

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年11月3日(03.11.2022)



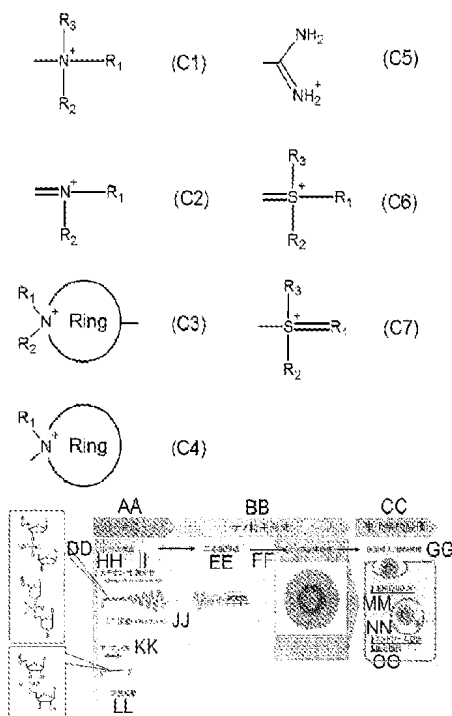
(10) 国際公開番号

WO 2022/230990 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 47/69 (2017.01) *A61K 47/36* (2006.01)
A61K 9/107 (2006.01) *A61K 47/56* (2017.01)
A61K 9/127 (2006.01) *A61K 47/60* (2017.01)
A61K 31/7088 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
A61K 31/7125 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01) *C07H 21/02* (2006.01)
A61K 47/10 (2006.01) *C07H 21/04* (2006.01)
A61K 47/32 (2006.01) *C12N 15/88* (2006.01)
A61K 47/34 (2017.01)
- (30) 優先権データ:
 特願 2021-075651 2021年4月28日(28.04.2021) JP
 特願 2022-026023 2022年2月22日(22.02.2022) JP
- (71) 出願人: 国立研究開発法人科学技術振興機構(JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒3320012 埼玉県川口市本町四丁目1番8号 Saitama (JP).
- (72) 発明者: 宮本 寛子 (MIYAMOTO Noriko); 〒4700392 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 Aichi (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2022/019343
- (22) 国際出願日: 2022年4月28日(28.04.2022)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (74) 代理人: 弁理士法人きさらぎ国際特許事務所 (KISARAGI ASSOCIATES); 〒1020084 東京都

(54) Title: ARTIFICIAL NUCLEIC ACID AND NUCLEIC ACID DELIVERING METHOD USING SAME

(54) 発明の名称: 人工核酸及びそれを用いた核酸の送達方法



(57) Abstract: The present invention is directed to a nucleic acid analog in which a cationic artificial nucleic acid and a hydrophilic polymer are bound to each other. The cationic artificial nucleic acid has a backbone structure consisting of: building blocks each including a ring structure selected from ribose and deoxyribose, and a base bound thereto; and linkage structures each linking two of the building blocks. The linkage structures in a cationic state each have a cationic group selected from the group consisting of the following formulae (C1) to

WO 2022/230990 A1

千代田区二番町5番地6 あいおいニッセイ
同和損保二番町ビル8階 Tokyo (JP).

- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

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

(C7). The cationic artificial nucleic acid can associate with phosphate groups of other nucleotides through electrostatic interaction between the phosphate groups and the cationic groups. (In the formulae, R_1 to R_3 each represent hydrogen or an alkyl group, and may be the same as or different from one another. Ring represents a cyclic compound and may be a heterocyclic ring.)

(57) 要約: 本発明は、カチオン性人工核酸と親水性重合体とが結合した核酸アナログである。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つの構成単位の間を連結する連結構造と、からなる骨格構造を有し、連結構造は、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カチオン性基を有し、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、 $R_1 \sim R_3$ は水素又はアルキル基を示し、同一又は異なってもよい。Ringは環式化合物であり複素環であってもよい。)

明 細 書

発明の名称：人工核酸及びそれを用いた核酸の送達方法

技術分野

[0001] 本発明は、核酸アナログ、核酸送達用構造体及びその製造方法並びに核酸送達方法に関し、特に、送達する対象である核酸を標的部位に送達するための核酸送達用構造体及びその製造方法並びに核酸送達方法に関する。

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。

[0003] 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30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。

[0004] 特許文献1には、リピッド単層によって内包された核複合体を含んだナノ粒子が開示されている。この複合体は、カチオン性ポリマーの1以上の分子に静電的に結合された1以上の核酸分子を含んでおり、カチオン性ポリマーはリピッド単層に内在する第1リピッドに共有結合している。ここで、カチオン性ポリマーとしてはポリエチレンイミンなどが、第1リピッドとしてはホスホリピッドなどが例示されており、リピッド単層は1以上の非結合リピッドを更に含んでおり、非結合ホスホリピッド分子の一部はペグ化（PE

Gy化) されていることが記載されている。このような構成により、核酸のための体内送達剤として利用するのに適したナノ粒子が提供されるとされている。

[0005] 特許文献2には、ポリエチレングリコール部分及び末端がチオール基の側鎖を有するポリカチオン部分を構成成分とするブロックコポリマーと、siRNAとを含む、ポリイオンコンプレックスが記載されている。ここで、ポリカチオン部分は、側鎖にカチオン性基を有するポリペプチドである。これにより、単分散性及び構造安定性が高く、かつ細胞へのsiRNA送達能に優れた、siRNA内包高分子ミセル複合体(ポリイオンコンプレックス)を提供することが可能になるとされている。

[0006] 特許文献3には、機能性オリゴヌクレオチドとポリ(エチレンオキシド)とのコンジュゲート、ならびに該コンジュゲートとカチオン性ポリマーによるポリイオン複合体及びそのミセルが開示されている。このコンジュゲートは、一般式(A): FuNT-L₁-L₂-PEGで示され、このFuNTは機能性オリゴヌクレオチドの残基を、L₁はアルキレン基を、L₂は生理学的条件下で開裂しうる連結基を、PEGはポリエチレングリコールを、それぞれ示している。カチオン性ポリマーは、ポリリジンなどから選択される。コンジュゲートとカチオン性ポリマーのポリイオン複合体を形成させ、これを動物細胞に取り込ませると、コンジュゲートはエンドソームの環境下で機能性オリゴヌクレオチドを開裂して放出する。このミセルによれば、オリゴヌクレオチドの動物細胞内での安定性が図られ、標的遺伝子への特異的結合性が向上するとされている。

[0007] さらに、発明者らは、DDSへの応用展開を目的として、ポリエチレングリコール(PEG)と天然核酸(DNA)のコンジュゲート体を合成している(非特許文献1)。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1: 特表2011-503070号(要約、請求項1~6、図1、段

落0060など)

特許文献2：国際公開第08/062909号（要約、請求項1など）

特許文献3：国際公開第05/100447号（要約、請求項1、請求項8など）

非特許文献1：「免疫回避型PMO/DNAナノ構造体の創製とDDS応用」
2017年度実績報告書 (<https://kaken.nii.ac.jp/ja/report/KAKENHI-PROJECT-17H07219/17H072192017jisseki/>)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 特許文献1の複合体は、カチオン性ポリマーとして、ポリエチレンイミンのような高分子化合物を使用しているが、送達対象の核酸との相互作用が弱い。また、本文献では、送達対象の核酸（DNA）とカチオン性ポリマーとが静電的に結合しているが、送達されるDNAは二本鎖であり（本文献の図1参照）、一本鎖DNAの状態では核酸と結合してこれを標的部位に送達することはできない。

[0010] また、本文献の複合体は、カチオン性ポリマーが両親媒性のリピッド（脂質）に共有結合した構造を有しており、この複合体で形成されるナノ構造（予備形成複合体）にPEG-PEのような非結合性のリピッドを内包させることで体内安定性を付与している（段落0060、図1参照）。すなわち、本文献では、複合体自体が形成するナノ構造体自体は、PEG化されていないため、血中滞留性などの体内安定性が十分ではなく、付加的に内包させた非結合リピッドのPEGによって体内安定性を付与している。なお、非結合リピッドは、カチオン性ポリマーと結合していないリピッドであり、本文献にはカチオン性ポリマーとPEGが結合した分子は開示されていない。

[0011] 特許文献2のブロックコポリマーは、ポリカチオン部分がポリペプチドであるため、特許文献1と同様の理由で、送達対象であるsiRNAとの相互作用が弱く、また一本鎖の状態ではsiRNAと結合することはできない。

[0012] 特許文献3のコンジュゲートは、機能性オリゴヌクレオチド（FuNT）

とPEGが結合したものであるが、この機能性オリゴヌクレオチドはカチオン性ではなくアニオン性のヌクレオチドである。また、本文献のコンジュゲートは、連結基の開裂によって機能性オリゴヌクレオチドを放出するためのものであり、それ自体が送達対象であり、核酸を運ぶための担体ではない。

[0013] 上記のように、従来は、送達対象である一本鎖の核酸と結合して標的部位に送達でき、かつ会合等で形成された構造がそれ自体で体内安定性の高い担体は知られていなかった。

[0014] 非特許文献1のDNA-PEGコンジュゲートは、送達対象である核酸との間で塩基-塩基間の水素結合と π - π スタッキングの相互作用により相補的二本鎖を形成している。このため、コンジュゲートのDNAと相補的な配列を有する核酸の送達に適している。一方、相補的でない配列の核酸の送達に適したDNA-PEGコンジュゲートはこれまで知られていなかった。

[0015] 本発明の目的は、相補的な配列だけでなく、相補的でない配列の一本鎖の核酸との間でも会合して送達部位に送達できる核酸アナログを提供することにある。また、本発明の他の目的は、このような核酸アナログによって形成される核酸送達用構造体、核酸アナログや核酸送達用構造体の製造方法、核酸アナログを用いた核酸送達方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0016] 本発明者らは、上記問題を解決すべく鋭意研究を重ねた。その結果、生体内ではゲノムDNAとヒストンタンパクの静電相互作用によって精密に高次構造を形成し核内に収納されていることに着目した。そして、コンジュゲートの核酸（あるいは核酸類似体）の連結構造の部分にカチオン性基を導入することで、送達対象である核酸と静電相互作用して会合することを見出し、本発明を完成させた。

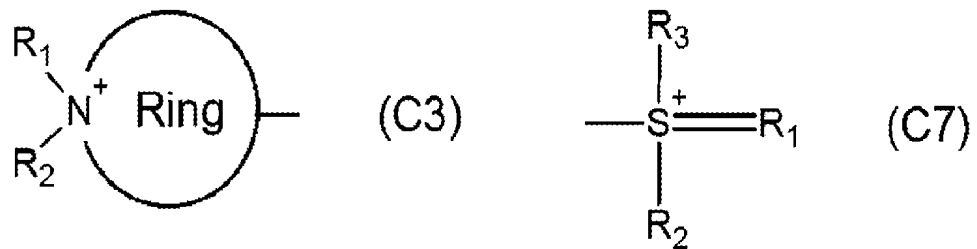
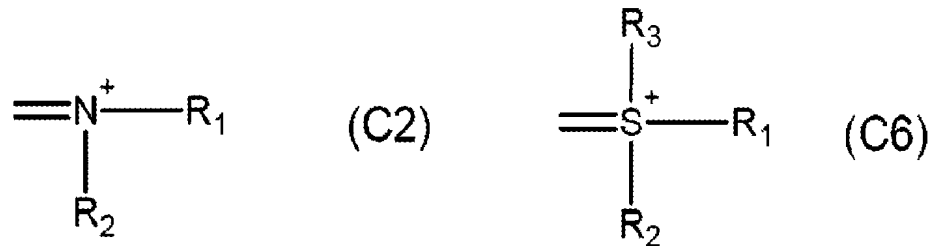
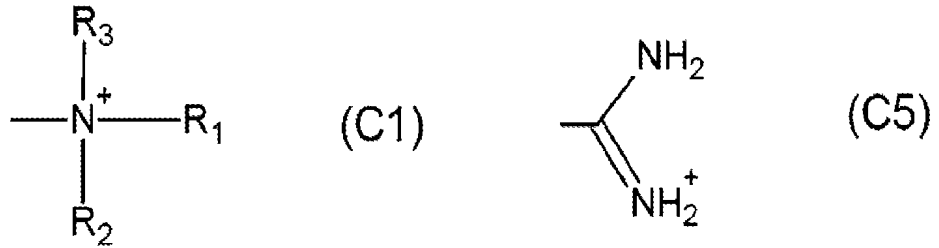
[0017] [1] カチオン性人工核酸と、該カチオン性人工核酸に結合した親水性重合体と、からなる核酸アナログであって、

前記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

連結構造と、からなる骨格構造を有し、

該連結構造は、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カチオン性基を有し、前記カチオン性人工核酸は、他のヌクレオチド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ことを特徴とする核酸アナログ。

[化1]



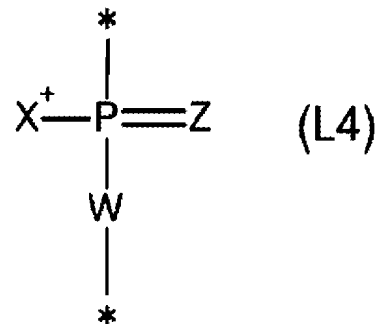
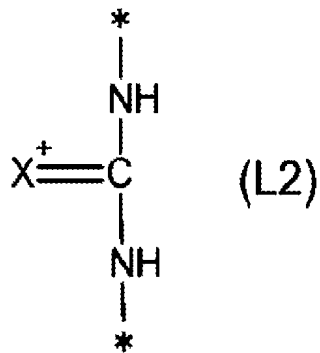
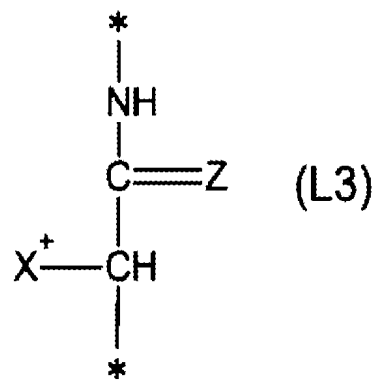
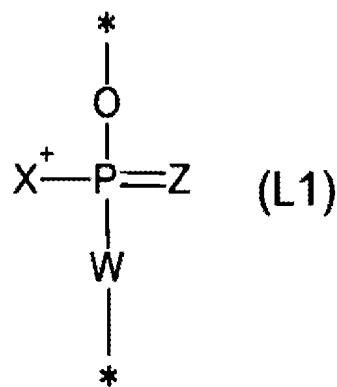
(ここで、 $R_1 \sim R_3$ は水素又は炭素数1~10のアルキル基を示し、 $R_1 \sim R_3$ は同一又は異なってもよい。Ringは4~8個の炭素原子で構成された環式化合物であり、該炭素原子の1つ以上が窒素、酸素及び硫黄から選択

されるヘテロ原子で置換された複素環であってもよい。)

[0018] [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] に記載の核酸アナログ。

[0019] [3] 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 [1] に記載の核酸アナログ。

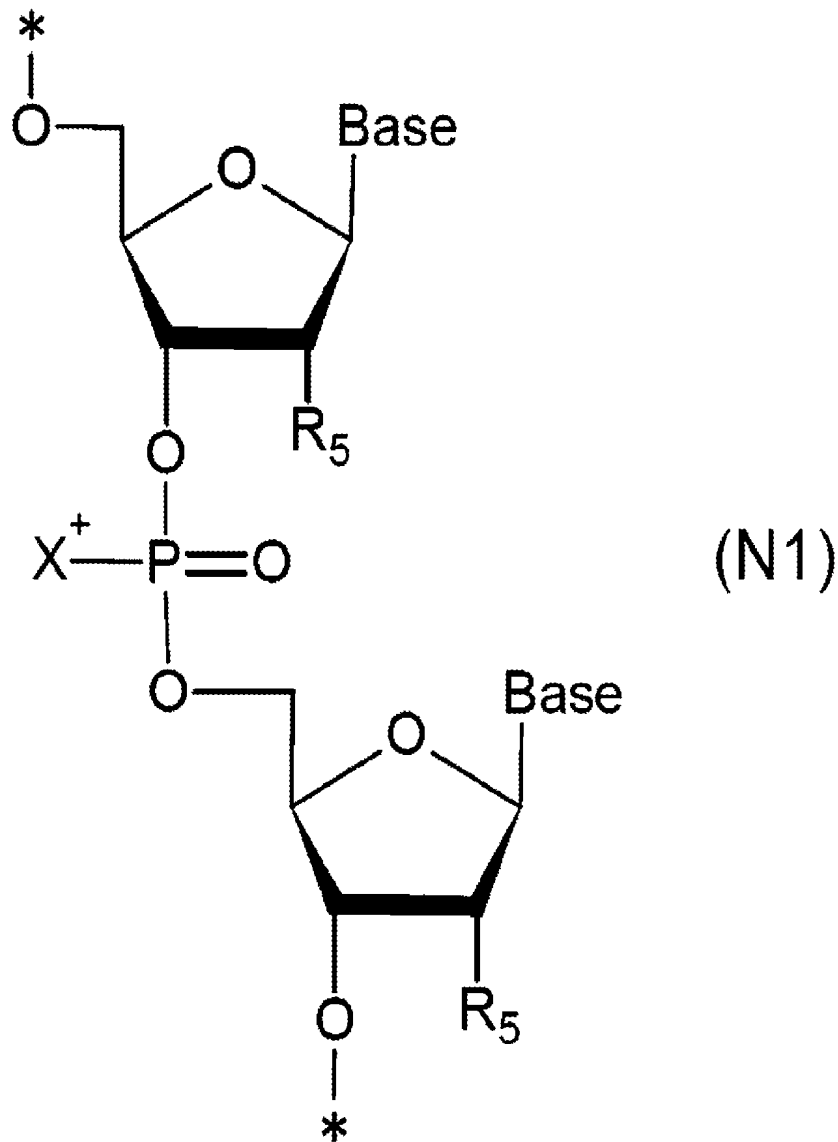
[化2]



(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-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。*は隣接する前記構成単位との結合手を意味する。)

[0020] [4] 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 [1] に記載の核酸アナログ。

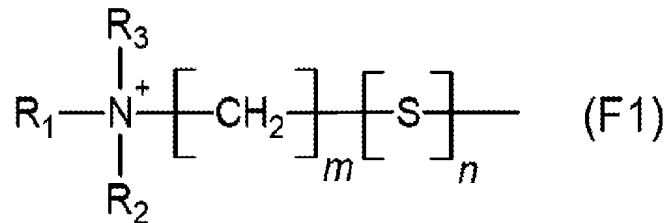
[化3]



(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。)

[0021] [5] 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であることを特徴とする[4]に記載の核酸アナログ。

[化4]

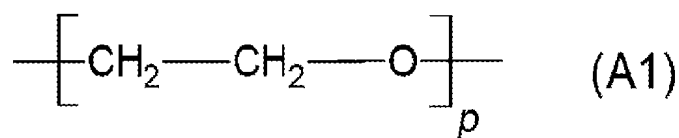


(ここで、 $R_1 \sim R_3$ は、水素又は炭素数1～10のアルキル基を示し、互いに同一又は異なってもよく、 m は0～10の整数を示し、 n は0又は1の整数を示す。)

[0022] [6] 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〕に記載の核酸アナログ。

[0023] [7] 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〔7〕に記載の核酸アナログ。

[化5]



(ここで、 p は1～20の整数を示す。)

[0024] [8] 送達対象である核酸を標的部位に送達するための担体であることを特徴とする〔1〕に記載の核酸アナログ。

[0025] [9] 上記〔8〕に記載の核酸アナログと送達対象である核酸とからなり該核酸を標的部位に送達するための核酸送達用構造体であって、前記カチオン性人工核酸と前記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。

[0026] [10] 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[9]に記載の核酸送達用構造体。

[0027] [11] 前記会合構造が内側に、前記親水性重合体が外側に位置するベシクル又はミセルであることを特徴とする[10]に記載の核酸送達用構造体。

[0028] [12] リガンドで修飾されていることを特徴とする[11]に記載の核酸送達用構造体。

[0029] [13] 医薬を更に有することを特徴する[11]に記載の核酸送達用構造体。

[0030] [14] 前記核酸送達用構造体が、中心部に中空部分を有する球状構造体であり、

該中空部分に医薬が包接されていることを特徴とする[13]に記載の核酸送達用構造体。

[0031] [15] 上記[1]に記載の核酸アナログの製造方法であって、前記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、該カチオン性人工核酸と前記親水性重合体とを結合する結合工程とを備え、前記カチオン性核酸合成工程は、前記連結構造にチオリン酸エステルを導入する工程と、該チオリン酸エステルとブロモ化合物とを反応させる工程と、を備えることを特徴とする核酸アナログの製造方法。

[0032] [16] 上記[9]に記載の核酸送達用構造体の製造方法であって、

前記核酸アナログの前記カチオン性基の pK_a よりも低く、前記核酸のリン酸の pK_a よりも高い pH 条件で前記核酸アナログと前記核酸とを静電相互作用により会合させて会合核酸構造を形成させる会合工程と、を有することを特徴とする核酸送達用構造体の製造方法。

[0033] [17] 複数の前記核酸送達用構造体を会合させて、前記会合構造が内側に、前記親水性重合体が外側に位置するベシクル又はミセルを水性溶媒中で形成する会合体形成工程と、を更に備えることを特徴とする[16]に記載の核酸送達用構造体の製造方法。

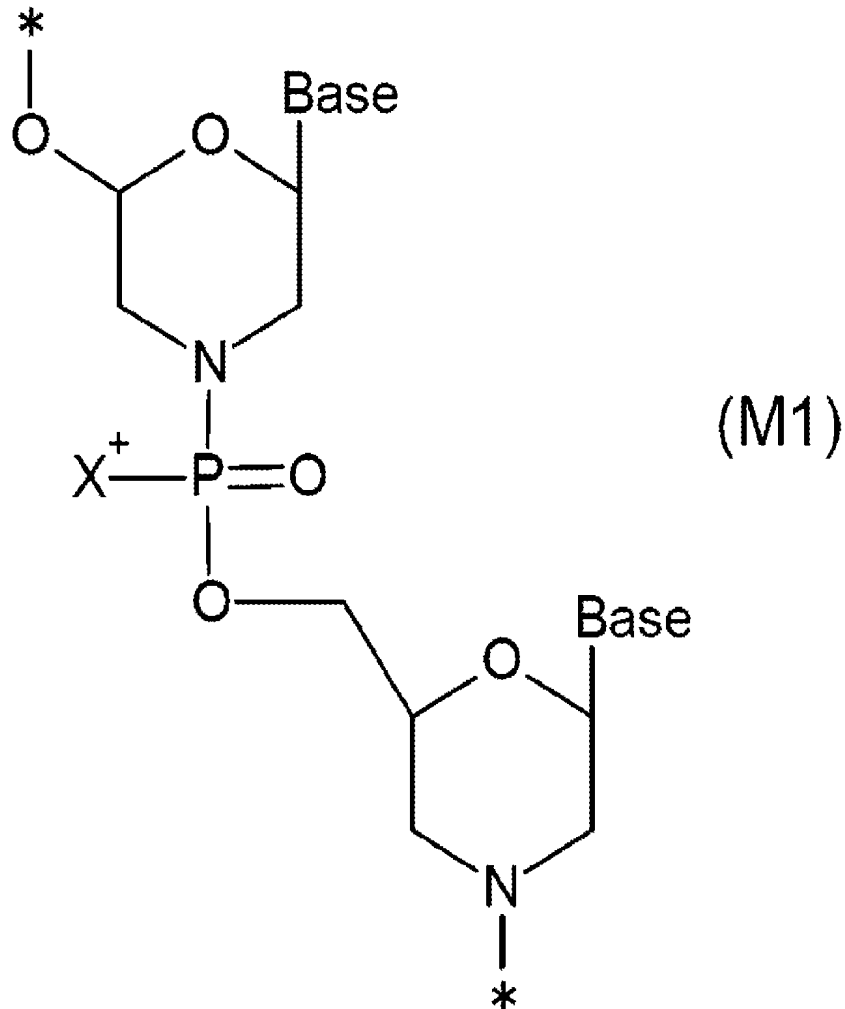
[0034] [18] 上記[9]に記載の核酸送達用構造体を用いて標的部位に前記核酸を送達するための核酸送達方法であって、

前記核酸送達用構造体を投与して前記標的部位内に前記核酸送達用構造体を取り込ませる投与工程と、

前記標的部位内で前記核酸を放出させる放出工程と、を有することを特徴とする核酸送達方法。

[0035] [A] 前記カチオン性人工核酸が、下記式(M1)で示されるモルフォリノ骨格を有することを特徴とする[1]に記載の核酸アナログ。

[化6]



(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。
。)

発明の効果

[0036] 本発明によれば、相補的な配列だけでなく、相補的でない配列の一本鎖の核酸との間でも静電相互作用により会合して送達部位に送達できる核酸アナログを提供することが可能となる。また、本発明によれば、このような核酸アナログによって形成される核酸送達用構造体、核酸アナログや核酸送達用構造体の製造方法、核酸アナログを用いた核酸送達方法を提供することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0037] [図1]本発明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。

[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]核酸アナログの合成スキームの一例を示す図である。

[図4]実施例における構造体の形成評価の実験とその結果を示す図である。PAGEイメージ (A, B)。左図はAS鎖のSEQ ID 1' のCy3を検出した蛍光像。ここで、SEQ ID 1' は、SEQ ID 1とSEQ ID 2を10:1で混合している。右図はRNA染色後の画像。(A) AN4のアニール混合物、(B) AN5のアニール混合物の泳動結果。(C) AN4をTEMで観察した図。スケールバーは100nm。(D) AN5をAFMで観察した結果。(E, F) DLS測定による粒径評価。

[図5]実施例における構造体のpH応答評価と血清耐性評価の実験とその結果を示す図である。CDの結果 (A, B)。(A) AN4と (B) AN5のpH7とpH5における核酸のキラリティ評価。DLS測定の結果 (C, D)。(C) AN4と (D) のpH7とpH5における粒径評価。血清でインキュベートした際のDLS測定の結果 (E)。

[図6]実施例における構造体による核酸送達の細胞評価の実験とその結果を示す図である。(A) DLD-1のルシフェラーゼ阻害活性評価。(B, C) DLD-1へのマイクロRNAの送達評価。細胞生存率 (B)、K-RAS

タンパクの発現量 (C)。

[図7]実施例における共焦点レーザー顕微鏡観察の結果を示す図である。(A) NT、(B) Naked、(C) AN3、(D) AN4、(E) AN5、(F) AN7、(G) AN8、(H) AN9。(I) AN4の120倍率観察像。スケールバーは50 μ m。

[図8]実施例におけるモルフォリノ核酸 (PMO) -PEGコンジュゲート体の構造形成評価の実験とその結果を示す図である。

[図9]実施例における非相補鎖アニーリングの実験とその結果を示す図である。(A) AN25-27の電気泳動の結果、(B) AN26構造体の共焦点顕微鏡観察、(C) AN26のレニーラルシフェラーゼ (RL) 活性阻害評価、(D) AN26のMCF-7細胞取り込み評価。

[図10]実施例におけるHPLCの結果を示す図である。

[図11]実施例におけるMCF-7のルシフェラーゼ阻害評価の結果を示す図である。

[図12]実施例におけるMCF-7の細胞生存率評価の結果を示す図である。

[図13]実施例におけるMCF-7のK-RASタンパクの発現量の結果を示す図である。

[図14]実施例におけるDL D-1担がんモデルマウスを用いた *in vivo* 評価結果を示す図であり、(A)は抗腫瘍効果、(B)は動態評価を示す。

[図15] (a) 実施例におけるリガンド導入後のナノ構造体の概要を示す図であり、(A) 配列設計、(B) 配列合成、(b) 実施例におけるリガンド導入後の人工核酸のHPLC上での挙動を示す図である。(c) 実施例におけるナノ構造体AN30を形成した場合の(C) 生理活性を示す。

[図16]実施例におけるナノ構造体AN4及びリガンド導入後のナノ構造体AN30の(D) 細胞取り込みを示す。

[図17]実施例におけるナノ構造体AN8及びリガンド導入後のナノ構造体AN31の(B) 細胞取り込みを示す。

発明を実施するための形態

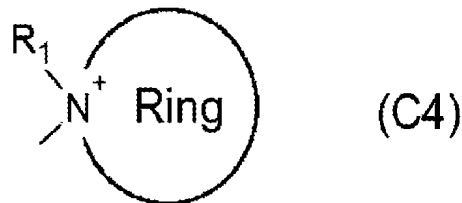
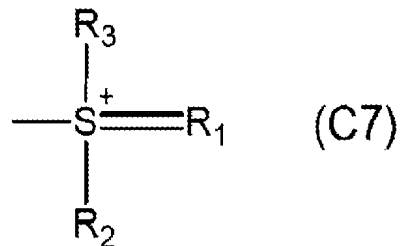
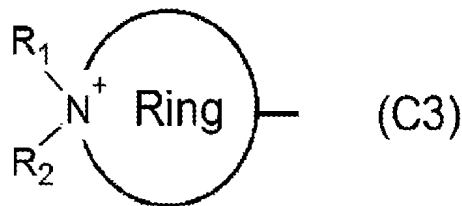
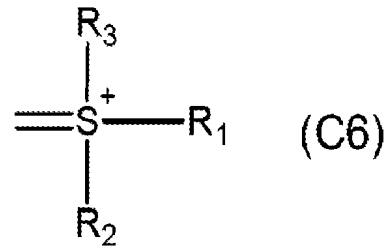
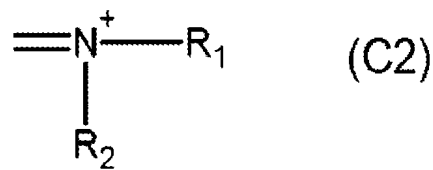
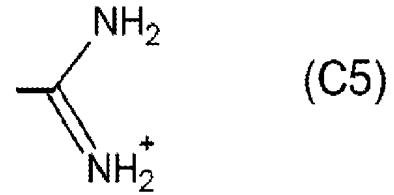
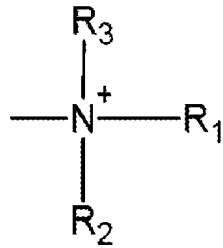
[0038] 1. 核酸アナログ

以下、本発明の核酸アナログについて説明する。本発明の核酸アナログは、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。以下、核酸アナログについて詳細に説明する。

[0039] (1) カチオン性人工核酸

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つの構成単位の間を連結する連結構造と、からなる骨格構造を有している。連結構造は、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カチオン性基を有している。

[化7]



(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。)

[0040] 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

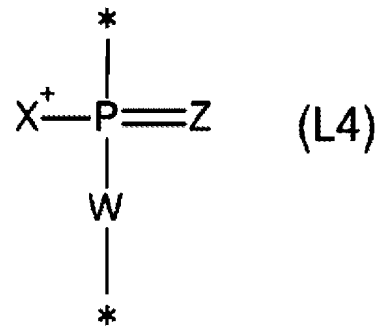
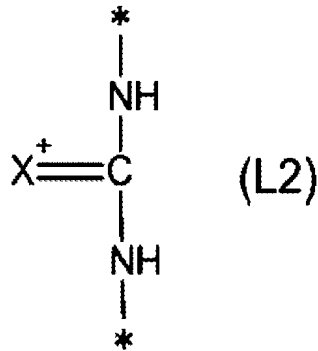
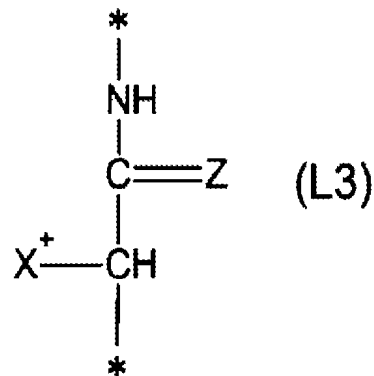
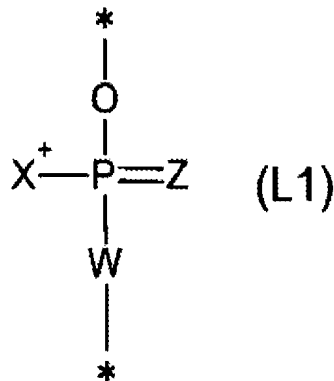
体を意味する。

[0041] カチオン性基の pK_a 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 pK_a よりも高い。核酸アナログのカチオン性基の pK_a よりも低く、他のヌクレオチドのリン酸基の pK_a 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 pK_a は 1 未満であることから、カチオン性基の pK_a 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 pK_a は 6~9 の範囲内であることが好ましい。

[0042] 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-ブロモシトシン、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-ブロモウラシル、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。

[0043] 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者が好ましい。

[化8]



(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 $-\text{O}-$ 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。*は隣接する上述した構成単位との結合手を意味する。)

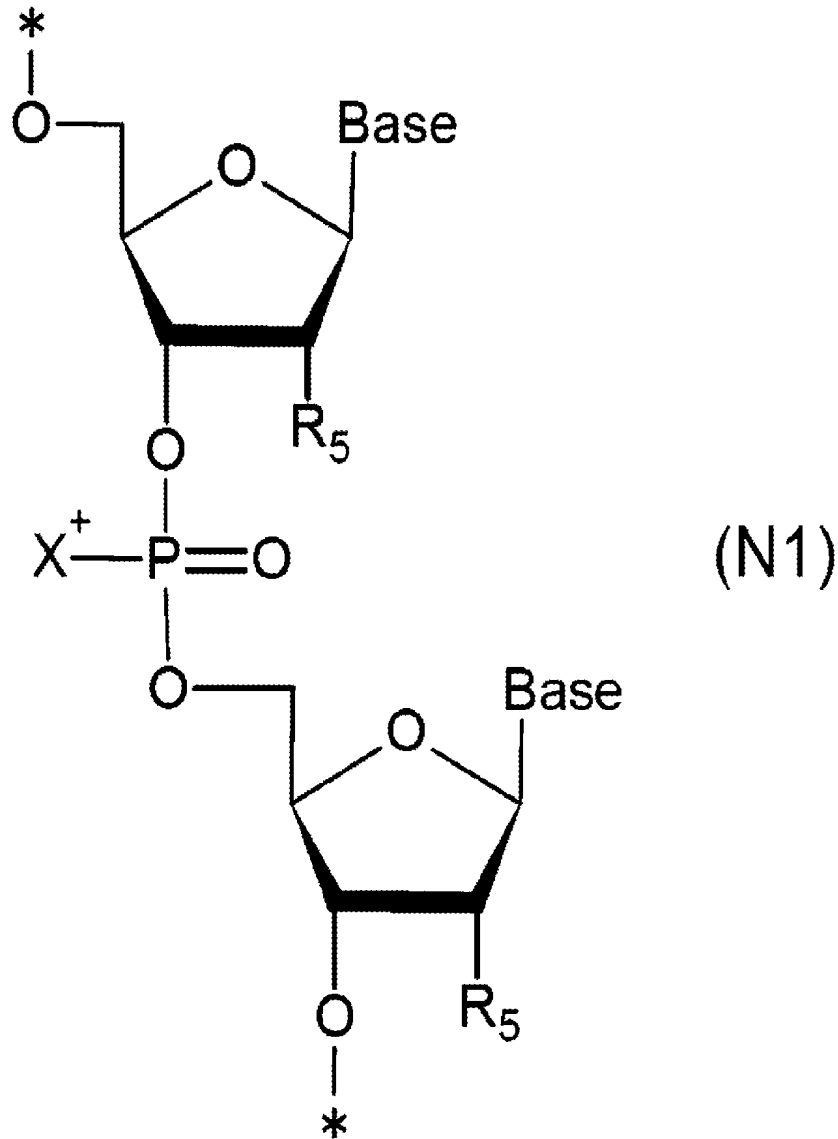
[0044] ここで、「カチオンの状態で」とは、カチオン性基が正に帯電したと仮定した場合を意味しており、核酸アナログのおかれている環境条件(溶媒のpHや種類など)によっては、カチオン性基は正に帯電していない状態の場合がある。正に帯電していない状態としては、例えば上記式(C1)を例にしてカチオン性基がアンモニウムの場合、一級アミン(カチオン化すると一級アンモニウム)、二級アミン(カチオン化すると二級アンモニウム)、三級アミン(カチオン化すると三級アンモニウム)の状態などが挙げられる。

[0045] 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、参考までに、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。

[0046] ヌクレオチド骨格を有するものとしては、下記式 (N1) で示される構造を挙げることができる。

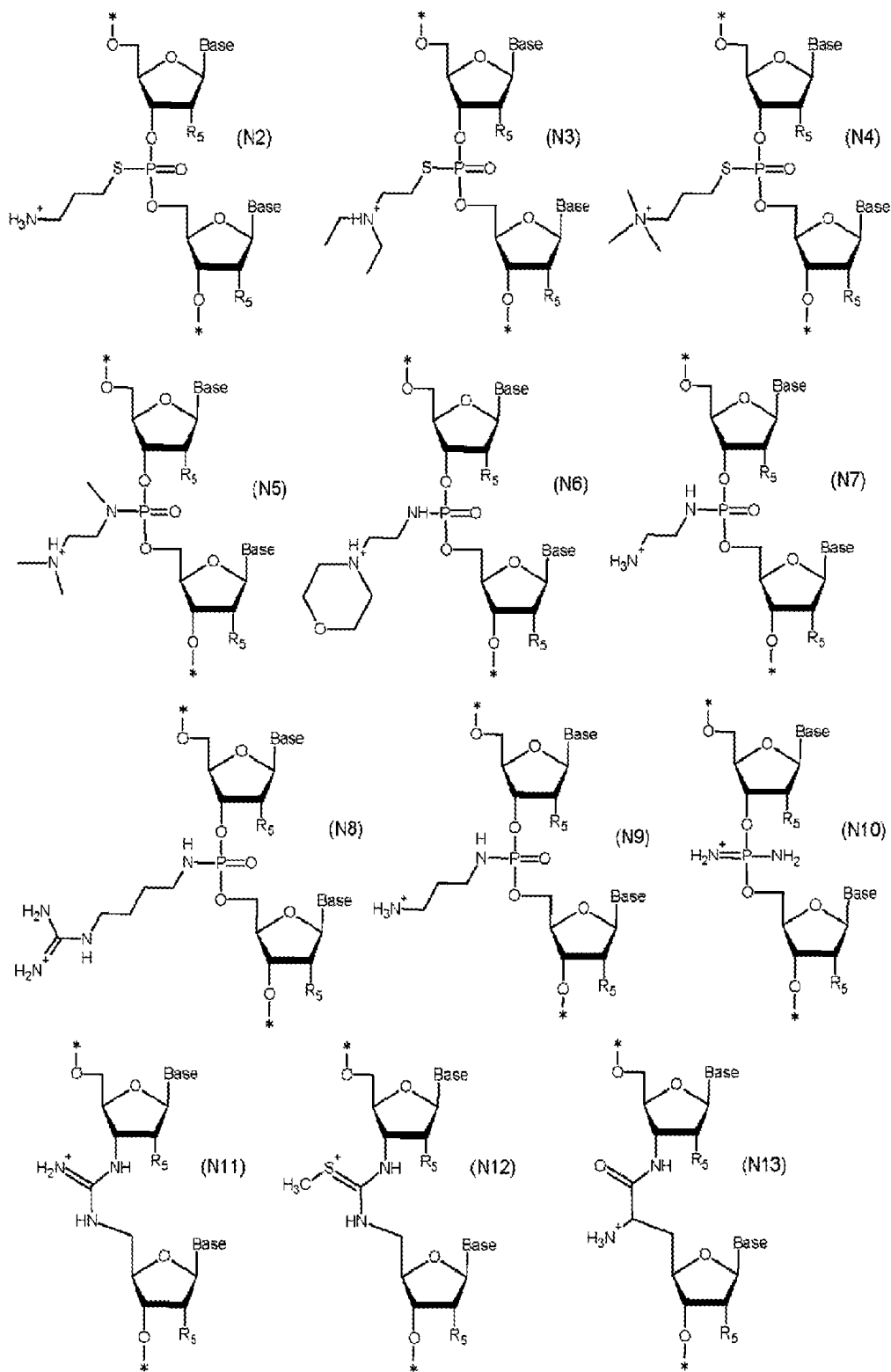
[化9]



(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述した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。)

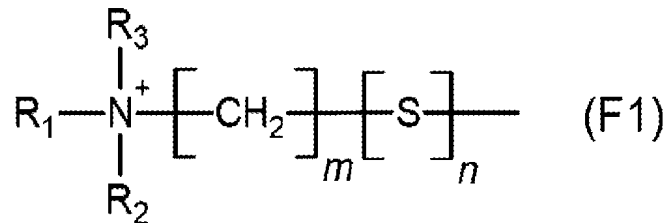
[0047] このようなヌクレオチド骨格を有する構造としては以下を挙げるこ
 ができる。

[化10]



[0048] 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11]

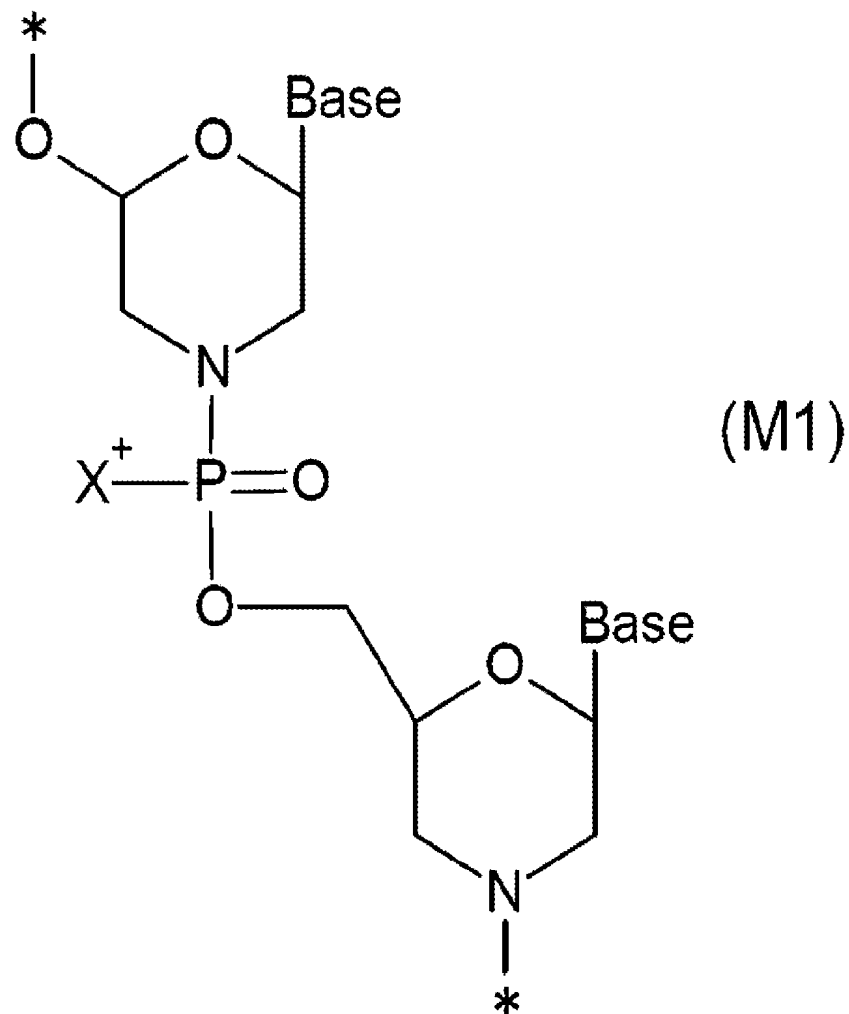


（ここで、R₁～R₃は、水素又は炭素数1～10のアルキル基を示し、互いに同一又は異なってもよく、mは0～10の整数を示し、nは0又は1の整数を示す。）

[0049] 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（R₁～R₃がすべて水素）＜二級アミン（R₁～R₃の2つが水素、他がアルキル基）＜三級アミン（R₁～R₃の1つが水素、他がアルキル基）＜四級アンモニウム（R₁～R₃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に応答して構造崩壊し、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pK_a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。

[0050] 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。

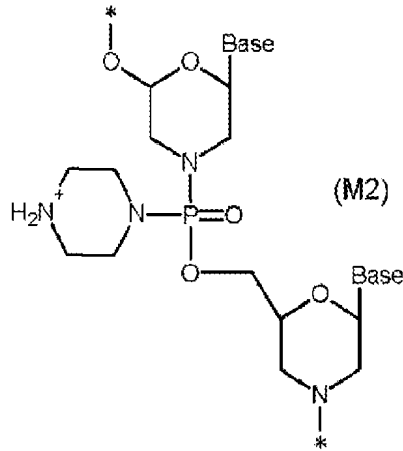
[化12]



(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述した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。)

[0051] 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13]



[0052] 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。

[0053] 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。

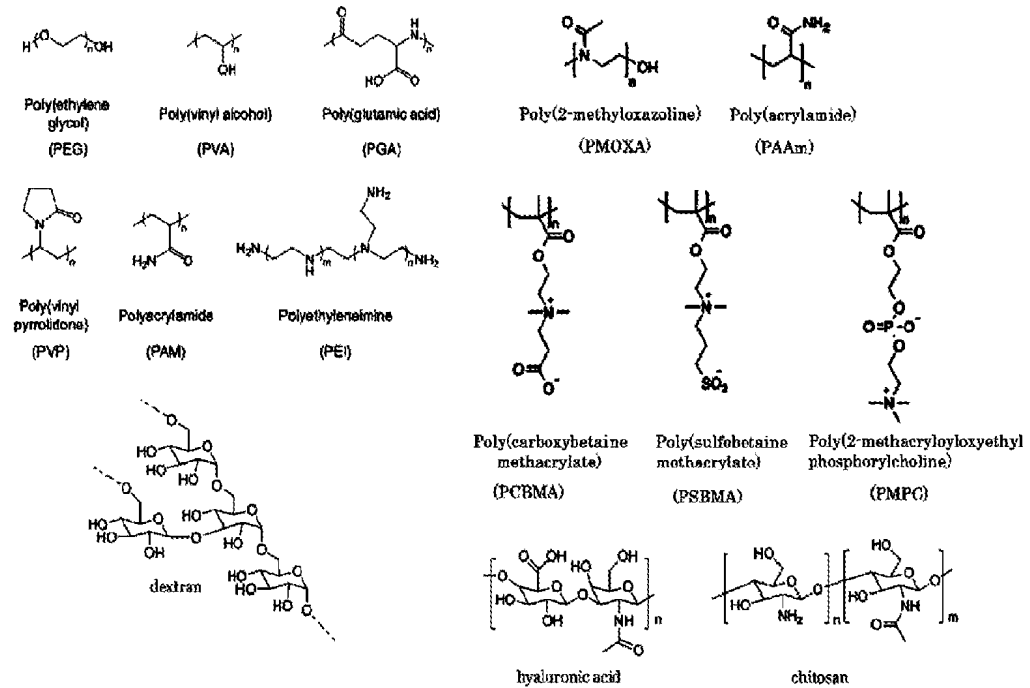
[0054] (2) 親水性重合体

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、核酸アナログと電氣的に相互作用（吸引、反発）しにくい中性のものが好ましい。

[0055] 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が好ましい。

[0056] このような親水性重合体としては以下を挙げるができる。

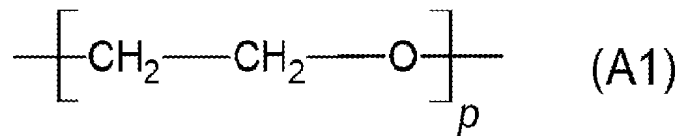
[化14]



[0057] 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。一般に、親水性重合体の重合度としては、3～100程度であり、10～50程度が好ましい。親水性重合体の重合度が低いと、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。

[0058] 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のポリ値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15]



(ここで、 p は1～20の整数を示す。)

また、A1は、核酸塩基や、リン酸エステル誘導体(—PO(OH)—, —PS(OH)—, PO(SH)—)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、さらに好ましくは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、トレ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ができる。これらの誘導体単位は、さら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、さらに好ましくは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。

[0059] 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—)、ホスホルアルミド(—P(OH)—NH

一)、リン酸エステル(−OPO−O−)などを挙げるができる。リンカーとしては、これらが単独また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、カチオン性事項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を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、ホスホロアミダイドを介した場合は、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、ホスホロアミダイドを介する場合には、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。

[0060] 2. 核酸対象核酸の送達用の担体、核酸送達用構造体

本発明の核酸アナログは、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(図の「合成」参照)。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(図の「ナノ粒子形成」の「二本鎖形成」参照)。

[0061] 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、本発明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。

[0062] 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。

[0063] 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。

[0064] 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）。

[0065] 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、本発明の核酸アナログは有効であることが示されている。

[0066] 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。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。主なりガンドとその応用分野は以下のとおりである。

- ・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
- ・NCL-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
- ・sgc8アプタマー：白血病CEM-CCRF細胞用
- ・NX 1838：癌細胞のVEGFに特異的に結合
- ・Anti-CD44：癌細胞の選択的ターゲティング
- ・DAG-NX213：血管新生を促すVEGF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 α : 腫瘍微小環境を利用した腫瘍増殖の抑制

[0067] 3. 核酸アナログ、核酸送達用構造体の製造方法

(1) 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とを個別に合成し、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、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、親水性重合体を合成する親水性重合体工程と、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。

[0068] (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。

[0069] (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ブromo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。

(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 (DMTr) 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DMTr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垂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垂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。

[0070] (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ブロモ化合物を反応させる。ブロモ化合物としては、例えば、3-ブロモ-1-プロピルアミン臭化水素酸塩、2-ブロモ-N, N-ジエチルエチルアミン臭化水素酸塩、(3-ブロモプロピル) トリメチルアンモニウムブロミドなどを例示することができる。合成核酸とブ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。

[0071] (a-2) 2段階合成法11

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—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）。

[0072] (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。

[0073] (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、これにブ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。

[0074] 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垂リン酸化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。

[0075] 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。

[0076] 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。

[0077] (2) 核酸送達用構造体の製造方法

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。

[0078] 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。

[0079] 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、25～2500 μ M程度であり、100～1000 μ Mの範囲内がより好ましい。

[0080] 4. 核酸送達方法

本発明の核酸送達方法は、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由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。

実施例

[0081] 以下、本発明を実施例に基づいて具体的に説明するが、これらは本発明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。

[0082] 1. 核酸アナログ（人工核酸＋親水性重合体）の製造

(1-1) オリゴヌクレオチド合成

オリゴヌクレオチド (SEQ ID 1-4, 8, 12-15, 19-21, 25, 33, 37) は、Gene Design Inc. (Osaka, Japan) より購入した。なお、親水性重合体が結合したオリゴヌクレオチドは、エチレングリコールのホスホロアミダイト体を核酸配列合成と同様に Gene Design Inc. にて自動核酸合成機で連結した（連結部位はホスホジエステル結合）。

[0083] オリゴヌクレオチド (SEQ ID 5-7, 9-11, 16-18, 22-24, 26-28) は、それぞれあらかじめ親水性重合体が結合している SEQ ID 4, 8, 15, 21, 25 を出発物質とし、ブromo化合物 (100-1000 当量) を用いてリン酸緩衝液 (PBS: pH 6.5) 中で、45 °C で 24 時間反応した。反応後、Float-A-Lyzer G2, CE, 1 ml, 3.5-5 KDa (Repligen, Waltham, MA, US) を用いて 5-7 日間蒸留水で透析し精製した。精製後、凍結乾燥機で濃縮し化合物を得た。ブromo化合物の 3-ブromo-1-プロピルアミン臭化水素酸塩は Waco (Osaka, Japan) より購入した。2-ブromo-N, N-ジエチルエチルアミン臭化水素酸塩と、(3-ブromoプロピル) トリメチルアンモニウムブromid は Merck (Darmstadt, Germany) より購入した。SEQ ID 22-24 は反応後、HPLC 精製と脱塩、濃縮を経て生成物を得た (図 10)。溶出時間は下記の表に示した。

[0084]

[表1]

SEQ ID	HPLC, Elution time (min)
4	
5	5
6	5
7	5
11	24
12	5
13	5
14	5
20	22.9
21	24.4
22	24.5
23	27.6
24	26.8

[0085] (2) モルフォリノ核酸

モルフォリノ核酸 (SEQ ID 29) は、Gene Tools, LLC (Philomath, Oregon, US) より購入した。オリゴヌクレオチド (SEQ ID 30-32, 34-36, 38-40) は、それぞれ SEQ ID 29、24、28 を出発物質とし、アジドポリエチレングリコール化合物 (10 当量) を用いて、硫酸銅 (II) (10 当量) とアスコルビン酸ナトリウム (10 当量) を加え、PBS (pH 7.4) 中で、室温で 15 分反応し親水性重合体を連結した。反応後、HPLC 精製と脱塩、濃縮を経て生成物を得た。アジド化合物の Poly (ethylene glyc

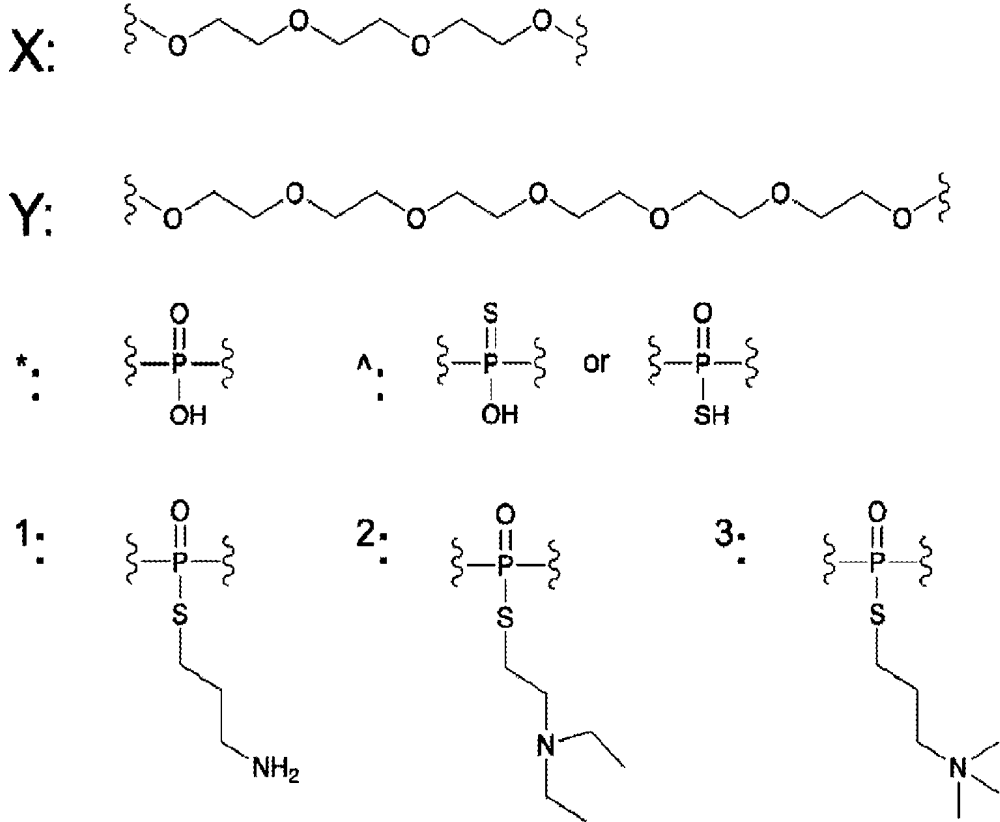
ol) methyl ether azide, average Mn 1000 (10K), 5000 (50K), 10000 (100K) は、Merck (Darmstadt, Germany) より購入した。

[0086] (3) 配列一覧

合成したオリゴヌクレオチドの配列を表2及び表3に示す。SEQ ID 1-2はマイクロRNA-143のアンチセンス鎖 (AS-1, 2)、SEQ ID 3-11はマイクロRNA-143のセンス鎖 (S-1-9)、SEQ ID 12-13はレニーラルシフェラーゼに対する siRNAのアンチセンス鎖、SEQ ID 14-18レニーラルシフェラーゼに対する siRNAのセンス鎖を示す (以下、アンチセンス鎖を「AS」、センス鎖を「S」と略す場合がある。)。この表において、「N」(大文字)はRNAを、「dN」はDNAを、「N_f」は2'-FRNAを、「N_m」は2'-OMeRNAを、「X」は-(OCH₂CH₂)₃O-、「Y」は-(OCH₂CH₂)₆O-を示す。「*」は-P(O)OH-を、「¹」は-P(S)OH-を、「¹」は-P(S-(CH₂)₃-NH₂)OH-を、「²」は-P(S-(CH₂)₂-N(CH₂CH₃)₂)OH-を、「³」は-P(-S(CH₂)₃-N(CH₃)₃)OH-を、「^{pmo}」はモルフォリノ核酸を、それぞれ意味する (これらの一部については下記の化学式を参照。なお、「¹」については2つの構造が共役した構造を示す。。「E」はエチニル基を、「L」はリガンド化合物 (グルコース、ガラクトース、フコース、アミノ糖) を、「S」はジスルフィドを示す。

[0087]

[化16]



[0088] [表2]

SEQ ID	ID	5' end modification	Oligonucleotide(5'-3')	3' end modification
1	AS-1	-	U ₁ G ₂ A ₃ G ₄ A ₅ U ₆ G ₇ A ₈ A ₉ G ₁₀ C ₁₁ A ₁₂ C ₁₃ U ₁₄ G ₁₅ U ₁₆ A ₁₇ G ₁₈ U ₁₉ C ₂₀ A ₂₁	dT dT
2	AS-2	Cyt	U ₁ G ₂ A ₃ G ₄ A ₅ U ₆ G ₇ A ₈ A ₉ G ₁₀ C ₁₁ A ₁₂ C ₁₃ U ₁₄ G ₁₅ U ₁₆ A ₁₇ G ₁₈ U ₁₉ C ₂₀ A ₂₁	dT dT
3	S-1	-	U ² G ³ A ⁴ G ⁵ U ⁶ A ⁷ C ⁸ A ⁹ G ¹⁰ U ¹¹ G ¹² C ¹³ A ¹⁴ U ¹⁵ C ¹⁶ U ¹⁷ C ¹⁸ U	-
4	S-2	-	U ² G ³ A ⁴ G ⁵ C ⁶ U ⁷ A ⁸ C ⁹ A ¹⁰ G ¹¹ C ¹² U ¹³ G ¹⁴ C ¹⁵ A ¹⁶ U ¹⁷ C ¹⁸ U ¹⁹ C ²⁰ U	XXXXXXXXXX
5	S-3	-	U ² G ³ A ⁴ G ⁵ C ⁶ U ⁷ A ⁸ C ⁹ A ¹⁰ G ¹¹ C ¹² U ¹³ G ¹⁴ C ¹⁵ A ¹⁶ U ¹⁷ C ¹⁸ U ¹⁹ C ²⁰ U	XXXXXXXXXX
6	S-4	-	U ² G ³ A ⁴ G ⁵ C ⁶ U ⁷ A ⁸ C ⁹ A ¹⁰ G ¹¹ C ¹² U ¹³ G ¹⁴ C ¹⁵ A ¹⁶ U ¹⁷ C ¹⁸ U ¹⁹ C ²⁰ U	XXXXXXXXXX
7	S-5	-	U ² G ³ A ⁴ G ⁵ C ⁶ U ⁷ A ⁸ C ⁹ A ¹⁰ G ¹¹ C ¹² U ¹³ G ¹⁴ C ¹⁵ A ¹⁶ U ¹⁷ C ¹⁸ U ¹⁹ C ²⁰ U	XXXXXXXXXX
8	S-6	-	U ² G ³ A ⁴ G ⁵ C ⁶ U ⁷ A ⁸ C ⁹ A ¹⁰ G ¹¹ C ¹² U ¹³ G ¹⁴ C ¹⁵ A ¹⁶ U ¹⁷ C ¹⁸ U ¹⁹ C ²⁰ U	XXXXXXXXXX
9	S-7	-	U ² G ³ A ⁴ G ⁵ C ⁶ U ⁷ A ⁸ C ⁹ A ¹⁰ G ¹¹ C ¹² U ¹³ G ¹⁴ C ¹⁵ A ¹⁶ U ¹⁷ C ¹⁸ U ¹⁹ C ²⁰ U	XXXXXXXXXX
10	S-8	-	U ² G ³ A ⁴ G ⁵ C ⁶ U ⁷ A ⁸ C ⁹ A ¹⁰ G ¹¹ C ¹² U ¹³ G ¹⁴ C ¹⁵ A ¹⁶ U ¹⁷ C ¹⁸ U ¹⁹ C ²⁰ U	XXXXXXXXXX
11	S-9	-	U ² G ³ A ⁴ G ⁵ C ⁶ U ⁷ A ⁸ C ⁹ A ¹⁰ G ¹¹ C ¹² U ¹³ G ¹⁴ C ¹⁵ A ¹⁶ U ¹⁷ C ¹⁸ U ¹⁹ C ²⁰ U	XXXXXXXXXX
12	AS-3	-	G ² G ³ C ⁴ C ⁵ U ⁶ U ⁷ C ⁸ A ⁹ C ¹⁰ U ¹¹ A ¹² C ¹³ U ¹⁴ C ¹⁵ C ¹⁶ U ¹⁷ A ¹⁸ G ¹⁹	TB TB
13	AS-4	Cyt	G ² G ³ C ⁴ C ⁵ U ⁶ U ⁷ C ⁸ A ⁹ C ¹⁰ U ¹¹ A ¹² C ¹³ U ¹⁴ C ¹⁵ C ¹⁶ U ¹⁷ A ¹⁸ G ¹⁹	TB TB
14	S-10	-	G ² U ³ A ⁴ G ⁵ G ⁶ A ⁷ G ⁸ U ⁹ A ¹⁰ G ¹¹ G ¹² A ¹³ A ¹⁴ G ¹⁵ G ¹⁶ C ¹⁷ C	TB TB
15	S-11	-	G ² U ³ A ⁴ G ⁵ G ⁶ A ⁷ G ⁸ U ⁹ A ¹⁰ G ¹¹ G ¹² A ¹³ A ¹⁴ G ¹⁵ G ¹⁶ C ¹⁷ C	XXXXXXXXXXTB
16	S-12	-	G ² U ³ A ⁴ G ⁵ G ⁶ A ⁷ G ⁸ U ⁹ A ¹⁰ G ¹¹ G ¹² A ¹³ A ¹⁴ G ¹⁵ G ¹⁶ C ¹⁷ C	XXXXXXXXXXTB
17	S-13	-	G ² U ³ A ⁴ G ⁵ G ⁶ A ⁷ G ⁸ U ⁹ A ¹⁰ G ¹¹ G ¹² A ¹³ A ¹⁴ G ¹⁵ G ¹⁶ C ¹⁷ C	XXXXXXXXXXTB
18	S-14	-	G ² U ³ A ⁴ G ⁵ G ⁶ A ⁷ G ⁸ U ⁹ A ¹⁰ G ¹¹ G ¹² A ¹³ A ¹⁴ G ¹⁵ G ¹⁶ C ¹⁷ C	XXXXXXXXXXTB
19	AS-5	-	dA ² dA ³ dA ⁴ dA ⁵ dA ⁶ dA ⁷ dA ⁸ dA ⁹ dA ¹⁰ dA ¹¹ dA ¹² dA ¹³ dA ¹⁴ dA ¹⁵ dA ¹⁶ dA ¹⁷ dA ¹⁸ dA ¹⁹ dA ²⁰ dA ²¹	-
20	S-15	-	dT ² dT ³ dT ⁴ dT ⁵ dT ⁶ dT ⁷ dT ⁸ dT ⁹ dT ¹⁰ dT ¹¹ dT ¹² dT ¹³ dT ¹⁴ dT ¹⁵ dT ¹⁶ dT ¹⁷ dT ¹⁸ dT ¹⁹ dT ²⁰ dT ²¹	-
21	S-16	XXXXXXXX	dT ² dT ³ dT ⁴ dT ⁵ dT ⁶ dT ⁷ dT ⁸ dT ⁹ dT ¹⁰ dT ¹¹ dT ¹² dT ¹³ dT ¹⁴ dT ¹⁵ dT ¹⁶ dT ¹⁷ dT ¹⁸ dT ¹⁹ dT ²⁰ dT ²¹	-
22	S-17	XXXXXXXX	dT ² dT ³ dT ⁴ dT ⁵ dT ⁶ dT ⁷ dT ⁸ dT ⁹ dT ¹⁰ dT ¹¹ dT ¹² dT ¹³ dT ¹⁴ dT ¹⁵ dT ¹⁶ dT ¹⁷ dT ¹⁸ dT ¹⁹ dT ²⁰ dT ²¹	-
23	S-18	XXXXXXXX	dT ² dT ³ dT ⁴ dT ⁵ dT ⁶ dT ⁷ dT ⁸ dT ⁹ dT ¹⁰ dT ¹¹ dT ¹² dT ¹³ dT ¹⁴ dT ¹⁵ dT ¹⁶ dT ¹⁷ dT ¹⁸ dT ¹⁹ dT ²⁰ dT ²¹	-
24	S-19	XXXXXXXX	dT ² dT ³ dT ⁴ dT ⁵ dT ⁶ dT ⁷ dT ⁸ dT ⁹ dT ¹⁰ dT ¹¹ dT ¹² dT ¹³ dT ¹⁴ dT ¹⁵ dT ¹⁶ dT ¹⁷ dT ¹⁸ dT ¹⁹ dT ²⁰ dT ²¹	-

「S-3」(SEQ ID 5) = 実施例1、
「S-4」(SEQ ID 6) = 実施例2、
「S-5」(SEQ ID 7) = 実施例3、
「S-7」(SEQ ID 9) = 実施例4、
「S-8」(SEQ ID 10) = 実施例5、
「S-9」(SEQ ID 11) = 実施例6、
「S-12」(SEQ ID 16) = 実施例7、
「S-13」(SEQ ID 17) = 実施例8、
「S-14」(SEQ ID 18) = 実施例9、
「S-17」(SEQ ID 22) = 実施例10、
「S-18」(SEQ ID 23) = 実施例11、
「S-19」(SEQ ID 24) = 実施例12、
「S-21」(SEQ ID 26) = 実施例13、
「S-22」(SEQ ID 27) = 実施例14、
「S-23」(SEQ ID 28) = 実施例15、
「S-33」(SEQ ID 42) = 実施例16、
「S-34」(SEQ ID 43) = 実施例17、
「S-35」(SEQ ID 44) = 実施例18

[0091] 2. 構造体の形成方法と物性評価

(1) アニールング

各ヌクレオチドを滅菌水に溶解した後、AS : S = 1 : 1 - 10の重量比で混合した。その後、98℃で15分間、25℃で50分間、45℃で50分間インキュベートし、アニールング混合物(下記表のAN1-24)を得た。

[0092]

[表4]

AN ID	ID	AN ID	ID	AN ID	ID	AN ID	ID
AN1	AS-1	AN10	AS-3	AN19	AS-3	AN28	AS-7
	S-1		S-10		S-5		S-25
AN2	AS-1	AN11	AS-3	AN20	AS-3	AN29	AS-7
	S-2		S-11		S-6		S-28
AN3	AS-1	AN12	AS-3	AN21	AS-3		
	S-3		S-12		S-7		
AN4	AS-1	AN13	AS-3	AN22	AS-5		
	S-4		S-13		S-17		
AN5	AS-1	AN14	AS-3	AN23	AS-5		
	S-5		S-14		S-18		
AN6	AS-1	AN15	AS-3	AN24	AS-1		
	S-6		S-1		S-19		
AN7	AS-1	AN16	AS-3	AN25	AS-3		
	S-7		S-2		S-17		
AN8	AS-1	AN17	AS-3	AN26	AS-3		
	S-8		S-3		S-18		
AN9	AS-1	AN18	AS-3	AN27	AS-3		
	S-9		S-4		S-19		

[0093] (2) 構造体の物性評価

得られたアニーリング混合物は、20 wt% アクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)、透過型電子顕微鏡 (TEM: Transmission electron microscope)、原子間力顕微鏡 (AFM: Atomic force microscope)、動的光散乱法 (DLS: Dynamic light scattering)、円偏光二色性 (CD: Circular dichroism) などを用いて物性を評価した。

[0094] (3) ネイティブPAGE

10 μ M に調整したアニーリング混合物は、7.5 又は 20 wt% アクリルアミドゲルに 5-10 pmol アプライし、25-40 分間泳動した。泳動後、Alliance Q9 (UVITEC, Cambridge, UK) で Cy3 の蛍光を検出した。撮影後、SYBR Gold で 5 分間核酸を染色し、SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) の蛍光を検出した。なお、マーカーは 100 bp DNA

Ladder (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) と 20bpDNA Ladder (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) をサンプルの両端にアプライした。

[0095] (4) 構造体のTEM観察

グリッド基盤上に10 μ Mアニーリング混合物を5 μ L滴下し、自然乾燥させた後、リンタングステン酸で染色し、JEM-2010 (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) で観察した。

[0096] (5) 構造体のAFM観察

マイカ基盤上に1.5 μ Mアニーリング混合物を5 μ L滴下し、一晩自然乾燥させた後、10分間真空乾燥させて、Nanocute (Hitachi High-Tech Corp., Tokyo, Japan) で観察した。

[0097] (6) 動的光散乱 (DLS) 測定による構造体の粒子径の評価

DLSは、DelsaMax PRO (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) を用いて37 $^{\circ}$ Cで測定した。アニーリング混合物の濃度は20–50 μ Mとした。自己相関関数より流体力学的半径 (R_H) を算出した。pHによる構造変化は1N HClをpH5になるように調整した。血清耐性評価は、50%FBS中で、37 $^{\circ}$ Cでインキュベートして経時的な構造変化を評価した。

[0098] (7) 円偏光二色性 (CD: Circular dichroism) によるキラリティ評価

CDは、円二色性分散計 (J-820KS; JASCO Corporation, Tokyo, Japan) を用いて波長240–320nm, 温度20–80 $^{\circ}$ Cの範囲で光路長1cmの石英セルを用いて37 $^{\circ}$ Cで測定を行った。アニーリング混合物の濃度は1.5 μ Mとした。

[0099] (8) 構造体の形成評価

図4 (A) はAN4 (S-4 (実施例2) とAS-1)、図の (B) はAN5 (S-5 (実施例3) とAS-1) のアニーリング混合物の泳動結果を

示した。図の（A）の左図のレーン5から7ではCy3（シアニン色素）に由来するSEQID1'のバンドが薄くなった。ここで、SEQID1'は、SEQID1とSEQID2を9：1で混合したものであり、Cy3はSEQID2に由来する。これはSEQID6の混合比が1から5と増えると、SEQID1'が構造形成した可能性が示唆された。この現象は、Cy3検出後にRNA染色後の右図のレーン5から7も同様の傾向が観察された。図の（B）の左図のレーン5から7はCy3に由来するSEQID1'のバンドが検出されなかった。これは、SEQID7のアニーリング混合ではSEQID7の混合比が1から10の増加に関係なく、1の時点からの構造形成が示唆された。図の（C）は、AN4をTEMで観察した結果で、直径60nm程度の構造体が観察された。図の（D）は、AN5をAFMで観察した結果で、直径75nm程度の構造体が観察された。図の（E、F）より、AN4とAF5の流体力学的半径（ R_H ）はそれぞれ、35nmと45nmだった。これらの結果より、アニーリング混合物はナノ構造体を形成することが明らかとなった。他のアニーリング混合物の R_H を下記の表に示す。

[0100]

[表5]

AN ID	R_H (nm)
AN2	3.0
AN3	833
AN4	35
AN5	45
AN7	114
AN8	54
AN9	70
AN11	2.5
AN12	610
AN13	141
AN29(pH7)	2
AN29(pH4)	150

※アニーリング混合物の粒子系一覧

(AN3=RIO¹⁴³(TEG-A)、AN4=RIO¹⁴³(TEG-B)、
AN5=RIO¹⁴³(TEG-C)、AN7=RIO¹⁴³(HEG-A)、A
N8=RIO¹⁴³(HEG-B)、AN9=RIO¹⁴³(HEG-C))

[0101] (9) 構造体のpH応答評価と血清耐性評価

図5に、構造体のpH応答による構造変化と構造体の血清中での安定性を評価した結果を示す。図の(A、B)より、pH7の条件下では、AN4とAN5ともに、AN2に観測されたA型らせん構造に特徴的な260nmの正のピークは長波長側にシフトし、210nmの激しいネガティブの落ち込みは観測されなかった。pHを5に変化させた時、AN4は変化が見られなかったのに対し、AN5では260nmの正のピークの強度が低下した。こ

の時の R_H を測定した結果を図の(C、D)に示す。AN4は、 R_H が35 nmから85 nmと増大した。一方、AN5では、pH5の時に、自己相関関数の強度が大幅に低下し、 R_H が算出できなかった。これらの結果から、AN4は、カチオン性基が三級アミンであるが、pHが7から5に変化することで、構造体のキラリティは大きく変化しないが、 R_H が2倍程度変化することが明らかとなった。AN5は、カチオン性基が四級アンモニウムであるが、pHが7から5に変化すると、構造体のキラリティも R_H も大きく変化し、特に、 R_H が算出できなかったことからpH低下に伴い構造体が崩壊することが示唆された。図の(E)では、AN4の経時的な血清耐性を R_H から評価した。24時間と、48時間において血清とインキュベートする前の R_H と比較して変化は見られず、48時間と長時間において血清耐性を示すことが明らかとなった。

[0102] (10) 構造体による核酸送達の細胞評価

図6では、構造体による核酸送達の評価として、DLD-1細胞株を用いたレニーラルシフェラーゼ(RL)活性阻害評価(図の(A))と、マイクロRNA-143の送達評価(図の(B、C))した結果を示す。AN12(S-12(実施例7)とAS-3)、AN13(S-13(実施例8)とAS-3)、AN14(S-14(実施例9)とAS-3)は、添加濃度に依存してRLの発現阻害の傾向が評価され、構造体を形成するレニーラルシフェラーゼ配列による阻害活性が確認された(図の(A))。図の(B)では、AN4、AN5が添加濃度依存的にDLD-1の生存率を大きく低下させた。DLD-1からタンパクを抽出し、マイクロRNA-143の標的タンパクであるK-RASの存在を評価した(図の(C))。その結果、AN4やAN5でK-RASの発現が抑えられていることが明らかとなり、AN4やAN5は特にマイクロRNA-143を送達できることが示された。他のアニーリング混合物の結果を下記の表に示す。

[0103]

[表6]

AN ID	DLD-1 cell viability	
	% of NT	SD
AN1 (50 nM)	80.5	1.84
AN3 (50 nM)	72.9	0.31
AN4 (50 nM)	18.1	0.99
AN5 (50 nM)	24.5	3.9
AN7 (100 nM)	64.0	4.6
AN8 (100 nM)	54.4	3.9
AN9 (100 nM)	50.4	2.6

※アニーリング混合物によるDLD-1生存率一覧

[0104] (11) 共焦点レーザー顕微鏡観察

それぞれの構造体のDLD-1細胞への取り込みは、共焦点レーザー顕微鏡で観察された。図7(C、D、E、G)はRNAに由来するCy3の赤色蛍光像が観察され、リソソームの緑色像とは独立して存在することが重ね合わせ像より示された。特に図の(D)のAN4は強い細胞取り込みが観察された。図の(1)はAN4の取り込みを120倍率で観察した像を示す。結果より構造体は細胞核やリソソームと交わることなく細胞質に取り込まれていることが推測された。

[0105] 3. モルフォリノ核酸(PMO)－PEGコンジュゲート体の構造形成評価

図8は、モルフォリノ核酸を用いたアニーリング混合物(AN28(S-25とAS-7)、AN29(S-28とAS-7))のpH7と4におけ

る電気泳動の結果を示す。泳動後、ゲルをRNA染色し、撮影した。電気泳動の条件は、7.5wt% acrylamide gel、Loading Volume: 10 pmol/well、Time: 40 min、Dye: Sybr gold、Detection: UV→Ebt r f i l l t e rである。レーン1と4は、アニーリング前のSEQ ID 34とSEQ ID 38である。それぞれSEQ ID 30とアニーリングし、pH7とpH4に調整した。その結果から、AN28とAN29はpHが7から4に変化するとバンドが高分子側へシフトした。DLSによる粒子系の測定より、AN29 (pH7) は2 nm (レーン5)、AN29 (pH4) は150 nm (レーン6)であった。モルフォリノ核酸を用いたアニーリング混合物はpH変化によって構造体を形成することが示唆された。

[0106] 4. 非相補鎖アニーリング混合物の評価

非相補鎖のアニーリング混合物 (AN25-27) の泳動結果を図9 (A) に示す。レーン3のAN25 (S-17 (実施例10) とAS-3) は、SEQ ID 12 (ルシフェラーゼのAS鎖) のバンドが薄くなり、ウェル部分に新たな蛍光が観察された。レーン4のAN26 (S-18 (実施例18) とAS-1) は、新たな位置にバンドが観察された。レーン5のAN27 (S-19 (実施例12) とAS-3) では非相補鎖の相互作用は特に観察されていない。続いて、共焦点顕微鏡でAN26を観察した (図の (B), (C))。その結果、約250 nmの蛍光が観察され構造体が存在することが示唆された。AN26を用いて、MCF-7細胞株 (ヒト乳がん) を用いたレニーラルシフェラーゼ (RL) 活性阻害評価を行なった (図の (D))。AN26の添加濃度に依存してRLの発現が阻害された。この時、AN26はMCF-7に取り込まれることを観測している (図の (E))。

[0107] 5. 構造体を用いたルシフェラーゼ siRNA の送達評価

(1) 細胞培養

ヒト大腸がん細胞株DLD-1 (K-RAS mutant; G13D) とヒト乳がん細胞株MCF-7は、Japanese Collectio

n Research Bioresources Cell Bankより購入した。DLD-1細胞は、10%非働化FBS含有RPMI-1640 (Waco Inc., Osaka, Japan) を用いて5%CO₂、37℃の条件下で培養した。MCF7細胞は、10%非働化FBS、非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム含有MEM α (Waco Inc., Osaka, Japan) を用いて5%CO₂、37℃の条件下で培養した。

[0108] (2) ルシフェラーゼ阻害評価

DLD-1、MCF-7は、 5×10^4 cell/wellで24ウェルプレートに播種し、一晩培養した。その後、psiCheck2 (Promega Corporation, Madison, WI, USA) 100ngをTransfast (Waco Inc., Osaka, Japan) を用いて添加した。翌日、細胞を回収したのち、 5×10^4 cell/wellで96ウェルプレートに播種し、一晩培養した。次に、最終濃度が1-1000nMとなるように各アニーリング混合物を添加し、48時間培養した。その後、上清液を除去しプレートを-200℃で6時間凍結した。その後、レニールルシフェラーゼの阻害活性をDual-Glo (登録商標) Luciferase Assay System (Promega Corporation, Madison, WI, USA) を用いて発光シグナルとして検出した。その結果を図6(A)、図9(D)、11に示す。

[0109] 6. 構造体を用いたRNA医薬(miR-143)送達評価

(1) 構造体によるDLD-1、MCF-7増殖抑制効果

DLD-1、MCF-7は 1×10^3 cell/wellで96ウェルプレートに播種し、一晩培養した。その後、最終濃度が1-100nMになるように各アニーリング混合物を添加し、72時間培養した後、残存する生細胞を細胞増殖/細胞毒性アッセイキット(Cell counting WS T-8; Waco Inc., Osaka, Japan) を用いて吸光シグナルとして検出した。なお、NT(non treatment)は

、miRNAを導入していないコントロールで、AN2はリポフェクション試薬を使用していないコントロール(Naked)である。その結果を図6(B)、図12に示す。

[0110] 7. 構造体によるDLD-1、MCF-7増殖抑制メカニズム

(1) ウェスタンブロット解析

(a) タンパク質サンプル調整: DLD-1、MCF-7は 1×10^5 cell/wellで6ウェルプレートに播種し、一晩培養した。その後、最終濃度が50nMになるように各アニーリング混合物を添加し、48時間培養した後、スクレーパーで細胞を剥がし、15mLチューブに細胞懸濁液を回収した。遠心して細胞のペレットを得た後、タンパク抽出を行った。タンパク抽出液には、protein lysis buffer (10mM Tris-HCl、0.1% SDS、1% NP-40、0.1% デオキシコール酸ナトリウム、150mM NaCl、1mM EDTA) に1% Protease inhibitor cocktail (Nakarai, Kyoto, Japan)、Phosphatase inhibitor cocktail I, II (Merck Millipore, Burlington, MA, US)、及び、IIIを混合して用いた。タンパク質抽出液に細胞のペレットを懸濁させ、20分間氷中に静置した。その後、15,000rpm、4℃、20分間遠心分離した。遠心分離した上清を回収し、タンパク質サンプルとした。タンパク質サンプルは、SDS buffer (62.5mM Tris-HCl、2% SDS、10%グリセロール、50mM DTT、0.01%ブロモフェノールブルー) と混和して $20 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ に調整し、98℃で5分間煮沸処理した後、氷上で5分間静置した。

[0111] (b) 電気泳動、転写、及び検出

電気泳動には、イージーセパレーター (Wako Inc., Osaka, Japan) 及びSuper Sep Ace (Wako Inc., Osaka, Japan) を用いた。泳動後、ゲルをBlottin

g buffer (25mM Tris、0.2M グリシン、20%エタノール) に5分間浸した。PVDFメンブレン (Perkin Elmer Life Sciences) はメタノールに10分間浸し、超純水に10分間浸した。その後、Blotting Bufferに5分間浸した。陽極側から、Blotting bufferに浸したろ紙、PVDFメンブレン、ゲル、ろ紙の順に重ね、15V、370mAで40分間転写した。転写後、0.1% Tween20含有50 mM Tris-HCl buffer (TBST) で洗浄し、Blocking buffer (PVDF;) に1時間浸した。TBSTで洗浄し、抗体希釈液 (2% BSA、0.01%アジ化ナトリウム、TBST) で希釈した一次抗体に浸して4℃で一晩反応させた。TBSTで洗浄した後、二次抗体に浸して室温で1時間静置した。その後、TBSTで洗浄し、Luminata Forte Western HRP Substrate (WBLUF0500; Merck Millipore, Burlington, MA, US) で発光させた後に、GloMax Navigator (Promega Corporation, Madison, WI, USA) を用いて検出した。コントロールにはanti-GAPDH (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, US) を使用した。K-RASに対する抗体はAbcam (Cambridge, UK) から購入した。その結果を図6 (C)、図13に示す。

[0112] 8. 構造体の細胞取り込み

(1) DLD-1、MCF-7への構造の取り込み観察

DLD-1、MCF-7は、 5×10^3 cell/wellで96ウェルプレートに播種し、一晩培養した。その後、最終濃度が50nMになるように各アニーリング混合物を添加し、24-72時間培養した後、共焦点レーザー顕微鏡 (FV3000; OLYMPUS, Tokyo, Japan) を用いて蛍光像を観察した。なお、核は、Cellstain Hoechst 33342 (Wako Inc., Osaka, Japan)

で染色し、リソソームはCellLight Lysosomes-GFP (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) で染色した。

[0113] 9. リガンド人工核酸

(1) オリゴヌクレオチド合成の実験データ

オリゴヌクレオチド (SEQ ID 41, 45) はGene Design Inc. (Osaka, Japan) より購入した。オリゴヌクレオチド (SEQ ID 41 (E=Glu)、SEQ ID 45 (E=Glu)) は、それぞれSEQ ID 41, 45を出発物質とし、アジド化合物 (10当量) を用いて、アスコルビン酸、銅イオンを添加しPBS (pH7.4) 中で、30分間室温で反応した (反応の参考文献: DOI: <https://doi.org/10.1039/C0CC04979D>)。ここで「SEQ ID 41 (E=Glu)」は、SEQ ID 41の親水性基にリガンドとしてグルコースが結合したリガンド人工核酸を意味する。反応に用いる溶液は全て脱気したものを用いた。反応後、高速液体クロマトグラフィーにて反応を確認し分取した。分取後、脱塩処理し凍結乾燥機で濃縮した。その後、ブロモ化合物 (100-1000当量) を用いてPBS中45℃で24時間反応した。反応後、Float-A-Lyzer G2, CE, 1ml, 3.5-5 KDa (Repligen, Waltham, MA, US) を用いて5-7日間蒸留水で透析した。透析後、凍結乾燥機で濃縮し、化合物 (SEQ ID 43 (L=Glu)、SEQ ID 47 (L=Glu)) を得た。ブロモ化合物 (2-ブロモ-N,N-ジエチルエチルアミン臭化水素酸塩) はMerck (Darmstadt, Germany) より購入した。新たに合成したオリゴヌクレオチドの配列を表7に、アニーリング混合物を表8に示す。

[0114] [表7]

SEQ ID	ID	5' end modification	Oligonucleotide(5'-3')	3' end modification
45	S-36	-	U ¹ G ¹ A ¹ G ¹ C ¹ U ¹ A ¹ C ¹ A ¹ G ¹ U ¹ G ¹ C ¹ U ¹ G ¹ C ¹ A ¹ U ¹ C ¹ U ¹ C ¹ U	*SYYYYYYYYE
46	S-37	-	U ¹ G ¹ A ¹ G ¹ C ¹ U ¹ A ¹ C ¹ A ¹ G ¹ U ¹ G ¹ C ¹ U ¹ G ¹ C ¹ A ¹ U ¹ C ¹ U ¹ C ¹ U	*SYYYYYYYYL
47	S-38	-	U ² G ² A ² G ² C ² U ² A ² C ² A ² G ² U ² G ² C ² U ² G ² C ² A ² U ² C ² U ² C ² U	*SYYY*YYYYYL
48	S-39	-	U ³ G ³ A ³ G ³ C ³ U ³ A ³ C ³ A ³ G ³ U ³ G ³ C ³ U ³ G ³ C ³ A ³ U ³ C ³ U ³ C ³ U	*SYYY*YYYYYL

[表8]

AN ID	ID
AN30	AS-1
	S-34(L=Glu)
AN31	AS-1
	S-38(L=Glu)

[0115] (2) 抗腫瘍効果：in vivoの実験

実験に供したマウスは、広島大学の動物実験ガイドラインに基づいて飼育した。担がんマウスはマウス背中皮下へハanks液に懸濁した大腸がん細胞（DLD-1細胞、 8.0×10^5 cells）の移植により作製した。固形がん生着後（移植7日後）より3日に1回（計4回）マウスの尾静脈からサンプルを投与した。投与したサンプルは、生理食塩水、AN1とAN4（容量 $100 \mu\text{L}$ 、核酸（ガイド鎖） $375 \mu\text{g}/\text{kg}$ ）である。3日に1回マウスの腫瘍の長径（Lmm）と短径（Smm）をノギスで計測し、腫瘍堆積（ $V \text{ mm}^3$ ）を体積の式： $V = (L \times S^2) \times 0.5$ より算出した。担がんマウスの腫瘍の体積変化より抗腫瘍効果を評価した。

[0116] (3) 抗腫瘍効果

担がんマウスはマウス背中皮下へハanks液に懸濁した大腸がん細胞（DLD-1細胞 8.0×10^5 cells）の移植により作製した。固形がん生着後（移植7日後）より3日に1回（計4回）生理食塩水、AN1、AN4を尾静脈投与（容量 $100 \mu\text{L}$ 、核酸（ガイド鎖） $375 \mu\text{g}/\text{kg}$ ）した。3日に1回マウスの腫瘍の長径（Lmm）と短径（Smm）をノギスで計測し、腫瘍堆積（ $V \text{ mm}^3$ ）を体積の式： $V = (L \times S^2) \times 0.5$ より算出した。担がんマウスの腫瘍の体積変化より抗腫瘍効果を評価した。

[0117] (4) 動態評価

担がんマウスにAN1、AN4を尾静脈投与（容量 $100 \mu\text{L}$ 、核酸（ガイド鎖） $375 \mu\text{g}/\text{kg}$ ）し、尾静脈から経時的（1, 2, 4, 8, 24時間）に採血し、Cy3の蛍光強度を測定し、投与した核酸の血中における生物学的半減期を求めたところ約2.4時間であった。また、24時間後に

それぞれの臓器を回収し、Cy3の蛍光強度を測定したところ、肝臓においてはCy3の蛍光は観測されず、投与した核酸の肝臓への集積は検出されなかったものの、腫瘍細胞においてはCy3の蛍光が観察され集積していることが確認された。なお、LNPによりRNAsを投与した先行研究(Chen, S., et al, Journal of Controlled Release, 235, 236-244 (2016))によると、投与した核酸の血中における半減期は0.25時間であり、肝臓への集積率は91.4%。

[0118] (5) AN4 (R1O¹⁴³ (TEG-B)) の *in vivo*での抗腫瘍効果

*In vitro*で有効性が実証されたAN4を*in vivo*へ展開し、大腸がん担持マウスにおける抗腫瘍効果と組織動態を評価した。その結果を図14に示す。がん細胞を移植して7日後より、マウスの尾静脈にサンプルを投与し、腫瘍の体積変化を観察した。AN4を投与したグループは、生理食塩水やAN1 (Naked¹⁴³)を投与したグループと比較して腫瘍体積の増加が抑制され、抗腫瘍効果の誘導が観察された。動態評価では、担がんモデルマウスの尾静脈より蛍光標識したAN4を投与し24時間後に各臓器を回収し、蛍光強度を測定することで、臓器への取り込みを測定した。その結果、AN4は、腫瘍に高く取り込まれており、肝臓への蓄積はごくわずかであった。本結果は、核酸の運搬体として広く利用されている脂質ナノ粒子(LNP)の課題である肝臓への蓄積を回避する他の運搬技術として展開が期待される。

[0119] (6) リガンドR1ON^{miR-143}の細胞内取り込み

全身投与におけるDDSは、“パッシブ・ターゲティング”と“アクティブ・ターゲティング”がある。パッシブ・ターゲティングでは、腫瘍周辺の血管内皮の特徴である、Enhanced Permeability and Retention effect (EPR効果)の利用が知られている。アクティブ・ターゲティングは、標的細胞や組織だけに特異的送達することによって、より少ない投与量でがんにも効率的に核酸を送達することが

期待される。そこで、アクティブ・ターゲティングとしてリガンド導入構造体（AN30）について検討した。

[0120] その結果を図15、図16、図17に示す。図15の（a）は人工核酸の親水性基にリガンドとしてグルコース（Glu）を結合し、送達するRNAとともに構造体を形成するスキームを表す図である。図15の（B）、図17（A）は、リガンドとしてグルコースをRNA鎖に結合した反応前後の図である。図16の（D）と図17（B）は、送達したRNAが細胞に取り込まれていることを示す図である。AN30の細胞取り込みを蛍光顕微鏡にて観察したところ、添加6時間後には、RNA由来の赤色蛍光が観察され、細胞に取り込まれていることがわかった。AN31の細胞取り込み観察では、添加24時間後にRNA由来の赤色傾向が観察され、細胞に取り込まれていることがわかった。図15（C）の細胞増殖抑制効果の評価では、AN30は添加濃度依存的にDL D-1細胞の生存を抑制した。

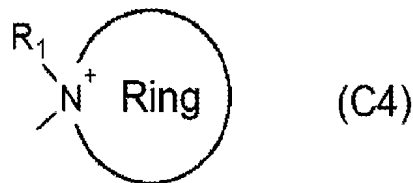
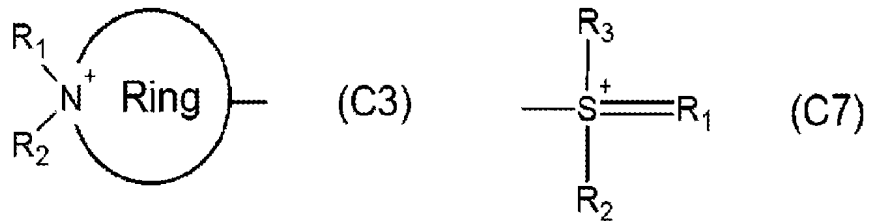
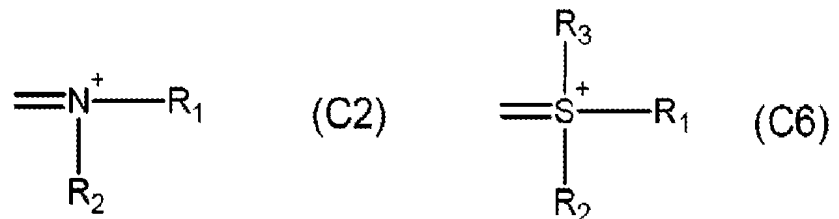
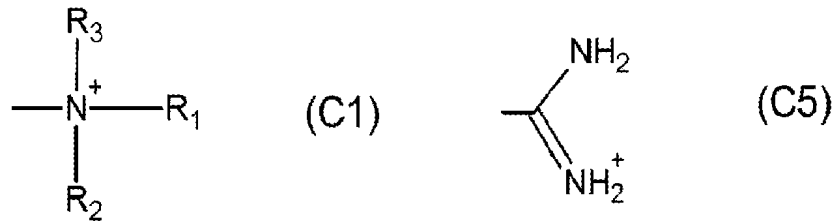
請求の範囲

[請求項1] カチオン性人工核酸と、該カチオン性人工核酸に結合した親水性重合体と、からなる核酸アナログであって、

前記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連結構造と、からなる骨格構造を有し、

該連結構造は、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カチオン性基を有し、前記カチオン性人工核酸は、他のヌクレオチド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ことを特徴とする核酸アナログ。

[化1]

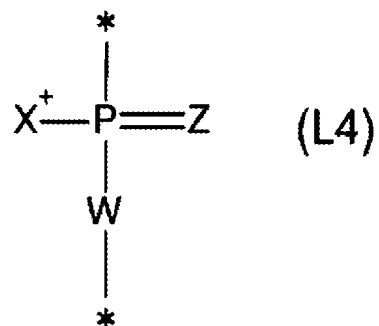
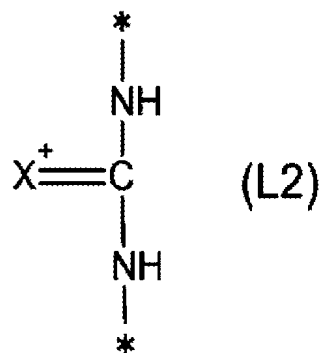
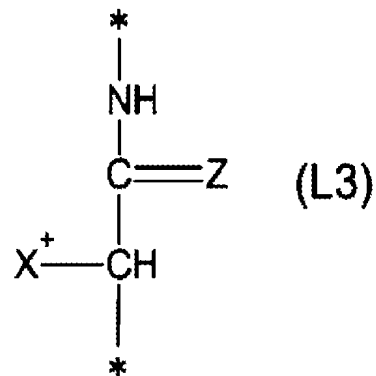
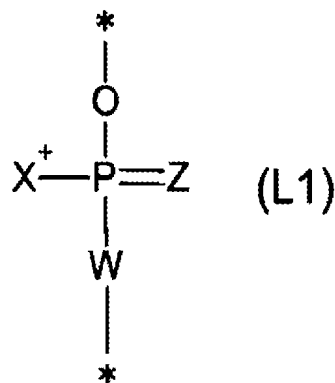


(ここで、 $R_1 \sim R_3$ は水素又は炭素数1～10のアルキル基を示し、 $R_1 \sim R_3$ は同一又は異なってもよい。Ringは4～8個の炭素原子で構成された環式化合物であり、該炭素原子の1つ以上が窒素、酸素及び硫黄から選択されるヘテロ原子で置換された複素環であってもよい。)

[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に記載の核酸アナログ。

[請求項3] 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に記載の核酸アナログ。

[化2]

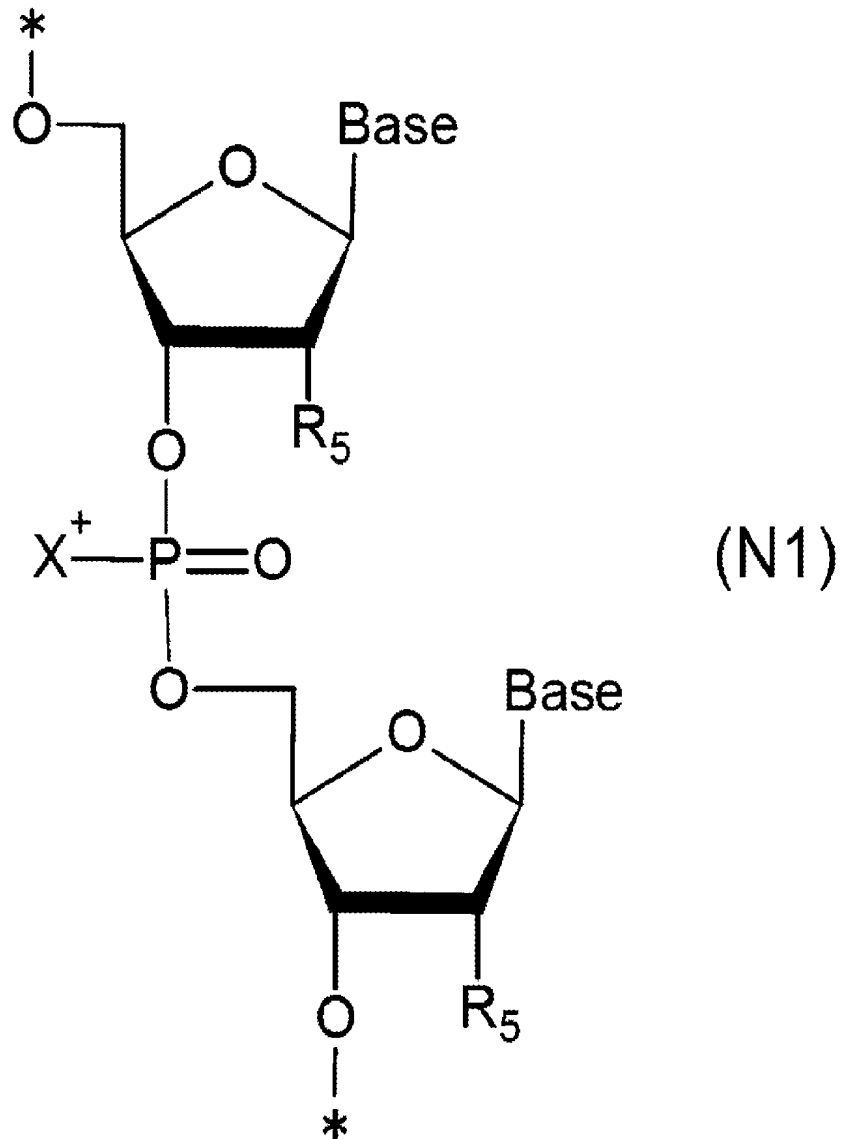


(ここで、 X^+ は前記カチオン性基を含む官能基であり、ZはO又はSを示し、Wは-O-又は-NR₄-を示し、ここでR₄は水素又は炭素数1～10のアルキル基を示す。*は隣接する前記構成単位との

結合手を意味する。)

[請求項4] 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に記載の核酸アナログ。

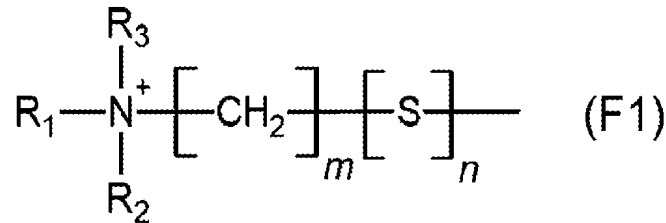
[化3]



(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5] 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であることを特徴とする請求項4に記載の核酸アナログ。

[化4]

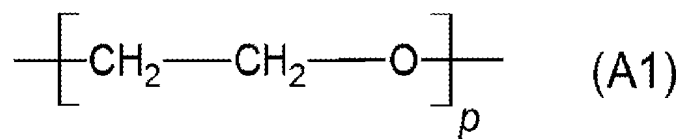


(ここで、R₁~R₃は、水素又は炭素数1~10のアルキル基を示し、互いに同一又は異なってもよく、mは0~10の整数を示し、nは0又は1の整数を示す。)

[請求項6] 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請求項1に記載の核酸アナログ。

[請求項7] 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7に記載の核酸アナログ。

[化5]



(ここで、pは1~20の整数を示す。)

- [請求項8] 送達対象である核酸を標的部位に送達するための担体であることを特徴とする請求項1に記載の核酸アナログ。
- [請求項9] 請求項8に記載の核酸アナログと送達対象である核酸とからなり該核酸を標的部位に送達するための核酸送達用構造体であって、前記カチオン性人工核酸と前記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。
- [請求項10] 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9に記載の核酸送達用構造体。
- [請求項11] 前記会合構造が内側に、前記親水性重合体が外側に位置するベシクル又はミセルであることを特徴とする請求項10に記載の核酸送達用構造体。
- [請求項12] リガンドで修飾されていることを特徴とする請求項11に記載の核酸送達用構造体。
- [請求項13] 医薬を更に有することを特徴する請求項11に記載の核酸送達用構造体。
- [請求項14] 前記核酸送達用構造体が、中心部に中空部分を有する球状構造体であり、
該中空部分に医薬が包接されていることを特徴とする請求項13に記載の核酸送達用構造体。
- [請求項15] 請求項1に記載の核酸アナログの製造方法であって、前記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、該カチオン性人工核酸と前記親水性重合体とを結合する結合工程とを備え、
前記カチオン性核酸合成工程は、前記連結構造にチオリン酸エステルを導入する工程と、該チオリン酸エステルとプロモ化合物とを反応させる工程と、を備えることを特徴とする核酸アナログの製造方法。
- [請求項16] 請求項9に記載の核酸送達用構造体の製造方法であって、
前記核酸アナログの前記カチオン性基の pK_a よりも低く、前記核酸のリン酸の pK_a よりも高い pH 条件で前記核酸アナログと前記核

酸とを静電相互作用により会合させて会合構造を形成させる会合工程と、を有することを特徴とする核酸送達用構造体の製造方法。

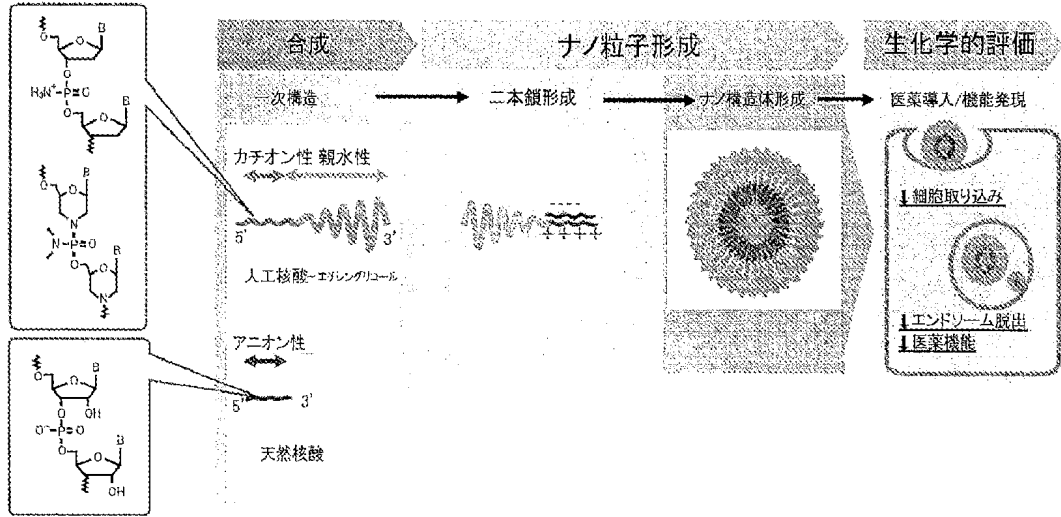
[請求項17] 複数の前記核酸送達用構造体を会合させて、前記会合構造が内側に、前記親水性重合体が外側に位置するベシクル又はミセルを水性溶媒中で形成する会合体形成工程と、を更に備えることを特徴とする請求項16に記載の核酸送達用構造体の製造方法。

[請求項18] 請求項9に記載の核酸送達用構造体を用いて標的部位に前記核酸を送達するための核酸送達方法であって、

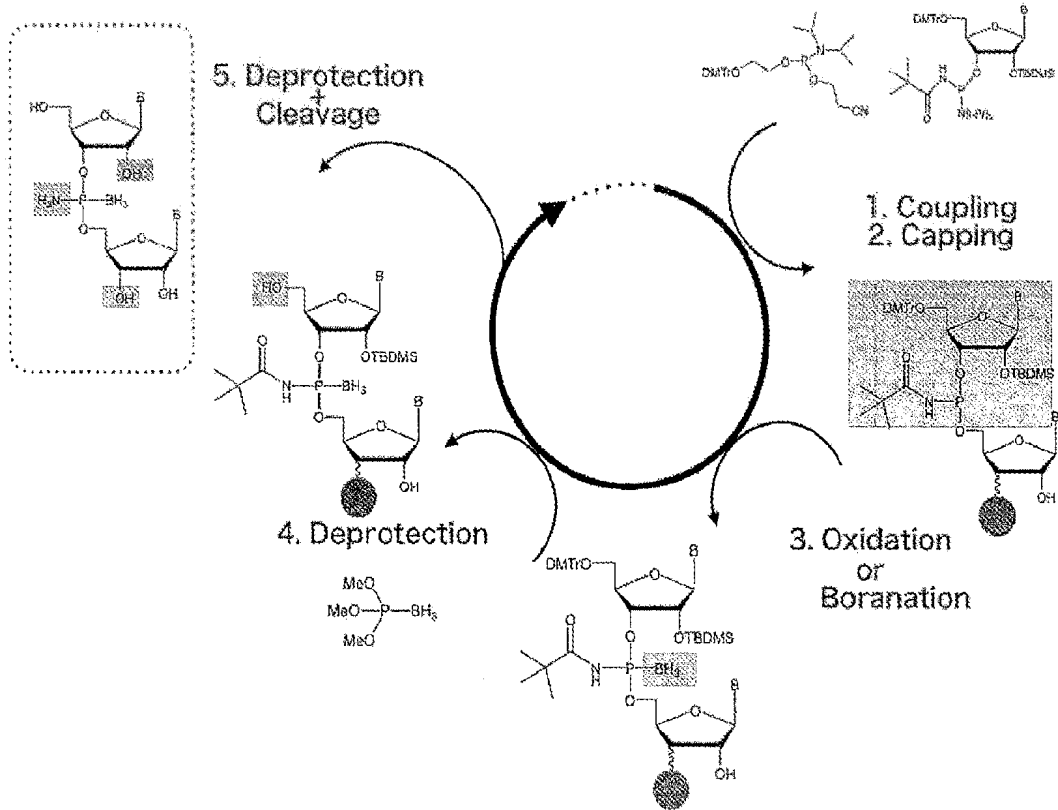
前記核酸送達用構造体を投与して前記標的部位内に前記核酸送達用構造体を取り込ませる投与工程と、

前記標的部位内で前記核酸を放出させる放出工程と、を有することを特徴とする核酸送達方法。

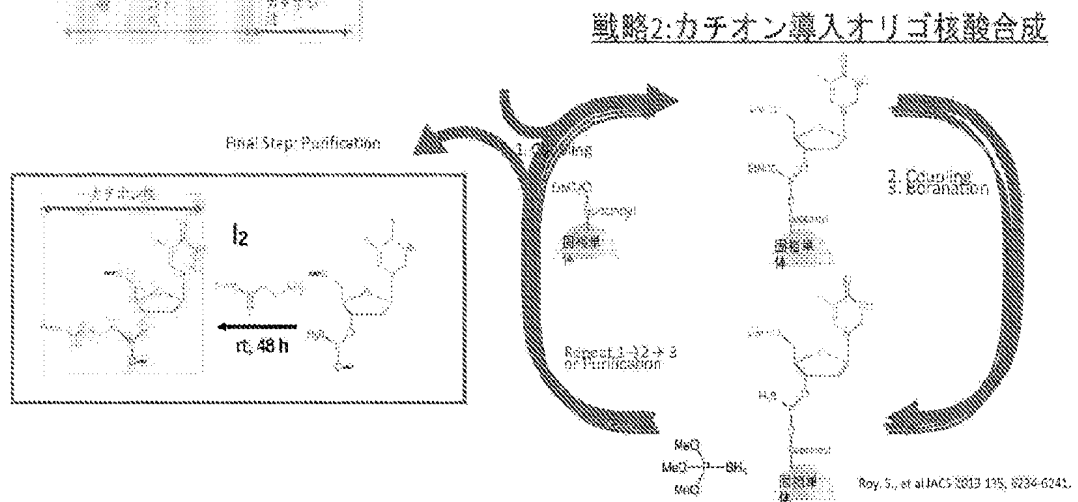
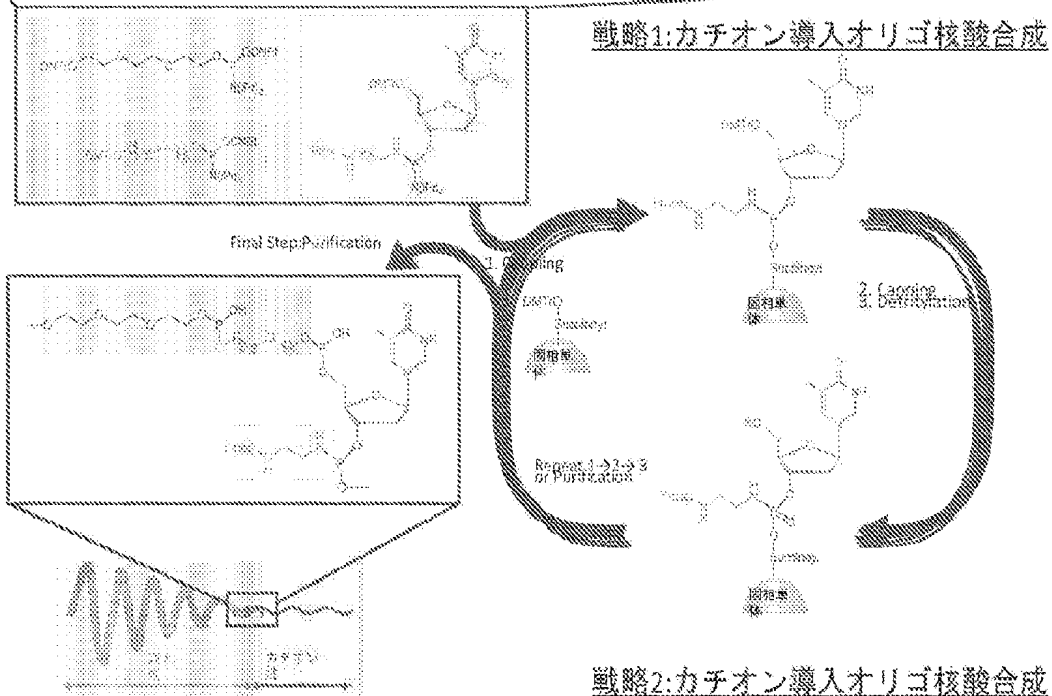
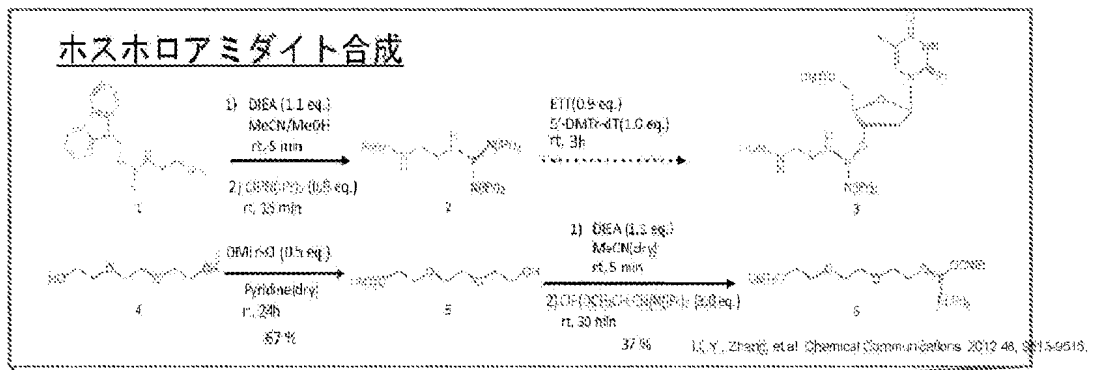
[図1]



[図2]

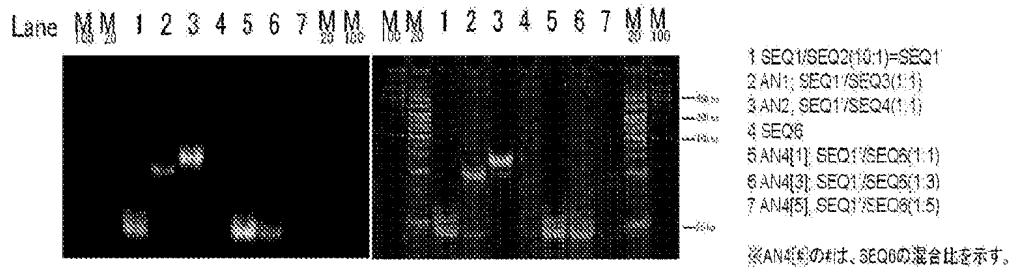


[図3]

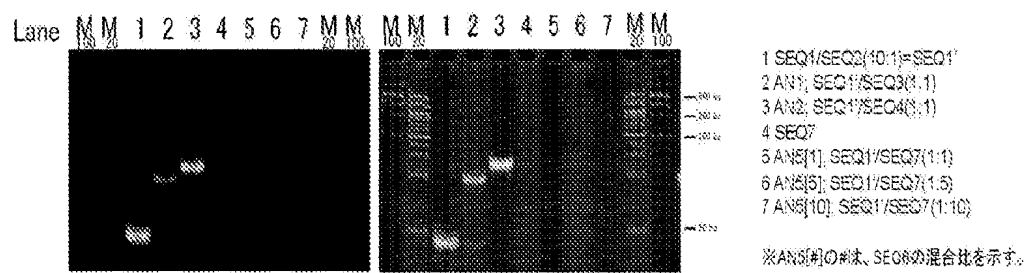


[図4]

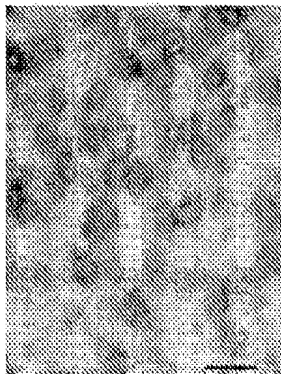
(A)



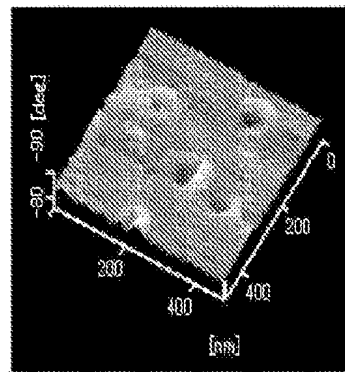
(B)



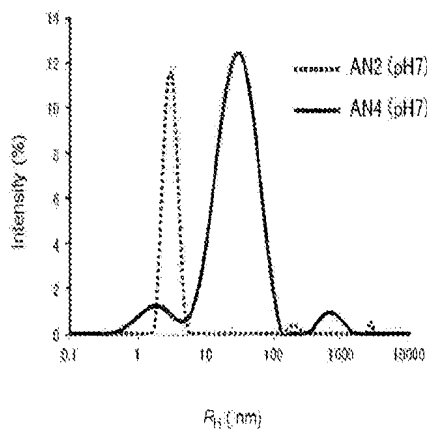
(C)



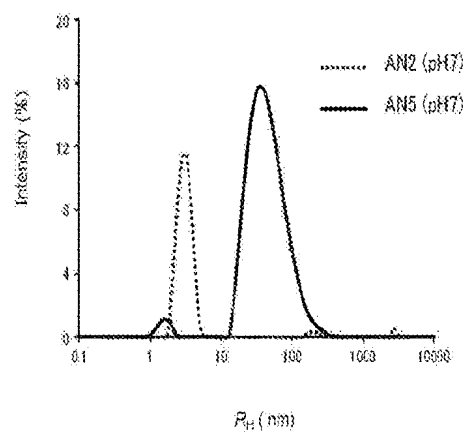
(D)



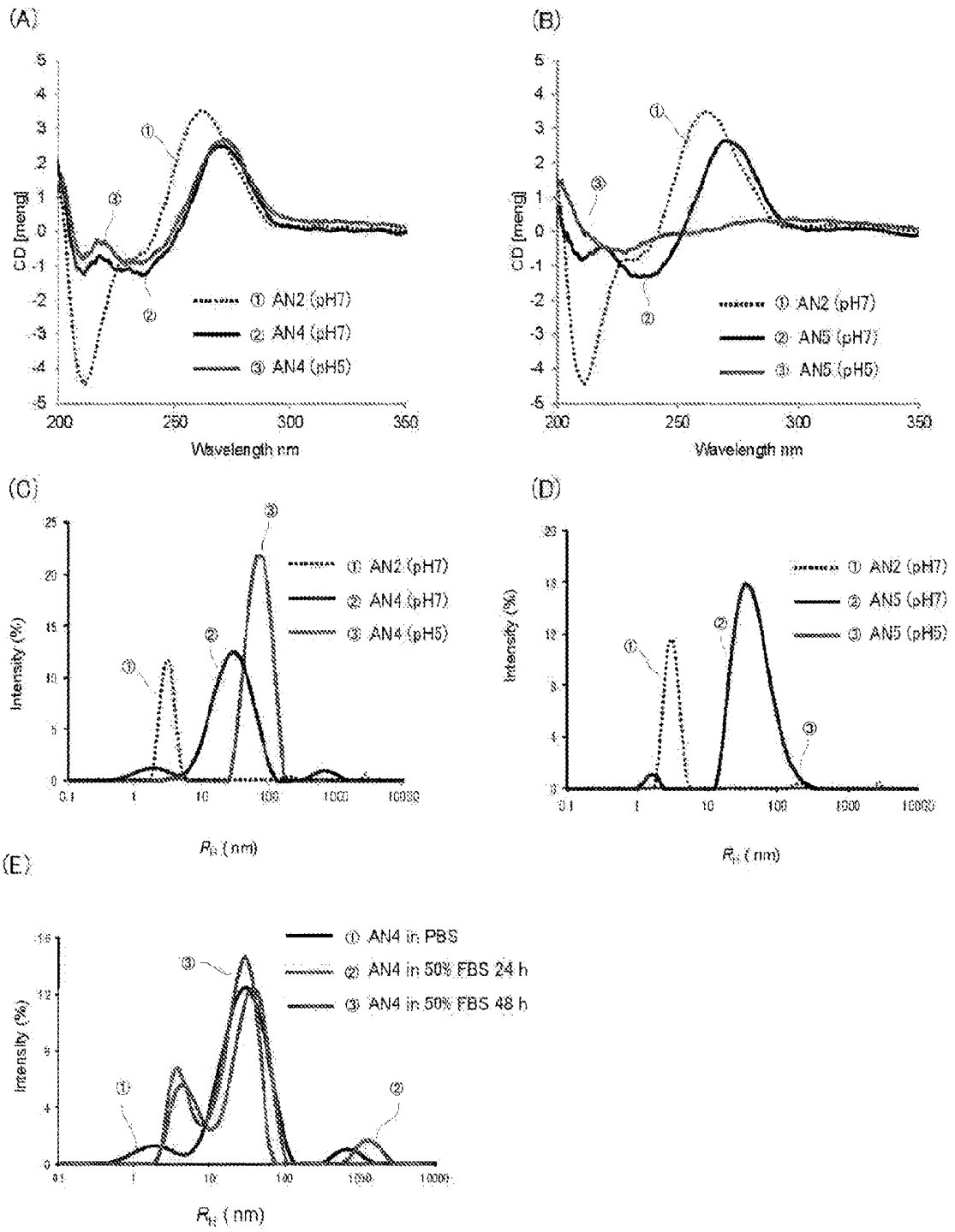
(E)



(F)

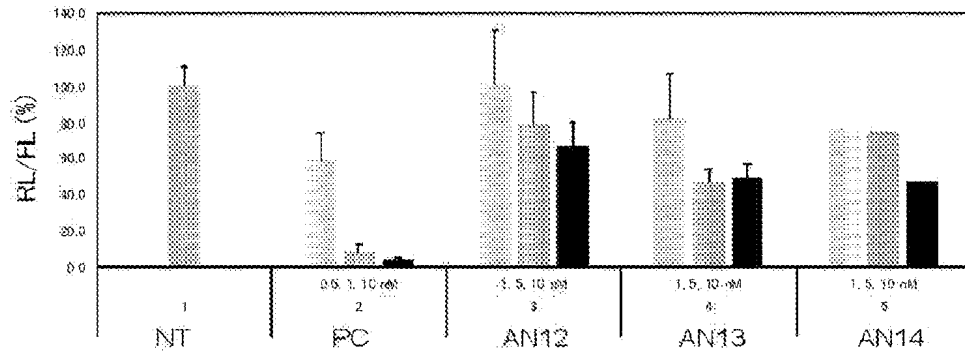


[5]

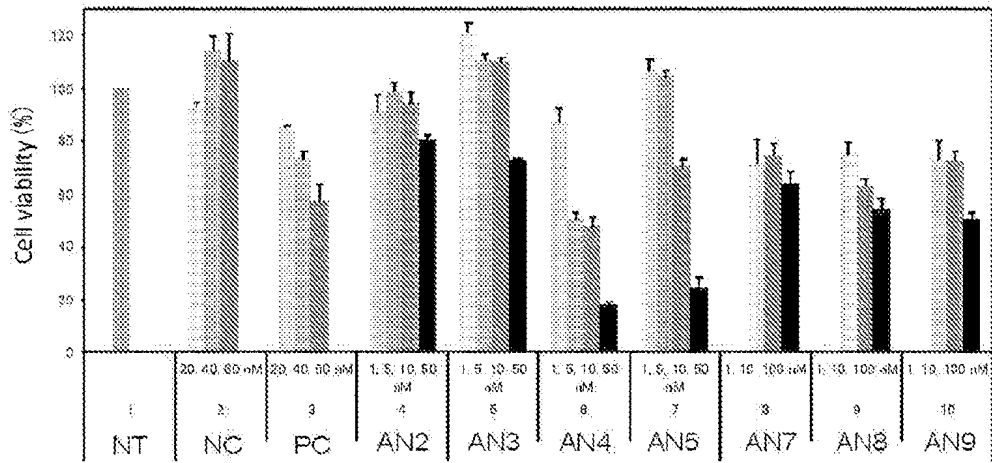


[圖6]

(A)



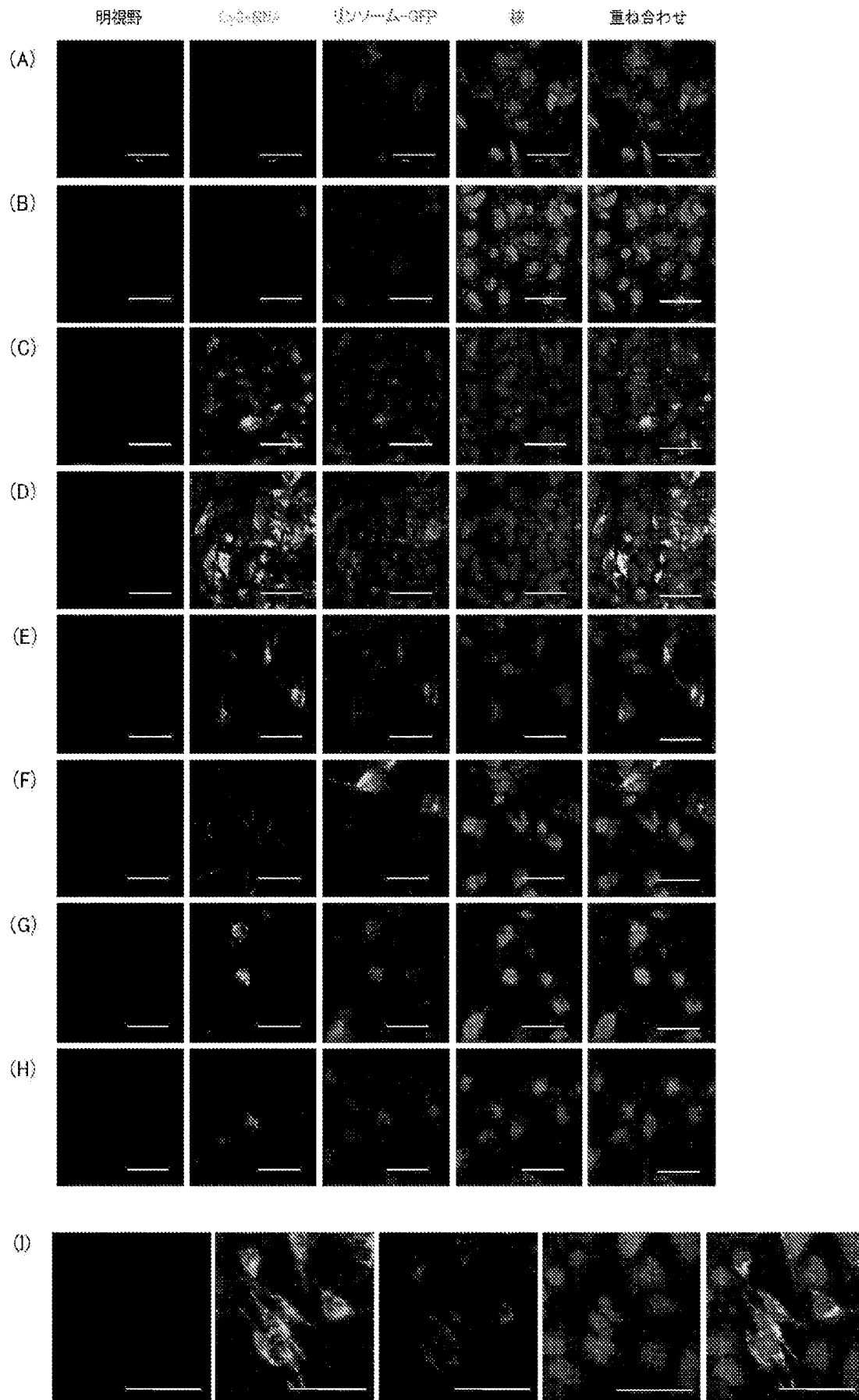
(B)



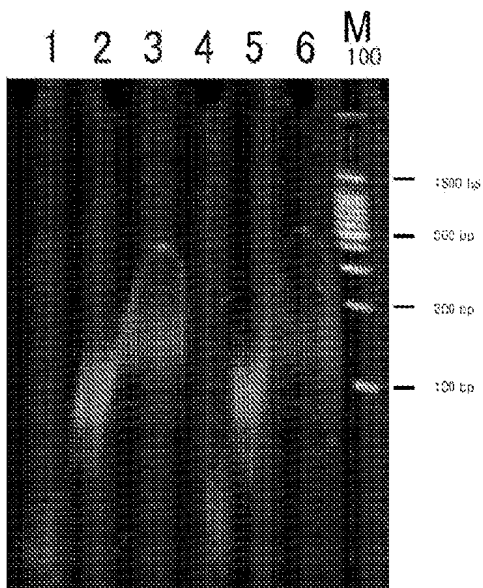
(C)



[図7]



[8]



1 SEQ34

2 AN28; SEQ30/SEQ34(1:1) pH7

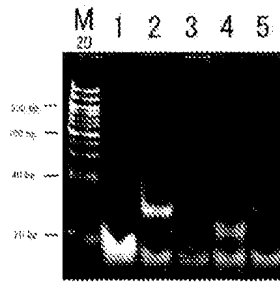
3 AN28; SEQ30/SEQ34(1:1) pH4

4 SEQ38

5 AN29; SEQ30/SEQ38(1:1) pH7 R_H 2 nm6 AN29; SEQ30/SEQ38(1:1) pH4 R_H 150 nm

[図9]

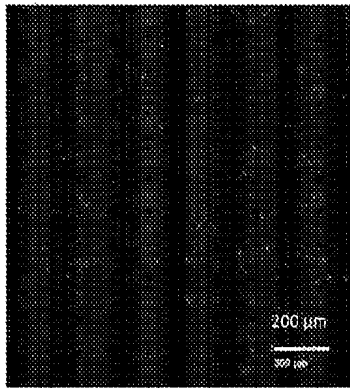
(A)



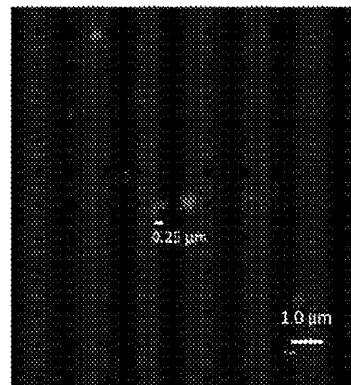
1 SEQ12/SEQ13(10:1)=SEQ12
 2 AN10[3], SEQ12/SEQ14(1:3)
 3 AN25[3], SEQ12/SEQ22(1:3)
 4 AN26[3], SEQ12/SEQ23(1:3)
 5 AN27[3], SEQ12/SEQ24(1:3)

※ []の#は、SEQ14,22,23,24の混合比を示す。

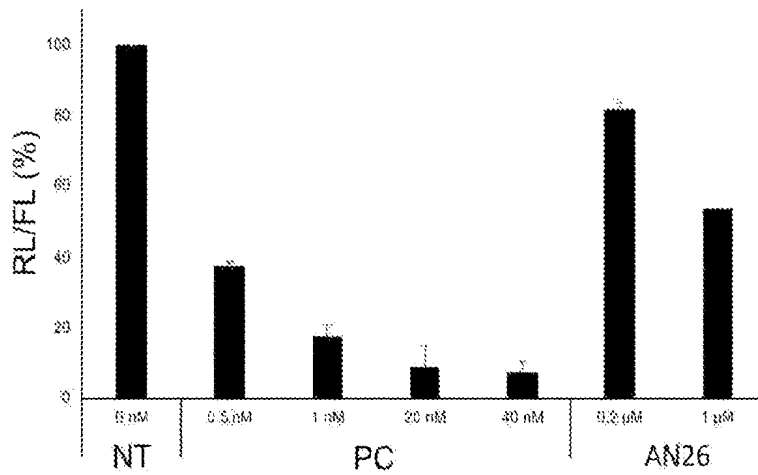
(B)



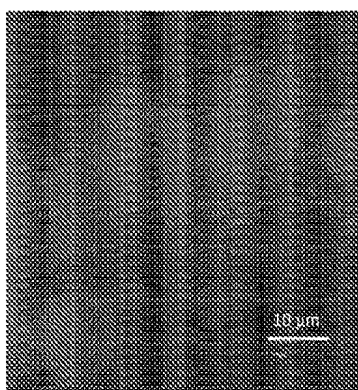
(C)



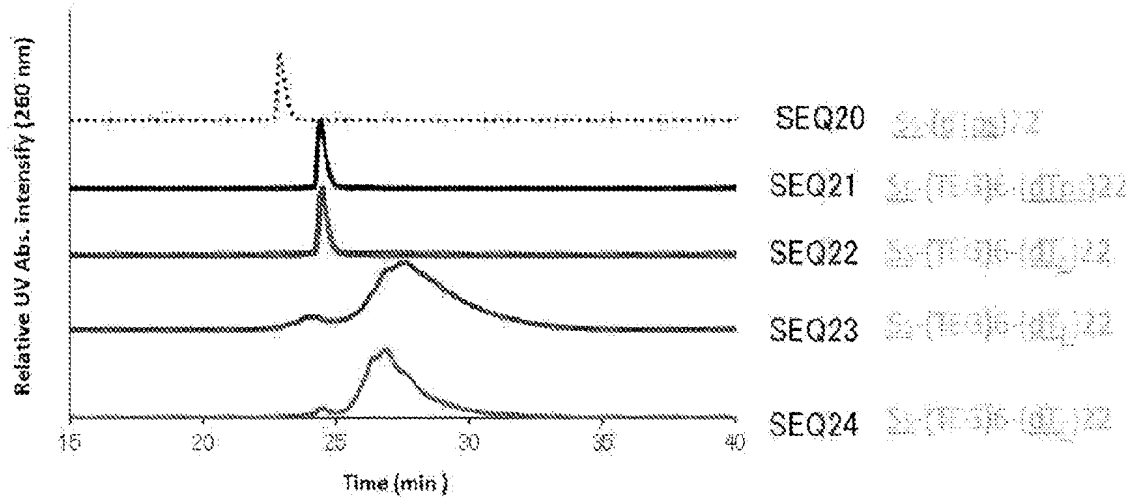
(D)



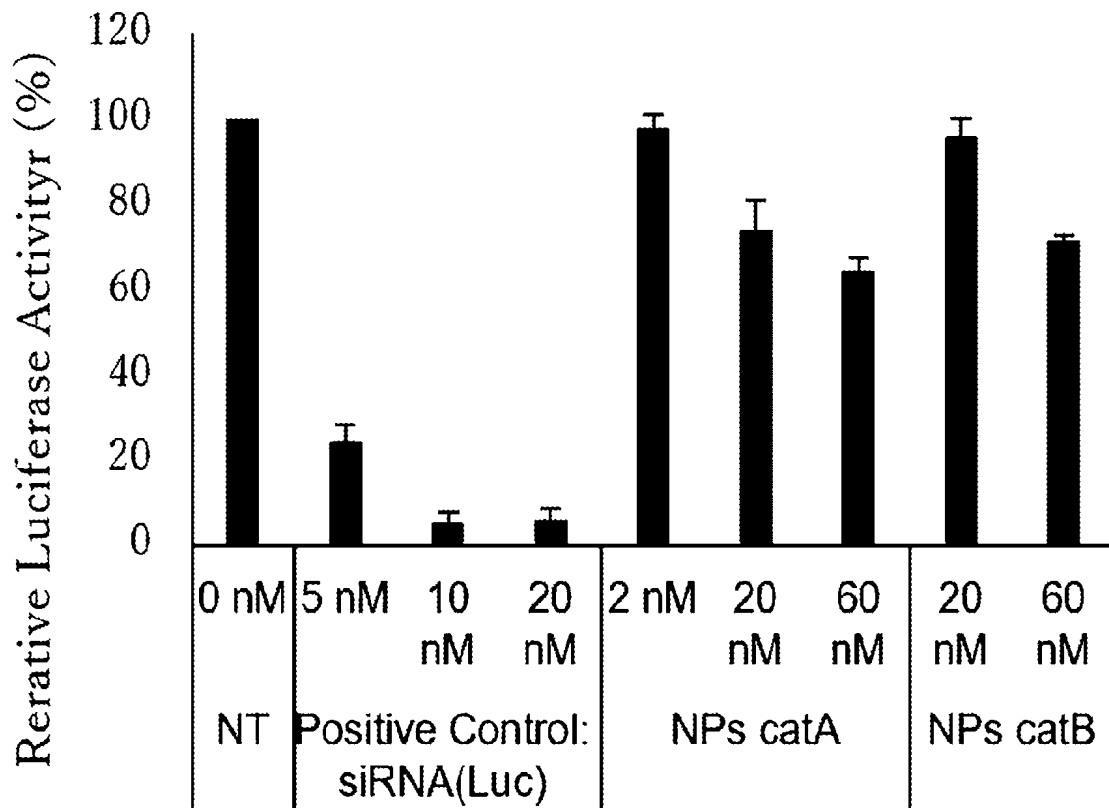
(E)



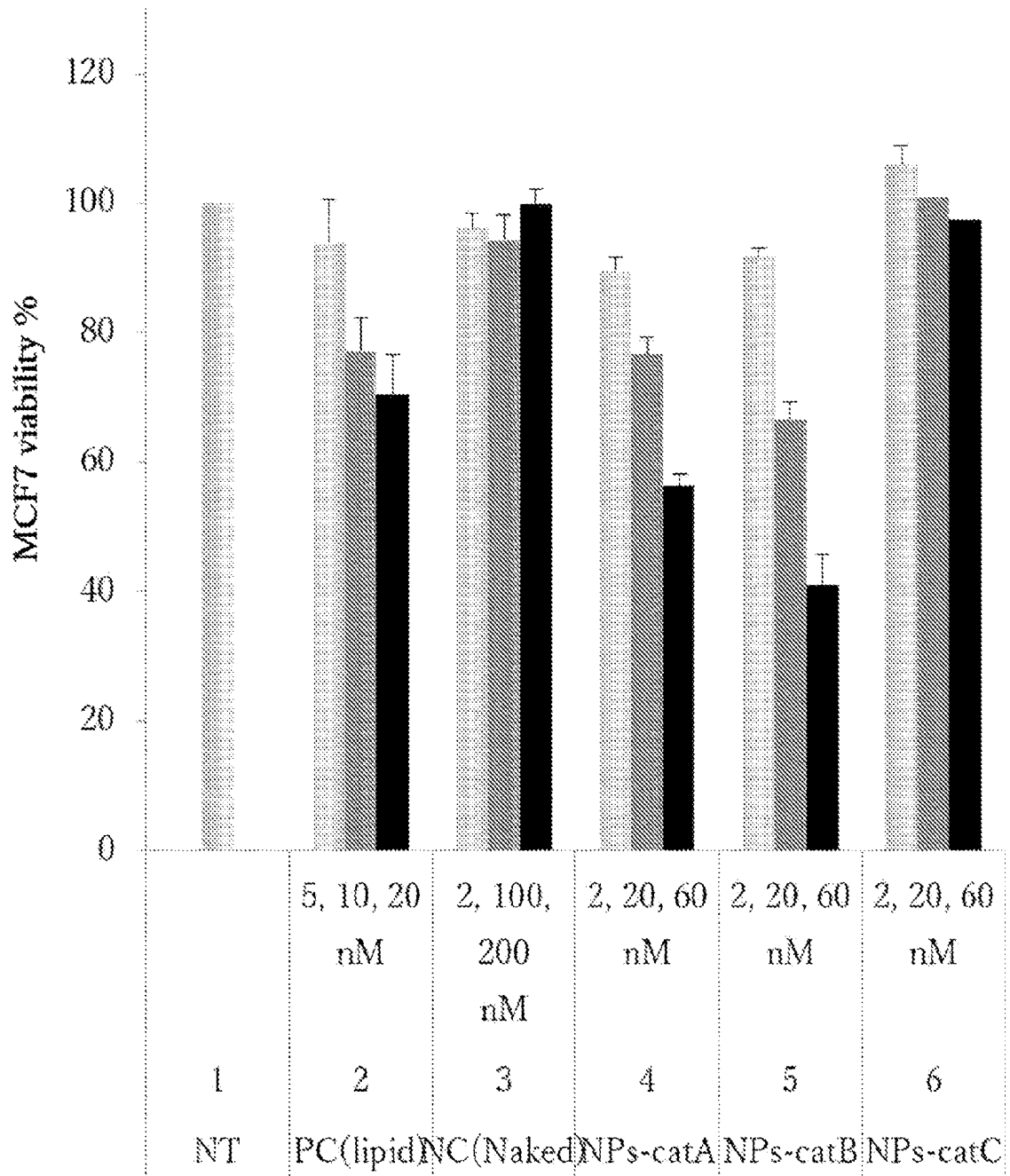
[10]



[11]

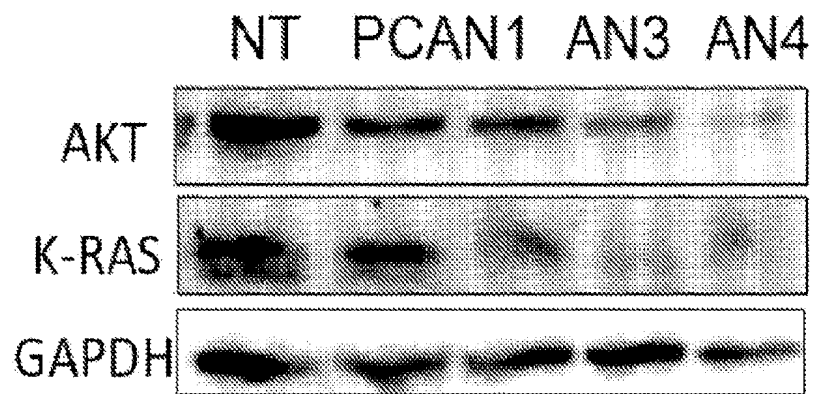


[12]



[13]

PC, Naked, RIO143(TEG-A), RIO143(TEG-B)

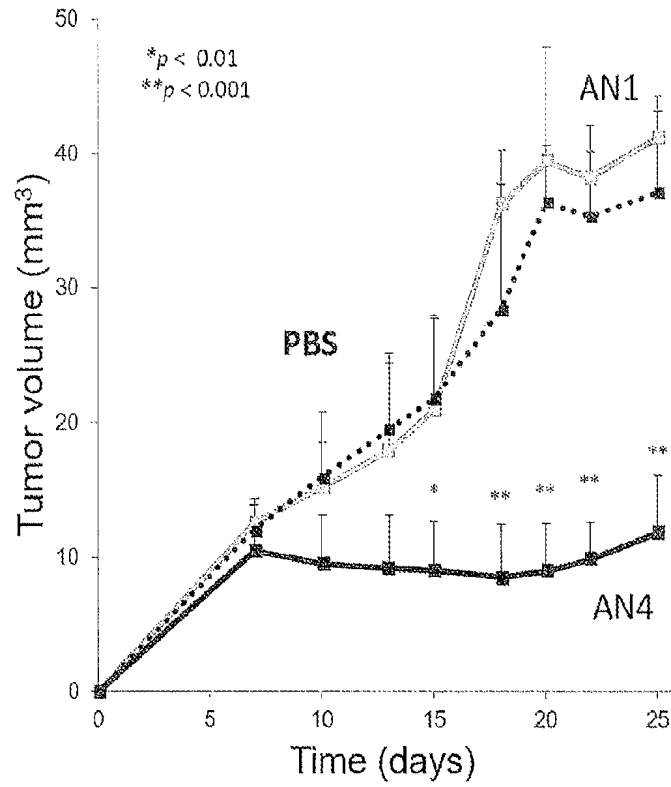


Protein Expression

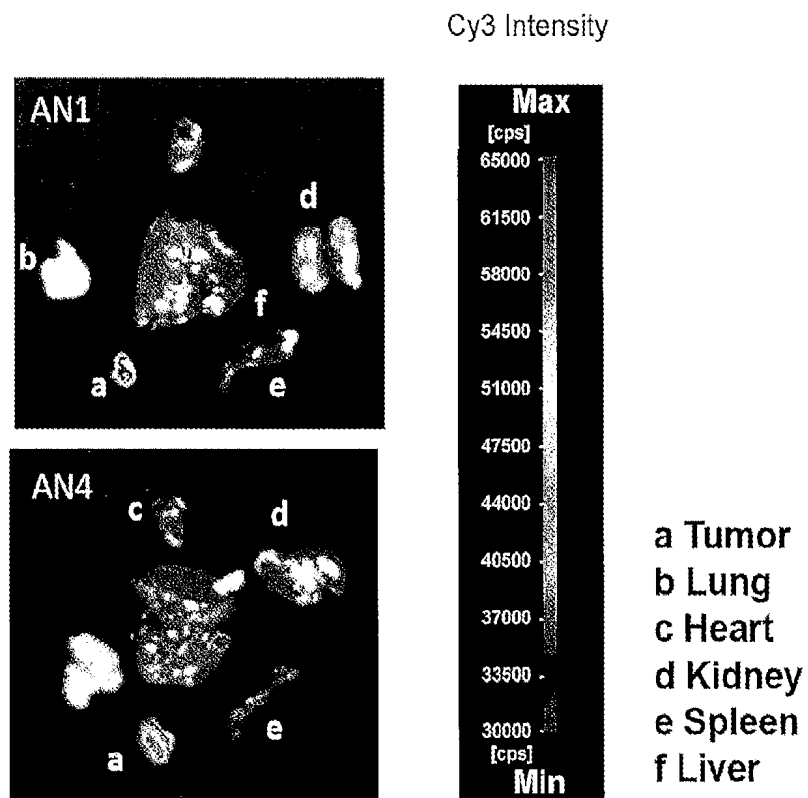
(48 h, 60 nM)

[図14]

(A)

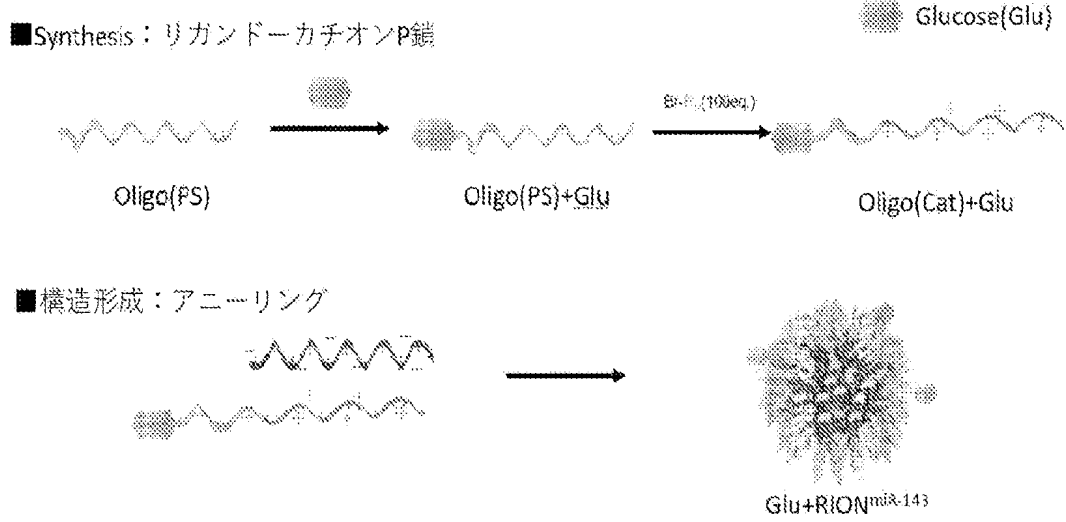


(B)

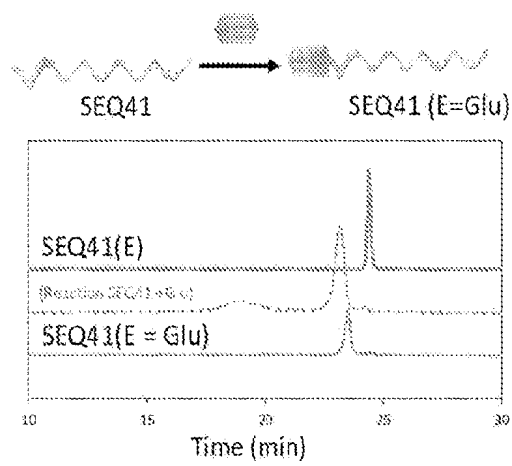


[図15]

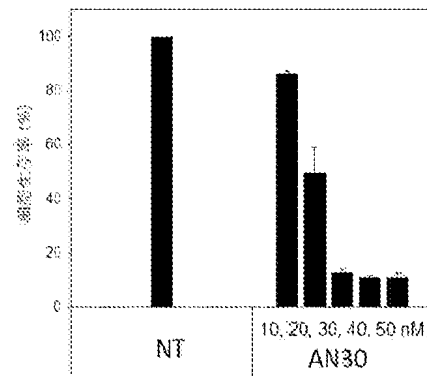
(A)



(B)

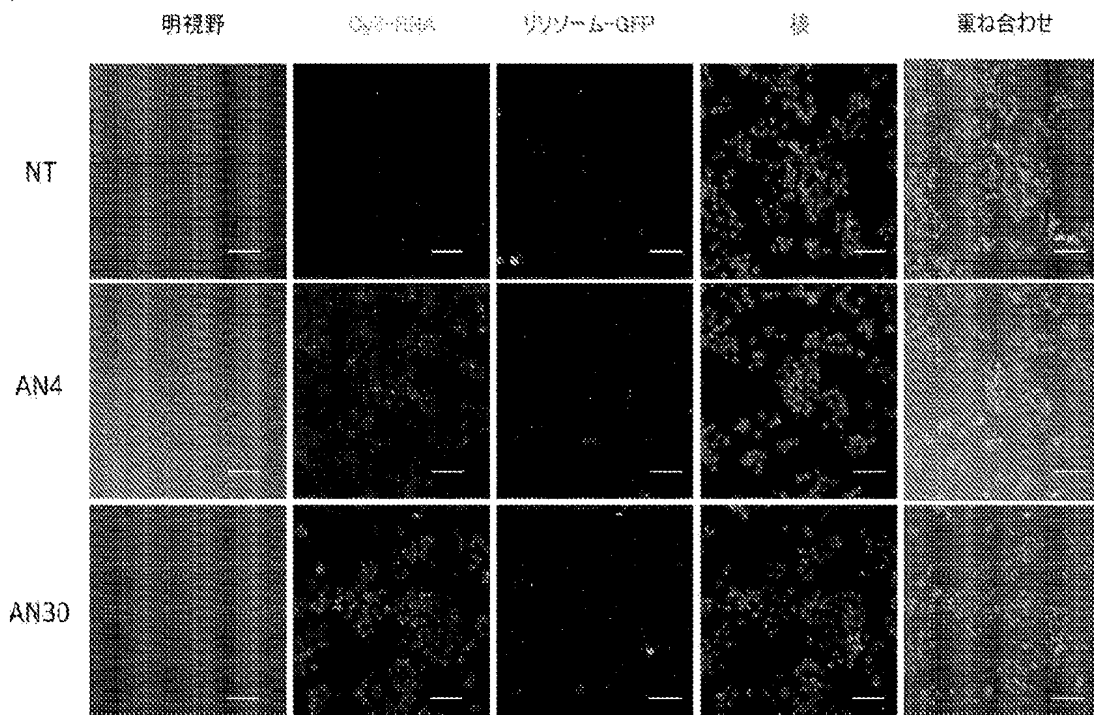


(C)

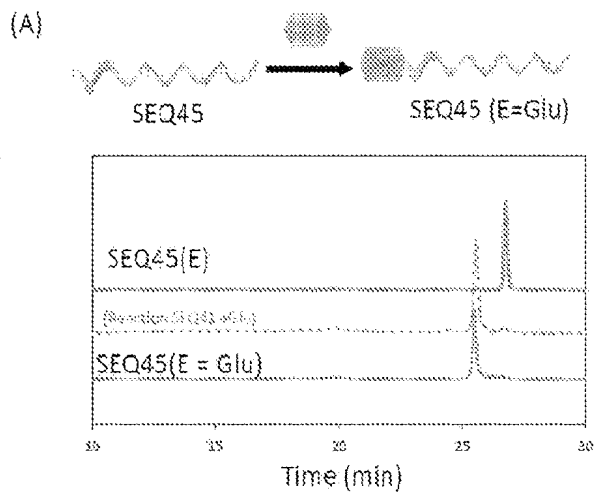


[図16]

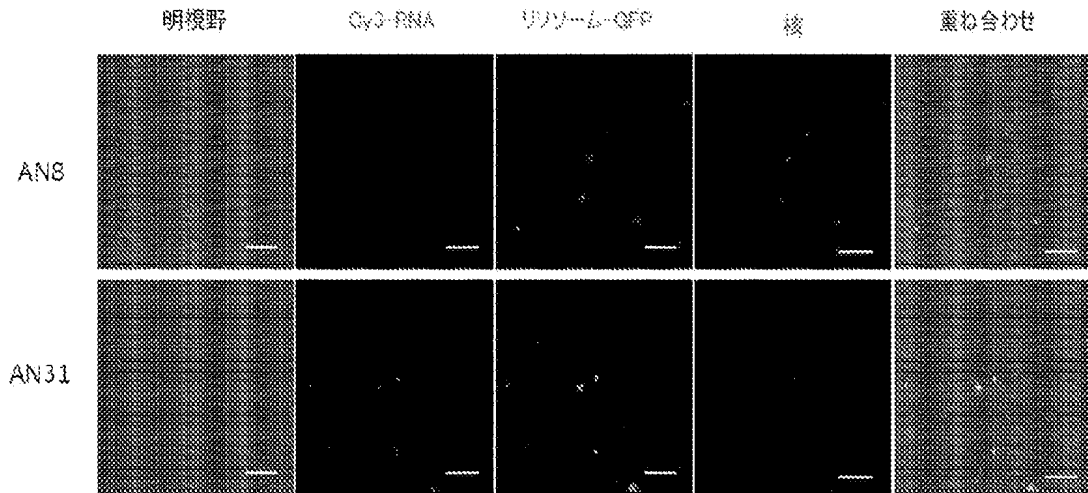
(D)



[図17]



(B)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/019343

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 47/69(2017.01)i; **A61K 9/107**(2006.01)i; **A61K 9/127**(2006.01)i; **A61K 31/7088**(2006.01)i; **A61K 31/7125**(2006.01)i; **A61K 45/00**(2006.01)i; **A61K 47/10**(2006.01)i; **A61K 47/32**(2006.01)i; **A61K 47/34**(2017.01)i; **A61K 47/36**(2006.01)i; **A61K 47/56**(2017.01)i; **A61K 47/60**(2017.01)i; **A61K 48/00**(2006.01)i; **A61P 35/00**(2006.01)i; **C07H 21/02**(2006.01)i; **C07H 21/04**(2006.01)i; **C12N 15/88**(2006.01)i

FE: **A61K47/69**; **A61K31/7088**; **C07H21/04 Z**; **A61K47/56**; **A61P35/00**; **A61K47/10**; **A61K47/32**; **A61K47/34**; **A61K47/36**; **A61K9/127**; **A61K9/107**; **A61K31/7125**; **A61K45/00**; **A61K48/00**; **C12N15/88 Z ZNA**; **C07H21/02**; **A61K47/60**

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K47/69; **A61K9/107**; **A61K9/127**; **A61K31/7088**; **A61K31/7125**; **A61K45/00**; **A61K47/10**; **A61K47/32**; **A61K47/34**; **A61K47/36**; **A61K47/56**; **A61K47/60**; **A61K48/00**; **A61P35/00**; **C07H21/02**; **C07H21/04**; **C12N15/88**

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022
Registered utility model specifications of Japan 1996-2022
Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); C Aplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SUN, Xiaoli et al. Cationic Polymer Optimization for Efficient Gene Delivery. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. 2010, vol. 10, pp. 108-125 in particular, abstract, p. 108, left column to p. 110, right column, p. 117, right column to p. 119, right column	1-18
A	SCOMPARIIN, Anna et al. Achieving successful delivery of oligonucleotides - From physico-chemical characterization to in vivo evaluation. Biotechnology Advances. 2015, vol. 33, pp. 1294-1309 in particular, abstract, p. 1297, table 1	1-18
A	JP 10-509740 A (CHIRON CORPORATION) 22 September 1998 (1998-09-22) claims, examples	1-18
A	US 2006/0241071 A1 (GRINSTAFF, Mark W. et al.) 26 October 2006 (2006-10-26) claims 5-6, 13-23, example 10	1-18

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 16 June 2022	Date of mailing of the international search report 05 July 2022
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/019343

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2014-522862 A (WAVE LIFE SCIENCES PTE.LTD) 08 September 2014 (2014-09-08) claims, example 2	1-18

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2022/019343

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
JP	10-509740	A	22 September 1998	US	6017700	A	
				claims, examples			
				WO	1997/006183	A1	
				EP	785942	A1	
				AU	6897196	A1	
				CA	2201963	A1	
US	2006/0241071	A1	26 October 2006	WO	2005/007810	A2	
				claims 5-6, 13-23, example 10			
				EP	1644479	A2	
JP	2014-522862	A	08 September 2014	US	2014/0194610	A1	
				claims, example 2			
				WO	2013/012758	A1	
				EP	2734208	A1	
				AU	2012284265	A1	
				CA	2842358	A1	
				CN	103796657	A	
				KR	10-2014-0068884	A	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K 47/69(2017.01)i; A61K 9/107(2006.01)i; A61K 9/127(2006.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i; A61K 31/7125(2006.01)i; A61K 45/00(2006.01)i; A61K 47/10(2006.01)i; A61K 47/32(2006.01)i; A61K 47/34(2017.01)i; A61K 47/36(2006.01)i; A61K 47/56(2017.01)i; A61K 47/60(2017.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C07H 21/02(2006.01)i; C07H 21/04(2006.01)i; C12N 15/88(2006.01)i</p> <p>FI: A61K47/69; A61K31/7088; C07H21/04 Z; A61K47/56; A61P35/00; A61K47/10; A61K47/32; A61K47/34; A61K47/36; A61K9/127; A61K9/107; A61K31/7125; A61K45/00; A61K48/00; C12N15/88 Z ZNA; C07H21/02; A61K47/60</p>														
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K47/69; A61K9/107; A61K9/127; A61K31/7088; A61K31/7125; A61K45/00; A61K47/10; A61K47/32; A61K47/34; A61K47/36; A61K47/56; A61K47/60; A61K48/00; A61P35/00; C07H21/02; C07H21/04; C12N15/88</p> <p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2022年</td> </tr> </table> <p>国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDream11); CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/Biosis (STN)</p>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2022年	日本国実用新案登録公報	1996-2022年	日本国登録実用新案公報	1994-2022年				
日本国実用新案公報	1922-1996年													
日本国公開実用新案公報	1971-2022年													
日本国実用新案登録公報	1996-2022年													
日本国登録実用新案公報	1994-2022年													
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>SUN, Xiaoli et al., Cationic Polymer Optimization for Efficient Gene Delivery, Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 2010, Vol.10, pp.108-125 特に, Abstract, 108ページ左欄~110ページ右欄, 117ページ右欄~119ページ右欄</td> <td>1-18</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>SCOMPARIJN, Anna et al., Achieving successful delivery of oligonucleotides - From physico-chemical characterization to in vivo evaluation, Biotechnology Advances, 2015, Vol.33, pp.1294-1309 特に, Abstract, 1297ページ, Table 1</td> <td>1-18</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JP 10-509740 A (カイロン コーポレイション) 22.09.1998 (1998-09-22) 特許請求の範囲, 実施例</td> <td>1-18</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	A	SUN, Xiaoli et al., Cationic Polymer Optimization for Efficient Gene Delivery, Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 2010, Vol.10, pp.108-125 特に, Abstract, 108ページ左欄~110ページ右欄, 117ページ右欄~119ページ右欄	1-18	A	SCOMPARIJN, Anna et al., Achieving successful delivery of oligonucleotides - From physico-chemical characterization to in vivo evaluation, Biotechnology Advances, 2015, Vol.33, pp.1294-1309 特に, Abstract, 1297ページ, Table 1	1-18	A	JP 10-509740 A (カイロン コーポレイション) 22.09.1998 (1998-09-22) 特許請求の範囲, 実施例	1-18
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号												
A	SUN, Xiaoli et al., Cationic Polymer Optimization for Efficient Gene Delivery, Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 2010, Vol.10, pp.108-125 特に, Abstract, 108ページ左欄~110ページ右欄, 117ページ右欄~119ページ右欄	1-18												
A	SCOMPARIJN, Anna et al., Achieving successful delivery of oligonucleotides - From physico-chemical characterization to in vivo evaluation, Biotechnology Advances, 2015, Vol.33, pp.1294-1309 特に, Abstract, 1297ページ, Table 1	1-18												
A	JP 10-509740 A (カイロン コーポレイション) 22.09.1998 (1998-09-22) 特許請求の範囲, 実施例	1-18												
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>														
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>"E" 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>"I" 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）</p> <p>"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>"P" 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>"T" 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>"X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>"Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>"&" 同一パテントファミリー文献</p>														
<p>国際調査を完了した日</p> <p>16.06.2022</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>05.07.2022</p>													
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁(ISA/JP)</p> <p>〒100-8915</p> <p>日本国</p> <p>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>榎本 佳予子 4C 9638</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3452</p>													

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	US 2006/0241071 A1 (GRINSTAFF, Marx W. et al.) 26.10.2006 (2006 - 10 - 26) 請求項 5 ~ 6, 13 ~ 23, 実施例 10	1-18
A	JP 2014-522862 A (ウェイブ ライフ サイエンス プライベート リミテッド) 08.09.2014 (2014 - 09 - 08) 特許請求の範囲, 実施例 2	1-18

第1欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第1ページの1. cの続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式
 - 紙形式又はイメージファイル形式
- b. 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
 - 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2022/019343

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 10-509740 A	22.09.1998	US 6017700 A 特許請求の範囲, 実施例	
		WO 1997/006183 A1	
		EP 785942 A1	
		AU 6897196 A1	
		CA 2201963 A1	
US 2006/0241071 A1	26.10.2006	WO 2005/007810 A2 請求項 5~6, 13~23, 実施例 10	
		EP 1644479 A2	
JP 2014-522862 A	08.09.2014	US 2014/0194610 A1 特許請求の範囲, 実施例 2	
		WO 2013/012758 A1	
		EP 2734208 A1	
		AU 2012284265 A1	
		CA 2842358 A1	
		CN 103796657 A	
		KR 10-2014-0068884 A	