

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012年10月26日(26.10.2012)



(10) 国際公開番号
WO 2012/144446 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 9/14 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61K 35/76 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) C12N 7/02 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
A61K 47/34 (2006.01) C12P 21/02 (2006.01)
A61K 47/42 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/060229
- (22) 国際出願日: 2012年4月16日(16.04.2012)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2011-092252 2011年4月18日(18.04.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人国立精神・神経医療研究センター(NATIONAL CENTER OF NEUROLOGY AND PSYCHIATRY) [JP/JP]; 〒1878551 東京都小平市小川東町4丁目1番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 岡田 尚巳 (OKADA Takashi) [JP/JP]; 〒1878551 東京都小平市小川東町4丁目1番1号 独立行政法人国立精神・神経医療研究センター内 Tokyo (JP). 武田 伸一 (TAKEDA Shin'ichi) [JP/JP]; 〒1878551 東京都小平市小川東町4丁目1番1号 独立行政法人国立精神・神経医療研究センター内 Tokyo (JP). 喜納 裕美 (KINOH Hiromi) [JP/JP]; 〒1878551 東京都小平市小川東町4丁目1番1号 独立行政法人国立精神・神経医療研究センター内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI Yusuke et al.); 〒1056232 東京都港区愛宕2丁目5番1号 愛宕グリーンヒルズMORIタワー32階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告(条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則 5.2(a))

(54) Title: DRUG DELIVERY PARTICLES AND METHOD FOR PRODUCING SAME

(54) 発明の名称: 薬剤送達粒子及びその製造方法

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to develop and provide a method for having a hollow capsid contain a nucleic acid, a peptide and/or a low molecular weight compound by simple processes, while maintaining the initial infectious activity of a virus. Provided is a method for producing drug delivery particles, which comprises: a step wherein hollow capsids or hollow particles and a medicinal agent that contains a nucleic acid, a peptide and/or a low molecular weight compound are mixed in a solution that contains 0.1-20% of a surfactant; and a step wherein the medicinal agent is introduced into each hollow capsid or hollow particle, while maintaining the thus-obtained mixed liquid at -5°C to 50°C.

(57) 要約: 中空カプシド内に、ウイルスの初期感染活性を保持した状態で、簡便に核酸、ペプチド及び/又は低分子化合物を包含させる方法の開発と提供を目的とする。0.1~20%の界面活性剤を含む溶液中で中空カプシド又は中空粒子と核酸、ペプチド及び/又は低分子化合物を含む薬剤を混合する工程、及び得られた混合液を-5~50°Cで保持して、前記薬剤を中空カプシド又は中空粒子内に導入する工程を含む薬剤送達粒子の製造方法を提供する。



WO 2012/144446 A1

明 細 書

発明の名称：薬剤送達粒子及びその製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、薬剤送達粒子及びその製造方法、並びに該薬剤送達粒子を有効成分として含む薬物組成物に関する。

背景技術

[0002] 細胞、組織又は個体に目的の遺伝子を導入し、発現させるために、様々な遺伝子導入技術が開発されている。ウイルスの感染能や複製能を利用したウイルスベクターも、その一つであり、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス等に由来する種々のベクターが知られている。中でも、アデノ随伴ウイルスベクターは、近年、遺伝子治療において有用な遺伝子導入担体として期待されている。

[0003] アデノ随伴ウイルス（AAV；Adeno-Associated Virus、以下、本明細書では「AAV」で表記する。）は、パルボウイルスに属する非病原性のウイルスであって、自己複製能を欠損しているため自律的増殖ができず、増殖にはアデノウイルスやヘルペスウイルスの共感染を必要とするため感染性が低い。また宿主において免疫原性が低い性質も有する。そのような特徴から遺伝子導入の担体として、安全性が高いという利点を有している。加えて、宿主域が広いことから種々の細胞に感染可能であり、また1～9型の各血清型AAVに由来するベクターも開発されていることから（非特許文献1）、それぞれの血清型における感染標的細胞の特異性を応用して、神経細胞、筋細胞、肝細胞等、特定の細胞、組織及び器官での遺伝子発現が可能となっている。

[0004] しかし、AAVをはじめとする従来ウイルスベクターは、いずれも投与個体に対して、in vivoでの遺伝子発現の一過性、野生型ウイルス混入の可能性、遺伝子発現とその作用の発現に時間を要する、大きな遺伝子を組込むことが出来ない、副反応が出現した場合に発現を制御する機構が必要等の様々な問題点があった。

[0005] 上記問題点を解決するため、Samulskiらは、AAVカプシドの発現プラスミドを用いてカプシドを発現させ、これを薬剤の送達担体として利用することを提唱した（非特許文献2）。カプシド内部にウイルスゲノムを含まない空のカプシド、すなわち中空カプシドは、標的細胞の特異的認識、吸着、侵入、脱殻等のウイルスの初期感染活性は有するが、ウイルス由来の遺伝子を全く有さないためウイルスの増殖活性はない。したがって、中空カプシドは、薬剤の標的細胞特異的送達性と投与個体に対する安全性を兼ね備えた理想的な薬剤送達系（DDS ; Drug Delivery System）の担体となり得る。それ故、中空カプシドをDDSの担体として利用するには、カプシド内部に目的の薬剤を導入する技術が非常に重要となってくる。

[0006] Samulskiらは、中空カプシドを尿素、熱やpHの条件によって一旦変性させ、薬剤を内部に取り込ませた後に再構成させる導入方法を提示している（非特許文献2）。しかし、尿素等の変性剤をカプシドに作用させると、カプシドが有する初期感染活性までもが失われてしまい、送達担体として機能し得なくなるという問題があった。結局のところ、カプシドの初期感染活性を保持したままで送達物質としての薬剤を中空カプシドに導入する技術は、提唱から7年以上経過した現在もなお確立されていない。例えば、特許文献1ではAAV中空粒子の送達担体としての有用性は示唆しているが、中空カプシドを送達担体として利用した具体的な事例に関しては、何も記載されていない。それ故、当業者間では、Samulskiの提唱する技術は、実現不可能な技術と認識されていた。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特願2005-314476

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Okada T. and Takeda S., Gene therapy for Duchenne muscular dystrophy. in A Guide to Human Gene Therapy (ed. by Roland W. Herzog and Sergei Zolotukhin), World Scientific, NJ. 2010, 5(1), pp113-12

3.

非特許文献2 : Samulski, et al., 1995, Appl. No.:08/472;594

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0009] 本発明は、上記問題を解決するために、中空カプシド内にウイルスの初期感染活性を保持した状態で、核酸、ペプチド及び／又は低分子化合物を導入する方法を開発し、それを提供することを目的とする。
- [0010] また、本発明は、前記方法によって製造される、標的細胞内に特異的に目的の薬剤を送達することのできる薬剤送達粒子の提供を目的とする。
- [0011] さらに、本発明は、前記方法に用いるためのAAV由来の中空カプシドの宿主細胞内生産効率を高める方法、及びウイルス中空粒子の精製方法の開発と、その提供を目的とする。

課題を解決するための手段

- [0012] 本発明者は、鋭意研究を重ねた結果、簡便かつ効率的な方法で、ウイルスの初期感染活性を維持したまま中空カプシド内部に任意の核酸、ペプチド及び／又は低分子を導入することに成功した。また、この薬剤を包含したカプシドと宿主細胞を混合することにより、カプシドに内包された薬剤を該細胞内に効果的に導入できることも確認した。さらに、宿主細胞内での中空カプシドの生産量を増加する方法及び中空カプシドの精製方法を開発した。本発明は、これらの知見と結果に基づくものであり、以下を提供するものである。
- [0013] (1) 薬剤を含むカプシド又は被膜粒子からなる薬剤送達粒子の製造方法であって、(a) 0.1~20%の界面活性剤を含む溶液中で中空カプシド又は中空粒子と薬剤を混合する工程、及び(b) 前記混合工程後の混合液を-5~50℃で保持して、薬剤を中空カプシド又は中空粒子内に導入する工程を含む前記製造方法。
- [0014] (2) 前記導入工程において混合液を5分~120分保持する、(1)に記載の製造方法。

- [0015] (3) (c) 前記導入工程後に溶液中の界面活性剤を除去する工程をさらに含む、(1)又は(2)に記載の製造方法。
- [0016] (4) 界面活性剤がTriton X-100、Triton X-114、NP-40、Brij-35、Brij-58、Tween-20、Tween-80、オクチル- β -グルコシド、OTG、SDS、CHAPS、CHAPSO、及びPEGとPPGのコポリマーからなる群から選択される一以上の界面活性剤である、(1)～(3)のいずれかに記載の製造方法。
- [0017] (5) 薬剤が核酸、ペプチド及び／又は低分子化合物である、(1)～(4)のいずれかに記載の製造方法。
- [0018] (6) 核酸が機能性核酸、mRNA、mRNA断片、及び任意の遺伝子又はその断片を含むベクターからなる群から選択される一以上の核酸である、(1)～(5)のいずれかに記載の製造方法。
- [0019] (7) 機能性核酸が、siRNA、miRNA、shRNA、核酸アプタマー、アンチセンスDNA、U1アダプター、リボザイム、モレキュラー・ビーコン及びリボスイッチからなる群から選択される一以上の核酸である、(6)に記載の製造方法。
- [0020] (8) ベクターがプラスミド、コスミド及び人工染色体からなる群から選択される、(6)に記載の製造方法。
- [0021] (9) 中空カプシド又は中空粒子が修飾されている、(1)～(8)のいずれかに記載の製造方法。
- [0022] (10) 中空カプシド又は中空粒子が特定の細胞に対する初期感染活性を有する、(1)～(9)のいずれかに記載の製造方法。
- [0023] (11) 中空カプシドがアデノウイルス又はアデノ随伴ウイルス由来である、(1)～(10)のいずれかに記載の製造方法。
- [0024] (12) カプシド又は被膜粒子内に薬剤を含んでなる薬剤送達粒子であって、前記薬剤が該カプシド又は被膜粒子が由来するウイルス自身の遺伝子を含まない外因性の核酸、ペプチド及び／又は低分子化合物である前記薬剤送達粒子。
- [0025] (13) 前記外因性の核酸が機能性核酸、mRNA、mRNA断片、及び任意の遺伝子又はその断片を含むベクターからなる群から選択される一以上の核酸であ

- る、(12)に記載の薬剤送達粒子。
- [0026] (14) 機能性核酸が、siRNA、miRNA、shRNA、核酸アプタマー、アンチセンスDNA、U1アダプター、リボザイム、モレキュラー・ビーコン及びリボスイッチからなる群から選択される一以上の核酸である、(13)に記載の薬剤送達粒子。
- [0027] (15) ベクターがプラスミド、コスミド及び人工染色体からなる群から選択される、(13)に記載の薬剤送達粒子。
- [0028] (16) カプシド又は被膜粒子が修飾されている、(12)～(15)のいずれかに記載の薬剤送達粒子。
- [0029] (17) カプシドがアデノウイルス又はアデノ随伴ウイルス由来である、(11)～(16)のいずれかに記載の薬剤送達粒子。
- [0030] (18) カプシド又は被膜粒子が特定の細胞に対する初期感染活性を有する、(11)～(17)のいずれかに記載の薬剤送達粒子。
- [0031] (19) (1)～(11)のいずれかに記載の製造方法で得られる薬剤送達粒子及び／又は(12)～(18)のいずれかに記載の薬剤送達粒子の少なくとも一つを有効成分として含む薬物組成物。
- [0032] (20) 疾患若しくは病害の予防又は治療用である、(19)に記載の薬物組成物。
- [0033] (21) 中空カプシド若しくは被覆粒子又はウイルス粒子を生産した宿主細胞の培養液及び／又は該宿主細胞の抽出液を加熱する工程を含む中空カプシド若しくは被覆粒子又はウイルス粒子の精製方法であって、加熱温度が45℃以上55℃よりも低い場合には加熱時間が10分～90分であり、又は加熱温度が55℃以上60℃以下の場合には加熱時間が3分～30分である前記精製方法。
- [0034] (22) アデノ随伴ウイルス産生能増強細胞株の製造方法であって、HEK293細胞株にアデノウイルス由来のE1A遺伝子領域、E1B19k遺伝子、E2A遺伝子領域、E4orf6遺伝子及びVA RNAをコードする遺伝子を導入する工程を含む前記製造方法。
- [0035] (23) 導入した前記全遺伝子を安定的に発現する細胞株を選択する工程を

さらに含む、(22)に記載の製造方法。

[0036] (24) ヒト由来のBcl-x_L遺伝子を導入する工程、導入したBcl-x_L遺伝子を安定的に発現する細胞株を選択する工程、をさらに含む、(22)又は(23)に記載の製造方法。

[0037] 本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2011-092252号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

発明の効果

[0038] 本発明の薬剤送達粒子は、ウイルスの初期感染活性を保持した状態で、核酸、ペプチド及び／又は低分子化合物を薬剤として包含することができる。また、本発明の薬剤送達粒子によれば、薬剤を標的細胞特異的に送達することができる。

[0039] 本発明の薬剤送達粒子の製造方法によれば、ウイルス遺伝子を必要とせず、簡便かつ効率的に目的の薬剤を中空カプシド又は中空粒子内に導入することができる。それによって安全性が高く、かつ標的細胞特異性を有する薬剤送達粒子を提供することができる。

[0040] 本発明の組成物によれば、投与個体の目的の細胞内に、疾患予防用若しくは治療用薬剤、品種改良用薬剤、又は標識用薬剤等を送達することができる。

[0041] 本発明の細胞によれば、単位細胞あたりの中空カプシドの収量を増加することができる。

[0042] 本発明の中空カプシドの精製方法によれば、前記薬剤送達粒子の製造方法において、効率的に不純物を除去することができる。

図面の簡単な説明

[0043] [図1]HEK293細胞に、E1遺伝子領域(E1A遺伝子領域、E1B19k遺伝子及びE2A遺伝子領域を含む)発現プラスミドを異なる分量で導入したときの、導入量とAAV産生量の関係を示す図である。

[図2]E1遺伝子領域及びBcl-x_L遺伝子を安定的に発現するHEK293EB細胞と通常のHEK293細胞における、AAVの産生量の比較を示す図である。

[図3]蛍光標識したモルフォリノオリゴのヒト横紋筋肉種細胞 (RD) 株への取り込みを示す図である。Aは未処理のRD株、Bはエンドポーターで処理したRD株、そしてCは本発明の薬剤送達粒子で処理したRD株を示す。また、D及びEは、それぞれエンドポーターでの処理及び薬剤送達粒子での処理後120時間のRD細胞の形態を示す。図A及びB中のスケールバーは50 μm 、またD及びEのスケールバーは100 μm である。

[図4]AAV中空カプシド内への蛍光標識モルフォリノオリゴの導入における界面活性剤の濃度効果を示した図である。

[図5]蛍光標識した9型AAV中空カプシドの筋細胞親和性を示す図である。Aは、筋分化非誘導処理のヒト線維芽細胞(WI-38)株を、Bは筋分化誘導処理後のWI-38株をそれぞれ示す。図A及びB中のスケールバーは100 μm である。

[図6]本発明の方法で処理したAAV中空カプシド (AAV-EC) とFITC標識siRNA、Alexa標識BSA又はAlexa標識IgGからなる薬剤送達粒子のヒト横紋筋肉種細胞 (RD) 株への取り込みを示す図である。各カラムにおいて、一番上の図は、微分干渉顕微鏡 (DIC) によるRD細胞を、中央の図は、FITC又はAlexaによる蛍光を、そして、一番下の図は、画像ソフト (Olympus DP Manager version 3.1.1.208) を用いて前2図を融合した図を、それぞれ示している。

発明を実施するための形態

[0044] 1. 薬剤送達粒子

1-1. 概要

本発明の第1の実施形態は、薬剤送達粒子である。本発明の薬剤送達粒子は、薬剤とカプシド又は被膜粒子を構成因子として含み、内包する薬剤の宿主細胞内導入能を有する。

[0045] 1-2. 構成

本発明の「薬剤送達粒子」は、カプシド (1) 又は被膜粒子 (2) とそれに包含される薬剤 (3) を構成因子として含む。以下、それぞれについて説明をする。

[0046] (1) カプシド

「カプシド (capsid)」は、ウイルス粒子 (virion) において、ウイルス核酸又はコアを取り囲む複数の単位タンパク質 (カプソメア : capsomere) からなる外皮 (coat) 又は殻 (shell) である。本明細書では、単に「カプシド」と標記した場合には当該構造体を意味する。また、カプシドにおいて、その内部にウイルス核酸、コア又は他の物質を何も含まないカプシドタンパク質のみから構成されたものを、本明細書では「中空カプシド (empty capsid)」と呼ぶ。これに対して、その内部にウイルス核酸やコアを含むものを、「ヌクレオカプシド (nucleocapsid)」と呼ぶ。

[0047] 本発明の薬剤送達粒子のカプシドは、薬剤送達粒子を適用する生物種に合わせて選択すればよい。例えば、適用する生物種を、動物とする場合には動物ウイルス由来のカプシドを、植物とする場合には植物ウイルス由来のカプシドを、そして細菌とする場合にはバクテリオファージ由来のカプシドを、それぞれ用いればよい。好ましくは、動物ウイルス由来又は植物ウイルス由来のカプシドである。

[0048] カプシドが動物ウイルス由来の場合、動物ウイルスは、RNAウイルス群又はDNAウイルス群を問わない。具体的には、例えば、RNAウイルスであれば、レトロウイルス科、ピコルナウイルス科、カリシウイルス科、アストロウイルス科、フラビウイルス科、トガウイルス科、コロナウイルス科、パラミクソウイルス科、ラブドウイルス科、フィロウイルス科、オルソミクソウイルス科、ブニヤウイルス科、アレナウイルス科、レオウイルス科又はビルナウイルス科に属するいずれのウイルス由来のカプシドであってもよい。また、DNAウイルスであれば、アデノウイルス科、ヘルペスウイルス科、ポックスウイルス科、イリドウイルス科、ヘパドナウイルス科、サーコウイルス科、パルボウイルス科、又はパポバウイルス科に属するいずれのウイルス由来のカプシドであってもよい。RNAウイルス群のレトロウイルス科に属するウイルスや、DNAウイルス群のアデノウイルス科、パルボウイルス科又はヘルペスウイルス科に属するウイルスは、前記カプシドの由来ウイルスとして好適に使用できる。レトロウイルス科のオンコウイルス、レンチウイルス若しくはスプーマ

ウイルス、アデノウイルス科のアデノウイルス、又はパルボウイルス科のAAVは、前記カプシドの由来ウイルスとして特に好適に使用できる。

[0049] カプシドが植物ウイルス由来の場合も、植物ウイルスは、RNAウイルス群又はDNAウイルス群を問わない。具体的には、例えば、RNAウイルスであれば、テヌイウイルス属、トバモウイルス群、ポティウイルス科、ダイアンソウイルス群、プロモウイルス群、ククモウイルス群、ラウドウイルス科、レオウイルス科又はクリプティックウイルス群に属するいずれのウイルス由来のカプシドであってもよい。また、DNAウイルスであれば、カリモウイルス属、バドナウイルス属又はジェミニウイルス属のいずれのウイルス由来のカプシドであってもよい。

[0050] カプシドを構成するカプソメアは、カプシドを構成可能な範囲においてアミノ酸変異を含んでいてもよい。ここでいう「変異」とは、カプソメアを構成するアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入されていることをいう。アミノ酸置換の場合、類似アミノ酸間での置換が好ましい。「類似アミノ酸」とは、アミノ酸を電荷、側鎖、極性、芳香族性等の性質に基づいて分類した場合に、同一の集団に属するアミノ酸をいう。このような集団には、例えば、塩基性アミノ酸群（アルギニン、リジン、ヒスチジン）、酸性アミノ酸群（アスパラギン酸、グルタミン酸）、非極性アミノ酸群（グリシン、アラニン、フェニルアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、メチオニン、トリプトファン）、極性無電荷アミノ酸群（セリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、チロシン、システイン）、分枝鎖アミノ酸群（ロイシン、イソロイシン、バリン）、芳香族アミノ酸群（フェニルアラニン、チロシン）、異節環状アミノ酸群（ヒスチジン、トリプトファン、プロリン）、脂肪族アミノ酸群（グリシン、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン）が挙げられる。

[0051] 本明細書においてカプシドは、後述する薬剤を包含し、それを標的細胞内へ送達する送達担体として機能する。カプシドは、大別すると正20面体型とらせん型が知られているが、本発明の薬剤送達粒子のカプシドは、薬剤を包

含できる限り、いずれの形態であってもよい。

[0052] 本発明の薬剤送達粒子が後述するエンベロープを纏わない裸のカプシドで構成されている場合、当該カプシドは、それ自身がウイルスの本来的に有する初期感染活性を有する。

[0053] 本明細書において「感染」とは、ウイルスの生活環において、ウイルス粒子が宿主細胞の細胞表面に吸着 (adsorption) し、宿主細胞内で増殖された後、細胞外に放出 (release ; エンベロープを有さない裸のカプシドの場合) 又は出芽 (budding ; エンベロープを有するカプシド、すなわち後述する被膜粒子の場合) されるまでの一連の過程をいう。「初期感染」とは、宿主細胞へのウイルス粒子の侵入段階をいう。具体的には、ウイルスの宿主細胞表面への吸着、宿主細胞内への侵入 (penetration) 及び宿主細胞内でのカプシドの破壊による脱殻 (uncoating) までを指す。それに対して「後期感染」とは、ウイルス感染における増殖段階であって、具体的には、例えば、宿主細胞内に遊離したウイルス遺伝子の転写又はウイルス遺伝子の逆転写とプロウイルスとしての宿主染色体への組み込みを介した後の転写、ウイルスタンパク質の翻訳、ウイルス核酸の複製、カプソマーによるカプシドの構築とウイルス核酸のカプシド内へのパッケージング、及び娘ウイルス粒子の宿主細胞からの放出又は出芽までを指す。

[0054] 前記吸着は、カプシド表面上のタンパク質が宿主細胞の細胞表面に露出しているレセプターを標的分子として認識し、それに吸着することによって達成される。故に、カプシドの宿主細胞の特異性は、宿主細胞上のレセプターの有無によって決定される。例えば、CD4をレセプターとするヒト免疫不全ウイルス (HIV) は、CD4を細胞表面に有するヘルパーT細胞を標的細胞とする。したがって、本発明の薬剤送達粒子に対して、標的細胞の特異性を付与するためには、標的細胞が有するレセプターを認識し、吸着し得るウイルスのカプシドを用いればよい。前述の例で言えば、本発明の薬剤送達粒子の標的細胞をヘルパーT細胞に特定したい場合には、ヘルパーT細胞の細胞表面に存在するレセプターCD4タンパク質を認識し、吸着するHIVのカプシドを薬剤送達

粒子の構成因子とすればよい。つまり、本発明の薬剤送達粒子は、中空カプシド又は後述する中空粒子が本来的に有する標的細胞特異的な送達活性を利用して、その内部に包含する目的の薬剤を該標的細胞内に送達することを特徴とする。

[0055] カプシドは、修飾されていてもよい。ここでいう修飾は、機能上の修飾又は標識上の修飾を含む。「機能上の修飾」とは、カプシドとその標的細胞間の特異的な結合活性を増強又は安定化する上で有用な修飾をいう。例えば、グリコシル化、脱グリコシル化、PEG化が挙げられる。「標識上の修飾」とは、薬剤送達粒子又はその標的細胞を *in vivo* で検出する上で有用な修飾をいう。例えば、蛍光色素（フルオレセイン、FITC、ローダミン、テキサスレッド、Cy3、Cy5、Alexa Fluor(登録商標)）、蛍光タンパク質（例えば、PE、APC、GFP、Venus、YFP、DsRed、Sirius）、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコースオキシダーゼ）、放射性同位元素（例えば、³H、¹⁴C、³⁵S）又はビオチン若しくは（ストレプト）アビジンによる標識が挙げられる。カプシドの修飾は、タンパク質への修飾が可能で、かつカプシドの有するウイルスの初期感染活性に影響を与えない方法であれば、特に限定はしない。また、市販の修飾キットを用いてもよい。例えば、Alexa Fluor 568 Protein Labeling Kit (A10238) (Molecular Probes社) が挙げられる。

[0056] (2) 被膜粒子

本明細書において「被膜粒子」とは、エンベロープを纏ったカプシドをいう。また、本明細書では、被膜粒子において、エンベロープを纏った中空カプシドを「中空粒子」と呼ぶ。以降、本明細書において、カプシド及び被膜粒子をまとめて「カプシド等」とし、中空カプシド及び中空粒子をまとめて「中空カプシド等」とする。

[0057] 「エンベロープ (envelope)」は、カプシドの外側に存在する外被であり、一部のウイルスが有する。脂質二重膜で構成され、所々にスパイク又はエンベロープタンパク質と呼ばれるウイルス由来の糖タンパク質が埋め込まれ

ている。エンベロープの脂質二重膜は、ウイルスが宿主細胞から出芽する際に宿主細胞の細胞質膜又は核膜の一部を纏ったものであり、宿主細胞に由来する。

[0058] 本発明の薬剤送達粒子において被膜粒子は、本発明の薬剤送達粒子に用いるカプシドの由来ウイルス種に応じて追加される選択的な構成因子である。すなわち、本発明の薬剤送達粒子に用いるカプシドの由来ウイルスがエンベロープを本来的に有する種である場合には、原則として必須の構成因子となる。エンベロープを本来的に有するウイルス種では、通常、エンベロープが宿主細胞への初期感染活性における吸着及び侵入の機能を担っているためである。そのようなウイルス種の具体例として、例えば、オルソミクソウイルス科のインフルエンザウイルス、ヘルペスウイルス科の単純ヘルペスウイルス、及びレトロウイルス科のHIVが挙げられる。一方、アデノウイルスやAAVのようにエンベロープを本来的に有さないウイルス種や、エンベロープを本来的に有するウイルス種であってもカプシドのみで初期感染活性の全てを有するウイルス種の場合には、エンベロープは必要に応じて適宜選択すればよい。

[0059] 本発明の薬剤送達粒子が被膜粒子で構成される場合、被膜粒子のエンベロープは、それ自身が本来的に有するウイルスの初期感染活性のうち、少なくとも吸着活性及び侵入活性を有する。一方、被膜粒子のカプシドは、初期感染活性のうち、少なくとも脱殻活性を有していればよい。

[0060] 被膜粒子のエンベロープに埋め込まれたウイルス糖タンパク質は、変異を有していてもよく、また修飾されていてもよい。

[0061] (3) 薬剤

本明細書において「薬剤」とは、本発明の薬剤送達粒子に内包される送達物質であり、具体的には、核酸、ペプチド、低分子化合物、又はその組合せである。薬剤は、標的細胞及び適用した生体に生物学的、物理学的、又は化学的効果をもたらし得る。生物学的効果には、例えば、標的遺伝子発現の増強若しくは抑制等の遺伝子発現制御、タンパク質の機能制御、免疫賦活若し

くは免疫抑制等の免疫系制御、又は細胞若しくは生体の生理機能の制御が挙げられる。物理学的又は化学的効果は、例えば、カプシド等又は薬剤の標識による標的細胞の生体内におけるイメージング化（例えば、FITG、GFP、X線、PET、MRI又はCTイメージング化）又は追跡効果が挙げられる。以下、それぞれの薬剤について説明をする。

[0062] (a) 核酸

本明細書において「核酸」は、天然型核酸、化学修飾核酸、人工核酸、核酸類似体及びそれらの組合せを含む。

[0063] 「天然型核酸」とは、自然界に存在する天然型ヌクレオチドのみが連結してなるDNA及びRNAをいう。ただし、本実施形態の天然型核酸は、薬剤送達粒子を構成するカプシドの由来ウイルス自身の遺伝子の全部又はその一部を含まない外因性の核酸である。「由来ウイルスの遺伝子の全部又は一部を含む核酸」には、例えば、由来ウイルスのウイルス核酸や由来ウイルスの遺伝子に基づいて構築されたウイルスベクターが該当する。

[0064] 「化学修飾核酸」とは、人工的に化学修飾をされた核酸をいう。例えば、メチルホスホネート型DNA/RNA、ホスホロチオエート型DNA/RNA、ホスホルアミデート型DNA/RNA、2'-O-メチル型DNA/RNA等が挙げられる。

[0065] 「人工核酸」とは、天然型核酸の一部に非天然型ヌクレオチドを含む核酸又は非天然型ヌクレオチドのみが連結してなる核酸をいう。ここでいう「非天然型ヌクレオチド」とは、前記天然型ヌクレオチドに類似の性質及び／又は構造を有する人工的に構築された又は人工的に化学修飾された自然界に存在しないヌクレオチドをいう。

[0066] 「核酸類似体」とは、天然型核酸に類似の構造及び／又は性質を有する人工的に構築された高分子化合物をいう。例えば、ペプチド核酸（PNA：Peptide Nucleic Acid）、ホスフェート基を有するペプチド核酸（PHONA）、架橋化核酸（BNA/LNA：Bridged Nucleic Acid/Locked Nucleic Acid）、モルフォリノ核酸（ホルフォリノオリゴを含む）等が挙げられる。

[0067] 核酸は、必要に応じて、リン酸基、糖及び／又は塩基が標識されていても

よい。標識は、当該分野で公知の標識物質を利用することができる。例えば、放射性同位元素（例えば、 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{14}C ）、DIG、ビオチン、蛍光色素（例えば、FITC、Texas、cy3、cy5、cy7、FAM、HEX、VIC、JOE、Rox、TET、Bodipy493、NBD、TAMRA）、又は発光物質（例えば、アクリジニウムエステル）が挙げられる。

[0068] 薬剤送達粒子に包含される核酸の具体例としては、機能性核酸、任意の遺伝子を含むベクター、mRNA若しくはその断片、又はその組合せが挙げられる。

[0069] 「機能性核酸」とは、生体内又は細胞内において、好ましくは細胞内において、特定の生物学的機能、例えば、酵素機能、触媒機能又は生物学的阻害若しくは亢進機能（例えば、転写、翻訳の阻害又は亢進）を有する核酸をいう。具体的には、例えば、RNA干渉剤、核酸アプタマー（RNAアプタマー及びDNAアプタマーを含む）、アンチセンスDNA、リボザイム（デオキシリボザイムを含む）、U1アダプター、モレキュラー・ビーコン、リボスイッチ、又は転写因子結合領域等が挙げられる。特にRNA干渉剤は、薬剤送達粒子の薬剤として好ましく適用できる。ここで、「RNA干渉剤」とは、生体内においてRNA干渉（RNA interference : RNAi）を誘導し、標的とする遺伝子の転写産物の分解を介してその遺伝子の発現を抑制（サイレンシング）することができる物質をいう。例えば、siRNA (small interfering RNA)、shRNA (short hairpin RNA) 又はmiRNA (micro RNA) (pri-miRNA及びpre-miRNAを含む) が挙げられる。RNA干渉剤は、遺伝子発現の抑制効果とその有用性が確認されながらも裸のRNA分子では生体内でヌクレアーゼによる分解を受けるため不安定であり、それ故、標的細胞内へ送達させる有効な手段が十分には確立されていなかった。しかし、本発明の薬剤送達粒子によれば、薬剤がカプシド内に保護されているため、生体内投与後にも標的細胞内に送達されるまでヌクレアーゼ等の分解から免れることができる。薬剤送達粒子は、中空カプシド等内に2種以上の機能性核酸を含むことができる。

[0070] 「ベクター」は、例えば、ウイルスベクター、プラスミド、コスミド、及

び人工染色体を含む。人工染色体には、ヒト人工染色体 (HAC; Human Artificial Chromosome)、酵母人工染色体 (YAC; Yeast Artificial Chromosome)、菌人工染色体 (BAC; Bacterial Artificial Chromosome)、及びP1由来人工染色体 (PAC; P1-derived Artificial Chromosome) を含む。好ましくは、HACである。前述のように、ウイルスベクターは、カプシドの由来ウイルスの遺伝子に基づいて構築されたウイルスベクターを含まない。

[0071] 各ベクターは、薬剤送達粒子を構成するカプシドの由来ウイルス遺伝子以外の任意の遺伝子又はその断片を含むことができる。例えば、転写因子、シグナル伝達因子、細胞外分泌性タンパク質又は酵素をコードする遺伝子、又はそれらの活性を有する断片が挙げられる。包含される遺伝子が、野生型遺伝子であるか、又は変異遺伝子であるかは問わない。また、異なる遺伝子を含む二以上のベクターが薬剤として包含されていてもよい。

[0072] 本発明の薬剤送達粒子において、各ベクターは、遺伝子又はその断片を標的細胞内で発現可能な状態で包含することが好ましい。ここで「発現可能な状態」とは、ベクターに含まれる遺伝子又はその断片が標的細胞内で発現可能なように、核酸発現システム内のプロモーターとターミネーターの制御下に配置されていることをいう。「核酸発現システム」とは、遺伝子の発現に必要な発現調節エレメントを、機能可能な状態で少なくとも一組有する系である。発現調節エレメントには、プロモーター及びターミネーターの他、必要に応じてエンハンサ及びポリA付加シグナルが含まれる。

[0073] プロモーターは、核酸が導入される標的細胞内で作動可能である必要がある。それ故、薬剤送達粒子を適用する生物種又はその近縁種由来のプロモーターが好ましい。例えば、ヒトへの投与を目的とする薬剤送達粒子であれば、プロモーターはヒト由来であることが好ましい。プロモーターには、発現パターンに応じて、過剰発現型プロモーター、構成的プロモーター、部位特異的プロモーター、段階特異的プロモーター、又は誘導性プロモーター等が知られているが、薬剤送達粒子では、いずれのプロモーターも使用することができる。導入する細胞内での所望の発現パターンに応じて、適宜選択すれ

ばよい。

- [0074] ターミネーターは、前記プロモーターにより転写された遺伝子の転写を終結できる配列であれば特に限定はしない。好ましくはプロモーターと同一生物種由来のターミネーターであり、より好ましくはプロモーターが由来する生物種のゲノム上で、そのプロモーターと組となっているターミネーターである。
- [0075] エンハンサは、ベクター内の遺伝子又はその断片の発現効率を增強できるものであれば特に限定はされない。好ましくはプロモーターと同一生物種由来のターミネーターである。
- [0076] 上記のような構成を有する核酸発現システム的具体例としては、発現ベクターが挙げられる。
- [0077] また、各ベクターは、薬剤である核酸が標的細胞内に送達されたことを確認するための選抜又は標識マーカー遺伝子を含むこともできる。標識若しくは選抜マーカー遺伝子には、例えば、薬剤耐性遺伝子、蛍光又は発光レポーター遺伝子（例えば、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルクロニターゼ（GUS）、又はGFP）、又は酵素遺伝子が挙げられる。
- [0078] さらに、本発明の薬剤送達粒子は、任意のタンパク質をコードする「mRNA」又はその断片を含んでいてもよい。mRNAは、mRNA前駆体又は成熟mRNAのいずれであってもよい。好ましくは成熟mRNAである。また、mRNA又はその断片は、5'末端にm7Gキャップ構造を、及び／又は3'末端にポリA鎖を含んでいてもよい。mRNAがコードするタンパク質は、野生型であるか、又は変異型であるかは問わない。
- [0079] 核酸のサイズは、カプシドに包含可能なサイズであれば、限定はしないが、カプシドの容量は、由来ウイルスの種類によって異なるため、包含される核酸の塩基数もカプシドの由来ウイルス種によって左右される。通常は、50kb以下、好ましくは20kb以下、より好ましくは10kb以下、一層好ましくは5kb以下である。
- [0080] (b) ペプチド

本明細書におけるペプチドは、オリゴペプチド、ポリペプチドのいずれも含む。オリゴペプチドの具体例としては、ペプチドホルモンやポリペプチド断片が挙げられる。ポリペプチド具体例としては、抗体、転写因子、シグナル伝達因子、酵素が挙げられる。

[0081] 抗体は、例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、組換え抗体、合成抗体、抗体フラグメントを含む。

[0082] 抗体がポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体の場合、免疫グロブリン分子は、任意のクラス（例えば、IgG、IgE、IgM、IgA、IgD及びIgY）、又は任意のサブクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2）であってもよい。薬剤としてモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を用いる場合、抗体は、薬剤送達粒子を投与する生物種と同種由来の抗体であることが好ましい。例えば、薬剤送達粒子をヒトに投与する場合、薬剤としてのモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体は、ヒト抗体であることが好ましい。

[0083] 「組換え抗体」とは、キメラ抗体、ヒト化抗体、又は多重特異性抗体をいう。「キメラ抗体」とは、異なる動物由来の抗体のアミノ酸配列を組み合わせることで作製される抗体で、ある抗体の定常領域（C領域）を他の抗体のC領域で置換した抗体である。例えば、マウスモノクローナル抗体のC領域をヒト抗体のC領域と置き換えた抗体が該当する。これによりヒト体内における当該抗体に対する免疫反応を軽減し得る。「ヒト化抗体」とは、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウス抗体のV領域における相補性決定領域（CDR）とヒト抗体のCDRとを置換したモザイク抗体である。「多重特異性抗体」とは、多価抗体、すなわち抗原結合部位を一分子内に複数有する抗体において、それぞれの抗原結合部位が異なるエピトープと結合する抗体をいう。例えば、IgGのように2つの抗原結合部位を有する抗体で、それぞれの抗原結合部位が異なるエピトープと結合する二重特異性抗体（Bispecific抗体）が挙げられる。

[0084] 「合成抗体」とは、化学的に又は組換えDNA法を用いることによって合成した抗体をいう。例えば、組換えDNA法を用いて新たに合成された抗体が挙げら

れる。具体的には、例えば、単鎖抗体 (scFv : single chain Fragment of variable region)、ダイアボディ (diabody)、トリアボディ (triabody) 又はテトラボディ (tetrabody) 等が挙げられる。

[0085] 「抗体フラグメント」とは、例えば、Fab、F(ab'₂)、Fv等が該当する。

[0086] ペプチドは、修飾されていてもよい。ペプチドの修飾には、機能上の修飾又は標識上の修飾を含む。機能上の修飾には、例えば、グリコシル化、アセチル化、ホルミル化、アミド化、リン酸化、又はPEG化が挙げられる。標識上の修飾には、蛍光色素 (フルオレセイン、FITC、ローダミン、テキサスレッド、Cy3、Cy5、)、蛍光タンパク質 (例えば、PE、APC、GFP、)、酵素 (例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコースオキシダーゼ)、放射性同位元素 (例えば、³H、¹⁴C、³⁵S) 又はビオチン若しくは (ストレプト) アビジンによる標識が挙げられる。

[0087] ペプチドのサイズは、カプシドに包含可能なサイズであれば、限定はしない。一般に、カプシドの容量は、由来ウイルスの種類によって異なり、また同じアミノ酸数のペプチドでもその立体構造によってカプシド内部への導入の可否が異なることから、それらを勘案して適宜定めればよい。通常は、500kDa以下、好ましくは100kDa以下、より好ましくは80kDa以下、さらに好ましくは50kDa以下である。

[0088] (c) 低分子化合物

本明細書において「低分子化合物」とは、分子量5000以下、好ましくは2000以下、より好ましくは1000以下の化合物であって、前記核酸及びペプチド以外の物質が該当する。例えば、ホルモン (例えば、アンドロゲン、エストロゲン、プロゲステロン、アルドステロン、コルチゾール等のステロイドホルモン)、神経伝達物質 (例えば、アドレナリン、エピネフリン、ノルアドレナリン、ドーパミン)、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、及び免疫抑制剤等の様々な医薬化合物が挙げられる。また、特定の低分子化合物と同等の薬理活性を有する低分子化合物の誘導体、又はその塩も含む。

[0089] 1-3. 効果

本発明の薬剤送達粒子によれば、ウイルスベクターのようなウイルス由来の遺伝子を含まないことから適用後の安全性が高く、かつ従来カプシド内への導入が困難であったペプチドや低分子化合物を薬剤として包含することができる。また、薬剤送達粒子を構成するカプシド又はエンベロープの血清型に基づく標的細胞特異的送達活性により、特定の細胞内に薬剤を送達することができる。

[0090] 本発明の薬剤送達粒子は、構成因子であるカプシド等により、ウイルスの宿主細胞への侵入段階である初期感染活性は有しているが、カプシド等の由来ウイルスの遺伝子の全部又は一部を含む核酸を含まないため、ウイルスの増殖段階である後期感染性を欠損している。したがって、本発明の薬剤送達粒子の適用により、内包する薬剤をエンドサイトーシス又は膜融合を介して標的細胞内に送達し得るが、標的細胞内でのウイルス粒子の増殖に伴う標的細胞の生理機能の破綻、及び宿主細胞からのウイルス粒子の放出又は出芽に伴う宿主細胞の細胞膜の損傷を生じない。このため、様々な分子や遺伝子の機能解析を、細胞の機能に影響を及ぼすことなく行うことが可能となる。

[0091] 2. 薬剤送達粒子の製造方法

2-1. 概要

本発明の第2の実施形態は、薬剤送達粒子の製造方法である。

[0092] 上述のように、AAVの中空カプシドを発現させて、これを薬剤の送達担体として利用する案は従来からあったが、ウイルスの初期感染活性を保持したままで、送達物質である薬剤を中空カプシドに導入する技術は、これまで確立されていなかった。本製造方法によれば、中空カプシド等のウイルスの初期感染活性を維持したままで、簡便な方法で、その内部に薬剤を導入し、第1実施形態の薬剤送達粒子を製造することができる。

[0093] 2-2. 製造方法

本発明の製造方法は、混合工程（1）及び導入工程（2）を含む。さらに、必要に応じて除去工程（3）を含むことができる。以下、各工程について具体的に説明をする。なお、本製造方法において、一連の工程は、汚染（コ

ンタミ)等を防止するために、無菌条件下で行われることが望ましい。

[0094] (1) 混合工程

「混合工程」とは、界面活性剤を含む溶液中で中空カプシド等と薬剤を混合する工程である。

[0095] 中空カプシド等は、前記第1実施形態に記載の各ウイルス由来のカプシド等を用いることができる。中空カプシド等の調製については後述する。本工程で用いる中空カプシド等は、精製処理後のものが好ましい。宿主細胞のタンパク質をはじめとする不純物が混在している場合、次の導入工程で薬剤の導入効率が低減するためである。

[0096] 薬剤は、前記第1実施形態に記載の薬剤を用いればよい。一つの中空カプシド等に異なる2種以上の薬剤を導入することもできる。この場合、上記溶液中に異なる2種以上の薬剤を加えればよい。第1実施形態と異なり、本実施形態では、必要であれば、使用する中空カプシド等由来ウイルス自身の遺伝子の全部又はその一部を薬剤として使用することができる。例えば、由来ウイルスのウイルス核酸や由来ウイルスの遺伝子に基づいて構築されたウイルスベクターを薬剤に使用してもよい。

[0097] 本工程で使用する界面活性剤は、特に限定はしない。例えば、Triton X-100、Triton X-114、NP-40、Brij-35、Brij-58、Tween-20、Tween-80、オクチル-β-グルコシド又はOTGのような非イオン性界面活性剤、PEGとPPGのコポリマーのような高分子非イオン性界面活性剤、SDSのような陰イオン性界面活性剤、CHAPS又はCHAPS0のような両性イオン性界面活性剤、又はそれらの組合せのいずれであってもよい。好ましくは、非イオン性界面活性剤である。

[0098] 「界面活性剤を含む溶液」は、前記界面活性剤を適当な溶媒に溶解した溶液をいう。溶媒には、例えば、水（蒸留水、滅菌水、脱イオン水を含む）、生理食塩水、又はリン酸バッファが挙げられる。好ましくは水である。溶液中の界面活性剤の濃度は、容量%で0.1%~20%、好ましくは1%~20%、より好ましくは3%~18%、さらに好ましくは5%~15%である。

[0099] 界面活性剤を含む溶液に混合する中空カプシド等と薬剤の（容量比又は質

量比)は、中空カプシド等に導入する薬剤の種類に応じて適宜定めればよい。

[0100] 中空カプシド等及び薬剤を、界面活性剤を含む溶液中に加えた後、必要に応じてPBS等のバッファで分量を調節し、攪拌器や攪拌棒等により攪拌して十分に混合して、混合液を調製すればよい。

[0101] (2) 導入工程

「導入工程」とは、前記混合工程後に得られた混合液を所定の温度で保持して、薬剤を中空カプシド等内に導入する工程をいう。

[0102] 保持温度は、 $-5\sim 50^{\circ}\text{C}$ の範囲内であればよい。 -5°C より低い場合には混合液が氷結してしまう可能性が高く、 50°C よりも高い場合には中空カプシド等及び／又は薬剤が変性及び／又は失活してしまう可能性が高いためである。好ましくは $0\sim 40^{\circ}\text{C}$ 、又は $4\sim 35^{\circ}\text{C}$ である。

[0103] 混合液の保持時間は、限定はしないが、混合後5分～120分が好ましい。5分よりも短いと薬剤の導入に不十分であり、120分よりも長く保持しても導入効率の増大は見込めないためである。より好ましくは、10分～90分、又は15分～60分である。

[0104] 本工程では、混合液を上記保持温度下で上記保持時間静置していればよい。必要であれば、軽く攪拌しても構わない。

[0105] 本工程で、界面活性剤処理された中空カプシド等内に薬剤が導入され、本発明の薬剤送達粒子が得られる。

[0106] (3) 除去工程

「除去工程」とは、前記導入工程の後に溶液中の界面活性剤を除去する工程である。本工程は、選択工程であり、必要に応じて行えばよい。

[0107] 本発明の薬剤送達粒子の製造方法では、中空カプシド等への薬剤の導入に界面活性剤を使用する。薬剤送達粒子は、前記導入工程で製造され得るが、薬剤送達粒子を含む導入工程後の溶液中には、使用した界面活性剤が混在している。薬剤送達粒子を生体に適用する場合、この界面活性剤は、通常、生体に有害な影響をもたらし得る。それ故、製造された薬剤送達粒子を後述す

る組成物の有効成分として使用する場合には、本工程で界面活性剤を除去しておくことが好ましい。

[0108] 界面活性剤の除去方法は、溶液中より界面活性剤を除去できる当該分野で公知の方法を使用すればよく、特に限定はしない。例えば、限外濾過膜を利用した除去方法、透析膜又は透析カセットによる透析操作を用いた除去方法が挙げられる。薬剤送達粒子のカプシドや被膜粒子の大きさは、通常10nm以上である。そこで、細孔径が10nmよりも小さい、すなわち分画分子量100kMW以下の限外濾過膜を用いて導入工程後の混合液を流通させることにより、導入工程後の溶液中の界面活性剤を分離、除去し、薬剤送達粒子を回収することができる。また、中空カプシド等に取り込まれなかった遊離の薬剤も、その種類によっては、薬剤送達粒子が適用される生体に有害な影響をもたらし得る。しかし、この方法によれば、同時に導入工程後の溶液中の遊離の薬剤も分離、除去することができるので便利である。なお、限外濾過膜を用いた方法では、導入工程において薬剤を取り込まなかった中空カプシド等は除去できない。しかし、中空カプシド等は、上述のように初期感染活性を有するが、後期感染活性を欠損していることから、薬剤送達粒子に混在していても問題はない。

[0109] 2-3. 中空カプシド等の調製方法

本実施形態の混合工程で使用する中空カプシド等は、ウイルスに感染した宿主細胞から直接調製することができる。また、中空カプシドのみ得ることを目的とする場合、組換えカプシドとして調製することもできる。

[0110] (ウイルスに感染した宿主細胞から調製する方法)

中空カプシド等は、通常、ウイルスに感染した宿主細胞内でウイルスが増殖し、娘ウイルス粒子が構築される際に、同時に形成される。したがって、中空粒子等は、ウイルスに感染した宿主細胞の抽出液から、又はウイルス粒子の放出若しくは出芽後の培養液から直接調製することができる。この場合、宿主細胞の抽出液又は培養液には中空カプシド等と共にウイルス粒子も混在している。それ故、宿主細胞の抽出液又は培養液からウイルス粒子を分離

し、又は失活させて、中空カプシド等を精製することが好ましい。これらは、公知の方法を利用すればよい。例えば、ウイルス粒子の分離と中空カプシド等の調製方法は、塩化セシウムを用いた密度勾配遠心法、及び特開2007-117003に記載のイオン交換膜を用いる方法が挙げられる。

[0111] 一方、AAVのようなウイルスは、自律的増殖ができず、増殖には原則として宿主細胞におけるヘルパーウイルスの共感染を必要とする。したがって、ヘルパーウイルス未感染細胞に、このようなウイルスを感染させても、その細胞内では増殖しないことから、宿主細胞抽出後のウイルス粒子の失活又は除去を要さずに使用できる。それ故、本発明の薬剤送達粒子の製造方法で使用する中空カプシドの由来ウイルスとして好ましい。特にAAVは、それ自体に病原性が知られていないことから安全性が高く、より好ましい。ヘルパーウイルスを必要とするウイルス由来の中空カプシド等を宿主細胞内で生産させる場合、宿主細胞にヘルパーウイルスを共感染させるか、ヘルパーウイルスの一部遺伝子（ヘルパー遺伝子）を宿主細胞内で予め又は同時に発現させておく必要がある。

[0112] 以下、一例として、AAV由来の中空カプシドを宿主細胞から調製する方法を説明する。

[0113] 宿主細胞内でAAVを増殖させる場合、当然AAV自身の遺伝子を必要とする。すなわち、AAV複製に関与するRep遺伝子及びカプシドタンパク質をコードするCap遺伝子、並びにそれらの遺伝子の5'末端及び3'末端に位置するITR (Inverted Terminal Repeat) である。AAVが感染し得る任意の宿主細胞に、これらの遺伝子を含む発現ベクター等を公知の形質転換又はトランスフェクション法等により導入してAAVを感染させることによって、感染した宿主細胞又はその培養液から中空カプシドを回収することができる。宿主細胞から中空カプシドを回収する方法は、公知の方法を用いればよい。例えば、宿主細胞を破碎して得られる細胞抽出液から、後述する実施例に記載の方法で回収すればよい。

[0114] また、AAVの複製及び増殖には、アデノウイルス遺伝子の一部を内在する宿

主細胞を利用することもできる。例えば、アデノウイルスのE1A遺伝子領域及びE1B19k遺伝子（本明細書では、しばしばこれらを総称して「E1遺伝子領域」とする。）を内在するヒト胎児腎細胞株（Human Embryonic Kidney Cell line）であるHEK293細胞（本明細書では、しばしば「293細胞」と略す）の利用が挙げられる。293細胞を用いてAAVを複製及び増殖させる場合には、ヘルパー遺伝子としてアデノウイルスのE2A遺伝子領域、E4orf6遺伝子及びVA RNAをコードする遺伝子のみを293細胞に導入すればよく、E1遺伝子領域の導入を必要としないのでAAV由来中空カプシドの生産に好適である。

[0115] 宿主細胞あたりのAAV由来中空カプシドの生産効率を向上させるために、上記ヘルパー遺伝子と共に293細胞にアデノウイルスのE1遺伝子領域をさらに導入してAAV産生能増強細胞株を調製してもよい。上記のように、293細胞は、既にアデノウイルスE1遺伝子領域を包含することから、通常はE1遺伝子領域を導入する必要はない。しかし、本発明者らは、後述の実施例1で示すように、E1遺伝子領域発現プラスミドを、ヘルパー遺伝子等を含む他のプラスミドと同時に293細胞に導入した場合、AAVの力価がヘルパー遺伝子のみを導入した293細胞よりも一層高くなり、AAV産生が増強されることを見出した。このメカニズムの詳細については定かではないが、E1遺伝子産物は、アデノウイルス初期遺伝子の発現のマスタースイッチとして機能すること（Matsushita, T., et al., 2004, J. Gen. Virol., 85: 2209-2214）から、E1遺伝子領域の細胞内発現量を通常の293細胞内発現量よりも増強することで、アデノウイルスの下流の遺伝子群の発現量がより増強され、結果として宿主細胞からより多くのAAV由来中空カプシドが生産され得たものと推測される。

[0116] 上記AAV産生能増強細胞株の調製は、E1遺伝子領域、E2A遺伝子領域、E4orf6遺伝子及びVA RNAをコードする遺伝子をそれぞれ発現可能な状態で、例えば、発現ベクターに挿入した状態で、293細胞に導入することによって達成し得る。必要であれば、上記各遺伝子又は遺伝子領域を含む発現ベクターを293細胞に導入後、E1遺伝子領域、E2A遺伝子領域、E4orf6遺伝子及びVA RNAをコードする遺伝子からなる群の一以上を安定的に発現し得る293細胞を選択し、当

該調製された新たな細胞系列を利用することもできる。

- [0117] 上記AAV産生能増強細胞株を用いて、AAVを産生させる場合、当該細胞株に、上記必要なAAV遺伝子（Rep遺伝子、Cap遺伝子、ITR等）を発現又は機能可能な状態で導入すればよい。
- [0118] さらに、宿主細胞の生物種におけるBcl-x_L遺伝子を含む発現ベクターを、前記E1遺伝子領域を含む発現ベクターと共に導入してもよい。Bcl-x_Lは、従来の研究から、E1B19k遺伝子の機能を補完すること(Matsushitaら、J. Gen. Viro l., 2004, 85: 2209-2214)が知られており、後述する実施例2で示すように、E1遺伝子領域をさらに活性化することができる。また、Bcl-x_Lは、細胞死（アポトーシス）を抑制する効果もあり(Yamaguchiら、Gene Ther., 2003, 10: 375-85)、遺伝子導入操作に伴う細胞毒性を抑制することもできる。
- [0119] また、293細胞にE1遺伝子領域発現ベクター及び／又はBcl-x_L遺伝子発現ベクターを導入させた後、それらを安定的に発現し得るようにライン化した細胞株を用いてもよい。例えば、後述する実施例2に記載のHEK293EB株等が挙げられる。
- [0120] （組換え中空カプシド等として調製する場合）
- 中空カプシド等のみを調製する場合、所望のウイルスのCap遺伝子を含む発現ベクターを、適当な宿主細胞内で発現させてもよい。例えば、AAVの組換え中空カプシド等を必要とするのであれば、所望の血清型AAVのCap遺伝子（具体的には、例えば、1型であれば、配列番号1で示される塩基配列からなるCap遺伝子、2型であれば、配列番号2で示される塩基配列からなるCap遺伝子、5型であれば、配列番号3で示される塩基配列からなるCap遺伝子、6型であれば、配列番号4で示される塩基配列からなるCap遺伝子、7型であれば、配列番号5で示される塩基配列からなるCap遺伝子、8型であれば、配列番号6で示される塩基配列からなるCap遺伝子又は9型であれば、配列番号7で示される塩基配列からなるCap遺伝子）を含むヌクレオチドを適当な発現ベクターに挿入すれば足りる。Cap遺伝子を宿主細胞内で発現させた後に、その宿主細胞を破碎した細胞抽出液から、又はその宿主細胞の培養液から、組換え中空カ

プシド等を得ることができる。細胞抽出液や培養液からの回収方法は、当該分野で公知の方法により行えばよい。

[0121] 本方法では、アデノウイルス由来のヘルパー遺伝子は不要であり、宿主細胞内で発現可能な発現ベクターを用いれば、その種類も問わない。例えば、細菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞、植物細胞を用いることができる。このとき、大腸菌用発現ベクターとしては、例えば、pET21 α 系、pGEX4T系、pC118系、pC119系、pC18系、pC19系を、枯草菌由来発現ベクターとしては、例えば、pUB110系、pTP5系を、酵母由来発現ベクターとしては、例えば、YEp13系、YEp24系、YCp50系を、昆虫細胞用発現ベクターとしては、バキュロウイルスを、動物細胞用発現ベクターとしては、pC18系又はpC19系の（例えば、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNAI/Neo）を、植物細胞用発現ベクターとしては、pRI系若しくはpGW系のバイナリーベクター等を、それぞれ利用すればよい。このような発現ベクターは、各製造メーカー（Novagen社、宝酒造、第一化学薬品、Qiagen社、Stratagene社、Promega社、Roche Diagnostics社、インビトロジェン社、Genetics Institute社、GEヘルスケア社等）から入手することもできる。

[0122] 上記発現ベクターへのCap遺伝子の挿入は当該分野で公知の組換え遺伝子技術を用いて行えばよい。例えば、Sambrook, J. et. al., (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Second Ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New Yorkに記載の方法を参考にすればよい。

[0123] 2-4. 中空カプシド精製方法

細胞破碎物からAAV由来中空カプシドを精製する方法は、当該分野で公知の方法に基づいて精製すればよい。例えば、一般的な方法である、セシウム密度勾配超遠心法によって精製することができる。又はイオン交換クロマトグラフィーを含む各種クロマトグラフィーを用いた精製方法が、例えば、特許第3313117、特表2000-510682、特表平11-511326、特表2001-513644、特表2001-514845号、又は米国特許第6,593,123号等に開示されており、それを利用して精製してもよい。さらに、特開2007-117003に開示された、イオン交換

膜を用いて中空カプシドとウイルス粒子とを分離、精製する方法を利用してもよい。

[0124] しかしながら、セシウム密度勾配超遠心法による精製方法は、中空カプシド等とウイルス粒子の比重が近接するため、両者を十分に分離することは困難という問題がある。上記各種クロマトグラフィーを用いた精製方法は、ビーズ充填カラムを用いるため、サンプルの拡散が不十分であり、またサンプルのカラムへの吸着効率が低く、かつカラムの容積が大きいため吸着及び溶出に時間がかかる等、精製の効率面での問題がある。さらに、イオン交換膜を用いた上記方法は、精製後にも可溶性タンパク質等の不純物の混入が多いという問題がある。

[0125] 本発明者は、宿主細胞抽出液又は培養液を所定の温度で加熱し、混在する可溶性タンパク質を凝固させることによって、可溶性タンパク質を簡便に除去する新規精製方法を開発した。本精製方法は、中空カプシド等のみならず、ウイルスベクターのようなウイルスゲノムを含むウイルス粒子の精製にも使用することができる。一般に、可溶性タンパク質を加熱によって凝固させた後に除去する方法は、周知の方法であるが、中空カプシド等やウイルス粒子の精製を下記に示す温度及び加熱時間条件で行い、可溶性タンパク質を除去する方法は、これまで知られていない。上記中空カプシド等やウイルス粒子の精製するための所定の加熱温度は、45～60℃の範囲であることが好ましい。45℃よりも低い温度では、可溶性タンパク質の変性が不十分で凝固しない可能性があり、また60℃よりも高い温度では、目的の中空カプシド等やウイルス粒子が変性して、ウイルスの初期感染活性が失活してしまう可能性があるためである。より好ましい温度範囲は48～58℃、さらに好ましい温度範囲は50～55℃である。

[0126] また、加熱時間は、加熱温度によって変化する。例えば、加熱温度が55～60℃の場合、好ましい過熱時間は3分～30分であり、より好ましくは5分～20分、さらに好ましくは5分～10分である。55～60℃の範囲で30分よりも長く加熱した場合、中空カプシド等が熱変性して、初期感染活性が失活する可能性が

あるためである。一方、加熱温度が45℃以上で55℃よりも低い場合、好ましい過熱時間は10分～90分であり、より好ましくは15分～60分、さらに好ましくは20分～40分である。45℃以上で55℃よりも低い温度範囲で、10分よりも短い加熱時間では、可溶性タンパク質の変性が不十分で凝固しない可能性があるからである。したがって、加熱時間は、加熱温度を考慮して、上記範囲内で適宜定めればよい。

[0127] 加熱処理の方法は特に限定はしない。宿主細胞抽出液又は培養液を直火、ホットプレート、マイクロ波（電子レンジ）又は誘導加熱（IH）、湯煎等で加熱すればよい。加熱処理によって凝固し、又は凝集した可溶性タンパク質の除去は、当該分野で公知の方法によって行い得る。例えば、遠心によって凝固タンパク質を沈殿させ、上清を回収する方法、又はろ過によって凝固タンパク質を除去する方法が挙げられる。本発明の加熱処理による中空カプシド等やウイルス粒子の精製方法を上述の一以上の公知精製方法と組み合わせてもよい。例えば、本発明の過熱処理による中空カプシド等やウイルス粒子の精製方法は、不純物としての可溶性タンパク質を除去するには有効であるが、中空カプシド等とウイルス粒子を分離することはできない。しかし、本発明の精製方法と、例えば、前記特開2007-117003に記載のイオン交換膜を用いる方法とを組み合わせることによって、中空カプシドのみを高純度で精製することができる。

[0128] 2-5. 効果

本発明の製造方法によれば、中空カプシド等の初期感染活性を喪失させることなく、簡便かつ効率的に薬剤を中空カプシド等に導入させて、薬剤送達粒子を製造することができる。本製造方法で得られた薬剤送達粒子は、使用する中空カプシド等がウイルスの後期感染活性を喪失しているためウイルスの増殖活性がなく安全性が高い。

[0129] 本発明のAAV中空粒子の調製方法によれば、宿主細胞あたりのAAV生産量を増強することができるため、より多くの中空粒子を調製することができる。

[0130] 本発明の中空粒子等やウイルス粒子の精製方法によれば、従来十分な除去

が困難であった宿主細胞抽出液又は宿主細胞培養液中の可溶性タンパク質を簡便に、除去することができる。

[0131] 3. 薬物組成物

3-1. 概要

本発明の第3の実施形態は、薬物組成物である。本発明の薬物組成物は、第1実施形態の薬剤送達粒子又は第2実施形態の製造方法で得られる薬剤送達粒子の少なくとも一つを有効成分として含むことを特徴とする。

[0132] 3-2. 構成

本明細書において「薬物組成物」は、有効成分である薬剤送達粒子に含まれる薬剤の作用によって、それを適用した生物又はその細胞に何らかの生理的作用を付与することを目的とする組成物である。そのような生理作用には、例えば、疾患若しくは病害抵抗性、薬物抵抗性若しくは感受性、生理活性の増強若しくは抑制、及び／又は新規形質が挙げられる。適用する生物が動物、特にヒトであって、有効成分の作用によって疾患の予防、診断、及び／又は治療を目的とする場合、本明細書では、特に「医薬組成物」という。本明細書において「予防」とは疾患又は病害の罹患を防ぐことをいう。「治療」とは、罹患した疾患又は病害及び／又はそれに伴う症状を緩和又は除去することをいう。

[0133] 本発明の薬物組成物は、薬剤送達粒子を有効成分として含む他、担体、及び／又は同一の若しくは異なる薬理効果を有する他の薬剤を含むことができる。

[0134] (薬剤送達粒子)

本実施形態の薬剤送達粒子は、第1の実施形態の薬剤送達粒子又は第2の実施形態の製造法で得られる薬剤送達粒子である。一の薬物組成物中に含まれる薬剤送達粒子は、異なる二以上のものであってもよい。この場合、薬剤送達粒子は、カプシド等が互いに異なるウイルス由来であってもよいし、及び／又は薬物が互いに異なる種類であってもよい。例えば、標的細胞の異なる薬剤送達粒子を含んでもよい。

[0135] 薬物組成物における薬剤送達粒子の含有量は、その薬剤送達粒子に含まれる薬剤の種類及び／又はその有効量、適用対象細胞、疾患又は病害の種類、薬物組成物の剤形（形態、大きさを含む）、並びに後述する担体の種類によって異なり、それぞれの条件を勘案し、適宜定められる。

[0136] 本明細書において「有効量」とは、薬剤送達粒子の包含される薬剤が有効成分としての機能を発揮する上で必要な量であって、かつそれを適用する生体に対して所望しない有害な副作用をほとんど又は全く付与しない量をいう。この有効量は、被検体の情報及び投与経路等の様々な条件によって変化し得る。

[0137] ここで「被検体」とは、薬物組成物を適用する生体（動物、植物を含む）をいう。被検体がヒトの場合には、特に「被検者」とする。また、「被検体の情報」とは、薬物組成物を適用する生体の様々な個体情報であって、例えば、被験者の場合であれば、全身の健康状態、疾患・病害に罹患している場合にはその進行度や重症度、年齢、体重、性別、食生活、薬剤感受性、併用薬物の有無及び治療に対する耐性等を含む。薬剤送達粒子の最終的な有効量、及びそれに基づいて算出される適用量は、個々の被検体の情報等に応じて、最終的には医師、歯科医師、獣医師又は植物医師等の判断によって決定され得る。

[0138] （担体）

「担体」とは、薬物組成物の製剤化や生体への適用を容易にし、また薬剤送達粒子に含まれる薬剤の効果を維持するために、その作用を阻害又は抑制しない範囲で添加される物質をいう。

[0139] 薬物組成物が動物適用用の場合、担体には、例えば、賦形剤、結合剤、崩壊剤、充填剤、乳化剤、流動添加調節剤又は潤滑沢剤が挙げられる。

[0140] 「賦形剤」としては、例えば、単糖、二糖類、シクロデキストリン及び多糖類のような糖（具体的には、限定はしないが、グルコース、スクロース、ラクトース、ラフィノース、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、デキストリン、マルトデキストリン、デンプン及びセルロースを含む）、金

属塩（例えば、リン酸ナトリウム若しくはリン酸カルシウム、硫酸カルシウム、硫酸マグネシウム）、クエン酸、酒石酸、グリシン、低、中、高分子量のポリエチレングリコール（PEG）、プルロニック、或いはそれらの組み合わせが挙げられる。

[0141] 「結合剤」としては、例えば、トウモロコシ、コムギ、コメ、若しくはジャガイモのデンプンを用いたデンプン糊、ゼラチン、トラガカント、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム及び／又はポリビニルピロリドン等が挙げられる。

[0142] 「崩壊剤」としては、例えば、前記デンプンや、カルボキシメチルデンプン、架橋ポリビニルピロリドン、アガー、アルギン酸若しくはアルギン酸ナトリウム又はそれらの塩が挙げられる。

[0143] 「充填剤」としては、例えば、前記糖及び／又はリン酸カルシウム（例えば、リン酸三カルシウム、若しくはリン酸水素カルシウム）が挙げられる。

[0144] 「乳化剤」としては、例えば、ソルビタン脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステル、プロピレングリコール脂肪酸エステルが挙げられる。

[0145] 「流動添加調節剤」及び「滑沢剤」としては、例えば、ケイ酸塩、タルク、ステアリン酸塩又はポリエチレングリコールが挙げられる。

[0146] このような担体は、必要に応じて適宜使用すればよい。本発明の薬物組成物は、上記の添加剤の他、必要に応じて矯味矯臭剤、溶解補助剤（可溶化剤）、懸濁剤、希釈剤、界面活性剤、安定剤、吸収促進剤（例えば、第4級アンモニウム塩類、ラウリル硫酸ナトリウム等）、増量剤、付湿剤、保湿剤（例えば、グリセリン、澱粉等）、吸着剤（例えば、澱粉、乳糖、カオリン、ベントナイト、コロイド状ケイ酸等）、崩壊抑制剤（例えば、白糖、ステアリン、カカオバター、水素添加油等）、コーティング剤、着色剤、保存剤、抗酸化剤、香料、風味剤、甘味剤、緩衝剤等を含むこともできる。

[0147] 薬物組成物が植物適用用の場合、担体には、例えば、粉碎天然鉱物、粉碎合成鉱物、乳化剤、分散剤及び界面活性剤等が挙げられる。

- [0148] 「粉碎天然鉱物」としては、例えば、カオリン、クレイ、タルク及びチョークが該当する。
- [0149] 「粉碎合成鉱物」としては、例えば、高分散シリカ及びシリケートが該当する。
- [0150] 「乳化剤」としては、非イオン性乳化剤やアニオン性乳化剤（例えば、ポリオキシエチレン脂肪アルコールエーテル、アルキルスルホネート及びアリアルスルホネート）が該当する。
- [0151] 「分散剤」としては、例えば、リグノ亜硫酸廃液及びメチルセルロースが挙げられる。
- [0152] 「界面活性剤」としては、例えば、リグノスルホン酸、ナフタレンスルホン酸、フェノールスルホン酸、ジブチルナフタレンスルホン酸のアルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩及びアンモニウム塩、アルキルアリアルスルホネート、アルキルスルフェート、アルキルスルホネート、脂肪アルコールスルフェート、脂肪酸及び硫酸化脂肪アルコールグリコールエーテル、さらに、スルホン化ナフタレン及びナフタレン誘導体とホルムアルデヒドの縮合物、ナフタレン又はナフタレンスルホン酸とフェノール及びホルムアルデヒドの縮合物、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル、エトキシ化イソオクチルフェノール、オクチルフェノール、ノニルフェノール、アルキルフェニルポリグリコールエーテル、トリブチルフェニルポリグリコールエーテル、トリスチアイルフェニルポリグリコールエーテル、アルキルアリアルポリエーテルアルコール、アルコール及び脂肪アルコール／エチレンオキシドの縮合物、エトキシ化ヒマシ油、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、エトキシ化ポリオキシプロピレン、ラウリルアルコールポリグリコールエーテルアセタール、ソルビトールエステル、リグノ亜硫酸廃液、及びメチルセルロースが該当する。
- [0153] 本実施形態の薬物組成物は、一薬物組成物中に上記担体を一以上包含することが可能である。
- [0154] なお、担体は、医薬組成物に使用する場合には製薬上許容可能なものを、

また植物に使用する場合には農学上許容可能なものを使用する。

[0155] (他の薬剤)

本発明の薬物組成物は、有効成分である薬剤送達粒子の作用を阻害又は抑制しない範囲で、薬剤送達粒子に包含される薬剤と同一又は異なる薬理作用を有する他の薬剤を一以上含むことができる。例えば、被験者の場合、治療対象疾患に対して併発する可能性の高い他の疾患が存在する場合、他の疾患に対する治療剤を含んでいてもよい。また、被検体が植物の場合、例えば、殺虫剤、殺菌剤、肥料を含んでいてもよい。

[0156] 3-3. 剤形

薬物組成物の剤形は、適用方法及び／又は処方条件によって異なる。

[0157] 薬物を動物に投与する場合には、投与方法は、通常、経口投与方法又は非経口投与方法に大別することができる。これについては後述する。

[0158] 経口投与に適した剤形としては、例えば、固形剤（錠剤、丸剤、舌下剤、カプセル剤、ドロップ剤、トローチ剤を含む）、顆粒剤、粉剤、散剤、液剤等を挙げることができる。さらに固形剤は、必要に応じ、当該分野で公知の剤皮を施した剤形、例えば、糖衣錠、ゼラチン被包錠、腸溶錠、フィルムコーティング錠、二重錠、多層錠とすることができる。

[0159] 非経口投与は、全身投与及び局所投与に細分され、局所投与は、組織内投与、経表皮投与、経粘膜投与及び経直腸的投与にさらに細分されるが、薬物組成物も、それぞれの投与方法に適した剤形にすることができる。全身又は組織内投与に適した剤形としては、例えば、液剤である注射剤が挙げられる。経表皮投与又は経粘膜投与に適した剤形としては、例えば、液剤（塗布剤、点眼剤、点鼻剤、吸引剤を含む）、懸濁剤（乳剤、クリーム剤を含む）、粉剤（点鼻剤、吸引剤を含む）、ペースト剤、ゲル剤、軟膏剤、硬膏剤等を挙げることができる。経直腸的投与に適した剤形としては、例えば、坐剤等を挙げることができる。

[0160] 薬物を植物に投与する場合には、薬剤組成物の剤形は、液体、固体（半固体を含む）又はその組み合わせが挙げられる。溶液剤、油性分散液剤、エマ

ルション剤、懸濁製剤、粉剤、散剤、ペースト剤、ゲル剤、ペレット剤、錠剤及び粒剤とすることができる。

[0161] なお、上記各剤形の具体的な形状、大きさについては、いずれもそれぞれの剤形において当該分野で公知の剤形の範囲内にあればよく、特に限定はしない。

[0162] 3-4. 薬物組成物の製造

本発明の薬物組成物を製剤化するには、原則として当該分野で公知の方法を利用することができる。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences (Merck Publishing Co., Easton, Pa.) に記載の方法を用いればよい。

[0163] 例えば、注射剤の場合には、第1の実施形態の薬剤送達粒子に製薬上許容可能な溶媒に溶解し、必要に応じて製薬上許容可能な担体を加え、当該分野で慣用されている方法により製造することができる。

[0164] 「薬学的に許容可能な溶媒」としては、例えば、水、エタノール、プロピレングリコール、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類等が挙げられる。これらは、殺菌されていることが望ましく、必要に応じて血液と等張に調整されていることが好ましい。

[0165] 3-5. 薬物組成物の適用方法

薬物組成物の有効成分である薬剤送達粒子は、ウイルスの標的細胞特異的な感染活性を利用したものである。それ故、薬物組成物の適用方法は、薬物組成物に含まれる薬剤送達粒子がその標的細胞に接触し得る方法であれば、当該分野で公知の単位形態で適用することができる。

[0166] 適用対象生物が動物の場合、当該分野で公知の投与単位形態には、上述のように、例えば、経口投与方法及び非経口投与方法が挙げられる。非経口投与方法は、さらに、局所投与方法（例えば、皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与のような組織内投与方法、経皮投与、経粘膜投与、又は経直腸的投与等）に細分できる。本発明の薬物組成物は、これらの投与単位形態のいずれを使用してもよい。限定はしないが、好ましい方法は、注射、経口投与、又は経粘膜投与

である。

[0167] 注射は、標的部位又はその近傍に薬物組成物を直接投与でき、また、血液を介して薬剤送達粒子を全身に行き渡らせることができるからである。さらに、侵襲性が比較的 low、被検体に与える負担が小さいからである。注射による薬物組成物の注入部位は、特に限定しない。例えば、静脈内、動脈内、肝臓内、筋肉内、関節内、骨髓内、髄腔内、心室内、経皮、皮下、皮内、腹腔内、鼻腔内、腸内、舌下等が挙げられる。好ましくは、静脈内注射、動脈内注射等の血管内への注射である。

[0168] 経口投与や経粘膜投与は、薬剤送達粒子が腸管粘膜、口腔粘膜、咽頭粘膜、鼻腔粘膜等を介して体内に取り込まれ得る場合、侵襲性が低く、投与が容易だからである。

[0169] 適用対象生物が植物の場合、当該分野で公知の投与単位形態は、薬物組成物に含まれる薬剤送達粒子が植物体に接触し得る方法であれば、当該分野で公知の慣用の方法を使用することができる。植物体への接触方法としては、例えば、植物体への噴霧、散布、塗布、注入、浸漬、有傷接種（針接種を含む）、根部からの吸収等の方法が挙げられる。適用対象植物体への接触部位は、地上部であれば、葉、花芽、実、茎、枝等、また地下部であれば根、根茎、根塊等、所望の箇所をよく、特に限定しない。薬剤送達粒子の由来するウイルスの感染経路に応じて、適宜勘案すればよい。

実施例

[0170] <実施例 1 : AAV由来中空カプシドの大量製造 (1) >

(目的)

既存の内在性E1遺伝子領域を含むHEK293細胞に、さらにE1遺伝子領域発現プラスミドを導入した場合、その導入量による、AAVの産生量の変化を検証した。

[0171] (方法)

225cm²フラスコ16個を用いて、フラスコあたり 2×10^7 個の293細胞を10%FBS + /DMEM / F12培地で5%CO₂下37°Cにて培養した。培養48時間後にリン酸カルシ

ウム法にて、AAVのITR (Inverted Terminal Repeat) とLacZ遺伝子を含むAAVベクタープラスミドをフラスコあたり23 μ g、2型AAVのrep遺伝子及び8型AAVのcap遺伝子をクローニングしたAAVヘルパープラスミドをフラスコあたり23 μ g、2型アデノウイルスのE2A遺伝子領域、E4orf6遺伝子、VA-RNAをコードする遺伝子をクローニングしたアデノウイルスヘルパープラスミドをフラスコあたり23 μ g、及びE1遺伝子領域発現プラスミド(pE1 Δ 55)をフラスコあたり0、2.3、6.9又は23 μ gで導入し(各n=4)、AAV粒子を細胞内で複製させた。pE1 Δ 55を0、2.3、6.9 μ gで用いた場合には、プラスミド内の総量が同一となる様にコントロールプラスミド(pCMV)にて調製した。なお、pE1 Δ 55は、E1B遺伝子領域よりE1B55k遺伝子のみを欠失したE1遺伝子領域発現プラスミドである。6時間後に10%FBS+/DMEM/F12培地で培地交換を行なった。72時間後に細胞を回収し、細胞ペレットの凍結融解を6回繰り返す、毎回ボルテックス操作にてよく混和した。DNaseI処理にて残存するプラスミドを消化後、Q-PCR法にてAAVのコピー数(g. c.)を定量化した。

[0172] なお、細胞培養方法とトランスフェクション方法の詳細については、Okada T., et al., *Methods Enzymol.*, Vol 346: *Gene Therapy Methods* (ed. by M. Ian Phillips), 2002, 378-393; Okada T., et al., *Methods.*, 2002, 28 : 237-247 ; 及びOkada T., et al., *Hum. Gene Ther.*, 2005, 16: 1212-1218 に記載の方法に基づいて行った。

[0173] (結果)

図1に結果を示す。この図で示すように、HEK293細胞に、E1遺伝子領域発現プラスミドを導入した場合、導入する発現プラスミドの量依存的に、AAV産生量が向上することが明らかとなった。

[0174] <実施例2 : AAV由来中空カプシドの大量製造(2)>

(目的)

E1遺伝子領域及びBcl-x_L遺伝子を安定的に発現する293細胞を構築し、Bcl-x_L遺伝子の発現増強による、AAVの産生量を検証した。

[0175] (方法)

まず、E1遺伝子領域及びBcl-x_L遺伝子を安定的に発現する293細胞株を構築した。E1遺伝子領域発現プラスミドpE1Δ55、Bcl-x_L遺伝子発現プラスミド、及びネオマイシン発現プラスミドを20：20：1の比率にて293細胞に導入し、ネオマイシン耐性の細胞株のクローンを10個単離して増殖させた。このうち、最も増殖率の高いクローンを選択してライン化し、「HEK293EB細胞株」（本明細書では、しばしば「293EB細胞株」と略す）とした。

[0176] 次に、225cm²フラスコ28個を用いて、フラスコあたり2×10⁷個の293細胞及び293EB細胞を、それぞれ10%FBS+/DMEM/F12培地で培養した。培養48時間後にリン酸カルシウム法にて、293EB細胞については、AAVのITR-LacZ遺伝子を含むAAVベクタープラスミドをフラスコあたり23μg、2型AAVのrep遺伝子及び8型AAVのcap遺伝子をクローニングしたAAVヘルパープラスミドをフラスコあたり23μg、2型アデノウイルスのE2A、E4、VA-RNA遺伝子をクローニングしたアデノウイルスヘルパープラスミドをフラスコあたり23μgで、293細胞については、さらにE1遺伝子発現プラスミドpE1Δ55をフラスコあたり23μgで、それぞれ導入した。6時間後に10%FBS+/DMEM/F12培地で培地交換を行なった。72時間後にそれぞれの細胞を遠心して回収し、細胞ペレットの凍結融解を6回繰り返し、毎回ボルテックス操作にて十分に混合した。DNaseI処理にて残存するプラスミドを消化後、Q-PCR法にてベクターのゲノムコピー数を定量化した。

[0177] なお、細胞培養方法とトランスフェクション方法の詳細については、実施例1に準じた。

[0178] (結果)

結果を図2に示す。この図で示すように、293細胞と比較して、E1遺伝子領域及びBcl-x_L遺伝子を安定的に発現する293EB細胞ではAAV産生量が2.1倍に増加することが明らかとなった。

[0179] <実施例3：AAV由来中空カプシドの大量製造(3)>

(目的)

細胞破碎物からAAVやAAV由来中空カプシドを精製する場合、従来法では密

度勾配超遠心やイオン交換精製で行っていたが、不純物の混入が多く、精製効率が十分とは言い難かった。

[0180] 本発明者は、前記細胞破砕物を55°Cで30分間加熱して可溶性タンパク質を凝固させたのち、沈殿、除去することにより、ウイルス粒子や中空カプシドを簡便に精製する方法を見出した。そこで、検討するため、以下の検討を行った。

[0181] そこで、AAVや中空カプシドを含む細胞破砕物から不純物を効率的に除去し、かつAAVや中空カプシドの初期感染活性を可能な限り保持し得る至適条件を検討した。

[0182] (方法)

1.4×10⁸個の293EB細胞を、225cm²フラスコ28本（又は6320cm²の10段フラスコ1個）を用いて10%FBS+/DMEM/F12培地で5%CO₂下37°Cにて培養した。培養48時間後に、AAVのITR (Inverted Terminal Repeat) を含むルシフェラーゼ遺伝子を挿入したAAVベクタープラスミド、AAVの2型rep及び9型cap遺伝子をクローニングしたAAVヘルパープラスミド、及び2型アデノウイルスのE2A、E4、VA-RNA遺伝子をクローニングしたアデノウイルスヘルパープラスミドをそれぞれ650μgずつリン酸カルシウム法で293EB細胞に導入し、AAV粒子及びAAV中空カプシドを該細胞内で複製させた。6時間後に10%FBS+/DMEM/F12培地で培地交換を行なった。72時間後に細胞を遠心にて回収し、細胞ペレットを30mLのTBSバッファにて懸濁した。このサンプルの凍結融解を4~6回繰り返し、毎回ボルテックス操作にて十分に混合した。

[0183] 150μLの1M MgCl₂と20μLの250U/μL Benzonaseを添加し、37°Cで30分間反応させた後、300μLの0.5M EDTAを添加して反応を停止させた。900μLの5M NaClを加えてよく混和し、4°Cで10,000×g、10分間遠心して上清を回収した。

[0184] Benzonase処理後のサンプルを1.0mLずつ24本のマイクロチューブに分注し、未処理、50°C/30分、50°C/60分、55°C/10分、55°C/20分及び55°C/30分の各条件（それぞれn=4）で加熱後、生じた凝固物を4°C、10,000×gの条件下で10分間遠心して、沈殿物を回収し、その平均値（mg）を算出した。また、24ウ

エルプレートにて培養した293細胞に、 1×10^{11} ゲノムコピー／ウェルの条件で、上記各条件にて処理後のカプシドを混合した。初期感染活性を、細胞の遺伝子発現で検証し、その評価として、Bright-Glo Luciferase Assay System (Promega社)を用い、サーモ・エレクトリック社製発光プレートリーダーAppliskanを用いて、ルシフェラーゼ活性を定量した。

[0185] なお、細胞培養方法とトランスフェクション方法の詳細については、実施例1に準じた。

[0186] (結果)

表1に結果を示す。この表では、ルシフェラーゼ活性をRLU(relative light unit)で示している。この結果から、いずれの条件でも未処理と比較して、可溶性タンパク質を30%以上多く除去できることが明らかとなった。一方、55°Cで20分以上処理した場合には、遺伝子発現が低減することがわかった。各条件を比較すると、50°Cでは60分以下、55°Cでは20分よりも短い時間が適当であることが示された。

[表1]

加熱条件	沈殿物 (mg)	沈殿物の平均 (mg)	遺伝子発現 (RLU)
未処理	25.4	25.8	166.0
	25.8		
	26.1		
50°C/30分	36.2	34.2	160.3
	33.3		
	33.0		
50°C/60分	36.9	37.5	155.0
	36.7		
	39.0		
55°C/10分	34.2	33.6	143.0
	32.6		
	33.9		
55°C/20分	38.3	38.5	115.3
	38.4		
	38.9		
55°C/30分	39.5	41.7	118.3
	41.8		
	43.9		

[0187] <実施例4：薬剤送達粒子の製造（1）>

（目的）

本発明の薬剤送達粒子の製造方法による薬剤送達方法の製造の実施とその細胞内送達能の効果を検証した。

[0188] （方法）

（1）中空カプシドの製造

4×10⁸個の293EB細胞を、225cm²フラスコ28本（又は6320cm²の10段フラスコ1個）を用いて、10%FBS+/DMEM/F12培地で、5%CO₂下37°Cにて培養した。培養48時間後に、AAVのITRを含むeGFP遺伝子を挿入したAAVベクタープラスミド、9型AAVのrep及びcap遺伝子をクローニングしたAAVヘルパープラスミド、及び2型アデノウイルスのE2A、E4、VA RNA遺伝子をクローニングしたアデノウイルスヘルパープラスミドをそれぞれ650μgずつリン酸カルシウム法にて293EB細

胞に導入し、AAV粒子及びAAV中空カプシドを該細胞内で複製させた。72時間後に細胞を遠心にて回収し、細胞ペレットを30mLのTBSバッファにて懸濁した。このサンプルの凍結融解を4~6回繰り返し、毎回ボルテックス操作にて十分に混合した。

[0189] 150 μ Lの1M MgCl₂と20 μ Lの250U/ μ L Benzonaseを添加し、37°Cで30分間反応させた後、300 μ Lの0.5M EDTAを添加して反応を停止させた。900 μ Lの5M NaClを加えてよく混和し、4°Cで10,000 \times g、10分間遠心して上清を回収した。

[0190] さらに、サンプルを50°Cで30分間加熱して、可溶性タンパク質を凝固させた後、4°Cで10,000 \times g、10分間遠心して上清を回収した。

[0191] (2) 超遠心による粗精製

1.50g/mL塩化セシウム溶液上に1.25g/mL塩化セシウム溶液を重層し、さらにこの上に前記(1)で回収した上清を重層した。16°Cで25,000 \times g、3時間超遠心後、塩化セシウム層を遠心チューブ下方から0.5mLずつ回収した。各分画の屈折率(RI: refractive index:)を測定し、RIが1.365~.368の画分を回収した後、サンプルの約100倍量のMHNバッファ(3.33mM MES、3.33mM HEPES(pH6.5)、3.33mM NaOAc)に対し、30分間透析した。得られたサンプルの約5倍量のMHNバッファでサンプルを希釈した。

[0192] (3) 中空カプシドの分離及び精製

イオン交換膜として基材表面にスルホン酸基を保持する陽イオン交換膜ムスタングS(ポールコーポレーション)を使用した。FPLCシステムとして、AKTA explorer 100(GEヘルスケア)を用い、精製操作を行った。MHNバッファでムスタングSアクロディスクを平衡化した後、流速3mL/分でサンプルをムスタングSアクロディスクに中空カプシドを吸着させ、AAV粒子を分離、除去した。10CVのMHNバッファでムスタングSアクロディスクを洗浄し、0~100%B(2M NaCl)/50CVの濃度勾配条件下にてピークの画分に含まれる中空カプシドを溶出し、画分量1mLで回収した。電子顕微鏡により、中心に黒い部分があるウイルスゲノムが入っていない中空カプシドであることを確認した。

[0193] (4) 薬剤送達粒子の調製

最終濃度0.5%のTriton X-100 (Wako) の存在下で、(1) ~ (3) で調製した9型AAV (AAV9) の中空カプシド4 μ gを、最終濃度10 μ Mの3' -カルボキシフルオレセイン標識化モルフォリノオリゴ (Gene Tools社) (以下、「フルオレセイン-PM0」とする) を薬剤として混合した後、PBSにて総量を20 μ Lとした。その後、軽く攪拌して氷上で30分間静置した。

[0194] 続いて、限外濾過膜Vivaspin 500 (30kDa MWC0) (GE Healthcare, Cat.#28-9322-35) を用いて、Triton X-100及び未導入のフルオレセイン-PM0を除去した。具体的には、前記混合サンプル20 μ Lを500 μ LのPBS溶液に懸濁し、Vivaspin 500にて15,000回転/分の速度で、4 $^{\circ}$ Cにて10分間遠心した。この操作を2回繰り返し、最終サンプルをPBS溶液で20 μ Lに調整した。ここで得られた薬剤送達粒子を便宜的に「AAV9/PM0」とする。

[0195] (5) 標的細胞への導入

ヒト横紋筋肉種細胞 (RD) 株 (財団法人ヒューマンサイエンス振興財団、ヒューマンサイエンス研究資源バンクより入手; JCRB9072) に (4) で調製したAAV9/PM0を投与して混合し、薬剤の細胞内への取り込みと局在を評価した。具体的には、 1.0×10^4 個のRD細胞を7 μ LのAAV9/PM0と混合し、5% CO₂、37 $^{\circ}$ Cの培養条件下で培養した。培地は、ペニシリン(100IU/mL)及びストレプトマイシン(100 μ g/mL)含有DMEM/F12(1:1)培地を用い、血清は終濃度10%とした。また、対照用として、フルオレセイン-PM0のみを 1.0×10^4 個のRD細胞と混合したサンプル、及び従来技術のPM0用トランスフェクション試薬エンドポーター (Gene Tools社) を用いて、フルオレセイン-PM0をRD細胞に導入したサンプルを調製した。この際、エンドポーターの投与量は、100 μ Lのウェルの培地あたり0.6 μ Lとし、終濃度は6 μ Mとした。

[0196] 処理24時間後にオリンパス社製IX70蛍光顕微システムを用いて蛍光観察を行い、AAV9/PM0のRD細胞内への取り込みと局在を評価した。また、処理120時間後のRD細胞の形態を観察した。

[0197] (結果)

図3に結果を示す。A~Cは、投与24時間後の蛍光図である。Aはフルオレセ

イン-PM0のみで処理したRD細胞を、Bはエンドポーターで処理したRD細胞を、CはPAAV9/PM0で処理したRD細胞を、それぞれ示す。またD及びEは、それぞれエンドポーターで処理したRD細胞とPAAV9/PM0で処理したRD細胞の処理120時間後のRD細胞の形態を示す。

[0198] Aでは、蛍光はほとんど観察されず、フルオレセイン-PM0のみを混合してもPM0は取り込まれないことが示された。これに対して、B及びCでは、細胞内に蛍光が観察され細胞内へフルオレセイン-PM0の取り込みが認められたが、Cでは、核を中心として、Bを上回る強い蛍光が観察され、高効率で細胞内、特に核内にPM0が取り込まれたことが示唆された。そこで、画像解析ソフトBZ-II (KEYENCE社) を用いてB及びCにおける蛍光強度を測定し、フルオレセイン-PM0の取り込み率を比較した。核内の蛍光強度値(RFU)の平均値は、エンドポーターを用いた場合が55であったのに対して、PAAV9/PM0を用いた場合には414であり、PAAV9/PM0の方が約7.5倍高かった。また、細胞質に対する核の蛍光強度の比率は、エンドポーターの場合は2.0、PAAV9/PM0の場合は4.6であり、中空カプシドの方が2倍強の値を示した。

[0199] 一方、処理120時間後のRD細胞を観察したところ、エンドポーター処理をしたサンプルではほとんどの細胞が死滅しており (図3D)、エンドポーターの細胞毒性が示唆されたのに対して、PAAV9/PM0処理の場合には細胞の死滅はほとんどなく、また形態的な変化も認められなかった (図3E)。

[0200] 以上の結果から、中空カプシド等を用いた本発明の薬剤送達粒子は、エンドポーターよりもPM0の細胞内、特に核への送達効率が高く、さらに標的細胞に対する安全性が立証された。

[0201] <実施例5：薬剤送達粒子の製造(2)>

(目的)

実施例4では、中空カプシド等内に導入する薬剤として低分子化合物である3'-カルボキシフルオレセインで標識化した核酸類似体のモルフォリノオリゴを本発明の製造方法によって導入した。そこで、本実施例では、薬剤を他の核酸又はペプチドにした場合であっても、本発明の製造方法によって実

施例4と同様に中空カプシド等内に導入でき、かつ製造されたその薬剤送達粒子が細胞内に導入され得ることを検証した。

[0202] (方法)

(1) 中空カプシドの製造から分離及び精製

AAV中空カプシドの製造から分離及び精製までは、実施例4に記載の方法と同様であることから、その記載は省略する。

[0203] (2) 薬剤の調製

(i) FITC-siRNA

モルフォリノオリゴ以外の他の核酸としてFITC標識化したsiRNA (FITC-siRNA) を用いた。FITC-siRNAは、siRNAコントロール配列のセンス鎖であるsiCont-s (Sigma Genosys)の5'末端にFITC標識したもの (5'-Fluorescein (5,6-FAM) UUCUCCGAACGUCACGUUU-3'; 配列番号8) と、同コントロール配列のアンチセンス鎖であり、5'-ACGUGACACGUUCGGAGAAUU-3' (配列番号9) で示す塩基配列を有するsiCont-as (Sigma Genosys)からなるsiRNAを使用した。当該FITC-siRNAの合成は、Sigma genosysに合成委託した。

[0204] (ii) Alexa488-BSA及びAlexa-IgG

ペプチドとしてAlexa488標識されたウシ血清アルブミン (BSA) (Alexa488-BSA; Molecular Probes, A13100) 及び抗ラット Alexa-IgG (Molecular Probes, A21208) を使用した。

[0205] (3) 薬剤送達粒子の調製

AAV中空カプシド7.8 μ g (0.65mg/mL)を12 μ LとPBSを4 μ L混合し、界面活性剤として0.5% Pluronic F-68 (PEGのコポリマーである高分子非イオン性界面活性剤)を1 μ L加えた溶液に、100 μ MのFITC-siRNAを3 μ L、50 μ MのAlexa488-BSAを1 μ L又は13 μ MのAlexa-IgGを加え、PBSで20 μ Lにメスアップしたものを、30分間、室温に静置した。その後、PBSで200 μ Lにメスアップした後、70%エタノールで滅菌した限外濾過カラムを用いて30 μ Lまで濃縮し、さらに同一操作を反復して、フリーのsiRNA、BSA又はIgGを除去した。

[0206] (4) 標的細胞への導入

基本的な方法は、実施例4に記載の方法と同じである。10% Fetal Bovine Serum (CCB, Lot8D0264)及び1% ペニシリン-ストレプトマイシン (Sigma P44 58)を添加したDMEM/F12(1:1)培地(Gibco, #11320)で培養したヒト横紋筋肉腫RD細胞株(財団法人ヒューマンサイエンス振興財団、ヒューマンサイエンス研究資源バンクより入手、JCRB9072)を10,000 cells/wellとなるように96wellプレートに播種し、37°C、5% CO₂下で一晩培養した。その後、前記濃縮後の30 µL溶液のうち1/5量(6 µL)を培養液に添加し、さらに同条件で20時間培養した。

[0207] 培養後に培養液をPBS(+)に交換し、オリンパス社製IX70蛍光顕微システムを用いて蛍光観察(励起330-385nm)を行い、AAV9/PM0のRD細胞内への取り込みと局在を評価した。

[0208] (結果)

図6に結果を示す。この結果から、本発明の製造方法によって、モルフォリノオリゴ以外の酸FITC標識された核酸であるsiRNAであっても、またAlexaで標識されたペプチド(BSA及びIgG)であっても中空カプシド等内に導入でき、さらにその薬剤送達粒子が細胞内に導入され得ることが確認された。特に、FITC-siRNAでは、導入されたFITC-siRNAが核に送達されていることも示された。

[0209] この結果から、本発明の製造方法によれば、核酸、ペプチド、低分子化合物、及びそれらの組合せを中空カプシド等内に導入することが可能であり、さらに、その結果得られる薬剤送達粒子は、ウイルスカプシド等の感染性に基づいて、所定の細胞内に導入されることが立証された。

[0210] <実施例6：界面活性剤の濃度効果>

(目的)

薬剤を効率的に中空カプシド等内に導入するための界面活性剤の濃度条件について検証した。

[0211] (方法)

薬剤送達粒子の調製の基本的な手順は、前記実施例4(4)に記載の方法

に従った。ただし、界面活性剤にはTween20を用い、その濃度は、0、0.5、0.75、1、3及び10%とし、また薬剤にはFITC標識化PMO（以下、「FITC-PMO」とする）を用いた。さらに、AAV中空カプシド、及びTween20を混合後、4°Cで30分間静置した。

[0212] FITC-PMOを導入した中空カプシド、すなわち薬剤送達粒子と未導入の遊離FITC-PMOを限外濾過膜Vivaspin 500 (30kDa MWC0) で遠心分離し、分離後、それぞれのサンプルの蛍光強度を測定して、カラムにかける前の蛍光量との割合を算出し、取り込み率とした。

[0213] (結果)

結果を図4に示す。取り込み率は、濃度依存的に上昇し、10%では半数以上の割合で効果的に取り込みが可能となったことが明らかとなった。

[0214] <実施例7：中空カプシドの細胞特異的送達活性>

(目的)

本発明の薬剤送達粒子に用いる中空カプシド等が標的細胞特異的送達活性を有することを検証した。

[0215] (方法)

Alexa Fluor 568 Protein Labeling Kit(Molecular Probes)を用いて、AAV9由来中空カプシドを蛍光標識した。具体的な標識方法については、添付のプロトコルに従った。続いて、ヒト線維芽細胞(WI-38)株にMyoD発現アデノウイルスベクター(MOI=10)を感染させて筋分化誘導した細胞と、誘導処理しない細胞のそれぞれに、前記蛍光標識したAAV9中空カプシドを投与した。MyoD発現アデノウイルスベクターでの感染から4日後、AAV9中空カプシド投与から16時間後に細胞における蛍光を観察した。なお、AAV9の標的細胞は筋細胞である。

[0216] (結果)

図5に結果を示す。Aは筋分化非誘導処理のWI-38株を、Bは筋分化誘導処理後のWI-38株を、それぞれ示す。未分化のWI-38細胞では、わずかな蛍光しか観察されなかった(図5A)が、筋分化したWI-38細胞では細胞質や核膜周囲

に強い蛍光が観察された（図5B）。すなわち、蛍光標識したAAV9中空カプシドは、筋分化細胞に親和性が高く、細胞内では核膜周囲に集積していることが確認された。この結果は、中空カプシド等が標的細胞特異的な送達活性を有していることを示している。

[0217] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

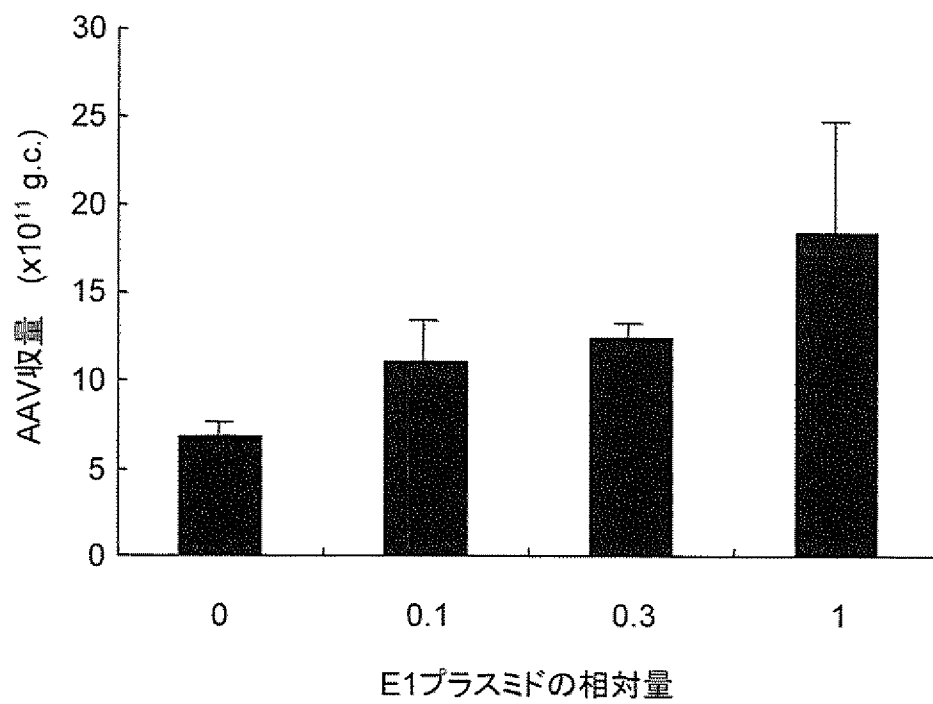
請求の範囲

- [請求項1] 薬剤を含むカプシド又は被膜粒子からなる薬剤送達粒子の製造方法であって、
- (a) 0.1~20%の界面活性剤を含む溶液中で中空カプシド又は中空粒子と薬剤を混合する工程、及び
 - (b) 前記混合工程後の混合液を-5~50°Cで保持して、薬剤を中空カプシド又は中空粒子内に導入する工程を含む前記製造方法。
- [請求項2] 前記導入工程において混合液を5分~120分保持する、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項3] (c) 前記導入工程後に溶液中の界面活性剤を除去する工程をさらに含む、請求項1又は2に記載の製造方法。
- [請求項4] 界面活性剤がTriton X-100、Triton X-114、NP-40、Brij-35、Brij-58、Tween-20、Tween-80、オクチル-β-グルコシド、OTG、SDS、CHAPS、CHAPSO、及びPEGとPPGのコポリマーからなる群から選択される一以上の界面活性剤である、請求項1~3のいずれか一項に記載の製造方法。
- [請求項5] 薬剤が核酸、ペプチド及び／又は低分子化合物である、請求項1~4のいずれか一項に記載の製造方法。
- [請求項6] 核酸が機能性核酸、mRNA、mRNA断片、及び任意の遺伝子又はその断片を含むベクターからなる群から選択される一以上の核酸である、請求項1~5のいずれか一項に記載の製造方法。
- [請求項7] 機能性核酸がsiRNA、miRNA、shRNA、核酸アプタマー、アンチセンスDNA、U1アダプター、リボザイム、モレキュラー・ビーコン及びリボスイッチからなる群から選択される一以上の核酸である、請求項6に記載の製造方法。
- [請求項8] ベクターがプラスミド、コスミド及び人工染色体からなる群から選択される、請求項6に記載の製造方法。

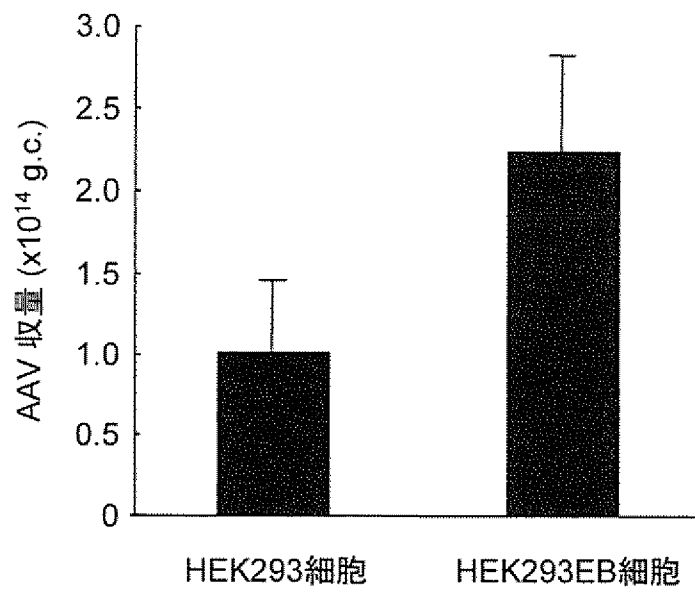
- [請求項9] 中空カプシド又は中空粒子が修飾されている、請求項1～8のいずれか一項に記載の製造方法。
- [請求項10] 中空カプシド又は中空粒子が特定の細胞に対する初期感染活性を有する、請求項1～9のいずれか一項に記載の製造方法。
- [請求項11] 中空カプシドがアデノウイルス又はアデノ随伴ウイルス由来である、請求項1～10のいずれか一項に記載の製造方法。
- [請求項12] カプシド又は被膜粒子内に薬剤を含んでなる薬剤送達粒子であって、前記薬剤が該カプシド又は被膜粒子が由来するウイルス自身の遺伝子を含まない外因性の核酸、ペプチド及び／又は低分子化合物である前記薬剤送達粒子。
- [請求項13] 前記外因性の核酸が機能性核酸、mRNA、mRNA断片、及び任意の遺伝子又はその断片を含むベクターからなる群から選択される一以上の核酸である、請求項12に記載の薬剤送達粒子。
- [請求項14] 機能性核酸が、siRNA、miRNA、shRNA、核酸アプタマー、アンチセンスDNA、U1アダプター、リボザイム、モレキュラー・ビーコン及びリボスイッチからなる群から選択される一以上の核酸である、請求項13に記載の薬剤送達粒子。
- [請求項15] ベクターがプラスミド、コスミド及び人工染色体からなる群から選択される、請求項13に記載の薬剤送達粒子。
- [請求項16] カプシド又は被膜粒子が修飾されている、請求項12～15のいずれか一項に記載の薬剤送達粒子。
- [請求項17] カプシドがアデノウイルス又はアデノ随伴ウイルス由来である、請求項11～16のいずれか一項に記載の薬剤送達粒子。
- [請求項18] カプシド又は被膜粒子が特定の細胞に対する初期感染活性を有する、請求項11～17のいずれか一項に記載の薬剤送達粒子。
- [請求項19] 請求項1～11のいずれか一項に記載の製造方法で得られる薬剤送達粒子及び／又は請求項12～18のいずれか一項に記載の薬剤送達粒子の少なくとも一つを有効成分として含む薬物組成物。

- [請求項20] 疾患若しくは病害の予防又は治療用である、請求項19に記載の薬物組成物。
- [請求項21] 中空カプシド若しくは被覆粒子又はウイルス粒子を生産した宿主細胞の培養液及び／又は該宿主細胞の抽出液を加熱する工程を含む中空カプシド若しくは被覆粒子又はウイルス粒子の精製方法であって、
加熱温度が45℃以上55℃よりも低い場合には加熱時間が10分～90分であり、又は
加熱温度が55℃以上60℃以下の場合には加熱時間が3分～30分である
前記精製方法。
- [請求項22] アデノ随伴ウイルス産生能増強細胞株の製造方法であって、
HEK293細胞株にアデノウイルス由来のE1A遺伝子領域、E1B19遺伝子、E2A遺伝子領域、E4orf6遺伝子及びVA RNAをコードする遺伝子を導入する工程、
を含む前記製造方法。
- [請求項23] 導入した前記全遺伝子を安定的に発現する細胞株を選択する工程をさらに含む、請求項22に記載の製造方法。
- [請求項24] ヒト由来のBcl-x_L遺伝子を導入する工程、
導入したBcl-x_L遺伝子を安定的に発現する細胞株を選択する工程、
をさらに含む、請求項22又は23に記載の製造方法。

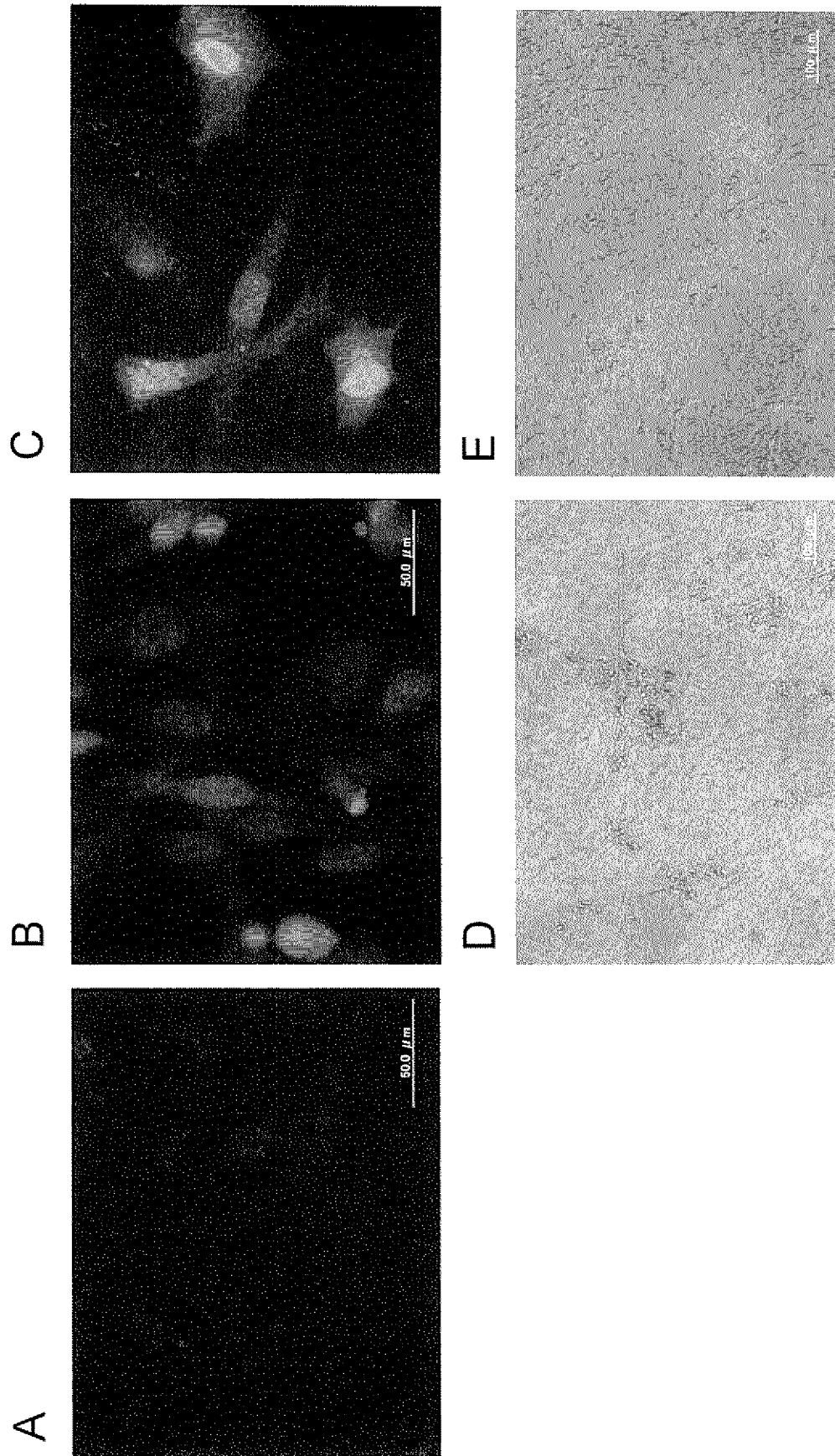
[図1]



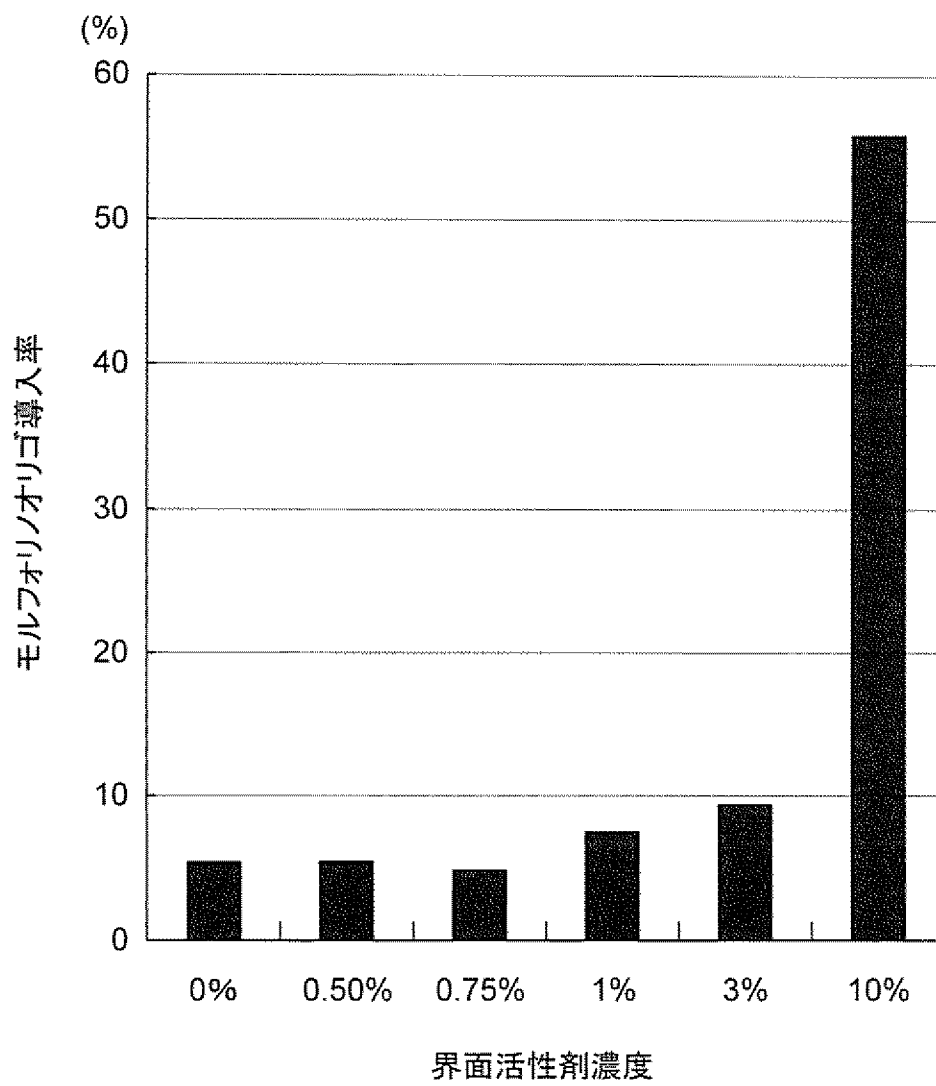
[図2]



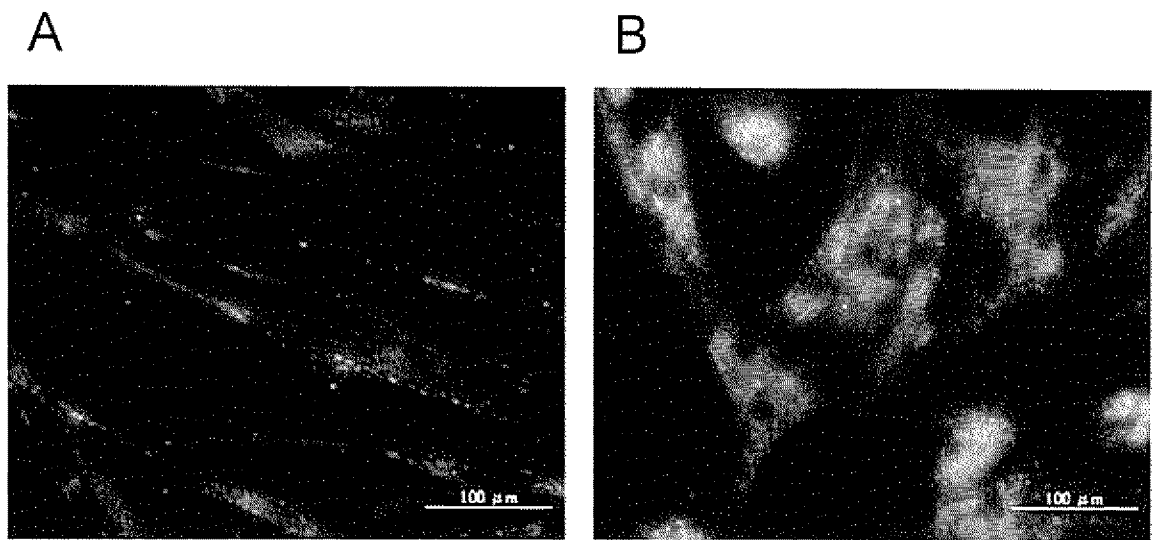
[図3]



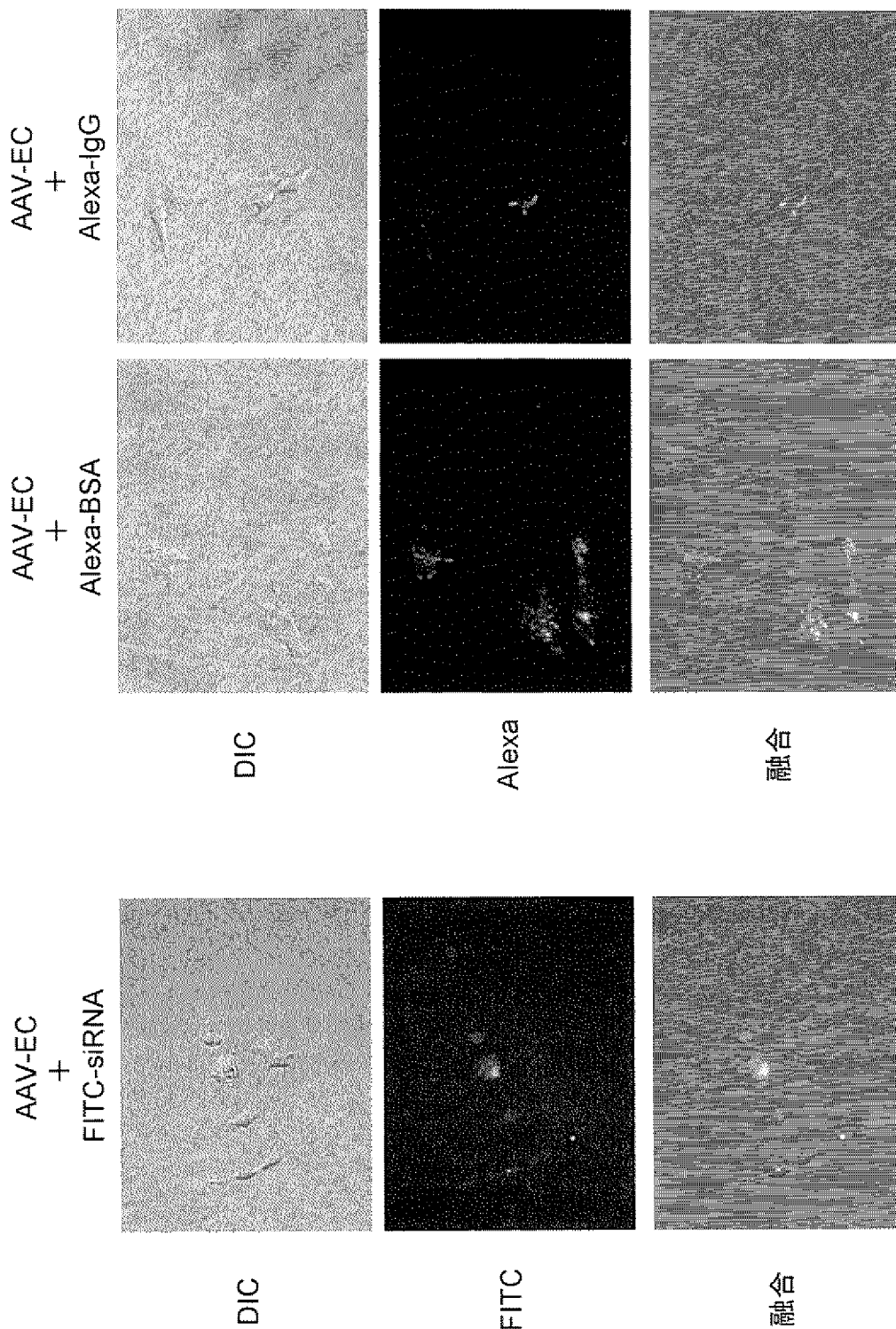
[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/060229

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K9/14(2006.01)i, A61K35/76(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K47/26(2006.01)i, A61K47/34(2006.01)i, A61K47/42(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N7/02(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i,
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K9/14, A61K35/76, A61K38/00, A61K47/26, A61K47/34, A61K47/42, A61P43/00, C12N5/10, C12N7/02, C12N15/09, C12P21/02

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

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

JSTPlus/JMEDPlus (JDreamII), CA/MEDLINE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	WO 03/082344 A1 (Japan Science and Technology Corp.), 09 October 2003 (09.10.2003), page 3, line 18 to page 4, line 20; page 7, line 21 to page 9, line 20 & US 2006/0165726 A1 & EP 1491215 A1	12-20/1-11
X/A	JP 2010-077091 A (Beacle, Inc.), 08 April 2010 (08.04.2010), claims; paragraphs [0019], [0027] (Family: none)	12-16, 18-20/ 1-11, 17

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
22 June, 2012 (22.06.12)

Date of mailing of the international search report
03 July, 2012 (03.07.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/060229

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	WO 2007/116808 A1 (Tokyo Institute of Technology), 18 October 2007 (18.10.2007), claims; paragraphs [0025], [0055], [0061], [0090] (Family: none)	12,16-20/ 1-11,13-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/060229

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

C12P21/02(2006.01) i

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/060229

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.:
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:
See extra sheet

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.: 1-20

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/060229

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

The invention of claim 1 and the invention of claim 21 are common only in being inventions related to virus particles. The common technical feature, however, cannot be considered as a special technical feature since the virus particles themselves do not make a contribution over the prior art in view of the disclosure of document 1 (JP 10-502526 A (University of Pittsburgh), 10 March 1998 (10.03.1998), claims). In addition, there is no other same or corresponding special technical feature between those inventions.

Meanwhile, the invention of claim 1 and the invention of claim 22 are common only in being inventions related to a virus. The common technical feature, however, cannot be considered as a special technical feature and there is no other same or corresponding special technical feature between those inventions.

Consequently, the claims of this international application contain the following three (groups of) inventions.

(Invention group 1) the inventions of claims 1-20

A method for producing drug delivery particles that are composed of capsid or enveloped particles each containing a medicinal agent, which comprises:

(a) a step wherein hollow capsid or hollow particles and a medicinal agent are mixed in a solution that contains 0.1-20% of a surfactant; and

(b) a step wherein the medicinal agent is introduced into each hollow capsid or hollow particle, while maintaining the mixed liquid after the mixing step at -5°C to 50°C , and

drug delivery particles which are obtained by having capsid or enveloped particles contain a medicinal agent, wherein the medicinal agent is an exogenous nucleic acid that does not contain the gene of a virus itself from which each of the capsid or enveloped particles is derived, a peptide and/or a low molecular weight compound.

(Invention group 2) the invention of claim 21

A method for purifying hollow capsid or enveloped particles or virus particles, which comprises a step wherein a broth of host cells that have produced hollow capsid or enveloped particles or virus particles and/or an extract liquid of the host cells is heated, in said method the heating time being 10-90 minutes when the heating temperature is 45°C or more but less than 55°C , while the heating time being 3-30 minutes when the heating temperature is 55°C or more but 60°C or less.

(Invention group 3) the inventions of claims 22-24

A method for producing a cell line having enhanced adeno-associated virus-producing ability, which comprises a step wherein the E1A gene region derived from an adeno virus, E1B19 gene, the E2A gene region, E4orf6 gene and a gene encoding VA RNA are introduced into a HEK293 cell line.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K9/14(2006.01)i, A61K35/76(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K47/26(2006.01)i, A61K47/34(2006.01)i, A61K47/42(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N7/02(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P21/02(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K9/14, A61K35/76, A61K38/00, A61K47/26, A61K47/34, A61K47/42, A61P43/00, C12N5/10, C12N7/02, C12N15/09, C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2012年
日本国実用新案登録公報	1996-2012年
日本国登録実用新案公報	1994-2012年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus (JDreamII), CA/MEDLINE/BIOSIS(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/A	WO 03/082344 A1 (科学技術振興事業団) 2003.10.09, 3 ページ 1 8 行-4 ページ 2 0 行、7 ページ 2 1 行-9 ページ 2 0 行 & US 2006/0165726 A1 & EP 1491215 A1	12-20/ 1-11
X/A	JP 2010-077091 A (株式会社ビークル) 2010.04.08, 特許請求の範囲、【0019】、【0027】 (ファミリーなし)	12-16, 18-20/ 1-11, 17

C 欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22.06.2012

国際調査報告の発送日

03.07.2012

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山村 祥子

電話番号 03-3581-1101 内線 3439

4U

9217

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/A	WO 2007/116808 A1 (国立大学法人東京工業大学) 2007.10.18, 特許請求の範囲、【0025】、【0055】、【0061】、【0090】 (ファミリーなし)	12, 16-20/ 1-11, 13-15

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。
別紙参照。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

請求項1-20

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

第Ⅲ欄の続き

請求項1に係る発明と請求項21に係る発明は、ウイルス粒子に関する発明である点でのみ共通するが、ウイルス粒子自体は、文献1（JP10-502526 A(ユニバーシティ オブ ピッツバーグ), 1998.03.10, 特許請求の範囲)の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえず、また、これらの発明の間には、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

また、請求項1に係る発明と請求項22に係る発明は、ウイルスに関する発明である点でのみ共通するものであるが、当該共通部分は特別な技術的特徴であるとはいえず、また、これらの発明の間には、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

そして、請求の範囲には、以下に示す3の発明（群）が含まれる。

（発明1）請求項1-20に係る発明

薬剤を含むカプシド又は被膜粒子からなる薬剤送達粒子の製造方法であって、

(a) 0.1~20%の界面活性剤を含む溶液中で中空カプシド又は中空粒子と薬剤を混合する工程、及び

(b) 前記混合工程後の混合液を-5~50°Cで保持して、薬剤を中空カプシド又は中空粒子内に導入する工程を含む前記製造方法、及び、

カプシド又は被膜粒子内に薬剤を含んでなる薬剤送達粒子であって、前記薬剤が該カプシド又は被膜粒子が由来するウイルス自身の遺伝子を含まない外因性の核酸、ペプチド及び/又は低分子化合物である前記薬剤送達粒子。

（発明2）請求項21に係る発明

中空カプシド若しくは被覆粒子又はウイルス粒子を生産した宿主細胞の培養液及び/又は該宿主細胞の抽出液を加熱する工程を含む中空カプシド若しくは被覆粒子又はウイルス粒子の精製方法であって、加熱温度が45°C以上55°Cよりも低い場合には加熱時間が10分~90分であり、又は加熱温度が55°C以上60°C以下の場合には加熱時間が3分~30分である前記精製方法。

（発明3）請求項22-24に係る発明

アデノ随伴ウイルス産生能増強細胞株の製造方法であって、HEK293細胞株にアデノウイルス由来のE1A遺伝子領域、E1B19遺伝子、E2A遺伝子領域、E4orf6遺伝子及びVA RNAをコードする遺伝子を導入する工程、を含む前記製造方法。