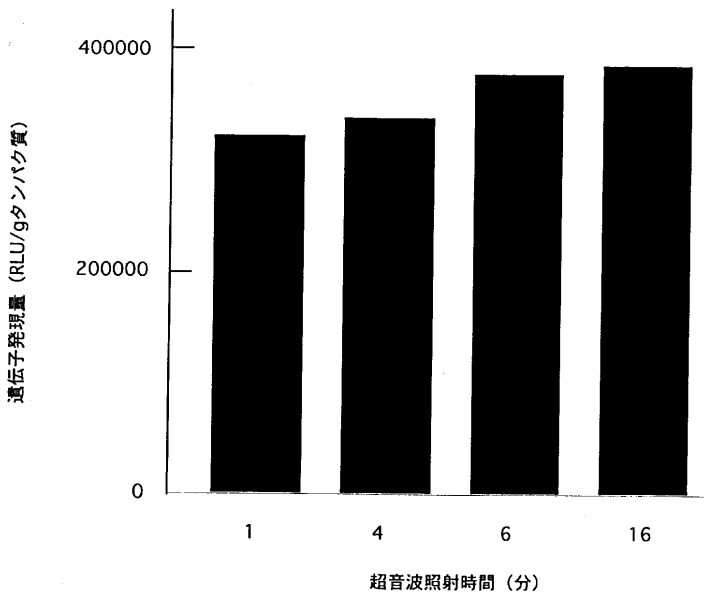
【図1】



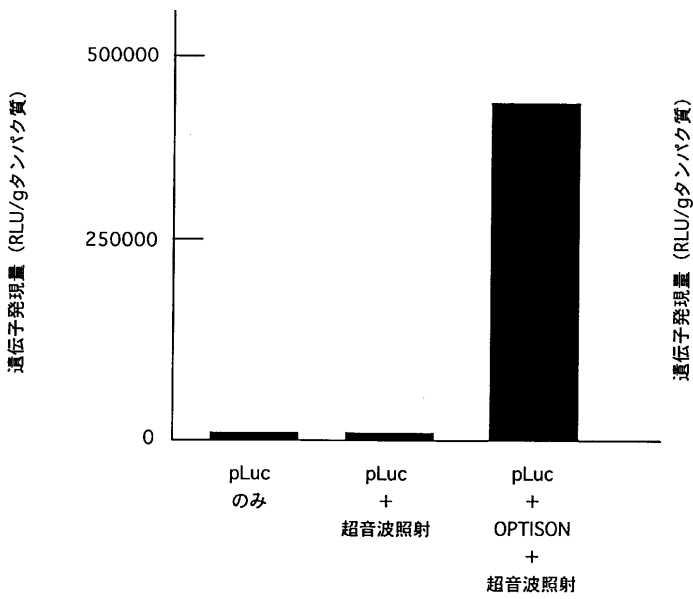
【図2】



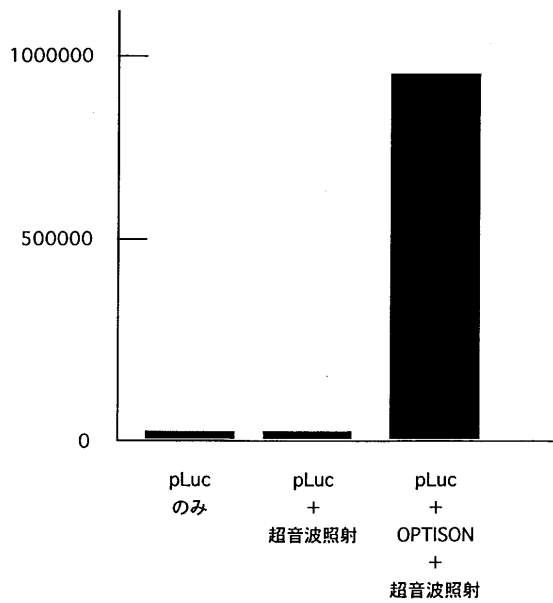
【図3】



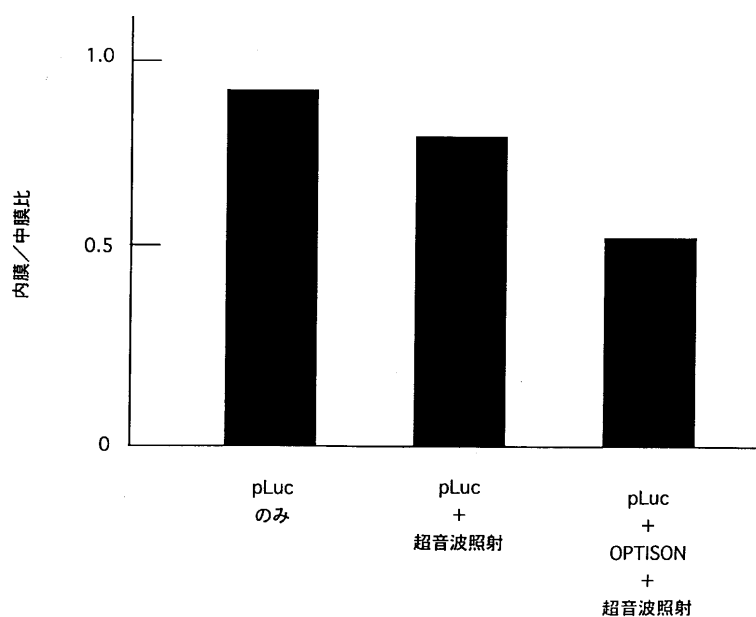
【図4】



【図5】



【図6】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
A 6 1 K	35/76	A 6 1 K	4 C 0 8 7
	47/06		4 C 0 9 9
	47/42		4 C 1 6 7
	48/00		4 C 3 0 1
A 6 1 M	37/00	A 6 1 M	
C 1 2 N	15/09	A 6 1 B	3 3 0
		C 1 2 N	A

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA20 CA01 CA09 DA02
 GA11 HA17
 4C060 JJ11 MM24 MM25
 4C076 AA95 AA99 DD35 EE41 FF02
 4C084 AA13 MA05 NA13 ZC801
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA05 NA13
 ZC80
 4C087 AA01 AA02 BC83 MA05 NA13
 ZC80
 4C099 AA10 CA03 CA11 CA13 JA13
 TA04
 4C167 AA74 BB26 BB45 CC05 CC08
 CC12 CC20 CC23 CC24 DD10
 GG02 GG12 GG16 GG31 GG34
 GG41 GG42 HH01 HH08 HH30
 4C301 EE20 LL20

专利名称(译)	生物活性剂引入组合物及其使用方法		
公开(公告)号	JP2002145784A	公开(公告)日	2002-05-22
申请号	JP2000342838	申请日	2000-11-10
[标]申请(专利权)人(译)	森下龙一		
申请(专利权)人(译)	森下龙一		
[标]发明人	森下 竜一 谷山 義明		
发明人	森下 竜一 谷山 義明		
IPC分类号	C12N15/09 A61B8/00 A61B18/00 A61F7/00 A61J3/07 A61K31/7088 A61K35/76 A61K47/06 A61K47/42 A61K48/00 A61M37/00 A61N7/00		
FI分类号	A61K31/7088 A61B8/00 A61F7/00.322 A61J3/07.D A61K35/76 A61K47/06 A61K47/42 A61K48/00 A61M37/00 A61B17/36.330 C12N15/00.A A61N7/00		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA20 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/GA11 4B024/HA17 4C060/JJ11 4C060/MM24 4C060/MM25 4C076/AA95 4C076/AA99 4C076/DD35 4C076/EE41 4C076/FF02 4C084/AA13 4C084/MA05 4C084/NA13 4C084/ZC801 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA05 4C086/NA13 4C086/ZC80 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/MA05 4C087/NA13 4C087/ZC80 4C099/AA10 4C099/CA03 4C099/CA11 4C099/CA13 4C099/JA13 4C099/TA04 4C167/AA74 4C167/BB26 4C167/BB45 4C167/CC05 4C167/CC08 4C167/CC12 4C167/CC20 4C167/CC23 4C167/CC24 4C167/DD10 4C167/GG02 4C167/GG12 4C167/GG16 4C167/GG31 4C167/GG34 4C167/GG41 4C167/GG42 4C167/HH01 4C167/HH08 4C167/HH30 4C301/EE20 4C301/LL20 4C047/LL16 4C160/MM32 4C160/MM33 4C160/MM43 4C267/AA74 4C267/BB26 4C267/BB45 4C267/CC05 4C267/CC08 4C267/CC12 4C267/CC20 4C267/CC23 4C267/CC24 4C267/DD10 4C267/GG02 4C267/GG12 4C267/GG16 4C267/GG31 4C267/GG34 4C267/GG41 4C267/GG42 4C267/HH01 4C267/HH08 4C267/HH30 4C601/DE07 4C601/EE30 4C601/LL40		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种用于将能够将基因等直接导入生物体内的生物活性剂引入的组合物及其使用方法。用于将生物活性剂递送至生物体内特定部位的组合物包含源自白蛋白的含微泡的微球，该微球包含全氟化碳。在使用该组合物时，将特定部位暴露于超声下，以使生物活性剂被该特定部位吸收。

【图 2】

