

(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2020-526515

(P2020-526515A)

(43) 公表日 令和2年8月31日(2020.8.31)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 7 6
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	4 C 0 8 4
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	4 C 0 8 6
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/16	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2020-500140 (P2020-500140)  
 (86) (22) 出願日 平成30年7月5日 (2018.7.5)  
 (85) 翻訳文提出日 令和2年2月28日 (2020.2.28)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2018/040928  
 (87) 国際公開番号 W02019/010310  
 (87) 国際公開日 平成31年1月10日 (2019.1.10)  
 (31) 優先権主張番号 62/528,566  
 (32) 優先日 平成29年7月5日 (2017.7.5)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 米国 (US)

(71) 出願人 594106405  
 ウィスコンシン・アルムナイ・リサーチ・  
 ファウンデーション  
 WISCONSIN ALUMNI RE  
 SEARCH FOUNDATION  
 アメリカ合衆国 ウィスコンシン 537  
 26, マディソン, ウォルナット ス  
 トリート 614  
 (74) 代理人 100101454  
 弁理士 山田 卓二  
 (74) 代理人 100156144  
 弁理士 落合 康

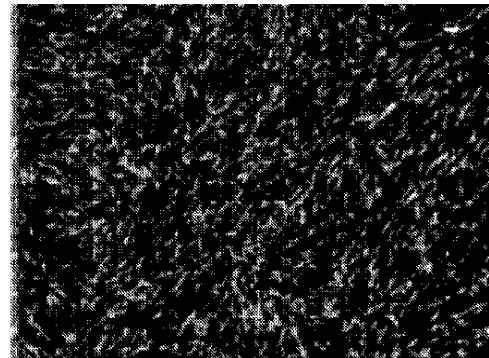
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子送達成果を改善する核酸と抗炎症性分子の共送達のためのミネラルコーティングされたマイクロ粒子

(57) 【要約】

リボ核酸とインターフェロン結合タンパク質の共送達のための組成物および方法を開示する。組成物は、ミネラル層、リボ核酸およびインターフェロン結合タンパク質を有する、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子を含む。リボ核酸およびインターフェロン結合タンパク質は、ミネラル層に吸着されていてもよく、ミネラル層中へ組み込まれていてもよく、およびそれらの組合せであってもよい。リボ核酸とインターフェロン結合タンパク質の共送達を提供する、ミネラル層を有するミネラルコーティングされたマイクロ粒子を用いた、リボ核酸とインターフェロン結合タンパク質の共送達法および炎症性疾患の処置方法もまた開示する。

FIG. 4C



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

少なくとも1つのミネラル層；ならびに

リボ核酸；インターフェロン結合タンパク質；インターフェロン阻害剤；およびそれらの組合せの少なくとも1つ

を含む、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子

を含む、組成物。

## 【請求項 2】

リボ核酸；インターフェロン結合タンパク質；インターフェロン阻害剤；およびそれらの組合せの少なくとも1つが、ミネラル層に吸着されている、請求項1に記載の組成物。

10

## 【請求項 3】

リボ核酸；インターフェロン結合タンパク質；インターフェロン阻害剤；およびそれらの組合せの少なくとも1つが、ミネラル層内に組み込まれている、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項 4】

リボ核酸が、メッセンジャーリボ核酸（mRNA）である、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項 5】

リボ核酸が、約1,000ヌクレオチド～約10,000ヌクレオチドの範囲である、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項 6】

インターフェロン結合タンパク質が、B18R、E3Lインターフェロン耐性タンパク質、K3L、非構造タンパク質1、新世界アレナウイルスZタンパク質、Vタンパク質、3C、リーダープロテアーゼ、E6、N<sup>P</sup>、NS5Aおよびそれらの組合せより選択される、請求項1に記載の組成物。

20

## 【請求項 7】

少なくとも1つのミネラル層が、カルシウム、リン酸、炭酸、およびそれらの組合せを含む、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項 8】

少なくとも1つのミネラル層が、ハロゲンを含み、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項 9】

ハロゲンが、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、アスタチンおよびそれらの組合せより選択される、請求項8に記載の組成物。

30

## 【請求項 10】

ポリマー、セラミック、金属、ガラスおよびそれらの組合せより選択されるコアを含み、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項 11】

少なくとも1つのミネラル層が、複数のミネラル層を含み、複数のミネラル層が、同一のミネラル組成物を含む、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項 12】

少なくとも1つのミネラル層が、複数のミネラル層を含み、複数のミネラル層が、別個のミネラル組成物を含む、請求項1に記載の組成物。

40

## 【請求項 13】

インターフェロン阻害剤が、小分子インターフェロン阻害剤である、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項 14】

小分子インターフェロン阻害剤が、BX795、MRT68844、MRT67307、TPCA-1、Cyt387、AZD1480、ルキソリチニブ、トファシチニブおよびそれらの組合せより選択される、請求項13に記載の組成物。

## 【請求項 15】

少なくとも1つのミネラル層が、球晶様、板状、網状、針状およびそれらの組合せより

50

選択される形態を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項16】

リボ核酸；インターフェロン結合タンパク質；インターフェロン阻害剤；およびそれらの組合せの少なくとも1つの送達方法であって、該方法が、少なくとも1つのミネラル層；ならびにリボ核酸；インターフェロン結合タンパク質；インターフェロン阻害剤；およびそれらの組合せの少なくとも1つを含む、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子を含む組成物を投与することを含む、方法。

【請求項17】

リボ核酸；インターフェロン結合タンパク質；インターフェロン阻害剤；およびそれらの組合せの少なくとも1つが、ミネラル層に吸着されている、請求項16に記載の方法。

10

【請求項18】

リボ核酸；インターフェロン結合タンパク質；インターフェロン阻害剤；およびそれらの組合せの少なくとも1つが、ミネラル層中へ組み込まれている、請求項16に記載の方法。

【請求項19】

リボ核酸が、メッセンジャーリボ核酸（mRNA）である、請求項16に記載の方法。

【請求項20】

インターフェロン結合タンパク質が、B18R、E3Lインターフェロン耐性タンパク質、K3L、非構造タンパク質1、新世界アレナウイルスZタンパク質、Vタンパク質、3C、リーダープロテアーゼ、E6、N<sup>P</sup>、NS5Aおよびそれらの組合せより選択される、請求項16に記載の方法。

20

【請求項21】

少なくとも1つのミネラル層が、カルシウム、リン酸、炭酸、およびそれらの組合せを含む、請求項16に記載の方法。

【請求項22】

少なくとも1つのミネラル層が、ハロゲンを含み、請求項16に記載の方法。

【請求項23】

ミネラルコーティングされたマイクロ粒子が、ポリマー、セラミック、金属、ガラスおよびそれらの組合せより選択されるコアを含む、請求項16に記載の方法。

【請求項24】

少なくとも1つのミネラル層が、複数のミネラル層を含み、複数のミネラル層が、同一のミネラル組成物を含む、請求項16に記載の方法。

30

【請求項25】

少なくとも1つのミネラル層が、複数のミネラル層を含み、複数のミネラル層が、別個のミネラル組成物を含む、請求項16に記載の方法。

【請求項26】

インターフェロン阻害剤が、小分子インターフェロン阻害剤である、請求項16に記載の方法。

【請求項27】

小分子インターフェロン阻害剤が、BX795、MRT68844、MRT67307、TPCA-1、Cyt387、AZD1480、ルキソリチニブ、トファシチニブおよびそれらの組合せより選択される、請求項26に記載の方法。

40

【請求項28】

少なくとも1つのミネラル層が、球晶様、板状、網状、針状およびそれらの組合せより選択される形態を含む、請求項16に記載の方法。

【請求項29】

処置を必要とする対象体における炎症性疾患の処置方法であって、該方法が、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子を含む組成物を対象体に投与することを含み、該ミネラルコーティングされたマイクロ粒子が、少なくとも1つのミネラル層；ならびにリボ核酸；インターフェロン結合タンパク質；インターフェロン阻害剤；およびそれらの組合せの

50

少なくとも1つを含む、方法。

【請求項30】

リボ核酸；インターフェロン結合タンパク質；およびインターフェロン阻害剤の少なくとも1つが、ミネラル層に吸着されている、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

リボ核酸；インターフェロン結合タンパク質；およびインターフェロン阻害剤の少なくとも1つが、ミネラル層中へ組み込まれている、請求項29に記載の方法。

【請求項32】

リボ核酸が、メッセンジャーリボ核酸（mRNA）である、請求項29に記載の方法。

【請求項33】

インターフェロン結合タンパク質が、B18R、E3Lインターフェロン耐性タンパク質、K3L、非構造タンパク質1、新世界アレナウイルスZタンパク質、Vタンパク質、3C、リーダープロテアーゼ、E6、N<sup>P</sup>、NS5Aおよびそれらの組合せより選択される、請求項32に記載の方法。

【請求項34】

少なくとも1つのミネラル層が、カルシウム、リン酸、炭酸、およびそれらの組合せを含む、請求項29に記載の方法。

【請求項35】

少なくとも1つのミネラル層が、ハロゲンを含み、請求項29に記載の方法。

【請求項36】

ミネラルコーティングされたマイクロ粒子が、ポリマー、セラミック、金属、ガラスおよびそれらの組合せより選択されるコアを含む、請求項29に記載の方法。

【請求項37】

少なくとも1つのミネラル層が、複数のミネラル層を含み、複数のミネラル層が、別個のミネラル組成物を含む、請求項29に記載の方法。

【請求項38】

少なくとも1つのミネラル層が、複数のミネラル層を含み、複数のミネラル層が、同一のミネラル組成物を含む、請求項29に記載の方法。

【請求項39】

インターフェロン阻害剤が、小分子インターフェロン阻害剤である、請求項29に記載の方法。

【請求項40】

小分子インターフェロン阻害剤が、BX795、MRT68844、MRT67307、TPCA-1、Cyt387、AZD1480、ルキソリチニブ、トファシチニブおよびそれらの組合せより選択される、請求項39に記載の方法。

【請求項41】

少なくとも1つのミネラル層が、球晶様、板状、網状、針状およびそれらの組合せより選択される形態を含む、請求項29に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

（連邦政府資金による研究開発の記載）

本発明は、米国環境保護庁による助成83573701および米国国立科学財団による助成DGE1256259の下米国政府支援でなされた。米国政府は、本発明における一定の権利を有する。

【0002】

（関連出願の相互参照）

本願は、2017年7月5日出願の米国仮出願第62/528,566号に基づく優先権を主張し、該出願は、出典明示によりその全体として本明細書の一部とする。

【背景技術】

【0003】

10

20

30

40

50

本開示は、メッセンジャーリボ核酸（mRNA）の送達を提供するための組成物および方法に関する。組成物は、ミネラルコーティングに吸着されているmRNAおよびミネラルコーティングに吸着されているインターフェロン結合タンパク質を含む、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子を含む。ミネラルコーティングに吸着されているmRNAおよびミネラルコーティングに吸着されているインターフェロン結合タンパク質を含む、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子を用いた、mRNAの送達方法およびインターフェロン結合タンパク質の持続送達および炎症性疾患の処置方法もまた開示する。

【0004】

活性剤の送達戦略には、局所送達戦略および持続送達戦略が含まれる。局所送達において、活性剤は、対象とする部位でのみ活性であり、対象とする部位以外の領域に影響を及ぼさない。例えば、担体システム（ゲル、スカフォールド、マイクロ粒子）への封入は、薬剤が局所的に作用するが、循環に入らない局所送達のために利用される。持続送達システムは、様々なプラットフォームを利用して、長時間かけて薬剤を制御放出することにより、全身的または局所的に治療濃度範囲を維持する。これらの戦略によって、活性剤がより低活性となり得て、これは、治療効果を提供するためにより高用量を必要とする。

10

【0005】

トランスフェクションは、核酸を細胞に導入するプロセスである。一般的に細胞膜に一時的な孔を開け、細胞による物質の取り込みを可能にすることを含む、様々なトランスフェクション戦略が利用可能である。トランスフェクションは、リン酸カルシウム（すなわち、化学物質ベース）を用いて、電気穿孔、セルスクイーミングまたはリボソーム形成により実施され得る。

20

【0006】

これらの方法は、他の非ウイルスの方法と比較してトランスフェクションの増加を示すが、メッセンジャーリボ核酸（mRNA）のインビボ送達は、mRNAの速やかな細胞質除去および炎症を引き起こす強力な自然免疫応答により制限される。これらの問題を軽減する一般的戦略としては、化学修飾リボ核酸塩基のmRNAへの組み込み、または体内の自然免疫応答による認識および分解を防ぐB18Rタンパク質（ウイルス、組換え）の送達が挙げられる。ワクシニアウイルスのウェスタンリザーブ（WR）株においてB18Rオープンリーディングフレームによってコードされる、B18Rタンパク質は、I型インターフェロン（IFN）結合タンパク質である。RNA介在性遺伝子送達を用いた細胞内再プログラミングを支援することに加えて、B18Rタンパク質は、IFNファミリーメンバーの中和活性を示し、インターフェロンの抗ウイルス作用から細胞を保護することが示されている。しかしながら、両戦略は、有用性は限られている（前者は、制限的な知的財産権のため、後者は、短時間の活性のため）。

30

【0007】

したがって、治療用遺伝子送達についてのこれらの問題に対処する新しい改善された戦略が必要とされている。

【発明の概要】

【0008】

一態様において、本開示は、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子を含む組成物であって、該ミネラルコーティングされたマイクロ粒子が、少なくとも1つのミネラル層；ならびにリボ核酸、インターフェロン結合タンパク質、インターフェロン阻害剤およびこれらの組合せの少なくとも1つを含む、組成物に関する。

40

【0009】

一態様において、本開示は、リボ核酸；インターフェロン結合タンパク質；インターフェロン阻害剤の少なくとも1つの送達方法であって、該方法が、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子を含む組成物を投与することを含み、該ミネラルコーティングされたマイクロ粒子が、少なくとも1つのミネラル層；ならびにリボ核酸、インターフェロン結合タンパク質およびインターフェロン阻害剤の少なくとも1つを含む、方法に関する。

【0010】

50

一態様において、本開示は、処置を必要とする対象体における炎症性疾患の処置方法であって、該方法が、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子を含む組成物を対象体に投与することを含む、方法に関する。ミネラルコーティングされたマイクロ粒子は、少なくとも1つのミネラル層；ならびにリボ核酸、インターフェロン結合タンパク質、インターフェロン阻害剤およびそれらの組合せの少なくとも1つを含む。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】図1は、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子からBR18Rと共送達されたmRNAの導入遺伝子を示すグラフである。\*p値 0.05。

【0012】

【図2】図2は、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子を用いてまたは用いずに、B18RとのmRNAの共送達による導入遺伝子発現を示すグラフである。\*一元配置分散分析p値 0.05。

【0013】

【図3】図3は、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子からBR18Rと共送達された化学修飾mRNA (MOD-mbFGF)、およびミネラルコーティングされたマイクロ粒子からBR18Rと共送達された野生型mRNA (WT-mbFGF + B18R) の導入遺伝子発現を示すグラフである。

【0014】

【図4】図4A、図4B、図4Cおよび図4Dは、B18Rタンパク質無しでミネラルコーティングされたマイクロ粒子から送達されたか (図4Aおよび図4B)、またはミネラルコーティングされたマイクロ粒子からB18Rと共送達された (図4Cおよび図4D) 増強緑色蛍光をコードするmRNAでトランスフェクトされた星状細胞の落射蛍光顕微鏡分析を示す画像である。図4Aおよび図4Cは、細胞密度を示し、図4Bおよび図4Dは、緑色落射蛍光のグレースケール画像である。

【0015】

【図5】図5Aおよび図5Bは、野生型mRNAのB18RとのMCM介在性送達が最終創傷回復を改善することを示す。図5Aは、処置19日後の各処置群についての平均創傷組織学的スコアを示す。図5Bは、未処置コントロールと比較したDunnetの事後分析による一元配置分散分析を示す。\*p値 < 0.05、\*\*\*p値 < 0.001。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本開示は、リボ核酸、インターフェロン結合タンパク質、インターフェロン阻害剤およびそれらの組合せの共送達のためのミネラルコーティングされたマイクロ粒子に関する。いくつかの実施態様において、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子は、少なくとも1つのミネラル層、ならびに該ミネラル層に吸着されているリボ核酸およびインターフェロン結合タンパク質を含む。いくつかの実施態様において、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子は、少なくとも1つのミネラル層、ならびに該ミネラル層内に組み込まれているリボ核酸およびインターフェロン結合タンパク質を含む。いくつかの実施態様において、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子は、少なくとも1つのミネラル層、ならびに該ミネラル層に吸着されているリボ核酸およびインターフェロン結合タンパク質の少なくとも1つ、ならびに該ミネラル層内に組み込まれているリボ核酸およびインターフェロン結合タンパク質の少なくとも1つを含む。また、リボ核酸とインターフェロン結合タンパク質の共送達を提供する、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子を用いた、リボ核酸とインターフェロン結合タンパク質の共送達法および炎症性疾患の処置方法を開示する。

【0017】

一態様において、本開示は、少なくとも1つのミネラル層；ならびにリボ核酸、インターフェロン結合タンパク質、インターフェロン阻害剤およびそれらの組合せの少なくとも1つを含む、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子に関する。一実施態様において、リボ核酸、インターフェロン結合タンパク質およびインターフェロン阻害剤の少なくとも

10

20

30

40

50

1つは、ミネラル層に吸着されている。一実施態様において、リボ核酸、インターフェロン結合タンパク質およびインターフェロン阻害剤の少なくとも1つは、ミネラル層中へ組み込まれている。一実施態様において、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子は、リボ核酸（ミネラル層内、ミネラル層に吸着されている、およびそれらの組合せ）を含み、および別のミネラルコーティングされたマイクロ粒子は、インターフェロン結合タンパク質（ミネラル層内、ミネラル層に吸着されている、およびそれらの組合せ）を含み、および/または別のミネラルコーティングされたマイクロ粒子は、インターフェロン阻害剤（ミネラル層内、ミネラル層に吸着されている、およびそれらの組合せ）を含み、およびリボ核酸を含むミネラルコーティングされたマイクロ粒子は、インターフェロン結合タンパク質を含むミネラルコーティングされたマイクロ粒子および/またはインターフェロン阻害剤を含むミネラルコーティングされたマイクロ粒子と混合され、リボ核酸、インターフェロン結合タンパク質および/またはインターフェロン阻害剤を送達する。

10

**【0018】**

一実施態様において、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子は、コアを含む。

**【0019】**

一実施態様において、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子は、複数のミネラル層を含む。少なくとも1つのミネラル層は、本明細書に記載のように同一ミネラル製剤であり得る。少なくとも1つのミネラル層はまた、本明細書に記載のように別個のミネラル製剤であり得る。

**【0020】**

複数のリボ核酸、インターフェロン結合タンパク質および/またはインターフェロン阻害剤は、各ミネラル層が本明細書に記載のように製造された後、該ミネラル層上に吸着され得る。複数のリボ核酸、インターフェロン結合タンパク質および/またはインターフェロン阻害剤は、本明細書に記載のようにミネラル層形成中に、該ミネラル層内に組み込まれ得る。複数のリボ核酸、インターフェロン結合タンパク質および/またはインターフェロン阻害剤は、本明細書に記載のように同一のリボ核酸、インターフェロン結合タンパク質および/またはインターフェロン阻害剤であり得る。複数のリボ核酸、インターフェロン結合タンパク質および/またはインターフェロン阻害剤は、本明細書に記載のように別個のリボ核酸、インターフェロン結合タンパク質および/またはインターフェロン阻害剤であり得る。

20

**【0021】**

本開示のミネラルコーティングされたマイクロ粒子は、インビボ送達のための製剤に含まれ得る。本明細書で用いられる用語「製剤」（「組成物」と相互交換可能に用いられる）は、有益な剤およびミネラルコーティングされたマイクロ粒子が、非経腸投与に許容される物理化学的形態の液体中でまたはそれにより製剤化、混合、添加、溶解、分散、可溶化、溶液への製剤化、運搬などされることを総称的に示す。

30

**【0022】**

適切なリボ核酸としては、例えば、メッセンジャーRNA (mRNA)、オリゴヌクレオチド、低分子干渉RNA (siRNA)、短ヘアピンRNA (shRNA)、マイクロRNAおよびRNAアプタマーが挙げられる。特に適切なリボ核酸としては、メッセンジャーRNA (mRNA) が挙げられる。適切なRNAはまた、5-メチルシチジン、シュードウリジン( )、2-チオウリジン、N<sub>1</sub>-メチル-シュードウリジン、5-メチルシチジンとN<sub>1</sub>-メチル-シュードウリジンとの組合せ、mRNAを含む5-メチルシチジンとシュードウリジン( )との組合せの組み込みなどの化学修飾塩基を有するRNAを含む。一実施態様において、RNAは、約1,000塩基対~約10,000塩基対を含む。別の一実施態様において、RNAは、約1,000ヌクレオチド~約10,000ヌクレオチドを含む。

40

**【0023】**

RNAは、対象とする任意のタンパク質をコードし得る。例えば、RNAは、増殖因子およびレポーターを含むタンパク質をコードし得る。適切なレポーターは、例えば緑色蛍光タンパク質、クロラムフェニコールアセチル-トランスフェラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、

50

-グルクロニダーゼおよびルシフェラーゼであり得る。

【0024】

適切なインターフェロン結合タンパク質としては、1型インターフェロン結合タンパク質が挙げられる。特に適切なインターフェロン結合タンパク質は、B18Rタンパク質である。B18Rタンパク質は、野生型ワクシニアウイルスにおいてB18Rオープンリーディングフレームによってコードされる1型インターフェロン結合タンパク質である。証拠は、トランスフェクションのためおよびIPS再プログラミングにおける使用のための免疫抑制剤としてのB18Rを示唆している。本開示のミネラルコーティングされたマイクロ粒子は、予想外にも抗炎症性B18Rタンパク質活性を延長する。他の適切なインターフェロン結合タンパク質としては、ワクシニアウイルスE3Lインターフェロン耐性タンパク質、ワクシニアウイルス(VV) K3L、非構造タンパク質1(NS1)、新世界アレナウイルスZタンパク質、Vタンパク質(SV5構造タンパク質V)、3C、リーダープロテアーゼ(L<sup>Pro</sup>)、E6、N<sup>Pro</sup>(豚熱ウイルスN<sup>pro</sup>)、およびNS5A(非構造タンパク質5A)が挙げられる。

10

【0025】

適切なインターフェロン阻害剤としては、小分子インターフェロン阻害剤が挙げられる。当業者に公知のとおり、「小分子」は、低分子量(900ダルトン未満)の有機化合物を指す。典型的に、小分子化合物は、1 nmほどのサイズを有する。適切な小分子インターフェロン阻害剤は、BX795、MRT68844、MRT67307、TPCA-1、Cyt387、AZD1480、ルキソリチンおよびトファシチニブであり得る。小分子インターフェロン阻害剤は、RNAおよびインターフェロン結合タンパク質について記載したように、1つ以上のミネラル層内に含まれていてもよく、1つ以上のミネラル層に吸着されていてもよく、それらの組合せであってもよい。

20

【0026】

本明細書で用いられる、有効量、治療的有效量、予防的有效量および診断的有效量は、投与後の所望の生物学的反応を誘発するのに必要とされるミネラルコーティングされたマイクロ粒子のミネラル層に吸着されているかまたはその層内に組み込まれているRNA、インターフェロン結合タンパク質およびインターフェロン阻害剤の量を指す。

【0027】

適切な担体としては、水、生理食塩水、等張生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、乳酸リンゲル液などが挙げられる。

30

【0028】

ミネラルコーティングされたマイクロ粒子を含む製剤はまた、界面活性剤、防腐剤および添加剤などの他の成分を含み得る。界面活性剤は、活性剤およびミネラルコーティングされたマイクロ粒子の表面誘発凝集を減少または防止し得る。ポリオキシエチレン脂肪酸エステルおよびアルコール、およびポリオキシエチレンソルビトール脂肪酸エステルなどの様々な従来の界面活性剤が用いられ得る。量は、一般的に、製剤の約0.001~4重量%の範囲である。医薬的に許容される防腐剤としては、例えばフェノール、o-クレゾール、m-クレゾール、p-クレゾール、p-ヒドロキシ安息香酸メチル、p-ヒドロキシ安息香酸プロピル、2-フェノキシエタノール、p-ヒドロキシ安息香酸ブチル、2-フェニルエタノール、ベンジルアルコール、クロロブタノール、およびチメロサル、プロノポール、安息香酸、イミド尿素、クロロヘキシジン、デヒドロ酢酸ナトリウム、クロロクレゾール、p-ヒドロキシ安息香酸エチル、塩化ベンゼトニウム、クロルフェネシン(3p-クロルフェノキシプロパン-1,2-ジオール)およびそれらの混合物が挙げられる。防腐剤は、約0.1 mg/ml ~ 約20 mg/ml、例えば約0.1 mg/ml ~ 約10 mg/mlの範囲の濃度で存在し得る。医薬組成物における防腐剤の使用は、当業者に周知である。便宜のため、The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995を参照されたい。製剤は、酢酸ナトリウム、グリシルグリシン、HEPES(4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸)およびリン酸ナトリウムなどの適切な緩衝剤を含み得る。添加剤は、医薬製剤の製造で一般的に用いられる等張化剤、抗酸化剤および安定化剤のための成分を含む。他の不活性成分としては、例えばL-ヒスチジン、L-ヒスチジン-塩化塩-水和物、ソルビトール、ポリソルベート80、

40

50

クエン酸ナトリウム、塩化ナトリウム、およびEDTA二ナトリウムが挙げられる。

【0029】

任意の適切な材料を、ミネラル層が形成されるコアとして用い得る。特に適切なコア材料は、ヒトおよび動物に無毒性であることが知られている材料である。特に適切なコア材料としてはまた、ヒトおよび動物で分解および/または溶解することが知られている材料が挙げられる。適切なコア材料としては、型リン酸三カルシウム、ヒドロキシアパタイト、PLGA、およびそれらの組合せが挙げられる。型リン酸三カルシウムは分解するため、型リン酸三カルシウムコアは特に適切である。他の実施態様において、コア材料は、ミネラル層形成後に溶解し得る。他の実施態様において、コア材料は、非分解性である。ミネラル層が形成される他の適切なコア材料としては、粒子形態のポリマー、セラミック、金属、ガラスおよびそれらの組合せが挙げられる。適切な粒子は、例えばアガロースビーズ、ラテックスビーズ、磁性ビーズ、ポリマービーズ、セラミックビーズ、金属ビーズ（磁性金属ビーズを含む）、ガラスビーズおよびそれらの組合せであり得る。

10

【0030】

ミネラル層は、カルシウム、リン酸、炭酸、およびそれらの組合せを含む。ミネラルコーティングされたマイクロ粒子を製造するために、コア材料は、改変模擬体液中でインキュベートされる。改変模擬体液は、カルシウムおよびリン酸を含み、コア表面にミネラル層を形成し、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子を生じる。異なるミネラル層形態は、カルシウム、リン酸および炭酸の量および比率を変更することにより達成され得る。異なるミネラル層形態は、例えば板状構造、球晶様構造、網状構造、針状構造、およびそれらの組合せを含む。高炭酸濃度は、板状構造を有するミネラル層を生じる。低炭酸濃度は、球晶様構造を有するミネラル層を生じる。ミネラル層形態はまた、活性剤の吸着に影響を及ぼす。

20

【0031】

適切なミネラルコーティングされたマイクロ粒子サイズは、直径約 $1\mu\text{m}$ ～約 $100\mu\text{m}$ の範囲であり得る。マイクロ粒子の直径は、顕微鏡画像から得られる測定（光学および電子顕微鏡画像を含む）、サイズ選択基材によるろ過などの当業者に公知な方法により測定され得る。

【0032】

コア基材は、最初に例えばポリ( -ヒドロキシエステル)フィルムでコーティングされ得る。特に適切なポリ( -ヒドロキシエステル)は、例えばポリ(L-ラクチド)、ポリ(ラクチド-コ-グリコリド)、ポリ( -カプロラクトン)、およびそれらの組合せであり得る。上記フィルムの任意の組合せを作るときに、フィルムは、典型的には、当該技術分野で知られる適切な有機溶媒中で混合されることを理解されたい。また、当分野で理解されるとおり、分子量、結晶化速度、ガラス転移温度、粘度などの違いが、最終基材での相分離および均質性欠如を防止するために、同様に考慮されるべきである。相分離および均質性欠如はまた、基材中で用いられるフィルムの混合比を変更することにより回避し得る。

30

【0033】

基材においてポリ( -ヒドロキシエステル)フィルムを製造した後、フィルムコーティングの表面を、アルカリ性条件下で加水分解して、COOHおよびOH基を有する表面を作製する。表面の加水分解後、基材を、適切なミネラル形成材料を含有する模擬体液中でインキュベートして、ミネラル層を形成する。適切なミネラル形成材料は、例えばカルシウム、リン酸、炭酸、およびそれらの組合せであり得る。

40

【0034】

本開示の方法における使用のための模擬体液(SBF)は、典型的には、約 $5\text{ mM}$ ～約 $12.5\text{ mM}$ のカルシウムイオン、例えば約 $7\text{ mM}$ ～約 $10\text{ mM}$ のカルシウムイオン、例えば約 $8.75\text{ mM}$ のカルシウムイオン；約 $2\text{ mM}$ ～約 $12.5\text{ mM}$ のリン酸イオン、例えば約 $2.5\text{ mM}$ ～約 $7\text{ mM}$ のリン酸イオン、例えば約 $3.5\text{ mM}$ ～約 $5\text{ mM}$ のリン酸イオン；および約 $4\text{ mM}$ ～約 $100\text{ mM}$ の炭酸イオンを含む。

【0035】

50

いくつかの実施態様において、SBFは、約145 mMのナトリウムイオン；約6 mM～約9 mMのカリウムイオン；約1.5 mMのマグネシウムイオン；約150 mM～約175 mMの塩化物イオン；約4 mMの $\text{HCO}_3^-$ ；および約0.5 mMの $\text{SO}_4^{2-}$ イオンの1つ以上をさらに含み得る。

【0036】

SBFのpHは、典型的には、約4～約7.5、例えば約5.3～約6.8、例えば約5.7～約6.2、例えば約5.8～約6.1の範囲であり得る。

【0037】

適切なSBFは、例えば約145 mMのナトリウムイオン；約6 mM～約9 mMのカリウムイオン；約5 mM～約12.5 mMのカルシウムイオン；約1.5 mMのマグネシウムイオン；約150 mM～約175 mMの塩化物イオン；約4.2 mMの $\text{HCO}_3^-$ 、約2 mM～約5 mMの $\text{HPO}_4^{2-}$ イオン；および約0.5 mMの $\text{SO}_4^{2-}$ イオンを含み得る。模擬体液のpHは、約5.3～約7.5、例えば約6～約6.8であり得る。

10

【0038】

一実施態様において、SBFは、例えば約145 mMのナトリウムイオン；約6 mM～約17 mMのカリウムイオン；約5 mM～約12.5 mMのカルシウムイオン；約1.5 mMのマグネシウムイオン；約150 mM～約175 mMの塩化物イオン；約4.2 mM～約100 mMの $\text{HCO}_3^-$ ；約2 mM～約12.5 mMのリン酸イオン；および約0.5 mMの $\text{SO}_4^{2-}$ イオンを含み得る。模擬体液のpHは約5.3～約7.5、例えば約5.3～約6.8であり得る。

【0039】

別の実施態様において、SBFは、約145 mMのナトリウムイオン；約6 mM～約9 mMのカリウムイオン；約5 mM～約12.5 mMのカルシウムイオン；約1.5 mMのマグネシウムイオン；約60 mM～約175 mMの塩化物イオン；約4.2 mM～約100 mMの $\text{HCO}_3^-$ ；約2 mM～約5 mMリン酸イオン；約0.5 mMの $\text{SO}_4^{2-}$ イオンを含み；pHは約5.8～約6.8、例えば約6.2～約6.8である。

20

【0040】

さらに別の実施態様において、SBFは、約145 mMのナトリウムイオン；約9 mMのカリウムイオン；約12.5 mMのカルシウムイオン；約1.5 mMのマグネシウムイオン；約172 mMの塩化物イオン；約4.2 mMの $\text{HCO}_3^-$ ；約5 mM～約12.5 mMのリン酸イオン；約0.5 mMの $\text{SO}_4^{2-}$ イオン；約4 mM～約100 mMの $\text{CO}_3^{2-}$ を含み；pHは約5.3～約6.0である。

【0041】

複数のミネラル層を含む実施態様において、コアを改変模擬体液の製剤中でインキュベートする。ミネラル層は、数分から数日のインキュベート中にコア上に形成される。最初のミネラル層がコア上に形成された後、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子を、改変模擬体液から除去し、洗浄し得る。複数のミネラル層を形成するために、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子は、所望の数のミネラル層が達成されるまで、第2、第3、第4などの改変模擬体液中でインキュベートされる。各インキュベート期間中に、新しいミネラル層が、前の層上に形成される。これらの工程は、所望の数のミネラル層が達成されるまで、繰り返される。

30

【0042】

ミネラル層形成中に、活性剤（例えば、RNA、インターフェロン結合タンパク質およびインターフェロン阻害剤）を改変模擬体液中に含ませて、ミネラル形成中にミネラル層内に活性剤を組み込ませ得る。ミネラルの各層の形成後、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子を、少なくとも1つの活性剤を含む担体中でインキュベートして、ミネラル層に活性剤を吸着させる。ミネラル層内に活性剤を組み込むおよび/またはミネラル層に活性剤を吸着させた後、別のミネラル層が、改変模擬体液の別の製剤中でマイクロ粒子をインキュベートすることにより形成し得る。必要に応じて、ミネラル層はミネラルに活性剤を組み込み得て（層は、ミネラル層に吸着されている活性剤を有し得る）、ミネラル層は、活性剤を組み込むことなく、または活性剤を吸着することなく形成でき、かつそれらの組合せである。異なるミネラル層を有するミネラルコーティングされたマイクロ粒子は、改変模擬体液の1つの製剤を用いてミネラル層を形成し、その後改変模擬体液の異なる製剤

40

50

中でミネラルコーティングされたマイクロ粒子をインキュベートすることにより調製され得る。したがって、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子は、各層が異なる複数のミネラル層を有するように調製され得る。異なる1つ以上のミネラル層と組み合わせた、同一の2つ以上のミネラル層を含む実施態様もまた企図される。

【0043】

異なるミネラル層の組成を調整することにより、有利には、各ミネラル層からの活性剤の放出動態を調整できる。

【0044】

ミネラル層内にRNA、インターフェロン結合タンパク質およびインターフェロン阻害剤の少なくとも1つを組み込むことが所望される実施態様において、RNA、インターフェロン結合タンパク質およびインターフェロン阻害剤は、SBF中に含まれる。ミネラル層形成が生じると、RNA、インターフェロン結合タンパク質およびインターフェロン阻害剤は、ミネラル層中へ組み込まれる。

10

【0045】

他の実施態様において、磁性物質は、ミネラル層に組み込まれ得る。例えば、ウシ血清アルブミンに結合した超磁性酸化鉄は、ミネラル層に組み込まれ得る。結合タンパク質（例えば、ウシ血清アルブミン）は、ミネラル層上に吸着して、ミネラル層内に磁性物質を組み込み得る。

【0046】

いくつかの実施態様において、ミネラル層は、ドーパントをさらに含む。適切なドーパントとしては、ハロゲン化物イオン、例えばフッ化物イオン、塩化物イオン、臭化物イオンおよびヨウ化物イオンが挙げられる。SBF中で基材をインキュベートして、ミネラル層を形成する前に、ドーパントは、SBFの他の成分と共に加えられ得る。

20

【0047】

一実施態様において、ハロゲン化物イオンは、フッ化物イオンを含む。適切なフッ化物イオンは、フッ化物イオン含有物、例えば水溶性フッ化物塩、例えばフッ化アルカリ塩およびフッ化アンモニウム塩により提供され得る。

【0048】

フッ化物イオン含有物は、一般的に、100 mMまでのフッ化物イオン、例えば約0.001 mM ~ 約100 mM、例えば約0.01 mM ~ 約50 mM、例えば約0.1 mM ~ 約15 mM、例えば約1 mMのフッ化物イオンの量を提供するようにSBF中に含まれる。

30

【0049】

SBF中に1つ以上のドーパントを含むことは、細胞への生体分子送達の効率を著しく向上させるハロゲンドーパミネラル層の形成をもたらすことが分かった。

【0050】

さらに別の実施態様において、磁鉄鉱、磁鉄鉱ドーパプラスチックおよびネオジムを含む磁性物質は、マイクロ粒子コア材料に用いられる。磁性物質を含むことで、磁力の適用によるMCMの位置および/または移動/位置決めを可能にするMCMが形成される。磁性マイクロ粒子コア材料を別に使用することで、例えば細胞に対する生体分子の影響を分析しながら、どこに生体分子送達が生じるかを空間的に制御できる。

40

【0051】

ミネラル層は、約3日 ~ 約10日の期間約37 °の温度にてSBFと基材をインキュベートすることにより形成され得る。

【0052】

ミネラルコーティング製造が完了した後、ミネラル層を分析して、ミネラルコーティングの形態および組成を決定し得る。ミネラル層の組成は、エネルギー分散型X線分光法、フーリエ変換赤外分光法、X線回折法、およびそれらの組合せにより分析され得る。適切なX線回折ピークは、例えば26°および31°におけるものであり得て、これは、ヒドロキシアパタイト鉱物相についての(002)面、(211)面、(112)面および(202)面に対応する。特に適切なX線回折ピークは、例えば26°および31°におけるものであり

50

得て、これは、炭酸置換ヒドロキシアパタイトについての(0 0 2)面、(1 1 2)面および(3 0 0)面に対応する。他の適切なX線回折ピークは、例えば16°、24°および33°におけるものであり得て、これは、リン酸八カルシウム鉱物相に対応する。フーリエ変換赤外分光法分析により得られる適切なスペクトルは、例えば、O-P-O結合に対応する450~600 cm<sup>-1</sup>におけるピーク、およびヒドロキシアパタイトのPO<sub>4</sub><sup>3-</sup>基の非対称P-O伸縮に対応する900~1200 cm<sup>-1</sup>におけるピークであり得る。フーリエ変換赤外分光法分析により得られる特に適切なスペクトルピークは、例えば炭酸(CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>)基に対応する876 cm<sup>-1</sup>、1427 cm<sup>-1</sup>および1483 cm<sup>-1</sup>におけるピークであり得る。HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>のピークは、ミネラル層を調製するのに用いられるSBFのカルシウムおよびリン酸イオン濃度を調節することにより影響を受け得る。例えば、HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>ピークは、SBFのカルシウムおよびリン酸濃度の増加により増加し得る。あるいは、HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>ピークは、SBFのカルシウムおよびリン酸濃度の減少により減少し得る。フーリエ変換赤外分光法分析により得られる別の適切なピークは、例えば1075 cm<sup>-1</sup>におけるリン酸八カルシウム鉱物相についてのピークであり得て、これは、ミネラルコーティングを調製するのに用いられる模擬体液中でのカルシウムおよびリン酸イオン濃度を調節することにより影響を受け得る。例えば、1075 cm<sup>-1</sup>ピークは、ミネラル層を調製するのに用いられる模擬体液中でのカルシウムおよびリン酸イオン濃度を増加させることにより明瞭にさせ得る。あるいは、1075 cm<sup>-1</sup>ピークは、ミネラル層を調製するのに用いられる模擬体液中でのカルシウムおよびリン酸イオン濃度を減少させることにより明瞭でなくさせ得る。

10

#### 【0053】

エネルギー分散型X線分光法分析はまた、ミネラル層のカルシウム/リン酸比を決定するために用いられ得る。例えば、カルシウム/リン酸比は、SBF中でのカルシウムおよびリン酸イオン濃度を減少させることにより増加し得る。あるいは、カルシウム/リン酸比は、SBF中でのカルシウムおよびリン酸イオン濃度を増加させることにより減少し得る。エネルギー分散型X線分光法によるミネラルコーティングの分析により、PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>の炭酸(CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>)置換レベルおよびミネラル層へのHPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>の組込みを決定できる。典型的には、SBFは、約10:1~約0.2:1、例えば約2.5:1~約1:1の範囲の比でカルシウムおよびリン酸イオンを含む。

20

#### 【0054】

また、ミネラル層のマイクロ構造形態は、例えば走査型電子顕微鏡法により分析され得る。走査型電子顕微鏡法は、得られたミネラル層のマイクロ構造形態を視覚化するために用いられ得る。得られたミネラル層のマイクロ構造形態は、例えば球晶マイクロ構造、板状マイクロ構造、網状マイクロ構造、針状マイクロ構造、およびそれらの組合せであり得る。球晶マイクロ構造の球晶の適切な平均直径は、例えば約2 μm~約42 μmの範囲であり得る。球晶マイクロ構造の球晶の特に適切な平均直径は、例えば約2 μm~約4 μmの範囲であり得る。別の一実施態様において、球晶マイクロ構造の球晶の特に適切な平均直径は、例えば約2.5 μm~約4.5 μmの範囲であり得る。別の一実施態様において、球晶マイクロ構造の球晶の特に適切な平均直径は、例えば約16 μm~約42 μmの範囲であり得る。

30

#### 【0055】

また、ミネラル層のナノ構造形態は、例えば走査型電子顕微鏡法により分析され得る。走査型電子顕微鏡法は、得られたミネラル層のナノ構造形態を視覚化するために用いられ得る。得られたミネラル層の形態は、例えば板状ナノ構造、針状ナノ構造および球晶様ナノ構造であり得る。板状ナノ構造サイズは、約100 nm~約1500 nmの平板の範囲であり得る。板状ナノ構造細孔サイズは、約200 nm~約750 nmの平板の範囲であり得る。一の特に適切な実施態様において、板状ナノ構造で用いられる場合、ミネラル層は、カルシウム、リン酸、水酸化物および重炭酸を含む。針状ナノ構造のサイズは、約10 nm~約750 nmの針の範囲であり得る。一の特に適切な実施態様において、針状ナノ構造で用いられる場合、ミネラル層は、カルシウム、リン酸、水酸化物、重炭酸およびフッ化物を含む。

40

#### 【0056】

ミネラルコーティングされたマイクロ粒子は、後で使用するために保存されてもよく、

50

後で使用するために洗浄および保存されてもよく、吸着工程のために洗浄されずぐに使用されてもよく、または洗浄することなく吸着工程のためにすぐ使用されてもよい。

【0057】

ミネラルコーティングされたマイクロ粒子に活性剤（例えば、RNA、インターフェロン結合タンパク質および/またはインターフェロン阻害剤）を吸着させるために、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子を活性剤含有溶液に接触させる。本明細書で用いられる「活性剤」は、生物学的に活性な物質（例えば、RNAおよびインターフェロン結合タンパク質）を指す。活性剤を、当該技術分野で公知の任意の方法を用いてミネラルコーティングされたマイクロ粒子と接触させ得る。例えば、活性剤の溶液を、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子上にピペットで移してもよく、注いでもよく、またはスプレーしてもよい。あるいは、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子を、活性剤含有溶液中に浸してもよい。活性剤は、活性剤とミネラルコーティングされたマイクロ粒子のミネラル層間の静電相互作用によりミネラル層に吸着する。適切な活性剤としては、本明細書に記載のRNAおよびインターフェロン結合タンパク質が挙げられる。

10

【0058】

ミネラルコーティングされたマイクロ粒子への活性剤（例えば、リボ核酸、インターフェロン結合タンパク質および/またはインターフェロン阻害剤）の吸着は、ミネラル成分（例えば、高炭酸および低炭酸マイクロスクフェア）を変えること、活性剤とインキュベートするミネラルコーティングされたマイクロ粒子の量を変えること、インキュベート溶液中の活性剤の濃度を変えること、およびそれらの組合せにより調整し得る。

20

【0059】

ミネラルコーティングされたマイクロ粒子のミネラル層に吸着されている活性剤は、ミネラル層が分解するにつれて放出される。ミネラル分解は、ミネラル層が急速にまたはゆっくりと分解できるように制御され得る。ミネラル層溶解速度は、ミネラルコーティング組成を変えることにより制御され得る。例えば、炭酸置換がより多いミネラル層ほど、より急速に分解する。炭酸置換がより少ないミネラル層ほど、よりゆっくりと分解する。ドーパント、例えばフッ化物イオンの組込みはまた、溶解動態を変え得る。ミネラル層組成の変更は、ミネラル層形成中に改変模擬体液におけるイオン濃度を変えることにより達成し得る。より高濃度の炭酸、例えば100 mMの炭酸を有する改変模擬体液は、生理学的炭酸濃度（4.2 mMの炭酸）を有する改変模擬体液において形成された層より急速に分解する層をもたらす。

30

【0060】

本開示の製剤は、ミネラル層に吸着されているおよび/またはその中に組み込まれている活性剤を有するミネラルコーティングされたマイクロ粒子に、担体を加えることにより製造され得る。一実施態様において、活性剤を含む担体を、ミネラル層に吸着されているおよび/またはその中に組み込まれている活性剤を有するミネラルコーティングされたマイクロ粒子に加えて、結合活性剤（ミネラルコーティングされたマイクロ粒子に吸着されている活性剤）および未結合活性剤を含む製剤を製造し得る。別の一実施態様において、活性剤を含まない担体を、ミネラルに吸着されているおよび/またはその中に組み込まれている活性剤を有するミネラルコーティングされたマイクロ粒子に加えて、結合活性剤を含む製剤を製造し得る。

40

【0061】

特に適切な製剤の実施態様において、製剤は、結合および未結合活性剤の両方を含む。理論に拘束されるものではないが、結合活性剤および未結合活性剤を有するミネラルコーティングされたマイクロ粒子を含む製剤を注射することで、未結合活性剤が即時効果を提供でき、一方、結合活性剤が、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子への吸着により隔離され、ミネラル層が分解し、リボ核酸、インターフェロン結合タンパク質および/またはインターフェロン阻害剤を放出するにつれて、持続効果を提供すると考えられる。

【0062】

一実施態様において、担体は、医薬的に許容される担体である。当業者に理解されてい

50

るとおり、医薬的に許容される担体、場合により他の治療的および/または予防的成分は、製剤の他の成分と適合し、その受給者に有害でないという意味で「許容され」なければならない。適切な医薬的に許容される担体溶液としては、水、生理食塩水、等張生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、乳酸リンゲル液などが挙げられる。本開示の組成物は、動物に、好ましくは哺乳類に、特にヒトに、治療薬自体として、互いの混合物として、または通常の医薬的に無害な添加剤および添加物に加えて活性成分として有効量の活性剤を含有する医薬製剤の形態で投与され得る。

【0063】

非経腸投与（例えば注射、例えばボラス注射または持続点滴による）のための製剤は、アンプル、プレフィルドシリンジ、少量点滴の単位投与形態で、または防腐剤が添加された、および添加されていない多回投与容器で提供され得る。製剤は、懸濁剤、液剤、または油性もしくは水性ビヒクル中のエマルジョンなどの形態であり得て、製剤化物質、例えば懸濁化、安定化および/または分散化物質を含有し得る。あるいは、活性剤を有するミネラルコーティングされたマイクロ粒子は、使用前に適切なビヒクル、例えば滅菌済みの発熱物質を含まない水で構成するための、例えば溶液からの凍結乾燥により得られる粉末形態であり得る。

10

【0064】

一態様において、本開示は、ミネラル層内に組み込まれているミネラル層ならびにリボ核酸、インターフェロン結合タンパク質、インターフェロン阻害剤およびそれらの組合せの少なくとも1つ、ならびにミネラル層に吸着されているリボ核酸、インターフェロン結合タンパク質、インターフェロン阻害剤およびそれらの組合せの少なくとも1つを含む、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子に関する。

20

【0065】

本明細書に開示されるように、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子内にリボ核酸、インターフェロン結合タンパク質、インターフェロン阻害剤およびそれらの組合せの少なくとも1つを組み込むために、リボ核酸、インターフェロン結合タンパク質および/またはインターフェロン阻害剤の少なくとも1つは、ミネラル層形成工程中に模擬体液に含まれる。特に適切なリボ核酸、インターフェロン結合タンパク質およびインターフェロン阻害剤としては、本明細書に記載のものが挙げられる。

【0066】

別の一態様において、本開示は、リボ核酸、インターフェロン結合タンパク質、インターフェロン阻害剤およびそれらの組合せの少なくとも1つの即時および持続共送達方法に関する。方法は、それを必要とする個体に製剤を提供することを含み、ここで、製剤は、担体を含み、担体は、リボ核酸、インターフェロン結合タンパク質、インターフェロン阻害剤およびそれらの組合せの少なくとも1つ；ならびにミネラル層およびリボ核酸、インターフェロン結合タンパク質、インターフェロン阻害剤およびそれらの組合せの少なくとも1つを含むミネラルコーティングされたマイクロ粒子を含む。

30

【0067】

一実施態様において、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子のリボ核酸、インターフェロン結合タンパク質、インターフェロン阻害剤およびそれらの組合せの少なくとも1つは、担体中のリボ核酸、インターフェロン結合タンパク質および/またはインターフェロン阻害剤と同一である。別の一実施態様において、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子のリボ核酸、インターフェロン結合タンパク質および/またはインターフェロン阻害剤の少なくとも1つは、担体中のミネラルコーティングされたマイクロ粒子のリボ核酸、インターフェロン結合タンパク質および/またはインターフェロン阻害剤と異なる。

40

【0068】

本開示の製剤の投与に適する方法は、非経腸経路（例えば、IV、IM、SCまたはIP）によるものであり、通常投与される製剤は、許容される希釈剤、担体および/またはアジュバントと組み合わせて有効量の生成物を含む。ヒト血清アルブミンなどの標準的な希釈剤は、生理食塩水などの標準的な担体と同様に、本開示の医薬組成物に企図される。

50

## 【0069】

リボ核酸、インターフェロン結合タンパク質および/またはインターフェロン阻害剤の送達は、確立された治療レベルの活性剤を模倣する放出値を得るために決定され得る。一定期間にわたって所望の濃度のリボ核酸、インターフェロン結合タンパク質および/またはインターフェロン阻害剤を送達するのに必要とされるミネラルコーティングされたマイクロ粒子（リボ核酸、インターフェロン結合タンパク質および/またはインターフェロン阻害剤と共に）の量は、予め計算され得る。例えば、所望の治療効果を提供するリボ核酸、インターフェロン結合タンパク質および/またはインターフェロン阻害剤の単回ボラス注射は、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子からの活性剤放出値を得ることにより所望の期間にわたって送達され得る。その後、所望の期間治療効果を提供するために活性剤を送達するのに必要とされるミネラルコーティングされたマイクロ粒子の量は、計算され得る。局所的かつ持続的送達プラットフォームは、多回注射を必要とせずに、損傷部位における連続的治療レベルの活性剤の利益を提供する。

10

## 【0070】

有効用量は、用いられるリボ核酸、インターフェロン結合タンパク質および/またはインターフェロン阻害剤および処置される具体的な疾患、障害または状態に応じて実質的に変化すると予想される。本開示の製剤に含まれる活性剤の急速および持続送達のため、適切な用量は、ボラス注射により送達される活性剤の有効用量より低いと予想される。本明細書に記載されるように、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子は、数日間にわたって有効量の活性剤を送達するために製造され得る。したがって、本開示の製剤の投与は、活性剤の急速な効果を有する未結合活性剤のボラス投与および望みどおり数時間から数日間にわたって効果を維持するために活性剤の持続放出を有するミネラルコーティングされたマイクロ粒子のミネラル層の分解中の活性剤の持続放出を提供する。

20

## 【0071】

本開示の製剤は、それを必要とする対象体に投与され得る。本明細書で用いられる「対象体」（「個体」および「患者」とも相互交換可能に称される）は、ヒトおよび非ヒト動物を含む動物を指す。したがって、本明細書に記載の組成物、デバイスおよび方法は、ヒトおよび獣医用途、特にヒトおよび獣医医療用途に用いられ得る。適切な対象体としては、温血哺乳類宿主、例えばヒト、コンパニオン動物（例えば、イヌ、ネコ）、ウシ、ウマ、マウス、ラット、ウサギ、霊長類およびブタ、好ましくはヒト患者が挙げられる。

30

## 【0072】

本明細書で用いられる「それを必要とする対象体」（「それを必要とする患者」とも相互交換可能に称される）は、特定の疾患、障害または状態に感受性であるか、またはリスクがある対象体を指す。本明細書に記載の方法は、炎症性疾患および障害に感受性であるか、またはリスクが高い対象体のサブセットで用いられ得る。本開示の方法の実施態様のいくつかは、特定の対象体の特定のサブセットまたはサブクラス（すなわち、本明細書で言及される1つ以上の特定の状態に対処する際に助けを「必要とする」対象体のサブセットまたはサブクラス）に関するため、すべてではない対象体が、本明細書に記載される特定の疾患、障害または状態についてのサブセットまたはサブクラスに含まれる。

## 【0073】

別の一態様において、本開示は、処置を必要とする対象体において炎症性疾患を処置するための方法に関する。当該方法は、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子を含む組成物を対象体に投与することを含み、ここでミネラルコーティングされたマイクロ粒子は、ミネラル層；ならびにリボ核酸、インターフェロン結合タンパク質、インターフェロン阻害剤およびそれらの組合せの少なくとも1つを含む。

40

## 【0074】

炎症性疾患としては、関節炎、特に、リウマチ性関節炎および骨関節症が挙げられる。他の適切な炎症性疾患としては、インターロイキン-1関連疾患、例えば2型糖尿病、自己免疫疾患、新生児期発症多臓器系炎症性疾患、および神経障害性疾患（例えばアルツハイマー病）ならびに局所および急性炎症状態（例えば皮膚および靭帯創傷治癒）が挙げられ

50

る。

【0075】

ミネラルコーティングされたマイクロ粒子は、注射により投与され得る。骨関節症については、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子は、滑膜注射であり得る。

【0076】

適切なりボ核酸、インターフェロン結合タンパク質およびインターフェロン阻害剤は、本願明細書に記載されている。特に適切なRNAとしては、mRNAが挙げられる。特に適切なインターフェロン結合タンパク質としては、B18Rタンパク質が挙げられる。特に適切なインターフェロン阻害剤としては、小分子インターフェロン阻害剤が挙げられる。

【0077】

本開示のミネラルコーティングされたマイクロ粒子の投与に適する方法は、本明細書に記載されるように非経腸（例えば、IV、IM、SCまたはIP）経路によるものである。

【実施例】

【0078】

実施例1

この実施例において、ミネラルコーティングされたマイクロ粒子（MCM）からB18Rと共送達された野生型（WT）mRNAの導入遺伝子発現を分析した。

【0079】

Lipofectamine Messenger MAXを用いて、ガウシアルシフェラーゼをコードする100ngのWT-mRNAをヒト皮膚線維芽細胞（hDF）にトランスフェクトした。WT-mRNAリポプレックス（30 ng/mL）を、MCM上にB18R（200 ng/mL）と共吸着させたか、またはMCMもしくはB18R無しで送達した。ガウシアルシフェラーゼ導入遺伝子発現を、トランスフェクションの12時間後に生物発光により測定した。

【0080】

図1に示すように、MCMからB18Rと共送達された野生型mRNA（MCM+/B18R+）は、MCMまたはB18R無しで送達されたWT-mRNA（MCM-/B18R-）より大きな導入遺伝子発現をもたらした。

【0081】

実施例2

この実施例において、B18R有りおよび無しでミネラルコーティングされたマイクロ粒子（MCM）から送達された野生型（WT）mRNAの導入遺伝子発現を分析した。

【0082】

Lipofectamine Messenger MAXを用いて、ガウシアルシフェラーゼをコードする100 ngのWT-mRNAをhDFにトランスフェクトした。MCMを伴うおよび伴わないB18R（200 ng/mL）を加えて、トランスフェクションの2時間前に培養した。WT-mRNAリポプレックス（30 ng/mL）をMCM上にB18R（200 ng/mL）と共吸着させたか、またはMCM無しでB18Rと共に送達した。培地をトランスフェクション前に交換しなかった（両条件での合計B18R送達は同じと予想される）。ガウシアルシフェラーゼ導入遺伝子発現を、トランスフェクションの12時間後に生物発光により測定した。

【0083】

図2に示すように、MCMからB18Rと共送達された野生型（WT）mRNA（MCM+）は、B18Rと共にであるがMCM無しで送達されたWT-mRNA（MCM-）より大きな導入遺伝子発現をもたらした。

【0084】

実施例3

この実施例において、MCMからB18Rと共送達された野生型（WT）mRNAおよび化学修飾（MOD）RNAの導入遺伝子発現を分析した。

【0085】

Lipofectamine Messenger MAXおよびMCMを用いて、bFGFをコードする100ngのMOD-またはWT-mRNAをhDFにトランスフェクトした。MOD-mRNAリポプレックス（30 ng/mL）をMCM上

10

20

30

40

50

に吸着させた。WT-mRNAリポプレックス (30 ng/mL) をMCM上にB18R (200 ng/mL) と共吸着させた。bFGFを、トランスフェクション後12時間にてELISAにより測定した。

【0086】

図3に示すように、化学修飾 (MOD) およびMCMからB18Rと共送達された野生型 (WT) mRNAのトランスフェクションの結果として、hDFは同等量のbFGFタンパク質を産生した。

【0087】

#### 実施例4

この実施例において、B18R有りおよび無しでミネラルコーティングされたマイクロ粒子 (MCM) から送達された野生型 (WT) mRNAの導入遺伝子発現を分析した。

【0088】

Lipofectamine Messenger MAXを用いて、増強緑色蛍光タンパク質 (EGFP) をコードする100ngのWT-mRNAをラット星状細胞にトランスフェクトした。B18R (200 ng/mL) をMCMと共に加えて、トランスフェクションの2時間前に培養した。WT-mRNAリポプレックス (30 ng/ $\mu$ L) をMCM上にB18R (200 ng/mL) と共吸着させたか、またはB18R無しでMCMと共に送達した。EGFP導入遺伝子発現を、トランスフェクションの12時間後に落射蛍光顕微鏡により測定した。

【0089】

図4A、図4B、図4Cおよび図4Dに示すように、MCMからB18Rと共送達された野生型 (WT) mRNAは、MCMと共にであるがB18R無しで送達されたWT-mRNAより大きなトランスフェクションをもたらした。

【0090】

#### 実施例5

この実施例において、インピボ遺伝子送達に対するMCMおよびmRNA化学修飾の影響を決定した。

【0091】

db+/db+変異体マウス (Jackson Labs) に2つの皮膚創傷を与え、処置を図5Aに、コントロールを図5Bに記載する。創傷を19日間治癒させ、その時点で動物を屠殺し、組織を組織学的検査のために採取した。切除した創傷部を横方向に切断し、H&Eで染色した。染色した組織は、創傷回復の質について、処置群について伏せられた2人によって採点された。結果を図5Aおよび図5Bに示す。

【0092】

上記を考慮して、本開示のいくつかの利点が達成され、他の有利な結果が得られることが分かるだろう。本開示の範囲から逸脱することなく上記方法において様々な変更がなされ得るため、上記説明に含まれ、添付の図面に示されるすべての事項は、限定的な意味ではなく、例示として解釈されるべきであることを意図する。

【0093】

本開示の要素またはその様々な変形物、実施態様または態様を導入するとき、冠詞「a」、「an」、「the」および「said」は、1つ以上の要素があることを意味することが意図される。用語「含む (comprising)」、「含む (including) 」および「有する (having) 」は、包括的であり、リストされる要素以外の更なる要素があり得ることを意味することが意図される。

10

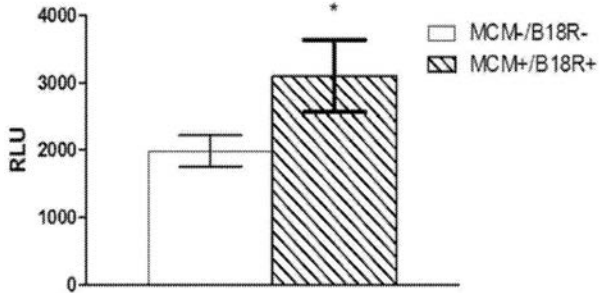
20

30

40

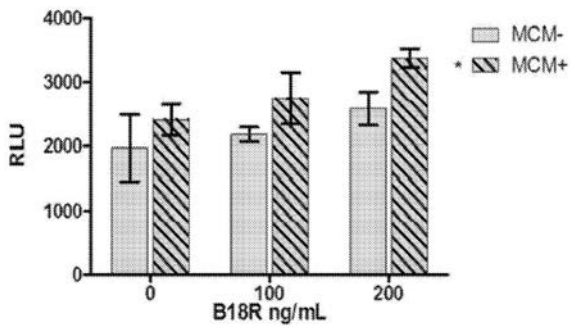
【 図 1 】

FIG. 1



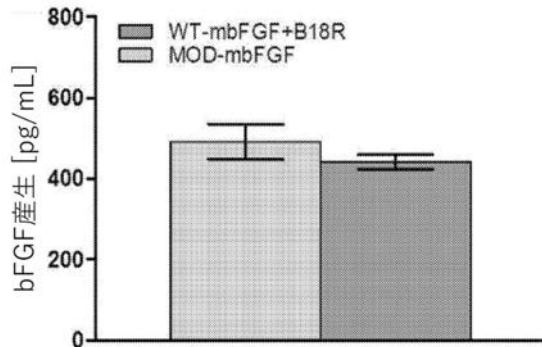
【 図 2 】

FIG. 2



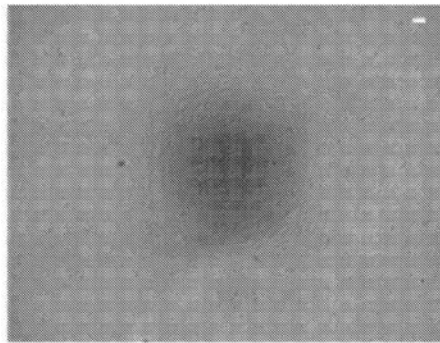
【 図 3 】

FIG. 3



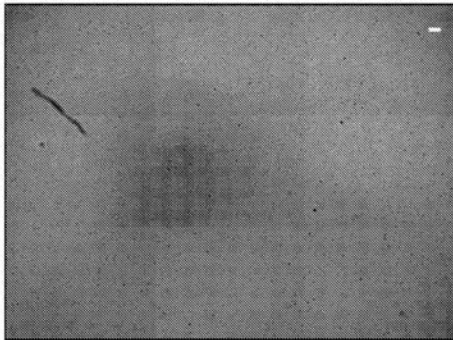
【 図 4 A 】

FIG. 4A



【 図 4 B 】

FIG. 4B



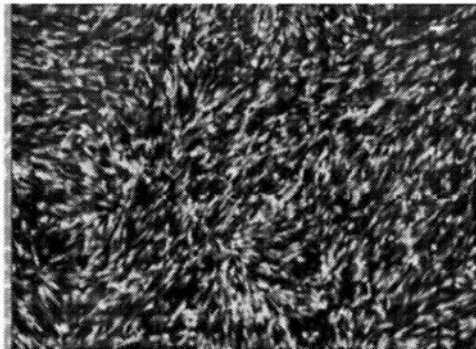
【 図 4 D 】

FIG. 4D



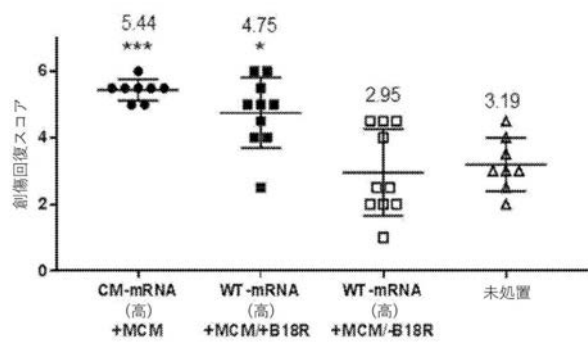
【 図 4 C 】

FIG. 4C



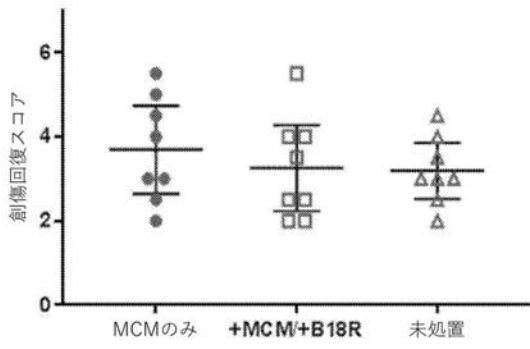
【 図 5 A 】

FIG. 5A



【 図 5 B 】

FIG. 5B



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US18/40928

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC - A61K 9/50, 31/265, 33/06, 33/42; C07K 14/705, 14/715; C12N 15/85, 15/87 (2018.01)		
CPC - A61K 9/50, 9/501, 9/5015, 9/5073, 31/265, 33/06, 33/42; C07K 14/705, 14/715; C12N 15/85, 15/87		
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) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X - Y	US 2016/0017368 A1 (WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION) 21 January 2016; paragraphs [0007], [0052], [0056], [0080], [0145]	1-5, 7-11, 15-19, 21-24, 29 --- 6, 12-14, 20, 25-27, 30-42
Y	✓ (HUANG, SS et al.) Evaluation of protective efficacy using a nonstructural protein NS1 in DNA vaccine-loaded microspheres against dengue 2 virus. International Journal of Nanomedicine. 2013, Epub 19 August 2013, Vol. 8; pages 3161-3169; page 3162, 2nd column, 1st and 2nd paragraphs, page 3164, 2nd column, 1st paragraph; DOI: 10.2147/IJN.S49972	6, 20, 34
Y	✓ (YU, X et al.) Multilayered Inorganic Microparticles for Tunable Dual Growth Factor Delivery. Advances Functional Materials. 28 May 2014, Vol. 24, No. 20; pages 3082-3093; page 5, 1st paragraph; DOI: 10.1002/adfm.201302859	12, 25, 38
Y	✓ (RANGANATH, SH et al.) Controlled Inhibition of the Mesenchymal Stromal Cell Pro-inflammatory Secretome via Microparticle Engineering. Stem Cell Reports. 14 June 2016, Epub 2 June 2016, Vol. 6, No. 6; pages 926-939; page 927, 2nd column, 1st and 3rd paragraphs; DOI: 10.1016/j.stemcr.2016.05.003	13-14, 26-27, 40-41
Y	US 2016/0185822 A1 (BCN PEPTIDES, SA) 30 June 2016; paragraphs [0012], [0113], [0130]	30-42
<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:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	
"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)	"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	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 28 August 2018 (28.08.2018)	Date of mailing of the international search report <b>14 SEP 2018</b>	
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer <b>Shane Thomas</b>  PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 9/14 (2006.01)	A 6 1 K 9/14	
A 6 1 K 47/02 (2006.01)	A 6 1 K 47/02	
A 6 1 K 47/04 (2006.01)	A 6 1 K 47/04	
A 6 1 K 47/30 (2006.01)	A 6 1 K 47/30	

(81) 指定国・地域 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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

(72) 発明者 ウィリアム・エル・マーフィー  
アメリカ合衆国 5 3 7 2 6 ウィスコンシン州マディソン、ウォルナット・ストリート 6 1 4 番、サーティーンズ・フロア、ウィスコンシン・アルムナイ・リサーチ・ファウンデーション内

(72) 発明者 アンドリュー・サリム・カイル  
アメリカ合衆国 5 3 7 2 6 ウィスコンシン州マディソン、ウォルナット・ストリート 6 1 4 番、サーティーンズ・フロア、ウィスコンシン・アルムナイ・リサーチ・ファウンデーション内

(72) 発明者 シャオホア・ユー  
アメリカ合衆国 5 3 7 2 6 ウィスコンシン州マディソン、ウォルナット・ストリート 6 1 4 番、サーティーンズ・フロア、ウィスコンシン・アルムナイ・リサーチ・ファウンデーション内

F ターム(参考) 4C076 AA29 CC04 DD21 DD23 DD25 DD26 DD27 DD28 EE01  
4C084 AA02 AA13 AA22 BA44 MA02 MA43 NA13 ZB11  
4C086 AA01 AA02 EA16 MA03 MA05 MA43 NA13 ZB11