

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7725042号
(P7725042)

(45)発行日 令和7年8月19日(2025.8.19)

(24)登録日 令和7年8月8日(2025.8.8)

(51)Int. Cl.		F I
A 6 1 K 31/713	(2006. 01)	A 6 1 K 31/713
A 6 1 P 35/00	(2006. 01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 35/02	(2006. 01)	A 6 1 P 35/02
A 6 1 K 48/00	(2006. 01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 K 47/26	(2006. 01)	A 6 1 K 47/26

請求項の数 14 (全 49 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2025-515487(P2025-515487)
 (86)(22)出願日 令和6年5月17日(2024. 5. 17)
 (86)国際出願番号 PCT/JP2024/018410
 (87)国際公開番号 W02024/242065
 (87)国際公開日 令和6年11月28日(2024. 11. 28)
 審査請求日 令和7年3月12日(2025. 3. 12)
 (31)優先権主張番号 特願2023-82728(P2023-82728)
 (32)優先日 令和5年5月19日(2023. 5. 19)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 日本国(JP)

早期審査対象出願

(73)特許権者 503360115
 国立研究開発法人科学技術振興機構
 埼玉県川口市本町四丁目1番8号
 (74)代理人 110001612
 弁理士法人きさらぎ国際特許事務所
 (72)発明者 宮本 寛子
 愛知県豊田市八草町八千草1247 愛知
 工業大学 工学部 応用化学科内
 (72)発明者 北出 幸夫
 愛知県豊田市八草町八千草1247 愛知
 工業大学 工学部 応用化学科内
 (72)発明者 赤尾 幸博
 岐阜県岐阜市柳戸1番1 国立大学法人東
 海国立大学機構 岐阜大学大学院 連合創
 業医療情報研究科内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】造血管腫瘍治療用組成物、造血管腫瘍治療用医薬、及び造血管腫瘍における癌化細胞の増殖抑制用組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

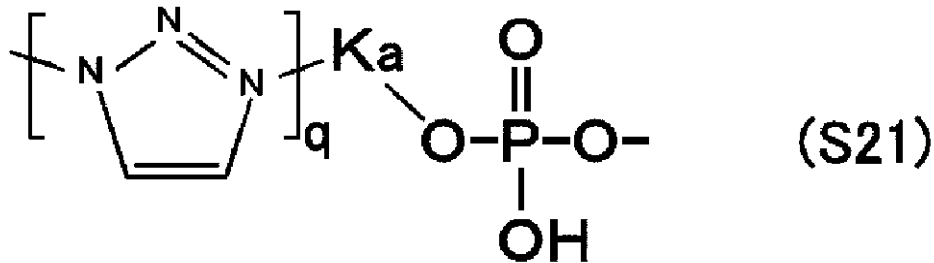
下記式(1)で表される核酸アナログと、がん遺伝子KRASのネットワークを制御するマイクロRNAからなり、miR-143又は下記のSEQ-1~SEQ-23から選択される送達対象核酸と、が静電相互作用により会合した会合構造を有することを特徴とする核酸送達用構造体を含む造血管腫瘍治療用組成物。

【化1】



(ここで、Nはカチオン性人工核酸、Hは親水性重合体であってポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリグルタミン酸、ポリビニルピロリドン、ポリアクリルアミド、ポリエチレンイミン、ポリアルキルアクリレート、ポリオキサゾリン、ポリアクリルアミド、ポリ(カルボキシベタインメタクリレート)、ポリ(スルホベタインメタクリレート)、ポリ(2-メタアクリロイルオキシエチルホスホコリン)、ヒアルロン酸、キトサン及びデキストラン並びにポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリグルタミン酸、ポリビニルピロリドン、ポリアクリルアミド、ポリエチレンイミン、ポリアルキルアクリレート、ポリオキサゾリン、ポリアクリルアミド、ポリ(カルボキシベタインメタクリレート)、ポリ(スルホベタインメタクリレート)、ポリ(2-メタアクリロイ

ルオキシエチルホスホコリン)、ヒアルロン酸、キトサン及びデキストランのいずれかのリン酸エステルから選択され、S 1はエステル結合、エーテル結合、ジスルフィド結合、ホスホロアミド、リン酸ジエステルのいずれかから選択され、S 2はリン酸ジエステル結合、又は下記式(S 2 1)に示すトリアゾールを含むリン酸ジエステル結合であり、
【化 8】



(式中、K aは炭素数1～20のメチレン基を含むアミド結合、炭素数6～12の芳香族を含む化合物、又は直接結合を表し、q = 0又は1であり、q = 0のときK aはリガンドと結合する。)

Lはリガンドを表し、グルコース、マンノース、ガラクトース、スクロース、マルトース、ラクトースから選択され、sは0又は1、tは0又は1を表し、

Nは、リボース及びデオキシリボースから選択される環構造に塩基が結合した構成単位と、2つの前記構成単位の間を連結する、カチオン性基を有する連結構造と、を有し、

該カチオン性人工核酸は、前記送達対象核酸のリン酸基と前記カチオン性基との静電相互作用により会合しうる。)

【表1】

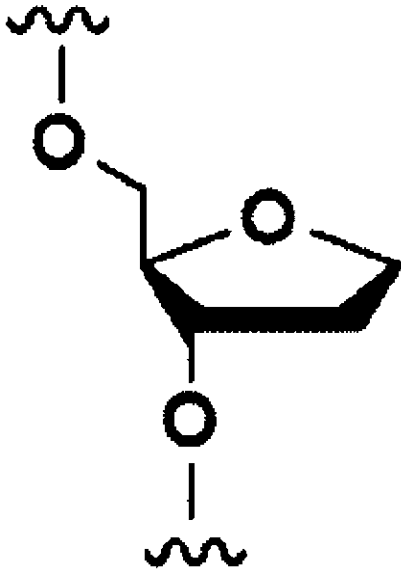
	鎖の名称		5'末端の修飾	オリゴヌクレオチド (5'→3')	3'末端の修飾
SEQ-1	センス鎖	S-1		U*G*A*G*G*U*G*C*A*G*U*G*C*U*G*C*A* U*C*U*C*U*G*G	
	アンチセンス鎖	AS-4		U ^r G _m [^] A ^r G _m [*] A ^r U _m [*] G ^r A _m [*] A ^r G _m [*] C ^r A _m [*] *C ^r U _m [*] G ^r U _m [*] A ^r G _m [*] C ^r U _m [*] C ^r A _m [*]	^dT^dT
SEQ-2	センス鎖	S-1		U*G*A*G*G*U*G*C*A*G*U*G*C*U*G*C*A* U*C*U*C*U*G*G	
	アンチセンス鎖	AS-7	・P(O)(OH) ₂	U ^r G _m [^] A ^r G _m [*] A ^r U _m [*] G ^r A _m [*] A ^r G _m [*] C ^r A _m [*] *C ^r U _m [*] G ^r U _m [*] A ^r G _m [*] C ^r U _m [*] C ^r A _m [*]	^dT^dT
SEQ-3	センス鎖	S-17		U ^r G [^] A*G*G*U ^r G*C ^r A*G*U ^r G*C ^r U ^r G*C ^r *A*U ^r C ^r U ^r C ^r U ^r G*G	
	アンチセンス鎖	AS-4		U ^r G _m [^] A ^r G _m [*] A ^r U _m [*] G ^r A _m [*] A ^r G _m [*] C ^r A _m [*] *C ^r U _m [*] G ^r U _m [*] A ^r G _m [*] C ^r U _m [*] C ^r A _m [*]	
SEQ-4	センス鎖	S-1		U*G*A*G*G*U*G*C*A*G*U*G*C*U*G*C*A* U*C*U*C*U*G*G	
	アンチセンス鎖	AS-30		U _m [^] G _m [^] A _m [^] G _m [^] A _m [*] U _m [*] G _m [*] A _m [*] A _m [*] G _m [*] C _m [*] A _m [*] U _m [*] G _m [*] U _m [*] A _m [*] G _m [*] U _m [*] C _m [*] A _m [*]	^dT^dT
SEQ-5	センス鎖	S-1		U*G*A*G*G*U*G*C*A*G*U*G*C*U*G*C*A* U*C*U*C*U*G*G	
	アンチセンス鎖	AS-31		U ^r G ^r A ^r G _m [*] A _m [*] U _m [*] G ^r A ^r A ^r G _m [*] C _m [*] A _m [*] C ^r U ^r G ^r U _m [*] A _m [*] G _m [*] C ^r U ^r C ^r A _m [*]	^dT^dT
SEQ-6	センス鎖	S-17		U ^r G [^] A*G*G*U ^r G*C ^r A*G*U ^r G*C ^r U ^r G*C ^r *A*U ^r C ^r U ^r C ^r U ^r G*G	
	アンチセンス鎖	AS-3		U ^r G [^] A*G*A*U ^r G*A*A*G*C ^r A*C ^r U ^r G*U ^r A*G*C ^r U ^r C ^r A	^dT^dT
SEQ-7	センス鎖	S-17		U ^r G [^] A*G*G*U ^r G*C ^r A*G*U ^r G*C ^r U ^r G*C ^r *A*U ^r C ^r U ^r C ^r U ^r G*G	
	アンチセンス鎖	AS-10		U ^r G _m [^] A ^r G _m [*] A ^r U _m [*] G ^r A _m [*] A ^r G _m [*] C ^r A _m [*] *C ^r U _m [*] G ^r U _m [*] A ^r G _m [*] C ^r U _m [*] C ^r A _m [*]	^dG^dG
SEQ-8	センス鎖	S-18		U _m [^] G [^] A*G*G*U _m [*] G _m [*] C _m [*] A _m [*] G _m [*] U _m [*] G _m [*] C _m [*] U _m [*] G _m [*] C _m [*] A _m [*] U _m [*] C _m [*] U _m [*] C _m [*] U _m [*] G*G	
	アンチセンス鎖	AS-12		U ^r G _m [^] A ^r G _m [*] A ^r U _m [*] G ^r A _m [*] A ^r G _m [*] C ^r A _m [*] C ^r U _m [*] *G ^r U _m [*] A ^r G _m [*] C ^r U _m [*] C ^r A _m [*]	^G _m ^G _m
SEQ-9	センス鎖	S-18		U _m [^] G [^] A*G*G*U _m [*] G _m [*] C _m [*] A _m [*] G _m [*] U _m [*] G _m [*] C _m [*] U _m [*] G _m [*] C _m [*] A _m [*] U _m [*] C _m [*] U _m [*] C _m [*] U _m [*] G*G	
	アンチセンス鎖	AS-13		U ^r G _m [^] A ^r G _m [*] A ^r U _m [*] G ^r A _m [*] A ^r G _m [*] C ^r A _m [*] C ^r U _m [*] *G ^r U _m [*] A ^r G _m [*] C ^r U _m [*] C ^r A _m [*]	^G _r ^G _r
SEQ-10	センス鎖	S-19		U ^r G [^] A*G*G*U ^r G*C ^r A*G*U ^r G*C ^r U ^r G*C ^r A*U ^r C ^r U ^r C ^r U ^r G*G	
	アンチセンス鎖	AS-3		U ^r G [^] A*G*A*U ^r G*A*A*G*C ^r A*C ^r U ^r G*U ^r A*G*C ^r U ^r C ^r A	^dT^dT
SEQ-11	センス鎖	S-1		U*G*A*G*G*U*G*C*A*G*U*G*C*U*G*C*A* U*C*U*C*U*G*G	
	アンチセンス鎖	AS-42	VP-	U _m [^] G _m [^] A ^r G _m [*] A ^r U _m [*] G ^r A _m [*] A ^r G _m [*] C ^r A _m [*] C ^r U _m [*] G ^r U _m [*] A ^r G _m [*] C ^r U _m [*] C ^r A _m [*]	^dT^dT
SEQ-12	センス鎖	S-1		U*G*A*G*G*U*G*C*A*G*U*G*C*U*G*C*A* U*C*U*C*U*G*G	
	アンチセンス鎖	AS-47		U ^r G _m [^] A ^r G _m [*] A ^r U _m [*] G ^r A _m [*] A ^r G _m [*] C ^r A _m [*] C ^r U _m [*] G ^r U _m [*] A ^r G _m [*] C ^r U _m [*] Ab*Ab	^dT^dT

【表2】

	鎖の名称		5'末端の修飾	オリゴヌクレオチド (5'→3')	3'末端の修飾
SEQ-13	センス鎖	S-18		$U_m^*G^*A^*G^*G^*U_m^*G^*C_m^*A^*G^*U_m^*G^*C_m^*U_m^*G^*C_m^*A^*U_m^*C_m^*U_m^*C_m^*U_m^*G^*G$	
	アンチセンス鎖	AS-47		$U_r^*G_m^*A_r^*G_m^*A_r^*U_m^*G_r^*A_m^*A_r^*G_m^*C_r^*A_m^*C_r^*U_m^*G_r^*U_m^*A_r^*G_m^*C_r^*U_m^*A_b^*A_b$	$^*dT^*dT$
SEQ-14	センス鎖	S-1		$U^*G^*A^*G^*G^*U^*G^*C^*A^*G^*U^*G^*C^*U^*G^*C^*A^*U^*C^*U^*C^*U^*G^*G$	
	アンチセンス鎖	AS-50	$\cdot P(O)(OH)_2$	$U_r^*G_m^*A_r^*G_m^*A_r^*U_m^*G_r^*A_m^*A_r^*G_m^*C_r^*A_m^*C_r^*U_m^*G_r^*U_m^*A_r^*G_m^*C_r^*U_m^*C_r^*A_m$	$^*dG^*dG$
SEQ-15	センス鎖	S-1		$U^*G^*A^*G^*G^*U^*G^*C^*A^*G^*U^*G^*C^*U^*G^*C^*A^*U^*C^*U^*C^*U^*G^*G$	
	アンチセンス鎖	AS-51	$\cdot P(O)(OH)_2$	$U_r^*G_m^*A_r^*G_m^*A_r^*U_m^*G_r^*A_m^*A_r^*G_m^*C_r^*A_m^*C_r^*U_m^*G_r^*U_m^*A_r^*G_m^*C_r^*U_m^*C_r^*A_m$	$^*G_m^*^*G_m$
SEQ-16	センス鎖	S-1		$U^*G^*A^*G^*G^*U^*G^*C^*A^*G^*U^*G^*C^*U^*G^*C^*A^*U^*C^*U^*C^*U^*G^*G$	
	アンチセンス鎖	AS-52	$\cdot P(O)(OH)_2$	$U_r^*G_m^*A_r^*G_m^*A_r^*U_m^*G_r^*A_m^*A_r^*G_m^*C_r^*A_m^*C_r^*U_m^*G_r^*U_m^*A_r^*G_m^*C_r^*U_m^*C_r^*A_m$	$^*G_r^*^*G_r$
SEQ-17	センス鎖	S-1		$U^*G^*A^*G^*G^*U^*G^*C^*A^*G^*U^*G^*C^*U^*G^*C^*A^*U^*C^*U^*C^*U^*G^*G$	
	アンチセンス鎖	AS-55	$\cdot P(O)(OH)_2$	$U_r^*G_r^*A_r^*G_m^*A_m^*U_m^*G_r^*A_r^*A_r^*G_m^*C_m^*A_m^*C_r^*U_r^*G_r^*U_m^*A_m^*G_m^*C_r^*U_r^*C_r^*A_r$	$^*dT^*dT$
SEQ-18	センス鎖	S-1		$U^*G^*A^*G^*G^*U^*G^*C^*A^*G^*U^*G^*C^*U^*G^*C^*A^*U^*C^*U^*C^*U^*G^*G$	
	アンチセンス鎖	AS-56	$\cdot P(O)(OH)_2$	$U_r^*G_m^*A_r^*G_m^*A_r^*U_m^*G_r^*A_m^*A_r^*G_m^*C_r^*A_m^*C_r^*U_m^*G_r^*U_m^*A_r^*G_m^*C_r^*U_m^*A_b^*A_b$	$^*dT^*dT$
SEQ-19	センス鎖	S-17		$U_r^*G^*A^*G^*G^*U_r^*G^*C_r^*A^*G^*U_r^*G^*C_r^*U_r^*G^*C_r^*A^*U_r^*C_r^*U_r^*C_r^*U_r^*G^*G$	
	アンチセンス鎖	AS-56	$\cdot P(O)(OH)_2$	$U_r^*G_m^*A_r^*G_m^*A_r^*U_m^*G_r^*A_m^*A_r^*G_m^*C_r^*A_m^*C_r^*U_m^*G_r^*U_m^*A_r^*G_m^*C_r^*U_m^*A_b^*A_b$	$^*dT^*dT$
SEQ-20	センス鎖	S-18		$U_m^*G^*A^*G^*G^*U_m^*G^*C_m^*A^*G^*U_m^*G^*C_m^*U_m^*G^*C_m^*A^*U_m^*C_m^*U_m^*C_m^*U_m^*G^*G$	
	アンチセンス鎖	AS-56	$\cdot P(O)(OH)_2$	$U_r^*G_m^*A_r^*G_m^*A_r^*U_m^*G_r^*A_m^*A_r^*G_m^*C_r^*A_m^*C_r^*U_m^*G_r^*U_m^*A_r^*G_m^*C_r^*U_m^*A_b^*A_b$	$^*dT^*dT$
SEQ-21	センス鎖	S-1		$U^*G^*A^*G^*G^*U^*G^*C^*A^*G^*U^*G^*C^*U^*G^*C^*A^*U^*C^*U^*C^*U^*G^*G$	
	アンチセンス鎖	AS-57	$\cdot P(O)(OH)_2$	$U_m^*G_r^*A_m^*G_r^*A_m^*U_r^*G_m^*A_r^*A_m^*G_r^*C_m^*A_r^*C_m^*U_r^*G_m^*U_r^*A_m^*G_r^*C_m^*U_r^*C_m^*A_r$	$^*A_m^*^*A_m$
SEQ-22	センス鎖	S-17		$U_r^*G^*A^*G^*G^*U_r^*G^*C_r^*A^*G^*U_r^*G^*C_r^*U_r^*G^*C_r^*A^*U_r^*C_r^*U_r^*C_r^*U_r^*G^*G$	
	アンチセンス鎖	AS-57	$\cdot P(O)(OH)_2$	$U_m^*G_r^*A_m^*G_r^*A_m^*U_r^*G_m^*A_r^*A_m^*G_r^*C_m^*A_r^*C_m^*U_r^*G_m^*U_r^*A_m^*G_r^*C_m^*U_r^*C_m^*A_r$	$^*A_m^*^*A_m$
SEQ-23	センス鎖	S-18		$U_m^*G^*A^*G^*G^*U_m^*G^*C_m^*A^*G^*U_m^*G^*C_m^*U_m^*G^*C_m^*A^*U_m^*C_m^*U_m^*C_m^*U_m^*G^*G$	
	アンチセンス鎖	AS-57	$\cdot P(O)(OH)_2$	$U_m^*G_r^*A_m^*G_r^*A_m^*U_r^*G_m^*A_r^*A_m^*G_r^*C_m^*A_r^*C_m^*U_r^*G_m^*U_r^*A_m^*G_r^*C_m^*U_r^*C_m^*A_r$	$^*A_m^*^*A_m$

(配列中、A、U、G及びCは、それぞれアデニン、ウラシル、グアニン又はシトシンを含むRNAを表し、dT及びdGは、それぞれチミン又はグアニンを含むDNAを表し、RNAfは2'-FRNAを表し、RNAmは2'-OMeRNAを表し、^は-P(S)OH-を表し、*は-P(O)OH-を表し、Ab(Abasic)は、以下で示される基を表し：

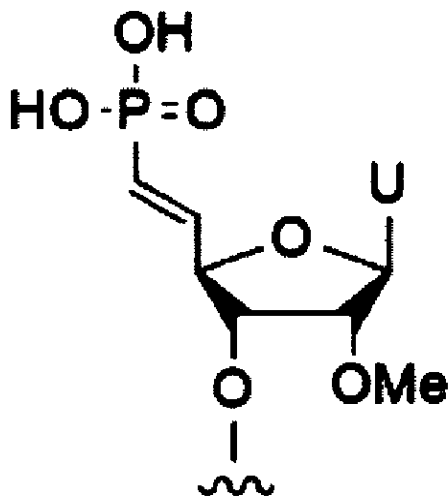
【化 9】



AS - 42 の 5' 末端の VP - 及びオリゴヌクレオチドの末端の Um は、以下で示される基を構成しており、 $=CH - P(=O)(OH)_2$ が 5' 末端修飾 (VP -) に該当する。

20

【化 10】



【請求項 2】

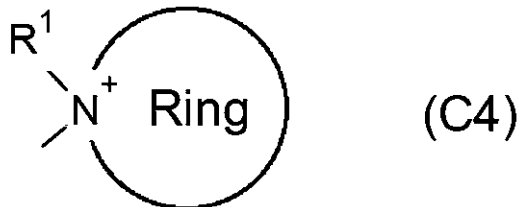
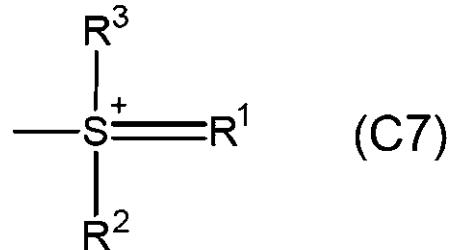
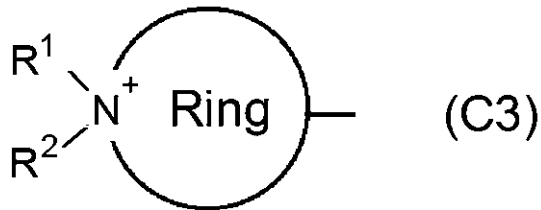
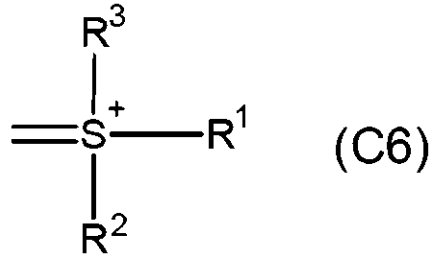
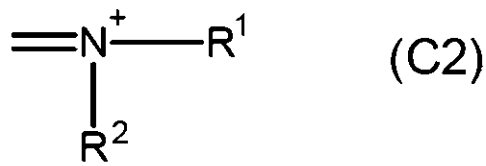
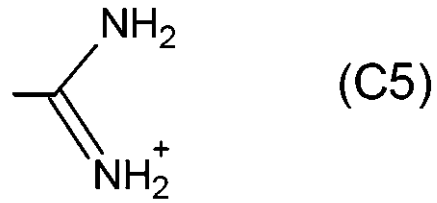
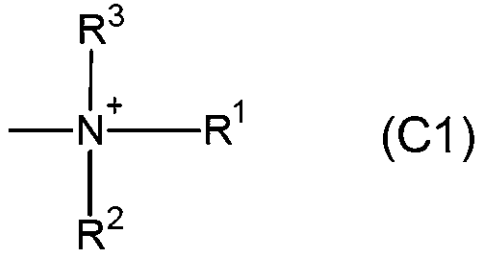
前記カチオン性基の pKa が 6 ~ 9 の範囲であることを特徴とする請求項 1 に記載の造血器腫瘍治療用組成物。

40

【請求項 3】

前記カチオン性基は、カチオンの状態で、下記式 (C1) ~ (C7) からなる群より選択される部分構造を有することを特徴とする請求項 1 に記載の造血器腫瘍治療用組成物。

【化 2】

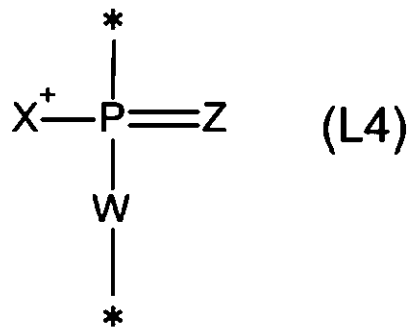
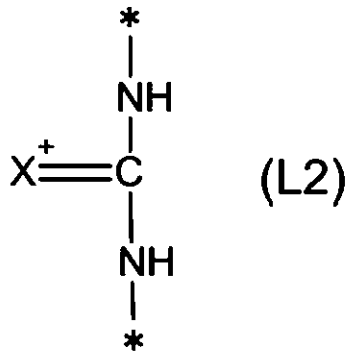
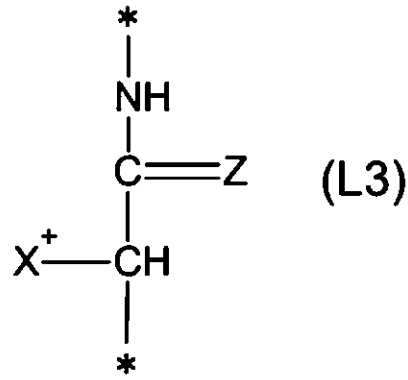
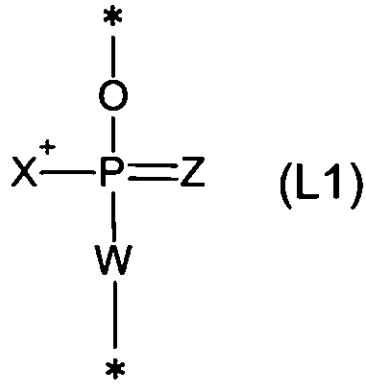


(ここで、 $\text{R}^1 \sim \text{R}^3$ は水素又は炭素数1～10のアルキル基を示し、 $\text{R}^1 \sim \text{R}^3$ は同一又は異なってもよい。Ringは4～8個の炭素原子で構成された環式化合物であり、該炭素原子の1つ以上が窒素、酸素及び硫黄から選択されるヘテロ原子で置換された複素環であってもよい。)

【請求項 4】

前記カチオン性人工核酸の前記連結構造が、カチオンの状態で、下記式(L1)～(L4)から選択される構造を少なくとも有することを特徴とする請求項1に記載の造血器腫瘍治療用組成物。

【化 3】

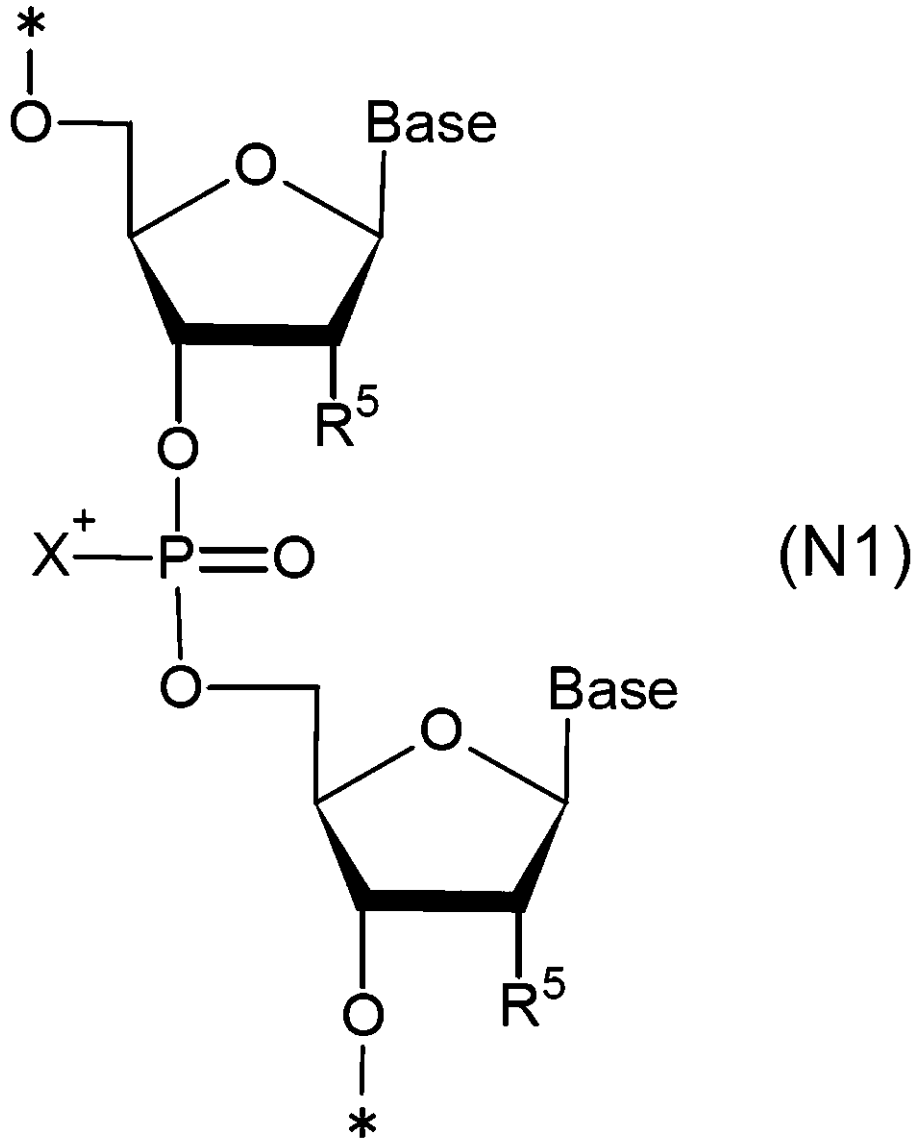


(ここで、 X^+ は前記カチオン性基を含む官能基であり、 Z は O 又は S を示し、 W は $-\text{O}-$ 又は $-\text{NR}_4-$ を示し、ここで R_4 は水素又は炭素数1~10のアルキル基を示す。*は隣接する前記構成単位との結合手を意味する。)

【請求項 5】

前記カチオン性人工核酸が、下記式(N1)で示されるヌクレオチド骨格を有することを特徴とする請求項1に記載の造血管腫瘍治療用組成物。

【化4】

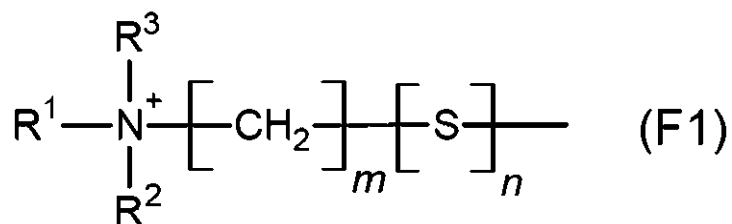


(ここで、 X^+ は前記カチオン性基を含む官能基であり、 $Base$ は塩基を示し、 R^5 はH又はOHを示す。*は隣接するヌクレオチド骨格のリン酸との結合手を意味し、5'末端又は3'末端においては少なくとも一方が前記親水性重合体と結合し、該親水性重合体と結合していない場合は水素である。)

【請求項6】

前記 X^+ が、カチオンの状態で、下記式(F1)で示されるアンモニウムカチオンになり得ることを特徴とする請求項5に記載の造血器腫瘍治療用組成物。

【化5】



(ここで、 $R^1 \sim R^3$ は、水素又は炭素数1～10のアルキル基を示し、互いに同一又は

異なってもよく、 m は0～10の整数を示し、 n は0又は1の整数を示す。)

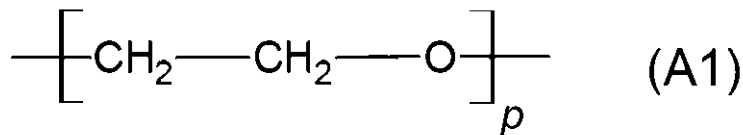
【請求項7】

前記造血管腫瘍は、細胞上にグルコーストランスポーターを発現しており、前記リガンドは、グルコースであることを特徴とする請求項1に記載の造血管腫瘍治療用組成物。

【請求項8】

前記親水性重合体が、下記式(A1)で示されるポリエチレングリコール骨格を有することを特徴とする請求項1に記載の造血管腫瘍治療用組成物。

【化6】



(ここで、 p は1～20の整数を示す。)

【請求項9】

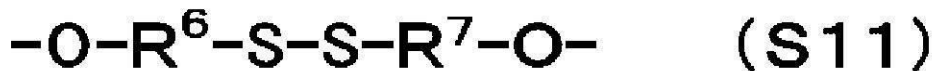
前記式(A1)がリン酸ジエステル基で結合していることを特徴とする請求項8に記載の造血管腫瘍治療用組成物。

【請求項10】

前記S1が、下記式(S11)で表される結合を有することを特徴とする請求項1に記載の造血管腫瘍治療用組成物。

20

【化7】



(ここで、式中 R^6 、 R^7 は炭素数1～12のメチレン基を表し、 R^6 、 R^7 は同一又は異なってもよい。)

【請求項11】

複数の前記核酸送達用構造体が会合したナノスケールの構造体であることを特徴とする請求項1に記載の造血管腫瘍治療用組成物。

30

【請求項12】

前記会合構造が内側に、前記親水性重合体及びリガンドが外側に位置したベシクル又はミセルであることを特徴とする請求項1に記載の造血管腫瘍治療用組成物。

【請求項13】

請求項1に記載された前記核酸送達用構造体を含む造血管腫瘍治療用医薬。

【請求項14】

下記式(1)で表される核酸アナログと、がん遺伝子KRASのネットワークを制御するマイクロRNAからなり、miR-143又は下記のSEQ-1～SEQ-23から選択される送達対象核酸と、が静電相互作用により会合した会合構造を有することを特徴とする核酸送達用構造体を含む、造血管腫瘍における癌化細胞の増殖抑制用組成物。

40

【化1】

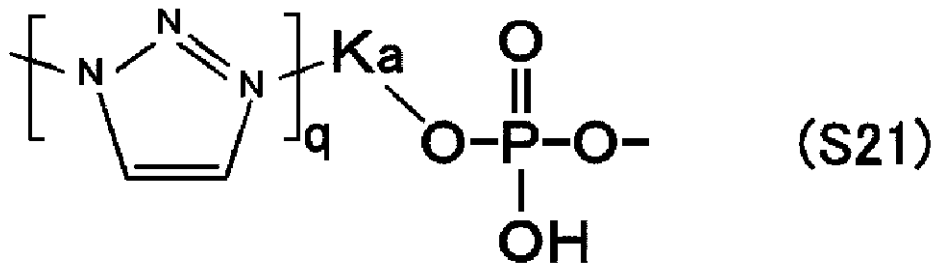


(ここで、Nはカチオン性人工核酸、Hは親水性重合体であってポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリグルタミン酸、ポリビニルピロリドン、ポリアクリルアミド、ポリエチレンイミン、ポリアルキルアクリレート、ポリオキサゾリン、ポリアクリル

アミド、ポリ(カルボキシベタインメタクリレート)、ポリ(スルホベタインメタクリレート)、ポリ(2-メタアクリロイルオキシエチルホスホコリン)、ヒアルロン酸、キトサン及びデキストラン並びにポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリグルタミン酸、ポリビニルピロリドン、ポリアクリルアミド、ポリエチレンジイミン、ポリアルキルアクリレート、ポリオキサゾリン、ポリアクリルアミド、ポリ(カルボキシベタインメタクリレート)、ポリ(スルホベタインメタクリレート)、ポリ(2-メタアクリロイルオキシエチルホスホコリン)、ヒアルロン酸、キトサン及びデキストランのいずれかのリン酸エステルから選択され、S1はエステル結合、エーテル結合、ジスルフィド結合、ホスホロアミド、リン酸ジエステルのいずれかから選択され、S2はリン酸ジエステル結合、又は下記式(S21)に示すトリアゾールを含むリン酸ジエステル結合のいずれかから選択され、

10

【化8】



(式中、Kaは炭素数1~20のメチレン基を含むアミド結合、炭素数6~12の芳香族を含む化合物、又は直接結合を表し、q=0又は1であり、q=0のときKaはリガンドと結合する。)

Lはリガンドを表し、グルコース、マンノース、ガラクトース、スクロース、マルトース、ラクトースから選択され、sは0又は1、tは0又は1を表し、

Nは、リボース及びデオキシリボースから選択される環構造に塩基が結合した構成単位と、2つの前記構成単位の間を連結する、カチオン性基を有する連結構造と、を有し、

該カチオン性人工核酸は、前記送達対象核酸のリン酸基と前記カチオン性基との静電相互作用により会合しうる。)

【表1】

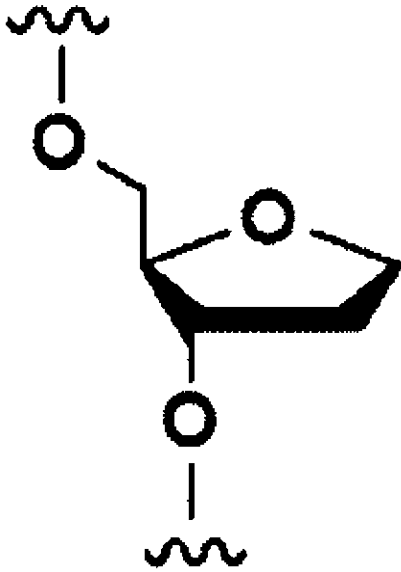
	鎖の名称		5'末端の修飾	オリゴヌクレオチド (5'→3')	3'末端の修飾
SEQ-1	センス鎖	S-1		U*G*A*G*G*U*G*C*A*G*U*G*C*U*G*C*A* U*C*U*C*U*G*G	
	アンチセンス鎖	AS-4		U ^r G _m [^] A ^r G _m [*] A ^r U _m [*] G ^r A _m [*] A ^r G _m [*] C ^r A _m [*] *C ^r U _m [*] G ^r U _m [*] A ^r G _m [*] C ^r U _m [*] C ^r A _m [*]	^dT^dT
SEQ-2	センス鎖	S-1		U*G*A*G*G*U*G*C*A*G*U*G*C*U*G*C*A* U*C*U*C*U*G*G	
	アンチセンス鎖	AS-7	・P(O)(OH) ₂	U ^r G _m [^] A ^r G _m [*] A ^r U _m [*] G ^r A _m [*] A ^r G _m [*] C ^r A _m [*] *C ^r U _m [*] G ^r U _m [*] A ^r G _m [*] C ^r U _m [*] C ^r A _m [*]	^dT^dT
SEQ-3	センス鎖	S-17		U ^r G [^] A*G*G*U ^r G*C ^r A*G*U ^r G*C ^r U ^r G*C ^r *A*U ^r C ^r U ^r C ^r U ^r G*G	
	アンチセンス鎖	AS-4		U ^r G _m [^] A ^r G _m [*] A ^r U _m [*] G ^r A _m [*] A ^r G _m [*] C ^r A _m [*] *C ^r U _m [*] G ^r U _m [*] A ^r G _m [*] C ^r U _m [*] C ^r A _m [*]	
SEQ-4	センス鎖	S-1		U*G*A*G*G*U*G*C*A*G*U*G*C*U*G*C*A* U*C*U*C*U*G*G	
	アンチセンス鎖	AS-30		U _m [^] G _m [^] A _m [^] G _m [^] A _m [*] U _m [*] G _m [*] A _m [*] A _m [*] G _m [*] C _m [*] A _m [*] U _m [*] G _m [*] U _m [*] A _m [*] G _m [*] U _m [*] C _m [*] A _m [*]	^dT^dT
SEQ-5	センス鎖	S-1		U*G*A*G*G*U*G*C*A*G*U*G*C*U*G*C*A* U*C*U*C*U*G*G	
	アンチセンス鎖	AS-31		U ^r G ^r A ^r G _m [*] A _m [*] U _m [*] G ^r A ^r A ^r G _m [*] C _m [*] A _m [*] C ^r U ^r G ^r U _m [*] A _m [*] G _m [*] C ^r U ^r C ^r A _m [*]	^dT^dT
SEQ-6	センス鎖	S-17		U ^r G [^] A*G*G*U ^r G*C ^r A*G*U ^r G*C ^r U ^r G*C ^r *A*U ^r C ^r U ^r C ^r U ^r G*G	
	アンチセンス鎖	AS-3		U ^r G [^] A*G*A*U ^r G*A*A*G*C ^r A*C ^r U ^r G*U ^r A*G*C ^r U ^r C ^r A	^dT^dT
SEQ-7	センス鎖	S-17		U ^r G [^] A*G*G*U ^r G*C ^r A*G*U ^r G*C ^r U ^r G*C ^r *A*U ^r C ^r U ^r C ^r U ^r G*G	
	アンチセンス鎖	AS-10		U ^r G _m [^] A ^r G _m [*] A ^r U _m [*] G ^r A _m [*] A ^r G _m [*] C ^r A _m [*] *C ^r U _m [*] G ^r U _m [*] A ^r G _m [*] C ^r U _m [*] C ^r A _m [*]	^dG^dG
SEQ-8	センス鎖	S-18		U _m [^] G [^] A*G*G*U _m [*] G _m [*] C _m [*] A _m [*] G _m [*] U _m [*] G _m [*] C _m [*] U _m [*] G _m [*] C _m [*] A _m [*] U _m [*] C _m [*] U _m [*] C _m [*] U _m [*] G*G	
	アンチセンス鎖	AS-12		U ^r G _m [^] A ^r G _m [*] A ^r U _m [*] G ^r A _m [*] A ^r G _m [*] C ^r A _m [*] C ^r U _m [*] *G ^r U _m [*] A ^r G _m [*] C ^r U _m [*] C ^r A _m [*]	^G _m ^G _m
SEQ-9	センス鎖	S-18		U _m [^] G [^] A*G*G*U _m [*] G _m [*] C _m [*] A _m [*] G _m [*] U _m [*] G _m [*] C _m [*] U _m [*] G _m [*] C _m [*] A _m [*] U _m [*] C _m [*] U _m [*] C _m [*] U _m [*] G*G	
	アンチセンス鎖	AS-13		U ^r G _m [^] A ^r G _m [*] A ^r U _m [*] G ^r A _m [*] A ^r G _m [*] C ^r A _m [*] C ^r U _m [*] *G ^r U _m [*] A ^r G _m [*] C ^r U _m [*] C ^r A _m [*]	^G _r ^G _r
SEQ-10	センス鎖	S-19		U ^r G [^] A*G*G*U ^r G*C ^r A*G*U ^r G*C ^r U ^r G*C ^r A*U ^r C ^r U ^r C ^r U ^r G*G	
	アンチセンス鎖	AS-3		U ^r G [^] A*G*A*U ^r G*A*A*G*C ^r A*C ^r U ^r G*U ^r A*G*C ^r U ^r C ^r A	^dT^dT
SEQ-11	センス鎖	S-1		U*G*A*G*G*U*G*C*A*G*U*G*C*U*G*C*A* U*C*U*C*U*G*G	
	アンチセンス鎖	AS-42	VP-	U _m [^] G _m [^] A ^r G _m [*] A ^r U _m [*] G ^r A _m [*] A ^r G _m [*] C ^r A _m [*] C ^r U _m [*] G ^r U _m [*] A ^r G _m [*] C ^r U _m [*] C ^r A _m [*]	^dT^dT
SEQ-12	センス鎖	S-1		U*G*A*G*G*U*G*C*A*G*U*G*C*U*G*C*A* U*C*U*C*U*G*G	
	アンチセンス鎖	AS-47		U ^r G _m [^] A ^r G _m [*] A ^r U _m [*] G ^r A _m [*] A ^r G _m [*] C ^r A _m [*] C ^r U _m [*] G ^r U _m [*] A ^r G _m [*] C ^r U _m [*] Ab*Ab	^dT^dT

【表2】

	鎖の名称		5'末端の修飾	オリゴヌクレオチド (5'→3')	3'末端の修飾
SEQ-13	センス鎖	S-18		U _m [^] G [^] A [^] G [^] G [^] U _m [^] G [^] C _m [^] A [^] G [^] U _m [^] G [^] C _m [^] U _m [^] G [^] C _m [^] A [^] U _m [^] C _m [^] U _m [^] C _m [^] U _m [^] G [^] G	
	アンチセンス鎖	AS-47		U _r [^] G _m [^] A _r [^] G _m [^] A _r [^] U _m [^] G _r [^] A _m [^] A _r [^] G _m [^] C _r [^] A _m [^] C _r [^] U _m [^] G _r [^] U _m [^] A _r [^] G _m [^] C _r [^] U _m [^] Ab [^] Ab	^dT^dT
SEQ-14	センス鎖	S-1		U [^] G [^] A [^] G [^] G [^] U [^] G [^] C [^] A [^] G [^] U [^] G [^] C [^] U [^] G [^] C [^] A [^] U [^] C [^] U [^] C [^] U [^] G [^] G	
	アンチセンス鎖	AS-50	・P(O)(OH) ₂	U _r [^] G _m [^] A _r [^] G _m [^] A _r [^] U _m [^] G _r [^] A _m [^] A _r [^] G _m [^] C _r [^] A _m [^] C _r [^] U _m [^] G _r [^] U _m [^] A _r [^] G _m [^] C _r [^] U _m [^] C _r [^] A _m [^]	^dG^dG
SEQ-15	センス鎖	S-1		U [^] G [^] A [^] G [^] G [^] U [^] G [^] C [^] A [^] G [^] U [^] G [^] C [^] U [^] G [^] C [^] A [^] U [^] C [^] U [^] C [^] U [^] G [^] G	
	アンチセンス鎖	AS-51	・P(O)(OH) ₂	U _r [^] G _m [^] A _r [^] G _m [^] A _r [^] U _m [^] G _r [^] A _m [^] A _r [^] G _m [^] C _r [^] A _m [^] C _r [^] U _m [^] G _r [^] U _m [^] A _r [^] G _m [^] C _r [^] U _m [^] C _r [^] A _m [^]	^G _m ^G _m
SEQ-16	センス鎖	S-1		U [^] G [^] A [^] G [^] G [^] U [^] G [^] C [^] A [^] G [^] U [^] G [^] C [^] U [^] G [^] C [^] A [^] U [^] C [^] U [^] C [^] U [^] G [^] G	
	アンチセンス鎖	AS-52	・P(O)(OH) ₂	U _r [^] G _m [^] A _r [^] G _m [^] A _r [^] U _m [^] G _r [^] A _m [^] A _r [^] G _m [^] C _r [^] A _m [^] C _r [^] U _m [^] G _r [^] U _m [^] A _r [^] G _m [^] C _r [^] U _m [^] C _r [^] A _m [^]	^G _r ^G _r
SEQ-17	センス鎖	S-1		U [^] G [^] A [^] G [^] G [^] U [^] G [^] C [^] A [^] G [^] U [^] G [^] C [^] U [^] G [^] C [^] A [^] U [^] C [^] U [^] C [^] U [^] G [^] G	
	アンチセンス鎖	AS-55	・P(O)(OH) ₂	U _r [^] G _r [^] A _r [^] G _m [^] A _m [^] U _m [^] G _r [^] A _r [^] A _r [^] G _m [^] C _m [^] A _m [^] C _r [^] U _r [^] G _r [^] U _m [^] A _m [^] G _m [^] C _r [^] U _r [^] C _r [^] A _r [^]	^dT^dT
SEQ-18	センス鎖	S-1		U [^] G [^] A [^] G [^] G [^] U [^] G [^] C [^] A [^] G [^] U [^] G [^] C [^] U [^] G [^] C [^] A [^] U [^] C [^] U [^] C [^] U [^] G [^] G	
	アンチセンス鎖	AS-56	・P(O)(OH) ₂	U _r [^] G _m [^] A _r [^] G _m [^] A _r [^] U _m [^] G _r [^] A _m [^] A _r [^] G _m [^] C _r [^] A _m [^] C _r [^] U _m [^] G _r [^] U _m [^] A _r [^] G _m [^] C _r [^] U _m [^] Ab [^] Ab	^dT^dT
SEQ-19	センス鎖	S-17		U _r [^] G [^] A [^] G [^] G [^] U _r [^] G [^] C _r [^] A [^] G [^] U _r [^] G [^] C _r [^] U _r [^] G [^] C _r [^] *A [^] U _r [^] C _r [^] U _r [^] C _r [^] U _r [^] G [^] G	
	アンチセンス鎖	AS-56	・P(O)(OH) ₂	U _r [^] G _m [^] A _r [^] G _m [^] A _r [^] U _m [^] G _r [^] A _m [^] A _r [^] G _m [^] C _r [^] A _m [^] C _r [^] U _m [^] G _r [^] U _m [^] A _r [^] G _m [^] C _r [^] U _m [^] Ab [^] Ab	^dT^dT
SEQ-20	センス鎖	S-18		U _m [^] G [^] A [^] G [^] G [^] U _m [^] G [^] C _m [^] A [^] G [^] U _m [^] G [^] C _m [^] U _m [^] G [^] C _m [^] A [^] U _m [^] C _m [^] U _m [^] C _m [^] U _m [^] G [^] G	
	アンチセンス鎖	AS-56	・P(O)(OH) ₂	U _r [^] G _m [^] A _r [^] G _m [^] A _r [^] U _m [^] G _r [^] A _m [^] A _r [^] G _m [^] C _r [^] A _m [^] C _r [^] U _m [^] G _r [^] U _m [^] A _r [^] G _m [^] C _r [^] U _m [^] Ab [^] Ab	^dT^dT
SEQ-21	センス鎖	S-1		U [^] G [^] A [^] G [^] G [^] U [^] G [^] C [^] A [^] G [^] U [^] G [^] C [^] U [^] G [^] C [^] A [^] U [^] C [^] U [^] C [^] U [^] G [^] G	
	アンチセンス鎖	AS-57	・P(O)(OH) ₂	U _m [^] G _r [^] A _m [^] G _r [^] A _m [^] U _r [^] G _m [^] A _r [^] A _m [^] G _r [^] C _m [^] A _r [^] C _m [^] U _r [^] G _m [^] U _r [^] A _m [^] G _r [^] C _m [^] U _r [^] C _m [^] A _r [^]	^A _m ^A _m
SEQ-22	センス鎖	S-17		U _r [^] G [^] A [^] G [^] G [^] U _r [^] G [^] C _r [^] A [^] G [^] U _r [^] G [^] C _r [^] U _r [^] G [^] C _r [^] *A [^] U _r [^] C _r [^] U _r [^] C _r [^] U _r [^] G [^] G	
	アンチセンス鎖	AS-57	・P(O)(OH) ₂	U _m [^] G _r [^] A _m [^] G _r [^] A _m [^] U _r [^] G _m [^] A _r [^] A _m [^] G _r [^] C _m [^] A _r [^] C _m [^] U _r [^] G _m [^] U _r [^] A _m [^] G _r [^] C _m [^] U _r [^] C _m [^] A _r [^]	^A _m ^A _m
SEQ-23	センス鎖	S-18		U _m [^] G [^] A [^] G [^] G [^] U _m [^] G [^] C _m [^] A [^] G [^] U _m [^] G [^] C _m [^] U _m [^] G [^] C _m [^] A [^] U _m [^] C _m [^] U _m [^] C _m [^] U _m [^] G [^] G	
	アンチセンス鎖	AS-57	・P(O)(OH) ₂	U _m [^] G _r [^] A _m [^] G _r [^] A _m [^] U _r [^] G _m [^] A _r [^] A _m [^] G _r [^] C _m [^] A _r [^] C _m [^] U _r [^] G _m [^] U _r [^] A _m [^] G _r [^] C _m [^] U _r [^] C _m [^] A _r [^]	^A _m ^A _m

(配列中、A、U、G及びCは、それぞれアデニン、ウラシル、グアニン又はシトシンを含むRNAを表し、dT及びdGは、それぞれチミン又はグアニンを含むDNAを表し、RNA_fは2'-FRNAを表し、RNA_mは2'-OMeRNAを表し、^は-P(S)OH-を表し、*は-P(O)OH-を表し、Ab(Abasic)は、以下で示される基を表し：

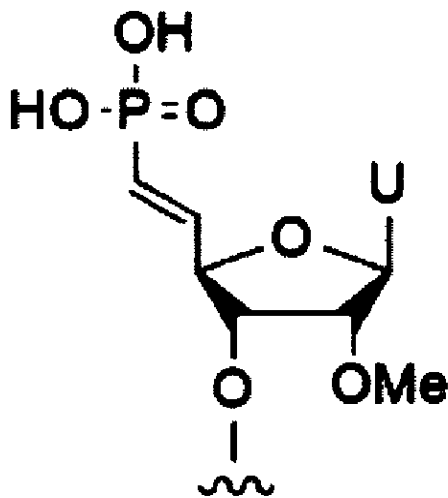
【化 9】



AS - 42 の 5' 末端の VP - 及びオリゴヌクレオチドの末端の Um は、以下で示される基を構成しており、 $=CH - P(=O)(OH)_2$ が 5' 末端修飾 (VP -) に該当する。

20

【化 10】



【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、造血器腫瘍治療用組成物、造血器腫瘍治療用医薬、及び造血器腫瘍における癌化細胞の増殖抑制用組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

遺伝子治療の分野では、DNA や RNA などのオリゴヌクレオチドを細胞などの標的部位に送達して、遺伝子の発現を抑制したり、遺伝子の組み換えを行ったりすることで、疾患の治療が行われている。このような治療において、標的部位に効率的に核酸を送達するドラッグデリバリーシステム (DDS) の技術が重要となる。これまで、種々の DDS の手法が開発されている。また、核酸解析、診断トレーサー、分子マシン、分子コンピューターとしてナノマテリアル分野、人工細胞分野への応用も盛んに行われている。

40

50

【 0 0 0 3 】

一方で、例えば、全がんの30%に関連するがん促進遺伝子のRASを標的とした創薬は、過去40年に渡り広く進められてきた。しかし、RASタンパクは低分子のポケットが狭く阻害剤の設計が難しいことや、アンチセンス-オリゴヌクレオチド(AS-ODN)やsiRNAによるRASの1つの遺伝子制御ではがん細胞が耐性を獲得することから、未だ有効な治療薬の開発に至っていない。

【 0 0 0 4 】

発明者らは、リボース及びデオキシリボースから選択される環構造に塩基が結合した構成単位と、2つの構成単位の間を連結する連結構造とからなる人工核酸の3'末端に親水性基を連結させた構造を特徴とする核酸が、RNAとともにアニーリングを行うことでミセル又はナノ粒子が形成すること、ミセル又はナノ粒子はRNAを送達するベシクルとして作用すること、さらに、カチオン性人工核酸を用いてmiR-143をナノ粒子とした組成物が固形癌である大腸癌の成長を抑制することに有効であることを見出した(特許文献1)。

10

【 0 0 0 5 】

白血病に代表される造血器腫瘍は、白血球もしくはその未熟な段階での細胞が勝手に増殖する病気である。固形癌とは異なり外科的手法のみによる治療は困難であると言われる。一部の造血器腫瘍、とりわけRAS変異多発性骨髄腫は再発を繰り返し予後不良ながんとして知られている。発明者らは、RAS変異癌においてmiR-143及びその誘導体ががんの有効であることを見出している(特許文献2)。

20

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 6 】

【 特許文献 1 】 国際公開第 2 0 2 2 / 2 3 0 9 9 0 号

【 特許文献 2 】 国際公開第 2 0 1 7 / 1 7 9 6 6 0 号

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 7 】

白血病に代表される造血器腫瘍の中にはRAS変異多発性骨髄腫が知られているが、再発しやすく予後は不良であるとされる。固形癌にも有効であったmiR-143がかかる血液癌にも有効であることが期待されるものの、浮遊細胞の血液がんに対する核酸導入は難しく、新たな核酸医薬送達システムが必要とされていた。

30

【 0 0 0 8 】

本開示の目的は、造血器腫瘍の治療に有効な核酸送達用構造体及びその製造方法並びに造血器腫瘍の医薬及び造血器腫瘍の治療方法を提供することにある。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 9 】

発明者らは、カチオン性人工核酸と送達ヌクレオチドからなるミセル又はナノ粒子の表面にリガンドで修飾されたものが造血器腫瘍由来の細胞の増殖を抑えることを見出し、本開示を完成させた。

40

【 0 0 1 0 】

(1) 下記式(1)で表される核酸アナログと、がん遺伝子KRASのネットワークを制御するマイクロRNAからなる送達対象核酸と、が静電相互作用により会合した会合構造を有する核酸送達用構造体を含む造血器腫瘍治療用組成物。

【 化 1 】



(ここで、Nはカチオン性人工核酸、Hは親水性重合体、S1はスペーサー1、S2はス

ペーサー 2、L はリガンドを表し、s は 0 又は 1、t は 0 又は 1 を表し、

N は、リボース及びデオキシリボースから選択される環構造に塩基が結合した構成単位と、2つの前記構成単位の間を連結する、カチオン性基を有する連結構造と、を有し、

該カチオン性人工核酸は、前記送達対象核酸のリン酸基と前記カチオン性基との静電相互作用により会合しうる。))

【0011】

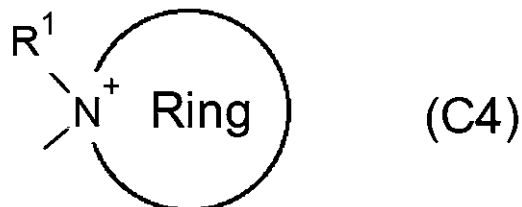
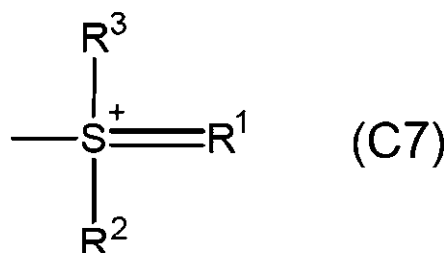
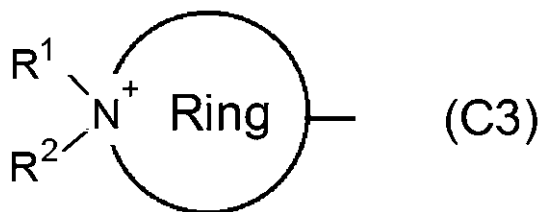
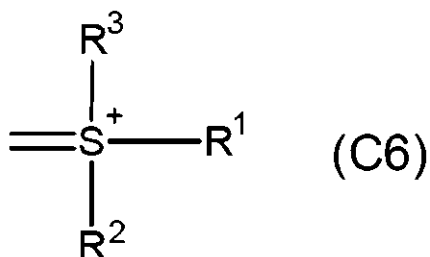
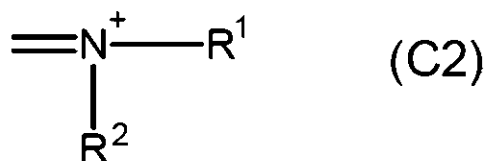
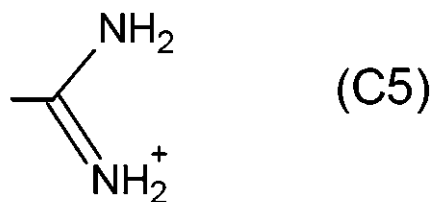
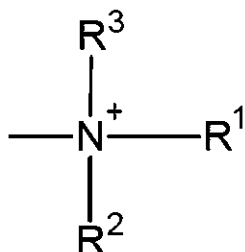
〔2〕前記カチオン性基の pKa が 6 ~ 9 の範囲であることを特徴とする〔1〕に記載の造血器腫瘍治療用組成物。

【0012】

〔3〕前記カチオン性基は、カチオンの状態で、下記式 (C1) ~ (C7) からなる群より選択される部分構造を有することを特徴とする前記〔1〕~〔2〕記載の造血器腫瘍治療用組成物。

10

【化2】

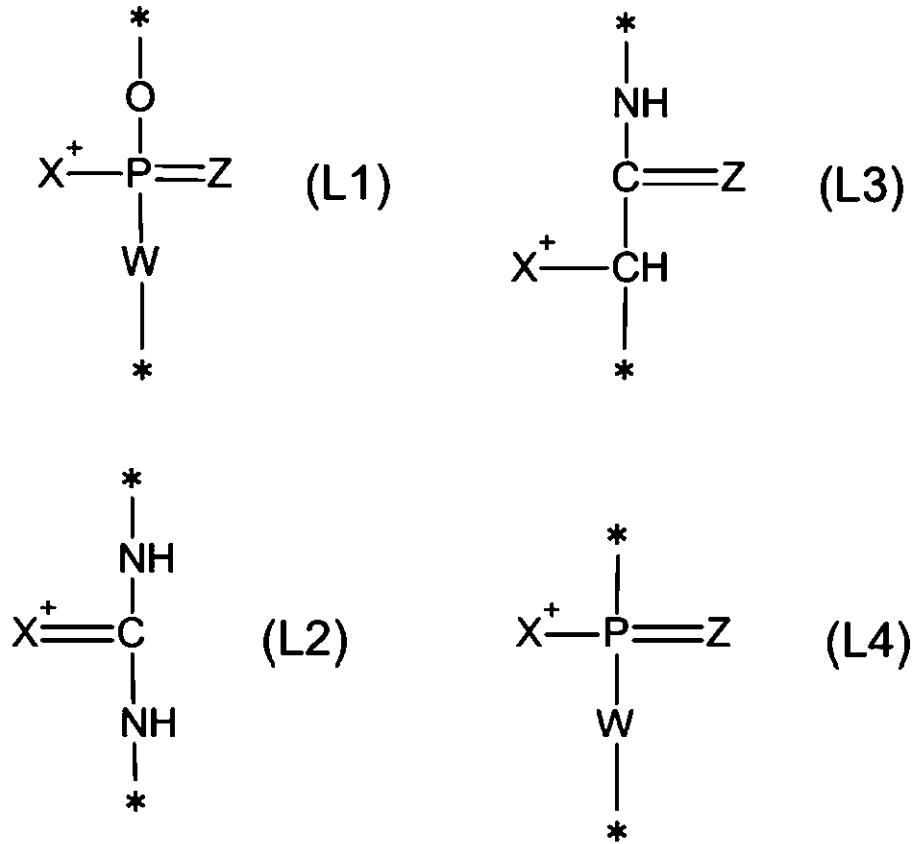


(ここで、 $R^1 \sim R^3$ は水素又は炭素数 1 ~ 10 のアルキル基を示し、 $R^1 \sim R^3$ は同一又は異なってもよい。Ring は 4 ~ 8 個の炭素原子で構成された環式化合物であり、該炭素原子の 1 つ以上が窒素、酸素及び硫黄から選択されるヘテロ原子で置換された複素環であってもよい。)

【 0 0 1 3 】

〔 4 〕 前記カチオン性人工核酸（ N ）の前記連結構造が、カチオンの状態で、下記式（ L 1 ）～（ L 4 ）から選択される構造を少なくとも有することを特徴とする〔 1 〕～〔 3 〕に記載の造血器腫瘍治療用組成物。

【化 3】

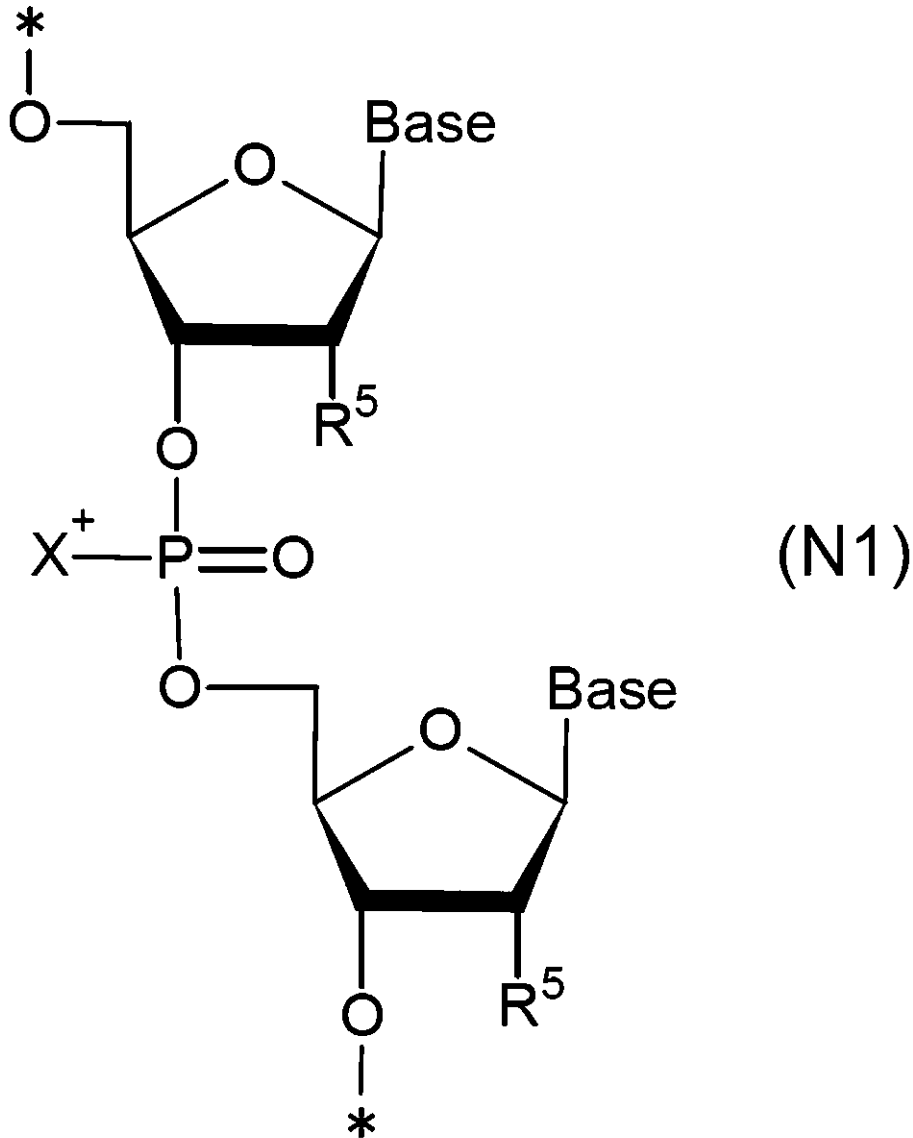


（ここで、 X^+ は前記カチオン性基を含む官能基であり、 Z は O 又は S を示し、 W は $-\text{O}-$ 又は $-\text{NR}^4-$ を示し、ここで R^4 は水素又は炭素数 $1 \sim 10$ のアルキル基を示す。 $*$ は隣接する前記構成単位との結合手を意味する。）

【 0 0 1 4 】

〔 5 〕 前記カチオン性人工核酸が、下記式（ N 1 ）で示されるヌクレオチド骨格を有することを特徴とする〔 1 〕～〔 4 〕に記載の造血器腫瘍治療用組成物。

【化4】

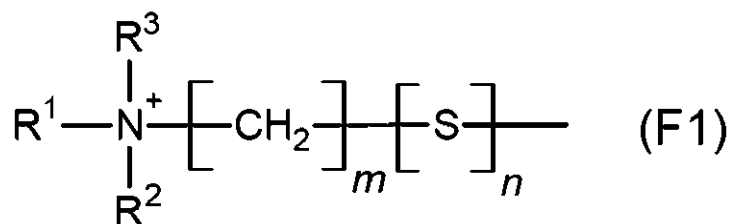


(ここで、 X^+ は前記カチオン性基を含む官能基であり、Baseは塩基を示し、 R^5 はH又はOHを示す。*は隣接するヌクレオチド骨格のリン酸との結合手を意味し、5'末端又は3'末端においては少なくとも一方が前記親水性重合体と結合し、該親水性重合体と結合していない場合は水素である。)

【0015】

〔6〕前記 X^+ が、カチオンの状態で、下記式(F1)で示されるアンモニウムカチオンになり得ることを特徴とする〔5〕に記載の造血器腫瘍治療用組成物。

【化5】



(ここで、 $R^1 \sim R^3$ は、水素又は炭素数1～10のアルキル基を示し、互いに同一又は

異なってもよく、 m は0～10の整数を示し、 n は0又は1の整数を示す。)

【0016】

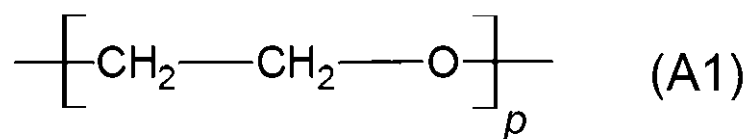
〔7〕前記親水性重合体が、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリグルタミン酸、ポリビニルピロリドン、ポリアクリルアミド、ポリエチレンジイミン、ポリアルキルアクリレート、ポリオキサゾリン、ポリアクリルアミド、ポリ(カルボキシベタインメタクリレート)、ポリ(スルホベタインメタクリレート)、ポリ(2-メタアクリロイルオキシエチルホスホコリン)、ヒアルロン酸、キトサン及びデキストラン並びにこれらの誘導体から選択されることを特徴とする〔1〕に記載の造血器腫瘍治療用組成物。

【0017】

〔8〕前記親水性重合体(H)が、下記式(A1)で示されるポリエチレングリコール骨格を有することを特徴とする〔1〕に記載の造血器腫瘍治療用組成物。

10

【化6】



(ここで、 p は1～20の整数を示す。)

【0018】

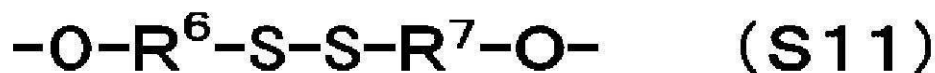
〔9〕前記式(A1)がリン酸ジエステル基で結合していることを特徴とする前記〔8〕に記載の造血器腫瘍治療用組成物。

20

【0019】

〔10〕前記スペーサー1(S1)が、下記式(S11)で表される結合を有することを特徴とする〔1〕～〔9〕に記載の造血器腫瘍治療用組成物。

【化7】



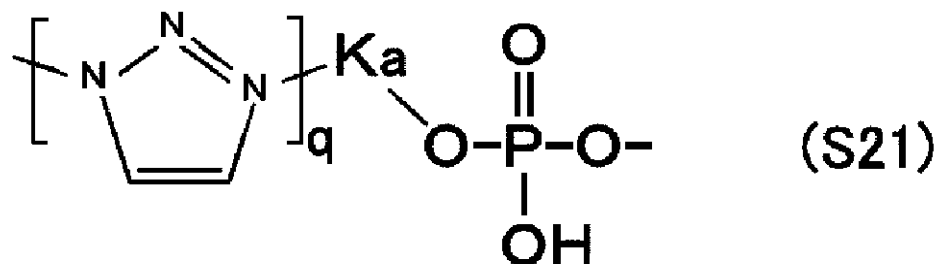
(ここで、式中 R^6 、 R^7 は炭素数1～12のメチレン基を表し、 R^6 、 R^7 は同一又は異なってもよい。)

30

【0020】

〔11〕前記スペーサー2(S2)が、リン酸ジエステル結合、又は下記式(S21)に示すトリアゾールを含むリン酸ジエステル結合であることを特徴とする〔1〕～〔10〕に記載の造血器腫瘍治療用組成物。

【化8】



(式中、Kaは炭素数1～20のメチレン基を含むアミド結合、炭素数6～12の芳香族を含む化合物、又は直接結合を表し、 $q = 0$ 又は1であり、 $q = 0$ のときKaはリガンドと結合する。)

【0021】

〔12〕前記リガンド(L)が、グルコース、マンノース、ガラクトース、スクロース、マルトース、ラクトースから選択されることを特徴とする〔1〕～〔11〕に記載の核酸送達用構造体の造血器腫瘍治療用組成物。

【0022】

〔13〕複数の前記核酸送達用構造体が会合したナノスケールの構造体であることを特徴とする〔1〕～〔12〕に記載の造血器腫瘍治療用組成物。

【0023】

〔14〕前記会合構造が内側に、前記親水性重合体及びリガンドが外側に位置したベシクル又はミセルであることを特徴とする〔13〕に記載の造血器腫瘍治療用組成物。

10

【0024】

〔15〕前記送達対象核酸が、miR-143又はそのアナログから選択されることを特徴とする〔1〕～〔14〕に記載の造血器腫瘍治療用組成物。

【0025】

〔16〕前記miR-143が、SEQ-1～SEQ-23からなる群より選択される〔15〕に記載の造血器腫瘍治療用組成物。

【0026】

〔17〕前記〔1〕～〔16〕に記載された前記核酸送達用構造体を含む造血器腫瘍治療用医薬。

【0027】

〔18〕造血器腫瘍の治療方法であって、前記〔1〕～〔16〕に記載された前記核酸送達用構造体を患者に投与することを特徴とする造血器腫瘍の治療方法。

20

【0028】

〔19〕下記式(1)で表される核酸アナログと、がん遺伝子KRASのネットワークを制御するマイクロRNAからなる送達対象核酸と、が静電相互作用により会合した会合構造を有する核酸送達用構造体を含む、造血器腫瘍における癌化細胞の増殖抑制用組成物。

【化1】



(ここで、Nはカチオン性人工核酸、Hは親水性重合体、S1はスペーサー1、S2はスペーサー2、Lはリガンドを表し、sは0又は1、tは0又は1を表し、

Nは、リボース及びデオキシリボースから選択される環構造に塩基が結合した構成単位と、2つの前記構成単位の間を連結する、カチオン性基を有する連結構造と、を有し、

該カチオン性人工核酸は、前記送達対象核酸のリン酸基と前記カチオン性基との静電相互作用により会合しうる。)

【0029】

〔20〕造血器腫瘍の治療に用いられる核酸送達用構造体であって、下記式(1)で表される核酸アナログと、がん遺伝子KRASのネットワークを制御するマイクロRNAからなる送達対象核酸と、が静電相互作用により会合した会合構造を有することを特徴とする核酸送達用構造体。

40

【化1】



(ここで、Nはカチオン性人工核酸、Hは親水性重合体、S1はスペーサー1、S2はスペーサー2、Lはリガンドを表し、sは0又は1、tは0又は1を表し、

Nは、リボース及びデオキシリボースから選択される環構造に塩基が結合した構成単位

と、2つの前記構成単位の間を連結する、カチオン性基を有する連結構造と、を有し、

該カチオン性人工核酸は、前記送達対象核酸のリン酸基と前記カチオン性基との静電相互作用により会合しうる。))

【発明の効果】

【0030】

本開示によれば、造血器腫瘍の治療に有効な核酸送達用構造体及びその製造方法並びに造血器腫瘍の医薬及び造血器腫瘍の治療方法を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】本開示の核酸アナログや核酸送達用構造体の概略を示す図である。(a) Glu - R I O N - m i R 1 4 3 # 1 2 のための配列デザインを表す図である。(b) Glu - R I O N - m i R 1 4 3 # 1 2 の送達用構造体の生成を表す図である。(c) Glu - R I O N - m i R 1 4 3 # 1 2 の粒径分布を表す図である。(d) Glu - R I O N - m i R 1 4 3 # 1 2 をマウスに投与したあとの血中の安定性を表す図である。

10

【図2】カチオン性人工核酸の合成スキームの一例を示す図である。

【図3】合成スキームの一例を示す図である。

【図4】DLD-1細胞において、miR-143#12をRION(コントロール)とGlu-RIONで48時間の処理をしたときの生存率を表す図である。コントロールに抑制する効果はなかった。

【図5a】各種の造血器腫瘍細胞についてのGlu-RION-miR143#12の効果を示す図である。各種細胞を72時間処理して細胞増殖抑制効果などを調べた(図5a、c、e)。PRMI8226細胞について、Glu-RION-miR143#12で処理をしたものと処理しないものの、蛍光顕微鏡で観察した結果を示している。蛍光試薬はヘキスト33342を使用した(図5d)。NB4細胞及びHL-60細胞において、Glu-RIONの代わりに遺伝子導入試薬リポフェクタミンを用いても細胞増殖抑制効果は無かった(図5c)。

20

【図5b】各種の造血器腫瘍細胞についてのGlu-RION-miR143#12の効果を示す図である。各種細胞を72時間処理して細胞増殖抑制効果などを調べた(図5a、c、e)。PRMI8226細胞について、Glu-RION-miR143#12で処理をしたものと処理しないものの、蛍光顕微鏡で観察した結果を示している。造血器腫瘍細胞上にグルコーストランスポーターの存在を確認した。NB4細胞について、ヘキスト33342で染色をした後に蛍光顕微鏡で観察した(図5f)。

30

【図6a】PRMI8226細胞において、Glu-RION-miR143#12によるRASネットワークの下流の因子の発現状況を調べたウェスタンブロットの結果を示す図である。

【図6b】NB4、HL-60、Jurkat細胞において、Glu-RION-miR143#12によるRASネットワークの下流の因子の発現状況を調べたウェスタンブロットの結果を示す図である。

【図7】ヒト末梢リンパ球の成長のGlu-RION-miR143#12の効果についてコンカナバリンAによる刺激の有無との関係について調べた図である。

40

【発明を実施するための形態】

【0032】

本開示の造血器腫瘍の治療剤の治療に用いられる、下記式(1)で表される核酸アナログとmiR-143及びそのアナログ、との組成物から得られるミセル又はナノ粒子について説明する。

【0033】

(造血器腫瘍)

本開示に用いられるミセル又はナノ粒子は造血器腫瘍の治療に用いられる。本開示において「造血器腫瘍」とは、大きくは白血病、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫と大別される腫瘍であり、多くの場合はK-RASネットワークに異常がある場合であると言われている

50

。いずれの癌も多くの場合、固形癌とは異なり外科的手法のみによる治療は困難であると言われる。本開示において「造血器腫瘍を治療する」とは、K - R A Sネットワークを制御することで、造血器内に集散的に存在し、又は血液や体液中で浮遊している状態でそれらの腫瘍細胞を死滅あるいは増殖抑制に導くことを言う。

【 0 0 3 4 】

白血病は、主に白血球、もしくはその未熟な段階での細胞が勝手に増える病気の総称である。白血病の種類としては、急性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、成人T細胞白血病、成人T細胞白血病に大別される。急性白血病は、更に急性骨髄性白血病と急性リンパ性白血病に分類される他、F A B分類 (F r e n c h - A m e r i c a n - B r i t i s h C l a s s i f i c a t i o n) とされる診断基準では形態学的な所見を加味して急性骨髄性白血球が再分類されたり急性前骨髄性白血病、急性骨髄単球性白血病、急性単球性白血病、急性赤白血病、急性巨核芽性白血病と分類されたりするものである。

10

【 0 0 3 5 】

悪性リンパ腫は、血液中の「リンパ球」ががん化した疾患であり、主にリンパ節、脾臓及び扁桃腺などのリンパ組織に発生するが、胃、腸管、甲状腺、肺、肝臓、皮膚、骨髄及び脳など、リンパ組織以外の臓器にも発生する。悪性リンパ腫は、病理組織学的に50種類以上に分類され、ホジキンリンパ腫と非ホジキンリンパ腫に大別される。非ホジキンリンパ腫は、B細胞性とT/NK細胞性の二つに分類され、更に細かい病理組織型に分けられる。

20

【 0 0 3 6 】

多発性骨髄腫は、血液細胞の一つである形質細胞ががん化することで起こる。形質細胞は、白血球の中のリンパ球のうち、B細胞から分化した細胞で、形質細胞ががん化して異常細胞(骨髄腫細胞)になると、異物を攻撃する能力が失われる。形質細胞腫瘍にはいくつかの種類があり、多発性骨髄腫のほか、形質細胞腫、マクログロブリン血症などが知られている。

【 0 0 3 7 】

(送達対象核酸：miR - 143及びそのアナログ)

本開示における送達対象核酸は、がん遺伝子K R A Sのネットワークを制御するマイクロRNAである。マイクロRNA(以下、「miRNA」と称する。)は、ゲノム上にコードされた内在性の20~25塩基程度の非コード(non-coding)RNAである。miRNAは、ゲノムDNA上のmiRNA遺伝子から、まず数百~数千塩基程度の長さの一次転写物(Primary miRNA、Pri-miRNA)として転写され、次にプロセッシングを受けて約60~110塩基程度のヘアピン構造を有するpre-miRNA(precursor miRNA)となる。その後、核から細胞質内へ移動し、スプライシングによって、20~25塩基程度の二本鎖miRNAとなる。二本鎖miRNAは、RISCと呼ばれるタンパク質に取り込まれ、一本鎖miRNA(ガイド鎖、アンチセンス鎖)となり、より不安定な一本鎖(パッセンジャー鎖、センス鎖)は分解される。一本鎖miRNAが、部分相補的な塩基配列をもつ標的遺伝子のmRNAに結合することで、標的遺伝子の翻訳を阻害する働きをする。なお、本明細書において、「miR - 143」を「miR143」と表記することがある。

30

40

【 0 0 3 8 】

miRNAは、ヒトやマウス等で1000種類以上が知られており、それぞれが複数の標的遺伝子の発現を調節し、細胞の増殖や分化等、様々な生命現象に関与することが示唆されている。なかでもmiRNAが癌細胞の増殖に深く関与していることは多くの研究者らによって指摘されており、核酸医薬品として研究開発が行われている。

RASは10をこえる下流のシグナルを制御することで膨大なネットワークを形成している。miR - 143は、K - R A Sネットワークを多角的に制御する抑制miRNAであり、癌の成長を抑制することができる。癌を抑制するために多くのmiR - 143が知

50

られており、発明者らを中心に以下のようなmiR-143 (SEQ-1~SEQ-23) が提案されている(下記表1、表2:特許第6730717号)。本開示のmiR-143のアナログとは、これらのmiR-143と類似の配列及び/又は構造を有し、KRASネットワークを多角的に制御する作用を有するマイクロRNAを意味する。

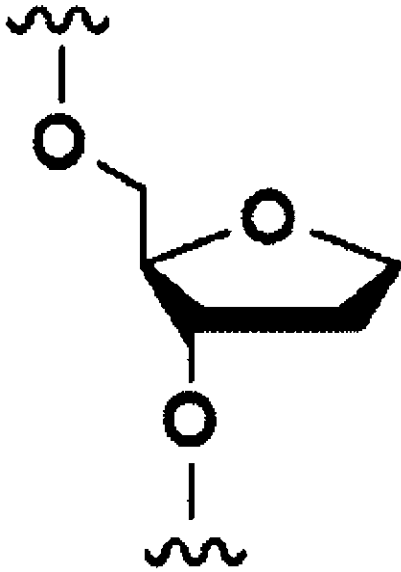
【0039】

【表1】

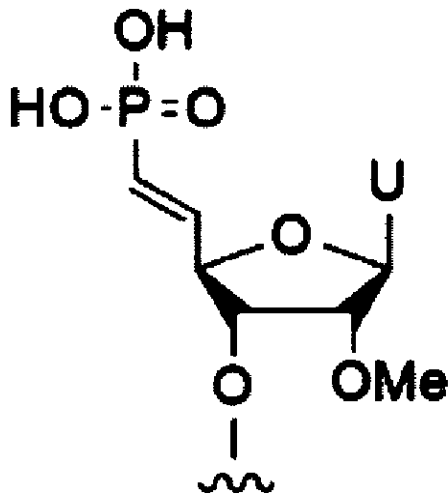
鎖の名称		5'末端の修飾	オリゴヌクレオチド (5'→3')	3'末端の修飾
SEQ-1	センス鎖	S-1	U*G*A*G*G*U*G*C*A*G*U*G*C*U*G*C*A*U*C*U*C*U*G*G	
	アンチセンス鎖	AS-4	U ^r G _m [^] A ^r G _m [*] A ^r U _m [*] G ^r A _m [*] A ^r G _m [*] C ^r A _m [*] C ^r U _m [*] G ^r U _m [*] A ^r G _m [*] C ^r U _m [*] C ^r A _m	^dT^dT
SEQ-2	センス鎖	S-1	U*G*A*G*G*U*G*C*A*G*U*G*C*U*G*C*A*U*C*U*C*U*G*G	
	アンチセンス鎖	AS-7	P(O)(OH) ₂ U ^r G _m [^] A ^r G _m [*] A ^r U _m [*] G ^r A _m [*] A ^r G _m [*] C ^r A _m [*] C ^r U _m [*] G ^r U _m [*] A ^r G _m [*] C ^r U _m [*] C ^r A _m	^dT^dT
SEQ-3	センス鎖	S-17	U ^r G [^] A*G*G*U ^r G*C ^r A*G*U ^r G*C ^r U ^r G*C ^r A*U ^r C ^r U ^r C ^r U ^r G*G	
	アンチセンス鎖	AS-4	U ^r G _m [^] A ^r G _m [*] A ^r U _m [*] G ^r A _m [*] A ^r G _m [*] C ^r A _m [*] C ^r U _m [*] G ^r U _m [*] A ^r G _m [*] C ^r U _m [*] C ^r A _m	
SEQ-4	センス鎖	S-1	U*G*A*G*G*U*G*C*A*G*U*G*C*U*G*C*A*U*C*U*C*U*G*G	
	アンチセンス鎖	AS-30	U _m [^] G _m [^] A _m [*] G _m [*] A _m [*] U _m [*] G _m [*] A _m [*] A _m [*] G _m [*] C _m [*] A _m [*] C _m [*] U _m [*] G _m [*] U _m [*] A _m [*] G _m [*] C _m [*] U _m [*] C _m [*] A _m	^dT^dT
SEQ-5	センス鎖	S-1	U*G*A*G*G*U*G*C*A*G*U*G*C*U*G*C*A*U*C*U*C*U*G*G	
	アンチセンス鎖	AS-31	U ^r G ^r A ^r G _m [*] A _m [*] U _m [*] G ^r A ^r A ^r G _m [*] C _m [*] A _m [*] C ^r U ^r G ^r U _m [*] A _m [*] G _m [*] C ^r U ^r C ^r A ^r	^dT^dT
SEQ-6	センス鎖	S-17	U ^r G [^] A*G*G*U ^r G*C ^r A*G*U ^r G*C ^r U ^r G*C ^r A*U ^r C ^r U ^r C ^r U ^r G*G	
	アンチセンス鎖	AS-3	U ^r G [^] A*G*A*U ^r G*A*A*G*C ^r A*C ^r U ^r G*U ^r A*G*C ^r U ^r C ^r A	^dT^dT
SEQ-7	センス鎖	S-17	U ^r G [^] A*G*G*U ^r G*C ^r A*G*U ^r G*C ^r U ^r G*C ^r A*U ^r C ^r U ^r C ^r U ^r G*G	
	アンチセンス鎖	AS-10	U ^r G _m [^] A ^r G _m [*] A ^r U _m [*] G ^r A _m [*] A ^r G _m [*] C ^r A _m [*] C ^r U _m [*] G ^r U _m [*] A ^r G _m [*] C ^r U _m [*] C ^r A _m	^dG^dG
SEQ-8	センス鎖	S-18	U _m [^] G [^] A*G*G*U _m [*] G*C _m [*] A*G*U _m [*] G*C _m [*] U _m [*] G*C _m [*] A*U _m [*] C _m [*] U _m [*] C _m [*] U _m [*] G*G	
	アンチセンス鎖	AS-12	U ^r G _m [^] A ^r G _m [*] A ^r U _m [*] G ^r A _m [*] A ^r G _m [*] C ^r A _m [*] C ^r U _m [*] G ^r U _m [*] A ^r G _m [*] C ^r U _m [*] C ^r A _m	^G _m ^G _m
SEQ-9	センス鎖	S-18	U _m [^] G [^] A*G*G*U _m [*] G*C _m [*] A*G*U _m [*] G*C _m [*] U _m [*] G*C _m [*] A*U _m [*] C _m [*] U _m [*] C _m [*] U _m [*] G*G	
	アンチセンス鎖	AS-13	U ^r G _m [^] A ^r G _m [*] A ^r U _m [*] G ^r A _m [*] A ^r G _m [*] C ^r A _m [*] C ^r U _m [*] G ^r U _m [*] A ^r G _m [*] C ^r U _m [*] C ^r A _m	^G ^r ^G ^r
SEQ-10	センス鎖	S-19	U ^r G [^] A*G*G*U ^r G*C ^r A*G*U ^r G*C ^r U ^r G*C ^r A*U ^r C ^r U ^r C ^r U ^r G*G	
	アンチセンス鎖	AS-3	U ^r G [^] A*G*A*U ^r G*A*A*G*C ^r A*C ^r U ^r G*U ^r A*G*C ^r U ^r C ^r A	^dT^dT
SEQ-11	センス鎖	S-1	U*G*A*G*G*U*G*C*A*G*U*G*C*U*G*C*A*U*C*U*C*U*G*G	
	アンチセンス鎖	AS-42	VP- U _m [^] G _m [^] A ^r G _m [*] A ^r U _m [*] G ^r A _m [*] A ^r G _m [*] C ^r A _m [*] C ^r U _m [*] G ^r U _m [*] A ^r G _m [*] C ^r U _m [*] C ^r A _m	^dT^dT
SEQ-12	センス鎖	S-1	U*G*A*G*G*U*G*C*A*G*U*G*C*U*G*C*A*U*C*U*C*U*G*G	
	アンチセンス鎖	AS-47	U ^r G _m [^] A ^r G _m [*] A ^r U _m [*] G ^r A _m [*] A ^r G _m [*] C ^r A _m [*] C ^r U _m [*] G ^r U _m [*] A ^r G _m [*] C ^r U _m [*] Ab*Ab	^dT^dT

【0040】

【化 1 1】



【化 1 2】



AS - 42 の 5' 末端の VP - 及びオリゴヌクレオチドの末端の Um は、以下で示される基を構成しており、式： $=CH - P(=O)(OH)_2$ が 5' 末端修飾 (VP -) に該当する。

【0041】

なお、配列表における上記表の配列とその配列番号は以下のとおり。

S - 1 (配列番号 1)、S - 17 (配列番号 2)、S - 18 (配列番号 3)、S - 19 (配列番号 4)、AS - 4 (配列番号 5)、AS - 7 (配列番号 6)、AS - 30 (配列番号 7)、AS - 31 (配列番号 8)、AS - 3 (配列番号 9)、AS - 10 (配列番号 10)、AS - 12 (配列番号 11)、AS - 13 (配列番号 12)、AS - 42 (配列番号 13)、AS - 47 (配列番号 14)、AS - 50 (配列番号 15)、AS - 51 (配列番号 16)、AS - 52 (配列番号 17)、AS - 55 (配列番号 18)、AS - 56 (配列番号 19)、AS - 57 (配列番号 20)

【0042】

上記のうち、本開示のターゲットである造血器腫瘍には、上記表中 SEQ - 8 (センス鎖 S - 18、アンチセンス鎖 AS - 12) が好ましい。

【0043】

(核酸アナログ)

以下、本開示の核酸アナログについて説明する。本開示の核酸アナログは、カチオン性人工核酸と、このカチオン性人工核酸に結合した親水性重合体と、から構成される。核酸アナログは、送達する対象となる核酸（以下、「送達対象核酸」という場合がある）を標的部位に送達するための担体として好ましく使用される。本開示の送達対象核酸は、miR-143又は上記miR-143の誘導体である。本開示の核酸アナログは、下記式(1)で示すことができる。

【化13】



(ここで、Nは、カチオン性人工核酸、Hは親水性重合体、S1はスペーサー1、S2はスペーサー2、Lはリガンドを表し、sは0又は1、tは0又は1を表わす。)

【0044】

(カチオン性人工核酸)

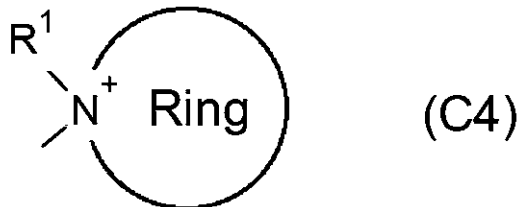
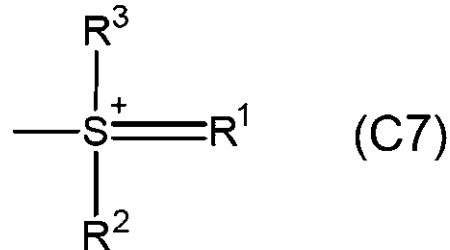
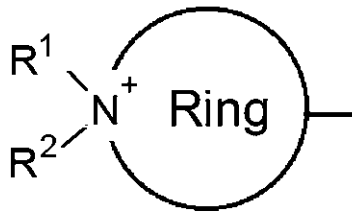
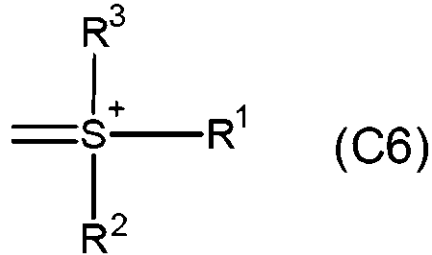
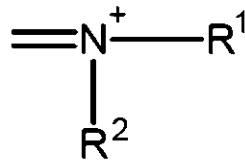
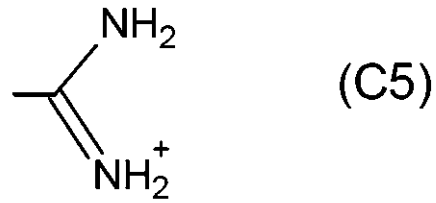
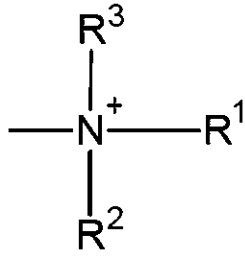
核酸アナログを構成する要素のうち、Nで示されるカチオン性人工核酸は、リボース及びデオキシリボースから選択される環構造に塩基が結合した構成単位と、2つの前記構成単位の間を連結する、カチオン性基を有する連結構造と、を有する。カチオン性人工核酸の塩基配列は、送達対象核酸の塩基配列に応じて、塩基の相補性や静電的相互作用の強度などを考慮の上、適宜設計することができる。

20

【0045】

カチオン性基は、カチオンの状態で、下記式(C1)~(C7)からなる群より選択される部分構造を有する。

【化14】



(ここで、 $\text{R}^1 \sim \text{R}^3$ は水素又は炭素数1～10のアルキル基を示し、 $\text{R}^1 \sim \text{R}^3$ は同一又は異なってもよい。Ringは4～8個の炭素原子で構成された環式化合物であり、該炭素原子の1つ以上が窒素、酸素及び硫黄から選択されるヘテロ原子で置換された複素環であってもよい。)

【0046】

カチオン性人工核酸は、他のヌクレオチドのリン酸基とカチオン性基との静電相互作用により会合しうる。ここで、「他のヌクレオチド」とは、DNA、RNAなどのヌクレオチドやその類似体を意味し、核酸アナログが担体として使用される場合は、送達対象核酸を構成するヌクレオチドやその類似体を意味する。

【0047】

カチオン性基のpKaは、他のヌクレオチドのリン酸基と静電相互作用をする点から、他のヌクレオチドのリン酸基のpKaよりも高い。核酸アナログのカチオン性基のpKaよりも低く、他のヌクレオチドのリン酸基のpKaよりも高いpH条件下では、カチオン性基が正に、リン酸基は負に帯電するため、これらの基が静電結合する。ここで、一般に、ヌクレオチドのリン酸基のpKaは1未満であることから、カチオン性基のpKaは1以上であり、好ましくは3以上、より好ましくは6.0以上である。カチオン性基のpK

a の上限は、特に限定されないが、12 以下であり、好ましくは 11 以下、より好ましくは 9 以下である。他のヌクレオチドのリン酸基との静電相互作用の強さや、カチオン性人工核酸の構造などの観点から、カチオン性基の pKa は 6 ~ 9 の範囲内であることが好ましい。

【0048】

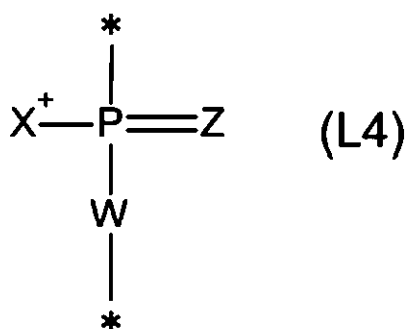
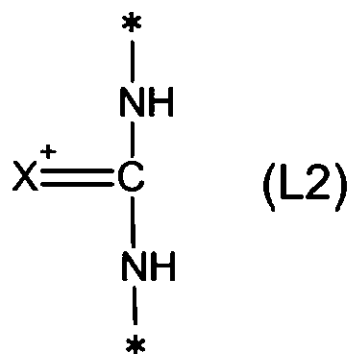
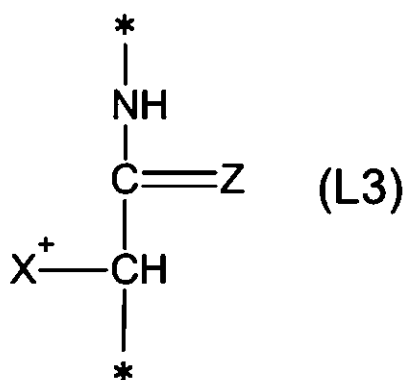
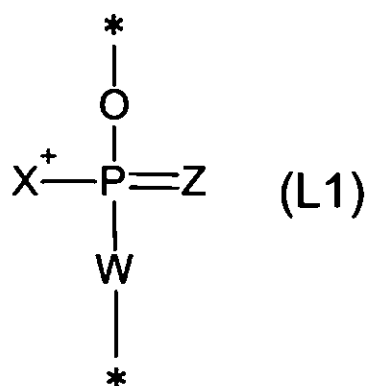
塩基としては、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウラシル、N - メチルアデニン、N - ベンゾイルアデニン、2 - メチルチオアデニン、2 - アミノアデニン、7 - メチルグアニン、N - イソブチリルグアニン、5 - フルオロシトシン、5 - プロモシトシン、5 - メチルシトシン、4 - N - メチルシトシン、4 - N, N - ジメチルシトシン、5 - フルオロウラシル、5 - プロモウラシル、5 - クロロウラシル、又は 5, 6 - ジヒドロウラシルなどを挙げることができる。

10

【0049】

連結構造としては、カチオンの状態で、下記式 (L1) ~ (L4) から選択される構造を少なくとも有するものが好ましい。

【化15】



(ここで、X⁺ は上記式 (C1) ~ (C7) のカチオン性基を含む官能基であり、Z は O 又は S を示し、W は - O - 又は - NR⁴ - を示し、ここで R⁴ は水素又は炭素数 1 ~ 10 のアルキル基を示す。* は隣接する上記の構成単位との結合手を意味する。)

40

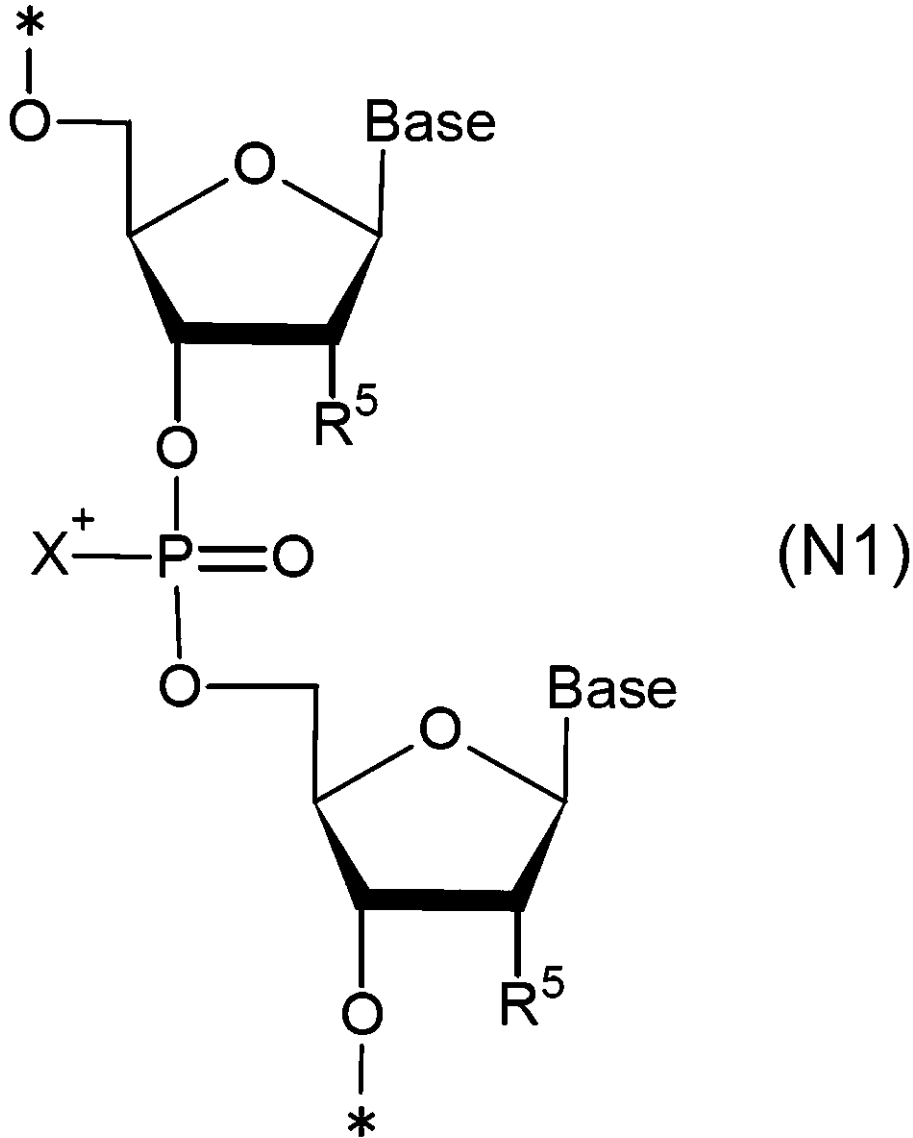
【0050】

ここで、「カチオンの状態で」とは、カチオン性基が正に帯電したと仮定した場合を意味しており、核酸アナログのおかれている環境条件 (溶媒の pH や種類など) によっては、カチオン性基は正に帯電していない状態の場合がある。正に帯電していない状態としては、例えば上記式 (C1) を例にしてカチオン性基がアンモニウムの場合、一級アミン (カチオン化すると一級アンモニウム)、二級アミン (カチオン化すると二級アンモニウム)、三級アミン (カチオン化すると三級アンモニウム) の状態などが挙げられる。

【0051】

カチオン性人工核酸としては、リボースやデオキシリボースに塩基が結合したヌクレオチドを構成単位とするヌクレオチド骨格を有するものを挙げることができる。なお、モルフォリンに塩基が結合した構造を構成単位とするモルフォリノ骨格を有するものも示す。

【化16】

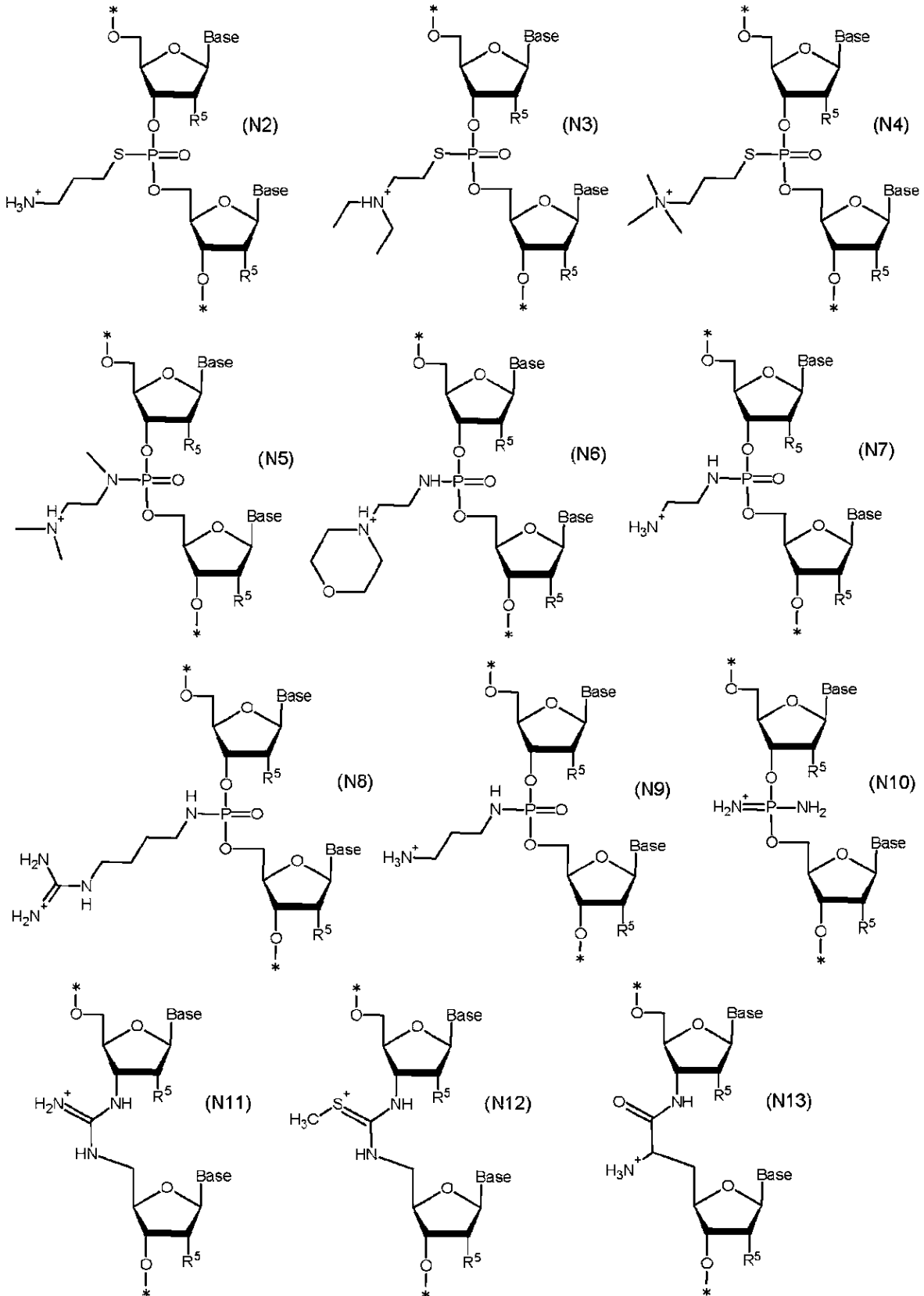


(ここで、Baseは塩基を示し、R⁵はH又はOHを示す。*は隣接するヌクレオチド骨格のリン酸との結合手を意味し、5'末端又は3'末端においては少なくとも一方が上記の親水性重合体と結合し、該親水性重合体と結合していない場合は水素である。)

【0052】

このようなヌクレオチド骨格を有する構造としては以下を挙げることができる。

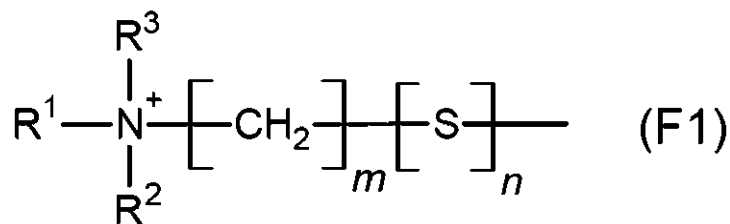
【化17】



【0053】

上記の場合において、 X^+ は、カチオンの状態で、下記式(F1)で示されるアンモニウムカチオンであることが好ましい。

【化 1 8】



(ここで、 $R^1 \sim R^3$ は、水素又は炭素数1～10のアルキル基を示し、互いに同一又は異なってもよく、 m は0～10の整数を示し、 n は0又は1の整数を示す。)

10

【0054】

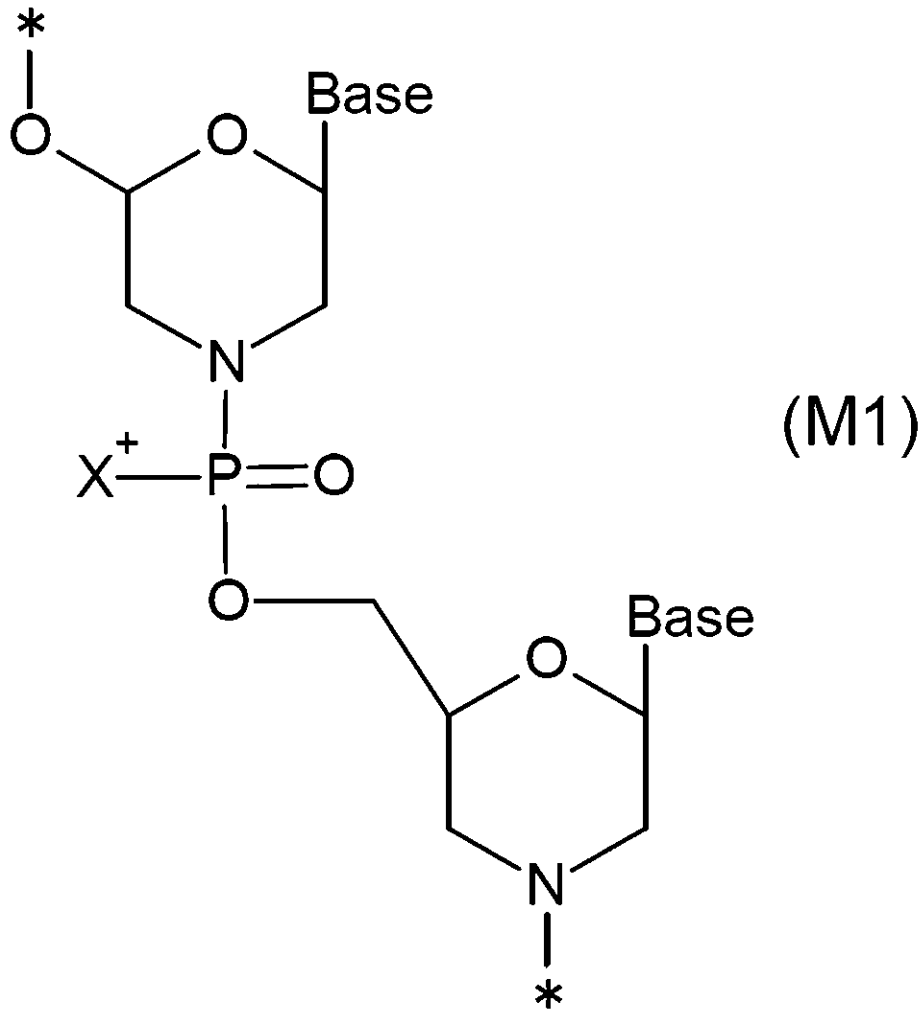
ここで、他のヌクレオチドのリン酸基との静電相互作用の強さは、一級アミン($R^1 \sim R^3$ がすべて水素) < 二級アミン($R^1 \sim R^3$ の2つが水素、他がアルキル基) < 三級アミン($R^1 \sim R^3$ の1つが水素、他がアルキル基) < 四級アンモニウム($R^1 \sim R^3$ がすべてアルキル基)となる。また、後述する実施例でも示すように、三級アミンなどと比較して四級アンモニウムをカチオン性基とする構造体は、環境のpHの低下に伴って構造崩壊しやすい性質を有している。これは、四級アンモニウムをカチオン性基とする構造体は、エンドソーム経由で構造体が細胞質に移行すると、弱酸性のエンドソーム内pHに反応して構造崩壊し、送達対象核酸を放出しやすい性質であることを意味する。したがって、 X^+ のカチオン性基としては、これらの中では、特に四級アンモニウムが好ましい。なお、カチオン性基のpKaは、構造にもよるが、一級アミンの場合はおおむね6.1～7.9、二級アミンは6.9～7.0、三級アミンは8.0～8.6、四級アンモニウムは8.0～9.0程度である。

20

【0055】

一方、モルフォリノ骨格を有するものとしては、下記式(M1)で示される構造を挙げることができる。

【化 1 9】



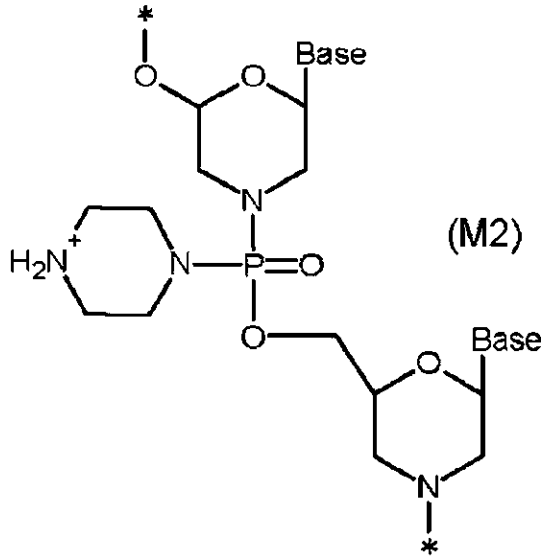
(ここで、Baseは塩基を示す。*は隣接するモルフォリノ骨格のリンとの結合手を意味し、5'末端又は3'末端においては少なくとも一方が上記の親水性重合体と結合し、該親水性重合体と結合していない場合は水素である。)

30

【0056】

このようなモルフォリノ骨格を有する構造としては以下を挙げるができる。

【化20】



【0057】

カチオン性人工核酸を構成する環構造と塩基とが結合した構成単位の数（重合度）は、環構造やカチオン性基の種類、送達対象核酸の種類や長さ（塩基数）などの条件によって適宜設定することができる。一般に、カチオン性人工核酸の重合度としては、5～100程度であり、10～50程度が好ましい。送達対象核酸の重合度（塩基数）が20塩基程度と短い場合、担体であるカチオン性人工核酸の重合度も送達対象核酸と同程度とすることが好ましい。一方、mRNAなどの比較的長い核酸の送達を想定した場合は、核酸の長さに対するマイナス電荷の割合が小さくなり、核酸全体に対するマイナス電荷を有する部分の影響が小さくなることから、カチオン性人工核酸と送達対象核酸の会合を妨げないのであれば、カチオン性人工核酸の重合度は送達対象核酸の重合度と異なってもよい。例えば、送達対象核酸がmRNAのような長い核酸の場合、カチオン性人工核酸の重合度は送達対象核酸の重合度よりも小さくてもよい。

20

【0058】

カチオン性人工核酸において、カチオン性基は、構成単位間を結合する連結構造の一部又は全部に導入されるが、後述するベシクルやミセルなどの構造形成の観点から、連結構造の総数に対してカチオン性基が導入されている連結構造の割合が50%以上であることが好ましく、80%以上であることがより好ましく、100%（連結構造のすべて）であることが特に好ましい。連結構造の総数に対してカチオン性基が導入された連結構造の数の割合が低いと、カチオン性人工核酸と送達対象核酸との間で形成される会合構造において、送達対象核酸の負電荷が優勢となり、構造体形成されにくくなる。あるいは、3'や5'末端の一方に連続でカチオン性基が導入された場合や、一個飛ばしなど飛び飛びの連結構造にカチオン性基が導入された場合には、構造体を形成することが考えられるが、これらの構造は、カチオンの導入割合に依存してpH応答に変化が生じ、構造が不安定であると考えられる。このため、カチオン性基が導入される連結構造の割合は高い方が好ましい。

30

40

【0059】

（親水性重合体）

式（1）において、Hは親水性重合体を表す。

親水性重合体は、核酸アナログの用途等に応じて、種々の重合体を使用することができる。特に、核酸を標的部位に送達するための担体として核酸アナログを使用する場合、親水性重合体としては、生体適合性を有するものが好ましい。また、核酸アナログがカチオン性であることから、親水性重合体としては、核酸アナログと電気的に相互作用（吸引、反発）しにくい中性のものが好ましい。

50

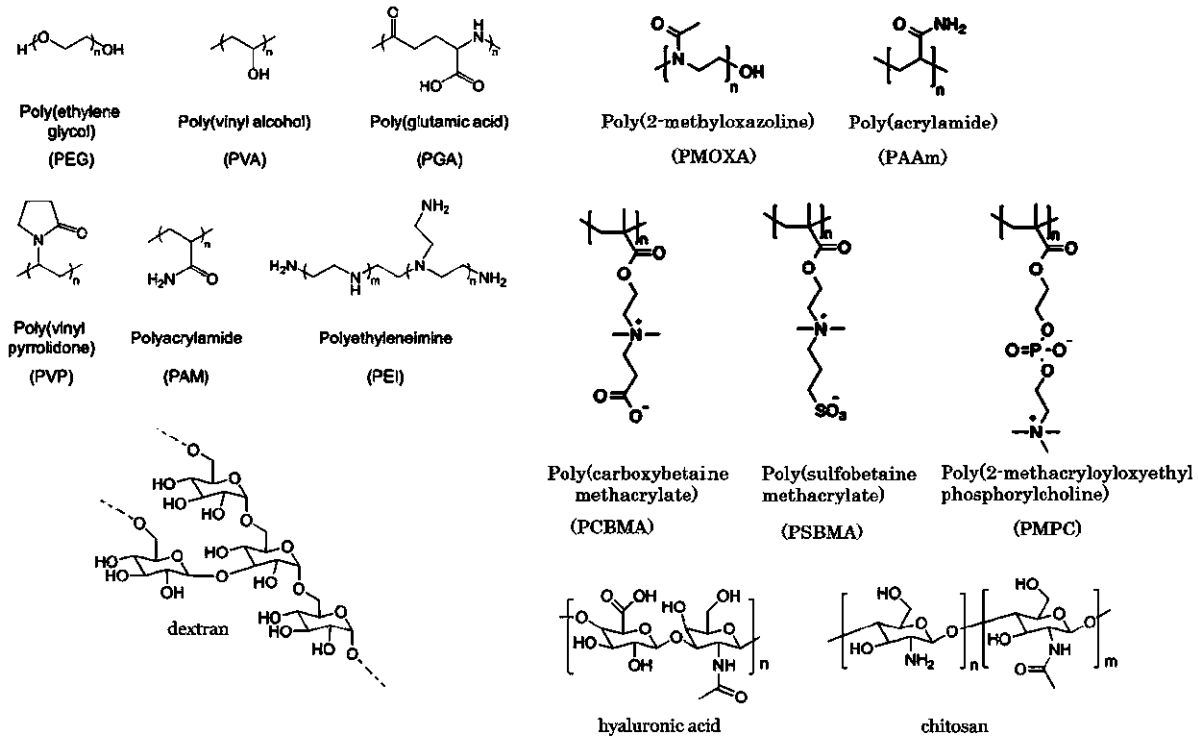
【 0 0 6 0 】

このような親水性重合体としては、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリグルタミン酸、ポリビニルピロリドン、ポリアクリルアミド、ポリエチレンジミン、ポリアルキルアクリレート、ポリオキサゾリン、ポリアクリルアミド、ポリ(カルボキシベタインメタクリレート)、ポリ(スルホベタインメタクリレート)、ポリ(2-メタアクリロイルオキシエチルホスホコリン)、ヒアルロン酸、キトサン及びデキストラン並びにこれらの誘導体から選択されることが好ましい。

【 0 0 6 1 】

このような親水性重合体としては以下を挙げることができる。

【化 2 1】



【 0 0 6 2 】

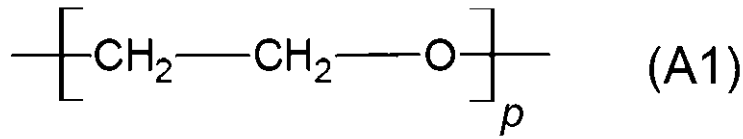
親水性重合体を構成するモノマーの種類やモノマー単位の数(重合度)は、送達する核酸の種類や分子量、人工核酸の分子量、送達する標的部位の周辺環境などの条件によって適宜設定することができる。代表的には、モノマーの種類はエチレングリコール、プロピレングリコール、ブチレングリコール単位のオリゴマーを挙げることができ、親水性重合体の重合度としては、2~100程度であり、2~50程度が好ましく、2~10程度がより好ましい。また、これらの親水性重合体のオリゴマーはリン酸ジエステル基などを介して2以上繰り返されていてもよい。リン酸ジエステル結合を介した繰り返し数は、人工核酸の分子量や、送達する核酸のとの相補性や静電的な相互作用で会合した場合の疎水性とのバランスの関係で親水性重合体の繰り返しは3以上でも良く、好ましくは4以上であり、多くても繰り返し数は100以下であり、30以下が好ましく、10以下がより好ましい。親水性重合体の重合度、又は親水性重合体の繰り返し数が低いと、後述する構造体を形成しにくくなるほか、生体内で異物として排除されやすいなど、分解安定性や血中滞留性が低くなりやすい。逆に、親水性重合体の重合度が高すぎると、構造体のサイズが大きすぎて標的部位への送達対象核酸の送達効率が低くなりやすい。

【 0 0 6 3 】

特に、ドラッグデリバリーシステム(DDS)の担体として核酸アナログを使用する場合、血中滞留性などの点から、親水性重合体としては、ポリエチレングリコールが特に好ましい。ポリエチレングリコールとしては、10~100Kのポリエチレングリコールを用いる場合もあるが、下記式(A1)で示されるポリエチレングリコール骨格を有するこ

とが好ましい。

【化 2 2】



(ここで、p は 1 ~ 20 の整数を示す。)

【0064】

また、A1 は、核酸塩基や、リン酸エステル誘導体 (- P O (O H) - , - P S (O H) - , P O (S H) -) をモノマー単位とした重合体として用いることもできる。モノマー単位の A1 のエチレングリコールの繰り返し回数 q は 1 ~ 20、好ましくは 3 ~ 10 であり、モノマーの構造は同一でも異なってもよく、モノマー単位の重合度は 1 ~ 10、好ましくは 2 ~ 10、更に好ましくは 2 ~ 8 である。そのようなリン酸エステル誘導体モノマー単位としては、エチレングリコールリン酸エステル誘導体単位、ジエチレングリコールリン酸エステル誘導体単位、トリエチレングリコールリン酸エステル誘導体単位、ヘキサエチレングリコールリン酸エステル誘導体単位などを挙げることができる。

10

これらの誘導体単位は、更に重合体のモノマーとして用いることもできる。リン酸エステル誘導体単位の重合度は、人工核酸の大きさにもよるが、人工核酸の塩基数が 10 ~ 30 であれば、1 ~ 10、好ましくは 2 ~ 10、更に好ましくは 2 ~ 8 である。モノマー単位はトリエチレングリコールリン酸エステル誘導体、ヘキサエチレングリコールリン酸エステル誘導体であることが最も好ましい上記で述べた親水性重合体のモノマーの種類や重合度、特にエチレングリコールリン酸誘導体モノマーの重合度は、後述する構造体の形成がしやすさ、生体内で異物として認識されにくさ、分解安定性や血中滞留性の低くなる、などの観点から、選択することができる。

20

【0065】

(リガンド)

構造体は、各種のリガンドで表面が修飾されていてもよい。このようなリガンドで構造体の表面を修飾することで、構造体に標的指向性などを付与することができる。リガンドとしては、免疫グロブリン、炭水化物、ペプチド、タンパク質、アプタマーなどを挙げることができる。脂質ナノ粒子などの研究から予想される主なリガンドとその応用分野は以下のとおりであると思われる。本開示においては、以下の予想にもかかわらず、グルコースをリガンドに用いた場合、浮遊系細胞の造血器腫瘍に対しても効果のあることが分かった。

30

【0066】

- ・グルコース：腫瘍研究、脳毛細血管内皮細胞へのドラッグデリバリー
- ・マンノース：巨大リポソームの効率的な形成
- ・ガラクトース：マクロファージのガラクトース受容体の研究、ガラクトースの肝細胞への標的送達の研究
- ・スクロース：ドキシルビシンによる癌治療
- ・マルトース：癌治療におけるドキシルビシンの輸送
- ・ラクトース：リポソームのサイズと安定性の研究
- ・オリゴ糖：治療用インヒビターのデザイン
- ・レクチン：肺のドラッグデリバリー
- ・トマトレクチン、小麦胚芽アグルチニン：インスリンの経口投与
- ・N C L - アプタマー：広範な癌に対するシスプラチンを使用した化学療法
- ・s g c 8 アプタマー：白血病 C E M - C C R F 細胞用
- ・N X 1 8 3 8：癌細胞の V E G F に特異的に結合
- ・A n t i - C D 4 4：癌細胞の選択的ターゲティング

40

- ・ D A G - N X 2 1 3 : 血管新生を促す V E G F への特異性
- ・ A S 1 4 1 1 : 乳がん細胞 M C F - 7 に対する細胞傷害性
- ・ M a c u g e n : 黄斑型加齢性黄斑変性症の治療薬
- ・ B O C K : トロンビンの異なる結合部位を認識するための使用
- ・ T A S S E T : 標的タンパク質の異なる結合部位を認識するための使用
- ・ x P S M - A 9 : 前立腺がん細胞に発現する前立腺特異的膜抗原に対する使用
- ・ I L - 4 R : 腫瘍微小環境を利用した腫瘍増殖の抑制

【 0 0 6 7 】

(スパーサー 1)

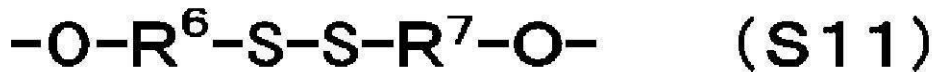
【 0 0 6 8 】

10

カチオン性人工核酸と親水性重合体との結合は、種々の結合様式で結合していても良いし、リンカーを介して結合していてもよい。このような結合としては、エステル結合 (- C (= O) - O -)、エーテル結合 (- O -)、ジスルフィド結合 (- S - S -)、ホスホロアミド (- P (O H) - N H -)、リン酸エステル (- O P O - O -) などを挙げることができる。リンカーとしては、これらが単独又は組合わせて用いられていてもよく、アルキル鎖のエステル結合、エーテル結合、ジスルフィド結合などを介していてもよい。これらのリンカーは、カチオン性人工核酸がヌクレオチド骨格の場合、カチオン性人工核酸の 5' 末端又は 3' 末端あるいはこれらの両方の水酸基に結合し、カチオン性核酸と親水性重合体を介するように結合することが好ましい。カチオン性人工核酸と親水性重合体がリンカーにより結合する場合は、リンカーが親水性重合体と構造が異なることから電荷を調節することが期待できる。また、ホスホロアミダイトを介した場合は、ポリエチレングリコールからなる重合体と同様に負電荷として振る舞うことから好ましい。さらに、PEG 抗体の誘導が抑えられるという点からも有利である。さらに、ホスホロアミダイトを介する場合には、核酸自動合成で核酸配列から親水性重合体部分まで一貫して合成できる点は工業的にはメリットとなる。

20

スパーサー 1 は、カチオン性人工核酸と親水性重合体を連結する構造である。スパーサー 1 (S 1) は、下記式 (S 1 1) で表される結合を有していてもよい。



(ここで、式中 R₆, R₇ は炭素数 1 ~ 12 のメチレン基を表し、R₆, R₇ は同一又は異なってもよい。)

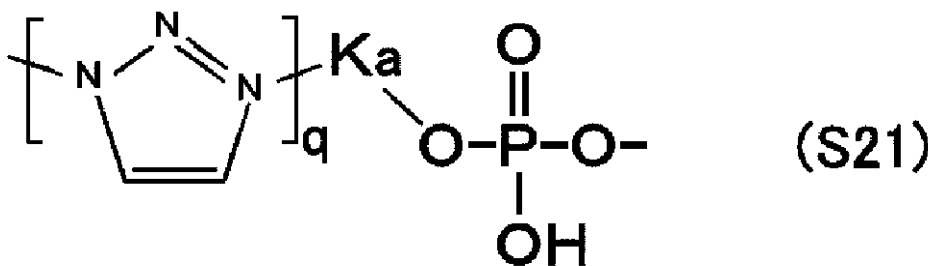
【 0 0 6 9 】

(スパーサー 2)

リガンドがアルドースの場合で、対応するホスホロアミダイト試薬が不安定な場合は、スパーサー 2 2 を用いることができる。スパーサー 2 2 は、親水性重合体とリガンドを連結する構造である。スパーサー 2 (S 2) が、リン酸ジエステル結合、又は式 (S 2 1) に示すトリアゾールを含むリン酸ジエステル結合であることが好ましい。

【 化 2 4 】

40



式中、 K_a は炭素数1~20のメチレン基を含むアミド結合、炭素数6~12の芳香族を含む化合物、又は直接結合を表し、 $q = 0$ 又は1であり、 $q = 0$ のとき K_a はリガンドと結合する。スペーサー1とスペーサー2は、核酸アナログにおいて任意の構造であり、必要に応じて設けることができる。

【0070】

(核酸送達用構造体)

本開示の核酸アナログは、送達対象核酸を標的部位に送達するための担体として特に好ましく用いることができる。図1は、核酸アナログを担体として使用した場合について説明する模式図である。この図に示すように、核酸アナログは、一次構造として、カチオン性基と親水性重合体とを備えており、天然核酸などの送達対象核酸はアニオン性を有している。このアニオン性の送達対象核酸と核酸アナログのカチオン性基との間で静電相互作用により会合した会合構造が形成され、担体である核酸アナログと送達対象核酸とで構成される複合体(イオンコンプレックス)となる。

10

【0071】

ここで、送達対象核酸とカチオン性基との間で相補性がある場合は、塩基-塩基間の水素結合により二本鎖が形成されるが、本開示では相補性が低い場合であっても、カチオン性基と送達対象核酸のリン酸基との間の静電相互作用により会合しうる点で優れている。すなわち、完全な相補性(100%マッチ)を有する送達対象核酸だけでなく、例えば80%や90%の相補性を有する送達対象核酸であっても、上記の静電相互作用によって会合構造が形成されて複合体となる。このため、非相補鎖である送達対象核酸を標的部位に送達することが可能となる。カチオン性基の種類などにもよるが、カチオン性人工核酸と送達対象核酸の相補性の程度としては、50%以上であることが好ましく、80%以上であることがより好ましく、100%であることが特に好ましい。

20

【0072】

血液中などの水性環境下では、この複合体の親水性重合体のセグメントどうしが会合し、ナノスケールの核酸送達用構造体(以下、単に「構造体」という場合がある)を形成する。このナノスケールの構造体としては、会合構造のセグメントが内側に、親水性重合体のセグメントが外側に位置するミセルやベシクルなどの構造体がある(図の「ナノ構造体形成」参照)。これらのミセルやベシクルは中心部に中空部分を有する球状構造体を形成し、この中空部分に低分子の化合物などの医薬を包接させることもできる。これにより、標的対象核酸だけでなく低分子の医薬も送達することが可能となる。中空部分の直径は、約50~500nm程度である。

30

【0073】

なお、ミセルは、親水性重合体のセグメントが球状構造体の最外殻に位置し、会合構造のセグメントが球状構造体の中心にある中空部分に面する位置にある構造である。一方、ベシクルは、会合構造のセグメントを介して2つの複合体が会合した二重膜構造をとっており、この二重膜の一方の親水性重合体のセグメントが球状構造体の最外殻に位置し、他方の親水性重合体のセグメントが球状構造体の中心にある中空部分に面する位置にある構造である。このため、ミセルの中空部分には疎水性の医薬などを包接することが好ましく、ベシクルの中空部分には親水性の医薬などを包接することが好ましい。

40

【0074】

このような構造体は、球状の構造体の内部に送達対象核酸が位置しているため、分解安定性が高くなる。また、上記の構造体は、親水性重合体のセグメントを最外殻に有するため、血中滞留性に優れたものとなる。そして、構造体は、標的部位である細胞などにおいてエンドソームに包まれて細胞質に取り込まれ、その後エンドソームを脱出し、細胞質内や核内で医薬である送達対象核酸や低分子医薬を放出する(図の「生化学的評価」参照)。

【0075】

このような構造体の用途としては、種々の疾患に対するドラッグデリバリーの担体などを挙げることができる。例えば後述する実施例では、がん促進遺伝子のK-Rasとその

50

ネットワークを対象に、抗オンコマイクロRNAであるマイクロRNA - 143を送達対象核酸として送達する担体として、本開示の核酸アナログは有効であることが示されている。

【0076】

核酸送達用構造体は、各種のリガンドで表面が修飾されていてもよい。このようなりガンドで構造体の表面を修飾することで、構造体に標的指向性などを付与することができる。便宜上、核酸送達用構造体のことを、“Reversibly Ionic Oligonucleotide-based Nanoparticles”と称し、RIO N又はRIOと記載することがある。

【0077】

(核酸アナログの製造方法)

次に、核酸アナログの製造方法について説明する。核酸アナログは、種々の方法で製造することができるが、カチオン性人工核酸と親水性重合体を個別に合成し、これらを結合する方法を挙げることができる。すなわち、核酸アナログの製造方法は、

- (i) カチオン性人工核酸を合成するカチオン性核酸合成工程と、
- (ii) 親水性重合体を合成する親水性重合体工程と、
- (iii) カチオン性人工核酸と親水性重合体とを結合する結合工程と、を有する。

より具体的には、核酸自動合成機を用いる場合であれば、核酸の3'又は5'を固定して先にカチオン性人工核酸を合成し、親水性重合体を合成し、リガンドと結合させる方法でもよいし、リガンドを先に固定し、親水性重合体を合成しその先に核酸を合成することができ、親水性重合体と核酸の間にスペーサーを入れてもよい。このようにして製造された核酸はアニオン性核酸だが、上記反応によって製造された核酸をカチオン化することもできる。

さらに詳述する。

【0078】

(a) 2段階合成法

カチオン性人工核酸は、2段階の反応で合成することができる(2段階合成法)。2段階合成法としては、主に3種類を挙げることができる。以下、順次説明する。

(a-1) 2段階合成法I

この方法では、核酸自動合成により核酸の硫黄化(S化)を行い、これに親水性重合体ホスホロアミダイト(例えば、エチレングリコールホスホロアミダイト)を連結させてオリゴPS体—親水性重合体を合成したのち、更にBr化合物を反応させて核酸にカチオン性基を導入する(後述する実施例のTEG-PSオリゴ、HEG-PSオリゴの系)。

カチオン性人工核酸は、ヌクレオチド骨格の場合、後述する実施例に記載のように、連結構造にチオリン酸エステルを導入する工程と、カチオン性基を有するプロモ化合物とチオリン酸エステルとを反応させて連結構造にカチオン性基を導入する工程を含む方法で合成することができる。

【0079】

(a-1-2) チオリン酸エステルの導入

チオリン酸エステルは、公知のホスホロアミダイト法によって合成することができる。ホスホロアミダイト法の概要としては、5'が4,4'-ジメトキシトリチル(DMT r)基で保護されたヌクレオシド又はヌクレオチドを固相に担持させる(担持工程)。つぎに、ジクロロ酢酸などの脱保護試薬でDMT r基を脱保護し(脱保護工程)、4,5-ジシアノイミダゾールなどの活性化剤の存在下でホスホロアミダイトヌクレオチドとカップリングさせる(カップリング工程)。その後、(N,N-ジメチルアミノメチリデン)アミノ-3H-1,2,4-ジチアゾリン-3-チオン(DDTT)などの硫化剤によって亜リン酸エステルをチオリン酸エステルに変換する(硫化工程)。あるいはヨウ素、ピリジンなどを含む酸化剤によって亜リン酸エステルをリン酸ジエステルに変換する(酸化工程)。この工程を繰り返すことで、連結構造にチオリン酸エステルを含む合成核酸を製造することができる。ホスホロアミダイトの塩基の種類を変えることで、所望の配列を有す

10

20

30

40

50

る合成核酸を製造することができる。なお、酸化工程に替えて硫化工程を行うことで、ヌクレオチド骨格を構成する連結構造の所望の位置にのみチオリン酸エステルを導入することも可能である。

【0080】

(a-1-2)

次に、得られた合成核酸に、アミン又はアンモニウム基を有するプロモ化合物を反応させる。プロモ化合物としては、例えば、3-プロモ-1-プロピルアミン臭化水素酸塩、2-プロモ-N,N-ジエチルエチルアミン臭化水素酸塩、(3-プロモプロピル)トリメチルアンモニウムプロミドなどを例示することができる。合成核酸とプロモ化合物との反応は、リン酸緩衝液などで行うことができ、反応条件は適宜設定できるが、例えばpHは5~7の範囲内、反応温度は30~60、反応時間10~50時間で行うことができる。

10

【0081】

(a-2) 2段階合成法 I I

この方法では、核酸自動合成により核酸のボラノホスフェート化(B化)を行い、これに親水性重合体ホスホロアミダイト(例えば、エチレングリコールホスホロアミダイト)を連結させてオリゴB化一親水性重合体を合成(図2)したのち、更にヨウ素酸化によってアミノ基化合物を反応させてカチオン性基を導入する(図3の戦略2)。この方法では、後述のカチオンホスホロアミダイトを用いることで1つのリン酸基に2つのカチオン性基を導入することも可能である(ダブルカチオン導入)。

20

【0082】

(a-3) 2段階合成法 I I I

この方法では、核酸自動合成によるカチオン性人工核酸を合成ののち、親水部をクリック反応で導入する(後述する実施例のPEG-PMOの系)。すなわち、骨格にカチオン性基を有するカチオン性人工核酸を合成したのち、これにアジドポリエチレングリコールなどの親水性アジド化合物をクリック反応により連結させる方法である。

【0083】

(b) 1段階合成法

先に説明した方法は、チオリン酸エステルを含む合成核酸を製造し、これにプロモ化合物を反応させる2段階の合成方法であったが、1段階でカチオン性人工核酸を合成することもできる。図2はこの方法のスキームを示している。この方法の概略としては、カチオンホスホロアミダイトとエチレングリコールホスホロアミダイトの核酸自動合成によるカチオン-親水性重合体の1段階合成である(図2、図3の戦略1)。この方法も、基本的には2段階合成法で示したホスホロアミダイト法と類似したスキームであるが、一部に相違がある。

30

【0084】

まず、固相に担持したヌクレオチドに、ジイソプロピルアミド亜リン酸化合物とヌクレオチドモノマーとを反応させる(図の「1. Coupling」)。一部の水酸基を保護基で保護し(「2. Capping」)、酸化剤又はホウ化剤で酸化又はホウ素化する(「3. Oxidation or Boranation」)。ヨウ素酸化によってアミノ基化合物を反応させてカチオン性基を導入する。

40

【0085】

図3に核酸アナログの合成スキームの一例を示す。この例では、カチオン性人工核酸としてヌクレオチド骨格を、親水性重合体としてポリエチレングリコールを有する核酸アナログを合成するスキームを示している。図の「ホスホロアミダイト合成」において、化合物1~3の順に公知の方法でホスホロアミダイトヌクレオチドを合成する。一方で、化合物4~6の順に、ホスホロアミダイトポリエチレングリコールを合成する。

【0086】

次に、図の「戦略1: カチオン導入オリゴ核酸合成」に示すスキームで核酸アナログを合成する。具体的には、上記のスキームで合成したホスホロアミダイトヌクレオチドとホ

50

スホロアミダイトポリエチレングリコールと、分子内にジスルフィド結合とホスホロアミダイトを有するホスホロアミダイトジスルフィドとを原料とする。そして、保護基による保護と脱保護などの反応を行い、カチオン性人工核酸の5'位に親水性重合体を結合する。なお、図の「戦略2：カチオン導入オリゴ核酸合成」に示すスキームのように、固相合成によって一段階でカチオン性人工核酸を合成してもよい。カチオン性人工核酸の製造方法は特許文献1などを参考にすることができる。

【0087】

(核酸送達構造体の製造方法)

次に、核酸送達用構造体の製造方法について説明する。核酸送達用構造体は、送達対象核酸と核酸アナログとを会合させて複合体を形成させる(会合工程)。核酸アナログのカチオン性基と送達対象核酸のリン酸基との間に相補性がある場合は、アニーリングによって両者を結合して二本鎖を形成させる。アニーリングの際の核酸アナログと送達対象核酸の比率としては特に制限はないが、核酸アナログ：送達対象核酸=1：1~1：10の範囲内が好ましい。アニーリングは所定温度への昇温と、その後の降温によって行う。アニーリングとしては、80以上への昇温が好ましく、90以上への昇温より好ましい。また、昇温した温度の保持時間としては、5分以上が好ましく、10分以上がより好ましい。その後、50以下、好ましくは30以下に降温し、10分以上、好ましくは30分以上その温度を保持する。

【0088】

なお、核酸アナログのカチオン性基と送達対象核酸のリン酸基との静電相互作用の観点から、この工程は、核酸アナログのカチオン性基のpKaよりも低く、送達対象核酸のリン酸基のpKaよりも高いpH条件下で行うことが好ましい。すなわち、このようなpH条件では、カチオン性基が正に、リン酸基は負に帯電しており、これらの基が静電結合する。このようなpH条件は、カチオン性基のpKaなどにもよるが、pH2~7程度が好ましく、pH3~6程度がより好ましい。

【0089】

次に、複数の複合体を会合させて高次構造を形成させる(会合体形成工程)。この工程では、水や水溶液などの水性溶媒中で複合体どうしが自己凝集してミセルやベシクルなどの構造体が形成される。構造体を形成するための複合体の濃度としては、25~2500μM程度であり、100~1000μMの範囲内がより好ましい。

【0090】

(核酸送達方法)

本開示の核酸送達方法は、上記の核酸送達用構造体を投与して標的部位内に核酸送達用構造体を取り込ませる投与工程と、標的部位内で核酸を放出させる放出工程と、を有する。投与工程では、送達対象核酸と結合した状態の上記の構造体を、人やその他の哺乳動物などに投与する。構造体を含む薬剤は、血液中に投与することが好ましいが、治療対象となる疾患や親水性重合体の種類などに応じて適宜決定することができる。投与された構造体は、細胞が標的部位である場合はエンドソーム経路で細胞質に取り込まれる。放出工程では、標的部位である細胞内に取り込まれた構造体から送達対象核酸が放出される。カチオン性基が四級アンモニウムなどpH応答性の高い構造体では、エンドソーム内の酸性環境下で構造崩壊して送達対象核酸を放出しやすくなる。また、上記のように、構造体の中空部分に低分子の医薬を包接させて評定部位内で放出させることも可能である。このような方法で、標的部位に送達対象核酸や低分子医薬を送達することができる。

【0091】

以下、本開示を実施例に基づいて具体的に説明するが、これらは本開示の目的を限定するものではない。また、以下の実施例において「%」表示は特に規定しない限り質量基準(質量パーセント)である。

【実施例】

【0092】

(細胞)

評価に用いたDLD-1(ヒト大腸癌細胞の培養株)、ASF4-1(ヒト線維芽細胞の培養株)、PRMI8226(ヒト多発性骨髄腫細胞の培養株)、NB4(ヒト急性前骨髄球性白血病プレB細胞の培養株)、HL-60(ヒト前骨髄性白血病細胞の培養株)及びJrukac細胞(ヒト白血病T細胞由来の細胞株)は、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所のJCRB細胞バンクより入手した。DLD-1、PRMI8226、NB4、HL-60及びJrukac細胞の培養には、RPMI-1640培地(富士フイルム和光純薬製)を用いた。ASF4-1細胞の培養には、イーグル最小必須培地を用いた。すべての培地は、熱不活化ウシ胎児血清(ニチレイバイオサイエンス)を加えて10(v/v)%とし、各細胞は、空気95%、二酸化炭素5%の雰囲気化でインキュベーションした。

10

【0093】

(細胞評価)

すべての細胞は、サンプル処理の一日前に、 0.25×10^5 細胞/ウェルで、12ウェルプレートに播種した。サンプルはmiR-143#12の濃度が0.5~10nMとなるように投与した。48時間又は72時間培養後それぞれの細胞評価を実施した。細胞増殖評価は、生細胞の数をトリパンプルー色素排除法により数え評価した。mRNA発現量とタンパク発現量は培養後、細胞を回収しそれぞれ解析を実施した。

【0094】

(粒径分布)

粒径分布はZetasizer(Beckman Coulter Inc)を用い、動的光散乱法により求めた。測定には、送達する核酸(本開示のmiR-143)の10 μ MのPBS溶液(pH7.4)を作製してサンプルとした。

20

【0095】

RNAはNucleoSpin(登録商標)miRNA(Takara)を用いて培養細胞から単離した。RNA濃度と純度はUV分光法を用いて評価した。RNU6Bを内部表標準に用いた。加えて、NRAS及びKRASのmRNAの発現レベルを評価するためのmRNAのqRT-PCRは、qPCR Thunderbird(登録商標)NextXYBR(登録商標)qPCR Mix(東洋紡)を用いて行った。NRAS、KRAS及びGAPDHのプライマー以下の通りである。GAPDHは内部コントロールとして用いた。相対的発現レベルはCt法を用いて計算した。

30

NRASセンス鎖: 5'-CCT CCT CAC TTG GCT GTC TG-3'(配列番号27)

NRASアンチセンス鎖: 5'-TCA CGT TTG CGG TTT GGT TC-3'(配列番号28)

KRASセンス鎖: 5'-TGG TGG TGT GCC AAG ACA TT-3'(配列番号29)

KRAS アンチセンス鎖: 5'-CAC CTC ACC ATG CCA TCT CA-3'(配列番号30)

GAPDHセンス鎖: 5'-TCT AGA CGG CAG GTC AGG TC C ACC-3'(配列番号31)

40

GAPDHアンチセンス鎖: 5'-CCACCC ATG GCA AAT TCC ATG GCA-3'(配列番号32)

【0096】

(ウェスタンブロット)

細胞溶解液は、10mM Tris-HCl(pH7.4)、1%NP-40、0.1%デオキシコール酸、0.1%SDS、2%プロテアーゼ阻害剤カクテル、2%フォスファターゼ阻害剤カクテルII、及び2%リン酸阻害剤カクテルIII(Sigma-Aldrich)からなる溶解バッファーで調製し、20分間氷上に静置した。4、20分間、13000rpm(16200xg)で遠心後、上澄み液を蛋白質のサンプルとした。蛋白含量は、DC蛋白アッセイキット(Bio-Rad)を用いて測定した。2 μ gの溶

50

解蛋白は、10.0%又は12.5%ポリアクリルアミドゲルを用いるドデシル硫酸ポリアクリルアミドゲルにより分離し、フッ化ポリビニリデン (PVDF) (Merck Millipore) のイモビロン - Pメンブレンにエレクトロブロットングを行った。蒸留水中Can Get Signal (登録商標: 東洋紡) で20% PVDFを用いて1時間非特異的結合をブロックしたのち、Get Signal Solution 1 (東洋紡) を用いる一次抗体により4、終夜でイモビロン - Pメンブレンをインキュベーションした。翌日、0.1% Tween 20 (TBS-T) を含むトリス緩衝生理食塩水 (TBS) でメンブレンを3回洗浄した。イムノブロットは、Immobilon Forte Western horseradish peroxidase (HRP) substrate (Millipore) を用いて可視化した。イムノブロット画像は、ImageQuant LAS 4000 生体分子イメージャーを使用して取得した (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA)。デンストメトリー解析は、画像解析ソフトImageQuant Total Lab-7 (GEヘルスケア・ライフサイエンス) を用いて実施した。

10

【0097】

使用した一次抗体は以下のとおり:

抗AKT、ERK1/2、PARP、Cyclin D1、ERK5、SOS1、GLUT1、及びGLUT4 (Cell Signaling Technology); 抗KRAS (LifeSpan BioScience, Seattle, WA, USA); KRAS、HRAS、NRAS (abcam) を含む抗Total (T) - RAS。

20

抗 - アクチン (Sigma-Aldrich); 抗 - Tubulin (株式会社メディカル&バイオラトリーズ、東京、日本)。

【0098】

【表3】

SEQ ID	Name	5' end	Oligonucleotide (5'→3')	3' end
1	G#12	-	U [^] r [^] G [^] m [^] A [^] r [^] G [^] m [^] A [^] r [^] U [^] n [^] G [^] r [^] A [^] n [^] A [^] r [^] G [^] m [^] C [^] r [^] A [^] m [^] C [^] r [^] U [^] n [^] G [^] r [^] U [^] n [^] A [^] r [^] G [^] m [^] C [^] r [^] U [^] n [^] C [^] r [^] A [^] m	[^] dT [^] dT
2	P#1	-	U [^] G [^] A [^] G [^] C [^] U [^] A [^] C [^] A [^] G [^] U [^] G [^] C [^] U [^] G [^] C [^] A [^] U [^] C [^] U [^] C [^] U	
3	P#2	-	U [^] G [^] A [^] G [^] C [^] U [^] A [^] C [^] A [^] G [^] U [^] G [^] C [^] U [^] G [^] C [^] A [^] U [^] C [^] U [^] C [^] U	*X*X*X*X*X*Y*Z
4	P#3	-	U [^] G [^] A [^] G [^] C [^] U [^] A [^] C [^] A [^] G [^] U [^] G [^] C [^] U [^] G [^] C [^] A [^] U [^] C [^] U [^] C [^] U	*X*X*X*X*X*Y*Glu
5	AS#1	-	G [^] G [^] C [^] C [^] U [^] U [^] U [^] C [^] A [^] C [^] U [^] A [^] C [^] U [^] C [^] C [^] U [^] A [^] C	[^] dT [^] dT
6	S#1	-	G [^] U [^] A [^] G [^] G [^] A [^] G [^] U [^] A [^] G [^] U [^] G [^] A [^] A [^] G [^] G [^] C [^] C	[^] r [^] X [^] X [^] X [^] X [^] X [^] Y*Z
7	S#2	-	G [^] U [^] A [^] G [^] G [^] A [^] G [^] U [^] A [^] G [^] U [^] G [^] A [^] A [^] G [^] G [^] C [^] C	[^] r [^] X [^] X [^] X [^] X [^] X [^] Y*Glu

- G : miR - 143 のガイド鎖
- P : 本開示の人工核酸
- AS : siRNA のアンチセンス鎖 コントロール
- S : siRNA のセンス鎖 コントロール
- N : RNA
- n : DNA
- Mf : 2' - F - RNA
- * : リン酸ジエステルのアニオン性骨格
- ^ : - P (S) OH -
- + : リン酸塩のカチオン性骨格
- X : ヘキサエチレングリコール

40

Y ; リンカー (本願のスペーサー 2)

Z : アセチレン誘導体

G l u : グルコース

下線 : ミスマッチの塩基

【 0 0 9 9 】

なお、配列表における上記表の配列とその配列番号は以下のとおり。

P # 1 (配列番号 2 1)、P # 2 (配列番号 2 2)、P # 3 (配列番号 2 3)、A S # 1 (配列番号 2 4)、S # 1 (配列番号 2 5)、S # 2 (配列番号 2 6)

【 0 1 0 0 】

(製造例 1 : P # 2 の合成)

m i R - 1 4 3 及びその誘導体を送達するための人工核酸 (I D 4、P # 3) の塩基配列は、送達する核酸の塩基配列をもとに設計した。本実施例で用いる m i R - 1 4 3 及びその誘導体は、G # 1 2 (A S - 4 と同じ) の核酸を用いた。

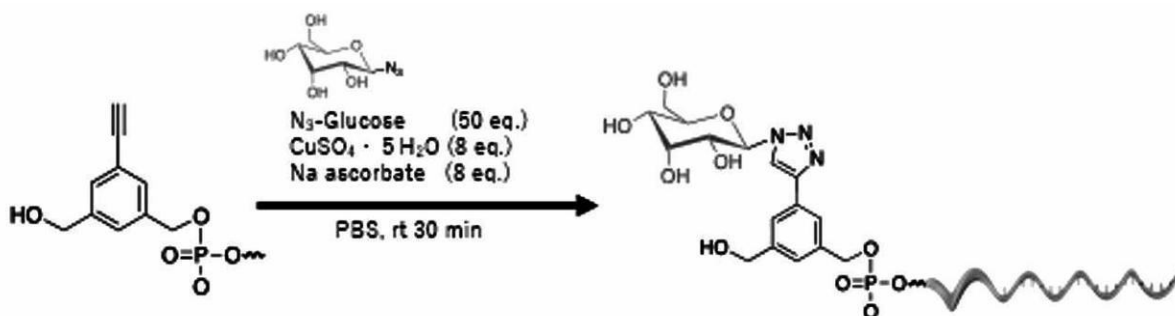
【 0 1 0 1 】

P # 2 の人工核酸は核酸自動合成装置で合成した。P # 2 に記載のヌクレオチド配列をチオリン酸ジエステルにより連結した後、ホスホロアミダイト法によりヘキサエチレングリコールをリン酸基により 6 単位導入し、更にその末端に下記の化学式に示す三重結合構造体を構築し、人工核酸がチオリン酸ジエステルで連結された P # 2 を得た。

別途、国際公開 2 0 1 6 / 1 5 2 9 8 0 号に記載の方法により、1 - アジドグルコースを合成した。

【 0 1 0 2 】

【 化 2 5 】



【 0 1 0 3 】

上記で合成した人工核酸がチオリン酸ジエステルで連結された P # 2 を P B S (p H 7 . 4) に溶解した。次に、5 0 m M のアスコルビン酸ナトリウム溶液 (1 0 当量)、及び、5 0 m M の硫酸銅 (I I) (1 0 当量) 溶液、及び 5 0 m M の 1 - アジドグルコースを P B S (p H 7 . 4) に核酸 P # 2 (1 0 n m o l、1 当量) を混合し、1 5 分間反応させた。反応後のサンプルを高速液体クロマトグラフィで精製し、人工核酸がチオリン酸ジエステルで連結された核酸 P # 3 を得た。

【 0 1 0 4 】

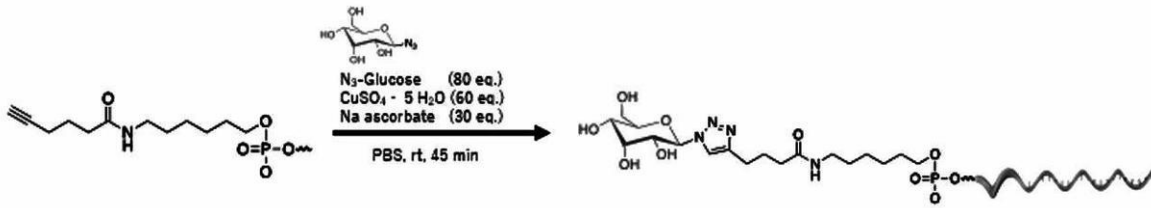
人工核酸がチオリン酸ジエステルで連結された核酸 P # 3 (4 n m o l) と 4 M の 2 - (d i e t h y l a m i n o) e t h y l b r o m i d e h y d r o b r o m i d e (W a c o , O s a k a , J a p a n , 2 μ L , 8 m m o l) を、P B S 中で 4 5、2 4 時間反応させた。反応後のサンプルを蒸留水で 3 ~ 5 日間の間透析し、凍結乾燥により精製し、P # 3 を得た。

【 0 1 0 5 】

(製造例 2)

製造例 1 において、末端の 3 重結合が下記の化学式に示す構造であるチオリン酸ジエステルで結合された人工核酸である以外は、製造例 1 と同様にして、P # 3 を得た。

【化 2 6】



【 0 1 0 6】

(製造例 3 : G l u - R I O N)

m i R - 1 4 3 アナログ G # 1 2 (「 m i R - 1 4 3 G # 1 2 」 と記載することがある) と製造例 1 で得られた核酸アナログ P # 3 を 1 : 5 の比率で 9 8 1 5 分、2 5 5 0 分、4 5 5 0 分間アニーリングして G l u - R I O N - m i R 1 4 3 # 1 2 を得た。

10

【 0 1 0 7】

(粒径分布の測定)

m i R - 1 4 3 アナログ G # 1 2 と製造例 1 で得られた核酸アナログ P # 3 を 1 : 5 のモル比で混合し、アニーリングを行った。その結果を図 1 c に示す。m i R - 1 4 3 G # 1 2 と核酸アナログ P # 3 がアニールされて自己集積して R I O N - m i R 1 4 3 # 1 2 がナノ粒子として形成されたこと分かる。

【 0 1 0 8】

(参考例 1)

G l u - R I O N - m i R 1 4 3 # 1 2 のヒト大腸癌 D L D - 1 細胞への効果を調べ、R I O N - C o n t r o l (C n t l .) と比較した。その結果を図 4 及び表 4 に示す。G l u - R I O N - m i R 1 4 3 # 1 2 は細胞取り込みがグルコース付加のないものより向上した (図 4 a , b) 。 R I O N - m i R 1 4 3 # 1 2 は受動輸送で細胞内に侵入するが、G l u - R I O N - m i R # 1 4 3 を用いた場合には同細胞に発現するグルコーストランスポーターを經由して細胞に取り込みが向上しているものと考えられる。G l u - R I O N - m i R 1 4 3 # 1 2 の I C ₅₀ は 3 . 3 n M であり、m i R - 1 4 3 の標的遺伝子の K R A S , S o s - 1 , A k t , E R K 1 / 2 の発現を抑制した。D L D - 1 の細胞死は切断 P A R P - 1 が観察されたことからアポトーシスであることがわかった。したがって、がん細胞への核酸導入にはグルコーストランスポーターを經由した導入が有用であることが考えられる。

20

30

【 0 1 0 9】

(実施例 1)

ヒト K R A S 変異型造血器腫瘍細胞の特性評価及び G l u - R I O N - m i R 1 4 3 # 1 2 を用いた m i R - 1 4 3 # 1 2 の送達による成長抑制効果について調べた。

造血器腫瘍細胞として、R P M I 8 2 2 6 (K R A S G 1 2 A) 、 N B 4 (K R A S A 1 8 D) 、 H L - 6 0 (N R A S Q 6 1 L) 、 J u r k a t (w i l d t y p e) を用いた。これらは、既存のトランスフェクションでは核酸の導入が困難とされる浮遊細胞である。結果を図 5 及び表 4 に示す。R P M I 8 2 2 6 に対する I C ₅₀ は、6 . 9 n M 、 N B 4 に対する I C ₅₀ は 6 . 4 n M 、 H L 6 0 に対する I C ₅₀ は 7 . 3 n M であった。

40

【 0 1 1 0】

R P M I 8 2 2 6 細胞において、G l u - R I O N - m i R 1 4 3 # 1 2 の効果が確かめられているが、m i R - 1 4 3 # 1 2 なしで G l u - R I O N を用いた場合、m i R - 1 4 3 # 1 2 と遺伝子導入試薬リポフェクタミンを用いた場合、いずれの場合も細胞増殖抑制効果は認められなかった (図 5 b) 。とくに、リポフェクティオン試薬は一般的な遺伝子導入試薬として広く用いられているが、R P M I 8 2 2 6 細胞のような浮遊細胞では導入効率が極めて低いことが知られている。図 5 b では核酸濃度を 2 0 0 n M にしても m i R 1 4 3 # 1 2 の導入による細胞死が誘導されてない。一方、図 5 c の G l u - R I O N - m i R 1 4 3 # 1 2 では、1 - 1 0 n M において濃度依存的に細胞死が誘導された。し

50

たがって、RPMI 8226細胞に核酸を導入したGlu-RION-miR143#12は、低濃度で核酸導入が可能なることから有用な核酸導入技術である。HL-60細胞とNB4細胞についても細胞増殖抑制効果が確認されているが、NB4においてはアポトーシスも観察された(図5)。造血器腫瘍細胞にはグルコーストランスポーター(GLUT1及びGLUT4)が発現していることを確認した(図5g)。

【0111】

(実施例2)

Glu-RION-miR143#12を用いた造血器腫瘍へのmiR-143#12の送達効果について調べた。

RPMI 8226細胞において、RAS及びRAS関連蛋白質(Sos-1、ERK1/2、ERK5、Akt)の発現レベルをウェスタンブロットにより求めた。結果を図6aに示した。この結果は、Glu-RION-miR143#12を用いることで、miR-143の標的遺伝子のTRAS、Akt、ERK5、ERK1/2の発現がmiR-143#12により抑制されたことを示すものである。これは、細胞内にmiR-143#12が送達され、RNA干渉によってタンパク質の発現が抑制されたためと考えられる。RPMI 8226細胞には、栄養素トランスマッターの一つであるグルコーストランスポーターが存在し、RIONの表面に存在するリガンドがこのトランスマッターを認識することで効率よく浮遊細胞へ核酸が取り込まれたものと考えられる。

10

【0112】

図6bではmRNAの発現レベルを評価した。miRNAはmRNAの非翻訳領域に結合することでタンパク質の翻訳を阻害する、つまり、miRNAの作用ではmRNAの発現量は低下しないことが知られている。mRNA NRAS又はKRASの発現レベルを解析したところ発現量の著しい低下は観測されなかった。このことからRPMI 8226に対するGlu-RION-miR143#12のタンパク発現抑制や細胞増殖抑制の作用はmiRNA143#12による作用であることが示唆された。図6c、図6dではNB4とHL60におけるGlu-RION143#12のタンパク発現レベルを評価した。その結果、NB4ではmiR143#12の標的タンパクであるSos-1、TRAS、Akt、ERK5、ERK1/2の発現低下がみられ、HL-60ではTRAS、Akt、ERK1/2の発現低下が観測され、細胞増殖抑制(図5e)はmiR143#12による薬効の誘導であることが示唆された。一方で、図6eでは、Jurkatにおけるタンパク発現レベルを評価した。JurkatではmiR143#12の標的タンパクであるSos-1、TRAS、Akt、ERK5、ERK1/2の発現低下がみられた。しかし、Jurkatは細胞増殖抑制が誘導されてない(図6e)ことから、JurkatはRASがドライバー遺伝子のがんではないことが推測された。

20

30

【0113】

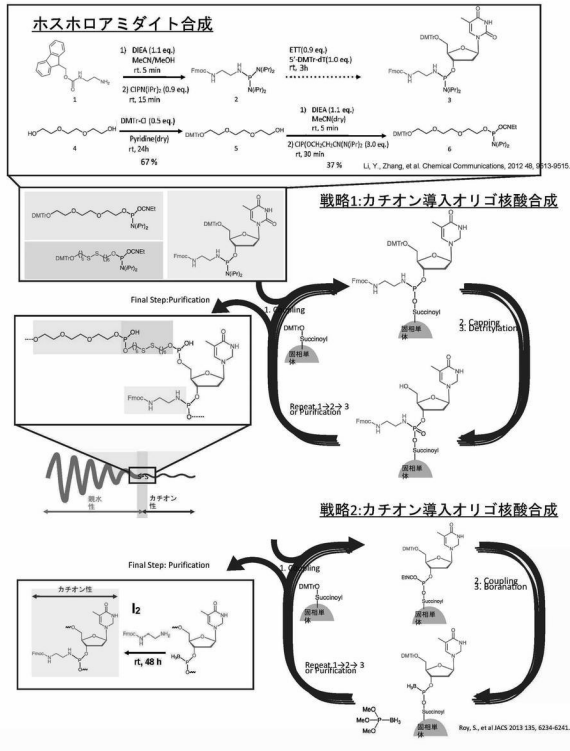
(実施例3)

Glu-RION-miR143#12を用いてmiR-143#12定常状態における末梢リンパ球の刺激について、コンカナバリンAを用いた場合と用いない場合の違いについて調べた。その結果を図7に示す。末梢リンパ球の生存率は、コンカナバリンAを用いない場合は上昇したが、コンカナバリンAを用いた場合は末梢リンパ球の増殖抑制の傾向がみられた。この増殖抑制は細胞周期の停止によるものと考えられる。

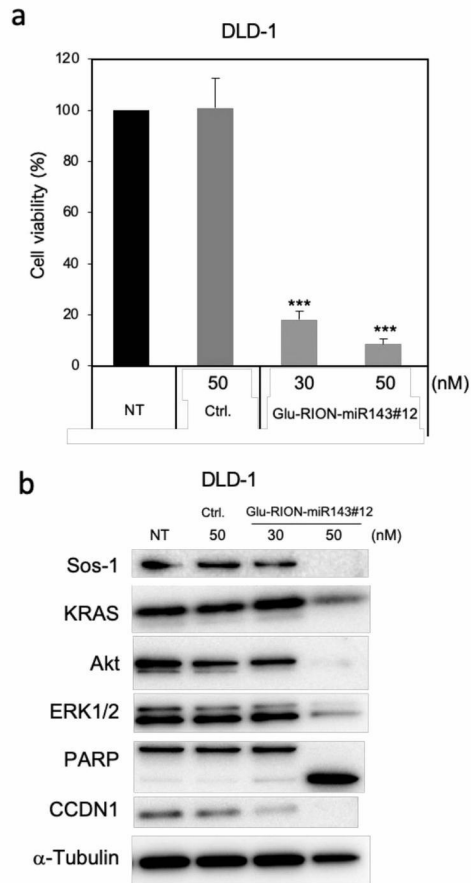
40

【0114】

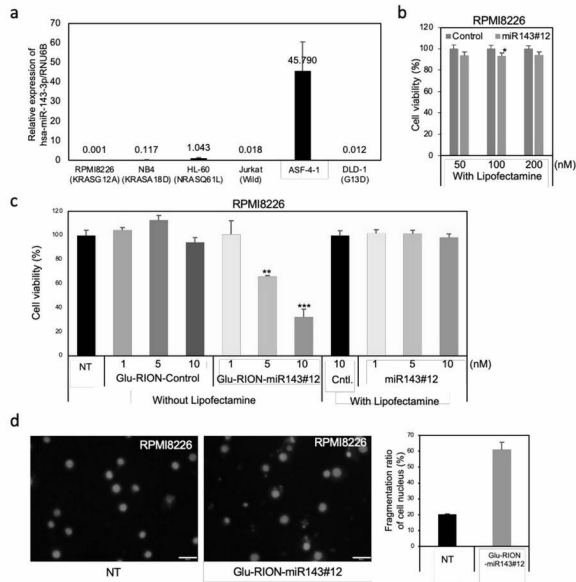
【 図 3 】



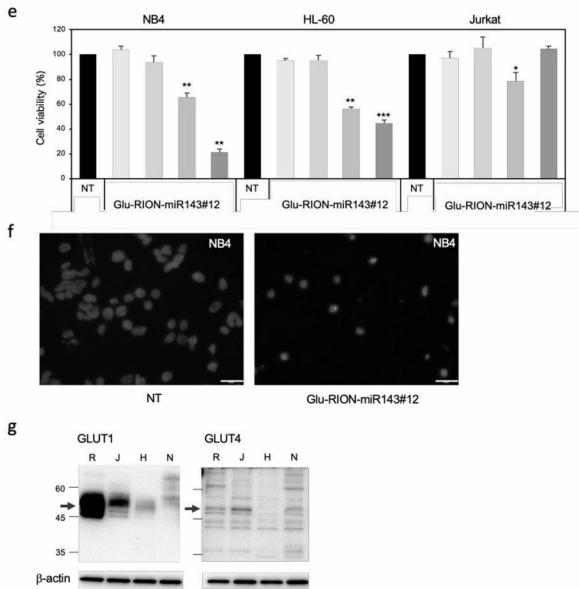
【 図 4 】



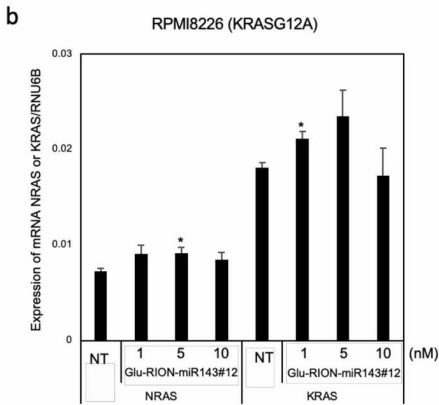
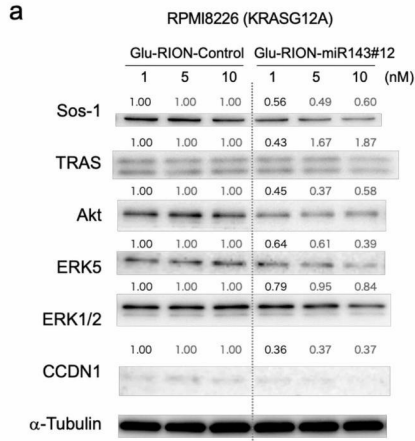
【 図 5 a 】



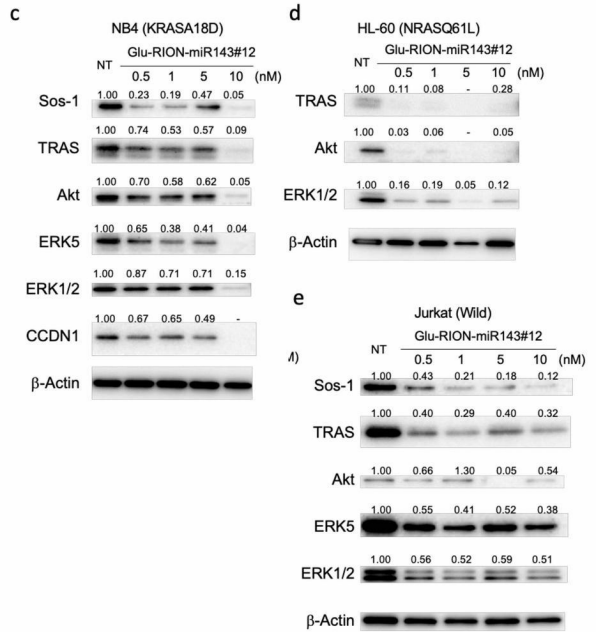
【 図 5 b 】



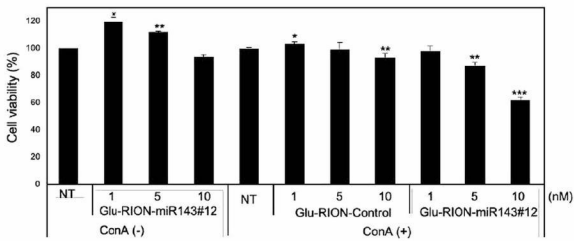
【 6 a 】



【 6 b 】



【 7 】



【配列表】

0007725042000001.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	47/32 (2006.01)	A 6 1 K	47/32
A 6 1 K	47/34 (2017.01)	A 6 1 K	47/34
A 6 1 K	47/36 (2006.01)	A 6 1 K	47/36
A 6 1 K	9/107 (2006.01)	A 6 1 K	9/107
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113 1 1 0 Z
C 1 2 N	15/88 (2006.01)	C 1 2 N	15/88 Z
C 1 2 N	15/10 (2006.01)	C 1 2 N	15/113 Z
C 1 2 N	15/11 (2006.01)	C 1 2 N	15/10 1 1 0 Z
C 1 2 N	15/87 (2006.01)	C 1 2 N	15/11 Z
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	15/87 Z
C 1 2 N	5/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/88 Z Z N A
		C 1 2 N	5/10
		C 1 2 N	5/12

審査官 池田 百合香

(56)参考文献 国際公開第2022/230990(WO, A1)

平島 一輝, miR-143-ナノ脂質抱合粒子を用いたKRAS変異多発性骨髄腫治療法の開発, 科学研究費助成事業 研究成果報告書, 課題番号: 20K16216, 2022年06月20日

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

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

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

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