

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02009/063998

発行日 平成23年3月31日(2011.3.31)

(43) 国際公開日 平成21年5月22日(2009.5.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 6 3
A 6 1 K 31/712 (2006.01)	A 6 1 K 31/712	4 C O 7 6
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	4 C O 8 6
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 41 頁) 最終頁に続く		

出願番号	特願2009-541198 (P2009-541198)	(71) 出願人	505254175 株式会社リボミック 東京都港区白金台三丁目16番13号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2008/070822	(74) 代理人	100080791 弁理士 高島 一
(22) 国際出願日	平成20年11月14日(2008.11.14)	(74) 代理人	100125070 弁理士 土井 京子
(31) 優先権主張番号	特願2007-295951 (P2007-295951)	(74) 代理人	100136629 弁理士 鎌田 光宜
(32) 優先日	平成19年11月14日(2007.11.14)	(74) 代理人	100121212 弁理士 田村 弥栄子
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人	100122688 弁理士 山本 健二
		(74) 代理人	100117743 弁理士 村田 美由紀
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】疎水性物質付加核酸及びその使用

(57) 【要約】

ミッドカインに結合し、その活性を阻害する疎水性物質付加核酸およびそのナノ粒子を提供すること。

ミッドカインに結合し、その活性を阻害する疎水性物質付加核酸およびそのナノ粒子；さらにプレイオトロフィンに対する結合活性を有することを特徴とする核酸；当該核酸および機能性物質（例えば、親和性物質、標識用物質、酵素、薬物送達媒体、又は薬物など）を含む複合体；当該核酸あるいは複合体を含む医薬または試薬；当該核酸あるいは複合体を用いることを特徴とするミッドカインの検出方法；当該ナノ粒子の製造方法など。

- 【特許請求の範囲】
- 【請求項 1】
ミッドカインに結合しその活性を阻害することを特徴とする、疎水性物質付加核酸。
- 【請求項 2】
さらにプレイオトロフィンに対する阻害活性を有することを特徴とする、請求項 1 に記載の核酸。
- 【請求項 3】
疎水性物質がコレステロールである、請求項 1 または 2 に記載の核酸。
- 【請求項 4】
配列番号 1 ~ 10 のいずれかで表される核酸、あるいは配列番号 1 ~ 10 のいずれかで表される核酸に 1 ~ 3 個の塩基が置換、欠失、付加または挿入した核酸である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の核酸。 10
- 【請求項 5】
請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の核酸及び機能性物質を含む複合体。
- 【請求項 6】
機能性物質が、親和性物質、標識用物質、酵素、薬物送達媒体又は薬物である、請求項 5 に記載の複合体。
- 【請求項 7】
請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の核酸あるいは請求項 5 または 6 に記載の複合体を含む医薬または試薬。 20
- 【請求項 8】
請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の核酸あるいは請求項 5 または 6 に記載の複合体を用いることを特徴とする、ミッドカインを検出する方法。
- 【請求項 9】
核酸に疎水性物質を結合させることを特徴とする、核酸をナノ粒子化する方法。
- 【請求項 10】
(a) 核酸に疎水性物質を結合させる工程；
(b) (a) で得られた疎水性物質付加核酸を、中性塩溶液に溶解させる工程；
を含んでなる、核酸をナノ粒子化する方法。
- 【請求項 11】 30
0.1 mg/mL ~ 10 mg/mL の濃度で疎水性物質付加核酸を中性塩溶液に溶解させることを特徴とする、請求項 10 に記載の方法。
- 【請求項 12】
疎水性物質を結合させることを特徴とする、核酸の体内薬物動態を向上させる方法。
- 【請求項 13】
核酸が、生理活性を有する核酸である、請求項 12 に記載の方法。
- 【請求項 14】
疎水性物質がコレステロールである、請求項 9 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 15】
疎水性物質が結合してなる、核酸ナノ粒子。 40
- 【請求項 16】
請求項 15 に記載の核酸ナノ粒子を含有してなる医薬または試薬。
- 【請求項 17】
細胞遊走阻害剤である、請求項 7 または 16 に記載の医薬または試薬。
- 【請求項 18】
調節性 T 細胞の増殖促進剤である、請求項 7 または 16 に記載の医薬または試薬。
- 【請求項 19】
自己免疫性疾患または癌の予防・治療剤である、請求項 7 または 16 に記載の医薬。
- 【請求項 20】
哺乳動物に対して、請求項 1 に記載の核酸の有効量を投与することを特徴とする、自己 50

免疫性疾患または癌の予防・治療方法。

【請求項 2 1】

自己免疫性疾患または癌の予防・治療剤を製造するための、請求項 1 に記載の核酸の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、疎水性物質付加核酸及びその使用方法、検出法などに関する。

【背景技術】

10

【0002】

ミッドカイン (midkine: 以下、必要に応じて「MK」と記載する) は、肺性腫瘍細胞 (EC) のレチノイン酸による分化誘導の過程で一過性に発現する遺伝子の産物として発見された増殖・分化因子で、塩基性アミノ酸とシステインに富む分子量 13 kDa のポリペプチドである (例えば、非特許文献 1 及び非特許文献 2 参照)。

【0003】

MK はその立体構造が NMR により決定されている (例えば、非特許文献 3 参照)。MK は、構造上の特徴より主として 2 つのフラグメントから構成されている。具体的には、例えばヒト MK の場合、1 ~ 52 番目のアミノ酸からなる N 末端側のフラグメント (以下、「N - フラグメント」という)、62 ~ 121 番目のアミノ酸からなる C 末端側のフラグメント (以下、「C - フラグメント」という) 及びそれらを結合するループ領域 (53 ~ 61 番目のアミノ酸) からなる。それぞれのフラグメントはドメインと塩基性アミノ酸に富むテイルからなる。ドメインは 3 本の逆シート構造をとる (以下、15 ~ 52 番目のアミノ酸からなる N - フラグメント中のドメインを「N - ドメイン」、62 ~ 104 番目のアミノ酸からなる C - フラグメント中のドメインを「C - ドメイン」という)。また、テイルは自由に動き特定の構造をとらない (以下、1 ~ 14 番目のアミノ酸からなる N - フラグメント中のテイルを「N - テイル」、105 ~ 121 番目のアミノ酸からなる C - フラグメント中のテイルを「C - テイル」という)。

20

【0004】

MK の受容体としては、受容体型タンパク質チロシンホスファターゼ (PTP)、LRP (low density lipoprotein receptor-related protein)、ALK (anaplastic leukemia kinase)、インテグリン及びシンデカンなどが知られている。MK は、塩基性アミノ酸であるリジン (K) およびアルギニン (R) を多く含んだ、正に強く帯電したタンパク質である。C ドメインにヘパリン結合部位を持ち、ヘパリンやコンドロイチン硫酸 E など負に帯電した分子と強く結合することで知られている。変異導入解析と NMR 解析の結果、ヘパリンとの結合には K79、R81、K102 で構成されるクラスター I と K86、K87、R89 で構成されるクラスター II が重要であると考えられている。一方、コンドロイチン硫酸 E との結合にはクラスター I のみが重要であるとする報告がある。クラスター I の R81 を A に変えると、ヘパリンとの結合能が低下する。その結果、PTP への結合能が低下したり、MK による神経細胞の突起伸長および移動が阻害される。例えば、シャーレを MK でコートしておき、この上にマウス胚の神経細胞をまくと、神経突起が伸長する。この際、神経細胞をヘパリチナーゼで消化すると神経突起の伸長が阻害される。一方、血管内皮細胞を培養し MK を添加すると、細胞のプラスミノゲン活性化酵素の活性が上昇する。この場合も細胞をヘパリチナーゼ消化するとプラスミノゲンの活性上昇が阻害される。

30

40

【0005】

このように MK はグリコサミノグリカンに結合して活性を示す場合が多い。しかし、負に帯電したものはどんなものでも MK に結合するわけではない。コンドロイチン硫酸 E やヘパリンは MK に強く結合するが、コンドロイチン硫酸 A、B、C および D は MK に結合

50

しないことが知られている。この他、スルファチドやコレステロール - 3 - 硫酸、高濃度ではホスファチジルセリンやホスファチジン酸に結合するが、レシチン、ホスファチジリンイノシトール、スフィンゴミエリン、コレステロールなどには結合しない（例えば、特許文献 4 参照）。

【 0 0 0 6 】

M K は様々な生物活性を有することが知られている。例えば、ヒトの癌細胞において M K の発現が増大していることが知られている。この発現の増大は、食道癌、甲状腺癌、膀胱癌、大腸癌、胃癌、膵臓癌、胸部癌、肝臓癌、肺癌、乳癌、神経芽細胞腫、ニューロblastoma、グリオblastoma、子宮癌、卵巣癌、ウィルムス腫瘍といった多様な癌で確認されている（例えば、特許文献 1 及び非特許文献 5 参照）。また、M K は癌細胞の生存と移動を促進し、血管新生を促し、癌の進展を助けると考えられている。

10

【 0 0 0 7 】

また、M K は炎症像形成の過程で中核を占める分子の一つであることが知られている。例えば、血管に傷害を与えた時の新生内膜の形成と虚血傷害時の腎炎の発症が、M K 遺伝子を欠失させたノックアウトマウスでは軽減されていることが知られている。また、リウマチモデル、手術後の癒着もノックアウトマウスで大きく軽減されることが知られている（例えば、特許文献 2、特許文献 3 及び特許文献 4 参照）。このように、M K は、関節炎、自己免疫疾患、リウマチ性関節炎（慢性関節リウマチ（R A）、変形性関節症（O A））、多発性硬化症、手術後の癒着、炎症性大腸炎、乾癬、狼瘡、喘息、好中球機能異常等の炎症性疾患に関与していることが知られている。更に、M K はマクロファージや好中球といった炎症性細胞の移動（遊走）を促進することが知られている。この移動は炎症像の成立に必要なので、ミッドカインが欠失すると炎症に基盤がある病気が起こりにくいと考えられる（例えば、特許文献 5 参照）。

20

【 0 0 0 8 】

また、進行子宮内膜症の女性の腹腔液において、M K レベルが増加していること、及び、M K が培養子宮内膜間質細胞の増殖を刺激することから、M K が子宮内膜症の発症や進行に関与することが知られている（例えば、特許文献 6 参照）。

【 0 0 0 9 】

また、M K は、血管内膜肥厚作用を有することから、血管再建術後再狭窄、心臓冠動脈血管閉塞性疾患、脳血管閉塞性疾患、腎血管閉塞性疾患、末梢血管閉塞性疾患、動脈硬化、脳梗塞等の血管閉塞性疾患に関与することが知られている（例えば、特許文献 2 参照）。

30

【 0 0 1 0 】

更に、M K は、調節性 T 細胞の増殖を抑制することが知られている。このため、M K 阻害剤は多発性硬化症、慢性関節リウマチ、I 型糖尿病、クローン病、全身性エリテマトーデス、重症筋無力症など、調節性 T 細胞と関係する疾患の治療薬として利用可能である（特許文献 7、非特許文献 6）。

【 0 0 1 1 】

細胞遊走は、癌細胞の浸潤・転移、動脈硬化巣での内膜肥厚、血管新生などの機序に重要であることが知られている。また、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、脳出血、高血圧などの循環器疾患に、炎症性の細胞の遊走が深く関わっていることが知られている。

40

【 0 0 1 2 】

プレイオトロフィン（P T N または H B - G A M ; 以下、必要に応じて「P T N」と記載する）は、M K の唯一のファミリータンパク質であって、M K と約 5 0 % のホモロジーを有している。M K と P T N はともにシステインと塩基性アミノ酸を多く含むタンパク質である。M K と P T N に存在する 1 0 個全てのシステインは保存されており、P T N も M K と同様に、構造上 N - ドメインと C - ドメインに分けることができる。N M R 解析の結果、これら 2 つの分子の三次元構造は非常によく似ていることがわかっている。それぞれのドメインは三つのシートから成っており、フレキシブルなリンカー領域でつながれている。コンドロイチン硫酸やヘパリンとの結合に重要だと考えられている K 7 9、R 8 1

50

、K 1 0 2 は両タンパク質間で保存されている。K 7 9 と R 8 1 は同一のシート上に存在するが、K 1 0 2 は別のシート上に存在する。MK および P T N が立体構造を形成すると、これらの塩基性アミノ酸はタンパク質表面近傍に現れる。

【0013】

MKの活性を阻害する物質としては、低分子化合物、抗体、siRNA、アンチセンスなどが考えられ、これらは上記疾患の治療または予防に有用であると考えられるが、既に承認されている医薬品や臨床試験中の医薬品候補品はない。近年、MKに対する高性能なRNAアプタマーが作製され、医薬品候補品として開発が進められている（特許文献7および8参照）。また、MKに対して結合する低分子化合物についても報告されている（非特許文献4参照）。

10

【0014】

コレステロールが結合した核酸を医薬品化する試みは既に行われている。その多くはsiRNAにコレステロールを結合したもので、細胞内へのデリバリー効率が向上する（例えば非特許文献7、8）。また、コレステロールが結合したアプタマーをリポソームに封入することで体内薬物動態が改善する（特許文献9、非特許文献9、10）。一方でリポソーム製剤化していないコレステロール結合アプタマーはコレステロールが結合していないアプタマーと体内薬物動態が大きく変わらない結果が報告されている（非特許文献11）。

【特許文献1】特開平6-172218号公報

【特許文献2】国際公開第2000/10608号パンフレット

【特許文献3】国際公開第2004/078210号パンフレット

【特許文献4】国際公開第2004/085642号パンフレット

【特許文献5】国際公開第1999/03493号パンフレット

【特許文献6】国際公開第2006/016571号パンフレット

【特許文献7】国際公開第2006/322659号パンフレット

【特許文献8】国際公開第2008/059877号パンフレット

【特許文献9】国際公開第1996/34876号パンフレット

【非特許文献1】Kadomatsu, K. et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun., 151: p. 1312 - 1318

【非特許文献2】Tomokura, M. et al., (1990) J. Biol. Chem., 265: p. 10765 - 10770

【非特許文献3】Iwasaki, W. et al., (1997) EMBO J., 16, p. 6936 - 6946

【非特許文献4】Kurosawa, N. et al., (2000) Eur. J. Biochem., 267, p. 344 - 351

【非特許文献5】Muramatsu, T., (2002) J. Biochem., 132, p. 359 - 371

【非特許文献6】Wang, J. et al., (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105: p. 3915 - 3920

【非特許文献7】Soutschek, J. et al., (2004) Nature 432: p. 173 - 178

【非特許文献8】Bijsterbosch, M. K. et al., (2001) Biochem. Pharm., 62: p. 627 - 633

【非特許文献9】de Smidt, P. C. et al., (1991) Nucl. Acids Res., 19: p. 4695 - 4700

【非特許文献10】Willis, M. C. et al., (1998) Bioconjugate Chem., 9: p. 573 - 582

【非特許文献11】Healy, J. M., et al., (2004) Pharm. Res., 21: p. 2234 - 2246

【発明の開示】

20

30

40

50

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

本発明は、疎水性物質付加核酸を提供することを目的とする。特に本発明は、ミッドカインの活性阻害能を有する疎水性物質付加核酸およびそのナノ粒子を提供することを目的とする。また、その使用方法、検出方法などを提供することも目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、ミッドカインの活性阻害能を有する疎水性物質付加核酸を作製することに成功した。また当該疎水性物質付加核酸がナノ粒子として存在し得ることが分かった。本発明者らはさらに鋭意検討し、本発明を完成するに至った。

10

【0017】

即ち、本発明は、以下の発明などを提供するものである：

[1] ミッドカインに結合しその活性を阻害することを特徴とする、疎水性物質付加核酸；

[2] さらにプレイオトロフィンに対する阻害活性を有することを特徴とする、[1]に記載の核酸；

[3] 疎水性物質がコレステロールである、[1]または[2]に記載の核酸；

[4] 配列番号1～10のいずれかで表される核酸、あるいは配列番号1～10のいずれかで表される核酸に1～3個の塩基が置換、欠失、付加または挿入した核酸である、[1]～[3]のいずれかに記載の核酸；

20

[5] [1]～[4]のいずれかに記載の核酸及び機能性物質を含む複合体；

[6] 機能性物質が、親和性物質、標識用物質、酵素、薬物送達媒体又は薬物である、[5]に記載の複合体；

[7] [1]～[4]のいずれかに記載の核酸あるいは[5]または[6]に記載の複合体を含む医薬または試薬；

[8] [1]～[4]のいずれかに記載の核酸あるいは[5]または[6]に記載の複合体を用いることを特徴とする、ミッドカインを検出する方法；

[9] 核酸に疎水性物質を結合させることを特徴とする、核酸をナノ粒子化する方法；

[10] (a) 核酸に疎水性物質を結合させる工程；(b) (a)で得られた疎水性物質付加核酸を、中性塩溶液に溶解させる工程；を含んでなる、核酸をナノ粒子化する方法；

30

[11] 0.1mg/mL～10mg/mLの濃度で疎水性物質付加核酸を中性塩溶液に溶解させることを特徴とする、[10]に記載の方法；

[12] 疎水性物質を結合させることを特徴とする、核酸の体内薬物動態を向上させる方法；

[13] 核酸が、生理活性を有する核酸である、[12]に記載の方法；

[14] 疎水性物質がコレステロールである、[9]～[13]のいずれかに記載の方法；

[15] 疎水性物質が結合してなる、核酸ナノ粒子；

[16] [15]に記載の核酸ナノ粒子を含有してなる医薬または試薬；

40

[17] 細胞遊走阻害剤である、[7]または[16]に記載の医薬または試薬；

[18] 調節性T細胞の増殖促進剤である、[7]または[16]に記載の医薬または試薬；

[19] 自己免疫性疾患または癌の予防・治療剤である、[7]または[16]に記載の医薬；

[20] 哺乳動物に対して、[1]に記載の核酸の有効量を投与することを特徴とする、自己免疫性疾患または癌の予防・治療方法；

[21] 自己免疫性疾患または癌の予防・治療剤を製造するための、[1]に記載の核酸の使用。

【発明の効果】

50

【 0 0 1 8 】

本発明の疎水性物質付加核酸及び複合体は、自己免疫疾患、癌、術後癒着、子宮内膜症などの種々の疾患に対する医薬、あるいは診断薬などの試薬として有用であり得る。本発明の疎水性物質を付加した核酸及び複合体はまた、MKの精製及び濃縮、並びにMKの検出及び定量に有用であり得る。

【 0 0 1 9 】

本発明により得られる核酸ナノ粒子は、核酸分子が有する生理活性を保持しているだけでなく、より向上した生理活性と体内薬物動態を有しているので、核酸の活性を強めた核酸医薬、核酸試薬の製造に有用である。

【 図面の簡単な説明 】

10

【 0 0 2 0 】

【 図 1 】 表面プラズモン共鳴法を用いた核酸 1 の MK に対する結合活性測定の結果を示す図である。

【 図 2 】 配列番号 1 0 で表されるコレステロール付加核酸投与による、EAEモデルマウスにおける臨床症状変化の観察結果を示す図である。

【 図 3 】 ゲルろ過HPLCによる核酸ナノ粒子の分析結果を示す図である。

【 図 4 】 非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を示す図である。

【 図 5 】 核酸ナノ粒子の体内薬物動態が向上していることを示す図である。

【 発明を実施するための最良の形態 】

20

【 0 0 2 1 】

(1) 疎水性物質付加核酸

本発明は、ミッドカイン (MK) との結合活性を有する疎水性物質付加核酸を提供する。また、本発明は、MKの活性を阻害する疎水性物質付加核酸を提供する。

【 0 0 2 2 】

上記MKの活性としては、例えば、細胞 (例、マクロファージ、好中球、好酸球、血管平滑筋細胞、腫瘍細胞、骨芽細胞、神経細胞及びそれらの前駆細胞) の遊走活性 (Takada et al., 1997, J. Biochem. 122, 453 - 458; Horiba et al., 2000, J. Clin. Invest. 105, 489 - 495; Maeda et al., 1999, J. Biol. Chem. 274, 12474 - 12479; Qi et al., 2001, J. Biol. Chem. 276, 15868 - 15875 など参照)、細胞 (例、腫瘍細胞、繊維芽細胞、ケラチノサイト、神経細胞、軟骨細胞及びそれらの前駆細胞) の増殖及び分化促進活性 (Muramatsu and Muramatsu, 1991, Biochem. Biophys. Res. Commun. 177, 652 - 658; Muramatsu et al., 1993, Dev. Biol. 159, 392 - 402; Takei et al., 2001, Cancer Res. 61, 8486 - 8491 など参照)、調節性T細胞の増殖阻害活性、調節性T細胞の機能阻害活性、神経細胞の神経突起の伸長促進活性、細胞 (例、腫瘍細胞、神経細胞) のアポトーシス阻害活性、細胞 (例、腫瘍細胞) の血管新生の誘導活性、筋原細胞のシナプス形成誘導活性、血管内皮細胞の線溶系促進活性、血管平滑筋細胞のIL-8産生促進活性などが挙げられる。

30

40

【 0 0 2 3 】

本発明の疎水性物質付加核酸は、任意の哺乳動物に由来するMKの任意の部分に結合し、その活性を阻害し得る。

【 0 0 2 4 】

上記哺乳動物としては、例えば、霊長類 (例、ヒト、サル)、げっ歯類 (例、マウス、ラット、モルモット)、並びにペット、家畜及び使役動物 (例、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ブタ) が挙げられるが、霊長類およびげっ歯類が好ましく、ヒトが最も好ましい。

【 0 0 2 5 】

なお、各種哺乳動物に由来するMKのうち、例えばヒトMKのアミノ酸配列は、Gen

50

B a n k アクセション番号 B C 0 1 1 7 0 4 に示されている。このうち、M K として機能する分泌タンパクは 2 3 番目のリジンから 1 4 3 番目のアスパラギン酸の 1 2 1 アミノ酸で構成される。そのため本明細書中、以下 M K のアミノ酸配列においてアミノ酸番号を示す場合、一般に 2 3 番目のリジンを 1 番目のアミノ酸として表示する。

すなわち、本明細書における「ヒト M K」は、1 ~ 5 2 番目のアミノ酸からなる N - フラグメント、6 2 ~ 1 2 1 番目のアミノ酸からなる C - フラグメント及びそれらを結合するループ領域からなる。他の哺乳動物由来の M K も、同様に分泌シグナルを除いた成熟タンパクを指すものとする。

【 0 0 2 6 】

本発明の疎水性物質付加核酸が結合する M K 上の位置は特に限定されず、例えば、M K の N - フラグメントおよび C - フラグメントが挙げられる。1 つの疎水性物質付加核酸が M K の複数の位置に対して結合活性を有していてもよい。本発明の疎水性物質付加核酸は、M K のいずれかの位置（例えば、N - フラグメント、C - フラグメント等）に結合することにより、M K の活性を阻害し得る。

10

【 0 0 2 7 】

本明細書中、疎水性物質付加核酸とは、R N A、D N A、修飾核酸又はそれらの混合物などの核酸が疎水性物質と結合したものをいう。すなわち、本発明の疎水性物質付加核酸とは、「核酸」部分と、「疎水性物質」部分とが結合した物質のことをいう。「核酸」部分と「疎水性物質」部分とは、「リンカー」部分で結合していてもよい。

【 0 0 2 8 】

本発明の疎水性物質付加核酸の、「核酸」部分を構成するヌクレオチドの種類は、疎水性物質付加核酸が M K に結合し、M K の活性を阻害する限り特に限定されず、D N A、R N A などの自体公知のヌクレオチド、修飾核酸またはそれらの混合物のいずれであってもよく、また二本鎖であっても一本鎖であってもよい。また、ヌクレオチドの配列自体も特に限定されない。なお上記「修飾核酸」とは、特に示されない限り、下記で示される「置換可能な位置で置換（修飾）されているヌクレオチド」のことをいう。

20

【 0 0 2 9 】

「核酸」部分を構成する各ヌクレオチドは、疎水性物質付加核酸が M K に結合し、M K の活性を阻害する限り、置換可能な位置でどのように置換（修飾）されているヌクレオチドであってもよいし、全く置換（修飾）されていないヌクレオチドであってもよい。置換（修飾）される場合、当業者であれば、「置換可能な位置」は明らかであるし、また置換基についても、自体公知の置換基を選択することが可能である。

30

【 0 0 3 0 】

「核酸」部分を構成するヌクレオチドのうち、置換可能な位置で置換（修飾）されているヌクレオチド（本明細書中、修飾核酸と記載する場合がある）としては、好ましくは、各ヌクレオチドが、リボース（例、ピリミジンヌクレオチドのリボース）の 2' 位がヒドロキシル基であるヌクレオチド（即ち、未置換であるヌクレオチド）、あるいはリボースの 2' 位において、ヒドロキシル基が、同一又は異なって、任意の原子又は置換基で置換されているヌクレオチドである。

上記原子又は置換基としては、例えば、水素原子、ハロゲン原子（例、フッ素原子）、- O - アルキル基（例、- O - M e 基）、- O - アシル基（例、- O - C H O 基）、アミノ基（例、- N H ₂ 基）などが挙げられる。

40

【 0 0 3 1 】

本発明の疎水性物質付加核酸の「核酸」部分は、M K に対する結合性、安定性、薬物送達性等を高めるため、さらに各ヌクレオチドの糖残基（例、リボース）が修飾されたものであってもよい。糖残基において置換可能な部位としては、2' 位以外には、例えば、糖残基の 3' 位及び / 又は 4' 位が挙げられる。また、糖残基に相当する部分は必ずしも 5 炭糖である必要はなく、6 炭糖や他の物質であってもよい。

【 0 0 3 2 】

置換（修飾）としては、各位のヒドロキシル基が、例えば、フルオロ基、O - アルキル

50

基（例、O - メチル基、O - エチル基）、O - アリル基、S - アルキル基（例、S - メチル基、S - エチル基）、S - アリル基、アミノ基（例、 $-NH_2$ ）で置換されることが挙げられる。他にも、4'位の酸素を硫黄に置換した4' - SRNA、2'位と4'位とをメチレンを介して架橋したLNA（Locked Nucleic Acid）、3'位の水酸基をアミノ基に置換した3' - N - ホスホロアミデート核酸などを例として挙げる
 ことができる。このような糖残基の置換（修飾）は、自体公知の方法により行うことができる（例えば、Sproat et al., (1991) Nucleic Acid Res. 19, 733 - 738; Cotton et al., (1991) Nucleic Acid Res. 19, 2629 - 2635; Hobbs et al., (1973) Biochemistry 12, 5138 - 5145など参照）。

10

【0033】

本発明の疎水性物質付加核酸の、「核酸」部分は、MKに対する結合性等を高めるため、核酸塩基（例、プリン、ピリミジン）がさらに置換（修飾）（例、化学的置換）されたものであってもよい。このような置換（修飾）としては、例えば、5位ピリミジン改変、6または/および8位プリン改変、環外アミンでの改変、4 - チオウリジンでの置換、5 - プロモ又は5 - ヨード - ウラシルでの置換が挙げられる。

【0034】

本発明の疎水性物質付加核酸の「核酸」部分において、当該核酸から1つ以上の塩基が置換、欠失、付加または挿入された核酸であっても、当該核酸が有する機能を保持する限り、本発明の核酸に含まれる。核酸が有する機能としては特に限定されないが、例えばMKに対する結合活性、MKの阻害活性などが挙げられる。

20

置換、欠失、付加または挿入されてよい塩基の数は特に限定されないが、通常1 ~ 数個、好ましくは1 ~ 5個、より好ましくは1 ~ 3個である。

【0035】

さらに、本発明の疎水性物質付加核酸の「核酸」部分の一部または全部からなる核酸に相補的な塩基配列を有するDNAとストリンジентな条件下でハイブリダイズしうるDNAも、当該核酸が有する機能を保持する限り、本発明のDNAに含まれる。ここで、ストリンジентな条件とは、例えば、「モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル 第2版（Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd ed.）」（T. Maniatisら編集、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー発行、1989年）に記載の条件等が挙げられる。

30

【0036】

また、ヌクレアーゼ及び加水分解などに対して耐性であるように、本発明の疎水性物質付加核酸に含まれるリン酸基がさらに置換（修飾）されていてもよい。例えば、P(O)O基（ホスホジエステル結合）の一つ以上が、P(O)H（H - ホスホネート結合）、P(O)S（ホスホロチオエート結合）、P(S)S（ホスホロジチオエート結合）、P(O)NR₂（ホスホロアミデート結合）、P(O)R、R(O)OR'、CO又はCH₂（ホルムアセタール）又は3' - アミン（ $-NH-CH_2-CH_2-$ ）で置換されていてもよい〔ここで、R、R'およびR₂はそれぞれ独立して、Hであるか、あるいは置換されているか、又は置換されていないアルキル（例、メチル、エチル）である。〕し、ポラ
 ノホスフェート結合、ホスホロセレネート結合などで置換されていてもよい。

40

上記置換（修飾）はまた、キャッピングのような3'末端及び5'末端の改変を含んでもよい。

【0037】

上記置換（修飾）はさらに、ポリエチレングリコール、アミノ酸、ペプチド、inverted dT、核酸、ヌクレオシド、Myristoyl、Lithocholic-oleyl、Docosanyl、Lauroyl、Stearoyl、Palmitoyl、Oleoyl、Linoleoyl、その他脂質、ステロイド、コレステロール、カフェイン、ビタミン、色素、蛍光物質、抗癌剤、毒素、酵素、放射性物質、ビオチンなどを「核酸」部分の3'末端または5'末端に付加することにより行うことができる。

このような改変については、例えば、米国特許第5,660,985号、同第5,75

50

6, 703号を参照することができる。

【0038】

本発明の疎水性物質付加核酸の、「核酸」部分の長さは、疎水性物質付加核酸がMKに結合し、MKの活性を阻害する限り特に限定されず、通常、1~200ヌクレオチドであり得るが、好ましくは5~100ヌクレオチドであり、より好ましくは5~60ヌクレオチドであり、さらに好ましくは10~40ヌクレオチドである。

「核酸」部分の総ヌクレオチド数が少なければ、本発明の疎水性物質付加核酸の化学合成及び大量生産がより容易となるため、コスト面でのメリットが大きい。また化学修飾も容易となり、生体内安定性も高く、毒性も低い疎水性物質付加核酸を得ることができる。一方で、「核酸」部分の総ヌクレオチド数が少なすぎると、MKの活性を阻害することができなくなる可能性がある。適切なヌクレオチド数は、当業者であれば目的に応じて適宜決定することが可能である。

【0039】

本発明の疎水性物質付加核酸の「疎水性物質」部分を構成する物質は、疎水性物質付加核酸がMKに結合し、MKの活性を阻害する限り、置換可能な位置でどのように置換（修飾）されている物質であってもよい。当業者であれば、「置換可能な位置」は明らかであるし、また置換基についても、自体公知の置換基を選択することが可能である。

【0040】

「疎水性物質」部分を構成する物質としては、例えば、ストロファンチジン、コレスタノール、ステロイドホルモン（テストステロン、エストラジオール、プロゲステロン、コルチゾール、コルチゾン、アルドステロン、コルチコステロン、デオキシコルチコステロンなど）、ステロール類（コレステロール類（例、コレステロール、コレステロールエステル、スチグマステロール、ラノステロール、エルゴステロールなど）、シトステロール、エルゴステロールなど）をはじめとしたステロイド類が挙げられ、好ましくはステロール類であり、更に好ましくはコレステロール類である。またコレステロール類は誘導体化されていてもよく、そのようなコレステロール誘導体としては、水素添加したジヒドロコレステロール、低級または高級脂肪酸とのエステル体が挙げられ、例えば、ヒドロキシステアリン酸コレステリル、オレイン酸コレステリル、イソステアリン酸コレステリル、ラノリン脂肪酸コレステリル、マカデミアナッツ油脂肪酸コレステリル、ノナン酸コレステリル、ステアリン酸コレステリル、酪酸コレステリルなどが市販されている。また、ビタミンA、ビタミンD、ビタミンE、ビタミンKなどであってもよい。

【0041】

本発明の疎水性物質付加核酸は、「核酸」部分と「疎水性物質」部分とが直接結合してなるものであってもよいし、「核酸」部分と「疎水性物質」部分とを「リンカー」部分で結合してなるものであってもよい。「核酸」部分と「疎水性物質」部分とは、当業者に公知の方法で結合することが可能である。

【0042】

本発明の疎水性物質付加核酸の、「核酸」部分と「疎水性物質」部分とを結合しうる「リンカー」部分としては、疎水性物質付加核酸がMKに結合し、MKの活性を阻害する限り特に限定されず、当業者であれば適宜決定することが可能である。このようなリンカーとしては、例えば、飽和炭化水素鎖（例、炭素数12の飽和炭化水素鎖）、ヌクレオチド鎖（例、1~約20ヌクレオチド）、非ヌクレオチド鎖（例、 $-(CH_2)_n-$ リンカー、ペプチドを含むリンカー（例、 $-Gly-Cys-$ ）、 $-S-S-$ 結合を含むリンカー（例、 $-(CH_2)_m-S-S-(CH_2)_n-$ ）、 $-CONH-$ 結合を含むリンカー（例、 $-CONH-$ 、 $-(CH_2)_m-CONH-(CH_2)_n-$ 、 $-O-CO-NH-(CH_2)_n-$ ）、 $-OPO_3-$ 結合を含むリンカー（例、 $-(CH_2)_m-O-PO_2-O-(CH_2)_n-$ ）、ポリエチレングリコールリンカー（例、ペンタエチレングリコールリンカー、ヘキサエチレングリコールリンカー）、アミダイト体（例、Spacer 9、Spacer 18）などが挙げられる（各リンカーにおけるmおよびnは、任意の整数を示す）。

10

20

30

40

50

リンカー部分は、上記で例示したリンカーを枝分かれさせて、ジメトキシトリチル基 (DMT) や蛍光物質などの機能性分子を付加したものであってもよい (これらの機能性分子は最終的に取り除かれる場合がある)。更に、トロンピン、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)、Factor X などの酵素が認識して切断することができるペプチドであつてもよいし、ヌクレアーゼや制限酵素が切断できるポリヌクレオチドであつてもよい。

【0043】

上記「飽和炭化水素鎖」としては、例えば、炭素数が3、6、12、18、24個のものが考えられる。また、枝分かれしたものであつてもよい。

【0044】

上記「ヌクレオチド鎖」としては、リボース (例、ピリミジンヌクレオチドのリボース、プリンヌクレオチドのリボース) の2'位においてヒドロキシル基を含むヌクレオチドであるか、あるいはリボースの2'位において、ヒドロキシル基が、任意の基 (例、水素原子、フッ素原子又は-O-メチル基) で置換 (修飾) されているヌクレオチド、LNA、リン酸部分が修飾されているもの、核酸塩基部分が修飾されているものなどが挙げられ、さらにそれらの組み合わせであつてもよい。リン酸、核酸塩基の修飾としては特に限定されず、当業者に公知の自体公知の修飾が挙げられる。

【0045】

「リンカー」部分と「疎水性物質」部分との結合は、特に限定されず、両部分は当業者に公知の方法で結合することが可能である。

また、「リンカー」部分と「核酸」部分との結合も、特に限定されず、両部分は当業者に公知の方法で結合することが可能である。

【0046】

本発明の疎水性物質付加核酸の「リンカー」部分および「疎水性物質」部分は、「核酸」部分の5'末端側に結合していてもよいし、3'末端側に結合していてもよい。また、「核酸」部分の5'末端および3'末端の両方に結合していてもよい。また、「核酸」部分の途中の配列の核酸塩基またはリボース、リン酸部分に結合してもよい。

【0047】

本発明の疎水性物質付加核酸は、当該技術分野における自体公知の方法により化学合成することができる。例えば、市販のコレステロールTEGホスホロアミダイト (Glen Research社製) を用いて、核酸合成機を用いて合成した核酸の5'末端にコレステロールを付加することができる。この場合、市販のアミダイト体であるSpacer 18 (Glen Research社製) などを同時に用いることで、核酸とコレステロールの間に任意のリンカーを加えることもできる。

また、市販の3'-コレステロールTEG-CPG (Glen Research社製) を用いることで、核酸の3'末端にコレステロールを付加することができる。上記と同様に、市販のアミダイト体であるSpacer 18 (Glen Research社製) などを同時に用いることで、核酸とコレステロールの間に任意のリンカーを加えることができる。

同様の手法を用いることで、途中の配列の核酸塩基やリボース、リン酸部分にコレステロールを付加することもできる。

【0048】

さらに、核酸の末端または途中にアミノ基を付加することで、合成機を用いた核酸合成の後に、コレステロールをカップリング反応により付加することが可能である。

核酸の5'末端にアミノ基を付加するには、市販の5'-amino-modified C6-TFA (Glen Research社製) などを用いることができる。

また、核酸の3'末端にアミノ基を付加するには、市販の3'-amino-modified C7-CPG (Glen Research社製) などを用いることができる。

核酸の途中にコレステロールを付加するには、核酸塩基中のアミノ基を利用したり、ピリミジンの5位やプリン6位などにアミノ基を導入することで行うことができる。また、リボースの2'位やリン酸部分にアミノ基を導入してもよい。

10

20

30

40

50

ch o l - C 1 2 - G (M) G (M) G (M) A (M) A (M) G (M) G (M) A (M) G (M) G (M) A (M) A (M) G (M) C (M) A (M) C (M) A (M) G (M) G (M) G (M) G (M) U (M) U (M) G (M) G (M) U (M) G (M) U (M) C (M) G (M) G (M) G (M) U (M) G (M) C (M) - i d T (以上、配列番号 5)、

ch o l - G (F) G (F) G (F) A (M) A (M) G (F) G (F) A (M) G (F) G (F) A (M) A (M) G (M) U (F) G (M) C (F) A (M) C (F) A G G (M) G (M) U (F) U (F) G (M) G (M) U (F) G (M) U (F) C (F) G G G U (F) G (M) C (F) A (M) C (F) - i d T および

G G G A (M) A (M) G G A (M) G G A (M) A (M) G (M) U (F) G (M) C (F) A (M) C (F) A (M) G G (M) G (M) G (M) U (F) U (F) G (M) G (M) U (F) G (M) U (F) C (F) G G G (M) U (F) G (M) C (F) A (M) C (F) - C h o l (以上、配列番号 6)、

ch o l - G G A (M) A (M) G G A (M) G G A (M) A (M) G (M) U (F) G (M) C (F) A (M) C (F) A (M) G G (M) G (M) G (M) U (F) U (F) G (M) G (M) U (F) G (M) U (F) C (F) G G G (M) U (F) G (M) C (F) A (M) C (F) - i d T、

ch o l - G G A (M) A (M) G G A (M) G G A (M) A (M) G (M) U (F) G (M) C (F) A (M) C (F) A (M) G G (M) G (M) G (M) U (F) U (F) G (M) G (M) U (F) G (M) U (F) C (F) G G G (M) U (F) G (M) C (F) A (M) C (F) - S 1 8 - P E G 4 0 k、

ch o l - G (F) G (F) A (M) A (M) G (F) G (F) A (M) G (F) G (F) A (M) A (M) G (M) U (F) G (M) C (F) A (M) C (F) A (M) G (F) G (M) G (M) G (M) U (F) U (F) G (M) G (M) U (F) G (M) U (F) C (F) G (F) G (F) G (M) U (F) G (M) C (F) A (M) C (F) - i d T、

ch o l - G G A (M) A (M) G G A (M) G G A (M) A (M) G (M) U (F) G (M) C (F) A (M) C (F) A (M) G G (M) G (M) G (M) U (F) U (F) G (M) G (M) U (F) G (M) U (F) C (F) G G G (M) U (F) G (M) C (F) A (M) C (F) - P E G 4 0 k、

ch o l - G G A (M) A (M) G G A (M) G G A (M) A (M) G (M) U (F) G (M) C (F) A (M) C (F) A (M) G G (M) G (M) G (M) U (F) U (F) G (M) G (M) U (F) G (M) U (F) C (F) G G G (M) U (F) G (M) C (F) A (M) C (F) - C 1 2 - P E G 4 0 k、および

ch o l - G (F) G (F) A (M) A (M) G (F) G (F) A (M) G (F) G (F) A (M) A (M) G (M) U (F) G (M) C (F) A (M) C (F) A (M) G (F) G (M) G (M) G (M) U (F) U (F) G (M) G (M) U (F) G (M) U (F) C (F) G (F) G (F) G (M) U (F) G (M) C (F) A (M) C (F) - C 1 2 - P E G 4 0 k (以上、配列番号 7)、

ch o l - C 1 2 - G (M) U (F) G (M) C (F) A (M) C (F) A (M) G G (M) G (M) G (M) U (F) U (F) G (M) G (M) U (F) G (M) U (F) C (F) G G G (M) U (F) G (M) C (F) A (M) C (F) - i d T (配列番号 8)

ch o l - C 1 2 - G G G A (M) G A (M) G G A (M) G A (M) A (M) G A (M) G G A (M) A (M) G U (F) G (M) C (F) A (M) C (F) A G G G G (M) U (F) U (F) G (M) G (M) U (F) G (M) U (F) C (F) G G G U (F) G (M) C (F) A (M) C (F) - i d T (配列番号 9)、ならびに

ch o l - G (M) G (M) A (M) A (M) G (M) G (M) A (M) A (M) G (M) G (M) A (M) A (M) G (M) A (M) A (M) G (M) A (M) A (M) A (M) U (M) U (M) C (M) C (M) U (M)

10

20

30

40

50

M)U(M)C(M)C(M)U(M)U(M)C(M)C(M) - i d T (配列番号 10)

が挙げられる。

【0052】

本発明はまた、MKの活性(例、MKの細胞遊走活性)を阻害することに加えて、プレイオトロフィンに対する阻害活性を有することを特徴とする疎水性物質付加核酸を提供する。

【0053】

MKノックアウトマウスおよびPTNノックアウトマウスは大きな欠陥なく成育するが、MKとPTNのダブルノックアウトマウスは胎生致死となることから、MKとPTNはその機能を相互に補完していると考えられている。また、各種癌、アルツハイマー病、骨粗鬆症、多発性硬化症のモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)マウスなどでMKとPTNの発現がともに上昇していることが知られている。従って、これらの疾患に対してはMKだけでなくPTNに対しても阻害活性を有する核酸が有用であると考えられる。

【0054】

本発明のコレステロール付加核酸はMKとPTNの両方を阻害するが、コレステロールを取り除くとMKとPTNの両方に対して阻害活性がなくなる場合がある(配列番号5、ならびに後述する表1の核酸5-1および核酸5-2参照)。この場合は、コレステロールと核酸の間にある種の酵素により切断されるペプチド配列などを入れることで、ターゲット依存的な副作用が出た場合に、コレステロールを切断してすばやく解毒することができる。また、コレステロール付加核酸はMKとPTNの両方を阻害するが、コレステロールが付加されていない核酸ではMKは阻害するがPTNは阻害しない場合がある。この場合は、コレステロールのリンカーに切断部位を含めることで、MKとPTNの両方を阻害したり、MKのみを阻害したりするよう調節することができる。このような調節は、当業者であれば容易に行うことができる。

【0055】

本発明の疎水性物質付加核酸および疎水性物質を除去した核酸におけるMKおよびPTNの阻害活性は、例えば、後記実施例に示される方法等に従って、それぞれ測定することができる。

【0056】

(2) 疎水性物質付加核酸および機能性物質を含む複合体

本発明はまた、本発明の疎水性物質付加核酸および機能性物質を含む複合体を提供する。本発明の複合体における「疎水性物質付加核酸」と「機能性物質」との間の結合は、例えば共有結合、または非共有結合であり得る。本発明の複合体は、本発明の疎水性物質付加核酸と1個以上(例、2又は3個)の同種又は異種の機能性物質とが結合したものであってもよい。

【0057】

上記「機能性物質」としては、本発明の疎水性物質付加核酸に何らかの機能を新たに付加するもの、あるいは本発明の疎水性物質付加核酸が保持し得る特性(例えば、MKへの結合活性を有すること、MKの阻害活性を有すること、PTNへの阻害活性を有すること、薬物体内動態、ヌクレアーゼ耐性など)を変化(例、増加、減少)させ得るものである限り特に限定されない。

【0058】

機能性物質としては、例えば、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、脂質、糖質、単糖、ポリヌクレオチド、ヌクレオチドが挙げられる。

他の機能性物質としては、例えば、親和性物質(例、ビオチン、ストレプトアビジン、標的相補配列に対して親和性を有するポリヌクレオチド、抗体、グルタチオンセファロース、ヒスチジン)、標識用物質(例、蛍光物質、発光物質、放射性同位体)、酵素(例、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ)、薬物送達媒体(例、リボソ-

10

20

30

40

50

ム、ミクロスフェア、ペプチド、ポリエチレングリコール類、コレステロール類)、薬物(例、カリケアマイシンやデュオカルマイシンなどミサイル療法に使用されているもの、シクロフォスファミド、メルファラン、イホスファミドまたはトロホスファミドなどのナイトロジェンマスタード類似体、チオテパなどのエチレンイミン類、カルムスチンなどのニトロソ尿素、テモゾロミドまたはダカルバジン、メトトレキセートまたはラルチトレキセドなどの葉酸類似代謝拮抗剤、チオグアニン、クラドリピンまたはフルダラピンなどのプリン類似体、フルオロウラシル、テガフルまたはゲムシタピンなどのピリミジン類似体、ピンラスチン、ピンクリスチンまたはピノレルピンなどのピンカルカロイド及びその類似体、エトポシド、タキサン、ドセタキセルまたはパクリタキセルなどのポドフィロトキシン誘導体、ドキシソルピシン、エピルピシン、イダルピシン及びミトキサントロンなどのアントラサイクリン類及び類似体、プレオマイシン、マイトマイシン、ミノマイシンなどの他の細胞毒性抗生物質、シスプラチン、カルボプラチン及びオキザリプラチンなどの白金化合物、ペントスタチン、ミルテフォシン、エストラムスチン、トポテカン、イリノテカン及びピカルタミド)、毒素(例、リシン毒素、リア毒素及びベロ毒素)などが挙げられる。

10

20

30

40

50

【0059】

「疎水性物質付加核酸」と「機能性物質」との間の結合として例示される「共有結合」としては飽和炭素鎖リンカー(例、 $-(CH_2)_n-$)、ペプチドを含むリンカー(例、 $-Gly-Cys-$)、 $-S-S-$ 結合を含むリンカー(例、 $-(CH_2)_m-S-S-(CH_2)_n-$)、 $-CONH-$ 結合を含むリンカー(例、 $-(CH_2)_m-CONH-(CH_2)_n-$)、 $-O-CO-NH-(CH_2)_n-$)、 $-OPO_3-$ 結合を含むリンカー(例、 $-(CH_2)_m-O-PO_2-O-(CH_2)_n-$)、ポリエチレングリコールリンカー(例、ヘキサエチレングリコールリンカー)などが挙げられる(各リンカーにおける記号は、上記と同様である)。これらのリンカーは、分子中の可能な位置で枝分かれしたものであってもよい。さらに、トロンピンやマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)、Factor Xなどの酵素が認識して切断することができるペプチド、ヌクレアーゼや制限酵素が切断できるポリヌクレオチドであってもよい。

【0060】

また、同様に例示される「非共有結合」としては、疎水結合、イオン結合、水素結合、キレート剤を利用した結合、ビオチンとアビジンの結合を利用した結合、抗体を利用した結合、アプタマーを利用した結合、塩基対を利用した結合などが挙げられる。

【0061】

(3)核酸をナノ粒子化する方法

本発明は、疎水性物質を結合させることを特徴とする、核酸をナノ粒子化する方法を提供する。

本明細書において、「ナノ粒子」とは、粒子径を特定するものではないが、一応の目安としてはナノ単位、具体的には約10~約1000nmの粒子径を有する粒子のことをいう。本明細書における「ナノ粒子化」とは、核酸分子を約10~約1000nmの粒子径を有する複数の核酸分子の集合体へと成長させることをいう。本発明のナノ粒子は、核酸に疎水性物質を結合させることで製造される。具体的には、本発明のナノ粒子は、疎水性物質が結合した核酸分子が集合して形成されるものである。

【0062】

本発明の核酸をナノ粒子化する方法において、核酸へ疎水性物質を結合させる方法としては、上記(1)記載の「疎水性物質付加核酸」の製造と同様の方法が挙げられる。また核酸が結合する「疎水性物質」としては、上記(1)記載の疎水性物質と同様のものが挙げられるが、好ましくはコレステロールである。

【0063】

本発明の核酸をナノ粒子化する方法において、疎水性物質が結合する「核酸」としては特に限定されず、自体公知の核酸、例えばアプタマー、siRNA、アンチセンス核酸、デコイ核酸など、それ自体有用な生理活性を有する種々の核酸分子を適用することが可能

であるが、好ましくは上記(1)記載の核酸と同様のものを挙げることができる。

当該核酸の塩基数としては、塩基数5~100の核酸が好ましく、塩基数10~50の核酸がより好ましく、塩基数15~45の核酸が最も好ましい。

【0064】

本発明の核酸をナノ粒子化する方法としては、核酸に疎水性物質を結合させることを特徴とするものの、それ以外の手法としては特に限定されない。従ってそれ以外の手法については、自体公知の方法を適用することが可能である。

【0065】

本発明の核酸をナノ粒子化する方法としては、好ましくは、

(a) 核酸に疎水性物質を結合させる工程；

10

(b) (a)で得られた疎水性物質付加核酸を、中性塩溶液に溶解させる工程；

を含んでなる方法が挙げられる。以下、各工程について説明する。

【0066】

(a) 核酸に疎水性物質を結合させる工程

本工程は、核酸分子に疎水性物質を結合させる工程である。核酸へ疎水性物質を結合させる方法としては、上記(1)記載の「疎水性物質付加核酸」の製造と同様の方法が挙げられる。また疎水性物質としては、上記(1)記載の疎水性物質が挙げられ、好ましくはコレステロールである。また疎水性物質が結合する「核酸」としては特に限定されず、自体公知の核酸、例えばアプタマー、siRNA、アンチセンス核酸、デコイ核酸など、それ自体有用な生理活性を有する種々の核酸分子を適用することが可能であるが、好ましくは上記(1)記載の核酸や、国際公開W02008/059877に記載のアプタマーと同様のものを挙げることができる。

20

【0067】

(b) 疎水性物質付加核酸を溶解させる工程

本工程は、上記(a)で得られた疎水性物質付加核酸を、中性塩溶液に溶解させる工程である。

本工程における「中性塩溶液」の「中性塩」としては、例えば、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、塩化カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸カルシウム、炭酸マグネシウム、硫酸ナトリウム、硫酸カリウム、硫酸カルシウム、硫酸マグネシウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウムなどが挙げられる。なかでも塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウムが好ましく、塩化ナトリウムが特に好ましい。

30

【0068】

また「中性塩」を溶解する溶液としては、疎水性物質付加核酸が溶解して、核酸ナノ粒子を形成する反応が進行する限り特に限定されず、水、生理食塩水、アルコール(例、メタノール、エタノール)などが挙げられる。溶液中の疎水性物質付加核酸の濃度は、疎水性物質付加核酸が溶解して、核酸ナノ粒子を形成する反応が進行する限り特に限定されず、通常、0.1mg/ml~100mg/mlであり、好ましくは0.1mg/ml~10mg/mlである。疎水性物質付加核酸の濃度が0.1mg/mlより少ないと、核酸分子が集合し難くナノ粒子が適切に製造されず、一方で疎水性物質付加核酸の濃度が100mg/mlより大きいと、核酸濃度が大きすぎてゲル化するので、適度な大きさのナノ粒子が製造されない。

40

溶液中の中性塩濃度については、疎水性物質付加核酸が溶解して、核酸ナノ粒子を形成する反応が進行する限り特に限定されず、通常、1mM~1Mであり、好ましくは10mM~300mMである。

【0069】

本工程の溶解に際しては、単に疎水性物質付加核酸を中性塩溶液に加えて溶解すれば足りるが、疎水性物質付加核酸が溶解して核酸ナノ粒子を形成する反応が進行する限り攪拌等の追加の操作を加えても構わない。また当該溶液はその後静置することで核酸ナノ粒子を製造せしめるが、当該静置時間としては特に限定されず、通常、1時間~96時間、好ましくは1時間~48時間、より好ましくは1時間~24時間である。

50

本工程では中性塩溶液に疎水性物質付加核酸を、好ましくは0.1mg/ml~10mg/mlの濃度で溶解した後に、その後好ましくは加熱することで、核酸ナノ粒子の形成を促進することができる。溶解する際の温度としては特に限定されないが、通常、0~100であり、好ましくは10~40の室温である。また加熱する際の温度も特に限定されないが、通常50~100、好ましくは60~90である。また50~100、好ましくは60~90の温度で溶解と加熱を同時に行ってもよい。

【0070】

(4) 核酸の体内薬物動態を向上させる方法

本発明の方法により得られる核酸ナノ粒子は、ナノ粒子化していない核酸が有する生理活性を維持しているだけでなく、その体内薬物動態を著しく向上させている点で有用である。即ち本発明は、疎水性物質を結合させることを特徴とする、核酸の体内薬物動態を向上させる方法を提供する。本明細書中、「体内薬物動態を向上させる」とは、薬物などとして体内に投与される物質の血中安定性を向上させることをいう。即ち本発明により、体内に投与された核酸の血中安定性を高めることができる。体内薬物動態を向上させる対象としては特に限定されない。

核酸への疎水性物質の結合については、上記(3)記載の通りである。また核酸分子のナノ粒子化の方法についても、上記(3)記載の通りである。

本発明の方法における「核酸」としては、上記(1)記載の核酸が挙げられる。当該核酸に疎水性物質を結合させて核酸ナノ粒子化することで、当該核酸の血中安定性が向上して血液中における滞留時間が著しく増大することから、MKへの阻害効果を維持することが可能となる。

【0071】

なお上記したとおり、本発明は生理活性を有するコレステロール付加核酸そのものをナノ粒子化することで体内薬物動態を向上させるものである。本発明のナノ粒子はそれ自身が生理活性を有する。これは、前記したリポソームのような他のデリバリー剤を使用するものとは異なる。リポソームのような他のデリバリー剤を使用する場合は、原薬そのものの安定性と有効性を確認するだけでなく、それらのデリバリー剤の安全性と有効性も別途確認する必要があり、臨床試験において多大な費用と時間を要することになる。

本発明のコレステロール付加核酸から得られる核酸ナノ粒子は原薬そのものであるため、医薬開発において、時間の短縮、費用の削減につながる。またリポソームに封入した薬剤はリポソームから徐放されて初めて薬効を示すが、本発明の核酸ナノ粒子はそのものが薬効を示すので、即効性が高い点でも有用である。

【0072】

(5) 生理活性を有する核酸をナノ粒子化して体内薬物動態を向上させる方法

リポソームは球形の殻状であり、その中に薬物を封入して体内に投与することで、薬物を目的の疾患部位に到達させるデリバリー剤である。一方、本発明はそのようなデリバリー剤を必要とせず、生理活性(薬物活性)を有する核酸そのものをナノ粒子化することで、当該核酸の血中安定性を向上させるものである。疎水性物質付加核酸はナノ粒子化してもその生理活性を維持しているので、ナノ粒子そのものを薬剤として働かせることが可能である。

核酸への疎水性物質の結合については、上記(3)記載の通りである。また核酸分子のナノ粒子化の方法についても、上記(3)記載の通りである。

本発明の方法における「核酸」としては、上記(1)記載の核酸が挙げられる。当該核酸に疎水性物質を結合させて核酸ナノ粒子化することで、体内薬物動態を向上させることができ、結果として効果の高い医薬を提供することができる。ここで「生理活性を有する核酸」が有する「生理活性」としては特に限定されず、核酸が有する活性およびそれにより生じる生理活性、薬物活性、副作用などとして報告される全ての活性が挙げられるが、例えば上記(1)記載の核酸の場合は、MKの阻害活性、調節性T細胞の増殖活性などを好ましい例として挙げるができる。

【0073】

10

20

30

40

50

(6) 疎水性物質付加核酸等を含有してなる医薬

本発明の疎水性物質付加核酸、複合体、および核酸ナノ粒子は、医薬として使用される。特に本発明の核酸ナノ粒子は、前記したとおり、ナノ粒子そのものが薬剤として働くので、当該医薬の有効成分としても極めて有用である。すなわち本発明は、本発明の疎水性物質付加核酸、複合体、または核酸ナノ粒子（好ましくは、本発明の疎水性物質付加核酸を用いて製造した核酸ナノ粒子）を含む、医薬を提供する。

疎水性物質付加核酸の生理活性により、その医薬としての具体的用途は異なるが、例えば、当該医薬が、本発明のミッドカインに結合してその活性を阻害することを特徴とする疎水性物質付加核酸のときは、細胞遊走の阻害剤、調節性T細胞の増殖促進剤、調節性T細胞の阻害機能促進剤、アポトーシス阻害抑制剤、細胞増殖阻害剤、細胞分化阻害剤などが挙げられる。

10

【0074】

具体的には、自己免疫疾患（例、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス（SLE）、シェーグレン症候群、多発性筋炎（PM）、皮膚筋炎（DM）、リウマチ性関節炎（慢性関節リウマチ（RA）、変形性関節症（OA）など）、炎症性腸炎（クローン病など）、進行性全身性硬化症（PSS）、結節性動脈周囲炎（PN）、甲状腺疾患（バセドウ病など）、ギラン・バレー症候群、原発性胆汁性肝硬変（PBC）、特発性血小板減少性紫斑病、自己免疫溶血性貧血、重症筋無力症（MG）、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、I型糖尿病、乾癬、喘息、好中球機能異常など）、癌（例、食道癌、甲状腺癌、膀胱癌、大腸癌、胃癌、膵臓癌、胸部癌、肝臓癌、肺癌、乳癌、神経芽細胞腫、ニューログラストーマ、グリオブラストーマ、子宮癌、卵巣癌、ウィルムス腫瘍、前立腺癌など）、術後癒着、子宮内膜症、移植時の拒絶反応、アレルギー、血管再建術後再狭窄、心臓冠動脈血管閉塞性疾患、脳血管閉塞性疾患、腎血管閉塞性疾患、末梢血管閉塞性疾患、動脈硬化、脳梗塞などの種々の疾患の予防又は治療に使用され得る。

20

【0075】

特に、MKの細胞遊走活性を阻害することから、多発性硬化症、術後癒着、子宮内膜症、慢性関節リウマチ、血管狭窄、腎炎の予防又は治療に有用である。また、制御性T細胞の増殖活性から、特に多発性硬化症の予防又は治療に有用である。

【0076】

本発明の医薬は、医薬上許容される担体が配合されたものであってもよい。医薬上許容される担体としては、例えば、ショ糖、デンプン、マンニット、ソルビット、乳糖、グルコース、セルロース、タルク、リン酸カルシウム、炭酸カルシウム等の賦形剤、セルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリプロピルピロリドン、ゼラチン、アラビアゴム、ポリエチレングリコール、ショ糖、デンプン等の結合剤、デンプン、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルスターチ、ナトリウム・グリコール・スターチ、炭酸水素ナトリウム、リン酸カルシウム、クエン酸カルシウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、エアロジル、タルク、ラウリル硫酸ナトリウム等の滑剤、クエン酸、メントール、グリチルリチン・アンモニウム塩、グリシン、オレンジ粉等の芳香剤、安息香酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、メチルパラベン、プロピルパラベン等の保存剤、クエン酸、クエン酸ナトリウム、酢酸等の安定剤、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ステアリン酸アルミニウム等の懸濁剤、界面活性剤等の分散剤、水、生理食塩水、オレンジジュース等の希釈剤、カカオ脂、ポリエチレングリコール、白灯油等のベースワックスなどが挙げられるが、それらに限定されるものではない。

30

40

【0077】

本発明の医薬は、経口投与に好適な製剤であってもよい。経口投与に好適な製剤としては、水、生理食塩水、オレンジジュースのような希釈液に有効量のリガンドを溶解させた液剤、有効量のリガンドを固体や顆粒として含んでいるカプセル剤、サッシェ剤又は錠剤、適当な分散媒中に有効量の有効成分を懸濁させた懸濁液剤、有効量の有効成分を溶解させた溶液を適当な分散媒中に分散させ乳化させた乳剤等が挙げられる。

【0078】

50

また、本発明の医薬は必要により、味のマスクング、腸溶性あるいは持続性などの目的のため、自体公知の方法でコーティングすることができる。コーティングに用いられるコーティング剤としては、例えば、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリオキシエチレングリコール、ツイーン 80、ブルニック F 68、セルロースアセテートフタレート、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、ヒドロキシメチルセルロースアセテートサクシネート、オイドラギット（ローム社製、ドイツ、メタアクリル酸・アクリル酸共重合体）および色素（例、ベンガラ、二酸化チタンなど）などが用いられる。また本発明の医薬は、特に持続性の目的のため、徐放剤と共に使用することができる。徐放剤の基材としては、例えば、リポソーム、アテロコラーゲン、ゼラチン、ヒドロキシアパタイト、P L G A、多糖シゾフィランなどが挙げられる。

10

本発明の医薬は、速放性製剤、徐放性製剤のいずれであってもよい。

【0079】

非経口的な投与（例えば、静脈内投与、皮下投与、筋肉内投与、局所投与、腹腔内投与、経鼻投与、経肺投与など）に好適な製剤としては、水性及び非水性の等張な無菌の注射液剤が挙げられ、これには抗酸化剤、緩衝液、制菌剤、等張化剤等が含まれていてもよい。また、水性及び非水性の無菌の懸濁液剤も挙げることができ、これには懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定化剤、防腐剤等が含まれていてもよい。当該製剤は、アンプルやバイアルのように単位投与量あるいは複数回投与量ずつ容器に封入することができる。また、有効成分及び医薬上許容される担体を凍結乾燥し、使用直前に適当な無菌の溶媒に溶解又は懸濁すればよい状態で保存することもできる。更に注射液剤以外にも、吸入剤、軟膏剤も可能である。吸入剤の場合、凍結乾燥状態の有効成分を微細化し適当な吸入デバイスを用いて吸入投与する。吸入剤には、更に必要に応じて従来より使用されている界面活性剤、油、調味料、シクロデキストリンまたはその誘導体等を適宜配合することができる。

20

【0080】

界面活性剤としては、例えばオレイン酸、レシチン、ジエチレングリコールジオレエート、テトラヒドロフルフリルオレエート、エチルオレエート、イソプロピルミリステート、グリセリルトリオレエート、グリセリルモノラウレート、グリセリルモノオレエート、グリセリルモノステアレート、グリセリルモノリシノエート、セチルアルコール、ステアリルアルコール、ポリエチレングリコール 400、セチルピリジニウムクロリド、ソルビタントリオレエート（商品名スパン 85）、ソルビタンモノオレエート（商品名スパン 80）、ソルビタンモノラウエート（商品名スパン 20）、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油（商品名 HCO - 60）、ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート（商品名ツイーン 20）、ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノオレエート（商品名ツイーン 80）、天然資源由来のレシチン（商品名エピクロン）、オレイルポリオキシエチレン（2）エーテル（商品名ブリジ 92）、ステアリルポリオキシエチレン（2）エーテル（商品名ブリジ 72）、ラウリルポリオキシエチレン（4）エーテル（商品名ブリジ 30）、オレイルポリオキシエチレン（2）エーテル（商品名ゲナボル 0 - 020）、オキシエチレンとオキシプロピレンとのブロック共重合体（商品名シンペロニック）等が挙げられる。油としては、例えばトウモロコシ油、オリーブ油、綿実油、ヒマワリ油等が挙げられる。また、軟膏剤の場合、適当な医薬上許容される基剤（黄色ワセリン、白色ワセリン、パラフィン、プラスチックベース、シリコン、白色軟膏、ミツロウ、豚油、植物油、親水軟膏、親水ワセリン、精製ラノリン、加水ラノリン、吸水軟膏、親水プラスチックベース、マクロゴール軟膏等）を用い、有効成分と混合し製剤化し使用する。

30

40

【0081】

吸入剤は常法に従って製造することができる。すなわち、上記本発明のアプタマー及び複合体を粉末または液状にして、吸入噴射剤および/または担体中に配合し、適当な吸入容器に充填することにより製造することができる。また上記本発明のアプタマー及び複合体が粉末の場合は通常の機械的粉末吸入器を、液状の場合はネブライザー等の吸入器をそれぞれ使用することもできる。ここで噴射剤としては従来公知のものを広く使用でき、フ

50

ロン - 1 1、フロン - 1 2、フロン - 2 1、フロン - 2 2、フロン - 1 1 3、フロン - 1 1 4、フロン - 1 2 3、フロン - 1 4 2 c、フロン - 1 3 4 a、フロン - 2 2 7、フロン - C 3 1 8、1, 1, 1, 2 - テトラフルオロエタン等のフロン系化合物、プロパン、イソブタン、n - ブタン等の炭化水素類、ジエチルエーテル等のエーテル類、窒素ガス、炭酸ガス等の圧縮ガス等を例示できる。

【0082】

本発明の医薬における本発明の疎水性物質付加核酸の濃度は、特に制限されないが、濃度を上げることで該核酸の多量体を形成することができる。多量体を形成すると、ヌクレアーゼ耐性が向上したり、排泄が抑制されたりし得る点で有利である。また当該多量体は、濃度を下げて加熱することで容易に単量体にすることができるので、高濃度の多量体として製剤化した後で、目的に応じて、用時希釈および加熱を行うことで単量体として用いてもよい。また本発明の医薬における本発明の核酸ナノ粒子の濃度も特に制限されない。本発明の疎水性物質付加核酸または核酸ナノ粒子（好ましくは、本発明の疎水性物質付加核酸を用いて製造した核酸ナノ粒子）の多量体および単量体は、ともに細胞遊走阻害活性を有している。

10

【0083】

本発明の医薬の投与量は、有効成分の種類・活性、製剤自体の特性（腸溶性、持続性、徐放性など）、病気の重篤度、投与対象となる動物種、投与対象の薬物受容性、体重、年齢等によって異なるが、通常、成人1日あたり有効成分量として約0.0001～約100mg/kg、例えば約0.0001～約10mg/kg、好ましくは約0.005～約1mg/kgであり得る。

20

【0084】

本発明の疎水性物質付加核酸、複合体および核酸ナノ粒子（好ましくは、本発明の疎水性物質付加核酸を用いて製造した核酸ナノ粒子）はまた、試薬（例、診断薬、検査薬など。実験用試薬を含む。）として使用され得る。すなわち本発明は、本発明の疎水性物質付加核酸、複合体または核酸ナノ粒子（好ましくは、本発明の疎水性物質付加核酸を用いて製造した核酸ナノ粒子）を含む、試薬を提供する。

【0085】

当該試薬としては、上記した本発明の疎水性物質付加核酸、複合体または核酸ナノ粒子（好ましくは、本発明の疎水性物質付加核酸を用いて製造した核酸ナノ粒子）が有する機能を利用したものである限り特に限定されない。当該試薬に係る用途としては、上記核酸、複合体または核酸ナノ粒子に係る用途であって、当該分野の当業者に公知の用途が広く適用される。

30

【0086】

当該試薬が、MKに結合してその活性を阻害することを特徴とするものであるときは、当該試薬の用途として好ましくは、実験用試薬（例、細胞遊走阻害剤、調節性T細胞の増殖促進剤、調節性T細胞の抑制機能促進剤、アポトーシス阻害抑制剤、細胞増殖阻害剤、細胞分化阻害剤、インビボイメージング用プローブ、MKの血中濃度測定用プローブ、組織染色用プローブ、ELISA用プローブ、MKおよびPTNの精製用分離剤のリガンドなど）、診断薬（例、インビボ診断薬、MKの血中濃度測定薬、組織染色薬、ELISA用診断薬など）、および標識剤（例、インビボ標識剤、組織染色用標識剤、ELISA用標識剤など）などが挙げられる。

40

上記の本発明の疎水性物質付加核酸、複合体および核酸ナノ粒子（好ましくは、本発明の疎水性物質付加核酸を用いて製造した核酸ナノ粒子）の用途として、より好ましくは調節性T細胞の増殖促進剤、細胞遊走阻害剤、抗癌剤、診断薬、または標識剤としての用途が挙げられる。すなわち本発明は、上記疎水性物質付加核酸、複合体または核酸ナノ粒子（好ましくは、本発明の疎水性物質付加核酸を用いて製造した核酸ナノ粒子）を含む、調節性T細胞の増殖促進剤、細胞遊走阻害剤、抗癌剤、診断薬あるいは標識剤を提供する。

【0087】

本発明の試薬の使用量は、当業者であれば適宜決定することが可能である。

50

【0088】

本発明はまた、本発明の疎水性物質付加核酸、複合体および核酸ナノ粒子（好ましくは、本発明の疎水性物質付加核酸を用いて製造した核酸ナノ粒子）が固定化された固相担体を提供する。固相担体としては、例えば、基板、樹脂、プレート（例、マルチウェルプレート）、フィルター、カートリッジ、カラム、多孔質材が挙げられる。

上記基板としては、DNAチップやプロテインチップなどに使われているものなどであって、例えば、ニッケル-PTFE（ポリテトラフルオロエチレン）基板やガラス基板、アパタイト基板、シリコン基板、アルミナ基板などが挙げられ、さらにこれらの基板にポリマーなどのコーティングを施したものも含まれる。

上記樹脂としては、例えば、アガロース粒子、シリカ粒子、アクリルアミドとN,N'-メチレンビスアクリルアミドの共重合体、ポリスチレン架橋ジビニルベンゼン粒子、デキストランをエピクロロヒドリンで架橋した粒子、セルロースファイバー、アシルデキストランとN,N'-メチレンビスアクリルアミドの架橋ポリマー、単分散系合成ポリマー、単分散系親水性ポリマー、セファロース、トヨパールなどが挙げられ、また、これらの樹脂に各種官能基を結合させた樹脂も含まれる。本発明の固相担体は、例えば、MKおよびPTNの精製、及びMKおよびPTNの検出、定量に有用であり得る。

【0089】

本発明の疎水性物質付加核酸、複合体および核酸ナノ粒子は、自体公知の方法により固相担体に固定できる。例えば、親和性物質（例、上述したもの）や所定の官能基を本発明の疎水性物質付加核酸、複合体および核酸ナノ粒子に導入し、次いで当該親和性物質や所定の官能基を利用して固相担体に固定化する方法が挙げられる。本発明はまた、このような方法を提供する。所定の官能基は、カップリング反応に供することが可能な官能基であり得、例えば、アミノ基、チオール基、ヒドロキシル基、カルボキシル基が挙げられる。また、ビオチン-ストレプトアビジンの結合、GSTタグ、Flagタグ、ヒスチジンタグ、抗体を利用した結合、核酸のハイブリダイゼーションなどを利用することができる。本発明はまた、このような官能基が導入された疎水性物質付加核酸および核酸ナノ粒子を提供する。

【0090】

本発明はまた、MKおよびPTNの精製及び濃縮方法を提供する。本発明の精製及び濃縮方法は、本発明の固相担体にMKを吸着させ、吸着したMKを溶出液により溶出させる工程を含んでいてもよい。本発明の固相担体へのMKの吸着は自体公知の方法により行うことができる。例えば、MKを含有する試料（例、細菌又は細胞の培養物又は培養上清、血液）を、本発明の固相担体又はその含有物に導入することによりなされる。MKの溶出は、中性溶液等の溶出液を用いて行うことができる。中性溶液としては特に限定されないが、当該溶液のpHとしては、例えばpH約6～約9、好ましくは約6.5～約8.5、より好ましくは約7～約8である。中性溶液はまた、例えば、カリウム塩（例、NaCl、KCl）、マグネシウム塩（例、MgCl₂）、表面活性剤（例、Tween 20、Triton、NP40など）、グリセリン、キレート剤（例、EDTA）、尿素、有機溶媒などから選ばれる一つ以上の物質を含むものであり得る。

本発明の精製及び濃縮方法はさらに、MKの吸着後、洗浄液を用いて固相担体を洗浄する工程を含んでいてもよい。当該洗浄液としては、例えば、尿素、キレート剤（例、EDTA）、Tris、酸、アルカリを含むものなどが挙げられる。本発明の精製及び濃縮方法はさらに、固相担体を加熱処理する工程を含んでいてもよい。かかる工程により、固相担体の再生、滅菌が可能である。

【0091】

本発明はまた、MKおよびPTNの検出または定量方法を提供する。本発明の検出または定量方法は、本発明の疎水性物質付加核酸、複合体または核酸ナノ粒子（好ましくは、本発明の疎水性物質付加核酸を用いて製造した核酸ナノ粒子）を用いることを特徴とする、MKを検出する方法またはMKを定量する方法である。MKの検出及び定量方法は、抗体の代わりに本発明の疎水性物質付加核酸、複合体または核酸ナノ粒子を用いること以外

グリコール鎖とアミド結合で結ばれている。

【0098】

核酸2

cho1 - C (M) C (M) U (M) U (M) C (M) C (M) U (M) U (M) C (M)
) C (M) U (M) U (M) C (M) C (M) U (M) U (M) C (M) C (M) U (M)
) U (M) C (M) C (M) U (M) (配列番号2)

【0099】

本コレステロール付加核酸はCとUの繰返し配列からなる23ヌクレオチドの核酸で、5'末端にコレステロールが付加されたものである。ヌクレオチドはリボースの2'位がO-メチル基で修飾されている。また、コレステロールと核酸とは、5つのポリエチレングリコール鎖とアミド結合で結ばれている。

10

【0100】

核酸3

cho1 - G (M) C (M) A (M) C (M) A (M) G (M) G (M) G (M) G (M)
) U (M) U (M) G (M) G (M) U (M) G (M) U (M) C (M) G (M) G (M)
) G (M) U (M) G (M) C (M) (配列番号3)

【0101】

本コレステロール付加核酸はA、G、C、Uからなる23ヌクレオチドの核酸で、5'末端にコレステロールが付加されたものである。ヌクレオチドはリボースの2'位がO-メチル基で修飾されている。また、コレステロールと核酸とは、5つのポリエチレングリ

20

【0102】

核酸3 - 1

cho1 - G (M) C (M) A (M) C (M) A (M) G (M) G (M) G (M) G (M)
) U (M) U (M) G (M) G (M) U (M) G (M) U (M) C (M) G (M) G (M)
) G (M) U (M) G (M) C (M) - i d T (配列番号3)

【0103】

本コレステロール付加核酸は核酸3で表される核酸の改変体で、3'末端がidT修飾してある。

【0104】

核酸3 - 2

cho1 - C12 - G (M) C (M) A (M) C (M) A (M) G (M) G (M) G (M) G (M)
) G (M) U (M) U (M) G (M) G (M) U (M) G (M) U (M) C (M) G (M)
) G (M) G (M) U (M) G (M) C (M) - i d T (配列番号3)

【0105】

本コレステロール付加核酸は核酸3で表される核酸の改変体で、コレステロールと核酸とを、炭素数12の飽和炭化水素鎖、5つのポリエチレングリコール鎖、アミド結合で結んだものである。また、3'末端がidT修飾してある。

30

【0106】

核酸3 - 3

cho1 - G (H) C (H) A (H) C (H) A (H) G (H) G (H) G (H) G (H)
) U (H) U (H) G (H) G (H) U (H) G (H) U (H) C (H) G (H) G (H)
) G (H) U (H) G (H) C (H) (配列番号3)

【0107】

本コレステロール付加核酸は核酸3の改変体で、ヌクレオチドがデオキシリボヌクレオチドである核酸である。

40

【0108】

核酸3 - 4

G (M) C (M) A (M) C (M) A (M) G (M) G (M) G (M) G (M) U (M)
 U (M) G (M) G (M) U (M) G (M) U (M) C (M) G (M) G (M) G (M)

50

U (M) G (M) C (M) - c h o l (配列番号 3)

【 0 1 0 9 】

本コレステロール付加核酸は核酸 3 の改変体で、コレステロールが 3 ' 末端に付加されたものである。

【 0 1 1 0 】

核酸 4

c h o l - C 1 2 - U (M) U (M) G (M) G (M) U (M) G (M) U (M) - i d T (配列番号 4)

【 0 1 1 1 】

本コレステロール付加核酸は G と U からなる 7 ヌクレオチドの核酸で、5 ' 末端にコレステロール、3 ' 末端に i d T が付加されたものである。ヌクレオチドはリボースの 2 ' 位が O - メチル基で修飾されている。また、コレステロールと核酸は炭素数 1 2 の飽和炭化水素鎖、5 つのポリエチレングリコール鎖、アミド結合で結ばれている。

10

【 0 1 1 2 】

核酸 5

c h o l - G (M) G (M) G (M) A (M) A (M) G (M) G (M) A (M) G (M) G (M) A (M) A (M) G (M) C (M) A (M) C (M) A (M) G (M) G (M) G (M) G (M) U (M) U (M) G (M) G (M) U (M) G (M) U (M) C (M) G (M) G (M) G (M) U (M) G (M) C (M) - i d T (配列番号 5)

【 0 1 1 3 】

本コレステロール付加核酸は A、G、C、U からなる 3 5 ヌクレオチドの核酸で、5 ' 末端にコレステロール、3 ' 末端に i d T が付加されたものである。ヌクレオチドはリボースの 2 ' 位が O - メチル基で修飾されている。また、コレステロールと核酸は 5 つのポリエチレングリコール鎖とアミド結合で結ばれている。

20

【 0 1 1 4 】

核酸 5 - 1

c h o l - C 1 2 - G (M) G (M) G (M) A (M) A (M) G (M) G (M) A (M) G (M) G (M) A (M) A (M) G (M) C (M) A (M) C (M) A (M) G (M) G (M) G (M) G (M) U (M) U (M) G (M) G (M) U (M) G (M) U (M) C (M) G (M) G (M) G (M) U (M) G (M) C (M) - i d T (配列番号 5)

【 0 1 1 5 】

本コレステロール付加核酸は核酸 5 の改変体で、コレステロールと核酸とを、炭素数 1 2 の飽和炭化水素鎖と 5 つのポリエチレングリコール鎖とを介してアミド結合で結んだものである。

30

【 0 1 1 6 】

核酸 5 - 2

i d T - G (M) G (M) G (M) A (M) A (M) G (M) G (M) A (M) G (M) G (M) A (M) A (M) G (M) C (M) A (M) C (M) A (M) G (M) G (M) G (M) G (M) U (M) U (M) G (M) G (M) U (M) G (M) U (M) C (M) G (M) G (M) G (M) U (M) G (M) C (M) - i d T (配列番号 5)

【 0 1 1 7 】

本コレステロール付加核酸は核酸 5 の改変体で、コレステロールの代わりに i d T を付加したものである。

40

【 0 1 1 8 】

核酸 5 - 3

G G G A A G G A G G A A G C (F) A C (F) A G G G G U (F) U (F) G G U (F) G U (F) C (F) G G G U (F) G C (F) (配列番号 5)

【 0 1 1 9 】

本コレステロール付加核酸は核酸 5 の改変体で、両末端の修飾を取除いたものである。G と A はリボヌクレオチドであり C と U はリボースの 2 ' 位が F で修飾されているもので

50

ある。

【0120】

核酸6

cho1 - G (F) G (F) G (F) A (M) A (M) G (F) G (F) A (M) G (F)
G (F) A (M) A (M) G (M) U (F) G (M) C (F) A (M) C (F) A G G
G (M) G (M) U (F) U (F) G (M) G (M) U (F) G (M) U (F) C (F)
G G G U (F) G (M) C (F) A (M) C (F) - i d T (配列番号6)

【0121】

本コレステロール付加核酸はA、G、C、Uからなる39ヌクレオチドの核酸で、5'末端にコレステロール、3'末端にidTが付加されたものである。ヌクレオチドはリボースの2'位がフルオロ基およびO-メチル基で修飾されているものと未修飾のものが混在している。

10

【0122】

核酸6-1

G G G A (M) A (M) G G A (M) G G A (M) A (M) G (M) U (F) G (M) C
(F) A (M) C (F) A (M) G G (M) G (M) G (M) U (F) U (F) G (M)
G (M) U (F) G (M) U (F) C (F) G G G (M) U (F) G (M) C (F) A (M)
C (F) - C h o 1 (配列番号6)

【0123】

本コレステロール付加核酸は核酸6の改変体で、コレステロールを3'末端に付加し、リボースの2'位の修飾を変えたものである。

20

【0124】

核酸6-2

P E G 4 0 k - C 6 - G G G A (M) A (M) G G A (M) G G A (M) A (M) G (M)
U (F) G (M) C (F) A (M) C (F) A (M) G G (M) G (M) G (M) U (F)
U (F) G (M) G (M) U (F) G (M) U (F) C (F) G G G (M) U (F)
G (M) C (F) A (M) C (F) - i d T (配列番号6)

【0125】

本核酸は核酸6-1の改変体で、コレステロールを除去して、5'末端にC6のリンカーをはさんで40kDaのPEGを、3'末端にidTを付加したものである。

30

【0126】

核酸6-3

P E G 4 0 k - C 1 2 - G G G A (M) A (M) G G A (M) G G A (M) A (M) G (M)
U (F) G (M) C (F) A (M) C (F) A (M) G G (M) G (M) G (M) U (F)
U (F) G (M) G (M) U (F) G (M) U (F) C (F) G G G (M) U (F)
G (M) C (F) A (M) C (F) - i d T (配列番号6)

【0127】

本核酸は核酸6-1の改変体で、コレステロールを除去して、5'末端にC12のリンカーをはさんで40kDaのPEGを、3'末端にidTを付加したものである。

40

【0128】

核酸6-4

S 1 8 - G G G A (M) A (M) G G A (M) G G A (M) A (M) G (M) U (F) G
(M) C (F) A (M) C (F) A (M) G G (M) G (M) G (M) U (F) U (F)
G (M) G (M) U (F) G (M) U (F) C (F) G G G (M) U (F) G (M) C (F)
A (M) C (F) - i d T (配列番号6)

【0129】

本核酸は核酸6-1の改変体で、コレステロールを除去して、5'末端にS18を、3'末端にidTを付加したものである。

【0130】

核酸7

50

cho1 - G G A (M) A (M) G G A (M) G G A (M) A (M) G (M) U (F) G
(M) C (F) A (M) C (F) A (M) G G (M) G (M) G (M) U (F) U (F)
G (M) G (M) U (F) G (M) U (F) C (F) G G G (M) U (F) G (M) C (F)
A (M) C (F) - i d T (配列番号 7)

【 0 1 3 1 】

本コレステロール付加核酸は核酸 6 の改変体で、5' 末端の G を取り除き、リボースの 2' 位の修飾を変化させたものである。

【 0 1 3 2 】

核酸 7 - 1

cho1 - G G A (M) A (M) G G A (M) G G A (M) A (M) G (M) U (F) G
(M) C (F) A (M) C (F) A (M) G G (M) G (M) G (M) U (F) U (F)
G (M) G (M) U (F) G (M) U (F) C (F) G G G (M) U (F) G (M) C (F)
A (M) C (F) - S 1 8 - P E G 4 0 k (配列番号 7)

10

【 0 1 3 3 】

本コレステロール付加核酸は核酸 7 の改変体で、3' 末端の i d T を取り除き、代わりに S p a c e r 1 8 をはさんで 4 0 K D a の枝分かれしたポリエチレングリコールを付加したものである。

【 0 1 3 4 】

核酸 7 - 2

cho1 - G (F) G (F) A (M) A (M) G (F) G (F) A (M) G (F) G (F)
(F) A (M) A (M) G (M) U (F) G (M) C (F) A (M) C (F) A (M) G (F)
) G (M) G (M) G (M) U (F) U (F) G (M) G (M) U (F) G (M) U (F)
) C (F) G (F) G (F) G (M) U (F) G (M) C (F) A (M) C (F) - i d
T (配列番号 7)

20

【 0 1 3 5 】

本コレステロール付加核酸は核酸 7 の改変体で、リボースの 2' 位の修飾を変えたものである。

【 0 1 3 6 】

核酸 7 - 3

G (F) G (F) A (M) A (M) G (F) G (F) A (M) G (F) G (F) A (M)
A (M) G (M) U (F) G (M) C (F) A (M) C (F) A (M) G (F) G (M)
G (M) G (M) U (F) U (F) G (M) G (M) U (F) G (M) U (F) C (F)
G (F) G (F) G (M) U (F) G (M) C (F) A (M) C (F) (配列番号 7)

30

【 0 1 3 7 】

本核酸は核酸 7 - 2 の改変体で、末端のコレステロールと i n v e r t e d d T を除いたものである。

【 0 1 3 8 】

核酸 7 - 4

cho1 - G G A (M) A (M) G G A (M) G G A (M) A (M) G (M) U (F) G
(M) C (F) A (M) C (F) A (M) G G (M) G (M) G (M) U (F) U (F)
G (M) G (M) U (F) G (M) U (F) C (F) G G G (M) U (F) G (M) C (F)
A (M) C (F) - P E G 4 0 k (配列番号 7)

40

【 0 1 3 9 】

本コレステロール付加核酸は核酸 7 - 1 の改変体で、S p a c e r 1 8 を取り除いたものである。

【 0 1 4 0 】

核酸 7 - 5

cho1 - G G A (M) A (M) G G A (M) G G A (M) A (M) G (M) U (F) G
(M) C (F) A (M) C (F) A (M) G G (M) G (M) G (M) U (F) U (F)
G (M) G (M) U (F) G (M) U (F) C (F) G G G (M) U (F) G (M) C (F)
A (M) C (F) (配列番号 7)

50

F) A (M) C (F) - C 1 2 - P E G 4 0 k (配列番号 7)

【 0 1 4 1 】

本コレステロール付加核酸は核酸 7 - 1 の改変体で、S p a c e r 1 8 の代わりに C 1 2 リンカーを用いたものである。

【 0 1 4 2 】

核酸 7 - 6

c h o l - G (F) G (F) A (M) A (M) G (F) G (F) A (M) G (F) G (F)
A (M) A (M) G (M) U (F) G (M) C (F) A (M) C (F) A (M) G (F)
G (M) G (M) G (M) U (F) U (F) G (M) G (M) U (F) G (M) U (F)
C (F) G (F) G (F) G (M) U (F) G (M) C (F) A (M) C (F) - S 1
8 - P E G 4 0 k (配列番号 7)

10

【 0 1 4 3 】

本コレステロール付加核酸は核酸 7 - 2 の改変体で、3'末端の i d T を取り除き、代わりに S p a c e r 1 8 をはさんで 4 0 K D a の枝分かれしたポリエチレングリコールを付加したものである。

【 0 1 4 4 】

核酸 8

c h o l - C 1 2 - G (M) U (F) G (M) C (F) A (M) C (F) A (M) G G (M)
G (M) G (M) U (F) U (F) G (M) G (M) U (F) G (M) U (F) C (F)
G G G (M) U (F) G (M) C (F) A (M) C (F) - i d T (配列番号 8)

20

本コレステロール付加核酸は 2 7 ヌクレオチドの核酸で、5'末端にコレステロール、3'末端に i d T が付加されたものである。コレステロールと核酸との間は炭素数 1 2 の飽和炭化水素鎖で結ばれている。ヌクレオチドはリボースの 2'位がフルオロ基および O - メチル基で修飾されているものと未修飾のものが混在している。

核酸 9

c h o l - C 1 2 - G G G A (M) G A (M) G G A (M) G A (M) A (M) G A (M)
G G A (M) A (M) G U (F) G (M) C (F) A (M) C (F) A G G G G (M)
U (F) U (F) G (M) G (M) U (F) G (M) U (F) C (F) G G G U (F) G
(M) C (F) A (M) C (F) - i d T (配列番号 9)

30

【 0 1 4 5 】

本コレステロール付加核酸は 4 5 ヌクレオチドの核酸で、5'末端にコレステロール、3'末端に i d T が付加されたものである。コレステロールと核酸との間は炭素数 1 2 の飽和炭化水素鎖で結ばれている。ヌクレオチドはリボースの 2'位がフルオロ基および O - メチル基で修飾されているものと未修飾のものが混在している。

【 0 1 4 6 】

細胞遊走阻害実験の結果を表 1 に記す。阻害活性%は核酸を加えないときに移動した細胞の数を 1 0 0 として、核酸を加えたときに移動した細胞の数を表したものを 1 0 0 から引いた値である。コレステロールのみの阻害活性も測定したが、核酸の濃度の 1 0 0 倍加えても阻害活性は見られなかった。一方、核酸 5、5 - 1、5 - 2、5 - 3 の比較より分かるとおり、コレステロールが付加されていない核酸(核酸 5 - 2、5 - 3)は阻害活性を示さなかったが、これにコレステロールを付加すると高い阻害活性を示した(核酸 5、5 - 1)。以上より核酸とコレステロールが組み合わさることで、M K の細胞遊走活性が阻害されることが示された。

40

【 0 1 4 7 】

【表 1】

コレステロール付加核酸の細胞遊走阻害活性

核酸	阻害活性MK (%)	測定回数	阻害活性PTN (%)	測定回数	長さ(nt)
1	92	2	-	0	23
2	92	2	-	0	23
3	93	2	-	0	23
3-1	91	2	-	0	23
3-2	93	3	94	3	23
3-3	91	2	-	0	23
3-4	89	2	-	0	23
4	68	5	23	3	7
5	97	2	98	3	35
5-1	94	6	85	4	35
5-2	0	2	0	2	35
5-3	11	2	-	0	35
6	98	2	-	0	39
6-1	96	2	-	0	39
6-2	16	3	-	0	39
6-3	29	3	-	0	39
6-4	28	2	-	0	39
7	98	2	-	0	38
7-1	98	2	-	0	38
7-2	84	2	-	0	38
7-3	51	2	-	0	38
7-4	92	3	-	0	38
7-5	99	3	-	0	38
7-6	96	2	-	0	38
8	88	2	-	0	27
9	98	2	-	0	45
Chol (0.5μM)	14	2	5	2	-
Chol (5μM)	7	4	9	2	-

10

20

30

【0148】

これらの結果より以下のことがわかる。

- (1) コレステロールの位置は5'末端であっても3'末端であっても構わない。
- (2) コレステロールと核酸をつなぐリンカーの種類は活性に大きく影響しない。
- (3) 核酸の長さが短いと生理活性が低下する。
- (4) ミッドカインを阻害するコレステロール付加核酸は、プレイオトロフィン阻害する。
- (5) コレステロール付加核酸の末端にポリエチレングリコールを付加しても生理活性は低下しない。

40

【0149】

〔実施例2〕表面プラズモン共鳴法による結合活性の評価

核酸1、3、3-2、3-3、4、5、5-1、5-3、7、7-1で表されるコレステロール付加核酸のミッドカインに対する結合活性を、表面プラズモン共鳴法により調べた。測定にはBIAcore社製のBIAcore 2000を用いた。センサーチップにはカルボキシル基が固定化されているCM4チップを用い、アミノカップリングによりミッドカインを固定化した。アミノカップリングはBIAcore社の仕様書に従って、N-hydroxysuccinimide (NHS, 11mg/L) 及びN-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide

50

hydrochloride (EDC, 75 mg/L) を用いて行った。また、エタノールアミンを用いて未反応カルボキシル基をブロックした。ランニングバッファーに 145 mM 塩化ナトリウム、5.4 mM 塩化カリウム、0.8 mM 塩化マグネシウム、1.8 mM 塩化カルシウム、20 mM Tris (pH 7.6) の混合液 (以下この溶液を、「溶液 A」と記載する) を用いた。再生溶液に 6 M の尿素溶液を用いた。400 nM のコレステロール付加核酸をインジェクションし相互作用を確認した。その結果、測定した全てのコレステロール付加核酸がミッドカインに結合した。それらの結合強度は核酸により異なった。核酸 1 を用いた場合のセンサーグラムの一例を図 1 に示す。

【0150】

〔実施例 3〕コレステロール付加核酸を用いた EAE モデルマウスの発症抑制実験

300 μg の Myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide 35-55 (MOG₃₅₋₅₅) (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK (配列番号 11)) を 500 μg の結核死菌 (Mycobacterium tuberculosis) を含む不完全 Freund's adjuvant とともにエマルジョン化し、野生型 C57/BL6 (メス、8 週齢) の腰部に皮下投与し、感作した。さらに、感作直後及び 48 時間後に 300 ng の百日咳毒素 (pertussis toxin) を 200 μL の PBS に溶かし、腹腔内投与し EAE を誘導した。以後、毎日以下の基準により臨床症状を評価した。

野生型マウス群 (n = 5) および核酸 10 で表されるコレステロール付加核酸投与群 (n = 5) に対して毎日臨床スコアを付け、臨床症状の評価を行った。臨床スコア値は、0 : 症状なし、1 : 尾が垂れる、2 : 仰向けにして起き上がれない、3 : 不安定歩行、4 : 軽度の後肢麻痺、5 : 重度の後肢麻痺、6 : 死亡を示し、MOG₃₅₋₅₅ 投与後 28 日までの全ての動物の割合を記録した。

なお、核酸 10 で表されるコレステロール付加核酸は、次のようなものである。

【0151】

核酸 10

chol - G (M) G (M) A (M) A (M) G (M) G (M) A (M) A (M) G (M) G (M) A (M) A (M) G (M) G (M) A (M) A (M) G (M) A (M) A (M) A (M) U (M) U (M) C (M) C (M) U (M) U (M) C (M) C (M) - idT (配列番号 10)

【0152】

本コレステロール付加核酸は A、G、C、U からなる 36 ヌクレオチドの核酸で、5' 末端にコレステロール、3' 末端に idT が付加されたものである。ヌクレオチドはリボースの 2' 位が O-メチル基で修飾されている。また、コレステロールと核酸は 5 つのポリエチレングリコール鎖とアミド結合で結ばれている。

【0153】

核酸 10 で表されるコレステロール付加核酸は、1 mM 塩化マグネシウムを含む生理食塩水に溶解し、MOG₃₅₋₅₅ 投与後 14 日まで 2 日に 1 回の間隔で計 8 回、その後 1 日に 1 回の間隔で計 13 回投与した (図 2 黒四角)。投与量は 1 mg/kg とした。コントロール群として 1 mM 塩化マグネシウムを含む生理食塩水を同量同様に投与した (図 2 黒丸)。

実験の結果、コレステロール付加核酸投与群において 17 日目から 21 日目まで p < 0.05 の統計学的有意差を持って臨床症状の軽減が見られた (図 2)。統計学的有意差は Dunnett 法を用いて解析した。以上より、コレステロール付加核酸が多発性硬化症の治療薬として利用できる可能性が示唆された。

【0154】

〔実施例 4〕コレステロール付加核酸のナノ粒子化

コレステロールは疎水性物質である一方、核酸は親水性物質である。このことに鑑み、これらを結合させてなるコレステロール付加核酸は条件によってナノ粒子化すると考えら

れた。そこで、種々の条件でコレステロール付加核酸を溶解し、ナノ粒子化するか否かについてゲルろ過HPLCを用いて調べた。ゲルろ過HPLCの条件は以下のとおりである。

カラム：東ソーG3000SW_{xL}

溶離液：溶液A

流速：0.5 mL/min

モード：アイソクラティック

カラム温度：25

検出波長：260 nm

【0155】

1 mM塩化マグネシウムを含む生理食塩水に、核酸7を1 mg/mLの濃度で溶解したところナノ粒子の形成が確認された(図3D)。この水溶液を90℃で10分加熱したところ、ナノ粒子化が促進された(図3E)。一方、この水溶液を0.1 mg/mL以下の濃度まで1 mM塩化マグネシウムを含む生理食塩水で希釈して90℃で10分加熱したところ、ゲルろ過HPLCのピークが低分子量側にシフトした(このピークを以後モノマーピークと呼ぶ。図3F)。また、核酸7を1 mg/mLの濃度で超純水に溶解したところ、モノマーピークの位置にピークが現れ、ナノ粒子の形成は確認されなかった(図3C)。同様の実験をコレステロールが付加していない核酸7-7および核酸7-8を用いてそれぞれ行ったところ、ナノ粒子の形成は確認されなかった(図3B；なお図3Bは核酸7-8を1 mg/mLの濃度で1 mM塩化マグネシウムを含む生理食塩水に溶解した場合の結果である。)。ここで「コレステロールが付加されていない核酸」である核酸7-7および核酸7-8とは、それぞれ以下のようなものである。

【0156】

核酸7-7

GG A (M) A (M) GG A (M) GG A (M) A (M) G (M) U (F) G (M) C (F) A (M) C (F) A (M) GG (M) G (M) G (M) U (F) U (F) G (M) G (M) U (F) G (M) U (F) C (F) GG G (M) U (F) G (M) C (F) A (M) C (F) (配列番号7)

核酸7-8

S18 - GG A (M) A (M) GG A (M) GG A (M) A (M) G (M) U (F) G (M) C (F) A (M) C (F) A (M) GG (M) G (M) G (M) U (F) U (F) G (M) G (M) U (F) G (M) U (F) C (F) GG G (M) U (F) G (M) C (F) A (M) C (F) - id T (配列番号7)

【0157】

標準サンプルとしてAMPが40連続したポリAをインジェクションしたところ、0.1 mg/mL以下の濃度の核酸7を加熱したサンプル(図3F)、核酸7を超純水に溶解したサンプル(図3C)および核酸7-8(図3B)と同程度の保持時間を示した(モノマーピーク付近、図3A)。これらの結果は、0.1 mg/mL以下の濃度の核酸7を加熱したサンプルおよび核酸7を超純水に溶解したサンプルがモノマーであることを示唆している。

【0158】

次に、ナノ粒子の形成が水溶液中の中和塩の有無と核酸の濃度に依存するかどうか調べた。核酸7を1 mg/mLの濃度で超純水に溶解したところ、ナノ粒子の形成は確認されなかった。この溶液を23時間室温で保持したが、ゲルろ過HPLCで高質量側へのピークシフトは見られなかった。一方、核酸7を10 mg/mLの濃度で超純水に溶解したところ、高質量から低質量にかけてブロードなピークが検出され、多様な大きさのナノ粒子が形成していることが確認された。また、1 mM塩化マグネシウムを含む生理食塩水に核酸7を0.1、0.5、1.5、2、10 mg/mLの濃度でそれぞれ溶解し、90℃で10分加熱したところ、0.1 mg/mL以外の濃度でナノ粒子の形成が確認された。これらのナノ粒子は中性塩溶液中で少なくとも24時間安定に存在した。一方、0.1 mg

10

20

30

40

50

/mLのサンプルは加熱後にモノマーピークの位置にピークが見られた。なお、核酸7を0.1mg/mLの濃度で1mM塩化マグネシウムを含む生理食塩水に室温で溶解したところ、ナノ粒子化することが確認できた。

以上より、核酸ナノ粒子の形成には塩が必要で、加熱することでその形成が促進されることがわかった。また、一度形成したナノ粒子は安定であるが、0.1mg/mL以下の濃度に希釈して加熱することでモノマー化することがわかった。

【0159】

次に12%非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)により核酸7を分析した。核酸7を超純粋と1mM塩化マグネシウムを含む生理食塩水にそれぞれ溶かし0.1mg/mLとした。これらの溶液を5μLずつ泳動した。その結果、超純水に溶解した核酸7はモノマーと思われる場所にバンドが見られた(図4)。一方、1mM塩化マグネシウムを含む生理食塩水に溶解した核酸7はウェルに溜まった状態で、そのほとんどが泳動されなかった。これらの結果はゲルろ過HPLCの結果と一致しており、核酸ナノ粒子が塩存在下で形成されやすいことを示している。なお図4中、Mはマーカーを、Wは超純水に溶解した核酸7を、Sは1mM塩化マグネシウムを含む生理食塩水に溶解した核酸7をそれぞれ示す。

10

【0160】

同様の実験を、核酸3-2を用いて行った。その結果、核酸7と同様に塩存在下でナノ粒子を形成した。この溶液を加熱するとナノ粒子化が促進された。また、超純水中ではナノ粒子は形成されなかった。この溶液を加熱するとモノマーの形成が促進された。

20

【0161】

生理活性を有した疎水性物質付加核酸がナノ粒子化しても活性を失っていないことを確認するために、実施例1と同様の方法を適用して細胞遊走阻害実験を行った。1mM塩化マグネシウムを含む生理食塩水に核酸7を10mg/mLになるように溶解し、数時間維持した後、生理食塩水で0.069mg/mLになるように希釈した。このサンプルを2つに分けた(サンプル1および2)。サンプル1はそのまま細胞遊走阻害実験に使用した(ナノ粒子状態)。サンプル2は90℃で10分間加熱した後に細胞遊走阻害実験に使用した(非ナノ粒子状態)。実験の結果、サンプル1および2は共に細胞遊走を強く阻害した。

以上より、核酸はコレステロールを付加することでナノ粒子化することが示された。また、ナノ粒子化は塩の有無、核酸の濃度、加熱の有無に依存することがわかった。さらに、ナノ粒子化しても生理活性が保持されていることが示された。

30

【0162】

〔実施例5〕ナノ粒子化したコレステロール付加核酸の体内薬物動態

核酸7とコレステロールが付加されていない核酸7-8とをそれぞれ1mg/mLで生理食塩水に溶解し、C57/BL6/Jマウス(雌マウス、8週齢、N=3)に10mg/kgで静脈内投与した。核酸7-8は5'末端がSpacer18で修飾されているもので、ヌクレアーゼ耐性は核酸7と変わらないと考えられるものである。

【0163】

0.25、1、2、4時間後にそれぞれ血液を採取し、ELISA法(ハイブリダイゼーション法)を用いて血液中の残存核酸濃度を測定した。ELISA法とは測定対象の核酸と相補的な配列からなる二種類の核酸プローブを用いて生体試料中の核酸を定量する方法で、既に臨床試験等で使用されている一般的な方法である。一つのプローブはプレート(DNA固定化用96ウェルプレート(丸型)キット、住友ベークライト社製)に固定化し、目的の核酸をトラップするために用いた。もう一つのプローブにはFAMを結合し検出用に用いた。感度を上げるために、HRPが結合した抗FAM抗体を使用し、発色基材の吸光度により分析をおこなった。定量は既知濃度のサンプルを用いて作成した検量線を用いて行った。

40

測定の結果、コレステロールが付加している核酸7はコレステロールが付加していない核酸7-8に比べて血液中の核酸滞留時間が顕著に長く、また血中濃度が高いことが示さ

50

れた(図5)。

【0164】

ところで、Healyらは32ヌクレオチドの長さのTGF- β 2に対するアプタマーにコレステロールを付加したものをリン酸生理食塩水に1mg/mLの濃度で溶解し、ラットに1mg/kgで静脈内投与するという実験を行っている(Pharmaceutical Research, Vol. 21, No. 12, 2004, 2234参照)。そして当該実験においては、ELISA法を用いて血中薬物濃度を測定し、薬物動態パラメーターを求めたところ、コレステロール付加アプタマーとコレステロールが付加していないアプタマーではコレステロールが付加していないアプタマーの方の特性がよいことが報告されている。このことは、コレステロールを単に付加しただけでは体内動態は改善されないことを示している。

10

以上より、核酸に疎水性物質を付加しナノ粒子化することで体内薬物動態を向上させることができることがわかる。

【産業上の利用可能性】

【0165】

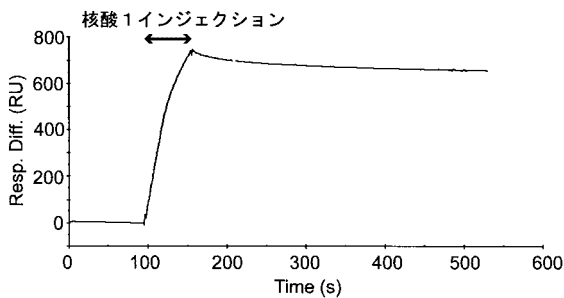
本発明の疎水性物質付加核酸及び複合体は、自己免疫疾患、癌、術後癒着、子宮内膜症などの種々の疾患に対する医薬、あるいは診断薬などの試薬として有用であり得る。本発明の疎水性物質を付加した核酸及び複合体はまた、MKの精製及び濃縮、並びにMKの検出及び定量に有用であり得る。

20

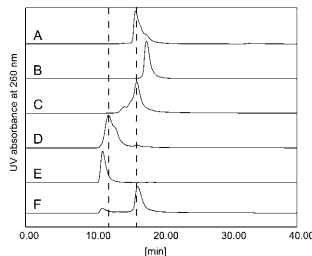
本発明により得られる核酸ナノ粒子は、核酸分子が有する生理活性を保持しているだけでなく、より向上した生理活性と体内薬物動態を有しているため、核酸の活性を強めた核酸医薬、核酸試薬の製造に有用である。

本出願は、日本で出願された特願2007-295951を基礎としており、それらの内容は本明細書にすべて包含される。

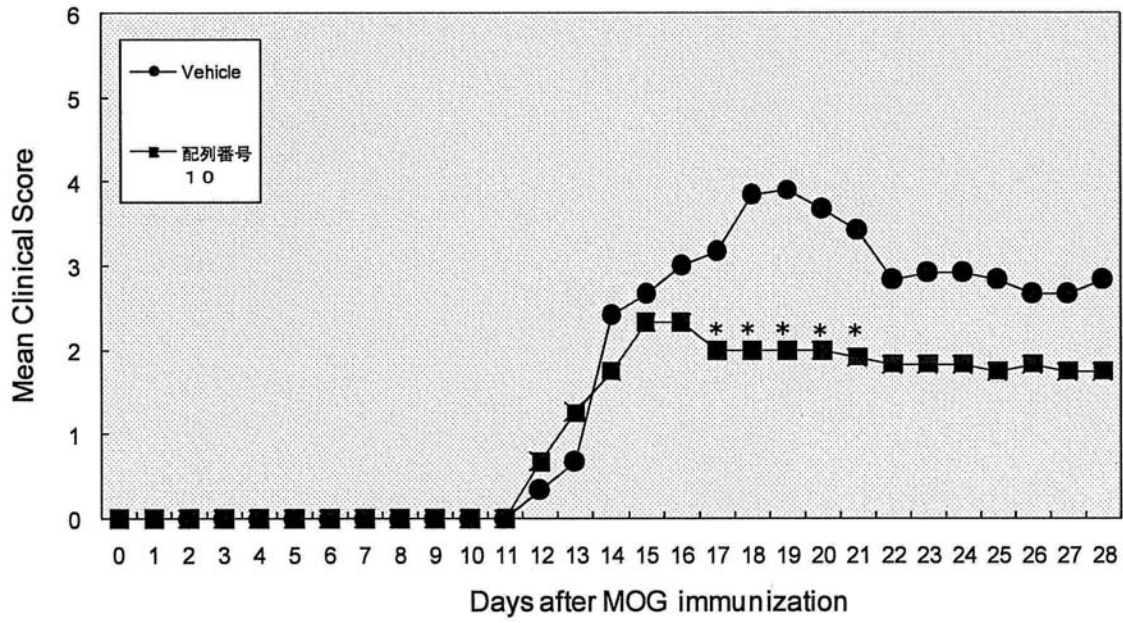
【図1】



【図3】

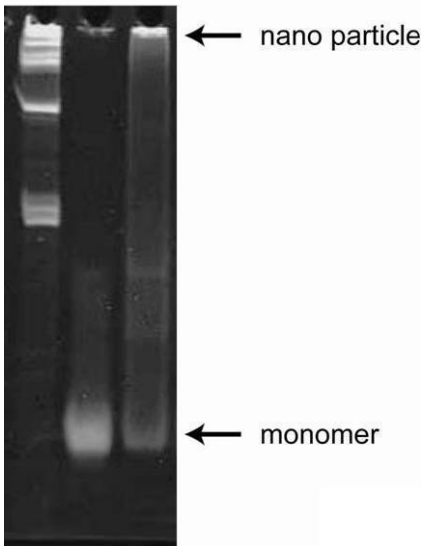


【 図 2 】

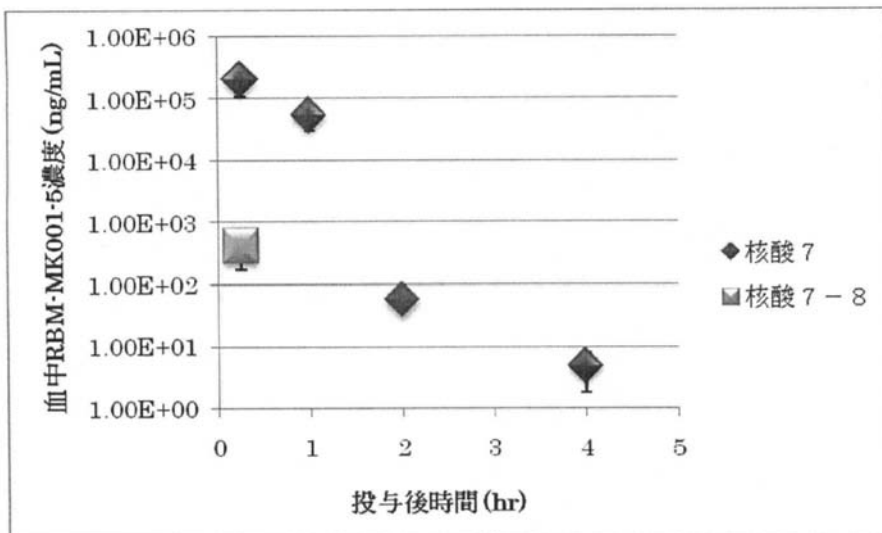


【 図 4 】

M W S



【 図 5 】



【配列表】

2009063998000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2008/070822
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/09(2006.01)i, A61K31/712(2006.01)i, A61K47/48(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P37/02(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/09, A61K31/712, A61K47/48, A61P35/00, A61P37/02, A61P43/00, C12Q1/68, G01N33/53 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), CA (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	WO 2007/086881 A2 (SIRNA THERAPEUTICS INC.), 02 August, 2007 (02.08.07), Full text & JP 2008-530215 A & EP 1922300 A2	9-19, 21/1-8
X/Y	WO 2007/055378 A1 (CELL SIGNALS INC.), 18 May, 2007 (18.05.07), Full text & EP 1964574 A1	1-8/1-8
Y	JP 11-504926 A (Nexstar Pharmaceuticals Inc.), 11 May, 1999 (11.05.99), Full text & WO 96/34876 A1 & EP 824541 A1	1-8
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "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 28 November, 2008 (28.11.08)		Date of mailing of the international search report 09 December, 2008 (09.12.08)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer Telephone No.
Facsimile No.		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/070822

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 20
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 20 pertains to a method for treatment of a human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv), to search.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The special technical feature of the nucleic acid having a hydrophobic substance added thereto of the invention of claim 1 resides in a matter that the nucleic acid is capable of binding to midkine to inhibit the activity of midkine. The special technical feature of the inventions relating to the methods and the substances claimed in claims 9 and 15 resides in a nanoparticle which is not an essential component in claim 1, and is not essentially required to have the function of binding to midkine to inhibit the activity of midkine as stated above.

Therefore, there is found no technical relationship in the meaning within
(continued to extra sheet)

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
the

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/070822

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

PCT Rule 13 between these groups of inventions. Thus, it is obvious that the inventions of claims 1-19 and 21 do not comply with the requirement of unity of invention.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2008/070822	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K31/712(2006.01)i, A61K47/48(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P37/02(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09, A61K31/712, A61K47/48, A61P35/00, A61P37/02, A61P43/00, C12Q1/68, G01N33/53			
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			
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), CA (STN)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X/ Y	WO 2007/086881 A2 (SIRNA THERAPEUTICS INC.) 2007.08.02 全文, & JP 2008-530215 A & EP 1922300 A2	9-19, 21/ 1-8	
X/ Y	WO 2007/055378 A1 (CELL SIGNALS INC.) 2007.05.18 全文, & EP 1964574 A1	1-8/ 1-8	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。	
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 28.11.2008		国際調査報告の発送日 09.12.2008	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 森井 隆信	4B 9455
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2008/070822

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 11-504926 A (ネクスター ファーマスーティカルズ, インコーポレイテッド) 1999.05.11 全文, & WO 96/34876 A1 & EP 824541 A1	1-8

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 K 47/28 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 7
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 K 47/28	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 21/04 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 9/12 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 1
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
	A 6 1 P 21/04	
	A 6 1 P 35/04	
	A 6 1 P 9/12	
	A 6 1 P 15/00	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 宮川 伸
東京都港区白金台三丁目 1 6 番 1 3 号 株式会社リポミック内

(72) 発明者 藤原 将寿
東京都港区白金台三丁目 1 6 番 1 3 号 株式会社リポミック内

(72) 発明者 中村 義一
東京都文京区本郷 7 丁目 3 番 1 号 国立大学法人 東京大学内

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA04 CA05 CA06 CA09 CA10 HA08 HA09 HA12
4B063 QA01 QQ79 QR32 QR45 QR48 QR56 QR66 QR83 QS03 QS32
QS36 QX02 QX10
4C076 AA30 AA95 BB01 BB12 BB13 BB15 BB16 BB25 BB27 CC01
CC03 CC04 CC07 CC11 CC15 CC16 CC17 CC21 CC26 CC27
CC29 DD70A EE59A FF01 FF31 FF63
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 MA43 NA13 NA14 ZA02
ZA36 ZA42 ZA45 ZA59 ZA66 ZA81 ZA89 ZA94 ZA96 ZB05
ZB08 ZB11 ZB15 ZB21 ZB22 ZB26 ZC20 ZC35

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。