

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-507359
(P2025-507359A)

(43)公表日 令和7年3月18日(2025.3.18)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z Z N A	4 C 0 7 6
C 0 7 K	7/06 (2006.01)	C 0 7 K	7/06		4 C 0 8 4
C 0 7 K	5/103(2006.01)	C 0 7 K	5/103		4 C 0 8 6
C 0 7 K	14/00 (2006.01)	C 0 7 K	14/00		4 H 0 4 5
C 0 7 K	7/08 (2006.01)	C 0 7 K	7/08		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全58頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-547456(P2024-547456)	(71)出願人	522006144	(74)代理人 100127926 弁理士 結田 純次 100216105 弁理士 守安 智	
(86)(22)出願日	令和5年2月9日(2023.2.9)		コード バイオセラピューティクス イン		
(85)翻訳文提出日	令和6年8月29日(2024.8.29)		コーポレイテッド		
(86)国際出願番号	PCT/US2023/062270		アメリカ合衆国ペンシルベニア州190		
(87)国際公開番号	WO2023/154788		02. ローワー・グウィネッド・スイー		
(87)国際公開日	令和5年8月17日(2023.8.17)		ト300.ビルディング9.ノリスタウ	(72)発明者 ロバート・シー・ゲッツ アメリカ合衆国ペンシルベニア州190 02. ローワー・グウィネッド・スイー ト300.ビルディング9.ノリスタウ 最終頁に続く	
(31)優先権主張番号	63/308,776		ン・ロード727		
(32)優先日	令和4年2月10日(2022.2.10)	(74)代理人	100127926		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	弁理士 結田 純次		
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV		100216105		
			弁理士 守安 智		
			ロバート・シー・ゲッツ		
			アメリカ合衆国ペンシルベニア州190		
			02. ローワー・グウィネッド・スイー		
			ト300.ビルディング9.ノリスタウ		
			最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 増強されたDNAデンドリマー及びその使用方法

(57)【要約】

本明細書において、標的化部分に連結されたDNAデンドリマー及びカーゴポリヌクレオチドを含む組成物が記載され、幾つかの実施形態では、カーゴポリヌクレオチドは、DNAデンドリマーに直接連結されている。幾つかの実施形態では、カーゴポリヌクレオチドは、アダプター分子によりDNAデンドリマーに連結されている。幾つかの実施形態では、カーゴポリヌクレオチドは、少なくとも1つのプロモーター及び関心対象の少なくとも1種の分子をコードする少なくとも1つのコード配列を含み、完全な環状ポリヌクレオチド、ニックの入った環状ポリヌクレオチド、閉じた5'及び3'末端を有する直鎖状ポリヌクレオチド、開いた5'及び3'末端を有する直鎖状ポリヌクレオチド、ならびに1つの開いた末端及び1つの閉じた末端を有する直鎖状ポリヌクレオチドからなる群から選択されるトポロジーを有する。幾つかの実施形態では、本明細書におけるカーゴポリヌクレオチドは、DNA標的配列(DTS)、核局在化シグナル配列(NLS)、またはDNAデンドリマー結合配列のうちの1つ以上を任意に含む。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的化部分と、
アダプター分子－カーゴポリヌクレオチド複合体と、
に連結されたか、またはそれらと会合した DNA デンドリマーを含む組成物。

【請求項 2】

前記 DNA デンドリマーが、前記アダプター分子との静電的相互作用、共有結合、非共有結合、または水素結合により前記アダプター分子－カーゴポリヌクレオチド複合体に連結されている、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記カーゴポリヌクレオチドが、少なくとも 1 つのプロモーター、及び関心対象の少なくとも 1 種の分子をコードする少なくとも 1 つのコード配列を含み、前記カーゴポリヌクレオチドが、ニックの入った環状ポリヌクレオチド、閉じた 5' 及び 3' 末端を有する直鎖状ポリヌクレオチド、開いた 5' 及び 3' 末端を有する直鎖状ポリヌクレオチド、または 1 つの開いた末端及び 1 つの閉じた末端を有する直鎖状ポリヌクレオチドであり、前記 1 つの開いた末端及び前記 1 つの閉じた末端が、前記ポリヌクレオチドの 5' 及び 3' のいずれかに存在し得る、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記カーゴポリヌクレオチドが、少なくとも 1 つの DNA 標的化配列 (D T S) を更に含む、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記少なくとも 1 つの D T S が、前記少なくとも 1 つのプロモーターの上流に存在する、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記少なくとも 1 つの D T S が、前記少なくとも 1 つのプロモーターの下流に存在する、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記カーゴポリヌクレオチドが 2 つ以上の D T S を含む、請求項 4 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 8】

前記 2 つ以上の D T S が互いに隣接して存在するか、または互いにほぼ隣接して存在する、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記 2 つ以上の D T S が互いに隣接して存在しないか、または互いにほぼ隣接して存在しない、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記カーゴポリヌクレオチドが、少なくとも 1 つの核局在化シグナル配列 (N L S) を更に含む、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 11】

前記少なくとも 1 つの N L S が、前記少なくとも 1 つのプロモーターの上流に存在する、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記少なくとも 1 つの N L S が、前記少なくとも 1 つのプロモーターの下流に存在する、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記カーゴポリヌクレオチドが、少なくとも 1 つの D T S 及び少なくとも 1 つの N L S を含む、請求項 6 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 14】

前記アダプター分子が、DNA デンドリマー結合配列 (D B S) 及びカーゴ結合領域 (C B R) を含む、請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 15】

前記アダプターが前記DBSを介して前記DNAデンドリマーに連結されている、請求項14に記載の組成物。

【請求項 16】

前記DBSが、前記DNAデンドリマーの核酸配列に相補的な核酸配列を含む、請求項14または15に記載の組成物。

【請求項 17】

前記DBSが、TAGAGGTAACAACCTAGCGTACAA（配列番号3）、CTCAGCTTGTACTCTAGTTGTACCTCTAATGCTGGACCTCAGC（配列番号22）、またはCCTCAGCACCCCTACAGAGTAACCTAGATTGATCAAAACACCTCAGC（配列番号23）の核酸配列を含む、請求項14～16のいずれか1項に記載の組成物。

10

【請求項 18】

前記DBSが、前記DBSの5'または3'末端のいずれかにポリチミン配列を更に含む、請求項14～17のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 19】

前記DBSが、TAGAGGTAACAACCTAGCGTACAAATTTTTTTTTT（配列番号4）の核酸配列を含む、請求項18に記載の組成物。

【請求項 20】

前記カーゴ結合領域（CBR）が、DNAライゲーションにより前記カーゴポリヌクレオチドに連結されていてもよく、すなわち、共有結合、例えば、ホスホジエステル結合により前記ポリヌクレオチドに連結されている、請求項14～19のいずれか1項に記載の組成物。

20

【請求項 21】

前記CBRが、化学的カップリングにより前記カーゴポリヌクレオチドに連結されていてもよく、すなわち、共有結合、例えば、ジスルフィド結合により前記ポリヌクレオチドに連結されている、請求項14～19のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 22】

前記カーゴ結合領域が少なくとも1つのシステインを含む、請求項14～21のいずれか1項に記載の組成物。

30

【請求項 23】

前記アダプター分子が、例えば、組成物複合体を単離／精製するためのアフィニティータグとして使用され得るタグなどのタグを更に含む、請求項14～22のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 24】

前記タグが前記DBSと前記CBRとの間に存在する、請求項23に記載の組成物。

【請求項 25】

前記タグがポリヒスチジンタグである、請求項24に記載の組成物。

【請求項 26】

前記アダプター分子が、少なくとも1つの核局在化シグナル配列（NLS）を更に含む、請求項14～25のいずれか1項に記載の組成物。

40

【請求項 27】

前記少なくとも1つのNLSが、前記DBSと前記カーゴ結合領域との間に存在するか、または前記DBS及び前記カーゴ結合領域と重なる、請求項26に記載の組成物。

【請求項 28】

前記少なくとも1つのNLSが、本明細書において開示される1つ以上のNLS配列を含む、請求項26または27に記載の組成物。

【請求項 29】

前記少なくとも1つのNLSが、YPDEVKRKKKP（配列番号1）のアミノ酸配列を含む、請求項26～28のいずれか1項に記載の組成物。

50

【請求項 30】

前記少なくとも1つのNLSが、S L L E S P F D K P D E V K R K K K P P T S H Q S D A T A E D D S S S K K K (配列番号2)のアミノ酸配列を含む、請求項26～28のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 31】

前記少なくとも1つのNLSが、前記少なくとも1つのNLSの前または後のいずれかに存在する少なくとも1つのスペーサーを更に含む、請求項26～30のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 32】

前記少なくとも1つのNLSが、前記少なくとも1つのNLSの前または後に存在する2つのスペーサーを含み、例えば、前記NLSの前に1つ及び前記NLSの後に1つ、または前記NLSの前または後に両方のスペーサーを含む、請求項31に記載の組成物。

10

【請求項 33】

前記スペーサーまたは複数の前記スペーサーが、ポリエチレングリコール(PEG)、アルギン酸プロピレングリコール(PGA)、PEG-ポリ乳酸(PLA)、ポリ乳酸-グリコール酸コポリマー(PGLA)、またはそれらの任意の組み合わせを含む、請求項31または32に記載の組成物。

【請求項 34】

前記スペーサーまたは前記複数のスペーサーが、任意によりアラニン及び／またはセリン残基と共に、ポリグリシン配列を含む、請求項31または32に記載の組成物。

20

【請求項 35】

前記スペーサーまたは複数の前記スペーサーが、G G G G (配列番号5)のアミノ酸配列を有する、請求項34に記載の組成物。

【請求項 36】

前記アダプター分子が、少なくとも1つのDNA標的化配列(DTS)を更に含む、請求項14～35のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 37】

前記少なくとも1つのDTSが、前記DBSと前記CBRとの間に存在するか、または前記DBS及び前記CBRと重なる、請求項36に記載の組成物。

【請求項 38】

前記アダプター分子が細胞貫通ペプチド配列(CPP)を更に含む、請求項14～37のいずれか1項に記載の組成物。

30

【請求項 39】

前記CPPが、前記DBSと前記CBRとの間に存在するか、または前記DBS及び前記CBRと重なっている、請求項38に記載の組成物。

【請求項 40】

前記CPPが本明細書において開示されるCPPを含む、請求項38または39に記載の組成物。

【請求項 41】

前記CPPが、Q P R R R P R R K K R G (配列番号6)のアミノ酸配列を含む、請求項38～40のいずれか1項に記載の組成物。

40

【請求項 42】

前記アダプター分子が少なくとも1つの切断部位を更に含む、請求項14～41のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 43】

前記少なくとも1つの切断部位が、前記DBSと前記CBRとの間に存在するか、または前記DBS及び前記CBRと重なる、請求項42に記載の組成物。

【請求項 44】

前記切断部位が前記DBSに隣接して存在する、請求項42または43に記載の組成物。

50

【請求項 45】

前記切断部位が V a l - C i t リンカーである、請求項 42～44 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 46】

前記アダプター分子が少なくとも 1 つの可動性リンカーを更に含む、請求項 14～45 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 47】

前記少なくとも 1 つの可動性リンカーが、前記 D N S と前記 C B R との間に存在する、請求項 46 に記載の組成物。

【請求項 48】

前記少なくとも 1 つの可動性リンカーが、ポリエチレングリコール (P E G)、アルギン酸プロピレングリコール (P G A)、P E G - ポリ乳酸 (P L A)、ポリ乳酸 - グリコール酸コポリマー (P G L A)、(G G) n、(G G G G S) n、または (G G G G A) n からなる群から選択され、各 n が独立して 1～5 である、請求項 46 または 47 に記載の組成物。

【請求項 49】

前記組成物が補助分子を更に含む、請求項 1～47 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 50】

前記補助分子が前記 D N A デンドリマーに連結されている、請求項 49 に記載の組成物。

【請求項 51】

前記補助分子が前記 D N A デンドリマーに連結されていない、請求項 49 に記載の組成物。

【請求項 52】

前記補助分子が、前記カーゴポリヌクレオチド、前記 D N A デンドリマー、またはその両方のサイズを圧縮する、請求項 49～51 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 53】

前記補助分子が核への送達を補助することができる、請求項 49～52 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 54】

前記補助分子が、前記カーゴポリヌクレオチド、前記 D N A デンドリマー、またはその両方をヌクレアーゼ分解から保護することができる、請求項 49～53 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 55】

前記補助分子が、前記組成物の形質移入効率を増強することができる、請求項 49～54 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 56】

前記補助分子が、A T P K K S T K K T P K K A K K A T P K K S T K K T P K K A K K (配列番号 12)、W R R R G F G R R R (配列番号 13)、G R K K R R Q R R R P Q (配列番号 14)、P K K K R K V (配列番号 15)、G L F H A I A H F I H G G W H G L I H G W Y G (配列番号 16)、W E A A L A E A L A E A L A E H L A E A L A E A L E A L A A (配列番号 17)、H H H H H H H H H H (配列番号 18)、(K K) q のアミノ酸配列を含み、q が 2～15 である、請求項 49～55 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 57】

前記補助分子が、G L F H A I A H F I H G G W H G L I H G W Y G W S Q P P K K K R K V A T P K K S T K K T P K K A K K A T P K K S T K K T P K K A K K (配列番号 19) のアミノ酸配列を含む、請求項 49～56 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 58】

前記補助分子が、H H H H H H H H H H A T P K K S T K K T P K K A K K A T P K K

10

20

30

40

50

【請求項 59】

【請求項 60】

【請求項 6 1】

【請求項 6 2】

【請求項 63】

【請求項 64】

【請求項 65】

【請求項 66】

【請求項 67】

【請求項 68】

前記カーゴポリヌクレオチドがニックの入った環状ポリヌクレオチドである、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 69】

前記カーゴポリヌクレオチドが、前記 DNA デンドリマーに共有結合的に連結されていない、請求項 64～68 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 70】

前記カーゴポリヌクレオチドが、少なくとも 1 つの DNA 標的化配列 (DTS) を更に含む、請求項 64～69 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 71】

前記 DTS が前記カーゴポリヌクレオチド内に存在する、請求項 70 に記載の組成物。

10

【請求項 72】

前記 DTS が前記カーゴポリヌクレオチドに連結されている、請求項 70 に記載の組成物。

【請求項 73】

前記カーゴポリヌクレオチドが、ニックの入った環状ポリヌクレオチドであり、前記 DTS が、一本鎖 DNA 切断点 (すなわち、ニックの位置) で前記カーゴポリヌクレオチドに連結されている、請求項 72 に記載の組成物。

【請求項 74】

前記カーゴポリヌクレオチドが、少なくとも 1 つの核局在化シグナル配列 (NLS) を更に含む、請求項 64～73 のいずれか 1 項に記載の組成物。

20

【請求項 75】

前記カーゴポリヌクレオチドが、少なくとも 1 つの DTS 及び少なくとも 1 つの NLS を含む、請求項 64～74 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 76】

前記 DBS が、TAGAGGTAACAACCTAGCGTACAA (配列番号 3)、CTCAGCTTGTACTCTAGTTGTACCTCTAATGCTGGACCTCAGC (配列番号 22)、または CTCAGCACCCCTACAGAGTAACCTAGATTGATCAAAACACCTCAGC (配列番号 23) の核酸配列を含む、請求項 66～75 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 77】

30

前記 DBS が、前記 DBS の 5' または 3' 末端のいずれかにポリチミン配列を更に含む、請求項 76 に記載の組成物。

【請求項 78】

前記 DBS が、TAGAGGTAACAACCTAGCGTACAAATTTTTTTTTT (配列番号 4) の核酸配列を含む、請求項 77 に記載の組成物。

【請求項 79】

前記補助分子が前記 DNA デンドリマーに連結されている、請求項 64～78 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 80】

前記補助分子が前記 DNA デンドリマーに連結されていない、請求項 64～79 のいずれか 1 項に記載の組成物。

40

【請求項 81】

前記補助分子が、前記カーゴポリヌクレオチド、前記 DNA デンドリマー、またはその両方のサイズを圧縮する、請求項 64～80 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 82】

前記補助分子が核への送達を補助することができる、請求項 64～81 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 83】

前記補助分子が、前記カーゴポリヌクレオチド、前記 DNA デンドリマー、またはその両方をヌクレアーゼ分解から保護することができる、請求項 64～82 のいずれか 1 項に

50

【請求項 97】

前記カーゴポリヌクレオチドの前記コード配列が、抗体、酵素、タンパク質、miRNA、siRNA、アンチセンスRNAなどをコードする、請求項1～97のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 98】

前記組成物の窒素／リン酸（N／P）比が、0.5～10である、請求項1～97のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 99】

前記組成物のN／P比が2～5である、請求項98に記載の組成物。

【請求項 100】

請求項1～99のいずれか1項に記載の組成物及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 101】

関心対象の分子を標的細胞の核に送達する方法であって、前記方法が、標的細胞を請求項1～99のいずれか1項に記載の組成物または請求項100に記載の医薬組成物と接触させることを含み、前記標的化部分が前記標的細胞に結合する、前記方法。

【請求項 102】

前記カーゴポリヌクレオチドが、前記標的細胞の核内で前記関心対象の分子を発現する、請求項101に記載の方法。

【請求項 103】

前記カーゴポリヌクレオチドが、前記標的細胞の核内で2種以上の関心対象の分子を発現する、請求項101または102に記載の方法。

【請求項 104】

前記カーゴポリヌクレオチドが組織特異的プロモーターを含む、請求項101～103のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 105】

前記標的化部分が組織特異的な標的化部分である、請求項101～104のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 106】

前記組成物または医薬組成物が、2種以上の標的化部分を含む、請求項101～105のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 107】

疾患を処置する方法であって、前記方法が、請求項1～99のいずれか1項に記載の組成物または請求項100に記載の医薬組成物を対象に投与して、前記疾患を処置することを含み、前記標的化部分が標的細胞に結合する、前記方法。

【請求項 108】

前記カーゴポリヌクレオチドが、前記標的細胞の核内で前記関心対象の分子を発現する、請求項107に記載の方法。

【請求項 109】

前記カーゴポリヌクレオチドが、前記標的細胞の核内で2種以上の関心対象の分子を発現する、請求項107または108に記載の方法。

【請求項 110】

前記カーゴポリヌクレオチドが組織特異的プロモーターを含む、請求項107～109のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 111】

前記標的化部分が組織特異的な標的化部分である、請求項107～110のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 112】

前記組成物または医薬組成物が、2種以上の標的化部分を含む、請求項107～111のいずれか1項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1 3】

少なくとも 2 つの制限酵素認識部位を含むプラスミド骨格、少なくとも 1 つのプロモーター、関心対象の少なくとも 1 種の分子をコードする少なくとも 1 つのコード配列、及び任意に DNA デンドリマー結合配列 (DBS) を含むプラスミドであって、前記プラスミドが 1 つ以上の 5' 末端及び 3' 末端を有するか、またはそれらのいずれも有さないかに応じて、前記プラスミドが様々な構造を有するカーゴポリヌクレオチドを形成することができる、前記プラスミド。

【請求項 1 1 4】

前記プラスミドが、完全な環状ポリヌクレオチド、ニックの入った環状ヌクレオチド、閉じた 5' 及び 3' 末端を有する直鎖状ヌクレオチド、開いた 5' 及び 3' 末端を有する直鎖状ヌクレオチド、ならびに 1 つの開いた末端及び 1 つの閉じた末端を有する直鎖状ヌクレオチドである、請求項 1 1 3 に記載のプラスミド。

【請求項 1 1 5】

前記ニックの入った環状ヌクレオチド、閉じた 5' 及び 3' 末端を有する直鎖状ヌクレオチド、開いた 5' 及び 3' 末端を有する直鎖状ヌクレオチド、ならびに 1 つの開いた末端及び 1 つの閉じた末端を有する直鎖状ヌクレオチドが、1 種以上の制限酵素で前記プラスミドを切断することにより形成される、請求項 1 1 3 に記載のプラスミド。

【請求項 1 1 6】

前記プラスミドが、少なくとも 1 つの DNA 標的化配列 (DTS) を更に含む、請求項 1 1 3 ~ 1 1 5 のいずれか 1 項に記載のプラスミド。

20

【請求項 1 1 7】

前記少なくとも 1 つの DTS が、前記プラスミド骨格に存在し、すなわち、前記少なくとも 2 つの制限酵素認識部位の間に存在するか、またはそれらと重なっている、請求項 1 1 6 に記載のプラスミド。

【請求項 1 1 8】

前記少なくとも 1 つの DTS が、前記少なくとも 1 つのプロモーターの上流に存在する、請求項 1 1 6 または 1 1 7 に記載のプラスミド。

【請求項 1 1 9】

前記少なくとも 1 つの DTS が、前記少なくとも 1 つのプロモーターの下流に存在する、請求項 1 1 6 または 1 1 7 に記載のプラスミド。

30

【請求項 1 2 0】

前記カーゴポリヌクレオチドが、少なくとも 1 つの核局在化シグナル配列 (NLS) を更に含む、請求項 1 1 3 ~ 1 1 9 のいずれか 1 項に記載のプラスミド。

【請求項 1 2 1】

前記少なくとも 1 つの NLS が、前記少なくとも 1 つのプロモーターの上流に存在する、請求項 1 2 0 に記載のプラスミド。

【請求項 1 2 2】

前記少なくとも 1 つの NLS が、前記少なくとも 1 つのプロモーターの下流に存在する、請求項 1 2 0 に記載のプラスミド。

【請求項 1 2 3】

前記カーゴポリヌクレオチドが、少なくとも 1 つの DTS 及び少なくとも 1 つの NLS を含む、請求項 1 1 6 ~ 1 2 2 のいずれか 1 項に記載のプラスミド。

40

【請求項 1 2 4】

前記 DBS が、TAGAGGTAACAACCTAGCGTACAA (配列番号 3)、CTCAGCTTGTACTCTAGTTGTACCTCTAATGCTGGACCTCAGC (配列番号 22)、または CCTCAGCACCCCTACAGAGTAACCTAGATTGATCAAACACCTCAGC (配列番号 23) の核酸配列を含む、請求項 1 1 6 ~ 1 2 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 1 2 5】

前記 DBS が、前記 DBS の 5' または 3' 末端のいずれかにポリチミン配列を更に含む

50

、請求項 1 2 4 に記載の組成物。

【請求項 1 2 6】

前記 DBS が、TAGAGGTAAACAACCTAGCGTACAATTTTTTTTTTTT (配列番号 4) の核酸配列を含む、請求項 1 2 5 に記載の組成物。

【請求項 1 2 7】

前記少なくとも 1 つのプロモーターが、組織特異的プロモーターである、請求項 1 1 6 ~ 1 2 6 のいずれか 1 項に記載のプラスミド。

【請求項 1 2 8】

前記プラスミドが、2 種以上の関心対象の分子をコードするポリヌクレオチド配列を含む、請求項 1 1 6 ~ 1 2 6 のいずれか 1 項に記載のプラスミド。

10

【請求項 1 2 9】

請求項 1 ~ 6 3 のいずれか 1 項に記載の組成物を製造する方法であって、前記方法が、請求項 1 1 3 ~ 1 2 9 のいずれか 1 項に記載のプラスミドを、前記制限酵素認識部位で切断する 1 種以上の制限酵素と接触させて、ニックの入った環状ポリヌクレオチド、閉じた 5' 及び 3' 末端を有する直鎖状ポリヌクレオチド、開いた 5' 及び 3' 末端を有する直鎖状ポリヌクレオチド、または 1 つの開いた末端及び 1 つの閉じた末端を有する直鎖状ポリヌクレオチドを形成させることと、

前記カーゴポリヌクレオチドを前記アダプター分子に連結させて、アダプター分子-カーゴポリヌクレオチド複合体を形成させることと、

前記アダプター分子-カーゴポリヌクレオチド複合体及び標的化部分を DNA デンドリマーに連結させて、前記組成物を形成させることと、を含む、前記方法。

20

【請求項 1 3 0】

請求項 6 4 ~ 9 9 のいずれか 1 項に記載の組成物を製造する方法であって、前記方法が、

DNA デンドリマー結合配列 (DBS) を含む請求項 1 1 3 ~ 1 2 9 のいずれか 1 項に記載のプラスミドを、前記制限酵素認識部位で切断する 1 種以上の制限酵素と接触させて、ニックの入った環状ポリヌクレオチド、閉じた 5' 及び 3' 末端を有する直鎖状ポリヌクレオチド、開いた 5' 及び 3' 末端を有する直鎖状ポリヌクレオチド、または 1 つの開いた末端及び 1 つの閉じた末端を有する直鎖状ポリヌクレオチドを形成させることと、

前記カーゴポリヌクレオチド及び標的化部分を DNA デンドリマーに連結させて、前記組成物を形成させることと、を含む、前記方法。

30

【請求項 1 3 1】

請求項 6 4 ~ 9 9 のいずれか 1 項に記載の組成物を製造する方法であって、前記方法が、

請求項 1 1 3 ~ 1 2 9 のいずれか 1 項に記載の切断されていない環状プラスミドを標的化部分に連結された DNA デンドリマーと、前記カーゴポリヌクレオチド及び前記 DNA デンドリマーのサイズを圧縮することができる補助分子と共に接触させることであって、その結果、前記カーゴポリヌクレオチド及び前記 DNA デンドリマーが互いに会合して、前記組成物を形成する、前記接触させることを含む、前記方法。

【請求項 1 3 2】

請求項 1 ~ 9 9 に記載の組成物、請求項 1 0 0 に記載の医薬組成物、請求項 1 1 3 ~ 1 2 9 のいずれか 1 項に記載のプラスミド、またはそれらの幾つかの組み合わせを含むキット。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、2022 年 2 月 10 日に提出された米国仮出願第 63 / 308, 776 号の優先権を主張し、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0 0 0 2】

50

本発明の実施形態は、標的化分子、カーゴ分子、アダプター分子、補助分子、またはそれらの組み合わせに連結されたか、またはそれらをコードするDNAデンドリマー及び他の分子、ならびにそれらの使用方法及びそれらを生成させる方法に関する。

【背景技術】

【0003】

多数の研究、診断、及び治療用途において、分子、例えば、レポータープローブ、低分子薬物、ペプチド、または核酸の作用標的は、細胞内に存在する。標的細胞内での転写及び／または翻訳を必要とする核酸では、当該核酸は、細胞核に安全に輸送されなければならない。しかしながら、選択された細胞種への分子の標的化、細胞質ゾルへの細胞内送達
10
の達成、及びその後の目的の細胞内区画、例えば、核への輸送は、困難な目標である。更に、治療用核酸カーゴは、分解から安全に守られなければならない、制限され過ぎることも多過ぎることもない量で核において発現しなければならない。従って、治療用核酸などの分子を分解されることなく標的細胞の核に確実に送達することができ、発現を最適化する能力を有する組成物の必要性が存在する。本開示は、この必要性などに取り組むものである。

【発明の概要】

【0004】

本明細書において、標的化部分及びカーゴポリヌクレオチドに連結されたDNAデンドリマーを含む組成物が記載される。幾つかの実施形態では、カーゴポリヌクレオチドは、DNAデンドリマーに直接連結されている。幾つかの実施形態では、カーゴポリヌクレオチドは、アダプター分子によりDNAデンドリマーに連結されている。幾つかの実施形態では、カーゴポリヌクレオチドは、少なくとも1つのプロモーター及び関心対象の少なくとも1種の分子をコードする少なくとも1つのコード配列を含み、完全な環状ポリヌクレオチド、ニックの入った環状ポリヌクレオチド、閉じた5'及び3'末端を有する直鎖状ポリヌクレオチド、開いた5'及び3'末端を有する直鎖状ポリヌクレオチド、ならびに1つの開いた末端及び1つの閉じた末端を有する直鎖状ポリヌクレオチドからなる群から選択されるトポロジーを有する。幾つかの実施形態では、本明細書におけるカーゴポリヌクレオチドは、DNA標的配列(DTS)、核局在化シグナル配列(NLS)、またはその両方のうちの1つ以上を任意に含む。
20

【0005】

幾つかの実施形態では、カーゴポリヌクレオチドは、DNAデンドリマー結合配列(DBS)を含む。幾つかの実施形態では、DBSは、カーゴポリヌクレオチドをDNAデンドリマーに連結させる。幾つかの実施形態では、アダプター分子は、DBS及びカーゴ結合領域を含む。幾つかの実施形態では、DBSは、アダプター分子をDNAデンドリマーに連結させる。幾つかの実施形態では、カーゴ結合領域は、アダプター分子をカーゴポリヌクレオチドに連結させる。幾つかの実施形態では、アダプター分子は、精製用領域、DTS、NLS、スペーサー、細胞貫通ペプチド(CPP)配列、切断部位、可動性リンカー、またはそれらの幾つかの組み合わせのうちの1つ以上を更に含む。
30

【0006】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載される任意の組成物は、補助分子を含み得る。幾つかの実施形態では、補助分子は、DNAデンドリマーと会合することができる。幾つかの実施形態では、補助分子は、DNAデンドリマーと連結する。幾つかの実施形態では、補助分子は、カーゴポリヌクレオチド、DNAデンドリマー、またはその両方のサイズを圧縮する。
40

【0007】

また本明細書において、カーゴポリヌクレオチド、補助分子、及び標的化部分に連結されたDNAデンドリマーを含む組成物であって、当該カーゴポリヌクレオチドが、少なくとも1つのプロモーター及び関心対象の少なくとも1種の分子をコードする少なくとも1つのコード配列を含み、完全な環状ヌクレオチド、ニックの入った環状ヌクレオチド、閉じた5'及び3'末端を有する直鎖状ヌクレオチド、開いた5'及び3'末端を有する直鎖状
0

ヌクレオチド、ならびに1つの開いた末端及び1つの閉じた末端を有する直鎖状ヌクレオチドからなる群から選択されるトポロジを有する、当該組成物も記載される。幾つかの実施形態では、カーゴポリヌクレオチドは、完全な環状のトポロジであり、DNAデンドリマーに連結されていない。

【0008】

また本明細書において、少なくとも2つの制限部位を含むプラスミド骨格、少なくとも1つのプロモーター、及び関心対象の少なくとも1種の分子をコードする少なくとも1つのコード配列を含むプラスミドであって、様々なトポロジを有するカーゴポリヌクレオチドを形成することができる、当該プラスミドも記載される。幾つかの実施形態では、様々なトポロジは、完全な環状ヌクレオチド、ニックの入った環状ヌクレオチド、閉じた5'及び3'末端を有する直鎖状ヌクレオチド、開いた5'及び3'末端を有する直鎖状ヌクレオチド、ならびに1つの開いた末端及び1つの閉じた末端を有する直鎖状ヌクレオチドからなる群から選択される。

【0009】

幾つかの実施形態では、関心対象の分子を標的細胞の核に送達する方法であって、当該方法が当該標的細胞を本明細書に記載される任意の組成物と接触させることを含み、標的化部分が当該標的細胞に結合して、当該組成物が当該標的細胞に侵入するのを可能にし、カーゴポリヌクレオチドが当該標的細胞の核に侵入することができる、当該方法が提供される。幾つかの実施形態では、疾患を処置する方法であって、当該方法が本明細書に記載される任意の組成物を対象に投与して、当該疾患を処置することを含み、標的化部分が当該標的細胞に結合して、当該組成物が当該標的細胞に侵入するのを可能にし、カーゴポリヌクレオチドが当該標的細胞の核に侵入することができる、当該方法が提供される。幾つかの実施形態では、カーゴポリヌクレオチドを製造する方法であって、少なくとも1つのプロモーター及び関心対象の少なくとも1種の分子をコードする少なくとも1つのコード配列をプラスミド骨格に追加して、本明細書に記載される任意のプラスミドを形成させ、次いで、任意に当該プラスミドを1種以上の制限酵素と接触させることを含み、当該方法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】プラスミドマップ、及びある特定の制限酵素をプラスミドと接触させることにより、または接触させないことによりプラスミドが変化し得る個々のトポロジを示す図を示す。

【図2】様々なポリヌクレオチドトポロジでのGFP蛍光百分率(%)を示す。

【図3】様々なポリヌクレオチドトポロジでの単位面積当たりのGFP陽性細胞の数を示すグラフを示す。

【図4】CHO-K1細胞におけるDNA標的化配列(DTS)を含むポリヌクレオチドの、DTSのないポリヌクレオチドと比較した相対平均蛍光を示す。

【図5】A427細胞におけるDNA標的化配列(DTS)を含むポリヌクレオチドの、DTSのないポリヌクレオチドと比較した相対平均蛍光を示す。

【図6】C2C12細胞におけるDNA標的化配列(DTS)を含むポリヌクレオチドの、DTSのないポリヌクレオチドと比較した相対平均蛍光を示す。

【図7】C2C12細胞におけるDNA標的化配列(DTS)を含むポリヌクレオチドの、DTSのないポリヌクレオチドと比較した相対積分蛍光を示す。

【図8】C2C12細胞におけるDNA標的化配列(DTS)を含むポリヌクレオチドの、DTSのないポリヌクレオチドと比較した相対ピーク蛍光を示す。

【発明を実施するための形態】

【0011】

特に定義しない限り、本明細書において使用される全ての技術用語及び科学用語は、当業者により一般的に理解される意味と同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと類似または同等の方法及び材料を実施または試験に使用することができるが、好適な方法及

び材料が本明細書に記載される。矛盾する場合、定義を含め、本発明の明細書が優先する。更に、材料、方法、及び例は、例示にすぎず、限定することを意図しない。本明細書に記載される実施形態の他の特徴及び効果は、本明細書の発明を実施するための形態及び特許請求の範囲により明らかとなるであろう。

【0012】

核酸及びペプチド合成が含まれる、組換え操作の技術及び手順は、通常、当該技術分野における従来の方方法及び本明細書全体にわたって提供される種々の一般的な参考文献（例えば、Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning, A Laboratory Approach, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., Ausubel et al., eds, 2005, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N. Y., 及びGerhardt et al., eds., 1994, Methods for General and Molecular Bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, D. C.）に従って実行される。

10

【0013】

用語「約」または「ほぼ」は、この用語と共に使用されている数値の±10%の数値を意味する。従って、約50%は、45%～55%の範囲内を意味する。

【0014】

文脈上特に明記されない限り、単数形の「a」、「an」、及び「the」は、複数形の参照を包含する。

20

【0015】

本明細書で使用する場合、用語「含む (comprise)」、「有する (have)」、「含む (include)」、及びそれらの同根語は、「含むが、これに限定されない (including but not limited to)」を意味する。様々な組成物、方法、及びデバイスが、様々な構成要素またはステップを「含む (comprising)」（「含むが、これに限定されない (including but not limited to)」を意味すると解釈される）という言葉で記載されるが、当該組成物、方法、及びデバイスは、当該様々な構成要素またはステップ「から本質的になる (consist essentially of)」か、または当該様々な構成要素またはステップ「からなる (consist of)」場合もある。

30

【0016】

本明細書で使用する場合、用語「抗体」は、抗原上の特異的なエピトープに特異的に結合することができる免疫グロブリン分子を指す。抗体は、天然の供給源または組換え供給源に由来するインタクトな免疫グロブリンであり得、インタクトな免疫グロブリンの免疫反応性部分であり得る。本発明に有用な抗体は、例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、細胞内抗体（「イントラボディ」）、Fv、Fab、及びF(ab)2、ならびに一本鎖抗体 (scFv)、ラクダ科抗体、及びヒト化抗体が含まれる、種々の形態で存在し得る (Harlow et al., 1999, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Harlow et al., 1989, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N. Y., Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883, Bird et al., 1988, Science 242: 423-426)。

40

【0017】

本明細書で使用する場合、「相補的」は、2つの核酸間、例えば2つのDNA分子の間のサブユニット配列相補性の広い概念を指す。両方の分子におけるヌクレオチド位が、通常は互いに塩基対を形成することができるヌクレオチドにより占められている場合、核酸

50

はこの位置で互いに相補的であると考えられる。従って、分子の各々における対応する位置のうちの少なくとも約50%、好ましくは、少なくとも60%、より好ましくは、少なくとも約80%が、通常は互いに塩基対を形成するヌクレオチド（例えば、A:T及びG:Cヌクレオチド対）により占められている場合、2つの核酸は互いに実質的に相補的である。

【0018】

本明細書で使用する場合、「DNAベースの担体」は、デオキシリボ核酸分子を含む送達系を指す。DNAベースの担体の非限定的な例は、DNAデンドリマーである。他のDNAベースの担体としては、二本鎖DNA、一本鎖DNA、及び一本鎖ヘアピンDNA、またはそれらの多量体が挙げられる。

10

【0019】

本明細書で使用する場合、「DNAデンドリマー」または「デンドリマー」は、開始モノマーなどのコア分子へのまたはそれからの分岐層の逐次付加または世代付加により形成された分岐を示す、ポリヌクレオチドのマトリックスを指す。

【0020】

本明細書で使用する場合、「開始モノマー」は、デンドリマー形成の核を生成するのに役立つポリヌクレオチド化合物である。

【0021】

本明細書で使用する場合、「延長モノマー」は、デンドリマーの構築時に開始モノマーに、及び／または互いに結合することができるポリヌクレオチド化合物である。延長モノマーは、デンドリマーの層を形成する。デンドリマーの第1層は、開始モノマーに最も近い延長モノマーの層である。外層は、開始モノマーから最も遠く、デンドリマーの表面を形成している層である。延長モノマーは、当該技術分野においてマトリックスモノマー、マトリックス延長モノマー、及びマトリックスポリヌクレオチドモノマーとも称される。

20

【0022】

本明細書で使用する場合、用語「置換する」、「置換された」、「変異させる」、または「変異した」は、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列において1つ以上のアミノ酸またはヌクレオチドを変化させるか、欠失させるか、または挿入して、その配列のバリエーションを作製することを指す。

【0023】

用語「ポリヌクレオチド」または「核酸分子」は、糖リン酸骨格または他の同等な共有結合性の化学反応により共有結合的に連結されたヌクレオチドの鎖を含む分子を意味する。二本鎖及び一本鎖のDNA及びRNAは、ポリヌクレオチドの非限定的な例である。

30

【0024】

用語「ポリペプチド」または「タンパク質」は、ポリペプチドを形成するためのペプチド結合により連結された少なくとも2つのアミノ酸残基を含む分子を意味する。幾つかの実施形態では、「ペプチド」という用語も使用され得る。

【0025】

本明細書で使用する場合、用語「バリエーション」は、置換、挿入、または欠失が含まれる、1つ以上の改変によって、参照ポリペプチドまたは参照ポリヌクレオチドと異なるポリペプチドまたはポリヌクレオチドを指す。

40

【0026】

ポリヌクレオチド配列を表現するための従来の表記法が本明細書において使用される。すなわち、一本鎖ポリヌクレオチド配列の左端は、5'末端であり、二本鎖ポリヌクレオチド配列の左側方向は、5'方向と称される。

【0027】

本明細書で使用する場合、用語「プロモーター／調節配列」は、プロモーター／調節配列に作動可能に連結された遺伝子産物の発現を制御または促進する核酸配列を意味する。幾つかの例では、この配列は、コアプロモーター配列であり得、他の例では、この配列は、遺伝子産物の発現を制御または促進するエンハンサー配列及び他の調節エレメントも含

50

み得る。プロモーター／調節配列は、例えば、遺伝子産物を誘導可能な様式で発現させるものであり得る。「誘導性」プロモーターは、遺伝子産物をコードまたは規定するポリヌクレオチドと作動可能に連結される場合に、プロモーターに対応する（例えば、結合する）誘導因子が実質的に存在する場合にのみ遺伝子産物を生じさせるヌクレオチド配列である。

【0028】

本明細書で使用する場合、「標的化部分」は、標的細胞の細胞表面に存在する分子に結合する分子を指す。

【0029】

本明細書で使用する場合、「標的化されたDNAベースの担体」及び「DNAベースの担体は、標的化部分を含む」は、DNAベースの担体及び標的化部分を含む組成物を指す。標的化部分は、直接的にまたはリンカーを介して、DNAベースの担体に連結され得る。あるいは、標的化部分は、別の分子、例えば、カーゴ分子または組成物中の第2の非核酸担体に連結され得る。DNAベースの担体は、標的化されたカーゴまたは標的化された二次担体と共に同じ組成物中に存在することによって標的化される。

【0030】

本明細書で使用する場合、用語「ベクター」は、細胞に感染、形質移入、一過性または永続的に形質導入することができる核酸を指す。ベクターは、裸の核酸またはタンパク質もしくは脂質と複合体を形成した核酸であり得ることが理解されるであろう。ベクターとしては、限定されるものではないが、DNAの断片が結合され得、複製され得るレプリコン（例えば、RNAレプリコン、バクテリオファージ）が挙げられる。従って、ベクターとしては、限定されるものではないが、RNA、自律的に自己複製する環状または直鎖状DNAまたはRNA（すなわち、「プラスミド」）が挙げられ、発現プラスミド及び非発現プラスミドの両方を包含する。組換え微生物または細胞培養物が「発現ベクター」を宿していると記載される場合、発現ベクターは、染色体外環状及び直鎖状DNAならびに宿主染色体（複数可）に組み込まれたDNAの両方を包含する。ベクターが宿主細胞により保持されている場合、ベクターは、自律的な構造として有糸分裂時に細胞により安定的に複製されていてもよく、または宿主のゲノム内に取り込まれている。

【0031】

本明細書で使用する場合、「プロモーター」は、細胞における核酸の発現を付与、活性化、または増強することができる合成または天然由来の分子を意味する。プロモーターは、発現を更に増強するため、及び／またはその空間的発現及び／または経時的発現を変化させるための1つ以上の特異的な転写調節配列を含み得る。プロモーターは、転写の開始部位から数千塩基対も離れて位置し得る遠位のエンハンサーまたはリプレッサーエレメントも含み得る。かかるプロモーター-エンハンサーは、例えば、限定されるものではないが、組織特異性または形質導入効率を修飾することができる。プロモーターは、ウイルス、細菌、真菌、植物、昆虫、及び動物が含まれる、供給源に由来し得る。プロモーターは、恒常的に、または発現が起こる細胞、組織、もしくは器官に対して差次的に、または発現が起こる発生段階に対して差次的に、または外部刺激、例えば、生理学的ストレス、病原体、金属イオン、もしくは誘導剤に応答して、遺伝子成分の発現を調節することができる。

【0032】

本明細書で使用する場合、用語「トポロジー」は、本明細書において開示される任意のベクター、プラスミド、またはポリヌクレオチドの種々の構造配置を指す。例えば、ポリヌクレオチドは、当該ポリヌクレオチドが5'または3'末端を有さないプラスミドなどの環状トポロジーを有し得る。本明細書において開示されるポリヌクレオチドは、当該ポリヌクレオチドが5'及び3'末端を有する直鎖状トポロジーを有してもよい。直鎖状トポロジーを有するポリヌクレオチドは、当該ポリヌクレオチドの一方または両方の末端が共有結合により閉じられていてもよい。幾つかの実施形態では、ある特定の制限酵素、例えば、テロメラーゼN（TelN）は、DNA末端を共有結合により閉じることができる。

【0033】

組成物

A. DNAベースの担体

幾つかの実施形態では、本明細書において開示される組成物は、DNAベースの担体を含む。DNAベースの担体としては、限定されるものではないが、単分子構造または互いに架橋された幾つかの単位の立体構造を含む（例えば、多量体）のいずれかとして製剤化される、DNAデンドリマー、二本鎖直鎖状DNA、一本鎖直鎖状DNA、及び一本鎖ヘアピンDNAが挙げられる。幾つかの実施形態では、組成物は、DNAデンドリマーを含む。DNAデンドリマーは、相互にハイブリダイズしたDNAモノマーにより形成された可動性分枝の球状粒子（直径は通常約130～約150nmであるが、他のサイズとなるように設計することができる）である。各DNAモノマーは、2本の鎖が互いにハイブリダイズする相補配列の中心領域を共有する2本のポリヌクレオチド鎖から構成され、4つの一本鎖ポリヌクレオチド末端部分を残している。これらの末端配列は、それら自身の間で相補的であり、従って、それらは他のDNAモノマーの末端配列に（層内で）ハイブリダイズすることができる。任意により、DNAデンドリマーは、共有結合により架橋されたDNA鎖を含む。

10

【0034】

DNAデンドリマーは市販されている。加えて、DNAデンドリマーの構造設計及び構築は、一般に当該技術分野において公知である。例えば、米国特許第5,175,270号及び同6,274,723号（これらの各々は参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる）を参照のこと。開始モノマーは、デンドリマーの分岐形成の種類に応じて、デンドリマーのほぼ中心を構成する。開始モノマー周囲の延長モノマーの三次元構築は、デンドリマーの内部容積を構成する。延長モノマーの最外層は、デンドリマーの表面を形成する。従って、デンドリマーの構築は、三次元形状、通常は、延長モノマーの層を含むほぼ球形の形状（しかし、これに限定さない）をもたらす。外層は多数の結合部位を含む。

20

【0035】

より具体的には、DNAデンドリマーは、以下の特徴を有するプロトコールにより調製され得る。（i）出発材料は、「開始モノマー」と称される、5'及び3'の一本鎖オーバーハングまたは二重鎖の幹に結合された「結合アーム」（例えば、合計で4つの結合アーム）を有するDNAの二本鎖二重鎖であり、名称はデンドリマーの構築におけるその役割を表現している。各開始モノマーの5'及び3'結合アームは、同様の組成及び形態を有する「延長モノマー」の相補的な結合アームにアニーリングされる。（ii）各延長モノマーの4つの結合アームのサブセットは、開始モノマーの結合アームに相補的である。延長モノマーの非相補的な結合アームは、開始モノマーへのアニーリングに不活性である。典型的には、4つの延長モノマーは、開始モノマーにアニーリングして、溶液中に単層または一層のデンドリマーを生じさせることができる。（iii）デンドリマーに延長モノマーの更なる層を追加するためには、典型的には、類似するが、識別可能な延長モノマーであって、各モノマーがデンドリマー上の結合アームに相補的な4つの結合アームのサブセットを有する、当該延長モノマーを添加する。これにより、一層のデンドリマーを二層のデンドリマーに変換することができ、段階的に、目的のサイズのデンドリマーに達するまで以下同様に続く。典型的には、三層または四層のデンドリマーが使用される。

30

40

【0036】

構築後、DNAデンドリマーは、デンドリマーの構造を維持及び安定化するために架橋され得る。モノマー間のハイブリダイズした領域の架橋（すなわち、モノマー間架橋）、またはモノマーと検出可能な標識を保有する核酸との間、及び幹部分間のハイブリダイズした領域の架橋（モノマー内架橋）は、ポリヌクレオチドデンドリマーの構造を安定化し得る。同様に、任意のDNAベースの担体の任意のハイブリダイズされた領域が、担体を安定化するために架橋され得る。担体の個々の単位は、多分子担体に架橋され得る。かかる架橋化学反応は、当該技術分野において周知である。例えば、Cimino et al

50

l., Annu. Rev. Biochem. 54:1151-1193 (1985)、Shi et al., Biochemistry 25:5895-5902 (1986)、及び Cimino et al., Biochemistry 25:3013-3020 (1986) を参照のこと。米国特許第4,196,281号も参照のこと。好適な架橋剤の非限定的な例としては、とりわけ、ソラレン(8-メトキシブソラレン及びアンゲリシンが含まれるが、これらに限定されない)、マイトマイシンC、ダウノマイシン、エチジウムジアジド、シスプラチン、トランスプラチン、カルボプラチン、8-メトキシブソラレン、メクロレタミン、オキサリプラチン、及びカルボジイミド化合物が挙げられる。

【0037】

デンドリマーまたは他のDNAベースの担体のモノマーに使用されるポリヌクレオチド鎖は、核酸合成の標準的な技術を使用して作製され得る。これらの技術は、生物学的または化学的技術であり得る。技術及び手順は、通常、当該技術分野及び種々の一般的な参考文献(例えば、Sambrook et al., 2001(前出)、Ausubel et al., eds., 2005(前出)、及びGerhardt et al., eds., 1994, Methods for General and Molecular Bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, D.C.)における従来の方法に従って実行される。

【0038】

幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、当該技術分野において公知の方法を使用して化学合成される。例えば、Gait, 1985, Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, England) を参照のこと。別の実施形態では、ポリヌクレオチドは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を使用して酵素合成される。一本鎖ポリヌクレオチドを生成させるのに適した1つのPCR法は、単一のプライマーを使用したマルチサイクルPCRであり、これにより、一本鎖が増幅される。当該技術分野において周知であるように、核酸は、それらの使用前に任意の適切な手段により精製され得る。例えば、核酸は、逆相もしくはイオン交換HPLC、サイズ排除クロマトグラフィー、またはゲル電気泳動により精製され得る。当業者は、精製方法が精製される核酸のサイズに部分的に依存することを理解するであろう。

【0039】

DNAデンドリマーの外層は、少なくとも2種類の結合アームを有し得る。これらの結合アームは、1種類以上の部分を結合させるために使用され得る。幾つかの実施形態では、組成物のDNAデンドリマーは、標的化部分、カーゴ、補助分子などに結合または付着することができる。

【0040】

幾つかの実施形態では、DNAベースの担体は、DNAベースの担体の足場として機能し得る二次担体と会合している。かかる二次担体の例としては、限定されるものではないが、リボソーム、非DNAデンドリマー、ポリマー担体、マイクロバブル、常磁性及び強磁性粒子、自己組織化ポリマー、ポリマソーム、フィロミセル(filomicelle)、アルブミン粒子、リポタンパク質などが挙げられる。自己組織化ポリマーは、単分子の構成単位の自己組織化により形成されるポリマーである。これらの構成単位は、親水性成分(限定されるものではないが、例えば、ポリエチレンイミンまたはポリエチレングリコール)及び疎水性成分(限定されるものではないが、例えば、脂肪族ポリエステル)をコアシェル型構造に含む両親媒性コポリマーであり得る。構成単位の直接的なコンジュゲーションまたは架橋により維持されないこれらの構造は、ミセルとして公知であり、それらの形態は、例えば、球状ミセル(「ポリマソーム」)から細長いまたは糸状の棒(「フィロミセル(filomicelle)」)まで異なり得る。これらの構造のサイズもナノメートルからマイクロメートルのサイズ範囲まで異なり得る。あるいは、これらの構造

10

20

30

40

50

は、自己組織化により形成されると、それらの安定性を増加させるために化学的に更に架橋され得る。疎水性カーゴが担体の疎水性領域に包埋され得る一方で、親水性カーゴは内部の水性コアまたは外部の親水性コアに組み込まれ得る。

【0041】

幾つかの実施形態では、DNAベースの担体は、二次担体の表面に連結される。幾つかの実施形態では、DNAベースの担体は、二次担体に連結されていないが、同じ組成物中に存在することにより、二次担体と会合している。幾つかの実施形態では、カーゴ及び標的化部分は、本明細書に記載される方法及び当該技術分野において公知の方法を使用して、DNAベースの担体または足場担体に連結され得る。

【0042】

B. 標的化部分

幾つかの実施形態では、DNAベースの担体は、標的化部分を担体、二次担体、及び／またはカーゴに連結することにより、特異的な細胞に対して指向される。幾つかの実施形態では、標的化部分は、DNAベースの担体に連結される。幾つかの実施形態では、標的化部分は、二次担体に連結される。標的化部分は、抗体、受容体もしくはその機能的誘導体の天然に存在するリガンド、ビタミン、ホルモン、天然に存在するリガンドの低分子模倣物、ペプチド、ポリペプチド、ペプチド模倣物、炭水化物、脂質、FN3ドメイン、アプタマー、核酸、毒素、微生物の成分、または任意の他の分子（ただし、これは細胞表面分子に特異的に結合し、結合した部分のエンドサイトーシスを誘発する）であり得る。

【0043】

特定の理論に拘束されるものではないが、標的化部分は、標的細胞の細胞表面の分子に特異的に結合することができる。標的化部分は、細胞表面分子に結合することができ、幾つかの実施形態では、細胞表面分子は、DNAベースの担体のエンドサイトーシスを誘発することができる。標的とされ得る細胞表面分子の非限定的な例としては、細胞表面タンパク質、炭水化物、及び脂質が挙げられる。標的とされ得る細胞表面分子としては、古典的エンドサイトーシスに関連する分子及び非古典的エンドサイトーシスに関連する分子が挙げられる。

【0044】

幾つかの実施形態では、標的の細胞表面分子は、細胞接着分子（CAM）である。本発明に有用な細胞接着分子としては、限定されるものではないが、神経特異的接着分子（例えば、NCAM）及び全身細胞間接着分子が挙げられる。全身CAMとしては、細胞間接着分子（例えば、ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3）、血小板／内皮細胞接着分子（PECAM）、活性化白血球細胞接着分子（ALCAM）、Bリンパ球細胞接着分子（BL-CAM）、血管細胞接着分子（VCAM）、粘膜血管アドレシン細胞接着分子（MA dCAM）、CD44、LFA-2（CD2）、LFA-3（CD58）、ペイジン（CD147）などが挙げられる。幾つかの実施形態では、細胞表面分子は、CD71である。

【0045】

幾つかの実施形態では、標的化部分は、標的の細胞表面分子に特異的に結合する抗体である。幾つかの実施形態では、抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、合成抗体、重鎖抗体、及び抗体の生物学的に活性な断片からなる群から選択され、ここで、当該生物学的に活性な断片は、Fab断片、F(ab')₂断片、scFv断片である。

【0046】

本発明の組成物及び方法において標的化部分として使用される抗体がポリクローナル抗体（IgG）である場合、抗体は、標的とされる細胞表面分子を好適な動物に接種することにより作製される。次いで、接種された動物において産生された、細胞表面分子に特異的に結合する抗体は、動物から得られた体液から単離される。抗体は、このようにして幾つかの非ヒト哺乳動物、限定されるものではないが、例えば、ヤギ、ヒツジ、ウマ、ラクダ、ウサギ、及びロバで作製され得る。ポリクローナル抗体を作製する方法は、当該技術

10

20

30

40

50

分野において周知であり、例えば、Harlow, et al. (1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N. Y.) に記載されている。

【0047】

標的とされる全長の細胞表面分子またはその断片に対して指向されたモノクローナル抗体は、例えば、Harlow et al. (1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N. Y.) 及び Tuszynski et al. (1988, Blood, 72:109-115) に記載されるものなどの、周知の任意のモノクローナル抗体調製手順を使用して調製され得る。ヒトモノクローナル抗体は、米国特許出願公開第2003/0224490号に記載される方法により調製され得る。抗原に対して指向されたモノクローナル抗体は、本明細書において引用される標準的な手順を使用して当該抗原で免疫化されたマウスから生成される。本明細書に記載される手順を使用して得られたモノクローナル抗体をコードする核酸は、当該技術分野において利用可能な技術を使用してクローニング及び配列決定され得、例えば、Wright et al. (1992, Critical Rev. in Immunol. 12 (3, 4): 125-168) 及びその中で引用される参考文献に記載されている。

【0048】

標的化されたDNAベースの担体、例えば、DNAデンドリマーを調製するために、標的化部分は、DNAベースの担体に連結され得るか、またはDNAベースの担体を含む組成物に連結されているか、もしくはそれと会合している二次担体もしくはカーゴに連結され得る。単一の標的化部分がDNAベースの担体または二次担体に連結され得る。あるいは、複数の（例えば、2種以上の）標的化部分がDNAベースの担体、二次担体、またはカーゴに連結される。複数種の標的化部分が担体またはカーゴに連結される場合、当該部分は、同一の細胞表面分子を標的とし得るか、または異なる細胞表面分子を標的とし得る。異なる細胞表面分子を標的とする場合、これらの分子は、同じエンドサイトーシス経路または異なるエンドサイトーシス経路に関連し得る。標的化部分は、エンドサイトーシス経路に関連していなくてもよい。異なる細胞表面分子を標的とする場合、当該細胞表面分子は、同じ細胞種に存在し得るか、または異なる細胞種に存在し得る。

【0049】

連結は、非共有結合性または共有結合性であり得る。標的化部分は、DNAベースの担体を構成するポリヌクレオチド鎖のうちの1つ以上に連結され得る。あるいは、標的化部分はリンカー分子に連結され、次に、リンカー分子はDNAベースの担体に連結される。DNAベースの担体がDNAデンドリマーである幾つかの実施形態では、リンカー分子は、DNAデンドリマーの表面上の結合アームのうちの1つに存在する配列に実質的に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチドである。従って、標的化部分は、オリゴヌクレオチドの結合アームへのハイブリダイゼーションにより、間接的かつ非共有結合的にDNAデンドリマーに連結される。この手法は、他のDNAベースの担体にも適用可能である。任意により、ハイブリダイズされたオリゴヌクレオチドもDNAデンドリマーに架橋される。架橋化学は、本明細書の他箇所を開示される。架橋されない場合、DNAデンドリマーと標的化部分に連結されたオリゴヌクレオチドとの間のハイブリダイゼーションは、使用条件下で十分に長く持続しなければならない。核酸分子の結合自由エネルギーの測定は、当該技術分野において周知である（例えば、Turner et al., 1987, CSH Symp. Quant. Biol. LII pp. 123-133、Freier et al., 1986, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 83:9373-9377、Turner et al., 1987, J. Am. Chem. Soc. 109:3783-3785、Chavali et al., 2005, Bioinformatics 21 (20): 3918-3925を参照のこと）。

【0050】

幾つかの実施形態では、リンカーは、DNAベースの担体に連結されているIgG F

c 特異的二次抗体である。幾つかの実施形態では、抗体は、IgG 一次抗体、例えば、標的化部分または介在抗体のFc 部分に特異的に結合する。二次抗体は、好ましくは、一次抗体の供給源である種に特異的である。例えば、標的化部分がヒトIgG 抗体である場合、二次抗体は抗ヒトIgG である。別の態様では、二次抗体は、Fc 部分だけでなく、一次抗体全体のエピトープを認識する。あるいは、リンカーは、IgG 抗体のFc 部分に特異的に結合するFcγ 受容体である。いずれの場合でも、担体は、IgG 抗体である任意の標的化部分に容易に連結され得る。

【0051】

非共有結合的連結としては、限定されるものではないが、親和性結合ペア、例えば、ビオチン-ストレプトアビジン、及び使用中に結合を維持するほど十分に高い親和性を有する免疫親和性が挙げられ、当該技術分野において周知である。当該技術分野には、直接的にまたはリンカーを介して標的部分をDNA ベースの担体、二次担体、またはカーゴに共有結合的に連結するのに有用なコンジュゲーション化学も豊富に存在する。当該技術分野において認められている共有結合カップリング技術は、例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれる米国特許第5,416,016号、同6,335,435号、同6,528,631号、同6,861,514号、及び同6,919,439号に開示されている。他のコンジュゲーション化学は、参照により全体が本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第20040249178号に開示されている。更なる他のコンジュゲーション化学としては、p-ヒドロキシ安息香酸リンカー (Chang-Po et al., 2002, Bioconjugate Chem. 13 (3): 525-529); ネイティブライゼーション (Stetsenko et al., 2000, J. Org. Chem. 65: 4900-4908); ジスルフィド架橋コンジュゲート (Oehlke et al., 2002, Eur. J. Biochem. 269: 4025-4032 及び Rogers et al., 2004, Nuc. Acids Res. 32 (22): 6595-6604); マレイミドリンカー (Zhu et al., 1993, Antisense Res. Dev. 3: 265-275); チオエステルリンカー (Ede et al., 1994, Bioconjug. Chem. 5: 373-378); ディールス・アルダー環化付加 (Marchan et al., 2006, Nuc. Acids Res. 34 (3): e24, 2006 Feb. 14 Epub); 米国特許第6,656,730号などが挙げられる。ペプチド-オリゴヌクレオチドコンジュゲーション化学反応の概説については、Tung et al., 2000, Bioconjugate Chem. 11: 605-618、Zatsepin et al., 2005, Curr. Pharm. Des. 11 (28): 3639-3654、及び Juliano, 2005, Curr. Opin. Mol. Ther. 7 (2): 132-136 も参照のこと。

【0052】

C. カーゴ

本明細書において提供される組成物は、カーゴも含み得る。幾つかの実施形態では、カーゴは、直接または間接的にDNA デンドリマーに結合している。DNA デンドリマーに結合しているカーゴは、リンカーまたは他の種類の分子 (アダプター)などを介してDNA デンドリマーと会合している。1種、2種、またはそれ以上の異なるカーゴが、標的化されたDNA ベースの担体により送達され得る。本明細書において開示される組成物により送達され得るカーゴとしては、限定されるものではないが、種々の薬剤、例えば、限定されるものではないが、治療薬、造影剤、モニタリング剤、化学療法薬、抗発癌剤、抗血管新生剤、腫瘍抑制剤、抗菌剤、酵素補充剤、遺伝子発現調節剤、及び治療用タンパク質または核酸をコードする核酸を含む発現構築物が挙げられる。幾つかの実施形態では、カーゴは、外来性物質または内在性物質であり得る。カーゴとしては、任意のタンパク質、核酸、低分子、炭水化物、または脂質が含まれる、細胞において効果を誘発する任意の分子が挙げられる。カーゴは、ペプチド、タンパク質 (酵素、抗体、及びペプチドホルモンが含まれる)、細胞骨格のリガンド、核酸、低分子、非ペプチドホルモンなどであり得る

。本発明の方法により送達され得る核酸及びカーゴポリヌクレオチドは、DNA、RNA、トランスポゾンDNA、アンチセンス核酸、dsRNA、siRNA、転写RNA、メッセンジャーRNA、リボソームRNA、核小体低分子RNA、マイクロRNA、リボザイム、プラスミド、及び発現構築物が含まれる、合成及び天然の核酸物質を含む。カーゴが核酸であるか、またはそれを含む場合、核酸は、DNAベースの担体とは別個の実体であり得る。これらの実施形態では、DNAベースの担体は、それ自体がカーゴではない。

【0053】

幾つかの実施形態では、カーゴは、少なくとも1つのプロモーター及び関心対象の少なくとも1種の分子をコードする少なくとも1つのコード配列を含むポリヌクレオチドである。例えば、カーゴポリヌクレオチドは、1つのプロモーター及び関心対象の異なる分子をコードする2つ以上のコード配列、または存在する各コード配列に対して1つのプロモーターを含み得る。幾つかの実施形態では、プロモーターまたは複数のプロモーターは、組織特異的プロモーターであって、カーゴポリヌクレオチドを含む組成物が、当該組織特異的プロモーターに適合する標的細胞内に存在する場合にのみ、関心対象の少なくとも1種の分子を転写または翻訳する、当該組織特異的プロモーターである。

【0054】

幾つかの実施形態では、関心対象の分子は、遺伝子産物、例えば、酵素、タンパク質、受容体などである。幾つかの実施形態では、カーゴポリヌクレオチドは、2種以上の関心対象の分子をコードする。幾つかの実施形態では、関心対象の分子のうちの少なくとも1つは、検出可能な分子、例えば、限定されるものではないが、タグ付けされており、生物発光、蛍光、放射線シグナル、またはそれらの幾つかの組み合わせにより検出可能なタンパク質である。幾つかの実施形態では、かかる関心対象の分子は、体内分布研究ならびに他の定量的及び／またはリアルタイム評価に有用である。

【0055】

幾つかの実施形態では、カーゴポリヌクレオチドは、1つ以上の構造またはトポロジを有し得る。例えば、カーゴポリヌクレオチドは、遊離5'または3'末端がない完全に環状の二本鎖DNAまたはRNAとして存在し得る。幾つかの実施形態では、カーゴポリヌクレオチドは、プラスミドである。幾つかの実施形態では、カーゴポリヌクレオチドは、ニックの入った環状ポリヌクレオチド、閉じた5'及び3'末端を有する直鎖状ポリヌクレオチド、開いた5'及び3'末端を有する直鎖状ポリヌクレオチド、ならびに1つの開いた末端及び1つの閉じた末端を有する直鎖状ポリヌクレオチドであり得る。幾つかの実施形態では、ニックの入った環状ポリヌクレオチドは、DNAまたはRNAの一本鎖に少なくとも1つの切断を有する完全に環状の二本鎖DNAまたはRNAである。幾つかの実施形態では、ニックは、ニックング制限酵素の作用に起因し得る。幾つかの実施形態では、直鎖状ポリヌクレオチドは、規定された5'及び3'末端を有し、いずれかの末端またはその両方が共有結合により任意に閉じられている。

【0056】

異なるトポロジまたは構造は、DNAデンドリマーへの異なる結合のために使用され得る。

【0057】

本明細書において、少なくとも2つの制限部位を含むプラスミド骨格、少なくとも1つのプロモーター、及び関心対象の少なくとも1種の分子をコードする少なくとも1つのコード配列を含むプラスミドであって、本明細書に記載されるものなどの様々なトポロジを有するカーゴポリヌクレオチドを形成することができる、当該プラスミドが提供される。例えば、プロモーター配列及び関心対象の少なくとも1種の分子をコードするコード配列を含む遺伝子カセットがプラスミド骨格に挿入され得る。得られるプラスミドは、完全に環状のトポロジを有し得、このようなトポロジが望ましい場合、更なるステップは必要とされない。しかしながら、異なるトポロジが望ましい場合、プラスミドの一方または両方のヌクレオチド鎖を切断し、ニックの入った環状ポリヌクレオチド、閉じた5'及び3'末端を有する直鎖状ポリヌクレオチド、開いた5'及び3'末端を有する直鎖状ポ

リヌクレオチド、または1つの開いた末端及び1つの閉じた末端を有する直鎖状ポリヌクレオチドを作製するために、プラスミドは1種以上の制限酵素と接触させられ得る。幾つかの実施形態では、直鎖状ポリヌクレオチドの閉じられた末端は、テロメラーゼ N (T e l N) を使用して形成される。

【0058】

幾つかの実施形態では、カーゴポリヌクレオチドは、細胞の核に輸送される。幾つかの実施形態では、カーゴポリヌクレオチドは、DNA 標的化配列 (D T S) または核局在化シグナル (N L S) のうちの1つ以上も含み得る。D T S 及び N L S は、それぞれ、タンパク質及び関連する核酸を核への移入の標的とする短いアミノ酸配列である。例えば、カーゴポリヌクレオチドによりコードされ得る N L S は、Y P D E V K R K K K P (配列番号 1) または S L L E S P F D K P D E V K R K K K P P T S H Q S D A T A E D D S S S K K K (配列番号 2) のアミノ酸配列を有する。これらは N L S 配列の非限定的な例であり、任意の N L S が使用され得る。幾つかの実施形態では、少なくとも1つの D T S 、少なくとも1つの N L S 、またはその両方が、カーゴポリヌクレオチド内のどこかに、またはカーゴポリヌクレオチドに関するどこかに存在し得る。例えば、D T S 、N L S 、またはその両方は、カーゴポリヌクレオチドの少なくとも1つのプロモーターの上流または下流に存在し得る。このような分子において、ポリペプチドは、カーゴポリヌクレオチドに連結されている。

【0059】

幾つかの実施形態では、1つ以上の D T S または N L S 配列は、カーゴポリヌクレオチド内に存在するのではなく、カーゴポリヌクレオチドに結合していてもよく、または連結されていてよい。幾つかの実施形態では、1つ以上の D T S または N L S 配列は、本明細書に記載される任意のアダプター分子に含まれ得、ここで、当該アダプター分子は、カーゴポリヌクレオチドに連結されている。幾つかの実施形態では、1つ以上の D T S または N L S 配列は、対応するアダプター分子と会合することなくカーゴポリヌクレオチドに直接連結され得る。幾つかの実施形態では、D T S または N L S 配列は、修飾ヌクレオチドを介してカーゴポリヌクレオチドに結合していてもよい。例えば、D T S または N L S 配列は、任意により、修飾ヌクレオチドがニック部位に最初に挿入された、ニックの入った環状のカーゴポリヌクレオチドにニック部位で結合していてもよい。

【0060】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるカーゴポリヌクレオチドが含まれる、カーゴは、本明細書に記載される任意の共有結合性または非共有結合性の相互作用または結合、例えば、水素結合により DNA デンドリマーに直接連結され得る。従って、幾つかの実施形態では、カーゴポリヌクレオチドは、カーゴポリヌクレオチドを DNA デンドリマーに連結する DNA デンドリマー結合配列 (D B S) を含む。幾つかの実施形態では、D B S は、DNA デンドリマーの核酸配列に相補的な核酸配列を含む。例えば、D B S は、DNA デンドリマーの少なくとも1つの結合アームに相補的な核酸配列を含む。幾つかの実施形態では、D B S は、水素結合により DNA デンドリマーに結合する。幾つかの実施形態では、D B S は、T A G A G G T A A C A A C T A G C G T A C A A (配列番号 3) の核酸配列を含む。幾つかの実施形態では、D B S 配列は、配列の 5 ' または 3 ' 末端にポ 40 リチミン配列を更に含む。例えば、幾つかの実施形態では、D B S は、T A G A G G T A A C A A C T A G C G T A C A A T T T T T T T T T T (配列番号 4) の核酸配列を含む。幾つかの実施形態では、D B S は、C C T C A G C T T G T A C T C T A G T T G T T A C C T C T A A T G C T G G A C C T C A G C (配列番号 2 2) の核酸配列を含む。幾つかの実施形態では、D B S は、C C T C A G C A C C C T A C A G A G T A A C C T A G A T T G A T C A A A C A C C T C A G C (配列番号 2 3) の核酸配列を含む。これらは、D B S 分子の非限定的な例であり、デンドリマーのアームに相補的な任意の D B S 配列が使用され得る。

【0061】

D. アダプター分子

10

20

30

40

50

カーゴは、本明細書に記載されるようなアダプター分子によりDNAデンドリマーに連結されてもよい。幾つかの実施形態では、アダプター分子は、アダプター分子をDNAデンドリマーに結合させるDNAデンドリマー結合配列(DBS)、及びカーゴ、例えば、本明細書に記載されるようなカーゴポリヌクレオチドに連結させるカーゴ結合領域を含む。

【0062】

幾つかの実施形態では、DBSは、DNAデンドリマーの核酸配列に相補的な核酸配列を含む。例えば、DBSは、DNAデンドリマーの少なくとも1つの結合アームに相補的な核酸配列を含む。幾つかの実施形態では、DBSは、水素結合によりDNAデンドリマーに結合する。幾つかの実施形態では、DBSは、本明細書において開示される任意のDBS配列を含む。幾つかの実施形態では、デンドリマーアームに相補的な任意のDBS配列が使用され得る。

10

【0063】

幾つかの実施形態では、カーゴ結合領域は、当該技術分野において公知の様々なリンカーによりカーゴポリヌクレオチドに連結され得る。例えば、カーゴ結合領域は、カーゴポリヌクレオチドの少なくとも一部分に相補的であり、及び／またはDNAライゲーションによりカーゴと連結する核酸配列を含み得る。別の例では、カーゴ結合領域は、化学的カップリング、限定されるものではないが、例えば、クリックケミストリーまたはEDC架橋によりカーゴポリヌクレオチドと連結し得る。幾つかの実施形態では、カーゴ結合領域は、アミン、アジド、または他の反応性基を有する少なくとも1つのヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、カーゴ結合領域は、少なくとも1つのシステイン残基を含む。

20

【0064】

アダプター分子は、含まれる他の領域または特徴も有し得る。幾つかの実施形態では、かかる領域または特徴は、DBSとカーゴ結合領域との間に存在し得るが、アダプター分子内で任意の順序で存在してもよい。

【0065】

幾つかの実施形態では、アダプター分子は、少なくとも1つの精製用領域を更に含む。幾つかの実施形態では、精製用領域は、少なくとも1つの精製タグまたはアフィニティータグを含む。精製またはアフィニティータグは、当該技術分野において公知の種類の化学タグまたはアミノ酸タグ、例えば、ポリヒスチジンタグ、例えば、限定されるものではないが、His6、His12などであり得る。

30

【0066】

幾つかの実施形態では、アダプター分子は、本明細書に記載されるようなDTS、NLS、またはその両方を更に含む。幾つかの実施形態では、DTS及びNLS領域は、DBSとカーゴ結合領域との間に存在する。幾つかの実施形態では、NLSは、YPDEVK RKKKP（配列番号1）またはSLLESPFDKPEVKRKKKPPTSHQS DATAEDSSSKKK（配列番号2）のアミノ酸配列を有する。幾つかの実施形態では、DTSまたはNLS領域は、STSまたはNLS領域の前または後のいずれかに存在する少なくとも1つのスペーサーを更に含む。2つのスペーサーが存在する場合、それらは、DTS、NLS、またはその両方の直前及び直後に存在する。スペーサーは、一般に当該技術分野において公知であり、様々な可動性または半可動性のアミノ酸または分子を含む。幾つかの実施形態では、スペーサーまたは複数のスペーサーは、任意によりアラニン及び／またはセリン残基と共に、ポリグリシンを含む。幾つかの実施形態では、スペーサーまたは複数のスペーサーは、GGGG（配列番号5）のアミノ酸配列を有する。幾つかの実施形態では、スペーサーまたは複数のスペーサーは、ポリエチレングリコール(PEG)、アルギン酸プロピレングリコール(PGA)、PEG-ポリ乳酸(PLA)、ポリ乳酸-グリコール酸コポリマー(PGLA)、またはそれらの任意の組み合わせを含む。幾つかの実施形態では、スペーサーまたは複数のスペーサーは、任意に置換されていてもよい3～6個の炭素を含む飽和または不飽和炭化水素鎖を含む。

40

【0067】

50

幾つかの実施形態では、アダプター分子は、細胞貫通ペプチド配列（CPP）を更に含む。CPPは、膜を通した形質導入を増加させる能力を有し、細胞膜を通した分子の輸送を補助するために使用され得る一群の短鎖ペプチドである（概説については、Xu et al., 2019, J Control Release, 309:106-124を参照のこと）。DNAデンドリマーベースの組成物が標的細胞または標的核に入るのを補助するために、様々なCPPがアダプター分子に含まれ得る。例えば、幾つかの実施形態では、CPPは、QPRRRPRRK KRG（配列番号6）のアミノ酸配列を有する。幾つかの実施形態では、CPPは、DBSとカーゴ結合領域との間に存在する。

【0068】

幾つかの実施形態では、カーゴは、DNAデンドリマーと分離可能である。従って、幾つかの実施形態では、アダプター分子は、1つ以上の切断部位を更に含む。切断部位は、DBSとカーゴ結合領域との間のどこにでも存在し得る。幾つかの実施形態では、切断部位は、DBSに隣接して存在するか、またはDBSにほぼ隣接して存在する。例えば、幾つかの実施形態では、切断部位は、バリニン-シトルリン/p-アミノベンジルカルバメート（Val-Cit）切断可能リンカーである。Val-Citリンカーは、当該技術分野において公知であり、薬物コンジュゲーションにおいて標的化部分からカーゴを遊離させるために使用される。当該技術分野において公知の他の切断可能なリンカー、例えば、自己切断型リボザイム切断部位または調整可能なpH感受性リンカーが含まれてもよい（例えば、Choy et al., Bioconjugate Chem. (2016) 27(3):824-830を参照のこと）。

【0069】

幾つかの実施形態では、アダプター分子は、少なくとも1つの可動性リンカーを更に含む。幾つかの実施形態では、可動性リンカーは、DNSとカーゴ結合領域との間に存在する。幾つかの実施形態では、少なくとも1つの可動性リンカーは、ポリエチレングリコール（PEG）、アルギン酸プロピレングリコール（PGA）、PEG-ポリ乳酸（PLA）、ポリ乳酸-グリコール酸コポリマー（PGLA）、（GG）_n、（GGGGS）_n（配列番号7）、（GGGGA）_n（配列番号27）、またはそれらの任意の組み合わせであるか、またはそれを含み、ここで、各nは独立して1～5である。

【0070】

本明細書に記載されるアダプター分子は、本明細書において開示される任意の要素のいずれも有さないか、そのうちの幾つかを有するか、またはそのうちの全てを有する。例えば、アダプター分子は、DBS及びカーゴ結合領域に加えて、1つ以上の精製用領域、DTS、NLS、CPP、スペーサー、切断部位、可動性リンカー、またはそれらの任意の組み合わせを含み得る。アダプター分子の非限定的な例を以下に列挙する。

10

20

30

40

50

【表 1】

DBS、精製用領域、カーゴ結合領域	TAGAGGTAACAACCTAGCGTACAATT TTTTTTTTTHHHHHHC 配列番号 8
DBS、可動性リンカー、NLS、カーゴ結合領域	TAGAGGTAACAACCTAGCGTACAATT TTTTTTTTTGGGGGGGYPDEVKRKKKP 配列番号 9
DBS、可動性リンカー、切断部位、スペーサー、NLS、スペーサー、精製用領域、カーゴ結合領域	TAGAGGTAACAACCTAGCGTACAATT TTTTTTTTTGGGGGGGC i t VGGGGYPD EVKRKKKPGGGGHHHHHC 配列番号 1 0
DBS、可動性リンカー、切断部位、CPP、NLS、スペーサー、精製用領域、カーゴ結合領域	TAGAGGTAACAACCTAGCGTACAATT TTTTTTTTTGGGGGGGC i t VQPRRRPR RKKRGS L L E S P F D K P D E V K R K K K P P T S H Q S D A T A E D D S S S K K K G G G G H H H HHHC 配列番号 1 1

【0071】

幾つかの実施形態では、提供される組成物は、本明細書において開示される標的化部分及びカーゴを含み、ここで、当該標的化部分及び当該カーゴは、少なくとも1つのDTSを含むアダプター分子により連結されている。幾つかの実施形態では、標的化部分／DTSを有するアダプター分子／カーゴの組成物は、DNAデンドリマーを含まない。

【0072】

幾つかの実施形態では、組成物は、以下の表に示される配列を含む。幾つかの実施形態では、組成物は、5'末端から3'末端までに、以下の表に示される配列を含む。

10

20

30

40

50

【表 2】

T A G A G G T A A C A A C T A G C G T A C A A T T T T T T T T T T (配 列番号 4)	H H H H H H C (配列番 号 2 8)					
T A G A G G T A A C A A C T A G C G T A C A A T T T T T T T T T T (配 列番号 4)	G G G G G G (配 列番号 2 9)	Y P D E V K R K K K P (配 列番号 1)				
T A G A G G T A A C A A C T A G C G T A C A A T T T T T T T T T T (配 列番号 4)	G G G G G G (配 列番号 2 9)	C i t V	G G G G (配列番 号 5)	Y P D E V K R K K K P (配列番 号 1)	G G G G (配列番 号 5)	H H H H H H C (配列番 号 2 8)
T A G A G G T A A C A A C T A G C G T A C A A T T T T T T T T T T (配 列番号 4)	G G G G G G (配 列番号 2 9)	C i t V	Q P R R R P R R K K R G (配列番 号 6)	S L L E S P F D K P D E V K R K K K P P T S H Q S D A T A E D D S S S K K K (配 列番号 2)	G G G G (配列番 号 5)	H H H H H H C (配列番 号 2 8)

10

20

30

【0073】

幾つかの実施形態では、組成物は、5'末端から3'末端までに、配列番号4及び配列番号28の配列を含む。幾つかの実施形態では、組成物は、5'末端から3'末端までに、配列番号4、配列番号29、及び配列番号1の配列を含む。幾つかの実施形態では、組成物は、5'末端から3'末端までに、配列番号4、配列番号29、C i t V、配列番号5、配列番号1、配列番号5、及び配列番号28の配列を含む。幾つかの実施形態では、組成物は、5'末端から3'末端までに、配列番号4、配列番号29、C i t V、配列番号6、配列番号2、配列番号5、及び配列番号28の配列を含む。

40

【0074】

幾つかの実施形態では、組成物は、5'末端から3'末端までに、配列番号4及び配列番号28の配列を含み、ここで、配列は互いにコンジュゲートされている。幾つかの実施形態では、組成物は、5'末端から3'末端までに、配列番号4、配列番号29、及び配列番号1の配列を含み、ここで、配列は互いにコンジュゲートされている。幾つかの実施形態では、組成物は、5'末端から3'末端までに、配列番号4、配列番号29、C i t V、配列番号5、配列番号1、配列番号5、及び配列番号28の配列を含み、ここで、配列は互

50

いにコンジュゲートされている。幾つかの実施形態では、組成物は、5'末端から3'末端までに、配列番号4、配列番号29、CitV、配列番号6、配列番号2、配列番号5、及び配列番号28の配列を含み、ここで、配列は互いにコンジュゲートされている。

【0075】

E. 補助分子

本明細書における組成物は、1種以上の補助分子も含み得る。本明細書に記載されるような補助分子は、限定されるものではないが、DNAデンドリマー及びカーゴポリヌクレオチドのヌクレアーゼ分解からの保護、形質移入効率の増強、核への送達の補助、ならびにDNAデンドリマー、カーゴポリヌクレオチド、またはその両方のサイズの圧縮が含まれる、様々な課題に対して使用され得る。補助分子は、標的化部分及びカーゴと同じまたは同様の方法で、共有結合的にまたは非共有結合的にDNAデンドリマーに連結され得る。しかしながら、幾つかの実施形態では、1種以上の補助分子は、DNAデンドリマーに連結されておらず、他の手段により組成物と会合することができる。

10

【0076】

理論に拘束されることを望むものではないが、多数のポリヌクレオチド構造が負に変化したアミン骨格を有するため、十分な正電荷を有する補助分子は、電荷引力により組成物と会合することができる。従って、幾つかの実施形態では、1種以上の補助分子は、電荷引力により組成物と会合する。幾つかの実施形態では、1種以上の補助分子は、1種以上の補助分子が負に荷電したDNAデンドリマーと相互作用し、任意により、それを圧縮することを可能にするほど十分に高い正味正電荷を有する。幾つかの実施形態では、1種以上の補助分子は、凝集または他の細胞に有毒な副作用を回避するほど十分に低い正味正電荷を有する。

20

【0077】

加えて、かかる補助分子は、カーゴポリヌクレオチド及びDNAデンドリマーと同時に会合することもできる。従って、幾つかの実施形態では、本明細書に記載される組成物は、カーゴポリヌクレオチド、補助分子、及び標的化部分に連結されたDNAデンドリマーを含み、ここで、当該カーゴポリヌクレオチドは、当該DNAデンドリマーに共有結合的に連結されていない。補助分子は、カーゴポリヌクレオチドのトポロジーにかかわらず、このようにしてカーゴポリヌクレオチドをDNAデンドリマーと会合させることができる。しかしながら、カーゴポリヌクレオチドが、DNAデンドリマーまたはアダプター分子への直接的な共有結合による連結のためのいかなるニック、部位、または領域も有さない完全な環状のトポロジーを有する場合、1種以上の補助分子は、カーゴポリヌクレオチド及びDNAデンドリマーを互いに会合させて、組成物を形成させることができる。

30

【0078】

本明細書に記載される補助分子は、個別に使用され得るか、リピートとして使用され得るか、または1つの分子実体内もしくは個々の分子実体の複雑な混合物内で組み合わせて使用され得る。幾つかの実施形態では、補助分子は、カーゴ、DNAデンドリマー、及び任意にアダプター分子の会合前に組成物に添加され得る。幾つかの実施形態では、補助分子は、カーゴ、DNAデンドリマー、及び任意にアダプター分子の会合後に組成物に添加され得る。

40

【0079】

幾つかの実施形態では、補助分子は、生体適合性のペプチド、ポリマー、またはその両方から構成される。幾つかの実施形態では、補助分子は、細胞貫通ペプチド(CPP)配列、核局在化シグナル(NLS)配列、またはその両方を含み得る。幾つかの実施形態では、CPP配列は、本明細書において開示される任意のCPP配列である。幾つかの実施形態では、NLS配列は、本明細書において開示される任意のNLS配列である。

【0080】

幾つかの実施形態では、1種以上の補助分子は、ATPKKSTKKTPKKAKKA
TPKKSTKKTPKKAKK(配列番号12)、WRRRGFGRRR(配列番号13)、
GRKKRRQRRRPQ(配列番号14)、PKKKRKV(配列番号15)、

50

10

20

30

40

50

$$\frac{N}{P} = \frac{\frac{\text{ペプチド/ポリマーの重量 (ug)}}{(\text{ペプチド/ポリマーの分子量})/(\text{正電荷の数})}{\frac{\text{DNAの重量 (ug)}}{\text{dNMPの分子量の平均値}}}$$

幾つかの実施形態では、補助分子は、組成物が0.25～10のN/P比のイオンバランスを有するように、組成物に添加される。幾つかの実施形態では、補助分子は、組成物が0.5～10のN/P比のイオンバランスを有するように、組成物に添加される。幾つかの実施形態では、補助分子は、組成物が1～10のN/P比のイオンバランスを有するように、組成物に添加される。幾つかの実施形態では、補助分子は、組成物が2～10のN/P比のイオンバランスを有するように、組成物に添加される。幾つかの実施形態では、補助分子は、組成物が3～10のN/P比のイオンバランスを有するように、組成物に添加される。幾つかの実施形態では、補助分子は、組成物が4～10のN/P比のイオン

バランスを有するように、組成物に添加される。幾つかの実施形態では、補助分子は、組成物が5～10のN/P比のイオンバランスを有するように、組成物に添加される。幾つかの実施形態では、補助分子は、組成物が6～10のN/P比のイオンバランスを有するように、組成物に添加される。幾つかの実施形態では、補助分子は、組成物が7～10のN/P比のイオンバランスを有するように、組成物に添加される。幾つかの実施形態では、補助分子は、組成物が8～10のN/P比のイオンバランスを有するように、組成物に添加される。幾つかの実施形態では、補助分子は、組成物が9～10のN/P比のイオンバランスを有するように、組成物に添加される。幾つかの実施形態では、補助分子は、組成物が0.25～9のN/P比のイオンバランスを有するように、組成物に添加される。幾つかの実施形態では、補助分子は、組成物が0.25～8のN/P比のイオンバランスを有するように、組成物に添加される。幾つかの実施形態では、補助分子は、組成物が0.25～7のN/P比のイオンバランスを有するように、組成物に添加される。幾つかの実施形態では、補助分子は、組成物が0.25～6のN/P比のイオンバランスを有するように、組成物に添加される。幾つかの実施形態では、補助分子は、組成物が0.25～5のN/P比のイオンバランスを有するように、組成物に添加される。幾つかの実施形態では、補助分子は、組成物が0.25～4のN/P比のイオンバランスを有するように、組成物に添加される。幾つかの実施形態では、補助分子は、組成物が0.25～3のN/P比のイオンバランスを有するように、組成物に添加される。幾つかの実施形態では、補助分子は、組成物が0.25～2のN/P比のイオンバランスを有するように、組成物に添加される。幾つかの実施形態では、補助分子は、組成物が0.25～1のN/P比のイオンバランスを有するように、組成物に添加される。幾つかの実施形態では、補助分子は、組成物が0.25～5のN/P比のイオンバランスを有するように、組成物に添加される。

10

20

【0084】

F. 修飾

修飾核酸は、DNAデンドリマー、カーゴ、アダプター分子、及び補助分子を含め、本明細書に記載される組成物の全体にわたって使用され得る。かかる化学修飾の非限定的な例としては、限定されるものではないが、独立して、リン酸骨格修飾（例えば、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合）、ヌクレオチド糖修飾（例えば、2'-O-メチルヌクレオチド、2'-O-アリルヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチド、2'-デオキシリボヌクレオチド）、ヌクレオチド塩基修飾（例えば、「ユニバーサル塩基」を含有するヌクレオチド、5-C-メチルヌクレオチド）、及び非ヌクレオチド修飾（例えば、脱塩基ヌクレオチド、逆位デオキシ脱塩基残基）、またはこれらの修飾の組み合わせが挙げられる。加えて、モルホリノ骨格構造（米国特許第5,034,506号）またはポリアミド骨格構造（Nielsen et al., 1991, Science 254:1497）を有するオリゴヌクレオチドも使用され得る。これらの及び他の化学修飾は、核酸のインビボで生物活性を保持すると同時に、これらの化合物の血清安定性、効力、効果持続時間、及び／または特異性を劇的に増加させる。修飾されたヌクレオチド間結合を含有する核酸は、当該技術分野において周知である試薬及び方法を使用して合成され得る。例えば、ホスホネートホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロアミデートメトキシエチルホスホロアミデート、ホルムアセタール、チオホルムアセタール、ジイソプロピルシリル、アセトアミデート、カルバメート、ジメチレンスルフィド（-CH₂-S-CH₂-）、ジメチレンスルホキシド（-CH₂-S-O-CH₂-）、ジメチレンスルホン（-CH₂-SO₂-CH₂-）、2'-O-アルキル、及び2'-デオキシ-2'-フルオロホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含有する核酸を合成するための方法は、当該技術分野において周知である（Uhlmann et al., 1990, Chem. Rev. 90:543-584, Schneider et al., 1990, Tetrahedron Lett. 31:335、及びそれらの中で引用される参考文献を参照のこと）。

30

40

【0085】

50

本明細書に記載されるオリゴヌクレオチド修飾の例は網羅的ではなく、組成物は、オリゴヌクレオチドの基本的な配列を顕著に変化させることなく、オリゴヌクレオチドの治療特性またはその他の特性を増強するのに役立つ更なる修飾を含むと理解されよう。同様に、タンパク質カーゴが本明細書の他箇所に記載されるように修飾されてもよい。

【0086】

加えて、本明細書に記載される連結は、非共有結合的または共有結合的であり得る。共有結合による連結としては、細胞に内部移行されると、切断に感受性となる連結が挙げられる。かかる連結としては、pH不安定性、光不安定性、及び放射線不安定性の結合が挙げられ、当該技術分野において周知である。カーゴは、結合アームに実質的に相補的であるか、DNAデンドリマーの表面の結合アームのうちの1つに存在する配列に実質的に相補的であるか、または任意のDNAベースの担体の一本鎖配列の一部に実質的に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチドに連結され得る。オリゴヌクレオチドは、核酸カーゴを更に含み得る。DNAデンドリマーの結合アーム、または任意のDNAベースの担体の一部は、核酸カーゴをDNAデンドリマーに（水素結合により）直接連結させるために、既知の核酸分子（例えば、ゲノムDNA、cDNA、RNA、プラスミドなど）の配列に相補的な配列を含むように設計されてもよい。DNAデンドリマーの結合アーム、分岐、もしくは本体、または任意のDNAベースの担体の一部は、カーゴ（例えば、DNAオリゴヌクレオチド）である配列を含むように設計されてもよい。

【0087】

医薬組成物及びキット

幾つかの実施形態では、組成物の医薬組成物が提供される。幾つかの実施形態では、本発明の組成物は、薬学的に許容される担体を更に含む。治療用途では、組成物は、有効量のカーゴ、組成物、ドメイン、または分子を活性成分として薬学的に許容される担体中に含有する医薬組成物として調製され得る。「薬学的に許容される担体」は、活性化合物と共に投与される希釈剤、補助剤、賦形剤、またはビヒクルを指す。薬学的に許容される担体は、DNAデンドリマーまたは本明細書に記載されるような他の成分とは別個である。幾つかの実施形態では、医薬組成物は、任意の追加の薬学的に許容される担体を有さない。かかるビヒクルは、液体、例えば、水、及び石油、動物、植物、または合成起源のものが含まれる油、例えば、落花生油、大豆油、鉱油、ゴマ油などであり得る。例えば、0.4%の生理食塩水及び0.3%のグリシンが使用され得る。これらの溶液は無菌であり、通常は粒子状物質を含まない。それらは、従来の周知の滅菌技術（例えば、濾過）により滅菌され得る。組成物は、生理学的条件に近づけるために必要とされる薬学的に許容される補助剤、例えば、pH調整剤及び緩衝剤、安定化剤、増粘剤、潤滑剤、ならびに着色剤などを含有し得る。かかる医薬製剤中の本明細書において開示される分子の濃度は、広範囲に、すなわち、重量に対して約0.5%未満、通常は少なくとも約1%から15または20%ほどにまで変化し得、選択される特定の投与様式に従って、必要とされる用量、液量、粘度などに主に基づいて選択される。好適なビヒクル及び製剤（他のヒトタンパク質、例えば、ヒト血清アルブミンを含む）は、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Troy, D. B. ed., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Part 5, Pharmaceutical Manufacturing pp 691-1092に記載されており、特にpp. 958-989を参照のこと。

【0088】

幾つかの実施形態では、本明細書において開示される任意の組成物は、本明細書に記載されるような補助分子または他の成分とは異なる、当該技術分野において公知の好適な配合薬剤、例えば、安定剤、緩衝剤、賦形剤などを含み得る。例えば、好適な配合薬剤としては、限定されるものではないが、精製水、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、種々の糖、デンプン、セルロース誘導体、ゼラチン、ポリマー、例えば、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、PEG 400、グリセリン、DMA、エタノール、ベンジル

アルコール、クエン酸／クエン酸ナトリウム（pH 3）、クエン酸／クエン酸ナトリウム（pH 5）、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンHCl（pH 7.0）、0.9%生理食塩水、1.2%生理食塩水、シリコン、蠟、石油ゼリー、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、リポソーム、糖、例えば、マンニトール及びラクトース、ならびに使用される特定の種類の製剤に応じた他の物質が挙げられる。

【0089】

本明細書において開示される組成物の治療用途での投与様式は、受容者に薬剤を送達する任意の好適な経路、例えば、非経口投与、例えば、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、もしくは肺投与；錠剤、カプセル、溶液、粉末、ゲル、粒子の製剤を使用した経粘膜（経口、鼻腔内、腔内、直腸）投与；及びシリンジ、植込み型デバイス、浸透ポンプ、カートリッジ、マイクロポンプへの収容；または当該技術分野において周知であると当業者により認められる他の手段であり得る。部位特異的投与は、例えば、関節内、気管支内、腹腔内、嚢内、軟骨内、洞内、腔内、小脳内、脳室内、結腸内、頸管内、胃内、肝内、心臓内、骨内、骨盤内、心膜内、腹膜内、胸膜腔内、前立腺内、肺内、直腸内、腎内、網膜内、脊髄内、滑液嚢内、胸腔内、子宮内、血管内、膀胱内、病巣内、腔、直腸、口腔内、舌下、鼻腔内、または経皮送達により達成され得る。

10

【0090】

医薬組成物は、本明細書に記載されるような医薬組成物を含む容器を含むキットとして供給され得る。医薬組成物は、例えば、単回投与もしくは複数回投与のための注射剤の形態で、または注射前に再構成される無菌粉末として提供され得る。このようなキットは、

20

【0091】

方法

幾つかの実施形態では、関心対象の分子を標的細胞に送達する方法が提供される。幾つかの実施形態では、関心対象の分子は、標的細胞の核に送達される。幾つかの実施形態では、本方法は、標的細胞を本明細書において開示される組成物または医薬組成物のいずれかと接触させることを含む。いずれの理論にも拘束されるものではないが、標的化部分は、標的細胞に結合して、組成物が標的細胞に侵入するのを促進することができ、ここで、カーゴポリヌクレオチドは、標的細胞の核に輸送され得る。幾つかの実施形態では、カーゴポリヌクレオチドは、アダプター分子、例えば、本明細書において開示される任意のアダプター分子に連結されている。幾つかの実施形態では、カーゴポリヌクレオチド、アダプター分子、またはその両方は、標的細胞の核への輸送を補助するために、DTS、NLS、またはその両方を更に含む。幾つかの実施形態では、アダプター分子は、CPPを含む。幾つかの実施形態では、カーゴポリヌクレオチドは、標的細胞の核内で関心対象の分子を発現する。幾つかの実施形態では、医薬組成物の組成物は、関心対象の2種以上の分子を発現することができる。幾つかの実施形態では、カーゴポリヌクレオチドのプロモーターまたは複数のプロモーターは、組織特異的プロモーターである。幾つかの実施形態では、標的化部分は、組織特異的な標的化部分である。幾つかの実施形態では、組成物または医薬組成物は、2種以上の組織特異的な標的化部分を含む。幾つかの実施形態では、標的化部分は、本明細書において開示される任意の種類のものであり得る。

30

40

【0092】

幾つかの実施形態では、疾患を処置する方法が提供される。幾つかの実施形態では、本方法は、標的細胞を本明細書において開示される組成物または医薬組成物のいずれかと接触させることを含む。幾つかの実施形態では、標的化部分は、標的細胞に結合して、組成物が標的細胞に侵入するのを促進する。幾つかの実施形態では、カーゴポリヌクレオチドは、標的細胞の核に侵入することができる。幾つかの実施形態では、カーゴポリヌクレオチドは、DNAデンドリマーに連結されている。幾つかの実施形態では、カーゴポリヌクレオチドは、アダプター分子、例えば、本明細書において開示される任意のアダプター分子に連結されている。幾つかの実施形態では、カーゴポリヌクレオチド、アダプター分子、またはその両方は、標的細胞の核への輸送を補助するために、DTS、NLS、または

50

その両方を更に含む。幾つかの実施形態では、アダプター分子は、C P Pを含む。幾つかの実施形態では、カーゴポリヌクレオチドは、標的細胞の核内で関心対象の分子を発現する。幾つかの実施形態では、医薬組成物の組成物は、関心対象の2種以上の分子を発現することができる。幾つかの実施形態では、カーゴポリヌクレオチドのプロモーターまたは複数のプロモーターは、組織特異的プロモーターである。幾つかの実施形態では、標的化部分は、組織特異的な標的化部分である。幾つかの実施形態では、組成物または医薬組成物は、2種以上の組織特異的な標的化部分を含む。幾つかの実施形態では、標的化部分は、本明細書において開示される任意の種類のものであり得る。

【0093】

幾つかの実施形態では、組成物は、本明細書に記載されるような投与経路により対象に投与される。幾つかの実施形態では、組成物は、非経口投与、例えば、静脈内投与される。

10

【0094】

幾つかの実施形態では、組成物のカーゴは治療薬であり、本方法は、障害もしくは疾患を軽減するために、または障害もしくは疾患の予防処置を提供するために使用される。本方法は、本明細書において提供される任意の組成物または医薬組成物を、それを必要とする個体に投与することにより実行される。いずれの理論にも拘束されるものではないが、リソソーム送達及びカーゴの分解を回避または制限し、カーゴを細胞核に成功裡に送達することにより、本明細書に記載される組成物及び医薬組成物は、先行技術の送達方法と比較して治療薬の用量の低減を可能にし得る。有利には、用量の低減により、潜在的副作用のリスクも低減される。幾つかの実施形態では、治療薬は、ポリペプチドまたは低分子薬物である。他の実施形態では、治療薬は、核酸を含む。治療用分子は、ポリヌクレオチドにコードされ得る任意の治療用分子であり得る。本発明の発現カセットにコードされ得る治療用分子の種類の非限定的な例としては、限定されるものではないが、ポリペプチド酵素、サイトカイン、ホルモン、抗体、例えば、細胞内抗体またはs c F v、自殺遺伝子、例えば、H S V - T K、血管新生を阻害する分子、血管新生を増加させる分子、腫瘍抑制因子、例えば、p 5 3 及び p 2 1、アポトーシス促進分子、例えば、T R A I L、転写因子、受容体、リガンド、免疫原性分子、抗増殖性分子、アゴニスト、アンタゴニスト、抗炎症性分子、抗生物質、抗うつ薬、プロドラッグ、抗高血圧剤、抗酸化剤などが挙げられる。核酸を含む治療用分子は、遺伝子のインビボでの発現を調節する核酸であり得る。かかる核酸としては、アンチセンス分子、s i R N A、及びリボザイムが挙げられる。

20

30

【0095】

従って、本明細書における方法は、がんまたはがん性疾患、感染性疾患、眼疾患、心血管疾患、神経系疾患、プリオン病、炎症性疾患、自己免疫疾患、代謝疾患、遺伝性疾患、肺疾患、腎疾患、肝疾患、ミトコンドリア疾患、内分泌疾患、生殖関連疾患及び症状、移植片対宿主病、ならびに細胞または個体において発現される遺伝子産物のレベルに反応し得る任意の他の適応症が含まれる、広い範囲の疾患及び症状に対する新規の治療手段を提供する。幾つかの実施形態では、疾患は、限定されるものではないが、脊髄小脳失調症、齒状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症、ハンチントン病、筋萎縮症、マシャド・ジョセフ病、有棘赤血球舞踏病、痙攣性対麻痺、筋緊張性異栄養症、脆弱X症候群、脆弱X失調症候群、脊髄小脳失調症、前頭側頭型認知症、筋萎縮性側索硬化症、筋緊張性ジストロフィー、嚢胞性線維症、及びダウン症候群が含まれる、遺伝性疾患または障害である。幾つかの実施形態では、疾患は、限定されるものではないが、多発性骨髄腫、B細胞リンパ腫、黒色腫、レーベル先天性黒内障、脊髄性筋萎縮症、リポタンパク質リパーゼ欠損症、異染性白質ジストロフィー、マントル細胞リンパ腫、大細胞型B細胞リンパ腫、βサラセミア、血管内皮増殖因子末梢動脈疾患、大脳型副腎白質ジストロフィー、頭頸部扁平上皮癌、アデノシンデアミナーゼ欠損症、及びB細胞リンパ芽球性白血病を含め、遺伝子治療により処置可能であるか、または潜在的に処置可能であることが示されている。

40

【0096】

当該技術分野には、患者が1種以上の分子の発現または発現の阻害により恩恵を受け得

50

る、例示的な分子及び関連する疾患または障害が豊富に存在する。例えば、種々のヒト癌における遺伝子ファミリーの発現変化の評価が探求されてきた（米国特許出願公開第20060168670号）。加えて、何千個もの遺伝子について組織特異的発現レベルが発現プロファイリングによりマッピングされてきた（Alon et al., 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:6745-50, Iyer et al., 1999, Science 283:83-87, Khan et al., 1998, Cancer Res. 58:5009-13, Lee et al., 1999, Science 285:1390-93, Wang et al., 1999, Gene 229:101-08、及びWhitney et al., 1999, Ann. Neurol. 46:42）。従って、当業者は、過度な実験をすることなく、本発明の実施に有用な分子を選択することができる。

10

【0097】

幾つかの実施形態では、カーゴポリヌクレオチドを製造する方法であって、少なくとも1つのプロモーター及び関心対象の少なくとも1種の分子をコードする少なくとも1つのコード配列をプラスミド骨格に追加して、プラスミドを形成させ、次いで、任意に当該プラスミドを1種以上の制限酵素と接触させることを含む、当該方法が提供される。幾つかの実施形態では、プラスミドは、ニックの入った環状ヌクレオチド、閉じた5'及び3'末端を有する直鎖状ヌクレオチド、開いた5'及び3'末端を有する直鎖状ヌクレオチド、または1つの開いた末端及び1つの閉じた末端を有する直鎖状ヌクレオチドのトポロジーが含まれる、様々なトポロジーを形成させるために、1種以上の制限酵素と接触させられる。幾つかの実施形態では、カーゴポリヌクレオチドは、次いで、アダプター分子に連結され、次に、組成物を形成させるためにDNAデンドリマーに連結される。幾つかの実施形態では、完全な環状ヌクレオチドのトポロジーを形成させるために、プラスミドを1種以上の制限酵素と接触させない。幾つかの実施形態では、カーゴポリヌクレオチドは、次いで、可能な補助分子の存在下で、標的化部分に連結されたDNAデンドリマーと接触させられ、その結果、カーゴポリヌクレオチド及び当該DNAデンドリマーは、互いに会合して、組成物を形成した。幾つかの実施形態では、補助分子は、本明細書に記載される任意の補助分子である。幾つかの実施形態では、補助分子は、カーゴポリヌクレオチド、DNAデンドリマー、またはその両方のサイズを圧縮する。

20

【0098】

幾つかの実施形態では、少なくとも1つのコード配列を含有するプラスミドは、細菌、例えば、E. coliによる従来の方法により増幅される。幾つかの実施形態では、少なくとも1つのコード配列を含有するプラスミドは、ローリングサークル増幅または他の細菌を用いない方法により増幅される。例えば、増幅は、米国特許第11,149,302号及び米国特許出願公開第US2019/0185924号（これらの両方はそれらの全体が参照により組み込まれる）に記載されているような共有結合により閉じられた直鎖状DNAの酵素合成を使用して行われ得る。

30

【0099】

実施形態

本明細書において提供される実施形態としては、限定されるものではないが、以下も挙げられる。

40

1. 標的化部分と、

アダプター分子-カーゴポリヌクレオチド複合体と、

に連結されたか、またはそれらと会合したDNAデンドリマーを含む組成物。

【0100】

2. 前記DNAデンドリマーが、前記アダプター分子との静電的相互作用、共有結合、非共有結合、または水素結合により前記アダプター分子-カーゴポリヌクレオチド複合体に連結されている、実施形態1に記載の組成物。

【0101】

3. 前記カーゴポリヌクレオチドが、少なくとも1つのプロモーター、及び関心対象の

50

少なくとも1種の分子をコードする少なくとも1つのコード配列を含み、前記カーゴポリヌクレオチドが、ニックの入った環状ポリヌクレオチド、閉じた5'及び3'末端を有する直鎖状ポリヌクレオチド、開いた5'及び3'末端を有する直鎖状ポリヌクレオチド、または1つの開いた末端及び1つの閉じた末端を有する直鎖状ポリヌクレオチドであり、前記1つの開いた末端及び前記1つの閉じた末端が、前記ポリヌクレオチドの5'及び3'のいずれかに存在し得る、実施形態1または2に記載の組成物。

【0102】

4. 前記カーゴポリヌクレオチドが、少なくとも1つのDNA標的化配列(DTS)を更に含む、実施形態2に記載の組成物。

【0103】

5. 前記少なくとも1つのDTSが、前記少なくとも1つのプロモーターの上流に存在する、実施形態4に記載の組成物。

【0104】

6. 前記少なくとも1つのDTSが、前記少なくとも1つのプロモーターの下流に存在する、実施形態4に記載の組成物。

【0105】

7. 前記カーゴポリヌクレオチドが2つ以上のDTSを含む、実施形態4～6のいずれか1項に記載の組成物。

【0106】

8. 前記2つ以上のDTSが互いに隣接して存在するか、または互いにほぼ隣接して存在する、実施形態7に記載の組成物。

【0107】

9. 前記2つ以上のDTSが互いに隣接して存在しないか、または互いにほぼ隣接して存在しない、実施形態7に記載の組成物。

【0108】

10. 前記カーゴポリヌクレオチドが、少なくとも1つの核局在化シグナル配列(NLS)を更に含む、実施形態1～5のいずれか1項に記載の組成物。

【0109】

11. 前記少なくとも1つのNLSが、前記少なくとも1つのプロモーターの上流に存在する、実施形態10に記載の組成物。

【0110】

12. 前記少なくとも1つのNLSが、前記少なくとも1つのプロモーターの下流に存在する、実施形態10に記載の組成物。

【0111】

13. 前記カーゴポリヌクレオチドが、少なくとも1つのDTS及び少なくとも1つのNLSを含む、実施形態6～8のいずれか1項に記載の組成物。

【0112】

14. 前記アダプター分子が、DNAデンドリマー結合配列(DBS)及びカーゴ結合領域(CBR)を含む、実施形態1～9のいずれか1項に記載の組成物。

【0113】

15. 前記アダプターが前記DBSを介して前記DNAデンドリマーに連結されている、実施形態14に記載の組成物。

【0114】

16. 前記DBSが、前記DNAデンドリマーの核酸配列に相補的な核酸配列を含む、実施形態14または15に記載の組成物。

【0115】

17. 前記DBSが、TAGAGGTAACAACCTAGCGTACAA(配列番号3)、CCTCAGCTTGTACTCTAGTTGTACCTCTAATGCTGGA CCTCAGC(配列番号22)、またはCCTCAGCACCCCTACAGAGTAA CCTAGATTGATCAAAACACCTCAGC(配列番号23)の核酸配列を含む

10

20

30

40

50

、実施形態 14～16 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【0116】

18．前記 DBS が、前記 DBS の 5' または 3' 末端のいずれかにポリチミン配列を更
に含む、実施形態 14～17 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【0117】

19．前記 DBS が、TAGAGGTAACAAC TAGCGTACAATTTTT
TTTT（配列番号 4）の核酸配列を含む、実施形態 18 に記載の組成物。

【0118】

20．前記カーゴ結合領域（CBR）が、DNAライゲーションにより前記カーゴポリ
ヌクレオチドに連結されていてもよく、すなわち、共有結合、例えば、ホスホジエステル
結合により前記ポリヌクレオチドに連結されている、実施形態 14～19 のいずれか 1 項
に記載の組成物。

【0119】

21．前記 CBR が、化学的カップリングにより前記カーゴポリヌクレオチドに連結さ
れていてもよく、すなわち、共有結合、例えば、ジスルフィド結合により前記ポリヌクレ
オチドに連結されている、実施形態 14～19 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【0120】

22．前記カーゴ結合領域が少なくとも 1 つのシステインを含む、実施形態 14～21
のいずれか 1 項に記載の組成物。

【0121】

23．前記アダプター分子が、例えば、前記組成物の複合体を単離／精製するためのア
フィニティータグとして使用され得るタグなどのタグを更を含む、実施形態 14～22 の
いずれか 1 項に記載の組成物。

【0122】

24．前記タグが前記 DBS と前記 CBR との間に存在する、実施形態 23 に記載の組
成物。

【0123】

25．前記タグがポリヒスチジンタグである、実施形態 24 に記載の組成物。

【0124】

26．前記アダプター分子が、少なくとも 1 つの核局在化シグナル配列（NLS）を更
に含む、実施形態 14～25 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【0125】

27．前記少なくとも 1 つの NLS が、前記 DBS と前記カーゴ結合領域との間に存在
するか、または前記 DBS 及び前記カーゴ結合領域と重なる、実施形態 26 に記載の組成
物。

【0126】

28．前記少なくとも 1 つの NLS が、本明細書において開示される 1 つ以上の NLS
配列を含む、実施形態 26 または 27 に記載の組成物。

【0127】

29．前記少なくとも 1 つの NLS が、YPDEVKRKKKP（配列番号 1）のアミ
ノ酸配列を含む、実施形態 26～28 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【0128】

30．前記少なくとも 1 つの NLS が、SLLSPFDKPDDEVKRKKKPP
TSHQSDATAEDSSSKKK（配列番号 2）のアミノ酸配列を含む、実施形態 2
6～28 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【0129】

31．前記少なくとも 1 つの NLS が、前記少なくとも 1 つの NLS の前または後のい
ずれかに存在する少なくとも 1 つのスペーサーを更を含む、実施形態 26～30 のいずれ
か 1 項に記載の組成物。

【0130】

10

20

30

40

50

32. 前記少なくとも1つのNLSが、前記少なくとも1つのNLSの前または後に存在する2つのスペーサーを含み、例えば、前記NLSの前に1つ及び前記NLSの後に1つ、または前記NLSの前または後に両方のスペーサーを含む、実施形態31に記載の組成物。

【0131】

33. 前記スペーサーまたは複数のスペーサーが、ポリエチレングリコール(PEG)、アルギン酸プロピレングリコール(PGA)、PEG-ポリ乳酸(PLA)、ポリ乳酸-グリコール酸コポリマー(PGLA)、またはそれらの任意の組み合わせを含む、実施形態31または32に記載の組成物。

【0132】

34. 前記スペーサーまたは複数のスペーサーが、任意によりアラニン及び／またはセリン残基と共に、ポリグリシン配列を含む、実施形態31または32に記載の組成物。

【0133】

35. 前記スペーサーまたは複数のスペーサーが、GGGG(配列番号5)のアミノ酸配列を有する、実施形態34に記載の組成物。

【0134】

36. 前記アダプター分子が、少なくとも1つのDNA標的化配列(DTS)を更に含む、実施形態14～35のいずれか1項に記載の組成物。

【0135】

37. 前記少なくとも1つのDTSが、前記DBSと前記CBRとの間に存在するか、または前記DBS及び前記CBRと重なる、実施形態36に記載の組成物。

【0136】

38. 前記アダプター分子が細胞貫通ペプチド配列(CPP)を更に含む、実施形態14～37のいずれか1項に記載の組成物。

【0137】

39. 前記CPPが、前記DBSと前記CBRとの間に存在するか、または前記DBS及び前記CBRと重なっている、実施形態38に記載の組成物。

【0138】

40. 前記CPPが本明細書において開示されるCPPを含む、実施形態38または39に記載の組成物。

【0139】

41. 前記CPPが、QPRRRPRRKRG(配列番号6)のアミノ酸配列を含む、実施形態38～40のいずれか1項に記載の組成物。

【0140】

42. 前記アダプター分子が少なくとも1つの切断部位を更に含む、実施形態14～41のいずれか1項に記載の組成物。

【0141】

43. 前記少なくとも1つの切断部位が、前記DBSと前記CBRとの間に存在するか、または前記DBS及び前記CBRと重なる、実施形態42に記載の組成物。

【0142】

44. 前記切断部位が前記DBSに隣接して存在する、実施形態42または43に記載の組成物。

【0143】

45. 前記切断部位がVal-Citリンカーである、実施形態42～44のいずれか1項に記載の組成物。

【0144】

46. 前記アダプター分子が少なくとも1つの可動性リンカーを更に含む、実施形態14～45のいずれか1項に記載の組成物。

【0145】

47. 前記少なくとも1つの可動性リンカーが、前記DNSと前記CBRとの間に存在

10

20

30

40

50

する、実施形態 46 に記載の組成物。

【0146】

48. 前記少なくとも 1 つの可動性リンカーが、ポリエチレングリコール (PEG)、アルギン酸プロピレングリコール (PGA)、PEG-ポリ乳酸 (PLA)、ポリ乳酸-グリコール酸コポリマー (PGLA)、(GG)n、(GGGGS)n、または (GGGG A)n からなる群から選択され、各 n が独立して 1~5 である、実施形態 46 または 47 に記載の組成物。

【0147】

49. 前記組成物が補助分子を更に含む、実施形態 1~47 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【0148】

50. 前記補助分子が前記 DNA デンドリマーに連結されている、実施形態 49 に記載の組成物。

【0149】

51. 前記補助分子が前記 DNA デンドリマーに連結されていない、実施形態 49 に記載の組成物。

【0150】

52. 前記補助分子が、前記カーゴポリヌクレオチド、前記 DNA デンドリマー、またはその両方のサイズを圧縮する、実施形態 49~51 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【0151】

53. 前記補助分子が核への送達を補助することができる、実施形態 49~52 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【0152】

54. 前記補助分子が、前記カーゴポリヌクレオチド、前記 DNA デンドリマー、またはその両方をヌクレアーゼ分解から保護することができる、実施形態 49~53 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【0153】

55. 前記補助分子が、前記組成物の形質移入効率を増強することができる、実施形態 49~54 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【0154】

56. 前記補助分子が、ATPKKSTKKTPKKAKKATPKKSTKKTPKKAKK (配列番号 12)、WRRRGFGRRR (配列番号 13)、GRKKRRQR RRPQ (配列番号 14)、PKKKRKV (配列番号 15)、GLFHAI AHFIHGGWHGLIHGWYG (配列番号 16)、WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALAEALAA (配列番号 17)、HHHHHHHHHH (配列番号 18)、(KK)q のアミノ酸配列を含み、q が 2~15 である、実施形態 49~55 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【0155】

57. 前記補助分子が、GLFHAI AHFIHGGWHGLIHGWYGWSQPPKKKKRKVATPKKSTKKTPKKAKKATPKKSTKKTPKKAKK (配列番号 19) のアミノ酸配列を含む、実施形態 49~56 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【0156】

58. 前記補助分子が、HHHHHHHHHHATPKKSTKKTPKKAKKATPKKSTKKTPKKAKK (配列番号 20) のアミノ酸配列を含む、実施形態 49~56 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【0157】

59. 前記補助分子が、GLFHAI AHFIHGGWHGLIHGWYGWSQPPKKKKRKVGRKKRRQR RRPQWRRRGFGRRR (配列番号 21) のアミノ酸配列を含む、実施形態 49~56 のいずれか 1 項に記載の組成物。

10

20

30

40

50

70. 前記カーゴポリヌクレオチドが、少なくとも1つのDNA標的化配列(DTS)を更に含む、実施形態64~69のいずれか1項に記載の組成物。

【0169】

71. 前記DTSが前記カーゴポリヌクレオチド内に存在する、実施形態70に記載の組成物。

【0170】

72. 前記DTSが前記カーゴポリヌクレオチドに連結されている、実施形態70に記載の組成物。

【0171】

73. 前記カーゴポリヌクレオチドが、ニックの入った環状ポリヌクレオチドであり、前記DTSが、一本鎖DNA切断点(すなわち、ニックの位置)で前記カーゴポリヌクレオチドに連結されている、実施形態72に記載の組成物。

【0172】

74. 前記カーゴポリヌクレオチドが、少なくとも1つの核局在化シグナル配列(NLS)を更に含む、実施形態64~73のいずれか1項に記載の組成物。

【0173】

75. 前記カーゴポリヌクレオチドが、少なくとも1つのDTS及び少なくとも1つのNLSを含む、実施形態64~74のいずれか1項に記載の組成物。

【0174】

76. 前記DBSが、TAGAGGTAACAACCTAGCGTACAA(配列番号3)、CCTCAGCTTGTACTCTAGTTGTACCTCTAATGCTGGA CCTCAGC(配列番号22)、またはCCTCAGCACCTCTACAGAGTAA CCTAGATTGATCAAAACACCTCAGC(配列番号23)の核酸配列を含む、実施形態66~75のいずれか1項に記載の組成物。

【0175】

77. 前記DBSが、前記DBSの5'または3'末端のいずれかにポリチミン配列を更に含む、実施形態76に記載の組成物。

【0176】

78. 前記DBSが、TAGAGGTAACAACCTAGCGTACAAATTTTTT TTTT(配列番号4)の核酸配列を含む、実施形態77に記載の組成物。

【0177】

79. 前記補助分子が前記DNAデンドリマーに連結されている、実施形態64~78のいずれか1項に記載の組成物。

【0178】

80. 前記補助分子が前記DNAデンドリマーに連結されていない、実施形態64~79のいずれか1項に記載の組成物。

【0179】

81. 前記補助分子が、前記カーゴポリヌクレオチド、前記DNAデンドリマー、またはその両方のサイズを圧縮する、実施形態64~80のいずれか1項に記載の組成物。

【0180】

82. 前記補助分子が核への送達を補助することができる、実施形態64~81のいずれか1項に記載の組成物。

【0181】

83. 前記補助分子が、前記カーゴポリヌクレオチド、前記DNAデンドリマー、またはその両方をヌクレアーゼ分解から保護することができる、実施形態64~82のいずれか1項に記載の組成物。

【0182】

84. 前記補助分子が、前記組成物の形質移入効率を増強することができる、実施形態64~83のいずれか1項に記載の組成物。

【0183】

10

20

30

40

50

【 0 1 8 4 】

【 0 1 8 5 】

10

【 0 1 8 6 】

【 0 1 8 7 】

20

【 0 1 8 8 】

【 0 1 8 9 】

【 0 1 9 0 】

30

【 0 1 9 1 】

【 0 1 9 2 】

40

【 0 1 9 3 】

95. 前記ポリエチレン分子がPEG2000である、実施形態94に記載の組成物。

【 0 1 9 4 】

【 0 1 9 5 】

50

れか 1 項に記載の組成物。

【0196】

98. 前記組成物の窒素／リン酸（N／P）比が、0.5～10である、実施形態1～97のいずれか1項に記載の組成物。

【0197】

99. 前記組成物のN／P比が2～5である、実施形態98に記載の組成物。

【0198】

100. 実施形態1～99のいずれか1項に記載の組成物及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

【0199】

101. 関心対象の分子を標的細胞の核に送達する方法であって、前記方法が、前記標的細胞を実施形態1～99のいずれか1項に記載の組成物または実施形態100に記載の医薬組成物と接触させることを含み、前記標的化部分が前記標的細胞に結合する、前記方法。

【0200】

102. 前記カーゴポリヌクレオチドが、前記標的細胞の核内で前記関心対象の分子を発現する、実施形態101に記載の方法。

【0201】

103. 前記カーゴポリヌクレオチドが、前記標的細胞の核内で2種以上の関心対象の分子を発現する、実施形態101または102に記載の方法。

【0202】

104. 前記カーゴポリヌクレオチドが組織特異的プロモーターを含む、実施形態101～103のいずれか1項に記載の方法。

【0203】

105. 前記標的化部分が組織特異的な標的化部分である、実施形態101～104のいずれか1項に記載の方法。

【0204】

106. 前記組成物または医薬組成物が、2種以上の標的化部分を含む、実施形態101～105のいずれか1項に記載の方法。

【0205】

107. 疾患を処置する方法であって、前記方法が、実施形態1～99のいずれか1項に記載の組成物または実施形態100に記載の医薬組成物を対象に投与して、前記疾患を処置することを含み、前記標的化部分が標的細胞に結合する、前記方法。

【0206】

108. 前記カーゴポリヌクレオチドが、前記標的細胞の核内で前記関心対象の分子を発現する、実施形態107に記載の方法。

【0207】

109. 前記カーゴポリヌクレオチドが、前記標的細胞の核内で2種以上の関心対象の分子を発現する、実施形態107または108に記載の方法。

【0208】

110. 前記カーゴポリヌクレオチドが組織特異的プロモーターを含む、実施形態107～109のいずれか1項に記載の方法。

【0209】

111. 前記標的化部分が組織特異的な標的化部分である、実施形態107～110のいずれか1項に記載の方法。

112. 前記組成物または医薬組成物が、2種以上の標的化部分を含む、実施形態107～111のいずれか1項に記載の方法。

【0210】

113. 少なくとも2つの制限酵素認識部位を含むプラスミド骨格、少なくとも1つのプロモーター、関心対象の少なくとも1種の分子をコードする少なくとも1つのコード配

10

20

30

40

50

列、及び任意にDNAデンドリマー結合配列（DBS）を含むプラスミドであって、前記プラスミドが1つ以上の5'末端及び3'末端を有するか、またはそれらのいずれも有さないかに応じて、前記プラスミドが様々な構造を有するカーゴポリヌクレオチドを形成することができる、前記プラスミド。

【0211】

114．前記プラスミドが、完全な環状ポリヌクレオチド、ニックの入った環状ヌクレオチド、閉じた5'及び3'末端を有する直鎖状ヌクレオチド、開いた5'及び3'末端を有する直鎖状ヌクレオチド、ならびに1つの開いた末端及び1つの閉じた末端を有する直鎖状ヌクレオチドである、実施形態113に記載のプラスミド。

【0212】

115．前記ニックの入った環状ヌクレオチド、閉じた5'及び3'末端を有する直鎖状ヌクレオチド、開いた5'及び3'末端を有する直鎖状ヌクレオチド、ならびに1つの開いた末端及び1つの閉じた末端を有する直鎖状ヌクレオチドが、1種以上の制限酵素で前記プラスミドを切断することにより形成される、実施形態113に記載のプラスミド。

【0213】

116．前記プラスミドが、少なくとも1つのDNA標的化配列（DTS）を更に含む、実施形態113～115のいずれか1項に記載のプラスミド。

【0214】

117．前記少なくとも1つのDTSが、前記プラスミド骨格に存在し、すなわち、前記少なくとも2つの制限酵素認識部位の間に存在するか、またはそれらと重なっている、実施形態116に記載のプラスミド。

【0215】

118．前記少なくとも1つのDTSが、前記少なくとも1つのプロモーターの上流に存在する、実施形態116または117に記載のプラスミド。

【0216】

119．前記少なくとも1つのDTSが、前記少なくとも1つのプロモーターの下流に存在する、実施形態116または117に記載のプラスミド。

【0217】

120．前記カーゴポリヌクレオチドが、少なくとも1つの核局在化シグナル配列（NLS）を更に含む、実施形態113～119のいずれか1項に記載のプラスミド。

【0218】

121．前記少なくとも1つのNLSが、前記少なくとも1つのプロモーターの上流に存在する、実施形態120に記載のプラスミド。

【0219】

122．前記少なくとも1つのNLSが、前記少なくとも1つのプロモーターの下流に存在する、実施形態120に記載のプラスミド。

【0220】

123．前記カーゴポリヌクレオチドが、少なくとも1つのDTS及び少なくとも1つのNLSを含む、実施形態116～122のいずれか1項に記載のプラスミド。

【0221】

124．前記DBSが、TAGAGGTAACAACCTAGCGTACAA（配列番号3）、CCTCAGCTTGTACTCTAGTTGTACCTCTAATGCTGGACCTCAGC（配列番号22）、またはCCTCAGCACCCCTACAGAGTAACCTAGATTGATCAAAACACCTCAGC（配列番号23）の核酸配列を含む、実施形態116～123のいずれか1項に記載の組成物。

【0222】

125．前記DBSが、前記DBSの5'または3'末端のいずれかにポリチミン配列を更に含む、実施形態124に記載の組成物。

【0223】

126．前記DBSが、TAGAGGTAACAACCTAGCGTACAAATTTT

10

20

30

40

50

T T T T T（配列番号 4）の核酸配列を含む、実施形態 1 2 5 に記載の組成物。

【0 2 2 4】

1 2 7．前記少なくとも 1 つのプロモーターが、組織特異的プロモーターである、実施形態 1 1 6 ～ 1 2 6 のいずれか 1 項に記載のプラスミド。

【0 2 2 5】

1 2 8．前記プラスミドが、2 種以上の関心対象の分子をコードするポリヌクレオチド配列を含む、実施形態 1 1 6 ～ 1 2 6 のいずれか 1 項に記載のプラスミド。

【0 2 2 6】

1 2 9．実施形態 1 ～ 6 3 のいずれか 1 項に記載の組成物を製造する方法であって、前記方法が、

実施形態 1 1 3 ～ 1 2 9 のいずれか 1 項に記載のプラスミドを、前記制限酵素認識部位で切断する 1 種以上の制限酵素と接触させて、ニックの入った環状ポリヌクレオチド、閉じた 5' 及び 3' 末端を有する直鎖状ポリヌクレオチド、開いた 5' 及び 3' 末端を有する直鎖状ポリヌクレオチド、または 1 つの開いた末端及び 1 つの閉じた末端を有する直鎖状ポリヌクレオチドを形成させることと、

前記カーゴポリヌクレオチドを前記アダプター分子に連結させて、アダプター分子－カーゴポリヌクレオチド複合体を形成させることと、

前記アダプター分子－カーゴポリヌクレオチド複合体及び標的化部分を DNA デンドリマーに連結させて、前記組成物を形成させることと、を含む、前記方法。

【0 2 2 7】

1 3 0．実施形態 6 4 ～ 9 9 のいずれか 1 項に記載の組成物を製造する方法であって、前記方法が、

DNA デンドリマー結合配列（DBS）を含む実施形態 1 1 3 ～ 1 2 9 のいずれか 1 項に記載のプラスミドを、前記制限酵素認識部位で切断する 1 種以上の制限酵素と接触させて、ニックの入った環状ポリヌクレオチド、閉じた 5' 及び 3' 末端を有する直鎖状ポリヌクレオチド、開いた 5' 及び 3' 末端を有する直鎖状ポリヌクレオチド、または 1 つの開いた末端及び 1 つの閉じた末端を有する直鎖状ポリヌクレオチドを形成させることと、

前記カーゴポリヌクレオチド及び標的化部分を DNA デンドリマーに連結させて、前記組成物を形成させることと、を含む、前記方法。

【0 2 2 8】

1 3 1．実施形態 6 4 ～ 9 9 のいずれか 1 項に記載の組成物を製造する方法であって、前記方法が、

実施形態 1 1 3 ～ 1 2 9 のいずれか 1 項に記載の切断されていない環状プラスミドを標的化部分に連結された DNA デンドリマーと、前記カーゴポリヌクレオチド及び前記 DNA デンドリマーのサイズを圧縮することができる補助分子と共に接触させることであって、その結果、前記カーゴポリヌクレオチド及び前記 DNA デンドリマーが互いに会合して、前記組成物を形成する、前記接触させることを含む、前記方法。

【0 2 2 9】

1 3 2．実施形態 1 ～ 9 9 に記載の組成物、実施形態 1 0 0 に記載の医薬組成物、実施形態 1 1 3 ～ 1 2 9 のいずれか 1 項に記載のプラスミド、またはそれらの幾つかの組み合わせを含むキット。

【実施例】

【0 2 3 0】

以下の実施例は、例示のみを目的として提供され、特許請求の範囲は、これらの実施例に限定されるものと決して解釈されるべきではなく、むしろ、本明細書において提供される教示の結果として明らかとなる、あらゆる変形形態を包含すると解釈されるべきである。当業者は、ほぼ同様の結果をもたらすように変更または改変され得る種々の重要なパラメータを容易に理解するであろう。

【0 2 3 1】

実施例 1：ポリヌクレオチドカーゴの複数のトポロジーの特徴付け

10

20

30

40

50

様々なポリヌクレオチドカーゴのトポロジ構造がどれくらい発現効率に影響を及ぼし得るかを決定するために、CMVプロモーターにより駆動されるルシフェラーゼ及びeGFPを含む遺伝子カセットを、SalI、BbcCI、及びTelが含まれる、複数の制限酵素認識部位を含むプラスミド骨格に挿入した。様々なトポロジを生じさせるために、得られたプラスミドを表1に列挙される以下の制限酵素で切断した。様々なトポロジの記述を図1に示す。

【表3】

表1：プラスミドトポロジ

トポロジ名称	使用される制限酵素
完全な環状	なし
ニックの入った環状	Nt, BbvCI
直鎖状、2つの閉じた末端	TelNプロテロメラーゼ
直鎖状、2つの開いた末端	BbvCI
直鎖状、1つの閉じた末端、1つの開いた末端	TelNプロテロメラーゼ; BbvCI

【0232】

形成されたら、様々なポリヌクレオチドカーゴを、等しいモル量の各トポロジバリエーションを使用してCHO-K1細胞に形質移入した。GFP発現を、細胞イメージング及び定量的蛍光測定を使用して経時的に測定した。GFP陽性細胞の百分率及び全体の蛍光強度を比較した。結果を図2及び図3に示す。未改変の完全な環状（すなわち、プラスミド）及び2つの閉じた末端を有する直鎖状のトポロジは、概して、最も良好な全体の蛍光活性を有していたが、全てのトポロジが、必要とされる特定の治療薬の全体的な活性の変化に有用である活性な蛍光を示した。

【0233】

実施例2：非分裂細胞での局在化

多くの場合、コードされる関心対象の分子の発現のために、カーゴポリヌクレオチドが標的細胞の核に送達されることが重要である。細胞が分裂する場合、核膜は自然に壊れ、細胞質からの直接的な到達が可能となる。しかしながら、有糸分裂しない場合、核膜は無傷なままであり、ほとんどプラスミドを通さない。戦略の候補は、少なくとも1コピーのDNA標的化配列(DTS)、核局在化配列(NLS)、もしくはその両方をカーゴポリヌクレオチドに含めること、カーゴポリヌクレオチドと会合することができるアダプター分子、またはその両方である。健常な細胞質では、NLSを含む転写因子は、DTSに結合することができ、核輸送のためにカーゴを動員することができる。同様に、NLSは、核輸送のためにカーゴを読み取る、必要なインポートンを直接動員することができる。この一般的な戦略を試験するために、eGFPを発現するポリヌクレオチドプラスミドにDTSを含ませ、DTSを有さないeGFPを発現するプラスミドと以下の3つの異なる細胞株で比較した：増殖の早いCHO-K1、中間の増殖のA427、及び比較的緩徐に分裂する分化したC2C12筋芽細胞。

【0234】

概して、DTSなしのプラスミド(P1A)及びDTSプラスミド(P1B)の両方が、CHO-K1(図4)及びA427細胞株(図5)でGFPを発現することができた。両方の細胞株が核への容易な到達を可能にするほど十分な有糸分裂を起こすため、これは予想されていた。しかしながら、増殖しないこと、または遅い増殖速度により、増殖がなければ無傷な核への到達が制限されるC2C12細胞株では、DTSを含むプラスミドカーゴが相対平均蛍光(図6)、相対積分蛍光(図7)、及び相対ピーク蛍光(図8)にお

いて対照プラスミドと比べて有意に良好な発現を示した。図4～8について、ウェル1つ当たりおよそ5,000個の細胞を蒔き、イメージング及び蛍光の定量化を、最初の形質移入の24時間後に行った。有意性は、一元配置分散分析及び群間のテューキー多重比較検定を使用して決定した；* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、及び**** $p < 0.0001$ 。

【0235】

実施例3：ポリヌクレオチドカーゴの複数のトポロジーの更なる特徴付け

追加のポリヌクレオチドカーゴプラスミドを作製し、試験した。

【0236】

レポーター構築物

全てのレポーター構築物が、細菌選択用配列（抗生物質耐性、複製開始点（ORI））、SV40-DTS、コドン最適化したホタルルシフェラーゼ（Luc2-CO）、コドン最適化した高感度緑色蛍光タンパク質（eGFP-CO）、2A自己切断ペプチド（P2A）、及びウシ成長ホルモンポリアダニル化（bgh-ポリA）シグナルを含む。加えて、相補的ハイブリダイゼーションによるプラスミドのDNAデンドリマーナノ粒子への結合を可能にする2つのDBS配列（配列番号22または配列番号23）のうちの1つと共に、TelNプロテロメラーゼ配列を使用した。DBS酵素に隣接する2つのニッカーゼ酵素部位を使用して、一本鎖DNA（ssDNA）配列を合成足場の選択された結合アームに曝露させた。

【0237】

3つのレポーター構築物を作製した。レポーター構築物1及び2は、哺乳動物細胞株における口バストかつ遍在的な発現が公知であるサイトメガロウイルス（CMV）エンハンサー及びプロモーターを共有する。両方のレポーター構築物は、真核生物での翻訳開始のためのコザック配列も共有する。レポーター構築物1は、配列番号22のDBS配列を有する一方で、レポーター構築物2は、配列番号23のDBS配列を有する。レポーター構築物3は、配列番号22のDBS配列を有するが、以下の異なるプロモーターを有する：筋肉特異的プロモーターmCK8e。3つ全てのレポーター構築物が制限酵素の様々な切断部位を有し、2つのニッカーゼ部位をプラスミド操作のために配置した。選択された酵素切断部位及び結合配列を含む領域を「CB骨格エレメント」領域と称する。この領域における追加の特徴は、TelNプロテロメラーゼ認識部位である。この配列はパリンドロームであり、酵素により認識されると、切断部位で2つの共有結合により閉じられた末端（「TelR」及び「TelL」で表す）を形成する。

【0238】

加えて、構築物をコードするDNA挿入断片が10K塩基対超である関心対象の分子の構築物を作製した。この構築物は、レポーター構築物において見出されるのと同じ配列のうち多数を有する：細菌選択用部分、SV40-DTS、mCK8eプロモーター、コザック配列、及びTelNプロテロメラーゼ部位。追加のプロモーターであるT7プロモーターを、細菌での発現の増強のためにコード配列の前に組み込む。同様の制限酵素部位及び2つのニッカーゼ部位がDBS配列（配列番号22）の近くに存在する。

【0239】

方法

レポーター構築物のみで使用された制限酵素を「+」で表し、10K挿入断片の構築物のみで使用されたものを「+」で表す。「Nt」として表すニッカーゼは、配列番号22のDBS部位を有する構築物でのみ使用される。「Nb」として表すニッカーゼは、配列番号23のDBS部位を有する構築物でのみ使用される。記号のないいずれの酵素またはニッカーゼもユニバーサルであり、列挙される任意の構築物で使用され得る。

【0240】

1. 開いたニックの入った環状（OpC）

配列番号22のDBS部位を有する構築物を、1 μ gのプラスミド対1単位（U）の酵素の比率でNt.BbvCIと共にインキュベートする（10,000U/mL、New

10

20

30

40

50

England Biolabs、R0632L、ロット番号：10141032）。配列番号23のDBS部位を有する構築物を、 $1\mu\text{g}$ のプラスミド対1Uの酵素の比率でNb.BbvCIと共にインキュベートする（10,000U/mL、New England Biolabs、R0631L、ロット番号：10150965）。次いで、反応物を300回転数/分（rpm）で50℃にて1時間インキュベートする。

【0241】

次いで、DBS部位に対する適切な捕捉配列を20 μmol 過剰でプラスミドに添加する。次いで、反応物を90℃まで2分間加熱して、ニックの入った鎖がプラスミドから分離するのを可能にする。その後、反応物を3.5時間かけて室温にゆっくりと冷却して、捕捉配列をニックの入った配列に結合させ、付着部位を開いたままにする。

10

【0242】

次いで、イオン交換クロマトグラフィー（IEX）を利用して、捕捉されたニックの入った配列からニックの入ったプラスミドを分離する。次いで、関心対象のピークを含有する画分を合わせ、OpCプラスミドをエタノール（EtOH）沈殿を使用して抽出する。次いで、ペレットを乾燥し、選択すべき緩衝液で再構成する。

【0243】

2. ニックの入った直鎖状（LN）

構築物を、 $1\mu\text{g}$ のプラスミド対1Uの酵素の比率でTelNプロテロメラーゼと共にインキュベートする（20,000U/mL、New England Biolabs、M0651B-HC2、ロット番号：10151691）。反応物を30℃及び300rpmで4時間インキュベートする。ヌクレアーゼ非含有水への緩衝液交換を実行して、最初の緩衝液からトリトンXを除去する。

20

【0244】

TelNで直鎖化した配列番号22のDBS部位を有する構築物を、 $1\mu\text{g}$ のプラスミド対1単位（U）の酵素の比率でNt.BbvCIと共にインキュベートする（10,000U/mL、New England Biolabs、R0632L、ロット番号：10141032）。配列番号23のDBS部位を有する構築物を、 $1\mu\text{g}$ のプラスミド対1Uの酵素の比率でNb.BbvCIと共にインキュベートする（10,000U/mL、New England Biolabs、R0631L、ロット番号：10150965）。次いで、反応物を300rpmで50℃にて1時間インキュベートする。

30

【0245】

次いで、DBS部位に対する適切な捕捉配列を20 μmol 過剰でプラスミドに添加する。次いで、反応物を90℃まで2分間加熱して、ニックの入った鎖がプラスミドから分離するのを可能にする。その後、反応物を3.5時間かけて室温にゆっくりと冷却して、捕捉配列をニックの入った配列に結合させ、付着部位を開いたままにする。

【0246】

次いで、IEXを利用して、捕捉されたニックの入った配列からニックの入ったプラスミドを分離する。次いで、関心対象のピークを含有する画分を合わせ、LNプラスミドをEtOH沈殿を使用して抽出する。次いで、ペレットを乾燥し、選択すべき緩衝液で再構成する。

40

【0247】

3. 1つの開いた末端、1つの閉じた末端（1co）

構築物を、 $1\mu\text{g}$ のプラスミド対1Uの酵素の比率でTelNプロテロメラーゼと共にインキュベートする（20,000U/mL、New England Biolabs、M0651B-HC2、ロット番号：10151691）。反応物を30℃及び300rpmで4時間インキュベートする。ヌクレアーゼ非含有水への緩衝液交換を実行して、最初の緩衝液からトリトンXを除去する。

【0248】

MfeI+（20,000U/mL、New England Biolabs、R3589L、ロット番号：10150327）またはEagI+（100,000U/mL

50

、New England Biolabs、R3505M、ロット番号：10157687)を、1 μ gのプラスミド対1Uの酵素の比率で、TelNで直鎖化した構築物と共にインキュベートする。反応物を300rpmで37℃にて1時間インキュベートする。ニッカーゼ反応の前に、EtOH沈殿を使用して、1つの開いた末端を有する直鎖化したプラスミドを沈殿させる。

【0249】

配列番号22のDBS部位を有する構築物を、1 μ gのプラスミド対1単位(U)の酵素の比率でNt.BbvCIと共にインキュベートする(10,000U/mL、New England Biolabs、R0632L、ロット番号：10141032)。配列番号23のDBS部位を有する構築物を、1 μ gのプラスミド対1Uの酵素の比率でNt.BbvCIと共にインキュベートする(10,000U/mL、New England Biolabs、R0631L、ロット番号：10150965)。次いで、反応物を300rpmで50℃にて1時間インキュベートする。

10

【0250】

次いで、DBS部位に対する適切な捕捉配列を20 μ mol過剰でプラスミドに添加する。次いで、反応物を90℃まで2分間加熱して、ニックの入った鎖がプラスミドから分離するのを可能にする。その後、反応物を3.5時間かけて室温にゆっくりと冷却して、捕捉配列をニックの入った配列に結合させ、付着部位を開いたままにする。

【0251】

次いで、IEXを利用して、捕捉されたニックの入った配列からニックの入ったプラスミドを分離する。次いで、関心対象のピークを含有する画分を合わせ、1coplusミドをエタノール(EtOH)沈殿を使用して抽出する。次いで、ペレットを乾燥し、選択すべき緩衝液で再構成する。

20

【0252】

4. 2つの開いた末端(2oe)

MfeI+(20,000U/mL、New England Biolabs、R3589L、ロット番号：10150327)またはEagI+(100,000U/mL、New England Biolabs、R3505M、ロット番号：10157687)を、1 μ gのプラスミド対1Uの酵素の比率で構築物と共にインキュベートする。反応物を300rpmで37℃にて1時間インキュベートする。選択した緩衝液での再構成の前に、EtOH沈殿を使用して、直鎖化した2oeプラスミドを沈殿させる。

30

【0253】

配列番号22のDBS部位を有する構築物を、1 μ gのプラスミド対1単位(U)の酵素の比率でNt.BbvCIと共にインキュベートする(10,000U/mL、New England Biolabs、R0632L、ロット番号：10141032)。配列番号23のDBS部位を有する構築物を、1 μ gのプラスミド対1Uの酵素の比率でNt.BbvCIと共にインキュベートする(10,000U/mL、New England Biolabs、R0631L、ロット番号：10150965)。次いで、反応物を300回転数/分(rpm)で50℃にて1時間インキュベートする。

【0254】

次いで、DBS部位に対する適切な捕捉配列を20 μ mol過剰でプラスミドに添加する。次いで、反応物を90℃まで2分間加熱して、ニックの入った鎖がプラスミドから分離するのを可能にする。その後、反応物を3.5時間かけて室温にゆっくりと冷却して、捕捉配列をニックの入った配列に結合させ、付着部位を開いたままにする。

40

【0255】

次いで、IEXを利用して、捕捉されたニックの入った配列からニックの入ったプラスミドを分離する。次いで、関心対象のピークを含有する画分を合わせ、1coplusミドをエタノール(EtOH)沈殿を使用して抽出する。次いで、ペレットを乾燥し、選択すべき緩衝液で再構成する。

【0256】

50

確認の結果

別途注記のない限り、レポーター構築物 1 を全ての実験に使用した。

【0257】

1. OpC プラスミドの確認

制限断片長多型 (RFLP) 分析を使用して、ダブルニッカーゼの有効性を 15% TBE-尿素変性ポリアクリルアミドゲルで評価した。プラスミドの改変前は、ゲルバンドを示さなかったが、ニッカーゼ後のプラスミドは、予想される切断によるバンドサイズと一致する 38 bp のバンドを示した。RFLP のために、TelN を使用して、プラスミドを開き、その後、追加の制限酵素によりニック部位から更に上流で切断した。これは、ニックの入った上鎖からの 2 つのより小さな断片 (47 及び 58 bp) 及び下鎖からの 1 つのより長い断片 (209 bp) をもたらした。加えて、この分析が IEX による精製前に実行されたため、ニッカーゼによる 38 bp のバンドが存在する。これらのバンドは、切断により予想されるサイズと一致した。

10

【0258】

改変されたプラスミドが依然として機能していたかどうかを観察するために、Lipofectamine 2000 (カタログ番号: 11668019、ThermoFisher Scientific、Waltham、MA) を用いて HepG2 細胞に OpC トポロジーのレポーター構築物 1 を形質移入した。処理の 1 日前に細胞を約 2.5×10^4 個細胞/ウェルで播種した。48 時間後に eGFP 発現に起因する細胞の蛍光を撮像した (励起/発光: 488/509 nm)。個々のピクセルが偏りなく表現されることを可能にする積分蛍光強度の合計を使用して蛍光シグナルを定量化した。結果は、レポーター構築物 1 が蛍光シグナルの強い分布を示すことを示した。

20

【0259】

2. ニックの入った直鎖状 (LN) プラスミドの確認

LN プラスミドの RFLP については、プラスミドがすでに TelN で処理されていたため、ニッカーゼ部位の上流での追加の制限酵素のみが必要とされた。予想通り、ニッカーゼによる 38 bp のバンドに加えて、47、58、及び 209 bp のバンドが存在する。

【0260】

3. 1 つの開いた末端、1 つの閉じた末端 (1co) のプラスミドの確認

1co のプラスミドに対して実行された RFLP は、ニッカーゼの添加前に、除去された閉じた末端の 132 bp のバンド及び確認のための切断による 30 bp のバンドが予想通りに存在したことを示した。ニッカーゼの添加後、132、48、46、及び 38 bp のバンドの RFLP が、閉じた末端の除去、ニックの入った鎖のより小さな断片、及び DNA の切除された部分により、全て予想通りにもたらされた。

30

【0261】

実施例 4: 複合体生成及びポリヌクレオチドカーゴの保護についての補助分子の特徴付け
ヌクレアーゼは、核酸のヌクレオチド間のホスホジエステル結合を切断する酵素である。それらは多くの場合、DNA 修復メカニズム、例えば、複製の校正、岡崎フラグメントプロセッシング、ミスマッチ修復、塩基除去修復、ヌクレオチド除去修復、及び二本鎖切断修復において見出される。核酸ベースの遺伝子送達法では、ヌクレアーゼは、ペイロードが (DNA の場合は) 転写または (リボ核酸 (RNA) では) 翻訳され得る前にそれを破壊することにより、活性の強い阻害剤となり得る。

40

【0262】

インビボでの送達で考慮に入れるべき更なる要素は、ペイロードを有さないナノ担体に対するペイロードを有するナノ担体のサイズである。孔径は細胞種毎に異なり、同じサイズの物質のみが取り込まれることを許される。DNA デンドリマーナノ担体のサイズは、約 60 nm である。ペイロードは、そのトポロジーに応じて、劇的に粒子サイズを増加させ得る。以前に測定された直鎖化 pDNA は、DNA デンドリマーへのハイブリダイゼーション後で約 750 nm の長さであった。より小さな孔径を有する細胞への送達を可能に

50

容量に混合する。次いで、この溶液を300rpmで室温にて30分間混合する。

【0266】

補助分子がプラスミド核酸との複合体形成に成功したかどうかを確認するために、最終生成物を1.1%のアガロースゲル上で泳動させて、遊離プラスミドが反応後に依然として存在するかどうかを観察した。結果は、1または2のN/P比でExc 1が部分的な複合体生成を示したが、5及び8のN/P比で完全な複合体生成を示したことを示した。Exc 2は、1のN/P比で複合体生成を示さず、5のN/P比で部分的な複合体生成を示した一方で、Exc 3は、1または5のN/P比で複合体生成を示さなかった。ポリマーベースの補助分子は、それらの均一に正の配列に起因して、より低いN/P比で機能する。PLL P1、PLL P2、及びPLL P3は全て、0.5もの低いN/P比で完全な複合体生成を示した。ハイブリッドPEG-Exc 1補助分子は、Exc 1単独と同程度のN/P比で複合体生成を示した。

10

【0267】

ヌクレアーゼ保護をDNアーゼIアッセイを使用して測定した。試料を5UのDNアーゼI (M030S、New England Biolabs) に37℃で30分間供した。この量は、クリーンアップキットにより処理することができるDNAの最大量である0.5ugのプラスミドを完全に分解するために必要とされたDNアーゼIの量を定めることにより決定した。次いで、試料を、New England Biolabs社の市販のキット (T1030L) を用いて精製した。クリーンアップ後、試料を1.1%のアガロースゲル上で泳動させて、複合体、プラスミド、またはその両方が残存するかどうかを観察した。5及び8のN/P比でプラスミドDNAと複合体を形成したExc 1を用いて実験を行った。トランスフェクション剤であるTurboFect (商標) (R0531、ThermoFisher Scientific) と複合体を形成したプラスミドも、それが同様に複合体を形成する能力が実証されているため、対照として含めた。3つ全ての溶液がDNAプラスミドと複合体を形成したが、TurboFect (商標) は、プラスミドを分解から保護することができなかった。Exc 1は、両方のN/P比でほとんどまたは全く分解を示さない。PLL補助分子での追加の実験は、それらがより弱いDNアーゼ保護を示すことを示す。PEG-Exc 1ハイブリッドは、Exc 1と同等に保護し、このことは、PEGが補助分子の安定性に影響を及ぼさないことを示す。

20

【0268】

PEG-Exc 1ハイブリッド補助分子が何らかの細胞毒性を引き起こすかどうかを決定するために、CellTiter-Glo (登録商標) 発光細胞生存アッセイ (G7570、Promega) を、処理されたマウス細胞 (C2C12、CRL-1772、ATCC) に対して実行した。細胞を補助分子カプセル化コンジュゲーション (ナノ担体、プラスミド、標的化部分、及び補助分子) とインキュベートした。用量はプラスミド質量に基づく (ウェル当たり0.2 µg 及び1.0 µg)。試料を五重反復で試験した。ウェル当たり0.2 µg では、対照細胞と比較して、PEG-Exc 1またはTurboFect (商標) のいずれかによる生存率の統計的な減少はなかった。ウェル当たり1.0 µg では、対照細胞と比較して、PEG-Exc 1及びTurboFect (商標) の両方が生存率に影響を及ぼした。

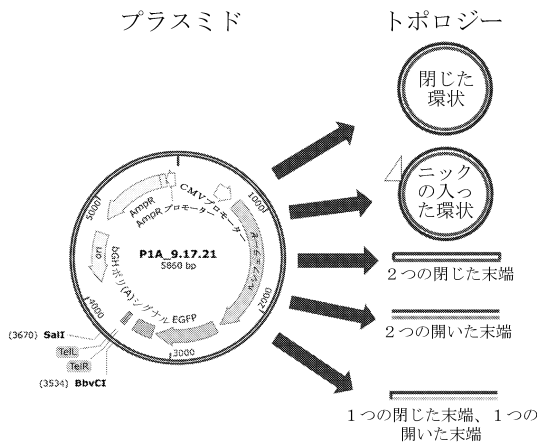
40

【0269】

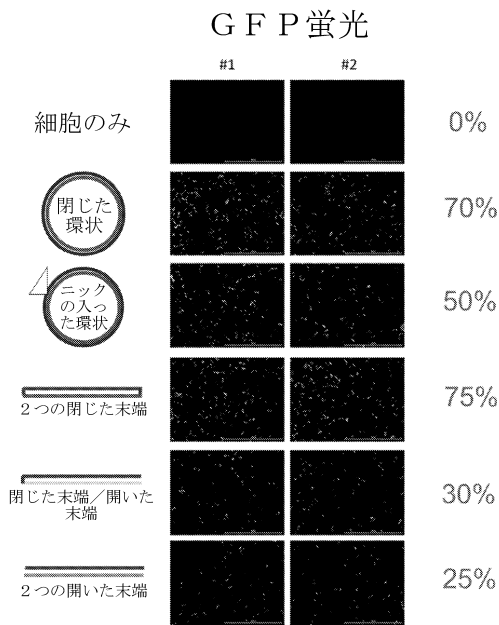
追加の補助分子が設計され得る。H1配列の数の変更により、核酸が圧縮され得、それらの追加によりN/P比及び全体の安定剤含量が低減され得る。異なるCPP、例えば、アルギニン-8が、インビトロ及びインビボモデルの両方での形質移入を変化させるために追加され得る。同様に、代替的なNLS配列が核送達を増強するために調査され得る。更に、標的化ペプチド配列が、合成時に塩基安定剤に添加され得るか、または官能基を介して化学的に付加され得る (例えば、クリックケミストリー、アミド、架橋)。最後に、補助分子の特定の領域が、複合体生成のための電荷区域の分離のために中性または陽性にされ得、新たな官能基が末端に付加され得るか、または鎖の全体にわたって配置され得る。例えば、これらは、低分子、抗体、及びペプチド配列に対する結合部位を含み得る。

50

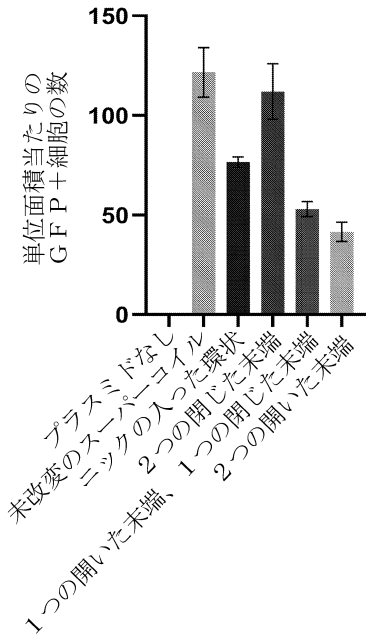
【図面】
【図 1】



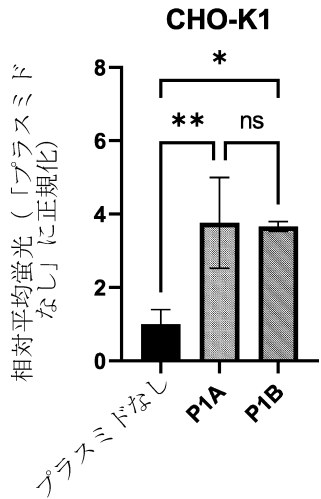
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

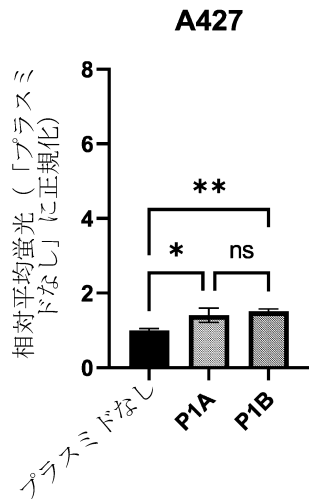
20

30

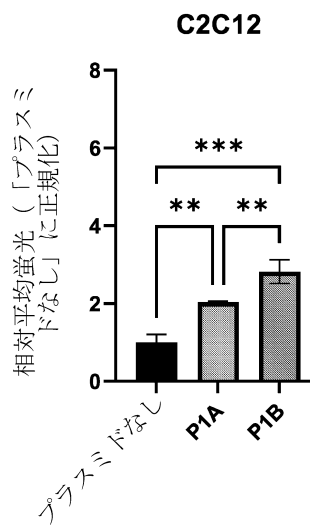
40

50

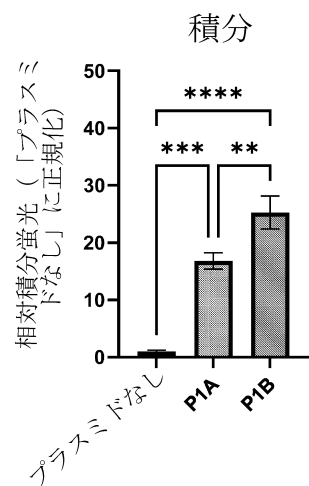
【図 5】



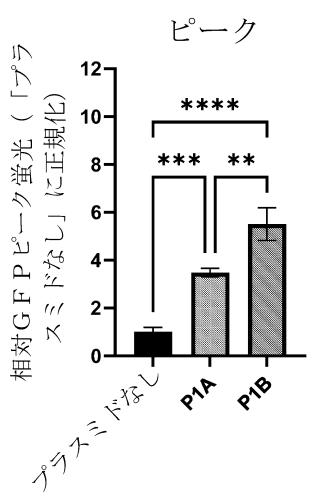
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【配列表】

2025507359000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US23/62270

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - INV. A61K 47/56; A61K 31/712; A61K 38/16; A61K 47/54; C12N 15/113; C12Q 1/6844 (2023.01)

ADD.

CPC - INV. A61K 47/56; A61K 47/549; C12N 15/113; C12Q 1/6844

ADD. C12Q 2525/313

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)

See Search History document

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

Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2021/0121580 A1 (GENISPHERE, LLC, et al.) 29 April 2021; paragraphs [0027], [0040], [0044], [0056], [0057]; claim 1	1-2 — 3-8
Y	US 2019/0185924 A1 (TOUCHLIGHT IP LIMITED) 20 June 2019; paragraph [0022]	3
X — Y	WO 2021/152147 A1 (TYRIS THERAPEUTICS, S.L.) 05 August 2021; abstract; page 5, lines 28-33; page 25, lines 4-8, 14-18; page 30, lines 31-39; page 36, lines 11-19; page 46, lines 16-23; figure 14	113-117 — 4-8
EX	WO 2023/154788 A2 (CODE BIOTHERAPEUTICS, INC.) 17 August 2023; entire document	1-8, 113-117

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"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

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 August 2023 (28.08.2023)

Date of mailing of the international search report

SEP 26 2023

Name and mailing address of the ISA/

Mall Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Shane Thomas

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US23/62270

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter:1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US23/62270

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
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.: 10-83, 89-112, 118-132
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

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:

-***Please See Supplemental Page-***

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.:
Group I, Claims 1-9, 113-117

20

30

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the 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.

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US23/62270

-Continued From Box No. III: Observations where unity of invention is lacking-

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, Claims 1-9, 113-117 are directed toward a composition comprising a DNA dendrimer linked to, or associated with: a targeting moiety; and an adaptor molecule-cargo polynucleotide complex.

Group II, Claims 64-68 are directed toward a composition comprising a cargo polynucleotide, a support molecule, and a DNA dendrimer linked to a targeting moiety.

The inventions listed as Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Group I include an adaptor molecule-cargo polynucleotide complex, not present in Group II; the special technical features of Group II include a support molecule, not present in Group I.

Groups I and II share the technical features including: a composition comprising a cargo polynucleotide and a DNA dendrimer linked to a targeting moiety.

However, these shared technical features are previously disclosed by US 2021/0121580 A1 to Genisphere, LLC, et al. (hereinafter 'Genisphere').

Genisphere discloses a composition comprising a cargo polynucleotide (gene construct (cargo polynucleotide); paragraph [0057]; claim 1) and a DNA dendrimer (DNA dendrimer; abstract) linked to a targeting moiety (functionalized DNA dendrimer having a moiety that target the DNA dendrimer to a particular cell type; paragraph [0027], [0040], [0056]; claim 1).

Since none of the special technical features of the Groups I and II inventions are found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Genisphere reference, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/56 (2017.01)	A 6 1 K 47/56	
A 6 1 K 47/60 (2017.01)	A 6 1 K 47/60	
A 6 1 K 47/64 (2017.01)	A 6 1 K 47/64	
A 6 1 K 31/712 (2006.01)	A 6 1 K 31/712	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 38/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11	Z

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

ン・ロード 7 2 7

- (72)発明者 ジェニファー・エム・ルーク
アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 0 0 2 . ローワー・グウィネッド . スイート 3 0 0 . ビルディング 9 . ノリスタウン・ロード 7 2 7
- (72)発明者 サマンサ・ズイー・ブラウン
アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 0 0 2 . ローワー・グウィネッド . スイート 3 0 0 . ビルディング 9 . ノリスタウン・ロード 7 2 7
- (72)発明者 ケイシー・ジェイ・マセナ
アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 0 0 2 . ローワー・グウィネッド . スイート 3 0 0 . ビルディング 9 . ノリスタウン・ロード 7 2 7
- (72)発明者 ローリー・エイ・ゲッツ
アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 0 0 2 . ローワー・グウィネッド . スイート 3 0 0 . ビルディング 9 . ノリスタウン・ロード 7 2 7

F ターム (参考) 4C076 AA95 CC26 CC41 EE30 EE41 EE59
4C084 AA02 AA03 AA13 BA44 NA13 ZB21
4C086 AA01 AA02 EA16 NA13 ZB21
4H045 AA10 AA30 BA09 BA13 BA14 BA15 BA16 BA17 BA18 BA19
BA20 EA20 EA50 FA74