

(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2016-540777

(P2016-540777A)

(43) 公表日 平成28年12月28日 (2016. 12. 28)

| (51) Int. Cl.             | F I             | テーマコード (参考) |
|---------------------------|-----------------|-------------|
| A 6 1 K 9/127 (2006.01)   | A 6 1 K 9/127   | 4 B 0 6 5   |
| A 6 1 K 31/7088 (2006.01) | A 6 1 K 31/7088 | 4 C 0 7 6   |
| A 6 1 K 47/24 (2006.01)   | A 6 1 K 47/24   | 4 C 0 8 6   |
| A 6 1 K 47/22 (2006.01)   | A 6 1 K 47/22   |             |
| A 6 1 K 47/28 (2006.01)   | A 6 1 K 47/28   |             |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 44 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-536806 (P2016-536806)  
 (86) (22) 出願日 平成26年12月3日 (2014. 12. 3)  
 (85) 翻訳文提出日 平成28年6月15日 (2016. 6. 15)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/068429  
 (87) 国際公開番号 W02015/126502  
 (87) 国際公開日 平成27年8月27日 (2015. 8. 27)  
 (31) 優先権主張番号 61/911, 334  
 (32) 優先日 平成25年12月3日 (2013. 12. 3)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 61/982, 269  
 (32) 優先日 平成26年4月21日 (2014. 4. 21)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 500041019  
 ノースウェスタン ユニバーシティ  
 アメリカ合衆国 イリノイ 60208,  
 エヴァンストン, クラーク ストリート 633  
 (71) 出願人 516164416  
 オーラセンス セラピューティクス, エルエルシー  
 アメリカ合衆国 イリノイ 60077,  
 スコーキー, ラモン アベニュー 8045,  
 スイート 410  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リポソーム粒子、前述のものを作製する方法及びその使用

(57) 【要約】

小単層小胞 (SUV) と呼ばれるリポソームは、20 - 50 nmサイズの範囲で合成することができるが、粒子間の融合をまねく不安定性及び凝集などの課題に遭遇し得る。これは、治療上の送達薬剤としてのこれらの使用を制限する。SUVの表面陰電荷を増加させることは、DNA/RNAなどの陰イオン性実体の付着を介して、これらの小胞のコロイド性安定度を増加させる。加えて、核酸の密度の高い球状配置及び放射状配向は、これらの直鎖状の対応物と異なった独特の化学的及び生物学的特性を示す。これらのリポソーム粒子は、無毒性及びしかし陰イオン性であり、非免疫原性様式で補助的な陽イオントランスフェクション薬剤を用いずに、細胞に効率的に入ることができる。これらの例外的な特性は、異なる療法における遺伝子制御のための送達薬剤としてのこれらの使用を可能にし、及び金属コア球状核酸に代わるプラットフォームを提供する。

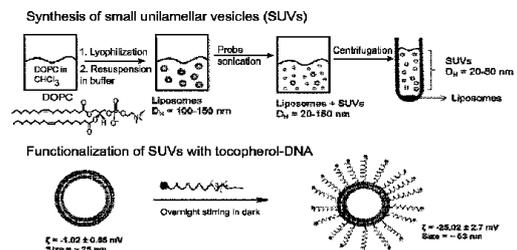


Figure 1

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

実質的に球状形状を有するリボソーム粒子であって、前記リボソーム粒子は：  
複数の脂質基を含む脂質二重層；及び  
オリゴヌクレオチド、  
を含む、前記リボソーム粒子。

## 【請求項 2】

請求項 1 の前記リボソーム粒子であって、前記複数の脂質基は、脂質のホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール及びホスファチジルエタノールアミンファミリーからなる群より選択される脂質を含む、前記リボソーム粒子。

10

## 【請求項 3】

請求項 2 の前記リボソーム粒子であって、前記脂質は、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DOPC)、1, 2 - ジミリストイル - sn - ホスファチジルコリン (DMPC)、1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - sn - ホスファチジルコリン (POPC)、1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - (1' - rac - グリセロール) (DSPG)、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - (1' - rac - グリセロール) (DOPG)、1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DSPC)、1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DPPC)、1, 2 - ジ - (9Z - オクタデセノイル) - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (DOPE) 及び 1, 2 - ジヘキサデカノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (DPPE) からなる群より選択される、前記リボソーム粒子。

20

## 【請求項 4】

請求項 1 - 3 のいずれか 1 項の前記リボソーム粒子であって、前記オリゴヌクレオチドは、親油性連結基を含むオリゴヌクレオチド - 脂質抱合体であり、前記親油性連結基は、脂質二重層の中に吸着される、前記リボソーム粒子。

## 【請求項 5】

請求項 4 の前記リボソーム粒子であって、前記親油性連結基は、トコフェロールまたはコレステロールを含む、前記リボソーム粒子。

## 【請求項 6】

請求項 5 の前記リボソーム粒子であって、トコフェロールは、トコフェロール誘導体、アルファ - トコフェロール、ベータ - トコフェロール、ガンマ - トコフェロール及びデルタ - トコフェロールからなる群より選択される、前記リボソーム粒子。

30

## 【請求項 7】

請求項 1 - 6 のいずれか 1 項の前記リボソーム粒子であって、前記オリゴヌクレオチドは、RNA または DNA を含む、前記リボソーム粒子。

## 【請求項 8】

請求項 7 の前記リボソーム粒子であって、前記 RNA は、非コード RNA である、前記リボソーム粒子。

## 【請求項 9】

請求項 8 の前記リボソーム粒子であって、前記非コード RNA は、阻害性 RNA (RNAi) である、前記リボソーム粒子。

40

## 【請求項 10】

請求項 8 または請求項 9 の前記リボソーム粒子であって、前記 RNAi は、低分子阻害性 RNA (siRNA)、二本鎖 DNA と三本鎖を形成する一本鎖 RNA (ssRNA) 及びリボザイムからなる群より選択される、前記リボソーム粒子。

## 【請求項 11】

請求項 8 または請求項 9 の前記リボソーム粒子であって、RNA は、マイクロ RNA である、前記リボソーム粒子。

## 【請求項 12】

50

請求項 7 の前記リボソーム粒子であって、前記 DNA は、アンチセンス DNA である、前記リボソーム粒子。

【請求項 13】

請求項 1 - 12 のいずれか 1 項の前記リボソーム粒子であって、前記リボソーム粒子の直径は、約 50 ナノメートル以下である、前記リボソーム粒子。

【請求項 14】

請求項 1 - 13 のいずれか 1 項の前記リボソーム粒子であって、前記粒子は、約 10 ~ 約 80 オリゴヌクレオチドを含む、前記リボソーム粒子。

【請求項 15】

請求項 14 の前記リボソーム粒子であって、前記粒子は、70 オリゴヌクレオチドを含む、前記リボソーム粒子。

10

【請求項 16】

請求項 1 - 15 のいずれか 1 項の前記リボソーム粒子であって、前記オリゴヌクレオチドは、修飾オリゴヌクレオチドである、前記リボソーム粒子。

【請求項 17】

リボソーム粒子を作製する方法であって：

溶媒にリン脂質を添加して第 1 の混合物を形成することであって、前記第 1 の混合物は、複数のリボソームを含むこと；

前記複数のリボソームを破壊して第 2 の混合物を作り出すことであって、前記第 2 の混合物は、リボソーム及び小単層小胞 (SUV) を含むこと；

前記第 2 の混合物から前記 SUV を単離することであって、前記 SUV は、約 20 ナノメートルと 50 ナノメートルとの間の粒径を有すること；

単離された SUV にオリゴヌクレオチドを添加してリボソーム粒子を作製すること、を含む、方法。

20

【請求項 18】

請求項 17 の方法であって、前記第 1 の混合物中の複数のリボソームの粒径は、約 100 ナノメートル ~ 150 ナノメートルの間にある、前記方法。

【請求項 19】

請求項 17 または請求項 18 の方法であって、前記第 2 の混合物中の前記リボソーム及び前記 SUV の粒径は、約 20 ナノメートル ~ 約 150 ナノメートルの間にある、前記方法。

30

【請求項 20】

請求項 17 の方法であって、前記リボソーム粒子は、約 50 ナノメートル以下の粒径を有する、前記方法。

【請求項 21】

請求項 17 - 20 のいずれか 1 項の前記リボソーム粒子であって、前記オリゴヌクレオチドは、親油性連結基を含むオリゴヌクレオチド - 脂質抱合体であり、前記親油性連結基は、脂質二重層中に吸着した、前記リボソーム粒子。

【請求項 22】

請求項 21 の方法であって、前記親油性連結基は、トコフェロールまたはコレステロールを含む、前記方法。

40

【請求項 23】

請求項 22 の方法であって、トコフェロールは、トコフェロール誘導体、アルファ - トコフェロール、ベータ - トコフェロール、ガンマ - トコフェロール及びデルタ - トコフェロールからなる群より選択される、前記方法。

【請求項 24】

請求項 17 - 23 のいずれか 1 項の方法であって、前記オリゴヌクレオチドは、RNA または DNA を含む、前記方法。

【請求項 25】

請求項 24 の方法であって、前記 RNA は、非コード RNA である、前記方法。

50

## 【請求項 26】

請求項 25 の方法であって、前記非コード RNA は、阻害性 RNA (RNAi) である、前記方法。

## 【請求項 27】

請求項 26 の方法であって、前記 RNAi は、低分子阻害性 RNA (siRNA)、二本鎖 DNA と三本鎖を形成する一本鎖 RNA (ssRNA) 及びリボザイムからなる群より選択される、前記方法。

## 【請求項 28】

請求項 24 の方法であって、前記 RNA は、マイクロ RNA である、前記方法。

## 【請求項 29】

請求項 24 の方法であって、前記 DNA は、アンチセンス DNA である、前記方法。

## 【請求項 30】

請求項 17 - 29 のいずれか 1 項の方法であって、前記オリゴヌクレオチドは、修飾オリゴヌクレオチドである、前記方法。

## 【請求項 31】

ポリヌクレオチドの全体または一部に相補的な 1 つまたは複数のオリゴヌクレオチドで前記遺伝子産物をコードする前記ポリヌクレオチドをハイブリダイズする工程を含む遺伝子の発現を阻害する方法であって、前記オリゴヌクレオチドは、請求項 1 - 16 のいずれか 1 項のリボソーム粒子に付着されており、前記ポリヌクレオチドと前記オリゴヌクレオチドとの間でハイブリダイズすることは、前記遺伝子産物の発現を阻害するのに十分な相補性の程度で前記ポリヌクレオチドの長さにならなくて起こる、前記方法。

## 【請求項 32】

請求項 29 の方法であって、前記遺伝子産物の発現は、インピボで阻害される、前記方法。

## 【請求項 33】

請求項 29 の方法であって、前記遺伝子産物の発現は、インピトロで阻害される、前記方法。

## 【請求項 34】

請求項 31 - 33 のいずれか 1 項の方法であって、前記リボソーム粒子は、約 50 ナノメートル以下の直径を有する、前記方法。

## 【請求項 35】

請求項 31 - 34 のいずれか 1 項の方法であって、前記オリゴヌクレオチドは、RNA または DNA を含む、前記方法。

## 【請求項 36】

請求項 35 の方法であって、前記 RNA は、非コード RNA である、前記方法。

## 【請求項 37】

請求項 36 のいずれか 1 項の方法であって、前記非コード RNA は、阻害性 RNA (RNAi) である、前記方法。

## 【請求項 38】

請求項 37 の方法であって、前記 RNAi は、低分子阻害性 RNA (siRNA)、二本鎖 DNA と三本鎖を形成する一本鎖 RNA (ssRNA) 及びリボザイムからなる群より選択される、前記方法。

## 【請求項 39】

請求項 35 の方法であって、前記 RNA は、マイクロ RNA である、前記方法。

## 【請求項 40】

請求項 35 の方法であって、前記 DNA は、アンチセンス DNA である、前記方法。

## 【請求項 41】

トール様受容体 (TLR) の活性をアップレギュレートするための方法であって、前記トール様受容体を有する細胞を請求項 1 - 16 のいずれか 1 項のリボソーム粒子と接触させることを含む、前記方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 4 2】

請求項 4 1 の方法であって、前記オリゴヌクレオチドは、TLR アゴニストである、前記方法。

## 【請求項 4 3】

請求項 4 1 または請求項 4 2 の方法であって、前記トール様受容体は、トール様受容体 1、トール様受容体 2、トール様受容体 3、トール様受容体 4、トール様受容体 5、トール様受容体 6、トール様受容体 7、トール様受容体 8、トール様受容体 9、トール様受容体 10、トール様受容体 11、トール様受容体 12 及びトール様受容体 13 からなる群より選択される、前記方法。

## 【請求項 4 4】

トール様受容体 (TLR) の活性をダウンレギュレートするための方法であって、トール様受容体を有する細胞を請求項 1 - 16 のいずれか 1 項のリボソーム粒子と接触させることを含む、前記方法。

## 【請求項 4 5】

請求項 4 4 の方法であって、前記オリゴヌクレオチドは、TLR アンタゴニストである、前記方法。

## 【請求項 4 6】

請求項 4 4 または請求項 4 5 の方法であって、前記トール様受容体は、トール様受容体 1、トール様受容体 2、トール様受容体 3、トール様受容体 4、トール様受容体 5 トール様受容体 6、トール様受容体 7、トール様受容体 8、トール様受容体 9、トール様受容体 10、トール様受容体 11、トール様受容体 12 及びトール様受容体 13 からなる群より選択される、前記方法。

## 【請求項 4 7】

インピトロで行われる請求項 4 1 - 4 6 のいずれか 1 項の前記方法。

## 【請求項 4 8】

インピボで行われる請求項 4 1 - 4 6 のいずれか 1 項の前記方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

関連出願の相互参照

この出願は、2013年12月3日に出願の U.S. Provisional Application No. 61/911,334 及び 2014年4月21日に出願の U.S. Provisional Application No. 61/982,269 の 35 U.S.C. § 119(e) 下での優先権利益を主張し、その開示は、それらの全体が参照により本明細書に援用される。

政府関心対象の記載

本発明は、Defense Advanced Research Project Agency によって授与される HR0011-13-2-0018 及び National Institutes of Health によって授与される CA151880 下で政府の支援を伴って行われた。政府は、本発明に一定の権利を有する。

## 【0002】

配列表

本出願は、本開示の別々の部分として、コンピュータ読み取り可能な形態の配列表を含み (ファイル名: 2013-201\_\_SeqListing.txt; 作製: 2014年12月3日; 1,893 バイト)、それはその全体が参照により援用される。

## 【0003】

本開示は、リボソーム粒子、前述のものを作製する方法及びその使用に関する。リボソーム粒子は、遺伝子制御及び薬物送達において有用である。

## 【背景技術】

## 【0004】

10

20

30

40

50

化学は、リポソーム及び小単層小胞 (SUV) を作製することを探索してきた。たとえば、Vogel et al., "DNA Controlled Assembly of Lipid Membranes", U.S. Patent Publication Number 2010/0144848 は、2つの親油性アンカーで修飾されたDNAが、リポソームまたはSUVを形成することができることを開示する。この後修飾技術は、高表面密度修飾には馴染まない。

【0005】

Hook et al., "Oligonucleotides Related to Lipid Membrane Attachment", U.S. Patent Publication Number 2013/0252852 は、作製されるリポソームまたはSUVが核酸の第1の鎖及び第2の鎖、並びにその末端に位置した2つ以上の疎水性のアンカリング部分を有するオリゴヌクレオチドを有し、疎水性のアンカリング部分は、二重層において見いだされるものを記述する。2つのコレステロール分子が脂質二重層の中に分子をアンカーするのに使用されるので、この後修飾技術は、高表面密度修飾には馴染まない。

10

【0006】

Lu et al., "Amphiphilic Substances and Functionalized Lipid Vesicles Including the Same", U.S. Patent Publication Number 2010/0166842 は、互いにハイブリダイズされる少なくとも2つのヌクレオチドセグメントを含むリポソームまたはSUVを記述する。小胞に基づいたこの非修飾後技術は、それが脂質二重層の両側に安定化部分を組み込むので、小胞を安定させることにはあまり効率的でない。

20

【0007】

また、非特許文献は、リポソーム及びSUVを作製するための化学を示すが、これらの化学のそれぞれは、その問題も有する。たとえば、"Liposome-Anchored Vascular Endothelial Growth Factor Aptamers" Bioconjugate Chem., 1998, 9, 573-582 は、アプタマーDNA機能性リポソームの合成及び選択的な癌細胞ターゲティングへのこれらの応用を記述する。この方法によって作製されるリポソームは、80ナノメートルのサイズの平均で、双脂質層の両側にアプタマーDNA分子を有し、及び遺伝子制御を示さなかった。

30

【0008】

"Reversible Cell-Specific Drug Delivery with Aptamer-Functionalized Liposomes" Angew. Chem. Int. Ed. 2009, 48, 6494-6498 は、アプタマーDNA機能性リポソームの合成及び選択的な癌細胞ターゲティング及び薬物送達へのこれらの応用を記述する。140ナノメートル~200ナノメートルの間の平均になるこの方法によって作製されるリポソームは、コレステロールユニットを利用して脂質二重層にDNAをアンカーし、双脂質層の両側にアプタマーDNA分子を含み、及び遺伝子制御を示さなかった。

40

【0009】

"Selective delivery of an anticancer drug with aptamer-functionalized liposomes to breast cancer cells in vitro and in vivo" J. Mater. Chem. B, 2013, 1, 5288 は、アプタマーDNA機能性リポソームの合成及び選択的な癌細胞ターゲティング及び薬物送達へのこれらの応用を開示する。この研究は、上の "Reversible Cell-Specific Drug Delivery with Aptamer-Functionalized Liposomes" において開示された研究の延長である。以

50

前のように、これらの粒子は、コレステロールユニットを利用して脂質二重層の中にDNAをアンカーし、双脂質層の両側にアプタマ-DNA分子を含み、及び遺伝子制御を示さなかった。

【0010】

“ Phospholipid Membranes Decorated by Cholesterol-Based Oligonucleotides as Soft Hybrid Nanostructures ” J. Phys. Chem. B, 2008, 112, 10942 - 10952における研究は、コレステロールDNA機能性リポソームを特徴づける。この報告において、33~35nmのサイズのリポソームは、1-パルミトイル-2-オレオイルホスファチジルコリン(POPC)脂質から作製され、及びコレステロール修飾DNA分子で後機能化された。この報告は、遺伝子制御を示さず、及びこれらの粒子は、コレステロールユニットを利用して脂質二重層にDNAをアンカーする。

10

【0011】

“ Bivalent Cholesterol-Based Coupling of Oligonucleotides to Lipid Membrane Assemblies ” J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 10224 - 10225は、脂質二重層の中へのアンカリングのための2つのコレステロールユニットを含む部分的に二重化されたDNA鎖の開発を記述する。脂質二重層の中にDNA鎖をアンカーする2つのコレステロールユニットの使用は、リポソームと会合するオリゴヌクレオチドの表面密度の減少をもたらす。

20

【0012】

“ Quantification of Oligonucleotide Modifications of Small Unilamellar Lipid Vesicles ” Anal. Chem. 2006, 78, 7493 - 7498において、研究者は、機能性リポソームナノ粒子上のDNA鎖の定量化のための技術の開発を記述する。記述された粒子は、脂質二重層の中へのアンカリングのための2つのコレステロールユニットを含む部分的に二重化されたDNA鎖を含む。脂質二重層の中にDNA鎖をアンカーする2つのコレステロールユニットの使用は、リポソームと会合するオリゴヌクレオチドの表面密度の減少をもたらす。

30

【0013】

“ Single-Molecule Detection and Mismatch Discrimination of Unlabeled DNA Targets ” Nano Lett. 2008, 8, 183 - 188は、2つのコレステロールユニットを含む部分的に二重化されたDNA鎖で機能化された100ナノメートルサイズのリポソームを開示する。この研究は、上の“ Bivalent Cholesterol-Based Coupling of Oligonucleotides to Lipid Membrane Assemblies ”及び“ Quantification of Oligonucleotide Modifications of Small Unilamellar Lipid Vesicles ”において開示された研究の延長である。以前のように、これらの粒子は、脂質二重層の中へのアンカリングのための2つのコレステロールユニットを含む部分的に二重化されたDNA鎖を含む。脂質二重層の中にDNA鎖をアンカーする2つのコレステロールユニットの使用は、リポソームと会合するオリゴヌクレオチドの表面密度の減少をもたらす。

40

【0014】

“ DNA-Induced Programmable Fusion of Phospholipid Vesicles ” J. Am. Chem. Soc. 2007, 129, 9584 - 9585は、コレステロールDNA機能性リポソームナノ粒子の融合の解析論文である。この論文において利用される小胞は、少なくとも100ナノメートルのサイズであった。

50

## 【0015】

“Determinants for Membrane Fusion Induced by Cholesterol-Modified DNA Zippers” J. Phys. Chem. B, 2008, 112, 8264-8274は、コレステロールDNA機能性リポソームナノ粒子の融合の解析論文であり、及び上で記述された“DNA-Induced Programmable Fusion of Phospholipid Vesicles”からの研究の続きである。この論文は、配列特異的融合を脂質二重層にオリゴヌクレオチドをアンカーするための2つのコレステロールユニットを含む部分的に二重化されたDNA鎖(たとえば、上の“Quantification of Oligonucleotide Modifications of Small Unilamellar Lipid Vesicles”において見いだされた部分的に二重化されたDNA鎖)の利用と組み合わせる。

10

## 【0016】

“Liposome-Based Chemical barcodes for Single Molecule DNA Detection Using Imaging Mass Spectrometry” Nano Lett., 2010, 10, 732-737は、DNA配列に応じて特異的DNA標的の検出の解析論文である。これは、配列特異的融合を異なるDNAアンカリング(ビスコレステリルアンカーを使用して、Anal. Chem. 2006, 78, 7493-7498を参照されたい)と組み合わせる報告された“DNA-Induced Programmable Fusion of Phospholipid Vesicles”と同じグループからの研究の延長である。

20

“Programmable Assembly of DNA-Functionalized Liposomes by DNA”は、コレステロールDNA機能性リポソームのアセンブリーを開示する解析論文である。この論文では、114及び251nmの流体力学的直径をもつリポソームが合成され、及びコレステロール修飾DNA分子で合成的に後機能化された。この報告における粒子は、脂質二重層の中へのオリゴヌクレオチド分子のコレステロールアンカリングを利用する。

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

30

## 【0017】

【特許文献1】米国特許出願公開第2010/0144848号明細書

【特許文献2】米国特許出願公開第2013/0252852号明細書

【特許文献3】米国特許出願公開第2010/0166842号明細書

## 【非特許文献】

## 【0018】

【非特許文献1】“Liposome-Anchored Vascular Endothelial Growth Factor Aptamers” Bioconjugate Chem., 1998, 9, 573-582

【非特許文献2】“Reversible Cell-Specific Drug Delivery with Aptamer-Functionalized Liposomes” Angew. Chem. Int. Ed. 2009, 48, 6494-6498

40

【非特許文献3】“Selective delivery of an anticancer drug with aptamer-functionalized liposomes to breast cancer cells in vitro and in vivo” J. Mater. Chem. B, 2013, 1, 5288

【非特許文献4】“Phospholipid Membranes Decorated by Cholesterol-Based Oligonucleotides

50

as Soft Hybrid Nanostructures" J. Phys. Chem. B, 2008, 112, 10942-10952

【非特許文献5】“Bivalent Cholesterol-Based Coupling of Oligonucleotides to Lipid Membrane Assemblies” J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 10224-10225

【非特許文献6】“Quantification of Oligonucleotide Modifications of Small Unilamellar Lipid Vesicles” Anal. Chem. 2006, 78, 7493-7498

【非特許文献7】“Single-Molecule Detection and Mismatch Discrimination of Unlabeled DNA Targets” Nano Lett. 2008, 8, 183-188

【非特許文献8】“DNA-Induced Programmable Fusion of Phospholipid Vesicles” J. Am. Chem. Soc. 2007, 129, 9584-9585

【非特許文献9】“Determinants for Membrane Fusion Induced by Cholesterol-Modified DNA Zippers” J. Phys. Chem. B, 2008, 112, 8264-8274

【非特許文献10】“Liposome-Based Chemical barcodes for Single Molecule DNA Detection Using Imaging Mass Spectrometry” Nano Lett., 2010, 10, 732-737

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0019】

リポソームは、親水性のコアをもつ1つまたはいくつかの疎水性の脂質二重層からなる様々なサイズ範囲の球状の、自己閉鎖構造である。これらの脂質の直径は、0.15~1マイクロメートルの範囲の担体を基礎とし、それは、20~100ナノメートルの有効な治療上の範囲より有意に高い。小単層小胞(SUV)と呼ばれるリポソームは、20~50ナノメートルのサイズ範囲で合成されることができ、粒子間融合をまねく不安定性及び凝集などの課題に遭遇し得る。この粒子間融合は、治療におけるSUVの使用を限定する。

【0020】

この不安定性と戦うために、SUVは、2つの異なる技術によって関心対象の重合体、ペプチド、DNA及びその他の分子で機能化することができる。第1のアプローチにおいて、関心対象の修飾された分子は、リポソームの合成の間に脂質、脂質フィルムまたは水和緩衝液の混合物に添加される。このアプローチは、リポソーム膜の内側及び外側層両方に関心対象の機能分子を含むリポソームを生じる。一般的にいて、この方法によって作製される構造は、80ナノメートル(nm)より小さいサイズで安定でない。代替のアプローチにおいて、SUVは、予め形成された小胞(「修飾後技術」)の脂質二重層の中に関心対象の基質をアンカーすることによって作製され得る。この代替のアプローチは、リポソーム膜の外層に関心対象の機能分子を含むリポソームナノ粒子をもたらす。重要なことに、この代替の修飾後アプローチは、50ナノメートル未満でさえ、任意のサイズのリポソームの作製を可能になる。

【0021】

したがって、一つの態様において、本開示は、親油性末端及び非親油性末端を含む構築物を提供する。親油性末端は、いくつかの実施形態において、トコフェロールを含む。さらなる実施形態において、トコフェロールは、アルファ-トコフェロール、ベータ-トコ

10

20

30

40

50

フェロール、ガンマ - トコフェロール及びデルタ - トコフェロールからなる群より選択される。

【0022】

非親油性末端は、さらなる実施形態において、荷電重合体である。いくつかの実施形態において、荷電重合体は、オリゴヌクレオチドである。関連した実施形態において、オリゴヌクレオチドは、RNAまたはDNAを含み、及び種々の実施形態において、RNAは、調節性機能を行う阻害性RNA (RNAi) である。なおさらなる実施形態において、RNAiは、低分子阻害性RNA (siRNA)、二本鎖DNAと三本鎖を形成するRNA及びリボザイムからなる群より選択される。さらなる実施形態において、RNAは、piwi相互作用RNA (piRNA) であり、またはRNAは、調節性機能を行うマイクロRNAである。いくつかの実施形態において、DNAは、アンチセンスDNAである。

10

【0023】

もう一つの態様において、本開示は、本開示の構築物を作製するための方法であって、方法は、オリゴヌクレオチドを提供すること、ホスホラミダイト - 修飾 - トコフェロールを提供すること、及び前記オリゴヌクレオチドを前記ホスホラミダイト - 修飾 - トコフェロールに曝露して本開示の構築物を作製することを含む方法を提供する。

【0024】

さらなる態様において、リボソーム粒子は、本開示によって提供され、前記リボソーム粒子は、実質的に球状形状を有し、前記リボソーム粒子は、複数の脂質基を含む脂質二重層及びオリゴヌクレオチドを含む。

20

【0025】

種々の実施形態において、前記複数の脂質基が脂質のホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール及びホスファチジルエタノールアミンファミリーからなる群より選択される脂質を含むことが、本開示によって想定される。

【0026】

種々の実施形態において、前記脂質は、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DOPC)、1, 2 - ジミリストイル - sn - ホスファチジルコリン (DMPC)、1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - sn - ホスファチジルコリン (POPC)、1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - (1' - rac - グリセロール) (DSPG)、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - (1' - rac - グリセロール) (DOPG)、1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DSPC)、1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DPPC)、1, 2 - ジ - (9Z - オクタデセノイル) - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (DOPE) 及び1, 2 - ジヘキサデカノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (DPPE) からなる群より選択される。

30

【0027】

さらなる実施形態において、オリゴヌクレオチドは、親油性連結基を含むオリゴヌクレオチド - 脂質抱合体であり、前記親油性連結基は、脂質二重層に吸着される。種々の実施形態において、親油性連結基は、トコフェロールまたはコレステロールを含む。

【0028】

また、本開示は、種々の実施形態において、トコフェロールが、トコフェロール誘導体、アルファ - トコフェロール、ベータ - トコフェロール、ガンマ - トコフェロール及びデルタ - トコフェロールからなる群より選択されることを想定する。さらに他の実施形態において、また、本開示は、親油性連結基 (すなわち、脂質アンカー) が、たとえば及び限定なしに、パルミトイル、ジパルミトイル、ステアリルまたはジステアリルを含むことを想定する。

40

【0029】

オリゴヌクレオチドは、さらなる実施形態において、RNAまたはDNAを含む。さらなる実施形態において、RNAは、非コードRNAであり、及びなおさらなる実施形態において、非コードRNAは、阻害性RNA (RNAi) である。本開示は、いくつかの実

50

施形態において、RNAiが低分子阻害性RNA ( siRNA )、二本鎖DNAと三本鎖を形成する一本鎖RNA ( ssRNA ) 及びリボザイムからなる群より選択されることをさらに想定する。さらなる実施形態において、RNAは、マイクロRNAである。いくつかの実施形態において、DNAは、アンチセンスDNAである。

【0030】

種々の実施形態において、前記リボソーム粒子の直径は、約50ナノメートル以下である。表面密度に関して、本開示は、組成物及び方法を提供し、リボソーム粒子は、約10~約100オリゴヌクレオチドまたは約10~約80オリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、粒子は、70オリゴヌクレオチドを含む。

【0031】

いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、修飾されたオリゴヌクレオチドである。

【0032】

本開示のもう一つの態様において、リボソーム粒子を作製する方法であって、方法は、溶媒にリン脂質を添加して第1の混合物を形成することであり、前記第1の混合物は、複数のリボソームを含むこと；前記複数のリボソームを破壊して第2の混合物を作製することであり、前記第2の混合物は、リボソーム及び小単層小胞 ( SUV ) を含むこと；前記第2の混合物から前記SUVを単離することであり、前記SUVは、約20ナノメートル~50ナノメートルの間の粒径を有すること；及びオリゴヌクレオチドを単離されたSUVに添加してリボソーム粒子を作製することを含む方法が提供され。

【0033】

いくつかの実施形態において、前記第1の混合物中の複数のリボソームの粒径は、約100ナノメートル~150ナノメートルの間にある。さらなる実施形態において、前記第2の混合物中のリボソーム及びSUVの粒径は、約20ナノメートル~約150ナノメートルの間にある。なおさらなる実施形態において、リボソーム粒子は、約50ナノメートル以下の粒径を有する。

【0034】

いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、親油性連結基を含むオリゴヌクレオチド-脂質抱合体であり、前記親油性連結基は、脂質二重層に吸着される。関連した実施形態において、親油性連結基は、トコフェロールまたはコレステロールを含む。さらなる実施形態において、トコフェロールは、トコフェロール誘導体、アルファ-トコフェロール、ベータ-トコフェロール、ガンマ-トコフェロール及びデルタ-トコフェロールからなる群より選択される。

【0035】

さらなる実施形態において、オリゴヌクレオチドは、RNAまたはDNAを含む。RNAは、いくつかの実施形態において、非コードRNAである。さらなる実施形態において、非コードRNAは、阻害性RNA ( RNAi ) である。本開示は、さらなる実施形態において、RNAiが、低分子阻害性RNA ( siRNA )、二本鎖DNAと三本鎖を形成する一本鎖RNA ( ssRNA ) 及びリボザイムからなる群より選択されることをさらに想定する。

【0036】

いくつかの実施形態において、RNAは、マイクロRNAである。種々の実施形態において、DNAは、アンチセンスDNAである。

【0037】

いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、修飾されたオリゴヌクレオチドである。

【0038】

本開示のもう一つの態様において、遺伝子の発現を阻害する方法であって、遺伝子産物をコードするポリヌクレオチドを前記ポリヌクレオチドの全体または一部に相補的な1つまたは複数のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズする工程を含み、前記オリゴヌクレオ

10

20

30

40

50

チドは、本開示のリボソーム粒子に付着され、前記ポリヌクレオチドと前記オリゴヌクレオチドとの間でハイブリダイズすることは、前記遺伝子産物の発現を阻害するのに十分な相補性の程度で前記ポリヌクレオチドの長さにわたって起こる方法が提供される。

【0039】

いくつかの実施形態において、前記遺伝子産物の発現は、インピボで阻害される。さらなる実施形態において、前記遺伝子産物の発現は、インピトロで阻害される。

【0040】

さらなる実施形態において、リボソーム粒子は、約50ナノメートル以下の直径を有する。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、RNAまたはDNAを含む。RNAは、いくつかの実施形態において、非コードRNAである。関連した実施形態において、非コードRNAは、阻害性RNA (RNAi) である。また、本開示は、RNAiが、種々の実施形態において、低分子阻害性RNA (siRNA)、二本鎖DNAと三本鎖を形成する一本鎖RNA (ssRNA) 及びリボザイムからなる群より選択されることを想定する。いくつかの実施形態において、RNAは、マイクロRNAである。さらなる実施形態において、DNAは、アンチセンスDNAである。

10

【0041】

本開示のもう一つの態様において、トール様受容体 (TLR) を有する細胞を開示のリボソーム粒子と接触させることを含むトール様受容体の活性をアップレギュレートするための方法が、提供される。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、TLRアゴニストである。さらなる実施形態において、トール様受容体は、トール様受容体1、トール様受容体2、トール様受容体3、トール様受容体4、トール様受容体5、トール様受容体6、トール様受容体7、トール様受容体8、トール様受容体9、トール様受容体10、トール様受容体11、トール様受容体12及びトール様受容体13からなる群より選択される。

20

【0042】

さらなる態様において、本開示は、トール様受容体 (TLR) を有する細胞を開示のリボソーム粒子と接触させることを含むトール様受容体の活性をダウンレギュレートするための方法を提供する。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、TLRアンタゴニストである。さらなる実施形態において、トール様受容体は、トール様受容体1、トール様受容体2、トール様受容体3、トール様受容体4、トール様受容体5、トール様受容体6、トール様受容体7、トール様受容体8、トール様受容体9、トール様受容体10、トール様受容体11、トール様受容体12及びトール様受容体13からなる群より選択される。

30

【0043】

また、本開示は、種々の実施形態において、本明細書において開示される方法がインピトロで行われることを想定する。さらなる実施形態において、本開示は、本明細書において開示される方法がインピボで行われることを想定する。

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1】脂質小胞の表面上のDNAまたはRNAで機能化された小単層小胞 (SUV) の合成を示す。より大きいサイズのリボソームは、プローブ超音波処理器を使用してSUVに音波破碎され、及び超遠心分離によって重い不純物から分離される。

40

【図2】小単層小胞 (SUV) からのリボソーム粒子の特性付けを示す。動的光散乱法 (DLS) 粒径データ及び透過型電子顕微鏡 (TEM) 画像を機能付与前及び後に得た。

【図3】リボソームにオリゴヌクレオチドをアンカーするための異なる親油性末端を有するオリゴヌクレオチドで安定するリボソーム粒子の安定度を示す。トコフェロール修飾オリゴヌクレオチドで安定するリボソームは、裸のリボソーム、コレステロール修飾オリゴヌクレオチドで安定するリボソーム、及びステアリル修飾オリゴヌクレオチドで安定するリボソームより優れた安定度を示す。a) 異なる親油性末端を有するオリゴヌクレオチドで機能化されたFITCカプセル化SUVのゲル電気泳動画像； b) 及び c) Cy5標識

50

されたDNAで機能化されたFITCカプセル化SUVのゲル電気泳動画像。

【図4】オリゴヌクレオチドで安定したリポソーム粒子が、優れた温度安定性を有することを示し、及びSUVを安定させるのに使用されたトコフェロール修飾DNA濃度の範囲を示す。a) 4にて貯蔵されたLSNAと比較して24時間37にて貯蔵された後のリポソームLSNA(LSNA)の安定性b)。SUVを安定させるのに使用されたトコフェロール修飾DNA濃度の範囲を示すゲル電気泳動。

【図5】本明細書において開示したリポソーム粒子が細胞に入ることができることを示す共焦点画像を含む。HeLa細胞を無血清培地中100nMの濃度でのDNA(dT<sub>30</sub>-Cy5またはdT<sub>30</sub>)で処理し、及び16時間後に解析した。

【図6】トコフェロール修飾オリゴヌクレオチドで安定するリポソームが、修飾されていないままのリポソームと比較して細胞における実質的細胞毒性効果を示さないことを示す細胞生存度アッセイデータを示す。

【図7】DOPC SUV及びトコフェロール修飾DNAからのリポソーム球状核酸(SNA)のアセンブリーを示す。

【図8】SUV及びLSNAの安定度研究を示す。(A)緩衝液中で加熱後のSUVの動的光散乱特性。(B)緩衝液中で加熱後のLSNAの動的光散乱特性。(C)ウシ血清アルブミン、ウシ胎児血清の主要成分の存在下でのリポソーム分解の略図。(D)溶液の蛍光における増加を生じさせるカプセル化されたローダミン色素の放出によってモニターしたときの、10%ウシ胎児血清の存在下でのSUV(上側線)及びLSNA(下側線)の分解。

【図9】(A)260nmにて吸光度としてモニターされるリポソーム-SNA凝集体の融解転移(B)凝集(下側線)の前及びリンカーDNA鎖の存在下での凝集の後(上側線)のリポソーム-SNAの吸光度スペクトルを示す。

【図10】(A)24時間100nM Cy5標識リポソーム-SNAとインキュベートしたSKOV3細胞の共焦点顕微鏡写真を示す。細胞核をヘキスト33342で染色する。(B)MTTアッセイによるSKOV3細胞におけるリポソーム-SNA及びDharmafect-DNA複合体の細胞毒性測定。(C)インキュベーションの1時間(それぞれの群における左棒)及び36時間(それぞれの群における右棒)後にフローサイトメトリーによって定量化されたSKOV3細胞における5-Cy5標識DNA鎖及び5'-Cy5標識リポソーム-SNAの細胞取り込み。(D)1μM DNA濃度にて抗HER2リポソーム-SNA構築物を使用するSKOV3細胞におけるHER2遺伝子ノックダウン。

【図11】単離及び精製の後のSUVのTEM顕微鏡写真を示す。

【図12】A)所与の溶液におけるリポソームの総数を算出する際に使用した方程式。脂質の濃度を、ICPを使用して決定することができる。本明細書において記述した大部分の研究については、使用脂質濃度1.3mMは、粒子(4pmol cm<sup>-2</sup>)あたり1.361×10<sup>17</sup>リポソーム/L及び71 DNA鎖のDNA充填を示す。B)見積もられたオリゴヌクレオチド充填に応じたリポソームSNAの粒子移動度を示す。

【図13】1% アガロースゲル電気泳動画像上の5'-Cy5標識DNA鎖で機能化されたFITCカプセル化LSNAの移動を示す。B)ネガティブに荷電されたDNAコロナの存在のためにゲル上のリポソームコアの移動を示すFITCチャンネル。C)Cy5チャンネルは、リポソーム構築物上で遊離鎖と機能化されたそれらとの間のサイズ相違のための移動度における相違を示す。両方のチャンネルは、同じバンド上で局在する。

【図14】Ramos-Blue(商標)NF-B/AP-1リポーターシステムを示す。

【図15】CpG含有オリゴヌクレオチドに曝露されるときRamos-Blue細胞の活性化を示す。

【図16】リポソームSNAの合成の図描写である。

【図17】様々な数のオリゴヌクレオチドで機能化された表面であったリポソームSNAのゲル電気泳動画像を示す。30nm SUVの濃度は、0.22μM(元素分析によ

10

20

30

40

50

てリン脂質含有量の解析によって決定し、及びおおよそ30 nm SUVあたり $2.2 \times 10^3$ リン脂質)であった。

【図18】リポソーム粒子がHIF1- の発現をノックダウンするのに使用された実験の結果を示す。

【図19】リポソーム粒子がBAXの発現をノックダウンするのに使用された実験の結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0045】

詳細な説明

球状核酸(SNA)ナノ粒子抱合体は、無機ナノ粒子鑄型から典型的に合成される構造及びこのような粒子の表面に固定された高度に配向された核酸リガンドのシェルである[Mirkin et al., Nature 382: 607 (1996)]。SNAは、様々な異なる形態で作成された[Cutler et al., J. Am. Chem. Soc. 134: 1376 (2012); Will et al., In Nanomaterials for Biomedicine; American Chemical Society: Vol. 1119, p 1-20 (2012)]。DNA、RNA、LNA[Seferos et al., ChemBioChem 8: 1230 (2007)]及びPNA[Lytton-Jean et al., Advanced Materials 21: 706 (2009)]からなるシェル組成物をもつ金、シリカ[Young et al., Nano Lett. 12: 3867 (2012)]、酸化鉄[Cutler et al., Nano Lett. 10: 1477 (2010); Zhang et al., Nat. Mater. 12: 741 (2013)]及びAg[Lee et al., Nano Lett. 7: 2112 (2007)]を含むコア組成物は、全て作製され、及び探索された。架橋されたオリゴヌクレオチド[Cutler et al., J. Am. Chem. Soc. 133: 9254 (2011)]からなる中空SNA構造は、ミセル-ブロック共重合体構造とともに合成された[Li et al., Nano Lett. 4: 1055 (2004); Alemdaroglu et al., Advanced Materials 20: 899 (2008); Liu et al., Chemistry - A European Journal 16: 3791 (2010); Chien et al., Chem. Commun. 47: 167 (2011)]。現在、公知のSNAの中には相当な構造的及び組成的な多様性があるが、これら全ては、いくつかの共通の特性及び特徴を共有する。これらの多価構築物は、これらが協同的にオリゴヌクレオチドを結合し、及び非常に狭い融解転移を示す二重鎖構造を形成することを可能にする。これらの特性は、高感度及び高い選択性ゲノム検出システムの開発に活用されてきた[Rosi et al., Chem. Rev. 105: 1547 (2005)]。直鎖状核酸が重合体、ペプチドまたはウイルスのトランスフェクション薬剤なしに細胞にうまく入らない一方で、3次元SNA構造は、クラスAスカベンジャー受容体によって認識され[Patel et al., Bioconjugate Chem. 21: 2250 (2010); Choi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 110: 7625 (2013)]、及び補助的トランスフェクション薬剤の必要なしに60を超える異なる細胞型の中に迅速に取り込まれる[McAllister et al., J. Am. Chem. Soc. 124: 15198 (2002); Whitehead et al., Nat Rev Drug Discov 8: 129 (2009); Zhang et al., Biomaterials 31: 1805 (2010)]。この特性は、アンチセンスまたはsiRNA経路[Rosi et al., Science 312: 1027 (2006); Agbasi-Porter et al., Bioconjugate Chem. 17: 1178 (2006)]

6) ; Giljohann et al., J. Am. Chem. Soc. 131: 2072 (2009); Jensen et al., Science Translational Medicine 5: 209ra152 (2013)]を介した細胞内検出 [Zheng et al., Nano Lett. 9: 3258 (2009); Prigodich et al., ACS Nano 3: 2147 (2009)]及び遺伝子制御の両方のためのストラテジーにおいてこのような構造重要要素を作製した。

#### 【0046】

しかし、治療上の使用に対する障壁は、特にこのような構造がクリアランスまたは未知の体内分布特徴の公知の問題を有する材料から作製されるときに高い。理想的には、すぐに利用できる出発材料から作製され、大規模に合成することができ、及びFDA認可医薬品の一部であった成分からなるSNA構造が望まれる [Cutler et al., J. Am. Chem. Soc. 134: 1376 (2012); Farokhzad et al., Drug Delivery Rev. 58: 1456 (2006)]。本明細書において、リポソーム構造を定義するリン脂質の間に差し込むことができる疎水性の尾部をもつ荷電重合体の高密度シェルで安定する小リポソームコアからなるこのような構造を作製するためのストラテジーが提供される。使用のための想定される1つのこのような荷電重合体は、核酸である。従来のSNAと同様に、これらのリポソーム構造は、迅速に複数の株化細胞に入り、及びアンチセンス経路を介して遺伝子発現を効率的にノックダウンするためにいくつかの実施形態において使用される。従来のSNAは、胸 (SKBR3、MDA-MB-231、AU-565)、脳 (U87、LN229、U118)、膀胱 (HT-1376、5637、T24)、結腸 (LS513)、子宮頸部 (HeLa、SiHa)、皮膚 (C166、KB、MCF10A)、腎臓 (MDCK)、脳 (ラット海馬神経細胞、アストロサイト、グリア細胞)、膀胱、血液 (PBMC、T細胞)、脾臓 (ヒト - 島)、皮膚 (ヒト)、血液 (Sup T1、Jurkat)、白血病 (K562)、肝臓 (HepG2)、腎臓 (293T)、卵巣 (CHO)、線維芽細胞 (NIH3T3)、マクロファージ (RAW264.7)を含む多くの器官及び組織に由来する細胞に入ることが示されてきた。球状核酸アーキテクチャは、スカベンジャー受容体A、細胞 - 膜受容体に結合することによって細胞の中にこれらの構築物の侵入を容易にする。この受容体を発現する株化細胞の少数の非限定的な例は、HeLa、SKOV-3、U87、Neuro 2A、RAW細胞、HepG2、Hep3B、MDA-MB-468、MCF-7、C8S、C166 Bend3、A549、Rab9、HeyA8、Jurkat細胞である。

#### 【0047】

SUVの使用の主要な欠点は、より大きいリポソーム構造に融合する傾向が高いことによる溶液中でのこれらの固有の不安定性である。負に荷電したDNAの高密度層でのこれらの構造の機能付与が、たとえば負に荷電した粒子表面の反発作用のために粒子 - 粒子相互作用を減少させることによってこれらの安定度を増加させることが、本明細書において開示される。本明細書において記述した本研究の過程において、トコフェロール機能性DNAが、その他の公知の疎水性DNA類似体と比較して粒子上にDNA鎖のより高い密度を提供し、有意に粒子の安定度を増加させることが判明した。一般的なコロイド性安定度に加えて、DNAの高密度は、スカベンジャー受容体B経路を介してこのナノ粒子の取り込みを増加させるだろうし、及び細胞の中に遺伝的材料の効率的な送達を可能にするだろう。最後に、DNAの高密度層は、身体、その循環割合における粒子安定度を上昇させ、及びしたがって、このナノ医薬の生体分布を改善すると予想される。

#### 【0048】

本開示は、DNA及びRNAを含むが、限定されない陰イオン性実体の付着を介してSUVの表面負電荷を増加させることによって、これらの小胞のコロイド性安定度が、増加することを教示する。加えて、核酸の高密度の球状配置及び放射状配向は、これらの直鎖状の対応物と異なった独特の化学的及び生物学的特性を示す。これらの球状核酸 (SNA

)は、無毒性及びしかし陰イオン性であり、非免疫原性様式で補助的陽イオントランスフェクション薬剤を用いずに細胞に効率的に入ることができる。これらの例外的な特性は、異なる療法における遺伝子制御のための送達薬剤としてのこれらの使用を可能にする。SNAのリポソーム-鋳型媒介された合成は、金属コアの生物濃縮でSNA治療上の多様性を限定する金属コアSNA及び治療上の実体をカプセル化することができないことに代わりのプラットフォームを提供する。

【0049】

これから、トコフェロール修飾オリゴヌクレオチド及びこのようなオリゴヌクレオチドを作製する方法、リポソーム粒子及び前述ものを作製する方法及びリポソーム粒子の使用は、以下に完全に記述されるだろう。実際は、本開示は、多くの異なる形態において具体化されてもよく、及び本明細書に記載される実施形態に限定されるように解釈されるべきでない。これらの実施形態は、特許請求の範囲及びその均等物によって定義されるとおり、本発明を実施するための最良の形態の開示とともに、当業者が本発明を作製し、及び使用することができるように十分に詳細に記述されて提供される。

10

【0050】

同様に、本明細書において記述した方法の多くの改良及びその他の実施形態は、前述及び関連する図面において示した教示の助けをかりて、本発明が属する当業者に思い浮かぶだろう。したがって、本発明が、開示される具体的実施形態に限定されるべきでないこと、及び改良及びその他の実施形態が、添付の特許請求の範囲の範囲内に含まれると意図されることを理解すべきである。特定の用語を本明細書において使用したが、これらは、一般的及び説明的意味のみにおいて使用され、及び限定の目的のためでない。

20

【0051】

用語法

別途定義されない限り、本明細書において使用される全ての専門的及び科学用語は、本発明が属する当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書において記述したものに類似の、またはそれと均等な任意の方法及び材料を本発明の実施または試験において使用することができるが、好ましい方法及び材料を本明細書において記述した。

【0052】

一定の用語は、最初に定義される。さらなる用語は、本明細書の全体にわたって定義される。

30

【0053】

簡潔さのために、また、小単層小胞(SUV)、リポソームSNA(LSNA)、リポソーム粒子または球状核酸(SNA)に関する本開示の実施形態の記述は、その他の前述の用語のいずれかを使用する実施形態に適用でき得る。例として、また、リポソームSNAを使用して遺伝子発現を調節する方法は、リポソーム粒子を使用して遺伝子発現を調節する方法として本明細書において記述され得る。小単層小胞(SUV)は、100ナノメートル以下のサイズのリポソーム粒子であり、及びLSNAの前駆体として使用される。SUV及びLSNAは、したがって、リポソーム粒子のサブクラスとみなすことができる。

40

【0054】

本明細書において使用される用語は、「オープンな」用語として意図される(たとえば、用語「含む」は、「含むが、限定されない」として解釈されるべきであり、用語「有する」は、「少なくとも有する」として解釈されるべきであり、用語「含む」は、「含むが、限定されない」として解釈されるべきである)。

【0055】

さらにまた、「A、B及びC、その他の少なくとも1つ」に類似の慣例が使用されるこれらの例において、一般に、このような構成は、当業者が慣例を理解するだろうという意味で意図される(たとえば、「A、B及びCの少なくとも1つを有するシステム」が、A単独、B単独、C単独、A及びB共に、A及びC共に、B及びC共に、及び/またはA、

50

B及びC共に有するシステムを含むが、限定されないだろう)。2つ以上の代わりの用語を提示する任意の選言的語及び/またはフレーズは、記述か、または図においてか、用語の1つ、用語のいずれか、または両方の用語を含む可能性を想定すると実質的に理解されるべきであることは、当業者によってさらに十分に理解されるだろう。たとえば、フレーズ「AまたはB」は、「AまたはB」または「A及びB」の可能性を含むと理解されるだろう。

【0056】

「から」、「に」、「まで」、「少なくとも」、「を上回る」、「より小さい」及び同様のものなどの全ての言語は、詳述される数を含み、及び上で議論したようにサブレンジにその後分類されることができる範囲をいう。

10

【0057】

範囲は、それぞれの個々の要素を含む。したがって、たとえば、1~3の要素を有する群は、1、2または3の要素を有する群をいう。同様に、6の要素を有する群は、1、2、3、4または6の要素を有する群、などをいう。

【0058】

法助動詞「でもよい」は、同じものの中に含まれるいくつかの記述された実施形態または特徴間の1つまたは複数の選択肢または選択の好ましい用途または選択をいう。選択肢または選択が、同じものに含まれる特定の実施形態または特徴に関して開示されない場合、法助動詞「でもよい」は、同じものに含まれる記述された実施形態または特徴の態様または同じものに含まれる記述された実施形態または特徴に関して特定の技術を使用するという決定的な決定をする、または使用する方法に関して肯定の行為をいう。この後の文脈において、法助動詞「でもよい」は、助動詞「ことができる」と同じ意味及び暗示的意味を有する。

20

【0059】

本明細書に使用される、冠詞「1つ」及び「1つ」は、冠詞の文法の目的語の1つまたは1つより多く(たとえば、少なくとも1つ)をいう。

【0060】

「約」及び「およそ」は、測定の性質または精度を考慮して測定された量についての誤差の許容される程度を一般に意味するものとする。エラーの例示的な程度は、所与の値または値の範囲の20~25パーセント(%)以内、典型的には、10%以内及びより典型的には、5%以内である。

30

【0061】

本明細書において記述した化学構造は、IUPAC命名法に従って命名し、及び適切な場合技術分野に認められた一般名及び略語を含む。IUPAC命名法は、ChemDraw(登録商標)(PerkinElmer, Inc)、ChemDoodle(登録商標)(iChemLabs, LLC)及びMarvin(ChemAxon Ltd.)などの化学的構造を描いているソフトウェアプログラムに由来し得る。化学構造は、IUPAC名が誤った名で呼ばれる、または別途本明細書において開示される化学構造と矛盾する範囲まで本開示において調整する。

【0062】

見出し、たとえば、(A)、(B)、(i)その他は、本明細書及び特許請求の範囲を読みやすくするために単に示してある。本明細書または特許請求の範囲における見出しの使用は、工程または要素がアルファベットまたは数値的な順番またはこれらが示される順番で行われることを必要としない。

40

【0063】

本開示は、新規の粒子、名付けられたリポソーム粒子、前述のものを作製する方法及びこれらの粒子の使用を記述する。本リポソーム粒子は、これらがその他の公知のリポソーム粒子より小さい粒径にて安定であり、及びDNAの高密度層が身体における粒子安定度を上昇させ、及びしたがって、リポソーム小胞の循環割合を増加させ、それは身体内部でこれらの粒子の生体分布を改善することにおいてその他の公知のリポソームに基づいた材

50

料と比較して有益である。

【0064】

A. トコフェロール修飾オリゴヌクレオチド

第一の実施形態において、トコフェロール修飾オリゴヌクレオチドを含む構築物が開示される。トコフェロール修飾オリゴヌクレオチドは、親油性末端及び非親油性末端を含む。親油性末端は、トコフェロールを含み、及びトコフェロール誘導体、アルファ-トコフェロール、ベータ-トコフェロール、ガンマ-トコフェロール及びデルタ-トコフェロールからなる群より選択されてもよい。親油性末端は、さらなる実施形態において、パルミトイル、ジパルミトイル、ステアリルまたはジステアリルを含む。

【0065】

トコフェロール修飾オリゴヌクレオチドの非親油性末端は、オリゴヌクレオチドである。オリゴヌクレオチドは、RNAまたはDNAのいずれかである。RNAは、調節性機能を行う阻害性RNA (RNAi) であることができ、低分子阻害性RNA (siRNA)、二本鎖DNAと三本鎖を形成するRNA及びリボザイムからなる群より選択される小RNAiからなる群より選択される。あるいは、RNAは、調節性機能を行うマイクロRNAである。なおさらなる実施形態において、RNAは、piwi相互作用RNA (piRNA) である。DNAは、いくつかの実施形態において、アンチセンスDNAである。

【0066】

本開示に従った使用のために想定されるオリゴヌクレオチドは、約5～約100ヌクレオチドの長さである。また、方法及び組成物は、オリゴヌクレオチドが約5～約90ヌクレオチドの長さ、約5～約80ヌクレオチドの長さ、約5～約70ヌクレオチドの長さ、約5～約60ヌクレオチドの長さ、約5～約50ヌクレオチドの長さ、約5～約45ヌクレオチドの長さ、約5～約40ヌクレオチドの長さ、約5～約35ヌクレオチドの長さ、約5～約30ヌクレオチドの長さ、約5～約25ヌクレオチドの長さ、約5～約20ヌクレオチドの長さ、約5～約15ヌクレオチドの長さ、約5～約10ヌクレオチドの長さであり、及び全てのオリゴヌクレオチド中間体のサイズの長さが、オリゴヌクレオチドが所望の結果を達成することができる程度まで具体的に開示されることが想定される。したがって、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99及び100ヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチドが、想定される。

【0067】

修飾されたオリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチドの特定の例は、修飾されたバックボーンまたは非天然ヌクレオシド間結合を含むものを含む。修飾されたバックボーンを有するオリゴヌクレオチドは、バックボーンにおけるリン原子を保持するもの及びバックボーンにおけるリン原子を有しないものを含む。これらのヌクレオシド間バックボーンにおいてリン原子を有しない修飾されたオリゴヌクレオチドは、「オリゴヌクレオチド」の意味の範囲内であると考慮される。

【0068】

リン原子を含む修飾されたオリゴヌクレオチドバックボーンは、たとえば、ホスホロチオアート、キラルホスホロチオアート、ホスホロジチオアート、リン酸トリエステル、アミノアルキルリン酸トリエステル、3'-アルキレンホスホナート、5'-アルキレンホスホナート及びキラルホスホナートを含むメチル及びその他のアルキルホスホナート、ホスフィナート、3'-アミノホスホロアミダート及びアミノアルキルホスホロアミダートを含むホスホロアミダート、チオノホスホロアミダート、チオノアルキルホスホナート、チオノアルキルリン酸トリエステル、セレノホスフェート及びボラノリン酸を、正常な3

10

20

30

40

50

' - 5' 結合、2' - 5' 結合したこれらの類似体及び1つまたは複数のヌクレオチド間結合が3' - 3'、5' - 5' または2' - 2' 結合である極性を反転したものを有して、含む。また、3' - 大部分のヌクレオチド間結合にて単一の3' - 3' 結合を含む極性を反転したオリゴヌクレオチド、すなわち脱塩基でもよい(ヌクレオチドは失っている、またはその場所にヒドロキシル基を有する)単一の反転されたヌクレオチド残基が、想定される。また塩、混合塩及び遊離酸の形態が、想定される。上のリン含有結合の作成を教示する代表的なアメリカ特許は、U. S. Pat. Nos. 3, 687, 808; 4, 469, 863; 4, 476, 301; 5, 023, 243; 5, 177, 196; 5, 188, 897; 5, 264, 423; 5, 276, 019; 5, 278, 302; 5, 286, 717; 5, 321, 131; 5, 399, 676; 5, 405, 939; 5, 453, 496; 5, 455, 233; 5, 466, 677; 5, 476, 925; 5, 519, 126; 5, 536, 821; 5, 541, 306; 5, 550, 111; 5, 563, 253; 5, 571, 799; 5, 587, 361; 5, 194, 599; 5, 565, 555; 5, 527, 899; 5, 721, 218; 5, 672, 697 及び 5, 625, 050 を含み、その開示は、本明細書において参照により援用される。

#### 【0069】

その中にリン原子を含まない修飾されたオリゴヌクレオチドバックボーンは、短鎖アルキルまたはシクロアルキルヌクレオチド間結合、混合ヘテロ原子及びアルキルまたはシクロアルキルヌクレオチド間結合または1つまたは複数の短鎖ヘテロ原子または複素環式ヌクレオチド間結合によって形成されるバックボーンを有する。これらは、モルホリノ結合を有するもの; シロキサバックボーン; スルフィド、スルホキシド及びスルホンバックボーン; ギ酸アセチル及びチオギ酸アセチルバックボーン; メチレンジ酸アセチル及びチオギ酸アセチルバックボーン; リポアセチルバックボーン; アルケン含有バックボーン; スルファマートバックボーン; メチレンイミノ及びメチレンヒドラジノバックボーン; スルホナート及びスルホンアミドバックボーン; アミドバックボーン; 及び混合されたN、O、S 及びCH<sub>2</sub> 成分部分を有するその他のものを含む。たとえば、U. S. Patent Nos. 5, 034, 506; 5, 166, 315; 5, 185, 444; 5, 214, 134; 5, 216, 141; 5, 235, 033; 5, 264, 562; 5, 264, 564; 5, 405, 938; 5, 434, 257; 5, 466, 677; 5, 470, 967; 5, 489, 677; 5, 541, 307; 5, 561, 225; 5, 596, 086; 5, 602, 240; 5, 610, 289; 5, 602, 240; 5, 608, 046; 5, 610, 289; 5, 618, 704; 5, 623, 070; 5, 663, 312; 5, 633, 360; 5, 677, 437; 5, 792, 608; 5, 646, 269 及び 5, 677, 439 を参照されたい、その開示は、これらの全体が参照により本明細書に援用される。

#### 【0070】

さらに他の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、ヌクレオチド単位の1つまたは複数の糖及び/または1つまたは複数のヌクレオチド間結合の両方が、「天然に存在しない」基で置換されることを模倣する。一つの態様において、この実施形態は、ペプチド核酸(PNA)を想定する。PNA化合物において、オリゴヌクレオチドの糖 - バックボーンは、アミド含有バックボーンで置換される。たとえばUS Patent Nos. 5, 539, 082; 5, 714, 331; 及び 5, 719, 262 並びに Nielsen et al., 1991, Science, , 254: 1497 - 1500 を参照されたい、その開示は、本明細書において参照により援用される。

#### 【0071】

さらに他の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、ホスホロチオアートバックボーン及びヘテロ原子バックボーンをもつオリゴヌクレオチドが提供され、及びUS Patent Nos. 5, 489, 677 及び 5, 602, 240 において記述された - CH<sub>2</sub> - NH - O - CH<sub>2</sub> - 、 - CH<sub>2</sub> - N(CH<sub>3</sub>) - O - CH<sub>2</sub> - 、 - CH<sub>2</sub> - O - N(CH<sub>3</sub>) - CH<sub>2</sub> - 、 - CH<sub>2</sub> - N(CH<sub>3</sub>) - N(CH<sub>3</sub>) - CH<sub>2</sub> - 及び - O - N

10

20

30

40

50

(CH<sub>3</sub>) - CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> - を含む。また、US Patent No. 5,034,506において記述されたモルホリノバックボーン構造をもつオリゴヌクレオチドが、想定される。

【0072】

様々な形態において、オリゴヌクレオチドにおける2つの連続する単量体間の結合は、  
 - CH<sub>2</sub> -、 - O -、 - S -、 - NR<sup>H</sup> -、 > C = O、 > C = NR<sup>H</sup>、 > C = S、 - Si  
 (R<sup>''</sup>)<sub>2</sub> -、 - SO -、 - S(O)<sub>2</sub> -、 - P(O)<sub>2</sub> -、 - PO(BH<sub>3</sub>) -、 - P  
 (O, S) -、 - P(S)<sub>2</sub> -、 - PO(R<sup>''</sup>) -、 - PO(OCH<sub>3</sub>) - 及び - PO  
 (NHR<sup>H</sup>) - から選択される2~4、望ましくは3つの基/原子からなり、RHは水素及  
 びC<sub>1-4</sub>-アルキルから選択され、及びR<sup>''</sup>は、C<sub>1-6</sub>-アルキル及びフェニルから  
 10 選択される。このような結合の図解例は、 - CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> -、 - CH<sub>2</sub> - CO  
 - CH<sub>2</sub> -、 - CH<sub>2</sub> - CHOH - CH<sub>2</sub> -、 - O - CH<sub>2</sub> - O -、 - O - CH<sub>2</sub> - CH  
 2 -、 - O - CH<sub>2</sub> - CH = (次の単量体に対する結合として使用されるときに、R<sup>5</sup>を  
 含む)、 - CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> - O -、 - NR<sup>H</sup> - CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> -、 - CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> - N  
 R<sup>H</sup> -、 - CH<sub>2</sub> - NR<sup>H</sup> - CH<sub>2</sub> -、 - O - CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> - NR<sup>H</sup> -、 - NR<sup>H</sup> - C  
 O - O -、 - NR<sup>H</sup> - CO - NR<sup>H</sup> -、 - NR<sup>H</sup> - CS - NR<sup>H</sup> -、 - NR<sup>H</sup> - C(=N  
 R<sup>H</sup>) - NR<sup>H</sup> -、 - NR<sup>H</sup> - CO - CH<sub>2</sub> - NR<sup>H</sup> - O - CO - O -、 - O - CO - C  
 H<sub>2</sub> - O -、 - O - CH<sub>2</sub> - CO - O -、 - CH<sub>2</sub> - CO - NR<sup>H</sup> -、 - O - CO - NR  
 H<sup>H</sup> -、 - NR<sup>H</sup> - CO - CH<sub>2</sub> -、 - O - CH<sub>2</sub> - CO - NR<sup>H</sup> -、 - O - CH<sub>2</sub> - CH  
 20 2 - NR<sup>H</sup> -、 - CH = N - O -、 - CH<sub>2</sub> - NR<sup>H</sup> - O -、 - CH<sub>2</sub> - O - N = (次の  
 単量体に対する結合として使用されるときに、R<sup>5</sup>を含む)、 - CH<sub>2</sub> - O - NR<sup>H</sup> -、  
 - CO - NR<sup>H</sup> - CH<sub>2</sub> -、 - CH<sub>2</sub> - NR<sup>H</sup> - O -、 - CH<sub>2</sub> - NR<sup>H</sup> - CO -、 - O  
 - NR<sup>H</sup> - CH<sub>2</sub> -、 - O - NR<sup>H</sup> -、 - O - CH<sub>2</sub> - S -、 - S - CH<sub>2</sub> - O -、 - CH  
 2 - CH<sub>2</sub> - S -、 - O - CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> - S -、 - S - CH<sub>2</sub> - CH = (次の単量体  
 に対する結合として使用されるときに、R<sup>5</sup>を含む)、 - S - CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> -、 - S - C  
 H<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> - O -、 - S - CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> - S -、 - CH<sub>2</sub> - S - CH<sub>2</sub> -、 - CH<sub>2</sub>  
 - SO - CH<sub>2</sub> -、 CH<sub>2</sub> - SO<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> -、 - O - SO - O -、 - O - S(O)<sub>2</sub> -  
 O -、 - O - S(O)<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> -、 - O - S(O)<sub>2</sub> - NR<sup>H</sup> -、 - NR<sup>H</sup> - S(O)  
 2 - CH<sub>2</sub> -、 - O - S(O)<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> -、 - O - P(O)<sub>2</sub> - O -、 - O - P(O,  
 S) - O -、 - O - P(S)<sub>2</sub> - O -、 - S - P(O)<sub>2</sub> - O -、 - S - P(O, S) -  
 O -、 - S - P(S)<sub>2</sub> - O -、 - O - P(O)<sub>2</sub> - S -、 - O - P(O, S) - S -、  
 - O - P(S)<sub>2</sub> - S -、 - S - P(O)<sub>2</sub> - S -、 - S - P(O, S) - S -、 - S -  
 P(S)<sub>2</sub> - S -、 - O - PO(R<sup>''</sup>) - O -、 - O - PO(OCH<sub>3</sub>) - O -、 - O -  
 PO(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) - O -、 - O - PO(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S - R) - O -、 - O -  
 - PO(BH<sub>3</sub>) - O -、 - O - PO(NHR<sup>N</sup>) - O -、 - O - P(O)<sub>2</sub> - NR<sup>H</sup>  
 H -、 - NR<sup>H</sup> - P(O)<sub>2</sub> - O -、 - O - P(O, NR<sup>H</sup>) - O -、 CH<sub>2</sub> - P(O)  
 2 - O -、 - O - P(O)<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> - 及び - O - Si(R<sup>''</sup>)<sub>2</sub> - O - であり；その中  
 で - CH<sub>2</sub> - CO - NR<sup>H</sup> -、 - CH<sub>2</sub> - NR<sup>H</sup> - O -、 - S - CH<sub>2</sub> - O -、 - O - P  
 (O)<sub>2</sub> - O - O - P(-O, S) - O -、 - O - P(S)<sub>2</sub> - O -、 - NR<sup>H</sup> P(O  
 )<sub>2</sub> - O -、 - O - P(O, NR<sup>H</sup>) - O -、 - O - PO(R<sup>''</sup>) - O -、 - O - PO(  
 40 CH<sub>3</sub>) - O - 及び - O - PO(NHR<sup>N</sup>) - O - が想定され、RHは、水素及びC<sub>1-4</sub>-  
 アルキルから選択され、及びR<sup>''</sup>は、C<sub>1-6</sub>-アルキル及びフェニルから選択され  
 る。さらなる図解例は、Mesmaeker et. al., 1995, Current Opinion in Structural Biology, 5: 34  
 3-355及びSusan M. Freier and Karl-Heinz Altmann, 1997, Nucleic Acids Research, vol  
 25: pp 4429-4443において与えられる。

【0073】

オリゴヌクレオチドのさらに他の修飾された形態は、U.S. Patent App  
 lication No. 20040219565に詳細に記述され、その開示は、そ  
 50

の全体が本明細書において参照により援用される。

【0074】

また、修飾されたオリゴヌクレオチドは、1つまたは複数の置換された糖部分を含んでもよい。一定の態様において、オリゴヌクレオチドは、2'位置にて以下の1つを含む：OH；F；O-、S-またはN-アルキル；O-、S-またはN-アルケニル；O-、S-またはN-アルキニル；またはO-アルキル-O-アルキル、式中アルキル、アルケニル及びアルキニルは、置換された、または置換されないC<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルキルまたはC<sub>2</sub>~C<sub>10</sub>アルケニル及びアルキニルでもよい。その他の実施形態は、O[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O]<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>、O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCH<sub>3</sub>、O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>、O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>、O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONH<sub>2</sub>及びO(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>を含み、式中n及びmは、1~約10である。その他のオリゴヌクレオチドは、2'位置にて以下の1つを含む：C<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>低級アルキル、置換された低級アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリル、アラルキル、O-アルカリルまたはO-アラルキル、SH、SCH<sub>3</sub>、OCN、Cl、Br、CN、CF<sub>3</sub>、OCF<sub>3</sub>、SOCH<sub>3</sub>、SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、ONO<sub>2</sub>、NO<sub>2</sub>、N<sub>3</sub>、NH<sub>2</sub>、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリル、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、RNA切断基、レポーター基、挿入剤、オリゴヌクレオチドの薬物動態学的特性を改善するための基またはオリゴヌクレオチドの薬力学的特性を改善するための基及び類似の特性を有するその他の置換基。一つの態様において、修飾は、2'-メトキシエトキシ(2'-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>、別名2'-O-(2-メトキシエチル)または2'-MOE)(Martin et al., 1995, Helv. Chim. Acta, 78: 486-504)、すなわち、アルコキシアルコキシ基を含む。その他の修飾は、下で本明細書において実施例において記述したように、2'-ジメチルアミノオキシエトキシ、すなわち、O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>基、別名2'-DMAOEを含み、及び、2'-ジメチルアミノエトキシエトキシ(また、2'-O-ジメチル-アミノ-エトキシ-エチルまたは2'-DMAEOEとして当該技術分野において公知である)、すなわち、2'-O-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>が、下で本明細書において実施例において記述される。

10

20

【0075】

さらに他の修飾は、2'-メトキシ(2'-O-CH<sub>3</sub>)、2'-アミノプロポキシ(2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>)、2'-アリル(2'-CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>)、2'-O-アリル(2'-O-CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>)及び2'-フルオロ(2'-F)を含む。2'-修飾は、アラビノ(上)位置またはリボ(下)位置であってもよい。一つの態様において、2'-アラビノ修飾は、2'-Fである。また、類似の修飾は、オリゴヌクレオチドのその他の位置にて、たとえば、3'末端ヌクレオチドの糖の3'位置にて、または2'-5'結合したオリゴヌクレオチド及び5'末端ヌクレオチドの5'位置において作製されてもよい。また、オリゴヌクレオチドは、ペントフラノシル糖の代わりにシクロブチル部分などの糖模倣体を有してもよい。たとえば、U.S. Pat. Nos. 4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633; 5,792,747; 及び5,700,920を参照されたい、この開示は、これらの全体が参照により本明細書に援用される。

30

40

【0076】

一つの態様において、糖の修飾は、2'-ヒドロキシル基が、糖環の3'または4'炭素原子に結合するロック核酸(LNA)を含み、これにより二環式糖部分を形成する。結合は、一定の態様においてであり、2'酸素原子及び4'炭素原子に架橋するメチレン(-CH<sub>2</sub>-)<sub>n</sub>基であり、式中nは、1または2である。LNA及びその作成は、WO 98/39352及びWO 99/14226において記述される。

50

## 【 0 0 7 7 】

また、オリゴヌクレオチドは、塩基修飾または置換を含んでいてもよい。本明細書に使用される「修飾されていない」、または「天然の」塩基は、プリン塩基アデニン（A）及びグアニン（G）及びピリミジン塩基チミン（T）、シトシン（C）及びウラシル（U）を含む。修飾された塩基は、5 - メチルシトシン（5 - me - C）、5 - ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2 - アミノアデニン、6 - メチル及びアデニン及びグアニンのその他のアルキル誘導体、2 - プロピル及びアデニン及びグアニンのその他のアルキル誘導体、2 - チオウラシル、2 - チオチミン及び2 - チオシトシン、5 - ハロウラシル及びシトシン、5 - プロピニルウラシル及びシトシン及びピリミジン塩基のその他のアルキニル誘導体、6 - アゾウラシル、シトシン及びチミン、5 - ウラシル（擬ウラシル）、4 - チオウラシル、8 - ハロ、8 - アミノ、8 - チオール、8 - チオアルキル、8 - ヒドロキシル及びその他の8置換されたアデニン及びグアニン、5 - ハロ特に5 - プロモ、5 - トリフルオロメチル及びその他の5置換されたウラシル及びシトシン、7 - メチルグアニン及び7 - メチルアデニン、2 - F - アデニン、2 - アミノアデニン、8 - アザグアニン及び8 - アザアデニン、7 - デアザグアニン及び7 - デアザアデニン及び3 - デアザグアニン及び3 - デアザアデニンなどのその他の合成及び天然塩基を含む。さらなる修飾された塩基は、フェノキサジンシチジン（1H - ピリミド[5, 4 - b][1, 4]ベンゾキサジン - 2(3H) - オン）、フェノサイアジンシチジン（1H - ピリミド[5, 4 - b][1, 4]ベンゾチアジン - 2(3H) - オン）、置換されたフェノキサジンシチジン（たとえば9 - (2 - アミノエトキシ) - H - ピリミド[5, 4 - b][1, 4]ベンゾキサジン - 2(3H) - オン）などのG - クランプ、カルバゾールシチジン（2H - ピリミド[4, 5 - b]インドール - 2 - オン）、ピリドインドールシチジン（H - ピリド[3', 2': 4, 5]ピロロ[2, 3 - d]ピリミジン - 2 - オン）などの三環系ピリミジンを含む。また、修飾された塩基は、プリンまたはピリミジン塩基がその他のヘテロ環で置換されたもの、たとえば7 - デアザ - アデニン、7 - デアザグアノシン、2 - アミノピリジン及び2 - ピリドンを含んでいてもよい。さらなる塩基は、U . S . Pat . No . 3 , 6 8 7 , 8 0 8 において開示されたもの、The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858 - 859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990で開示されたもの、Englisch et al., 1991, Angewandte Chemie, International Edition, 30: 613によって開示されたもの及びSanghvi, Y. S., Chapter 15, Antisense Research and Applications, pages 289 - 302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993によって開示されたものを含む。これらの塩基のいくつかは、結合親和性を増加させるために有用であり、及び5 - 置換されたピリミジン、6 - アザピリミジン及びN - 2、N - 6及びO - 6置換されたプリンを含み、及び2 - アミノプロピルアデニン、5 - プロピニルウラシル及び5 - プロピニルシトシンを含む。5 - メチルシトシン置換は、0 . 6 - 1 . 2 によって核酸二重鎖安定度を上昇させることを示し、及び一定の態様において、2' - O - メトキシエチル糖修飾と組み合わせられる。U . S . Pat . Nos . 3 , 6 8 7 , 8 0 8 , U . S . Pat . Nos . 4 , 8 4 5 , 2 0 5 ; 5 , 1 3 0 , 3 0 2 ; 5 , 1 3 4 , 0 6 6 ; 5 , 1 7 5 , 2 7 3 ; 5 , 3 6 7 , 0 6 6 ; 5 , 4 3 2 , 2 7 2 ; 5 , 4 5 7 , 1 8 7 ; 5 , 4 5 9 , 2 5 5 ; 5 , 4 8 4 , 9 0 8 ; 5 , 5 0 2 , 1 7 7 ; 5 , 5 2 5 , 7 1 1 ; 5 , 5 5 2 , 5 4 0 ; 5 , 5 8 7 , 4 6 9 ; 5 , 5 9 4 , 1 2 1 , 5 , 5 9 6 , 0 9 1 ; 5 , 6 1 4 , 6 1 7 ; 5 , 6 4 5 , 9 8 5 ; 5 , 8 3 0 , 6 5 3 ; 5 , 7 6 3 , 5 8 8 ; 6 , 0 0 5 , 0 9 6 ; 5 , 7 5 0 , 6 9 2 及び5 , 6 8 1 , 9 4 1を参照され、その開示は、参照により本明細書に援用される。

## 【 0 0 7 8 】

10

20

30

40

50

「修飾された塩基」またはその他の類似の用語は、天然塩基（たとえば、アデニン、グアニン、シトシン、ウラシル及び/またはチミン）と対にすることができる、及び/または天然に存在しない塩基と対にすることができる組成物をいう。一定の態様において、修飾された塩基は、15、12、10、8、6、4または2以下の $T_m$ 差異を提供する。例示的な修飾された塩基は、EP 1 072 679及びWO 97/12896において記述される。

#### 【0079】

「核酸塩基」によって、天然に存在する核酸塩基アデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）、チミン（T）及びウラシル（U）並びにキサンチン、ジアミノプリン、8-オキソ-N<sup>6</sup>-メチルアデニン、7-デアザキサンチン、7-デアザグアニン、N<sup>4</sup>, N<sup>4</sup>-エタノシトシン、N', N'-エタノ-2, 6-ジアミノプリン、5-メチルシトシン（mC）、5-(C<sup>3</sup>-C<sup>6</sup>)-アルキニル-シトシン、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、擬イソシトシン、2-ヒドロキシ-5-メチル-4-トリアゾロピリジン、イソシトシン、イソグアニン、イノシンなどの天然に存在しない核酸塩基及び Benner et al., U.S. Pat. No. 5,432,272及び Susan M. Freier and Karl-Heinz Altmann, 1997, Nucleic Acids Research, vol. 25: pp 4429-4443において記載された「天然に存在しない」核酸塩基を意味する。したがって、用語「核酸塩基」は、公知のプリン及びピリミジンヘテロ環のみでなく、また複素環式類似体及びその互変異性体を含む。さらなる天然に存在する、及び天然に存在しない核酸塩基は、U.S. Pat. No. 3,687,808 (Merigan, et al.)において、Chapter 15 by Sanghvi, in Antisense Research and Application, Ed. S. T. Crooke and B. Lebleu, CRC Press, 1993において、Englisch et al., 1991, Angewandte Chemie, International Edition, 30: 613-722（特にページ622及び623を参照されたい、及びthe Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, J. I. Kroschwitz Ed., John Wiley & Sons, 1990, pages 858-859, Cook, Anti-Cancer Drug Design 1991, 6, 585-607において、これらの全体が参照により本明細書に援用される）において開示されたものを含む。用語「ヌクレオシド塩基」または「塩基単位」は、最も古典的意味でヌクレオシド塩基でない一定の「普遍的な塩基」を含む核酸塩基のように働くが、ヌクレオシド塩基のように働くことができる複素環式化合物などの化合物を含むことが意図される。特に、普遍的な塩基として言及されるのは、3-ニトロピロール、任意に置換されたインドール（たとえば、5-ニトロインドール）及び任意に置換されたヒポキサンチンである。その他の望ましい普遍的な塩基は、ピロール、ジアゾールまたはトリアゾール誘導体を含み、当該技術分野において公知のこれらの普遍的な塩基を含む。

#### 【0080】

##### B. トコフェロール修飾オリゴヌクレオチドを作製する方法

第2の実施形態において、トコフェロールオリゴヌクレオチドを作製する方法が開示される。最初に、オリゴヌクレオチド及びホスホラミダイト修飾トコフェロールが提供される。次いで、オリゴヌクレオチドは、ホスホラミダイト修飾トコフェロールに曝露されて、トコフェロール修飾オリゴヌクレオチドを作製する。限定することを意味しないが、当業者に対する化学は、オリゴヌクレオチドにトコフェロールを付着させるのに使用することができ、アミド結鎖またはクリック化学を含む。

#### 【0081】

##### C. リポソーム粒子

第3の実施形態において、リポソーム粒子が、開示される。リポソーム粒子は、少なく

10

20

30

40

50

とも実質的に球状形状、内側及び外側を有し、及び脂質二重層を含む。脂質二重層は、第1の脂質及び第2の脂質からなる。第1の脂質及び第2の脂質は、いくつかの実施形態において、同じである。さらなる実施形態において、第1の脂質及び第2の脂質は、異なる。

【0082】

第1の脂質は、脂質のホスホコリンファミリーまたは脂質のホスホエタノールアミンファミリーから選ばれる。限定することを意味しないが、第1の脂質は、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DOPC)、1,2-ジミリストイル-sn-ホスファチジルコリン(DMPC)、1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-ホスファチジルコリン(POPC)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-(1'-rac-グリセロール)(DSPG)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-(1'-rac-グリセロール)(DOPG)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DPPC)、1,2-ジ-(9Z-オクタデセノイル)-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)及び1,2-ジヘキサデカノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DPPE)からなる群より選択される。

10

【0083】

第2の脂質は、脂質のホスホコリンファミリーまたは脂質のホスホエタノールアミンファミリーから選ばれる。限定することを意味しないが、第2の脂質は、1,2-ジオレオイルsn-グリセロ-3-ホスホコリン(DOPC)、1,2-ジミリストイル-sn-ホスファチジルコリン(DMPC)、1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-ホスファチジルコリン(POPC)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ3-ホスホ-(1'-rac-グリセロール)(DSPG)、1,2-ジオレオイルsn-グリセロ-3-ホスホ-(1'-rac-グリセロール)(DOPG)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ3-ホスホコリン(DSPC)、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DPPC)、1,2-ジ-(9Z-オクタデセノイル)-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)及び1,2-ジヘキサデカノイル-sn-グリセロ3-ホスホエタノールアミン(DPPE)からなる群より選択される。

20

【0084】

リポソーム粒子は、トコフェロール修飾オリゴヌクレオチドの親油性末端が脂質二重層に吸収されるトコフェロール修飾オリゴヌクレオチドをさらにも含む。トコフェロールは、-トコフェロール、-トコフェロール、-トコフェロール及びデルタ-トコフェロールからなる群より選択される。トコフェロール修飾オリゴヌクレオチドの非親油性末端は、オリゴヌクレオチドである。このオリゴヌクレオチドは、種々の実施形態において、RNAまたはDNAのいずれかである。RNAは、調節機能を実行する阻害性RNA(RNAi)であることができ、種々の実施形態において、低分子阻害性RNA(sRNA)、二本鎖DNAと三本鎖を形成するRNA及びリボザイムからなる群より選択される。あるいは、及びさらなる実施形態において、RNAは、調節機能を実行するマイクロRNAである。DNAは、任意にアンチセンスDNAである。なおさらなる実施形態において、RNAは、piwi相互作用RNA(piRNA)である。

30

40

【0085】

もう一つの方法において、本開示は、リポソーム粒子、実質的に球状形状を有する前記リポソーム粒子、複数の脂質基を含む脂質二重層を含む前記リポソーム粒子；及びオリゴヌクレオチドを提供する。種々の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、修飾オリゴヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、脂質基の複数の、脂質のホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール及びホスファチジルエタノールアミンファミリーからなる群より選択される脂質を含む。オリゴヌクレオチドは、さらなる実施形態において親油性連結基を含むオリゴヌクレオチド-脂質抱合体であり、前記親油性連結基は、脂質二重層に吸着される。親油性連結基は、種々の実施形態において、トコフェロール、

50

パルミトイル、ジパルミトイル、ステアリル、ジステアリルまたはコレステロールを含む。

【0086】

あるいは、リポソーム粒子は、リポソーム粒子の内側にカプセル化された治療薬をさらに含む。さらなる実施形態において、本開示のリポソーム粒子は、リポソーム粒子に直接または間接的のいずれかで付着された治療薬をさらに含む。間接的な付着は、たとえば及び限定されないが、オリゴヌクレオチドに対して付着され、これが次いでリポソーム粒子に付着されたものを含む。

【0087】

いくつかの実施形態において、リポソーム粒子は、リポソーム粒子の内側にカプセル化された診断薬をさらに含む。この診断薬は、いくつかの実施形態において、ガドリニウムである。

10

【0088】

本開示のリポソーム粒子の表面上のオリゴヌクレオチドの面密度に関して、本明細書において記述したとおりのリポソーム粒子は、その表面上に約1～約100オリゴヌクレオチドを含むことが想定される。種々の実施形態において、リポソーム粒子は、約10～約100または約10～約90または約10～約80または約10～約70または約10～約60または約10～約50または約10～約40または約10～約30または約10～約20のオリゴヌクレオチドをその表面上に含む。さらなる実施形態において、リポソーム粒子は、少なくとも約5、10、20、30、40、50、60、70、80、90または100オリゴヌクレオチドをその表面上に含む。

20

【0089】

D. リポソーム粒子を作製する方法

第4の実施形態において、リポソーム粒子を作製する方法が開示される。最初に、リン脂質、溶媒及びトコフェロール修飾オリゴヌクレオチドが提供される。次いで、リン脂質を溶媒に添加して、リポソームを含む第1の混合物を形成する。第1の混合物中のリポソームのサイズは、約100ナノメートル～約150ナノメートルの間である。

【0090】

次に、リポソーム及び小単層小胞(SUV)を含む第2の混合物を作製するために、リポソームを破壊する。第2の混合物中のリポソーム及びSUVのサイズは、約20ナノメートル～約150ナノメートルの間である。

30

【0091】

次に、約20ナノメートル～約50ナノメートルの間の粒径を有するSUVを第2の混合物から単離する。最後に、トコフェロール修飾オリゴヌクレオチドを単離されたSUVに添加して、リポソーム粒子を作製する。

【0092】

本開示の方法によって作製したリポソーム粒子の粒径は、約50ナノメートル以下である。いくつかの実施形態において、複数のリポソーム粒子が生成され、及び複数の粒子は、約50ナノメートル以下(たとえば、約5ナノメートル～約50ナノメートルまたは約5ナノメートル～約40ナノメートルまたは約5ナノメートル～約30ナノメートルまたは約5ナノメートル～約20ナノメートルまたは約10ナノメートル～約50ナノメートルまたは約10ナノメートル～約40ナノメートルまたは約10ナノメートル～約30ナノメートルまたは約10ナノメートル～約20ナノメートル)の平均粒径を有する。さらなる実施形態において、本開示の方法によって作製したリポソーム粒子の複数における粒子は、約20ナノメートル以下または約25ナノメートル以下または約30ナノメートル以下または約35ナノメートル以下、または約40ナノメートル以下または約45ナノメートル以下の平均粒径を有する。

40

【0093】

もう一つの方法において、いくつかの態様において、本開示は、リポソーム粒子を作製する方法であって、溶媒にリン脂質を添加して第1の混合物を形成することであって、前

50

記第1の混合物は、複数のリボソームを含むこと；前記複数のリボソームを破壊して第2の混合物を作り出すことであって、前記第2の混合物は、リボソーム及び小単層小胞（SUV）を含むこと；前記第2の混合物から前記SUVを単離することであって、前記SUVは、約20ナノメートルと50ナノメートルとの間の粒径を有すること；単離されたSUVにオリゴヌクレオチドを添加してリボソーム粒子を作製することを含む方法を提供する。

【0094】

E. 遺伝子制御/療法におけるリボソーム粒子の使用

本明細書に提供された遺伝子産物発現を阻害するための方法は、標的遺伝子産物の発現が、リボソームSNA非存在下での遺伝子産物発現と比較して少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%または100%まで阻害されたものをを含む。その他の文言において、提供される方法は、本質的に標的遺伝子産物の発現の阻害の任意の程度を生じるものを包含する。

10

【0095】

阻害の程度は、体液試料からもしくは生検試料からインビボで、または当該技術分野において周知の撮像技術によって決定される。あるいは、阻害の程度は、一般にリボソームSNAの特異的タイプ及び特異的オリゴヌクレオチドの使用から生じるインビボで予想することができる阻害の程度の予測可能な計測として、細胞培養アッセイで決定される。

20

【0096】

本開示のいくつかの態様において、リボソーム粒子は、遺伝子阻害性機能、並びに治療薬送達機能の両方を実行すると考えられる。このような態様において、治療薬は、本開示のリボソーム粒子にカプセル化し、及び粒子は、加えて、標的遺伝子発現の効果阻害に影響を及ぼすようにデザインされた一つまたは複数のオリゴヌクレオチドで機能化される。さらなる実施形態において、治療薬は、本開示のリボソーム粒子に付着される。

30

【0097】

種々の態様において、方法は、標的ポリヌクレオチドに100%相補的、すなわち完全マッチであるオリゴヌクレオチドの使用を含み、その一方で、その他の態様において、オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さにわたってポリヌクレオチドに少なくとも（以上を意味する）約95%相補的、オリゴヌクレオチドが所望の程度の標的遺伝子産物の阻害を達成することができる程度にオリゴヌクレオチドの長さにわたってポリヌクレオチドに少なくとも約90%、少なくとも約85%、少なくとも約80%、少なくとも約75%、少なくとも約70%、少なくとも約65%、少なくとも約60%、少なくとも約55%、少なくとも約50%、少なくとも約45%、少なくとも約40%、少なくとも約35%、少なくとも約30%、少なくとも約25%、少なくとも約20%相補的である。

40

【0098】

アンチセンス化合物の配列は、特異的にハイブリダイズ可能であるために、その標的核酸のものに100%相補的である必要がないことは、当該技術分野において十分に理解されている。その上、オリゴヌクレオチドは、介在または隣接するセグメントがハイブリダイゼーションイベントに含まれないように、一つまたは複数のセグメントにわたってハイブリダイズしてもよい（たとえば、ループ構造またはヘアピン構造）。パーセント相補性は、オリゴヌクレオチドの長さにわたって決定される。たとえば、アンチセンス化合物の20ヌクレオチドのうち18が100ヌクレオチドの全長の標的ポリヌクレオチドにおける20ヌクレオチド領域に相補的であるアンチセンス化合物を考えると、オリゴヌクレオチドは、90パーセント相補的だろう。この実施例において、残りの非相補的ヌクレオチドは、相補的な核酸塩基とクラスター形成しても、または点在してもよく、及び互いに

50

または相補的なヌクレオチドに隣接する必要がない。標的核酸の領域とのアンチセンス化合物のパーセント相補性は、当該技術分野において公知のBLASTプログラム（基本の局所的整列サーチツール）及びPowerBLASTプログラムを使用してルーチンで決定することができる（Altschulet al, J Mol Biol, 1990、215、403 - 410； Zhang及びMadden、Genome Res、1997、7、649 - 656）。

#### 【0099】

したがって、第5の実施形態において、遺伝子制御療法においてリボソーム粒子を利用する方法が提供される。この方法は、前記ポリヌクレオチドの全体または一部に1つまたは複数の相補的なオリゴヌクレオチドと前記遺伝子産物をコードするポリヌクレオチドをハイブリダイズする工程であって、前記オリゴヌクレオチドがリボソーム粒子に付着される工程を含み、前記ポリヌクレオチドと前記オリゴヌクレオチドの間のハイブリダイズは、前記遺伝子産物の発現を阻害するのに十分な相補性の程度で前記ポリヌクレオチドの長さによって生じる。リボソーム粒子は、約50ナノメートル以下である直径を有する。遺伝子発現の阻害は、インビボでまたはインビトロで生じてよい。

10

#### 【0100】

この方法において利用されるオリゴヌクレオチドは、RNAまたはDNAのいずれかである。RNAは、調節機能を実行する阻害性RNA（RNAi）であることができ、種々の実施形態において、低分子阻害性RNA（siRNA）、二本鎖DNAで三本鎖を形成するRNA及びリボザイムからなる群より選択される。あるいは、RNAは、調節機能を実行するマイクロRNAである。DNAは、いくつかの実施形態において、アンチセンスDNAである。

20

#### 【0101】

本開示のもう一つの態様において、リボソーム粒子は、外傷性脳損傷（TBI）を治療するための方法において使用される。米国において、軍隊において244,000以上のTBIの症例が2000年以降にあり、及びそれは45歳未満の人々における主要な死因及び障害である。さらに、「軽度の重症度」症例の神経性の予後予測することは現在困難であり、及び傷害（たとえば、炎症、虚血及びアポトーシス）の二次的段階を治療するのは、非常に困難である。

#### 【0102】

したがって、いくつかの実施形態において、本開示の方法は、TBIに関係する遺伝子産物の発現をターゲットし、及び調節するようにデザインされたリボソーム粒子の使用に向けられる。たとえば及び限定されないが、標的遺伝子産物は、ヒストンデアセチラーゼ（HDAC）、BCL2関連X（BAX）、マトリックスメタロペプチダーゼ/マトロプロテイナーゼ（MMP、限定されないが、マトリックスメタロペプチダーゼ9（MMP-9）を含む）、低酸素誘導因子（HIF、限定されないが、低酸素誘導性演算項目1アルファ（HIF1-）を含む）及びカルパインからなる群から選択される。

30

#### 【0103】

##### F. 免疫制御におけるリボソーム粒子の使用

トール様受容体（TLR）は、先天性免疫系の制御において重要な役割を果たすセンチネル細胞において発現されるタンパク質のクラスである。哺乳動物の免疫系は、2つの一般的なストラテジーを使用して感染性の疾患と戦う。病原体曝露は、免疫賦活性サイトカイン、ケモカイン及び多反応性IgM抗体の産生によって特徴づけられる先天性免疫応答を迅速にトリガーする。先天性免疫系は、感染性微生物の多様な群によって発現される病原関連分子パターン（PAMP）に対する曝露によって活性化される。PAMPの認識は、受容体のトール様ファミリーのメンバーによって媒介される。特異的オリゴヌクレオチドに対して応答するTLR4、TLR8及びTLR9などのTLR受容体は、特別な細胞内コンパートメントに位置して、エンドソームと呼ばれる。TLR4、TLR8及びTLR9受容体の調整の機構は、DNA-タンパク質相互作用に基づいている。

40

#### 【0104】

50

細菌DNAにおいて見いだされたものに類似するCpGのモチーフを含む合成免疫賦活性オリゴヌクレオチドは、TLR受容体の類似の応答を刺激する。したがって、免疫調節性ODNは、免疫欠損及び癌の治療を含む種々の潜在的な治療上の用途を有する。免疫調節性ODNで機能化されたりポソームナノ粒子の使用は、優先的な取り込みを増大及びしたがって、治療有効性を増大させるだろう。注目すべきことに、本明細書に提供されたものなどのより小さい粒子(25~40nm)は、より効率的に組織バリアを貫通し、したがって、先天性免疫応答のより有効な活性化を提供する。したがって、機能的CpGモチーフ含有DNAで機能化され安定化されたサイズが30nmの小さいリポソームナノ粒子は、増強された治療効果を提供するだろう。

#### 【0105】

免疫系のダウンレギュレーションは、トール様受容体の発現を担う遺伝子をロックダウンすることを含むだろう。このアンチセンスアプローチは、特異的アンチセンスオリゴヌクレオチド配列で機能化された任意のトール様タンパク質の発現をロックアウトするリポソームナノ粒子の使用を含む。

#### 【0106】

したがって、第6の実施形態において、トール様受容体を調節するためにリポソーム粒子を利用する方法が開示される。本方法は、それぞれTLRアゴニストまたはTLRアンタゴニストを用いることによりトール様受容体をアップレギュレートする、またはダウンレギュレートする。本方法は、リポソーム粒子とトール様受容体を有する細胞に接触することを含む。調節されるトール様受容体は、トール様受容体1、トール様受容体2、トール様受容体3、トール様受容体4、トール様受容体5、トール様受容体6、トール様受容体7、トール様受容体8、トール様受容体9、トール様受容体10、トール様受容体11、トール様受容体12及びトール様受容体13を含む。

#### 【0107】

##### G. ナノフレア技術におけるリポソーム粒子の使用

本開示のさらなる態様において、リポソーム粒子は、細胞内標的を検出するために使用される。このような方法は、U.S. Patent Number 8,507,200において開示され、これはその全体が本明細書に参照により援用される。

#### 【0108】

簡潔には、標的分子に対して特異的である認識配列を含むオリゴヌクレオチドを、本明細書において記述したリポソーム粒子に付着させる。したがって、本明細書に使用される「認識配列」は、関心対象の標的分子に部分的に、または完全に相補的である配列を意味することが理解される。

#### 【0109】

認識配列を含む付着したオリゴヌクレオチドをもつリポソーム粒子は、まず最初にリポーター配列と会合する。本明細書に使用される、「リポーター配列」は、部分的にまたは完全に相補的な、及びしたがって、認識配列にハイブリダイズすることができる配列を意味することが理解される。リポーター配列は、検出可能標識(限定されないが、蛍光体など)で標識され、及びまたナノフレアともいわれる。リポーター配列は、種々の態様において少数の、同じまたは認識配列より多くの基部からなり、その結果その標的分子に対する認識配列の結合により、ハイブリダイズされたりポーター配列の放出を生じさせ、これによってリポーター配列に付着された標識の検出可能な、及び測定可能な変化を生じる。

#### 【0110】

本発明は、以下の実施例によって図示され、これは任意の方法に限定することは意図されない。

#### 【実施例】

#### 【0111】

##### 実施例1 - 全般

全ての試薬は、最高の純度で供給元から得て、及び任意のさらなる精製を伴わずに使用した。HPLCは、Varian Prostarシステムで行った。UV/Viは、

10

20

30

40

50

Varian Cary 300 分光光度計で記録した。蛍光スペクトルは、SPEX FluoroLog 蛍光光度計で得た。

【0112】

実施例 2 - オリゴヌクレオチドの合成

オリゴヌクレオチドは、自動 DNA シンセサイザー (ABI 3400, Applied Biosystems, Inc) で 1.0 マイクロモル濃度のスケールで合成した。水酸化アンモニウム水溶液 (55、14 時間) での切断及び脱保護の後、DNA を逆相 HPLC によって精製して、UV 分光計によって定量化した。

【0113】

実施例 3 - リポソーム粒子の合成

脂質単量体 (クロロホルムに溶解した 40  $\mu\text{mol}$  の 1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DOPC)) を 20 mL バイアルに添加して、次いで一晩凍結乾燥前に蒸発させて、溶媒を除去して薄い脂質フィルムを生じる。次いで、フィルムを HBS 緩衝液 (50 mL, 20 mM HEPES 緩衝液, pH 7.4 にて 150 mM NaCl) で再水和して、続いて激しく混合してリポソーム懸濁液を形成し、次いでパルス化することなく 30 分間氷浴においてプローブ音波破碎した。次いで、生じる懸濁液を 104, 986 g 及び 90 分間 4 にて超遠心分離機にした。リン脂質濃度は、元素分析を使用して算出した。

10

【0114】

次に、DNA/RNA 鎖を、Expedite Nucleotide Synthesis System で標準的な固相ホスホアミダイト化学を経て - トコフェロール修飾で合成した。鎖を固体支持体から切断して、逆相高速液体クロマトグラフィーによって精製した。

20

【0115】

最後に、適切な DNA/RNA (16  $\mu\text{M}$ ) を 1.3 mM の SUV 溶液に添加して、一晩攪拌させた。次いで、粒子を 100 kDa のカットオフの遠心分離フィルタによって翌日精製した。次いで、粒子を TEM 及び動的散乱法によって解析した。FITC でカプセル化し、及び Cy5 標識した DNA で表面機能化したリポソーム粒子のゲル電気泳動を図 13 に示した。

【0116】

実施例 4 - リポソーム粒子の細胞取り込みの可視化

LSNA の細胞取り込みを視覚化するために、HeLa 細胞を一晩 Lab-Tek (登録商標); II Chamber #1.5 German Coverglass System (Nalge Nunc International) で培養し、及び Cy5 - 標識した LSNA (DNA 濃度の 0.1  $\mu\text{M}$ ) と共にインキュベートした。16 時間のインキュベーションの後、培地を新鮮な培地で置き換えて、生細胞を、製造業者の説明書に従ってヘキスト 33342 (Invitrogen) で染色した。全ての画像は、Maitai 3308 レーザー (Spectra-Physics) を使用して 40x 倍率にて Zeiss 510 LSM で得た。蛍光発光は、390 - 465 nm 及び 650 - 710 nm にて、それぞれ 729 及び 633 nm での励起 (図 5) で収集した。図 5 の左パネルは、HeLa 細胞へのリポソームフルオレセインの侵入を示し、その一方で、図 5 の右パネルは、フルオレセインの共局在性を示し、及び Cy5 は、細胞内への全てのリポソームの送達を示唆する。

30

40

【0117】

実施例 4 - 細胞生存度

リポソーム粒子の細胞毒性は、Alamar Blue (登録商標) Assay (Invitrogen) で評価した。簡潔には、HeLa 細胞を 200  $\mu\text{L}$  の培地中の 96 ウェルプレートに播種して、24 時間インキュベートした。次いで、細胞を FITC カプセル化されたそのままの SUV 及び LSNA 機能化 DNA で種々の濃度のリン脂質濃度 (0、32.5、65、162.5  $\mu\text{M}$ ) にて処理した。16 時間後、培地を除去し、細胞を

50

3回PBSで洗浄して、次いで90 $\mu$ Lの新鮮な培養培地を10 $\mu$ Lのアラマーブルー試薬を加えて4時間インキュベートした。次いで、560nmにて励起及び590nmにて発光を確認することによってこれらを解析した。

#### 【0118】

##### 実施例5 - SUVの作成

##### 材料

1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン脂質単量体 (DOPC) は、乾燥粉末形態で、またはクロロホルム溶液中のいずれかでAvanti Polar Lipids, Inc. から購入し、さらに精製することなく使用した。ホスホラミダイト及びその他のDNA合成試薬は、Glen Research, Incから最高の純粋にて購入し、及び製造業者から受けとったときに使用した。

10

#### 【0119】

##### 計測手段

凍結乾燥は、Freezone Lyophilizer (Labconco, Kansas City, MO) を使用して実施した。音波処理は、パルスにすることなく20kHzの40%強度にてチタン - 合金固体プローブ超音波処理器 (500ワットのVibra-Cell (商標) VC 505, Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT) セットを使用して行った。超遠心分離は、Beckman - Coulter Avanti J - 30I (Beckmann - Coulter, Inc., Indianapolis, IN) を使用して実施した。透過型電子顕微鏡法 (TEM) は、日立 - 2300 STEM電子顕微鏡を使用して行った。動的光散乱法 (DLS) は、Malvern Zetasizer Nano - ZS (Malvern Instruments, UK) を使用して収集した。MALDI - ToF解析は、Bruker Autoflex III SmartBeam質量分析計 (Bruker Daltonics Inc, MA, USA) を使用して行った。蛍光測定は、Fluorlog - 3システム (HORIBA Jobin Yvon Inc, NJ, USA) で実施した。UV - Vi分光法は、Cary 5000 UV - Vi分光光度計を使用して収集した。(Varian Inc., CA, USA)。

20

#### 【0120】

##### オリゴヌクレオチド合成

オリゴヌクレオチドは、自動化固体支持体ホスホラミダイト合成を使用してExpedite 8909 Nucleotide Synthesis System (MM48 Synthesizer, Bioautomation) で活性化因子としてDCIを使用して合成した。トコフェロールホスホラミダイトは、延長した15分の結合時間を使用して自動化されたプロトコルによって結合した。固相合成の完了後、オリゴヌクレオチド鎖を水性水酸化アンモニウム (28 - 30%の水溶液、Aldrich) での一晩の処理を使用して固体支持体から切断し、その後に窒素ガス (貯蔵窒素を使用した) の穏やかな流れを使用して、過剰アンモニアを除去した。オリゴヌクレオチドを、TEAA (トリエチルアンモニウムアセテート) 緩衝液及びアセトニトリルの勾配 (勾配: 30分にわたって10% v/vから100% v/vアセトニトリル) を使用する逆相高圧液体クロマトグラフィー (HPLC, Varian) でMicrosorb C18カラムを使用して精製した。生成物を含む収集した画分を凍結乾燥器で濃縮した。得られたオリゴヌクレオチドをナノピュア水に再懸濁して、純度を、MALDI - TOF及び変性アクリルアミドゲル電気泳動技術を使用して解析した。

30

40

【表 1】

| 鎖の名称                     | 用途                    | 配列 (5' - 3')   |
|--------------------------|-----------------------|--|
| Cy5 標識 T <sub>25</sub> 鎖 | サイズ解析、DNA 密度決定及び安定度研究 | 5' - Cy5 - T <sub>25</sub> - トコフェロール - 3' (配列番号: 1)                        |
| 融解物鎖 1                   | 融解物解析                 | 5' - トコフェロール - A <sub>10</sub> - TCT CT T GGA - 3' (配列番号: 2)               |
| 融解物鎖 2                   | 融解物解析                 | 5' - TGC GTA GAC - A <sub>10</sub> トコフェロール - 3' (配列番号: 3)                  |
| リンカー鎖                    | 融解物解析                 | 5' - ACG CAT CTG TCC AA G AGA - 3' (配列番号: 4)                               |
| HER2 アンチセンス              | 遺伝子制御                 | 5' - CTC CAT GGT GCT CA C - T <sub>10</sub> - トコフェロール - 3' (配列番号: 5)       |
| Cy5 標識 HER2 アンチセンス       | イメージング及び細胞の取り込み       | 5' - Cy5 - CTC CAT GGT G CT CAC - T <sub>10</sub> - トコフェロール - 3' (配列番号: 6) |
| スクランブル化 アンチセンス           | 遺伝子制御                 | 5' - GAG CTG CAC GCT GC C GTC A - T <sub>10</sub> - トコフェロール - 3' (配列番号: 7) |

10

20

表 1. 実験で使用されるオリゴヌクレオチド配列

## 【0121】

## 小単層小胞の合成

脂質単量体保存液の量 (25 - 50 mg) を 20 mL バイアルに添加して、25 mL ガラスバイアルに置き、及び溶媒を、窒素気流を使用して慎重に蒸発した。得られた脂質単量体は、残留するクロロホルムを除去するために真空下でさらに一晚乾燥させた。次いで、生じる脂質フィルムを 20 mM HBS (5.0 mL) で水化し、続いてバイアルをボルテックスしてリポソーム懸濁液を形成した。この懸濁液を 10 日より下 (氷水浴で冷却) に混合脂質の温度を保持して、さらに 30 分間プローブ音波破碎した。音波処理の後、懸濁液を 12 にて 90 分間 100,000 × g にて超遠心分離に供した。遠心分離の後、所望の小単層小胞 (SUV) を含む透明な上清を収集して、ペレットを捨てた (図 1)。より狭いサイズ分布で粒子を得るために、得られた SUV 粒子をポリカーボネート膜 (30 nm 孔径) を通してさらに押し出した。

30

## 【0122】

得られた SUV を、動的光散乱法 (DLS) 及び透過型電子顕微鏡 (TEM) 技術 (図 11) を使用してさらに解析した。所与の試料における最終的なリン脂質濃度は、誘導結合プラズマ質量分光法 (ICP-MS) を介して決定した。溶液におけるリポソームの数及びリポソームの表面上のオリゴヌクレオチドの数は、図 12 において示した方程式に従って算出することができる。

40

## 【0123】

## DNA 機能性リポソーム SNA の作成

リポソーム SNA を調製するために、15 μM の所望の 3' - トコフェロール修飾オリゴヌクレオチドを SUV 溶液に添加し (1.3 mM の [リン脂質])、及び一晚振盪させた。次いで、生じる溶液を架橋されたセファロースカラム (Separose CL 4B, Aldrich) でのゲル濾過クロマトグラフィーを介して精製した。粒径分布は、DLS を使用して解析した。TEM を使用してリポソーム SNA を観察するために、試料をプラズマ洗浄炭素 TEM グリッド上に置き、及び酢酸ウラニル (2% w/v) の溶液でさらに染色した (2 分間染色し、次いで水で洗浄し、及び乾燥)。次いで、乾燥したグリッドを日立 - 2300 STEM 電子顕微鏡下で撮像した。

50

## 【0124】

## リポソームSNAのゲル電気泳動

全てのゲル電気泳動実験は、 $1 \times$ TBE (トリスボラート、EDTA) 緩衝液中で1%のアガロースゲルにおいて行った。試料は、充填薬剤としてグリセロール (30% v/v、5  $\mu$ L) を用いて、ウェルに充填した。ゲルチャンバーを $1 \times$ TBEで満たして、氷で予冷した。ゲルを10 にて1時間70Vにて泳動して、ゲルの画像をCy5フィルタでFluorchem Qで記録した。

## 【0125】

## リポソーム表面上のDNA密度の定量化

リポソームの表面上のDNAの充填を決定するために、Cy5標識した3'トコフェロール修飾DNAの濃度を増大して固定された濃度のSUUVと共に一晚インキュベートした (1.3 mM [P])。次いで、リポソームSNAをゲル電気泳動を使用して解析した。SUUVで機能化したDNA密度を定量化するために、構築物を1%のSDS溶液に溶解して、吸光度を260nmにて収集して、それぞれのDNA鎖の吸光係数を使用して算出した。対応する溶液におけるリポソームの数は、リポソームのリン脂質濃度が機能付与の後一定のままであるという仮定で理論方程式を使用して算出した。

10

## 【0126】

## 溶融アッセイ

2ナノ粒子成分系は、表1に記載されているようにリンカー鎖に相補的な鎖で機能化したリポソームSNAを使用して形成した。凝集体は、2つのDNA機能性リポソームSNAの添加及び1:1の比 (総DNA濃度1.5  $\mu$ M、容積1mL) でリンカー鎖にこれらをハイブリダイズすることによって形成した。リンカーをもつリポソームSNAについての吸光度スペクトルをCary 5000 UV-Vi分光計を使用して収集して、リンカーのないリポソームSNAの吸光度スペクトルと比較した。次いで、凝集体を0.25 /分の割合にて20から65 までの温度の緩やかな増大に供して、吸光度を凝集体について260nmにてモニターした。

20

## 【0127】

## ローダミンカプセル化

乾燥DOPC単量体 (25mg) をHBS (5mL) 中の20mMスルホローダミンB溶液に再懸濁した。生じる懸濁液を100nm、80nm、50nm、30nmサイズの一連のポリカーボネート膜を通して徐々に押し出した。ローダミン含有リポソームを架橋されたセファロース (セファロースCL-4B、Aldrich) でのゲル濾過クロマトグラフィーを介して遊離ローダミンから分離した。得られた粒子を、上で記述した手順を使用してDNA-トコフェロール抱合体で機能化した。構築物の血清安定度を解析するために、ローダミン含有リポソーム及びリポソーム-SNAを、HBS中の10%のウシ胎児血清溶液に懸濁して、420nmにて試料を励起し、及び480nmにて強度を測定して、色素の放出をFluorlog-3システムでモニターした。

30

## 【0128】

## 細胞培養研究

SKOV-3細胞は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC) から購入して、10%の熱不活化ウシ胎児血清、100Uペニシリン及び50  $\mu$ gストレプトマイシンを伴うMcCoy's 5A培地中で培養し、及びATCC説明書に従って5%のCO<sub>2</sub>で37 にて維持した。細胞研究のためには、細胞を50%の集密度にて処理の24時間前にプレートにまいた。

40

## 【0129】

## リポソームSNAの共焦点顕微鏡法

リポソームSNAの細胞内部移行の視覚化のためには、SKOV3細胞を50%の集密度にて35mmのFluorodish (商標) チャンバーにまいた。細胞を20時間培地においてCy5標識されたリポソームSNA (0.1  $\mu$ MのDNA濃度) と共にインキュベートし、続いて0.01% (容積によって) のトゥイーン-20を含む $1 \times$ PBSで

50

3回洗浄し、次いで新鮮な培地で置換した。核を、製造業者のプロトコルに従ってヘキスト3342 (Invitrogen)で染色した。次いで、生細胞をMai Tai 3308レーザー (Spectra-Physics)でのZeiss LSM510倒立レーザー走査共焦点顕微鏡で40×拡大にて撮像した。ヘキストを780nmにて励起して、390-495nmにて収集して、640nmにて励起し、及び650-710nmにて発光。

#### 【0130】

##### フローサイトメトリー実験

リポソームSNAの細胞の取り込みを遊離DNA鎖と比較するために、細胞を、100μLの培地中の96ウェルにまき、及び0.1μM濃度の遊離DNAまたはリポソームSNAと共に、及び24時間インキュベートした。未処理細胞を実験のための負の対照として使用した。インキュベーション期間の後、細胞を0.01% (容積の)のTween-20を含む1×PBSで3回洗浄して、次いでトリプシン処理して懸濁液を形成した。フローサイトメトリーは、背景強度に関して未処理細胞からのシグナルを使用して、Guava easyCyte 8HT (Millipore, USA)でCy5強度チャンネルを使用して細胞の懸濁液で行った。エラー値は、単一の試料を表する異なるウェルからの中央シグナルの平均値の標準誤差を使用して算出した。

10

#### 【0131】

##### 細胞毒性研究 (MTTアッセイ) :

リポソームSNAの細胞毒性を評価するために、SKOV-3細胞を実験の24時間前に96ウェルにまいた。細胞をDNAの種々の濃度のリポソームSNAで24時間処理した。リポソームSNAの細胞毒性をDharmaFECT (登録商標) 1 (Dharmacon) (市販のトランスフェクション薬剤)と比較した。細胞には、製造業者のトランスフェクションプロトコルに従ってDharmaFECT (登録商標) 1でトランスフェクトした種々の濃度のDNAをトランスフェクトした。処理を受けなかった細胞は、負の対照として使用した。24時間のインキュベーション期間の後、細胞を1×PBSで3回洗浄して、AlamarBlue (登録商標) 溶液 (Thermo Fisher Scientific Inc.)と共にインキュベートして、4時間5%のCO<sub>2</sub>中で37にてインキュベートした。590nmにおける蛍光発光を、BioTek, Synergy H4 Hybrid Readerを使用して記録した。

20

30

#### 【0132】

##### HER2タンパク質ノックダウンを定量化するためのウェスタンブロッティング

SKOV-3細胞を6穴プレートにまき、及び5%のCO<sub>2</sub>中で37にて一晩インキュベートした。細胞を抗HER2アンチセンスリポソームSNA及びスクランブル化リポソームSNAと共にインキュベートした。24時間の処理の後、培地を新鮮な培地で置換して、細胞をさらなる48時間増殖させた。HER2タンパク質ノックダウンを解析するために、細胞を収集して、プロテアーゼ及び脱リン酸化酵素阻害薬を含む100μLの哺乳動物細胞溶解緩衝液 (Cell Signaling, MA, USA)に再懸濁した。(Thermo Scientific, IL, USA)。細胞可溶化液中のタンパク質濃度は、BCA Protein Assay Kit (Pierce, IL, USA)を使用して決定した。同量(20μg)のタンパク質を4-20%のPrecast勾配ゲル (Bio-Rad)によって分画して、ニトロセルロース膜 (Thermo Scientific, IL, USA)へ転写した。膜をトリス-緩衝食塩水 (TBS)中の5%の乾燥脱脂乳溶液 (w/v)を使用してブロックした。タンパク質をHER2 (1:1000)に対する一次ウサギ抗体及びGAPDH (1:500)続いて抗ウサギ二次抗体 (1:10,000) (LI-COR Biosciences, NE, USA)で検出した。蛍光シグナルは、Odyssey (登録商標) Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences, NE, USA)を使用して記録した。

40

#### 【0133】

50

## 合成

典型的なリポソーム SNA は、2 工程で合成した (図 7)。第 1 の工程は、脂質単量体から 30 nm 直径単層小胞の調製を含む。このサイズ粒子は、SNA トランスフェクションの見地から理想的であり、及びより高い血液循環を最大にするために、及び腎臓を介したクリアランスを最小限にするために、適切な範囲にある。残念なことに、このサイズ状況のリポソームは、たいてい不安定であり、及び融合してより大きな構造を形成する。したがって、この研究の目標は、このような構造を合成し、及びこのような粒子成長経路を回避する方法を決定することであった。

## 【0134】

小単層小胞 (SUV) を調製するために、DOPC (1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン)、ホスフェート部分から伸長し、及び四級アンモニウム頭基で終結される 2 つのオレイン酸誘導体を含む不飽和脂質、を選択した。典型的な実験において、20 mM HBS 中の DOPC 単量体の懸濁液を音波破碎して平均 30 nm SUV 粒子を生じた。粒子を遠心分離 (100, 000 × g) によって単離した。30 nm 孔をもつポリカーボネート膜を通すこの材料のさらなる押出により、70% の全収率で 0.11 の多分散性指数 (PDI) をもつ粒子を得た。次いで、粒子を生理食塩水に再分散して、DLS を使用してこれらの 30 ± 3 nm 直径を確認し、及びこれをまた、その後ネガティブ染色を使用する TEM 解析によって確認した。

## 【0135】

合成の第 2 の工程は、疎水性トコフェロール部分を有する核酸誘導体でのリポソームの表面機能付与を含み、これは SUV を定義する脂質二重層に効率的に挿入する。様々な疎水性の頭基が適切かもしれないが [Pfeiffer et al., J Am. Chem. Soc. 126:10224 (2004); Banchelli et al., J Phys. Chem. B 112:10942 (2008); Dave et al., ACS Nano 5:1304 (2011); Jakobson et al., Bioconjugate Chem. 24:1485 (2013)]、その生体適合性及び低コストのため、 $\alpha$ -トコフェロール (ビタミン E の形態) を選択した。 $\alpha$ -トコフェロールは、市販のトコフェロールホスホラミダイト誘導体 (Glenn Research) を利用して、従来のオリゴヌクレオチド合成を経て核酸鎖 (DNA) 上に配置した。リポソーム SNA は、8:1 の脂質対核酸比を使用して室温にて 12 時間核酸 - トコフェロール抱合体 (16 mM) と共に SUV の懸濁液 (1.3 mM までの脂質) をインキュベートすることによって合成した。次いで、リポソームのないトコフェロール - 核酸を、セファロースカラム (セファロース 4LB) でのサイズ排除クロマトグラフィーによって試料から除去した。DNA の場合において、-1 から -23 へのゼータ電位の有意な低下がこの工程の後に生じ、負に荷電した核酸でのリポソーム表面機能付与を示す。加えて、最終ナノ粒子試料の動的光散乱法 (DLS) 解析は、30 から 46 nm までの粒径の増大を示し、長さ 8 - 9 nm 二重鎖構造の装填に一致する。リポソームの表面上に装填された核の鎖の平均数を定量的に決定するために、リポソーム - SNA を Triton X の存在下において溶解し、これらを放出した。最終的な核酸濃度は、標準的な較正されたオリゴヌクレオチドに相対的に 260 nm にて吸光度を測定することによって決定した。DNA で被覆されているリポソーム SNA は、粒子あたり 70 の平均で鎖を有した (図 17)。この密度は、典型的な金に基づいた SNA 構造より低い [Hurst et al., Anal. Chem. 78:8313 (2006)]、このような構造の協同的な特性の多くを示すためには十分である。リポソーム SNA の図表を図 16 に提供した。

## 【0136】

これらのリポソーム SNA 構造は、いくつかの興味深い特性を有する。最初に、これらは、これらが由来した天然の 30 nm リポソーム構築物と比較して著しく安定である (図 2、図 8)。たとえば、オリゴヌクレオチド表面層のない SUV が 37 (生理的温度) にて 4 日間貯蔵される場合、これらはより大きな多分散構造を融合し、及び形成する (数

10

20

30

40

50

ミクロンサイズとなった実体をもつ平均100nm構造で)。対照的に、リボソームSNAは、ほとんど同一の条件下で同じ時間にわたって粒子分解または融合の証拠を示さない。リボソーム-SNAシステムに関する安定度におけるこの増大は、おそらくリボソーム-SNA表面を含む負に荷電した核酸鎖間の斥力の結果であり、これは、個体粒子及び抑制粒子-粒子融合相互作用の両方を安定させる[Li et al., *Bioconjugate Chem.* 24:1790(2013)]。その上、リボソーム-SNA上の負に荷電されたDNAコナは、血清タンパク質の存在下でその分解を予防するリボソームコアのための保護層として役立つ[Senior et al., *Life Sci.* 30:2123(1982); Kim et al., *Arch Pharmacol Res.* 14:336(1991); Sulkowski et al., *J. Mol. Struct.* 744-747:737(2005)]。たとえば、リボソーム-SNAシステムの血清安定度を、20mM(コア濃度)の自己消光濃度にてリボソーム-SNAのコア内に物理的に取り込んだスルホローダミン色素の放出を測定することによって調査した。この実験において、リボソームコア破壊により、粒子の内部からスルホローダミン色素の放出及びその後の自己消光の消失を生じ、したがって蛍光の増大を生じる[Versluis et al., *J Am Chem. Soc.* 135:8057(2013)]。典型的な実験では、ローダミン含有リボソームナノ粒子を37℃にて10%のウシ胎児血清中でインキュベートして、蛍光スペクトルを3時間連続的に記録した。同じ安定度研究を非機能性粒子について行った。熱安定性研究と同様に、DNA機能性粒子は、実験の期間の間に血清中で安定なままであった。色素の放出は、3時間のインキュベーションの間に観察されなかった。対照的に、裸のDOPCリボソームのインキュベーションでは、ローダミン蛍光体の有意な放出に至り、血清中のリボソーム構造の迅速な分解を示す(図8)。

#### 【0137】

リボソームSNAの第2の特性は、これらが協同的に相補的な核酸を結合する能力である。これは、全てのSNAの顕著な特徴であり、及び表面に結合した核酸の高密度に圧縮され、かつ高度に配向された配置に由来する。リボソーム-SNA構築物の結合及びその後の溶融特性を探索するために、それぞれが異なるDNA配列で作製されたリボソーム-SNAナノ粒子の2つのセット：粒子A及び粒子Bを合成した。リボソーム-SNAのオリゴヌクレオチド配列に相補的であるDNAリンカー配列を、ハイブリダイゼーションを介した重合を容易にするために使用した。2つのリボソームSNA粒子の等モル混合物に対するリンカー配列の付加により、DLSによって証明される凝集が生じ、及び最終的には、鱗状の沈殿物が形成された[Dave et al., *ACS Nano* 5:1304(2011)]。これらの凝集体を20mM HBS(150mM NaCl)に再懸濁して、溶融解析を、260nmにて吸光度をモニターすることによって行った。重要なことに、著しく狭い融解転移が47.5℃にて観察され(最初の誘導体の最大半減における全幅は、およそ2℃である)、これは高表面密度の核酸をもつSNA構造で高度に特徴的である(図9)。

#### 【0138】

SNAの重要な特性は、補助的トランスフェクション薬剤を伴わずにこれらが細胞に入る能力に係する[Cutler et al., *J. Am. Chem. Soc.* 134:1376(2012)]。リボソームSNAがこの挙動を示すかどうかを決定するために、卵巣癌腹水(SKOV3、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション)を、5'-Cy5標識DNAで合成したリボソームSNAの存在下において異なるDNA濃度にて任意のトランスフェクション薬剤非存在下でインキュベートした。SKOV3細胞におけるリボソーム-SNAの取り込みは、共焦点顕微鏡法及びフローサイトメトリー技術を使用して解析した。注目すべきことに、リボソームSNAは、1時間のインキュベーションの後でさえ大量に細胞に容易に入り、これは細胞内プローブ及び標的調節薬としてのこれらの有用性を証明する。加えて、SKOV3細胞における遊離DNA鎖(5'-Cy5標識)の有意な取り込みは、同じ条件下で36時間のインキュベーションの後

でさえも検出されなかった。Au-SNAと同様に、SKOV3細胞におけるリボソーム-SNAの高い取り込みは、高濃度でさえ何らの毒性を生じさせなかった(図10)。逆に、リボソーム-SNAによって送達される同等のDNAを送達する試みにおけるDharmaFECTの使用は、有意な細胞毒性を生じ、これはインキュベーションの24時間の期間にわたって35%まで細胞生存度を減少させた。

#### 【0139】

リボソーム-SNAは細胞毒性がないことを確立した後に、ヒト上皮細胞成長因子受容体2(HER2)-SKOV3細胞において過剰発現される癌遺伝子をノックダウンすることができるリボソーム-SNAを合成した[Zhang et al., J. Am. Chem. Soc. 134:16488(2012)]。リボソーム-SNAのアンチセンス活性の有効性を従来のトランスフェクションシステムのものと比較するために、SKOV3細胞を抗HER2リボソーム-SNA及び対照リボソーム-SNA(それぞれ1µMの総DNA濃度にて)の存在下においてインキュベートした。72時間のインキュベーションの後、細胞を収集して、ウェスタンブロッティングによってタンパク質含有量について解析した。重要なことに、HER2タンパク質レベルは、内部参照遺伝子グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)(図10)と比較して、抗HER2リボソーム-SNAの存在下で85%まで減少された。ひとまとめにして、これらの結果は、細胞トランスフェクション及び遺伝子制御の両方に影響を及ぼすためのリボソーム-SNAの使用の潜在性を示す。

10

#### 【0140】

要約すると、新規の金属を含まないリボソームSNAのための拡張性のある合成経路が開発された。このような構造は、すぐに利用できる、無毒性出発材料から迅速に構築される。核酸構築物は、これらの小さいリボソーム構造を安定させるだけでなく、SKOV3細胞によるこれらの内部移行も容易にする。結果的に、このような構造は、より慣習的な金ナノ粒子に基づいたSNAの魅力的な特性の多くを示す新たな生体適合性遺伝子制御構築物としての有用性を示す。

20

#### 【0141】

実施例6-Ramos-Blue(商標)細胞においてリボソーム粒子を試験する

Ramos-Blue(商標)細胞は、NF-B/AP-1リポーターBリンパ球細胞である。Ramos-Blueは、NF-B/AP-1-誘導性SEAP(分泌型胚性アルカリ性ホスファターゼ)リポーター遺伝子を安定して発現するBリンパ球株化細胞である。刺激したときに、これらは、上清にSEAPを産生し、これはQUANTI-Blueアッセイを使用して容易にモニターすることができる。QUANTI-Blueは、SEAPの存在下において青くなるSEAP検出媒体である(図14)。

30

#### 【0142】

CpGを含むオリゴヌクレオチドと接触したときに、Ramos-Blue細胞の活性化が検出された(図15)。代表化合物は、TLR9アゴナイズオリゴヌクレオチドCpG7909(5'-TCGTCGTTTGTCTTTTGTCTTTTGTCTTT-3'(配列番号:8))に基づいて合成した。これらは、13nm金ナノ粒子(CpG7909-poSNA(Au))上に高密度に機能化されたホスホジエステル骨格をもつCpG7909、完全なホスホロチオアートバックボーンをもつCpG7909(CpG7909-ps)、ホスホジエステルCpG7909をもつリボソームSNA(7909ターゲティング(粒子))、全てのホスホジエステル骨格オリゴヌクレオチドのC及びGがTLR9結合部位を排除するように反転したリボソームSNA(7909対照(粒子))、リボソームSNAに製剤化されることなくホスホジエステル骨格及び3'-トコフェロール脂質をもつCpG7909(7909ターゲティング(トコフェロール))並びに制御配列はリボソームSNAにまた製剤化されていなく反転したC及びGをもつ(7909対照(トコフェロール))を含む。次いで、これらの化合物を連続的に希釈して、次いでRamos-Blue細胞、炎症誘発性転写因子NF-Bの活性化に応じて分泌されるアルカリ性ホスファターゼ(SEAP)を発現する株化細胞と共に一晚インキュ

40

50

ベートして、Quant i Blueキット ( In V i v o g e n ) を介して細胞培地中の S E A P レベルをプローブした。活性化は、650nmにおける光の吸収によって測定した。

【0143】

実施例7 - H I F 1 - を調節するリポソーム粒子の使用

本開示の組成物の有効性をさらに証明するために、リポソーム粒子を、H I F 1 - 及び B A X を個々にターゲットするようにデザインした。実験には、成長の早いマウス神経芽腫株化細胞である N e u r o - 2 a ( N 2 A ) 株化細胞を利用した。H I F 1 - ( 図 1 8 ) 及び B A X ( 図 1 9 ) をターゲットするリポソーム粒子と N 2 A 細胞を接触すると、標的遺伝子産物の量における有意な減少を示した。それぞれの実験において、m R N A 発現の相対量は、6穴プレートにおける N 2 A 細胞の処理を開始した72時間後の定量的 P C R ( q P C R ) によって決定した - 細胞は、リポソーム粒子の除去及び M E M 及び 1 0 % ウシ胎児血清 ( F B S ) との培地の置換の前に、O p t i M E M 中で24時間リポソーム粒子で処理した。

10

【0144】

H I F 1 - がターゲットされた実験については、N 2 A 細胞を C o c 1 2 刺激した低酸素に最初に供し、これは約50%まで H I F 1 - m R N A 発現を増加させた。次に、N 2 A 細胞を、H I F 1 - に向けた s i R N A で機能化したリポソーム粒子と接触した。接触により、約50%の H I F 1 - のノックダウンを生じた ( 図 1 8 ) 。

20

【0145】

B A X がターゲットされた実験については、N 2 A 細胞の処理では、リポソーム粒子による B A X m R N A のほぼ65%のノックダウン及び脂質ミセル S N A による B A X m R N A の50%を上回るノックダウンを生じた ( 対照リポソーム S N A に対して測定したとき ) ( 図 1 9 ) 。

【0146】

これらの実験は、哺乳動物細胞における標的遺伝子発現を阻害することにて本開示のリポソーム粒子が極めて効率が高いことを示した。

【0147】

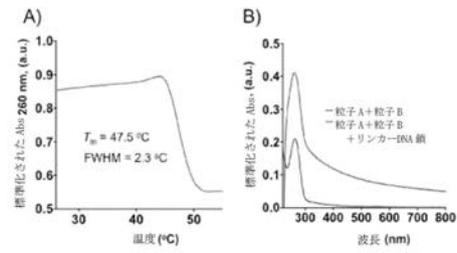
本発明は、前述の図解の実施例に限定されないこと、及びその必須の属性を逸脱しない範囲でその他の具体的形態において実施することができることが当業者には明らかだろう。したがって、実施例は、全ての点において例示的であり限定的でないことみなされ、及び前述の実施例よりはむしろ添付の特許請求の範囲及び特許請求の範囲の均等の意味及び範囲内に入る全ての変化に対して参照がなされ、及びしたがって、その中に包含されることが意図されることが望まれる。

30



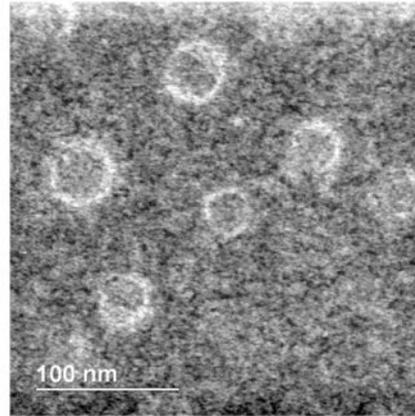
【 図 9 】

【 図 9 】



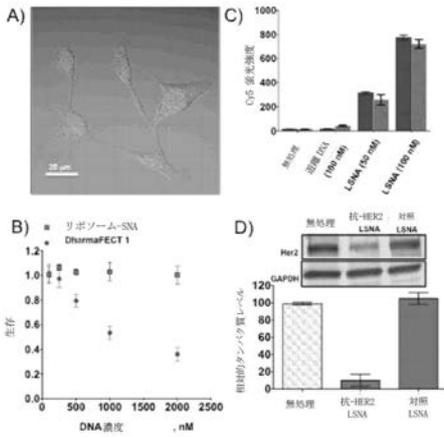
【 図 1 1 】

【 図 1 1 】



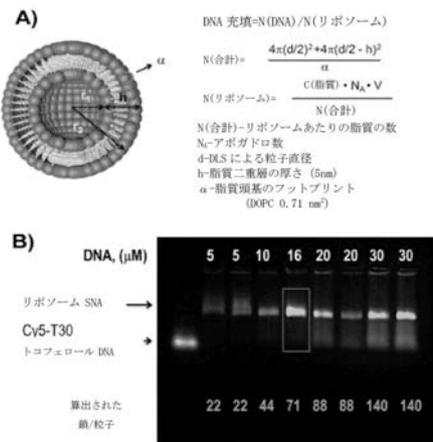
【 図 1 0 】

【 図 1 0 】



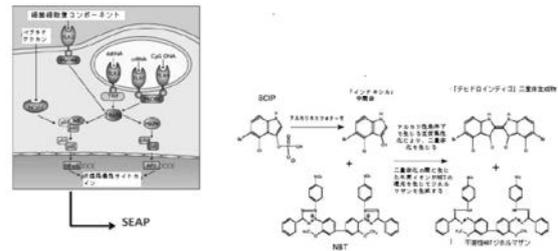
【 図 1 2 】

【 図 1 2 】



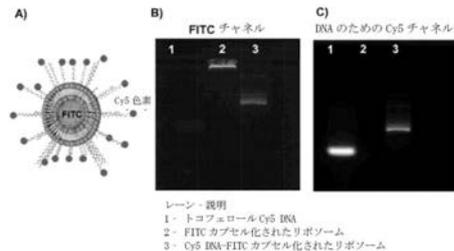
【 図 1 4 】

【 図 1 4 】



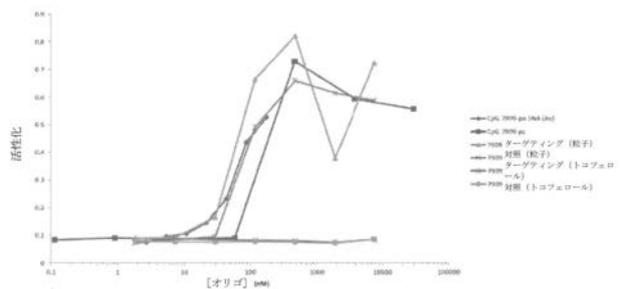
【 図 1 3 】

【 図 1 3 】



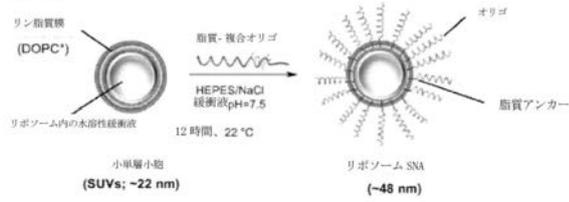
【 図 1 5 】

【 図 1 5 】



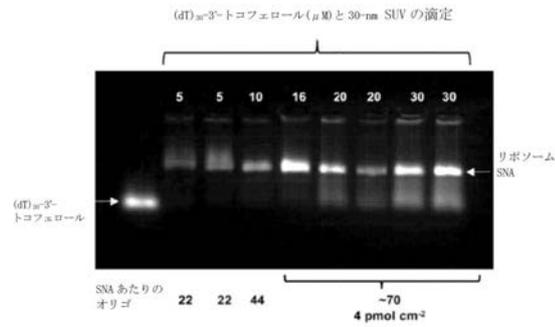
【 図 1 6 】

【 図 1 6 】



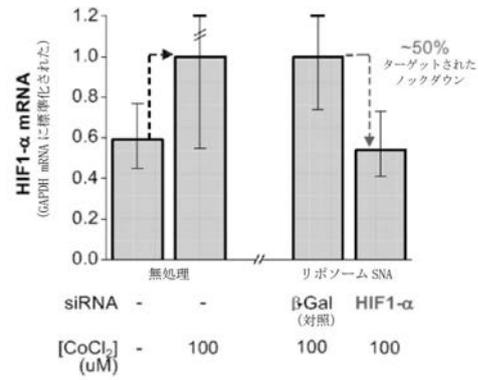
【 図 1 7 】

【 図 1 7 】



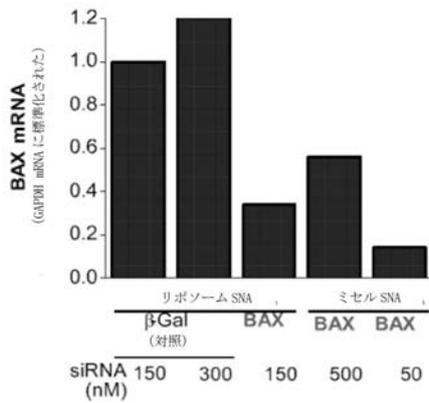
【 図 1 8 】

【 図 1 8 】



【 図 1 9 】

【 図 1 9 】



【配列表】

2016540777000001.app

## 【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT  |   | International application No.<br>PCT/US2014/068429  |
|--|---|---|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC(B) - A61K 8/14 (2015.01)<br>CPC - A61K 8/14 (2015.07)<br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC   |   |   |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>IPC(B) - A61K 8/14, 9/127, 49/18, 51/12; B82Y 30/00; C12N 15/88, 15/117 (2015.01)<br>CPC - A61K 8/14, 9/127, 9/141, 47/48815, 49/18, 51/12; B82Y 30/00; C12N 15/88, 15/117, 2310/17 (2015.07)  |   |   |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>CPC - A61K 8/14, 9/127, 9/141, 47/48815, 49/18, 51/12; B82Y 30/00; C12N 15/88, 15/117, 2310/17 (2015.07) (keyword delimited)<br>USPC - 424/450, 498; 514/44R; 536/23.1; 977/907   |   |   |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>Orbit, Google Patents, Google Scholar. Search terms used: bilayer, unilamellar, liposome, microsome, microsphere, nanosphere, spherical, conjugated, tethered, covalent, linked, nucleic, DNA, RNA, polynucleotide, oligonucleotide, lipid, phospholipid, DOPC, DMPC, POPC, DSPG, DPOG, DPPC, DOPE, DPPE, tocopherol   |   |   |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>  |   |   |
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.   |
| X  | BUNGE et al "Lipophilic oligonucleotides spontaneously insert into lipid membranes, bind complementary DNA strands, and sequester into lipid-disordered domains," <i>Langmuir</i> , 17 March 2007 (17.03.2007), Vol. 23, No. 8, Pgs. 4455-4464, entire document                                     | 1-6<br>17-20  |
| Y  | HOPE et al. "Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure: characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential," <i>Biochim Biophys Acta</i> , 10 January 1985 (10.01.1985), Vol. 812, No. 1, Pgs. 55-65, entire document | 17-20   |
| A  | WQ 2007/096134 A1 (UNIVERSITY OF BERLIN HUMBOLDT) 30 August 2007 (30.08.07) entire document   | 1-6, 17-20  |
| A  | US 5,008,050 A (CULLIS et al) 16 April 1991 (16.04.1991) entire document  | 1-6, 17-20  |
| A  | WQ 1996/034876 A1 (NEXSTAR PHARMACEUTICALS, INC) 07 November 1996 (07.11.1996) entire document  | 1-6, 17-20  |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.  |   |   |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"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)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"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<br>"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<br>"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<br>"&" document member of the same patent family |   |   |
| Date of the actual completion of the international search<br>17 July 2015  |   | Date of mailing of the international search report<br><b>10 AUG 2015</b>                        |
| Name and mailing address of the ISA/<br>Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents<br>P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450<br>Facsimile No. 571-273-8300  |   | Authorized officer<br>Blaine Copenheaver<br>PCT Helpdesk: 571-272-4300<br>PCT OSP: 571-272-7774 |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2014/068429

**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.: 7-16, 21-45  
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:

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.:

**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.

## 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 P 43/00 (2006.01)  | A 6 1 P | 43/00 | 1 1 1      |
| A 6 1 P 37/02 (2006.01)  | A 6 1 P | 37/02 |            |
| A 6 1 P 35/00 (2006.01)  | A 6 1 P | 35/00 |            |
| C 1 2 N 15/113 (2010.01) | C 1 2 N | 15/00 | Z N A G    |
| C 1 2 N 5/10 (2006.01)   | C 1 2 N | 5/10  |            |

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, 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, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ミルキン, チャド エー.

アメリカ合衆国 イリノイ 60091, ウィルメット, ウェスト ブラックホーク ロード  
2737

(72)発明者 ヌイエン, ソンビン ティー.

アメリカ合衆国 イリノイ 60202, エバンストン, ドブソン ストリート 1522

(72)発明者 バンガ, レシャム シン

アメリカ合衆国 イリノイ 60626, シカゴ, ニューガード アベニュー 6642

(72)発明者 チェルニャーク, ナタリア

アメリカ合衆国 イリノイ 60201, エバンストン, シカゴ アベニュー 1410,  
アパートメント 501

(72)発明者 グリャズノフ, セルゲイ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94402, サン マテオ, ウェスト ベルビュー アベ  
ニュー 138

(72)発明者 ラドビッチ-モレノ, アレクサンダー

アメリカ合衆国 イリノイ 60202, エバンストン, シャーマン アベニュー 905

(72)発明者 マダー, クリストファー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02140, ケンブリッジ, コンコード ターンパイク  
223, ナンバー 413

Fターム(参考) 4B065 AA93X AB01 AC14 BA05 BC03 BC07 CA43

4C076 AA19 CC29 DD59 DD63A DD70 FF07 FF16 FF36

4C086 AA01 AA02 EA16 MA03 MA05 MA24 NA03 ZB07 ZB26 ZC42