

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7660568号
(P7660568)

(45)発行日 令和7年4月11日(2025.4.11)

(24)登録日 令和7年4月3日(2025.4.3)

(51)国際特許分類	F I	
A 6 1 K 31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088
A 6 1 K 9/14 (2006.01)	A 6 1 K	9/14
A 6 1 K 38/02 (2006.01)	A 6 1 K	38/02
A 6 1 K 38/17 (2006.01)	A 6 1 K	38/17
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/00
		G
請求項の数 9 (全20頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2022-526180(P2022-526180)	(73)特許権者	521274533
(86)(22)出願日	令和2年11月5日(2020.11.5)		サムヤン ホールディングス コーポレイ ション
(65)公表番号	特表2023-500921(P2023-500921 A)		SAMYANG HOLDINGS CO RPORATION
(43)公表日	令和5年1月11日(2023.1.11)		大韓民国, ソウル, チョンノ - グ, チョ ン - ロ 33ギル 31
(86)国際出願番号	PCT/KR2020/015435		31, Jong - ro 33 - gil, Jongno - gu, Seoul, Re public of Korea
(87)国際公開番号	WO2021/091272	(74)代理人	110002837
(87)国際公開日	令和3年5月14日(2021.5.14)		弁理士法人アスフィ国際特許事務所
審査請求日	令和5年9月7日(2023.9.7)	(72)発明者	イ, ソジン
(31)優先権主張番号	10-2019-0141745		大韓民国 02468 ソウル, トンデム ン - グ, フェギ - ロ, 36 - 10
(32)優先日	令和1年11月7日(2019.11.7)		最終頁に続く
(33)優先権主張国・地域又は機関	韓国(KR)		

(54)【発明の名称】 免疫誘導用ポリマーナノ粒子組成物及びその製造方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

免疫誘導用組成物であって、
有効成分としての核酸、ポリペプチド又はそれらの組み合わせ、
カチオン性化合物としての1, 6 - ジオレオイルトリエチレンテトラミド、
両親媒性ブロック共重合体としての、親水性Aブロックのモノメトキシポリエチレング
リコールと疎水性Bブロックのポリ乳酸で構成されるA - B型ブロック共重合体、及び
ポリ乳酸塩としてのポリ乳酸ナトリウム塩(PLANA)
を含み、
カチオン性化合物の含量は、有効成分1重量部に対して、3 ~ 8重量部であり、
両親媒性ブロック共重合体の含量は、有効成分1重量部に対して、15 ~ 30重量部であ
り、
ポリ乳酸塩の含量は、有効成分1重量部に対して、5 ~ 30重量部であり、
有効成分が、両親媒性ブロック共重合体及びポリ乳酸塩によって形成されるナノ粒子構
造内部に封入されており、
免疫誘導用組成物は、有効成分を効率的に脾臓に送達するためのものであり、かつ、有効
成分によって免疫を誘導して癌を治療又は予防するためのものであることを特徴とする免
疫誘導用組成物。

【請求項2】

核酸が腫瘍抗原を発現する請求項1に記載の免疫誘導用組成物。

【請求項 3】

ポリペプチドが、腫瘍抗原として認識され得る請求項 1 に記載の免疫誘導用組成物。

【請求項 4】

ナノ粒子の表面電荷が、 $-40 \sim 40$ mV である請求項 1 に記載の免疫誘導用組成物。

【請求項 5】

疎水性 B ブロックが、その末端のヒドロキシ基にトコフェロール、コレステロール、又は炭素数 10 ~ 24 を有する脂肪酸を化学的に結合させることによって修飾されている請求項 1 に記載の免疫誘導用組成物。

【請求項 6】

親水性 A ブロックの数平均分子量が、 $200 \sim 50,000$ ダルトンであり、疎水性 B ブロックの数平均分子量が、 $50 \sim 50,000$ ダルトンである請求項 1 に記載の免疫誘導用組成物。

10

【請求項 7】

腫瘍抗原に関連する癌を治療又は予防のためのものである請求項 2 又は 3 に記載の免疫誘導用組成物。

【請求項 8】

腫瘍抗原に関連する癌に対するワクチンとして使用するためのものである請求項 2 又は 3 に記載の免疫誘導用組成物。

【請求項 9】

免疫誘導用組成物の製造方法であって、

20

(a) 有効成分としての核酸、ポリペプチド又はそれらの組み合わせ、カチオン性化合物としての 1, 6 - ジオレオイルトリエチレントラミド、両親媒性ブロック共重合体としての、親水性 A ブロックのモノメトキシポリエチレングリコールと疎水性 B ブロックのポリ乳酸で構成される A - B 型ブロック共重合体及びポリ乳酸塩としてのポリ乳酸ナトリウム塩 (PLANA) を、水溶液、水混和性有機溶媒又はそれらの組み合わせである溶媒と混合する工程、及び

(b) 前記工程 (a) の混合物に水性溶媒を加えて混合する工程を含み、

カチオン性化合物の混合量は、有効成分 1 重量部に対して、 $3 \sim 8$ 重量部であり、

両親媒性ブロック共重合体の混合量は、有効成分 1 重量部に対して、 $15 \sim 30$ 重量部であり、

30

ポリ乳酸塩の混合量は、有効成分 1 重量部に対して、 $5 \sim 30$ 重量部であり、

有効成分が、両親媒性ブロック共重合体及びポリ乳酸塩によって形成されるナノ粒子構造内部に封入されており、

免疫誘導用組成物は、有効成分を効率的に脾臓に送達するためのものであり、かつ、有効成分によって免疫を誘導して癌を治療又は予防するためのものであることを特徴とする免疫誘導用組成物の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

40

本発明は、免疫を誘導することができるポリマーナノ粒子組成物及びその製造方法に関する。より具体的には、抗原に対する T 細胞免疫を効果的に誘導する治療又は予防用ワクチン組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

安全で効率的な薬物送達技術が、核酸を含むアニオン性薬物を用いた治療のために長い間研究されており、様々な送達方法及び送達技術が開発されてきた。送達方法は、アデノウイルス又はレトロウイルスなどを使用するウイルス性送達方法、カチオン性脂質及びカチオン性ポリマーなどを使用する非ウイルス性送達方法に大きく分けられる。ウイルス性送達方法を使用した技術は、非特異的免疫反応などのリスクに曝され、生産工程が複雑で

50

あるため、商業化に多くの問題があることが知られている。したがって、最近の研究は、これらの問題を克服するため、非ウイルス性送達方法に対して進められている。非ウイルス性送達方法は、ウイルス性送達方法と比較して、インビボでの安全性の点で副作用が少なく、経済性の点で生産価格が低いという利点を有する。

【0003】

一方、抗癌治療剤として抗原特異的T細胞反応を誘導する癌抗原ワクチンが活発に開発されている（非特許文献1）。効果的な抗癌免疫反応を誘導するためには、癌抗原を抗原提示細胞に送達し、腫瘍特異的抗原由来エピトープの提示率を増加させることによって、細胞毒性T細胞を効果的に刺激する必要がある。効率的な抗原送達のために、腫瘍細胞自体を抗原として使用するか、ペプチド、核酸、ウイルス、又は樹状細胞などを抗原として使用して、抗原特異的免疫反応を誘導する方法が使用されている（非特許文献2）。特に、核酸のmRNAは、非感染性で非挿入性プラットフォームであり、変異遺伝子のようなリスクが比較的少なく、インビトロ転写反応により大量に迅速かつ経済的に製造できるという利点がある。したがって、mRNAは、感染性疾患とともに様々な種類の癌に対して個別化された抗癌ワクチンのプラットフォームとして注目されている（非特許文献3）。

10

【0004】

特許文献1は、有効成分としてのアニオン性薬物、カチオン性化合物、両親媒性ブロック共重合体、及びポリ乳酸塩を含み、アニオン性薬物は、カチオン性化合物と静電相互作用により複合体を形成し、その複合体が両親媒性ブロック共重合体及びポリ乳酸塩により形成されたナノ粒子構造内部に封入されることを特徴とするアニオン性薬物送達用組成物及びその製造方法を開示する。しかし、送達方法としてアニオン性薬物の使用のみが明細書に開示されており、対象の免疫に対する効果は開示されていない。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【文献】韓国公開特許第10-2017-0032858号

【非特許文献】

【0006】

【文献】npj Vaccines vol. 4, Article number: 7 (2019)

30

【文献】Advances in Cancer Research Vol. 119, 2013, 421-475

【文献】Nat Rev Drug Discov. 2018 Apr; 17(4): 261-279

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、核酸、ポリペプチド又はそれらの組み合わせなどの有効成分から個体の免疫を誘発することができ、有効成分が抗原として認識しにくい場合でも効果的に免疫を誘発することができる免疫誘導用組成物及びその製造方法を提供することを目的とする。

40

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明の一態様は、有効成分としての核酸、ポリペプチド又はそれらの組み合わせ、カチオン性化合物、両親媒性ブロック共重合体、及びポリ乳酸塩を含み、有効成分は、両親媒性ブロック共重合体及びポリ乳酸塩によって形成されたナノ粒子構造内部に封入されていることを特徴とする免疫誘導用組成物を提供する。

【0009】

本発明の別の態様は、(a)有効成分としての核酸、ポリペプチド又はそれらの組み合わせを含む水溶液とカチオン性化合物が水混和性有機溶媒に溶解されている溶液とを混合する工程、(b)前記工程(a)の混合物に、両親媒性ブロック共重合体及びポリ乳酸塩

50

の水溶液を混合する工程、(c)前記工程(b)の混合物に水性溶媒を加えて混合する工程、及び(d)前記工程(c)の混合物から溶媒を除去する工程を含むことを特徴とする免疫誘導用組成物の製造方法を提供する。

【発明の効果】

【0010】

本発明の免疫誘導用組成物は、核酸、ポリペプチド又はそれらの組み合わせなどの有効成分から個体の免疫を誘発することができ、有効成分が抗原として認識しにくい場合でも効果的に免疫を誘発することができるという利点を有する。これを使用して、免疫誘導用組成物は、自己癌ワクチンとして使用することができ、最終的には、癌を予防又は治療するために使用することができる。

10

【0011】

一実施形態において、本発明の免疫誘導用組成物は、有効成分を脾臓に効果的に送達することによって、免疫を誘導することができる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】図1は、本発明の一実施形態に係る免疫誘導用組成物の概略構造を示す図である。

【図2】図2は、実施例2の動物実験方法の概略図である。

【図3】図3は、本発明の一実施形態に係る免疫誘導用組成物を用いた脾細胞のIFN- γ 発現量を示す画像である。

【図4】図4は、本発明の一実施形態に係る免疫誘導用組成物を用いた脾細胞のIFN- γ 発現量を示すELISPOTグラフである。

20

【図5】図5は、本発明の一実施形態に係る免疫誘導用組成物の器官特異的発現を示す画像である。

【図6】図6は、本発明の一実施形態に係る免疫誘導用組成物を用いた癌治療効果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0013】

以下、本発明について詳細に説明する。

本発明の組成物の構成成分の中で、有効成分である核酸、ポリペプチド又はそれらの組み合わせは、免疫反応を誘導することができる抗原に関連し得る。例えば、核酸は、抗原を発現することができ、別の例において、前記ポリペプチドは、抗原として認識され得る。

30

【0014】

有効成分は、カチオン性化合物との静電相互作用によって複合体を形成してもよく、複合体は、両親媒性ブロック共重合体とポリ乳酸塩によって形成されたナノ粒子構造に封入され得る。その例示的な構造を図1に概略的に示す。

【0015】

ナノ粒子に関して、水性環境において、両親媒性ブロック共重合体の親水性の部分はナノ粒子の外壁を形成し、両親媒性ブロック共重合体の疎水性の部分及び両親媒性ブロック共重合体の別の成分として含まれるポリ乳酸塩はナノ粒子の内壁を形成し、形成されたナノ粒子の内部に、有効成分とカチオン性化合物の複合体が封入され得る。このようなナノ粒子構造は、血液中又は体液中の有効成分の安定性を向上させる。

40

【0016】

前記「核酸」は、例えば、DNA、RNA、siRNA、shRNA、miRNA、mRNA、アプタマー、アンチセンスオリゴヌクレオチド、又はそれらの組み合わせであってもよいが、これらに限定されない。核酸は、体内の一連のプロセスを通じて抗原を発現し、抗原をコードしていてもよい。例えば、前記核酸は、抗原の塩基配列を含むか、又はそのようなポリペプチド配列をコードするDNA、RNA、又はmRNAであってもよい。

【0017】

前記「ポリペプチド」は、抗原として認識できるものであってもよい。ポリペプチドは、体内の一連のプロセスを通じて抗原として認識され得るタンパク質、例えば抗原、その

50

類似体又は前駆体のポリペプチド配列を意味する。

【0018】

一実施形態による免疫誘導用組成物は、抗原を体内に効果的に送達し、抗原に関連する疾患を治療又は予防する効果を有する。例えば、疾患が腫瘍である場合、核酸は腫瘍抗原を発現するものであるか、又はポリペプチドが腫瘍抗原であってもよい。腫瘍抗原の例には、Trp2（チロシナーゼ関連タンパク質2）、gp100（糖タンパク質100）、チロシナーゼ、PSA（前立腺特異抗原）、WT1（ウィルムス腫瘍1）、MAGE-1（メラノーマ関連抗原1）、NY-ESO-1（精巣癌抗原）、MUC-1（ムチン1）などが含まれるが、これらに限定されない。

【0019】

本発明の免疫誘導用組成物は、一般的な投与方法又は担体を使用しても、免疫誘導を誘導することが困難な抗原を成功裏に発生させることにより、効率的かつ優れたワクチン効果を奏し、その結果、免疫誘導による疾患治療効果を奏することができる。

【0020】

別の実施形態において、ポリペプチドは、ウイルス外皮、糖タンパク質、細菌、癌細胞又はそれらの断片であってもよい。この場合、本発明の免疫誘導用組成物は、ウイルス、細菌、又は癌細胞による疾患を治療又は予防するためのものであってもよい。

【0021】

疾患は、癌、ウイルス感染、細胞性感染、アレルギーなどを含むが、これらに限定されない。免疫誘導用組成物は、疾患の予防のためのワクチンとして使用することができる。

【0022】

有効成分としての核酸又はポリペプチドは、血液中安定性を増加させるか、又は免疫誘導効果を増強させるために、化学的に改変されたアミノ酸、糖又は塩基の主鎖、又は修飾された末端を有する。

【0023】

一実施形態では、ナノ粒子の粒径は、Z平均値として定義することができ、例えば、800nm以下、600nm以下、500nm以下、400nm以下、300nm以下、200nm以下又は150nm以下であってもよく、また、10nm以上であってもよい。一実施形態において、Z平均値として定義される前記ナノ粒子の粒径は、例えば、10~800nm、10~600nm、10~500nm、10~400nm、10~300nm、10~200nm又は10~150nmであってもよい。

【0024】

前記「Z平均」は、動的光散乱(DSL)を利用して測定された粒子分布の流体学的直径の平均を意味する。ナノ粒子は、単分散粒子分布を有し、多分散度指数は、例えば、0.01~0.30、0.05~0.25、又は0.1~0.2であってもよい。

【0025】

また、一実施形態において、前記ナノ粒子の表面電荷は、例えば、-40mV以上、-30mV以上、-20mV以上又は-10mV以上であってもよく、また、40mV以下、30mV以下、20mV以下又は10mV以下であってもよい。一実施形態において、前記ナノ粒子の表面電荷は、例えば、-40~40mV、-30~30mV、-20~20mV又は-10~10mVであってもよい。前記表面電荷は、生物学的環境に近い環境、例えば、10mM HEPESバッファー(pH7.2)で測定することができる。

【0026】

ナノ粒子の粒径及び表面電荷が前記水準に維持されることは、ナノ粒子構造の安定性、構成成分の含量、体内での吸収度及び医薬組成物としての滅菌の容易さの観点から好ましい。例えば、前記有効成分が核酸である場合、前記核酸の一つ以上の末端は、コレステロール、トコフェロール及び炭素数10~24を有する脂肪酸からなる群から選ばれる一つ以上で修飾することができる。前記コレステロール、トコフェロール及び炭素数10~24を有する脂肪酸には、コレステロール、トコフェロール及び脂肪酸の類似体、誘導体及び代謝物が含まれる。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 7 】

前記有効成分の含量は、全成物重量に対して、例えば、30重量%以下、25重量%以下、20重量%以下、15重量%以下、10重量%以下、又は5重量%以下であってもよく、また、0.05重量%以上、0.1重量%以上、0.25重量%以上、0.5重量%以上又は1重量%以上であってもよい。一実施形態において、前記有効成分の含量は、全成物重量に対して、例えば、0.05～30重量%、0.1～25重量%、0.25～20重量%、0.5～15重量%、1～10重量%、又は1～5重量%であってもよい。有効成分の含量が全組成物の重量に対して前記範囲より少ないと、薬物と比較して使用される送達物の量が多すぎるため、送達物による副作用が生じる可能性がある。前記範囲を超えると、ナノ粒子径が大きくなりすぎてナノ粒子の安定性が低下し、フィルター滅菌時に損失率が高くなる恐れがある。

10

【 0 0 2 8 】

特定の実施形態において、前記カチオン性化合物は、カチオン性脂質又はカチオン性ポリマー、より具体的にはカチオン性脂質であってもよい。

【 0 0 2 9 】

一実施形態において、前記カチオン性脂質は、N, N - ジオレイル - N, N - ジメチルアンモニウムクロリド (DODAC)、N, N - ジステアリル - N, N - ジメチルアンモニウムブロミド (DDAB)、N - (1 - (2, 3 - ジオレオイルオキシ) プロピル - N, N - トリメチルアンモニウムクロリド (DOTAP)、N, N - ジメチル - (2, 3 - ジオレオイルオキシ) プロピルアミン (DODMA)、N, N, N - トリメチル - (2, 3 - ジオレオイルオキシ) プロピルアミン (DOTMA)、1, 2 - ジアシル - 3 - トリメチルアンモニウム - プロパン (TAP)、1, 2 - ジアシル - 3 - ジメチルアンモニウム - プロパン (DAP)、3 - [N - (N', N', N' - トリメチルアミノエタン) カルバモイル] コレステロール (TC - コレステロール)、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 (DC - コレステロール)、3 - [N - (N' - モノメチルアミノエタン) カルバモイル] コレステロール (MC - コレステロール)、3 - [N - (アミノエタン) カルバモイル] コレステロール (AC - コレステロール)、コレステリルオキシプロパン - 1 - アミン (COPA)、N - (N' - アミノエタン) カルバモイルプロパン酸トコフェロール (AC - トコフェロール) 及び N - (N' - メチルアミノエタン) カルバモイルプロパン酸トコフェロール (MC - トコフェロール) からなる群から選ばれる一つ又は二以上の組み合わせであってもよい。

20

30

【 0 0 3 0 】

このようなカチオン性脂質を使用する場合、カチオン性脂質による毒性を低減するために、電荷密度が高いポリカチオン性脂質を少なくすることが好ましい場合があり、より具体的には、水溶液中で分子当たりの正電荷を示すことができる1つの官能基を有するカチオン性脂質を使用することが好ましい。

【 0 0 3 1 】

従って、好ましい一実施形態において、前記カチオン性脂質は、3 - [N - (N', N', N' - トリメチルアミノエタン) カルバモイル] コレステロール (TC - コレステロール)、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 (DC - コレステロール)、3 - [N - (N' - モノメチルアミノエタン) カルバモイル] コレステロール (MC - コレステロール)、3 - [N - (アミノエタン) カルバモイル] コレステロール (AC - コレステロール)、N - (1 - (2, 3 - ジオレオイルオキシ) プロピル - N, N, N - トリメチルアンモニウムクロリド (DOTAP)、N, N - ジメチル - (2, 3 - ジオレオイルオキシ) プロピルアミン (DODMA)、及び N, N, N - トリメチル - (2, 3 - ジオレオイルオキシ) プロピルアミン (DOTMA) からなる群から選ばれる少なくとも1つであってもよい。

40

【 0 0 3 2 】

一方、一実施形態では、前記カチオン性ポリマーは、キトサン、グリコールキトサン、プロタミン、ポリリシン、ポリアルギニン、ポリアミドアミン (PAMAM)、ポリエチ

50

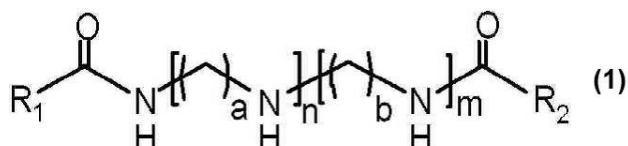
レンイミン、デキストラン、ヒアルロン酸、アルブミン、ポリマーポリエチレンイミン（PEI）、ポリアミン及びポリビニルアミン（PVAm）からなる群から選ばれる少なくとも1つであってもよく、より具体的には、ポリエチレンイミン（PEI）、ポリアミン及びポリビニルアミン（PVAm）からなる群から選ばれる少なくとも1つであってもよい。

【0033】

一実施形態に、前記カチオン性脂質は、下記式（1）で示されるカチオン性脂質であってもよい。

【0034】

【化1】



【0035】

（式中、 n 及び m は、それぞれ、 $2 \leq n + m \leq 12$ の条件下で、 $0 \sim 12$ であり、

a 及び b は、それぞれ、 $1 \sim 6$ であり、

R_1 及び R_2 は、それぞれ独立に、炭素数 $11 \sim 25$ を有する飽和及び不飽和炭化水素基よりなる群から選ばれる。）

【0036】

より具体的に、前記式（1）において、 n 及び m は、それぞれ独立して、 $1 \sim 9$ であり、 $2 \leq n + m \leq 10$ であってもよい。

【0037】

より具体的に、前記式（1）において、 a 及び b は、それぞれ独立して、 $2 \sim 4$ であってもよい。

【0038】

より具体的に、前記式（1）において、 R_1 及び R_2 は、それぞれ独立して、ラウリル、ミリスチル、パルミチル、ステアリル、アラキジル、ベヘニル、リグノセリル、セロチル、ミリストレイル、パルミトレイル、サピエニル、オレイル、リノレイル、アラキドニル、エイコサペンタエニル、エルシル、ドコサヘキサエニル、及びセロチルからなる群から選ばれてもよい。

【0039】

一実施形態において、前記カチオン性脂質は、1,6-ジオレオイルトリエチレンテトラミド（N,N'-（（エタン-1,2-ジイルビス（アザンジイル））ビス（エタン-2,1-ジイル））ジオレアミド）、1,8-ジリノレオイルテトラエチレンペンタミド（（9Z,9'Z,12Z,12'Z）-N,N'-（（（アザンジイルビス（エタン-2,1-ジイル））ビス（アザンジイル））ビス（エタン-2,1-ジイル））ビス（オクタデカ-9,12-ジエナミド））、1,4-ジミリストレオイルジエチレントリアミド（（9Z,9'Z）-N,N'-（アザンジイルビス（エタン-2,1-ジイル））ビス（テトラデカ-9-エンアミド））、1,10-ジステアロイルペンタエチレンヘキサミド（N,N'-（3,6,9,12-テトラアザテトラデカン-1,14-ジイル）ジステアラミド）及び1,10-ジオレオイルペンタエチレンヘキサミド（N,N'-（3,6,9,12-テトラアザテトラデカン-1,14-ジイル）ジオレアミド）からなる群から選ばれる一つ以上であってもよい。

【0040】

本発明の免疫誘導用組成物中の前記カチオン性化合物の含量は、有効成分1重量部に対して、例えば、2.5重量部以下、2.0重量部以下、1.8重量部以下、1.5重量部以下、1.2重量部以下、1.0重量部以下、又は8重量部以下であってもよく、また、1重量部以上、1.5重量部以上、2重量部以上、2.5重量部以上、又は3重量部以上であってもよ

10

20

30

40

50

い。一実施形態において、組成物中の前記カチオン性化合物の含量は、有効成分 1 重量部に対して、1 ~ 2.5 重量部、1.5 ~ 10 重量部、2 ~ 1.5 重量部、2.5 ~ 10 重量部、又は 3 ~ 8 重量部であってもよい。組成物中の前記カチオン性化合物の含量が前記範囲より少ないと、有効成分との安定した複合体を形成することができない可能性がある。前記カチオン性化合物の含量が前記範囲を超えると、ナノ粒子径が大きくなりすぎて安定性が低下し、フィルター滅菌時の損失率が高くなる恐れがある。

【0041】

前記有効成分が核酸である場合、前記カチオン性化合物と核酸は静電相互作用により結合して複合体を形成する。一実施形態において、前記核酸 (P) とカチオン性化合物 (N) の電荷量の比 (N/P; 核酸のアニオン電荷に対するカチオン性化合物のカチオン電荷の比) は、0.5 以上、1 以上、2 以上、又は 3 以上であってもよく、また、100 以下、50 以下、20 以下、又は 10 以下であってもよく、例えば、0.5 ~ 100、1 ~ 50、2 ~ 20、2 ~ 1.5、又は 3 ~ 10 であってもよい。前記比 (N/P) が 0.5 未満のとき、十分な量の核酸を含む複合体を形成することが困難な場合があり、前記比 (N/P) が 100 を超えると、毒性を生じる恐れがある。さらに、N/P 値は、脾臓での有効成分の特異的発現に重要な役割を果たす可能性がある。

10

【0042】

一実施形態において、前記両親媒性ブロック共重合体は、親水性 A ブロック及び疎水性 B ブロックを含む A - B 型ブロック共重合体であってもよい。前記 A - B 型ブロック共重合体は、水溶液中で疎水性 B ブロックがコア (内壁) を形成し、親水性 A ブロックがシェル (外壁) を形成するコア - シェル型のポリマーナノ粒子を形成する。

20

【0043】

一実施形態において、前記親水性 A ブロックは、ポリアルキレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリルアミド及びその誘導体からなる群から選ばれる少なくとも 1 つであってもよい。

【0044】

より具体的には、前記親水性 A ブロックは、モノメトキシポリエチレングリコール、モノアセトキシポリエチレングリコール、ポリエチレングリコール、ポリエチレンとプロピレングリコールの共重合体及びポリビニルピロリドンからなる群から選ばれる少なくとも 1 つであってもよい。

30

【0045】

一実施形態において、前記親水性 A ブロックは、数平均分子量が 200 ~ 50,000 ダルトン、より具体的には、1,000 ~ 20,000 ダルトン、より具体的には 1,000 ~ 5,000 ダルトンを有してもよい。

【0046】

必要に応じて、前記親水性 A ブロックの末端に、特定の組織又は細胞に到達できる官能基、リガンド、或いは細胞内送達を促進することができる官能基を化学的に結合させて、両親媒性ブロック共重合体とポリ乳酸塩で形成されたポリマーナノ粒子送達体の体内分布を調節するか、前記ナノ粒子送達体の細胞への送達効率を高めることができる。一実施形態において、前記官能基又はリガンドは、単糖、多糖、ビタミン、ペプチド、タンパク質及び細胞表面受容体に対する抗体からなる群から選ばれる少なくとも 1 つであってもよい。より具体的には、前記官能基又はリガンドは、アニサミド (anisamide)、ビタミン B9 (葉酸)、ビタミン B12、ビタミン A、ガラクトース、ラクトース、マンノース、ヒアルロン酸、RGD ペプチド、NGR ペプチド、トランスフェリン、トランスフェリン受容体に対する抗体などからなる群から選ばれる少なくとも 1 つであってもよい。

40

【0047】

前記疎水性 B ブロックは、生体適合性及び生分解性ポリマーであり、一実施形態では、ポリエステル、ポリ無水物、ポリアミノ酸、ポリオルトエステル及びポリホスファジンからなる群から選ばれる少なくとも 1 つであってもよい。

【0048】

50

より具体的には、前記疎水性Bブロックは、ポリ乳酸、ポリグリコリド、ポリカプロラクトン、ポリジオキサン-2-オン、ポリ乳酸とグリコリドの共重合体、ポリ乳酸とポリジオキサン-2-オンの共重合体、ポリ乳酸とポリカプロラクトンの共重合体及びポリグリコリドとポリカプロラクトンの共重合体からなる群から選ばれる少なくとも1つであってもよい。

【0049】

一実施形態において、前記疎水性Bブロックは、数平均分子量50~50,000ダルトン、より具体的には、200~20,000ダルトン、さらに具体的には1,000~5,000ダルトンを有してもよい。

【0050】

また、一実施形態において、疎水性Bブロックの疎水性を高めてナノ粒子の安定性を向上させるために、前記疎水性Bブロックは、疎水性Bブロック末端のヒドロキシ基に、トコフェロール、コレステロール、又は炭素数10~24を有する脂肪酸を化学的に結合させることによって修飾することができる。

【0051】

一実施形態において、組成物中の前記親水性ブロック(A)と疎水性ブロック(B)を含む両親媒性ブロック共重合体の含量は、有効成分1重量部に対して、例えば、150重量部以下、100重量部以下、70重量部以下、50重量部以下、又は30重量部以下であってもよく、また、1重量部以上、10重量部以上又は15重量部以上であってもよい。例えば、組成物中の前記両親媒性ブロック共重合体の含量は、有効成分1重量部に対して、1~150重量部、10~100重量部、10~70重量部、15~50重量部、又は15~30重量部であってもよい。組成物中の前記両親媒性ブロック共重合体の含量が前記範囲より少ないと、ナノ粒子径が大きくなりすぎてナノ粒子の安定性が低下し、フィルター滅菌時の損失率が増加する恐れがある。前記両親媒性ブロック共重合体の含量が前記範囲を超えると、取り込まれる有効成分の含量が少なくなりすぎる。

【0052】

一実施形態では、前記両親媒性ブロック共重合体における親水性ブロック(A)と疎水性ブロック(B)の割合について、親水性ブロック(A)の割合が共重合体総重量に対して、40~70重量%であってもよく、より具体的には50~60重量%であってもよい。親水性ブロック(A)の割合が共重合体の総重量に対して40重量%未満のとき、ポリマーの水への溶解度が低く、ナノ粒子の形成が困難になる場合がある。従って、共重合体がナノ粒子を形成するのに十分な水溶性を与えるために、親水性ブロック(A)の割合は、好ましくは40重量%以上である。一方、親水性ブロック(A)の割合が共重合体の総重量に対して70重量%を超えると、親水性が高すぎてポリマーナノ粒子の安定性が低下し、有効成分/カチオン性化合物複合体の可溶化組成物として使用されにくい場合がある。したがって、ナノ粒子安定性を考慮して、親水性ブロック(A)の割合は、好ましくは70重量%以下である。

【0053】

一実施形態において、前記両親媒性ブロック共重合体は、水溶液中の有効成分とカチオン性化合物の複合体をナノ粒子構造内部への封入を可能にするが、両親媒性ブロック共重合体の重量(b)に対する有効成分及びカチオン性化合物複合体の重量(a)の比 $[a/b \times 100; (有効成分重量 + カチオン性化合物重量) / 両親媒性ブロック共重合体重量 \times 100]$ は、90%以下、80%以下、60%以下、50%以下又は45%以下であってもよく、1%以上、2%以上、5%以上、10%以上、15%以上、20%以上、21%以上、又は25%以上であってもよく、例えば、1~90%、2~50%、10~50%、15~50%、又は21%~45%であってもよい。前記重量比(a/b x 100)が、1%未満のとき、有効成分及びカチオン性化合物の複合体の含量が少なくなりすぎて、有効成分が効果的に作用できる有効含量を満たすことが困難になる場合がある。前記重量比(a/b x 100)が、90%を超えると、両親媒性ブロック共重合体の分子量や有効成分及びカチオン性化合物の複合体の量のため、適切な大きさのナノ粒子構造が形成

10

20

30

40

50

されない場合がある。

【0054】

本発明の組成物中の前記ナノ粒子構造は、ポリ乳酸塩（例えば、ポリ乳酸ナトリウム塩（PLANA））を含む。前記ポリ乳酸塩は、コアの疎水性を高めてナノ粒子を安定させるために、ナノ粒子のコア（内壁）に分布すると同時に、体内の細網内皮系（RES）を効果的に回避するのに役立つ。すなわち、ポリ乳酸塩中のカルボン酸のアニオンが、効果的にカチオン性複合体と結合して、ポリマーナノ粒子の表面電荷を減少させる。それにより、ポリマーナノ粒子の表面正電荷は、ポリ乳酸塩を含まないポリマーナノ粒子よりも少なくなるので、細網内皮系によって捕獲されずに、標的部位（例えば、癌細胞、炎症細胞など）に効率的に送達することができる。

10

【0055】

一実施形態において、前記両親媒性ブロック共重合体から独立した成分であるポリ乳酸塩は、ナノ粒子の内壁の成分であり、ポリ乳酸塩の数平均分子量が500~50,000ダルトン、より具体的には1,000~50,000ダルトンであってもよい。ポリ乳酸塩の数平均分子量が500ダルトン未満のとき、疎水性が低すぎるため、ポリ乳酸塩がナノ粒子のコア（内壁）に容易に存在しない可能性があり、ポリ乳酸塩の数平均分子量が50,000ダルトンを超えるとポリマーナノ粒子の粒子が大きすぎる可能性がある。

【0056】

一実施形態では、組成物中の前記ポリ乳酸塩の含量は、有効成分1重量部に対して、80重量部以下、60重量部以下、50重量部以下、40重量部以下、又は30重量部以下であってもよく、また、1重量部以上、5重量部以上、10重量部以上、15重量部以上、又は20重量部以上であってもよい。例えば、組成物中の前記ポリ乳酸塩の含量は、有効成分1重量部に対して、1~80重量部、1~50重量部、1~40重量部、5~30重量部、又は20~60重量部であってもよい。組成物中の前記ポリ乳酸塩の含量が前記範囲より少ない場合、有効成分の送達効率が低下する可能性がある。前記ポリ乳酸塩の含量が前記範囲を超えると、ナノ粒子が大きくなりすぎて、滅菌膜でのろ過が困難になったり、安定性が低下したりする場合がある。

20

【0057】

一実施形態において、前記ポリ乳酸塩（例えば、ポリ乳酸ナトリウム塩）の末端のうち、カルボン酸金属（例えば、カルボン酸ナトリウム）の反対側の末端は、ヒドロキシ、アセトキシ、ベンゾイルオキシ、デカノイルオキシ、パルミトイルオキシ及び炭素数1~2のアルコキシからなる群から選ばれるもので置換されていてもよい。

30

【0058】

一実施形態において、前記ポリ乳酸塩は下記式2~7の化合物からなる群から選ばれてもよい。

【0059】

【化2】



40

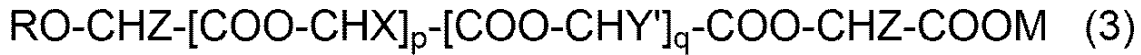
【0060】

（式中、Aは、-COO-CHZ-であり、
Bは、-COO-CHY-、-COO-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-又は-COO-CH₂CH₂OCH₂であり、
Rは、水素原子、アセチル基、ベンゾイル基、デカノイル基、パルミトイル基、メチル基、又はエチル基であり、
ZとYは、それぞれ、水素原子、メチル基又はフェニル基であり、
Mは、Na、K、又はLiであり、
nは、1~30の整数であり、
mは、0~20の整数である。）

50

【 0 0 6 1 】

【化 3】



【 0 0 6 2 】

(式中、X はメチル基であり、

Y ' は、水素原子又はフェニル基であり、

p は、0 ~ 25 の整数であり、

q は、0 ~ 25 の整数であり、但し、p + q は5 ~ 25 の整数であり、

R は、水素原子、アセチル基、ベンゾイル基、デカノイル基、パルミトイル基、メチル基又はエチル基であり、

M はNa、K、又はLiであり、

Z は、水素原子、メチル基又はフェニル基である。)

10

【 0 0 6 3 】

【化 4】

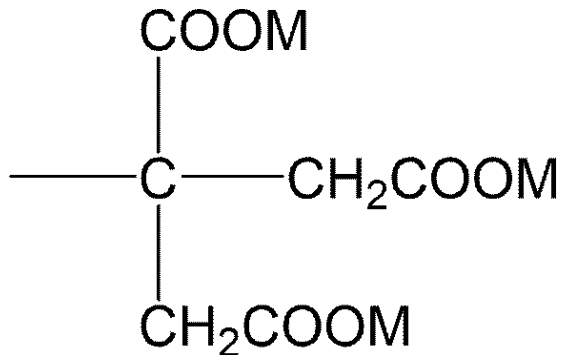


【 0 0 6 4 】

(式中、W - M' は、

20

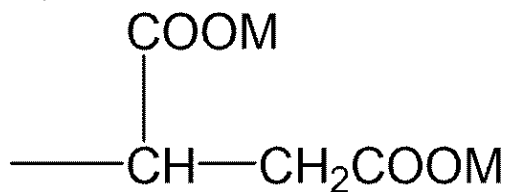
【化 5】



30

又は

【化 6】



であり、

40

PADは、D、L - ポリ乳酸、D - ポリ乳酸、ポリマンデル酸、D、L - 乳酸とグリコール酸の共重合体、D、L - 乳酸とマンデル酸の共重合体、D、L - 乳酸とカプロラク톤の共重合体及びD、L - 乳酸と1,4 - ジオキサン - 2 - オンの共重合体からなる群から選ばれ、

R は、水素原子、アセチル基、ベンゾイル基、デカノイル基、パルミトイル基、メチル基又はエチル基であり、

M は、独立して、Na、K、又はLiである。)

【 0 0 6 5 】

50

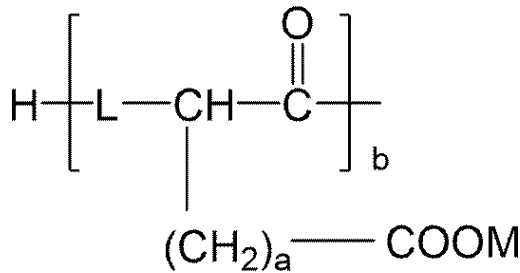
【化7】

S-O-PAD-COO-Q (5)

【0066】

[式中、Sは、

【化8】



10

【0067】

(Lは -NR₁- (R₁は、水素原子又はC₁₋₁₀アルキルである)又は -O- であり、aは、0~4の整数であり、bは、1~10の整数であり、Mは、Na、K、又はLiである) であり、

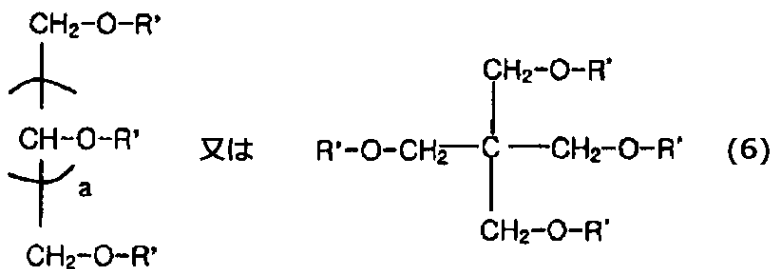
Qは、CH₃、CH₂CH₃、CH₂CH₂CH₃、CH₂CH₂CH₂CH₃、又はCH₂C₆H₅であり、

20

PADは、D、L-ポリ乳酸、D-ポリ乳酸、ポリマンデル酸、D、L-乳酸とグリコール酸の共重合体、D、L-乳酸とマンデル酸の共重合体、D、L-乳酸とカプロラクTONの共重合体、及びD、L-乳酸と1,4-ジオキサン-2-オンの共重合体からなる群から選ばれる少なくとも1つである。]

【0068】

【化9】



30

【0069】

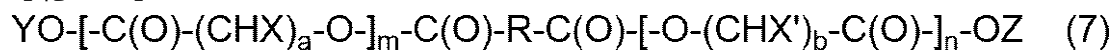
[式中、R'は、-PAD-O-C(O)-CH₂CH₂-C(O)-OM (PADは、D、L-ポリ乳酸、D-ポリ乳酸、ポリマンデル酸、D、L-乳酸とグリコール酸の共重合体、D、L-乳酸とマンデル酸の共重合体、D、L-乳酸とカプロラクTONの共重合体、D、L-乳酸と1,4-ジオキサン-2-オンの共重合体からなる群から選ばれるものであり、Mは、Na、K、又はLiである) であり、

40

aは、1~4の整数である。]

【0070】

【化10】



【0071】

(式中、X及びX'は、独立して、水素、炭素数1~10のアルキル又は炭素数6~20のアリールであり、

Y及びZは、独立して、Na、K、又はLiであり、

50

m及びnは、独立して、0～95の整数であり、但し、 $5 < m + n < 100$ であり、
a及びbは、独立して、1～6の整数であり、

Rは、 $-(CH_2)_k-$ (kは0～10の整数である)、炭素数2～10の2価アルケニル、炭素数6～20の2価アリール又はそれらの組み合わせである。))

【0072】

一実施形態において、前記ポリ乳酸塩は、前記式(2)又は式(3)の化合物であってもよい。

【0073】

一実施形態において、本発明の組成物は、mRNAの細胞への送達効率を高めるために、全組成物の総重量に対して、0.01～50重量%、より具体的には0.1～10重量%の融合性脂質をさらに含むことができる。

10

【0074】

前記融合性脂質は、mRNAとカチオン性脂質の複合体を混合すると、疎水性相互作用により結合して、mRNA、カチオン性脂質及び融合性脂質の複合体を形成する。前記融合性脂質を含む複合体は、両親媒性ブロック共重合体のナノ粒子構造の内部に封入される。

【0075】

一実施形態において、前記融合性脂質は、リン脂質、コレステロール、及びトコフェロールからなる群から選ばれる1つ又は2つ以上の組み合わせであってもよい。

【0076】

より具体的に、前記リン脂質は、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、ホスファチジルコリン(PC)及びホスファチジン酸からなる群から選ばれる少なくとも1つであってもよい。前記ホスファチジルエタノールアミン(PE)、ホスファチジルコリン(PC)及びホスファチジン酸は、1個又は2個のC₁₀₋₂₄脂肪酸と結合された形態であってもよい。前記コレステロール及びトコフェロールには、コレステロール及びトコフェロールの各類似体、誘導體、及び代謝体が含まれる。

20

【0077】

より具体的に、前記融合性脂質は、ジラウロイルホスファチジルエタノールアミン、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、ジリノレオイルホスファチジルエタノールアミン、1-パルミトイル-2-オレオイルホスファチジルエタノールアミン、1,2-ジフィタノイル-3-sn-ホスファチジルエタノールアミン、ジラウロイルホスファチジルコリン、ジミリストイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルコリン、ジリノレオイルホスファチジルコリン、1-パルミトイル-2-オレオイルホスファチジルコリン、1,2-ジフィタノイル-3-sn-ホスファチジルコリン、ジラウロイルホスファチジン酸、ジミリストイルホスファチジン酸、ジパルミトイルホスファチジン酸、ジステアロイルホスファチジン酸、ジオレオイルホスファチジン酸、ジリノレオイルホスファチジン酸、1-パルミトイル-2-オレオイルホスファチジン酸、1,2-ジフィタノイル-3-sn-ホスファチジン酸、コレステロール及びトコフェロールからなる群から選ばれる1つ又は2つ以上の組み合わせであってもよい。

30

40

【0078】

より具体的に、前記融合性脂質は、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)、ジパルミトレオイルホスホコリン(1,2-ジパルミトレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン; DPPC)、ジオレオイルホスホコリン(1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、DOPC)及びジパルミトレオイルホスホエタノールアミン(1,2-ジパルミトレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン; DPPe)からなる群から選ばれる少なくとも1つであってもよい。

【0079】

一実施形態において、本発明の組成物は2価又は3価の金属イオンをさらに含むことが

50

できる。

【0080】

前記2価又は3価の金属イオンは、好ましくはカルシウム (Ca^{2+})、マグネシウム (Mg^{2+})、バリウム (Ba^{2+})、クロム (Cr^{3+})、鉄 (Fe^{3+})、マンガン (Mn^{2+})、ニッケル (Ni^{2+})、銅 (Cu^{2+})、亜鉛 (Zn^{2+}) 又はアルミニウム (Al^{3+}) 等から選ぶことができる。

【0081】

前記金属イオンは、硫酸塩、塩酸塩、炭酸塩、リン酸塩及び水酸化物の形態でポリマーナノ粒子組成物に添加することができる。前記金属イオンは、好ましくは、塩化カルシウム (CaCl_2)、塩化マグネシウム (MgCl_2)、塩化亜鉛 (ZnCl_2)、塩化アルミニウム (AlCl_3)、塩化鉄 (FeCl_3)、炭酸カルシウム (CaCO_3)、炭酸マグネシウム (MgCO_3)、リン酸カルシウム ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)、リン酸マグネシウム ($\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$)、リン酸アルミニウム (AlPO_4)、硫酸マグネシウム (MgSO_4)、水酸化カルシウム ($\text{Ca}(\text{OH})_2$)、水酸化マグネシウム ($\text{Mg}(\text{OH})_2$)、水酸化アルミニウム ($\text{Al}(\text{OH})_3$)、水酸化亜鉛 ($\text{Zn}(\text{OH})_2$) 又はこれらの混合物の形態で添加することができる。

10

【0082】

前記2価又は3価の金属イオンの当量を調節することにより、ポリマーナノ粒子内部に封入される薬物の放出速度を調節することができる。具体的に、2価又は3価の金属イオンが、ポリ乳酸塩のカルボン酸基の当量に対して、ポリマーナノ粒子組成物に1当量以下の量で含まれると、ポリ乳酸塩のカルボキシル末端基と結合する数が少なく、薬物の放出速度が速くなる。2価又は3価の金属イオンが、ポリ乳酸塩のカルボン酸基の当量に対して、1当量以上で含まれていると、ポリ乳酸塩のカルボキシル末端基と結合する数が多く、薬物の放出速度が持続する。したがって、血液内の薬物の放出速度を増加させるために、少ない当量の金属イオンを使用することができ、薬物の放出速度を持続させるためには、多くの当量の金属イオンを使用することができる。

20

【0083】

また、2価又は3価の金属イオンは、前記ポリ乳酸塩のカルボキシル末端基の当量に対して、0.01~10当量、0.1~5当量、0.2~2当量で含まれてもよい。

【0084】

特定の実施形態において、両親媒性ブロック共重合体及びポリ乳酸塩のナノ粒子構造に封入された有効成分-カチオン性化合物複合体を含む本発明の組成物は、血管、筋肉、皮下、経口、骨、経皮又は局所組織などの経路によって投与することができ、様々な経口又は非経口投与製剤に製剤化することができる。前記経口投与製剤の例には、錠剤、カプセル、粉体及び液剤などが含まれ、非経口投与製剤の例には、点眼剤、注射剤など様々な製剤が含まれ得る。好ましい一実施形態において、前記組成物は、注射用製剤であってもよい。例えば、本発明の組成物が凍結乾燥されている場合、注射用蒸留水、0.9%生理食塩水及び5%デキストロス水溶液などで再溶解して、注射用製剤に調製することができる。

30

【0085】

一実施形態では、前記免疫誘導用組成物は、癌を治療又は予防するために使用することができる。前記免疫誘導用組成物は、有効成分を脾臓に効率的に送達することができる。この過程で、単回投与では抗原として認識しにくい自己抗原であっても、その抗原に対する免疫を誘導する組成物であるため、ワクチンと同じ効果が期待できる。したがって、一実施形態では、前記免疫誘導用組成物は、脾臓を標的とするものであってもよい。これらの効果は、局所投与だけでなく、全身投与によっても得ることができる。

40

【0086】

本発明の別の態様は、(a)有効成分としての核酸、ポリペプチド又はそれらの組み合わせ、カチオン性化合物、両親媒性ブロック共重合体及びポリ乳酸塩を、水溶液、水混和性有機溶媒又はそれらの組み合わせである溶媒と混合する工程、及び(b)前記工程(a

50

)の混合物に水性溶媒を加えて混合する工程を含む、免疫誘導用組成物の製造方法を提供する。

【0087】

前記工程(a)は、(a-1)有効成分としての核酸、ポリペプチド又はそれらの組み合わせを含む水溶液とカチオン性化合物が水混和性有機溶媒に溶解している溶液を混合する工程、及び(a-2)前記工程(a-1)の混合物を、両親媒性ブロック共重合体及びポリ乳酸塩の水溶液と混合する工程を含むことができる。

【0088】

又、前記工程(a)は、(a-1)有効成分としての核酸、ポリペプチド又はそれらの組み合わせを含む水溶液とポリ乳酸塩を含む水溶液を混合する工程、及び(a-2)前記工程(a-1)の混合物を、カチオン性化合物を含む水混和性有機溶媒と両親媒性ブロック共重合体を含む水溶液と混合する工程をさらに含むことができる。

10

【0089】

前記製造方法は、前記工程(b)の混合物から溶媒を除去する工程をさらに含むことができる。

【0090】

前記「水溶液」は、例えば、水、滅菌精製水、バッファー、注射液などを意味し、有機酸をさらに含むバッファーであってもよい。前記水溶液は、例えば、クエン酸バッファー、PBSバッファーなどであってもよいが、これらに限定されない。

【0091】

前記「水混和性有機溶媒」は、アルコール、アセトン、アセトニトリル、それらの水混合物又はそれらの混合物であってもよいが、これらに限定されない。

20

【0092】

別の実施形態によれば、前記製造方法は、前記溶媒を除去する工程の後に、凍結乾燥補助剤を加えて凍結乾燥する工程をさらに含むことができる。

【0093】

別の実施形態によれば、前記製造方法は、前記凍結乾燥前に、ポリマーナノ粒子水溶液を滅菌フィルターで滅菌する工程をさらに含むことができる。

【0094】

本発明で使用される凍結乾燥補助剤は、凍結乾燥された組成物がケーキ形態を維持するのを助けるため、又は両親媒性ブロック共重合体組成物を凍結乾燥後の再溶解プロセス中に迅速かつ均一に溶解するのを助けるために添加される。具体的には、凍結乾燥補助剤は、ラクトース、マンニトール、ソルビトール及びスクロースからなる群から選ばれる少なくとも1つであってもよい。前記凍結乾燥補助剤の含量は、凍結乾燥組成物の全乾燥重量に対して、1~90重量%であってもよく、より具体的には10~60重量%であってもよい。

30

【0095】

本発明の製造方法によって製造された組成物中のナノ粒子は、有効成分とカチオン性化合物の複合体が両親媒性ブロック共重合体及びポリ乳酸塩ナノ粒子構造体に封入されており、血液中で安定であり、それらの大きさは、具体的に10~200nmであってもよく、より具体的には10~150nmであってもよい。

40

【0096】

以下、本発明を以下の実施例を用いて詳細に説明する。しかし、これらの実施例は、本発明を説明することのみを意図しており、その範囲は、いかなる方法においても限定されない。

【0097】

[実施例1及び2]腫瘍抗原発現mRNAを有効成分として含む免疫誘導用組成物の製造
Trp2 mRNA (TriLink, cat L7008, 10mMクエン酸バッファー、1mg/mL) 100µLとPLANa水溶液(10mg/mL) 76.4µLを調製し、混合した。次に、カチオン性脂質である2OT(N,N'-((エタン-1,2

50

- ジイルピス (アザンジイル)) ピス (エタン - 2, 1 - ジイル)) ジオレアミド) 溶液 (20 mM 酢酸ナトリウムバッファー、20 mg / mL) 30 μ L と m P E G - P L A 水溶液 (10 mg / mL) 166 μ L を混合し、調製した T r p 2 mRNA と P L A N a の混合溶液に入れて複合体を形成した。その後、10 μ g / 200 μ L の mRNA 濃度まで P B S を充填し、0.22 μ m の P V D F フィルターでろ過して、大きな粒子を含む製剤を排除した。

【0098】

【表1】

	比較例 1	実施例 1	実施例 2	比較例 2
mRNA (μ g)	10	10	10	10
2OT (μ g)	10	40	60	250
mPEG-PLA (μ g)	100	200	166	1500
PLANa (μ g)	10	150	72	500

10

【0099】

m P E G - P L A : モノメトキシポリエチレングリコール - ポリラクトドブロック共重合体

P L A N a : ポリ乳酸ナトリウム塩

【0100】

[実験例 2] マウス免疫誘導用組成物の経静脈注射後タンパク質発現の確認

実施例 1 及び 2 の免疫誘導用組成物を、P B S バッファーを担体として使用してマウスの後肢に投与した。投与は、0 日、7 日、及び 14 日目に 3 回投与した後、20 日目にマウスを犠牲にし、脾臓を採取し、脾細胞を単離した。脾臓から脾細胞を摘出し、その組織を 40 μ m 細胞ろ過器に入れ、シリンジプランジャーの先端を使用してホモジナイズした。5 mL の無血清培地を加えて遠心分離した (1, 200 r p m、5 分、4)。上清を除去した後、1 mL の赤血球溶解液を加えた。室温で 3 分間反応させた後、1 mL の P B S を加えて中和させた。遠心分離 (1, 200 r p m、5 分、4) 後、1 mL の培地液に懸濁し、氷上で保存した。0.4 % トリパンブルー溶液で染色後、血球計算器を利用して生きている脾細胞を数えた。

30

【0101】

各試験群及び対照群について I F N - γ が発現しているかどうかを確認するために、E L I S P O T としてグラフで示した。具体的には、 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ の脾細胞を E L I S P O T プレートに入れ、刺激剤として O V A ペプチド (10 μ g / mL) を加えた。5 % C O ₂ 条件で 37 $^{\circ}$ C の湿式インキュベーター内で 36 時間反応させた後、I F N - γ に対する検出抗体とストレプトアビジン - A L P を使用して I F N - γ 発現を測定し、グラフで示した。脾細胞の中で、I F N - γ 分泌は主に抗原性エピトープを認識する T 細胞の活性化の結果であると考えられる。

40

【0102】

対照群として、P B S 担体、ナノ粒子に加工されていない遊離 mRNA をそれぞれ投与した。比較群として市販のトランスフェクション試薬である T r a n s I T (登録商標) を使用し、陽性対照群として T r p 2 ペプチド及び I : C (ポリイノシン酸 : ポリシチジル酸) を皮下投与した。「I : C」は、B 細胞、マクロファージ、樹状細胞の細胞表面に発現する T L R 3 (トール様受容体) を刺激することにより、免疫アジュバントとして作用することが知られている。したがって、抗原物質である T r p 2 と併用すると、免疫活性が誘導されるため、陽性対照群として適している。下記表 2 は、試験群及び各試験群に

50

対する抗原物質 (m R N A) 投与量をまとめたものである。

【 0 1 0 3 】

【 表 2 】

試験群	個体数	用量
PBS	2	N/A
遊離 mRNA	5	10 µg
実施例 2 (mSENS) I	9	10 µg
実施例 2 (mSENS) II	9	20 µg
TransIT (登録商標)	9	10 µg
Trp2 ペプチド + poly (I:C)	6	100 + 50 µg

10

【 0 1 0 4 】

その結果を図 3 及び 4 に示す。I F N - 発現の観察の結果、実施例 1 及び 2 の免疫誘導用組成物を投与した群及び陽性対照群において、強い I F N - が検出された。

【 0 1 0 5 】

[実験例 3] 免疫誘導用組成物のマウス脾細胞発現率の確認

免疫誘導用組成物は、Trp2 を発現する mRNA の代わりに、ルシフェラーゼ (l u c : T r i l i n k , c a t L 7 2 0 2) を発現することができる mRNA が導入されたことを除いて、実施例 2 と同じ方法で調製した (実施例 3) 。実施例 3、N / P (窒素対リン酸) 比が小さい比較例 1 及び N / P 比が大きい比較例 2 の mRNA 10 µg を、マウス (B A L B / c A n N C r l O r i , n = 3) の尾静脈に投与した。投与 6 時間後、マウスを犠牲にし、各器官を取り出して発光発現パターンを測定した (L = 肝臓、S = 脾臓、H = 心臓、L u = 肺、K = 腎臓) 。

20

その結果、図 5 に示すように、脾臓では他の臓器に比べて発光発現が有意に高いことが確認された。

30

【 0 1 0 6 】

[実験例 4] 免疫誘導用組成物の癌治療効果の確認

実施例 2 の免疫誘導用組成物を使用した。マウス (B A L B / c A n N C r l O r i , n = 3) に、黒色腫細胞 B 1 6 F 1 0 細胞を 2.5×10^5 細胞で静脈内投与した。3 日目に担体として PBS を尾静脈に使用し、3 日目、5 日目、7 日目、及び 9 日目に 10 µg の mRNA を免疫化のために投与した。19 日目に犠牲にした後、肺結節への転移が観察された。対照群として担体である PBS のみを投与したものと、mRNA のみを投与したものを使用した。肺結節の数に関する一元 ANOVA 事後 Tukey の多重比較は、図 6 に示すような統計値を示した (* * * p < 0 . 0 0 1 , * * * * p < 0 . 0 0 0 1 v s . m R N A) 。

40

その結果、本発明の免疫誘導用組成物の肺転移は、対照群よりも有意に低いことが観察され、免疫誘導による癌治療効果が確認された。

【 0 1 0 7 】

前記動物実験は、すべて実験動物保護協会及び委員会 (I A C U C) によって承認されたプロトコルに従って実施された。

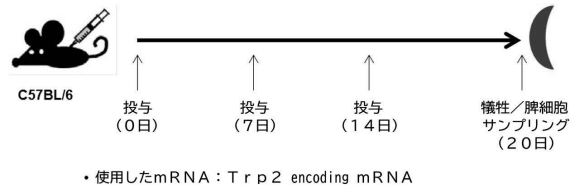
50

【 図面 】

【 図 1 】



【 図 2 】

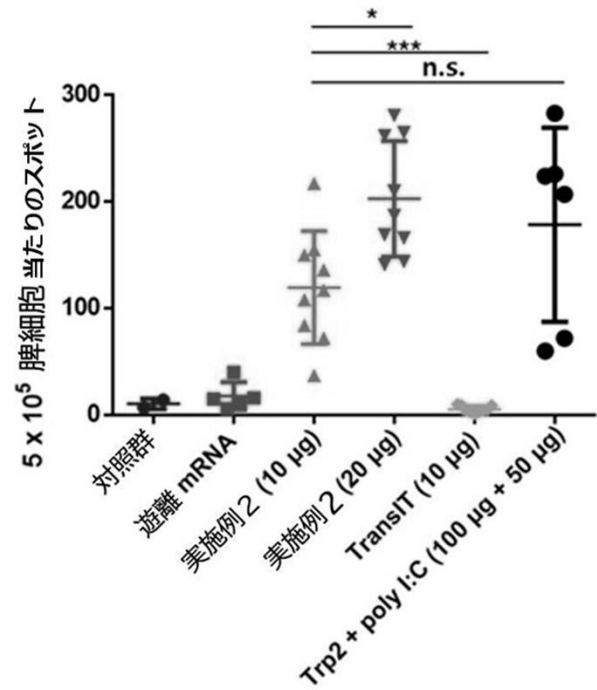


10

【 図 3 】

PBS	遊離 mRNA	mSENS (10 µg)	mSENS (20 µg)	TransIT (登録商標) (10 µg)	Trp2ヘプテド + ポリ (I-C) (100 µg + 50 µg) (s.c.)

【 図 4 】



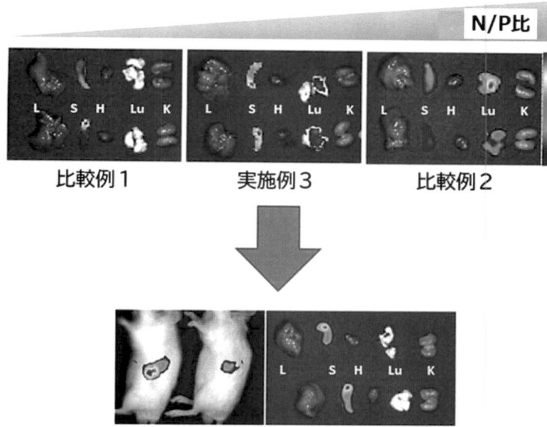
20

30

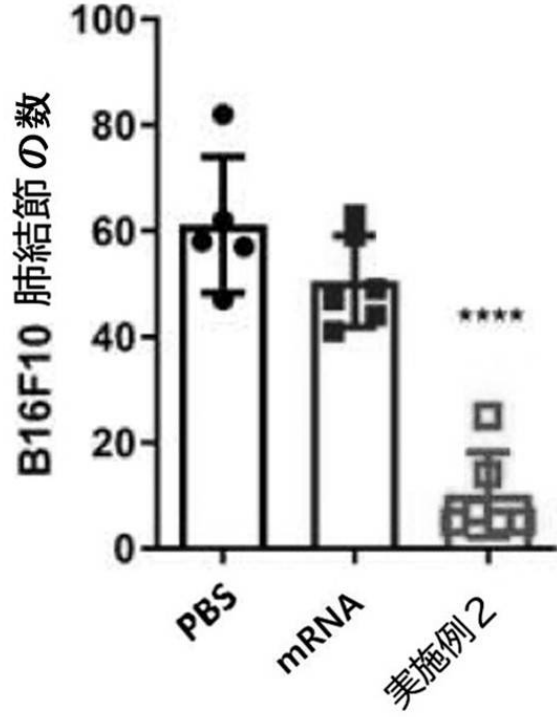
40

50

【図5】



【図6】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	47/18 (2017.01)	A 6 1 K	47/18
A 6 1 K	47/34 (2017.01)	A 6 1 K	47/34
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04
A 6 1 K	9/10 (2006.01)	A 6 1 K	9/10

(72)発明者 バク, チュンヨン

大韓民国 0 6 6 2 2 ソウル, ソチヨ - グ, ソチヨ - デロ 7 4 - ギル, 3 0, ナンバー 5 0 1 - 8 1 3

(72)発明者 ナム, ヘヨン

大韓民国 1 3 5 5 7 キョンギ - ド, ソンナム - シ, プンダン - グ, ヌティ - ロ, 2, ナンバー ビー - 2 7 0 2

(72)発明者 チョ, ヘリョン

大韓民国 1 3 4 5 7 キョンギ - ド, ソンナム - シ, プンダン - グ, サヌン - ロ, 1 2 1, ナンバ - 6 0 8 - 5 0 4

(72)発明者 キム, グヨン

大韓民国 1 6 8 7 2 キョンギ - ド, ヨンイン - シ, スジ - グ, ヒヨナム - ロ, 5 4, ナンバー 2 0 1 - 7 0 1

審査官 原口 美和

(56)参考文献 韓国公開特許第 1 0 - 2 0 1 1 - 0 0 7 7 8 1 8 (K R , A)

特表 2 0 1 8 - 5 2 7 4 1 3 (J P , A)

特表 2 0 1 5 - 5 1 4 0 7 6 (J P , A)

特表 2 0 1 8 - 5 2 6 3 2 1 (J P , A)

特表 2 0 1 6 - 5 2 0 1 2 3 (J P , A)

Nano Lett. Author manuscript; available in PMC 2018 March 08. (online), 2018年, [検 索日: 2024.08.07], Nano Lett. 2017 March 08; 17(3): 1326-1335. doi:10.1021/acs.nanolett.6b03329.

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

A 6 1 K 3 1 / 7 0 8 8

A 6 1 K 9 / 1 4

A 6 1 K 3 8 / 0 2

A 6 1 K 3 8 / 1 7

A 6 1 K 3 9 / 0 0

A 6 1 K 4 7 / 1 8

A 6 1 K 4 7 / 3 4

A 6 1 P 3 7 / 0 4

A 6 1 K 9 / 1 0

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)