

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7546927号
(P7546927)

(45)発行日 令和6年9月9日(2024.9.9)

(24)登録日 令和6年8月30日(2024.8.30)

(51)国際特許分類	F I
A 6 1 K 47/42 (2017.01)	A 6 1 K 47/42
A 6 1 K 47/44 (2017.01)	A 6 1 K 47/44
A 6 1 K 9/127(2006.01)	A 6 1 K 9/127
A 6 1 K 31/711(2006.01)	A 6 1 K 31/711
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00
請求項の数 58 (全50頁) 最終頁に続く	

(21)出願番号	特願2021-542150(P2021-542150)	(73)特許権者	500041019 ノースウェスタン ユニバーシティ アメリカ合衆国 イリノイ 6 0 2 0 8 , エヴァンストン , クラーク ストリート 6 3 3
(86)(22)出願日	令和2年1月24日(2020.1.24)	(74)代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(65)公表番号	特表2022-518479(P2022-518479 A)	(74)代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(43)公表日	令和4年3月15日(2022.3.15)	(74)代理人	100181674 弁理士 飯田 貴敏
(86)国際出願番号	PCT/US2020/015109	(74)代理人	100181641 弁理士 石川 大輔
(87)国際公開番号	WO2020/154705	(74)代理人	230113332 弁護士 山本 健策
(87)国際公開日	令和2年7月30日(2020.7.30)		
審査請求日	令和5年1月23日(2023.1.23)		
(31)優先権主張番号	62/796,534		
(32)優先日	平成31年1月24日(2019.1.24)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 脂質結合体化コア足場を使用する高密度リポタンパク質模倣ナノ粒子

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

球状高密度リポタンパク質ナノ粒子(HDL-NP)であって、コアおよび前記コアを取り囲みかつそれに付着したシェルを含み、ここで前記コアは、脂質結合体化有機性コア足場を含み、前記球状HDL-NPは、-16~-3.0ミリボルト(mV)の表面電位と、

(a)前記有機性コア足場が疎水性低分子-リン脂質結合体(PL₄)を含むこと；または
(b)前記有機性コア足場が両親媒性DNA連結低分子-リン脂質結合体(DNA-PL₄)を含むこと

のうちの少なくとも1つを特徴とする、球状HDL-NP。

【請求項2】

前記シェルは、脂質シェルである、請求項1に記載の球状HDL-NP。

【請求項3】

前記シェルは、脂質二重層または単層である、請求項1~2のいずれか1項に記載の球状HDL-NP。

【請求項4】

前記球状HDL-NPは、-2.0ミリボルト(mV)の表面電位を有する、請求項1~3のいずれか1項に記載の球状HDL-NP。

【請求項5】

前記有機性コア足場は、疎水性低分子-リン脂質結合体(PL₄)を含む、請求項1~

4のいずれか1項に記載の球状HDL-NP。

【請求項6】

前記PL₄は、ヘッド基改変リン脂質を含む、請求項5に記載の球状HDL-NP。

【請求項7】

前記ヘッド基改変リン脂質は、環ひずみアルキン、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-ジベンゾシクロオクチルを含む、請求項6に記載の球状HDL-NP。

【請求項8】

前記リン脂質は、複数の末端官能基を有する前記低分子にカップリングされる、請求項6~7のいずれか1項に記載の球状HDL-NP。

10

【請求項9】

前記複数の官能基は、2~6個の官能基である、請求項8に記載の球状HDL-NP。

【請求項10】

前記複数の官能基は、4個の官能基である、請求項8に記載の球状HDL-NP。

【請求項11】

前記官能基は、末端アジド(SM-Az)である、請求項8~10のいずれか1項に記載の球状HDL-NP。

【請求項12】

前記低分子は、テトラキス(4-アジドフェニル)メタンである、請求項8~11のいずれか1項に記載の球状HDL-NP。

20

【請求項13】

前記有機性コア足場は、両親媒性DNA連結低分子-リン脂質結合体(DNA-PL₄)を含む、請求項1~4のいずれか1項に記載の球状HDL-NP。

【請求項14】

前記DNAは、5~17ヌクレオチド長の2本鎖オリゴヌクレオチドである、請求項13に記載の球状HDL-NP。

【請求項15】

前記DNAは、8~15ヌクレオチド長の2本鎖オリゴヌクレオチドである、請求項13に記載の球状HDL-NP。

【請求項16】

前記DNAは、9ヌクレオチド長の2本鎖オリゴヌクレオチドである、請求項13に記載の球状HDL-NP。

30

【請求項17】

前記2本鎖DNAの第1の1本鎖は、リン脂質に連結され、ssDNA-リン脂質結合体(ssDNA-PL)を形成する、請求項14~16のいずれか1項に記載の球状HDL-NP。

【請求項18】

前記2本鎖DNAの前記第1鎖に相補的な前記2本鎖DNAの第2鎖は、低分子に連結される、請求項17に記載の球状HDL-NP。

【請求項19】

前記低分子は、四面体低分子であり、前記DNAに連結された前記低分子は、四面体低分子-DNAハイブリッド(SMDH₄)を形成する、請求項18に記載の球状HDL-NP。

40

【請求項20】

前記SMDH₄は、前記DNAの相補的な1本鎖の間の水素結合を介して前記ssDNA-PLに連結される、請求項19に記載の球状HDL-NP。

【請求項21】

前記球状HDL-NPは、5~30nm、5~20nm、5~15nm、5~10nm、8~13nm、8~12nm、または10nmの直径を有する、請求項1~20のいずれか1項に記載の球状HDL-NP。

50

【請求項 2 2】

前記球状HDL-NPは、金コアを有する合成HDLナノ粒子よりヒトHDLに近い電位を有する、請求項1～21のいずれか1項に記載の球状HDL-NP。

【請求項 2 3】

前記電位は、 $-16 \sim -26$ mVである、請求項22に記載の球状HDL-NP。

【請求項 2 4】

前記球状HDL-NPは、アポリポタンパク質または金コアを有する合成HDLナノ粒子のものより効率的なコレステロール輸送能を有する、請求項1～23のいずれか1項に記載の球状HDL-NP。

【請求項 2 5】

アポリポタンパク質をさらに含む、請求項1～24のいずれか1項に記載の球状HDL-NP。

10

【請求項 2 6】

アポリポタンパク質A-I (ApoA1)をさらに含む、請求項1～25のいずれか1項に記載の球状HDL-NP。

【請求項 2 7】

前記HDL-NPは、 8.7 nmより大きい流体力学的直径を有する、請求項1～26のいずれか1項に記載の球状HDL-NP。

【請求項 2 8】

前記HDL-NPは、 8.7 nm～ 17.7 nmの流体力学的直径を有する、請求項1～27のいずれか1項に記載の球状HDL-NP。

20

【請求項 2 9】

前記HDL-NPは、 10 nm～ 15 nmの流体力学的直径を有する、請求項1～28のいずれか1項に記載の球状HDL-NP。

【請求項 3 0】

前記HDL-NPは、 12 nm～ 14 nmの流体力学的直径を有する、請求項1～29のいずれか1項に記載の球状HDL-NP。

【請求項 3 1】

前記HDL-NPに連結された治療剤をさらに含む、請求項1～30のいずれか1項に記載の球状HDL-NP。

30

【請求項 3 2】

前記治療剤は、治療用核酸である、請求項31に記載の球状HDL-NP。

【請求項 3 3】

前記治療剤は、抗がん剤である、請求項31に記載の球状HDL-NP。

【請求項 3 4】

前記抗がん剤は、化学療法剤である、請求項33に記載の球状HDL-NP。

【請求項 3 5】

前記治療剤は、抗炎症剤である、請求項31に記載の球状HDL-NP。

【請求項 3 6】

請求項1～35のいずれか1項に記載の球状HDL-NPおよび薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

40

【請求項 3 7】

球状高密度リポタンパク質ナノ粒子(HDL-NP)を含む、がんを処置するための組成物であって、前記組成物は、がんを有する被験体に投与されることを特徴とし、前記HDL-NPが、コアおよび前記コアを取り囲みかつそれに付着したシェルを含み、ここで前記コアは、前記がんを処置するために有効な量で脂質結合体化有機性コア足場を含み、前記球状HDL-NPは、 $-16 \sim -30$ ミリボルト(mV)の表面電位と、
(a)前記有機性コア足場が疎水性低分子-リン脂質結合体(PL₄)を含むこと；または
(b)前記有機性コア足場が両親媒性DNA連結低分子-リン脂質結合体(DNA-PL₄)を含むこと

50

のうちの少なくとも1つとを特徴とする、組成物。

【請求項38】

球状高密度リポタンパク質ナノ粒子(HDL-NP)を含む、炎症性障害を処置するための組成物であって、前記組成物は、炎症性障害を有する被験体に投与されることを特徴とし、前記HDL-NPが、コアおよび前記コアを取り囲みかつそれに付着したシェルを含み、ここで前記コアは、前記炎症性障害を処置するために有効な量で脂質結合体化有機性コア足場を含み、前記球状HDL-NPは、-1.6~-3.0ミリボルト(mV)の表面電位と、

(a)前記有機性コア足場が疎水性低分子-リン脂質結合体(PL₄)を含むこと；または

(b)前記有機性コア足場が両親媒性DNA連結低分子-リン脂質結合体(DNA-PL₄)を含むこと

10

のうちの少なくとも1つとを特徴とする、組成物。

【請求項39】

前記球状HDL-NPは、請求項1~35のいずれか1項に記載の球状HDL-NPである、請求項37または38に記載の組成物。

【請求項40】

前記被験体は、哺乳動物である、請求項37~39のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項41】

前記被験体は、ヒトである、請求項40に記載の組成物。

【請求項42】

NF-κB活性を低減するための組成物であって、前記組成物は、請求項1~35のいずれか1項に記載の球状HDL-NPを含む、組成物。

20

【請求項43】

球状高密度リポタンパク質ナノ粒子(HDL-NP)を作製するための方法であって、前記方法は：

ssDNA-リン脂質結合体(ssDNA-PL)を調製する工程、

四面体低分子-DNAハイブリッド(SMDH₄)を調製する工程であって、ここで前記ssDNA-PLおよびSMDH₄は、相補的DNA配列を有する、工程、

前記ssDNA-PLおよびSMDH₄を、前記相補的DNA配列が互いに塩基対合して、DNA-PLコアを形成するようにインキュベートする工程、ならびに

前記DNA-PLコアにリン脂質リポソームおよびアポリタンパク質を添加して、前記コアを取り囲むシェルを生成し、それにより前記球状HDL-NPを生成する工程、
を包含する、方法。

30

【請求項44】

前記ssDNA-PLは、少なくとも9ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む、請求項43に記載の方法。

【請求項45】

前記オリゴヌクレオチドは、9ヌクレオチド長である、請求項44に記載の方法。

【請求項46】

前記オリゴヌクレオチドは、配列番号1を含む、請求項45に記載の方法。

40

【請求項47】

前記SMDH₄は、少なくとも9ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む、請求項43に記載の方法。

【請求項48】

前記オリゴヌクレオチドは、9ヌクレオチド長である、請求項47に記載の方法。

【請求項49】

前記オリゴヌクレオチドは、配列番号3を含む、請求項48に記載の方法。

【請求項50】

前記アポリタンパク質は、アポリタンパク質A-Iである、請求項43~49のいずれか1項に記載の方法。

50

助成金番号 A G 0 6 2 9 9 9 の下で政府支援を得て行われた。政府は、本発明において一定の権利を有する。

【 0 0 0 2 】

関連出願

本出願は、米国特許法第 1 1 9 条 (e) の下で、2 0 1 9 年 1 月 2 4 日出願の米国仮特許出願第 6 2 / 7 9 6 5 3 4 号 (その全内容は、本明細書に参考として援用される) の優先権を主張する。

【 背景技術 】

【 0 0 0 3 】

発明の背景

ナノ粒子は、ミクロン未満のサイズドメインにあり、物質をそれらのバルク形態と比較して、優れたものにする特有のサイズ依存特性を有する。ナノ粒子と関連する進歩した化学的および物理的特性は、生物学および医療の分野においてそれらの広範な用途をもたらした。高密度リポタンパク質 (H D L) は、血液中で循環する動的ナノ粒子である。

【 発明の概要 】

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 4 】

発明の要旨

本開示は、成熟ヒト H D L と一致するサイズ、形状、表面の化学的性質、組成、タンパク質構造、およびコレステロール輸送特性を有するソフトコア H D L 様ナノ粒子の合成を示す。脂質結合体化 (L C) した H D L N P は、細胞コレステロールを除去および送達し、炎症を低減するために関連する細胞タイプを標的化し、ヒト H D L の顕著な機能を再現する。L C H D L N P の合成は簡単であり、時間のかかるかつコストのかかる酵素成熟工程を要しないことから、これらのナノ粒子は、次世代の H D L ベースの治療剤の強力な候補であると判明することが認識される。

【 0 0 0 5 】

さらに、本開示は、脂質結合体化有機性コア足場を使用する球状 H D L 模倣物の合成および特徴付けのための方法を提供する。上記コア設計モチーフは、いくつかの実施形態においておよそ 1 0 n m 直径であり、それらのサイズ、形状、表面の化学的性質、組成およびタンパク質二次構造においてヒト H D L と似ているソフトコアナノ粒子の集合を促進するために、リン脂質幾何形状を制限し方向付ける。

【 0 0 0 6 】

いくつかの局面において、本開示は、コアおよび上記コアを取り囲みかつそれに付着したシェルを含み、ここで上記コアは、脂質結合体化有機性コア足場を含む球状高密度リポタンパク質ナノ粒子 (H D L - N P) を提供する。いくつかの実施形態において、上記シェルは、脂質シェルである。いくつかの実施形態において、上記シェルは、脂質二重層または単層である。いくつかの実施形態において、上記球状 H D L - N P は、約 - 2 0 m V の電位を有する。いくつかの実施形態において、上記有機性コア足場は、P L 4 を含む。いくつかの実施形態において、上記有機性コア足場は、9 - D N A - P L 4 を含む。いくつかの実施形態において、上記有機性コア足場は、1 8 - D N A - P L 4 を含む。いくつかの実施形態において、上記シェルは、無機性コアを有する合成 H D L ナノ粒子よりヒト H D L に近い電位を有する。いくつかの実施形態において、上記球状 H D L - N P は、金コアを有する合成 H D L ナノ粒子よりヒト H D L に近い電位を有する。いくつかの実施形態において、上記球状 H D L - N P は、アポリポタンパク質を有する。いくつかの実施形態において、上記アポリポタンパク質は、アポリポタンパク質 A - I である。

【 0 0 0 7 】

いくつかの局面において、本開示は、上記の球状 H D L - N P のうちのいずれか 1 つを含む組成物を提供する。

【 0 0 0 8 】

いくつかの局面において、本開示は、炎症性障害を処置する方法であって、前記方法は

10

20

30

40

50

、被験体に、有効量の、上記の球状HDL-NPのうちのいずれか1つを含む組成物を投与する工程を包含する方法を提供する。

【0009】

いくつかの局面において、本開示は、NF-kB活性を低減する方法であって、上記方法は、被験体に、有効量の、上記の球状HDL-NPのうちのいずれか1つを含む組成物を投与する工程を包含する方法を提供する。

【0010】

本発明の1またはこれより多くの実施形態の詳細は、以下の説明に示される。本発明の他の特長または利点は、以下の図面およびいくつかの実施形態の詳細な説明から、および添付の特許請求の範囲からも明らかである。

【0011】

一局面において、本開示は、コアおよび上記コアを取り囲みかつそれに付着したシェルを含む球状高密度リポタンパク質ナノ粒子(HDL-NP)であって、ここで上記コアは、脂質結合体化有機性コア足場を含むものに関する。

【0012】

いくつかの実施形態において、上記シェルは、脂質シェルである。いくつかの実施形態において、上記シェルは、脂質二重層または単層である。いくつかの実施形態において、上記シェルは、脂質二重層である。いくつかの実施形態において、上記シェルは、脂質単層である。

【0013】

いくつかの実施形態において、上記球状HDL-NPは、約-20ミリボルト(mV)の表面電位を有する。

【0014】

いくつかの実施形態において、上記有機性コア足場は、PL₄を含む。いくつかの実施形態において、上記有機性コア足場は、9-DNA-PL₄を含む。いくつかの実施形態において、上記有機性コア足場は、18-DNA-PL₄を含む。

【0015】

いくつかの実施形態において、上記シェルは、無機性コアを有する合成HDLナノ粒子よりヒトHDLに近い電位を有する。いくつかの実施形態において、上記球状HDL-NPは、金コアを有する合成HDLナノ粒子よりヒトHDLに近い電位を有する。いくつかの実施形態において、上記球状HDL-NPは、-16~26mVの電位を有する。

【0016】

いくつかの実施形態において、本開示の球状HDL-NPは、アポリポタンパク質をさらに含む。いくつかの実施形態において、上記アポリポタンパク質は、アポリポタンパク質A-Iである。

【0017】

いくつかの実施形態において、本開示の球状HDL-NPは、8.7nmより大きい流体力学的直径を含む。いくつかの実施形態において、上記流体力学的直径は、8.7nm~17.7nmである。いくつかの実施形態において、上記流体力学的直径は、10nm~15nmである。いくつかの実施形態において、上記流体力学的直径は、12nm~14nmである。

【0018】

いくつかの実施形態において、上記有機性コア足場は、疎水性低分子-リン脂質結合体(PL₄)を含む。いくつかの実施形態において、上記PL₄は、ヘッド基改変リン脂質を含む。いくつかの実施形態において、上記ヘッド基改変リン脂質は、環ひずみアルキン(ring-strained alkyne)、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-ジベンゾシクロオクチルを含む。いくつかの実施形態において、上記リン脂質は、複数の末端官能基を有する上記低分子にカップリングされる。いくつかの実施形態において、上記低分子は、テトラキス(4-アジドフェニル)メタンである。いくつかの実施形態において、上記複数の官能基は、2~6個の官能基

10

20

30

40

50

である。いくつかの実施形態において、上記複数の官能基は、4個の官能基である。いくつかの実施形態において、上記官能基は、末端アジド(SM-Az)である。

【0019】

他の実施形態において、上記有機性コア足場は、両親媒性DNA連結低分子-リン脂質結合体(DNA-PL₄)を含む。いくつかの実施形態において、上記DNAは、5~17ヌクレオチド長の2本鎖オリゴヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、上記DNAは、8~15ヌクレオチド長の2本鎖オリゴヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、上記DNAは、9ヌクレオチド長の2本鎖オリゴヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、上記2本鎖DNAの第1の1本鎖は、リン脂質に連結され、ssDNA-リン脂質結合体(ssDNA-PL)を形成する。いくつかの実施形態において、上記2本鎖DNAの第1鎖に相補的な上記2本鎖DNAの第2鎖は、低分子に連結される。いくつかの実施形態において、上記低分子は、四面体低分子であり、上記DNAに連結された上記低分子は、四面体低分子-DNAハイブリッド(SMDH₄)を形成する。いくつかの実施形態において、上記SMDH₄は、DNAの上記相補的1本鎖間の水素結合を介して上記ssDNA-PLに連結される。

10

【0020】

いくつかの実施形態において、上記球状HDL-NPは、アポリポタンパク質または金コアを有する合成HDLナノ粒子のものより効率的なコレステロール輸送能を有する。

【0021】

いくつかの実施形態において、上記球状HDL-NPは、約5~30nm、5~25nm、5~22nm、5~20nm、5~15nm、5~14nm、5~13nm、5~12nm、5~11nm、5~10nm、8~15nm、8~14nm、8~13nm、8~12nm、8~11nm、8~10nm、10~12nm、または10nmの直径を有する。

20

【0022】

いくつかの実施形態において、上記球状HDL-NPは、上記HDL-NPに連結された治療剤をさらに含む。いくつかの実施形態において、上記治療剤は、治療用核酸である。いくつかの実施形態において、上記治療剤は、抗がん剤である。いくつかの実施形態において、上記抗がん剤は、化学療法剤である。いくつかの実施形態において、上記治療剤は、抗炎症剤である。

30

【0023】

他の局面において、本発明は、がんを処置するための方法であって、上記方法は、がんを有する被験体に、コアおよび上記コアを取り囲みかつそれに付着したシェルを含み、ここで上記コアは、脂質結合体化有機性コア足場を含む球状高密度リポタンパク質ナノ粒子(HDL-NP)を、上記がんを処置するために有効な量で投与する工程を包含する方法である。

【0024】

他の局面において、炎症性障害を有する被験体に、コアおよび上記コアを取り囲みかつそれに付着したシェルを含み、ここで上記コアは、脂質結合体化有機性コア足場を含む球状高密度リポタンパク質ナノ粒子(HDL-NP)を、上記炎症性障害を処置するために有効な量で投与する工程による、炎症性障害を処置するための方法が提供される。

40

【0025】

一局面において、本開示は、本開示の球状HDL-NPのうちのいずれかを含む薬学的組成物に関する。

【0026】

一局面において、本開示は、がんまたは炎症性障害を処置する方法であって、上記方法は、被験体に、有効量の、本開示の球状HDL-NPを含む組成物を投与する工程を包含する方法に関する。

【0027】

一局面において、本開示は、NF-kB活性を低減する方法であって、上記方法は、被

50

験体に、有効量の、本開示の球状HDL-NPのうちのいずれかを含む組成物を投与する工程を包含する方法に関する。

【0028】

一局面において、本開示は、球状高密度リポタンパク質ナノ粒子(HDL-NP)を作製するための方法であって、上記方法は、ssDNA-リン脂質結合体(ssDNA-PL)を調製する工程、四面体低分子-DNAハイブリッド(SMDH₄)を調製する工程であって、ここで上記ssDNA-PLおよびSMDH₄は、相補的DNA配列を有する工程、上記ssDNA-PLおよびSMDH₄を、上記相補的DNA配列が互いに塩基対合して、DNA-PLコアを形成するようにインキュベートする工程、ならびに上記DNA-PLコアにリン脂質リポソームおよびアポリタンパク質を添加して、上記球状HDL-NPを生成する工程を包含する方法に関する。

10

【0029】

いくつかの実施形態において、上記ssDNA-PLは、少なくとも9ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、上記オリゴヌクレオチドは、6~16ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号1を含む。いくつかの実施形態において、上記オリゴヌクレオチドは、18ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号2を含む。

【0030】

いくつかの実施形態において、上記SMDH₄は、少なくとも9ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、上記オリゴヌクレオチドは、9~15ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号3を含む。いくつかの実施形態において、上記オリゴヌクレオチドは、18ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号4を含む。

20

【0031】

いくつかの実施形態において、本明細書で開示される方法のうちのいずれかのアポリタンパク質は、アポリタンパク質A-Iである。

【0032】

一局面において、本開示は、4個の末端アジドを有する四面体低分子コア(テトラキス(4-アジドフェニル)メタン)に連結された1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-ジベンゾシクロオクチル(DBCOPE)を含む、有機性コア足場に関する。

30

【0033】

本発明の限定の各々は、本発明の種々の実施形態を包含し得る。従って、任意の1つの要素または要素の組み合わせが関わる本発明の限定の各々は、本発明の各局面において包含されることが認識される。本発明は、構築の詳細へのその適用および以下の説明に示されるかまたは図面に図示される構成要素の配置において限定されない。本発明は、他の実施形態が可能であり、種々の方法で実施または行われることが可能である。本発明の1またはこれより多くの実施形態の詳細は、添付の詳細な説明、実施例、特許請求の範囲、および図面に示される。本発明の他の特徴、目的、および利点は、詳細な説明から、および請求項から明らかである。

40

【図面の簡単な説明】

【0034】

以下の図面は、本明細書の一部を形成し、本開示のある特定の局面をさらに示すために含まれ、これら局面は、本明細書で示される具体的実施形態の詳細な説明と組み合わせて、これらの図面のうちの1またはこれより多くを参照することによってよりよく理解され得る。明瞭にする目的で、全ての構成要素が、全ての図面において表示されないこともある。図面で例証されるデータが本開示の局面を決して限定しないことは、理解されるべきである。図面において：

50

【0035】

【図1】図1は、標準逆コレステロール輸送経路を示す。略語：FC：遊離コレステロール。CE：コレステリルエステル。PL：リン脂質。LCAT：レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ。

【0036】

【図2-1】図2A~2G。図2A~2Cは、PL₄およびDNA-PL₄コア足場、ならびにLC HDL NP集合体に関する合成スキームを示す。図2Dは、質量%(%)によって、天然および合成HDLの組成を示す。*Au HDL NP組成は、以前に公開したデータセットから報告される¹⁸。図2Eは、LC HDL NPおよびヒトHDLに関する円偏光二色性スペクトルを示す。図2Fは、それらのコア材料において変動する天然および合成HDL種の模式図を示す。図2Gは、98,000×倍率でのDNA-PL₄ HDL NP(9マーDNA)のTEM画像を示す。スケールバー=50nm。

10

【図2-2】図2A~2G。図2A~2Cは、PL₄およびDNA-PL₄コア足場、ならびにLC HDL NP集合体に関する合成スキームを示す。図2Dは、質量%(%)によって、天然および合成HDLの組成を示す。*Au HDL NP組成は、以前に公開したデータセットから報告される¹⁸。図2Eは、LC HDL NPおよびヒトHDLに関する円偏光二色性スペクトルを示す。図2Fは、それらのコア材料において変動する天然および合成HDL種の模式図を示す。図2Gは、98,000×倍率でのDNA-PL₄ HDL NP(9マーDNA)のTEM画像を示す。スケールバー=50nm。

【図2-3】図2A~2G。図2A~2Cは、PL₄およびDNA-PL₄コア足場、ならびにLC HDL NP集合体に関する合成スキームを示す。図2Dは、質量%(%)によって、天然および合成HDLの組成を示す。*Au HDL NP組成は、以前に公開したデータセットから報告される¹⁸。図2Eは、LC HDL NPおよびヒトHDLに関する円偏光二色性スペクトルを示す。図2Fは、それらのコア材料において変動する天然および合成HDL種の模式図を示す。図2Gは、98,000×倍率でのDNA-PL₄ HDL NP(9マーDNA)のTEM画像を示す。スケールバー=50nm。

20

【図2-4】図2A~2G。図2A~2Cは、PL₄およびDNA-PL₄コア足場、ならびにLC HDL NP集合体に関する合成スキームを示す。図2Dは、質量%(%)によって、天然および合成HDLの組成を示す。*Au HDL NP組成は、以前に公開したデータセットから報告される¹⁸。図2Eは、LC HDL NPおよびヒトHDLに関する円偏光二色性スペクトルを示す。図2Fは、それらのコア材料において変動する天然および合成HDL種の模式図を示す。図2Gは、98,000×倍率でのDNA-PL₄ HDL NP(9マーDNA)のTEM画像を示す。スケールバー=50nm。

30

【0037】

【図3】図3A~3D。図3Aは、cAMP処理J774マクロファージからのLC HDL NP流出H³-cholを示す。図3Bは、タンデム流出-流入アッセイ(tandem efflux-influx assay)からの全ての画分におけるH³-cholの定量を示す。図3Cは、タンデムアッセイにおける肝細胞へのコレステロールのパーセント(%)流入を示す。図3Dは、SR-B1依存性コレステロール流出を示す。統計的有意性を、両側スチューデントt検定を使用して決定した。* * p < 0.01。* * * p < 0.001。

40

【0038】

【図4-1】図4。LC HDL NPは、フローサイトメトリー(図4A~4B)および共焦点顕微鏡検査法(図4C)を介する、30分間での肝細胞(HepG2)への蛍光コレステロール(NBD-chol)の迅速な送達を促進する。統計的有意性を、両側スチューデントt検定を使用して決定した。* p < 0.05。* * * p < 0.001。

【図4-2】図4。LC HDL NPは、フローサイトメトリー(図4A~4B)および共焦点顕微鏡検査法(図4C)を介する、30分間での肝細胞(HepG2)への蛍光コレステロール(NBD-chol)の迅速な送達を促進する。統計的有意性を、両側スチューデントt検定を使用して決定した。* p < 0.05。* * * p < 0.001。

50

【0039】

【図5】図5A～5B。図5Aは、LCATコレステロールエステル化アッセイにおいて遊離コレステロール(FC)およびコレステロールエステル(CE)の定量を示す。図5Bは、炎症促進性NF-kBシグナル伝達のLC-HDL-NP媒介性抑制を示す。統計的有意性を、両側スチューデントt検定を使用して決定した。 $*p < 0.05$ 。 $**p < 0.01$ 。

【0040】

【図6】図6は、CPGに対するテトラキス(4-アジドフェニル)メタンとアルキン官能化9マーDNAとのカップリング反応からの9-SMDH₄(配列番号1)の分析的RP-HPLCトレースを示す。そのトレースは、260nmに設定したダイオード検出器のシグナルである。挿入図は、純粋生成物のMALDI-ToFスペクトルを示す： $m/z = 12, 144$ (12, 144.1 理論値)。

10

【0041】

【図7】図7は、CPGに対するテトラキス(4-アジドフェニル)メタンとアルキン官能化18マーDNAとのカップリング反応からの18-SMDH₄(配列番号2)の分析的RP-HPLCトレースを示す。そのトレースは、260nmに設定したダイオード検出器のシグナルである。挿入図は、純粋生成物のMALDI-ToFスペクトルを示す： $m/z = 23, 264$ (23, 263.7 理論値)。

【0042】

【図8】図8は、粗製9-DNA-脂質(配列番号3)の半分取用RP-HPLCトレースを示す。そのトレースは、260nmに設定したダイオード検出器のシグナルである。33～42分での純粋9-DNA-脂質(配列番号3)を単離し、MALDI-ToFによって同定した(挿入図)： $m/z = 3, 340$ (3, 342.4 理論値)。

20

【0043】

【図9】図9は、粗製18-DNA-脂質(配列番号4)の半分取用RP-HPLCトレースを示す。そのトレースは、260nmに設定したダイオード検出器のシグナルである。38～45分での純粋18-DNA-脂質(配列番号4)を単離し、MALDI-ToFによって同定した(挿入図)： $m/z = 6, 115$ (6, 118.2 理論値)。

【0044】

【図10】図10は、9-SMDH₄(配列番号1)および18-SMDH₄(配列番号2)、ならびに9-DNA-脂質(配列番号3)結合体および18-DNA-脂質(配列番号4)結合体の変性PAGE-ゲル画像(15%, 7M尿素)を示す。上記ゲル実験を、1×TBE緩衝液中、180Vにおいて1時間行い、次いで、上記ゲルをSYBR Gold(Thermo Fisher Scientific, Inc., Grand Island, NY)で染色し、それらの写真を、Typhoon 9400(GE Healthcare, Pittsburgh, PA)を使用して撮影した。

30

【0045】

【図11-1】図11。PL₄合成スキーム。PL₄コア材料を、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-ジベンゾシクロオクチル(DBCOPE)と4個の末端アジドを有する四面体低分子コア(テトラキス(4-アジドフェニル)メタン)との銅フリークリックケミストリー結合体化によって合成した(図11)。代表的反応において、DBCOPEおよびテトラキス(4-アジドフェニル)メタンを各々、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF, Sigma Aldrich)中に0.1重量%で溶解し、DMF中、DBCOPE対テトラキス(4-アジドフェニル)メタンの10:1モル比で混合した。その反応混合物を、ボルテックスおよび浴超音波処理を交互にして3回供し、次いで、ボルテックス下で24時間、室温で反応させた。次いで、HPLCおよびエレクトロスプレーイオン化質量分析法(図12)を使用して、得られた反応混合物を特徴づけた。図12は、PL₄の正確な質量の単一種を示すのみであるので、本発明者らは、部分的にカップリングされた生成物(PL₃、PL₂など)が存在しないと結論づけ、その反応混合物を集合工程に使用する。その集合工程は、大過剰の

40

50

D P P C 脂質を添加することを要することから、上記集合におけるその使用の前に、その過剰な D B C O P E 分子を P L ₄ コアから除去する必要はない。

【図 1 1 - 2】図 1 1。P L ₄ 合成スキーム。P L ₄ コア材料を、1, 2 - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - ジベンゾシクロオクチル (D B C O P E) と 4 個の末端アジドを有する四面体低分子コア (テトラキス (4 - アジドフェニル) メタン) との銅フリークリックケミストリー結合体化によって合成した (図 1 1)。代表的反応において、D B C O P E およびテトラキス (4 - アジドフェニル) メタンを各々、N, N - ジメチルホルムアミド (D M F , S i g m a A l d r i c h) 中に 0 . 1 重量%で溶解し、D M F 中、D B C O P E 対 テトラキス (4 - アジドフェニル) メタンの 1 0 : 1 モル比で混合した。その反応混合物を、ボルテックスおよび浴超音波処理を交互にして 3 回供し、次いで、ボルテックス下で 2 4 時間、室温で反応させた。次いで、H P L C およびエレクトロスプレーイオン化質量分析法 (図 1 2) を使用して、得られた反応混合物を特徴づけた。図 1 2 は、P L ₄ の正確な質量の単一種を示すのみであるので、本発明者らは、部分的にカップリングされた生成物 (P L ₃、P L ₂ など) が存在しないと結論づけ、その反応混合物を集合工程に使用する。その集合工程は、大過剰の D P P C 脂質を添加することを要することから、上記集合におけるその使用の前に、その過剰な D B C O P E 分子を P L ₄ コアから除去する必要はない。

【 0 0 4 6 】

【図 1 2】図 1 2 は、P L ₄ コアのエレクトロスプレーイオン化質量分析法を示す。生成物 m / z = 4 4 0 1 . 6 (理論値 : 4 4 0 1 . 7)。

【 0 0 4 7 】

【図 1 3】図 1 3 は、陰性染色 T E M を介する P L ₄ H D L N P の超微細構造特徴付けを示す。画像化を、F E I T e c n a i S p i r i t T E M で行った。挿入図 (右端のパネル) は、1 2 0 , 0 0 0 × 倍率である。各画像に表示したスケールバーは、5 0 ~ 2 0 0 n m である。T E M 直径を、I m a g e J ソフトウェアを使用して、> 5 0 粒子の測定によって 1 0 ± 2 n m であることを決定した。

【 0 0 4 8 】

【図 1 4】図 1 4 は、1 8 マー DNA - P L ₄ 足場を使用する集合試行の超微細構造特徴付けを示す。

【 0 0 4 9 】

【図 1 5】図 1 5 は、コア + D P P C、a p o A - 1 なし (上の列 : DNA - P L ₄ コア + D P P C ; 下の列 : P L ₄ コア + D P P C) の T E M 画像化を示す。注 : コア + タンパク質なしの D P P C コントロールサンプルの適切な可視化は、タンパク質含有サンプル (2 0 秒間の染色) と比較して、より長時間 (1 5 分間の染色) の酢酸ウラニル染色を要した。

【 0 0 5 0 】

【図 1 6】図 1 6。L C H D L N P 集合体および a p o A - 1 オリゴマー化プロフィールの特徴付け。a p o A - 1 は、P L ₄ および DNA - P L ₄ 粒子の両方に関して、脂質結合体コア足場での集合の際に、より高次のオリゴマー化状態をとる。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 5 1 】

発明の詳細な説明

高密度リポタンパク質 (H D L) は、コレステロールを運び、特定の細胞タイプを標的化し、そして多くの疾患プロセスにおいて重要な役割を果たす天然の循環するナノ粒子である。結果として、合成 H D L 模倣物は、有望な治療剤になった。しかし、今日までのアプローチは、最も存在量が豊富な H D L 種であり、特定の臨床上重要である球状 H D L の重要な特徴を再現することができなかった。

【 0 0 5 2 】

天然 H D L は、コレステロールを輸送し、がんおよび心血管疾患において重要な役割を果たす、循環するナノ粒子 (直径約 8 ~ 1 3 n m) である。球状 H D L は、最も存在量が

10

20

30

40

50

豊富なHDLの亜種であり、臨床上特に重要である。しかし、以前のHDL模倣物は、無機性のテンプレート材料（例えば、金ナノ粒子）に依拠なしでは球状HDL（例えば、球状HDLコンホメーション）の特徴を再現できなかった。本明細書では、予測外にも、球状HDLコンホメーションが、脂質結合体化有機性コア足場を有するHDL様ナノ粒子において達成され得ることを見出した。本開示のこれらHDL様ナノ粒子は、今までに類を見ない、すなわち、ソフトマテリアルコアを有する球状HDL模倣物である。

【0053】

本開示のHDL様ナノ粒子は、新規な脂質結合体化有機性コア足場を使用して、球状HDL種を模倣する。上記コア設計モチーフは、いくつかの実施形態においておよそ10nm直径であり、それらのサイズ、形状、表面の化学的性質、組成およびタンパク質二次構造においてヒトHDLと似ているソフトコアナノ粒子の集合を促進するために、リン脂質幾何形状を制限しかつ方向付ける。上記HDL様ナノ粒子は、サイズ（約10nm）、表面の化学的性質（-20mV 電位）、および円偏光二色性によって決定される場合、HDLタンパク質二次構造に関して、天然のHDLの構造を模倣する。合成HDLは、適応症の中でも、心血管疾患およびがんの治療として有望であると示されている。顕著なHDL機能を再現するために必要とされる合成HDL模倣物の主な特徴のうちの2つは、1）ソフトマテリアルコア、および2）球状コンホメーションである。本開示のHDL様ナノ粒子は、以前の合成プラットフォーム（これらはいずれも、上記で注記される特徴の両方を再現しない）と比較した場合、優れた治療有効性を可能にするように設計される。

【0054】

高密度リポタンパク質（HDL）は、血液中で循環し、コレステロールを輸送する動的ナノ粒子である。臨床上、上昇したHDLコレステロールレベルは、アテローム硬化性心血管疾患（ASCVD）の低減したリスクと関連する¹⁻²。細胞レベルでは、HDLは、マクロファージおよび肝細胞を標的化して、それぞれ、コレステロールを除去および送達し、これは、炎症およびアテローム硬化性の負荷を低減することが示されている³⁻⁴。HDLとASCVDとの間の有益な関連性、細胞特異的標的化特性、および標的化した薬物送達のためにHDLを使用するという策に起因して、非常な努力が、それらの天然の対応物に似たHDLを合成することに集中されている⁵。

【0055】

合成標的として働く多数のHDL種が、血液中に存在する。未成熟HDLは、コレステロールが少なく、形状が円板状であり、主に、HDLを規定するタンパク質である、アポリポタンパク質A-I（本明細書でapoA-I、apoA-1、および/またはアポリポタンパク質A-1ともいわれ得る）、およびリン脂質からなる。HDLの成熟形態（これはまた、apoA-Iおよびリン脂質の表面層を有する）は、コレステロールおよびコレステリルエステルが豊富であり、より球状の形状と想定される（図1）。球状HDLは、循環中のHDLの大部分を構成する⁶⁻⁷。しかし、治療として使用されるHDLの合成形態は、専ら未成熟円板状HDLに似ている⁸。これは主に、HDLのこれら組換え形態（rHDL）が、リン脂質およびapoA-Iを自己集合することによって比較的作製しやすいことが理由である⁸⁻¹²。rHDLを使用する臨床試験は、多少有望であることを示したが、より強かつ効果的な合成HDLを作製することに関して、改善の余地がかなりあることを明らかにしている¹⁰⁻¹²。

【0056】

球状HDL種は、低減したASCVDと最も相関する¹³。しかし、これらのHDLは、円板状HDLをコレステロール含有およびコレステリルエステル含有球状HDLへと成熟させるために必要とされる酵素による工程に起因して、より合成しがたい。以前の研究は、無機性ナノ粒子をテンプレートとして使用することによって、これらの生物学的成熟工程を回避しようと試みた¹⁴⁻¹⁶。そのテンプレートは、リン脂質およびapoA-Iで官能化され得、HDL模倣物のサイズを<15nm直径へと成功裡に制限し得る¹⁷。しかし、これらの材料は、天然球状HDL、すなわち、コレステロールおよびコレステリルエステルを動的に搭載する（loading）および降ろす（off-loading）

10

20

30

40

50

) ことができる強いソフトマテリアルコアの極めて重要な特徴を再現しない。無機性テンプレート材料とは別に、ソフトコア円板状HDL様粒子はまた、両親媒性ペプチドを使用して合成されている²²。

【0057】

本明細書では、脂質結合体化コア足場を使用するHDL模倣ナノ粒子(LC HDL NP)の合成が、2工程プロセスにおいて達成される：第1に、上記コア足場を合成および精製する；第2に、上記粒子を、上記コア足場、遊離リン脂質、および上記HDLを規定するタンパク質であるアポリボタンパク質A1(apo-A1)の超分子集合を介して製作する。種々の脂質結合体化有機性コアは、理論的には、粒子集合のために使用され得る。本明細書では、3つの異なる有機性コア足場を使用する成功裡の粒子製作を示す。具体的には、四面体低分子-リン脂質ハイブリッド(PL₄といわれる)および2つの異なる長さの四面体ssDNA-リン脂質-低分子ハイブリッド(DNA-PL₄といわれる)が使用される。

10

【0058】

本開示は、脂質結合体化コア足場を使用する成熟ヒトHDL(LC HDL NP)の構造および機能的特性を有する球状HDL様ナノ粒子の合成のための方法を提供する。サイズおよび組成において変動するが、同じ四面体幾何形状の3つの有機性足場を、調査した。第1の足場は、銅フリークリックケミストリーを使用して合成した高度に疎水性の低分子-リン脂質結合体(PL₄)である。具体的には、環ひずみアルキンを有するヘッド基改変リン脂質、1,2-ジバルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-ジベンゾシクロオクチルを、テトラキス(4-アジドフェニル)メタン(4個の末端アジドを有する低分子(SM-Az₄))にクリックカップリングした(図2Aおよび図11~12)。PL₄コアとは対照的に、第2の(9-DNA-PL₄)および第3の(18-DNA-PL₄)コア足場は、異なるDNAリンカー長(9マー対18マーのdsDNA)を有する両親媒性DNA連結PL₄コアである(図2B)。親水性DNAリンカーは、水性溶液中での上記コアの溶解度を増強する一方で、外側に向けたリン脂質テール基は、apoA-1およびリン脂質との疎水性相互作用を可能にする。これらのコアのサイズは、異なる長さのDNAリンカーを組み込むことによって容易に調節され得る。DNA-PL₄コアを、2工程様式で合成した(本明細書中の合成の節を参照のこと)。第1に、DNA-リン脂質結合体(ssDNA-PL)、および四面体低分子-DNAハイブリッド(SMDH₄)を合成した(表2)。第2に、塩基対合される相補的な配列を有するssDNA-PLおよびSMDH₄を、ハイブリダイズさせて、最終のDNA-PL₄コアを得た(図2Bおよび図6~9)。

20

30

【0059】

新生HDLが球状HDLへと成熟する機構は、遊離コレステロールの酵素によるエステル化(酵素、レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ(LCAT)によって血液中で行われる反応)を支持することによる。本明細書では、PL₄およびDNA-PL₄ HDL NPの両方が、LCAT媒介性エステル化を支持し得ることを見出した(図5A)。しかし、PL₄ HDL NPは、結合したコレステロールのうちの87%をコレステリルエステルへと変換する、Au HDL NPおよびDNA-PL₄ HDL NPを超える、実質的により大きいエステル化能を示した。この結果は、コレステリルエステルの効率的充填を可能にする、金(Au)およびDNA-PL₄コアを超えるPL₄コアの増大した可撓性および疎水性に起因するようである。

40

【0060】

本明細書で使用される場合、用語「HDL様(HDL-like)」、「HDL模倣物(HDL-mimetic)」および「HDL模倣物(HDL mimic)」とは、合成HDL-NPをいうために交換可能に使用される。

【0061】

いくつかの局面において、本開示は、コアおよび上記コアを取り囲みかつそれに付着したシェルを含み、ここで上記コアは、脂質結合体化有機性コア足場を含む球状高密度リポ

50

タンパク質ナノ粒子 (HDL-NP) を提供する。上記シェルは、図 1 に模式的に示されるように、上記有機性コア足場の構成要素に、1 またはこれより多くの点において連結されている脂質シェルであり得る。いくつかの実施形態において、上記シェルは、脂質二重層または単層である。

【0062】

実施形態の 1 セットにおいて、本明細書に記載される構造体またはその一部 (例えば、構造体のシェル) は、1 またはこれより多くの天然または合成の脂質または脂質アナログ (すなわち、親油性分子) を含む。1 またはこれより多くの脂質および/または脂質アナログは、単一層または多数層 (例えば、二重層) の構造を形成し得る。多数層が形成されるいくつかの場合には、上記天然または合成の脂質または脂質アナログは、(例えば、異なる層間で) 互いに組み合わさる (interdigitate)。天然または合成の脂質または脂質アナログの非限定的な例としては、脂肪酸アシル、グリセロ脂質、グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、サッカロ脂質およびポリケチド (ケトアシルサブユニットの縮合から得られる)、ならびにステロール脂質およびプレノール脂質 (イソプレノサブユニットの縮合から得られる) が挙げられる。

【0063】

実施形態の 1 つの特定のセットにおいて、本明細書に記載される構造体は、1 またはこれより多くのリン脂質を含む。上記 1 またはこれより多くのリン脂質としては、例えば、ホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール、レシチン、 α -ジパルミトイル- α -レシチン、スフィンゴミエリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、N-(2,3-ジ(9-(Z)-オクタデセニルオキシ))-プロパ-1-イル-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド、ホスファチジルエタノールアミン、リゾレシチン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、セファリン、カルジオリピン、セレプロシド、ジセチルホスフェート、ジオレオイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール、ジオレオイルホスファチジルグリセロール、パルミトイル-オレオイル-ホスファチジルコリン、ジ-ステアロイル-ホスファチジルコリン、ステアロイル-パルミトイル-ホスファチジルコリン、ジ-パルミトイル-ホスファチジルエタノールアミン、ジ-ステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン、ジ-ミリストイル-ホスファチジルセリン、ジ-オレイル-ホスファチジルコリン、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホチオエタノール、およびこれらの組み合わせが挙げられ得る。いくつかの場合には、構造体のシェル (例えば、二重層) は、50~200 の天然または合成の脂質または脂質アナログ (例えば、リン脂質) を含む。例えば、上記シェルは、例えば、構造体のサイズに依存して、約 500 未満、約 400 未満、約 300 未満、約 200 未満、または約 100 未満の天然または合成の脂質または脂質アナログ (例えば、リン脂質) を含み得る。

【0064】

非リン含有脂質がまた、使用され得る (例えば、ステアリルアミン、ドデシルアミン (docetylamine)、アセチルパルミテート、および脂肪酸アミド)。他の実施形態において、他の脂質 (例えば、脂肪)、油、ワックス、コレステロール、ステロール、脂溶性ビタミン (例えば、ビタミン A、D、E および K)、グリセリド (例えば、モノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリド) は、本明細書に記載される構造体の一部を形成するために使用され得る。

【0065】

本明細書に記載される構造体の一部 (例えば、シェルまたはナノ構造の表面) は、その構造体に疎水性を必要に応じて付与する 1 またはこれより多くのアルキル基 (例えば、アルカン含有、アルケン含有、またはアルキン含有種) を必要に応じて含み得る。「アルキル」基とは、飽和脂肪族基であって、直鎖アルキル基、分枝鎖アルキル基、シクロアルキル (脂環式) 基、アルキル置換されたシクロアルキル基、およびシクロアルキル置換されたアルキル基を含むものに言及する。上記アルキル基は、種々の炭素数 (例えば、C₂~C₄₀の間) を有し得、いくつかの実施形態においては、C₅、C₁₀、C₁₅、C₂₀、C

10

20

30

40

50

25、C₃₀、またはC₃₅より多くてもよい。いくつかの実施形態において、直鎖または分枝鎖のアルキルは、その骨格の中に、30個またはこれより少ない炭素原子、およびいくつかの場合には、20個またはこれより少ない炭素原子を有し得る。いくつかの実施形態において、直鎖または分枝鎖のアルキルは、その骨格の中に、12個もしくはこれより少ない炭素原子（例えば、直鎖に関してはC₁~C₁₂、分枝鎖に関してはC₃~C₁₂）、6個もしくはこれより少ない、または4個もしくはこれより少ない炭素原子を有し得る。同様に、シクロアルキルは、それらの環構造の中に3~10個の炭素原子、またはその環構造の中に5個、6個もしくは7個の炭素を有し得る。アルキル基の例としては、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、シクロプロピル、ブチル、イソブチル、tert-ブチル、シクロブチル、ヘキシル、シクロヘキシルなどが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0066】

いくつかの実施形態において、本開示の球状HDL-NPは、アポリポタンパク質をさらに含む。上記アポリポタンパク質は、アポリポタンパク質A（例えば、apo A-I、apo A-II、apo A-IV、およびapo A-V）、アポリポタンパク質B（例えば、apo B48およびapo B100）、アポリポタンパク質C（例えば、apo C-I、apo C-II、apo C-III、およびapo C-IV）、ならびにアポリポタンパク質D、E、およびHであり得る。具体的には、apo A1、apo A2、およびapo Eは、コレステロールおよびコレステリルエステルを代謝のために肝臓へと移動させることを促進し、本明細書に記載される構造体の中に含めるために有用であり得る。さらにまたは代わりに、本明細書に記載される構造体は、アポリポタンパク質（例えば、上記に記載されるもの）の1またはこれより多くのペプチドアナログを含み得る。当然のことながら、他のタンパク質（例えば、非アポリポタンパク質）がまた、本明細書に記載されるナノ構造体の中に含められ得る。いくつかの実施形態において、上記アポリポタンパク質は、アポリポタンパク質A-Iである。

20

【0067】

上記HDL-NPは、有機性コア足場を有する。有機性コア足場は、本明細書で使用される場合、3次元構造、および球状の形状において脂質層を組織化しかつ保持するために十分な電荷を有する非金属製材料のソフトコアに言及する。本明細書における「球状の」形状または構造は、丸いまたは球状様の構造を有する構造体に言及する。その構造は、完全に丸いまたは正確な球である必要はないが、むしろおよそ球状の形状である。

30

【0068】

いくつかの実施形態において、上記有機性コア足場は、疎水性低分子-リン脂質結合体(PL₄)を含む。上記疎水性低分子-リン脂質結合体は、リン脂質に連結され得る任意の低分子を含む。いくつかの実施形態において、上記低分子は、テトラキス(4-アジドフェニル)メタンである。

【0069】

いくつかの実施形態において、上記リン脂質は、ヘッド基改変リン脂質であり得る。いくつかの実施形態において、上記ヘッド基改変リン脂質は、環ひずみアルキン、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-ジベンゾシクロオクチルを含む。

40

【0070】

上記低分子は、上記リン脂質に直接連結されてもよいし、官能基の使用を介して連結されてもよい。上記官能基は、上記リン脂質を上記低分子に官能化するために使用され得る任意の適切な末端基を含み得る（例えば、アミノ基（例えば、不飽和または飽和アミン）、アミド基、アジド、イミン基、カルボキシル基、またはスルフェート基）。場合によっては、上記官能基は、少なくとも第2の末端基を含む。他の実施形態において、上記第2の末端基は、別の官能基に共有結合し得る反応性の基であり得る。いくつかの実施形態において、上記リン脂質は、複数の末端官能基を有する低分子にカップリングされる。いくつかの実施形態において、上記複数の官能基は、2~6個の官能基である。いくつかの実

50

施形態において、上記複数の官能基は、4個の官能基である。いくつかの実施形態において、上記官能基は、末端アジドである (SM-Az)。

【0071】

他の実施形態において、上記有機性コア足場は、両親媒性DNA連結低分子-リン脂質結合体 (DNA-PL₄) を含む。上記DNA (または任意の他の核酸 (改変されたおよび天然に存在する核酸を含む)) は、上記リン脂質と低分子との間に特有の連結を提供する。DNAを使用することは有利である。なぜなら上記DNAのサイズ、および従って、上記コアは、上記DNA鎖の長さを変更することによって容易に制御され得るからである。いくつかの実施形態において、上記DNAは、5~50ヌクレオチド長である。他の実施形態において、上記DNAは、5~45、5~40、5~35、5~30、5~25、5~20、5~17、5~16、5~15、5~14、5~13、5~12、5~11、5~10、5~9、5~8、5~7、6~45、6~40、6~35、6~30、6~25、6~20、6~17、6~16、6~15、6~14、6~13、6~12、6~11、6~10、6~9、6~8、6~7、7~45、7~40、7~35、7~30、7~25、7~20、7~17、7~16、7~15、7~14、7~13、7~12、7~11、7~10、7~9、7~8、8~45、8~40、8~35、8~30、8~25、8~20、8~17、8~16、8~15、8~14、8~13、8~12、8~11、8~10、8~9、9~45、9~40、9~35、9~30、9~25、9~20、9~17、9~16、9~15、9~14、9~13、9~12、9~11、または9~10ヌクレオチド長である。

10

20

【0072】

いくつかの実施形態において、上記DNAは、2本鎖オリゴヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、上記DNAは、8~15ヌクレオチド長の2本鎖オリゴヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、上記DNAは、9ヌクレオチド長の2本鎖オリゴヌクレオチドである。

【0073】

いくつかの実施形態において、上記2本鎖DNAの第1の1本鎖は、リン脂質に連結され、ssDNA-リン脂質結合体 (ssDNA-PL) を形成する。いくつかの実施形態において、上記2本鎖DNAの第1鎖に相補的な上記2本鎖DNAの第2鎖は、低分子に連結される。いくつかの実施形態において、上記低分子は、四面体低分子であり、上記DNAに連結された低分子は、四面体低分子-DNAハイブリッド (SMDH₄) を形成する。いくつかの実施形態において、上記SMDH₄は、DNAの相補的な1本鎖の間での水素結合を介して上記ssDNA-PLに連結される。

30

【0074】

いくつかの実施形態において、上記球状HDL-NPは、上記HDL-NPに連結された治療剤をさらに含む。いくつかの実施形態において、上記治療剤は、治療用核酸である。いくつかの実施形態において、上記治療剤は、抗がん剤である。いくつかの実施形態において、上記抗がん剤は、化学療法剤である。いくつかの実施形態において、上記治療剤は、抗炎症剤である。

【0075】

治療用核酸は、例えば、ポリヌクレオチド、DNA配列、治療用タンパク質をコードするDNA配列、RNA配列、低分子干渉RNA (siRNA)、mRNA、ショートヘアピンRNA (shRNA)、マイクロRNA (miRNA)、アンチセンスオリゴヌクレオチド、三重鎖DNA、プラスミドDNA (pDNA) またはこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない任意の核酸を含み得る。いくつかの実施形態において、治療用核酸は、処理されてもよいし、化学的に改変されてもよい。例えば、治療用核酸は、ホスホジエステル結合以外のヌクレオチド間連結を含み得る (例えば、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、メチルホスホジエステル、ホスホロジチオエート、ホスホルアミデート、ホスホトリエステル、またはホスフェートエステル連結)。これらのヌクレオチド間連結は、いくつかの実施形態において、増大した安定性を付与し得る。核酸安定

40

50

性はまた、3'-デオキシチミジンまたは2'-置換されたヌクレオチド（例えば、アルキル基で置換される）を、合成の間に核酸に組み込むことによって、または上記核酸をフェニルイソウレア（phenylisourea）誘導体として提供することによって、または他の分子（例えば、アミノアクリジンまたはポリリジン）を上記核酸の3'末端に連結させることによって、増大され得る。RNAおよび/またはDNAの改変は、オリゴヌクレオチド全体に、または核酸の選択された領域、例えば、5'および/または3'末端に存在し得る（例えば、メチル化による）。

【0076】

ある特定の実施形態において、上記抗がん剤は化学療法剤（例えば、パクリタキセル、シスプラチン、カルボプラチン、トポテカン（Topotecan）およびドキシソルピシン）である。

10

【0077】

一局面において、本開示は、2~6個の末端アジドを有する四面体低分子コア（テトラキス（4-アジドフェニル）メタン）に連結された1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-ジベンゾシクロオクチル（DBCOPE）を含む有機性コア足場に関する。いくつかの実施形態において、上記構造は、4個の末端アジドを有する。

【0078】

本開示のHDL-NPのサイズ、物理的特性および機能的特性は、天然に存在するHDL-NPのものに類似であり、他の合成HDL-NPとは異なる。これらの特性としては、例えば、球状の形状、表面の化学的性質、サイズ、流体力学的直径、電位、コレステロール流出、コレステロール送達、および治療上の機能（例えば、炎症の抑制）が挙げられる。

20

【0079】

いくつかの実施形態において、本開示の球状HDL-NPは、流体力学的直径に基づいて評価され得る。上記球状HDL-NPの流体力学的直径は、天然に存在するHDL-NPのものに類似であり、他の合成HDL-NPとは異なる。流体力学的直径は、測定されている粒子のものと同一様式で拡散する仮定の硬い球のサイズを評価し、動的な水和した/溶媒和した粒子の見かけ上のサイズを示す粒子の拡散特性の指標を提供する。それは、動的光散乱（DLS）によって測定され得る。いくつかの実施形態において、上記流体力学的直径は、8.7nmより大きい。いくつかの実施形態において、上記流体力学的直径は、8.7nm~17.7nmである。いくつかの実施形態において、上記流体力学的直径は、10nm~15nmである。いくつかの実施形態において、上記流体力学的直径は、12nm~14nmである。

30

【0080】

本開示の球状HDL様ナノ粒子は、例えば、約500nm未満もしくはこれに等しい、約250nm未満もしくはこれに等しい、約100nm未満もしくはこれに等しい、約75nm未満もしくはこれに等しい、約50nm未満もしくはこれに等しい、約40nm未満もしくはこれに等しい、約35nm未満もしくはこれに等しい、約30nm未満もしくはこれに等しい、約25nm未満もしくはこれに等しい、約20nm未満もしくはこれに等しい、約15nm未満もしくはこれに等しい、または約5nm未満もしくはこれに等しい、最大断面寸法（または、ときおり、最小断面寸法）を有する直径を有し得る。いくつかの実施形態において、上記球状HDL-NPは、約5~30nm、5~25nm、5~22nm、5~20nm、5~15nm、5~14nm、5~13nm、5~12nm、5~11nm、5~10nm、8~15nm、8~14nm、8~13nm、8~12nm、8~11nm、8~10nm、10~12nm、または10nmの直径を有する。

40

【0081】

本開示のHDL様ナノ粒子は、例えば、約300nm未満もしくはこれに等しい、約250nm未満もしくはこれに等しい、約100nm未満もしくはこれに等しい、約75nm未満もしくはこれに等しい、約50nm未満もしくはこれに等しい、約40nm未満も

50

しくはこれに等しい、約35nm未満もしくはこれに等しい、約30nm未満もしくはこれに等しい、約25nm未満もしくはこれに等しい、約20nm未満もしくはこれに等しい、約15nm未満もしくはこれに等しい、または約5nm未満もしくはこれに等しい、最大断面寸法（または、ときおり、最小断面寸法）を有するコアを有し得る。いくつかの場合には、上記コアは、約1:1より大きい、3:1より大きい、または5:1より大きいアスペクト比を有する。本明細書で使用される場合、「アスペクト比」とは、長さおよび幅が互いに対して垂直で測定され、その長さは、最長の直線的に測定される寸法をいう場合の長さまたは幅の比に言及する。

【0082】

いくつかの実施形態において、上記シェルは、無機性コアを有する合成HDLナノ粒子よりヒトHDLに近い電位を有する。いくつかの実施形態において、上記球状HDL-NPは、金コアを有する合成HDLナノ粒子よりヒトHDLに近い電位を有する。いくつかの実施形態において、上記球状HDL-NPは、-16~26mVの電位を有する。いくつかの実施形態において、上記HDL様ナノ粒子の電位は、約-20ミリボルト(mV)である。いくつかの実施形態において、上記HDL様ナノ粒子の電位は、-10mV、-12mV、-14mV、-16mV、-18mV、-20mV、-22mV、-24mV、-26mV、および-30mVからなる群より選択される。いくつかの実施形態において、上記HDL様ナノ粒子の電位は、-20mVより大きい。いくつかの実施形態において、上記電位は、-20mV未満である。いくつかの実施形態において、上記電位は、ヒトHDLの電位である。電位は、本明細書で開示される方法を含め、当該分野で公知の方法を使用して評価され得る。

【0083】

いくつかの実施形態において、本開示のHDL様ナノ粒子は、ペプチドベースの足場材料を含まない。

【0084】

本開示の組成物および方法は、球状HDLの正規の合成の機能的模倣物に向かう、重要な前進を示す。本開示のHDL様ナノ粒子（合成粒子または合成HDL粒子またはHDL-NPともいわれる）は、マクロファージから（または脂質搭載マクロファージから）のコレステロール流出、肝細胞へのコレステロール送達、レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ活性の支持、および炎症の抑制を含む顕著なHDL機能を実行し得る。従って、いくつかの実施形態において、上記球状HDL-NPは、アポリポタンパク質または金コアを有する合成HDLナノ粒子のものより効率的なコレステロール輸送能を有する。コレステロール輸送能は、インビトロアッセイ（例えば、本明細書に記載されるアッセイ）を使用して評価され得る。上記コレステロール輸送能は、コレステロール輸送の標準的な公知の値に対して、または金コアを有する合成HDL-NP粒子もしくはAPO-A1のような陰性コントロールに対して、または天然に存在するHDL-NPのような陽性コントロールに対して、評価され得る。

【0085】

従って、本開示の組成物および方法は、がん治療、炎症性疾患、心血管疾患治療、骨疾患治療、および免疫疾患治療が挙げられるが、これらに限定されない適用において使用され得る。

【0086】

治療としての合成HDLの使用は、非常に有望である。以前のまたは現場で進行中の臨床試験は、再構成されたHDLが、ヒトにおいて安全に注射され得ることを示しており、心血管疾患の状況において、それほど重要ではない臨床上の利益を示している。しかし、より強力な効果を発揮し得る合成HDLの新規なアプローチが必要である。本開示のHDL様ナノ粒子は、球状HDLのソフトコア模倣物を含むそれらの新規な要素に起因して、クリニックにおいて合成HDLの実質的に増強された治療効果の強力な候補を示す。

【0087】

マクロファージNF-kB活性によって促進される炎症は、疾患進行を駆動し、罹病率

10

20

30

40

50

および死亡率を増大させるASCVDの特質である。本明細書では、LC HDL NPが炎症を低減する能力を評価するために、ヒト単球レポーター細胞株(THP1-Dual)を、リポポリサッカリドで処理して、LC HDL NPまたはapoA-1コントロールでの処理の前に、NF-kB活性を刺激した。apoA-1単独は、NF-kB活性を低減する能力を示さなかったが、PL₄ HDL NPおよびDNA-PL₄ HDL NPは両方とも、用量依存性様式において、150 nMのタンパク質濃度でNF-kB活性をそれぞれ31%および16%低減した(図5B)。

【0088】

いくつかの局面において、本発明は、心血管疾患を処置するための方法である。心血管疾患は、血管内皮細胞機能不全であり、ある特定の症状が始まる(従来のようにまたは上記のように、心臓および血管系に、アテローム性動脈硬化症、高血圧症、ゴジヒョル(gojihyol)、冠動脈性心疾患(心臓発作)、脳血管疾患(脳卒中、認知症)、末梢血管疾患、不整脈、心不全、うっ血性心疾患、心疾患が挙げられ、少なくとも心臓および血管の名称に関して、それらが挙げられるが、限定されない)。心血管疾患の主要因子のうちのいくつかとしては、遺伝的因子、生活習慣、および糖尿病の合併症が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0089】

アテローム性動脈硬化症は、心筋に酸素の豊富な血液を供給する動脈が、コレステロールが豊富なプラークで次第に狭くなる機構である。これらのプラークは成長し、時間を経て硬くなり、血流を低減し、破れ、心臓発作を引き起こす。冠状動脈を支え、開いたままにしておく介入(例えば、血管形成術および金属ステント)は、非常に一般的である。これらの治療に伴う1つの極めて重大な問題は、新生内膜過形成(それによって、平滑筋細胞は、ステント中で増殖し、血管を再び狭くする(すなわち、再狭窄))といわれる血管リモデリングに起因する不全である。細胞増殖を防止する薬物でコーティングされている薬物溶出性ステント(DES)は、平滑筋細胞の増殖を制限することによって血管再狭窄を低減する;しかし、その薬物は、血管を天然に裏打ちし、血餅形成を防止する内皮細胞の増殖をも阻害する。患者は、強力な薬物療法を継続したまま、血餅を防止しなければならず、生命を脅かす出血性の合併症に罹りやすくする。

20

【0090】

本発明は、血管介入の成功率を改善する、およびアテローム硬化性プラークの破れによって引き起こされる長期の損傷を低減することにおいて非常な価値を有する。本明細書で使用される場合、心血管疾患としては、動脈硬化症、冠動脈性心疾患、虚血、内皮機能不全、特に、血管弾性に影響を及ぼす機能不全、再狭窄、血栓症、アンギナ、高血圧症、心筋症、高血圧性心疾患、心不全、肺性心、心律動異常、心内膜炎、炎症性心肥大、心筋炎、心筋梗塞、心臓弁膜症、脳卒中および脳血管疾患、大動脈弁狭窄、うっ血性心不全、および末梢動脈疾患が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0091】

いくつかの実施形態において、本発明の組成物は、心血管疾患と診断されたかまたはそのリスクにある被験体において、心血管パラメータを正常範囲へと回復および/または改善する。心血管パラメータの正常範囲としては、約65~240 mLの拡張終期容積(EDV)、約16~143 mLの収縮終期容積(ESV)、約55~100 mLの1回拍出量、約55~70%の駆出率、約60~100 bpmの心拍数、および/または約4.0~8.0 L/分の心拍出量が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0092】

他の局面において、炎症性障害を有する被験体に、コアおよび上記コアを取り囲みかつそれに付着したシェルを含み、ここで上記コアは、脂質結合体化有機性コア足場を含む球状高密度リポタンパク質ナノ粒子(HDL-NP)を、上記炎症性障害を処置するために有効な量で投与することによる、炎症性障害を処置する方法が提供される。

【0093】

本発明の組成物はまた、炎症性疾患を処置するために使用され得る。炎症性疾患の例と

50

しては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：尋常性ざ瘡、喘息、自己免疫疾患（例えば、急性播種性脳脊髄炎（A D E M）、アジソン病、無ガンマグロブリン血症、円形脱毛症、筋萎縮性側索硬化症、強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群、抗合成酵素症候群、アトピー性アレルギー、アトピー性皮膚炎、自己免疫再生不良性貧血、自己免疫性心筋症、自己免疫性腸症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性内耳疾患、自己免疫性リンパ球増殖症候群、自己免疫性末梢ニューロパシー、自己免疫性膀胱炎、自己免疫性多内分泌腺症候群（autoimmunepolyendocrine syndrome）、自己免疫性プロゲステロン皮膚炎、自己免疫性血小板減少性紫斑病、自己免疫性じんま疹、自己免疫性ぶどう膜炎、バロー同心円硬化症（Balo concentricsclerosis）、ベーチェット病、バージャー病、ビッカースタッフ脳炎（Bickerstaff's encephalitis）
10
、ブラウ症候群、水疱性類天疱瘡、キャッスルマン病、セリアック病、シャーガス病、慢性炎症性脱髄性多発神経炎、慢性再発性多病巣性骨髄炎、慢性閉塞性肺疾患、チャーク-ストラウス症候群、癬痕性類天疱瘡、コーガン症候群、寒冷凝集素症、補体成分2欠損症、接触性皮膚炎、頭蓋動脈炎、CREST症候群、クローン病、クッシング症候群、皮膚白血病破砕性血管炎、デゴス病、ダーカム病、ヘルペス状皮膚炎、皮膚筋炎、1型糖尿病、びまん性皮膚強皮症、ドレスラー症候群、薬物誘導性ループス、円板状エリテマトーデス、湿疹、子宮内膜症、腱付着部炎関連関節炎、好酸球性筋膜炎、好酸球性胃腸炎、後天性表皮水疱症、結節性紅斑、胎児赤芽球症、本態性混合型クリオグロブリン血症、エバンス症候群、進行性骨化性線維形成異常、線維化肺胞炎、胃炎、消化管の類天疱瘡（gastrointestinal pemphigoid）、巨細胞性動脈炎、糸球体腎炎、
20
グッドパスチャー症候群、グレープス病、ギラン・バレー症候群、橋本脳症、橋本甲状腺炎、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、妊娠性疱疹、化膿性汗腺炎、ヒューズ-ストーヴィン症候群、低ガンマグロブリン血症、特発性炎症性脱髄疾患、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病、IgA腎症、封入体筋炎、慢性炎症性脱髄性多発神経炎、間質性膀胱炎、若年性特発性関節炎、川崎病、ランバート・イートン筋無力症候群、白血球破砕性血管炎、扁平苔癬、硬化性苔癬、線状IgA病、全身性エリテマトーデス、マジード症候群、メニエール病、顕微鏡的多発血管炎、混合性結合組織病、限局性強皮症、ムーカ・ハーベルマン病、重症筋無力症、筋炎、ナルコレプシー、視神経脊髄炎、神経性筋緊張病、眼癬痕性類天疱瘡、眼球クローヌスミオクローヌス症候群、オード甲状腺炎、回帰性リウマチ、PANDAS、傍腫瘍性小脳変性症、発作性夜間ヘモグロビン尿症、パリー・ロンベルグ症候群、パーソネージ・ターナー症候群、毛様体扁平部炎、尋常性天疱瘡、悪性貧血、静脈周囲脳脊髄炎、POEMS症候群、結節性多発動脈炎、リウマチ性多発筋痛、多発性筋炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、進行性炎症性ニューロパチー、乾癬性関節炎、壊疽性膿皮症、赤芽球癆、ラスムッセン脳炎、レイノー現象、再発性多発軟骨炎、ライター症候群、下肢静止不能症候群、後腹膜線維症、リウマチ熱、シュニッツラー症候群、強膜炎、強皮症、血清病、シェーグレン症候群、脊椎関節症、全身硬直症候群、亜急性細菌性心内膜炎、スザック症候群、スイート症候群、交感性眼炎、高安動脈炎、側頭動脈炎、血小板減少症、トロサ・ハント症候群、横断性脊髄炎、潰瘍性大腸炎、未分化型結合組織病、未分化型脊椎関節症、白斑、およびウェジナー肉芽腫症、セリアック病、慢性前立腺炎、糸球体腎炎、過敏症、炎症性腸疾患、骨盤腹膜炎、再灌流傷害、関節リウマチ、サルコイドーシス、移植片拒絶、血管炎、間質性膀胱炎、および変形性関節症。
40

【0094】

他の局面において、本発明は、がんを処置するための方法であって、上記方法は、がんを有する被験体に、コアおよび上記コアを取り囲みかつそれに付着したシェルを含み、ここで上記コアは、脂質結合体化有機性コア足場を含む球状高密度リポタンパク質ナノ粒子（HDL-NP）を、上記がんを処置するために有効な量で投与する工程を包含する方法である。

【0095】

本発明の組成物を使用して処置され得る他の状態は、がんを含む。がんは、調節されない細胞増殖、悪性腫瘍の形成、および身体の近い部分への侵襲によって概して特徴づけら

10

20

30

40

50

れる。がんはまた、リンパ系または血流を通じて、身体のみより遠隔部分へと拡がり得る。がんは、喫煙、ある特定の感染症、放射線、運動不足、肥満、および/または環境汚染物質に起因する遺伝子損傷の結果であり得る。がんはまた、細胞内の既存の遺伝的欠陥が遺伝に起因して疾患を引き起こす結果であり得る。任意の顕著な症状が出現する前にがんを検出するためにスクリーニングが使用されてもよいし、処置は、がんを発生させるリスクがより高い者（例えば、がんの家族歴を有する人々）に与えられてもよい。がんのスクリーニング技術の例としては、身体検査、血液または尿検査、医用画像化、および/または遺伝子検査が挙げられるが、これらに限定されない。がんの非限定的な例としては、膀胱がん、乳がん、結腸および直腸がん、子宮内膜がん、腎臓または腎細胞がん、白血病、肺がん、黒色腫、非ホジキンリンパ腫、膵臓がん、前立腺がん、卵巣がん、胃がん、消耗病、および甲状腺がんが挙げられる。

10

【0096】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるナノ構造体は、スカベンジャーレセプタークラスBタイプI (SR-BI) を発現または過剰発現するがんを処置するために有用である。SR-BI を発現または過剰発現するがんの非限定的な例としては、ヒト前立腺がん、乳がん、および腎細胞癌が挙げられる。SR-BI を過剰発現するがんおよびがん細胞株のさらなる非限定的な例は、Rajoraら、Front Pharmacol. (2016) 7:326に列挙される。本明細書に記載されるように、用語「過剰発現」または「増大した発現」とは、参照細胞（例えば、非がん細胞またはSR-BI を過剰発現しないがん細胞）と比較した場合、所定の細胞、細胞タイプまたは細胞状態において所定の遺伝子生成物の発現の増大したレベルに言及する。いくつかの実施形態において、上記がん細胞は、SR-BI の任意のレベルを発現する。

20

【0097】

上記ナノ構造体はまた、自己免疫疾患または障害を処置および防止するために有用である。自己免疫疾患または障害は、被験体自身の抗体が宿主組織と反応するか、または免疫エフェクターT細胞が、内因性自己ペプチドに対して自己反応性でありかつ組織の破壊を引き起こす疾患のクラスである。従って、免疫応答は、被験体自身の抗原（自己抗原といわれる）に対して高められる。自己免疫性疾患または障害としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：関節リウマチ、クローン病、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス (SLE)、自己免疫性脳脊髄炎、重症筋無力症 (MG)、橋本甲状腺炎、グッドパスチャー症候群、天疱瘡（例えば、尋常性天疱瘡）、グレーブス病、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少性紫斑病、抗コラーゲン抗体を伴う強皮症、混合性結合組織病、多発性筋炎、悪性貧血、特発性アジソン病、自己免疫関連不妊症、糸球体腎炎（例えば、半月体形成性糸球体腎炎、増殖性糸球体腎炎）、水疱性類天疱瘡、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性、および自己免疫性糖尿病。

30

【0098】

有効量を含む組成物は、予防的または治療的処置のために投与され得る。予防的適用において、組成物は、コレステロールの上昇したレベルと関連した障害、心血管疾患、過剰増殖性疾患（例えば、がん）、炎症性疾患、脂質異常症、およびコレステロールと関連する他の病的状態の発生に対する臨床的に決定された素因または増大した感受性を有する患者に投与され得る。本発明の組成物は、上記臨床的疾患の発生を遅らせる、低減する、または好ましくは防止するために十分な量で、患者（例えば、ヒト）に投与され得る。治療的適用において、組成物は、心血管疾患、過剰増殖性疾患（例えば、がん）、炎症性疾患、およびコレステロールと関連する他の病的状態に既に罹患している患者（例えば、ヒト）に、上記状態およびその合併症を治癒するか、またはその症状を少なくとも部分的に停止させるために十分な量で投与される。この目的を達成するために適した量は、疾患または医学的状态と関連するいくつかの症状を実質的に改善するために十分な化合物の量である、「治療上有効な用量として定義される。薬剤または組成物の治療上有効な量は、疾患または状態を治癒することは要求されないが、疾患または状態の発生が遅らされる、妨げられる、もしくは防止される、または上記疾患または状態の症状が改善される、上記疾患

40

50

もしくは状態の期間が変化する、または例えば、あまり重篤でない、または回復が個体において加速されるように、上記疾患または状態の処置を提供する。

【0099】

一局面において、本開示は、NF-κB活性を低減する方法であって、上記方法は、被験体に、有効量の、本開示の球状HDL-NPのうちのいずれかを含む組成物を投与する工程を包含する方法に関する。

【0100】

本明細書で使用される場合、「被験体」または「患者」とは、任意の哺乳動物（例えば、ヒト）に言及する。被験体または患者の例としては、ヒト、非ヒト霊長類、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコまたは齧歯類（例えば、マウス、ラット、ハムスター、またはモルモット）が挙げられる。概して、本発明は、ヒトでの使用に指向される。

10

【0101】

いくつかの実施形態において、本開示のHDL様ナノ粒子は、薬学的組成物中に存在する。これらの「薬学的組成物」または「薬学的に受容可能な」組成物は、1またはこれより多くの薬学的に受容可能なキャリア、添加剤、および/または希釈剤と一緒に製剤化された、本明細書に記載される構造体のうちの1またはこれより多くの治療上有効な量を含み得る。本明細書に記載される薬学的組成物は、敗血症または他の関連する疾患を処置するために有用であり得る。本明細書に記載される任意の適切な構造体が、図面に関連して記載されるものを含め、このような薬学的組成物において使用され得ることは、理解されるべきである。

20

【0102】

上記薬学的組成物は、以下のために適合されたものを含め、固体または液体形態での投与のために特別に製剤化され得る：経口投与、例えば、水薬（水性または非水性の液剤または懸濁剤）、錠剤（例えば、口内、舌下、および全身吸収のために標的化されるもの）、ポーラス、散剤、顆粒剤、舌への適用のためのパスタ剤；非経口投与、例えば、皮下、筋肉内、静脈内もしくは硬膜外注射による（例えば、滅菌液剤または懸濁剤として）、または徐放性製剤；局所投与、例えば、クリーム剤、軟膏剤、または放出制御パッチまたは皮膚、肺、もしくは口腔に適用されるスプレーとして；腔内もしくは直腸内に、例えば、ペッサリー、クリーム剤もしくはフォーム剤として；舌下に；眼に；経皮的に；または鼻に、肺および他の粘膜表面に。

30

【0103】

語句「薬学的に受容可能な」は、妥当な医学的判断の範囲内で、過度の毒性、刺激、アレルギー応答、または他の問題もしくは合併症なしに、ヒトおよび動物の組織と接触した状態での使用に適切であり、合理的な利益/リスク比と釣り合っている、それらの構造、材料、組成物、および/または投与形態に言及するために本明細書で使用される。

【0104】

語句「薬学的に受容可能なキャリア」とは、本明細書で使用される場合、本発明の化合物を1つの器官または身体の一部から、別の器官または身体の一部へと運ぶかまたは輸送することに関与する、薬学的に受容可能な材料、組成物またはビヒクル（例えば、液体または固体の充填剤、希釈剤、賦形剤、または材料を被包する溶媒）を意味する。各キャリアは、製剤の他の成分と適合性であり、かつ患者に対して有害でないという意味において「受容可能」でなければならない。薬学的に受容可能なキャリアとして働き得る材料のいくつかの例としては、以下が挙げられる：糖（例えば、ラクトース、グルコースおよびスクロース）；デンプン（例えば、コーンスターチおよびジャガイモデンプン）；セルロースおよびその誘導体（例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロースおよび酢酸セルロース）；粉末化トラガカント；モルト；ゼラチン；タルク；賦形剤（例えば、カカオ脂および坐剤用ワックス）；油（例えば、ラッカセイ油、綿実油、サフラワー油、ゴマ油、オリーブ油、コーン油およびダイズ油）；グリコール（例えば、プロピレングリコール）；ポリオール（例えば、グリセリン、ソルビトール、マンニトールおよびポリエチレングリコール）；エステル（例えば、オレイン酸エチルおよびラウリル酸エ

40

50

チル) ; アガー ; 緩衝化剤 (例えば、水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウム) ; アルギン酸 ; 発熱物質非含有水 ; 等張性食塩水 ; リンゲル液 ; エチルアルコール ; pH緩衝化溶液 ; ポリエステル、ポリカーボネートおよび/またはポリ無水物 ; ならびに薬学的製剤中で使用される他の非毒性適合性物質。

【0105】

湿潤剤、乳化剤および滑沢剤 (例えば、ラウリル硫酸ナトリウムおよびステアリン酸マグネシウム) ならびに着色剤、放出剤 (release agent)、コーティング剤、甘味剤、矯味矯臭剤および芳香剤、保存剤および抗酸化剤がまた、組成物中に存在し得る。

【0106】

薬学的に受容可能な抗酸化剤の例としては、以下が挙げられる : 水溶性抗酸化剤 (例えば、アスコルビン酸、システイン塩酸塩、硫酸水素ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなど) ; 油溶性抗酸化剤 (例えば、パルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシアニソール (BHA)、ブチル化ヒドロキシトルエン (BHT)、レシチン、没食子酸プロピル、 α -トコフェロールなど) ; および金属キレート剤 (例えば、クエン酸、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、ソルビトール、酒石酸、リン酸など)。

10

【0107】

本明細書で記載される構造体は、経口投与され得る、非経口投与され得る、皮下投与され得る、および/または静脈内投与され得る。ある特定の実施形態において、構造体および薬学的調製物は、経口投与される。他の実施形態において、上記構造体または薬学的調製物は、静脈内投与される。代替の投与経路としては、舌下投与、筋肉内投与および経皮的投与が挙げられる。

20

【0108】

一局面において、本開示は、球状高密度リポタンパク質ナノ粒子 (HDL-NP) を作製するための方法であって、上記方法は、ssDNA-リン脂質結合体 (ssDNA-PL) を調製する工程、四面体低分子-DNAハイブリッド (SMDH₄) を調製する工程であって、ここで上記ssDNA-PLおよびSMDH₄は、相補的DNA配列を有する工程、上記ssDNA-PLおよびSMDH₄を、上記相補的DNA配列が互いに塩基対合して、DNA-PLコアを形成するようにインキュベートする工程、ならびに上記DNA-PLコアにリン脂質リポソームおよびアポリタンパク質を添加して、上記球状HDL-NPを生成する工程、を包含する方法に関する。

30

【0109】

いくつかの実施形態において、上記ssDNA-PLは、少なくとも9ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、上記オリゴヌクレオチドは、6~16ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号1を含む。いくつかの実施形態において、上記オリゴヌクレオチドは、18ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号2を含む。

【0110】

いくつかの実施形態において、上記SMDH₄は、少なくとも9ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、上記オリゴヌクレオチドは、9~15ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号3を含む。いくつかの実施形態において、上記オリゴヌクレオチドは、18ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号4を含む。

40

【0111】

いくつかの実施形態において、本明細書で開示される方法のうちのいずれかのアポリタンパク質は、アポリタンパク質A-Iである。

【0112】

さらに作り込むことなく、当業者は、上記の記載に基づいて、その完全な程度まで本発明を利用し得ると考えられる。従って、以下の具体的実施形態は、例証に過ぎないと解釈

50

されるべきであり、本開示の残りをどのようにしても限定するものではない。本明細書で引用される全ての刊行物は、本明細書で言及される目的または主題に関して参考として援用される。

【実施例】

【0113】

本明細書中の他の箇所に記載されるように、DNA-PL₄コアを、2工程様式で合成した（本明細書中の合成の節を参照のこと）。第1に、DNA-リン脂質結合体（ssDNA-PL）、および四面体低分子-DNAハイブリッド（SMDH₄）を合成した（表2）。第2に、塩基対合される相補的な配列を有するssDNA-PLおよびSMDH₄をハイブリダイズして、最終的なDNA-PL₄コアを得た（図2Bおよび図6~9）。 10

【0114】

得られたコア足場を使用して、LC HDL NPの集合を行い、最適化した。リン酸緩衝食塩水（PBS：10mM Na₂HPO₄および137mM NaCl；pH=7.4）中に薄いフィルム（1mM DPPC）を再懸濁し、続いて超音波処理することによって、1,2-ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）からリポソームを調製した。次いで、PL₄コア足場を、薄いフィルムとして調製した一方で、改善された水性の溶解度が、既に水性の緩衝液中で、DNA-PL₄コア足場で始まることを可能にした。次いで、他のNP構成要素を、コア足場に添加した：第1にDPPCリポソーム、および第2にapoA-1（各々、PBS中に予め懸濁されている）。その混合物を、3回の超音波処理に供し、氷上で緩和させ、次いで、濾過し、50kDa MWCOスピニカラムを使用して濃縮し、交互にベンチトップ遠心分離を行って、凝集物を除去した（図2C）。 20

【0115】

超微細構造的には、高度に単分散性のナノ粒子を、PL₄および9-DNA-PL₄足場（PL₄ HDL NP 直径：10±2nm、9-DNA-PL₄ HDL NP 直径：9±2nm）を使用する粒子集合体に関して透過型電子顕微鏡（TEM）によって観察した（図2Gおよび図13）。注目すべきことに、上記粒子の形態は、未成熟円板状HDL、またはrHDLに特徴的ではなかった。これらはともに、積み重なったリン脂質ディスクの特徴的な連鎖形成を示す^{17, 22-23}。代わりに、上記粒子は、ほぼ球状に見え、周辺は、環状の低密度領域があった。動的光散乱実験から、ヒトHDLのものに似た流体力学的直径が明らかになった（PL₄ HDL NPおよび9-DNA-PL₄ HDL NPに関して、それぞれ、DH=13.8±3.9および13.3±4.6nm）（表3）。サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）は、9-DNA-PL₄ HDL NPおよびPL₄ HDL NPに関して、それぞれ、8.22mLおよび8.58~8.88mLのピーク保持容積を示した。LC HDL NPのSECトレースはまた、少量の遊離apoA-I（10.13mL 保持容積）と一致する右側のテールを明らかにした。これは、ヒトHDLコントロールにおいても観察された。PL₄および9-DNA-PL₄足場が、20nm未満の粒子を成功裡に生成した一方で、18-DNA-PL₄足場を使用する集合体は、DPPCおよびapoA-1の添加後の大きな小胞構造体として持続した（図13）。本明細書では、これは、ハイブリッドのサイズが、apoA-1集合体にしては禁止されるほどに大きいことの結果であると仮定した。興味深いことには、9-DNA-PL₄ HDL NPは、PL₄ HDL NPより顕著に大きくはなかった。この結果は、18-DNA-PL₄を使用する集合体の欠如とともに、LC HDL NP粒径が、所定の閾値未満のコアサイズとは無関係に、apoA-1タンパク質折りたたみによって主に決定され得ることを示唆する。LC HDL NPは、9-DNA-PL₄を使用して達成したが、18-DNA-PL₄を使用して達成しなかったことから、全ての図面および残りの本文は、DNA-PL₄ HDL NPとして単純に9-DNA-PL₄ 足場を使用して形成される粒子に言及する。 30 40

【0116】

apoA-1タンパク質コンホメーションに関してLC HDL NP構造を特徴づける 50

ために、円偏光二色性を、ヒト血清から単離されたLC HDL NP、apoA-1、HDL₂およびHDL₃、ならびに無機性テンプレートHDL様ナノ粒子(Au HDL NP)に対して行った。二次構造の分析を、3つの別個の参照タンパク質データベースを使用して行った。驚くべきことに、PL₄ HDL NPおよびDNA-PL₄ HDL NPは、二次構造においてヒトHDLとよく似ていることが見出された一方で、Au HDL NPは対照的に、過剰なヘリシティーならびに実質的に少ないシートおよびターン含有量を示した(表1)(図2E)。LC HDL NP構造をさらに特徴づけるために、apoA-1のオリゴマー化状態を、LC HDL NPとスベリン酸ビススルホスクシニミジルとの架橋、続いて、イムノプロットによって調査した¹⁸。LCコアとのapoA-1相互作用は、安定なオリゴマー形成を誘導することが見出された(図16)。さらに、LC HDL NPの表面電位は、apoA-1単独(-10±3 mV)またはコア足場なしのapoA-1およびDPPC(-12±2 mV)より負であった(PL₄: -21±2 mV、DNA-PL₄: -19±1 mV)が、ヒトHDL₂(-19±2 mV)およびHDL₃(-21±5 mV)と一致した。これらの結果は、apoA-1オリゴマーが非常に負に荷電していることから、オリゴマー化と一致する。最後に、LC HDL NPの組成を決定し、それらをAu HDL NPおよびヒトHDLのものと比較した。LC HDL NPは、LC HDL NPがコレステロールもコレステリルエステルも含まないことを除いて、各構成要素の相対的質量寄与に関してHDL₂およびHDL₃を厳密に反映することが見出された(図2D;表4)。

【0117】

LC HDL NPが顕著なHDL機能を再現し得るか否かを調査するために、補完的な生物学的アッセイを行った。HDL模倣に極めて重要な特性は、コレステロールを脂質搭載マクロファージから流出させる能力である。LC HDL NPの流出効率を、インビトロ放射性標識コレステロール流出アッセイを使用して試験した(オリゴマー化アッセイの節を参照のこと)²⁴。簡潔には、J774マクロファージに、トリチウム標識コレステロール(³H-cho1)を搭載し、cAMPとともに培養して、コレステロール流出レセプターをアップレギュレートし、次いで、ナノ粒子またはコントロールで4時間処理した。その培地上清を、液体シンチレーションカウントに供して、パーセント流出³H-cho1を定量した。PL₄ HDL NPおよびDNA-PL₄ HDL NPはともに、用量依存性様式において強いコレステロール流出を促進した(PL₄: 6.2±0.7%、DNA-PL₄: 6.5±0.2%; 100 nM タンパク質)一方で、コア足場および脂質単独でのコントロール群は、流出に関して最小限の能力を示した(図3A)。

【0118】

流出に加えて、コレステロール送達は、成熟HDLによって天然の状況において実行される特別な機能である。コレステロール送達薬剤としてのLC HDL NPの有効性を評価するために、培養した肝細胞(HepG2)を、蛍光コレステロール(NBD-cho1)およびLC HDL NPまたはコントロールで同時処理し、その後、フローサイトメトリーまたは共焦点顕微鏡法のために処理した。LC HDL NPは、30分間だけ、NBD-cho1の効率的送達を促進し(図4)、PL₄ HDL NP処理細胞のうちの23%は、Au HDL NPおよびapoA-1に関して、それぞれ、5.7%および6.8%と比較して、NBD陽性であった。

【0119】

次いで、単一アッセイにおいて逆方向のコレステロール輸送プロセス全体をシミュレートするように実験を設計した。これを、標準的な放射性標識流出アッセイ、続いて、流入工程を行うことによって達成し、それによって調整した流出媒体をHepG2細胞に導入し、流入を、さらに4時間進めさせた。次いで、液体シンチレーションを、マクロファージ、肝細胞、および培地上清からの全3画分に対して計数して行った。本明細書中の結果(図3B~3C)は、LC HDL NPが、apoA-1(**p<0.01)およびAu HDL NP(***p<0.001)の両方と比較した場合に、優れたコレステロール輸送能を示すことを明らかにした。全体的に、このアッセイは、LC HDL NPが、

強いコレステロール流出および送達のあることのみならず、単一の粒子コホートが、動的様式においてコレステロールを搭載および降ろすことによって、これらの機能を逐次的に実行し得ることも示す。

【0120】

材料および計装

別段述べられなければ、全ての試薬および試薬グレード溶媒を、Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI) から購入し、受容したまま使用した。全ての脂質-1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-ジベンゾシクロオクチル (DBCO-PE) および 1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DPPC)-ならびに蛍光コレステロール (22-(N-(7-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾール-4-イル)アミノ)-23,24-ビスノル-5-コレン-3-オール((NBD)-コレステロール)) を、Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) から得た。ApoA-Iタンパク質を、MyBioSource (San Diego, CA) から得た。全ての化学物質を、さらに精製せずに使用した。ウルトラピュア脱イオン (DI) H₂O (18.2 M \cdot cm 抵抗率) を、Millipore システム (Milli-Q Biocel) から得た。テトラキス (4-アジドフェニル) メタン¹ および脂質ホスホルアミダイト² を、以前に公開した手順に従って合成した。

10

【0121】

ヘキシニル官能化 DNA 鎖および DNA-脂質結合体の合成を、Expedite 8909 Nucleic Acid System で行った。DNA 生成物を、それぞれ、逆相 (RP) 半分取用 (Dynamax, 250 \times 10mm, Microsorb 300 / 10 μ m / C18, Agilent # R083213C10) および分析用 (Dynamax, 100 \times 4.6mm, Microsorb 100 / 3 μ m / C18, Agilent # R0080200E3) カラムを装備した Agilent 1100 HPLC で精製および分析した。ヘキシニル官能化 DNA とテトラキス (4-アジドフェニル) メタンとのカップリングを、Thermomixer R 5355 (Eppendorf AG North America, Hauppauge, NY) 機器で行った。DNA 材料の吸収スペクトルを、マスクした石英セル (経路長 = 10mm, カタログ番号 29B-Q-10-MS, Starna cells Inc., Atascadero, CA) を使用して、Varian Cary 300 Bio UV-vis 分光光度計 (Varian, Inc., Palo Alto, CA) で記録した。陰性染色透過型電子顕微鏡検査法 (TEM) 画像を、300メッシュカーボンコーティング銅グリッド (Electron Microscopy Services) を使用して、120kV で作動する FEI Tecnai Spirit TEM を使用して獲得した。共焦点画像化を、Nikon A1R Spectral microscope で行った。フローサイトメトリーを、BD LSRFortessa 細胞分析機を使用して行った。マトリクス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間型 (MALDI-ToF) 質量分析データを、Bruker AutoFlex III MALDI-ToF 質量分析計 (Bruker Daltonics, Billerica, MA) で線形モードを使用して、陰イオンとして集めた。その機器に、サンプリング速度 10Hz で 30~40% 出力において作動させた SmartbeamTM レーザー技術を装備させた。1000 回のスキャンを、各質量スペクトルに対して平均化した。Agilent HPLC および Bruker MALDI-ToF 機器からのデータを、MestreNova ソフトウェアバージョン 8.1.1-11591 を使用して処理した。

20

30

40

【0122】

合成

a. DNA-PL₄ コアの合成

a-1. 9-SMDH₄ および 18-SMDH₄ の合成および精製

9マーおよび 18マー DNA アームとの低分子-DNA ハイブリッド (SMDH) (そ

50

れぞれ、9 - SMDH₄ (配列番号1) および18 - SMDH₄ (配列番号2) を、以前に公開した手順³ に従って合成および精製した。この研究において使用されるDNA配列を、表2に列挙する。SMDH調製において形成した種々の生成物を同定するために、粗製SMDHの集めたサンプルのアリコート、先ず、分析用RP - HPLCカラム (本明細書中の材料および計装の節を参照のこと)、および95 : 5 v/v 0.1M TEAA (水性) : MeCN (TEAA (水性) = 酢酸トリエチルアンモニウム、水性溶液) で開始し、60 : 40 v/v 0.1M TEAA (水性) : MeCNへと35分間かけて (+1 容積% MeCN/分の傾きで) 増大させ、流量1 mL/分での勾配法を使用して分析した。次いで、全サンプルを、半分取用RP - HPLCカラム (本明細書中の材料および計装の節を参照のこと)、および95 : 5 v/v 0.1M TEAA (水性) : MeCNで開始し、60 : 40 v/v 0.1M TEAA (水性) : MeCNへと70分間かけて (+0.5 容積% MeCN/分の傾きで。ここではより緩やかな勾配を使用して、ピークの適切な分離を確実にした) 増大させ、流量3 mL/分での勾配法を使用して精製に供した。その集めたSMDH₄生成物の正体をMALDI - TOF MS分析によって確認し (図6 ~ 7の挿入図)、その純度を、前述の分析用RP - HPLC溶媒プログラムとともに分析用RP - HPLCを使用して再評価した (図6 ~ 7)。

10

【0123】

a - 2 . DNA - リン脂質結合体の固相合成および精製

表面に付着したアデニン (Glen Research, dA - CPG # 20 - 2001 - 10 (1000, 28 μmol/g)) またはチミン (Glen Research, dT - CPG # 20 - 2031 - 10 (1000, 27 μmol/g)) のいずれかの1 μmolを有する孔制御ガラス (CPG) ビーズを使用して、合成を3' 方向から行った。そのCPGビーズを、1 μmol 合成カラムの中に入れ、次いで、3' - ホスホルアミダイト (Glen Research, dA - CEホスホルアミダイト # 10 - 1000 - C5, Ac - dC - CEホスホルアミダイト # 10 - 1015 - C5, dmf - dG - CEホスホルアミダイト # 10 - 1029 - C5, dT - CEホスホルアミダイト # 10 - 1030 - C5) を、Expedite 8909合成機で標準的な1 μmol プロトコールを使用して添加して、CPG - 3' - ssDNAを作製した (配列については表2を参照のこと)。脂質ホスホルアミダイトを、ssDNA鎖の5' 末端に付加し、次いで、ビーズを、乾燥窒素ガス流で乾燥させ、水性の新鮮なAMA溶液 (30重量% 水性水酸化アンモニウム溶液および40重量% 水性メチルアミン溶液の1 : 1 v/v 混合物を1 mL) を含むバイアル中に入れた。次いで、そのバイアルに蓋をし、65 °Cにおいて15分間加熱して、DNA - 脂質結合体を、固体支持体から切断した。次いで、アンモニアおよびメチルアミン副生成物を、特徴的なアンモニア臭が消失するまで、バイアルの内容物に乾燥窒素ガス流を通すことによって除去した。残りの液体 (これは、粗製DNA - 脂質結合体を含む) を、ピペットで集め、残りのビーズを、ウルトラピュア脱イオン水 (200 μL) でさらに抽出した。その抽出物を、粗製DNA - 脂質結合体の最初の溶液と合わせ (最終的には全容積0.4 mLを得る)、0.45 μm ナイロンシリンジフィルター (Acrodisc (登録商標) 13mmシリンジフィルター # PN 4426T) を通して濾過した。粗製生成物の集めたサンプルを、分析用RP - HPLC (図8 ~ 9) および95 : 5 v/v 0.1M TEAA (水性) : MeCN (TEAA (水性) = 酢酸トリエチルアンモニウム、水性溶液) で開始し、100% MeCNへと50分間かけて増大させ (+1.9容積% MeCN/分の傾きで)、流量1 mL/分での勾配法を使用して精製に供した。その集めた生成物の正体をMALDI - TOF MS分析によって確認し (図8 ~ 9の挿入図)、その純度を、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) によって検証した (図9)。

20

30

40

【0124】

a - 3 . DNA - リン脂質結合体およびSMDH₄の集合

TAMg緩衝溶液 (40mM Tris, 20mM 酢酸、および7.5mM MgCl₂; pH 7.4) 中の、調製したとおりのSMDH₄およびその相補的DNA - 脂質結合

50

体の等モル混合物を、0.5 mL エッペンドルフチューブへと添加した。次いで、得られた溶液を90℃へと加熱ブロック(Thermomixer R; Eppendorf, Hauppauge, NY)で加熱し、そこで5分間維持して、全ての最初のDNA相互作用を除去した。次いで、加熱ブロックへの出力を切って、その溶液を室温へと3時間かけてゆっくりと冷却させた(この装置の代表的な冷却プロフィールに関しては、Yildirim, I.; Eryazici, I.; Nguyen, S. T.; Schatz, G. C. J. Phys. Chem. B 2014, 118, 2366-2376の補足情報の図S16を参照されたい)。

【0125】

b. PL₄コアの合成

b-1. テトラキス(4-アジドフェニル)メタンの合成

テトラキス(4-アジドフェニル)メタンを、以前に公開した手順¹に従って合成した。

【0126】

b-2. DBCO-PEおよびテトラキス(4-アジドフェニル)メタンの結合体化

PL₄コア材料を、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-ジベンゾシクロオクチル(DBCO-PE)と四面体低分子コア(テトラキス(4-アジドフェニル)メタン)との銅フリークリックケミストリー結合体化によって合成した(図11)。代表的なクリックケミストリー反応において、DBCO-PEおよびテトラキス(4-アジドフェニル)メタンを各々、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)(Sigma Aldrich)中に0.1重量%で溶解し、DMF中、DBCO-PE対テトラキス(4-アジドフェニル)メタンの10:1モル比で混合した。その反応混合物を、3回の交互になったボルテックスおよび浴超音波処理に供し、次いで、室温において、24時間ボルテックスして反応させた。次いで、エレクトロスプレーイオン化質量分析法を使用して、得られた生成物を特徴づけた(図12)。

【0127】

c. LC-HDL-NP集合体

ナノ粒子集合を、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DPPC)リポソームを最初に調製することによって行った。DPPCを、5 mL ガラスバイアルの中で、クロロホルム中0.1重量%において溶解した。次いで、薄いフィルムを、N₂ガスでその溶媒をエバポレートすることによって生成した。そのフィルムを、デシケーターの中で>2時間、減圧下でさらに乾燥させた。次いで、リポソームを、浴超音波処理およびボルテックスを交互に行いながら、リン酸緩衝化食塩水(PBS: 10 mM ホスフェートおよび137 mM NaCl, pH = 7.4)中で、DPPC濃度1 mMにおいてその薄いフィルムを再懸濁することによって生成した。PL₄-HDL-NPに関しては、PL₄コア足場を、DPPCに関して上記で記載されるその同じ様式において、DMF中の0.1重量%溶液から薄いフィルムを生成することによって調製した。DNA-PL₄-HDL-NPに関しては、コア足場を、オリゴヌクレオチドによって付与されたコアの改善された水への溶解度に起因して、TAMG緩衝溶液(40 mM Tris, 20 mM 酢酸、および7.5 mM MgCl₂; pH = 7.4)中で開始した。粒子集合を開始するために、非足場ナノ粒子構成要素を、次いで、そのコア足場へと逐次的に添加した。代表的な集合において、40 nmolのDPPCを、2 nmol 脂質結合体コア足場(PL₄またはDNA-PL₄のいずれか)に添加し、続いて、4 nmolのapoA-1を添加した(DPPCおよびapoA-1はともに、PBS中に予め懸濁しておいた)。次いで、その懸濁物を、PBSにおいて、PBS中最終コア濃度10 μMへと希釈した。その懸濁物を、3回の交互になった浴超音波処理(90 s オン、30 s オフ)およびボルテックスに供し、氷上で>30分間緩和した。次いで、その粒子を濾過し、0.5 mL 50 kDa MWCOスピナラム(Millipore)を使用して濃縮した。そのカラムを、PBS中で10分間、10,000 x gにおいて4℃で先ずすぎ、その後、同じ条件下でその粒子を3回スピン濾過した。500 μlのPBSを、各スピン後にカラムに添加し、その結果、各粒子懸濁物の溶媒は、スピン濾過後にPBSであり、TA

10

20

30

40

50

Mg 緩衝液は、DNA-PL₄ HDL NPの溶液から除去された。各回の濾過後に、その粒子を、デスクトップ遠心分離によって遠心分離して、いかなる凝集物をも除去した。最終回の濾過後に、小容積の濃縮粒子（約20 μL）を、PBS中100～200 μlへと希釈し、そのタンパク質濃度を、BCA試薬とともに37℃で30分間インキュベートした後に、562 nmの吸光度を分光光度計で測定して、ピシニコニン酸アッセイ（BCA）によって決定した。次いで、その粒子は、直ぐに使用したか、または短期間の保存のために4℃に置いた。

【0128】

d. TEMのためのコントロールの調製

コントロールサンプルを調製して、LC HDL NP集合プロセス、ならびに脂質結合体化コア足場およびapoA-1に対するその依存性を調査した。コア+apoA-1なしの足場コントロールを、上記で記載されるとおりのDPPCリポソームを作製することによって調製した（本明細書中の合成の節を参照のこと）。次いで、DPPCリポソームを、LC HDL NPにおけるものと同じ濃度およびモル比でコア足場に添加したところ、PL₄足場は薄いフィルムになり、DNA-PL₄足場は、水性緩衝液（PBS）中にあった。次いで、その混合物を、3回の交互になった超音波処理およびボルテックスに供し、濾過し、上記のように50 kDa MWCOスピンカラムを通して濃縮した。apoA-1およびDPPC単独コントロールは、コア足場なしで同じ様式で集合した。

【0129】

陰性染色透過型電子顕微鏡検査法

グリッド準備のために、サンプルを、PBS中1～2 μM タンパク質の濃度で調製し、UV処理炭素コーティング銅300メッシュグリッド（Electron Microscopy Services）上にドロップキャストし、ドラフトチャンバ（chemical fume hood）の中で風乾した。そのグリッドをPBSで2回洗浄し、2% 酢酸ウラニルで20秒間、2回染色し、次いで、PBSで3回洗浄し、風乾し、その後画像化した。画像化を、80 kVで作動するFEI Tecnai Spirit TEMを使用して行った。

【0130】

円偏光二色性

円偏光二色性を、JASCO J-815 CD分光計を使用して行った。全てのサンプルを、蒸留水中で75 μg/mL タンパク質に希釈した。1つのサンプルの3つの累積からスペクトルを得た。二次構造データを、分析アルゴリズムCONTINを走らせるCDPrソフトウェアパッケージを使用して獲得した。種々の可溶性タンパク質参照セットを使用して、3回の別個の分析を行った。表1に報告される値は、これら3回の分析の平均±SEM結果を反映する。

【0131】

組成特徴付け

a. タンパク質定量。 ナノ粒子および天然HDLのタンパク質含有量を定量するために、本発明者らは、市販のピシニコニン酸（BCA）アッセイ（Thermo Fisher）を、製造業者の指示に従って使用した。簡潔には、本発明者らは、BCA試薬溶液を使用して、96ウェルプレートの中にウシ血清アルブミン（BSA）サンプルを最終容積80 μl/ウェルへと0.125 mg/mLから2 mg/mLまで希釈することによって、タンパク質標準曲線を作成した。ナノ粒子サンプルを、同じ様式で希釈した；標準およびサンプルを、40倍希釈した。標準を二連でプレートし、サンプルを三連でプレートした。プレートを、30分間、37℃においてインキュベートし、次いで、562 nmの吸光度を、Synergyプレートリーダーを使用して測定した。

【0132】

b. リン脂質定量。 ナノ粒子および天然HDLのリン脂質含有量を、比色によるPhospholipid Assay Kit（Sigma-Aldrich）を製造業者の指示に従って使用して定量した。簡潔には、リン脂質標準曲線を、15 μMから200 μ

10

20

30

40

50

Mまで段階希釈を介して調製した。サンプルをPBS中で段階希釈して、その標準曲線の範囲内の1またはこれより多くの希釈物を得た。次いで、サンプルおよび標準を、酵素反応混合物とともに30分間室温でインキュベートし、次いで、572nmの吸光度を、Synergyプレートリーダーを使用して決定した。

【0133】

c. コレステロール、コレステリルエステル、およびコア定量。 コレステロールおよびコレステリルエステル濃度を、Amplex Red Cholesterol Assay (ThermoFisher) を使用して、製造業者の指示に従って使用して決定した。簡潔には、コレステロール標準曲線を、8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から125 ng/mL まで、キットが提供する水性緩衝液において調製した。2セットのサンプルを三連で調製し、1 \times Reaction Bufferへと希釈した。次いで、過酸化水素、レソルフィン、および酵素西洋ワサビペルオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼを含む(コレステロールエステラーゼありまたはなしで)2つの反応混合物を調製して、遊離コレステロールおよびコレステリルエステルの両方の定量を可能にした。次いで、一方のセットのサンプルを、コレステロールエステラーゼを含む反応混合物とともにインキュベートし、他方のセットを、コレステロールエステラーゼなしの反応混合物とともにインキュベートした。次いで、マイクロプレートを用いて、37 $^{\circ}\text{C}$ で1時間、または蛍光シグナルが低下し始めるまでインキュベートした。DNA-PL₄ HDL NPのコア濃度を、UV-Vis分光法を介して260nmの吸光度を測定することによって決定した。PL₄コア濃度を直接決定できなかったため、そのコア濃度を、DNA-PL₄粒子に関して得た実験的に決定したコア:タンパク質モル比を使用して推測した。この近似値は、PL₄ HDL NPおよびDNA-PL₄ HDL NPの粒子1個あたりapoA-1分子の同じ平均コピー数を想定し、これは、類似の粒径がTEMによって観察されることを考慮すれば、近い近似値である可能性が高いことは、注目する価値がある。Au HDL NPの組成は、以前に公開された研究から報告された⁴。

【0134】

オリゴマー化アッセイ

a. 架橋された粒子およびタンパク質サンプルの調製。 架橋剤、スベリン酸ビス[スルホスクシンイミジル](BS3)(Sigma Aldrich)を使用して、イムノプロットを介する検出の前に、集合の際にLC HDL NPにおけるapoA-1のいかなるより高次のオリゴマー化状態をも安定化させた。ここで使用される方法を、以前に報告したプロトコール⁴から適合させた。LC HDL NPを、上記のように調製し、PBS中50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ タンパク質へと希釈した。次いで、BS3架橋剤を、2.5mMの最終BS3濃度になるようにLC HDL NPに添加し、その反応を、30分間、室温において進めた。apoA-1オリゴマーラダーを生成するために、脂質非含有純粋apoA-1(MyBioSource)をPBS中で透析し、次いで、BS3(0.25mM)で高タンパク質濃度(500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)において4時間、室温での架橋に供した。0.5M トリス塩基を使用して、その架橋反応を停止した(45mM 最終)。

【0135】

b. apoA-1イムノプロット。 BioRad装置を、ゲル電気泳動およびタンパク質転写のために使用した。プレキャスト4-20% ポリアクリルアミドゲル(Mini Protean TGX, BioRad)を、分離に使用した。ポリビニリデンフルオリド(PVDF)膜へのタンパク質転写を、20容積% メタノールを含むトリス-グリシン緩衝液を使用して行った。次いで、PVDF膜をTBS中ですすぎ、5重量% 脱脂粉乳中で、1時間室温においてブロッキングした。一次抗体(ウサギ抗apoA I, Abcam)を、上記膜に5重量% 脱脂粉乳中1:1000希釈で添加し、4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩インキュベートした。次いで、上記膜を、TBS-Tween(0.1%)中で3回、各々10分間洗浄した。次いで、二次抗体(ヤギ抗ウサギHRP, BioRad)を、5重量% 脱脂粉乳中1:2000希釈で添加した。次いで、上記膜を、TBS-Tween中で3回、各々10分間洗浄し、次いで、エレクトロケミルミネッセンス基質溶液中に1

分間浸し、オートラジオグラフィフィルムに10～90秒間、最適露出時間にわたって露出し、発色させた(図16)。

【0136】

放射性標識アッセイ

a. 流出アッセイ: 流出実験のために、本発明者らは、当該分野で基準のアッセイ、J774マクロファージからのトリチウム標識コレステロール(H^3 -chol)の流出を使用した。J774マクロファージを、少なくとも2継代にわたって培養し、その後、1日目に、RPMI、10%ウシ胎仔血清(FBS)、1%ペニシリン-ストレプトマイシン(PenStrep)中で24ウェルプレートにおいて150,000細胞/ウェルで播種した。 H^3 -cholのエタノールストックを、無菌条件下で扱った。 H^3 -cholストックをエバポレートし、1mLのエタノール中に再溶解し、37℃で60分間インキュベートした。次いで、その溶液を再びエバポレートし、50 μ Lエタノール中に再溶解し、37℃で30分間インキュベートした。次いで、熱不活化FBS(Corning, NY)を H^3 -chol溶液に添加し、4℃において一晚インキュベートした。2日目に、1%PenStepおよび2 μ g/mL Sandoz(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を含む無血清RPMIを、上記 H^3 -chol含有FBSに添加して、RPMI中、2 μ Ci/mL H^3 -chol、5容積% FBSの最終標識培地を得た。Sandozが、 H^3 -cholのエステル化を防止するために使用されるACATインヒビターであることに注意のこと。培地を24ウェルプレートから吸引し、500 μ Lの H^3 -chol標識培地を添加した(1 μ Ci/ウェル)。標識を、24時間にわたって進めた。3日目に、標識培地を除去し、細胞を、MEM、25 μ M HEPESで2回洗浄し、アップレギュレーション培地(RPMI、1% PenStrep、300 μ M cAMP、2 μ g/mL Sandoz、1% BSA)を添加して、標準コレステロール流出レセプターABCA1をアップレギュレートした(注: cAMP(-)流出アッセイ(図4D)に関しては、この培地を、SR-B1依存性流出を調査するために、cAMPなしで添加した)。アップレギュレーションを、24時間にわたって進め、その後、流出培地を添加した。ナノ粒子およびコントロールを含む流出サンプルを、無血清培地(MEM、25 μ M HEPES、1% PenStrep)中に調製して、血清コレステロールキャリアによる非特異的 H^3 -chol流出を低減させた。細胞をMEM、25 μ M HEPES中で2回洗浄し、流出培地を、処理レジメンに従って各ウェルに添加した。流出を、4時間にわたって進めた。次いで、流出培地を除去し、真空濾過し、シンチレーション計数のために3mL UltimaGoldシンチレーション液に添加した。 H^3 -chol搭載マクロファージの別個の三連のコホートを洗浄し、風乾し、イソプロパノール中で室温においてインキュベートして、流出の最初にt=0で全コレステロールの尺度として H^3 -cholを抽出した。PBS処理コントロールコホートをベースラインとして使用し、次いで、これらのサンプルに関して得た計数を、実験群から差し引いて、ベースライン補正した計数を得た。次いで、流出パーセンテージを、流出培地のベースライン補正した計数対t=0マクロファージの計数の比として計算した。これは、4時間の処理の過程にわたって細胞から除去された H^3 -cholの画分が拡散単独に起因しないことを示す。

【0137】

b. タンデム流出-流入アッセイ: 流出-流入実験のために、流出を、上記と同様に行った。肝細胞(HepG2細胞)を、3日目に、24ウェルプレートにおいてDMEM、10% FBS、1% PenStrep中、100,000細胞/ウェルでプレートした。4日目に、4時間の流出直後に、HepG2細胞を、無血清MEM、25 μ M HEPES中で2回洗浄し、次いで、J774マクロファージからの流出培地を除去し、HepG2細胞に直接添加した。流入を4時間にわたって進め、その後、採取した。次いで、流入培地上清を集め、上記の流出培地と同様に処理した。次いで、 H^3 -cholを、500 μ L イソプロパノール中で4時間室温においてインキュベートすることによってHepG2細胞から抽出し、パラフィルムでシールした。次いで、 H^3 -chol含有イソ

プロパノールを集め、エバポレートし、キシレン中に再溶解し、その後、シンチレーション計数のためにUltimaGoldに添加した。

【0138】

NBD - コレステロール送達実験

a. 共焦点顕微鏡検査法。HepG2細胞を、10% FBSおよび1% PenStrepを含むダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)中で培養した。処理の1日前に、細胞を、24ウェルプレートにおいてガラスカバースリップの上に100,000細胞/ウェルでプレートした。処理日に、細胞をPBSで3回洗浄し、次いで、5 μg/mL NBD - コレステロールを含む新鮮な培地を、処理レジメンに従って、送達薬剤ありまたはなしで各ウェルに添加した。取り込みを、上記細胞を固定したときに30分間にわたって進め、共焦点顕微鏡検査法のために調製した。細胞を、4% PFA中で10分間、室温において固定した。次いで、細胞を、PBS中で3回洗浄し、DAPI(PBS中300 nM)で5分間染色し、PBS中でさらに2回洗浄した。次いで、カバースリップを、Fluoromount G封入媒体を使用してガラススライド上に載せ、室温において少なくとも24時間シールさせ、その後、画像化した。共焦点顕微鏡検査法を、Nikon A1R Spectralを使用して行い、画像処理を、Nikon Element s and Fijiソフトウェアで行った。

10

【0139】

b. フローサイトメトリー。HepG2細胞を、処理の1日前に、24ウェルプレートにおいて200,000細胞/ウェルでプレートした。処理日に、細胞をPBSで3回洗浄し、次いで、5 μg/mL NBD - コレステロールを含む新鮮な培地を、処理レジメンに従って、送達薬剤ありまたはなしで各ウェルに添加した。取り込みを、採取前に30分間にわたって進めた。次いで、細胞をトリプシン処理し、血清含有培地中で中和し、300 × gで6分間遠心分離し、細胞をペレット化した。細胞を、2% ウシ血清アルブミン(BSA)を含むPBS中に再懸濁し、次いで、BD LSRFortessa細胞分析機(BD Biosciences)を使用してフローサイトメトリーに供した。FlowJoソフトウェアを使用して分析を行った。事象を、細胞デブリおよび凝集物を排除するようにゲートを設定し、その後、NBD - cho陽性の定量を行った。

20

【0140】

レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ(LCAT)活性アッセイ

PBS中に懸濁したLC HDL NPおよびAu HDL NP(250 nM)を、PBS中で、LCAT(10 nM)および遊離コレステロール(100 μg/mL)とともに37 °Cで15時間、300 rpmにおいてThermoMixerで振盪してインキュベートした。次いで、サンプルを、10,000 gで10分間、50 kDaスピンカラムを通して3回遠心分離して、過剰な結合していないコレステロールを除去した。次いで、サンプルを、1 × Reaction Buffer中で100倍希釈し、その後、Amplex Red Cholesterol Assay(Thermo Fisher)で定量した。Amplex Red Cholesterol Assayを、製造業者の指示に従って行った。簡潔には、コレステロール標準曲線を、8 μg/mLから125 ng/mLまで、キットが提供する水性緩衝液においてコレステロールを段階希釈し、96ウェル黒色底マイクロプレートに50 μl添加することによって調製した。50 μlのサンプルもまた、そのマイクロプレートの各ウェルに三連で添加した。2セットのAmplex Red反応混合物を、コレステロールエステラーゼありおよびなしで調製した。次いで、50 μlのAmplex Red反応混合物を各ウェルに添加した。マイクロプレートを、37 °Cで1時間または蛍光シグナルが低下し始めるまでインキュベートした。

30

40

【0141】

NF - kB活性アッセイ

NF - kB活性実験のために、THP1 - Dual細胞を、QUANTI - Blue分泌型胚性アルカリホスファターゼ(SEAP)検出キット(Invivogen)とともに使用した。THP1 - Dual細胞を、10% FBSを含むRPMI中で懸濁して培

50

養し、実験で使用する前に少なくとも2回継代した。THP1-Dual細胞を、96ウェルプレートにおいて100,000細胞/ウェルでプレートした。リポポリサッカリド(LPS)(5ng/mL)を使用して、NF-kB活性を刺激した。実験ウェルを、ナノ粒子またはコントロールを添加する1時間前にLPSで処理した。次いで、検出前に、細胞を、粒子またはコントロールとともに24時間インキュベートした。QUANTI-Blue溶液を、エンドトキシン非含有水中でパッケージの中身を溶解し、37で30分間インキュベートすることによって調製した。QUANTI-Blue溶液(180μL)を96ウェルプレートにおいて各ウェルに添加した。次いで、THP1-Dual細胞上清(20μL)を、そのQUANTI-Blue溶液に添加し、そのプレートを37で2~4時間インキュベートした。SEAPレベルを、Synergyプレートリーダーを使用して650nmの吸光度を検出することによって定量した。

10

【表1】

表1: 円偏光二色性を介する天然および合成HDLの構造分析

	α -ヘリックス (%)	β -シート(%)	ターン(%)	不規則 (%)
apoA-1	57 ± 3	4 ± 2	14 ± 3	25 ± 5
Au HDL NP	73 ± 1	0 ± 0	6 ± 1	21 ± 2
HDL ₂	50 ± 2	7 ± 1	18 ± 4	24 ± 2
HDL ₃	42 ± 1	15 ± 1	15 ± 1	28 ± 3
PL ₄ HDL NP	50 ± 1	7 ± 1	16 ± 5	27 ± 1
DNA- PL ₄ HDL NP	40 ± 1	20 ± 2	16 ± 2	25 ± 7

20

【表2】

表2: SMDH₄ DNAアームおよびDNA-脂質結合体のDNA配列のリスト

DNA長	DNA配列*	配列番号
9-SMDH ₄	3' -TCG GCT GGA-低分子	1
18-SMDH ₄	3' -TTG CTG AGT ATA ATT GTT-低分子	2
9-DNA-脂質	3' -TCC AGC CGA-脂質	3
18-DNA-脂質	3' -AAC AAT TAT ACT CAG CAA-脂質	4

40

* SMDH₄ DNAアームのDNA配列は、DNA-脂質結合体の配列に相補的である(すなわち、9-DNA-脂質(配列番号3)に対して9-SMDH₄(配列番号1)および18-DNA-脂質(配列番号4)に対して18-SMDH₄(配列番号2))。

50

【表 3】

表3: LC HDL NPおよびコントロールに関する動的光散乱結果

サンプル	流体力学的直径(nm)
遊離apoA-I	7.6 ± 0.2
ヒトHDL ₂	14.1 ± 5.0
ヒトHDL ₃	13.6 ± 6.1
PL ₄ HDL NP	13.8 ± 3.9
DNA-PL ₄ HDL NP	13.3 ± 4.6

10

【表 4】

表4: LC HDL NPの組成

サンプル	apoA-I/コア足場 (mol/mol)	DPPC/コア足場 (mol/mol)	DPPC/apoA-I (mol/mol)
PL ₄ HDL NP	-	89*	35
DNA-PL ₄ HDL NP	2.56	54	21

20

*DNA-PL₄ HDL NPに関して実験的に決定したタンパク質/コア足場比を使用して計算

【表 5】

表5: 天然HDLのモル組成

	apoA-I	スフィンゴミ エリン	ホスファチジ ルコリン	遊離コレステ ロール	コレステロー ルエステル	トリグリセリド	Lyso-PC
コピー#	2	19	109	50	90	19	10

30

【 0 1 4 2】

参考文献

【表 6 - 1】

1. Roth, G. A.; Huffman, M. D.; Moran, A. E.; Feigin, V.; Mensah, G. A.; Naghavi,

40

50

【表 6 - 2】

M.; Murray, C. J., Global and regional patterns in cardiovascular mortality from 1990 to 2013. *Circulation* **2015**, *132* (17), 1667-78.

2. Shepard, D.; VanderZanden, A.; Moran, A.; Naghavi, M.; Murray, C.; Roth, G., Ischemic Heart Disease Worldwide, 1990 to 2013: Estimates From the Global Burden of Disease Study 2013. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* **2015**, *8* (4), 455-6.

3. Feig, J. E.; Rong, J. X.; Shamir, R.; Sanson, M.; Vengrenyuk, Y.; Liu, J.; Rayner, K.; Moore, K.; Garabedian, M.; Fisher, E. A., HDL promotes rapid atherosclerosis regression in mice and alters inflammatory properties of plaque monocyte-derived cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2011**, *108* (17), 7166-71.

4. Yvan-Charvet, L.; Wang, N.; Tall, A. R., Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 transporters in cholesterol efflux and immune responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2010**, *30* (2), 139-43.

5. Lacko, A. G.; Sabnis, N. A.; Nagarajan, B.; McConathy, W. J., HDL as a drug and nucleic acid delivery vehicle. *Front Pharmacol* **2015**, *6*, 247.

6. Rosenson, R. S.; Brewer, H. B., Jr.; Chapman, M. J.; Fazio, S.; Hussain, M. M.; Kontush, A.; Krauss, R. M.; Otvos, J. D.; Remaley, A. T.; Schaefer, E. J., HDL measures, particle heterogeneity, proposed nomenclature, and relation to atherosclerotic cardiovascular events. *Clin Chem* **2011**, *57* (3), 392-410.

7. Kontush, A.; Chapman, M. J., Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. *Pharmacol Rev* **2006**, *58* (3), 342-74.

8. Simonsen, J. B., Evaluation of reconstituted high-density lipoprotein (rHDL) as a drug delivery platform - a detailed survey of rHDL particles ranging from biophysical properties to clinical implications. *Nanomedicine* **2016**, *12* (7), 2161-2179.

9. Cao, Y. N.; Xu, L.; Han, Y. C.; Wang, Y. N.; Liu, G.; Qi, R., Recombinant high-density lipoproteins and their use in cardiovascular diseases. *Drug Discov Today* **2017**, *22* (1), 180-185.

10. Andrews, J.; Janssan, A.; Nguyen, T.; Pisaniello, A. D.; Scherer, D. J.; Kastelein, J. J.; Merkely, B.; Nissen, S. E.; Ray, K.; Schwartz, G. G.; Worthley, S. G.; Keyserling, C.; Dasseux, J. L.; Butters, J.; Girardi, J.; Miller, R.; Nicholls, S. J., Effect of serial infusions of reconstituted high-density lipoprotein (CER-001) on coronary atherosclerosis: rationale and design of the CARAT study. *Cardiovasc Diagn Ther* **2017**, *7* (1), 45-51.

10

20

30

40

50

【表 6 - 3】

11. Kataoka, Y.; Andrews, J.; Duong, M.; Nguyen, T.; Schwarz, N.; Fendler, J.; Puri, R.; Butters, J.; Keyserling, C.; Paolini, J. F.; Dasseux, J. L.; Nicholls, S. J., Regression of coronary atherosclerosis with infusions of the high-density lipoprotein mimetic CER-001 in patients with more extensive plaque burden. *Cardiovasc Diagn Ther* **2017**, *7* (3), 252-263.

12. Keyserling, C. H.; Barbaras, R.; Benghozi, R.; Dasseux, J. L., Development of CER-001: Preclinical Dose Selection Through to Phase I Clinical Findings. *Clin Drug Investig* **2017**, *37* (5), 483-491.

13. Mendivil, C. O.; Furtado, J.; Morton, A. M.; Wang, L.; Sacks, F. M., Novel Pathways of Apolipoprotein A-I Metabolism in High-Density Lipoprotein of Different Sizes in Humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2016**, *36* (1), 156-65.

14. Thaxton, C. S.; Daniel, W. L.; Giljohann, D. A.; Thomas, A. D.; Mirkin, C. A., Templated Spherical High Density Lipoprotein Nanoparticles. **2009**.

15. Skajaa, T.; Cormode, D. P.; Falk, E.; Mulder, W. J.; Fisher, E. A.; Fayad, Z. A., High-density lipoprotein-based contrast agents for multimodal imaging of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2010**, *30* (2), 169-76.

16. Cormode, D. P.; Skajaa, T.; van Schooneveld, M. M.; Koole, R.; Jarzyna, P.; Lobatto, M. E.; Calcagno, C.; Barazza, A.; Gordon, R. E.; Zanzonico, P.; Fisher, E. A.; Fayad, Z. A.; Mulder, W. J., Nanocrystal core high-density lipoproteins: a multimodality contrast agent platform. *Nano Lett* **2008**, *8* (11), 3715-23.

17. Forte, T. M.; Nordhausen, R. W., Electron microscopy of negatively stained lipoproteins. *Methods Enzymol* **1986**, *128*, 442-57.

18. Luthi, A. J.; Lyssenko, N. N.; Quach, D.; McMahon, K. M.; Millar, J. S.; Vickers, K. C.; Rader, D. J.; Phillips, M. C.; Mirkin, C. A.; Thaxton, C. S., Robust passive and active efflux of cellular cholesterol to a designer functional mimic of high density lipoprotein. *Journal of lipid research* **2015**, *56* (5), 972-85.

19. Plebanek, M. P.; Mutharasan, R. K.; Volpert, O.; Matov, A.; Gatlin, J. C.; Thaxton, C. S., Nanoparticle Targeting and Cholesterol Flux Through Scavenger Receptor Type B-1 Inhibits Cellular Exosome Uptake. *Scientific reports* **2015**, *5*, 15724.

20. Cormode, D. P.; Roessler, E.; Thran, A.; Skajaa, T.; Gordon, R. E.; Schlomka, J. P.; Fuster, V.; Fisher, E. A.; Mulder, W. J.; Proksa, R.; Fayad, Z. A., Atherosclerotic plaque composition: analysis with multicolor CT and targeted gold nanoparticles. *Radiology* **2010**, *256* (3), 774-82.

10

20

30

40

50

【表 6 - 4】

21. McMahon, K. M.; Mutharasan, R. K.; Tripathy, S.; Veliceasa, D.; Bobeica, M.; Shumaker, D. K.; Luthi, A. J.; Helfand, B. T.; Ardehali, H.; Mirkin, C. A.; Volpert, O.; Thaxton, C. S., Biomimetic High Density Lipoprotein Nanoparticles For Nucleic Acid Delivery. **2011**.

22. Zhao, Y.; Imura, T.; Leman, L. J.; Curtiss, L. K.; Maryanoff, B. E.; Ghadiri, M. R., Mimicry of high-density lipoprotein: functional peptide-lipid nanoparticles based on multivalent peptide constructs. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135* (36), 13414-24. 10

23. Brouillette, C. G.; Jones, J. L.; Ng, T. C.; Kercret, H.; Chung, B. H.; Segrest, J. P., Structural studies of apolipoprotein A-I/phosphatidylcholine recombinants by high-field proton NMR, nondenaturing gradient gel electrophoresis, and electron microscopy. *Biochemistry* **1984**, *23* (2), 359-67.

24. Low, H.; Hoang, A.; Sviridov, D., Cholesterol efflux assay. *J Vis Exp* **2012**, (61), e3810. 20

25. Pandey, P.; Farha, O. K.; Spokoiny, A. M.; Mirkin, C. A.; Kanatzidis, M. G.; Hupp, J. T.; Nguyen, S. T., A "click-based" porous organic polymer from tetrahedral building blocks. *J Mater Chem* **2011**, *21* (6), 1700-1703.

26. Chan, Y. H.; van Lengerich, B.; Boxer, S. G., Lipid-anchored DNA mediates vesicle fusion as observed by lipid and content mixing. *Biointerphases* **2008**, *3* (2), FA17.

27. Hong, B. J.; Eryazici, I.; Bleher, R.; Thaner, R. V.; Mirkin, C. A.; Nguyen, S. T., Directed Assembly of Nucleic Acid-Based Polymeric Nanoparticles from Molecular Tetravalent Cores. *Journal of the American Chemical Society* **2015**, *137* (25), 8184-8191. 30

28. Luthi, A. J.; Lyssenko, N. N.; Quach, D.; McMahon, K. M.; Millar, J. S.; Vickers, K. C.; Rader, D. J.; Phillips, M. C.; Mirkin, C. A.; Thaxton, C. S., Robust passive and active efflux of cellular cholesterol to a designer functional mimic of high density lipoprotein. *Journal of lipid research* **2015**, *56* (5), 972-85.

【 0 1 4 3】

他の実施形態

本明細書で開示される特徴の全ては、任意の組み合わせにおいて組み合わせられ得る。本明細書で開示される各特徴は、同じ、等価な、または類似の目的に役立つ代替の特徴によって置き換えられ得る。従って、別段明示的に述べられなければ、開示される各特徴は、一般的な一連の等価なまたは類似の特徴の例に過ぎない。

【 0 1 4 4】

上述の説明から、当業者は、本発明の本質的な特徴を容易に確認し得、その趣旨および範囲から逸脱することなく、本発明を種々の使用法および条件に適合させるために、本発明に対して種々の変更および改変を行い得る。従って、他の実施形態もまた、特許請求の範囲内である。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 5 】

均等物

いくつかの本発明の実施形態が、本明細書で記載および例証されてきたが、当業者は、その機能を果たすならびに／または結果および／もしくは本明細書で記載される利点のうちの1もしくはこれより多くを得るために、種々の他の手段および／または構造を容易に想定し、このようなバリエーションおよび／または変更の各々は、本明細書で記載される発明の実施形態の範囲内であるとみなされる。より一般的には、当業者は、本明細書で記載される全てのパラメーター、寸法、材料、および構成は例示であることが意味され、実際のパラメーター、寸法、材料、および／または構成は、本発明の教示が使用される具体的適用に依存することを容易に認識する。当業者は、慣用的な実験のみを使用して、本明細書で記載される具体的な発明の実施形態に対する多くの均等物を認識するか、または確認し得る。従って、前述の実施形態が、例示によって示されるに過ぎず、添付の特許請求の範囲およびその均等物の範囲内で、発明の実施形態が、具体的に記載され、特許請求されるとおり以外の別の方法で実施され得ることは、理解されるべきである。本開示の発明の実施形態は、本明細書で記載される各個々の特徴、システム、物品、材料、キット、および／または方法に関する。さらに、2またはこれより多くのこのような特徴、システム、物品、材料、キット、および／または方法の任意の組み合わせは、このような特徴、システム、物品、材料、キット、および／または方法が互いに矛盾しなければ、本開示の発明の実施形態の発明の範囲内に含まれる。

10

【 0 1 4 6 】

全ての定義は、本明細書で定義および使用される場合、辞書の定義、参考として援用される文書中の定義、および／または定義される用語の通常の意味に対して優先されることは、理解されるべきである。

20

【 0 1 4 7 】

本明細書で開示される全ての参考文献、特許および特許出願は、各々が引用され、いくらかの場合には、その文書の全体を包含し得る主題に関して参考として援用される。

【 0 1 4 8 】

不定冠詞「1つの、ある(a)」および「1つの、ある(an)」は、本明細書および特許請求の範囲において使用される場合、明らかに逆に示されなければ、「少なくとも1(at least one)」を意味することが理解されるべきである。

30

【 0 1 4 9 】

語句「および／または(and/or)」は、本明細書および特許請求の範囲において使用される場合、そのように結合された要素の「いずれかまたは両方(either or both)」、すなわち、いくらかの場合には接続的に示され、他の場合には離節的に示される要素を意味することが理解されるべきである。「および／または」とともに列挙される多数の要素は、同じ様式において、すなわち、そのように結合された要素の「1またはこれより多くの(one or more)」と解釈されるべきである。他の要素は、「および／または」の文節によって具体的に特製される要素以外に、それらの具体的に特定される要素に関連しようが関連しまいが、必要に応じて存在し得る。従って、非限定的な例として、「Aおよび／またはB」への言及は、「含む、包含する(comprising)」のような制限のない文言とともに使用される場合、1つの実施形態では、Aのみ(必要に応じて、B以外の要素を含む)に；別の実施形態では、Bのみ(必要に応じて、A以外の要素を含む)に；さらに別の実施形態では、AおよびBの両方(必要に応じて、他の要素を含む)に；他に言及し得る。

40

【 0 1 5 0 】

本明細書および特許請求の範囲において使用される場合、「または(or)」は、上記で定義されるとおりの「および／または」と同じ意味を有することが理解されるべきである。例えば、リストの中の項目を分離する場合、「または」または「および／または」は、包括的、すなわち、多くの要素または要素のリスト、および必要に応じて、さらなる列挙されない項目のうちの少なくとも1を含むが、1より多くをも含むとして解釈されるも

50

のとする。「のうちの1つのみ (only one of) 」もしくは「のうちの正確に1つ (exactly one of) 」、または特許請求の範囲の中で使用される場合、「からなる (consisting of) 」のような、逆を明らかに示す用語のみが、多くの要素または要素のリストのうちの正確に1つの要素を含むことに言及する。概して、用語「または」は、本明細書で使用される場合、「いずれか (either) 」、「のうちの1つ (one of) 」、「のうちの1つのみ」または「のうちの正確に1つ」のような排他性の用語が先立つ場合、排他的な代替物 (すなわち、「一方または他方であるが、両方ではない (one or the other but not both) 」) を示すとして解釈されるに過ぎないものとする。「から本質的になる (consisting essentially of) 」は、特許請求の範囲の中で使用される場合、特許法の分野で使用されるとおりのその通常の意味を有するものとする。

10

【0151】

本明細書および特許請求の範囲において使用される場合、語句「少なくとも1」は、1またはこれより多くの要素のリストに言及して、要素のリストの中の要素のうちのいずれか1つまたはこれより多くから選択される少なくとも1つの要素を意味するが、要素のリスト内に具体的に列挙される各々および全ての要素のうちの少なくとも1つを必ずしも含むわけではなく、要素のリストの中の要素の任意の組み合わせを排除しないことを意味することが理解されるべきである。この定義はまた、語句「少なくとも1」が言及する要素のリスト内で具体的に同定される要素以外の要素が、それら具体的に特定される要素に関連しようが関連しまいが、必要に応じて存在し得ることを可能にする。従って、非限定的な例として、「AおよびBのうちの少なくとも1つ」(または等しくは、「AまたはBのうちの少なくとも1つ」)、または等しくは、「Aおよび/またはBのうちの少なくとも1つ」) は、1つの実施形態において、少なくとも1つの (必要に応じて、1より多くを含む) A、Bは存在しない (および必要に応じて、B以外の要素を含む) に; 別の実施形態において、少なくとも1つの (必要に応じて、1より多くを含む) B、Aは存在しない (および必要に応じて、A以外の要素を含む) に; さらに別の実施形態において、少なくとも1つの (必要に応じて、1より多くを含む) Aおよび少なくとも1つの (必要に応じて、1より多くを含む) B (必要に応じて、他の要素を含む) に; 他に言及し得る。

20

【0152】

明確に逆に示されなければ、1より多くの工程または行為を含む本明細書で特許請求される任意の方法において、上記方法の工程または行為の順序は、上記方法の工程または行為が記載される順序に必ずしも限定されないことがまた、理解されるべきである。

30

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目1)

球状高密度リポタンパク質ナノ粒子 (HDL-NP) であって、コアおよび前記コアを取り囲みかつそれに付着したシェルを含み、ここで前記コアは、脂質結合体化有機性コア足場を含む、HDL-NP。

(項目2)

前記シェルは、脂質シェルである、項目1に記載の球状HDL-NP。

(項目3)

前記シェルは、脂質二重層または単層である、項目1~2のいずれか1項に記載の球状HDL-NP。

40

(項目4)

前記球状HDL-NPは、約-20ミリボルト (mV) の表面電位を有する、項目1~3のいずれか1項に記載の球状HDL-NP。

(項目5)

前記有機性コア足場は、疎水性低分子-リン脂質結合体 (PL₄) を含む、項目1~4のいずれか1項に記載の球状HDL-NP。

(項目6)

前記PL₄は、ヘッド基改変リン脂質を含む、項目5に記載の球状HDL-NP。

50

(項目7)

前記ヘッド基改変リン脂質は、環ひずみアルキン、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-ジベンゾシクロオクチルを含む、項目6に記載の球状HDL-NP。

(項目8)

前記リン脂質は、複数の末端官能基を有する前記低分子にカップリングされる、項目6~7のいずれか1項に記載の球状HDL-NP。

(項目9)

前記低分子は、テトラキス(4-アジドフェニル)メタンである、項目8に記載の球状HDL-NP。

10

(項目10)

前記複数の官能基は、2~6個の官能基である、項目8または9に記載の球状HDL-NP。

(項目11)

前記複数の官能基は、4個の官能基である、項目8または9に記載の球状HDL-NP。

(項目12)

前記官能基は、末端アジド(SM-Az)である、項目8~11のいずれか1項に記載の球状HDL-NP。

(項目13)

前記有機性コア足場は、両親媒性DNA連結低分子-リン脂質結合体(DNA-PL₄)を含む、項目1~4のいずれか1項に記載の球状HDL-NP。

20

(項目14)

前記DNAは、5~17ヌクレオチド長の2本鎖オリゴヌクレオチドである、項目13に記載の球状HDL-NP。

(項目15)

前記DNAは、8~15ヌクレオチド長の2本鎖オリゴヌクレオチドである、項目13に記載の球状HDL-NP。

(項目16)

前記DNAは、9ヌクレオチド長の2本鎖オリゴヌクレオチドである、項目13に記載の球状HDL-NP。

30

(項目17)

前記2本鎖DNAの第1の1本鎖は、リン脂質に連結され、ssDNA-リン脂質結合体(ssDNA-PL)を形成する、項目13~16のいずれか1項に記載の球状HDL-NP。

(項目18)

前記2本鎖DNAの前記第1鎖に相補的な前記2本鎖DNAの第2鎖は、低分子に連結される、項目17に記載の球状HDL-NP。

(項目19)

前記低分子は、四面体低分子であり、前記DNAに連結された前記低分子は、四面体低分子-DNAハイブリッド(SMDH₄)を形成する、項目18に記載の球状HDL-NP。

40

(項目20)

前記SMDH₄は、前記DNAの相補的な1本鎖の間の水素結合を介して前記ssDNA-PLに連結される、項目19に記載の球状HDL-NP。

(項目21)

前記球状HDL-NPは、約5~30nm、5~20nm、5~15nm、5~10nm、8~13nm、8~12nm、または10nmの直径を有する、項目1~20のいずれか1項に記載の球状HDL-NP。

(項目22)

前記球状HDL-NPは、金コアを有する合成HDLナノ粒子よりヒトHDLに近い

50

電位を有する、項目 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載の球状 H D L - N P。

(項目 2 3)

前記 電位は、 - 1 6 ~ - 2 6 m V である、項目 2 2 に記載の球状 H D L - N P。

(項目 2 4)

前記球状 H D L - N P は、アポリタンパク質または金コアを有する合成 H D L ナノ粒子のものより効率的なコレステロール輸送能を有する、項目 1 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載の球状 H D L - N P。

(項目 2 5)

アポリタンパク質をさらに含む、項目 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の球状 H D L - N P。

10

(項目 2 6)

アポリタンパク質 A - I (A p o A 1) をさらに含む、項目 1 ~ 2 5 のいずれか 1 項に記載の球状 H D L - N P。

(項目 2 7)

前記 H D L - N P は、 8 . 7 n m より大きい流体力学的直径を有する、項目 1 ~ 2 6 のいずれか 1 項に記載の球状 H D L - N P。

(項目 2 8)

前記 H D L - N P は、 8 . 7 n m ~ 1 7 . 7 n m の流体力学的直径を有する、項目 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の球状 H D L - N P。

(項目 2 9)

前記 H D L - N P は、 1 0 n m ~ 1 5 n m の流体力学的直径を有する、項目 1 ~ 2 8 のいずれか 1 項に記載の球状 H D L - N P。

20

(項目 3 0)

前記 H D L - N P は、 1 2 n m ~ 1 4 n m の流体力学的直径を有する、項目 1 ~ 2 9 のいずれか 1 項に記載の球状 H D L - N P。

(項目 3 1)

前記 H D L - N P に連結された治療剤をさらに含む、項目 1 ~ 3 0 のいずれか 1 項に記載の球状 H D L - N P。

(項目 3 2)

前記治療剤は、治療用核酸である、項目 3 1 に記載の球状 H D L - N P。

30

(項目 3 3)

前記治療剤は、抗がん剤である、項目 3 1 に記載の球状 H D L - N P。

(項目 3 4)

前記抗がん剤は、化学療法剤である、項目 3 3 に記載の球状 H D L - N P。

(項目 3 5)

前記治療剤は、抗炎症剤である、項目 3 1 に記載の球状 H D L - N P。

(項目 3 6)

項目 1 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載の球状 H D L - N P を含む、薬学的組成物。

(項目 3 7)

がんを処置するための方法であって、前記方法は、

40

がんを有する被験体に、コアおよび前記コアを取り囲みかつそれに付着したシェルを含む球状高密度リポタンパク質ナノ粒子 (H D L - N P) を投与する工程であって、ここで前記コアは、前記がんを処置するために有効な量で脂質結合体化有機性コア足場を含む、工程、

を包含する、方法。

(項目 3 8)

炎症性障害を処置する方法であって、前記方法は、

炎症性障害を有する被験体に、コアおよび前記コアを取り囲みかつそれに付着したシェルを含む球状高密度リポタンパク質ナノ粒子 (H D L - N P) を投与する工程であって、ここで前記コアは、前記炎症性障害を処置するために有効な量で脂質結合体化有機性コア

50

足場を含む、工程、
を包含する、方法。

(項目 39)

前記球状 HDL - NP は、項目 1 ~ 35 のいずれか 1 項に記載の球状 HDL - NP である、項目 37 または 38 に記載の方法。

(項目 40)

前記被験体は、哺乳動物である、項目 37 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 41)

前記被験体は、ヒトである、項目 40 に記載の方法。

(項目 42)

NF - κB 活性を低減する方法であって、前記方法は、被験体に、有効量の、項目 1 ~ 35 のいずれか 1 項に記載の球状 HDL - NP を含む組成物を投与する工程を包含する、方法。

(項目 43)

球状高密度リポタンパク質ナノ粒子 (HDL - NP) を作製するための方法であって、前記方法は：

ssDNA - リン脂質結合体 (ssDNA - PL) を調製する工程、

四面体低分子 - DNA ハイブリッド (SMDH₄) を調製する工程であって、ここで前記 ssDNA - PL および SMDH₄ は、相補的 DNA 配列を有する、工程、

前記 ssDNA - PL および SMDH₄ を、前記相補的 DNA 配列が互いに塩基対合して、DNA - PL コアを形成するようにインキュベートする工程、ならびに前記 DNA - PL コアにリン脂質リポソームおよびアポリポタンパク質に添加して、前記球状 HDL - NP を生成する工程、

を包含する、方法。

(項目 44)

前記 ssDNA - PL は、少なくとも 9 ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む、項目 43 に記載の方法。

(項目 45)

前記オリゴヌクレオチドは、9 ヌクレオチド長である、項目 44 に記載の方法。

(項目 46)

前記オリゴヌクレオチドは、配列番号 1 を含む、項目 45 に記載の方法。

(項目 47)

前記 SMDH₄ は、少なくとも 9 ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む、項目 43 に記載の方法。

(項目 48)

前記オリゴヌクレオチドは、9 ヌクレオチド長である、項目 47 に記載の方法。

(項目 49)

前記オリゴヌクレオチドは、配列番号 3 を含む、項目 48 に記載の方法。

(項目 50)

前記アポリポタンパク質は、アポリポタンパク質 A - I である、項目 43 ~ 49 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 51)

4 個の末端アジドを有する四面体低分子コア (テトラキス (4 - アジドフェニル) メタン) に連結された 1, 2 - ジバルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - ジベンゾシクロオクチル (DBCO PE) を含む、有機性コア足場。

10

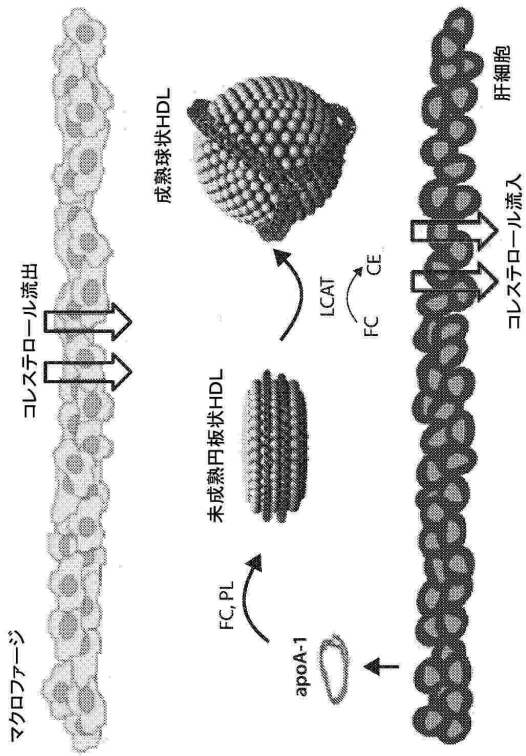
20

30

40

50

【図面】
【図 1】



【図 2 - 1】

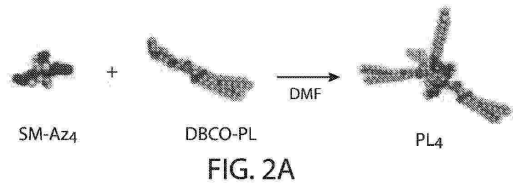


FIG. 2A

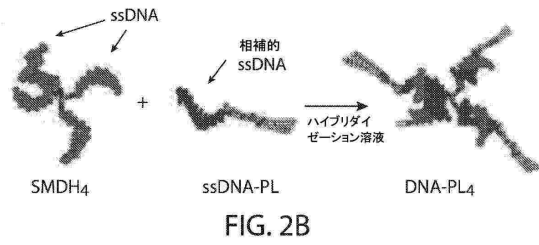


FIG. 2B

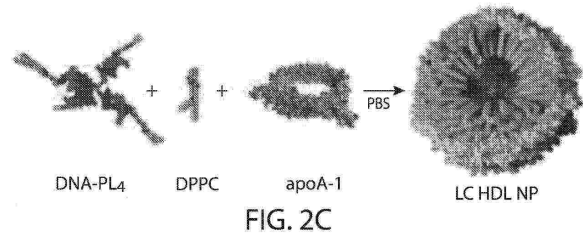


FIG. 2C

FIG. 1

10

20

【図 2 - 2】

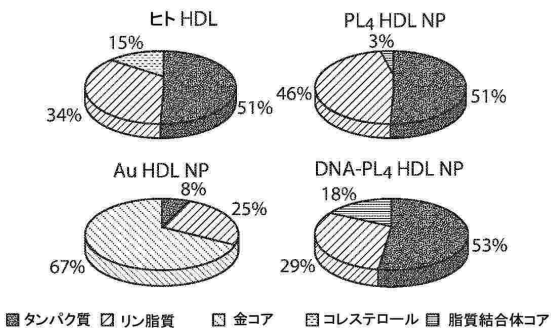


FIG. 2D

【図 2 - 3】

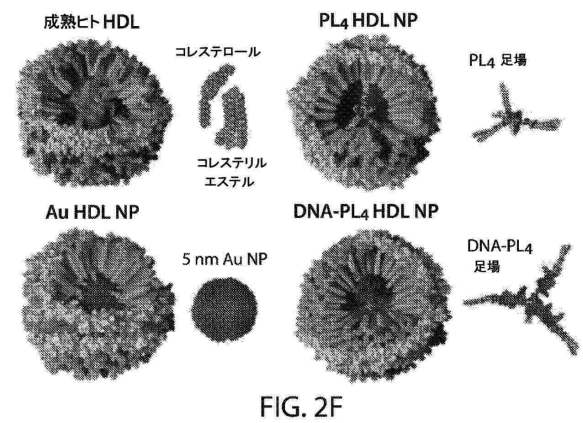


FIG. 2F

30

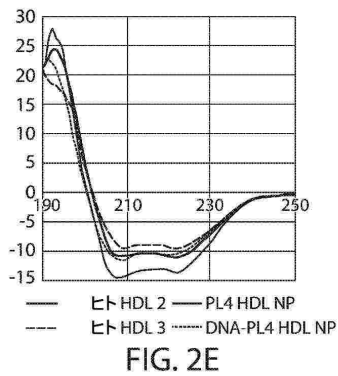


FIG. 2E

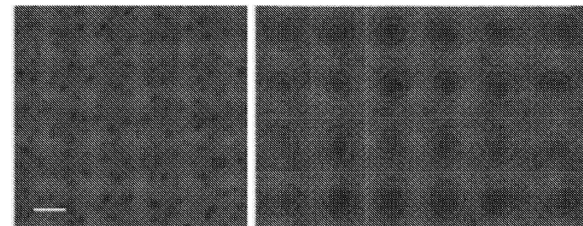


FIG. 2G

40

50

【 図 2 - 4 】

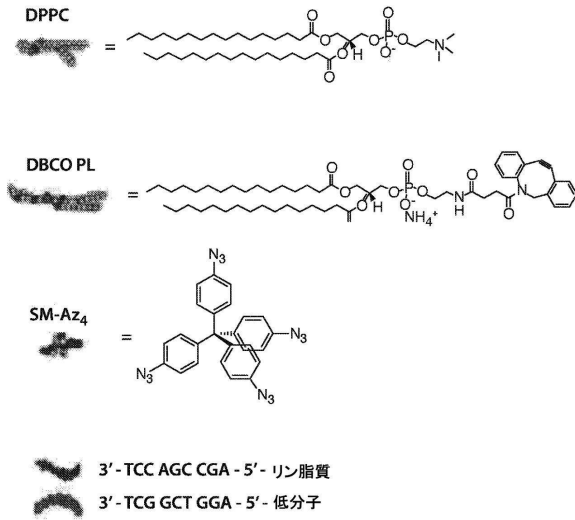
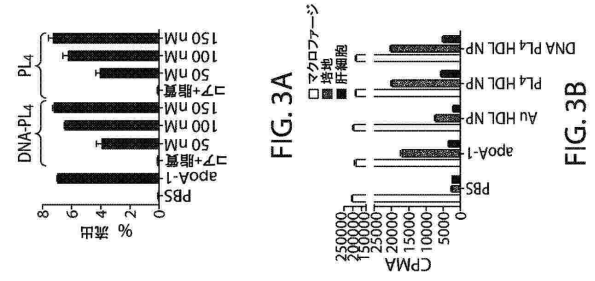
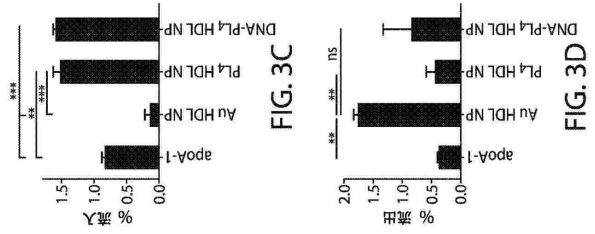
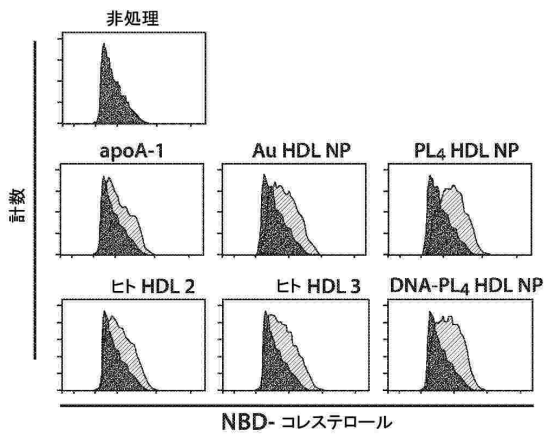
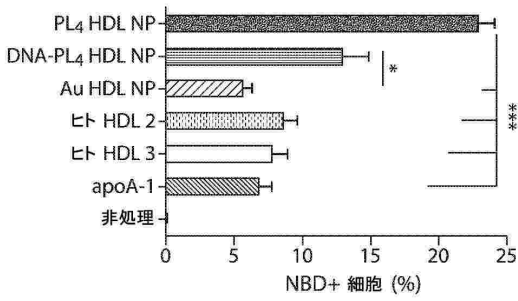


FIG. 2G
続き

【 図 3 】



【 図 4 - 1 】



【 図 4 - 2 】

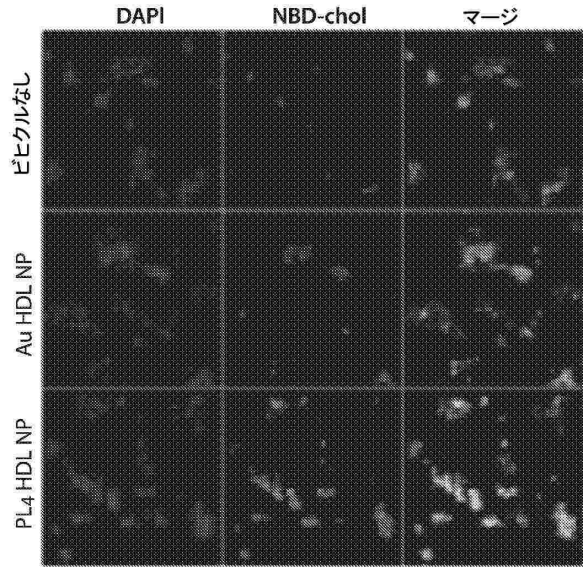


FIG. 4C

10

20

30

40

50

【 図 5 】

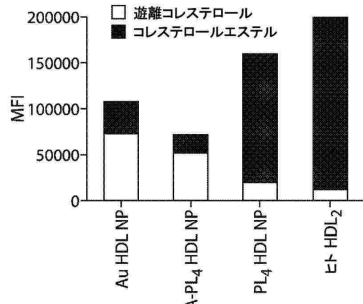


FIG. 5A

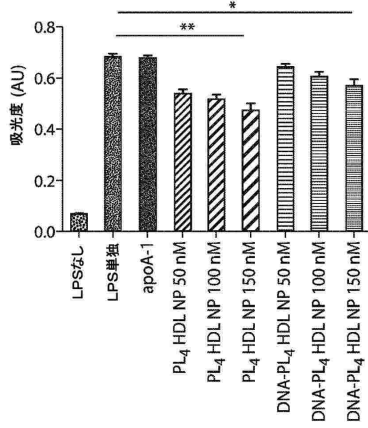


FIG. 5B

【 図 6 】

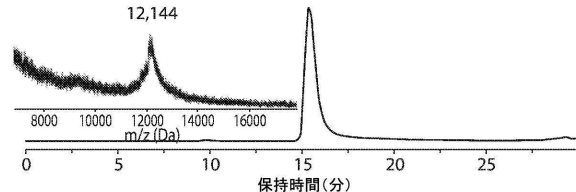


FIG. 6

10

【 図 7 】

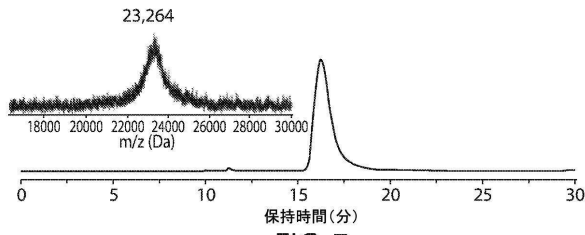


FIG. 7

【 図 8 】

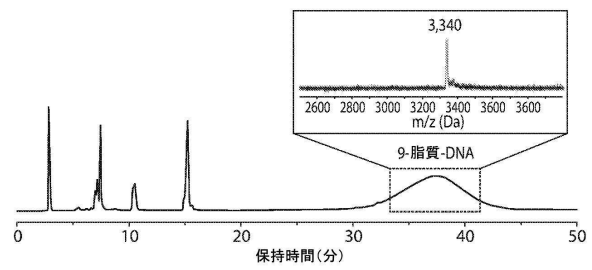


FIG. 8

20

30

40

50

【 図 9 】

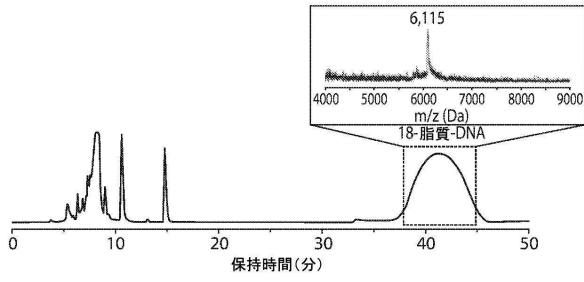


FIG. 9

【 図 10 】

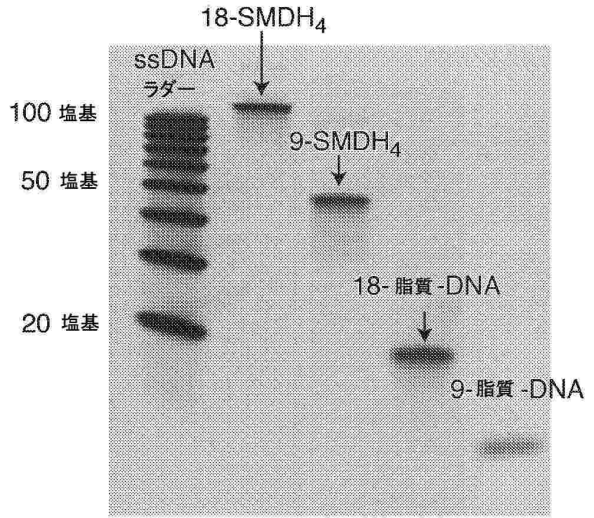
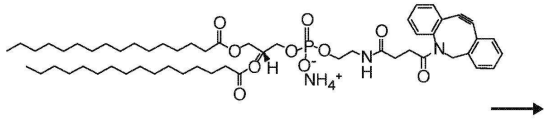
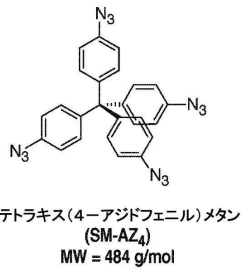


FIG. 10

【 図 11 - 1 】



1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-ジベンゾシクロオクチル (DBCO PL) MW = 996 g/mol

FIG. 11

【 図 11 - 2 】

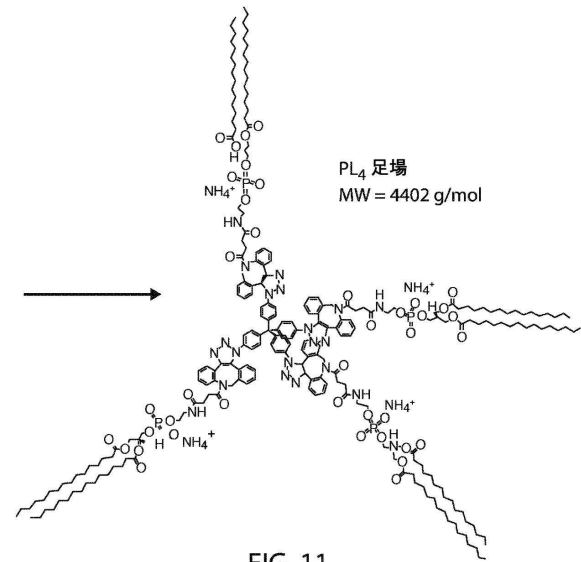


FIG. 11
続き

10

20

30

40

50

【 1 2 】

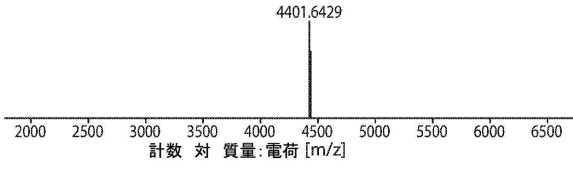


FIG. 12

【 1 3 】

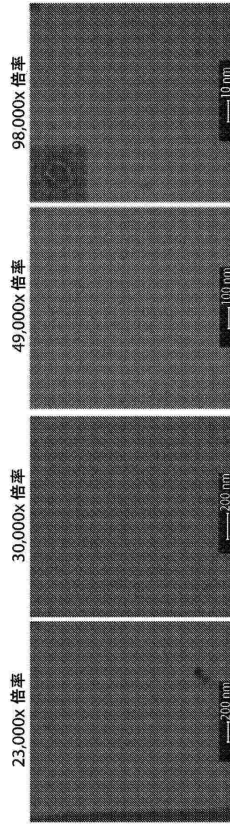


FIG. 13

10

20

【 1 4 】

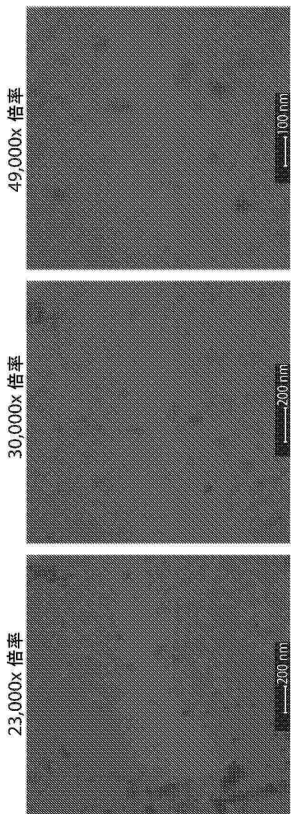


FIG. 14

【 1 5 】

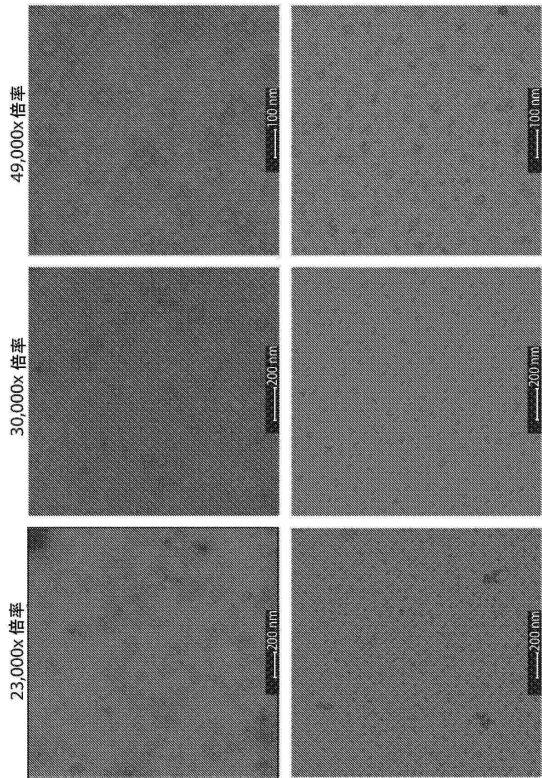


FIG. 15

30

40

50

【 図 16 】

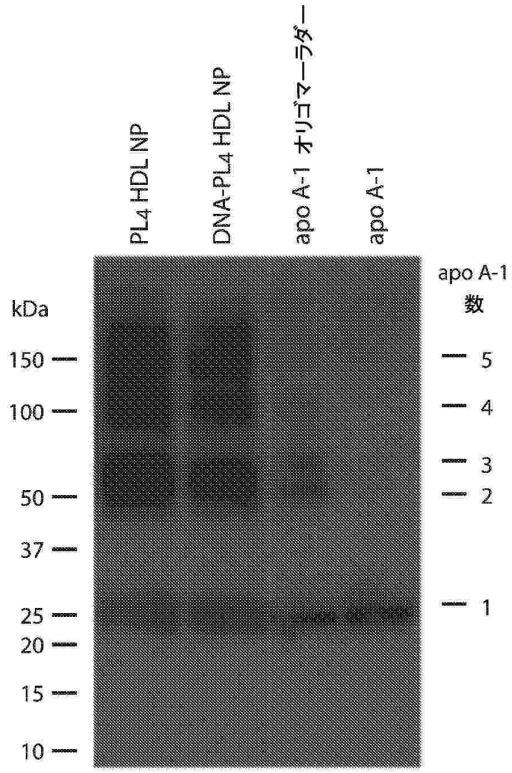


FIG. 16

【 配列表 】

[0007546927000001.app](#)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	47/64 (2017.01)	A 6 1 K	47/64	
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 K	47/24 (2006.01)	A 6 1 K	47/24	
C 0 7 K	17/02 (2006.01)	C 0 7 K	17/02	
C 0 7 K	14/775(2006.01)	C 0 7 K	14/775	
C 1 2 N	15/11 (2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z
C 1 2 N	15/88 (2006.01)	C 1 2 N	15/88	Z
A 6 1 K	9/51 (2006.01)	A 6 1 K	9/51	Z N A

(72)発明者 ヘンリック, スティーブン イー.

アメリカ合衆国 イリノイ 6 0 6 5 7, シカゴ, ダブリュー. ブライアー プレイス 5 4 0

(72)発明者 タックストン, シー. シャド

アメリカ合衆国 イリノイ 6 0 6 1 4, シカゴ, エヌ. ジャンスセン 2 4 3 1

(72)発明者 グエン, ソンピン ティー.

アメリカ合衆国 イリノイ 6 0 2 0 8, エヴァンストン, クラーク ストリート 6 3 3

(72)発明者 ホン, ボン ジン

アメリカ合衆国 イリノイ 6 0 2 0 1, エヴァンストン, ハンプトン パークウェイ 2 7 4 0, アpartment エイチ2

審査官 井上 政志

(56)参考文献 特表平06-500795(JP,A)

特表2015-513543(JP,A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 1 / 3 2 7

A 6 1 K 3 1 / 3 3 - 3 1 / 8 0

A 6 1 K 3 3 / 0 0 - 3 3 / 4 4

A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 6 9

A 6 1 K 9 / 0 0 - 9 / 7 2

A 6 1 P 1 / 0 0 - 4 3 / 0 0