

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-525209

(P2015-525209A)

(43) 公表日 平成27年9月3日 (2015. 9. 3)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/18 (2006.01)	A 6 1 K 47/18 Z N A	4 B 0 2 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 7 6
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	4 C 0 8 6
A 6 1 P 15/08 (2006.01)	A 6 1 P 15/08	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 89 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2015-514192 (P2015-514192)
 (86) (22) 出願日 平成25年5月23日 (2013. 5. 23)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年1月21日 (2015. 1. 21)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/042458
 (87) 国際公開番号 W02013/177419
 (87) 国際公開日 平成25年11月28日 (2013. 11. 28)
 (31) 優先権主張番号 61/650, 729
 (32) 優先日 平成24年5月23日 (2012. 5. 23)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/784, 892
 (32) 優先日 平成25年3月14日 (2013. 3. 14)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

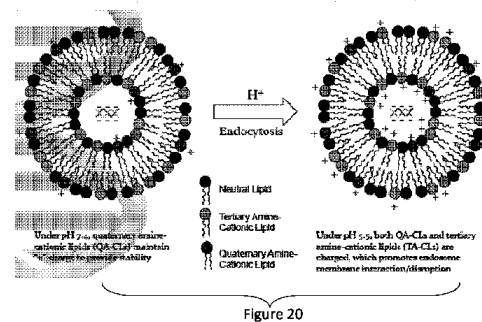
(71) 出願人 513225693
 ジ・オハイオ・ステート・ユニバーシティ
 アメリカ合衆国オハイオ州43201, コ
 ロンバス, ノース・ハイ・ストリート 1
 524
 (74) 代理人 100140109
 弁理士 小野 新次郎
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰
 (74) 代理人 100101373
 弁理士 竹内 茂雄
 (74) 代理人 100118902
 弁理士 山本 修
 (74) 代理人 100128750
 弁理士 廣瀬 しのぶ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脂質ナノ粒子組成物と、それを作製する方法、及びそれを使用する方法

(57) 【要約】

脂質ナノ粒子製剤と、それを作製する方法、及びそれを使用する方法を開示する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

三級アミンベースのカチオン性脂質と四級アミンベースのカチオン性脂質の組合せを含んでなる脂質ナノ粒子。

【請求項 2】

三級アミン - カチオン性脂質が、DODAP、DODMA、DC-CHOL、N,N-ジメチルヘキサデシルアミン、又はこれらの組合せより選択される、請求項 1 の脂質ナノ粒子。

【請求項 3】

四級アミン - カチオン性脂質が、DOTAP、DOTMA、DDAB、又はこれらの組合せより選択される、請求項 1 の脂質ナノ粒子。

【請求項 4】

三級アミン - カチオン性脂質の濃度が全脂質含量の 60.0 モルパーセント未満である、請求項 1 の脂質ナノ粒子。

【請求項 5】

四級アミン - カチオン性脂質の濃度が全脂質含量の 20.0 モルパーセント未満である、請求項 1 の脂質ナノ粒子。

【請求項 6】

核酸、タンパク質、多糖、脂質、放射活性物質、治療薬剤、プロドラッグ、栄養補給剤、バイオマーカー、又はこれらの組合せより選択される分子を被包する、請求項 1 の脂質ナノ粒子。

【請求項 7】

被包化分子が、プラスミド DNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、miR、抗miR、shRNA、siRNA、又はこれらの組合せより選択される核酸を含む、請求項 6 の脂質ナノ粒子。

【請求項 8】

カチオン性ポリマーをさらに含んでなる、請求項 1 の脂質ナノ粒子。

【請求項 9】

カチオン性ポリマーが：スベルミン、ジスベルミン、トリスベルミン、テトラスベルミン、オリゴスベルミン、テルミン、スベルミジン、ジスベルミジン、トリスベルミジン、オリゴスベルミジン、ブトレシン、ポリリジン、ポリアルギニン、分岐鎖又は直鎖型のポリエチレンジイミン、及びポリアルリルアミンからなる群より選択される、請求項 8 の脂質ナノ粒子。

【請求項 10】

膜融合性 (fusogenic) ペプチドをさらに含んでなる、請求項 1 の脂質ナノ粒子。

【請求項 11】

治療薬剤又はヌクレオチドの被包率が 20% 以上である、請求項 6 の脂質ナノ粒子。

【請求項 12】

300 nm 未満の直径を有する、請求項 1 の脂質ナノ粒子。

【請求項 13】

脂質の DODMA 及び DOTMA を 45:0、5:40、15:30、22.5:22.5、30:15、又は 40:5 より選択されるモル比で含む、請求項 1 の脂質ナノ粒子。

【請求項 14】

脂質の DMHDA 及び DOTAP を 90:10、70:30、50:50、30:70、又は 10:90 より選択されるモル比で含む、請求項 1 の脂質ナノ粒子。

【請求項 15】

300 nm 未満の直径を有してペプチドを含んでなる、脂質ナノ粒子。

【請求項 16】

ペプチドが、グラミシジン A、B、C、D、又は S；JTS-1；プロテイナーゼ K (

10

20

30

40

50

P r K) ; トリコロピン - X I I a ; 狂犬病ウイルス糖タンパク質 ; インターロイキン - 1 ; H I V - T a t ; 単純ヘルペスウイルス V P 2 2 タンパク質 ; 及びこれらの組合せより選択される、請求項 1 5 の脂質ナノ粒子。

【請求項 1 7】

ペプチドが抗生物質を含む、請求項 1 5 の脂質ナノ粒子。

【請求項 1 8】

抗生物質がグラミシジン A、B、C、D、又は S より選択される、請求項 1 7 の脂質ナノ粒子。

【請求項 1 9】

ペプチドが本質的に脂質化 J T S - 1 膜融合性ペプチドからなる、請求項 1 5 の脂質ナノ粒子。

【請求項 2 0】

脂質化 J T S - 1 膜融合性ペプチドが全製剤の約 0 ~ 約 3 0 モルパーセントで存在する、請求項 1 9 の脂質ナノ粒子。

【請求項 2 1】

プロテイナーゼ K をさらに含んでなる、請求項 1 5 の脂質ナノ粒子。

【請求項 2 2】

プロテイナーゼ K が全製剤の約 0 ~ 約 3 0 モルパーセントで存在する、請求項 1 5 の脂質ナノ粒子。

【請求項 2 3】

核酸、タンパク質、多糖、脂質、放射活性物質、治療薬剤、プロドラッグ、栄養補給剤、バイオマーカー、又はこれらの組合せより選択される分子を被包する、請求項 1 5 の脂質ナノ粒子。

【請求項 2 4】

被包化分子が、プラスミド D N A、アンチセンスオリゴヌクレオチド、m i R、抗 m i R、s h R N A s、s i R N A、又はこれらの組合せより選択される核酸を含む、請求項 2 3 の脂質ナノ粒子。

【請求項 2 5】

D N A 分解酵素若しくは R N A 分解酵素分解剤を含んでなる脂質ナノ粒子。

【請求項 2 6】

D N A 分解酵素若しくは R N A 分解酵素分解剤が本質的にプロテイナーゼ K からなる、請求項 2 5 の脂質ナノ粒子。

【請求項 2 7】

核酸、タンパク質、多糖、脂質、放射活性物質、治療薬剤、プロドラッグ、栄養補給剤、バイオマーカー、又はこれらの組合せより選択される分子を被包する、請求項 2 5 の脂質ナノ粒子。

【請求項 2 8】

被包化分子が、p D N A、アンチセンスオリゴヌクレオチド、m i R、抗 m i R、s h R N A、s i R N A、又はこれらの組合せより選択されるオリゴヌクレオチドを含む、請求項 2 7 の脂質ナノ粒子。

【請求項 2 9】

3 0 0 n m 未満の直径を有する、請求項 2 5 の脂質ナノ粒子。

【請求項 3 0】

3 0 0 n m 未満の直径を有して :

三級アミン - カチオン性ヘッド基と四級アミン - カチオン性ヘッド基の混合物 ;

抗生物質 ; 又は

D N A 分解酵素若しくは R N A 分解酵素分解剤

の 2 以上の組合せを含んでなる、脂質ナノ粒子。

【請求項 3 1】

D N A 分解酵素若しくは R N A 分解酵素分解剤が本質的にプロテイナーゼ K からなる、

請求項 30 の脂質ナノ粒子。

【請求項 32】

抗生物質がグラミシジン A、B、C、D、又は S を含む、請求項 30 の脂質ナノ粒子。

【請求項 33】

ポリエチレングリコール - 脂質コンジュゲートをさらに含んでなる、請求項 1、15 又は 25 の脂質ナノ粒子。

【請求項 34】

ポリエチレングリコール - 脂質コンジュゲートが、ポリソルベート 80、TPGS、mPEG-DSPE、PEG-DMG より選択される、請求項 33 の脂質ナノ粒子。

【請求項 35】

ポリエチレングリコール - 脂質が約 10.0 モルパーセント未満の濃度で存在する、請求項 33 の脂質ナノ粒子。

【請求項 36】

N, N - ジメチルヘキサデシルアミンをさらに含んでなる、請求項 33 の脂質ナノ粒子。

【請求項 37】

N, N - ジメチルヘキサデシルアミンが製剤の約 60.0 モルパーセント未満の濃度で存在する、請求項 36 の脂質ナノ粒子。

【請求項 38】

標的細胞又は標的分子へ結合することが可能なりガンドをさらに含んでなる、請求項 36 の脂質ナノ粒子。

【請求項 39】

リガンドが抗体又は抗体断片である、請求項 38 の脂質ナノ粒子。

【請求項 40】

リガンドが、cRGD、ガラトース含有部分、トランスフェリン、葉酸塩、低密度リポタンパク質、又は表皮増殖因子より選択される、請求項 39 の脂質ナノ粒子。

【請求項 41】

請求項 1、15 又は 25 の脂質ナノ粒子と医薬的に許容される賦形剤を含んでなる医薬組成物。

【請求項 42】

経口的に、静脈内に、腹腔内に、皮下に、又は経皮的に投与される、請求項 41 の医薬組成物。

【請求項 43】

経口投与錠剤として調製される、請求項 41 の医薬組成物。

【請求項 44】

無菌溶液剤として調製される、請求項 41 の医薬組成物。

【請求項 45】

無菌懸濁液剤として調製される、請求項 41 の医薬組成物。

【請求項 46】

凍結乾燥散剤として調製される、請求項 41 の医薬組成物。

【請求項 47】

坐剤として調製される、請求項 41 の医薬組成物。

【請求項 48】

癌又は感染症を診断するか又は治療する方法であって、請求項 41 の医薬組成物の有効量をその必要な患者へ投与することを含んでなる、前記方法。

【請求項 49】

核酸、化学療法剤、及びこれらの組合せより選択される少なくとも 1 つの分子を被包する、請求項 1、15 又は 25 の脂質ナノ粒子。

【請求項 50】

被包化分子が、プラスミド DNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、miR、抗 mi

10

20

30

40

50

R、shRNA、siRNA、及びこれらの組合せより選択される核酸を含む、請求項 49 の脂質ナノ粒子。

【請求項 51】

被包化分子が、抗新生物剤、抗感染症薬、局所麻酔薬、抗アレルギー薬、抗貧血薬、血管新生阻害剤、
- アドレナリン作動性遮断薬、カルシウムチャネル拮抗薬、降圧剤、抗うつ薬、抗痙攣薬、抗細菌薬、抗真菌薬、抗ウイルス薬、抗リウマチ薬、駆虫薬、抗寄生虫薬、コルチコステロイド、ホルモン、ホルモン拮抗薬、免疫調節剤、神経伝達物質拮抗薬、抗糖尿病剤、抗てんかん薬、止血薬、抗過緊張薬、抗緑内障剤、免疫調節性サイトカイン、鎮静剤、ケモカイン、ビタミン、毒素、麻薬、造影剤、及びこれらの組合せより選択される治療薬剤を含む、請求項 49 の脂質ナノ粒子。

10

【請求項 52】

被包化分子が核酸治療薬剤を含む、請求項 49 の脂質ナノ粒子。

【請求項 53】

核酸治療薬剤が、pDNA、siRNA、miRNA、抗miRNA、ASO、及びこれらの組合せより選択される、請求項 52 の脂質ナノ粒子。

【請求項 54】

核酸治療薬剤が、置換基 NA 塩基単位への修飾、及び/又はリボース 2' 位を修飾すること又はホスホジエステルリンカーを置換することによって安定化される、請求項 52 の脂質ナノ粒子。

【請求項 55】

約 300 nm 未満の直径を有する、請求項 1、15 又は 25 の脂質ナノ粒子。

20

【請求項 56】

約 200 nm 未満の直径を有する、請求項 1、15 又は 25 の脂質ナノ粒子。

【請求項 57】

ポリマーがその脂質の外部表面へ直結合を介するか又はリンカーを介して結合する、請求項 1、15 又は 25 の脂質ナノ粒子。

【請求項 58】

少なくとも約 40 % の分子の被包化効率を有する、請求項 16 の脂質ナノ粒子。

【請求項 59】

ポリエチレングリコール - コンジュゲート脂質がさらに含まれる、請求項 1、15 又は 25 の脂質ナノ粒子。

30

【請求項 60】

ポリエチレングリコール - コンジュゲート脂質が、ポリソルベート 80、TPGS、及び mPEG - DSPe の 1 以上を含む、請求項 59 の脂質ナノ粒子。

【請求項 61】

ポリエチレングリコール - コンジュゲート脂質が約 15 . 0 モルパーセント未満の濃度で存在する、請求項 27 の脂質ナノ粒子。

【請求項 62】

標的細胞又は標的分子へ結合することが可能なりガンドをさらに含んでなる、請求項 1、15 又は 25 の脂質ナノ粒子。

40

【請求項 63】

リガンドが抗体又は抗体断片である、請求項 62 の脂質ナノ粒子。

【請求項 64】

リガンドが、cRGD、ガラトース含有部分、トランスフェリン、葉酸塩、低密度リポタンパク質、又は表皮増殖因子より選択される、請求項 62 の脂質ナノ粒子。

【請求項 65】

請求項 1、15 又は 25 の脂質ナノ粒子と医薬的に許容される賦形剤を含んでなる医薬組成物。

【請求項 66】

経口的に、静脈内に、腹腔内に、皮下に、又は経皮的に投与される、請求項 65 の医薬

50

組成物。

【請求項 67】

経口投与錠剤、吸入剤、又は坐剤として調製される、請求項 65 の医薬組成物。

【請求項 68】

無菌溶液剤、無菌懸濁液剤、又は凍結乾燥散剤として調製される、請求項 65 の医薬組成物。

【請求項 69】

抗 miR - 221 と SPLN - G20 を含んでなり、ここで SPLN - G20 は、DMHDA、DOTAP、GRAM、DOPE、及びTPGSを40:5:20:30:5のモル比で含む、脂質ナノ粒子。

10

【請求項 70】

抗 miR - 221 が配列：5' - g_s a_s a a c c c a g c a g a c a a u g u_s a_s g_s c_s u - Chol - 3' (配列番号 1) を有する、請求項 69 の脂質ナノ粒子。

【請求項 71】

オリゴヌクレオチドのヌクレアーゼ安定性を高めるために 2' - O - メチル - 修飾化オリゴヌクレオチド (小文字) とホスホロチオエート連結 (下付きの s) が配列に含まれる、請求項 70 の脂質ナノ粒子。

【請求項 72】

抗 miR - 221 が複合した脂質ナノ粒子を含んでなる組成物。

20

【請求項 73】

脂質ナノ粒子が SPLN - G20v1 と SPLN - G20v2 を含み、ここで SPLN - G20 バージョン 1 (SPLN - G20v1) は、DMHDA、DOTAP、GRAM、DOPE、及びTPGSを40:5:20:30:5のモル比で含み、そしてここで SPLN - G20 (SPLN - G20v2) は、DODAP、DOTAP、GRAM、SoyPC (SPC)、及びTPGSを40:5:20:30:5のモル比で含む、請求項 72 の組成物。

【請求項 74】

脂質ナノ粒子が SPLN - G20v1 と SPLN - G20v2 を 15:1 の N:P で含む、請求項 73 の組成物。

30

【請求項 75】

請求項 69、70、71、72、73 又は 74 の脂質ナノ粒子の有効量を投与することを含んでなる、乳癌を有するか又は有することが疑われる被験者を治療する方法。

【請求項 76】

乳癌に罹患している被験者において癌抑制効果を提供する方法であって、ここで miR - 221 発現レベルは、対照被験者に比べて症例被験者の癌細胞においてより高く、請求項 69、70、71、72、73、又は 74 の組成物の有効量を該被験者へ投与することを含んでなる、前記方法。

【請求項 77】

脂質ナノ粒子が miR - 221 発現を下方調節する、請求項 76 の方法。

40

【請求項 78】

乳癌がトリプルネガティブ乳癌を含む、請求項 76 の方法。

【請求項 79】

被験者がヒトである、請求項 78 の方法。

【請求項 80】

脂質ナノ粒子と複合した抗 miR - 155 を含んでなる組成物。

【請求項 81】

脂質ナノ粒子が Lac - GLN を含み、ここで Lac - GLN は、ラクトビオン酸 (LA) から構成され、ガラクトース部分を担い、そしてリン脂質へ連結する親油性アシアロ糖タンパク質受容体 (ASGR) 標的化リガンドを含む、請求項 80 の組成物。

【請求項 82】

50

脂質ナノ粒子中へ取り込まれたグラミシジン A がさらに含まれる、請求項 80 又は 81 の組成物。

【請求項 83】

DODAP、Lac-DOPE、DOPE、DMG-PEG、及びグラミシジン A を 50 : 10 : 28 : 2 : 10 のモル比で含んでなる、請求項 82 の組成物。

【請求項 84】

抗 miR-155 が配列：5' - A * C * C C C U A U C A C G A U U A G C A U U * A * A - 3' (配列番号 6) を有する、請求項 80 の組成物。

【請求項 85】

配列がホスホロチオエート連結 (*) と 2' - O - メチルを含有する、請求項 84 の組成物。

10

【請求項 86】

請求項 80、81、82、83、84、又は 85 の脂質ナノ粒子の有効量を投与することを含んでなる、肝臓癌を有するか又は有することが疑われる被験者を治療する方法。

【請求項 87】

肝臓癌に罹患している被験者において癌抑制効果を提供する方法であって、ここで miR-155 発現レベルは、対照被験者に比べて症例被験者の癌細胞においてより高く、請求項 80、81、82、83、84、又は 85 の脂質ナノ粒子の有効量を該被験者へ投与することを含んでなる、前記方法。

【請求項 88】

脂質ナノ粒子が C / E B P 遺伝子と F O X P 3 遺伝子を下方調節する、請求項 87 の方法。

20

【請求項 89】

被験者がヒトである、請求項 86、87、又は 88 の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

[0001] 本出願は、その開示の全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国仮特許出願 61 / 650 , 729 (2012 年 5 月 23 日出願) 及び米国仮特許出願 61 / 784 , 892 (2013 年 3 月 14 日出願) に対する優先権を主張する。

30

【0002】

連邦政府支援研究に関する陳述

[0002] 本発明は、アメリカ国立衛生研究所によって授与された認可番号：R01CA135243、DK088076、及び CA152969 の下での政府支援でなされた。連邦政府は、本発明に一定の権利を有する。

【0003】

配列表

[0003] 本出願は、EFS-ウェブより提出されて、その全体が参照により本明細書に組み込まれる配列表を含有する。2013 年 5 月 22 日に作成された ASCII コピーは、604_54848_SEQ_LIST_OSU-2013-246.txt と名付けられて、大きさは 3 , 490 バイトである。

40

【0004】

技術分野

[0004] 本開示は、限定されないが、核酸 (NA) が含まれる、治療用組成物の送達に使用可能な脂質ナノ粒子 (LN) に関する。

【背景技術】

【0005】

[0005] リポソームは、親水性分子を水性コアの内側で運ぶか又は疎水性分子をその脂質二重層 (複数) の内側で運ぶことが可能な、1 以上の脂質二重層より構成される小胞で

50

ある。本明細書に使用するように、「脂質ナノ粒子」(LN)は、サブミクロン範囲の脂質ベースの粒子について記載するための一般的な用語である。LNは、リボソームの構造特性を有すること、及び/又は代わりの非二重層タイプの構造を有することが可能である。LNによる全身経路を介した薬物送達には、いくつかの生理学的障壁を克服することが求められる。LNの循環からのクリアランスは、細網内皮系(RES)が原因である。この血管構造から逃れて標的細胞に達すると、LNは、典型的にはエンドサイトーシスによって取り込まれて、酸性エンドソーム状況内での分解に先立って、薬物を細胞質へ放出しなければならない。

【0006】

[0006] 特に、siRNAや他の治療用オリゴヌクレオチドが含まれるような核酸(NA)の送達は、重大な技術課題であって、その臨床転用(clinical translation)の潜在可能性を制限してきた。

10

【0007】

[0007] 効率的な送達担体の開発は、オリゴヌクレオチド(ON)治療薬の臨床転用の鍵である。LN製剤には、(1)薬物を酵素分解より防護する；(2)毛細血管内皮を横断する；(3)過度の免疫活性化も標的外の細胞毒性も引き起こさずに標的細胞型へ特異的に到達する；(4)エンドサイトーシスとエンドソーム放出を促進する；及び(5)コロイド安定性と長い貯蔵寿命がある安定した製剤を生成することが可能であるべきことが望まれている。

20

【発明の概要】

【0008】

[0008] 本発明で提供するのは、治療用オリゴヌクレオチドを高い効率で被包して、有効な送達のための物理学的及び生物学的な判定基準を満たすことができる脂質ナノ粒子である。ある態様において、脂質ナノ粒子は、三級アミンヘッド基のあるカチオン性脂質と四級アミンヘッド基のあるカチオン性脂質との組合せを含む。ある態様において、脂質ナノ粒子は、脂質に加えて、グラミシジンのような低分子ペプチドを含む。ある態様において、脂質ナノ粒子は、プロテイナーゼKのような、RNA分解酵素若しくはDNA分解酵素分解剤を含む。これらの態様の組合せがさらに提供される。四級及び三級アミン-カチオン性脂質(QTソーム)、グラミシジン(A、B、C、又はD)(SPLN-G)、及び/又はプロテイナーゼK(PrKソーム)の組合せの取込みは、脂質ナノ粒子製剤のトランスフェクション効率を高める。

30

【0009】

[0009] 第一の側面において、本発明で提供するのは、三級アミン-カチオン性脂質と四級アミン-カチオン性脂質の組合せを含んでなる脂質ナノ粒子である。ある態様において、三級アミン-カチオン性脂質は、DODAP、DODMA、DC-CHOL、N,N-ジメチルヘキサデシルアミン、又はこれらの組合せより選択される。ある態様において、四級アミン-カチオン性脂質は、DOTAP、DOTMA、DDAB、又はこれらの組合せより選択される。ある態様において、三級アミン-カチオン性脂質の濃度は、全脂質含量の50.0モルパーセント未満である。ある態様において、四級アミン-カチオン性脂質の濃度は、全脂質含量の20.0モルパーセント未満である。特別な態様において、脂質ナノ粒子は、脂質のDODMA及びDOTMAを45:0、5:40、15:30、22.5:22.5、30:15、又は40:5より選択されるモル比で含む。ある態様において、脂質ナノ粒子は、脂質のDMHDA及びDOTAPを90:10、70:30、50:50、30:70、又は10:90より選択されるモル比で含む。

40

【0010】

[0010] ある態様において、脂質ナノ粒子は、核酸、タンパク質、多糖、脂質、放射活性物質、治療薬剤、プロドラッグ、栄養補給剤、バイオマーカー、又はこれらの組合せより選択される分子を被包する。ある態様において、被包化分子は、プラスミドDNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、miR、抗miR、shRNA、siRNA、又はこれらの組合せより選択される核酸を含む。ある態様において、治療薬剤又はヌクレオチドの

50

被包率は、20%以上である。

【0011】

[0011] ある態様において、脂質ナノ粒子は、カチオン性ポリマーをさらに含む。特別な態様において、カチオン性ポリマーは、スペルミン、ジスペルミン、トリスペルミン、テトラスペルミン、オリゴスペルミン、テルミン、スペルミジン、ジスペルミジン、トリスペルミジン、オリゴスペルミジン、プトレシン、ポリリジン、ポリアルギニン、分岐鎖又は直鎖型のポリエチレンイミン、及びポリアリルアミンからなる群より選択される。

【0012】

[0012] ある態様において、脂質ナノ粒子は、膜融合性ペプチドをさらに含む。

【0013】

[0013] ある態様において、脂質ナノ粒子は、300nm未満の直径を有する。

【0014】

[0014] 別の広い側面において、本発明で提供するのは、300nm未満の直径を有してペプチドを含んでなる脂質ナノ粒子である。ある態様において、ペプチドは、グラミシジンA、B、C、D、又はS；JTS-1；プロテイナーゼK（PrK）；トリコロピン-XIIa；狂犬病ウイルス糖タンパク質；インターロイキン-1；HIV-Tat；単純ヘルペスウイルスVP22タンパク質；及びこれらの組合せより選択される。ある態様において、該ペプチドは、抗生物質を含む。特別な態様において、抗生物質は、グラミシジンA、B、C、D、又はSより選択される。特別な態様において、ペプチドは、本質的に脂質化JTS-1膜融合性ペプチドからなる。特別な態様において、脂質化JTS-1膜融合性ペプチドは、全製剤の約0～約30モルパーセントで存在する。

【0015】

[0015] ある態様において、脂質ナノ粒子は、プロテイナーゼKをさらに含む。プロテイナーゼKは、全製剤の約0～約30モルパーセントで存在し得る。

【0016】

[0016] ある態様において、脂質ナノ粒子は、核酸、タンパク質、多糖、脂質、放射性物質、治療薬剤、プロドラッグ、栄養補給剤、バイオマーカー、又はこれらの組合せより選択される分子を被包する。ある態様において、被包化分子は、プラスミドDNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、miR、抗miR、shRNA、siRNA、又はこれらの組合せより選択される核酸を含む。

【0017】

[0017] 別の広い側面において、本発明で提供するのは、DNA分解酵素若しくはRNA分解酵素分解剤を含んでなる脂質ナノ粒子である。ある態様において、DNA分解酵素若しくはRNA分解酵素分解剤は、本質的にプロテイナーゼKからなる。ある態様において、ナノ粒子は、核酸、タンパク質、多糖、脂質、放射性物質、治療薬剤、プロドラッグ、栄養補給剤、バイオマーカー、又はこれらの組合せより選択される分子を被包する。特別な態様において、被包化分子は、pDNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、miR、抗miR、shRNA、siRNA、又はこれらの組合せより選択されるオリゴヌクレオチドを含む。ある態様において、脂質ナノ粒子は、300nm未満の直径を有する。

【0018】

[0018] 別の広い側面において、本発明で提供するのは、300nm未満の直径を有して、三級アミン-カチオン性ヘッド基と四級アミン-カチオン性ヘッド基の混合物；抗生物質；及びDNA分解酵素若しくはRNA分解酵素分解剤の2以上の組合せを含んでなる脂質ナノ粒子である。ある態様において、DNA分解酵素若しくはRNA分解酵素分解剤は、本質的にプロテイナーゼKからなる。ある態様において、抗生物質は、グラミシジンA、B、C、D、又はSを含む。

【0019】

[0019] 本明細書に記載する脂質ナノ粒子製剤のいずれも、ポリエチレングリコール-脂質コンジュゲートを含んでよい。ある態様において、ポリエチレングリコール-脂質コンジュゲートは、ポリソルベート80、TPGS、mPEG-DSPE、PEG-DMG

10

20

30

40

50

より選択される。ある態様において、ポリエチレングリコール - 脂質は、約 10.0 モルパーセント未満の濃度で存在する。ある態様において、脂質ナノ粒子は、N, N - ジメチルヘキサデシルアミンをさらに含む。特別な態様において、N, N - ジメチルヘキサデシルアミンは、製剤の約 60.0 モルパーセント未満の濃度で存在する。

【0020】

【0020】 ある態様において、脂質ナノ粒子は、標的細胞又は標的分子へ結合することが可能なリガンドをさらに含む。ある態様において、リガンドは、抗体又は抗体断片である。特別な態様において、リガンドは、cRGD、ガラトース含有部分、トランスフェリン、葉酸塩、低密度リポタンパク質、又は表皮増殖因子より選択される。

【0021】

【0021】 別の広い側面において、本発明で提供するのは、本明細書に記載するような脂質ナノ粒子と医薬的に許容される賦形剤を含んでなる医薬組成物である。ある態様において、医薬組成物は、経口的に、静脈内に、腹腔内に、皮下に、又は経皮的に投与される、ある態様において、医薬組成物は、経口投与錠剤、無菌溶液剤、無菌懸濁液剤、凍結乾燥散剤、又は坐剤として調製される。

【0022】

【0022】 別の広い側面において、本発明で提供するのは、癌又は感染症を診断するか又は治療する方法である。本発明は、本明細書に記載するような医薬組成物の有効量をその必要な患者へ投与することを含む。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】 【0023】 図1：SK - HEP - 1細胞におけるルシフェラーゼ発現の下方調節。ルシフェラーゼ発現性細胞を、三級アミン（DODMA、DMA）及び四級アミン（DOTMA、TMA）、（QTソーム）の数種の異なる組合せを含んでなるLNによって送達されるルシフェラーゼ特異的siRNAで処理した。リポフェクタミン2000（Lipo2000）を陽性対照として使用する。ルシフェラーゼ活性は、未処理細胞に対する百分率として表される。

【図2】 【0024】 図2：QTソーム中のG3139による、KB細胞におけるBcl - 2発現の下方調節。様々な量のDMHDAを含有するQTソームについて評価した。Lipo2000を陽性対照として使用する。アクチンに対するBcl - 2 mRNA発現をRT - PCRによって定量して、ここでは、未処理KB細胞をmRNA発現のベースラインとして役立てた。

【図3】 【0025】 図3：c - mybと15 : 1のN : Pで縮合したSPLN - Gのゼータ電位。

【図4】 【0026】 図4：0%及び20%の血清条件下にSPLN - Gで処理したSK - HEP - 1細胞の生存度。細胞生存度は、未処理SK - HEP - 1細胞の平均生存度に対する百分率として表される。

【図5】 【0027】 図5：SPLN - Gを使用して送達されたルシフェラーゼ - siRNAによる、SK - HEP - 1細胞におけるルシフェラーゼ発現の下方調節。リポフェクタミン2000（Lipo2000）を陽性対照として使用する。ルシフェラーゼ活性は、未処理細胞に対する百分率として表される。

【図6】 【0028】 図6：G3139（Bcl - 2に対するASO）をロードしたSPLN - Gを使用する、MCF - 7細胞におけるBcl - 2発現の下方調節。Lipo2000を陽性対照として使用する。アクチンに対するBcl - 2 mRNA発現をRT - PCRによって定量して、ここでは、未処理MCF - 7細胞をmRNA発現のベースラインとして役立てた。

【図7】 【0029】 図7：G3139（Bcl - 2に対するASO）をロードしたSPLN - Gを使用する、KB細胞におけるBcl - 2発現の下方調節。Lipo2000を陽性対照として使用する。アクチンに対するBcl - 2 mRNA発現をRT - PCRによって定量して、ここでは、未処理KB細胞をmRNA発現のベースラインとして役立てた。

10

20

30

40

50

【図 8】[0030] 図 8：S P L N - G のサイズ及びゼータ電位に対するラクトシル化の効果。これらは、アシアロ糖タンパク質受容体 (A S G R) を介して肝臓細胞と肝癌細胞を標的とする。

【図 9】[0031] 図 9：ルシフェラーゼ発現性 S K - H E P - 1 細胞における、ルシフェラーゼアッセイによる、アシアロ糖タンパク質受容体 (A S G R) 標的化と S P L N - G 中のグラミシジンの評価。ルシフェラーゼ活性は、未処理細胞に対する百分率として表される。

【図 10】[0032] 図 10：共焦点顕微鏡法による S P L N - G の細胞トラフィック。D A P I (青色) を使用して、細胞の核を染色した。s i R N A - C y 3 (赤色) を使用して、s i R N A の内部化を追跡した。重なり部分は、高百分率の s i R N A が細胞質へ送達されることを示す。

【図 11】[0033] 図 11：フローサイトメトリーによる、C y 3 - s i R N A を被包する非標的指向性 S P L N - G とラクトシル化 S P L N - G (L a c - S P L N - G) の細胞内取込み。

【図 12】[0034] 図 12：S K - H E P - 1 細胞における、L a c - S P L N - G - 抗 m i R - 1 5 5 による m i R - 1 5 5 の下方調節。スクランブル (scrambled) 対照 m i R N A (S C) を陰性対照として使用した。R N U 6 B に対する m i R - 1 5 5 発現を R T - P C R によって定量して、ここでは、未処理 S K - H E P - 1 細胞を m R N A 発現のベースラインとして役立てた。

【図 13】[0035] 図 13：L a c - S P L N - G - s i R N A 複合体の様々な脂質対 s i R N A (w / w) 比でのゲル移動度シフト分析。

【図 14】[0036] 図 14：L O R - 1 2 8 4 (リボヌクレオチドレダクターゼ R N R R 2 サブユニットを標的とする s i R N A、Dharmacon より購入) を担う P r K ソームを使用する、K B 細胞における R N R R 2 発現の下方調節。アクチンに対する R N R R 2 m R N A 発現を q R T - P C R によって定量して、ここでは、未処理 K B 細胞を m R N A 発現のベースラインとして役立てた。

【図 15 A】[0037] 図 15 A ~ B：様々な血清条件中の P r K ソームでの、R N R R 2 発現レベルの下方調節。図 15 A は、無血清を示し；図 15 B は、5 % F B S を示す。

【図 15 B】[0037] 図 15 A ~ B：様々な血清条件中の P r K ソームでの、R N R R 2 発現レベルの下方調節。図面 15 A は、無血清を示し；図面 15 B は、5 % F B S を示す。

【図 15 C】図 15 C は、10 % F B S を示す。アクチンに対する R N R R 2 m R N A 発現をリアルタイム R T - P C R によって定量して、ここでは未処理 K B 細胞を m R N A 発現のベースラインとして役立てた。

【図 16】[0038] 図 16：P r K の有り及び無しでの脂質ナノ粒子の比較細胞生存度試験。細胞生存度は、未処理 K B 細胞の平均生存度に対する百分率として表される。

【図 17】[0039] 図 17：L O R - 1 2 8 4 s i R N A の血漿中の安定性試験。P r K ソーム製剤をマウス血漿中で 72 時間にわたってインキュベートして、残存する s i R N A の相対量をゲル電気泳動法によって可視化した。

【図 18】[0040] 図 18：1 : 0 . 3 (w / w) の s i R N A : P r K を含有する P r K ソームの温度依存性のゼータ電位。

【図 19】[0041] 図 19：10 % F B S 培地中の P r K ソームによって送達される L O R - 1 2 8 4 s i R N A による R N R R 2 下方調節の温度依存性の効力。アクチンに対する R N R R 2 m R N A 発現をリアルタイム R T - P C R によって定量して、ここでは未処理 K B 細胞を m R N A 発現のベースラインとして役立てた。

【図 20】[0042] 図 20：Q T ソームの作用機序。

【図 21】[0043] 図 21：S P L N - G の図示。

【図 22】[0044] 図 22：プロテイナーゼ K コーティングは、血清に存在する D N A 分解酵素及び R N A 分解酵素よりオリゴヌクレオチドを防護する。

10

20

30

40

50

【図 2 3】[0045] 図 2 3 : J T S - 1 膜融合性ペプチドのある S P L N - J とプロテイナーゼ K コーティングのある L N の図解。

【図 2 4】[0046] 図 2 4 : M D A - M B - 4 6 8 乳癌細胞における、抗 m i R - 2 2 1 をロードした S P L N - G 2 0 による p 2 7 / k i p 1 m R N A の上方調節。このことは、S P L N - G 2 0 が抗 m i R の送達に有効な担体であることを示す。P 2 7 / K i p 1 は、m i R - 2 2 1 の標的である。この上方調節は、m i R - 2 2 1 機能の阻害を示す。

【図 2 5】[0047] 図 2 5 : B T - 5 4 9 細胞の p 2 7 / K i p 1 における S P L N - G 2 0 トランスフェクション。

【図 2 6】[0048] 図 2 6 : B T - 5 4 9 細胞の E R における S P L N - G 2 0 トランスフェクション。

【図 2 7】[0049] 図 2 7 : L a c - D O P E (青色)、D O P E (赤色)、及びラクトビオン酸 (緑色) の F T I R スペクトル。

【図 2 8 A】[0050] 図 2 8 A ~ B : L a c - G L N の特性決定 : 図 2 8 A は、様々な度合いのラクトシル化での G L N の粒径及びゼータ電位を示す。それぞれの値は、5 回の測定値の平均 \pm S D を表した。図 2 8 B は、抗 m i R - 1 5 5 - L a c - G L N の T E M による形態を示す。スケールバーは、1 0 0 n m を表す。

【図 2 8 B】[0050] 図 2 8 A ~ B : L a c - G L N の特性決定 : 図 2 8 A は、様々な度合いのラクトシル化での G L N の粒径及びゼータ電位を示す。それぞれの値は、5 回の測定値の平均 \pm S D を表した。図 2 8 B は、抗 m i R - 1 5 5 - L a c - G L N の T E M による形態を示す。スケールバーは、1 0 0 n m を表す。

【図 2 9 A】[0051] 図 2 9 A ~ 2 9 B : L a c - G L N の特性決定 : 図 2 9 A) L a c - G L B のコロイド安定性。L a c - G L N - 抗 m i R - 1 5 5 を 4 または 2 5 で保存して、粒径を経時的に測定した。結果は、3 回の別々の実験の平均値である。エラーバーは、標準偏差を表す。図 2 9 B) 抗 m i R - 1 5 5 - L a c - G L N の血清安定性。抗 m i R - 1 5 5 単独又は抗 m i R - 1 5 5 - L a c - G L N を 5 0 % F B S と 3 7 で 0 時間、4 時間、及び 1 2 時間混合した。次いで、試料をゲル電気泳動で分析した。

【図 2 9 B】[0051] 図 2 9 A ~ 2 9 B : L a c - G L N の特性決定 : 図 2 9 A) L a c - G L B のコロイド安定性。L a c - G L N - 抗 m i R - 1 5 5 を 4 または 2 5 で保存して、粒径を経時的に測定した。結果は、3 回の別々の実験の平均値である。エラーバーは、標準偏差を表す。図 2 9 B) 抗 m i R - 1 5 5 - L a c - G L N の血清安定性。抗 m i R - 1 5 5 単独又は抗 m i R - 1 5 5 - L a c - G L N を 5 0 % F B S と 3 7 で 0 時間、4 時間、及び 1 2 時間混合した。次いで、試料をゲル電気泳動で分析した。

【図 3 0】[0052] 図 3 0 : 抗 m i R - 1 5 5 含有 G L N と抗 m i R - 1 5 5 含有 L a c - G L N の物理化学特性。数値は、平均 \pm S D (n = 5) である。

【図 3 1】[0053] 図 3 1 : 共焦点顕微鏡法によって決定されるような、H e p G 2 細胞における、C y 3 - 抗 m i R - 1 5 5 含有 L a c - G L N と他の対照製剤の細胞内取込み。

【図 3 2 A】[0054] 図 3 2 A ~ C : G L N、L a c - G L N、又は 2 0 m M ラクトース及び 1 % B S A と共にプレインキュベートした L a c - G L N で H e p G 2 細胞を処理した。蛍光シグナルを F A C S C a l i b u r フローサイトメーターで測定した。図 3 2 A は、G L N 又は L a c - G L N で処理した H e p G 2 細胞を示す。図 3 2 B と図 3 2 C は、2 0 m M ラクトース及び 1 % B S A でのプレインキュベーションの L a c - G L N と G L N に対する効果をそれぞれ示す。X 軸が蛍光強度を示して Y 軸が細胞数を示すヒストグラムにおいて結果を示す。

【図 3 2 B】[0054] 図 3 2 A ~ C : G L N、L a c - G L N、又は 2 0 m M ラクトース及び 1 % B S A と共にプレインキュベートした L a c - G L N で H e p G 2 細胞を処理した。蛍光シグナルを F A C S C a l i b u r フローサイトメーターで測定した。図 3 2 A は、G L N 又は L a c - G L N で処理した H e p G 2 細胞を示す。図 3 2 B と図 3 2 C は、2 0 m M ラクトース及び 1 % B S A でのプレインキュベーションの L a c - G L N と G L N

10

20

30

40

50

に対する効果をそれぞれ示す。X軸が蛍光強度を示してY軸が細胞数を示すヒストグラムにおいて結果を示す。

【図32C】[0054] 図32A～C：GLN、Lac-GLN、又は20mMラクトース及び1% BSAと共にプレインキュベートしたLac-GLNでHepG2細胞を処理した。蛍光シグナルをFACSCalibur フローサイトメーターで測定した。図32Aは、GLN又はLac-GLNで処理したHepG2細胞を示す。図32Bと図32Cは、20mMラクトース及び1% BSAでのプレインキュベーションのLac-GLNとGLNに対する効果をそれぞれ示す。X軸が蛍光強度を示してY軸が細胞数を示すヒストグラムにおいて結果を示す。

【図33A】[0055] 図33A～33C：Lac-GLNと他の製剤のin vitro送達。図33A) Luc- siRNA含有Lac-GLNと他の対照製剤のin vitro送達。SK-HEP-1細胞をLuc- siRNA含有Lac-GLNで、100nMの濃度で4時間トランスフェクトして、トランスフェクション後48時間でルシフェラーゼ遺伝子発現を評価した。結果は、4回の反復試験の平均である。エラーバーは、標準偏差を表す。図33B) MTS分析からのLac-GLNの細胞毒性。結果は、平均±SDを表す。図33C) 抗miR-155を含有するLac-GLN製剤と対照製剤のin vitro送達。HepG2細胞を抗miR-155含有Lac-GLNで、100nMの濃度で4時間トランスフェクトして、トランスフェクション後48時間でmiR-155発現を評価した。結果は、3回の反復試験の平均である。エラーバーは、標準偏差を表す。

【図33B】[0055] 図33A～33C：Lac-GLNと他の製剤のin vitro送達。図33A) Luc- siRNA含有Lac-GLNと他の対照製剤のin vitro送達。SK-HEP-1細胞をLuc- siRNA含有Lac-GLNで、100nMの濃度で4時間トランスフェクトして、トランスフェクション後48時間でルシフェラーゼ遺伝子発現を評価した。結果は、4回の反復試験の平均である。エラーバーは、標準偏差を表す。図33B) MTS分析からのLac-GLNの細胞毒性。結果は、平均±SDを表す。図33C) 抗miR-155を含有するLac-GLN製剤と対照製剤のin vitro送達。HepG2細胞を抗miR-155含有Lac-GLNで、100nMの濃度で4時間トランスフェクトして、トランスフェクション後48時間でmiR-155発現を評価した。結果は、3回の反復試験の平均である。エラーバーは、標準偏差を表す。

【図33C】[0055] 図33A～33C：Lac-GLNと他の製剤のin vitro送達。図33A) Luc- siRNA含有Lac-GLNと他の対照製剤のin vitro送達。SK-HEP-1細胞をLuc- siRNA含有Lac-GLNで、100nMの濃度で4時間トランスフェクトして、トランスフェクション後48時間でルシフェラーゼ遺伝子発現を評価した。結果は、4回の反復試験の平均である。エラーバーは、標準偏差を表す。図33B) MTS分析からのLac-GLNの細胞毒性。結果は、平均±SDを表す。図33C) 抗miR-155を含有するLac-GLN製剤と対照製剤のin vitro送達。HepG2細胞を抗miR-155含有Lac-GLNで、100nMの濃度で4時間トランスフェクトして、トランスフェクション後48時間でmiR-155発現を評価した。結果は、3回の反復試験の平均である。エラーバーは、標準偏差を表す。

【図34A】[0056] 図34A～B：miR-155及び標的遺伝子の発現に対する、異なる濃度の抗miR-155処理のin vitro評価。図34Aは、miR-155発現に対する、異なる濃度の抗miR-155処理の評価を示す。100nM又は200nMの抗miR-155含有リポフェクタミン2000及びLac-GLNでHepG2細胞を4時間トランスフェクトして、トランスフェクション後48時間でmiR-155発現を評価した。数値は、平均±SD (n=3)を表す。図34Bは、miR-155標的化遺伝子の発現の評価を示す。100nM及び200nMの抗miR-155を含有する陽性対照又はLac-GLNでHepG2細胞をトランスフェクトして48時間後にC/EBP及びFOX P3の遺伝子発現を評価した。結果は、3回の反復試験の平均である。エラーバーは、標準偏差を表す。

【図34B】[0056] 図34A～B：miR-155及び標的遺伝子の発現に対する、異

10

20

30

40

50

【図 3 7 C】[0059] 図 3 7 A ~ C : m i R - 1 5 5 及び標的遺伝子の発現に対する抗 m i R - 1 5 5 処理の生体内 (in vivo) 評価。1 . 5 m g / k g の抗 m i R - 1 5 5 含有 L a c - G L N 製剤と対照製剤で C 5 7 B L / 6 マウスを処理した。静脈内投与の 4 時間

50

後、肝臓組織を採取して、RNAを抽出した。それぞれの数値は、3回の測定値の平均 \pm SDを表す。図37Aは、リアルタイムRT-PCRによって分析されたmiR-155の発現を示す。図37B及び37Cは、リアルタイムRT-PCRによって分析された、miR-155の下流標的であるCEBP及びFOX P3の発現を示す。それぞれの数値は、3回の測定値の平均 \pm SDを表す。

【発明を実施するための形態】

【0024】

[0060] 本明細書では、脂質ナノ粒子の文脈で様々な態様を記載する。当業者は、以下の詳細な態様の記載が例示に他ならず、限定的であることを決して意図しないことを理解されよう。本開示の利益を享けるような当業者には、他の態様が自ずと容易に示唆されよう。本明細書での「態様」、「側面」又は「実施例」への言及は、そのように記載される本発明の態様に特別な特徴、構造、又は特性が含まれる場合があっても、その特別な特徴、構造、又は特性がどの態様にも必ず含まれるわけではないことを示す。さらに、「1つの態様において」という句の反復使用は、同じ態様へ言及する場合があるとしても、必ずしも同じ態様へ言及するわけでない。

10

【0025】

[0061] 本明細書に記載する実行又は方法の定番の特徴をすべて示して記載するわけではない。当然ながら、そのような実際の実行の開発においては、応用及び事業に関連した制約の遵守といった、開発者の具体的な目標を達成するために数多くの実行特異的な決定がなされて、これらの具体的な目標は、実行ごとに、そして開発者ごとに異なると理解されよう。さらに、そのような開発努力は複雑で時間がかかるかもしれないが、それでも本開示の利益を享ける当業者にとっては、定番の作業になると理解されよう。

20

【0026】

[0062] 一般的な記載

[0063] 遺伝子発現を促進するか又は阻害するために核酸(NA)ベース治療薬が開発されている。遺伝子中の突然変異とmiRNAプロフィール中の変化が癌や他の疾患の根本原因であると考えられているので、NAベースの薬剤は、根本的な病因に直接作用して、治療ポテンシャルを最大にする可能性がある。NAベース治療薬の非限定的な例には：プラスミドDNA(pDNA)、低分子干渉RNA(siRNA)、小ヘアピンRNA(shRNA)、マイクロRNA(miR)、ミミック(模倣体)、抗miR/アンタゴミR/miR阻害剤、及びアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)が含まれる。本明細書に記載するナノ粒子組成物の開発まで、NAベース治療薬の臨床転用は、NAをその細胞内標的へ輸送することが特に難題であること、そしてNAが相対的に不安定で血清や細胞ヌクレアーゼによる分解を受けやすいことから、その実行においていくつかの障害(obstacles)に直面した。さらに、NAの高い陰電荷は細胞膜を通過するその輸送を不可能にして、さらに有用性を制限した。

30

【0027】

[0064] 本明細書に記載するLNは、慣用の治療用化合物とNAベース治療薬の両方の送達に有用な基盤を提供する。LNを使用して製剤化される薬物は、亢進された透過性及び保持(EPR)効果により、増加した血液循環時間や固形腫瘍の部位での増加した蓄積といった、望ましい生体内薬物動態(PK)特性を提供する。さらに、ある態様において、LNは、血清タンパク質によるLNのオプソニン化と生じるRES媒介性の取込みを抑制するためにポリエチレングリコールで表面コートしてよい、及び/又は標的指向性の薬物送達を提供するために細胞特異的リガンドでコートしてよい。

40

【0028】

[0065] 全身性の送達のために、LNのゼータ電位は、過度に陽性でも陰性でもないことが望ましい。高い陽電荷があるLNは、非標的の細胞、組織、及び循環血漿タンパク質と非特異的に相互作用する傾向があって、細胞毒性を引き起こす場合がある。あるいは、高い陰電荷があるLNは、それ自体が陰電荷であるNAを有効に取り込むことができないので、迅速なRES媒介性のクリアランスを誘発して、治療効力を低下させる場合がある

50

。生体内の薬物及び遺伝子送達には、中性～中位の電荷があるLNが最も適している。

【0029】

[0066] 本発明で提供するものは、トランスフェクション活性が改善された脂質ナノ粒子(LN)である。この脂質ナノ粒子は、脂質膜の内側で疎水性分子を分配しても、水性コアの内側で水溶性の粒子又は分子を被包してもよい。ある態様において、LN製剤は、脂質の混合物を含み、これには、一般的には帯電脂質と中性脂質が含まれて、さらにPEG化脂質及び/又はコレステロールが含まれてもよい。本開示のLN製剤は、四級アミンと三級アミンの組合せ、グラミシジン(A、B、C、D、又はS)のようなペプチド、又はプロテイナーゼKのようなRNA分解酵素若しくはDNA分解酵素・分解剤を含んでよい。ある態様において、脂質ナノ粒子は、四級アミンヘッド基のあるカチオン性脂質と三級アミンヘッド基のあるカチオン性脂質を組み合わせることによって産生される。ある態様において、脂質ナノ粒子は、低分子ペプチド性の脂質ナノ粒子(SPLN)であって、グラミシジン又はJTS1のようなペプチドを含む。ある態様において、脂質ナノ粒子は、プロテイナーゼKでコートされ、それにより血清の存在下でのトランスフェクションが高められる。容易に参照できるように、グラミシンを含んでなるSPLNを本明細書ではSPLN-Gと呼び、JTS-1ペプチドを含んでなるSPLNを本明細書ではSPLN-Jと呼んで、プロテイナーゼKを含んでなる脂質ナノ粒子を本明細書ではPrKソームと呼ぶ。これらの異なる態様の組合せがさらに提供される。LNは、300nm未満の直径を有するか、特別な態様では、約50nmと約200nmの間の直径を有する。これらのLNは、特に全身投与の間に見出される高血清条件の下で、亢進されたトランスフェクションと低下した細胞毒性を示す。このLNは、広範囲の現行の治療薬剤及びシステム、血清安定性、及び標的指向性の送達に、高いトランスフェクション効率で適用可能である。

【0030】

[0067] 本明細書に使用する「脂質ナノ粒子」という用語は、1以上の脂質成分によって形成されるあらゆる小胞を意味する。本明細書に記載するLN製剤には、カチオン性脂質を含めてよい。カチオン性脂質とは、どの生理学的pHでも正味の陽電荷を担う脂質である。この陽電荷は、ASOのような陰電荷の治療薬との静電相互作用を介した会合に使用される。

【0031】

[0068] 好適なカチオン性脂質には、限定されないが、3-[N-(N', N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル]コレステロール塩酸塩(DC-Chol); 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-ジメチルアンモニウム-プロパン(DODAP); ジメチルジオクタデシルアンモニウムプロミド塩(DDAB); 1, 2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリンクロリド(DL-EPC); N-[1-(2, 3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N-N-N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA); N-[1-(2, 3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N-N-N-ジメチルアンモニウムクロリド(DODMA); N, N-ジオクタデシル-N, N-ジメチルアンモニウムクロリド(DODAC); N-(1-(2, 3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N-2-(スペルミンカルボキサミド)エチル)-N, N-ジメチルアンモニウムトリフルオロアセテート(DOSPA); 1, 2-ジミリスチルオキシプロピル-3-ジメチルヒドロキシエチルアンモニウムプロミド(DMRIE); ジオクタデシルアミドグリシルスペルミン(DOGS); カチオン性修飾基ヘコンジュゲートした中性脂質; 並びにこれらの組合せが含まれる。加えて、LIPOFECTIN(登録商標)(販売元: ギブコ/BRL)、LIPOFECTAMINE(登録商標)(販売元: ギブコ/MRL)、siPORT NEOFX(登録商標)(販売元: アプライド・バイオシステムズ)、TRANSFECTAM(登録商標)(販売元: プロメガ)、及びTRANSFECTIN(登録商標)(販売元: Bio-Rad Laboratories 社)といった、入手可能な製品中の多くのカチオン性脂質も使用し得る。当業者は、さらに多くのカチオン性脂質が当該LN製剤における包含に適していることを認められよう。本開示のカチオン性脂質は、製剤中の脂質の約0～約80、

0 モルパーセントに及ぶ濃度で、又は製剤の約 5 . 0 ~ 約 5 0 . 0 モルパーセントに及ぶ濃度で存在してよい。

【 0 0 3 2 】

[0069] ある態様において、今回開示される L N 製剤には、アニオン性脂質も含まれてよい。アニオン性脂質とは、生理学的な pH で正味の陰電荷を担う脂質である。これらのアニオン性脂質は、カチオン性脂質と組み合わせられるとき、L N の全体の表面電荷を低下させて、L N 二重層構造の pH 依存性の破壊を導き、酸性 pH で非ラメラ相を誘発することによってヌクレオチド放出を促進するか又は細胞膜との融合を誘発するのに有用である。

【 0 0 3 3 】

[0070] 好適なアニオン性脂質の例には、限定されないが、オレイン酸、リノール酸、及びリノレン酸のような脂肪酸；コレステリルヘミスクシネート；1, 2 - ジ - O - テトラデシル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - (1' - rac - グリセロール) (ジエテル P G) ； 1, 2 - ジミリスティル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - (1' - rac - グリセロール) (ナトリウム塩) ； 1, 2 - ジミリスティル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - L - セリン (ナトリウム塩) ； 1 - ヘキサデカノイル, 2 - (9 Z, 12 Z) - オクタデカジジエノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスフェート；1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - rac - (1 - グリセロール)] (D O P G) ； ジオレオイルホスファチジン酸 (D O P A) ；及び 1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - L - セリン (D O P S) ；中性脂質へコンジュゲートしたアニオン性修飾基；並びにこれらの組合せが含まれる。本開示のアニオン性脂質は、製剤の約 6 0 . 0 モルパーセントまでの濃度で、又は製剤の約 5 . 0 ~ 約 2 5 . 0 モルパーセントの濃度で存在する。

【 0 0 3 4 】

[0071] ある態様では、帯電した L N がトランスフェクションに有利であるが、細胞毒性や R E S 媒介性の取込みといった標的外の効果が起こり得る。ポリエチレングリコール (P E G) のような親水性分子を脂質アンカーへコンジュゲートさせて、本明細書に記載する L N に含めて、L N 凝集や膜との相互作用を抑えることができる。親水性ポリマーは、脂質成分へ共有結合させても、架橋剤を使用してアミンのような官能基へコンジュゲートさせてもよい。

【 0 0 3 5 】

[0072] 親水性ポリマーの好適なコンジュゲートには、限定されないが、ポリビニルアルコール (P V A) ；ポリソルベート 8 0 ； 1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - P E G 2 0 0 0 (D S P E - P E G 2 0 0 0) ； D - トコフェリルポリエチレングリコール 1 0 0 0 スクシネート (T P G S) ；ジミリスティルホスファチジルエタノールアミン - P E G 2 0 0 0 (D M P E - P E G 2 0 0 0) ；及びジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン - P E G 2 0 0 0 (D P P E - P E G 2 0 0 0) が含まれる。親水性ポリマーは、製剤の約 0 ~ 約 1 5 . 0 モルパーセントに及ぶ濃度で、又は製剤の約 5 . 0 ~ 約 1 0 . 0 モルパーセントに及ぶ濃度で存在してよい。使用する P E G の分子量は、約 1 0 0 D a と約 1 0 , 0 0 0 D a の間であるか、又は約 1 0 0 D a ~ 約 2 , 0 0 0 D a である。

【 0 0 3 6 】

[0073] 本明細書に記載する L N は、中性及び / 又は両親媒性の脂質をヘルパー脂質としてさらに含んでよい。これらの脂質は、製剤を安定にする、生体内での消失を抑える、又はトランスフェクション効率を高めるために使用される。L N は、溶解安定性 (l y o s t a b i l i t y) 及び低温安定性 (c r y o s t a b i l i t y) を促進するために、限定されないが、グルコース、ソルビトール、スクロース、マルトース、トレハロース、ラクトース、セルビオース、ラフィノース、マルトトリオース、デキストラン、又はこれらの組合せのような糖類の溶液中で製剤化してよい。

【 0 0 3 7 】

[0074] 中性脂質は、生理学的な pH で 0 の正味電荷を有する。本明細書に開示すると

10

20

30

40

50

の L N 製剤にも、数種の中性脂質の 1 つ又は組合せを含めてよい。

【 0 0 3 8 】

[0075] 好適な中性脂質には、限定されないが、ホスファチジルコリン (P C)、ホスファチジルエタノールアミン、セラミド、セレブロシド、スフィンゴミエリン、セファリン、コレステロール、ジアシルグリセロール、グリコシル化ジアシルグリセロール、プレノール、リソソーム型 P L A 2 基質、N - アシルグリシン、並びにこれらの組合せが含まれる。

【 0 0 3 9 】

[0076] 他の好適な脂質には、限定されないが、ホスファチジルコリン、ホスファチジン酸、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルコリン、及びリソホスファチジルエタノールアミン；コレステロール、デモステロール、シトステロール、チモステロール、ジオスゲニン、ラノステノール、スチグマステロール、ラソステロール、及びデヒドロエピアンドロステロンのようなステロール類；及びスフィンゴシン、セラミド、スフィンゴミエリン、ガングリオシド、グリコスフィンゴ脂質、ホスホスフィンゴ脂質、フィトスフィンゴシンのようなスフィンゴ脂質；並びにこれらの組合せが含まれる。

10

【 0 0 4 0 】

[0077] 本明細書に記載する L N 製剤は、膜融合を促進するために、膜融合性脂質又は膜融合性コーティング剤をさらに含んでよい。好適な膜融合性脂質の例には、限定されないが、グリセリルモノオレエート、オレイン酸、パルミトレイン酸、ホスファチジン酸、ホスホイノシトール 4 , 5 - ビスホスフェート (P I P ₂)、並びにこれらの組合せが含まれる。

20

【 0 0 4 1 】

[0078] 本明細書に記載する L N 製剤は、カチオン性脂質をさらに含んでよい。このような脂質のヘッド基は、本質的に、一級、二級、三級、又は四級アミンであり得る。ある態様において、L N は、三級アミンと四級アミンの混合物を含む。

【 0 0 4 2 】

[0079] 好適な三級アミノ脂質には、限定されないが、D O D A P ; D O D M A ; N , N - ジメチルヘキサデシルアミン (D M H D A) ; 及び D C - C H O L が含まれる。好適な四級アミノ脂質には、限定されないが、D O T A P、D O T M A、及び D D A B が含まれる。多数のアミノ脂質の組合せ、特に三級カチオン性脂質と四級カチオン性脂質の組合せは、治療薬剤の L N 送達にとって有益である。カチオン性脂質は、組み合わせて約 6 0 モルパーセントまでの濃度で存在してよい。

30

【 0 0 4 3 】

[0080] 本明細書に記載する L N 製剤は、カチオン性ポリマー又はカチオン性ポリマーのコンジュゲートをさらに含んでよい。カチオン性ポリマー又はそのコンジュゲートは、単独で使用しても、脂質ナノ担体と組み合わせて使用してもよい。

【 0 0 4 4 】

[0081] 好適なカチオン性ポリマーには、限定されないが、ポリエチレンイミン (P E I) ; ペンタエチレンヘキサミン (P E H A) ; スペルミン ; スペルミジン ; ポリ (L - リジン) ; ポリ (アミドアミン) (P A M A M) デンドリマー ; ポリプロピレンイミンデンドリマー ; ポリ (2 - ジメチルアミノエチル) - メタクリレート (p D M A E M A) ; キトサン ; トリス (2 - アミノエチル) アミンとそのメチル化誘導体 ; 並びにこれらの組合せが含まれる。ポリマー送達系の実行には、鎖の長さや枝分かれが重要な考慮事項である。P E I (M W 2 5 , 0 0 0) のような高分子量ポリマーは、トランスフェクション剤として使用されるが、細胞毒性に悩まされる。低分子量 P E I (M W 6 0 0) は、細胞毒性を引き起こさないが、核酸との安定した縮合を促進する能力が無いことにより限界がある。

40

【 0 0 4 5 】

[0082] 今回開示した L N 製剤の中へアニオン性ポリマーも取り込んでよい。好適なア

50

ニオン性ポリマーには、限定されないが、ポリ（プロピルアクリル酸）（P P A A）；ポリ（グルタミン酸）（P G A）；アルギン酸塩；デキストラン；キサンタン；誘導化ポリマー；並びにこれらの組合せが含まれる。

【 0 0 4 6 】

【0083】 ある態様において、L N 製剤には、ポリマーのコンジュゲートが含まれる。このコンジュゲートは、標的化剤、親油性部分、ペプチド、タンパク質、又は全体の治療効力を高める他の分子へ架橋連結してよい。

【 0 0 4 7 】

【0084】 好適な架橋剤には、限定されないが、3 - [2 - ピリジルジチオ] - プロピオン酸 N - スクシンイミジル（S P D P）；3 , 3 ' - ジチオビスプロピオンイミド酸ジメチル（D T B P）；ジシクロヘキシルカルボジイミド（D C C）；ジイソプロピルカルボジイミド（D I C）；1 - エチル - 3 - [3 - ジメチルアミノプロピル] カルボジイミド（E D C）；N - ヒドロキシスルホスクシンイミド（スルホ - N H S）；N ' - N ' - カルボニルジイミダゾール（C D I）；N - エチル - 5 - フェニルイソオキサゾリウム - 3 ' スルホネート（ウッドワード [Woodward's] 試薬 K）；並びにこれらの組合せが含まれる。

10

【 0 0 4 8 】

【0085】 L N 製剤は、ペプチド及び / 又はタンパク質をさらに含んでよい。ペプチドとタンパク質、特に細菌及びウイルスに由来して抗生剤として使用されるものは、膜透過に役立つ場合がある。このペプチド又はタンパク質は、脂質と直接混合しても、共有結合させても、架橋剤で脂質部分へコンジュゲートさせてもよい。

20

【 0 0 4 9 】

【0086】 好適なペプチド及びタンパク質には、限定されないが、グラミシジン A、B、C、D、及び S；H A 2；J T S - 1；プロテイナーゼ K（P r K）；トリコロピン - X I I a（T V - X I I a）；狂犬病ウイルス糖タンパク質（R V G）；インターロイキン - 1；H I V - T a t；単純ヘルペスウイルス（H S V）V P 2 2 タンパク質；並びにこれらの組合せが含まれる。ある態様において、J T S - 1 及び / 又はグラミシジンは、約 0 ~ 約 4 0 モルパーセントで使用される。ある態様では、P r K の L N 表面コーティングのために、約 0 ~ 約 3 0 モルパーセントの濃度の P r K がオリゴヌクレオチドとの直接混合又はヘキサデシルイソシアネートへのコンジュゲーションによって適用される。

30

【 0 0 5 0 】

【0087】 L N へ標的化剤を加えると、受動的な標的化アプローチに優って高められる効力が提供される。標的化には、限定されないが、細胞表面受容体に対するリガンド又は抗体、ペプチド、リポタンパク質、糖タンパク質、ホルモン、ビタミン、抗体、抗体断片、プロドラッグ、並びにこれらの部分のコンジュゲート又は組合せといった特定の標的化部分の取込みが関与する。

【 0 0 5 1 】

【0088】 ある態様において、標的化効率の最大化には、標的化剤の被包化よりむしろ、適正な標的化部分で L N を表面コーティングすることが含まれる。この方法により、細胞表面受容体との相互作用が最適化される。

40

【 0 0 5 2 】

【0089】 標的化剤は、合成の間に L N 中へ直接取り込んでも、後続の工程で加えてもよいと理解されたい。L N 中への取込みの適正な手段を決定するのは、治療応用の仕様（specifications）（例、分解可能な連結）だけでなく、標的化部分上の官能基である。親油性領域を有さない標的化部分は、L N の脂質二重層の中へ直に挿入し得ないので、挿入の前に脂質への事前コンジュゲーションを必要とするか又は L N との静電複合体を生成しなければならない。

【 0 0 5 3 】

【0090】 また、ある状況下では、標的化リガンドが親油性アンカーへ直接結合することができない。これらの状況では、その相互作用を促進するために、架橋剤の形態をした分

50

子ブリッジを利用してよい。ある態様では、固定化された (anchored) 標的化部分の立体障害により企図される生理学的な標的との十分な相互作用が妨げられるならば、架橋剤を使用することが有利である。加えて、標的化部分がある配向下でのみ機能的である (例、モノクローナル抗体) ならば、架橋剤を介した脂質アンカーへの連結が有益である。ある態様では、標的化剤を LN へ連結するのに、他のバイオコンジュゲーションの方法を使用してよい。製剤の生体内での蓄積と関連する細胞毒性を防ぐには、還元可能又は加水分解可能な連結を適用してよい。

【0054】

[0091] 本開示の LN を合成するには、様々な LN 調製法が適している。例えば、エタノール希釈、凍結融解、薄膜水和、音波処理、押し出し、高圧均質化、界面活性剤透析、顕微溶液化、タンジェンシャルフロー透析濾過、濾過滅菌、及び / 又は凍結乾燥を利用してよい。加えて、LN のサイズを減少させるには、いくつかの方法を利用し得る。例えば、Avestin Emulsiflex C5 (登録商標) デバイスのような脂質均質化に適したどのデバイスでも均質化を実行してよい。適正な孔径 (0.05 ~ 0.2 μm) のポリカーボネート膜を使用する Lipex Biomembrane 押出機で押し出しを実行してよい。試料内のサイズ変動を最小にするには、多数の粒径縮小サイクルを実行し得る。次いで、生じる LN を Sepharose CL4B のようなサイズ排除カラムに通過させるか又はタンジェンシャルフロー透析濾過によって処理して、LN を精製し得る。

10

【0055】

[0092] 本明細書に記載する LN のどの態様にも、その調製法においてエタノールをさらに含めてよい。LN 製剤における約 30 ~ 50 % のエタノールの取込みは、脂質二重層を不安定にして、カチオン性脂質のような帯電部分とアニオン性の ASO 及び siRNA との間の静電相互作用を促進する。高濃度エタノール溶液において調製された LN は、投与前に希釈される。あるいは、透析又は透析濾過によってエタノールを除去してよく、これにより非被包化 NA も除去される。

20

【0056】

[0093] ある態様では、LN を滅菌することが望ましい。このことは、プレ濾過の有無で LN を 0.2 又は 0.22 μm の滅菌フィルターに通過させることによって達成し得る。

【0057】

[0094] LN の物理学的な特性決定は、多くの方法を介して行うことができる。動的光散乱法 (DLS) 又は原子間力顕微鏡法 (AFM) を使用して、平均直径とその標準偏差を定量することができる。ある態様では、LN が約 200 nm の直径を有することが特に望ましい。ゼータ電位計を介したゼータ電位の測定は、粒子の相対安定性を決定するのに有用である。動的光散乱分析もゼータ電位分析も、脱イオン水又は適正な緩衝溶液に希釈した試料で実行し得る。低温透過型電子顕微鏡法 (クライオ-TEM) と走査型電子顕微鏡法 (SEM) を使用して、LN の詳細な形態を決定することができる。

30

【0058】

[0095] 本明細書に記載する LN は、冷却下で数ヶ月間安定である。合成と投与の間で延長された期間が求められる LN は、標準手順を使用して凍結乾燥させてよい。製剤の完全性を維持するには、凍結に先立って、LN 懸濁液へ 10 % スクロースのような凍結防止物質を加えてよい。長期安定性には、凍結乾燥負荷した LN 製剤が推奨される。

40

【0059】

[0096] 四級及び三級アミン - カチオン性脂質 (QTソーム)

[0097] この LN の物理特性は、有窓性の腫瘍血管構造において亢進された透過性及び保持 (EPR) を促進するが、慣用の LN 製剤では、エンドソームからの脱出が依然として課題である。この目的を達成するために、核酸の複合化のために陽荷電の四級又は三級アミンベースのカチオン性脂質を含んでなる脂質ナノ粒子を開発した。四級アミンベースのカチオン性脂質は、永続的な陽電荷を担って、核酸との安定した静電複合体を生成することが可能である。しかしながら、三級アミン - カチオン性脂質は、条件付きでイオン化

50

可能であって、その陽電荷は、大部分がpHによって調節される。本発明で提供するのは、四級アミン・カチオン性脂質と三級アミン・カチオン性脂質の組合せ（QTソーム）を含んでなるLNであって、これは、治療薬剤がエンドソームの内側でLNより放出され得る機序を提供する。QTソームは、条件付きでイオン化可能であって、エンドソームの酸性条件下で、脂質二重層の破壊とオリゴヌクレオチドのエンドソーム放出を促進する。四級アミン・カチオン性脂質は、永続的に帯電していて、脂質とオリゴヌクレオチドの間の強い相互作用を確実にして、それによって安定性を確実にする。三級カチオン性脂質と四級カチオン性脂質の組合せは、それぞれの脂質群が個別ではあり得ない最適のpH応答プロフィールを提供する。QTソームは、細胞をトランスフェクトする場合に、通常のカチオン性リポソームより有効である。

10

【0060】

[0098] QTソームは、標準のカチオン性脂質製剤より大きなトランスフェクション活性を明示する。四級アミン・カチオン性脂質と三級アミン・カチオン性脂質の間の均衡を微調整することで、核酸の細胞質への正確な制御放出が可能になる。特別な態様では、特別な放出パラメータの使用により、核酸ベース治療薬の活性を最大化し得る技術が提供される。例えば、三級アミン・カチオン性脂質は、単独で使用されるとき、pH依存性のイオン化プロフィールを示す。単一の脂質分子種ではLN電荷特性の所望される制御レベルをもたらさない場合があるので、三級アミン・カチオン性脂質と四級アミン・カチオン性脂質の組合せを使用することにより、そのような組合せのsiRNA送達における有意に改善された活性をもたらすことができる。

20

【0061】

[0099] 図1は、三級カチオン性脂質と四級カチオン性脂質の組合せの相対的なルシフェラーゼ発現を図示する。5:40のQ対Tアミン・カチオン性脂質比では、ルシフェラーゼ発現性HCC細胞において、ルシフェラーゼのsiRNAトランスフェクションについて85%強の下方調節が示されている。図20は、QTソームの作用機序を図示する。pH7.4の下で、四級アミン・カチオン性脂質(QA-CL)は、「+」電荷を維持して、安定性をもたらす。pH5.5下では、QA-CLと三級アミン・カチオン性脂質(TA-CL)はともに帯電して、エンドソーム膜相互作用/破壊を促進する。

【0062】

[00100] 低分子ペプチド性の脂質ナノ粒子(SPLN)

30

[00101] 本発明でさらに提供するのは、低分子ペプチド性の脂質ナノ粒子(SPLN)であるLNである。ある態様において、SPLNは、抗生物質のグラミシジンを含む。本明細書に記載するのは、これまでトランスフェクション剤として検討されてこなかったグラミシジンのいくつかの変異体(A、B、C、D)である。これらのグラミシジンサブタイプは、保存されたペプチド配列をグラミシジンSと共有するが、グラミシジンA、B、C、及びDは、グラミシジンSが環状構造を形成するのに対し、ヘリックス構造を形成する。故に、グラミシジンA~Dは、グラミシジンSとは異なる。グラミシジン類は二量体化してイオノフォアを形成して膜融合を促進するが、それによりエンドソームとLNの脂質二重層の不安定化が促進される。従って、グラミシジンを含んでなるSPLNは、核酸ベース治療薬において理想的である。グラミシジンA、B、C、D、又はSのLN中への取込みは、ASOとsiRNAの細胞トランスフェクション効率を有意に高める。

40

【0063】

[00102] ある態様では、グラミシジンを利用するSPLNをSPLN-Gと指定して、製剤中のグラミシジンのモル百分率に相当する数を続ける。図21は、SPLN-Gを図示する。

【0064】

[00103] グラミシジンA、B、C、D、又はSを脂質ナノ粒子製剤へ組み合わせることによって、血清の存在下でのASO及びsiRNA製剤のトランスフェクション効率が高められる。グラミシジンは、エンドソーム膜二重層のODNへの易透化に役立つ。対照的に、リポフェクタミンTM 2000のようなトランスフェクション剤は、血清の存在下

50

では顕著に減少したトランスフェクション活性を示す。図 5 に示すように、ルシフェラーゼ *siRNA* のある *SPLN-G* は、*HCC* 細胞において血清の存在下で、低い細胞毒性と、トランスフェクション剤のリポフェクタミン 2000 (*LF*) より大きなトランスフェクション活性を明示する。血清の存在下でトランスフェクション活性の低下を示さない脂質ナノ粒子製剤は、血清条件が実際の患者中の条件を最もよく模倣するので有利であり、それによって臨床試験へのより良好な転用を容易にする。

【0065】

[00104] 本発明でさらに提供するのは、脂質化 *JTS-1* 膜融合性ペプチドを取り込んでいる *SPLN* である。これらの *SPLN-J* 粒子は、高いトランスフェクション活性を示して、*JTS-1* のコイルからヘリックスへの *pH* 依存性のコンホメーション変化によって始動される、高い膜融合活性を有する。

10

【0066】

[00105] プロテイナーゼ *K* (*PRK*) (*PRK* ソーム)

[00106] ヌクレオチドの投与後の血清中での分解は、脂質又はポリマー担体が関与するものであっても、核酸ベース治療薬にとって不断の懸案事項である。ヌクレオチドを分解に対してよりよく防護するために、しばしば、骨格や塩基対の修飾といった、ヌクレオチドへの改変が実行される。しかしながら、これらの修飾は、薬物の低下した活性又は標的外の活性をもたらす場合がある。この問題を克服するために、本発明で提供するの、*DNA* 分解酵素若しくは *RNA* 分解酵素分解剤を含んでなる脂質ナノ粒子製剤である。特別な態様において、*DNA* 分解酵素若しくは *RNA* 分解酵素分解剤は、プロテイナーゼ *K* (*PrK*) である。このプロテイナーゼ *K* コーティングは、血清に存在する *DNA* 分解酵素及び *RNA* 分解酵素よりオリゴヌクレオチドを防護する。これを図 23 に図示する。プロテイナーゼ *K* は、プロテイナーゼ *K* の無い脂質ナノ粒子よりよく *siRNA* を防護することができる。プロテイナーゼ *K* の包含は、*KB* 細胞において有意な細胞毒性を伴わずに、血清の存在下でトランスフェクション効率を高める。*PrK* ソームは、きわめて多用途性であって、天然オリゴヌクレオチドと化学修飾オリゴヌクレオチドの両方へ適用可能である。

20

【0067】

[00107] 本明細書に記載する *LN* のどの態様へもプロテイナーゼ *K* コーティングを取り込むことができる。非限定的な例を挙げると、図 24 は、プロテイナーゼ *K* コーティングのある *SPLN-J* を図示する。

30

【0068】

[00108] 応用例

[00109] 応用に依存して、本明細書に開示する脂質ナノ粒子は、核酸との相互作用の増加、血清安定性の増加、*RES* 媒介性の取込みの低下、標的指向性の送達、又はエンドソーム内部での *pH* 感受性の放出といった特性に有利になるように設計してよい。*LN* 製剤の多様な性質の故に、特別な治療目標を達成するには、本発明で提供するいくつかの方法のいずれも適用してよい。具体的な目標に応じるために、カチオン性脂質、アニオン性脂質、*PEG*-脂質、中性脂質、膜融合性脂質、アミノ脂質、カチオン性ポリマー、アニオン性ポリマー、ポリマーコンジュゲート、ペプチド、標的化部分、並びにこれらの組合せを適用してよい。

40

【0069】

[00110] 本明細書に記載する脂質ナノ粒子は、*siRNA*、*shRNA*、*miRNA*、抗 *miR*、及びアンチセンス *ODN* のようなオリゴヌクレオチド (*ON*) 治療薬の治療用送達の基盤として使用することができる。これらの治療薬は、様々な種類の癌、白血病、ウイルス感染症、及び他の疾患といった多種多様な疾患を管理するのに有用である。例えば、環状 *RGD*、葉酸塩、トランスフェリン、又は抗体といった標的化部分は、標的指向性の薬物送達を可能にすることによって、活性を大いに高める。数多くの腫瘍は、その細胞表面に受容体を過剰発現する。好適な標的化部分の非限定的な例には、トランスフェリン (*Tf*)、葉酸塩、低密度リポタンパク質 (*LDL*)、及び表皮増殖因子が含まれる

50

。加えて、 α -v- β 3 インテグリン及び前立腺特異的膜抗原 (PSMA) のような腫瘍血管内皮マーカーは、標的指向性 LN の標的として貴重である。ある態様では、約 300 nm 以下の直径を測定してゼータ電位が 50 mV 未満である粒子を有して、被包化効率が 20.0 % より高い LN 製剤が NA 送達に有用である。

【0070】

[00111] 本明細書に記載する LN 製剤の単独での態様又は互いと組み合わせた態様の実行は、現行の脂質ナノ粒子設計パラダイムとの相乗効果がある。

【0071】

[00112] 本明細書に記載する LN と併用して、広範囲の治療薬剤を使用し得る。そのような治療薬剤の非限定的な例には、抗新生物剤、抗感染症薬、局所麻酔薬、抗アレルギー薬、抗貧血薬、血管新生阻害剤、 α -アドレナリン作動性遮断薬、カルシウムチャネル拮抗薬、降圧剤、抗うつ薬、抗痙攣薬、抗細菌薬、抗真菌薬、抗ウイルス薬、抗リウマチ薬、駆虫薬、抗寄生虫薬、コルチコステロイド、ホルモン、ホルモン拮抗薬、免疫調節剤、神経伝達物質拮抗薬、抗糖尿病剤、抗てんかん薬、止血薬、抗過緊張薬、抗緑内障剤、免疫調節性サイトカイン、鎮静剤、ケモカイン、ビタミン、毒素、麻薬、造影剤、及びこれらの組合せが含まれる。

10

【0072】

[00113] 本開示の LN 製剤には、核酸ベース治療薬剤がきわめて適用可能である。そのような核酸ベース治療薬剤の例には、限定されないが、pDNA、siRNA、miRNA、抗miRNA、ASO、及びこれらの組合せが含まれる。血清ヌクレアーゼから防護して治療薬剤を安定化させるために、置換基の核酸及び/又はホスホジエステルリンカーに対する修飾をなすことができる。そのような修飾には、限定されないが、骨格修飾 (例、ホスホチオエート連結) ; 2' 修飾 (例、2' - O - メチル置換塩基) ; 双性イオン修飾 (6' - アミノヘキシ修飾 ODN) ; 親油性部分 (例、脂肪酸、コレステロール、又はコレステロール誘導体) の付加 ; 並びにこれらの組合せが含まれる。この修飾された配列には、本明細書に開示する LN 製剤との相乗効果がある。例えば、ODN への 3' - コレステロールの付加は、それがなければ単に静電相互作用によって結合している系に親油性の相互作用を加えることによって、LN 複合体へ安定性を供給する。加えて、この親油性の付加は、ODN を細胞膜の外葉へ局在化させることによって細胞透過を促進する。グラミシジン又は JTS-1 のようなペプチドを適用することは、その膜融合特性により該製剤の細胞透過をさらに促進する。あるいは、プロテイナーゼ K のような酵素の追加は、ODN が分解に抵抗することをさらに支援する可能性がある。

20

30

【0073】

[00114] 治療上の適用に依拠して、本明細書に記載する LN は、以下の方法によって投与され得る : 経口、非経口、静脈内、筋肉内、皮下、腹腔内、経皮、腫瘍内、動脈内、全身、又は対流強化送達。特別な態様において、LN は、静脈内に、筋肉内に、皮下に、又は腫瘍内に送達される。異なるか又は類似の LN での後続の投薬は、代替りの投与経路を使用して行ってもよい。

【0074】

[00115] 本開示の医薬組成物は、本明細書に開示する脂質ナノ粒子製剤及び/又は追加薬剤の有効量を、医薬的に許容される担体に溶解又は分散されて含む。「医薬的」又は「薬理学的に許容される」という句は、例えば、ヒトのような動物へ投与されるときに、有害反応、アレルギー反応、又は他の不都合な反応をもたらさない分子実体及び組成物に関連する。少なくとも 1 つの化合物又は追加の有効成分を含有する医薬組成物の調製法 (preparation) は、当業者には、本開示に照らして、参照により本明細書に組み込まれる「レミントン製薬科学 (Remington's Pharmaceutical Sciences)」2003 に例示されるように、公知であろう。さらに、動物 (例、ヒト) への投与では、FDA 生物製剤基準局 (FDA Office of Biological Standards) によって要求されるような無菌性、発熱性、一般的安全性、及び純度の基準を製剤が満たすべきであることが理解されよう。

40

【0075】

50

【00116】 本明細書に開示する組成物は、それが固体、液体、又はエアゾールの形態で投与されるか、そしてそれが注射のような投与経路のために無菌性である必要があるかどうかによって、異なるタイプの担体を含む場合がある。本明細書に開示する組成物は、静脈内に、皮内に、経皮的に、髄腔内に、動脈内に、腹腔内に、鼻腔内に、腔内に、直腸内に、局所的に、筋肉内に、皮下に、粘膜より、子宮内に、経口的に、局所的に、局部的に、吸入により（例、エアゾール吸入）、注射によって、注入によって、持続点滴によって、標的細胞を浸す局所灌流によって直接的に、カテーテルにより、洗浄液により、クリーム剤において、脂質組成物（例、リポソーム剤）において、又は当業者に公知であるような他の方法又は上記のあらゆる組合せによって、投与することができる（例えば、参照により本明細書に組み込まれる「レミントン製薬科学（Remington's Pharmaceutical Sciences）」2003 を参照のこと）。

10

【0076】

【00117】 動物又はヒト患者へ投与される、本明細書に開示する組成物の実際の投与量は、体重又は体表面積、病態の重症度、治療される疾患の種類、過去又は現行の治療介入、患者の突発性疾患、及び投与経路といった身体的因子及び生理学的因子によって決定することができる。投与量と投与経路に依拠して、好ましい投与量及び／又は有効量の投与回数は、被験者の応答に従って変動してよい。投与の任に当たる医療実施者は、ともかくも、組成物中の有効成分（複数）の濃度と個別の被験者に適した用量（複数）を決定するものである。

【0077】

20

【00118】 ある態様において、医薬組成物は、例えば、少なくとも約 0.1 % の活性化化合物を含み得る。他の態様において、活性化化合物は、単位重量の約 2 % ～ 約 75 % の間、又は例えば約 25 % ～ 約 60 % の間と、その中の導き得るあらゆる範囲を含み得る。当然ながら、それぞれの治療上有用な組成物中の活性化化合物（複数）の量は、該化合物のどの所与の単位用量においても好適な投与量が得られるようなやり方で調製してよい。このような医薬製剤を調製する当業者には、溶解度、バイオアベイラビリティ、生物学的半減期、投与経路、製品の貯蔵寿命といった因子、並びに他の薬理学的な考慮事項が熟慮されるものであり、それ故に、多様な投与量と治療レジメンが望ましい場合がある。

【0078】

【00119】 他の非限定的な例において、用量はまた、各投与につき約 1 マイクログラム / kg / 体重、約 5 マイクログラム / kg / 体重、約 10 マイクログラム / kg / 体重、約 50 マイクログラム / kg / 体重、約 100 マイクログラム / kg / 体重、約 200 マイクログラム / kg / 体重、約 350 マイクログラム / kg / 体重、約 500 マイクログラム / kg / 体重、約 1 ミリグラム / kg / 体重、約 5 ミリグラム / kg / 体重、約 10 ミリグラム / kg / 体重、約 50 ミリグラム / kg / 体重、約 100 ミリグラム / kg / 体重、約 200 ミリグラム / kg / 体重、約 350 ミリグラム / kg / 体重、約 500 ミリグラム / kg / 体重から、約 1000 mg / kg / 体重又はそれ以上までと、その中の導き得るあらゆる範囲を含み得る。本明細書に記載した数字から導き得る範囲の非限定的な例では、上記に記載した数字に基づいて、約 5 mg / kg / 体重 ～ 約 100 mg / kg / 体重、約 5 マイクログラム / kg / 体重 ～ 約 500 ミリグラム / kg / 体重、等の範囲を投与することができる。

30

40

【0079】

【00120】 ある態様では、本明細書の組成物及び／又は追加薬剤を製剤化して、消化経路より投与する。消化経路には、組成物が消化管と直接接触する、すべての可能な投与経路が含まれる。具体的には、本明細書に開示する医薬組成物は、経口的に、頬内に、直腸に、又は舌下に投与してよい。従って、これらの組成物は、不活性希釈剤とともに、又は吸収可能な食用の担体とともに製剤化してよい。

【0080】

【00121】 さらに態様では、本明細書に記載する組成物を非経口経路より投与してよい。本明細書に使用するように、「非経口」という用語には、消化管を迂回する経路が含

50

まれる。具体的には、本明細書に開示する医薬組成物は、例えば、限定されないが、静脈内に、皮内に、筋肉内に、動脈内に、髄腔内に、皮下に、又は腹腔内に投与してよい（米国特許第6,753,514号、6,613,308号、5,466,468号、5,543,158号；5,641,515号；及び5,399,363号は、その全体において参照により本明細書にそれぞれ具体的に組み込まれる）。

【0081】

[00122] 遊離塩基又は薬理学的に許容される塩として本明細書に開示される組成物の溶液剤は、好適にもヒドロキシプロピルセルロースのような界面活性剤と混合して、水中で調製され得る。分散液剤も、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、及びこれらの混合物において、そして油剤において調製され得る。通常、保存及び使用の条件の下で、これらの製剤は、微生物の増殖を防ぐために保存剤を含有する。注射可能な使用に適した医薬形態には、無菌水溶液剤又は分散液剤と、注射可能な無菌水溶液剤又は分散液剤の即時調製用の無菌散剤が含まれる（米国特許第5,466,468号、その全体が参照により本明細書に具体的に組み込まれる）。すべての事例において、この形態は、無菌でなければならず、容易に注射し得る程度に流動的でなければならない。それは、製造及び保存の条件下で安定でなければならず、細菌及び真菌のような微生物の汚染作用に抗して保存されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（即ち、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコール、等）、これらの好適な混合物、及び/又は植物油剤を含有する、溶媒又は分散媒体であり得る。例えば、レシチンのようなコーティング剤の使用によって、分散の場合に求められる粒径の維持によって、及び界面活性剤の使用によって、適正な流動性を維持してよい。微生物の作用の予防は、様々な抗菌剤及び抗真菌剤（例えば、パラベン類、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル、等）によってもたすことができる。多くの事例では、等張剤、例えば、糖類又は塩化ナトリウムクロリドを含めることが好ましいであろう。例えば、アルミニウムモノステアレート又はゼラチンのような吸収遅延剤の組成物における使用によって、注射可能な組成物の延長吸収をもたすことができる。

【0082】

[00123] 水溶液剤における非経口投与では、例えば、その溶液剤は、必要であれば好適に緩衝化すべきであって、液体希釈剤は、十分な生理食塩水又はブドウ糖で最初に等張にすべきである。この特別な水溶液剤は、静脈内、筋肉内、皮下、及び腹腔内の投与に特に適している。これに関連して、当業者には、本開示に照らして、利用し得る無菌水性媒体が公知であろう。例えば、1回の投与量を1mlの等張NaCl溶液剤に溶かして、1000mlの皮下注入液剤へ加えても、提案された注入部位に注射してもよい（例えば、「レミントン製薬科学（Remington's Pharmaceutical Sciences）」15版、1035-1038頁と1570-1580頁を参照のこと）。投与量のいくらかの変動は、治療される被験者の状態に依存して、必然的に生じるものである。投与の責任者は、ともかくも、個々の被験者に適した用量を決定するものである。さらに、ヒトへの投与では、FDA生物製剤基準局によって要求されるような無菌性、発熱性、一般的安全性、及び純度の基準を製剤が満たすべきである。

【0083】

[00124] 無菌注射溶液剤は、所要量の組成物を上記に列挙した様々な他の成分を含む適正な溶媒に取り込んで、必要に応じて濾過滅菌を続けることによって調製する。一般に、分散液剤は、様々な無菌組成物を、基本の分散媒体と上記に列挙したものより求められる他の成分を含有する無菌担体の中へ取り込むことによって調製する。無菌注射溶液剤の調製用の無菌散剤の場合、いくつかの調製法は、真空乾燥及び凍結乾燥の技術であって、これにより、すでに滅菌濾過したその溶液より、有効成分+所望の追加成分の散剤が入手される。粉末化した組成物は、安定化剤を伴うか又は伴わずに、例えば、水又は無菌溶液剤のような液体担体と組み合わせる。

【0084】

[00125] 他の態様において、組成物は、様々なその他の経路による投与、例えば、局

所（即ち、経皮）投与、粘膜投与（鼻腔内、膈内、等）及び／又は吸入による投与のために製剤化され得る。

【 0 0 8 5 】

[00126] 局所投与用の医薬組成物には、軟膏剤、ペースト剤、クリーム剤、又は散剤のような投薬適用のために製剤化される組成物を含めてよい。軟膏剤には、局所適用のための油性、吸着性、乳剤性、及び水溶性の基剤組成物がすべて含まれるが、一方、クリーム剤とローション剤は、乳剤性基剤だけが含まれる組成物である。局所投与される医薬品は、皮膚を通過する有効成分の吸着を促進する浸透エンハンサーを含有してよい。好適な浸透エンハンサーには、グリセリン、アルコール類、アルキルメチルスルホキシド、ピロリドン、及びラウロカブラムが含まれる。局所適用のための組成物に可能な基剤には、ポリエチレングリコール、ラノリン、コールドクリーム、及びワセリンだけでなく、他の好適な吸収性、乳剤性、又は水溶性の軟膏基剤が含まれる。局所製剤には、組成物を保存して均質な混合物を提供するために、必要に応じて、乳化剤、ゲル化剤、及び抗微生物保存剤も含めてよい。組成物の経皮投与は、「パッチ剤」の使用も含んでよい。例えば、パッチ剤は、1以上の組成物を所定の速度で、一定の時間帯にわたって連続したやり方で供給し得る。

10

【 0 0 8 6 】

[00127] ある態様において、組成物は、点眼剤、鼻腔スプレー剤、吸入、及び／又は他のエアゾール送達担体によって送達してよい。米国特許第5,756,353号及び5,804,212号（その全体が参照により本明細書にそれぞれ具体的に組み込まれる）には、組成物を点鼻エアゾールスプレー剤より肺へ直接的に送達するための方法が記載されている。同様に、鼻腔微粒子樹脂（Takenaga et al., 1998）とリソホスファチジルグリセロール化合物（米国特許第5,725,871号、その全体が参照により本明細書に具体的に組み込まれる）を使用する薬物の送達も製薬技術の分野でよく知られていて、本明細書に記載する組成物を送達するのに利用し得る。同様に、米国特許第5,780,045号（その全体が参照により本明細書に具体的に組み込まれる）には、ポリテトラフルオロエチレン支持マトリックス剤の形態での経粘膜薬物送達が記載されていて、本明細書に記載する組成物を送達するのに利用し得る。

20

【 0 0 8 7 】

[00128] 本明細書に開示する組成物は、エアゾール剤により送達し得ることがさらに想定される。「エアゾール剤」という用語は、微細化した固体又は液体粒子が液化又は加圧された気体推進薬に分散しているコロイド系を意味する。典型的な吸入用エアゾール剤は、液体推進薬又は液体推進薬と好適な溶媒の混合物中の有効成分の懸濁液剤からなる。好適な推進薬には、炭化水素類と炭化水素エーテル類が含まれる。好適な容器は、推進薬の圧力要件に従って変わるものである。エアゾール剤の投与は、被験者の年齢、体重、並びに症状の重症度及び応答に従って変わるものである。

30

【 実施例 】

【 0 0 8 8 】

[00129] 実施例

[00130] 本発明のいくつかの態様を本明細書の「実施例」において明確にする。これらの実施例は、本発明の好ましい態様を示すが、例解のためにのみ示されると理解されたい。上記の考察とこれらの実施例より、当業者は、本発明の本質的な特徴を確認することができて、その精神及び範囲より逸脱することなく、本発明の様々な変更及び修飾を行って、それを様々な使用法及び状況へ適用することができる。

40

【 0 0 8 9 】

[00131] 実施例 1

[00132] 脂質を100%エタノールに溶かすことによって、脂質ストック溶液を作製した。脂質はいずれも Avanti Polar Lipids（アメリカ）又はシグマ・アルドリッチ（アメリカ）より入手して、さらに精製せずに使用した。1.0 mL バイアルにおいて脂質（卵ホスファチジルコリン：コレステロール：TPGS, 15:35:5）を様々な濃度の

50

三級 (DODMA) アミン及び四級 (DOTMA) アミン (45 : 0, 5 : 40, 15 : 30, 22.5 : 22.5, 30 : 15, 40 : 5, 45 : 0 ; DODMA : DOTMA) と合わせた。追加のエタノールを加えて、180 μ L の容量とした。次いで、これを 420 μ L の 10 mM クエン酸緩衝液と合わせて、30 % エタノールの最終濃度とした。この製剤を SILENCER ホタルルシフェラーゼ (GL2 + GL3) siRNA (Invitrogen) と 15 : 1 のアミン対リン酸 (N : P) 比で合わせた。製剤をそのまま 15 分間インキュベートした後に無血清 DMEM (ギブコ) で希釈して、全量 300 μ L とした。リポフェクタミン 2000 (Invitrogen) を陽性対照として使用して、同量の siRNA と同じ N : P で合わせて、同一の全量まで希釈した。

【0090】

[00133] DMEM 培地において 5 % CO_2 雰囲気下に 37 $^{\circ}\text{C}$ で増殖させた、ルシフェラーゼ発現性 SK-HEP-1 (肝細胞癌) 細胞を、トランスフェクションに先立つ 24 時間前に、96 ウェルプレート中にウェルにつき 2×10^4 個の細胞密度で蒔いた。細胞をほぼ 80 % の集密度まで増殖させて、血清含有培地を取り出した。細胞を 70 μ L のトランスフェクション培地でトランスフェクトして、4 時間処理した。実験は、同一 4 検体で実施した。処理が完了した後で、細胞を 1X PBS で洗浄し、血清含有 DMEM を戻した。処理が完了してから 48 時間後、製造業者の説明書に従ってルシフェラーゼアッセイキット (プロメガ) によって、細胞についてルシフェラーゼ発現を分析した。この結果を図 1 に示す。最も有効なトランスフェクション活性を示したのは、ルシフェラーゼ発現において 85 % を超えるノックダウンを示した、5 % DOTMA と 40 % DODMA を含有する製剤である。

【0091】

[00134] 実施例 2

[00135] 脂質を 100 % エタノールに溶かすことによって、脂質ストック溶液を作製した。脂質はいずれも Avanti Polar Lipids (アメリカ) 又はシグマ・アルドリッチ (アメリカ) より入手して、さらに精製せずに使用した。1.0 mL バイアルにおいて脂質 (卵ホスファチジルコリン : コレステロール : TPGS, 15 : 35 : 5) を様々な濃度の三級 (DODMA) アミン及び四級 (DOTMA) アミン (90 : 10, 70 : 30, 50 : 50, 30 : 70, 10 : 90 ; DMHDA : DOTMA) と合わせた。追加のエタノールを加えて、180 μ L の容量とした。次いで、これを 420 μ L の 10 mM クエン酸緩衝液と合わせて、30 % エタノールの最終濃度とした。この製剤を G3139 (Gensense) ODN と 15 : 1 のアミン対リン酸比 (N : P) で合わせた。製剤をそのまま 15 分間インキュベートした後に無血清 RPMI 1640 (Mediatech) で全量 300 μ L まで希釈した。リポフェクタミン 2000 (Invitrogen) を陽性対照として使用して、同量の ODN と同じ N : P で合わせて、同一の全量まで希釈した。

【0092】

[00136] RPMI 1640 培地において 5 % CO_2 雰囲気下に 37 $^{\circ}\text{C}$ で増殖させた KB (ヒールの垂系) 細胞を、トランスフェクションに先立つ 24 時間前に、96 ウェルプレート中にウェルにつき 2×10^4 個の細胞密度で蒔いた。細胞をほぼ 80 % の集密度まで増殖させて、血清含有培地を取り出した。細胞を 70 μ L のトランスフェクション培地でトランスフェクトして、4 時間処理した。実験は、同一 4 検体で実施した。処理が完了した後で、細胞を 1X PBS で洗浄し、血清含有 RPMI 1640 を戻した。処理が完了してから 48 時間後、細胞について Bcl-2 下方調節を分析した。リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) を使用して、アクチンに対する Bcl-2 の下方調節を評価した。図 2 に示すように、DMHDA / DOTAP (90 / 10 のモル比) を含有する製剤でのトランスフェクションは、非トランスフェクト細胞に比較して、Bcl-2 発現の 75 % より大きい下方調節をもたらした。リポフェクタミンTM、DMHDA 単独、及び DOTAP 単独を対照として役立てた。代替りの比での DMHDA / DOTAP の製剤は、より低率のトランスフェクション効率を示した。

【0093】

10

20

30

40

50

[00137] 実施例 3

[00138] 様々な SPLN - G 製剤について、トランスフェクション効率を分析した：SPLN - G 50 (40 : 5 : 50 : 5 のモル比での DMHDA、DOTAP、GRAM、TPGS)、SPLN - G 35 (40 : 5 : 35 : 15 : 5 のモル比での DMHDA、DOTAP、GRAM、DOPE、TPGS)、SPLN - G 30 (40 : 5 : 30 : 20 : 5 のモル比での DMHDA、DOTAP、GRAM、DOPE、TPGS)、SPLN - G 20 (40 : 5 : 20 : 30 : 5 のモル比での DMHDA、DOTAP、GRAM、DOPE、TPGS)、SPLN - G 10 (40 : 5 : 10 : 40 : 5 のモル比での DMHDA、DOTAP、GRAM、DOPE、TPGS)、及び SPLN - G 0 (40 : 5 : 50 : 5 のモル比での DMHDA、DOTAP、DOPE、TPGS)。いずれの脂質も Avanti Polar Lipids (アメリカ) 又はシグマ・アルドリッチ (アメリカ) より購入して、さらに精製せずに使用した。脂質とペプチドをエタノールに溶かして、適正な比で合わせて、LN を生成した。追加のエタノールとクエン酸緩衝液を加えて、30% の最終エタノール含量とした。この 2.0 mg/mL の LN 溶液を siRNA 又は ODN と 15 : 1 の N : P で合わせてそのまま室温で 15 分間反応させてから、さらに希釈した。この製剤の粒径は、100 ~ 300 nm の間に及んだ。脱イオン水で希釈して c - myb ODN と合わせたこの製剤のゼータ電位測定値 (図 3) は、グラミシジン含有製剤では、5 ~ 15 mV の間に及ぶゼータ電位を示した。これは、35 mV を超えるゼータ電位を示した陽性対照のリボフェクタミン 2000 と対照的である。

10

【0094】

20

[00139] 10% FBS と 1% ストレプトマイシン / ペニシリンを補充した DMEM 培地 (ギブコ) において 5% CO₂ 雰囲気下に 37 °C で培養した SK - HEP - 1 細胞を集密になるまで増殖させて、96 ウェルプレートにおいてウェルにつき 2 × 10⁴ 個の細胞密度で蒔いた。ホタルルシフェラーゼ (GL2 + GL3) siRNA をこの製剤と 15 : 1 の N : P で合わせた。製剤をそのまま脂質製剤と室温で 15 分間合わせた後で、DMEM で希釈した。トランスフェクション効率を無血清条件と 20% 血清条件の両方で検査した。培養基を取り出して、ウェルにつき 70 µL のトランスフェクション培地と交換した。細胞を 4 時間処理した後で、1X PBS で 3 回洗浄した。48 時間の処理後、細胞生存度 (図 4) とルシフェラーゼ発現 (図 5) について MTS アッセイとルシフェラーゼアッセイキットによってそれぞれ分析した。35% 以下のグラミシジンを含有する製剤は、高血清トランスフェクション条件の下で、リボフェクタミン 2000 より低い細胞毒性とより高いトランスフェクション効率を明示した。

30

【0095】

[00140] MCF - 7 (ER 陽性乳癌) 細胞において、ODN G3139 による Bcl - 2 の下方調節を検討した。20% 血清の存在下でトランスフェクションを起こした。RT - PCR (図 6) を使用して、アクチンに対する Bcl - 2 の下方調節を評価した。SPLN - G 20 は、リボフェクタミン 2000 に比べて、有意な Bcl - 2 の下方調節を明示した。このことは、図 7 に見られるように、同一検体 (n = 3) での KB 細胞において再現された。

【0096】

40

[00141] 実施例 4

[00142] EDC / NHS (1 : 5 : 10 : 5、DOPE : LA : EDC : NHS) を使用してラクトビオン酸を DOPE と架橋連結させることによって、ラクトシル化 DOPE (L - DOPE) を生成した。脂質とペプチド (45 : 5 : 5 : 10 : 28 : 2 : 10 のモル比での DODAP : DOTAP : L - DOPE : DMG - PEG : グラミシジン) を 1X PBS 中で合わせた。L - DOPE (DOPE の代用) 及び / 又はグラミシジンを用いて、他の対照製剤を完成させた。この製剤化 LN の粒径 (図 8) は、50 nm と 150 nm の間へ低下した。この製剤は、30 日間にわたってコロイド安定性を示した。この LN のゼータ電位 (図 8) は、- 10 mV と 10 mV の間に及んだ。ODN ローディング効率の検討により、75% を超える濃縮が明らかになった。

50

【 0 0 9 7 】

[00143] ルシフェラーゼアッセイを使用して、ルシフェラーゼ発現性 S K - H E P - 1 細胞における L L N の標的化効率を決定した。10 % F B S と 1 % ストレプトマイシン / ペニシリンを補充した D M E M 培地 (ギブコ) において 5 % C O ₂ 雰囲気下に 37 で培養した S K - H E P - 1 細胞を集密になるまで増殖させて、96 ウェルプレートにおいてウェルにつき 2 × 10⁴ 個の細胞密度で蒔いた。ホタルルシフェラーゼ (G L 2 + G L 3) s i R N A をこの製剤と 10 : 1 の N : P で合わせた。製剤をそのまま脂質製剤と室温で 10 分間合わせた後で、D M E M で希釈した。トランスフェクション効率を無血清、10 %、及び 20 % 血清の条件で検査した。培養基を取り出して、ウェルにつき 70 μ L のトランスフェクション培地 (s i R N A 100 n M) と交換した。細胞を 4 時間 10 処理した後で、1 X P B S で 3 回洗浄した。48 時間の処理後、ルシフェラーゼ発現 (図 9) についてルシフェラーゼアッセイキットによって分析した。グラミシジンだけでなく A S G R も含有する製剤は、いずれかの L N 修飾単独の製剤よりも高いトランスフェクション効率を示した。

【 0 0 9 8 】

[00144] L L N の取込みについて蛍光顕微鏡法 (図 10) とフローサイトメトリー (図 11) によって分析した。D A P I 核染色法を肝細胞癌 (H C C) 細胞へ適用し、細胞内取込みを示すために、c y 3 - 標識化オリゴヌクレオチドを加えた。蛍光画像によって実証されるように、s i R N A 及び O D N の細胞の細胞質への有効な送達には、A S G R の標的化が必要である。フローサイトメトリーデータは、標的指向性の L L N と非標的指向性の L L N の間でほぼ 3 . 3 倍の差があることを示し、標的指向性の送達の利点をさらに実証した。L N - アンタゴ m i r 製剤による m i R - 155 の下方調節について R T - P C R によって評価した (図 12) 。R N U 6 B に比べて、m i R - 155 の約 60 % の下方調節が達成された。100 n M の抗 m i R - 155 を使用した。 20

【 0 0 9 9 】

[00145] 実施例 5

[00146] 脂質 (60 : 35 : 5 のモル比での D D A B、C H O L、T w e e n 80) を 100 % エタノールに溶かした。この溶液の 100 μ L を 900 μ L の 1 X P B S に希釈した。ゲル移動度シフト分析 (図 13) のために L N を様々な w / w 比で L O R - 1284 (Dharmacon より購入した s i R N A) (0 . 1 μ g) と合わせた。1 : 8 (s i R N A : L N) で遅滞が生じた。下方調節試験のために L N を 0 . 1 μ M s i R N A と合わせた。L N - s i R N A L O R - 1281 製剤による R N R R 2 の下方調節について、対照としてのアクチンと 1 : 20 及び 1 : 30 (s i R N A : L N) の w / w 比を使用する R T - P C R によって評価した。R P M I 1640 培地において 5 % C O ₂ 雰囲気下に 37 で増殖させた K B 細胞を、トランスフェクションに先立つ 24 時間前に、6 ウェルプレートにおいてウェルにつき 3 . 0 × 10⁵ 個の細胞密度で蒔いた。細胞をほぼ 80 % の集密度まで増殖させて、血清含有培地を取り出した。細胞を 1000 μ L のトランスフェクション培地でトランスフェクトして、4 時間処理した。10 % 血清含有 R P M I 1640 培地の存在下でトランスフェクションが生じた。実験は、同一 3 検体で実施した。処理が完了した後で、細胞を 1 X P B S で洗浄し、血清含有 R P M I 1640 を戻した。処理が完了してから 48 時間後、細胞について、アクチンをハウスキーピング遺伝子とする R T - P C R によって、R N R R 2 発現レベルを分析した。結果を図 14 に示す。1 : 30 (s i R N A : L N) の製剤で、有意な下方調節が生じた。 30 40

【 0 1 0 0 】

[00147] 先の工程の L N (1 : 30 , s i R N A : L N) を、L O R - 1284 とブレ混合した様々な量の P r K と室温で 15 分間合わせた。R P M I 1640 培地において 5 % C O ₂ 雰囲気下に 37 で増殖させた K B (マウス癌) 細胞を、トランスフェクションに先立つ 24 時間前に、6 ウェルプレートにおいてウェルにつき 3 . 0 × 10⁵ 個の細胞密度で蒔いた。細胞をほぼ 80 % の集密度まで増殖させて、血清含有培地を取り出した。細胞を 1000 μ L のトランスフェクション培地でトランスフェクトして、4 時間 50

処理した。0 %、5 %、及び10 %血清含有RPMI 1640培地の存在下でトランスフェクションが生じた。実験は、同一3検体で実施した。処理が完了した後で、細胞を1X PBSで洗浄し、血清含有RPMI 1640を戻した。処理が完了してから48時間後、細胞について、アクチンをハウスキーピング遺伝子とするRT-PCRによって、RNR R2発現レベルを分析した。結果を図15に示す。血清含有培地では、0.3 : 1のLN-PrK : siRNAのLOR-1281製剤が、PrK無しの製剤と比較して、有意な下方調節を示した。10 %血清含有培地での同じトランスフェクション変数の下で細胞生存度試験も行った。LNもPrK-LNもこの処理レベルで有意な毒性を示さなかった(図16)。PrK-siRNA複合体の血清中の保護効果について、LN-siRNAとPrK-LN-siRNA複合体を新鮮なマウス血漿においてインキュベートすることによって検討した(図17)。製剤中のPrKの包含は、非保護化製剤に優る有意な保護活性を3日間にわたって示した。

10

【0101】

[00148] さらなる試験により、PrK-LNへの温度効果を検討した。PrK、LOR-1284、及びLNを0.3 : 1 : 30の重量比で激しく攪拌しながら合わせて、4、18、37、及び55の温度で維持した。生成した複合体のゼータ電位(図18)を測定した。18と37で混合した複合体は、4と55で混合したものよりずっと高いゼータ電位を有した。様々な温度で生成した複合体について、in vitroの活性を検査した。RPMI 1640培地において5% CO₂ 雰囲気下に37で増殖させたKB細胞を、トランスフェクションに先立つ24時間前に、96ウェルプレートにおいてウェルにつき3.0 × 10⁵個の細胞密度で蒔いた。細胞をほぼ80%の集密度まで増殖させて、血清含有培地を取り出した。細胞を1000 µLのトランスフェクション培地でトランスフェクトして、4時間処理した。10 %血清含有RPMI 1640培地の存在下でトランスフェクションが生じた。実験は、同一2検体で実施した。処理が完了した後で、細胞を1X PBSで洗浄し、血清含有RPMI 1640を戻した。処理が完了してから48時間後、細胞について、アクチンをハウスキーピング遺伝子とするRT-PCRによって、RNR R2発現レベルを分析した。結果を図19に示す。より高い温度(37及び55)で複合した製剤は、より低い温度で生成した製剤に比べて、トランスフェクション効率のわずかな増加を示した。

20

【0102】

30

[00149] 実施例 6

[00150] SPLN-G20について、MDA-MB-468細胞中への抗miR送達を試験した。SPLN-G20を上記のように調製した。MDA-MB-468(トリプルネガティブ乳癌)細胞を、トランスフェクションに先立つ24時間前に、6ウェルプレートにおいて、1%ペニシリン/ストレプトマイシンと10% FBSを補充したDMEM/F12培地中2 × 10⁴個/cm²の細胞密度で蒔いた。SPLN-G20を抗miR-221と合わせて、miR-221の下流標的であるp27/Kip1(腫瘍抑制因子)を上方調節するその能力を評価した。抗miR-221の配列は、以下の通りであった: 5'-g s a s a a c c c a g c a g a c a a u g u s a s g s c s u - C h o l - 3' [配列番号1]。この配列には、アンチセンスオリゴヌクレオチドのヌクレアーゼ安定性に役立つ2'-O-メチル-修飾化オリゴヌクレオチド(小文字)とホスホロチオエート連結(s下付き文字)が含まれた。さらに、疎水性部分(コレステロール(Chol))の3'端への付加部分を加えて、脂質ナノ粒子製剤との会合をさらに促進した。20 %血清の存在下にSPLN-G20を50、100、及び250 nMの抗miR-221とともに使用してMDA-MB-468細胞をトランスフェクトした。処理をそのまま4時間進行させて、この時点でトランスフェクション培地を取り出して、新鮮な培地(10% FBSを補充した)と交換した。細胞をそのままさらに44時間増殖させた後で、RT-PCRを開始した。細胞からのRNAをTRIzol 試薬(Life Technologies)によって抽出して、製造業者の説明書に従ってSuperScript(登録商標)III First-Strang Synthesis System(Life Technologies)によって、cDNAを産生した。次

40

50

いで、SYBRグリーン (Life Technologies) と p 2 7 / k i p 1 用のプライマー (Alpha DNA) を使用して、RT-PCRを実施した。

【 0 1 0 3 】

[00151] フォワード : 5 ' C G T G C G A G T G T C T A A C G G - 3 ' [配列番号 2]、

[00152] リバーズ : 5 ' - C G G A T C A G T C T T T G G G T C - 3 ' [配列番号 3])。

【 0 1 0 4 】

[00153] - アクチン (フォワード : 5 ' - C G T C T T C C C C T C C A T C G - 3 ' [配列番号 4]、

[00154] リバーズ : 5 ' - C T C G T T A A T G T C A C G C A C - 3 ') [配列番号 5] を対照として使用した。図 2 4 に見られるように、mRNA は、SPLN - G / 抗 mi R - 2 2 1 の処理により、用量依存的なやり方で数倍上方調節された。

【 0 1 0 5 】

[00155] 実施例 7

[00156] DMHDA、DOTAP、GRAM、DOPE、TPGSより40:5:20:30:5のモル比で構成されるSPLN - G 2 0 バージョン1 (SPLN - G 2 0 v 1) を先に記載のように調製した。DMHDAとDOPEをDODAPとSoy PC (SPC) にそれぞれ置き換えて、SPLN - G 2 0 の第二バージョン (SPLN - G 2 0 v 2) も産生した。DODAPも三級アミンであって、トランスフェクションにおいては、DMHDAよりよく特性決定されている。この態様において、ヘルパー脂質をSPCに交換する選択を行ったのは、DOPEベースの製剤が血清タンパク質との相互作用により低下した生体内活性を概して示すからである。最終組成は、40:5:20:30:5 (DODAP:DOTAP:GRAM:SPC:TPGS) のモル比で設定した。いずれの脂質も Avanti Polar Lipids (アメリカ) 又はシグマ・アルドリッチ (アメリカ) より購入して、さらに精製せずに使用した。脂質とペプチドをエタノールに溶かして、適正な比で合わせた。追加のエタノールとクエン酸緩衝液 (pH 4.0) を加えて、30%の最終エタノール含量とした。この時点で、この2.0 mg / mLの脂質ナノ粒子溶液を抗 mi R と15:1のN:Pで合わせて、浴中で5分間音波処理して、そのまま室温で15分間、静電複合体を生成させた後で、さらに希釈した。この製剤の粒径は、100~200 nmの間に及んだ。

【 0 1 0 6 】

[00157] 抗 mi R - 2 2 1 を SPLN - G 2 0 v 1 と SPLN - G 2 0 v 2 と15:1のN:Pで合わせた。BT - 5 4 9 (トリプルネガティブ乳癌細胞系) について、mi R - 2 2 1 の下流標的である p 2 7 / k i p 1 (アポトーシス調節に關与する遺伝子) 及びエストロゲン受容体アルファ (ER、エストロゲン受容体の発現と、それによりホルモンベース療法への感作の原因となる遺伝子) の上方調節を検査した。細胞を、トランスフェクションに先立つ24時間前に、6ウェルプレートにおいて、5% FBSと1%ペニシリン/ストレプトマイシン (Life Technologies) を補充したDMEM / F12細胞培養基中 2×10^4 個 / cm^2 の細胞密度で蒔いた。トランスフェクションの時点で、培養基を20%血清含有培地と交換した。20%血清を使用して、生体内の高血清条件を模倣した。細胞を適正な対照で、又は250 nMの抗 mi R - 2 2 1 ロード SPLN - G ベース製剤で、37 で4時間トランスフェクトした。この処理時間の最後に、細胞を1X PBSで2回洗浄した。細胞そのまま44時間増殖させた後で、RT-PCRを開始した。細胞からのRNAをTRIzol 試薬 (Life Technologies) によって抽出して、製造業者の説明書に従ってSuperScript (登録商標) III First-Strang Synthesis System (Life Technologies) によって、cDNAを産生した。次いで、SYBRグリーン (Life Technologies) と、p 2 7 / k i p 1 用のプライマーとエストロゲン受容体用のプライマーを使用して、RT-PCRを実施した。 - アクチンを参照遺伝子として使用した。図 2 5 に明示するように、「抗 mi R - 2 2 1 無し」がほとんど活性を示さな

10

20

30

40

50

ったのに対し、SPLN-G20v1とSPLN-G20v2は、それぞれ約1.75倍と約2.5倍のp27/Kip1の上方調節を示した。図26に見られるように、ER発現についても同様の結果が観測された。SPLN-G20v1がERをほぼ3倍上方調節した一方で、SPLN-G20v2はERを5倍以上上方調節した。これらのデータは、生体内の抗miR送達にとって、SPLN-G20v2が特に有用なナノ担体であることを示す。

【0107】

[00158] 実施例 8

[00159] ラクトビオン酸(LA)より構成され、ガラクトース部分を担って、リン脂質へ連結される親油性アシアロ糖タンパク質受容体(ASGR)標的化リガンドを合成して、抗miR-155の肝臓特異的な送達のためにLNへ取り込んだ。抗miRのエンドソーム放出を容易にするために、そのLN中へグラミシジンAも取り込んだ。本明細書では、この製剤をラクトシル化グラミシジンベースのLN(Lac-GLN)と呼ぶ。HepG2細胞において、そしてマウスにおいて、肝細胞標的化について評価した。物理化学的性質、細胞内取込み、in vitro及び生体内での送達効率について検討した。

【0108】

[00160] 1, 2 - ジオレオイル - 3 - ジメチルアンモニウム - プロパン(DODAP)とL - - ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)は、Avanti Polar Lipids(アラバマ州アラバスター)より購入し; 1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロールとメトキシポリエチレングリコール(DMG-PEG)は、NOF America Corporation(ミネソタ州エリジアン)より購入し; 1 - エチル - 3 - [3 - ジメチルアミノプロピル]カルボジイミド塩酸塩(EDC)とN - ヒドロキシスクシンイミド(NHS)は、Thermo Scientific(イリノイ州ロックフォード)より購入した。モノメトキシポリエチレングリコール2000 - ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(mPEG-DSPE)は、GenzymePharmaceuticals(マサチューセッツ州ケンブリッジ)より入手した。コレステロール、ラクトビオン酸、グラミシジンA、及び他の試薬は、いずれもシグマ・アルドリッチ(ミズーリ州セントルイス)より購入して、さらに精製しなかった。ホタルルシフェラーゼ(GL2+GL3)siRNA(Luci-siRNA)(AM4629)、陰性スクランブル対照(AM17010)、及びリポフェクタミン2000は、Invitrogen(ニューヨーク州グランドアイランド)より購入した。

【0109】

[00161] 抗miR-155(配列: 5' - A* C* C C C U A U C A C G A U U A G C A U U * A * A - 3' (配列番号6)、ホスホロチオエート連結(*)と2' - O - メチルを含有する)、Cy3標識化抗miR-155(Cy3 - 抗miR-155)、及びCy5.5標識化抗miR-155(Cy5.5 - 抗miR-155)は、Alpha DNA(モントリオール、カナダ)によって合成された。miR-155(002623)及びRNU6B(001093)のリアルタイムRT-PCRアッセイ用のTaqmanキットは、アプライド・バイオシステムズ(カリフォルニア州カールスバッド)より購入した。

【0110】

[00162] ラクトビオン酸をEDCによって活性化してそのNHSエステルへ変換してから、これをDOPEと反応させて、n - ラクトビオニル - DOPE(Lac-DOPE)を得た。この生成物をNexus 470 FTIR分光計(Thermo Scientific, イリノイ州ロックフォード)でのフーリエ変換赤外(FTIR)分光法によって特性決定した。Lac-GLNは、エタノールインジェクション法によって調製した。DODAP、Lac-DOPE、DOPE、DMG-PEG及びグラミシジンAより50:10:28:2:10のモル比で構成される脂質混合物をエタノールに溶かして、RNA分解酵素及びDNA分解酵素フリーのHEPES緩衝化溶液(20mM, pH7.4)へ速やかに注入した。生じる脂質ナノ粒子を音波洗浄器によって2分間音波処理して、RNA分解酵素及びDNA分解酵素フリーの水に対して室温で4時間透析して、分子量カットオフ(MWCO)10,000 Dalton Float-A-Lyzer(Spectrum Laboratories 社、カリフォルニ

10

20

30

40

50

ア州ランコ・ドミングス)を使用してエタノールを除去した。

【0111】

[00163] 抗miR-155含有Lac-GLNは、RNA分解酵素及びDNA分解酵素フリーHEPES緩衝液に溶かした同容量の抗miR-155をLac-GLNへ加えて、10秒間の短いボルテックス操作(vortexing)と室温で10分間のインキュベーションを続けることによって調製した。脂質：抗miRの重量比は10：1に固定して、抗miR-155の濃度は、1mg/kgであった。生じるナノ粒子を、0.22µmフィルター(Fisher Scientific, ペンシルベニア州ピッツバーグ)を使用して滅菌した。同じ方法によって対照製剤を調製した。

【0112】

[00164] 抗miR-155含有Lac-GLNの粒径は、モデル370 NICOMPサブミクロン粒径分析計(NICOMP, カリフォルニア州サンタバーバラ)での動的光散乱法によって体積加重分布モードで定量した。粒子を細胞培養基に分散させた。Lac-GLNの形態は、FEI Tecnai G2 Bio TWIN 透過型電子顕微鏡(FEI Company, オレゴン州、アメリカ)によって検査した。試料を上記のように調製して、その試料の1滴を分析用の穿孔カーボングリッド上にて酢酸ウラニルで1分間ネガティブ染色した。Gatan 791 MultiScan CCS カメラを使用して画像を記録して、デジタル・マイクログラフ(Digital Micrograph) 3.1ソフトウェアパッケージによって処理した。

【0113】

[00165] ZetaPALS ゼータ電位分析計(Brookhaven Instruments 社、ニューヨーク州ホルツビル)を使用して、抗miR-155含有Lac-GLNの表面電荷を20mM HEPES緩衝液において検査した。Lac-GLNの被包化効率をQuant-iTTM RiboGreen RNAキット(Invitrogen, ニューヨーク州グランドアイランド)によって製造業者のプロトコルに従って定量して、発光分光計(KS 54B, パーキンエルマー、イギリス)を480nmの励起と520nmの発光で使用して、蛍光強度(FI)を定量した。被包化効率を算出した。

【0114】

[00166] 抗miR-155含有Lac-GLNのコロイド安定性は、4又は25で30日間の保存期間にわたるその粒径の変化をモニターすることによって決定した。血清安定性試験を使用して、抗miRを血清ヌクレアーゼ分解より防護するLac-GLNの能力について検討した。抗miR-155-Lac-GLNとフリーの抗miR-155を50%ウシ胎仔血清(FBS)へ曝露して、37で様々な時間帯の間インキュベートした。次いで、各試料のアリコートを臭化エチジウム含有1.5%(w/v)アガロースゲル上へロードした。

【0115】

[00167] ヒトHCC細胞系のSK-Hep-1細胞とHepG2細胞を、10%ウシ胎仔血清(FBS)、100U/mlのペニシリン、及び100µg/mlのストレプトマイシンを補充したDMEM培地において、37及び5%CO₂で培養した。

【0116】

[00168] Luciferase siRNAトランスフェクションでは、48ウェルプレートにおいて、ルシフェラーゼを安定的に発現する2×10⁴個のSK-Hep-1細胞をウェルにつき800µlの培養基に蒔いて、そのまま5%CO₂雰囲気下に37で一晩増殖させた。翌日、この培養基を、0%、10%、及び20%のFBSを含有する培地と交換して、Luciferase siRNA含有Lac-GLNと様々な対照製剤(100nM)で細胞を4時間トランスフェクトした。トランスフェクションの後で、培地を10%FBSを含有する新鮮な培地と交換して、トランスフェクション後48時間で細胞をPBSで洗浄して、ルシフェラーゼアッセイキット(プロメガ、ウィスコンシン州マジソン)を製造業者の説明書に従って使用して、細胞溶解液中のルシフェラーゼ活性を定量した。簡潔に言えば、BCAアッセイキット(ピアス、イリノイ州ロックフォード)を使用して各ウェルのタンパク質の総量を定量して、タンパク質の総量に対する正規化によってルシフェラー

10

20

30

40

50

ゼ活性を決定した。次いで、ルシフェラーゼの下方調節を未処理陰性対照に比較した相対値として計算した。

【0117】

[00169] 抗miR-155トランスフェクションでは、HepG2細胞を6ウェルプレートにおいて2mlの培養基とともにウェルにつき 2×10^5 個の細胞で蒔いて、5% CO₂ 雰囲気下に37℃で一晩インキュベートした。次いで、培養基を新鮮な培地と交換して、リポフェクタミン2000、Lac-GLN、及び対照製剤を使用して細胞を100nMの抗miR-155でトランスフェクトして、4時間後に、この培地を新鮮な培地と交換した。細胞を37℃でさらに48時間インキュベートしてから、miR-155とその標的遺伝子の発現レベルをリアルタイムRT-PCR分析によって定量した。陽性対照として、リポフェクタミン2000を使用してLuc-siRNAと抗miR-155でトランスフェクトした細胞を製造業者のプロトコルに従って実施した。未処理細胞とエンブティ(empty) Lac-GLNを陰性対照として使用した。

10

【0118】

[00170] Lac-GLNの細胞毒性は、MTSアッセイ(プロメガ、ウィスコンシン州マジソン)によって評価した。HepG2細胞を96ウェルプレートにおいてウェルにつき 1×10^4 個の細胞密度で蒔いた。一晩のインキュベーションの後で、細胞をエンブティLac-GLN、陰性対照RNA単独、抗miR-155単独、陰性対照RNA含有Lac-GLN、及び抗miR-155含有Lac-GLNで、100nMのRNA濃度で24時間処理した。次いで、各ウェルへMTS試薬(20μL)を加えて、細胞をさらに2時間インキュベートした。Multiskan Ascent 自動プレートリーダーを使用して、各ウェルの490nmでの光学密度(OD)を測定した。未処理細胞を対照として使用して、100%の生存度と規定した。この未処理細胞の百分率として細胞生存度を計算した。

20

【0119】

[00171] 蛍光性のCy3-抗miR-155をHepG2細胞にトランスフェクトすることによってLac-GLNの細胞内取込みの分析を実施して、共焦点顕微鏡法とフローサイトメトリーによって評価した。共焦点顕微鏡法では、各ウェルの底に無菌カバーガラスを含有する6ウェルプレート(Fisher Scientific, 12-545-82, ペンシルベニア州ピッツバーグ)にウェルにつき 2×10^5 個のHepG2細胞を蒔いて、そのまま一晩増殖させた。次いで、細胞を100nMのCy3-抗miR-155含有GLN、Lac-GLN、及びLac-GLN(20mMラクトースと1% BSAを含む)で、37℃で1時間処理して、PBSで5回の洗浄工程を続けた。細胞を4%パラホルムアルデヒドで15分間固定して、Hoechst 33342(Invitrogen, ニューヨーク州グランドアイランド)とAlexa-488ファロイジン(Invitrogen, ニューヨーク州グランドアイランド)で、それぞれ室温で10分間染色した。次いで、細胞付きのカバーガラスをそのプレートから取り外して、通常のスライドガラスでカバーした。共焦点分析をオリンパスFV1000フォルター共焦点顕微鏡(オリンパス光学、東京、日本)で実施した。

30

【0120】

[00172] フローサイトメトリー分析では、 2×10^5 個のHepG2細胞を100nMのCy3-抗miR-155含有GLN、Lac-GLN、GLN(20mMラクトースと1% BSAを含む)、及びLac-GLN(20mMラクトースと1% BSAを含む)で、37℃で1時間処理した。0.25%トリプシンを使用して細胞を懸濁させ、PBSで5回洗浄して、4%パラホルムアルデヒドで固定した。ベクトン・ディキンソンFACScalibur フローサイトメーター(ニュージャージー州フランクリンレイクス)で蛍光強度を測定して、各試料につき全部で10,000回のイベントを回収した。

40

【0121】

[00173] トランスフェクトされた細胞又は組織の抽出液由来の全RNAをTriZol 試薬(Invitrogen, ニューヨーク州グランドアイランド)によって単離して、標準プロトコルに従って精製した。TaqManマイクロRNA逆転写キット(アプライド・バイオシ

50

ステムズ、カリフォルニア州カールスバッド)を使用してmiR-155のcDNAを合成して、このcDNAを増幅して、TaqManマイクロRNAキット(アプライド・バイオシステムズ、カリフォルニア州カールスバッド)を使用して定量した。第一鎖cDNA合成キット(Invitrogen, ニューヨーク州グランドアイランド)を使用してC/EBP及びFOX P3のcDNAを合成して、生じるcDNAを増幅して、SYBRグリーン法(アプライド・バイオシステムズ、カリフォルニア州カールスバッド)を使用して定量した。

【0122】

[00174] プライマー・エクスプレス・プログラム(アプライド・バイオシステムズ)によってプライマーを設計した：

[00175] C/EBP：

[00176] フォワード：5'-AGAA GACCGTG GACAAGCACAG-3' [配列番号7]、

[00177] リバーズ：5'-TTGAACAAGTTTCCGCAGGGTG C-3' [配列番号8]；

[00178] FOX P3：

[00179] フォワード：5'-AATGGCACTGACCAAGGCTTTC-3' [配列番号9]、

[00180] リバーズ：5'-TGTGGAGGAAC TCTGGGAATGTG-3' [配列番号10]；及び

[00181] GAPDH：

[00182] フォワード：5'-CCCCCTGGCCAAGGTCATCCATGACAACTTT-3' [配列番号11]、

[00183] リバーズ：5'-GGCCATGAGGTCCACCACCCCTGTTGCTGTA-3' [配列番号12]。

【0123】

[00184] C/EBP及びFOX P3のレベルをGAPDHのそれに対して正規化する一方で、miR-155のレベルは、RUN6Bのそれに対して正規化した。 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ アプローチを使用して、それらの発現を計算した。

【0124】

[00185] 蛍光性Cy3-抗miR-155含有GLN及びLac-GLNを共焦点顕微鏡法分析に使用した。雄性C57BL/6マウスにCy3-抗miR-155(50 µg)含有GLN及びLac-GLNを全量200 µlの注射液で静脈内に投与した。4時間後、マウスを犠牲にして組織を回収した。採取した組織を4%パラホルムアルデヒド中に6時間固定して、30%スクロースに4で一晩浸漬した。次いで、組織をブロックホルダーへ移し、O.C.T.凍結培地(Fisher Scientific, ペンシルベニア州ピッツバーグ)で包埋して、液体窒素中で凍らせた。組織試料を組織切片作成用に処理して、Hoechst 33342(Invitrogen, ニューヨーク州グランドアイランド)とAlexa-488ファロイジン(Invitrogen, ニューヨーク州グランドアイランド)で、それぞれ室温で10分間染色した。オリンパスFV1000フォルター共焦点顕微鏡(オリンパス光学、東京、日本)を使用して、蛍光画像を捉えた。

【0125】

[00186] 異なる組織中の生体内取込みをIVIS造影法によって測定するために、蛍光性Cy5-抗miR-155含有GLN及びLac-GLNを使用した。この実験には、上記に記載したのと同じ処理を適用した。組織全体を採取して、4%パラホルムアルデヒド中に6時間固定して、30%スクロースに4で12時間浸した。Xenogen IVIS-200生体内光造影システム(Caliper Life Sciences, マサチューセッツ州ホプキントン)を使用して、組織全体のCy5蛍光シグナルを測定した。

【0126】

[00187] 雄性C57BL/6マウスへ陰性対照RNA又は抗miR-155含有Lac

10

20

30

40

50

c - G L N と他の対照を 1 . 5 m g / k g の用量で静脈内注射によって投与した。投与後 4 8 時間で、マウスに麻酔をして、肝臓組織を採取して、液体窒素で直ちに凍らせた。R N A 抽出と R T - P C R を先の節に記載したように実施した。

【 0 1 2 7 】

【00188】 結果を平均 ± 標準偏差として報告して、それぞれの実験では少なくとも同一 3 検体を実施した。群間の比較は、2 群ではスチューデントの t 検定によって、多群では A N O V A によって解析した。p 値が < 0 . 0 5 である場合に結果を統計学的に有意とみなした。すべての統計解析は、マイクロソフト E x c e l 2 0 0 3 ソフトウェアによって実施した。

【 0 1 2 8 】

【00189】 F T I R を使用して、コンジュゲートの生成を確認した。図 2 7 は、L a c - D O P E 、 D O P E 、 及びラクトビオン酸の F T I R スペクトルである。L a c - D O P E の吸収ピークは、 1660 cm^{-1} と 1540 cm^{-1} の青色にあって、アミド結合形成を示す。

【 0 1 2 9 】

【00190】 様々なモル百分率の L a c - D O P E を含む G L N の粒径とゼータ電位について評価して、この特性決定を図 3 9 A ~ B と図 4 1 A ~ B に示す。製剤中 1 0 % L a c - D O P E が最適の組成であって、 72.66 nm の平均直径と 3.49 mV のゼータ電位を有した。この組成物を以下の実験用の送達担体として選択して、L a c - G L N と名付けた。L a c - G L N のサイズと形態について T E M によってさらに検証した。図 3 0 B 中の画像は、直径が 100 nm 未満である L a c - G L N の球形と一様なサイズ分布を示し、これは D L S によって得られたデータと一致していた。

【 0 1 3 0 】

【00191】 オリゴヌクレオチドを濃縮する粒子の能力より被包化効率を計算した。図 3 0 に示すように、L a c - G L N の被包化効率は、 $> 85\%$ であった。粒径の経時的な変化をモニターすることによって、コロイド安定性を決定した。図 2 9 C に示すように、L a c - G L N の平均直径は、4 で 3 0 日の期間にわたって不変なままであったが、2 5 での保存下では、平均直径の有意な増加を観測した。

【 0 1 3 1 】

【00192】 抗 m i R を防護する L a c - G L N の能力について、血清安定性検査によって評価した。この検査では、フリーの抗 m i R と抗 m i R - 1 5 5 - L a c - G L N を F B S と混合して、3 7 で異なる期間の間、培養した。図 3 1 B に示すように、フリーの抗 m i R - 1 5 5 が 4 時間以内の血清インキュベーションで完全に分解された (digested) のに対して、L a c - G L N は、抗 m i R - 1 5 5 をヌクレアーゼ分解より 1 2 時間まで防護することができた。この結果は、L a c - G L N の良好な血清安定性を実証した。

【 0 1 3 2 】

【00193】 送達効率は、最初に、H C C 細胞特異的な取込みにおける G L N と L a c - G L N の性能を比較することによって検証した。その表面に A S G R の高発現がある H e p G 2 細胞を、C y 3 - 抗 m i R - 1 5 5 含有非標的指向性 G L N と A S G R - 標的指向性 L a c - G L N で処理した。2 0 m M ラクトースと 1 % B S A でのプレインキュベーションを適用して、A S G R 媒介性の取込みと非特異的な取込みをそれぞれ阻止した。共焦点顕微鏡法によって細胞を評価した。図 2 9 に示すように、L a c - G L N で処理した細胞は、非標的指向性 G L N で処理したで処理されたものより有意に強い蛍光シグナルを示した。この取込みの亢進は、ブロッキング剤で前処理された細胞において抑制されたので、L a c - G L N の細胞内取込みが A S G R 特異的であることを実証した。この結果は、L a c - G L N の成功裡の A S G R 標的化を示した。

【 0 1 3 3 】

【00194】 G L N と L a c - G L N の細胞内取込みについて、フローサイトメトリーによってさらに定量化した。図 3 0 A に示すように、H e p G 2 細胞において、L a c - G L N の取込みは、非標的指向性 G L N のそれより約 3 . 5 8 倍高かった。この蛍光シグナ

10

20

30

40

50

ルは、G L N前処理細胞において、20 mMラクトースと1% B S Aで有意に低下せず、H C C細胞によるG L Nの非特異的な取込みを示した(図30C)。しかしながら、ブロッキング剤の非存在下では、G L N処理細胞とL a c - G L N処理細胞の間で取込みが同等であるのに対し、ブロッキング剤とともにプレインキュベートされた細胞では、L a c - G L Nの取込みが3.51倍抑制された(図30B)。この結果により、A S G R - 標的指向性の送達によりH C C細胞における細胞内取込みが改善されることがさらに確認された。

【0134】

[00195] ホタルルシフェラーゼmRNAを安定的に発現するH C C S K - H e p 1細胞を使用して、ルシフェラーゼ遺伝子を標的とするs iRNAのサイレンシング(silencing)能力について分析することによって、異なる担体のトランスフェクション効率と、標的化リガンド、グラミシジンA、及び血清が含まれる様々な因子のトランスフェクション効率に対する効果を判定した。図32Aは、F B Sフリー培地において、L a c - L N処理群でのルシフェラーゼの発現(78.95%)がL N処理群(96.35%)でのそれと比べて有意に少ないことを示し、A S G R - 標的指向性戦略の利点を確認された。しかしながら、20% F B Sを含有する培地は、このトランスフェクション効率に6%しか影響を及ぼさなかった。市販のリポフェクタミン2000での処理は、L N処理群に近い、ルシフェラーゼ発現の7.84%低下を引き起こして、このトランスフェクションは、高濃度での血清によって強く阻害された。さらに、競合剤としてのグラミシジンAの濃度を高める効果について分析した。驚くべきことに、L a c - G L N処理群では、5%のグラミシジンAも10%のグラミシジンAも、トランスフェクションの間、F B Sの存在によって影響を受けなかった。この知見は、トランスフェクション活性が血清の存在に影響された、これまでに報告された研究結果と対照的であった。H e p G 2細胞においても同様の結果が得られた(データ示さず)。従って、このL a c - G L N製剤は、臨床状況での生体内送達では血清が主たる障壁であったので、有利であった。

【0135】

[00196] この担体のさらなるin vitro及び生体内送達における応用について評価するために、初めに、その細胞毒性をH C C細胞で検討した。H e p G 2細胞を等量のエンブティL a c - G L N、陰性対照RNA単独、抗m i R - 155単独、陰性対照RNA - L a c - G L N、及び抗m i R - 155 - L a c - G L Nで処理した。図33Bに示すように、処理細胞と未処理細胞の間で細胞生存度における有意な変化を観測しなかった。この結果は、H e p G 2細胞におけるL a c - G L Nの低い細胞毒性を明らかにした。

【0136】

[00197] 次に、m i R - 155とその下流標的の発現に対する、抗m i R - 155を含有するL a c - G L Nの効果を実験細胞において評価した。細胞を抗m i R - 155含有L a c - G L Nと他の対照製剤で4時間処理して、m i R - 155とその標的化遺伝子の発現をトランスフェクションから48時間後にリアルタイムR T - P C Rによって測定した。図33Cは、未処理群に対する、異なる処理群由来のm i R - 155発現レベルを示す。リポフェクタミン2000で処理した陽性対照は、未処理群の92.4%のm i R - 155発現を有した。加えて、L N、G L N、L a c - L N、及びL a c - G L N処理群は、リポフェクタミン2000処理群のそれと同様のm i R - 155発現レベルを明示して、これらの群の間の差は、わずかであった。陽性対照とL a c - G L N処理群の間のm i R - 155発現におけるわずかな差に基づいて、二倍の抗m i R - 155濃度を適用して、m i R - 155の下方調節が抗m i R - 155濃度依存性であるかどうかを検証した。図34Aに示すように、抗m i R - 155の濃度を100 nMから200 nMへ二倍にしたとき、リポフェクタミン2000処理群におけるm i R - 155発現は、92.4%から89.5%へ変化した。この2つの処理群間の差は、依然として統計学的には有意でなかった。L a c - G L N処理群においても同様の傾向が観測され、ここではm i R - 155の発現が100 nMと200 nMの抗m i R - 155処理においてそれぞれ87.2%と82.9%であった。上記のことは、m i R - 155の発現が抗m i R - 1

55の濃度に依存せず、抗miR-155の送達がmiR-155の分解をもたらさないことを示した。

【0137】

[00198] 送達効率についてさらに検証するために、miR-155標的化遺伝子のC/EBP及びFOX P3の発現を評価した。この結果を図34Bに要約する。miR-155の定常的な発現(図32A)とは対照的に、Lac-GLN 100nM抗miR-155処理群においては、C/EBPの発現とFOX P3の発現がそれぞれ16.1倍と4.1倍増加していた。リポフェクタミン2000でトランスフェクトした細胞では、C/EBPの発現とFOX P3の発現のそれぞれわずかに1.4倍と1.9倍の増加が観測された。さらに、抗miR-155濃度を二倍にすると、C/EBPとFOX P3の発現の向上した上方調節をもたらし、miR-155標的化遺伝子の発現が抗miR-155濃度に依存することを明瞭に示した。従って、抗miR-155の送達は、間違いなく、miR-155の分解よりは、その機能阻害をもたらしたのである。要約すると、これらの結果は、抗miR送達における、市販の薬剤を上回るLac-GLNの優位性を示している。

10

【0138】

[00199] Lac-GLNの生体内送達の効率及び組織特異性について評価するために、Cy5-抗miR-155含有GLNとCy5-抗miR-155含有Lac-GLNを1.5mg/kgの用量で静脈内投与したC57BL/6マウスにおいて、組織分布試験を実施した。4時間後、臓器を採取して、蛍光シグナルを比較した。図35に示すように、マウスに非標的指向性GLNを注射した場合、蛍光シグナルを明示する主要臓器は、肺、脾臓、及び肝臓であった。対照的に、マウスをLac-GLNで処理した場合、最大の蛍光シグナルが肝臓に蓄積して、脾臓と腎臓にはごく弱いシグナルがあって、肺には検出可能なシグナルが無かった。これらの結果は、Lac-GLNによるCy5-抗miR-155の送達が肝臓特異的であること、そしてLac-GLNが標的外の取込みを最少化することができて、それによって全体の送達効率を向上させたことを示す。

20

【0139】

[00200] 肝臓と他の臓器に対して共焦点顕微鏡法を実施して、GLNとLac-GLNの間の送達効率についてさらに評価した。肝細胞以外に、肝臓は、常在性マクロファージとして知られる、クッパー細胞の大集団も含有する。図36Aに示すように、非標的指向性GLN-Cy5-抗miR-155で処理された肝臓では、蛍光シグナルの取込みが主にクッパー細胞によってなされたのに対し、マウスをLac-GLNで処理した場合、蛍光シグナルのより大きな集団が肝臓のクッパー細胞よりも肝細胞によって取り込まれた。

30

【0140】

[00201] 蛍光シグナルの肺と脾臓における分布についても検証して、Lac-GLN送達を評価した。図36Bに示すように、Lac-GLN処理マウス中の肺と脾臓に蓄積する蛍光シグナルは、GLN処理マウス中のそれより少なく、Lac-GLNの肝臓への送達の高い特異性を示した。

【0141】

[00202] 次に、C57BL/6マウス肝臓におけるLac-GLN-抗miR-155の送達効率を検討した。この目的のために、リポフェクタミン2000、GLN、Lac-GLN、又はLac-GLNにおいて製剤化した1.5mg/kgの抗miR-155の単回用量を尾静脈よりマウスに注射した。陰性対照として、エンブティLac-GLN、陰性対照RNA含有Lac-GLN、又はフリー抗miR-155の注射を使用した。投与から48時間後にマウスを犠牲にして、肝臓を採取した。miR-155とその標的であるC/EBPの発現について、リアルタイムRT-PCRによって評価した。図37Aは、miR-155の発現を図解する。注目されるように、陰性対照群では、miR-155レベルが変化しなかった。リポフェクタミン2000とLac-GLNを使用して抗miR-155を送達した場合、非トランスフェクト対照と比較して、miR-15

40

50

5 発現のそれぞれ 13%と20%のわずかな減少が観測された。さらに、GLN、Lac-LN、及びLac-GLN間の差は、有意でなかった。ところが、C/EBP 発現によって反映される送達効率は、GLN、Lac-LN、及びLac-GLN処理群で、未処理群に比較して、それぞれその発現の2.8倍、3.7倍、及び6.9倍の増加によって実証されるように、これらの群の間でかなり異なっていた(図37B)。陰性対照群では有意な変化が観測されず、リポフェクタミン2000処理群では、1.4倍のC/EBPの上方調節を示しただけである。加えて、別のmiR-155標的遺伝子であるFOX P3の発現も、GLN、Lac-LN、及びLac-GLN処理群において、それぞれ1.1倍、1.2倍、及び2.1倍増加した(図37C)。上記のデータは、Lac-GLNによる送達効率の改善を実証して、in vitro実験の結果(図34)と一致する。

10

【0142】

[00203] 実施例 9

[00204] cRGD-PEG-DSPEコンジュゲートを合成した。cRGDfCとPEG-DSPE-マレイミドを、チオエーテル連結を生じる-SH及び-マレイミド反応によりコンジュゲートさせた。この反応の間に使用したcRGDfCとPEG-PSPE-マレイミドのモル比は、1.5:1であった。cRGDfCとPEG-DSPE-マレイミドを5mM EDTA含有PBS(pH=7.0)緩衝液にそれぞれ溶かした。このcRGDfC溶液とPEG-DSPE溶液を合わせて、攪拌しながら室温で6時間反応させた。生成物をPD-10カラムでのゲル濾過によって精製して、未反応/過剰のcRGDfCを生成物より除去した。スケールアップの反応では、このゲル濾過法をGPC、MWCO2000膜を使用する透析、又はタンジェンシャルフロー透析濾過に置き換えることができる。生成物は、長期安定性のために凍結又は凍結乾燥させることができる。生成物の純度は、HPLCとLC-MSによって確認した。規格として、最小のcRGDfCコンジュゲーションレベル(例、80%)と遊離ペプチド含量(例、<1%)を設定することができる。生成物中のcRGDfC含量は、BCAタンパク質アッセイによって定量することができる。

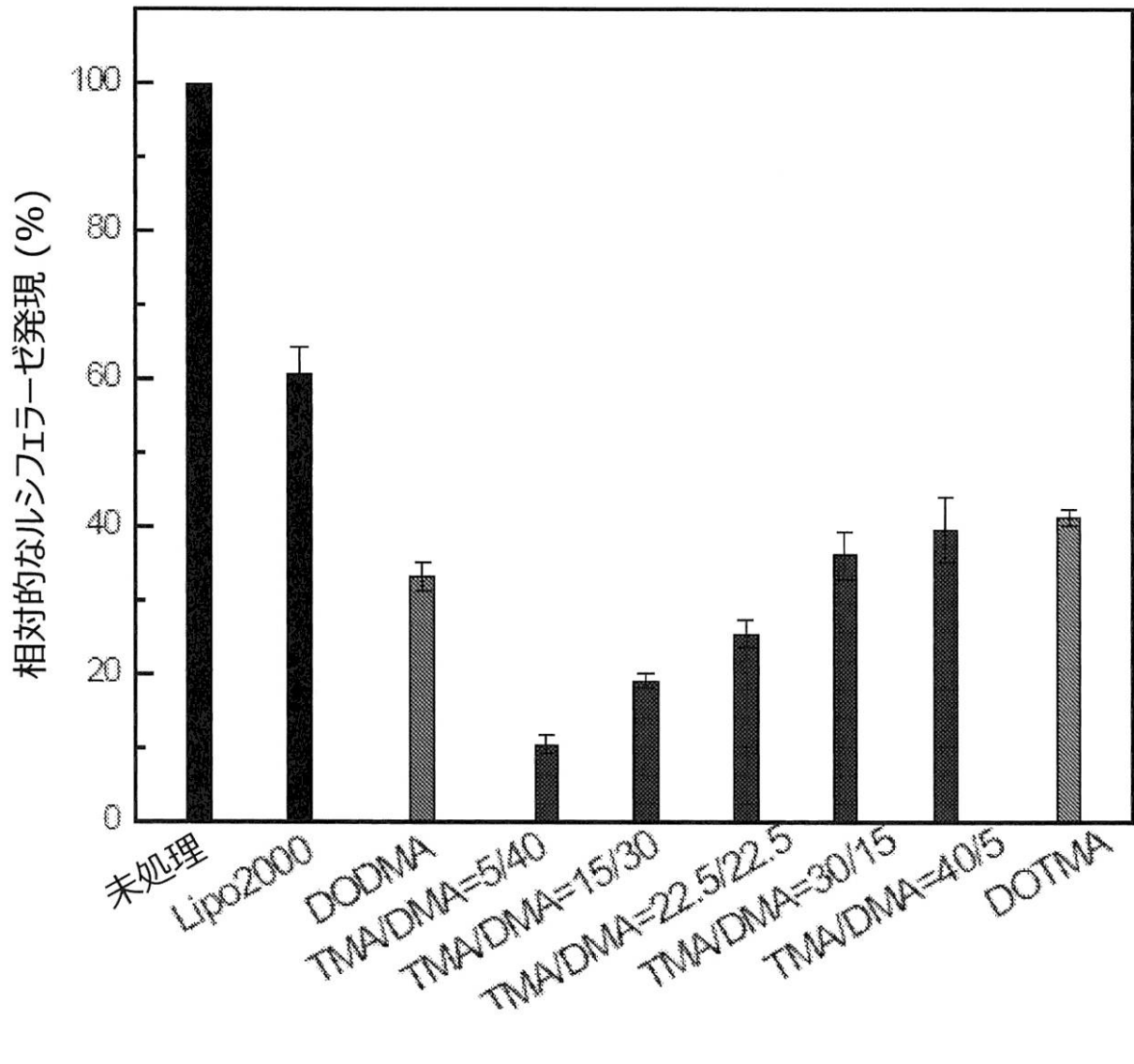
20

【0143】

[00205] 本明細書に開示した製剤及び方法のいくつかの態様を上記の実施例において明確化した。これらの実施例は、本発明の特別な態様を示すものではあるが、例解のためにのみ示されることを理解されたい。上記の考察とこれらの実施例より、当業者は、本開示の本質的な特徴を確認することができて、その精神及び範囲より逸脱することなく、様々な変更及び修飾を加えて、本明細書に記載される組成物及び方法を様々な使用法及び状況へ適用することができる。本開示の本質的な範囲より逸脱することなく、様々な変更をなし得て、その要素に均等物を代用し得る。加えて、本開示の教示内容に対して、その本質的な範囲より逸脱することなく、特別な状況又は材料を適用するために、多くの修飾を行うことができる。

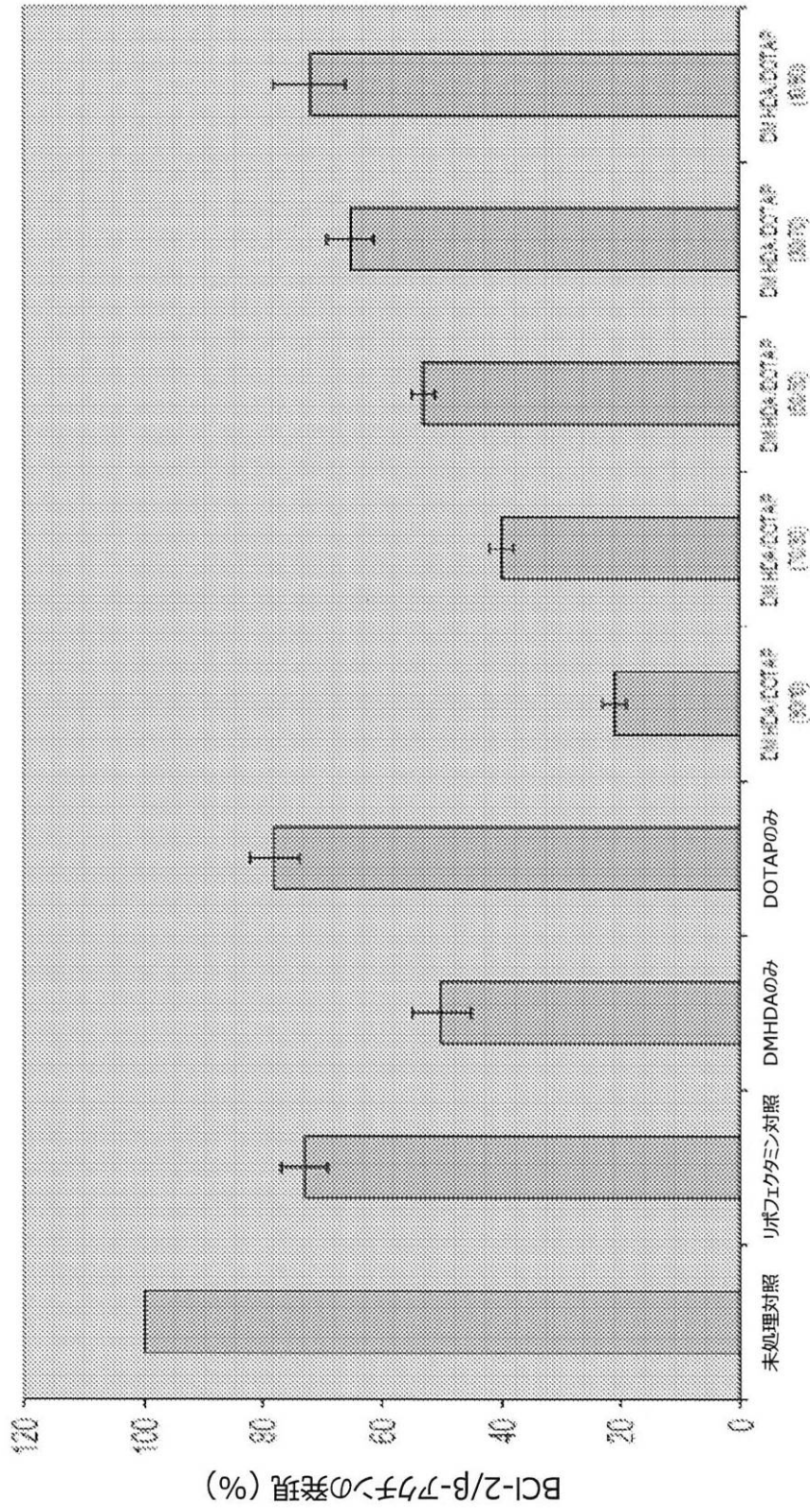
30

【図 1】

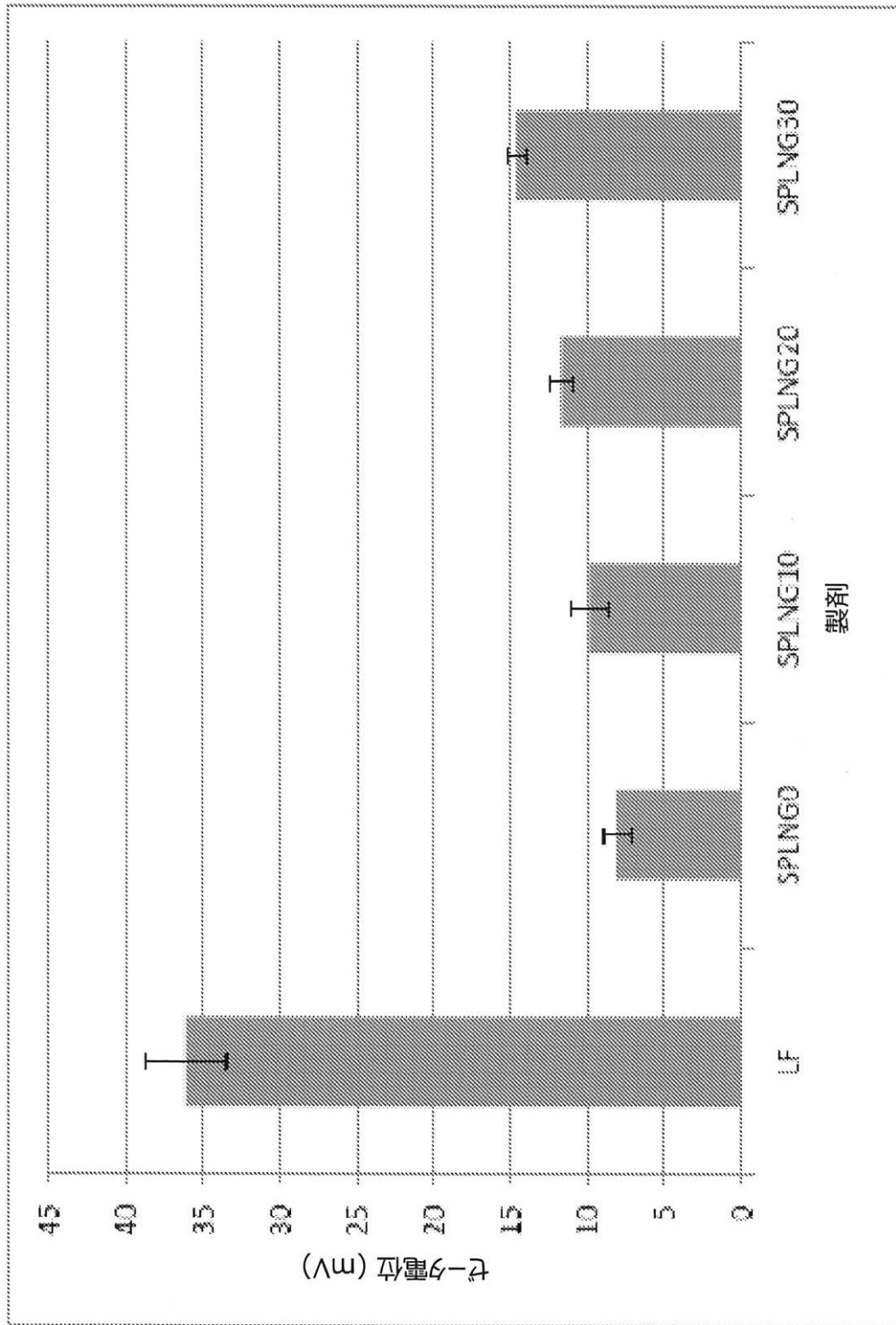


【図 2】

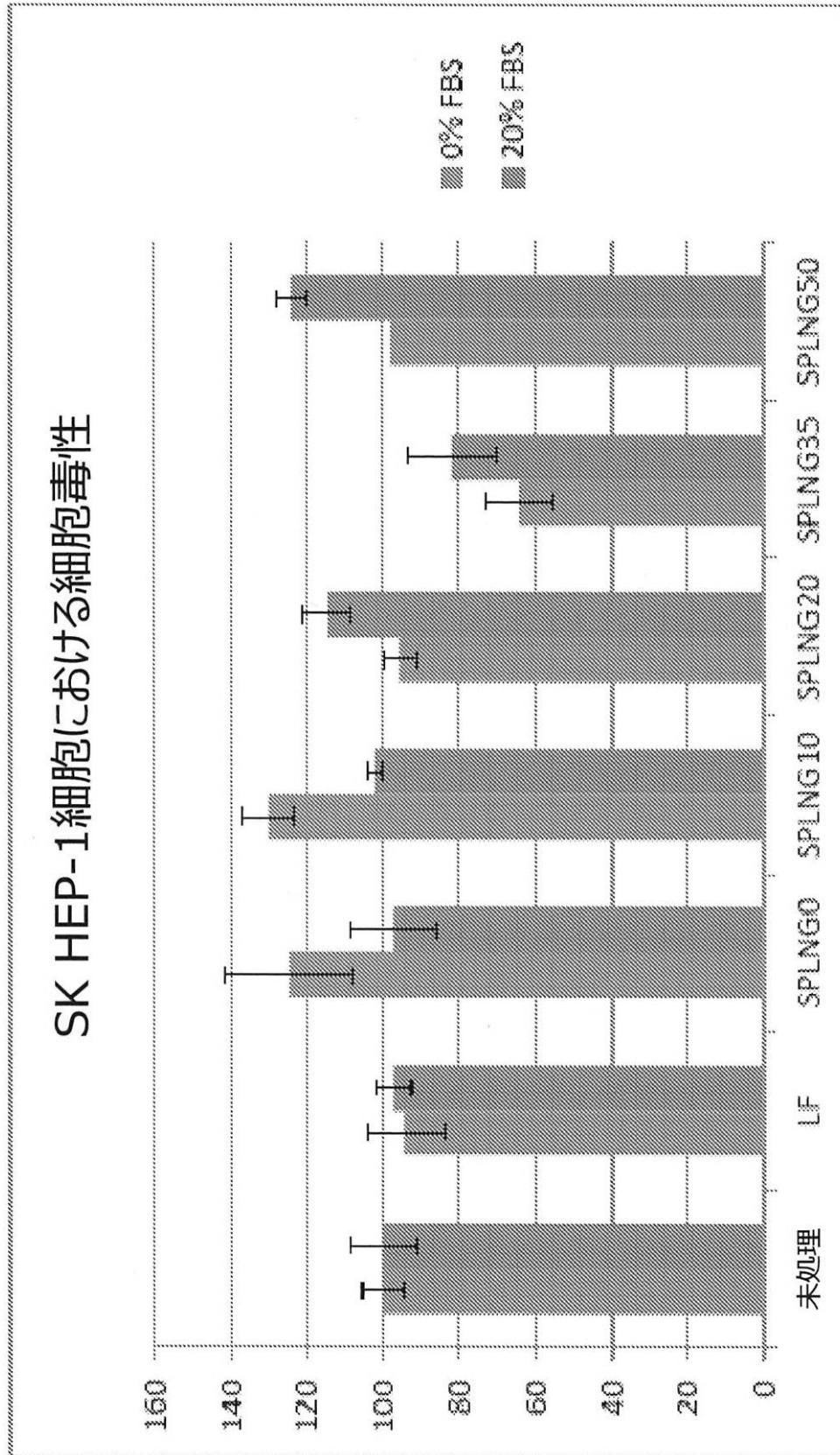
ODN G3139 トランスフェクションに対するDMHDA/DOTAPの効果



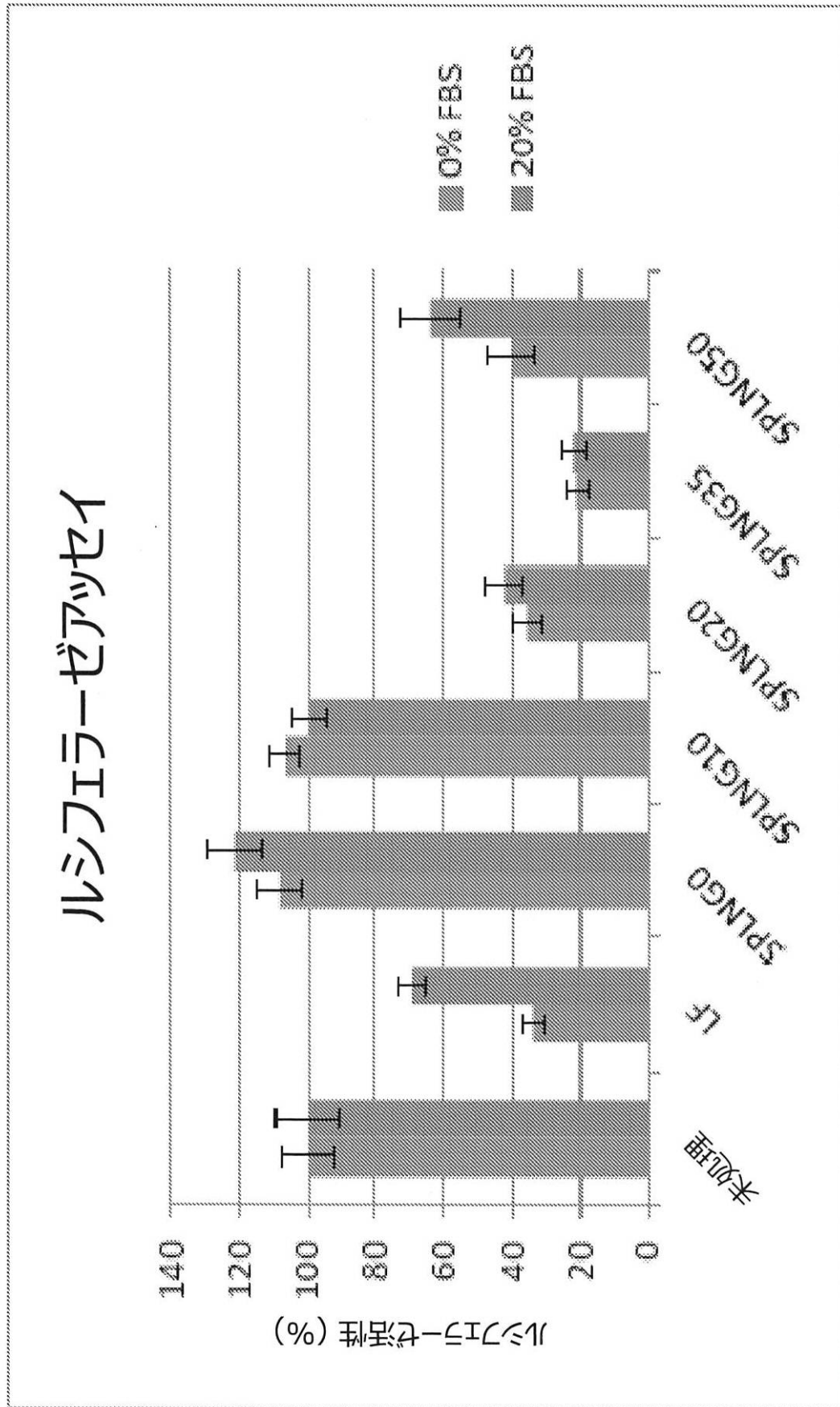
【図 3】



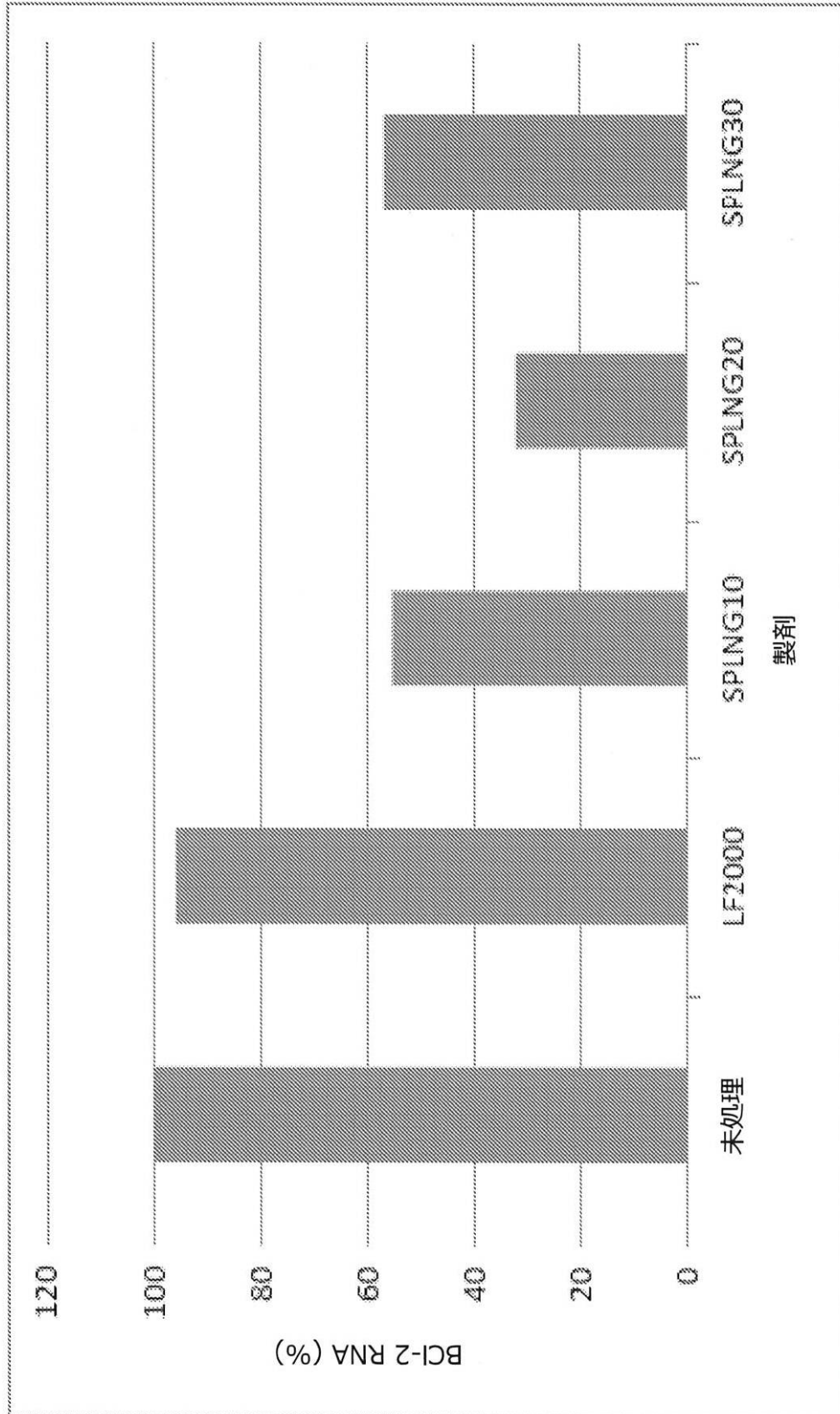
【図 4】



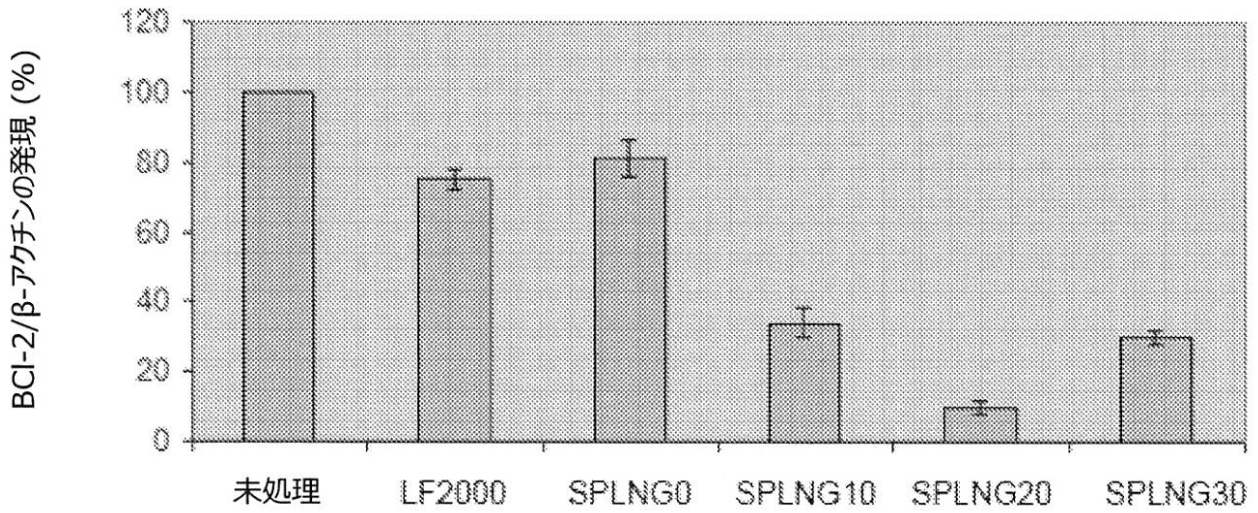
【図 5】



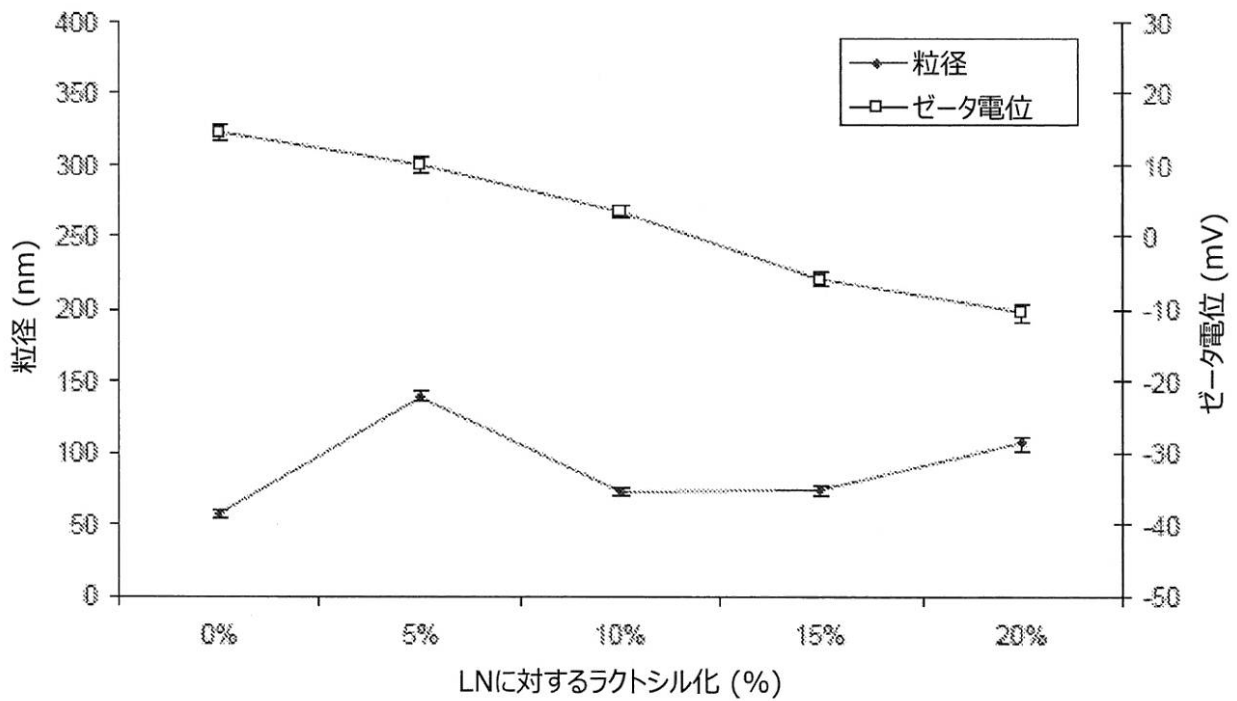
【図 6】



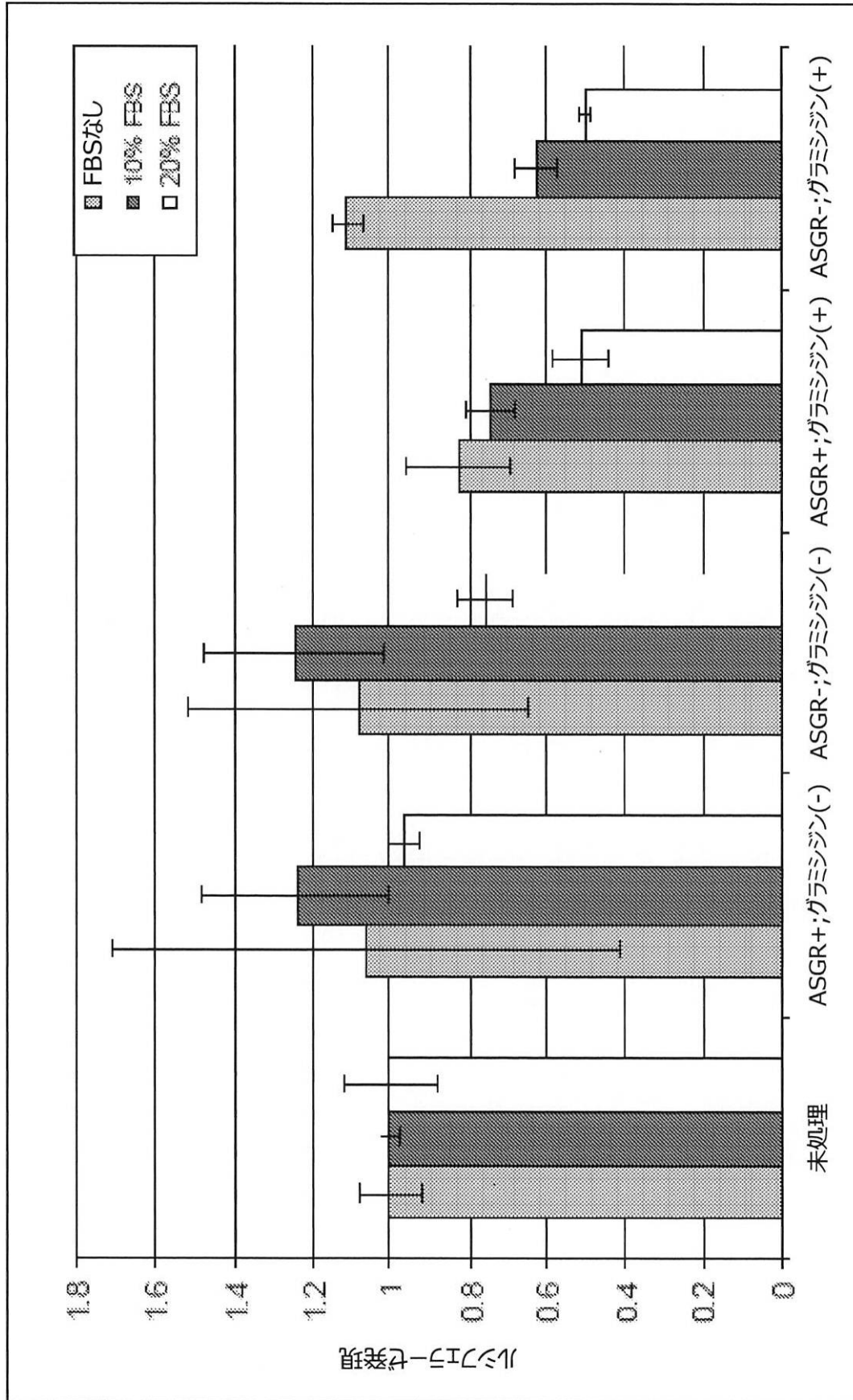
【図 7】



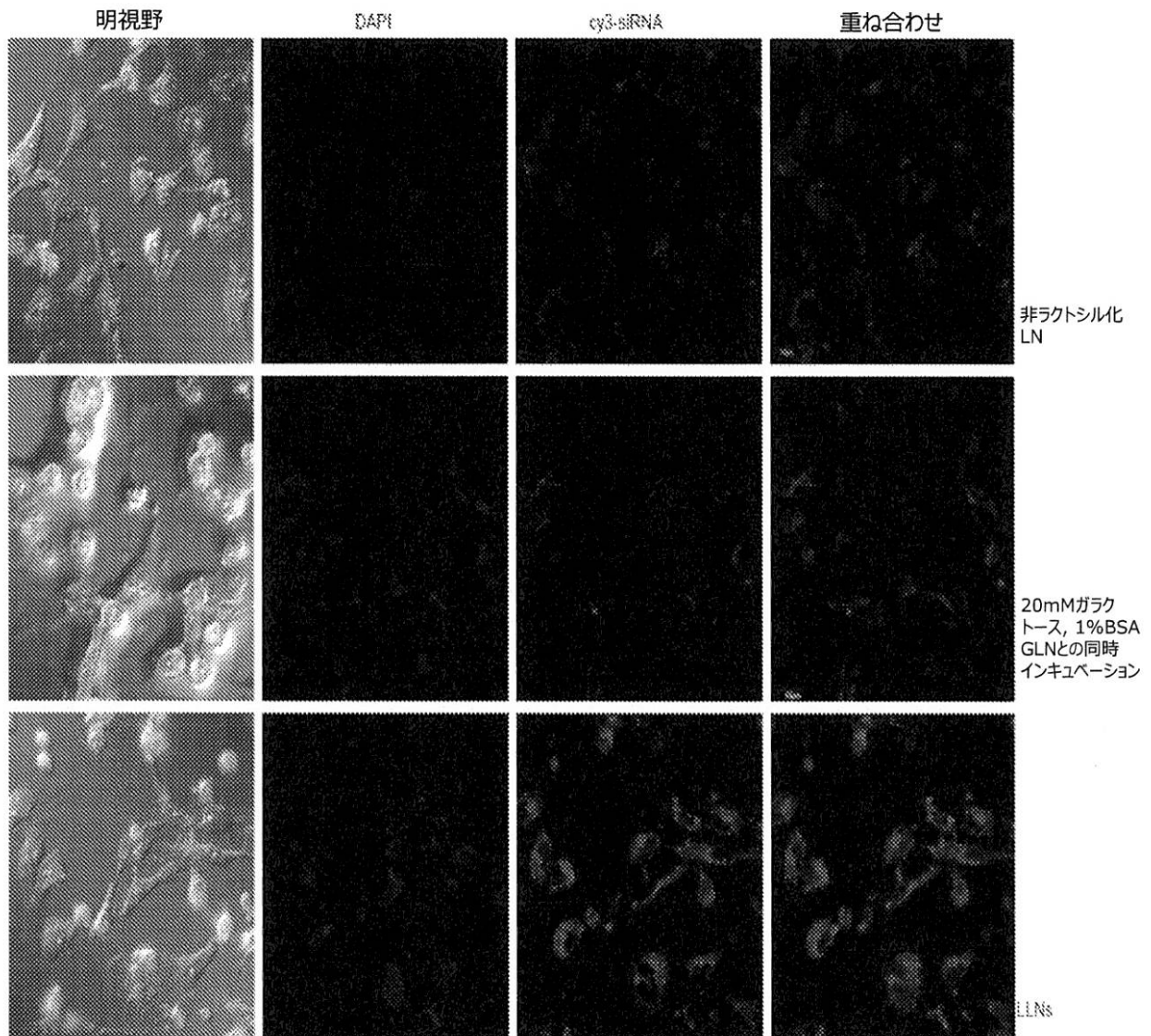
【図 8】



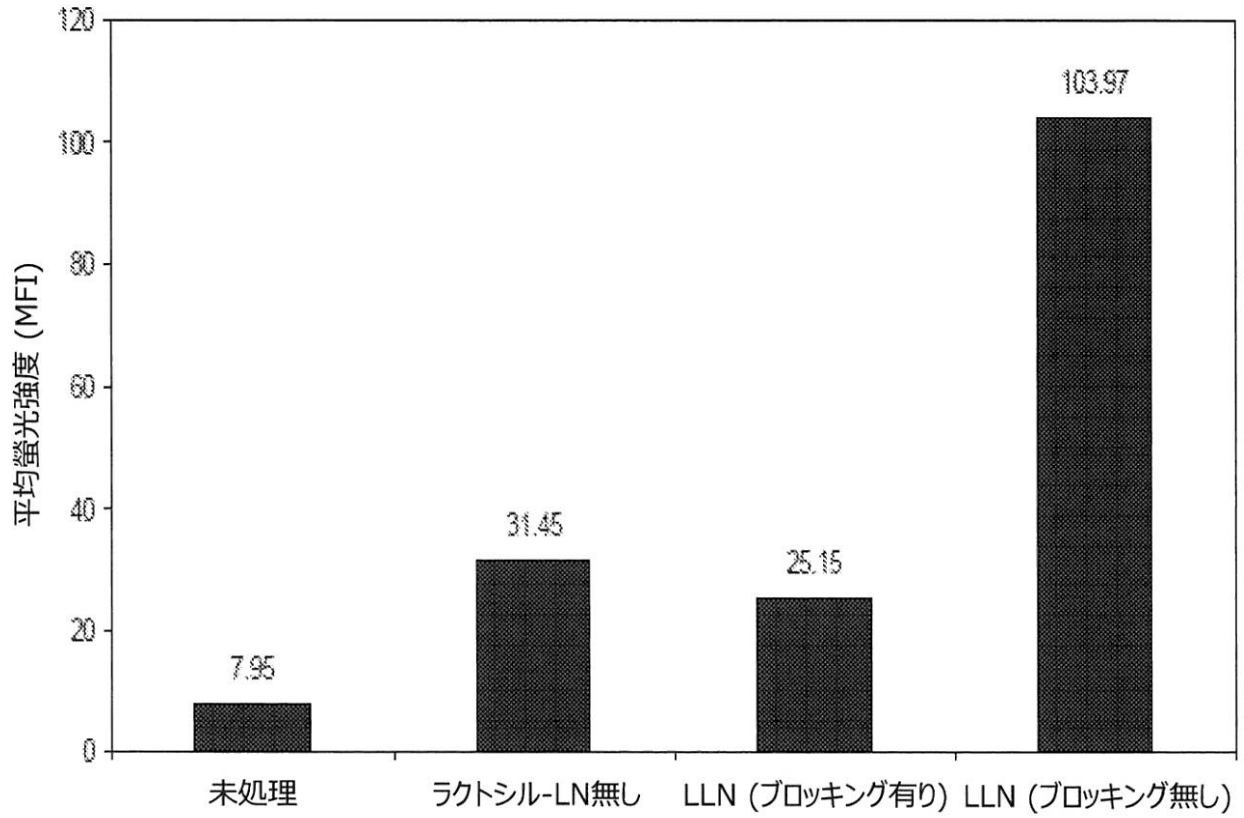
【図 9】



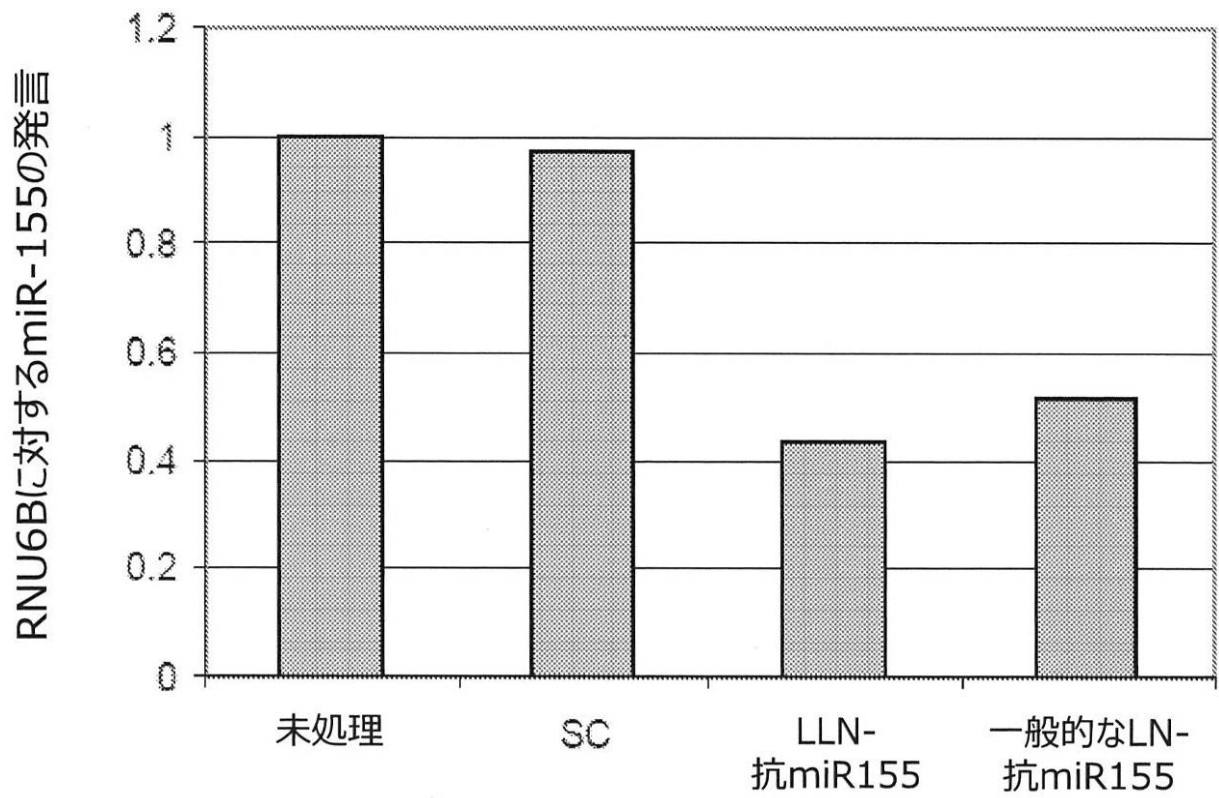
【図 10】



【図 1 1】



【図 1 2】

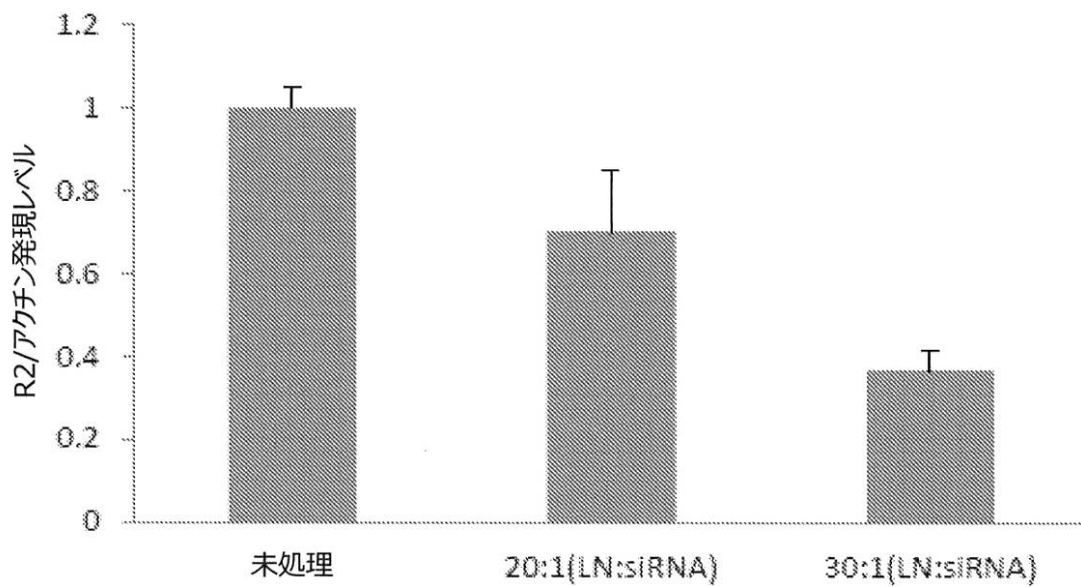


【図 1 3】

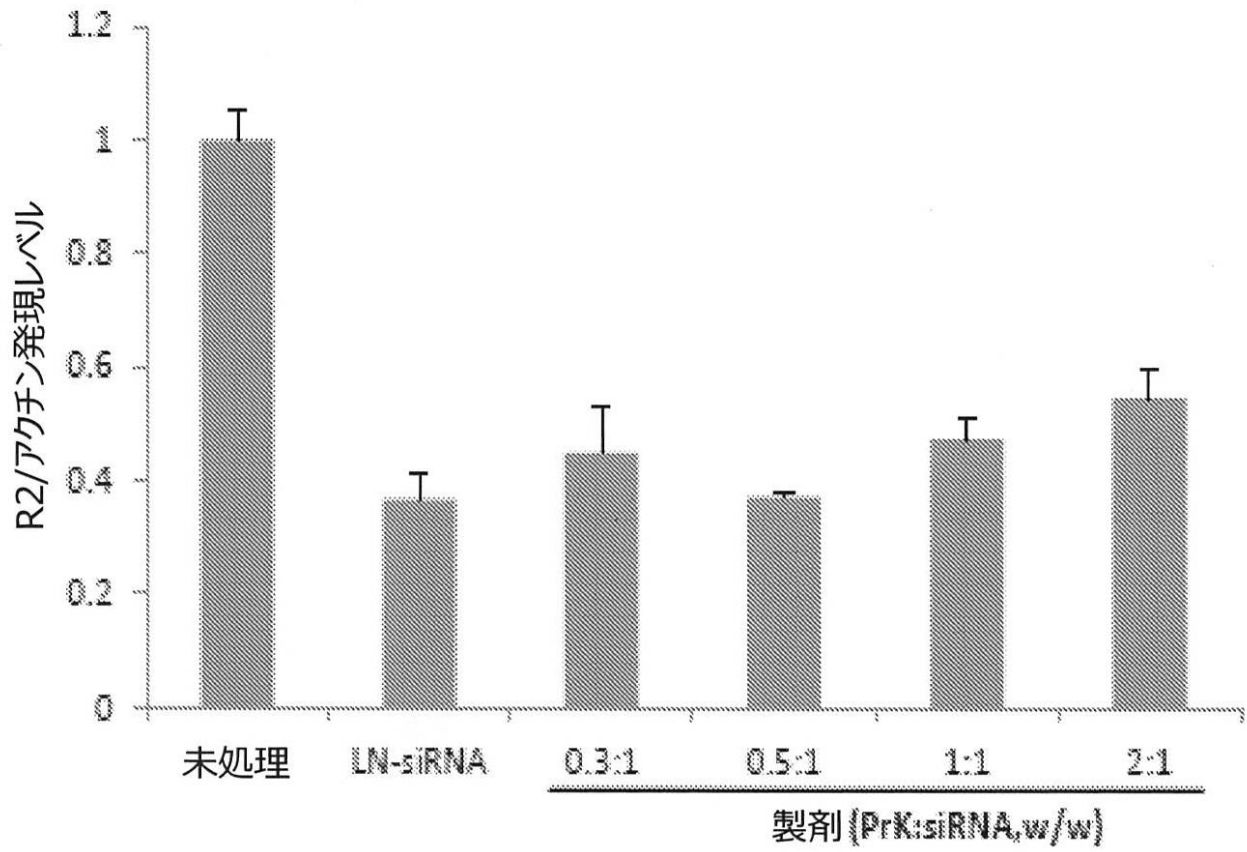


【図 1 4】

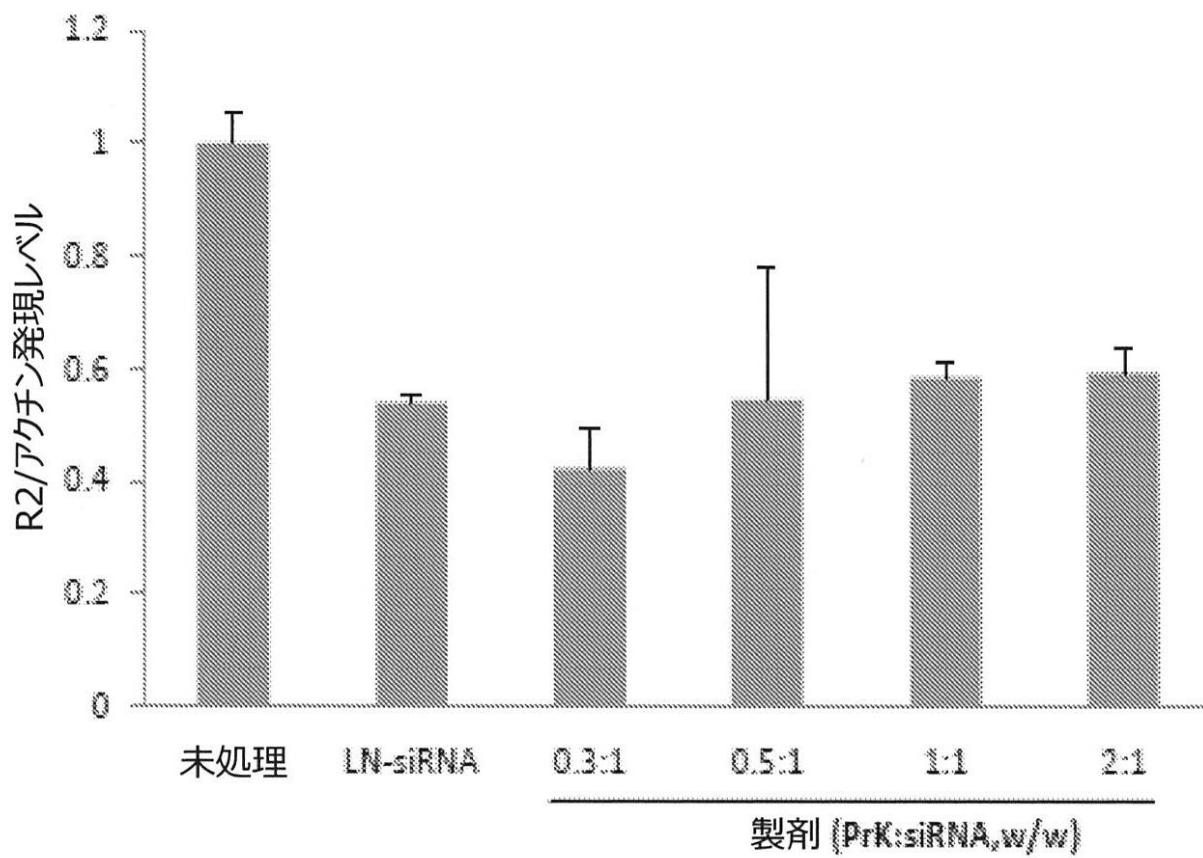
LN:siRNA比でのR2下方調節の効果



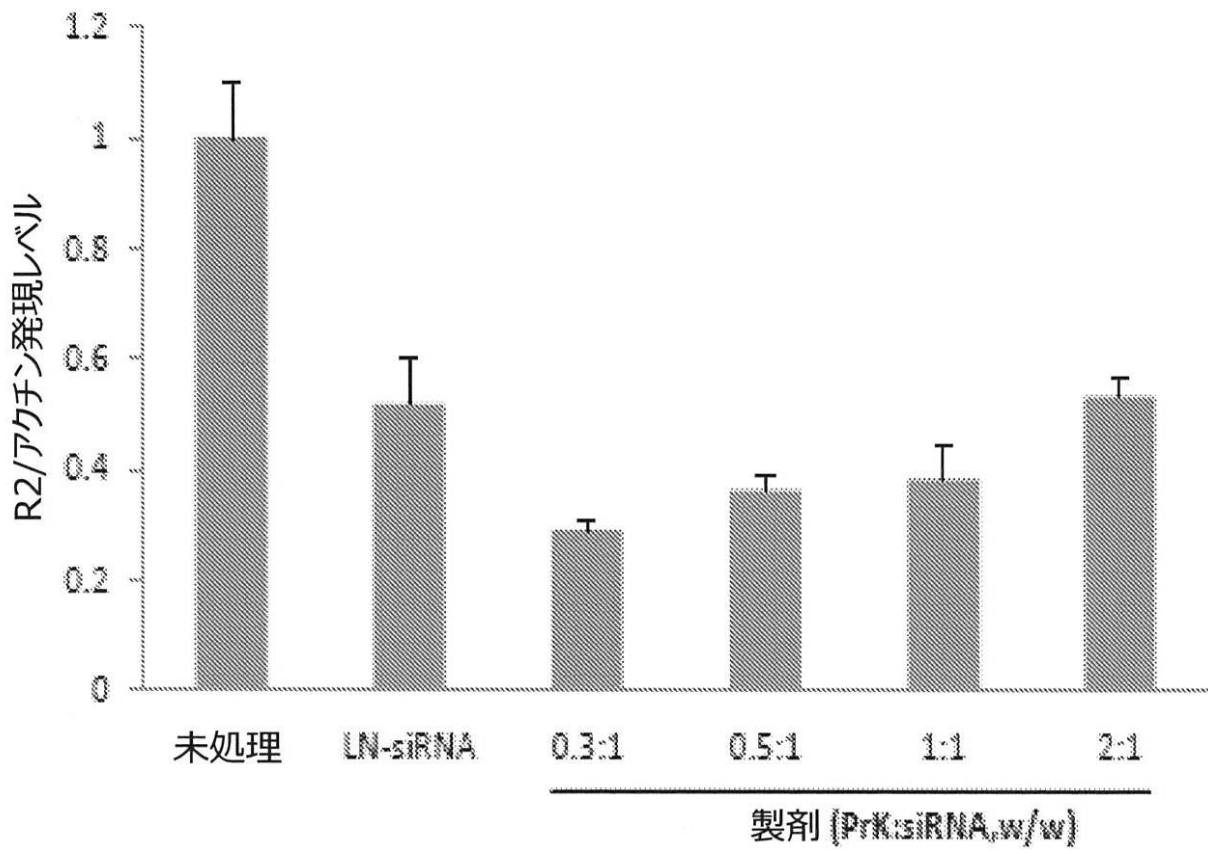
【図 15 A】



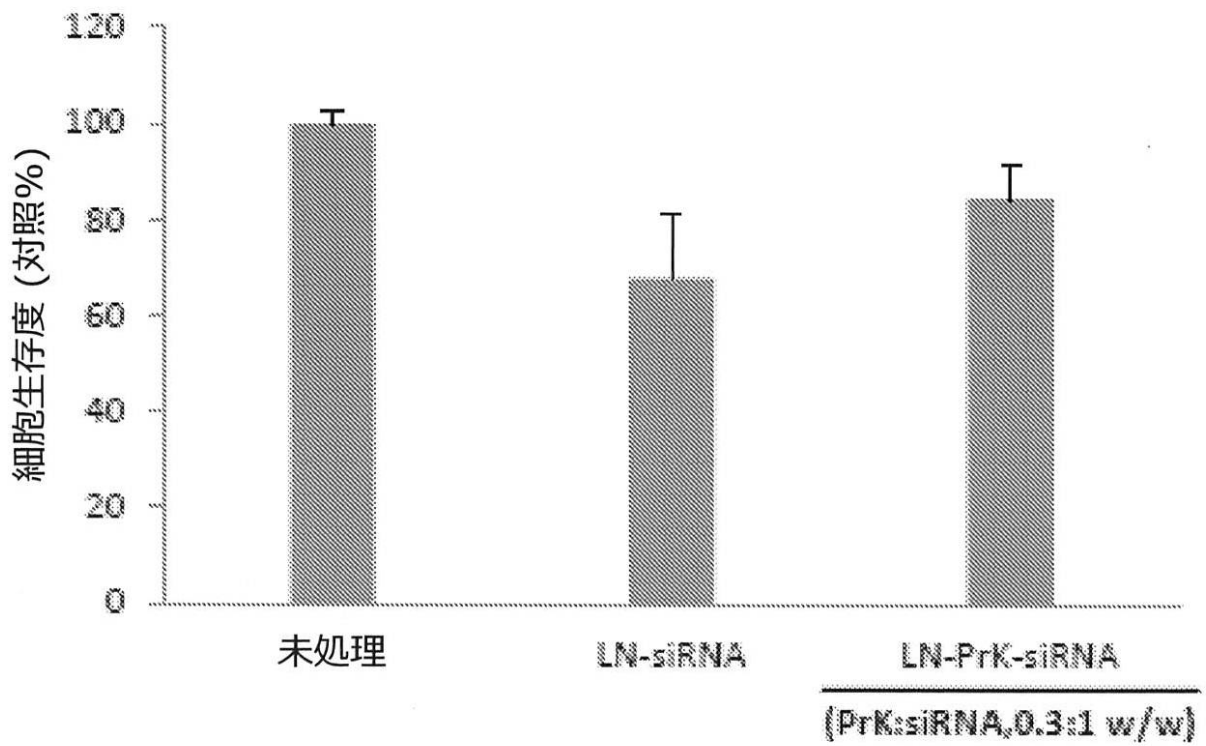
【図 15 B】



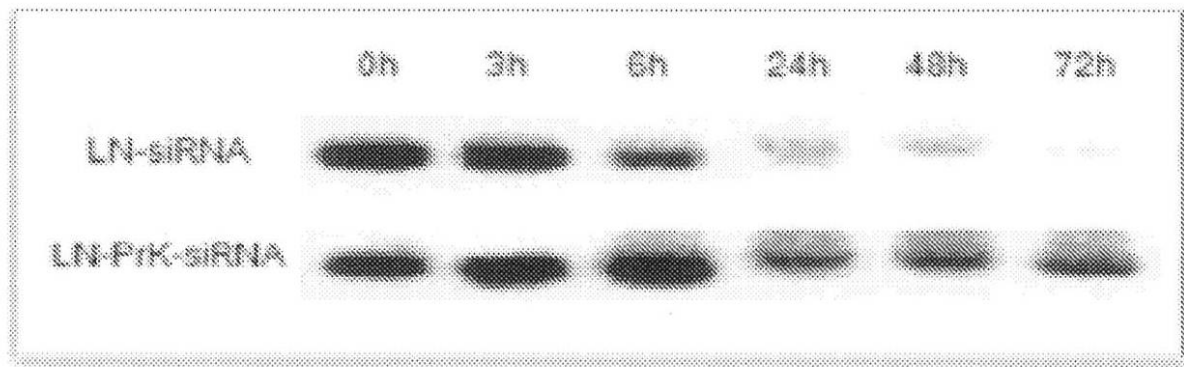
【図 15 C】



【図 16】

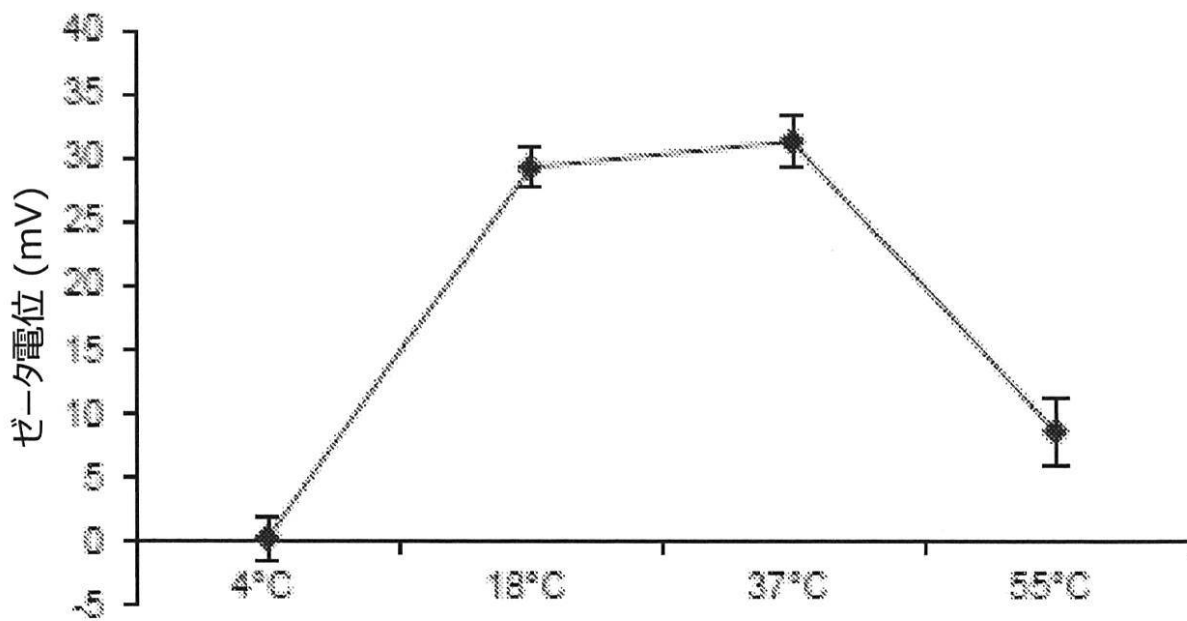


【図 17】

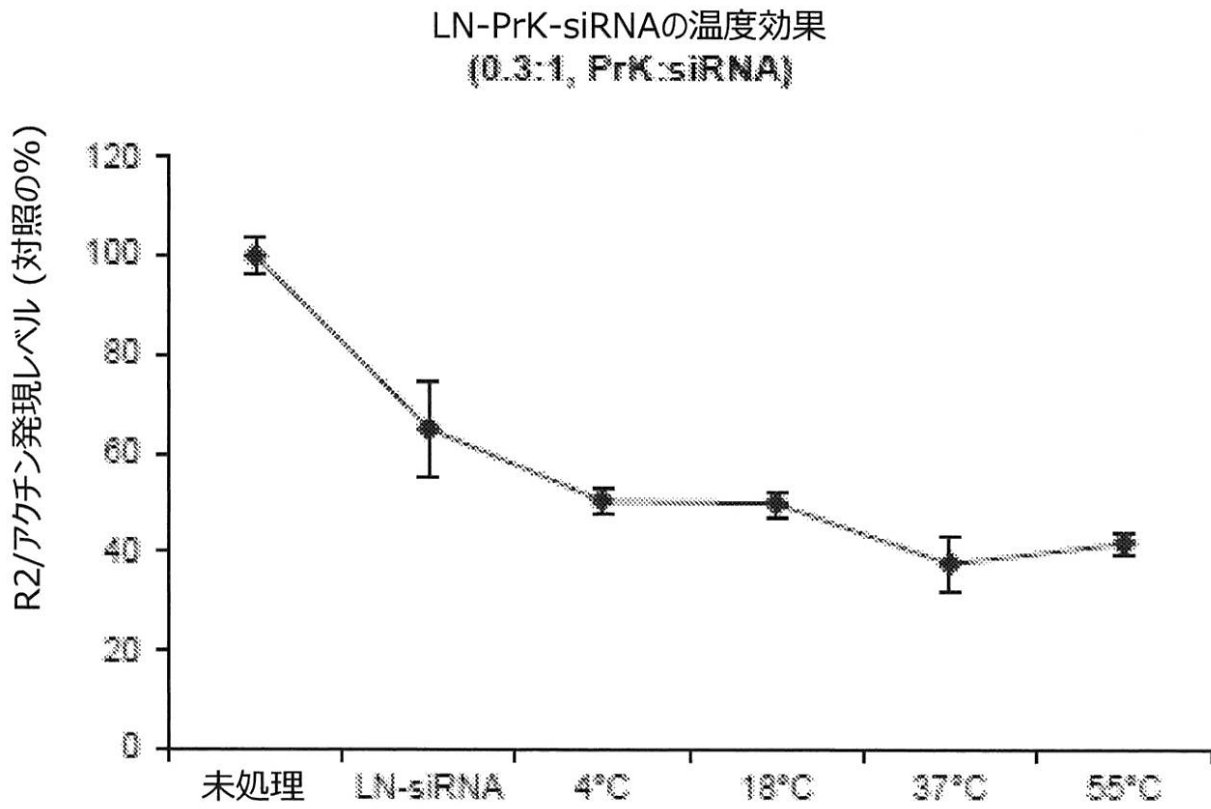


【図 18】

ゼータ電位 (PrK : siRNA 0.3:1)



【図 19】



【図 20】

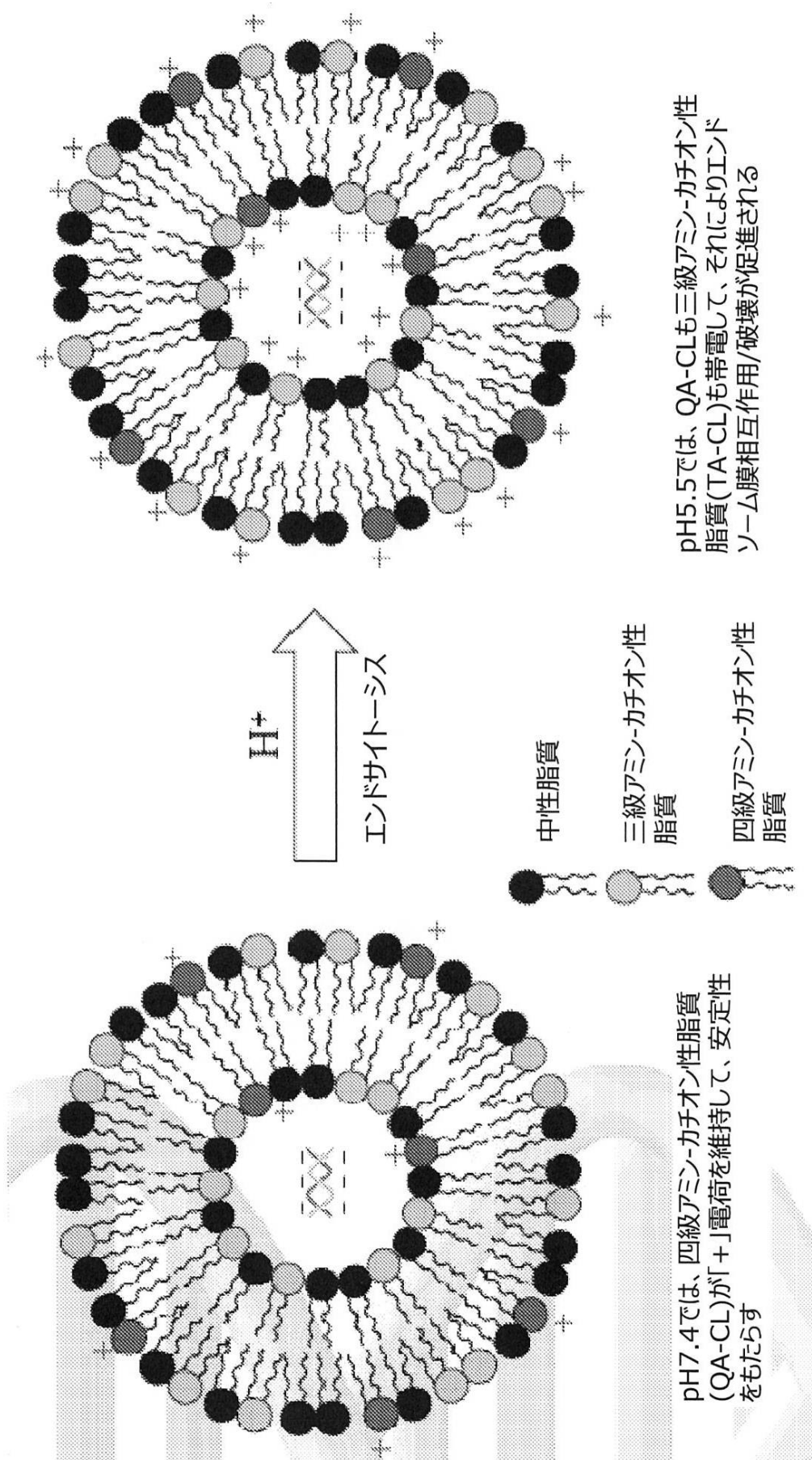


Figure 20

【図 21】

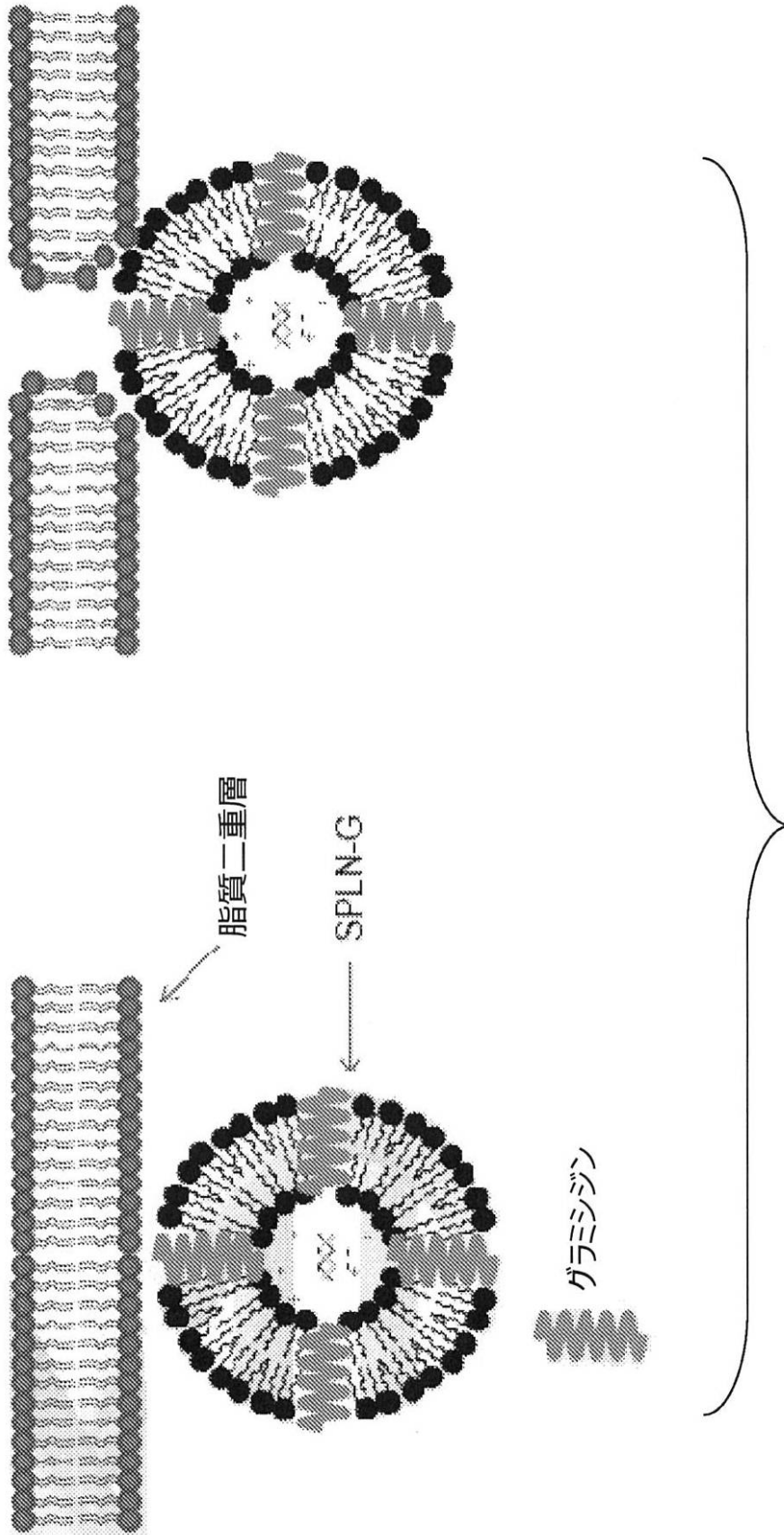


Figure 21

【図 22】

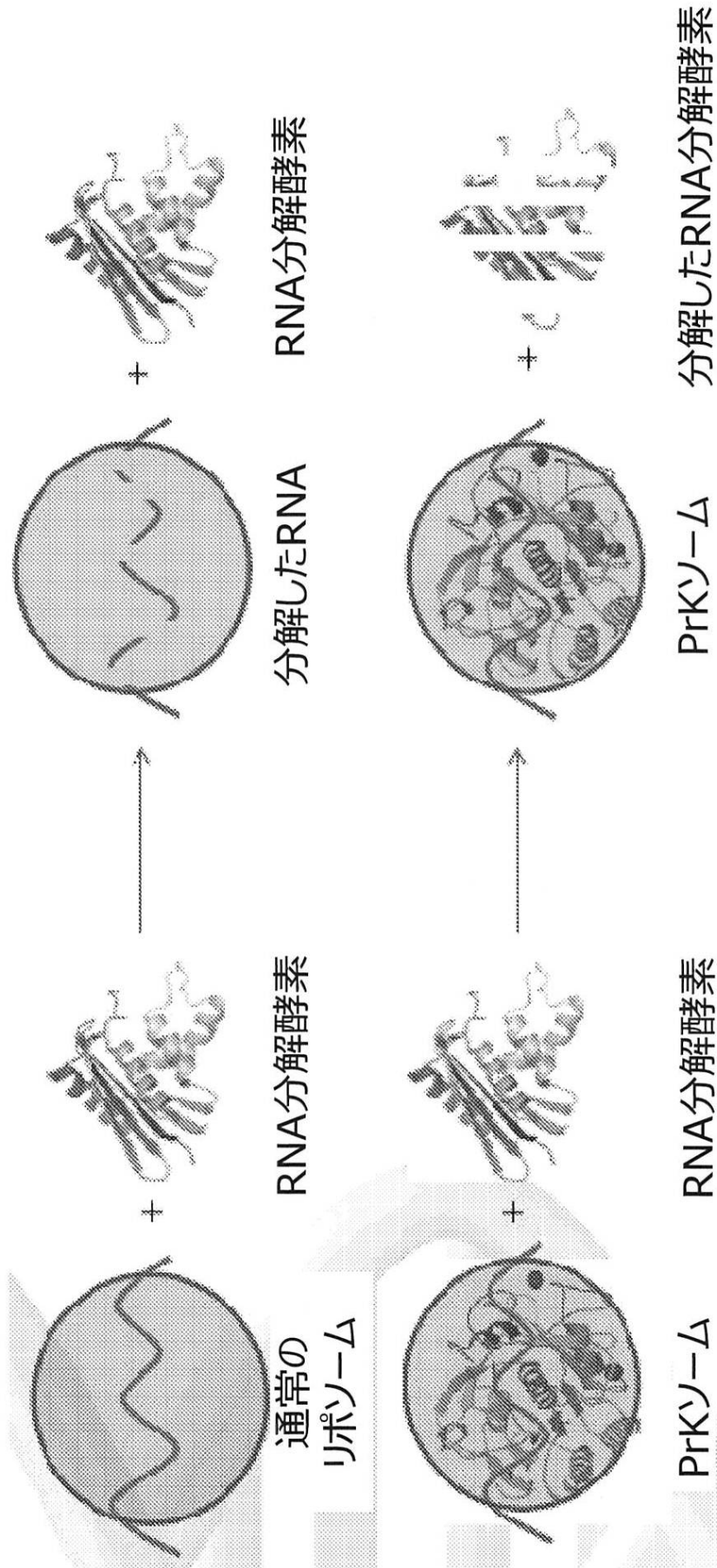
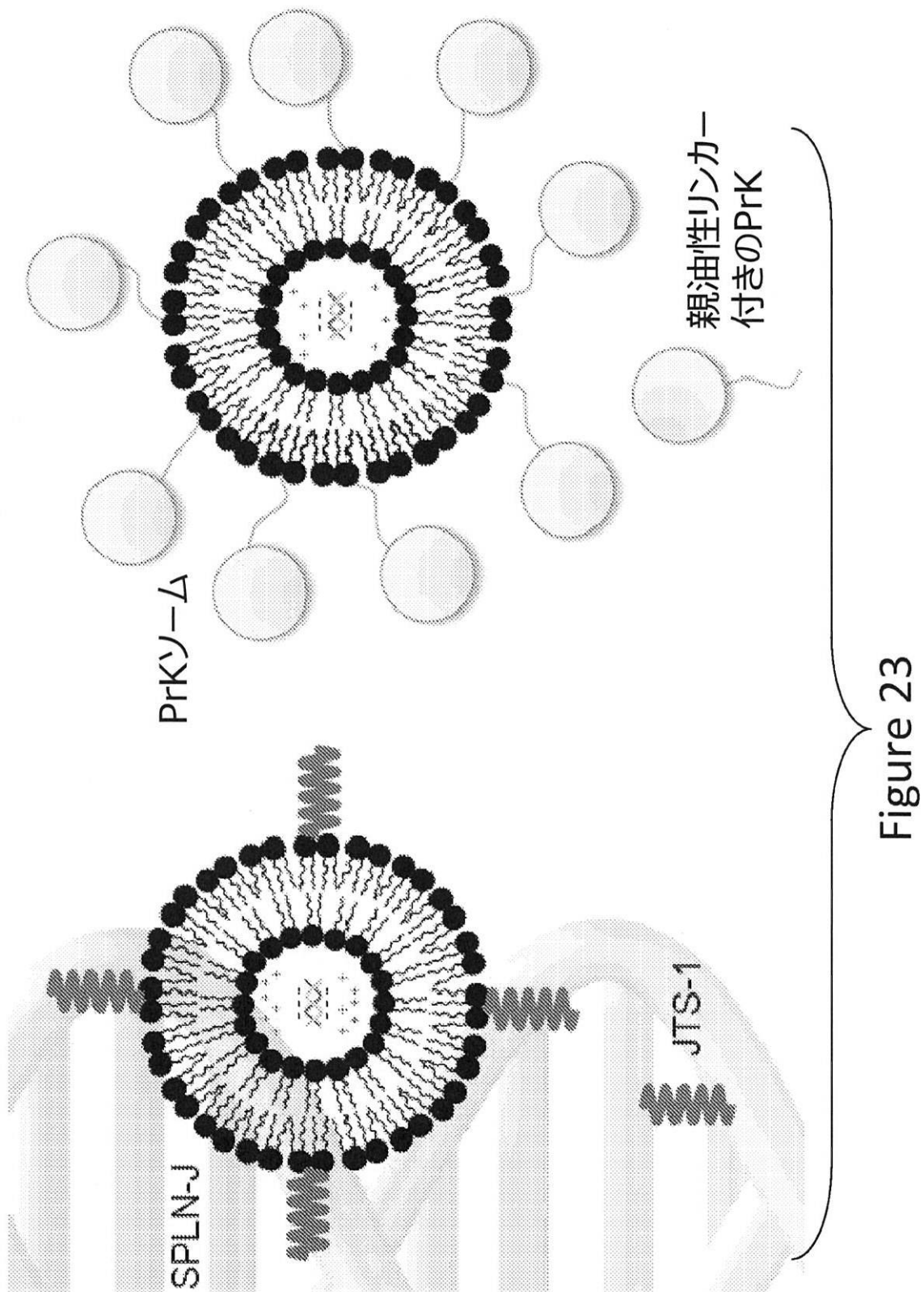
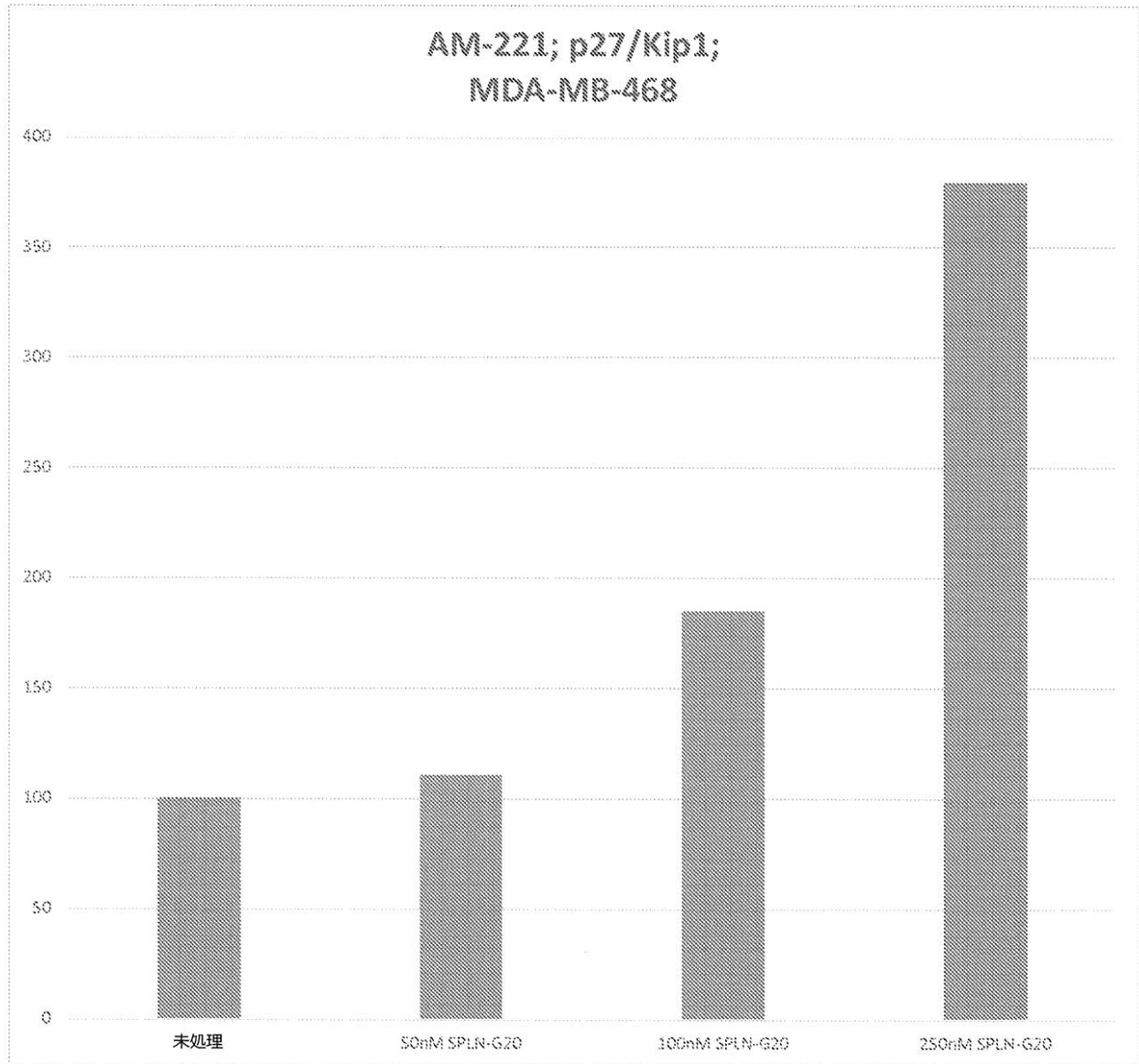


Figure 22

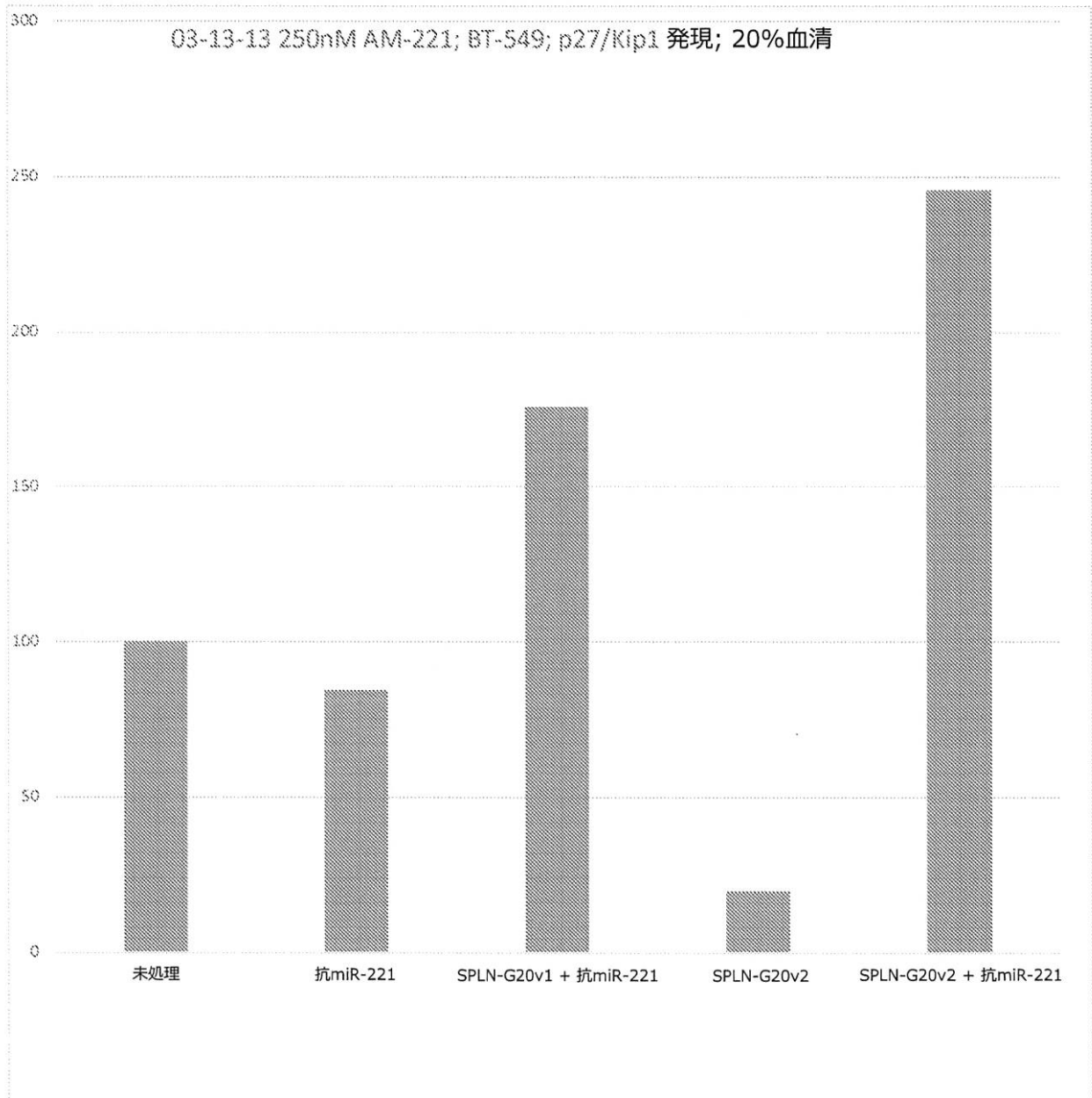
【図 23】



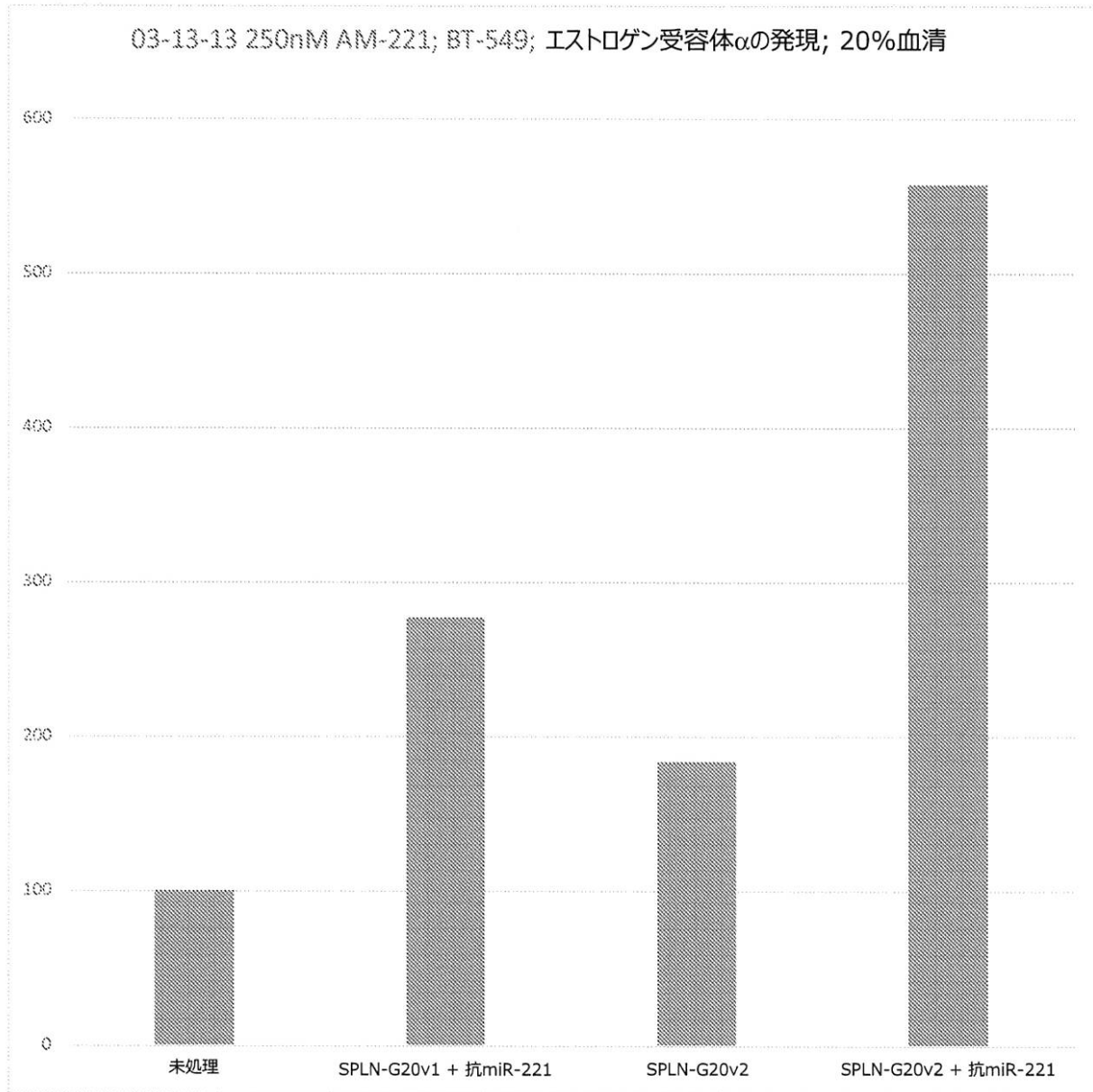
【 図 2 4 】



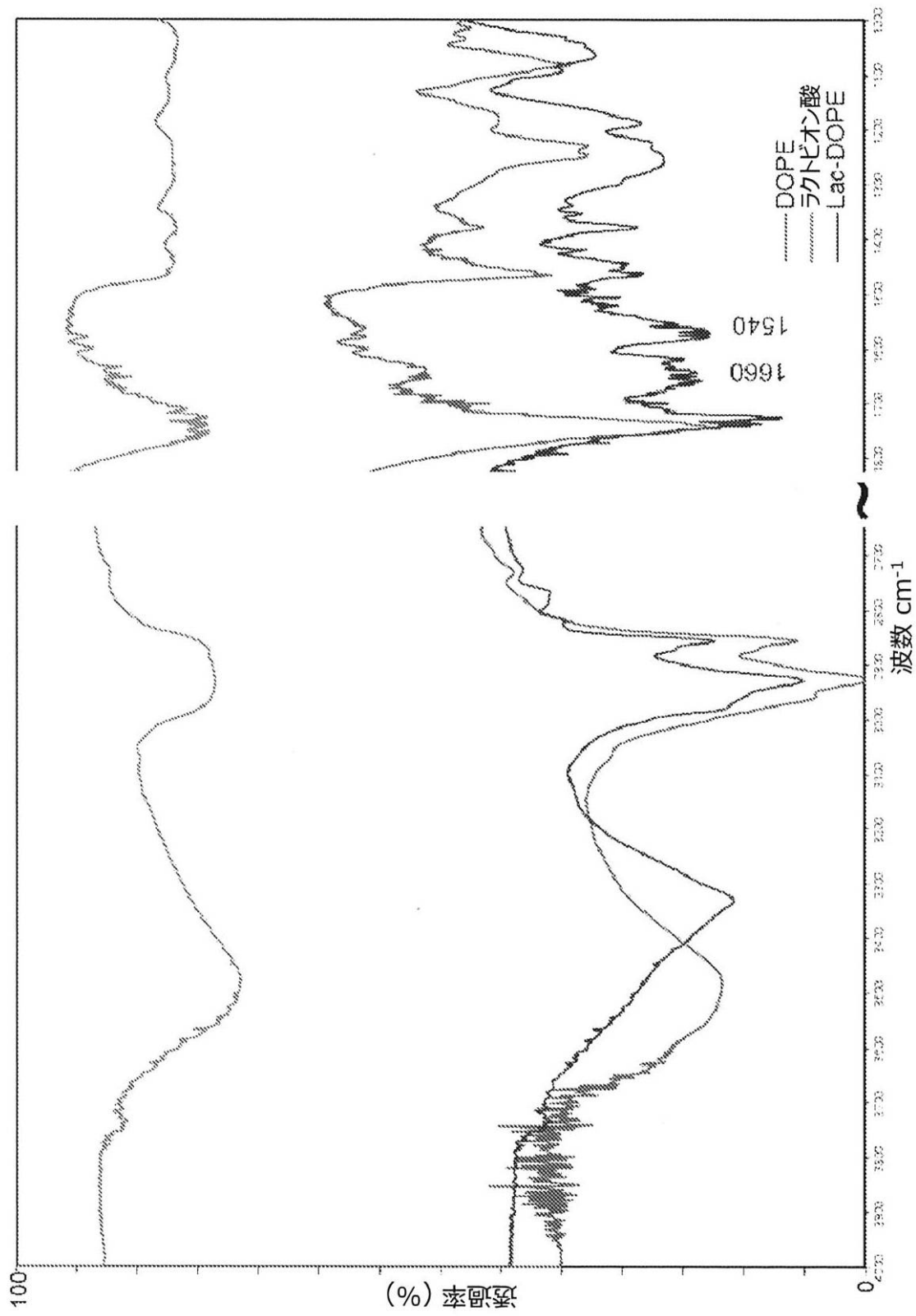
【 図 2 5 】



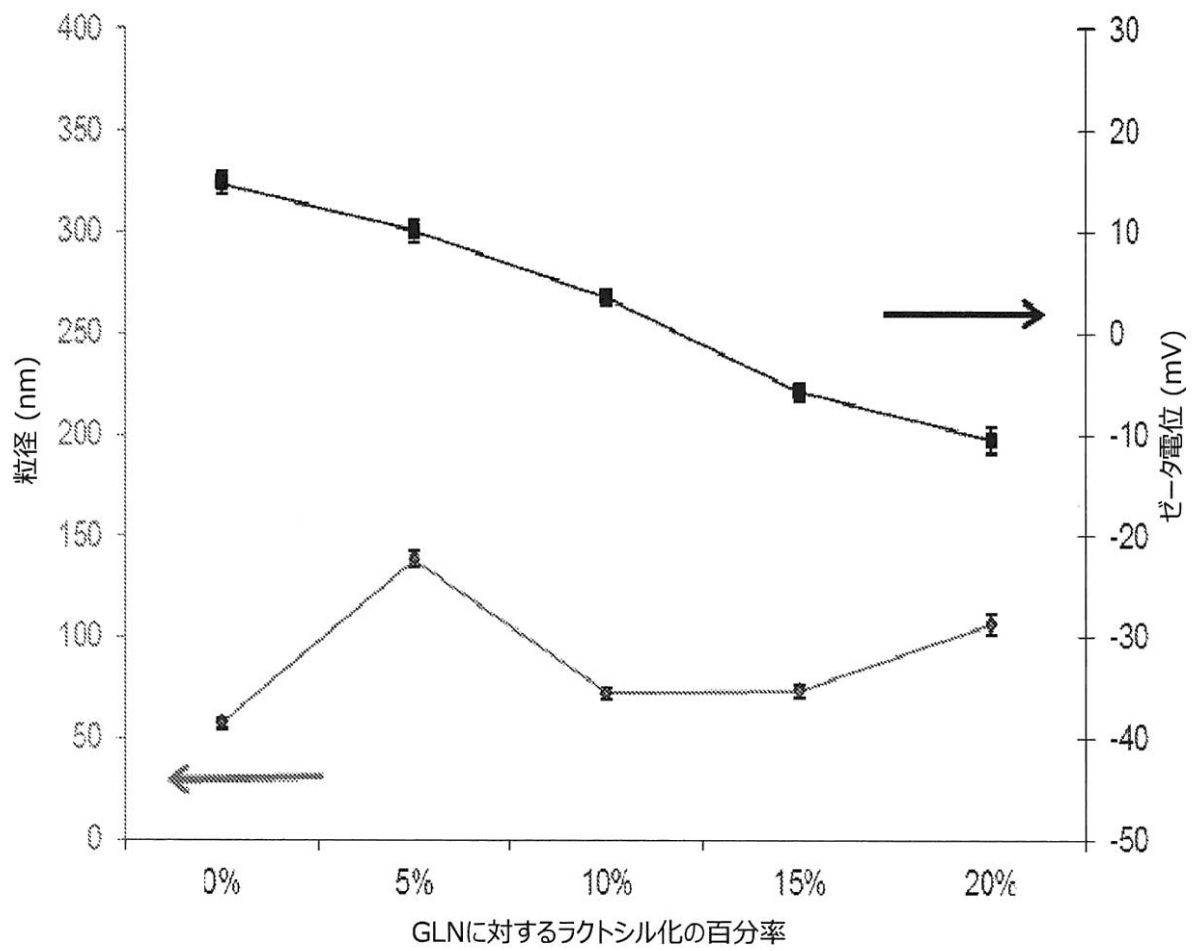
【図 26】



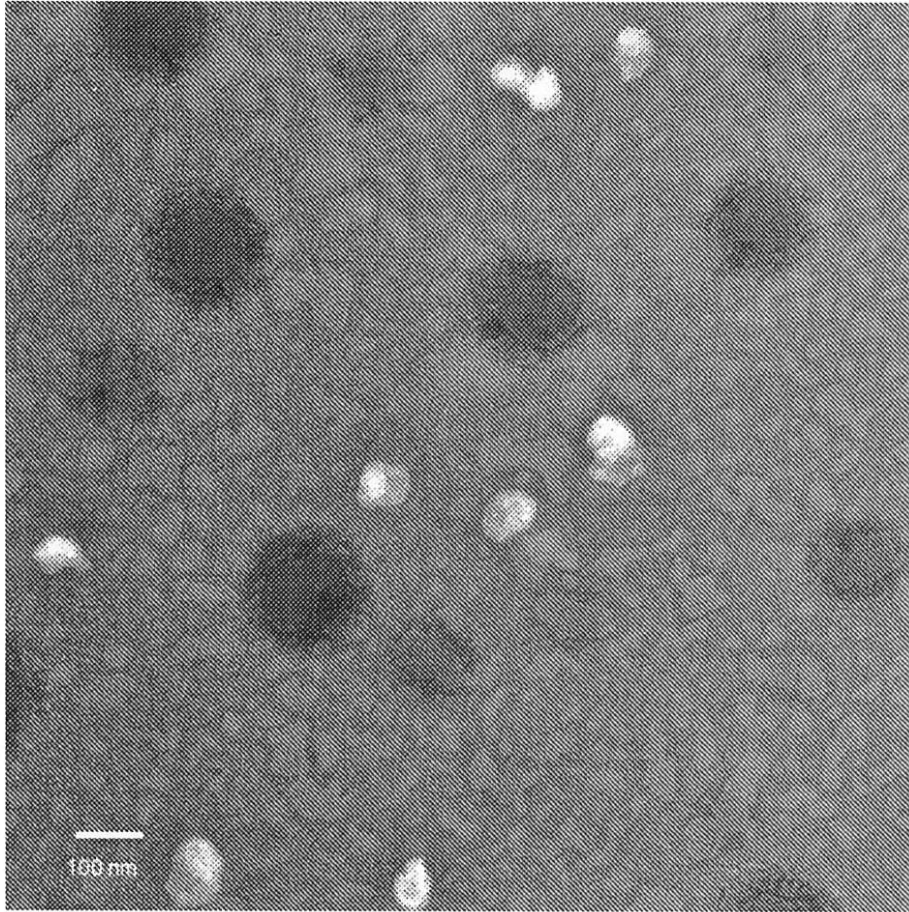
【図 27】



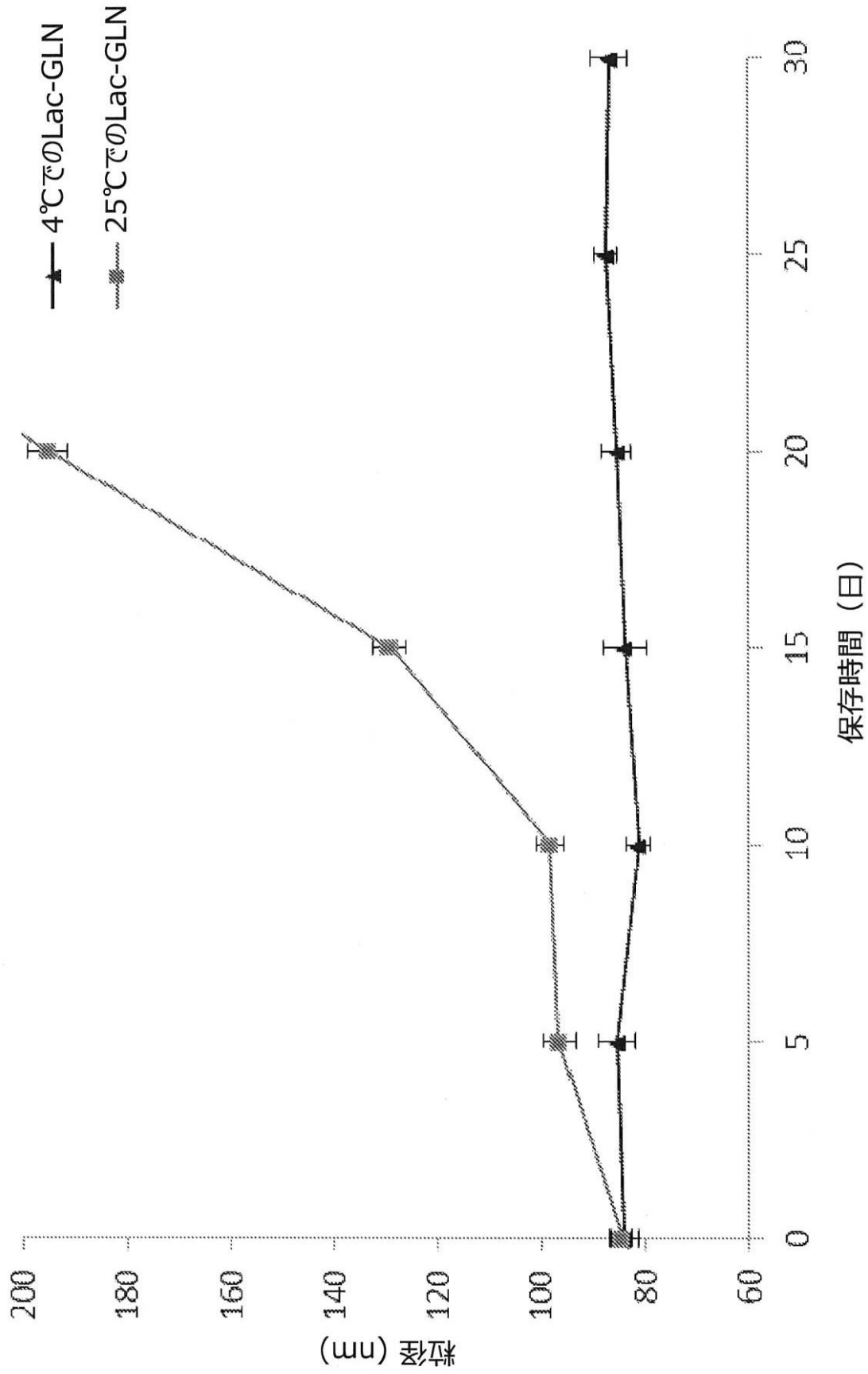
【図 28 A】



【図 28 B】



【図 29 A】

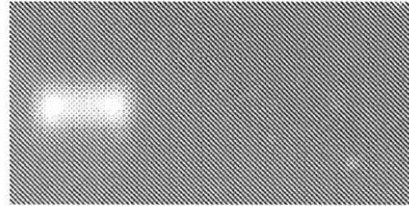


【図 29 B】

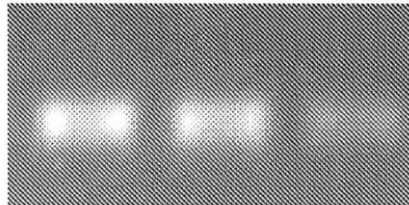
血清中でのインキュベーション時間（時間）

0 4 12

フリーの抗miR-155



Lac-GLN-抗miR-155



【図 30】

製剤	粒径 (nm)	ゼータ電位	被包化効率 (%)
GLN	57.39 ± 2.73	14.72 ± 1.15	87.5 ± 1.9
Lac-GLN	72.66 ± 3.14	3.49 ± 0.77	88.9 ± 2.2

【 図 3 1 】

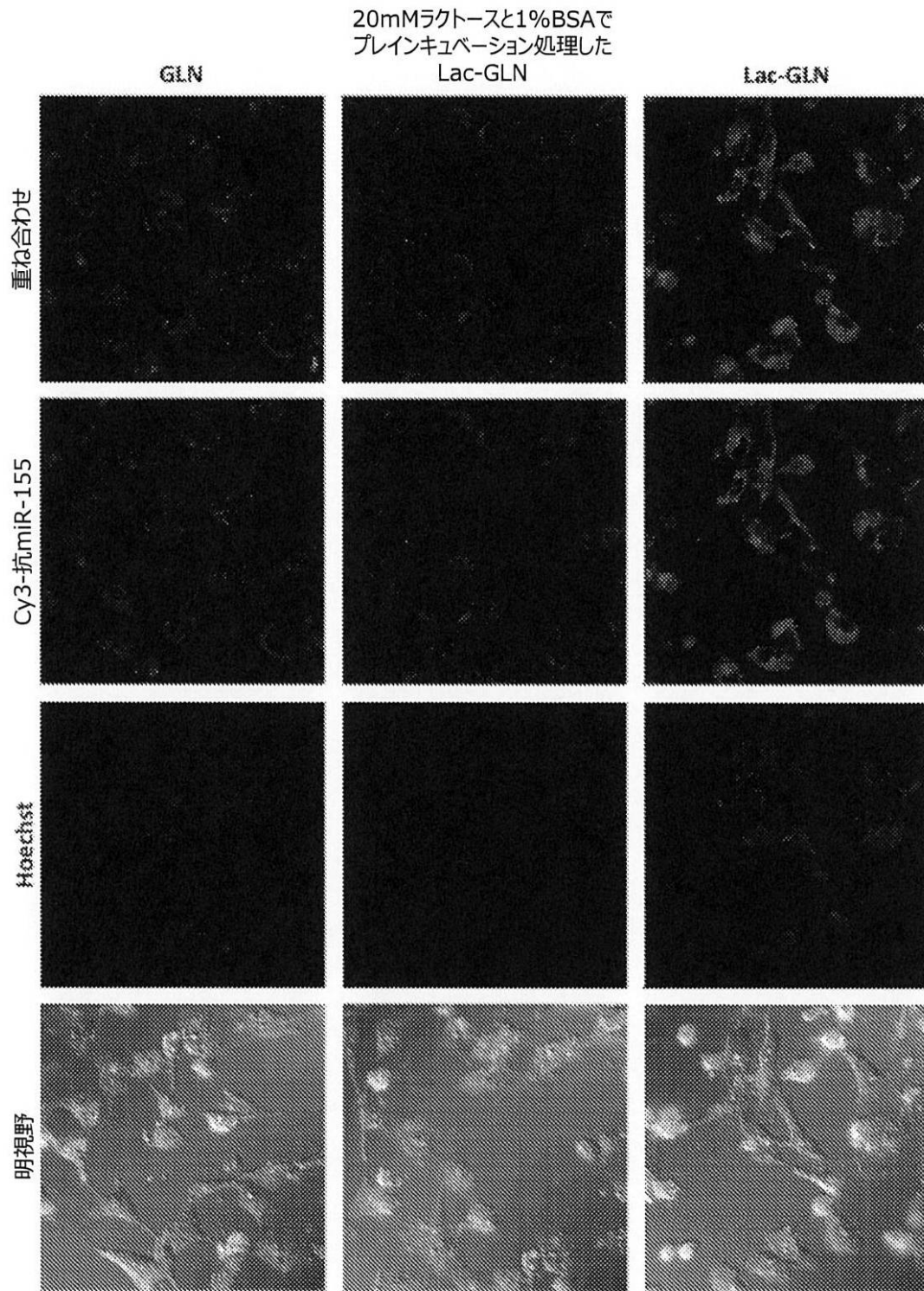
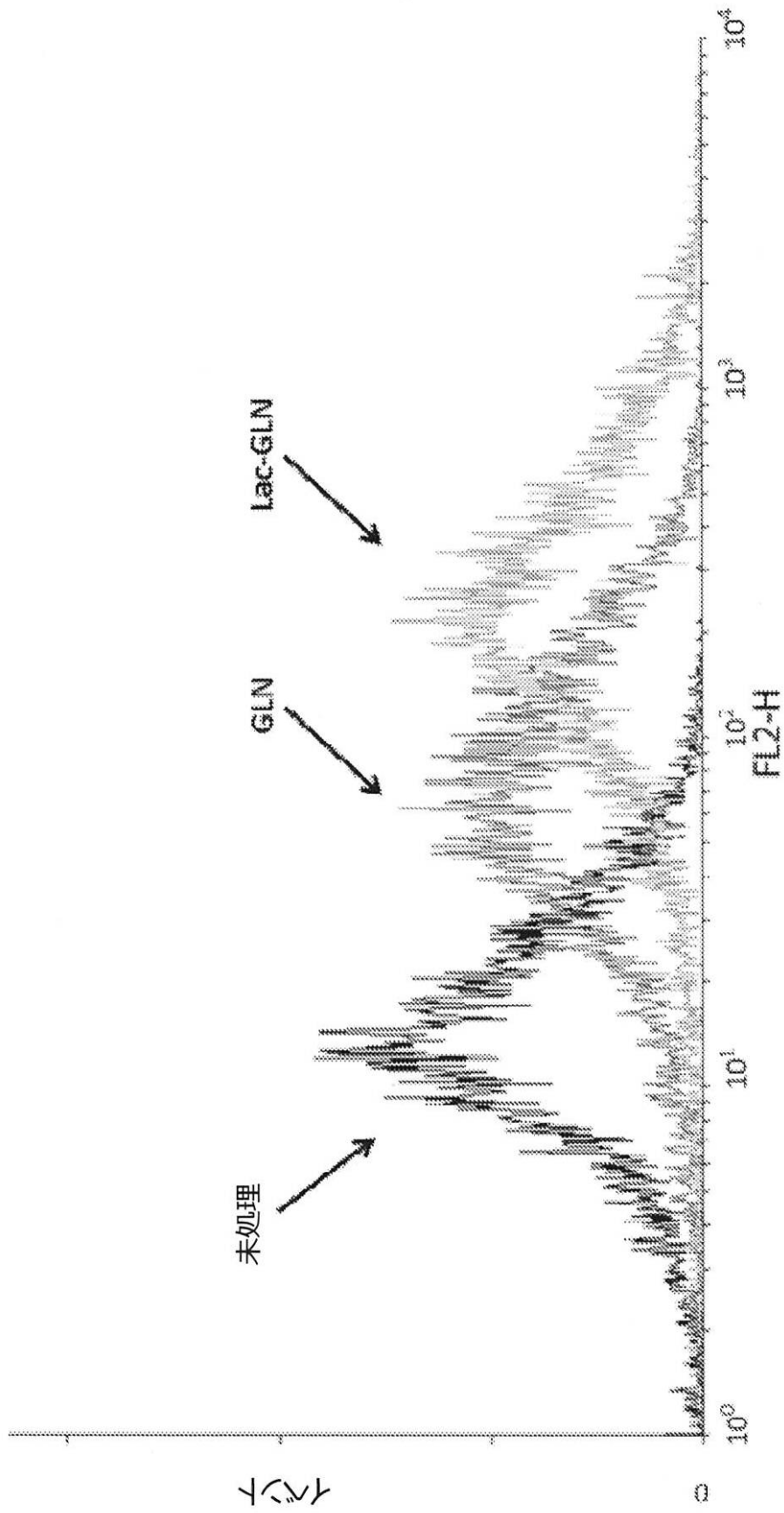
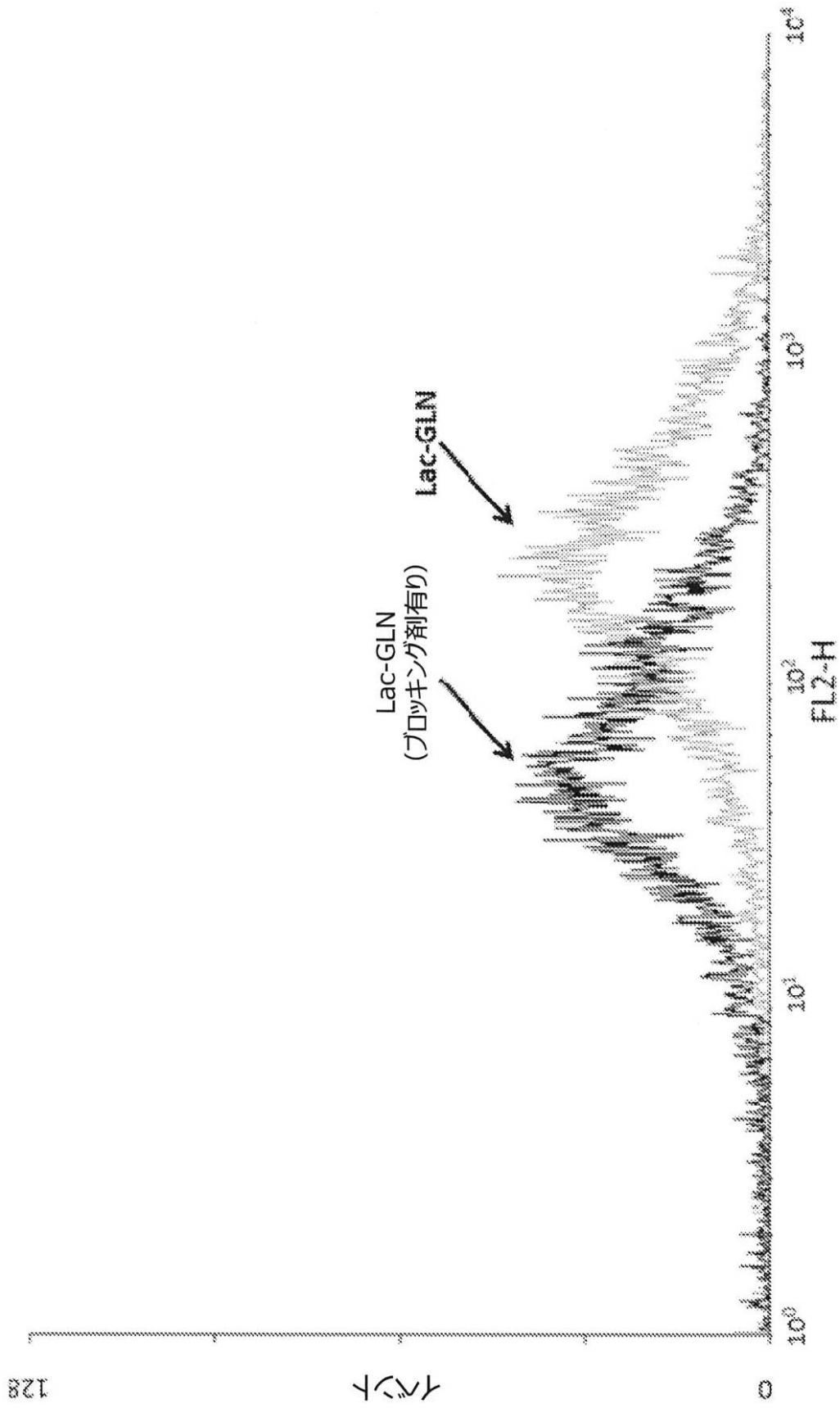


Figure 31

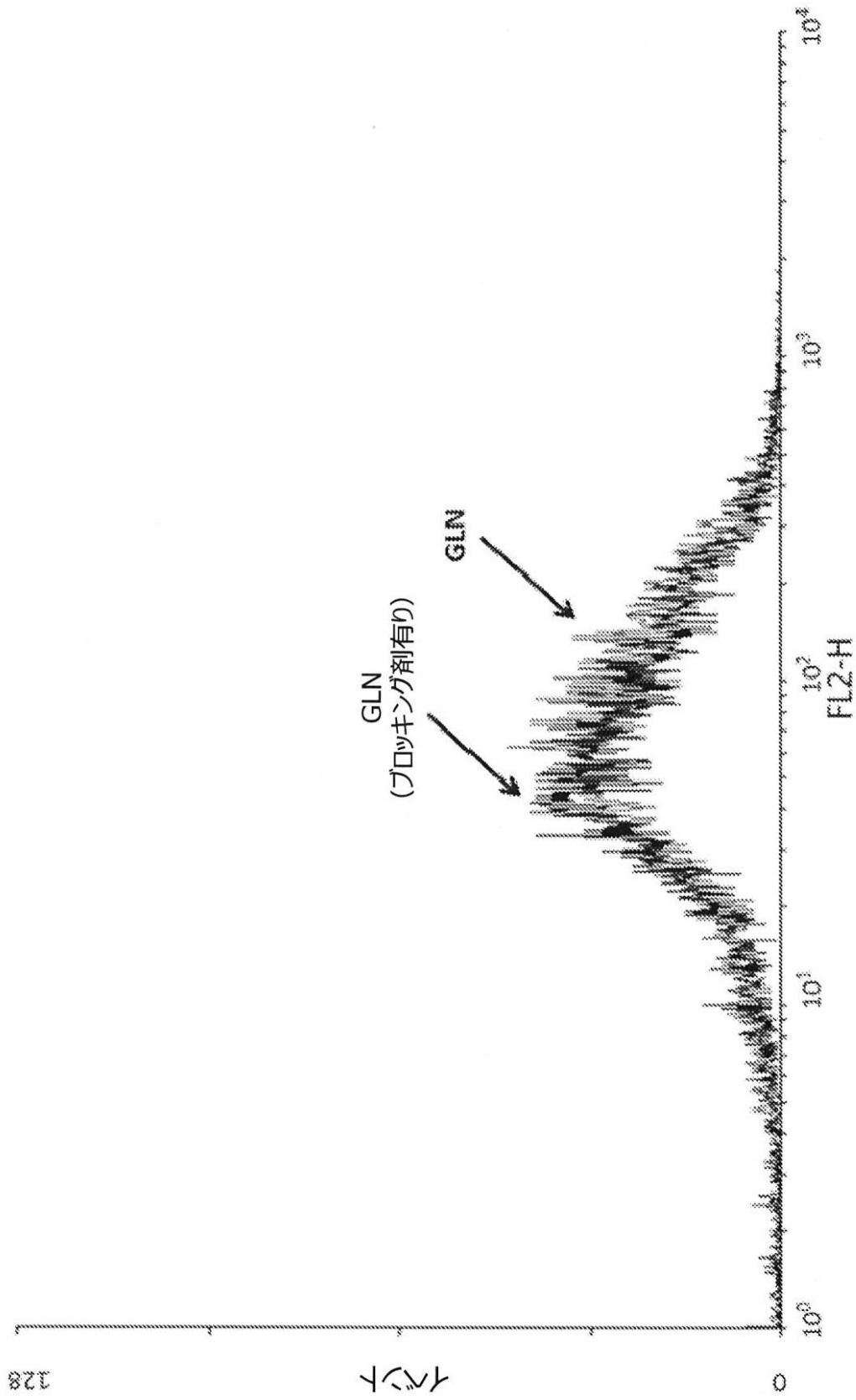
【図 3 2 A】



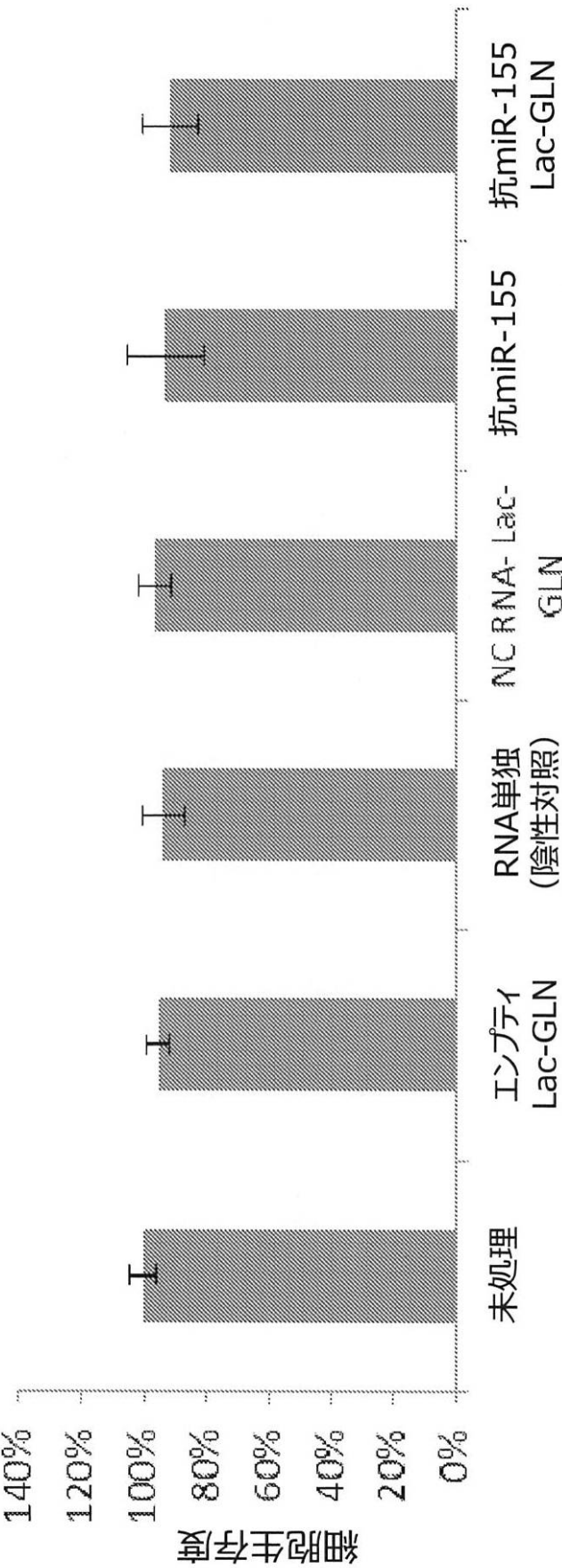
【図 3 2 B】



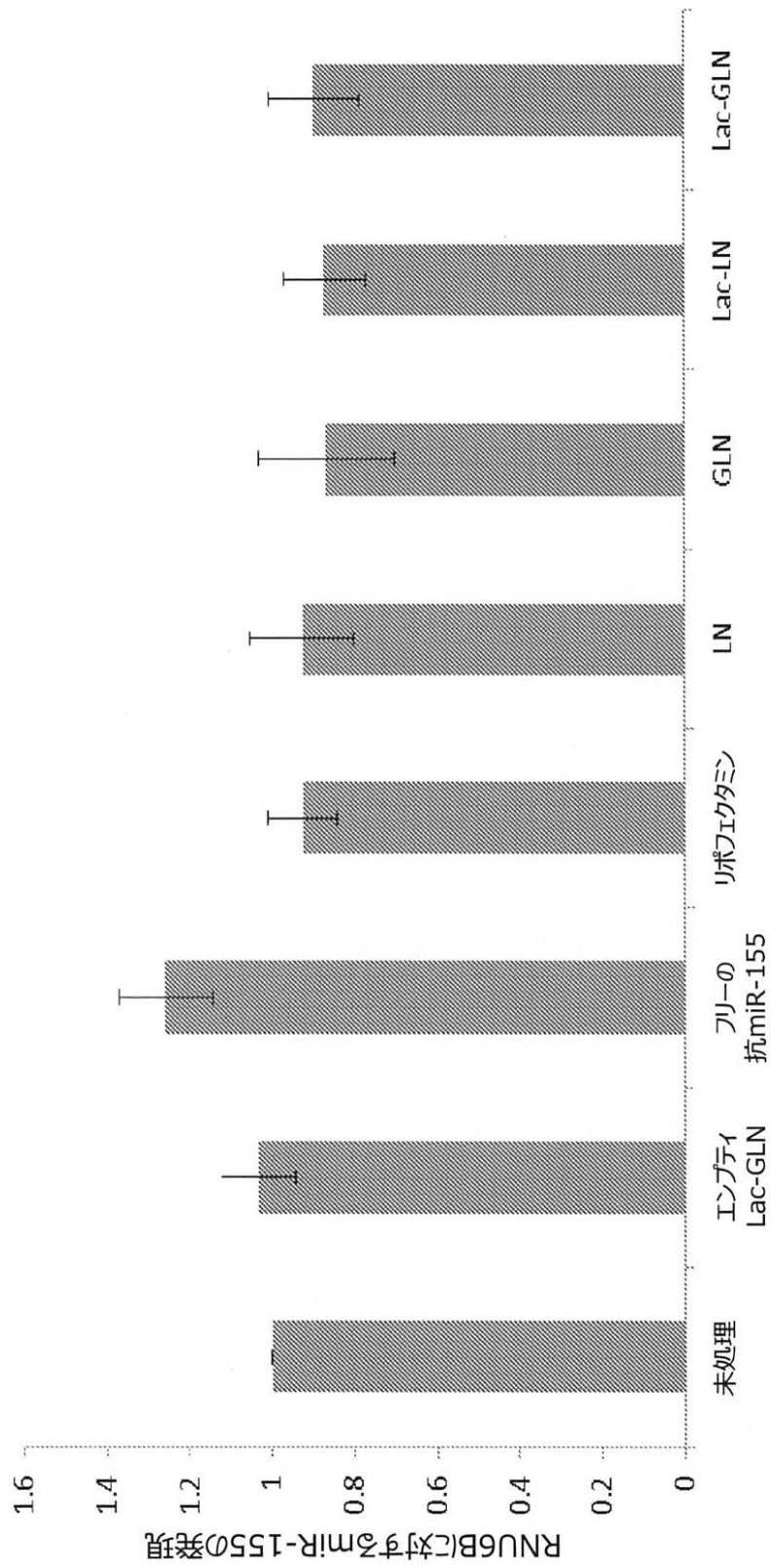
【図 3 2 C】



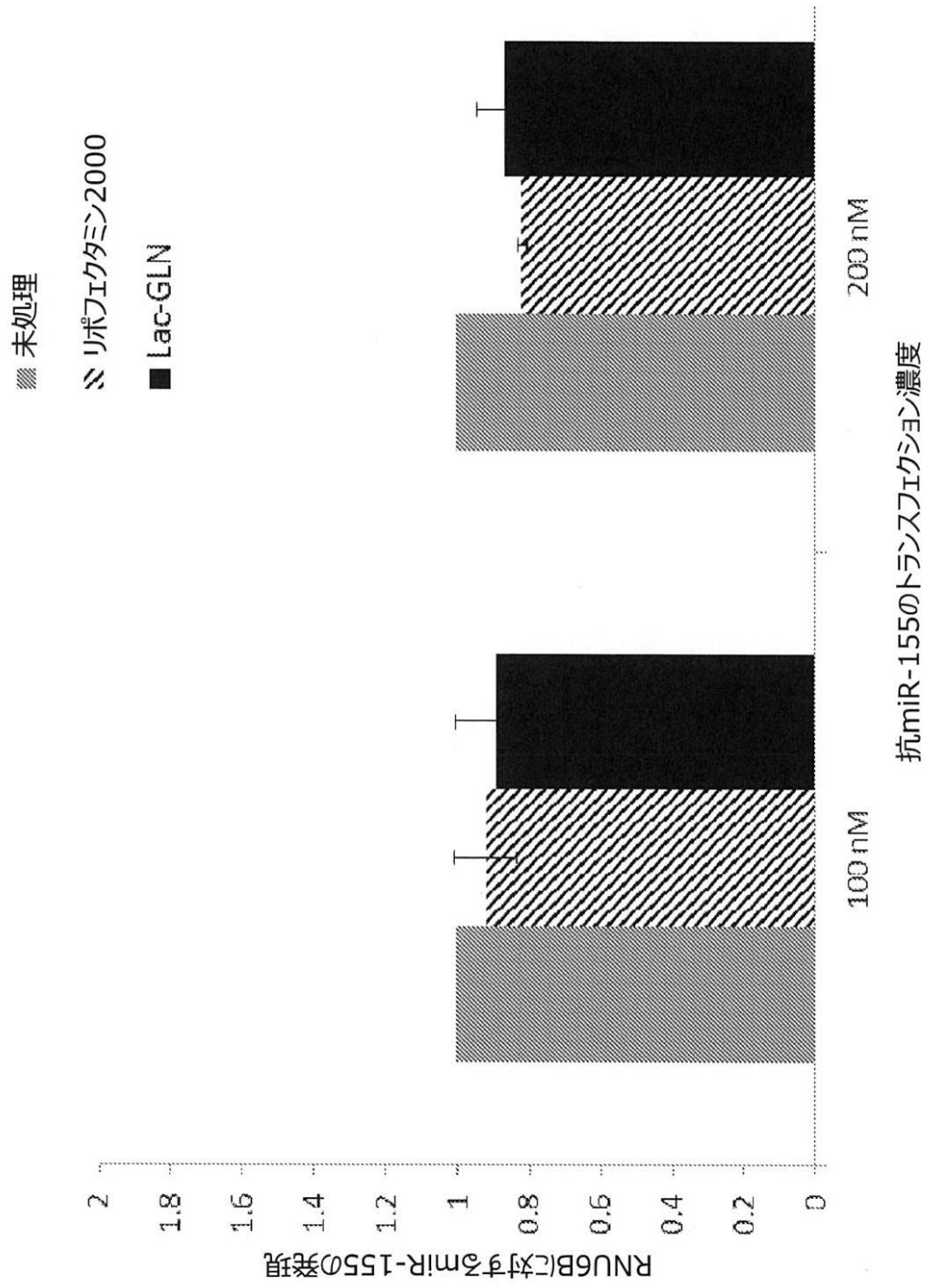
【図 3 3 B】



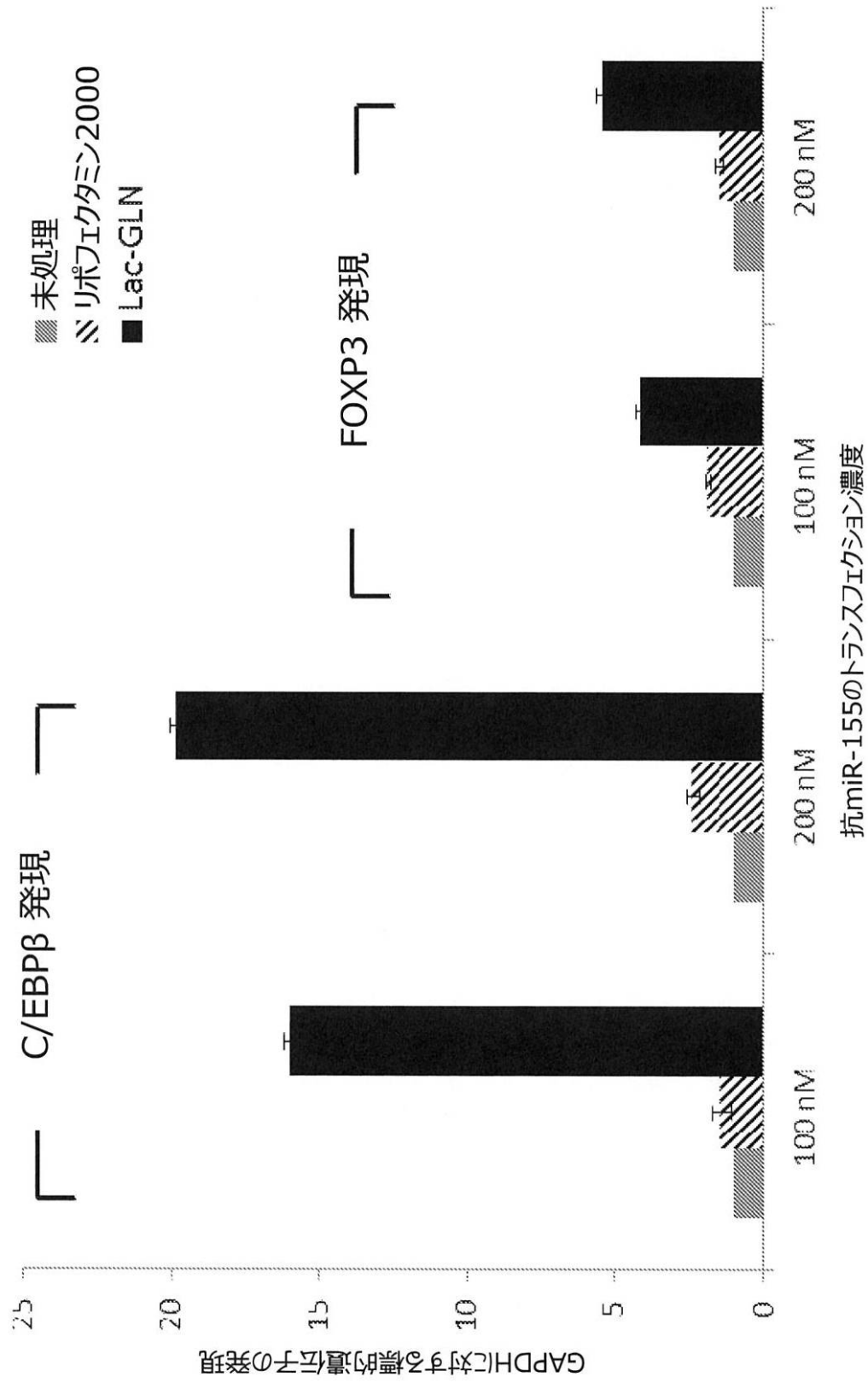
【図 3 3 C】



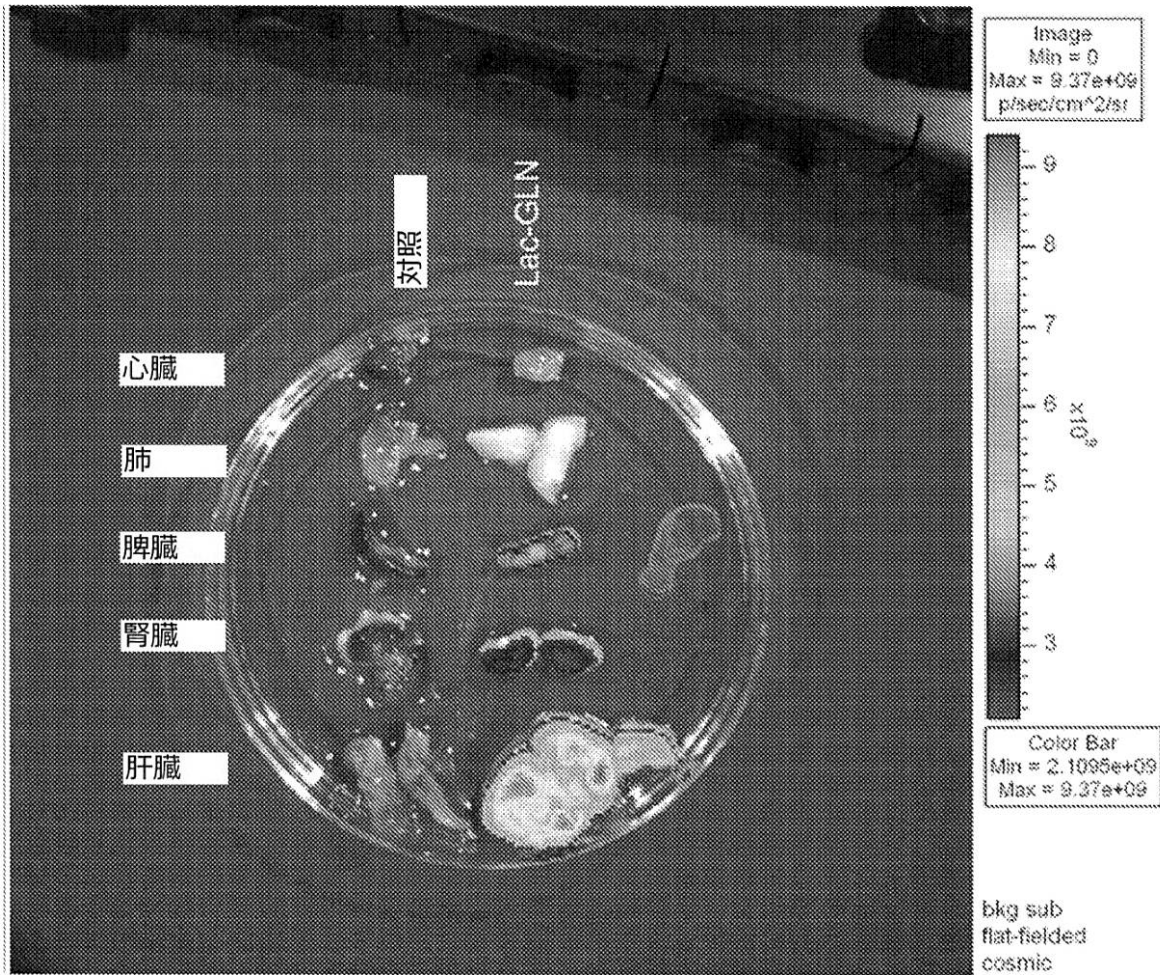
【図 3 4 A】



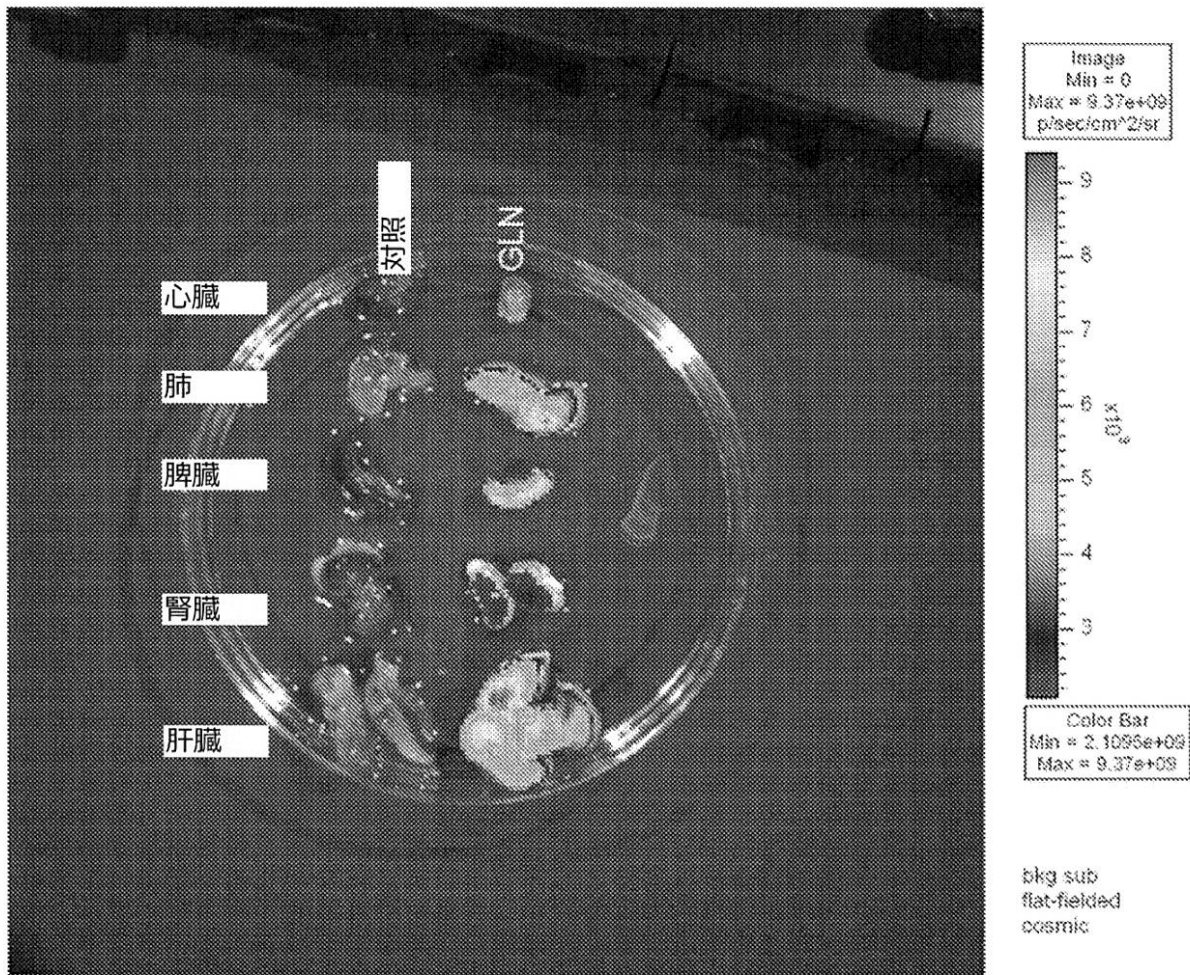
【図 3 4 B】



【図 3 5 A】

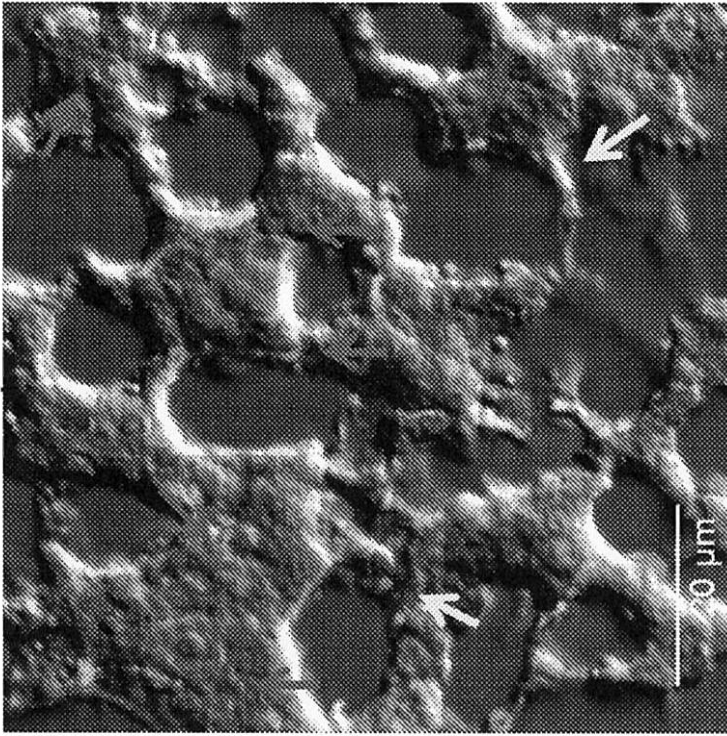


【図 3 5 B】



【図 36 A】

Lac-GLN-Cy3-抗miR-155



GLN-Cy3-抗miR-155

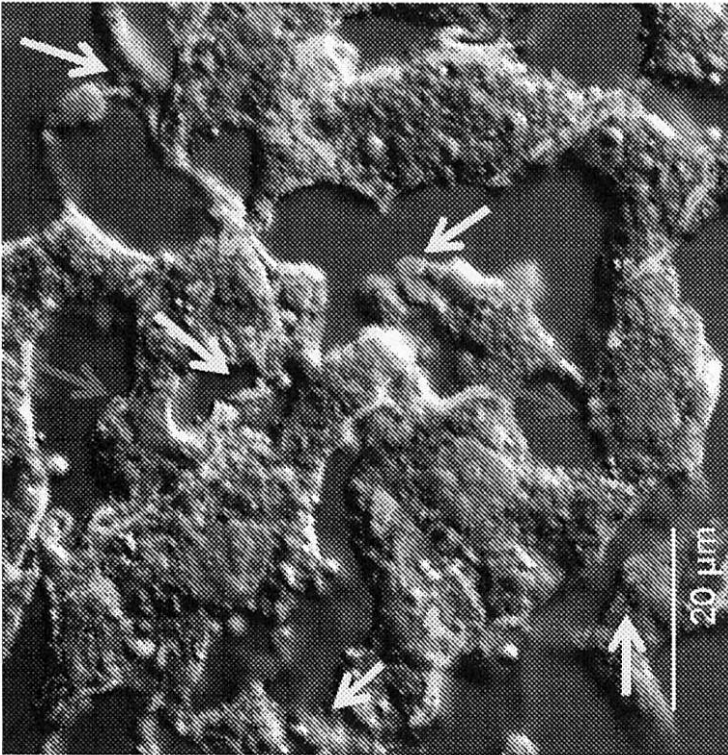


Figure 36A

【図 3 6 B】

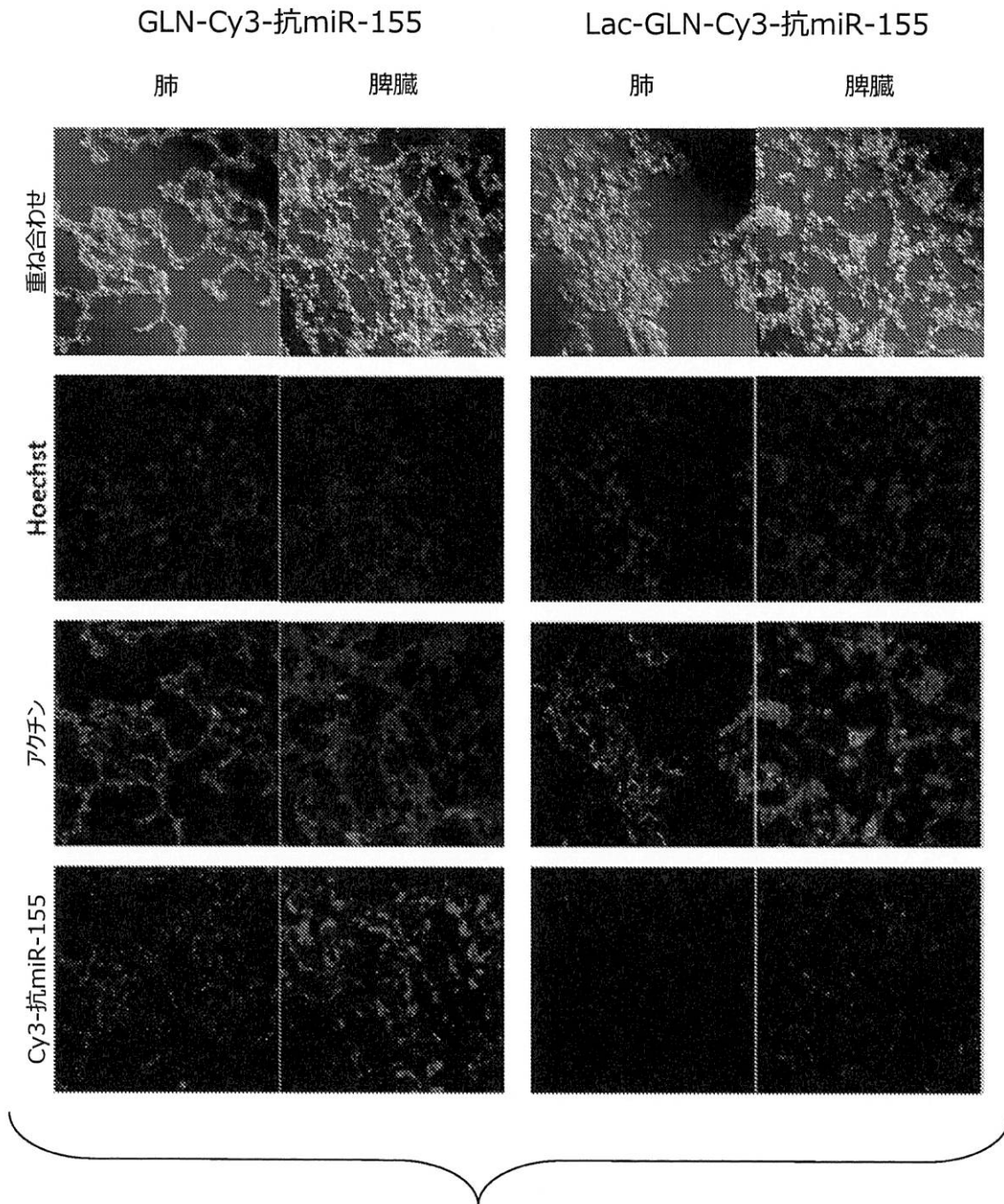
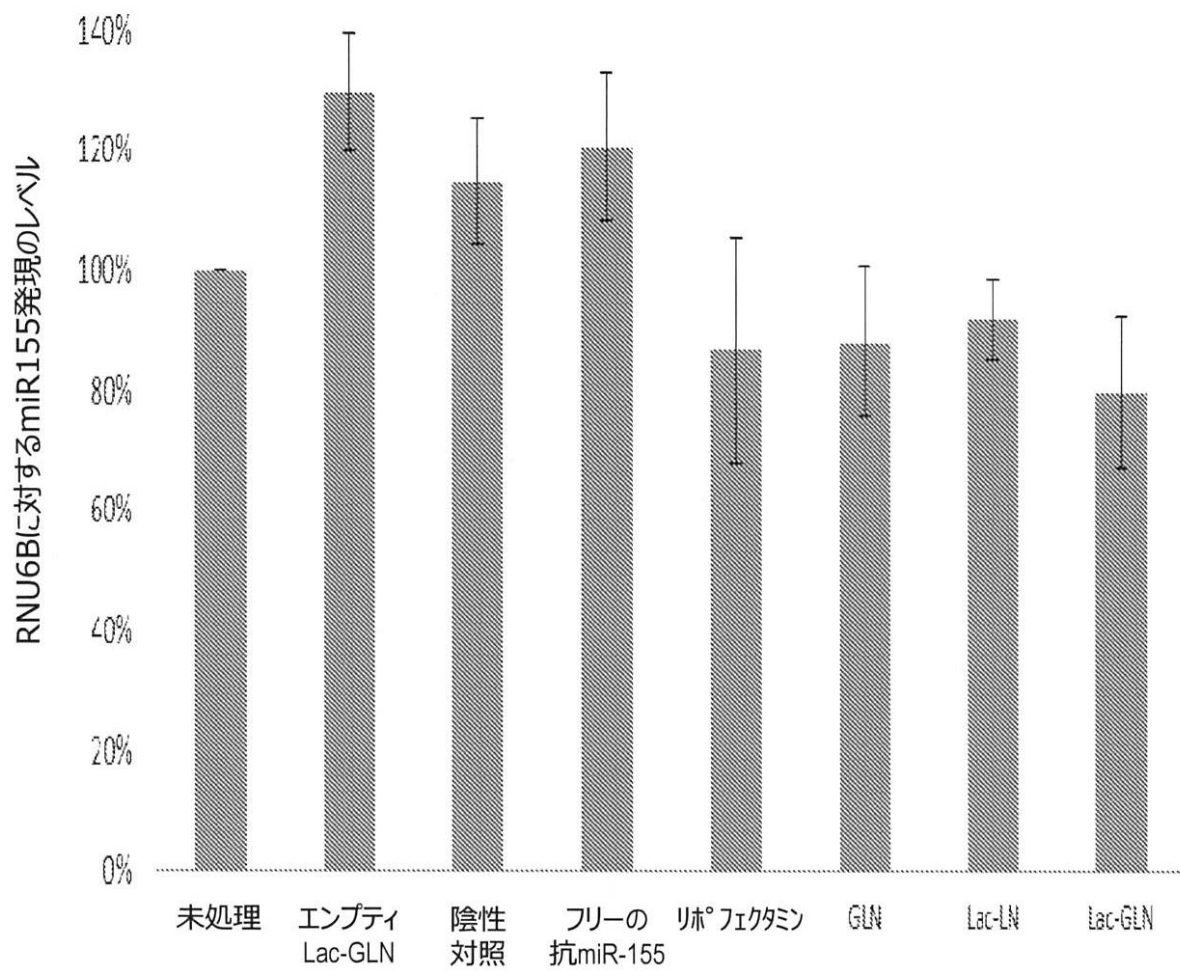
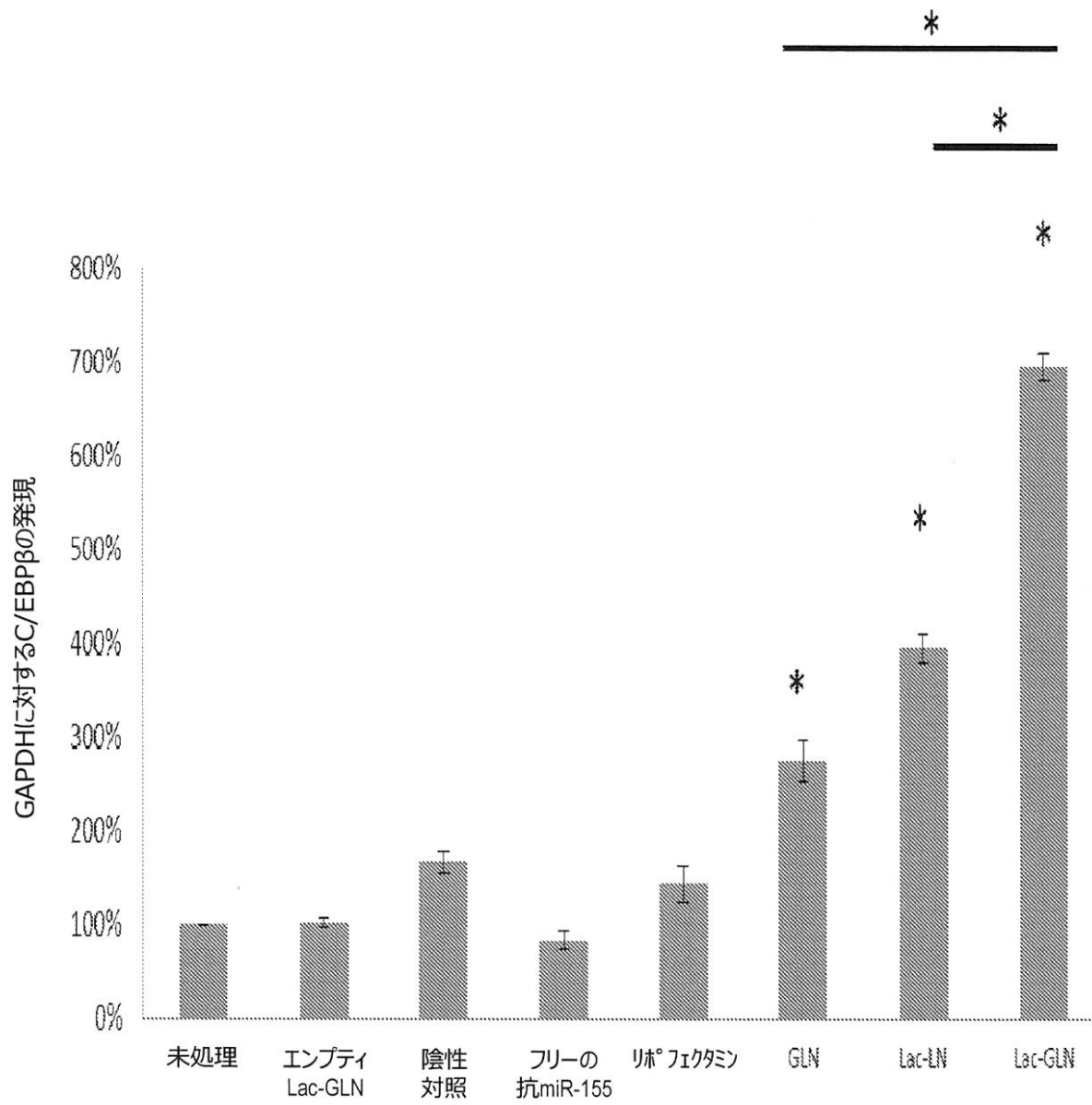


Figure 36B

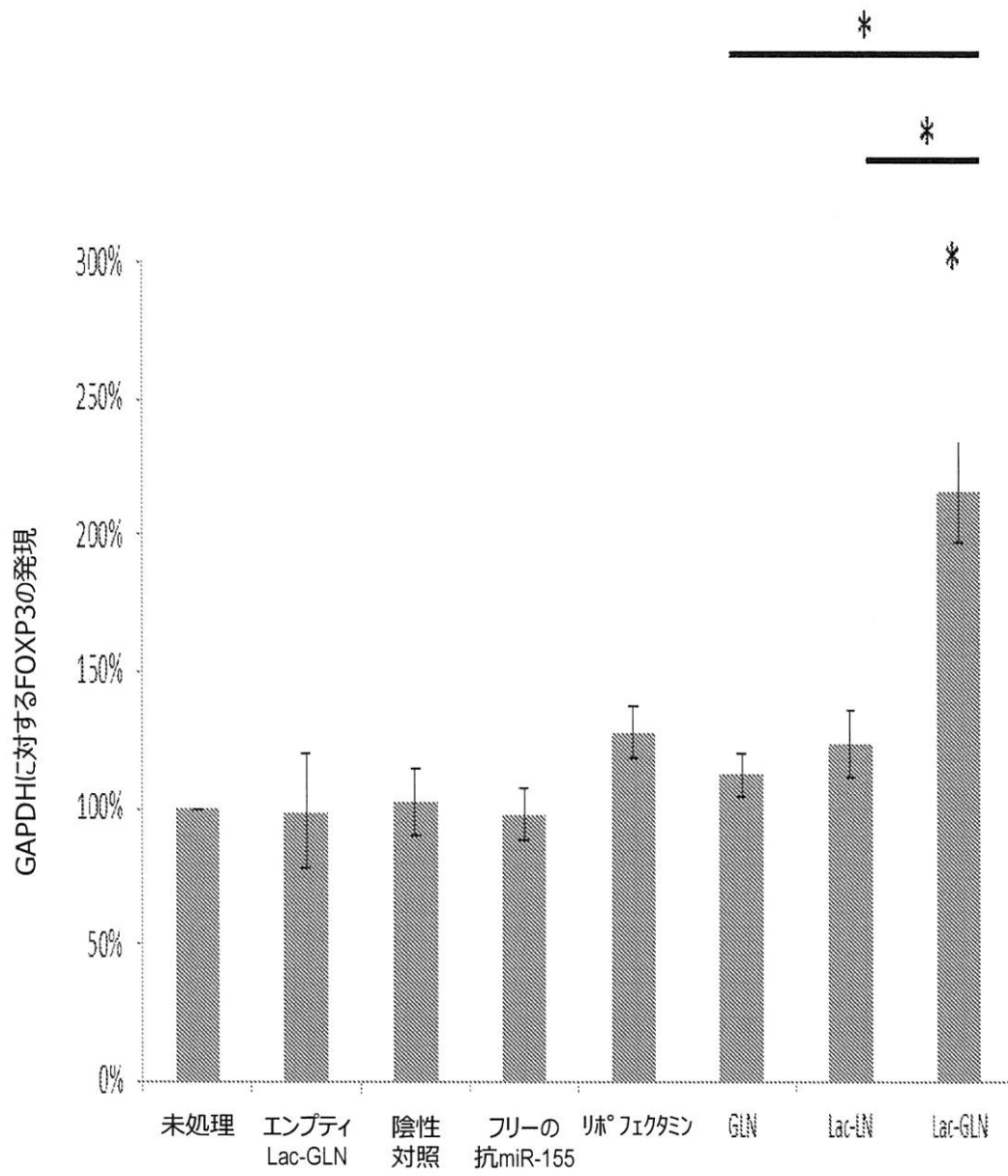
【図 3 7 A】



【図 3 7 B】



【図 3 7 C】



【配列表】

2015525209000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US13/42458

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 9/16, 9/127, 47/44 (2013.01)

USPC - 424/498, 450; 977/717

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)

IPC(8): A61K 9/16, 9/127, 47/44 (2013.01)

USPC: 424/498, 450, 490, 489, 400; 977/700-702, 715, 717, 788, 797-799

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

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

MicroPatent (US-G, US-A, EP-A, EP-B, WO, JP-bib, DE-C,B, DE-A, DE-T, DE-U, GB-A, FR-A); DialogPRO (Derwent, INSPEC, NTIS, PASCAL, Current Contents Search, Dissertation Abstracts Online, Inside Conferences); Google; Google Scholar; Pubmed/Pubmed Central; lipid, nanoparticle, tertiary, quaternary, amine, cationic, encapsulate, oligonucleotide, 'proteinase K,' 'DOTAP,' 'DODAP.'

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2007/0135372 A1 (MACLACHLAN, I et al.) June 14, 2007; paragraphs [0020], [0032]-[0044], [0094]-[0100], [0118]-[0126], [0142]-[0171], [0183]-[0191], [0256]-[0273], [0311]; Claims 60, 73, 74	1-9, 11-13, 15, 23, 24, 33/1, 33/15, 35/33/1, 33/35/15, 41/1, 41/15, 42/41/1, 42/41/15, 43/41/1, 43/41/15, 44/41/1, 44/41/15, 45/41/1, 45/41/15, 46/41/1, 46/41/15, 47/41/1, 47/41/15, 48/41/1, 48/41/15, 49/1, 49/15, 50/49/1, 50/49/15, 51/49/1, 51/49/15, 52/49/1, 52/49/15, 53/52/49/1, 53/52/49/15, 54/52/49/1, 54/52/49/15, 55/1, 55/15, 56/1, 56/15, 57/1, 57/15, 58/1, 58/15, 61/59/1, 61/59/15, 62/1, 62/15, 63/62/1, 63/62/15, 65/1, 65/15, 66/65/1, 66/65/15, 67/65/1, 67/65/15, 68/65/1, 68/65/15 10, 14, 16-22, 34/33/1, 34/33/15, ... -continued on next page-

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

* 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

12 December 2013 (12.12.2013)

Date of mailing of the international search report

20 DEC 2013

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Shane Thomas

PCT Helpdesk: 571-272-4300

PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US13/42458

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2007/0135372 A1 (MACLACHLAN, I et al.) June 14, 2007; paragraphs [0020], [0032]-[0044], [0094]-[0100], [0118]-[0126], [0142]-[0171], [0183]-[0191], [0256]-[0273], [0311]; Claims 60, 73, 74	-continued from previous page- ...36/33/1, 36/33/15, 37/36/33/1, 37/36/33/15, 38/36/33/1, 38/36/33/15, 39/38/36/33/1, 39/38/36/33/15, 40/39/38/36/33/1, 40/39/38/36/33/15, 60/59/1, 60/59/15, 64/62/1, 64/62/15, 58
X — Y	US 2004/0208921 A1 (HO, RUY et al.) October 21, 2004; abstract; paragraphs [0008]-[0011], [0025]-[0042], [0087]; Claims 1, 5, 7-16, 31, 32, 39	25, 27-30, 33/25, 41/25, 42/41/25, 44/41/25, 46/41/25, 48/41/25, 49/25, 50/49/25, 51/49/25, 52/49/25, 53/52/49/25, 55/25, 56/25, 57/25, 59/25, 65/25, 66/65/25, 68/65/25 17, 18, 26, 31, 32, 34/33/25, 35/33/25, 36/33/25, 37/36/33/25, 38/36/33/25, 39/38/36/33/25, 40/39/38/36/33/25, 43/41/25, 45/41/25, 47/41/25, 54/52/49/25, 60/59/25, 61/59/25, 62/25, 63/62/25, 64/62/25, 67/65/25
Y	WO 2009/120247 A2 (LEE, RJ et al.) October 1, 2009; paragraphs [000116]-[000118], [000127], [000128], [000155]-[000164], [000178], [000198]-[000207], [000216], [000230]-[0234], [000319], [000329], [000367], [000417], [000449], [000477]; Claims 29, 30	10, 34/33/1, 34/33/15, 34/33/25, 35/33/25, 38/36/33/25, 39/38/36/33/25, 40/39/38/36/33/1, 40/39/38/36/33/15, 40/39/38/36/33/25, 54/52/49/25, 60/59/1, 60/59/15, 60/59/25, 61/59/25, 62/25, 63/62/25, 64/62/1, 64/62/15, 64/62/25
Y	US 2010/0216908 A1 (GAO, F et al.) August 26, 2010; paragraph [0127]	14, 36/33/1, 36/33/15, 36/33/25, 37/36/33/1, 37/36/33/15, 37/36/33/25, 38/36/33/1, 38/36/33/15, 38/36/33/25, 39/38/36/33/1, 39/38/36/33/15, 39/38/36/33/25, 40/39/38/36/33/1, 40/39/38/36/33/15, 40/39/38/36/33/25
Y	WO 2011/133504 A2 (CAO, YC et al.) October 27, 2011; page 2, fifth paragraph; page 5, fifth paragraph; page 11, first paragraph; page 15, second paragraph; Claims 1, 4	16, 21, 22, 26, 31, 58
Y	WO 2011/133668 A2 (MANOHARAN, M et al.) October 27, 2011; page 121, second paragraph to page 123, thirteenth paragraph; page 142, fourth paragraph; page 164, second paragraph to page 174, sixth paragraph	19, 20, 43/41/25, 45/41/25, 47/41/25, 67/65/25
Y	ALLAHVERDIYEV, A et al. Coping With Antibiotic Resistance: Combining Nanoparticles With Antibiotics And Other Antimicrobial Agents. Expert Rev. Anti Infect. Ther. November 2011, Vol. 9, No. 11, pp 1035-1052; page 1041, first column, second paragraph; page 1048, Table 2; DOI: 10.1586/eri.11.121. -***-Continued on Next Supplemental Page-***-	18, 32 -***-Continued on Next Page-***-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US13/42458

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,Y	US 2012/0295832 A1 (CONSTIEN, R et al.) November 22, 2012; entire document	1-68
P, Y	US 2012/0183589 A1 (RODRIGUEZ-GASCON, A et al.) July 19, 2012; entire document	1-68
P, Y	ZHANG, M et al. Lactosylated Gramicidin-Based Lipid Nanoparticles (Lac-GLN) For Targeted Delivery Of Anti-miR-155 to Hepatocellular Carcinoma. J Control Release. 06 April 2013, Vol.188, No. 3, pp 251-261; entire document; DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.03.020.	1-68
A	FENSKE, D et al. Liposomal Nanomedicines: An Emerging Field. Toxicol Pathol. 01 January 2008, Vol. 36, No.1, pp. 21-29; entire document. DOI: 10.1177/0192623307310960.	1-68
A	US 6120798 A (ALLEN, TM et al.) September 19, 2000; entire document	1-68

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US13/42458

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

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.: 86-89
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:

-***Please See Supplemental Page-***

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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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.:

Group I: Claims 1-68

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the 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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US13/42458

---Continuation of Box No. III - Observations Where Unity Of Invention Is Lacking:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claims 1-68 are directed toward a lipid nanoparticle comprising a combination of tertiary and quaternary amine-based cationic lipids; a lipid nanoparticle having a diameter of less than 300 nm and comprising a peptide; a lipid nanoparticle comprising a DNase- or RNase-degrading agent; and a lipid nanoparticle having a diameter of less than 300 nm and comprising a combination of two or more of: a mixture of tertiary and quaternary amine-cationic head groups; an antibiotic; or a DNase or RNase-degrading agent.

Group II: Claims 69-79 and SEQ ID NO: 1 (anti-miR-221 nucleic acid sequence) are directed toward a lipid nanoparticle comprising, an anti-miR-221 and SPLN-G20, wherein SPLN-G20 comprises: DMHDA, DOTAP, GRAM, DOPE and TPGS at a molar ratio of 40:5:20:30:5; and a composition comprising anti-miR-221 combined with a lipid nanoparticle.

Group III: Claims 80-85 and SEQ ID NO: 6 (anti-miR-155 nucleic acid sequence) are directed toward a composition comprising anti-miR-155 combined with a lipid nanoparticle.

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Group I include a lipid nanoparticle comprising a combination of tertiary and quaternary amine-based cationic lipids; a lipid nanoparticle having a diameter of less than 300 nm and comprising a peptide; a lipid nanoparticle comprising a DNase- or RNase-degrading agent; and a lipid nanoparticle having a diameter of less than 300 nm and comprising a combination of two or more of: a mixture of tertiary and quaternary amine-cationic head groups; an antibiotic; or a DNase or RNase-degrading agent, which are not present in Group II, Group II having special technical features including a lipid nanoparticle comprising, an anti-miR-221 and SPLN-G20, wherein SPLN-G20 comprises: DMHDA, DOTAP, GRAM, DOPE and TPGS at a molar ratio of 40:5:20:30:5; and a composition comprising anti-miR-221 combined with a lipid nanoparticle, which are not present in Group III, Group III having special technical features including a composition comprising anti-miR-155 combined with a lipid nanoparticle.

Groups I-III share the technical features including lipid nanoparticles. Groups I-II share the technical features including a combination of tertiary and quaternary amine-based cationic lipids. Groups II-III share the technical features of an anti-miRNA.

However, these shared technical features are previously disclosed by US 2011/0038941 A1 to Lee, et al. (hereinafter 'Lee') in view of US 2004/0208921 A1 to Ho, et al. (hereinafter 'Ho'). Lee discloses the use of lipid nanoparticles (lipid nanoparticles; abstract) comprising tertiary amine and quaternary amine-based cationic lipids (tertiary amine and quaternary-amine based cationic lipids; paragraph [0157]), having a diameter of less than 300 nm (250 diameter (having a diameter of less than 300 nm); paragraph [0182]) and comprising a peptide (antibody (a peptide); paragraph [0163]), and an inhibitory nucleic acid, including miRNAs or antisense deoxyribonucleotides (antisense deoxyribonucleotides, small interfering RNAs, microRNAs (inhibitory nucleic acids); paragraph [0155]). Lee does not disclose a combination of tertiary and quaternary amine-based cationic lipids, a DNase- or RNase-degrading agent, and an anti-miRNA. Ho discloses the use of lipid (liposome; paragraph [0026]) nanoparticles (50-80 nm diameter; paragraph [0042]) comprising a DNase- or RNase-degrading agent (protease; paragraph [0028]). It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have modified the previous disclosure of Lee, in order to have included the use of a nuclease-degrading agent, such as a protease, for providing a means of preventing the degradation of the nucleic acids present in the lipid nanoparticles previously disclosed by Lee. Furthermore, although Lee does not disclose the use of a combination of tertiary and quaternary amine-based cationic lipids, Lee does disclose both the use of tertiary and quaternary amine-based cationic lipids (paragraph [0157]). As such, it would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have modified the previous disclosure of Lee, without undue experimentation or testing, in order to have implemented the use of tertiary and quaternary-amine based cationic lipids in a lipid nanoparticle, for enabling the modulation of the stability and pH of the particles. Moreover, although Lee does not disclose the use of an anti-miRNA, Lee does disclose the use of both antisense oligonucleotides and miRNAs (paragraph [0155]) and, as such, it would have been obvious to a person of ordinary skill in the art to have modified the previous disclosure of Lee, in order to have provided for the use of antisense miRNAs, or anti-miRNAs, to modulate the expression or activity of miRNAs in a subject or cell, for effectively altering the cellular expression pathways controlled by the miRNA.

Since none of the special technical features of the Groups I-III inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by a combination of the Lee and Ho references, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	9/16	(2006.01)	A 6 1 K	9/16		
A 6 1 K	9/20	(2006.01)	A 6 1 K	9/20		
A 6 1 K	9/08	(2006.01)	A 6 1 K	9/08		
A 6 1 K	9/10	(2006.01)	A 6 1 K	9/10		
A 6 1 K	9/14	(2006.01)	A 6 1 K	9/14		
A 6 1 K	9/02	(2006.01)	A 6 1 K	9/02		
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00		
A 6 1 K	31/7088	(2006.01)	A 6 1 K	31/7088		
A 6 1 K	31/7105	(2006.01)	A 6 1 K	31/7105		
A 6 1 K	31/711	(2006.01)	A 6 1 K	31/711		
A 6 1 K	31/713	(2006.01)	A 6 1 K	31/713		
A 6 1 K	9/127	(2006.01)	A 6 1 K	9/127		
A 6 1 K	47/34	(2006.01)	A 6 1 K	47/34		
B 8 2 Y	5/00	(2011.01)	B 8 2 Y	5/00		
C 1 2 N	15/113	(2010.01)	C 1 2 N	15/00		G
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00		A

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H U, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(74) 代理人 100198018

弁理士 石川 絵理

(72) 発明者 リー , ロバート・ジェイ

アメリカ合衆国オハイオ州 4 3 2 2 8 , コロンバス , グリーン・アイランド・ドライブ 2 3 0 0

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA01 CA09 CA11 DA03 EA04 GA13 HA17
 4C076 AA01 AA11 AA19 AA22 AA30 AA31 AA36 BB01 BB13 BB16
 BB21 BB31 CC27 CC32 DD49Q EE23 FF36 FF63 FF68 GG06
 4C084 AA17 AA27 MA05 MA17 MA23 MA31 MA35 MA41 MA44 MA52
 MA56 MA63 MA66 NA03 NA13 ZB261 ZB321
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA03 MA05 MA17 MA23 MA31 MA35 MA41
 MA44 MA52 MA56 MA63 MA66 NA03 NA13 ZB26 ZB32