

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 3 部門第 2 区分

【発行日】平成27年6月18日 (2015.6.18)

【公表番号】特表2014-512409(P2014-512409A)

【公表日】平成26年5月22日 (2014.5.22)

【年通号数】公開・登録公報2014-027

【出願番号】特願2014-508125(P2014-508125)

【国際特許分類】

A 6 1 K	9/16	(2006.01)
A 6 1 K	45/00	(2006.01)
A 6 1 K	9/127	(2006.01)
A 6 1 K	47/24	(2006.01)
A 6 1 K	47/28	(2006.01)
A 6 1 K	47/34	(2006.01)
A 6 1 K	38/00	(2006.01)
A 6 1 K	31/7088	(2006.01)
A 6 1 K	31/436	(2006.01)
A 6 1 K	31/506	(2006.01)
A 6 1 P	31/18	(2006.01)
A 6 1 P	31/20	(2006.01)
A 6 1 P	31/14	(2006.01)
A 6 1 P	35/00	(2006.01)
A 6 1 K	31/44	(2006.01)
A 6 1 K	31/404	(2006.01)
A 6 1 K	39/395	(2006.01)
A 6 1 K	31/517	(2006.01)
A 6 1 K	31/513	(2006.01)
A 6 1 K	31/522	(2006.01)
A 6 1 K	31/675	(2006.01)
A 6 1 K	31/7072	(2006.01)
A 6 1 K	47/04	(2006.01)

【 F I 】

A 6 1 K	9/16
A 6 1 K	45/00
A 6 1 K	9/127
A 6 1 K	47/24
A 6 1 K	47/28
A 6 1 K	47/34
A 6 1 K	37/02
A 6 1 K	31/7088
A 6 1 K	31/436
A 6 1 K	31/506
A 6 1 P	31/18
A 6 1 P	31/20
A 6 1 P	31/14
A 6 1 P	35/00
A 6 1 K	31/44
A 6 1 K	31/404
A 6 1 K	39/395

A 6 1 K 31/517  
A 6 1 K 31/513  
A 6 1 K 31/522  
A 6 1 K 31/675  
A 6 1 K 31/7072  
A 6 1 K 47/04

【手続補正書】

【提出日】平成27年4月27日(2015.4.27)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

複数のプロトセルを含むプロトセル組成物であって、前記プロトセルは、脂質二重層によって囲まれた多孔性のシリカコア又は多孔性の金属酸化物コアを含み、前記プロトセル組成物における前記複数のプロトセルは単分散である、プロトセル組成物。

【請求項 2】

複数のプロトセルを含むプロトセル組成物であって、前記プロトセルは、担持された脂質二重層を有するナノ多孔性のシリカコア又はナノ多孔性の金属酸化物コアと、

細胞を標的にする化学種と、

エンドソーム脱出を促進する融合ペプチドと、

二本鎖直鎖DNA、プラスミドDNA、薬物、造影剤、短鎖干渉RNA、短鎖ヘアピンRNA、マイクロRNA、及びタンパク質毒素からなる群から選択されるカーゴと、を含む、プロトセル組成物。

【請求項 3】

前記プロトセルが被包されたカーゴを含む、請求項 1 に記載のプロトセル組成物。

【請求項 4】

複数のプロトセルを含むプロトセル組成物であって、前記プロトセルが、

脂質二重層によって囲まれた多孔性のシリカコア又は多孔性の金属酸化物コアと、

融合ペプチドと、

被包されたカーゴと、

を含む、プロトセル組成物。

【請求項 5】

複数のプロトセルを含むプロトセル組成物であって、前記プロトセルが、

脂質二重層によって囲まれ、アミン含有シランによって修飾された多孔性のシリカコアと、

被包されたカーゴと、

を含む、プロトセル組成物。

【請求項 6】

複数のプロトセルを含むプロトセル組成物であって、前記プロトセルが、

脂質二重層によって囲まれた正電荷の多孔性シリカコア又は正電荷の多孔性金属酸化物コアと、

被包されたカーゴと、

を含む、プロトセル組成物。

【請求項 7】

前記プロトセル組成物が細胞を標的にする化学種を含む、請求項 1、3 から 6 のいずれ

かに記載のプロトセル組成物。

【請求項 8】

前記プロトセル組成物が融合ペプチドを含む、請求項 1、3、5 から 7 のいずれかに記載のプロトセル組成物。

【請求項 9】

前記被包されたカーゴが、二本鎖直鎖 DNA、プラスミド DNA、薬物、造影剤、短鎖干渉 RNA、短鎖ヘアピン RNA、マイクロ RNA、又はタンパク質毒素を含む、請求項 3 から 8 のいずれかに記載のプロトセル組成物。

【請求項 10】

前記プロトセルの前記シリカコアが、直径 10 nm ~ 250 nm の範囲である、請求項 1 から 9 のいずれかに記載のプロトセル組成物。

【請求項 11】

前記プロトセルの前記シリカコアが 150 nm の平均直径を有する、請求項 1 から 10 のいずれかに記載のプロトセル組成物。

【請求項 12】

前記プロトセルが単分散である、請求項 2 から 11 のいずれかに記載のプロトセル組成物。

【請求項 13】

前記プロトセルが多分散である、請求項 2 から 7 のいずれかに記載のプロトセル組成物。

【請求項 14】

前記脂質二重層は、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DOPC)、1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DPPC)、1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DSPC)、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホル - L - セリン] (DOPS)、1, 2 - ジオレオイル - 3 - トリメチルアンモニウム - プロパン (18 : 1 の DOTAP)、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - (1' - rac - グリセロール) (DOPG)、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (DOPE)、1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (DPPE)、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ (ポリエチレングリコール) - 2000] (18 : 1 PEG - 2000 PE)、1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ (ポリエチレングリコール) - 2000] (16 : 0 の PEG - 2000 PE)、1 - オレオイル - 2 - [12 - [(7 - ニトロ - 2 - 1, 3 - ベンゾオキサジアゾール - 4 - イル) アミノ] ラウロイル] - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (18 : 1 ~ 12 : 0 の NBD - PC)、1 - パルミトイル - 2 - {12 - [(7 - ニトロ - 2 - 1, 3 - ベンゾオキサジアゾール - 4 - イル) アミノ] ラウロイル} - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (16 : 0 - 12 : 0 の NBD - PC)、コレステロール、及びそれらの混合物からなる群から選択される脂質で構成される、請求項 1 から 13 のいずれかに記載のプロトセル組成物。

【請求項 15】

前記脂質二重層が、DOPC 及び DOPE を含む、請求項 1 から 14 のいずれかに記載のプロトセル組成物。

【請求項 16】

前記脂質二重層が、DOTAP、DOPG、又は DOPC を含む、請求項 1 から 15 のいずれかに記載のプロトセル組成物。

【請求項 17】

前記脂質二重層が DOPG 及び DOPC を含む、請求項 1 から 16 のいずれかに記載のプロトセル組成物。

【請求項 18】

前記脂質二重層がコレステロールを含む、請求項1から17のいずれかに記載のプロトセル組成物。

【請求項19】

前記脂質二重層が、脂質にコンジュゲートされたP E Gを含む、請求項1から18のいずれかに記載のプロトセル組成物。

【請求項20】

前記細胞を標的にする化学種がターゲティングペプチドである、請求項2、7から19のいずれかに記載のプロトセル組成物。

【請求項21】

前記細胞を標的にする化学種がS P 9 4ペプチドである、請求項2、7から20のいずれかに記載のプロトセル組成物。

【請求項22】

前記細胞を標的にする化学種が配列番号6、配列番号7、又は配列番号8である、請求項2、7から21のいずれかに記載のプロトセル組成物。

【請求項23】

前記細胞を標的にする化学種がM E T結合ペプチドである、請求項2、7から22のいずれかに記載のプロトセル組成物。

【請求項24】

前記M E T結合ペプチドが、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、又は配列番号5である、請求項23に記載のプロトセル組成物。

【請求項25】

前記融合ペプチドが、H 5 W Y Gペプチド（配列番号13）又はポリアルギニンの8 m e r（配列番号14）である、請求項2、4、8から24のいずれかに記載のプロトセル組成物。

【請求項26】

前記カーゴはプラスミドDNAを含み、該プラスミドDNAが核局在配列を発現するために任意で修飾される、請求項2から25のいずれかに記載のプロトセル組成物。

【請求項27】

前記カーゴはプラスミドDNAを含み、該プラスミドDNAが、超らせんプラスミドDNA又はパッケージングされたプラスミドDNAである、請求項2から26のいずれかに記載のプロトセル組成物。

【請求項28】

前記カーゴはプラスミドDNAを含み、該プラスミドDNAが、ヒストンでパッケージングされた超らせんプラスミドDNAであり、該ヒストンでパッケージングされた超らせんプラスミドDNAは、ヒトのヒストンタンパク質の混合物を含む、請求項2から27のいずれかに記載のプロトセル組成物。

【請求項29】

前記カーゴはプラスミドDNAであり、該プラスミドDNAが、タンパク質毒素、短鎖ヘアピンRNA（s h R N A）、又は短鎖干渉RNA（s i R N A）を発現可能である、請求項2から28のいずれかに記載のプロトセル組成物。

【請求項30】

前記タンパク質毒素が、リシン毒素A鎖又はジフテリア毒素A鎖からなる群から選択される、請求項29に記載のプロトセル組成物。

【請求項31】

前記カーゴが細胞のアポトーシスを誘導する、請求項2から30のいずれかに記載のプロトセル組成物。

【請求項32】

前記カーゴは、レポータータンパク質を発現可能なDNAを含む、請求項2から31のいずれかに記載のプロトセル組成物。

【請求項33】

前記レポータータンパク質が、緑色蛍光タンパク質又は赤色蛍光タンパク質である、請求項 3 2 に記載のプロトセル組成物。

【請求項 3 4】

前記カーゴは核局在配列にコンジュゲートされる、請求項 2 から 3 3 のいずれかに記載のプロトセル組成物。

【請求項 3 5】

前記核局在配列が、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、又は配列番号 12 のペプチドである、請求項 2 5 又は 3 4 に記載のプロトセル組成物。

【請求項 3 6】

前記カーゴが抗癌剤を含む、請求項 2 から 3 5 のいずれかに記載のプロトセル組成物。

【請求項 3 7】

前記カーゴが抗ウイルス剤を含む、請求項 2 から 3 6 のいずれかに記載のプロトセル組成物。

【請求項 3 8】

前記抗ウイルス剤が、抗 HIV 剤、抗 HBV 剤、又は抗 HCV 剤である、請求項 3 7 に記載のプロトセル組成物。

【請求項 3 9】

複数のプロトセルを含むプロトセル組成物であって、前記プロトセルが、担持された脂質二重層を有するナノ多孔性シリカコアと、M E T 結合ペプチドとを含む、プロトセル組成物。

【請求項 4 0】

前記プロトセルは、 $600\text{ m}^2/\text{g}$  以上の表面積を有する、請求項 1 から 3 9 のいずれかに記載のプロトセル組成物。

【請求項 4 1】

前記プロトセルは、単峰分布の細孔形態を有する、請求項 1 から 4 0 のいずれかに記載のプロトセル組成物。

【請求項 4 2】

前記プロトセルは、多峰分布の細孔形態を有する、請求項 1 から 4 0 のいずれかに記載のプロトセル組成物。

【請求項 4 3】

請求項 1 から 4 2 のいずれかに記載のプロトセル組成物の有効量と、医薬的に許容される担体、添加剤、又は賦形剤とを含む、医薬組成物。

【請求項 4 4】

前記プロトセル内にカーゴとして配置されない薬物を更に含む、請求項 4 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 4 5】

前記薬物が、抗癌剤又は抗ウイルス剤である、請求項 4 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 4 6】

前記抗ウイルス剤が、抗 HIV 剤、抗 HBV 剤、抗 HCV 剤、又はそれらの混合物である、請求項 4 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 4 7】

非経口剤形である請求項 4 3 から 4 6 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 4 8】

前記剤形が、皮内、筋肉内、骨内、腹腔内、静脈内、皮下、又は髄腔内投与の剤形である、請求項 4 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 4 9】

局所剤形又は経皮剤形である、請求項 4 3 から 4 6 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 5 0】

配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、又は配列番号 5 の M E T 結合ペプチド。

## 【請求項 5 1】

複数のプロトセルを含むプロトセル組成物であって、前記プロトセルは、抗癌剤、及び抗HBV剤、抗HCV剤又はそれらの混合物と組み合わせ、肝細胞癌の細胞に対して前記プロトセルが選択的に結合するようにターゲティングペプチドを含む、医薬組成物。

## 【請求項 5 2】

疾患の治療において使用するための、請求項 4 3 から 4 9、5 1 のいずれかに記載のプロトセル組成物。

## 【請求項 5 3】

癌の治療において使用するための、請求項 4 3 から 4 9、5 1 のいずれかに記載のプロトセル組成物。

## 【請求項 5 4】

癌の診断において使用するための、請求項 1 から 4 2 のいずれかに記載のプロトセル組成物。

## 【請求項 5 5】

癌治療観察において使用するための、請求項 1 から 4 2 のいずれかに記載のプロトセル組成物。

## 【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 2 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 2 2】

【図 1】エアロゾルによって支援される E I S A プロセスによって調製される本発明で用いられる一実施形態のナノ粒子が、粒子のサイズ及び分布を制御するために変えられ得ることを示す図である。

【図 2】一実施形態において、多くの種類のカーゴに合わせて設計されることが出来る細孔のサイズ及び骨格と、エアロゾル化した補助成分が容易に取り込まれることを示す。

【図 2 A】図 2 の a、b、c、及び e が、C T A B、B 5 8、P 1 2 3、及び P S + B 5 6 による鋳型であることを示す。A、B、C、D、及び E は、C T A P + N a C l、3 w t % の P 1 2 3、3 w t % の P 1 2 3 + ポリ（プロピレングリコールアクリレート）、ミクロエマルジョン、及び C T A B ( N H <sub>4</sub> )<sub>2</sub> S O<sub>4</sub> による鋳型である。

【図 3】一実施形態における、同時自己集合又は自己集合後の誘導体化によって細孔表面の化学的性質（即ち電荷及び疎水性）並びに細孔サイズが、有機シランと珪酸との共縮合によって主に制御されることを示す。Lin ら、Chem. Mater. 15, 4247-56 2003 ; Liu, J. ら、J. Phys. Chem., 104, 8323-2339, 2000 ; Fan, H. ら、Nature, 405, 56-60, 2000 ; Lu, Y. ら、J. Am. Chem. Soc., 122, 5258-5261, 2000 参照。

【図 4】ヒストンタンパク質による C B 1 プラスミドのパッケージングを示す。（A）は、C B 1 プラスミド（p C B 1）を超らせん化し、超らせん p C B 1 をヒストン H 1、H 2 A、H 2 B、H 3、及び H 4 でパッケージングし、得られた p C B 1 - ヒストン複合体を、核膜孔を通る移行を促進する核局在配列（N L S）で修飾するために用いられるプロセスを示す概念図である。（B）及び（D）は、C B 1 プラスミド（B）及びヒストンでパッケージングされた p C B 1（D）の原子間力顕微鏡法（A F M）画像である。スケールバー = 1 0 0 n m。（C）及び（E）は、それぞれ（B）及び（D）での赤線に対応する高さプロファイルを示す。

【図 5】ヒストンでパッケージングされた p C B 1 が装填された、M C 4 0 によって標的を定められたメソ多孔性のシリカナノ粒子に担持された脂質二重層（プロトセル）の合成を示す。（A）は、D N A を装填し、ペプチドで標的を定められたプロトセルを生成するために用いられるプロセスを示す概念図である。プロトセルのコアを形成するメソ多孔性のシリカナノ粒子を p C B 1 - ヒストン複合体の溶液中に単純に浸漬することによって、ヒストンでパッケージングされた p C B 1 をシリカナノ粒子に装填する。次に P E G 化リ

ポソームをDNAが装填されたコアと融合し、HCCに結合するターゲティングペプチド(MC40)と、内在化したプロトセルのエンドソーム脱出を促進するエンドソーム分解性ペプチド(H5WYG)とで更に修飾された、担持された脂質二重層(SLB)を形成する。スルフヒドリル-アミン架橋剤(スパーサーアーム = 9.5 nm)を用いて、C末端システイン残基で修飾したペプチドをSLB中のDOPE成分にコンジュゲートした。

(B)は、プロトセルのコアとして用いられるメソ多孔性のシリカナノ粒子の透過型電子顕微鏡法(TEM)画像である。スケールバー = 200 nm。挿入画像 = 走査型電子顕微鏡法(SEM)画像であって、15 ~ 25 nmの細孔が表面から利用可能であることを示す。挿入画像のスケールバー = 50 nm。(C)は、動的光散乱法(DLS)によって測定されたメソ多孔性のシリカナノ粒子のサイズ分布を示す。(D、左軸)バレット-ジョイナー-ハレング(BJH)モデルを用いて図14に示す窒素吸着等温線の吸着枝から計算された、メソ多孔性のシリカナノ粒子の累積細孔容積である。(D、右軸)DLSにより測定された、pCB1-ヒストン複合体のサイズ分布である。

【図6】一実施形態における、メソ多孔性のシリカナノ粒子がヒストンでパッケージングされたpCB1について高い収容能力を有し、得られたプロトセルが、エンドソーム環境を模倣する状況下でのみ被包されたDNAを放出することを示す。(A)は、未修飾のメソ多孔性のシリカナノ粒子( $\zeta = -38.5 \text{ mV}$ )又はアミン含有シランのAPTESで修飾されたメソ多孔性のシリカナノ粒子( $\zeta = +11.5 \text{ mV}$ )中に被包可能な、pCB1又はヒストンでパッケージングされたpCB1(「複合体」)の濃度を示す。(B)は、MC40で標的を定められ、pCB1が装填されたプロトセル( $1 \times 10^9$ 個)と共に $1 \times 10^6$ 細胞/mLを37 °Cで24時間培養した場合に、ZsGreen(pCB1によりコードされる緑色蛍光タンパク質)に対して陽性となるHep3Bの割合を示す。x軸は、プロトセルのコアがAPTESで修飾されたか否か及びpCB1がヒストンで予めパッケージングされたか否かを示す。(A)及び(B)では、DOTAPとDOPEとの混合物(1:1 w/w)でパッケージングされたpCB1を対照として含む。(C)及び(D)は、疑似体液(C)又はpH 5緩衝液(D)に暴露した際の、未修飾のメソ多孔性のシリカナノ粒子及び対応するプロトセルからの、ヒストンでパッケージングされたpCB1の時間に依存した放出を示す。プロトセルのSLBは、5 wt%のDOPE、30 wt%のコレステロール、及び10 wt%のPEG-2000を含むDOPCからなり、(B)については、0.015 wt%のMC40及び0.500 wt%のH5WYGで修飾された。全てのエラーバーは、 $n = 3$ の場合の95%信頼区間を表す(1.96 $\sigma$ )。

【図7】MC40で標的を定められたプロトセルが、ヒストンでパッケージングされたpCB1をHCCまで送達するプロセスを示す概念図である。[1]種々のHCC株により過剰発現されるMetへのターゲティングペプチドの動員によって、MC40で標的を定められたプロトセルは、Hep3B細胞に高親和性で結合する。流動性のDOPCのSLBはペプチドの流動性を促進し、それにより低いMC40密度で修飾されたプロトセルがHep3Bに対して高い特異親和性を保持することを可能にする(図8A参照)。[2]MC40で標的を定められたプロトセルは、受容体依存性エンドサイトーシスを介してHep3Bによって内在化される(図8B及び図15A参照)。[3]エンドソーム条件はSLBを不安定化し(Nature Materialsの参考文献を挿入)、エンドソーム分解性ペプチドH5WYGのプロトン化を引き起こす。これらは何れも、ヒストンでパッケージングされたpCB1がHep3B細胞の細胞質ゾル中に拡散することを可能にする(図16B参照)。[4]pCB1-ヒストン複合体は、核局在配列(NLS)で修飾された場合に、約24時間以内にHep3B細胞の核内に濃縮される(図16C参照)。これによって、分裂中及び非分裂中の癌細胞の両方での効率的なトランスフェクションが可能になる(図17参照)。

【図8】MC40で標的を定められたプロトセルがHCCに高親和性で結合し、Hep3Bによって内在化されるが正常肝細胞によっては内在化されないことを示す。(A)は、MC40で標的を定められたプロトセルをHep3B又は肝細胞に暴露した場合の見かけの解離定数( $K_d$ )を示す。 $K_d$ 値は、特異親和性に対して逆の関係にあり、飽和結合曲線

から求められた ( 図 2 1 参照 ) 。エラーバーは、 $n = 5$  の場合の 95 % 信頼区間を表す ( 1 . 96 ) 。( B ) 及び ( C ) は、MC 40 で標的を定められたプロトセル ( 1000 倍の過剰量 ) に 37 ° で 1 時間暴露された Hep 3 B ( B ) 及び肝細胞 ( C ) の共焦点蛍光顕微鏡法画像である。Met は Alexa Fluor ( 登録商標 ) 488 標識モノクローナル抗体で染色され ( 緑色 ) 、プロトセルコアは Alexa Fluor ( 登録商標 ) 594 で標識され ( 赤色 ) 、細胞核はヘキスト 33342 で染色された ( 青色 ) 。スケールバー = 20  $\mu$ m 。プロトセルの SLB は、5 wt % の D O P E 、30 wt % コレステロール、及び 10 wt % の P E G - 2000 ( 18 : 1 ) を含む D O P C からなり、0 . 015 wt % ( A ~ C ) 又は 0 . 500 wt % ( A ) の MC 40 ターゲティングペプチドで修飾された。

【図 9】MC 40 で標的を定められ、p C B 1 が装填されたプロトセルは、ピコモル濃度で H C C のアポトーシスを誘導するが、正常肝細胞の生存性に関してはごく小さい影響しか有さないことを示す。MC 40 で標的を定められ、p C B 1 が装填されたプロトセルに 37 ° で Hep 3 B を連続して暴露した際の、サイクリン B 1 の mRNA 及びサイクリン B 1 タンパク質の発現における用量 ( A ) 及び時間 ( B ) に依存した減少を示す。( A ) では、細胞を種々の p C B 1 濃度に 48 時間暴露し、( B ) では、5 p M の p C B 1 に種々の時間に渡って暴露した。肝細胞でのサイクリン B 1 タンパク質の発現及び Hep 3 B での Z s G r e e n の発現が、対照として含まれる。リアルタイム P C R 及び免疫蛍光法を用いて、サイクリン B 1 の mRNA 及びタンパク質それぞれの濃度を測定した。( C ) は、MC 40 で標的を定められ、p C B 1 が装填されたプロトセル ( [ p C B 1 ] = 5 p M ) に 37 ° で種々の時間に渡って連続して暴露した後の、 $G_2 / M$  期に停止した Hep 3 B の割合を示す。 $G_2 / M$  期の肝細胞の割合及び S 期の Hep 3 B の割合を比較のために含む。細胞は、細胞周期分析の前にヘキスト 33342 で染色された。( D ) は、MC 40 で標的を定められ、p C B 1 が装填されたプロトセル ( [ p C B 1 ] = 5 p M ) に 37 ° で種々の時間に渡って連続して暴露した際に、アポトーシス性になる Hep 3 B の割合を示す。アポトーシスのマーカーに陽性である肝細胞の割合を対照として含む。Alexa Fluor ( 登録商標 ) 647 標識 アネキシン V に陽性である細胞は、アポトーシスの初期にあると見なし、アネキシン V 及びヨウ化プロピジウムの両方に陽性である細胞は、アポトーシスの後期にあると見なした。アポトーシス性細胞の総数は、一方及び両方に陽性である細胞の数を加算して求められた。全ての実験において、プロトセルの SLB は、5 wt % の D O P E 、30 wt % コレステロール、及び 10 wt % の P E G - 2000 ( 18 : 1 ) を含む D O P C からなり、0 . 015 wt % の MC 40 及び 0 . 500 wt % の H 5 W Y G で修飾された。全てのエラーバーは、 $n = 3$  の場合の 95 % 信頼区間を表す ( 1 . 96 ) 。

【図 10】MC 40 で標的を定められ、p C B 1 が装填されたプロトセルが、対応するリポプレックスよりも 2500 倍有効に H C C の選択的なアポトーシスを誘導することを示す。( A ) は、D O P C プロトセル、10 wt % の P E G - 2000 ( 18 : 1 ) で修飾された D O P C プロトセル、p C B 1 と D O T A P 及び D O P E の混合物 ( 1 : 1 w / w ) とからなるリポプレックス、並びに 10 wt % の P E G - 2000 で修飾された D O T A P / D O P E リポプレックスの 電位の値を示す。全ての 電位測定は、0 . 5 x P B S ( p H 7 . 4 ) 中で行われた。( B 、左軸 ) MC 40 で標的を定められたプロトセル又はリポプレックスによって送達された 5 p M の p C B 1 に 37 ° で 48 時間連続して暴露した際に、アポトーシス性になる Hep 3 B 及び肝細胞の割合である。( B 、右軸 )  $1 \times 10^6$  個の Hep 3 B 細胞の 90 % において 37 ° で 48 時間以内にアポトーシスを誘導するのに必要な、MC 40 で標的を定められ、p C B 1 が装填されたプロトセル又はリポプレックスの数である。( B ) については、細胞は、Alexa Fluor ( 登録商標 ) 647 標識 アネキシン V 及びヨウ化プロピジウムで染色された。一方及び両方に陽性である細胞をアポトーシス性に見なした。プロトセルの SLB は、5 wt % の D O P E 、30 wt % コレステロール、及び 10 wt % の P E G - 2000 ( 表示される場合 ) を含む D O P C からなり、0 . 015 wt % の MC 40 及び 0 . 500 wt % の H 5 W Y G で修飾



された。DOTAP/DOPERiボブックスは、10 wt %のPEG-2000（表示される場合）、0.015 wt %のMC40、及び0.500 wt %のH5WYGで修飾された。pCB1は、全ての実験においてNLSで修飾された。全てのエラーバーは、 $n = 3$ の場合の95%信頼区間を表す（1.96）。

【図11】MC40で標的を定められたプロトセルが、肝細胞の生存性には影響を与えることなく、高濃度のタキソール、Bcl-2特異siRNA、及びpCB1をHCCに選択的に送達することを示す。（A）は、 $10^{12}$ 個のプロトセル、リボソーム、又はリボブックスの中に被包可能な、タキソール、Bcl-2の発現を抑制するsiRNA、及びCB1プラスミドの濃度を示す。赤色のバーは、タキソール及びpCB1の両方がプロトセルに装填された場合に、タキソール及びpCB1の濃度がどのように変わるかを示す。青色のバーは、タキソール、siRNA、及びpCB1のすべてがプロトセルに装填された場合又はsiRNA及びpCB1がリボブックスに装填された場合に、タキソール、siRNA、及びpCB1の濃度がどのように変わるかを示す。（B）は、MC40で標的を定められたプロトセルによってHep3Bまで送達された場合の、オレゴングリーン（登録商標）488標識タキソール（緑色）、AlexaFluor（登録商標）594標識siRNA（赤色）、及びCy5標識pDNA（白色）の細胞内分布を示す共焦点蛍光顕微鏡法画像である。細胞をMC40で標的を定められたプロトセルの1000倍の過剰量と共に37℃で24時間培養した後に固定して、ヘキスト33342で染色した（青色）。スケールバー = 10  $\mu$ m。（C）は、10 nMのタキソール及び/又は5 pMのpCB1に37℃で48時間暴露した際に、G<sub>2</sub>/M期に停止したHep3B、SNU-398、及び肝細胞細胞の割合を示す。割合は、G<sub>2</sub>/Mでの対数増殖細胞の割合に対して正規化された。（D）は、10 nMのタキソール、250 pMのBcl-2特異siRNA、及び/又は5 pMのpCB1に37℃で48時間暴露した際に、AlexaFluor（登録商標）647標識アネキシンV及びヨウ化プロビジウム（PI）について陽性になるHep3B、SNU-398、及び肝細胞の細胞の割合を示す。（C）及び（D）において、「pCB1」は、DOTAPとDOPEとの混合物（1:1 w/w）を用いてパッケージングされて細胞まで非特異的に送達されたpCB1を指す。全ての実験において、プロトセルのSLBは、5 wt %のDOPE、30 wt %のコレステロール、及び10 wt %のPEG-2000（18:1）を含むDOPCからなり、0.015 wt %のMC40及び0.500 wt %のH5WYGで修飾された。リボソームは、5 wt %のDMPE、30 wt %のコレステロール、及び10 wt %のPEG-2000（16:0）を含むDSPCからなり、0.015 wt %のMC40及び0.500 wt %のH5WYGで修飾された。リボブックスは、DOTAP:DOPE（1:1 w/w）混合物からなり、10 wt %のPEG-2000、0.015 wt %のMC40、及び0.500 wt %のH5WYGで修飾された。pCB1は、全ての実験においてNLSで修飾された。全てのエラーバーは、 $n = 3$ の場合の95%信頼区間を表す（1.96）。

【図12】CB1プラスミドのベクターマップを示す。CB1プラスミド（pCB1）は、RNAi-Ready pSIREN-RetroQ-ZsGreenベクター（クロンテック・ラボラトリーズ社、カリフォルニア州マウンテンビュー）及びpNEB193ベクター（ニュー・イングランド・バイオラボ社、マサチューセッツ州イプスウィッチ）から構築された。pCB1は、サイクリンB1特異的短鎖ヘアピンRNA（shRNA）及びスナギンチャク種の緑色蛍光タンパク質（ZsGreen）をコードする。構成的shRNA発現は、RNAPolIII依存性ヒトU6プロモーター（P<sub>U6</sub>）によって駆動され、構成的ZsGreen発現は、サイトメガロウイルスの最初期プロモーター（P<sub>CMV</sub>）によって駆動される。oriエレメント及びAmp<sup>R</sup>エレメントは、大腸菌内におけるプラスミドの増殖を可能にする。サイクリンB1特異的shRNAのセンス鎖及びアンチセンス鎖をコードするDNA配列に下線を付す。dsDNAオリゴヌクレオチドをpSIRENベクターに導入するために用いた制限酵素部位（BamHIは赤色、EcoRIは青色）が横にある。

【図13】ヒストンでパッケージングされたpCB1の特徴を示す。（A）は、漸増濃度

のヒストン（モル比 1 : 2 : 2 : 2 : 2 の H 1、H 2 A、H 2 B、H 3、及び H 4）に暴露された p C B 1 に関する電気泳動移動度シフトアッセイを示す。p C B 1 : ヒストンのモル比をレーン 3 ~ 6 に示す。レーン 1 は DNA ラダーを含み、レーン 2 は p C B 1 を含み添加ヒストンを含まない。（B）は、ヒストンでパッケージングされた p C B 1（p C B 1 : ヒストンのモル比 1 : 50）の TEM 画像である。スケールバー = 50 nm。

【図 1 4】未装填のメソ多孔性のシリカナノ粒子及び p C B 1 が装填されたメソ多孔性のシリカナノ粒子の窒素吸着分析を示す。（A）は、ヒストンでパッケージングされた p C B 1 の装填前後での、メソ多孔性のシリカナノ粒子の窒素吸着等温線である。（B）は、ヒストンでパッケージングされた p C B 1 の装填前後での、メソ多孔性のシリカナノ粒子のブルナウアー - エメット - テラー（BET）表面積である。エラーバーは、 $n = 3$  の場合の 95 % 信頼区間を表す（1.96）。

【図 1 5】DOPC プロトセルの小角中性子散乱（SANS）データを示す。フィッティングデータは、一定厚さの共形シェルを有する多分散な多孔性シリカ球のモデルを用いて得られたものであり、シリカ粒子の表面に細孔開口部を覆う 36 の二重層が存在することを示す。厚さ 0、20、60 の二重層についてシミュレーションされた SANS データを比較のために含む。測定された二重層の厚さ 36 は、平坦な担持された脂質二重層について行われた他の中性子研究（33 ~ 38）と一致しており、これらの対照条件下では、脂質二重層の水素に富む炭化水素コアからの散乱を主に示す。

【図 1 6】プロトセルが、被包された DNA をヌクレアーゼ分解から守ることを示す。DNase I 処理した p C B 1（レーン 3）、ヒストンでパッケージングされた p C B 1（レーン 5）、DOTAP と DOPE との 1 : 1（w/w）混合物でパッケージングされた p C B 1（レーン 7）、カチオン性コアを有するプロトセルに装填された p C B 1（レーン 9）、及びアニオン性コアを有するプロトセルに装填されたヒストンでパッケージングされた p C B 1（レーン 11）のアガロースゲル電気泳動を示す。裸の p C B 1（レーン 2）、ヒストンから放出された p C B 1（レーン 4）、DOTAP / DOPE リポブレンクスから放出された p C B 1（レーン 6）、カチオン性コアを有するプロトセルから放出された p C B 1（レーン 8）、及びアニオン性コアを有するプロトセルから放出されたヒストンでパッケージングされた p C B 1（レーン 10）を比較のために含む。レーン 1 は DNA ラダーを含む。試料を DNase I（50 ng の DNA 当たり 1 ユニット）と共に室温で 30 分培養し、p C B 1 放出は 1 % SDS を用いて促進された。

【図 1 7】メソ多孔性のシリカナノ粒子（「未修飾のコア」）、20 %（v/v）の APTE S 中に室温で 12 時間浸漬したメソ多孔性のシリカナノ粒子（「APTE S 修飾コア」）、CB1 プラスミド（「p C B 1」）、ヒストンでパッケージングされた p C B 1（「p C B 1 - ヒストン複合体」）、及び DOTAP と DOPE との 1 : 1（w/w）混合物でパッケージングされた p C B 1（「DOTAP / DOPE リポブレンクス」）の電位（ $\zeta$ ）の値を示す。電位測定は、0.5 x PBS（pH 7.4）中で行われた。エラーバーは、 $n = 3$  の場合の 95 % 信頼区間を表す（1.96）。

【図 1 8】図 6 及び 2 4 において ZsGreen 発現陽性の細胞の割合を求めるのに用いられた、代表的な前方散乱 - 側方散乱（FSC - SSC）プロット図及び FL - 1 ヒストグラムである。（A）~（D）は、ZsGreen 陰性細胞についての FSC - SSC プロット図（A 及び C）及び対応する FL - 1 ヒストグラム（それぞれ B 及び D）であり、（A）は細胞残屑を除外するためにゲーティングし、（C）はしていない。FL - 1 チャネルの平均蛍光強度（MFI）の値を、（B）及び（D）に示す。（E）~（H）は、ZsGreen 陽性細胞についての FSC - SSC プロット図（E 及び G）及び対応する FL - 1 ヒストグラム（それぞれ F 及び H）であり、（E）は細胞残屑を除外するためにゲーティングし、（G）はしていない。（F）及び（H）のゲートは、MFI = 282、即ち ZsGreen 陰性細胞の MFI の 100 倍（D 図参照）の細胞の割合に対応する。

【図 1 9】MC40 ターゲティングペプチドの識別を示す。図中に示す概念図は、MC40 ターゲティングペプチドを選択するのに用いられたプロセスを表す。1 x 10<sup>11</sup> pfu / mL のペプチドを、ヒト IgG の Fc ドメインに融合された 100 nM の組み換えヒト

Met ( rhMet ) と共に室温で 1 時間培養した。プロテイン A 又はプロテイン G でコーティングした磁性粒子を用いて Met - ファージ複合体を親和性捕捉し、続いて TBS ( 50 mM の Tris - HCl、150 mM の NaCl、pH 7.4 ) で 10 回洗浄して未結合のファージを除去した。結合したファージクローンは低 pH 緩衝液 ( 0.2 M グリシン、1 mg / mL の BSA、pH 2.2 ) で溶出し、溶出物を宿主細菌 ( 大腸菌 E R 2738 ) の感染によって増幅した。

【図 20】MC40 ターゲティングペプチドの特徴を示す。(A) は、5 回目の選択ラウンド後のペプチド配列アラインメントである。主配列 ASVHFPP は、以前に確認されていた Met 特異的な 12 mer の YLF SVHWPP LKA ( 配列番号 18、Zhao ら、ClinCancerRes 2007; 13(20 6049-6055) ) の下線部分に相似である。標的に無関係の HAIYPRH ペプチド ( 約 10% ) ( 配列番号 19、Brammer ら、Anal.Biochem. 377 (2008) 88-89 ) を提示するファージクローンは、配列アラインメントから除かれた。(B) 及び (C) は、親和性選択したファージクローンが rhMet に結合した度合を、酵素結合免疫吸着剤法 ( ELISA ) によって測定した。(B) に示す ELISA のスキームは、材料及び方法の項で説明する。ELISA の結果を (C) に示す。(D) は、Met に結合しないペプチドを除去した後の配列アラインメントである。図 19 に示す共通配列は、このアラインメントから決定された。(E) 及び (F) は、(1) Met に対する AlexaFluor (登録商標) 488 標識モノクローナル抗体と、無関係なファージクローン (TPDWLP) (配列番号 20) と、M13 ファージに対する AlexaFluor (登録商標) 546 標識モノクローナル抗体とに暴露された (青色のドット)、又は (2) Met に対する AlexaFluor (登録商標) 488 標識モノクローナル抗体と、MC40 クローンと、M13 ファージに対する AlexaFluor (登録商標) 546 標識モノクローナル抗体とに暴露された (橙色のドット)、Hep3B (E) 及び肝細胞 (F) についてのフローサイトメトリーの散布図である。未処理細胞 (赤色のドット) を用いて、FL-1 (AlexaFluor (登録商標) 488 蛍光) 及び FL-2 (AlexaFluor (登録商標) 546 蛍光) のチャンネルについての電圧パラメータを設定した。

【図 21】Hep3B に暴露された MC40 で標的を定められたプロトセルについての例示の結合曲線である。図 8 A の解離定数を求めるために、 $1 \times 10^6$  個の Hep3B 又は肝細胞をサイトカラシン D で前処理してエンドサイトーシスを抑制し、AlexaFluor (登録商標) 647 で標識され MC40 で標的を定められた種々の濃度のプロトセルと共に 37 °C で 1 時間培養した。フローサイトメトリーを用いて得られた細胞群の平均蛍光強度を測定し、プロトセル濃度に対してプロットして全体の結合曲線を得た。非特異的結合は、飽和濃度の非分類の肝細胞増殖因子の存在下において、AlexaFluor (登録商標) 647 で標識され MC40 で標的を定められたプロトセルと共に細胞を培養することによって求められた。特異的結合曲線は、非特異的結合曲線を全体の結合曲線から引くことによって得られた。 $K_d$  値は、特異的結合曲線から計算された。この図に示す実験において、プロトセルの SLB は 5 wt % の DOPC、30 wt % のコレステロール、及び 10 wt % の PEG-2000 (18:1) を含む DOPC からなり、0.015 wt % (約 6 ペプチド / 粒子) の MC40 ターゲティングペプチドで修飾された。対応する  $K_d$  値は  $1050 \pm 142$  pM である。全てのエラーバーは、 $n = 5$  の場合の 95% 信頼区間を表す (1.96 )。

【図 22】MC40 で標的を定められたプロトセルが受容体依存性エンドサイトーシスによって内在化され、H5WYG ペプチドの非存在下でリソソームへ誘導されることを示す。(A) は、Hep3B 又は肝細胞の細胞のそれぞれによって 1 時間以内に 37 °C で内在化された、MC40 で標的を定められたプロトセルの平均数である。 $1 \times 10^6$  個の細胞を飽和濃度 (100  $\mu$ g / mL) のヒト肝細胞増殖因子 (HGF) の非存在下 ( - ) 又は存在下 ( + ) において種々の濃度のプロトセルと共に培養し、フローサイトメトリーを用いて各細胞に結合した粒子の平均数を求めた。プロトセルを NBD 及び pHrodo (商標) で標識して、表面に結合した粒子を酸性細胞内区画に内在化されたものから区別した

(それぞれについて)。エラーバーは、 $n = 3$  の場合の 95% 信頼区間を表す (1.96)。 (B) は、プロトセルと、(1) Rab5、(2) Rab7、(3) リソソーム関連膜タンパク質 1 (LAMP-1) 又は (4) Rab11a との間のピアソンの相関係数 ( $r$  値) を示す。Hep3B 細胞を 1000 倍の過剰量の AlexaFluor (登録商標) 594 標識プロトセルと共に 37 で 1 時間培養した後、固定して透過処理し、Rab5、Rab7、LAMP-1、又は Rab11a に対して AlexaFluor (登録商標) 488 標識抗体と共に培養した。SlideBook ソフトウェアを用いて  $r$  値を求めた。 $r$  値は、 $n = 3 \times 50$  細胞の平均値  $\pm$  標準偏差として表される。 $r$  値計算の際に細胞境界の外のピクセルを無視できるように、微分干渉 (DIC) 画像を用いて Hep3B 細胞の境界線を定めた。プロトセルの SLB は、5 wt% の DOPC、30 wt% コレステロール、及び 10 wt% の PEG-2000 (18:1) を含む DOPC からなり、0.015 wt% の MC40 及び 0.500 wt% の H5WYG で修飾された。

【図 23】ヒストンでパッケージングされた pCB1 が NLS で修飾され、MC40 で標的を定められたプロトセルによって送達された場合に、HCC 細胞の核内で時間に依存して濃縮されることを示す。(A) ~ (C) は、MC40 で標的を定められ、pCB1 が装填された 1000 倍の過剰量のプロトセルに 37 で 15 分 (A)、12 時間 (B)、又は 24 時間 (C) 暴露された Hep3B 細胞の共焦点蛍光顕微鏡法画像である。(B) については、プロトセルのエンドソーム脱出及び pCB1 の細胞質ゾル内分散は、約 2 時間後までには明白であった。しかし、ZsGreen 発現は 12 ~ 16 時間まで検出可能でなかった。24 時間の時点で、Cy5 標識 pCB1 は細胞内全体に分布したままであった。一方、(C) において細胞質ゾルの染色が見えないのは、核内に局在したピクセルの飽和を回避するために Cy5 チャンネルのゲインを下げたせいである。シリカコアは AlexaFluor (登録商標) 594 で標識され (赤色)、pCB1 は Cy5 で標識され (白色)、細胞核はヘキスト 33342 で対比染色された (青色)。スケールバー = 20  $\mu$ m。(D) は、Cy5 で標識した pCB1 及びヘキスト 33342 で標識した Hep3B の核についての、時間に対するピアソンの相関係数 ( $r$  値) である。SlideBook ソフトウェアを用いて  $r$  値を求めた。 $r$  値は、 $n = 3 \times 50$  個の細胞の平均値  $\pm$  標準偏差として表される。 $r$  値計算の際に細胞境界の外のピクセルを無視できるように、微分干渉 (DIC) 画像を用いて Hep3B 細胞の境界線を定めた。プロトセルの SLB は、5 wt% の DOPC、30 wt% コレステロール、及び 10 wt% の PEG-2000 (18:1) を含む DOPC からなり、0.015 wt% の MC40 及び 0.500 wt% の H5WYG で修飾された。

【図 24】ヒストンでパッケージングされた pCB1 が NLS で修飾され、MC40 で標的を定められたプロトセルによって送達された場合に、分裂中及び非分裂中の HCC 細胞の両方をほぼ 100% の効率で選択的にトランスフェクションすることを示す。(A)、(C) 及び (E) は、MC40 で標的を定められ、pCB1 が装填された 1000 倍の過剰量のプロトセルに 37 で 24 時間暴露された Hep3B 細胞の共焦点蛍光顕微鏡法画像である。Hep3B 細胞は、(A) では分裂中であり、(C) 及び (E) では約 95% コンフルエントであった。全ての画像において pCB1 はヒストンで予めパッケージングされており、(E) において、pCB1 - ヒストン複合体は NLS で更に修飾された。シリカコアは AlexaFluor (登録商標) 594 で標識され (赤色)、pCB1 は Cy5 で標識され (白色)、細胞核はヘキスト 33342 で対比染色された (青色)。スケールバー = 20  $\mu$ m。(B)、(D) 及び (F) は、MC40 で標的を定められ、pCB1 が装填されたプロトセル (「PC」)  $1 \times 10^9$  個に 37 で 24 時間連続して暴露された際に、ZsGreen 発現陽性になる  $1 \times 10^6$  個の Hep3B 及び肝細胞の割合である。細胞は (B) では分裂中であり、(D) 及び (F) では約 95% コンフルエントであった。x 軸は、CB1 プラスミド (「pCB1」) 及び pCB1 - ヒストン複合体 (「複合体」) が NLS で修飾されていたか否かを示す。pCB1 単独に加えて、DOTAP と DOPC との 1:1 (w/w) 混合物でパッケージングされた pCB1 も対照として用いられた。細胞を 20 mg/mL の小麦胚芽アグルチニン (WGA) に暴露し、核膜孔複

合体を経る N L S 修飾した p C B 1 の移行を遮断した。エラーバーは、 $n = 3$  の場合の 95 % 信頼区間を表す ( 1 . 9 6 ) 。 ( G ) ~ ( I ) は、それぞれ ( A ) 、 ( C ) 及び ( E ) で用いた細胞の細胞周期のヒストグラムである。  $G_0 / G_1$  期の細胞の割合を各ヒストグラムについて示す。全ての実験において、プロトセルの S L B は 5 w t % の D O P E 、 3 0 w t % コレステロール、及び 1 0 w t % の P E G - 2 0 0 0 ( 1 8 : 1 ) を含む D O P C からなり、 0 . 0 1 5 w t % の M C 4 0 及び 0 . 5 0 0 w t % の H 5 W Y G で修飾された。

【図 2 5】 M C 4 0 で標的を定められ、 p C B 1 が装填されたプロトセルに 3 7 で 1 時間又は 7 2 時間暴露された H e p 3 B ( A ) 及び肝細胞 ( B ) の共焦点蛍光顕微鏡法画像を示す。 p C B 1 濃度は、全ての実験において 5 p M に維持された。 ( B ) の矢印は、有糸分裂細胞を示す。サイクリン B 1 は A l e x a F l u o r ( 登録商標 ) 5 9 4 標識モノクローナル抗体で標識され ( 赤色 ) 、細胞核はヘキスト 3 3 3 4 2 で染色された ( 青色 ) 。プロトセルの S L B は、 5 w t % の D O P E 、 3 0 w t % のコレステロール、及び 1 0 w t % の P E G - 2 0 0 0 ( 1 8 : 1 ) を含む D O P C からなり、 0 . 0 1 5 w t % の M C 4 0 及び 0 . 5 0 0 w t % の H 5 W Y G で修飾された。全てのスケールバー = 2 0  $\mu$  m 。

【図 2 6】 M C 4 0 で標的を定められ、 p C B 1 が装填されたプロトセルに 3 7 で 1 時間又は 7 2 時間暴露された H e p 3 B ( A ) 及び肝細胞 ( B ) の共焦点蛍光顕微鏡法画像を示す。 p C B 1 濃度は、全ての実験において 5 p M に維持された。細胞を A l e x a F l u o r ( 登録商標 ) 6 4 7 標識アネキシン V ( 白色 ) 及びヨウ化プロビジウム ( 赤色 ) で染色し、それぞれ初期及び後期のアポトーシスを試験した。細胞核はヘキスト 3 3 3 4 2 で対比染色された ( 青色 ) 。プロトセルの S L B は、 5 w t % の D O P E 、 3 0 w t % のコレステロール、及び 1 0 w t % の P E G - 2 0 0 0 ( 1 8 : 1 ) を含む D O P C からなり、 0 . 0 1 5 w t % の M C 4 0 及び 0 . 5 0 0 w t % の H 5 W Y G で修飾された。全てのスケールバー = 2 0  $\mu$  m 。

【図 2 7】双性イオン性脂質からなる S L B を有するプロトセルが、ごく低い非特異的細胞毒性しか誘導しないことを示す。  $1 \times 10^9$  個の A P T E S 修飾メソ多孔性のシリカナノ粒子、 A P T E S 修飾コアを有する D O P C プロトセル、スクランブル s h R N A 配列をコードするプラスミド ( 「スクランブル p C B 1」 ) が装填された D O P C プロトセル、又はスクランブル p C B 1 が装填された D O T A P / D O P E ( 1 : 1 w / w ) リボプレックスに 3 7 で 4 8 時間連続して暴露した際に、アポトーシス性になる  $1 \times 10^6$  個の H e p 3 B の割合を示す。プロトセル及びリボプレックスは、 1 0 w t % の P E G - 2 0 0 0 、 0 . 0 1 5 w t % の M C 4 0 、及び 0 . 5 0 0 w t % の H 5 W Y G で修飾された。正荷電及び負荷電のポリスチレンナノ粒子 ( それぞれ 「アミン - P S」 及び 「カルボキシル - P S」 ) を正の対照として用い、一方で 1 0 m M の抗酸化剤 N - アセチルシステイン ( N A C ) 又は 1 p m o l の遊離した p C B 1 に暴露された H e p 3 B を負の対照として用いた。全てのエラーバーは、  $n = 3$  の場合の 95 % 信頼区間を表す ( 1 . 9 6 ) 。

#### 【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 3 0

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 3 0】

< ヒストンでパッケージングされた p C B 1 が装填された、 M C 4 0 によって標的を定められたメソ多孔性のシリカナノ粒子に担持された脂質二重層 ( プロトセル ) の合成 >

図 5 に示すように、 5 ( A ) は D N A を装填し、ペプチドで標的を定められたプロトセルを生成するために用いられるプロセスを示す概念図である。この方法に従って、プロトセルのコアを形成するメソ多孔性のシリカナノ粒子を p C B 1 - ヒストン複合体の溶液中に単純に浸漬することによって、ヒストンでパッケージングされた p C B 1 をシリカナノ粒子に装填する。次に P E G 化リボソームを D N A が装填されたコアと融合し、 H C C に

結合するターゲティングペプチド (MC40) と、内在化したプロトセルのエンドソーム脱出を促進するエンドソーム分解性ペプチド (H5WYG) とで更に修飾された、担持された脂質二重層 (SLB) を形成する。スルフヒドリル - アミン架橋剤 (スパーサーアーム = 9.5 nm) を用いて、C 末端システイン残基で修飾したペプチドを SLB 中の DOPPE 成分にコンジュゲートした。図 5 (B) は、プロトセルのコアとして用いられるメソ多孔性のシリカナノ粒子の透過型電子顕微鏡法 (TEM) 画像である。スケールバー = 200 nm。挿入画像 = 走査型電子顕微鏡法 (SEM) 画像であって、15 ~ 25 nm の細孔が表面から利用可能であることを示す。挿入画像のスケールバー = 50 nm。5 (C) は、動的光散乱法 (DLS) によって測定されたメソ多孔性のシリカナノ粒子についてのサイズ分布を示す。(5D、左軸) バレット - ジョイナー - ハレンダ (BJH) モデルを用いて図 14 に示す窒素吸着等温線の吸着枝から計算された、メソ多孔性のシリカナノ粒子の累積細孔容積の線図である。(5D、右軸) DLS により測定された、pCB1 - ヒストン複合体のサイズ分布である。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0133

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0133】

< MC40 で標的を定められたプロトセルは HCC に高親和性で結合し、Hep3B によって内在化されるが正常肝細胞によっては内在化されない >

図 8 (A) は、MC40 で標的を定められたプロトセルを Hep3B 又は肝細胞に暴露した場合の見かけの解離定数 ( $K_d$ ) を示す。 $K_d$  値は、特異親和性に対して逆の関係にあり、飽和結合曲線から求められた (図 21 参照)。エラーバーは、 $n = 5$  の場合の 95% 信頼区間を表す (1.96)。図 8 (B) 及び (C) は、MC40 で標的を定められたプロトセル (1000 倍の過剰量) に 37 で 1 時間暴露された Hep3B (B) 及び肝細胞 (C) の共焦点蛍光顕微鏡法画像である。Met は AlexaFluor (登録商標) 488 標識モノクローナル抗体で染色され (緑色)、プロトセルコアは AlexaFluor (登録商標) 594 で標識され (赤色)、細胞核はヘキスト 33342 で染色された (青色)。スケールバー = 20  $\mu$ m。プロトセルの SLB は、5 wt% の DOPPE、30 wt% コレステロール、及び 10 wt% の PEG-2000 (18:1) を含む DOPC からなり、0.015 wt% (A ~ C) 又は 0.500 wt% (A) の MC40 ターゲティングペプチドで修飾された。