

国内の核酸DDS研究

- ✓ アカデミアのDDS技術を国内の核酸シーズとマッチングすることを目的として調査.
- ✓ 薬剤学会, DDS学会, 核酸医薬学会等において核酸DDSに関する発表をおこなった研究室に情報提供を依頼
- ✓ 共同研究として利用可能なDDS技術のみ収集

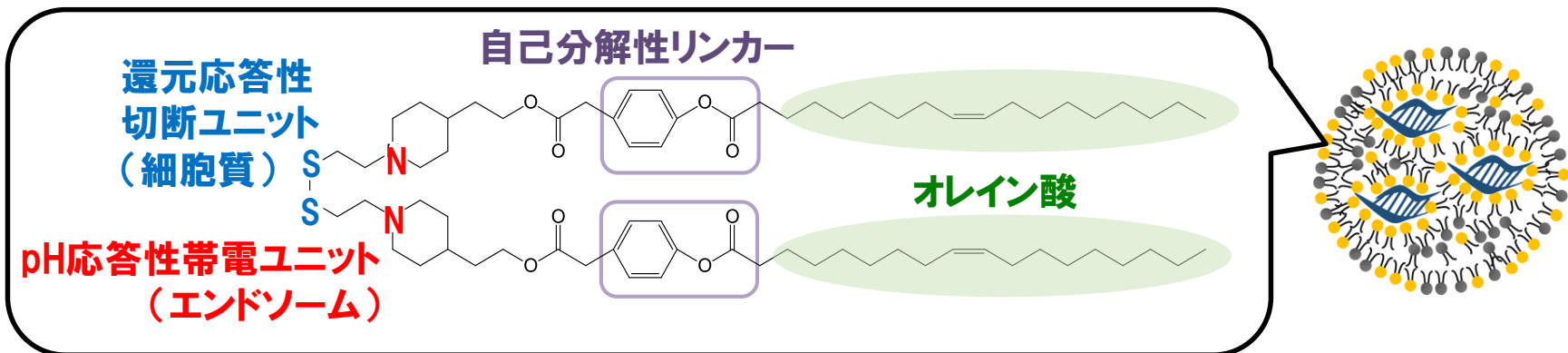
21研究室に情報提供を依頼 → 14研究室から24のDDS技術を集約

- 6研究室:企業連携, 特許申請などの理由により提供不可
- 1研究室:無回答

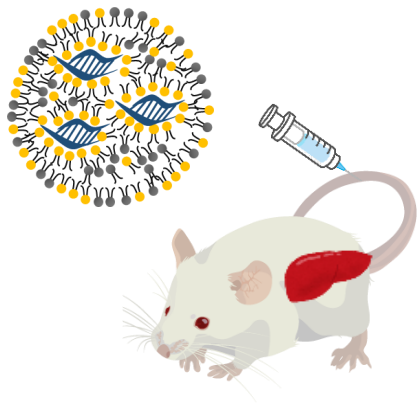
日本薬剤学会 核酸・遺伝子医薬FG
秋田英万, 浅井知浩, 井上貴雄

国内の核酸DDS技術一覧(概要)

スライド番号	開発代表者	所属	DDS技術の種類	核酸モダリティ	標的遺伝子・発現遺伝子	標的組織・細胞	投与経路
1	秋田 英万	千葉大・薬/東北大・薬	pH感受性LNP	siRNA	factor VII	肝臓	静脈内
2	秋田 英万	千葉大・薬/東北大・薬	pH感受性LNP	mRNA	CrisprCas9/guide RNA (TTR)	肝臓	静脈内
2	秋田 英万	千葉大・薬/東北大・薬	pH感受性LNP	mRNA	EPO	肝臓	静脈内
3	秋田 英万	千葉大・薬/東北大・薬	pH感受性LNP	アンチセンス	ApoB/Nr3c1	肝臓	静脈内
4	秋田 英万	千葉大・薬/東北大・薬	pH感受性LNP	mRNA	OVA/	免疫系(ワクチン)	皮下
4	秋田 英万	千葉大・薬/東北大・薬	pH感受性LNP	プラスミドDNA/ mRNA	OVA/TgPF	免疫系(ワクチン)	皮下
5	浅井 知浩	静岡県大・薬	pH感受性LNP(電荷反転型LNP)	siRNA	PLK-1, レポーター遺伝子	がん細胞	静脈内等
6	浅井 知浩	静岡県大・薬	pH感受性LNP(ペプチド脂質誘導体)	siRNA	レポーター遺伝子	がん細胞	その他
7	宮田 完二郎	東大・工	温度応答性高分子材料	アンチセンス	lncRNA	肺(癌なども想定)	気管内
8	宮田 完二郎	東大・工	疎水化カチオン性ポリアミノ酸	mRNA	ゲノム編集	脳・筋/肺など	局所/静脈内
9	金沢 貴憲	静岡県大・薬	ブロック重合体(ミセル)	siRNA	SOD1	中枢	経鼻
10	金沢 貴憲 高島 由季	静岡県大・薬 東京薬大・薬	ブロック重合体(ミセル)	siRNA アンチセンス	PLK-1	癌, ヒト隣癌細胞	静脈内
11	位高 啓史	東医歯大・生材研	ブロック重合体(ミセル)	mRNA	成長因子, 栄養因子, 転写因子等	再生医療など	その他
12	有馬 英俊	第一薬大・薬	dendリマー/シクロデキストリン結合体	siRNA等	PLK-1, NF-kB, TTR	がん, 炎症, 遺伝病	静脈内、皮下
13	根岸 洋一	東京薬大・薬	ナノバブル(脂質・超音波造影ガス)	アンチセンス	Dystrophin	骨格筋, 心筋, 脳など	筋肉内・静脈内
13	根岸 洋一	東京薬大・薬	ナノバブル(脂質・超音波造影ガス)	miRNA	miR126	虚血性疾患	静脈内
14	鈴木 亮	帝京大・薬	マイクロバブル(脂質・超音波造影ガス)	アンチセンス	miR-96-5p	脳・神経細胞	静脈内
15	小暮 健太郎	徳島大・薬	微弱電流	アンチセンス	NF-kB	乾癬	皮膚表面でのイオンフォレシス



肝臓特異的 発現遺伝子 (血液凝固第7因子) を標的とするsiRNA

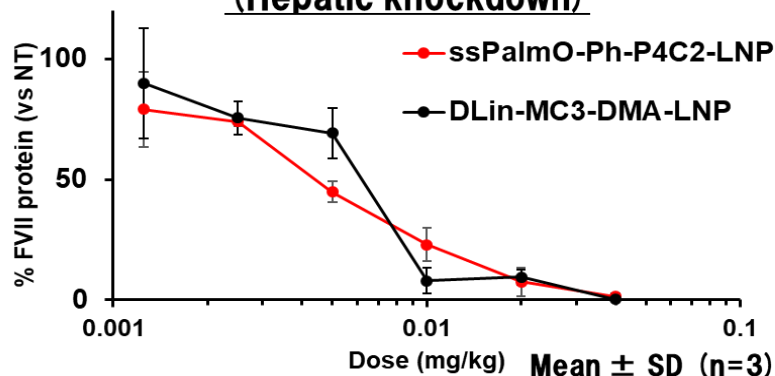


現在siRNA製剤として上市されている
Onpatroの主成分であるDlin-MC3-DMA (MC3)



Jayaraman M. et al, Angew Chem Int Ed Engl, 2012

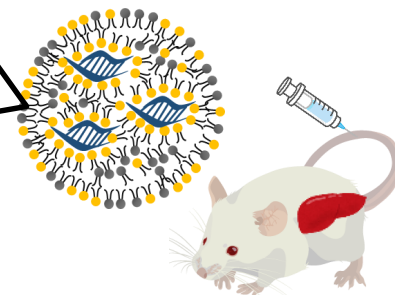
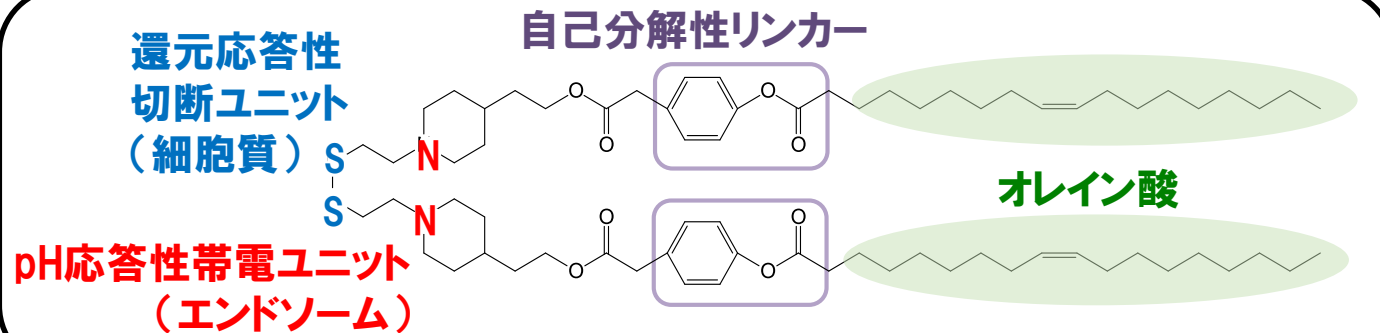
Dose-Response curve (Hepatic knockdown)



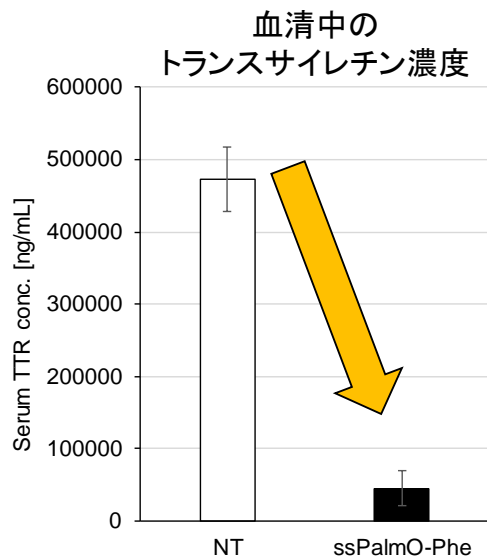
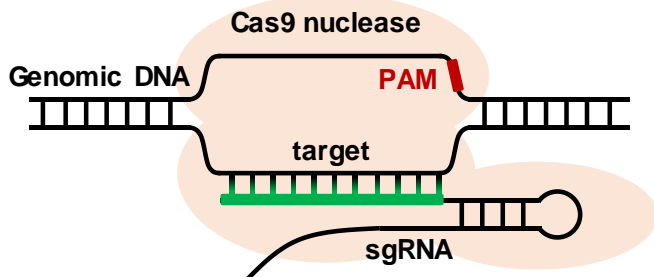
ALT (肝毒性マーカー)

Sample	ALT (IU/L)	
	4 hr	24 hr
PBS	29.2 ± 3.24	16.6 ± 6.13
Ph	54.1 ± 11.3	17.5 ± 2.63
MC3	558 ± 667	Dead

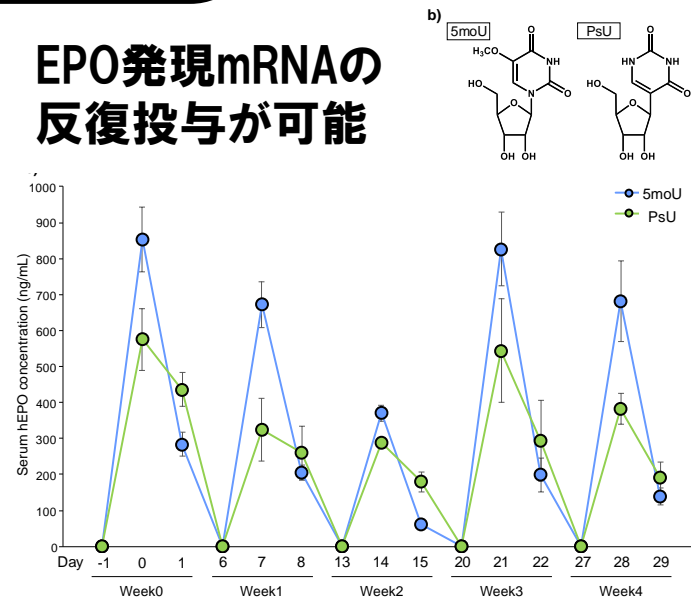
- ・静脈内投与後においてマウスの肝臓における遺伝子ノックダウン効果 (ED50として0.0044 mg/kg)
- ・従来技術に比べ高い生体適合性
- ・日油株式会社よりMTA締結のうえ供与実績あり。また、購入も可能
- ・Pharmaceutics. 13(4):544 (2021)



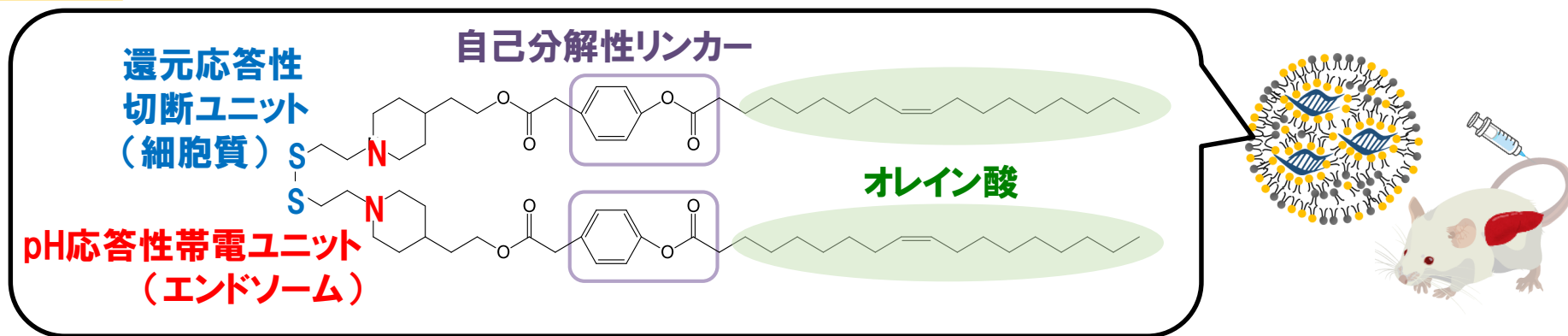
トランスサイレチンsgRNA Cas9-mRNAを同時投与



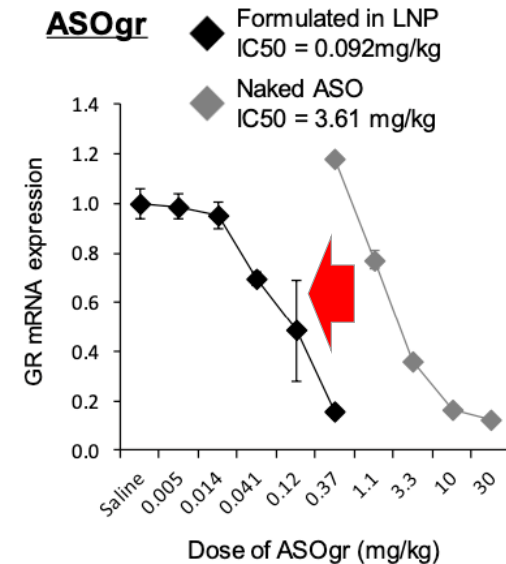
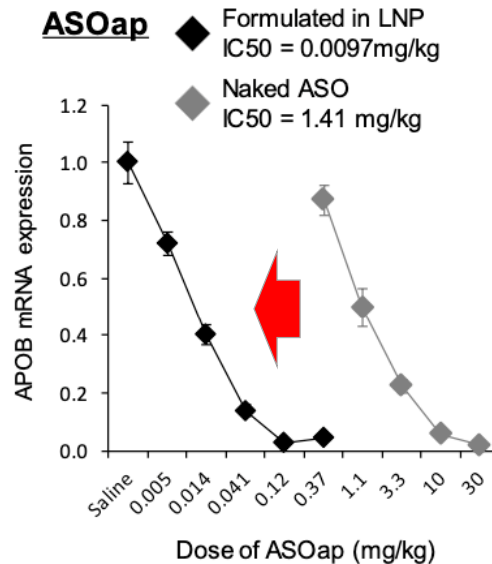
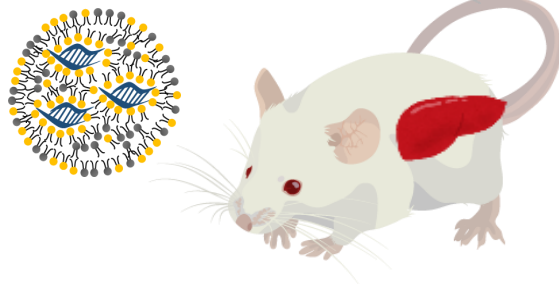
EPO発現mRNAの 反復投与が可能



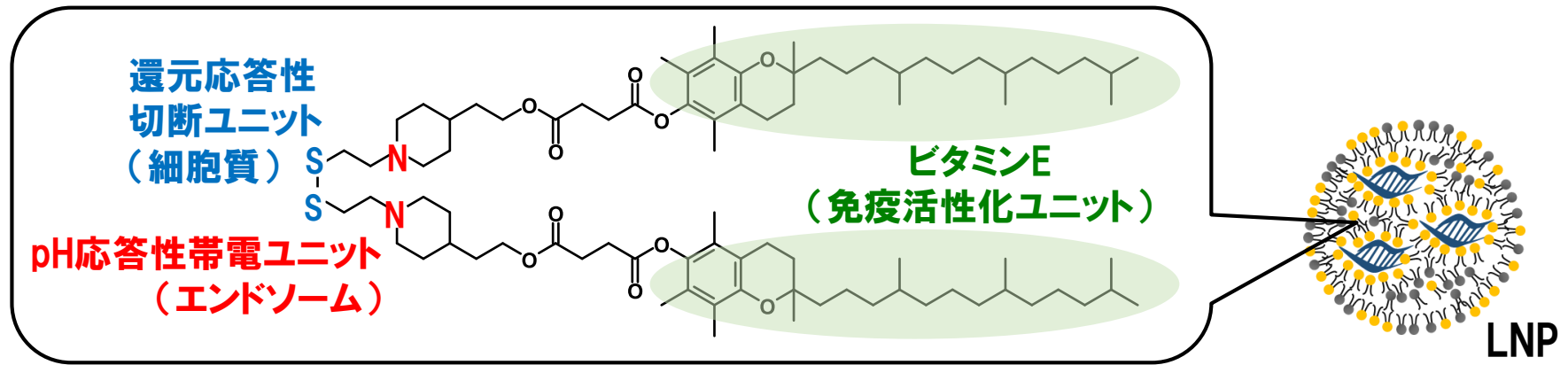
- ・肝臓においてmRNA-Cas9とsgRNAを投与後、血中TTR濃度が95%減少
- ・日油株式会社よりMTA締結のうえ供与実績あり。また、購入も可能
- ・ヒトエリスロポエチンのmRNAを0.05 mg/kgで投与した場合、5-メトキシウリジン修飾体で700 ng/mL、シュードウリジン修飾体で500 ng/mL (反復投与可能)
- ・Adv Funct Mater 30(34): 1910575 (2020)



肝臓特異的発現遺伝子 (ApoB/Nr3c1) を標的とするアンチセンス核酸



- ・アンチセンスオリゴの送達効率を40倍～150倍改善
- ・脂質自体は毒性を示さない
- ・日油株式会社よりMTA締結のうえ供与実績あり。また、購入も可能
- ・Pharmaceutics. 13(4):544 (2021)



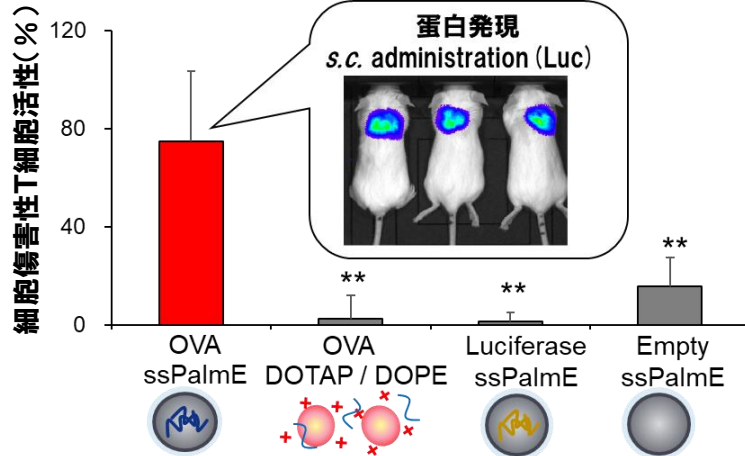
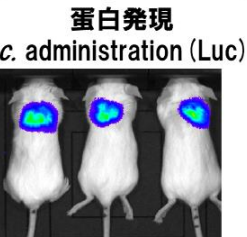
抗原特異的 CTL 活性

ssPalmE-P4C2
ルシフェラーゼ or
OVAコード mRNA



s.c.
administration

0.05 μ g mRNA
(Single dose)

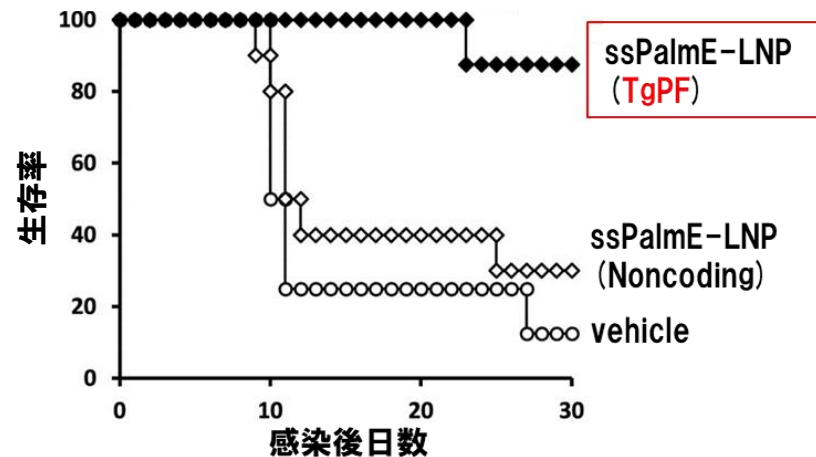


・マウスの皮下において0.05 μ gのRNAを投与することで細胞傷害性T細胞を活性化できる(モデル抗原OVA)

DNAワクチン

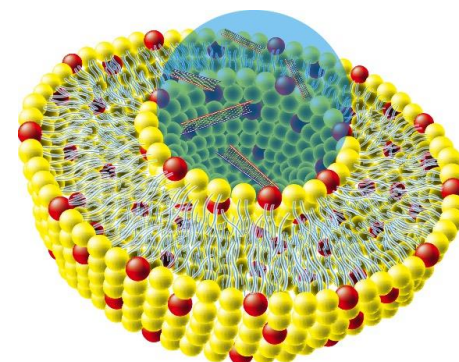
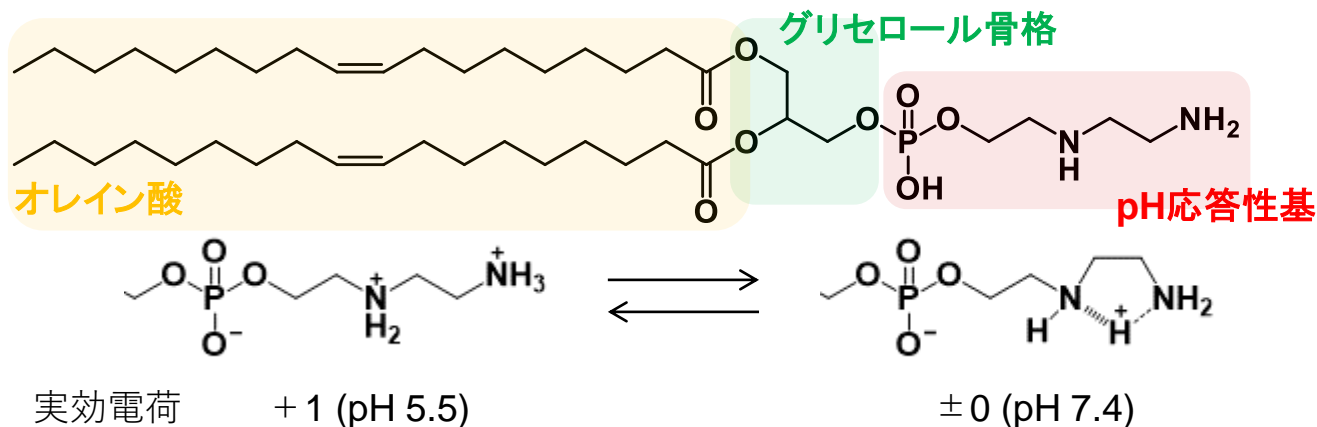
pDNA: 10 μ g

Maeta et al. Mol Pharm 17:
1237-1247 (2020)

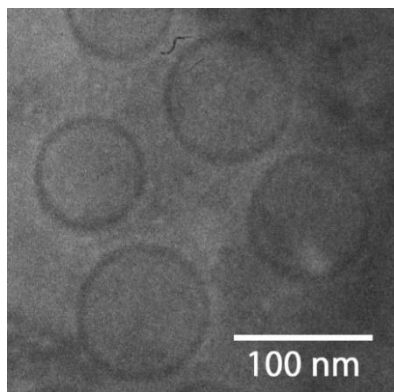


- ・マウスの皮下において10 μ gのpDNAを投与することでToxoplasma gondiiの致死感染を予防 (トキソプラズマ抗原)
- ・1 μ gのmRNAを投与することでも同様の致死感染予防効果あり (データ非公表)
- ・日油株式会社よりMTA締結のうえ供与実績あり。また、購入も可能
- ・Mol Pharm 17(4) 1237-147 (2020)

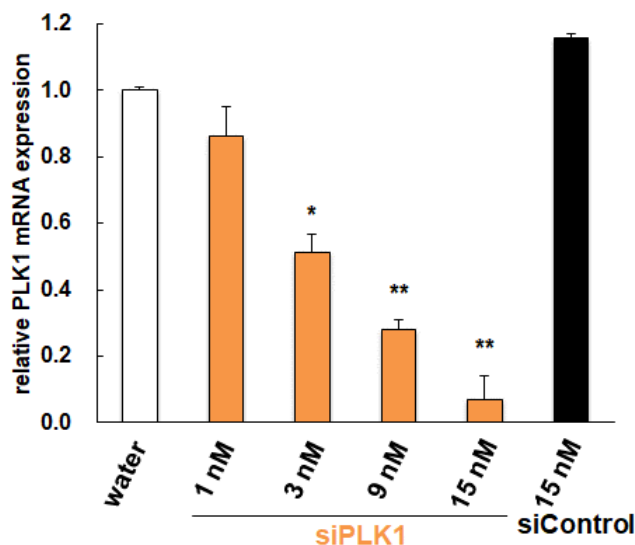
dioleoylglycerophosphate-diethylenediamine (DOP-DEDA)-based LNP



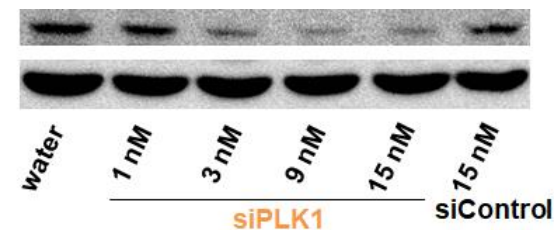
DOP-DEDA LNP



DOP-DEDA LNPのクライオ
電子顕微鏡写真
(分散性と均一性が高い)



左図 RT-PCR (*in vitro*)
下図 western blotting (*in vitro*)



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. water

LNP形成にPEG脂質は不要、低濃度のsiRNAで遺伝子サイレンシングを誘導可能

- ・mRNAも送達可能
- ・日本精化株式会社よりMTA締結後に供与可能、購入可能
- ・WO2018/190017, Int J Pharm. 585, 119479 (2020)

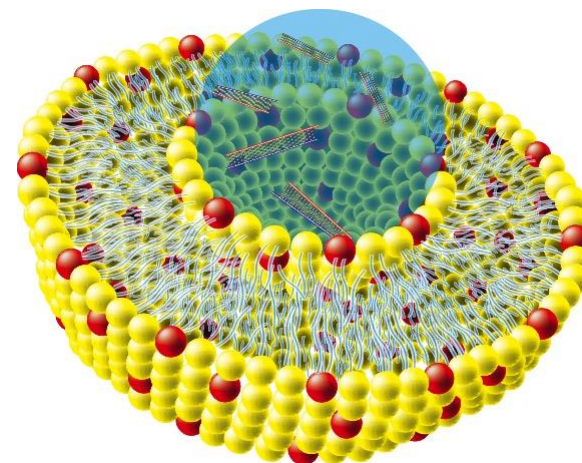
ペプチド脂質誘導体（SGL-0411）

炭化水素基

ペプチド

pH応答性基

SGL-0411 LNP



SGL-0411の構造は相互薬工株式会社と
秘密保持契約を締結後に開示可能

PEG脂質を用いずとも分散性の
高いLNPを形成する

新規ペプチド脂質誘導体を基盤としたLNPは**高いsiRNA導入効率**を示す

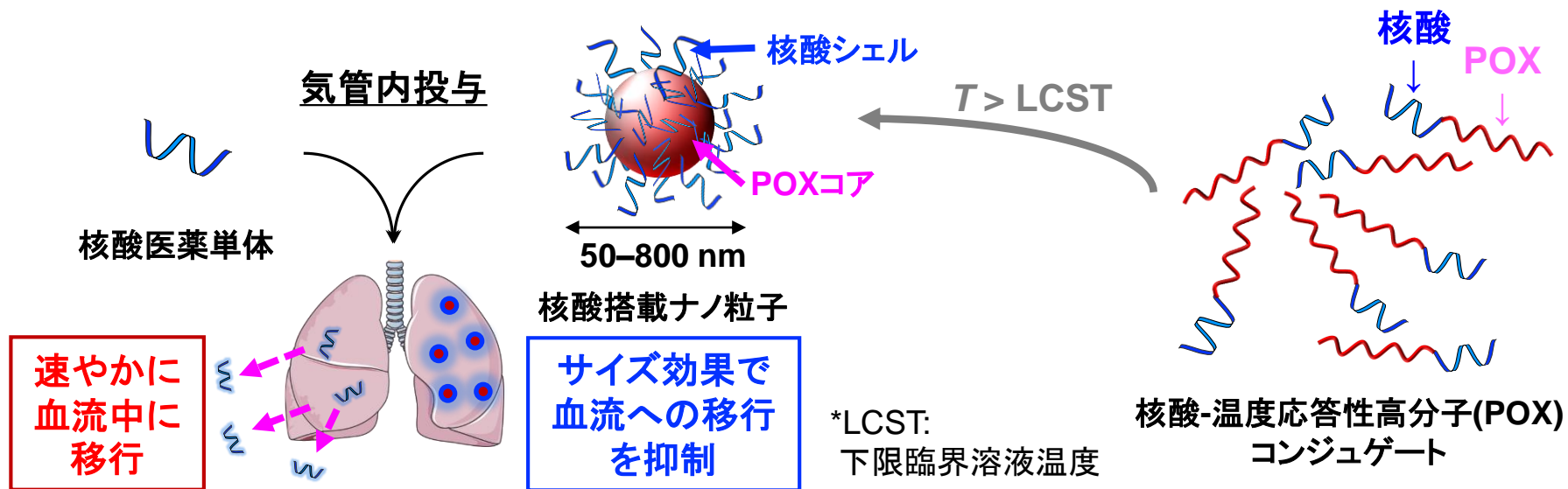
・特願2021- 66762

・SGL-0411は、MTA締結後に相互薬工株式会社より提供可能

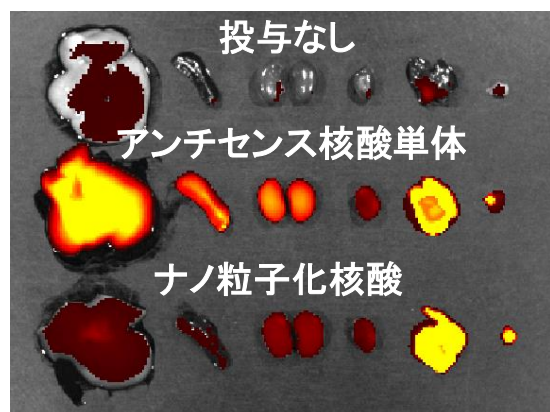
【アンチセンス】

【肺(がん)】

【気管内】

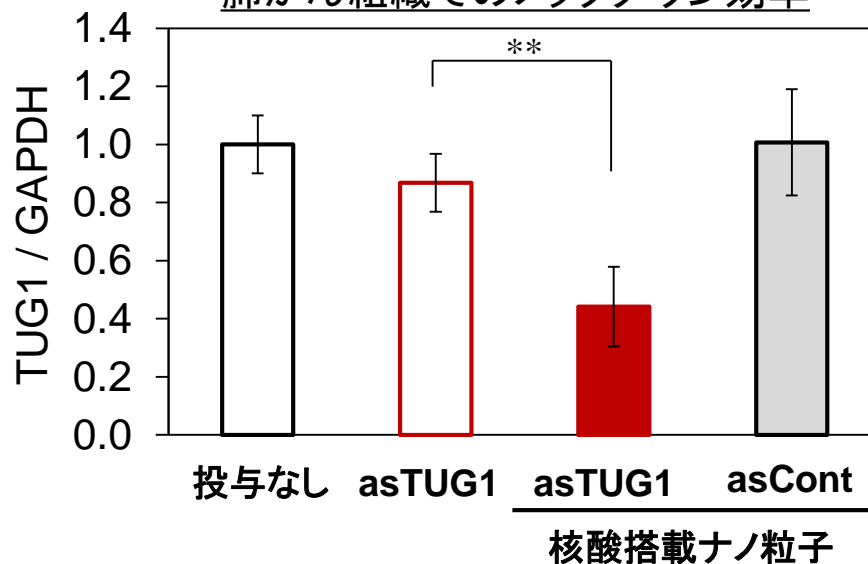


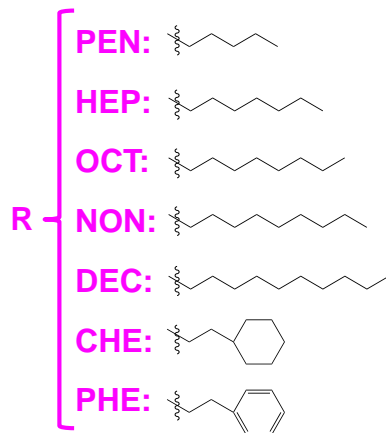
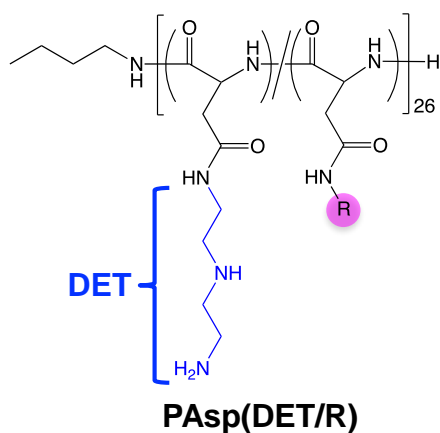
気管内投与24時間後の臓器分布



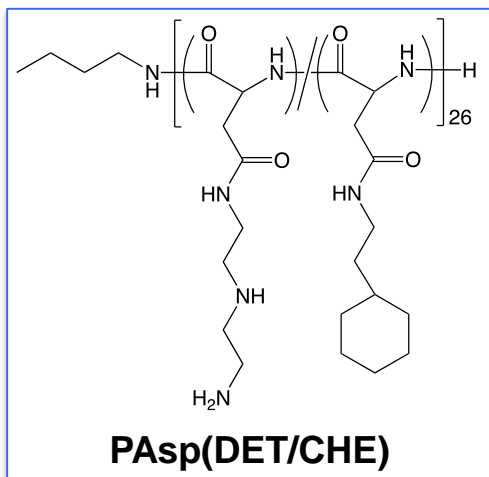
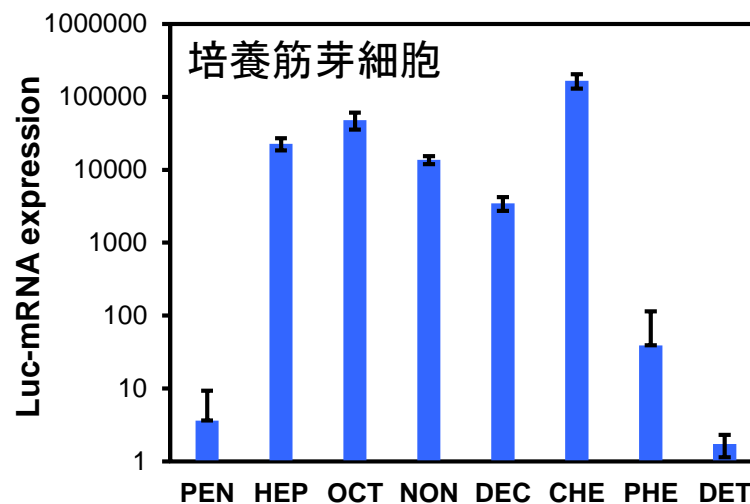
Liver
Spleen
Kidney
Heart
Lung
Tumor

肺がん組織でのノックダウン効率

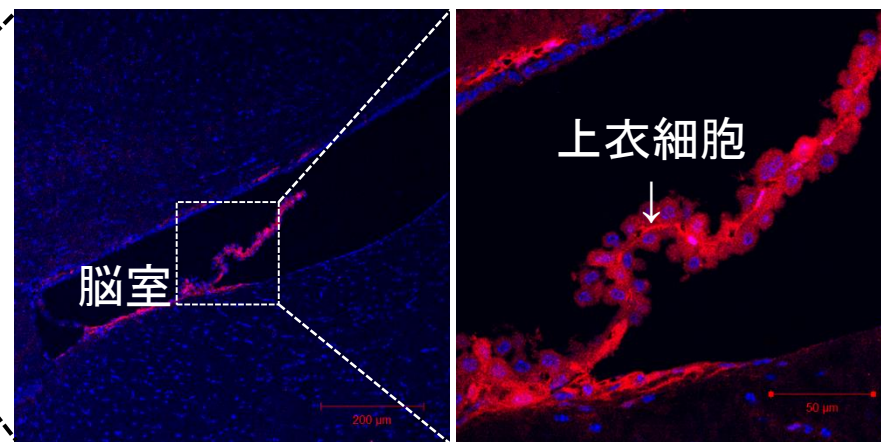
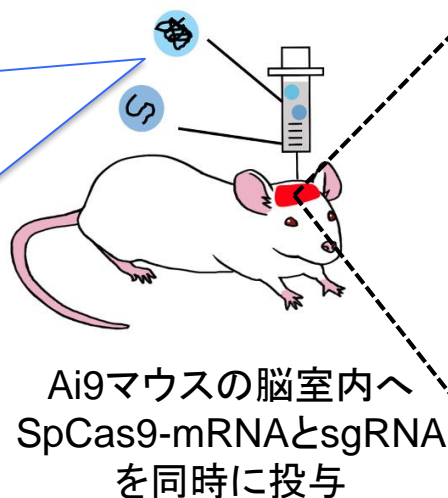




疎水性/カチオン性ポリペプチドライブラリー

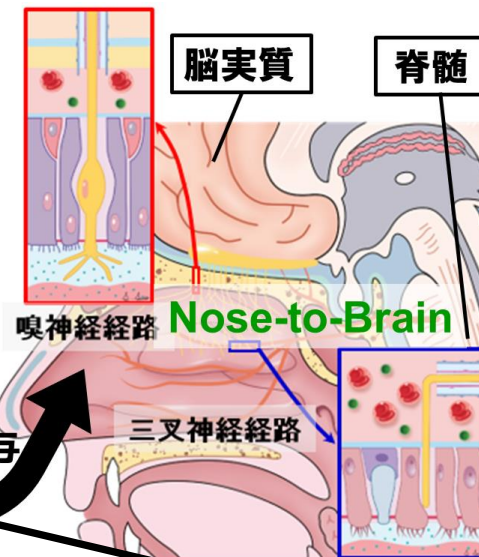
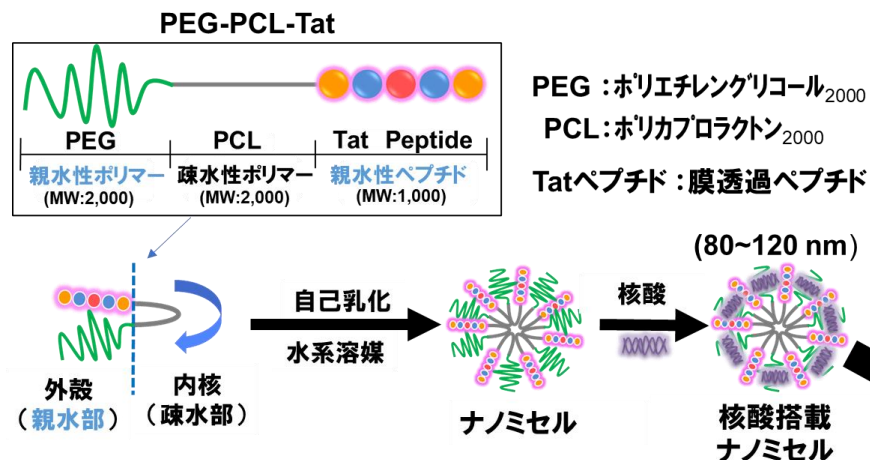


PAsp(DET/CHE)

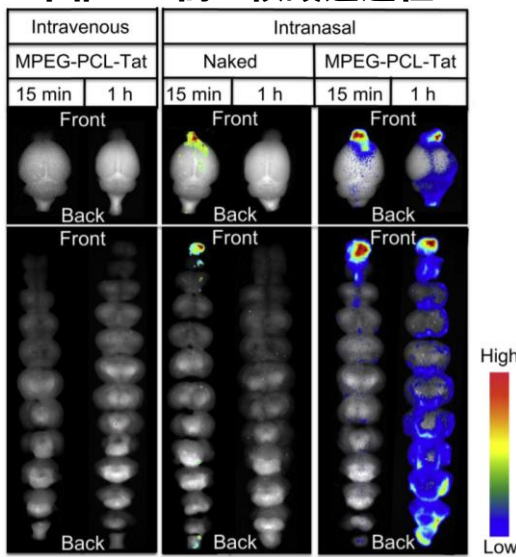
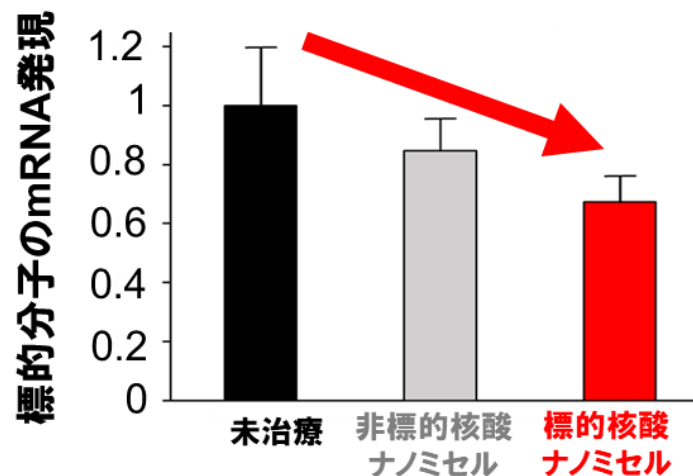


脳室の上衣層における遺伝子編集を確認

膜透過ペプチド修飾高分子ナノミセルの構造



中枢への高い核酸送達性

筋萎縮性側索硬化症(ALS)モデルマウス
脊髄中の標的遺伝子ノックダウン

- ・中枢、特に脊髄への高い核酸送達効率を確認(0.3~0.4% ID/g)。
- ・ALSモデルマウス(G93A)への経鼻投与により、脊髄における遺伝子ノックダウン効果を確認。
- ・特願2019-115688, PCT/JP2020/018512, *Biomaterials*, **34**:9220-9226 (2013).

ナノミセル形成
ブロックポリマー



細胞内動態制御
ペプチド

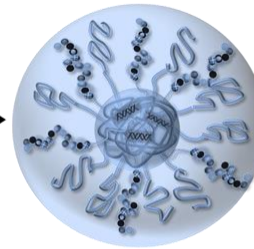


混合・溶媒希釈/共集合

核酸 (siRNA)

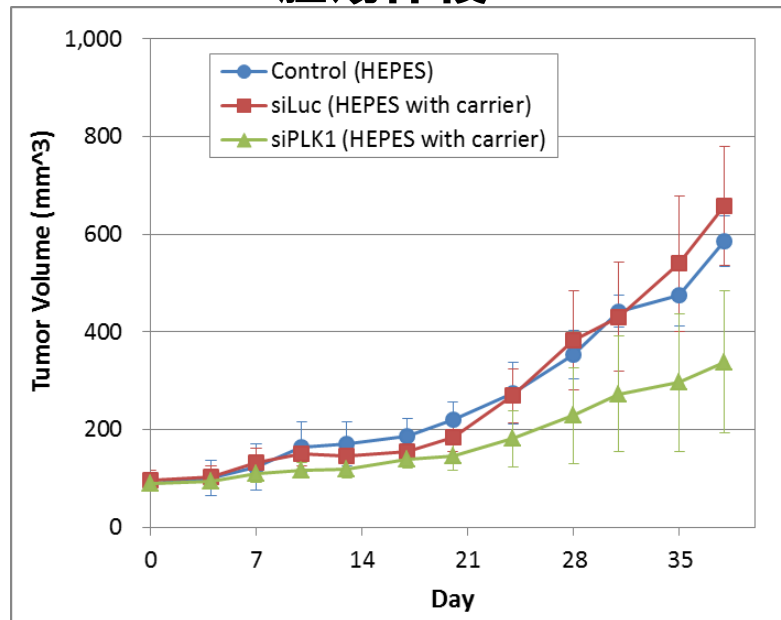


標的: PLK-1 (Polo Like Kinase-1)
細胞分裂期に癌細胞で高レベルに発現

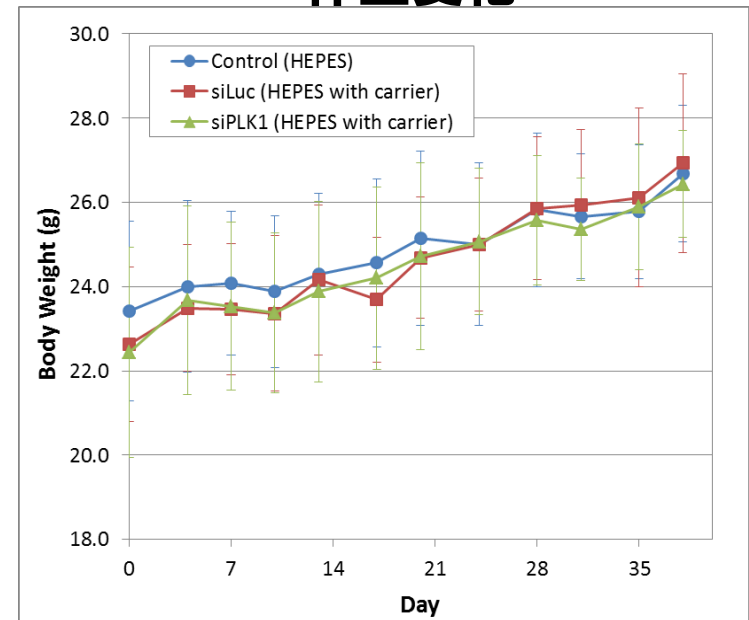


粒径: <40 nm
PDI: <0.2
電位: 5-10 mV
高い組織浸透性
凍結保存(1カ月~)
運搬・提供可能

腫瘍体積

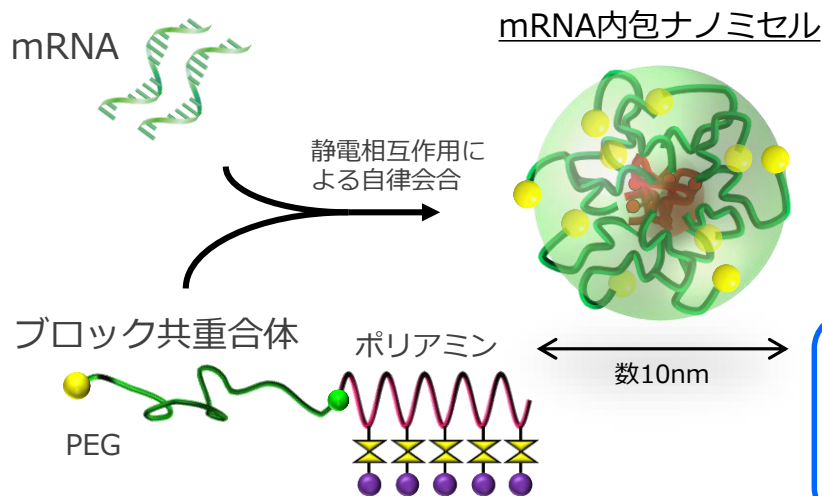


体重変化



- ・間質組織が多いヒト膵がん (BxPC3) の担癌マウスへの静脈投与によって、抗腫瘍効果を発揮した
- ・体重減少、生化学/血液学的副作用は見られなかった
- ・特願2017-135547, PCT/JP2018/026199

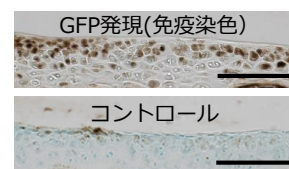
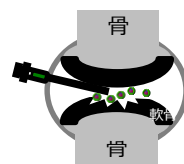
・ ナノミセル型キャリア



- PEG外殻・mRNA/カチオン性ポリアミンからなる内核の明確な二層構造
→ mRNAの安定な保持・異物認識の抑制（ステルス性）
- 数10nmの均一な粒径 → 高い組織浸透性
- 生体・細胞内環境応答能 → 迅速なタンパク質発現
- 生分解性高分子による高い安全性 → 反復投与可能

実施例

mRNA内包ナノミセルを関節内に投与



高い組織浸透性：軟骨細胞に広範・均一にタンパク質発現

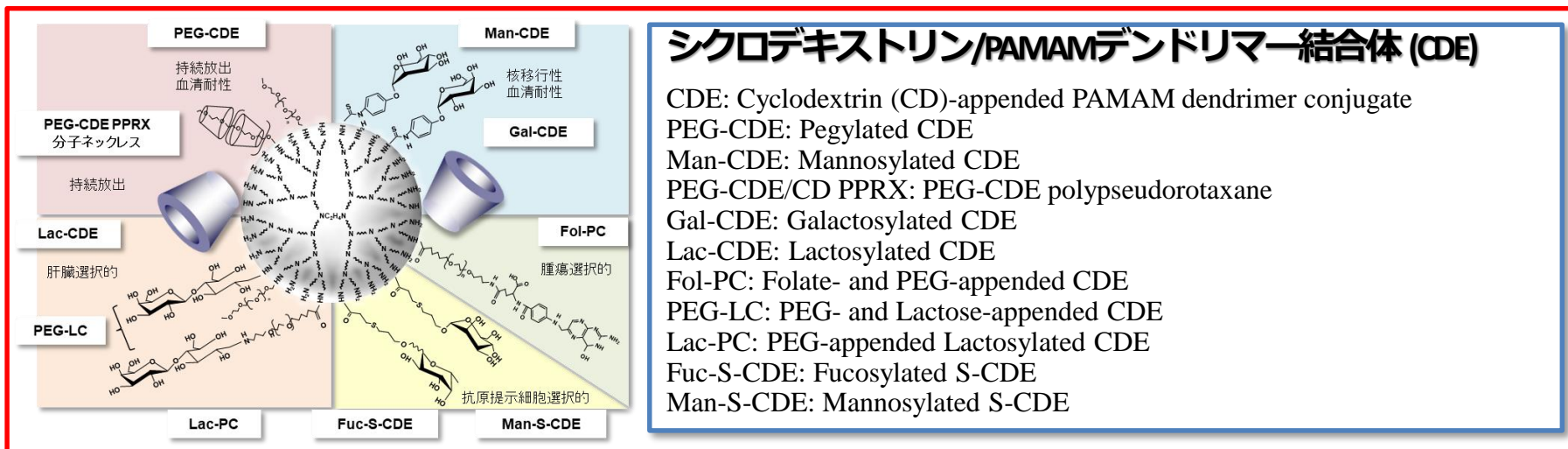
J Am Chem Soc 133:15524, 2011
 J Am Chem Soc 136:12396, 2014
 Scientific reports, 6: 18743, 2016
 Biomaterials 270: 120681, 2021 など

mRNAは種々の修飾mRNA、改変構造を含め設計可能。標的疾患・組織等は必要に応じて学内外医学系研究室との共同研究にて対応可能。

【低分子、タンパク質、
核酸医薬、遺伝子など】

【がん細胞、肝臓、抗原提示細胞、
腎臓、脳など】

【静脈内、皮下】

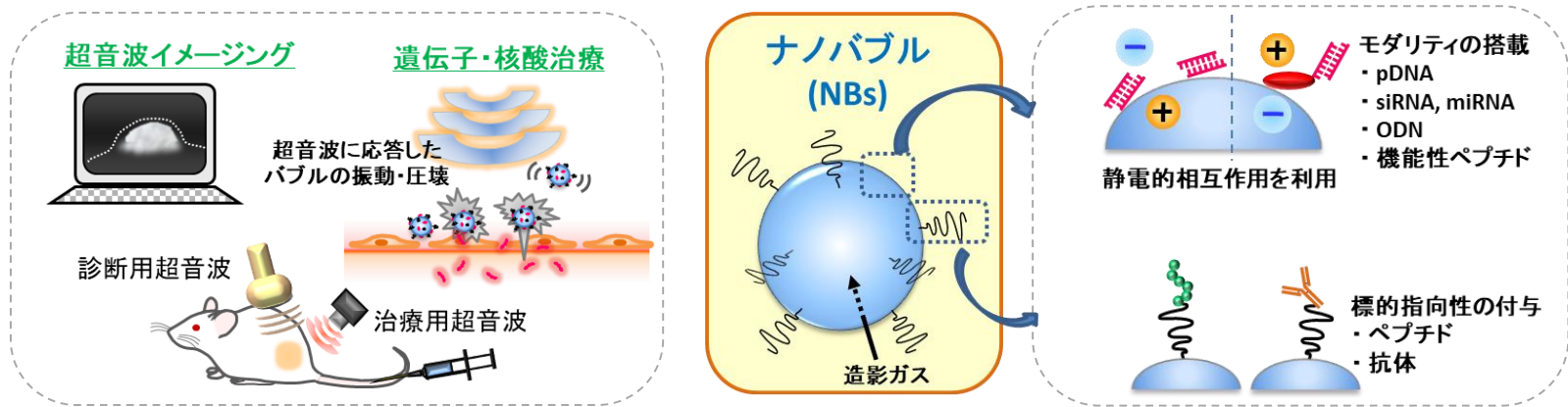


【多機能型CDEの特徴】

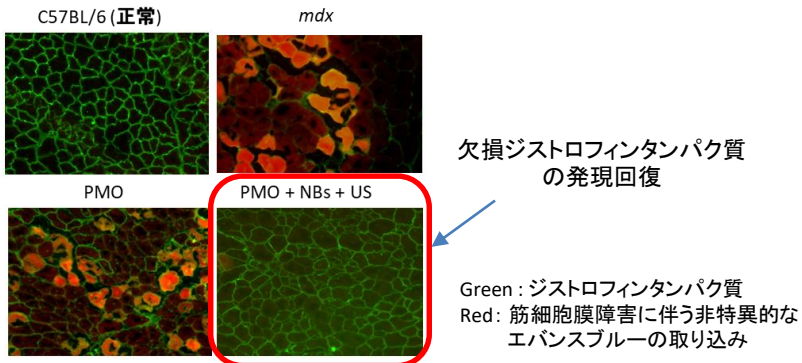
- ✓ 遺伝子・mRNA・核酸医薬 (siRNA, miRNA, decoy DNA等) のターゲティングキャリア
- ✓ 低分子薬物・タンパク質のターゲティングキャリア
- ✓ エンドソームエスケープ作用
- ✓ ゲノム編集用キャリア
- ✓ アニオン性高分子との三元複合体形成によるターゲティング効率の向上
- ✓ 低細胞障害性
- ✓ 高生体適合性
- ✓ アミロイド繊維形成抑制・溶解促進作用
- ✓ 抗炎症作用
- ✓ 超分子形成 (ゲル化、徐放化など)

・H. Arima, Twenty Years of Research on Cyclodextrin Conjugates with PAMAM Dendrimers, *Pharmaceutics*, 13, 697 (2021).

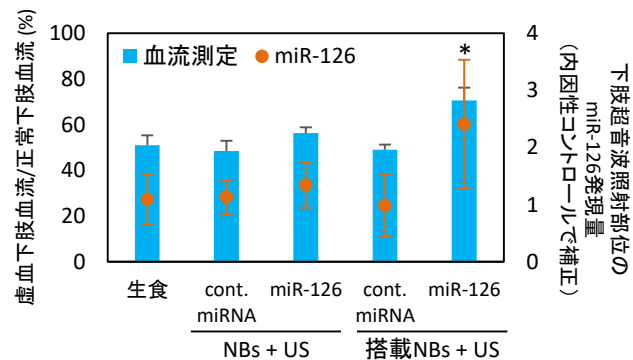
・シクロデキストリンの超分子特性を生かした創薬・創剤, *ファインケミカル*, 2019年11月号



PMOデリバリー



miRNAデリバリー



下肢虚血モデル作製後、
Day10,12にmiR-126導入治療、
Day19解析

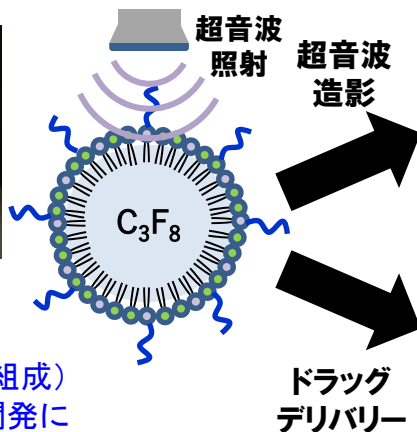
ナノバブルと超音波併用による核酸デリバリーにより有意に治療効率が上昇

- ・筋ジストロフィーモデルマウス (*mdx*) へのモルフォリノ核酸 (PMO) の筋肉内、静脈内投与後に、超音波照射を併用することでエクソスキッピング誘導による欠損ジストロフィンタンパク質の発現回復を確認。正常マウスにおける脳内への超音波照射によりPMO送達を確認。ナノバブルと超音波併用により他の標的組織・細胞への導入も可能。
- ・カチオン性材料を用いたナノバブルにmiRNAなどを含むmRNA、遺伝子など搭載することが容易であり、静脈内投与後に標的部位へと超音波照射することで、導入することが可能。

・Mol Pharm 11:1053–1061 (2014), Pharmaceutics 7:344–362 (2015), Scientific Reports 4:3883 (2014)
特許第5850519号, US09457102, 特許第6202563号

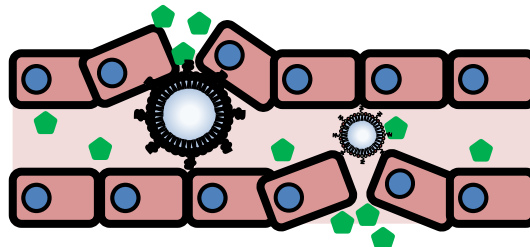
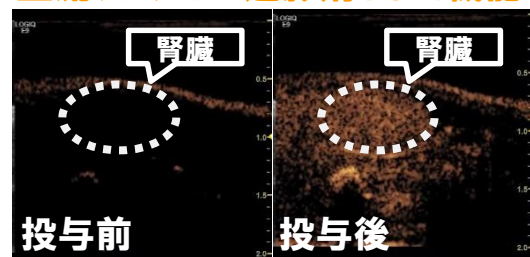
超音波応答性粒子(マイクロバブル)

- 内封ガス Perfluoropropane (C₃F₈)
- 外殻成分 DSPC (Distearoyl Phosphatidylcholine)
- DSPG (Distearoyl Phosphatidylglycerol)
- DSPE-PEG (Distearoyl Phosphatidyl-ethanolamine-polyethylene glycol 2,000)



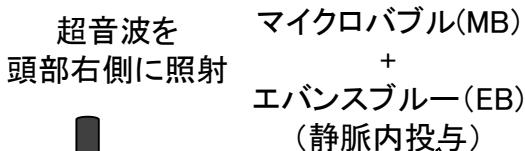
外殻成分が、マイクロバブルの安定性に大きく影響する。
 これまでに、血中安定性・滞留性に優れた新たな外殻成分(組成)を有する超音波診断・治療に応用可能なマイクロバブルの開発に成功した。(特許 6804095号)

血流リアタイム造影剤として機能

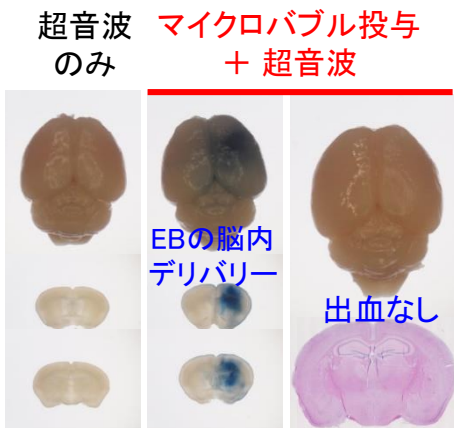


血管壁のオープニングによるドラッグデリバリー

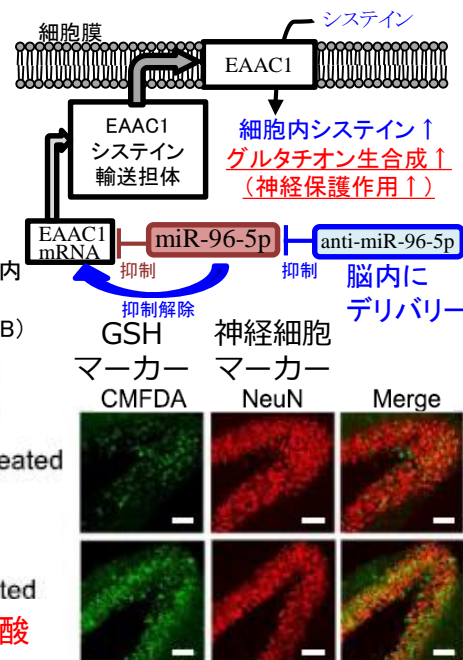
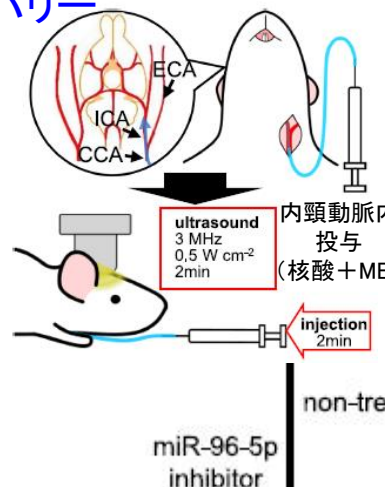
脳内毛細血管の透過性亢進効果(血液-脳関門(BBB)オープニング)
 マイクロバブルと超音波の併用による脳内薬物・核酸デリバリー



- 超音波照射条件
- 周波数: 3 MHz
 - 照射強度: 0.5 W/cm²
 - Duty: 50%
 - 照射時間 :3 min
 - 繰り返し周波数(PRF) : 10 Hz

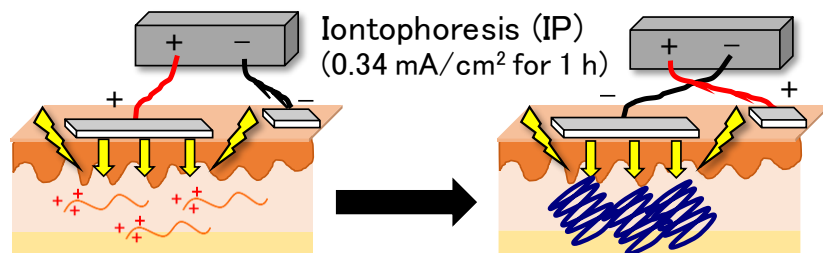
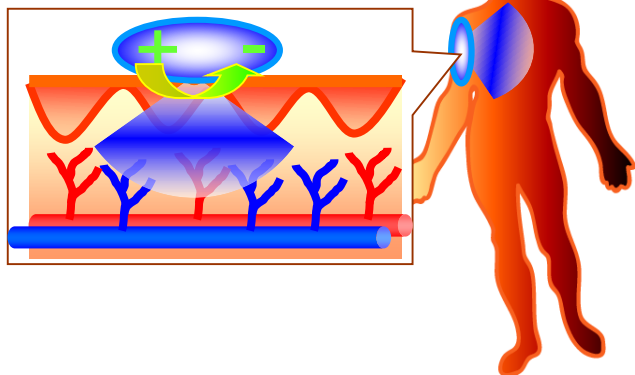


脳に傷害を与えず、脳内の毛細血管の透過性を亢進する方法として利用可能



神経保護作用を誘導できる核酸の脳内デリバリーに成功(神経細胞内のGSH量増加)

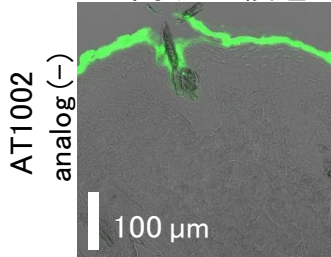
【アンチセンス】



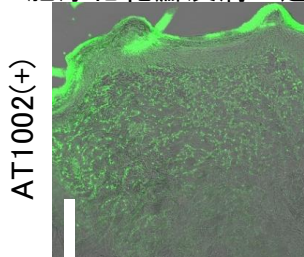
IPとタイトジャンクション開裂
ペプチドAT1002 (RRRGGLGCRFI)
の組合せでタイトジャンクションを
開裂

開裂皮膚中へのIPによる
NF- κ Bデコイオリゴ
DNA(ODN)の皮内送達

ODN単独では浸透せず



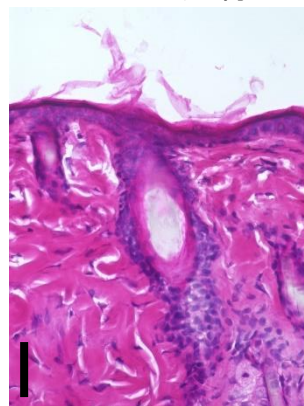
AT1002ペプチドとIPにより
肥厚化乾癬皮膚に送達



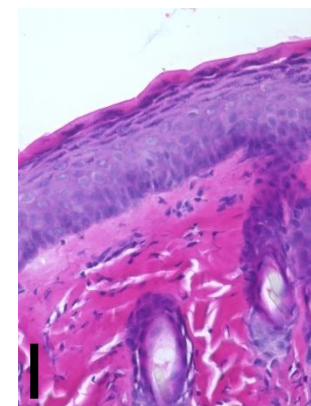
【乾癬】

【皮膚表面でのイオンフォレシス】

正常な皮膚

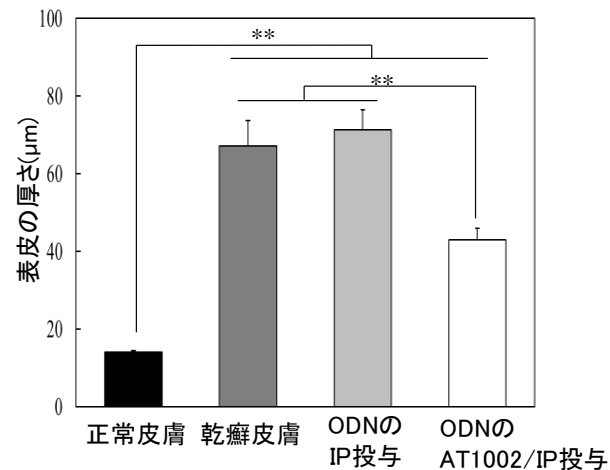
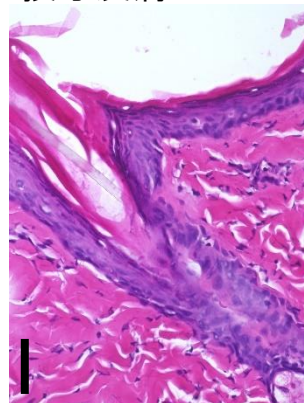


乾癬病態皮膚



肥厚化
表皮

ODNのAT1002/IP
投与皮膚



・タイトジャンクション開裂ペプチドAT1002とイオンフォレシスを組み合わせることで、乾癬病態の肥厚化した皮膚内にNF- κ BデコイオリゴDNAを浸透させ、乾癬病態の治療に成功した。現在、ヒアルロン酸(MW1,600k)等巨大分子の皮内および体内臓器送達に挑戦中。

・International Journal of Pharmaceutics 602(2021)120601

コンタクト情報 一覧

スライド番号	開発代表者	所属	メールアドレス
1, 2, 3, 4	秋田 英万	千葉大・薬/東北大・薬	akitahide@chiba-u.jp hidetaka.akita.a4@tohoku.ac.jp
5, 6	浅井 知浩	静岡県大・薬	asai@u-shizuoka-ken.ac.jp
7, 8	宮田 完二郎	東大・工	miyata@bmw.t.u-tokyo.ac.jp
9, 10	金沢 貴憲	静岡県大・薬	t.kanazawa@u-shizuoka-ken.ac.jp
11	位高 啓史	東医歯大・生材研	itaka.bif@tmd.ac.jp
12	有馬 英俊	第一薬大・薬	h-arima@daiichi-cps.ac.jp
13	根岸 洋一	東京薬大・薬	negishi@toyaku.ac.jp
14	鈴木 亮	帝京大・薬	r-suzuki@pharm.teikyo-u.ac.jp
15	小暮 健太郎	徳島大・薬	kogure@tokushima-u.ac.jp