

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-524477

(P2014-524477A)

(43) 公表日 平成26年9月22日(2014.9.22)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C07K 7/06 (2006.01)	C07K 7/06	Z N A 4 B 02 4
C07K 17/02 (2006.01)	C07K 17/02	4 C 07 6
A61K 31/7088 (2006.01)	A61K 31/7088	4 C 08 4
A61K 31/713 (2006.01)	A61K 31/713	4 C 08 6
A61K 48/00 (2006.01)	A61K 48/00	4 H 04 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 103 頁) 最終頁に続く

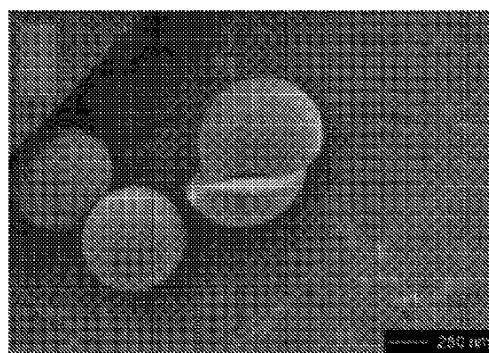
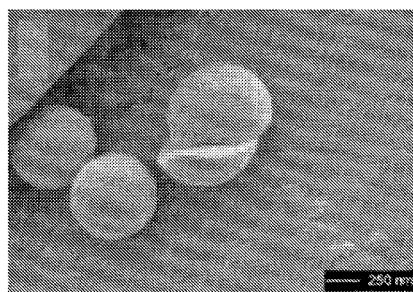
(21) 出願番号	特願2014-527288 (P2014-527288)	(71) 出願人	507244910 プレジデント・アンド・フェロウズ・オブ ・ハーバード・カレッジ アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケ ンブリッジ クインシー ストリート 1 7
(86) (22) 出願日	平成24年8月23日 (2012.8.23)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(85) 翻訳文提出日	平成26年4月17日 (2014.4.17)	(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(86) 國際出願番号	PCT/US2012/052027	(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(87) 國際公開番号	W02013/028843	(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(87) 國際公開日	平成25年2月28日 (2013.2.28)		
(31) 優先権主張番号	61/526,526		
(32) 優先日	平成23年8月23日 (2011.8.23)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ペプチドナノ粒子およびその使用

## (57) 【要約】

本明細書において提供される発明は、両親媒性ペプチドおよび両親媒性ペプチドを含む粒子に関する。本明細書において提供されるそのような両親媒性ペプチドおよび粒子は、例えば治療もしくは診断目的での送達システムとして、または細胞透過ビヒクルもしくは細胞トランスフェクト剤として、使用することができる。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

疎水性ペプチジルセグメントと親水性ペプチジルセグメントとを含む両親媒性ペプチドを含み、かつ自身の外表面にリガンドをさらに含むペプチド粒子であって、

疎水性ペプチジルセグメントが $(Trp-Leu)_m-(Trp)_n$ または $(Leu-Trp)_p-(Leu)_q$ のアミノ酸配列を含み、各TrpがD-TrpまたはL-Trpであり、かつ各LeuがD-LeuまたはL-Leuであり、mおよびpが独立して1～5の整数であり、かつnおよびqが独立して0または1であるが、ただし、TrpがD-Trpの場合、LeuはL-Leuであり、かつTrpがL-Trpの場合、LeuはD-Leuであり、またはその逆も同様であり；かつ

親水性ペプチジルセグメントが $(Lys)_r$ のアミノ酸配列を含み、rが1～15の整数である、前記ペプチド粒子。 10

## 【請求項 2】

親水性ペプチジルセグメントにおける少なくとも1つのLys残基または両親媒性ペプチドにおけるN末端アミノ基がアセチル化されている、請求項1記載のペプチド粒子。

## 【請求項 3】

両親媒性ペプチドが  
 $(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-X$   
 のアミノ酸配列を含み、Xが存在しないかまたはNH<sub>2</sub>である、請求項1または2記載のペプチド粒子。 20

## 【請求項 4】

L-Lys残基の少なくとも1つがアセチル化されている、および/または両親媒性ペプチドのN末端アミノ基がアセチル化されている、請求項3記載のペプチド粒子。 20

## 【請求項 5】

リガンドが細胞表面受容体リガンドまたは抗体を含む、請求項1～4のいずれか一項記載のペプチド粒子。

## 【請求項 6】

請求項1～5のいずれか一項記載の完全にアセチル化された両親媒性ペプチドと、請求項1～5のいずれか一項記載の部分的にアセチル化された両親媒性ペプチドと、任意で、請求項1～5のいずれか一項記載のアセチル化されていない両親媒性ペプチドとの混合物を含む、請求項1～5のいずれか一項記載のペプチド粒子。 30

## 【請求項 7】

活性剤をさらに含む、請求項1～6のいずれか一項記載のペプチド粒子。

## 【請求項 8】

活性剤の標的指向性送達のための、請求項7記載のペプチド粒子の使用。

## 【請求項 9】

細胞透過剤またはトランスフェクト剤として正に荷電した両親媒性ペプチドを含む組成物の使用であって、

正に荷電した両親媒性ペプチドが、疎水性ペプチジルセグメントと親水性ペプチジルセグメントとを含み、

疎水性ペプチジルセグメントが $(Trp-Leu)_m-(Trp)_n$ または $(Leu-Trp)_p-(Leu)_q$ のアミノ酸配列を含み、各TrpがD-TrpまたはL-Trpであり、かつ各LeuがD-LeuまたはL-Leuであり、mおよびpが独立して1～5の整数であり、かつnおよびqが独立して0または1であるが、ただし、TrpがD-Trpの場合、LeuはL-Leuであり、かつTrpがL-Trpの場合、LeuはD-Leuであり、またはその逆も同様であり；

親水性ペプチジルセグメントが $(Lys)_r$ のアミノ酸配列を含み、rが1～15の整数であり；かつ

Lys残基の少なくとも1つまたは両親媒性ペプチドのN末端アミノ基がアセチル化されていない、

前記使用。

## 【請求項 10】

40

50

Lys残基のすべておよび両親媒性ペプチドのN末端アミノ基がアセチル化されていない、請求項9記載の使用。

**【請求項 1 1】**

両親媒性ペプチドが  
(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-X  
のアミノ酸配列を含み、Xが存在しないかまたはNH<sub>2</sub>である、請求項9または10記載の使用。  
。

**【請求項 1 2】**

組成物が、細胞内へと送達される核酸分子をさらに含む、請求項9～11のいずれか一項記載の使用。 10

**【請求項 1 3】**

第1の両親媒性ペプチドと第2の両親媒性ペプチドとを含むペプチド粒子であって、  
第1および第2の両親媒性ペプチドが、各々独立して疎水性ペプチジルセグメントと親水性ペプチジルセグメントとを含み、

疎水性ペプチジルセグメントが(Trp-Leu)<sub>m</sub>-(Trp)<sub>n</sub>または(Leu-Trp)<sub>p</sub>-(Leu)<sub>q</sub>のアミノ酸配列を含み、各TrpがD-TrpまたはL-Trpであり、かつ各LeuがD-LeuまたはL-Leuであり、mおよびpが独立して1～5の整数であり、かつnおよびqが独立して0または1であるが、ただし、TrpがD-Trpの場合、LeuはL-Leuであり、かつTrpがL-Trpの場合、LeuはD-Leuであり、またはその逆も同様であり；かつ

親水性ペプチジルセグメントが(Lys)<sub>r</sub>のアミノ酸配列を含み、rが1～15の整数であり、かつ 20

第1の両親媒性ペプチドのLys残基のすべておよびN末端アミノ基がアセチル化されており；かつ

第2の両親媒性ペプチドの少なくともN末端アミノ基または1つのLys残基がアセチル化されていない、

前記ペプチド粒子。

**【請求項 1 4】**

第2の両親媒性ペプチドのN末端アミノ基およびLys残基がいずれもアセチル化されていない、請求項13記載のペプチド粒子。

**【請求項 1 5】**

活性剤をさらに含む、請求項13または14記載のペプチド粒子。 30

**【請求項 1 6】**

活性剤が核酸分子を含む、請求項15記載のペプチド粒子。

**【請求項 1 7】**

自身の外表面にリガンドをさらに含む、請求項13～16のいずれか一項記載のペプチド粒子。

**【請求項 1 8】**

第1および第2の両親媒性ペプチドが、各々独立して  
(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-X  
のアミノ酸配列を含み、Xが存在しないかまたはNH<sub>2</sub>である、請求項13～17のいずれか一項記載のペプチド粒子。 40

**【請求項 1 9】**

細胞に核酸分子を送達するための、請求項13～18のいずれか一項記載のペプチド粒子の使用。

**【請求項 2 0】**

核酸分子がsiRNA、miRNA、shRNA、DNA、またはそれらの任意の組み合わせを含む、請求項19記載の使用。

**【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

本願は、35 U.S.C § 119(e)に基づき、2011年8月23日に出願された米国仮出願第61/526,526号の恩典を主張し、その内容全体は参照により本明細書に組み入れられる。

### 【0002】

#### 政府による支援

本発明は、National Institutes of Healthにより授与された助成金第R01 GM090317号の下で政府による支援を受けてなされたものである。政府は本発明に関して一定の権利を有している。

### 【0003】

#### 技術分野

本発明は、両親媒性ペプチドおよび両親媒性ペプチドを含む粒子に関する。

### 【背景技術】

### 【0004】

#### 背景

ナノ粒子は、薬物の安定化および送達に有用であり；溶解性を改善し、保管期間を延ばし、副作用を減らし、そして長期的な治療効果のために薬物を曝露し続けるものである。標的指向性薬物送達に使用されるマトリックスは通常、脂質、ポリマーまたは金属から構成され、これらを集合させて小胞、ミセルまたは粒子にしている。Torchilin V. (2006) *Adv Drug Deliv.* 58: 1532; Stark W (2001) *Angew Chem Int Ed.* 50: 1242; Soussan E et al. (2009) *ACIE.* 48: 274を参照のこと。そのインビボ適用を決定する主要な独立粒子変数には、サイズ、表面電荷、および分散性が含まれ、これらは主にその疎水性効果によって支配されるものである。Nel A et al. (2009) *Nat Mater.* 8: 543。これらの古典的な担体材料とは対照的に、排他的にアミノ酸からコロイド送達システムを設計することは、主に短い疎水性ペプチドの溶解性の問題から、極めて困難である。

### 【0005】

疎水性ペプチドの溶解は、面倒な作業であり、しばしば複雑な溶媒添加プロトコルが必要となる[14]。あらゆる努力がなされても、多くの疎水性ペプチドは全く溶解せず、そのため、FmocまたはBoc保護基化学により合成することが困難であり；合成時の固相へのペプチドの沈降は、少ない収量および多量の副産物につながる。

### 【0006】

それでも、ペプチドから構成される粒子マトリックスは、単一のアミノ酸に分解できる点で望ましい。加えて、他のマトリックス材料、例えばポリマーと異なり、ペプチド合成の生成物は、98%まで精製することができ、分子の多分散性を、したがって物理化学的特性の再現性の問題を回避することができる。さらに、ペプチド構造の特性は、例えばアミノ酸点変異の導入によって、容易に改変することができる。したがって、単純なプロセスで合成および精製することができる、分解性の薬物担体を製造することに対して依然として強い要望がある。

### 【発明の概要】

### 【0007】

#### 概要

本明細書に提供される様々な局面および態様は、両親媒性ペプチド、本明細書に記載される両親媒性ペプチドの1つまたは複数の態様を含むペプチド粒子、および本明細書に記載される両親媒性ペプチドまたはペプチド粒子の使用に関する。本明細書に記載される両親媒性ペプチドの正味電荷は、両親媒性ペプチドのアミノ酸残基に存在する荷電基の数を、例えば1つまたは複数の荷電アミノ基を例えばアセチル化によってマスクすることによって、制御することにより、調節することができる。したがって、本明細書に記載される両親媒性ペプチドおよびペプチド粒子は、異なるタイプの活性剤の、例えば荷電もしくは非荷電分子または極性もしくは非極性分子の、送達担体またはビヒクルとして使用することができます。加えて、本明細書に記載されるペプチド粒子は、ペプチド粒子中に存在する2つまたはそれ以上の態様の両親媒性ペプチドの比を制御することによって、それらの溶

10

20

30

40

50

解性、例えば生理学的条件下でのそれらの溶解性について調節することができる。例えば、完全にマスクされた（例えば、完全にアセチル化された）両親媒性ペプチドは、概して、不溶性のペプチド粒子を形成することができ、一方、部分的にマスクされた（例えば、部分的にアセチル化された）またはマスクされていない（例えば、アセチル化されていない）ペプチドから形成される粒子は、概して、完全にマスクされた（例えば、完全にアセチル化された）両親媒性ペプチドよりも高い溶解性、例えば生理学的条件下での高い溶解性を有する。したがって、いくつかの態様において、本明細書に記載されるペプチド粒子の溶解性、例えば生理学的条件下での溶解性は、異なる溶解性を有するこれらの両親媒性ペプチドの混合物を用いてペプチド粒子を形成し、かつ同ペプチド粒子におけるそれらの量を適宜変更することによって、制御することができる。

10

## 【0008】

本明細書に提供される1つの局面は、疎水性ペプチジルセグメントと親水性ペプチドセグメントとを含む両親媒性ペプチドに関する。本発明者は、親水性セグメントの親水性を調整することによって、両親媒性ペプチドの自己凝集により形成される粒子のタイプを制御できることを発見した。

## 【0009】

したがって、本発明の1つの局面は、疎水性ペプチジルセグメントと親水性ペプチジルセグメントとを含む両親媒性ペプチドであって、疎水性ペプチジルセグメントが、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン（Leu）、フェニルアラニン、チロシンまたはトリプトファン（Trp）から選択される2~10個の交互に並ぶD-およびL-アミノ酸の配列を含み、かつ親水性ペプチジルセグメントが、荷電アミノ酸もしくは非荷電であるが極性のアミノ酸またはそれらの誘導体を含む、両親媒性ペプチドを提供する。

20

## 【0010】

本明細書に記載されるこの局面およびすべての他の局面の特定の態様において、疎水性ペプチジルセグメントは、 $(Trp-Leu)_m-(Trp)_n$ または $(Leu-Trp)_p-(Leu)_q$ のアミノ酸配列を含み得、ここで、各TrpはD-TrpまたはL-Trpであり、かつ各LeuはD-LeuまたはL-Leuであり、mおよびpは独立して1~20の整数であり、かつnおよびqは独立して0または1であるが、ただし、TrpがD-Trpの場合、LeuはL-Leuであり、かつTrpがL-Trpの場合、LeuはD-Leuであり、またはその逆も同様である。

30

## 【0011】

いくつかの態様において、親水性ペプチジルセグメントは、そのN末端かまたはアミノ酸残基かのいずれかに存在する少なくとも1つの電荷を含み得る。そのような態様において、少なくとも1つの電荷は、カチオン電荷またはアニオン電荷のいずれかであり得る。いくつかの態様において、少なくとも1つのカチオン電荷は、Lys、Arg、His、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるアミノ酸残基に存在し得る。いくつかの態様において、少なくとも1つのアニオン電荷は、AspまたはGluおよびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるアミノ酸残基に存在し得る。

## 【0012】

代わりの態様において、親水性ペプチジルセグメントは、非荷電であるが極性のアミノ酸を含み得る。他の態様において、親水性ペプチジルセグメントは、少なくとも1つの電荷と、非荷電であるが極性である少なくとも1つのアミノ酸とを含み得る。様々な態様において、非荷電であるが極性である少なくとも1つのアミノ酸残基は、Ser、Thr、AsnまたはGlnおよびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択され得る。

40

## 【0013】

本明細書に記載されるこの局面およびすべての他の局面の特定の態様において、親水性ペプチジルセグメントは、 $(Lys)_r$ のアミノ酸配列を含み得、ここで、rは1~15の整数である。いくつかの態様において、rは、2~5の整数であり得る。いくつかの態様において、rは3であり得る。

## 【0014】

本明細書に記載されるこの局面およびすべての他の局面のいくつかの態様において、疎

50

水性ペプチジルセグメントは、ポリマーを含み得る。いくつかの態様において、疎水性ペプチジルセグメントへの連結は、ポリマーに共有結合により連結するよう適合され得る。特定の態様において、ポリマーは、生体適合性および／または生分解性ポリマーであり得る。ポリマーの例は、PEG、PGG、PEO、ポリカプロラクトン、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリヒドロキシアルカノエート (polyhydroxyalkabooate)、デキストラン、ポリ無水物、PLA-PGA、ポリオルトエステル、ポリフマレート、ヒドロゲル、任意の当技術分野で知られている生体適合性および／または生分解性ポリマー、ならびにそれらの任意の組み合わせを含むがこれらに限定されない。

## 【0015】

本明細書に記載されるこの局面およびすべての他の局面の特定の態様において、両親媒性ペプチドにおける少なくとも1つのアミノ基は、例えばアセチル化によって、マスクされていてもよい。そのような態様において、少なくとも1つのアミノ基は、両親媒性ペプチドのN末端アミノ基であり得る。他の態様において、少なくとも1つのアミノ基は、親水性ペプチジルセグメントのLys残基に存在するものであり得る。

10

## 【0016】

本明細書に記載されるこの局面およびすべての他の局面のいくつかの態様においては、親水性ペプチジルセグメントのアミノ基のすべてがマスクされていてもよい、例えばアセチル化されていてもよい。他の態様においては、両親媒性ペプチドのN末端アミノ基と、親水性ペプチジルセグメントのアミノ基の少なくとも1つとがマスクされていてもよい、例えばアセチル化されていてもよい。さらに別の態様においては、両親媒性ペプチドのN末端アミノ基と、親水性ペプチジルセグメントのアミノ基のすべてとがマスクされていてもよい、例えばアセチル化されていてもよい。親水性ペプチジルセグメントが(Lys)<sub>n</sub>のアミノ酸配列を含むいくつかの態様においては、両親媒性ペプチドのN末端アミノ基と、親水性ペプチジルセグメントのLys残基の少なくとも1つ（少なくとも2つ、少なくとも3つまたはそれ以上を含む）とがマスクされている、例えばアセチル化されている。親水性ペプチジルセグメントが(Lys)<sub>n</sub>のアミノ酸配列を含む1つの態様においては、両親媒性ペプチドのN末端アミノ基と、親水性ペプチジルセグメントのLys残基のすべてとがマスクされている、例えばアセチル化されている。

20

## 【0017】

様々な態様において、疎水性ペプチジルセグメントは、親水性ペプチジルセグメントのC末端に連結され得る。

30

## 【0018】

特定の態様において、LeuはD-Leuである。いくつかの態様において、TrpはL-Trpである。いくつかの態様において、LysはL-Lysである。いくつかの態様において、mまたはpは、独立して1～3の間であり得る。1つの態様において、mまたはpは3である。1つの態様において、nまたはqは1である。したがって、両親媒性ペプチドの1つの態様は、(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)のアミノ酸配列を含み、ここで、L-Lys残基の少なくとも1つはアセチル化されている。

## 【0019】

いくつかの態様において、両親媒性ペプチドは、  
Ac-(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)  
のアミノ酸配列を含み得る。そのような態様において、L-Lys残基の少なくとも1つは、アセチル化されていてもよい。

40

## 【0020】

他の態様において、両親媒性ペプチドは、  
Ac-(L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-  
(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-X  
のアミノ酸配列を含み得、ここで、Xは存在しないかまたはNH<sub>2</sub>である。

## 【0021】

50

両親媒性ペプチドは、任意の長さのアミノ酸配列を有し得る。いくつかの態様において、両親媒性ペプチドは、約5～約25アミノ酸残基の長さを有し得る。

#### 【0022】

両親媒性ペプチドの疎水性ペプチジルセグメントまたは親水性ペプチジルセグメントは、修飾されていてもよい。例えば、疎水性ペプチジルセグメントまたは親水性ペプチジルセグメントのうち、少なくとも1つは、少なくとも1つの点変異を含み得る。様々な態様において、少なくとも1つの骨格アミド連結は、アミド代替連結 (amide replacement linkage) を含み得る。他の態様において、両親媒性ペプチドは、少なくとも1つの -アミノ酸、-アミノ酸、またはそれらの任意の組み合わせを含み得る。

#### 【0023】

いくつかの態様において、両親媒性ペプチドは、疎水性ペプチジルセグメントと親水性ペプチジルセグメントとを含み、疎水性ペプチジルセグメントはアミノ酸配列 (AA<sup>11</sup>-AA<sup>12</sup>)<sub>b</sub>-(AA<sup>13</sup>)<sub>d</sub>を含み、ここで、AA<sup>11</sup>、AA<sup>12</sup>およびAA<sup>13</sup>はそれぞれの場合で独立して選択される疎水性アミノ酸残基であり、bは1～20の整数であり、かつdは0または1であるが、ただし、AA<sup>11</sup>およびAA<sup>12</sup>は反対の（すなわち、D-およびL-）立体配置を有しかつA<sup>12</sup>およびA<sup>13</sup>は反対の（すなわち、D-およびL-）立体配置を有し；親水性ペプチジルセグメントは1つまたは複数の親水性アミノ酸またはその誘導体を含み；かつ両親媒性ペプチドは部分的にまたは完全にマスクされている。

#### 【0024】

いくつかの態様において、両親媒性ペプチドは、アミノ酸配列 (L-Lys)<sub>r</sub>-(L-Trp)-(D-Leu)<sub>m</sub>-(L-Trp)を含み、ここで、r'は3～21の整数であり、m'は3～20の整数であり、かつN末端アミノ基または少なくとも1つのLys残基の側鎖アミノ基のうち、少なくとも1つは窒素保護基またはアミノ保護基とコンジュゲートしている。

#### 【0025】

本発明者は、本明細書に記載される両親媒性ペプチドのいくつかの態様が細胞透過能力を有し得ることを発見した。したがって、いくつかの態様において、本明細書に記載される両親媒性ペプチドは、細胞透過剤および/またはトランスフェクト剤として使用され得る。これらの態様において、両親媒性ペプチドは、正に荷電するよう設計され得る。したがって、細胞透過剤またはトランスフェクト剤としての正に荷電した両親媒性ペプチドを含む組成物の使用が本明細書に提供され、正に荷電した両親媒性ペプチドは、疎水性ペプチジルセグメントと親水性ペプチジルセグメントとを含む。正に荷電した両親媒性ペプチドの疎水性ペプチジルセグメントは、(Trp-Leu)<sub>m</sub>-(Trp)<sub>n</sub>または(Leu-Trp)<sub>p</sub>-(Leu)<sub>q</sub>のアミノ酸配列を含み、ここで、各TrpはD-TrpまたはL-Trpであり、かつ各LeuはD-LeuまたはL-Leuであり、mおよびpは独立して1～5の整数であり、かつnおよびqは独立して0または1であるが、ただし、TrpがD-Trpの場合、LeuはL-Leuであり、かつTrpがL-Trpの場合、LeuはD-Leuであり、またはその逆も同様であり；親水性ペプチジルセグメントは、(Lys)<sub>r</sub>のアミノ酸配列を含み、ここで、rは1～15の整数である。したがって、正に荷電した両親媒性ペプチドにおいて、Lys残基の少なくとも1つまたは両親媒性ペプチドのN末端アミノ基はアセチル化されていない。いくつかの態様において、正に荷電した両親媒性ペプチドのN末端アミノ基およびLys残基のすべてはアセチル化されていない。

#### 【0026】

いくつかの態様において、正に荷電した両親媒性ペプチドは、(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-Xのアミノ酸配列を含み得、ここで、Xは存在しないかまたはNH<sub>2</sub>である。

#### 【0027】

いくつかの態様において、組成物はさらに、細胞に送達される核酸分子（例えば、DNAまたはRNA）を含み得る。

#### 【0028】

10

20

30

40

50

加えて、本明細書に記載される両親媒性ペプチドはまた、関心対象の化合物、例えば活性剤を細胞に送達するために、単独でまたは送達システムの一部分としてのいずれかで使用され得る。送達システムは、標的指向性送達システムであり得る。送達される化合物は、治療剤、診断剤およびそれらの任意の組み合わせを含み得る。したがって、本発明の1つの局面は、活性剤を両親媒性ペプチドと複合化させる工程および細胞を複合体と接触させる工程を含む、両親媒性ペプチドを送達システムとして使用する方法を提供する。いくつかの態様において、この方法は、治療または診断目的で使用され得る。

#### 【0029】

別の局面において、本発明は、本明細書に記載される両親媒性ペプチドを含む粒子を提供する。本発明者は、特に、本明細書に記載される両親媒性ペプチドによって形成される粒子が、C. Dittrich, Ph.D. Thesis, Universitat Basel, 2007に記載される粒子と相違することを発見した。本明細書に記載される両親媒性ペプチドから作製される粒子がDittrich (2007)に記載されるものと相違するということを明らかにする。Dittrich (2007)に記載されるペプチドは、マスクされたアミノ基を含まない。そのため、そのようなペプチドから形成される粒子は、ミセル、例えば中空の粒子であり、本明細書に記載されるような中実の粒子ではない。したがって、特定の態様において、本明細書に記載されるペプチド粒子は、ミセル、例えば中空の粒子ではない。別の言い方をすると、特定の態様において、本明細書に記載されるペプチド粒子は、中実の粒子である。

#### 【0030】

いくつかの態様において、本明細書に記載される両親媒性ペプチドを含む粒子はさらに、リガンドを含み得る。したがって、1つの態様において、本明細書に記載されるペプチド粒子は両親媒性ペプチドを含み、両親媒性ペプチドは疎水性ペプチジルセグメントと親水性ペプチジルセグメントとを含み、疎水性ペプチジルセグメントは $(Trp-Leu)_m-(Trp)_n$ または $(Leu-Trp)_p-(Leu)_q$ のアミノ酸配列を含み、ここで、各TrpはD-TrpまたはL-Trpであり、かつ各LeuはD-LeuまたはL-Leuであり、mおよびpは独立して1～5の整数であり、かつnおよびqは独立して0または1であるが、ただし、TrpがD-Trpの場合、LeuはL-Leuであり、かつTrpがL-Trpの場合、LeuはD-Leuであり、またはその逆も同様であり；かつ親水性ペプチジルセグメントは $(Lys)_r$ のアミノ酸配列を含み、ここで、rは1～15の整数であり、かつペプチド粒子はその外表面にリガンドをさらに含む。

#### 【0031】

1つの態様において、リガンドは、細胞表面受容体リガンドまたは抗体であり得る。例示的な細胞表面受容体リガンドは、トランスフェリン、EGF、フォレート、およびそれらの任意の組み合わせを含むがこれらに限定されない。特定の態様において、リガンドは、粒子の外表面に存在し得る。例えば、リガンドは、本明細書に記載される粒子の外表面に吸着され得る。代わりの態様において、リガンドは、両親媒性ペプチドに共有結合により連結され得る。1つの態様において、リガンドは、両親媒性ペプチドの親水性ペプチジルセグメントに共有結合により連結される。

#### 【0032】

本明細書に記載される粒子の外表面に存在するリガンドの厚みは、リガンド分子のサイズに一部依存する。いくつかの態様において、粒子の外表面に存在するリガンドの厚みは、約1nm～約100nmの範囲であり得る。1つの態様において、粒子の外表面に存在するリガンドの厚みは、約10nmである。いくつかの態様において、リガンド 対 両親媒性ペプチドの比は、約1:10～約1:1,000,000の範囲であり得る。

#### 【0033】

ペプチド粒子に存在するリガンドは、そのペプチド粒子を送達する標的のタイプ（例えば、細胞、細菌、タンパク質および／または核酸であるがこれらに限定されない）に基づき選択され得る。例えば、本明細書に記載されるペプチド粒子の細胞への送達を容易にするために、その細胞表面受容体に特異的なリガンドが選択され得る。したがって、本明細書に記載されるペプチド粒子のいくつかの態様は、同ペプチド粒子を送達担体またはビビクルとして使用する活性剤の標的指向性送達のために使用され得る。そのような態様にお

10

20

30

40

50

いて、ペプチド粒子は、単独で送達されるときには細胞不透過性である活性剤を、細胞に送達するために使用され得る。

#### 【0034】

したがって、本明細書に記載されるこの局面およびすべての他の局面の様々な態様において、ペプチド粒子は、1つまたは複数の活性剤を含み得る。そのような態様において、活性剤は、粒子内に分散され得る。活性剤は、正味電荷を有さないものまたは正味電荷を有するものであり得る。いくつかの態様において、活性剤は、少なくとも1つの芳香族基を含み得る。活性剤の例は、非限定的に、タンパク質、ペプチド、抗原、抗体またはその一部分、抗体様分子、酵素、核酸、アプタマー、低分子、抗生物質、薬学的に活性な剤、治療剤、造影剤、およびそれらの任意の組み合わせを含む。1つの態様において、活性剤は、薬学的に活性な剤または治療剤である。1つの態様において、活性剤は、siRNA miRNA、shRNA、DNAおよびそれらの任意の組み合わせを含むがこれらに限定されない核酸分子である。特定の態様において、活性剤 対 両親媒性ペプチドの比は、約1:1～約1:100,000、約1:1～約1:10,000、約1:1～約1:1,000、約1:1～約1:100または約1:1～約1:10の範囲であり得る。

10

#### 【0035】

本明細書に記載されるこの局面およびすべての他の局面のペプチド粒子は、いかなるサイズのものであってもよい。いくつかの態様において、ペプチド粒子は、約5nm～約5,000nmのサイズを有し得る。いくつかの態様において、粒子は、約30nm～約150nmのサイズを有し得る。

20

#### 【0036】

いくつかの態様において、ペプチド粒子は、完全にマスクされた（例えば、完全にアセチル化された）本明細書に記載される両親媒性ペプチドと、部分的にマスクされた（例えば、部分的にアセチル化された）本明細書に記載される両親媒性ペプチドとの混合物を含み得る。これらの態様において、完全にアセチル化された両親媒性ペプチド 対 部分的にマスクされた両親媒性ペプチドの比は、約95:5～約1:1の範囲であり得る。特定の態様において、粒子は、マスクされていない（例えば、アセチル化されていない）両親媒性ペプチドをさらに含み得る。

30

#### 【0037】

したがって、完全にアセチル化された両親媒性ペプチドと部分的にアセチル化された両親媒性ペプチドまたはアセチル化されていない両親媒性ペプチドとを含む混合ペプチド粒子もまた、本明細書に提供される。特定の態様において、混合ペプチド粒子は、第1の両親媒性ペプチドと第2の両親媒性ペプチドとを含み、ここで、第1および第2の両親媒性ペプチドは、各々独立して疎水性ペプチジルセグメントと親水性ペプチジルセグメントとを含み、疎水性ペプチジルセグメントは $(Trp-Leu)_m-(Trp)_n$ または $(Leu-Trp)_p-(Leu)_q$ のアミノ酸配列を含み、ここで、各TrpはD-TrpまたはL-Trpであり、かつ各LeuはD-LeuまたはL-Leuであり、mおよびpは独立して1～5の整数であり、かつnおよびqは独立して0または1であるが、ただし、TrpがD-Trpの場合、LeuはL-Leuであり、かつTrpがL-Trpの場合、LeuはD-Leuであり、またはその逆も同様であり；親水性ペプチジルセグメントは、 $(Lys)_r$ のアミノ酸配列を含み、ここで、rは1～15の整数である。加えて、第1の両親媒性ペプチドのLys残基のすべておよびN末端アミノ基がアセチル化されており；一方で、第2の両親媒性ペプチドの少なくともN末端アミノ基または1つのLys残基がアセチル化されていない。いくつかの態様において、第2の両親媒性ペプチドのN末端アミノ基およびLys残基はいずれもアセチル化されていない。

40

#### 【0038】

特定の態様において、第1および第2の両親媒性ペプチドは、各々独立して $(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-X$

のアミノ酸配列を含み得、ここで、Xは存在しないかまたは $NH_2$ である。

50

#### 【0039】

第1の両親媒性ペプチド 対 第2の両親媒性ペプチドの比は、多くの因子、例えば、非限定的に、ペプチド粒子の所望の溶解性および／もしくは安定性ならびに／またはその中に充填される活性剤の特性に基づき変更され得る。いくつかの態様において、第1の両親媒性ペプチド 対 第2の両親媒性ペプチドの比は、約1:1～約1000:1の範囲であり得る。他の態様において、第1の両親媒性ペプチド 対 第2の両親媒性ペプチドの比は、約5:1～約100:1の範囲であり得る。

#### 【0040】

いくつかの態様において、混合ペプチド粒子はさらに、本明細書に記載される活性剤を含み得る。活性剤は、例えばペプチド粒子の充填容量および／または第1もしくは第2の両親媒性ペプチドの結合能力に依存して、任意の量で混合ペプチド粒子中に存在し得る。いくつかの態様において、活性剤 対 第2の両親媒性ペプチドの比は、約1:1000～1:1または約1:100～約1:10の範囲であり得る。いくつかの態様において、活性剤 対 第2の両親媒性ペプチドの比は、約1:10～約1:2の範囲であり得る。

10

#### 【0041】

学説による制約を望まないが、混合ペプチド粒子における第2の両親媒性ペプチドの存在は、アニオン性の核酸分子との結合のためにカチオン電荷を提供し得る。したがって、いくつかの態様において、活性剤は、核酸分子を含み得る。

#### 【0042】

いくつかの態様において、混合ペプチド粒子はさらに、その外表面にリガンドを含み得る。前記のように、リガンドの選択は、混合ペプチド粒子を結合させる標的分子（例えば、細胞、細菌、タンパク質、核酸であるがこれらに限定されない）に基づき決定され得る。リガンドの非限定的な例は、細胞表面受容体リガンドまたはタンパク質、例えば抗体を含み得る。いくつかの態様において、リガンドは、第1および第2の両親媒性ペプチドの少なくとも1つに、例えば第1および第2の両親媒性ペプチドの少なくとも1つにおける親水性ペプチジルセグメントに、共有結合により連結され得る。

20

#### 【0043】

本明細書に記載される混合ペプチド粒子は、本明細書に記載される任意の活性剤を被包するために使用され得る。特定の態様において、混合ペプチド粒子は、核酸分子を被包するために使用され得る。したがって、本発明のさらなる局面は、細胞への核酸分子の送達のための、第1の両親媒性ペプチドと第2の両親媒性ペプチドとを含む混合ペプチド粒子の1つまたは複数の態様の使用を提供する。いくつかの態様において、核酸分子は、RNA（例えば、siRNA、miRNA、shRNAを含むがこれらに限定されない）、DNA、またはそれらの任意の組み合わせを含み得る。

30

#### 【0044】

ペプチド粒子または混合ペプチド粒子の1つまたは複数の態様を作製するための組成物またはキットもまた、本明細書に提供される。いくつかの態様において、組成物またはキットは、本明細書に記載される両親媒性ペプチドを含み得る。組成物またはキットに提供される両親媒性ペプチドは、容器に保存され得る。本明細書に記載されるペプチド粒子または混合粒子の製造に関する使用者の選択に依存して、いくつかの態様において、組成物またはキットは、本明細書に記載される第1の両親媒性ペプチドと第2の両親媒性ペプチドとを含み得る。両親媒性ペプチドは、粉末または凍結乾燥粉末として提供され得る。いくつかの態様において、組成物またはキットはさらに、例えば粉末化された両親媒性ペプチドの再構成のための、粒子集合混合物の乳化のための、またはその両方のための、少なくとも1つの試薬を含み得る。いくつかの態様において、組成物またはキットはさらに、例えば別個の容器で提供される、本明細書に記載されるリガンドを含み得る。いくつかの態様において、組成物またはキットはさらに、ペプチド粒子に被包させる活性剤を含み得る。活性剤は、別個の容器で提供され得る。

40

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0045】

(図1) 図1A～1Bは、本発明の1つまたは複数の態様に従う精製されたCD3acの特徴づ

50

けの結果を示している。図1Aは、オービトラップ (orbitrap) 質量分析装置において測定された質量スペクトルを示している。図1Bは、280nmにおける吸収によって測定された、CD3acおよび合成中間体CD3のRP-HPLC溶出プロファイルを重ねたものを示している。製造物純度は、両方の例で95%を上回っている。

(図2) 図2A～2Cは、本発明の1つまたは複数の態様に従うCD3acペプチドナノ粒子のSEM画像を示している。図2A～2Bは、凍結乾燥されたCD3acビーズのSEM画像を示している。図2Cは、凍結・乾燥のプロセスにおいて破損したCD3acビーズのSEM画像を示している。この画像は、ペプチド沈降物の中実の特性を明らかにする。

(図3) 図3A～3Bは、動的光散乱 (DLS) 結果の直線当てはめを示している。粒子濃度 (図3A) および検出角 (図3B) の両方ともに水性溶液中のCD3acビーズの拡散特性に影響を与える可能性が低いことが決定されている。

(図4) 図4は、CD3ac誘導体であるCD1、CD2、CD3およびCD4の円偏光二色性スペクトルのセットを示している。表示されている数字は、N末端に付加されたリジン残基の数に等しい。

(図5) 図5A～5Bは、ペプチドナノ粒子の特性に対するL-アミノ酸のみの影響を示している。図5Aは、沈降させたLCD3acのSEM画像を示している。CD3ac粒子において観察された球形の集合体は、沈降させたLCD3acでは観察できなかった。図5Bは、CD3 (直線) およびLCD3 (点線) の円偏光二色性スペクトルを示しており、ロイシンアミノ酸の対掌性により2次構造が異なっていることが示されている。LCD3は、-ヘリックスの特徴を示している。

(図6) 図6A～6Cは、ローズベンガル (RB) 、5-カルボキシ-フルオレセイン (CF) または両者の混合物と共に集合させたCD3acビーズの共焦点顕微鏡画像を示している。図6Aは、RBと共に集合させたCD3acビーズの共焦点顕微鏡画像を示している。図6Bは、CFと共に集合させたCD3acビーズの共焦点顕微鏡画像を示している。図6Cは、RBおよびCFを充填したCD3acビーズを示しており、水性溶液中で高い溶解性および低い溶解性の化合物を同時に被包するペプチドビーズの能力が示されている。図6A～6Cに示されるように、RB含有CD3acビーズは個別のスフェアとして観察され、一方、排他的にCFを含有するビーズは凝集する傾向がある。図6A～6Cにおいて、左上パネル：RBの蛍光放射；右下パネル：CFの蛍光放射；右上パネル：位相差画像；および左下パネル：両蛍光チャネルの共局在化。1つのパネルの幅は、55 μmに対応する。

(図7) 図7A～7Bは、CD3acナノ粒子によるローズベンガル (RB) の被包効率を示している。図7Aは、CD3acによるRBの共沈効率の結果を示している。x軸は、溶媒交換および集合前のCD3ac対RBの初期溶解濃度比を表す。左側y軸：沈降物のモル組成 (○)。右側y軸：被包されたRB対全RBのモル比 ( )。例として、RB:CD3acの初期比 = 1:4で、ビーズの約15mol-%がRBからなり、そして初期溶解RBの約33%が集合体内に被包された。図7Bは、異なる量のRBを含有するペレット ( ) および上清画分 ( ) のトリプトファン吸収を示しており、CD3ac集合体が等モル濃度のRBカーゴ (cargo) によって崩壊しないことが示されている。

(図8) 図8A～8Iは、AF568で標識されたトランスフェリン (Tfn-AF568) およびFlutax-2およびトランスフェリン (Tfn) の存在下で集合させたCD3acペプチド粒子の特徴づけの結果を示している。図8A～8Cは、トリプシン処理前のペプチド粒子の赤色 (図8A) および緑色 (図8B) 蛍光の蛍光顕微鏡画像を示している。それらの重ね合わせ (図8C) は、Tfn-AF-568 (リング) およびFlutax-2 (均等分布) の示差的な蛍光分布を示している。図8D～8Fは、6時間のトリプシン処理後の同一サンプルの蛍光画像を示している。Tfn-AF-568 蛍光の特徴的なリングは見えなくなり (図8D) 、Flutax-2の放射強度は13.5倍増大した (図8E) 。図8G～8Hは、トリプシン処理前および後の、赤色 (図8G) および緑色 (図8H) チャネルにおけるn=10の粒子の平均グレイレベルプロファイルを示している。図8Iは、トリプシン処理前および後の、タンパク質コロナ (例えば、Tfn-AF568) を有するCD3acペプチド粒子の概略図を示している。

(図9) 図9A～9Dは、CD3acペプチドナノ粒子内のFlutax-2およびTfn-AF568の組成の

10

20

30

40

50

結果を示している。図9Aおよび9Bは、それぞれ、Tfn-AF568（図9A）およびFlutax-2（図9B）と共に自己集合させたペプチド粒子の定量された組成を示している。x軸は、溶媒交換および集合前の、初期溶解Tfn-AF568またはFlutax-2対CD3ac（123 μM）の濃度比を表している。左側のy軸（白シンボル）：ペプチドナノ粒子（PNP）のモル組成。右側のy軸（黒シンボル）：被包されたTfn-AF568またはFlutax-2対全Tfn-AF568またはFlutax-2のモル比。図9Bの例として、Flutax-2対CD3acの初期比 = 0.1で、PNPの約7.5mol-%がFlutax-2からなり、そして初期溶解Flutax-2の約80%が被包された。80%付近で一定のFlutax-2の被包効率は、5.25の対数分配係数に対応する。図9Cは、Tfnとの競合前および後のPNPのTfn-AF568蛍光強度分布を示している。粒子は10 μg/mLのTfn-568の存在下で集合させ、形成直後に画像化した。黒色のバーは、得られた蛍光点の強度分布に対応する。灰色のバーによって表される分布は、1360 μg/mLのTfnの存在下、37 °Cで24時間のインキュベート期間の後の同一PNPの蛍光強度を示している。図9Dは、図9Cに示されるTfnとの競合前および後のPNPのTfn-AF568蛍光強度分布の累積データプロットを示している。

（図10）図10A～10Kは、粒子直径の制御およびTEMによるナノ粒子形態の特徴づけを示している。図10A～10Cは、492 μM、246 μMおよび123 μMのCD3acから集合させたペプチド粒子におけるTfn-AF568蛍光を示している。スケールバーは、1 μmに対応する。図10Dは、それぞれ10個の粒子の平均結果を示す、3つ重ねた蛍光強度プロファイルを示している。結果は、平均+/-標準偏差によって表されている。図10Eは、粒子サイズ、コロナ蛍光および蛍光顕微鏡の解像限界の関係を説明する、強度プロファイルの概略を示している。図10F～10Iは、10 μg/mLのTfnの非存在下（図10F～10G）および存在下（図10H～10I）で集合させたCD3ac粒子のネガティブ染色TEM画像を示している。タンパク質含有（例えば、Tfn含有）サンプルは、ペプチド粒子の周囲の中間コントラストの層によって区別することができる。時折みられる（黒色の矢印で示される）穴は、TEMにおいて適用された真空に起因するものであり、同様の観察がHyuk I. et al., (2005) Nat Matter 4: 671に記載されている。図10J～10Kは、最終粒子サイズが集合時のTfnの存在に依存することを示している。Tfn-AF568の非存在下での粒子形成では平均粒子直径が100nmであるが（図10J）、粒子集合時にタンパク質が存在する場合は直径が51nmに減少する（図10K）。タンパク質コロナの厚みは、9.0+/-2.1nmに相当する（図10Kの差し込み図）。

（図11）図11A～11Hは、CHO細胞への

$PNP_{Flutax-2}^{Tfn-AF568}$

の結合に対するTfn競合の効果を示している。

$PNP_{Flutax-2}^{Tfn-AF568}$

は、本明細書において、カーゴ（例えば、本明細書で使用されるFlutax-2）およびコロナ（例えば、本明細書で使用されるTfn-AF568）の存在下で自己集合させたCD3acペプチドナノ粒子の頭字表記として使用される。図11A～11Cは、

$PNP_{Flutax-2}^{Tfn-AF568}$

と共に1時間インキュベートされたCHO細胞の蛍光顕微鏡画像を示している。緑色（Flutax-2）および赤色チャネル（Tfn-AF568）の蛍光点の共局在化は、細胞に蓄積する粒子の正体を示している。図11D～11Fは、17 μMのTfnの存在下で

$PNP_{Flutax-2}^{Tfn-AF568}$

と共に1時間インキュベートされたCHO細胞を示している。PNPの会合が有意に減少している。スケールバーは、10 μmに対応する。図11Gは、細胞（例えば、CHOまたはTRVb）あたりの平均ペプチドナノ粒子（PNP）数を示している。陰性対照（NC）の値は、

$PNP_{Flutax-2}^{Tfn-AF568}$

の非存在下で、しかしそれ以外は同一の濃度のTfn-AF568およびFlutax-2と共にインキュ

10

20

30

40

50

ベートされたCHO細胞における擬陽性蛍光点に対応する。結果は平均+/- s.e.m.であり、アスタリスク2つはP<10<sup>-9</sup>、コルモゴロフ・スミルノフを示している。図11Hは、  
 $PNP_{Flutax-2}^{Tfn-AF568}$

との1時間のインキュベート後のCHO細胞を示す画像セットを示している。上列および下列は、それぞれ、17 μMのTfnの非存在下および存在下でインキュベートされた細胞を示している。白色の四角で囲まれた領域が図11A～11Fにおいて拡大されている。スケールバーは、20 μmに対応する。

(図12) 図12A～12Mは、ナノ粒子のインターナライズの実験結果を示している。図12A～12Dは、

$PNP_{Flutax-2}^{Tfn-AF568}$

と共に1時間インキュベートされたCHO細胞の蛍光顕微鏡画像を示している。図12Eは、CHO細胞を

$PNP_{Flutax-2}^{Tfn-AF568}$

と共に1時間インキュベートした後の

$PNP_{Flutax-2}^{Tfn-AF568}$

のFlutax-2/Tfn-AF568蛍光(G/R)の分布を示している。灰色のバーはガラススライド上のG/Rを表し、黒色のバーは細胞周囲部で見出されたG/Rに対応する。図12Fは、1時間後の粒子の会合およびインターナライズの概略を示している。図12G～12Jは、

$PNP_{Flutax-2}^{Tfn-AF568}$

と共に6時間インキュベートされたCHO細胞の蛍光顕微鏡画像を示しており、ここでは、高G/R値側への粒子のシフトが、粒子のインターナライズに代わるものとなっている。図12Kは、G/R値の分布が、より長いインキュベート期間の後に有意に進行することを示している(黒色バー)。対照的に、ガラススライド上のG/R値の分布(灰色のバー)は、1時間後の同一の部分集団のG/R値と統計的に区別できない。図12Lは、6時間後の粒子の会合およびインターナライズの概略を示している。リソソーム区画内の粒子では、コロナがタンパク質分解により消化され、それによりTfn-AF568蛍光が減少し、Flutax-2蛍光が増大する。図12Mは、

$PNP_{Flutax-2}^{Tfn-AF568}$

の色のシフトを示す画像を示している。上列は

$PNP_{Flutax-2}^{Tfn-AF568}$

と共に1時間インキュベートされたCHO細胞を示しており、同一細胞株が

$PNP_{Flutax-2}^{Tfn-AF568}$

と共に6時間インキュベートされた下例と対比されている。白色の四角で囲まれた領域が、図12A～12Dおよび12G～12Jで拡大されている。スケールバーは、20 μmに対応する。

(図13) 図13A～13Iは、

$PNP_{Flutax-2}^{Tfn-AF568}$

との24時間のインキュベート後のカーゴの放出を示している。図13A～13Cは、67nMのFlutax-2および0.09 μg/mLのTfn-AF568と共に24時間インキュベートされたCHO細胞の蛍光顕微鏡画像を示している。図13D～13Gは、

$PNP_{Flutax-2}^{Tfn-AF568}$

10

20

30

40

50

を形成するようCD3acと自己集合させた同一量のFlutax-2およびTfn-AF568と共に24時間インキュベートされたCHO細胞の蛍光画像を示している。図13Hは、平均Flutax-2蛍光強度が細胞株（CHO、TRVb）および溶解された非標識Tfnとの競合に依存することを示している。陰性対照（NC）は、緑色チャネルにおける細胞の自己蛍光に対応する。結果は平均+/-s.e.m.であり、アスタリスク1つはP<0.01を示し、アスタリスク2つはP<10<sup>-9</sup>、コルモゴロフ・スミルノフを示している。スケールバーは、10 μmに対応する。図13Iは、Flutax-2との24時間のインキュベート後のCHO細胞の画像を示している。両方のサンプル（上列および下例）ともに66.7nMのFlutax-2を含有する。上列は、細胞培養培地中に溶解させたFlutax-2と共にインキュベートされた細胞培養物を示し、下例は、事前に

$PNP_{Flutax-2}^{Tfn-AF568}$

10

に自己集合させたFlutax-2と共にインキュベートされた同一細胞株を示している。白色の四角で囲まれた領域が、図13A～13Gで拡大されている。スケールバーは、20 μmに対応する。

（図14）図14は、Flutax-2およびTfn-AF568と共に集合させたペプチド粒子（例えば、CD3ac）の蛍光顕微鏡画像セットを示している。上例は、トリプシン処理前のサンプルを示している。分散した粒子が移動したため、および励起および発光フィルターの交換により画像間に時間的遅延が生じたため、赤色および緑色のチャネルが一致していない。同一の粒子がカッコ内に示されており、図8A～8Fで重ね表示されている。下例は、トリプシンとの6時間のインキュベート後の同一サンプルを示している。赤色のコロナは見えなくなり、残りの粒子はガラスカバースライドの表面に接着している。

（図15）図15A～15Bは、Tfn-AF568（図15A）およびFlutax-2（図15B）の蛍光較正曲線を示している。両方とも、60% H<sub>2</sub>O、30% DMSO、10% FBSの溶液中で測定された。有機溶媒は、ペレット画分のナノ粒子を溶解させるのに必要となり、FBSの存在は、標識された分析物のプラスチック表面への吸着を最小化し、フルオロフォアの濃度と測定される蛍光との間に直線性を提供する。

（図16）図16A～16Bは、本発明の1つまたは複数の態様に従うペプチドナノ粒子を示している。図16Aは、EGF分子で機能化され、テキサスレッドによって任意で（可視化の目的で）標識され得るCD3ac粒子の概略図を示している。図16Bは、EGF機能化CD3ac粒子が細胞により取り込まれることを示す蛍光画像セットである。

（図17）図17A～17Kは、（微小管を脱重合させることができ、抗腫瘍剤として使用することができる化学的な剤である）ノコダゾールを被包したペプチドナノ粒子の1つの態様により処置された細胞（例えば、HeLa細胞）の実験結果を示している。図17Aは、4つの異なる実験条件の概要を示しており、ここで、PB1eは20 μMのノコダゾールを被包したEGF機能化CD3acナノ粒子を表す。そしてこれらの実験結果が図17B～17Fに示されている。図17Bは、図17Aに示される条件下での1時間のインキュベート後の細胞の微小管構造を示す蛍光画像セットを示している。細胞内の赤色蛍光シグナルは、細胞によって取り込まれたPB1eナノ粒子を示している。図17Cは、示されている様々な期間の後に細胞によって取り込まれたPB1eナノ粒子を示す蛍光画像セットを示している。図17D～17Fは、示されている異なる条件下で処置されたHeLa細胞の微小管構造の蛍光画像を示している。図17Gは、4つの異なる実験条件の概要を示しており、ここで、PB1eは40 μMのノコダゾールを被包したEGF機能化CD3acナノ粒子を表す。そしてこれらの実験結果が図17H～17Kに示されている。図17H～17Iは、示されている異なる条件下での4時間のインキュベート後の細胞の画像を示している。図17Iは、異なる条件下での細胞の（緑色により示される）微小管構造の蛍光画像を示している。細胞内の赤色のシグナルは、細胞によって取り込まれたPB1eナノ粒子を示している。図17J～17Kは、示されている異なる条件下での24時間のインキュベート後の細胞の画像を示している。図17Kは、異なる条件下での細胞の（緑色により示される）微小管構造の蛍光画像を示している。細胞内の赤色のシグナルは、細胞によって取り込まれたPB1eナノ粒子を示している。

（図18）図18A～18Cは、本発明に従うペプチドナノ粒子の別の態様を示しており、

20

30

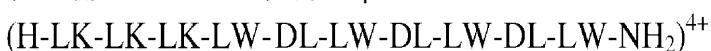
40

50

ここでは、CD3acナノ粒子は抗体で機能化されている。図18Aは、1次または2次抗体で機能化されたCD3acナノ粒子の概要を示している。図18Bは、ウサギ抗トランスフェリンIgGで機能化されたCD3acナノ粒子が(A568で標識された)トランスフェリンに結合できることを示しており、それが図の右側で輝点として示されている。図18Cは、ウサギ抗トランスフェリンIgGで機能化されたCD3acナノ粒子が(Alexa555で標識された)抗ウサギIgGに結合できることを示しており、それが図の右側で輝点として示されている。

(図19)図19A~19Bは、インビトロでトランスフェクト剤として使用されるアセチル化されていないペプチドナノ粒子(CD3)の蛍光画像を示している。図19Aは、オリゴヌクレオチドを細胞内に送達するためにCD3粒子を使用することができるることを示している。図19Bは、CD3粒子の非存在下ではオリゴヌクレオチドによる細胞のトランスフェクトが起らなかったことを示している。

(図20)図20A~20Bは、アセチル化されていないペプチド粒子によるオリゴヌクレオチドの被包効率を示している。図20Aは、オリゴヌクレオチドおよびタンパク質の電気泳動時のアガロースゲル中の移動を示す経時的な画像のセットである。図20Aにおいて、上側レーンには、約21 μMのCD3ペプチド



、約5.4 μMのssDNA



、約0.24 μMのAF488-ssDNA



および約4.14ug/mLのTfn-AF568を含有する混合物を充填し、一方、下側(対照)レーンには、CD3ペプチドを含まない同様の混合物を充填した。約40分間の電気泳動の後に、過剰なssDNAおよびTfnはアガロースゲル中をアノード側に移動したが、アガロースゲルの充填ゾーンで形成された(AF488シグナルおよびAF568蛍光シグナルの共局在化により証明される)ペプチド粒子は、それらのより大きなサイズのために、アガロースゲル中を移動することができなかった。図20Bは、大部分のCD3ペプチドおよびssDNAがペプチド粒子に被包され(ペレット)、上清にはわずかに残存するのみであることを示す、HP-WAX(弱アニオン交換)クロマトグラフィーデータのセットである。約1.5分のピーク:CD3ペプチド;約14.5分および約15分のピーク:それぞれ、分離しているおよび部分的にハイブリダイズしたssDNA。

(図21)図21は、HeLa細胞による核酸含有ペプチド粒子の取り込みを示す顕微鏡蛍光画像である。この実験において、ペプチド粒子は、CD3ペプチド、CD3acペプチド、オリゴヌクレオチド(例えば、ssDNA)およびトランスフェリンを含む混合物から形成された。ssDNA-AF488蛍光シグナルと(トランスフェリン-AF568蛍光によって示される、ここで、トランスフェリンは粒子の外表面を形成している)ペプチド粒子の共局在化は、生理学的条件下でのペプチド粒子の安定性およびそのようなペプチド粒子の、核酸分子またはオリゴヌクレオチドを細胞に送達する能力を示している。

(図22)図22A~22Dは、血清(例えば、約10%血清)中でのssDNA含有ペプチド粒子の安定性およびペプチド粒子を用いた細胞のトランスフェクトの効率に関するデータを示している。図22Aは、水中でのPNP1粒子(ssDNA含有CD3ペプチド粒子)の安定性が温度依存的であり、温度が高いほどより多くのPNP1粒子が解離する傾向があることを示している。図22Bは、水中でのPNP1粒子の経時的研究における安定性のデータを示しており、水中でのPNP1粒子の安定性が温度依存的であり、PNP1は温度が高いほど、例えば4℃より高い温度で、より速く解離する傾向があることを示している。図22Cは、PNP1粒子またはPNP2粒子(ssDNA含有CD3/CD3acペプチド粒子)の存在下、約4℃および約37℃の温度でインキュベートされたHeLa細胞を示す蛍光画像セットである。図22Cの上パネルは、細胞が約37℃でPNP1粒子と共にインキュベートされたときに、約4℃でインキュベートされた細胞で検出されたより点状のTfn-AF568蛍光と比較して、細胞質ゾルにおいて拡散したより強いTfn-AF568蛍光シグナルが検出されたことを示している。しかし、この対比は、図22Cの下

10

20

30

40

50

パネルに示されるように、PNP2粒子と共にインキュベートされた細胞では観察されなかった。代わりに、図22Cの下パネルは、PNP2粒子の存在下、約4%および約37%でインキュベートされた両方の細胞において、点状の同等のTfn-AF568蛍光シグナルが観察されたことを示している。これらの発見は、PNP1粒子は約37%の血清（例えば、約10%血清）中で解離する傾向があるが；PNP2粒子は約37%の血清（例えば、約10%血清）中で少なくとも約30分間、より安定のようであることを示している。図22Dは、陰性対照細胞（すなわち、PNP1もしくはPNP2粒子または対応するペプチドを加えずにssDNAの存在下でインキュベートされたHeLa細胞）の蛍光画像を示しており、この陰性対照では、PNP1またはPNP2粒子と共にインキュベートされた細胞におけるよりもずっと低いAF488-ssDNAの蛍光強度が観察されることを示している。

10

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0046】

###### 発明の詳細な説明

本明細書に提供される様々な局面および態様は、両親媒性ペプチド、本明細書に記載される両親媒性ペプチドの1つまたは複数の態様を含むペプチド粒子、および本明細書に記載される両親媒性ペプチドまたはペプチド粒子の使用に関する。本明細書に記載される両親媒性ペプチドの正味電荷は、両親媒性ペプチドのアミノ酸残基に存在する荷電基の数を制御することにより、例えば1つまたは複数の荷電アミノ基を例えばアセチル化によってマスクすることによって制御することにより、調節することができる。したがって、本明細書に記載される両親媒性ペプチドおよびペプチド粒子は、異なるタイプの活性剤の、例えば荷電もしくは非荷電分子または極性もしくは非極性分子の、送達担体またはビヒクルとして使用することができる。加えて、本明細書に記載されるペプチド粒子は、ペプチド粒子中に存在する両親媒性ペプチドの2つまたはそれ以上の態様の比を制御することによって、それらの溶解性、例えば生理学的条件下でのそれらの溶解性について調節することができる。例えば、完全にマスクされた（例えば、完全にアセチル化された）両親媒性ペプチドは、概して、不溶性のペプチド粒子を形成することができ、一方、部分的にマスクされた（例えば、部分的にアセチル化された）またはマスクされていない（例えば、アセチル化されていない）ペプチドから形成される粒子は、概して、完全にマスクされた（例えば、完全にアセチル化された）両親媒性ペプチドよりも高い溶解性（または低い安定性）、例えば生理学的条件下での高い溶解性（または低い安定性）を有する。したがって、いくつかの態様において、本明細書に記載されるペプチド粒子の溶解性または安定性、例えば生理学的条件下での溶解性または安定性は、異なる溶解性を有する両親媒性ペプチドの混合物を用いてペプチド粒子を形成し、そして同ペプチド粒子におけるそれらの量を適宜変更することによって、制御することができる。したがって、本明細書に記載される両親媒性ペプチドおよびペプチド粒子の過安定性（*verstability*）および安定性を、様々な用途のために、例えば薬物送達および／または活性剤の持続放出のために、特注することができる。

20

##### 【0047】

本明細書で使用される「安定」または「安定性」という用語は、ペプチド粒子が、指定条件下、例えば生理学的条件で、その当初の容積（例えば、その当初の容積の少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%またはそれ以上）を一定期間、例えば少なくとも約30分間またはそれより長時間（少なくとも約1時間、少なくとも約3時間、少なくとも約6時間、少なくとも約12時間、少なくとも約24時間またはそれより長時間を含む）保持する能力を意味する。ペプチド粒子の安定性は、一部、指定条件下でのその溶解性によって支配され得る。指定条件下でのペプチド粒子の溶解性が高いほど、ペプチド粒子はその指定条件下でより不安定である。1つの態様において、本明細書で使用される「安定」または「安定性」という用語は、ペプチド粒子が指定条件下、例えば指定温度の水性媒体中で、不溶性であることを表す。いくつかの態様において、水性媒体は、水である。いくつかの態様において、水性媒体は、生理学的媒体、例えば、特定の塩濃度、pHおよび／またはタンパク質／血清濃度を有

30

40

50

する生理学的媒体である。

【0048】

1つの局面において、疎水性ペプチジルセグメントと親水性ペプチジルセグメントとを含む両親媒性ペプチドが、本明細書に提供される。本発明者は、特に、両親媒性ペプチドの親水性アミノ酸残基の親水性を調整することによって両親媒性ペプチドの両親媒性を調整することができ、それによって予想外にそのペプチドが中実の粒子に自己集合することを発見した。両親媒性は、親水性ペプチジルセグメントのアミノ酸に親水性基をコンジュゲートすることによって、または親水性ペプチジルセグメントの親水性基をマスクするもしくは両親媒性ペプチドのN末端アミノ基をマスクすることによって、調整することができる。例えば、親水性アミノ酸が荷電アミノ酸である場合、その親水性は、その分子の荷電部分を保護基とコンジュゲートさせることによって調整され得る。したがって、いくつかの態様において、両親媒性ペプチドにおける少なくとも1つのアミノ基は、窒素保護基またはアミノ保護基とコンジュゲートしている。10

【0049】

いくつかの態様において、両親媒性ペプチドは、完全にマスクされている。本明細書で使用される場合、完全にマスクされたペプチドは、N末端アミノ基と親水性ペプチジルセグメントの側鎖アミノ基のすべてとが窒素保護基またはアミノ保護基とコンジュゲートしている両親媒性ペプチドを表す。

【0050】

いくつかの態様において、両親媒性ペプチドは、部分的にマスクされている。本明細書で使用される場合、部分的にマスクされたペプチドは、N末端アミノ基または親水性ペプチジルセグメントの側鎖アミノ基のうち、1つまたは複数が窒素保護基またはアミノ保護基とコンジュゲートしていないが；窒素保護基またはアミノ保護基とコンジュゲートしたアミノ基を少なくとも1つ含んでいる両親媒性ペプチドを表す。20

【0051】

本明細書で使用される場合、「窒素保護基」または「アミノ保護基」は、NH<sub>2</sub>基をブロックまたはマスクする部分を表す。例示的なアミノ保護基は、カルバメート保護基、例えば、2-トリメチルシリルエトキシカルボニル (Teoc)、1-メチル-1-(4-ビフェニリル)エトキシカルボニル (Bpoc)、t-ブトキシカルボニル (BOC)、アリルオキシカルボニル (Alioc)、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル (Fmoc) およびベンジルオキシカルボニル (Cbz)；アミド保護基、例えば、ホルミル、アセチル、トリハロアセチル、ベンゾイル、およびニトロフェニルアセチル；スルホンアミド保護基、例えば、2-ニトロベンゼンスルホニル；ならびにイミンおよび環状イミド保護基、例えば、フタルイミドおよびジチアスクシノイルを含むがこれらに限定されない。さらなるアミノ保護基および他の代表的な保護基は、その内容全体が参照により本明細書に組み入れられる、Greene and Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, Chapter 2, 2d ed., John Wiley & Sons, New York, 1991 および Oligonucleotides And Analogues A Practical Approach, Ekstein, F. Ed., IRL Press, N.Y, 1991 に開示されている。30

【0052】

いくつかの態様において、窒素保護基またはアミノ保護基は、アシルまたはアルキル、例えば、アセチル、エタノイル、プロピオニル、t-ブタノイル、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、またはヘキサニルである。40

【0053】

いくつかの態様において、両親媒性ペプチドのN末端アミノ基が、窒素保護基またはアミノ保護基とコンジュゲートしている。

【0054】

いくつかの態様において、両親媒性ペプチドのアミノ酸の側鎖アミノ基の少なくとも1つ（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10またはそれ以上）が、窒素保護基またはアミノ保護基とコンジュゲートしている。コンジュゲートされる側鎖アミノ基を有するアミノ酸は、両親媒性ペプチドのいかなる位置に存在していてもよい。コ50

ンジュゲートされた側鎖を有するアミノ酸は、互いに隣接して存在してもよく、または互いに隣接せずに存在してもよい。コンジュゲートされた側鎖を有するアミノ酸が3つまたはそれ以上存在する場合、側鎖を有するアミノ酸のいくつかは、コンジュゲートされた側鎖を有する別のアミノ酸に隣接して存在していることがあるが、一方で、コンジュゲートされた側鎖を有するアミノ酸のいくつかは、コンジュゲートされた側鎖を有する別のアミノ酸に隣接していない。加えて、2つまたはそれ以上の窒素保護基またはアミノ保護基が存在する場合、それらはすべて同一であってもよく、すべて異なっていてもよく、または同一のものと異なるものとの任意の組み合わせであってもよい。

#### 【0055】

いくつかの態様において、親水性ペプチジルセグメントのアミノ酸の側鎖アミノ基の少なくとも1つ（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10またはそれ以上）が、窒素保護基またはアミノ保護基とコンジュゲートしている。非限定的に、コンジュゲートされた側鎖を有するアミノ酸は、親水性ペプチジルセグメントのいかなる位置に存在してもよい。例えば、N末端から数えて、親水性ペプチジルセグメントの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10位等である。

10

#### 【0056】

いくつかの態様において、両親媒性ペプチドのN末端アミノ基および両親媒性ペプチドの親水性ペプチジルセグメントの少なくとも1つの側鎖アミノ基（例えば、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つまたはそれ以上の側鎖アミノ基を含む）が、窒素保護基またはアミノ保護基とコンジュゲートしている。いくつかの態様において、両親媒性ペプチドのN末端アミノ基および両親媒性ペプチドの親水性ペプチジルセグメントの少なくとも1つの側鎖アミノ基（例えば、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つまたはそれ以上の側鎖アミノ基を含む）が、アセチル化されている。

20

#### 【0057】

いくつかの態様において、両親媒性ペプチドのN末端アミノ基および両親媒性ペプチドの親水性ペプチジルセグメントにおけるすべての側鎖アミノ基が、窒素保護基またはアミノ保護基とコンジュゲートしている。いくつかの態様において、両親媒性ペプチドのN末端アミノ基および両親媒性ペプチドの親水性ペプチジルセグメントにおけるすべての側鎖アミノ基が、アセチル化されている。

30

#### 【0058】

学説による制約を望まないが、両親媒性ペプチドにおける窒素保護基またはアミノ保護基の存在は、両親媒性ペプチドの親水性を調整する。したがって、両親媒性ペプチドの両親媒性の性質は、両親媒性ペプチドにおける窒素保護基またはアミノ保護基の数を変更することによって調整することができる。

#### 【0059】

両親媒性ペプチドは、任意の長さのアミノ酸配列を有し得る。いくつかの態様において、両親媒性ペプチドは、約5～約25アミノ酸残基の長さを有し得る。1つの態様において、両親媒性ペプチドは、約10アミノ酸残基の長さを有する。

#### 【0060】

#### 疎水性ペプチジルセグメント

40

本明細書で使用される場合、「疎水性ペプチジルセグメント」という用語は、疎水性アミノ酸の含有量が相対的に高いペプチジルセグメントを表す。例えば、疎水性ペプチジルセグメントは、アミノ酸残基の少なくとも約50%またはそれ以上（少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%またはそれ以上を含む）が疎水性アミノ酸残基であるペプチジルセグメントを表す。1つの態様において、疎水性ペプチジルセグメントは、すべてのアミノ酸が疎水性アミノ酸であるペプチジルセグメントである。

#### 【0061】

したがって、いくつかの態様において、疎水性ペプチジルセグメントは、アミノ酸配列 $(AA^{11}-AA^{12})_b-(AA^{13})_d$ を含み、ここで、 $AA^{11}$ 、 $AA^{12}$ および $AA^{13}$ はそれぞれの場合で独立し

50

て選択される疎水性アミノ酸残基であり、bは1～20の整数であり、dは0または1であるが、ただし、AA<sup>11</sup>およびAA<sup>12</sup>が反対の（すなわち、D-およびL-）立体配置を有しつつAA<sup>12</sup>およびAA<sup>13</sup>が反対の立体配置を有する。例えば、AA<sup>11</sup>によって表されるアミノ酸がD立体配置を有する場合、AA<sup>12</sup>によって表されるアミノ酸はL立体配置を有し、そしてAA<sup>13</sup>は、存在する場合、D立体配置を有する。あるいは、AA<sup>11</sup>によって表されるアミノ酸がL立体配置を有する場合、AA<sup>12</sup>によって表されるアミノ酸はD立体配置を有し、そしてAA<sup>13</sup>は、存在する場合、L立体配置を有する。

## 【0062】

いくつかの態様において、疎水性ペプチジルセグメントは、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン(Leu)、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン(Trp)およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される2～10個の交互に並ぶD-およびL-アミノ酸の配列を含む。10

## 【0063】

本明細書で使用される場合、「疎水性アミノ酸」という用語は、Eisenberg, 1984, J. Mol. Biol. 179: 125-142 (1984)の標準化共通疎水性尺度(normalized consensus hydrophobicity scale)に従いゼロより大きな疎水性を示すアミノ酸を表す。例示的な疎水性アミノ酸は、Ala、Val、Ile、Leu、Phe、Tyr、Trp、Pro、Met、Glyおよびそれらの誘導体を含むがこれらに限定されない。

## 【0064】

いくつかの態様において、疎水性アミノ酸は、芳香族アミノ酸である。本明細書で使用される場合、「芳香族アミノ酸」という用語は、少なくとも1つの芳香環または芳香族複素環を有する側鎖を有する疎水性アミノ酸を表す。芳香環または芳香族複素環は、1つまたは複数の置換基、例えば、-OH、-SH、-CN、-F、-Cl、-Br、-I、-NO<sub>2</sub>、-NO、-NH<sub>2</sub>、-NHR、-NRR、-C(O)R、-C(O)OH、-C(O)OR、-C(O)NH<sub>2</sub>、-C(O)NHR、-C(O)NRR等を含み得、ここで、各Rは独立して(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>)アルキル、置換された(C<sub>2</sub>～C<sub>6</sub>)アルキル、(C<sub>2</sub>～C<sub>6</sub>)アルケニル、置換された(C<sub>2</sub>～C<sub>6</sub>)アルケニル、(C<sub>2</sub>～C<sub>6</sub>)アルキニル、置換された(C<sub>2</sub>～C<sub>6</sub>)アルキニル、(C<sub>5</sub>～C<sub>20</sub>)アリール、置換された(C<sub>5</sub>～C<sub>20</sub>)アリール、(C<sub>6</sub>～C<sub>26</sub>)アルカリル、置換された(C<sub>6</sub>～C<sub>26</sub>)アルカリル、5～20員ヘテロアリール、置換された5～20員ヘテロアリール、6～26員アルクヘテロアリール(alkheteroaryl)または置換された6～26員アルクヘテロアリールである。例示的な芳香族アミノ酸は、Phe、TyrおよびTrpを含むがこれらに限定されない。20

## 【0065】

いくつかの態様において、疎水性アミノ酸は、脂肪族アミノ酸である。本明細書で使用される場合、「脂肪族アミノ酸」という用語は、脂肪族炭化水素側鎖を有する疎水性アミノ酸を表す。例示的な脂肪族アミノ酸は、Ala、Val、LeuおよびIleを含むがこれらに限定されない。

## 【0066】

いくつかの態様において、疎水性アミノ酸は、非極性アミノ酸である。本明細書で使用される場合、「非極性アミノ酸」という用語は、生理学的pHで非荷電であり、かつ2つの原子によって共同保有されている電子対がその2つの原子の各々によってほぼ均等に保持されている結合を有する側鎖を有する（すなわち、側鎖が極性でない）疎水性アミノ酸を表す。例示的な非極性アミノ酸は、Leu、Val、Ile、Met、GlyおよびAlaを含むがこれらに限定されない。40

## 【0067】

当業者に理解されているように、本明細書に記載されるアミノ酸のカテゴリーは、互いに排他的なものではない。したがって、2つまたはそれ以上の物理化学的特性を示す側鎖を有するアミノ酸は、複数のカテゴリーに包含され得る。例えば、極性の置換基でさらに置換された芳香族部分を有するアミノ酸側鎖、例えばTyrは、芳香族の疎水性の特性と極性または親水性の特性の両方を示し得、したがって、これは芳香族および極性の両カテゴリーに包含され得る。任意のアミノ酸の適当なカテゴリー分類は、特に本明細書に提供さ50

れる詳細な開示に照らして、当業者に明らかであろう。

【0068】

いくつかの態様において、AA<sup>11</sup>、AA<sup>12</sup>およびAA<sup>13</sup>は、それぞれの場合で、Pro、Ile、Ph e、Val、Leu、Trp、Met、Ala、Gly、Tyr、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より独立して選択される。

【0069】

非限定的に、AA<sup>11</sup>およびAA<sup>12</sup>はすべて同一であってもよく、すべて異なっていてもよく、または同一のものと異なるものとの任意の組み合わせであってもよい。したがって、いくつかの態様において、AA<sup>11</sup>はすべて同一である。いくつかの態様において、AA<sup>12</sup>はすべて同一である。いくつかの態様において、AA<sup>11</sup>はすべて同一であり、AA<sup>12</sup>はすべて同一であり、かつAA<sup>11</sup>はAA<sup>12</sup>と異なっている。

10

【0070】

いくつかの態様において、AA<sup>11</sup>、AA<sup>12</sup>およびAA<sup>13</sup>の少なくとも1つは、TyrまたはLeuではない。

【0071】

いくつかの態様において、少なくとも1つのAA<sup>11</sup>は、Tyrではない。

【0072】

いくつかの態様において、少なくとも1つのAA<sup>12</sup>は、Leuではない。

【0073】

いくつかの態様において、AA<sup>13</sup>は、TyrまたはLeuではない。

20

【0074】

いくつかの態様において、AA<sup>11</sup>はTyrである。

【0075】

いくつかの態様において、AA<sup>12</sup>はLeuである。

【0076】

いくつかの態様において、疎水性ペプチジルセグメントは、アミノ酸配列(Trp-Leu)<sub>m</sub>-(Trp)<sub>n</sub>または(Leu-Trp)<sub>p</sub>-(Leu)<sub>q</sub>を含み、ここで、mおよびpは独立して3~20の整数であり、かつnおよびqは独立して0または1である。各TrpはD-TrpまたはL-Trpであり得、かつ各LeuはD-LeuまたはL-Leuであり得る。TrpがD-Trpの場合、LeuはL-Leuであり、かつTrpがL-Trpの場合、LeuはD-Leuである。同様に、LeuがL-Leuの場合、TrpはD-Trpであり、かつLeuがD-Leuの場合、TrpはL-Trpである。

30

【0077】

いくつかの態様において、mおよびpは、独立して1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15の整数である。いくつかの態様において、mおよびpは、独立して1~5の整数（例えば、1、2、3、4または5の整数）である。いくつかの態様において、mまたはpは、1、2または3の整数である。1つの態様において、mまたはpは、3の整数である。

【0078】

1つの態様において、疎水性ペプチジルセグメントは、アミノ酸配列((L-Trp)-(D-Leu))<sub>3</sub>-(L-Trp)を含む。

40

【0079】

### 親水性ペプチジルセグメント

本明細書で使用される場合、「親水性ペプチジルセグメント」という用語は、炭化水素部分と比べて親水性の特性を有するペプチジルセグメントを表す。いくつかの態様において、親水性ペプチジルセグメントは、本明細書に記載される両親媒性ペプチドの疎水性ペプチジルセグメントと比べて親水性の特性を有するペプチジルセグメントを表す。通常、親水性ペプチジルセグメントは、少なくとも1つの親水性アミノ酸を含む。本明細書で使用される場合、「親水性アミノ酸」という用語は、その内容が参照により本明細書に組み入れられるEisenberg, et al., J. Mol. Biol. 179: 125-142 (1984)の標準化共通疎水性尺度に従いゼロより小さい疎水性を示すアミノ酸残基を表す。例示的な親水性アミノ酸は、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Glnおよびそれらの誘導体を含むがこれら

50

に限定されない。

**【0080】**

いくつかの態様において、親水性アミノ酸は、荷電または非荷電アミノ酸である。本明細書で使用される場合、「荷電アミノ酸」という用語は、正味電荷を有するアミノ酸残基を表す。したがって、荷電アミノ酸は、カチオン性アミノ酸またはアニオン性アミノ酸であり得る。本明細書で使用される場合、「非荷電アミノ酸」という用語は、正味電荷を有さないアミノ酸残基を表す。荷電アミノ酸残基は、例えば電荷保有原子に保護基をコンジュゲートすることによって、そのアミノ酸の電荷をマスクすることにより、非荷電アミノ酸に改変され得る。1つの態様において、荷電アミノ酸残基は、アセチル化によって、非荷電アミノ酸に改変され得る。

10

**【0081】**

いくつかの態様において、親水性アミノ酸は、極性アミノ酸である。本明細書で使用される場合、「極性アミノ酸」という用語は、生理学的pHで荷電または非荷電であるが、2つの原子によって共同保有されている電子対がその一方の原子によってより密接に保持されている少なくとも1つの結合を有する側鎖を有する親水性アミノ酸を表す。例示的な極性アミノ酸は、Asn、Gln、Ser、Thrおよびそれらの任意の組み合わせを含むがこれらに限定されない。

**【0082】**

いくつかの態様において、親水性アミノ酸は、荷電または非荷電の極性アミノ酸である。

20

**【0083】**

いくつかの態様において、親水性アミノ酸は、カチオン性アミノ酸である。本明細書で使用される場合、「カチオン性アミノ酸」という用語は、通常の生理学的条件下で正に荷電した側鎖を含むアミノ酸残基を表す。したがって、「カチオン性アミノ酸」という用語は、通常の生理学的条件下で正に荷電した側鎖を有する任意の天然に存在するアミノ酸またはその模倣体を含む。概して、それらの多様性のある側鎖にアミノ基を含むアミノ酸残基は、カチオン性アミノ酸と考えられる。例示的なカチオン性アミノ酸は、リジン、ヒスチジン、アルギニン、ヒドロキシリジン、オルニチンならびにそれら各々の誘導体、アナログおよび立体異性体を含むがこれらに限定されない。

30

**【0084】**

いくつかにおいて、親水性アミノ酸は、アニオン性アミノ酸である。本明細書で使用される場合、「アニオン性アミノ酸」という用語は、負電荷を有する親水性アミノ酸を表す。例示的なアニオン性アミノ酸は、Glu、Aspおよびそれらの誘導体を含むがこれらに限定されない。

**【0085】**

いくつかの態様において、親水性アミノ酸は、酸性アミノ酸である。本明細書で使用される場合、「酸性アミノ酸」という用語は、pK値が7より小さい側鎖を有する親水性アミノ酸を表す。酸性アミノ酸は、典型的に、生理学的pHで、水素イオンの喪失により負に荷電した側鎖を有する。例示的な酸性アミノ酸は、Glu、Aspおよびそれらの誘導体を含むがこれらに限定されない。

40

**【0086】**

いくつかにおいて、親水性アミノ酸は、塩基性アミノ酸である。本明細書で使用される場合、「塩基性アミノ酸」という用語は、pK値が7より大きい側鎖を有する親水性アミノ酸を表す。塩基性アミノ酸は、典型的に、生理学的pHで、ヒドロニウムイオンとの会合により正に荷電した側鎖を有する。例示的な塩基性アミノ酸は、His、Arg、Lysおよびそれらの誘導体を含むがこれらに限定されない。

**【0087】**

いくつかの態様において、親水性ペプチジルセグメントは、少なくとも1つの荷電アミノ酸もしくは少なくとも1つの非荷電極性アミノ酸またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの態様において、親水性ペプチジルセグメントは、Lys、Arg、His、AspおよびGlu

50

からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸、もしくはSer、Thr、AsnおよびGlnからなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの態様において、親水性ペプチジルセグメントは、Lys、ArgおよびHisからなる群より選択される1つのアミノ酸を含み得る。

【0088】

いくつかの態様において、親水性ペプチジルセグメントにおける少なくとも1つのアミノ基は、窒素保護基またはアミノ保護基によってマスクまたはコンジュゲートされている。

【0089】

いくつかの態様において、親水性ペプチジルセグメントは、アミノ酸配列(AA<sup>21</sup>)<sub>f</sub>を含み、ここで、AA<sup>21</sup>はそれぞれの場合で独立して選択される親水性アミノ酸であり、fは1~21の整数である。

【0090】

非限定的に、AA<sup>21</sup>はすべて同一であってもよく、すべて異なっていてもよく、または同一のものと異なるものとの任意の組み合わせであってもよい。

【0091】

いくつかの態様において、fは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15である。

【0092】

いくつかの態様において、親水性ペプチジルセグメントは、アミノ酸配列(Lys)<sub>r</sub>を含み、ここで、rは1~15の整数である。いくつかの態様において、rは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15の整数である。いくつかの態様において、rは、2~5の整数である（例えば、rは2、3、4または5の整数である）。1つの態様において、rは3の整数である。

【0093】

いくつかの態様において、親水性ペプチジルセグメントは、(L-Lys)- (L-Lys)- (L-Lys)-

(L-Lys(Ac)), (L-Lys)- (L-Lys(Ac))- (L-Lys), (L-Lys(Ac))- (L-Lys)- (L-Lys), (L-Lys)- (L-

Lys(Ac))- (L-Lys(Ac)), (L-Lys(Ac))- (L-Lys)- (L-Lys(Ac)), (L-Lys(Ac))- (L-Lys(Ac))- (L-

Lys), L-Lys(Ac))- (L-Lys(Ac))- (L-Lys(Ac))

およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるアミノ酸配列を含み、ここで、「Ac」はLysアミノ酸残基のアセチル化を表す。

【0094】

いくつかの態様において、親水性ペプチドセグメントは、親水性ポリマーを含むまたは親水性ポリマーである。本明細書で使用される場合、「親水性ポリマー」という用語は、炭化水素部分と比べて親水性の特性を有するポリマーを表す。いくつかの態様において、「親水性ポリマー」という用語は、本明細書に記載される両親媒性ペプチドの疎水性ペプチジルセグメントと比べて親水性の特性を有するポリマーを表す。ポリマーの親水性は、例えば、ASTM D570試験によって決定することができる。概して、親水性ポリマーは、水溶性である。例示的な親水性ポリマーは、ポリ(エチレングリコール)、ポリ(エチレンオキシド)、ポリ(プロピレングリコール)、ポリ(エチレンオキシド-コ-プロピレンオキシド)、ヒアルロン酸、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、ヘパリン、ポリビニル(ピロリドン)、コンドロイチン硫酸(chondroitan sulfate)、キトサン、グルコサミノグルカン、デキストラン、デキストリン、デキストラン硫酸、酢酸セルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、セルロース系物質、ポリ(トリメチレングリコール)、ポリ(テトラメチレングリコール)、ポリペプチド、ポリアクリルアミド、ポリアクリルイミド、ポリ(エチレンアミン)、ポリ(アリルアミン)、およびそれらのブレンドを含むがこれらに限定されない。

10

20

30

40

50

## 【0095】

例示的なペプチド修飾

いくつかの態様において、本明細書に記載される両親媒性ペプチドは、アラニン；アルギニン；アスパラギン；アスパラギン酸；システイン；グルタミン酸；グルタミン；グリシン；ヒスチジン；イソロイシン；ロイシン；リジン；メチオニン；フェニルアラニン；プロリン；セリン；スレオニン；トリプトファン；チロシン；バリン；ホモシステイン；ホスホセリン；ホスホスレオニン；ホスホチロシン；ヒドロキシプロリン；-カルボキシグルタメート；馬尿酸；オクタヒドロインドール-2-カルボン酸；スタチン；1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸；ペニシラミン(3-メルカブト-D-バリン)；オルニチン(Orn)；シトルリン；-メチル-アラニン；パラ-ベンゾイルフェニルアラニン；パラ-アミノフェニルアラニン；p-フルオロフェニルアラニン；フェニルグリシン；プロパルギルグリシン；N-メチルグリシン(サルコシン、Sar)；およびtert-ブチルグリシン；ジアミノ酪酸；7-ヒドロキシ-テトラヒドロイソキノリンカルボン酸；ナフチルアラニン；ビフェニルアラニン；シクロヘキシルアラニン；アミノイソ酪酸(Aib)；ノルバリン；ノルロイシン(Nle)；tert-ロイシン；テトラヒドロイソキノリンカルボン酸；ピペコリン酸；フェニルグリシン；ホモフェニルアラニン；シクロヘキシルグリシン；デヒドロロイシン；2,2-ジエチルグリシン；1-アミノ-1-シクロヘキサンカルボン酸；1-アミノ-1-シクロヘキサンカルボン酸；アミノ安息香酸；アミノナフト工酸；-アミノ酪酸；ジフルオロフェニルアラニン；ニペコチン酸；N- -イミダゾール酢酸(IMA)；チエニル-アラニン；t-ブチルグリシン；デスマミノ-Tyr；アミノ吉草酸(Ava)；ピログルタミン酸(<Glu)；-アミノイソ酪酸(Aib)；-アミノ酪酸(Abu)；-アミノ酪酸(Abu)；-アミノ酪酸(Abu)；3-ピリジルアラニン(Pal)；イソプロピル- -N-リジン(ILys)；ナフチルアラニン(Naphthalanine；Nal)；-ナフチルアラニン(-Nal)；-ナフチルアラニン(-Nal)；アセチル- -ナフチルアラニン(Ac- -ナフチルアラニン)；，-ナフチルアラニン；N- -ピコロイル(picoloyle) -リジン(Pic Lys)；4-ハロ-フェニル；4-ピロリジルアラニン；イソニペコチン酸カルボン酸(isonip ecotic carboxylic acid)(inip)；-アミノ酸；ならびにそれらの異性体、アナログおよび誘導体からなる群より選択される少なくとも1つ(例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、またはそれ以上)のアミノ酸を含み得る。当業者は、この定義がD-およびL-アミノ酸；-、-および-アミノ酸；化学修飾アミノ酸；天然に存在する非タンパク質構成性アミノ酸；希少アミノ酸；ならびにアミノ酸に特徴的であることが当技術分野で公知の特性を有する化学合成化合物を含むことを理解するであろう。加えて、各々の態様は、この群の任意の組み合わせを含み得る。

## 【0096】

さらに、本明細書で使用される場合、「アミノ酸」という用語は、天然に存在するアミノ酸の構造からは外れているが、実質的にアミノ酸の構造を有しており、そのためペプチド内の天然に存在するアミノ酸の置換に使用することができ、その置換後もそのペプチドの活性、例えば凝集物形成活性が維持される、化合物または分子を表す。したがって、例えば、いくつかの態様において、アミノ酸は、側鎖修飾または置換を有するアミノ酸も含み得、かつ関連する有機酸、アミド等も含み得る。非限定的に、アミノ酸は、タンパク質構成性アミノ酸または非タンパク質構成性アミノ酸であり得る。本明細書で使用される場合、「タンパク質構成性」という用語は、そのアミノ酸が、細胞において周知の代謝経路を通じてタンパク質に組み込まれることを示す。

## 【0097】

いくつかの態様において、両親媒性ペプチドは、少なくとも1つ(例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、またはそれ以上)の化学修飾アミノ酸を含む。本明細書で使用される場合、「化学修飾アミノ酸」という用語は、1つまたは複数の試薬で処置されたアミノ酸を表す。化学修飾アミノ酸は、両親媒性ペプチドの任意の位置に存在し得る。2つ以上の化学修飾アミノ酸が存在する場合、それらは互いに隣接して配置されてもよく、または隣接せずに配置されてもよい。3つまたはそれ

10

20

30

40

50

以上の化学修飾アミノ酸が存在する場合、化学修飾アミノ酸のいくつかは互いに隣接して存在していることがあるが、一方で、化学修飾アミノのいくつかは別の化学修飾アミノ酸に隣接していない。

#### 【0098】

いくつかの態様において、親水性ペプチジルセグメントは、化学修飾アミノ酸を含む。非限定的に、化学修飾アミノ酸は、親水性ペプチジルセグメントの任意の位置に、例えば、N末端から数えて、親水性ペプチジルセグメントの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10位等に存在し得る。

#### 【0099】

いくつかの態様において、疎水性ペプチジルセグメントは、化学修飾アミノ酸を含む。非限定的に、化学修飾アミノ酸は、疎水性ペプチジルセグメントの任意の位置に、例えば、N末端から数えて、疎水性ペプチジルセグメントの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10位等に存在し得る。

#### 【0100】

いくつかの態様において、親水性および疎水性の両方のペプチジルセグメントが、各々、少なくとも1つの化学修飾アミノ酸を含み得る。親水性および疎水性の両方のペプチジルセグメントが化学修飾アミノ酸を含む場合、各セグメントに存在するそのような化学修飾アミノ酸の数は、同一であってもまたは異なっていてもよい。

#### 【0101】

いくつかの態様において、両親媒性ペプチドは、少なくとも1つ（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10またはそれ以上）の -アミノ酸を含む。2つ以上の -アミノ酸が存在する場合、それらは互いに隣接して配置されてもよく、または隣接せずに配置されてもよい。3つまたはそれ以上の -アミノ酸が存在する場合、 -アミノ酸のいくつかは別の -アミノ酸に隣接して存在していることがあるが、一方で、 -アミノ酸のいくつかは別の -アミノ酸に隣接していない。

#### 【0102】

いくつかの態様において、親水性ペプチジルセグメントは、 -アミノ酸を含む。非限定的に、 -アミノ酸は、親水性ペプチジルセグメントの任意の位置に、例えば、N末端から数えて、親水性ペプチジルセグメントの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10位等に存在し得る。

#### 【0103】

いくつかの態様において、疎水性ペプチジルセグメントは、 -アミノ酸を含む。非限定的に、 -アミノ酸は、疎水性ペプチジルセグメントの任意の位置に、例えば、N末端から数えて、疎水性ペプチジルセグメントの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10位等に存在し得る。

#### 【0104】

いくつかの態様において、親水性および疎水性の両方のペプチジルセグメントが、各々、少なくとも1つの -アミノ酸を含み得る。親水性および疎水性の両方のペプチジルセグメントが -アミノ酸を含む場合、各セグメントにおけるそのような -アミノ酸の数は、同一であってもまたは異なっていてもよい。

#### 【0105】

例示的な -アミノ酸は、L- -ホモプロリン塩酸塩；(±)-3-(Boc-アミノ)-4-(4-ビフェニリル)酪酸；(±)-3-(Fmoc-アミノ)-2-フェニルプロピオン酸；(1S,3R)-(+)-3-(Boc-アミノ)シクロペンタンカルボン酸；(2R,3R)-3-(Boc-アミノ)-2-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸；(2S,3R)-3-(Boc-アミノ)-2-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸；(R)-2-[(Boc-アミノ)メチル]-3-フェニルプロピオン酸；(R)-3-(Boc-アミノ)-2-メチルプロピオン酸；(R)-3-(Boc-アミノ)-2-フェニルプロピオン酸；(R)-3-(Boc-アミノ)-4-(2-ナフチル)酪酸；(R)-3-(Boc-アミノ)-5-フェニルペンタン酸；(R)-3-(Fmoc-アミノ)-4-(2-ナフチル)酪酸；(R)-(-)-ピロリジン-3-カルボン酸；(R)-Boc-3,4-ジメトキシ- -Phe-OH；(R)-Boc-3-(3-ピリジル)- -Ala-OH；(R)-Boc-3-(トリフルオロメチル)- -Phe-OH；(R)-Boc-3-シアノ- -Phe

10

20

30

40

50

-OH ; (R)-Boc-3-メトキシ- -Phe-OH ; (R)-Boc-3-メチル- -Phe-OH ; (R)-Boc-4-(4-ピリジル)- -Homoala-OH ; (R)-Boc-4-(トリフルオロメチル)- -Homophe-OH ; (R)-Boc-4-(トリフルオロメチル)- -Phe-OH ; (R)-Boc-4-プロモ- -Phe-OH ; (R)-Boc-4-クロロ- -Homophe-OH ; (R)-Boc-4-クロロ- -Phe-OH ; (R)-Boc-4-シアノ- -Homophe-OH ; (R)-Boc-4-シアノ- -Phe-OH ; (R)-Boc-4-フルオロ- -Phe-OH ; (R)-Boc-4-メトキシ- -Phe-OH ; (R)-Boc-4-メチル- -Phe-OH ; (R)-Boc- -Tyr-OH ; (R)-Fmoc-4-(3-ピリジル)- -Homoala-OH ; (R)-Fmoc-4-フルオロ- -Homophe-OH ; (S)-(+)-ピロリジン-3-カルボン酸 ; (S)-3-(Boc-アミノ)-2-メチルプロピオン酸 ; (S)-3-(Boc-アミノ)-4-(2-ナフチル)酪酸 ; (S)-3-(Boc-アミノ)-5-フェニルペンタン酸 ; (S)-3-(Fmoc-アミノ)-2-メチルプロピオン酸 ; (S)-3-(Fmoc-アミノ)-4-(2-ナフチル)酪酸 ; (S)-3-(Fmoc-アミノ)-5-ヘキセン酸 ; (S)-3-(Fmoc-アミノ)-5-フェニル-ペニタン酸 ; (S)-3-(Fmoc-アミノ)-6-フェニル-5-ヘキセン酸 ; (S)-Boc-2-(トリフルオロメチル)- -Homophe-OH ; (S)-Boc-2-(トリフルオロメチル)- -Homophe-OH ; (S)-Boc-2-メチル- -Phe-OH ; (S)-Boc-3,4-ジメトキシ- -Phe-OH ; (S)-Boc-3-(トリフルオロメチル)- -Homophe-OH ; (S)-Boc-3-メトキシ- -Phe-OH ; (S)-Boc-3-メチル- -Phe-OH ; (S)-Boc-4-(4-ピリジル)- -Homoala-OH ; (S)-Boc-4-(トリフルオロメチル)- -Phe-OH ; (S)-Boc-4-フルオロ- -Phe-OH ; (S)-Boc-4-クロロ- -Homophe-OH ; (S)-Boc-4-シアノ- -Phe-OH ; (S)-Boc-4-フルオロ- -Phe-OH ; (S)-Boc-4-ヨード- -Homophe-OH ; (S)-Boc-4-メチル- -Homophe-OH ; (S)-Boc-4-メチル- -Phe-OH ; (S)-Boc- -Tyr-OH ; (S)-Boc- , -ジフェニル- -Homoala-OH ; (S)-Fmoc-2-メチル- -Homophe-OH ; (S)-Fmoc-3,4-ジフルオロ- -Homophe-OH ; (S)-Fmoc-3-(トリフルオロメチル)- -Homophe-OH ; (S)-Fmoc-3-シアノ- -Homophe-OH ; (S)-Fmoc-3-メチル- -Homophe-OH ; (S)-Fmoc- , -ジフェニル- -Homoala-OH ; 2-(Boc-アミノメチル)フェニル酢酸 ; 3-アミノ-3-(3-プロモフェニル)プロピオン酸 ; 3-アミノ-4,4,4-トリフルオロ酪酸 ; 3-アミノブタン酸 ; DL-3-アミノイソ酪酸 ; DL- -アミノイソ酪酸 puriss ; DL- -ホモロイシン ; DL- -ホモメチオニン ; DL- -ホモフェニルアラニン ; DL- -ロイシン ; DL- -フェニルアラニン ; L- -ホモアラニン塩酸塩 ; L- -ホモグルタミン酸塩 ; L- -ホモイソロイシン塩酸塩 ; L- -ホモロイシン塩酸塩 ; L- -ホモリジン二塩酸塩 ; L- -ホモメチオニン塩酸塩 ; L- -ホモフェニルアラニンアリルエステル塩酸塩 ; L- -ホモフェニルアラニン塩酸塩 ; L- -ホモセリン ; L- -ホモスレオニン ; L- -ホモトリプトファン塩酸塩 ; L- -ホモチロシン塩酸塩 ; L- -ロイシン塩酸塩 ; Boc-D- -Leu-OH ; Boc-D- -Phe-OH ; Boc-<sup>3</sup>-Homopro-OH ; Boc- -Glu(OBzl)-OH ; Boc- -Homoarg(Tos)-OH ; Boc- -Homoglu(OBzl)-OH ; Boc- -Homohyp(Bzl)-OH(ジシクロヘキシリアンモニウム)塩 technical ; Boc- -Homolys(Z)-OH ; Boc- -Homoser(Bzl)-OH ; Boc- -Homothr(Bzl)-OH ; Boc- -Homotyr(Bzl)-OH ; Boc- -Ala-OH ; Boc- -Gln-OH ; Boc- -Homoala-OAI ; Boc- -Homoala-OH ; Boc- -Homogln-OH ; Boc- -Homoile-OH ; Boc- -Homoleu-OH ; Boc- -Homomet-OH ; Boc- -Homophe-OH ; Boc- -Homotrp-OH ; Boc- -Homotrp-OMe ; Boc- -Leu-OH ; Boc- -Lys(Z)-OH(ジシクロヘキシリアンモニウム)塩 ; Boc- -Phe-OH ; エチル3-(ベンジルアミノ)プロピオネート ; Fmoc-D- -Homophe-OH ; Fmoc-L- <sup>3</sup>-ホモプロリン ; Fmoc- -D-Phe-OH ; Fmoc- -Gln(Trt)-OH ; Fmoc- -Glu(OtBu)-OH ; Fmoc- -Homoarg(Pmc)-OH ; Fmoc- -Homogln(TRt)-OH ; Fmoc- -Homoglu(OtBu)-OH ; Fmoc- -Homohyp(tBu)-OH ; Fmoc- -Homolys(Boc)-OH ; Fmoc- -Homoser(tBu)-OH ; Fmoc- -Homothr(tBu)-OH ; Fmoc- -Homotyr(tBu)-OH ; Fmoc- -Ala-OH ; Fmoc- -Gln-OH ; Fmoc- -Homoala-OH ; Fmoc- -Homogln-OH ; Fmoc- -Homoile-OH ; Fmoc- -Homoleu-OH ; Fmoc- -Homomet-OH ; Fmoc- -Homophe-OH ; Fmoc- -Homotrp-OH ; Fmoc- -Leu-OH ; Fmoc- -Phe-OH ; N-アセチル-DL- -フェニルアラニン ; Z-D- -Dab(Boc)-OH ; Z-D- -Dab(Fmoc)-OH purum ; Z-DL- -ホモアラニン ; Z- -D-Homoala-OH ; Z- -Glu(OtBu)-OH technical ; Z- -Homotrp(Boc)-OH ; Z- -Ala-OH purum ; Z- -Ala-ONp purum ; Z- -Dab(Boc)-OH ; Z- -Dab(Fmoc)-OH ; Z- -Homoala-OH ; -アラニ

10

20

30

40

50

ン； -アラニンBioXtra； -アラニンエチルエステル塩酸塩； -アラニンメチルエステル塩酸塩； -グルタミン酸塩酸塩；シス-2-アミノ-3-シクロペンテン-1-カルボン酸塩酸塩；シス-3-(Boc-アミノ)シクロヘキサンカルボン酸；およびシス-3-(Fmoc-アミノ)シクロヘキサンカルボン酸を含むがこれらに限定されない。

## 【0106】

いくつかの態様において、本明細書に記載される両親媒性ペプチドは、少なくとも1つ（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15またはそれ以上）の修飾されたアミド連結、例えば、還元型psiペプチド結合、尿素、チオ尿素、カルバメート、スルホニル尿素、トリフルオロエチルアミン、オルト-(アミノアルキル)-フェニル酢酸、パラ-(アミノアルキル)-フェニル酢酸、メタ-(アミノアルキル)-フェニル酢酸、チオアミド、テトラゾール、ボロン酸エステル(boronic ester)およびオレフィン基からなる群より選択される連結によって置き替えられた骨格中のアミド結合を含み得る。アミド代替連結は、両親媒性ペプチドの任意の位置に存在し得る。2つまたはそれ以上のアミド代替連結が存在する場合、それらは互いに隣接して（例えば、あるアミノ酸の両側に）または隣接せずに（例えば、あるアミノ酸の一方の側のみがペプチド代替連結を介して次のアミノ酸に連結される）配置され得る。

10

## 【0107】

いくつかの態様において、アミド代替連結は、親水性ペプチジルセグメントに存在する。非限定的に、アミド代替連結は、親水性ペプチジルセグメントの任意の位置に、例えば、N末端から数えて、親水性ペプチジルセグメントの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10位等に存在し得る。

20

## 【0108】

いくつかの態様において、アミド代替連結は、疎水性ペプチジルセグメントに存在する。非限定的に、アミド代替連結は、疎水性ペプチジルセグメントの任意の位置に、例えば、N末端から数えて、疎水性ペプチジルセグメントの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10位等に存在し得る。

20

## 【0109】

いくつかの態様において、親水性および疎水性の両方のペプチジルセグメントが、各々、少なくとも1つのアミド代替連結を含み得る。親水性および疎水性の両方のペプチジルセグメントがアミド代替連結を含む場合、各セグメントにおけるそのようなアミド代替連結の数は、同一であってもまたは異なっていてもよい。

30

## 【0110】

本明細書に記載される両親媒性ペプチドのC末端は、非修飾であり得るまたはカルボキシル保護基もしくはアミド基をコンジュゲートすることによって修飾され得る。例示的なカルボキシル保護基は、エステル、例えばメチル、エチル、t-ブチル、メトキシメチル、2,2,2-トリクロロエチルおよび2-ハロエチル；ベンジルエステル、例えばトリフェニルメチル、ジフェニルメチル、p-ブロモベンジル、o-ニトロベンジル等；シリルエステル、例えばトリメチルシリル、トリエチルシリル、t-ブチルジメチルシリル等；アミド；ならびにヒドラジドを含むがこれらに限定されない。他のカルボン酸保護基は、保護されていてもよい。-アミノ酸を含み得、これはその-アミノ酸のアミノ部分で連結される。いくつかの態様において、両親媒性ペプチドのC末端は、NH<sub>2</sub>、NH-アルキルまたはN(アルキル)<sub>2</sub>とコンジュゲートしている。

40

## 【0111】

親水性セグメントと疎水性セグメントとの間の連結

非限定的に、親水性ペプチジルセグメントは、疎水性ペプチジルセグメントのN末端またはC末端のいずれかに連結され得る。したがって、両親媒性ペプチドは、（親水性ペプチジルセグメント）-リンカー-（疎水性ペプチジルセグメント）または（疎水性ペプチジルセグメント）-リンカー-（親水性ペプチジルセグメント）であり得る。1つの態様において、親水性ペプチジルセグメントは、疎水性ペプチジルセグメントのN末端に連結される。別の言い方をすると、1つの態様において、疎水性ペプチジルセグメントは、親水性

50

ペプチジルセグメントのC末端に連結される。親水性ペプチジルセグメントと疎水性ペプチジルセグメントとの間の連結は、アミド連結、アミド代替連結、または本明細書で定義されるリンカーであり得る。

#### 【0112】

いくつかの態様において、親水性ペプチジルセグメントと疎水性ペプチジルセグメントとの間の連結は、アミド連結（例えば、-NHC(O)-）またはアミド代替連結である。

#### 【0113】

いくつかの態様において、親水性ペプチジルセグメントと疎水性ペプチジルセグメントとの間の連結は、1つのアミノ酸、2つのアミノ酸、または3~15個のアミノ酸を含むペプチドを含む。親水性および疎水性ペプチジルセグメントがアミノ酸鎖によって連結される場合、リンカーは、1つまたは複数の本明細書に記載されるペプチド修飾、例えば、アミド代替連結、-アミノ酸、D-アミノ酸、化学修飾アミノ酸等を含み得ることを理解されたい。  
10

#### 【0114】

##### 例示的な両親媒性ペプチドおよびその使用

いくつかの態様において、両親媒性ペプチドは、アミノ酸配列(L-AA<sup>21</sup>)<sub>f</sub>-(L-AA<sup>11</sup>)-(D-AA<sup>12</sup>))<sub>b</sub>-(L-AA<sup>13</sup>)を含み、ここで、AA<sup>21</sup>はLys残基またはその置換であり；AA<sup>11</sup>およびAA<sup>13</sup>は各々独立してTrp残基またはその置換であり、AA<sup>12</sup>はLeu残基またはその置換であり、かつf'は3~21の整数であり、かつb'は3~20の整数であり、かつN末端アミノ基または少なくとも1つのAA<sup>21</sup>残基の側鎖アミノ基のうち、少なくとも1つは窒素保護基またはアミノ保護基とコンジュゲートしている。  
20

#### 【0115】

ペプチドを参照して言う場合の「置換」という用語は、アミノ酸から異なる実体への、例えば別のアミノ酸またはアミノ酸部分への交換を表す。置換は、保存的または非保存的置換であり得る。いくつかの態様において、置換は、保存的置換である。本明細書で使用される場合、「保存的置換」という用語は、置き換わるアミノ酸残基が、置き替えられる残基と類似の電荷および/または類似の疎水性を有するアミノ酸置換を表す。置き換わる残基は、置き替えられる残基と類似の生化学的特性を有する限り、置き替えられる残基と類似のサイズ、またはそれよりも小さいサイズもしくは大きいサイズを有し得る。アミノ酸の保存的置換は、以下のグループ内のアミノ酸間で行われる置換を含むがこれらに限定されない：(i) 小型非極性アミノ酸：アラニン(Ala)、メチオニン(Met)、イソロイシン(Ile)、ロイシン(Leu)およびバリン(Val)；(ii) 小型極性アミノ酸：グリシン(Gly)、セリン(Ser)、スレオニン(Thr)およびシスティン(Cys)；(iii) アミドアミノ酸：グルタミン(Gln)およびアスパラギン(Asn)；(iv) 芳香族アミノ酸：フェニルアラニン(Phe)、チロシン(Tyr)およびトリプトファン(Trp)；(v) 塩基性アミノ酸：リジン(Lys)、アルギニン(Arg)およびヒスチジン(His)；ならびに(vi) 酸性アミノ酸：グルタミン酸(Glu)およびアスパラギン酸(Asp)。電荷中性である置換および残基をそれよりも小さい残基と置き替える置換はまた、それらの残基が異なるグループに属している場合であっても、「保存的置換」とみなされ得る（例えば、フェニルアラニンからそれより小さなイソロイシンへの置き替え）。「保存的置換」という用語はまた、アミノ酸模倣体、アナログ、変種または非タンパク質構成性もしくは非標準的アミノ酸の使用を包含する。例にすぎないが、AdaAまたはAdaGはバリン(Val)と置換され得；L-1-チオアゾリジン-4-カルボン酸またはD-もしくはL-1-オキサゾリジン-4-カルボン酸(Kauerの米国特許第(4,511,390)号を参照のこと)はプロリンと置換され得；そしてAib、-AlaまたはAcpはグリシン(Gly)と置換され得る。  
30

#### 【0116】

したがって、いくつかの態様において、AA<sup>21</sup>は、Lys残基またはその保存的置換、例えば、ArgまたはHisであり得る。1つの態様において、AA<sup>21</sup>は、Lys残基またはその誘導体である。

#### 【0117】

10

20

30

40

50

いくつかの態様において、AA<sup>11</sup>およびAA<sup>13</sup>は、各々独立して、Trp残基またはその保存的置換、例えばPheまたはTyrであり得る。1つの態様において、AA<sup>11</sup>およびAA<sup>13</sup>は、各々独立して、Trp残基またはその誘導体である。

【0118】

いくつかの態様において、AA<sup>12</sup>は、Leu残基またはその保存的置換、例えば、Ala、Met、IleまたはValであり得る。1つの態様において、AA<sup>12</sup>は、Leu残基またはその誘導体である。

【0119】

いくつかの態様において、両親媒性ペプチドは、アミノ酸配列(L-Lys)<sub>r</sub>-(L-Trp)-(D-Leu))<sub>m</sub>-(L-Trp)を含み、ここで、r'は3~21の整数であり、かつm'は3~20の整数であり、かつN末端アミノ基または少なくとも1つのLys残基の側鎖アミノ基のうち、少なくとも1つは窒素保護基またはアミノ保護基とコンジュゲートしている。  
10

【0120】

いくつかの態様において、r'およびm'は、独立して、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15である。いくつかの態様において、r'およびm'の両方は、同一である。1つの態様において、r'およびm'の両方とも3である。

【0121】

いくつかの態様において、両親媒性ペプチドは、  
Ac-(L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-((L-Trp)-(D-Leu))<sub>3</sub>-(L-Trp)-NH<sub>2</sub>  
(本明細書でCD3acとも称される、ここで、「ac」または「Ac」という略記は両親媒性ペ  
20  
プチドのN末端アミノ基かまたは親水性ペプチジルセグメントのLys残基のアミノ基かのい  
ずれかのアセチル化を表す)；

Ac-(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Lys)-((L-Trp)-(D-Leu))<sub>3</sub>-(L-Trp)-NH<sub>2</sub>;  
 (L-Lys)-(L-Lys)-(L-Lys(Ac))-((L-Trp)-(D-Leu))<sub>3</sub>-(L-Trp)-NH<sub>2</sub>;  
 (L-Lys)-(L-Lys(Ac))-((L-Trp)-(D-Leu))<sub>3</sub>-(L-Trp)-NH<sub>2</sub>;  
 (L-Lys(Ac))-(L-Lys)-(L-Lys)-((L-Trp)-(D-Leu))<sub>3</sub>-(L-Trp)-NH<sub>2</sub>;  
 (L-Lys)-(L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-((L-Trp)-(D-Leu))<sub>3</sub>-(L-Trp)-NH<sub>2</sub>;  
 (L-Lys(Ac))-(L-Lys)-(L-Lys(Ac))-((L-Trp)-(D-Leu))<sub>3</sub>-(L-Trp)-NH<sub>2</sub>;  
 (L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-(L-Lys)-(L-Trp)-((D-Leu))<sub>3</sub>-(L-Trp)-NH<sub>2</sub>;  
 Ac-(L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-((L-Trp)-(D-Leu))<sub>3</sub>-(L-Trp)-NH<sub>2</sub>;  
 Ac-(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Lys)-((L-Trp)-(D-Leu))<sub>3</sub>-(L-Trp);  
 (L-Lys)-(L-Lys)-(L-Lys(Ac))-((L-Trp)-(D-Leu))<sub>3</sub>-(L-Trp);  
 (L-Lys)-(L-Lys(Ac))-(L-Lys)-((L-Trp)-(D-Leu))<sub>3</sub>-(L-Trp);  
 (L-Lys(Ac))-(L-Lys)-(L-Lys)-((L-Trp)-(D-Leu))<sub>3</sub>-(L-Trp);  
 (L-Lys)-(L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-((L-Trp)-(D-Leu))<sub>3</sub>-(L-Trp);  
 (L-Lys(Ac))-(L-Lys)-(L-Lys(Ac))-((L-Trp)-(D-Leu))<sub>3</sub>-(L-Trp);  
 (L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-((L-Trp)-(D-Leu))<sub>3</sub>-(L-Trp);  
 Ac-(L-Lys)-(L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-((L-Trp)-(D-Leu))<sub>3</sub>-(L-Trp)-NH<sub>2</sub>;  
 Ac-(L-Lys)-(L-Lys(Ac))-(L-Lys)-(L-Trp)-((D-Leu))<sub>3</sub>-(L-Trp)-NH<sub>2</sub>;  
 Ac-(L-Lys(Ac))-(L-Lys)-(L-Lys)-((L-Trp)-(D-Leu))<sub>3</sub>-(L-Trp)-NH<sub>2</sub>;  
 Ac-(L-Lys)-(L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-((L-Trp)-(D-Leu))<sub>3</sub>-(L-Trp)-NH<sub>2</sub>;  
 Ac-(L-Lys(Ac))-(L-Lys)-(L-Lys(Ac))-((L-Trp)-(D-Leu))<sub>3</sub>-(L-Trp);  
 Ac-(L-Lys)-(L-Lys(Ac))-(L-Lys)-((L-Trp)-(D-Leu))<sub>3</sub>-(L-Trp);  
 Ac-(L-Lys(Ac))-(L-Lys)-(L-Lys)-((L-Trp)-(D-Leu))<sub>3</sub>-(L-Trp);  
 Ac-(L-Lys)-(L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-((L-Trp)-(D-Leu))<sub>3</sub>-(L-Trp);  
 Ac-(L-Lys(Ac))-(L-Lys)-(L-Lys(Ac))-((L-Trp)-(D-Leu))<sub>3</sub>-(L-Trp);  
 Ac-(L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-(L-Lys)-(L-Trp)-((D-Leu))<sub>3</sub>-(L-Trp);  
 Ac-(L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-((L-Trp)-(D-Leu))<sub>3</sub>-(L-Trp);  
 ; およびそれらの任意の組み合わせ  
 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。  
**【0122】**  
 いくつかの態様において、両親媒性ペプチドの親水性ペプチジルセグメントは、システムを含み得る。いくつかの態様において、システムは、親水性ペプチジルセグメントのN末端に存在し得る。

**【0123】**

10

20

30

40

50

本発明者は、本明細書に記載される両親媒性ペプチドのいくつかの態様が、細胞透過能力を有し得ることを発見した。したがって、いくつかの態様において、本明細書に記載される両親媒性ペプチドは、細胞透過剤および／またはトランスフェクト剤として使用することができる。これらの態様において、両親媒性ペプチドは、正に荷電するよう設計され得る。したがって、疎水性ペプチジルセグメントと親水性ペプチジルセグメントとを含む正に荷電した両親媒性ペプチドを含む組成物の、細胞透過剤またはトランスフェクト剤としての使用が、本明細書に提供される。正に荷電した両親媒性ペプチドの疎水性ペプチジルセグメントは、 $(Trp-Leu)_m-(Trp)_n$  または  $(Leu-Trp)_p-(Leu)_q$  のアミノ酸配列を含み、ここで、各TrpはD-TrpまたはL-Trpであり、かつ各LeuはD-LeuまたはL-Leuであり、mおよびpは独立して1～5の整数であり、かつnおよびqは独立して0または1であるが、ただし、TrpがD-Trpの場合、LeuはL-Leuであり、かつTrpがL-Trpの場合、LeuはD-Leuであり、またはその逆も同様であり；親水性ペプチジルセグメントは、 $(Lys)_r$  のアミノ酸配列を含み、ここで、rは1～15の整数である。加えて、正に荷電した両親媒性ペプチドにおいて、Lys残基の少なくとも1つまたは両親媒性ペプチドのN末端アミノ基はアセチル化されていない。いくつかの態様において、正に荷電した両親媒性ペプチドのN末端アミノ基およびLys残基のすべてはアセチル化されていない。

10

20

30

40

50

#### 【0124】

いくつかの態様において、正に荷電した両親媒性ペプチドは、  
 $(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-X$   
 のアミノ酸配列を含み得、ここで、Xは存在しないかまたはNH<sub>2</sub>である。

20

#### 【0125】

いくつかの態様において、組成物はさらに、細胞に送達される核酸分子またはオリゴヌクレオチド（例えば、DNAまたはRNA）を含み得る。いくつかの態様において、組成物はさらに、複数（例えば、少なくとも2つまたはそれ以上）の核酸分子またはオリゴヌクレオチド（例えば、DNA、またはsiRNA、shRNA、miRNAを含むがこれらに限定されないRNA）を含み得る。いくつかの態様において、核酸分子またはオリゴヌクレオチドは、治療的介入、例えば遺伝子療法またはsiRNA療法において使用されるように設計され得る。

#### 【0126】

##### ペプチドの合成

本明細書に記載される両親媒性ペプチドは、溶液および固相ペプチド化学の通常の方法に従い、または当技術分野で公知の古典的方法により、合成することができる。ペプチドの精製は、当技術分野で周知であり、例えば、HPLCであり得る。有用なペプチド合成および精製の方法を記載した方法は、例えば、その内容が参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願第20060084607号において見出すことができる。

30

40

50

#### 【0127】

本明細書に記載されるペプチドは、適当な公知のペプチド重合技術、例えば、完全固相技術、部分固相技術、フラグメント縮合または古典的な溶液カップリングによって合成により構築することができる。例えば、本発明のペプチドは、t-ブチルオキシカルボニル(BOC)または9-フルオレニルメトキシカルボニル(FMOC)のいずれかの保護基に基づく標準的方法を用いる固相法によって合成することができる。この方法論は、G.B. Fieldsらにより、*Synthetic Peptides: A User's Guide*, W.M. Freeman & Company, New York, N.Y., pp. 77-183 (1992) および参考書「Solid-Phase Synthesis」, Stewart & Young, Freemen & Company, San Francisco, 1969に記載されており、かつ1979年8月8日発行の米国特許第4,105,603号の開示により例示されている。古典的な溶液合成は、「Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl): Synthese von Peptiden」, E. Wunsch (編者) (1974) Georg Thieme Verlag, Stuttgart West Germanyに詳細に記載されている。フラグメント縮合による合成法は、米国特許第3,972,859号に例示されている。他の利用可能な合成法は、米国特許第3,842,067号、米国特許第3,872,925号、1975年1月28日発行、Merrifield B, Protein Science (1996), 5: 1947-1951; The chemical synthesis of proteins; Mutter M, Int J Pept Protein Res 1979 Mar; 13(3): 274-7 Studies on the coup

ling rates in liquid-phase peptide synthesis using competition experiments; およびSolid Phase Peptide Synthesis in the series Methods in Enzymology (Eds, G.B. (1997) Solid-Phase Peptide Synthesis. Academic Press, San Diego. #9830)に例示されている。上記の開示物のすべての内容が参照により本明細書に組み入れられる。

#### 【0128】

ペプチド模倣体を調製する方法は、N末端アミノ基の修飾、C末端カルボキシル基の修飾、および／またはペプチド中の1つもしくは複数のアミノ連結の非アミノ連結への変更を含む。2つまたはそれ以上のそのような修飾は、1つのペプチド模倣体阻害剤において組み合わされ得る。ペプチド模倣体を製造するためのペプチドの修飾は、例えば、米国特許第5,643,873号および同第5,654,276号に記載されており、両方の内容は参考により本明細書に組み入れられる。10

#### 【0129】

##### ペプチド模倣体

いくつかの態様において、両親媒性ペプチドは、ペプチド模倣体である。例えば、親水性ペプチジルセグメントがペプチド模倣体であり得、疎水性ペプチジルセグメントがペプチド模倣体であり得、または両方がペプチド模倣体であり得る。

#### 【0130】

ペプチド模倣体を設計する方法および機能性ペプチド模倣体のスクリーニングは、当業者に周知である。既知のタンパク質またはペプチドを模倣する分子を設計する1つの基本的な方法は、最初に、既知のタンパク質の活性領域を同定し（例えば、抗体-抗原相互作用の場合、抗体のどの領域が抗原との結合を実現するのかが同定される）、次いでその活性領域をエミュレートする模倣体を探索するものである。既知タンパク質の活性領域が比較的小さい場合、模倣体はそのタンパク質よりも（例えば、分子量の点で）小さく、そのため合成が容易かつ安価であることが期待される。そのような模倣体は、扱いやすいタンパク質代用物として、標的分子と相互作用する物質として、使用され得る。20

#### 【0131】

ペプチド模倣体を調製する方法は、N末端アミノ基の修飾、C末端カルボキシル基の修飾、および／またはペプチド中の1つもしくは複数のアミド連結の非アミド連結もしくは修飾アミド連結への変更を含む。2つまたはそれ以上のそのような修飾は、1つのペプチド模倣体において組み合わされ得る。ペプチド模倣体を製造するためのペプチドの修飾は、例えば、米国特許第5,643,873号および同第5,654,276号に記載されており、両方の内容は参考により本明細書に組み入れられる。30

#### 【0132】

例えば、Reinekeら（その内容が参考により本明細書に組み入れられる、1999, *Nature Biotechnology*, 17; 271-275）は、各々がインターロイキン10の短い切片に対応する短い合成ペプチドの大規模ライブリを用いてインターロイキン-10タンパク質の結合部位を模倣する模倣分子を設計した。次いで、これらのペプチドの、各々の標的（この場合、インターロイキン-10に対する抗体）に対する結合が、アッセイ技術によって個々に試験され、潜在的に関連するペプチドが同定された。ペプチドのファージディスプレイライブリおよびアラニンスキャン法が使用され得る。40

#### 【0133】

特定のペプチドまたはタンパク質のペプチド模倣体を設計する他の方法は、欧州特許EP 1206494に記載されるもの、Andreas Goede et al. 2006 *BMC Bioinformatics*, 7: 11によるSuperMimicプログラム；およびW. Campbell et al., 2002, *Microbiology and Immunology* 46: 211-215によるMIMETICプログラムを含む。SuperMimicプログラムは、タンパク質の一部分を模倣する化合物または模倣体を挿入するのに適したタンパク質の位置を同定するよう設計されている。このアプリケーションは、一方にペプチド模倣体構築ロックを、他方にタンパク質構造を含むライブリを提供する。あるペプチドに対する見込みのあるペプチド模倣リンカーの探索は、そのペプチドと模倣体の様々な配座異性体との重ねあわせに基づく。新しい合成性の要素またはタンパク質がインポートされ、探索のために50

使用され得る。標的ペプチド配列との相互作用のためのペプチド群を生成するMIMETICコンピュータープログラムは、W. Campbell et. al., 2002によって教示されている。この話題のより深い考察は、Reviews in Computational Chemistry Reviews in Computational Chemistry, Jan 2007, Volume 9 Book Series ; Reviews in Computational Chemistry, 編者: Kenny B. Lipkowitz, Donald B. BoydPrint ISBN: 9780471186397 ISBN: 9780470125861 John Wiley & Sons, Inc. 発行のJames R. Damewood Jr.による「Peptide Mimetic Design with the Aid of Computational Chemistry」に；およびT. Tselios, et al., Amino Acids, 14: 333-341, 1998にまとめられている。この段落に記載されている参考文献のすべての内容が参照により本明細書に組み入れられる。

## 【0134】

10

ペプチド、ペプトイド、およびペプチド模倣体の混雑集団を含むライブラリを調製する方法は当技術分野で周知であり、かつ様々なライブラリが市販されている（例えば、各々参考により本明細書に組み入れられる、Ecker and Crooke, Biotechnology 13: 351-360 (1995) およびBlondelle et al., Trends Anal. Chem. 14: 83-92 (1995) およびそれらで引用されている参考文献を参照のこと；また、各々参考により本明細書に組み入れられる、「Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery」 Vol.1 (M.E. Wolff編；John Wiley & Sons 1995)、803～861ページのGoodman and Ro, Peptidomimetics for Drug Design、およびGordon et al., J. Med. Chem. 37: 1385-1401 (1994)も参照のこと）。当業者は、ペプチドを、インビトロで直接作製することができること、またはインビトロで作製され得る核酸から発現させることができることを理解している。合成ペプチドおよび核酸化学の方法は、当技術分野で周知である。この段落に記載されている参考文献のすべての内容が、参照により本明細書に組み入れられる。

20

## 【0135】

ペプチド分子のライブラリはまた、例えば、関心対象の組織から回収されたmRNAからcDNA発現ライブラリを構築することによって、作製することができる。そのようなライブラリを作製する方法は、当技術分野で周知である（例えば、参考により本明細書に組み入れられる、Sambrook et al., Molecular Cloning: A laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989)を参照のこと）。好ましくは、cDNAによってコードされるペプチドは、cDNAを含む細胞またはウイルスの表面で発現される。

30

## 【0136】

リガンドおよび活性剤

幅広い実体、例えばリガンドが、本明細書に記載される両親媒性ペプチドまたは後述のペプチド粒子にカップリングされ得る。リガンドは、天然に存在する分子または組み換えもしくは合成分子を含み得る。いくつかの態様において、リガンドは、本明細書に記載される両親媒性ペプチドまたはそれから作製されたペプチド粒子の分布、標的指向性または寿命を変化させ得る。いくつかの態様において、リガンドは、例えばそのようなリガンドが存在しない種と比較して、選択された標的、例えば、分子、細胞または細胞型、区画、例えば細胞または臓器区画、組織、臓器または体内の領域に対する強化された親和性（例えば、向上した結合強度）を提供し得る。いくつかの態様において、リガンドは、例えばそのようなリガンドを有さない両親媒性ペプチドと比較して、本明細書に記載される両親媒性ペプチドまたはそれから作製されるペプチド粒子の、選択された標的に対する強化された特異性を提供し得る。本明細書で使用される「特異性」という用語は、任意のその他の実体よりも選択された標的に優先的に結合する両親媒性ペプチドまたはペプチド粒子の能力を表す。例えば、本明細書に記載される両親媒性ペプチドおよび／またはペプチド粒子にリガンドが存在することにより、その両親媒性ペプチドまたはペプチド粒子は、そのようなリガンドを有さない両親媒性ペプチドまたはペプチド粒子と比較して、任意のその他の実体よりも選択された標的に優先的に結合できるようになる。

40

## 【0137】

非限定的に、リガンドは、ポリマー、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、ペプチド模倣体、糖タンパク質、レクチン、ヌクレオシド、ヌクレオチド、核酸、单糖、二糖、三

50

糖、オリゴ糖、多糖、リポ多糖、ビタミン、脂質、ステロイド、ホルモン、補因子、受容体、受容体リガンド、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択され得る。

## 【0138】

本明細書に記載されるこのおよび他の局面のいくつかの態様において、リガンドは、ポリエチレングリコール(PEG、例えば、PEG-2K、PEG-5K、PEG-10K、PEG-12K、PEG-15K、PEG-20K、PEG-40K)、MPEG、[MPEG]<sub>2</sub>、ポリ(エチレンオキシド)(PEO)、ポリ(プロピレングリコール)(PPG)、ポリ(エチレンオキシド-コ-プロピレンオキシド)、ヒアルロン酸、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、ヘパリン、ポリビニル(ビロリドン)、コンドロイチン硫酸、キトサン、グルコサミノグルカン、デキストラン、デキストリン、デキストラン硫酸、酢酸セルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、セルロース系物質、ポリ(トリメチレングリコール)、ポリ(テトラメチレングリコール)、ポリペプチド、ポリアクリルアミド、ポリアクリルイミド、ポリ(エチレンアミン)、ポリ(アリルアミン)、スチレン-無水マレイン酸コポリマー、ポリ(L-ラクチド-コ-グリコリド(glycolied))コポリマー、ジビニルエーテル-無水マレイン酸コポリマー、N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミドコポリマー(HMPA)、ポリビニルアルコール(PVA)、ポリウレタン、ポリ(2-エチルアクリル酸)、N-イソプロピルアクリルアミドポリマー、ポリホスファジン、ポリエチレンイミン、スペルミン、スペルミジン、ポリアミン、ブソイドペプチド-ポリアミン、ペプチド模倣ポリアミン、デンドリマー-ポリアミン、アルギニン、アミジン、プロタミン、サイロトロピン、メラノトロピン、レクチン、サーファクタントタンパク質A、ムチン、トランスフェリン、ビスホスホネート、ポリグルタメート、ポリアスパルテート、アプタマー、シアロフェツイン、ヒアルロン、プロコラーゲン、インスリン、トランスフェリン、アルブミン、アクリジン、クロス-ソラレン(cross-psoralen)、マイトイシンC、TPPC4、テキサフィリン、サフィリン(Sapphyrin)、多環式芳香族炭化水素(例えば、フェナジン、ジヒドロフェナジン)、胆汁酸、コレステロール、コール酸、アダマンタン酢酸、1-ピレン酇酸、ジヒドロテストステロン、1,3-ビス-0(ヘキサデシル)グリセロール、ゲラニルオキシヘキシル基、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メントール、1,3-プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ミリスチン酸、03-(オレオイル)リトコール酸、03-(オレオイル)コレン酸、ジメトキシリチル、またはフェノキサジン)、RGDペプチド、放射標識マーカー、ハプテン、ナブロキセン、アスピリン、ジニトロフェニル、HRP、AP、レクチン、ビタミンA、ビタミンE、ビタミンK、ビタミンB、葉酸、B12、リボフラビン、ビオチン、ピリドキサール、タクソン(taxon)、ビンクリスチン、ビンプラスチン、サイトカラシン、ノコダゾール、ジャスプラキノリド(japlakinolide)、ラトランクリンA、ファロイジン、スワインホリドA、インダノシン(indanocine)、ミオセルビン(myoservin)、腫瘍壞死因子(TNF)、インターロイキン-1、インターフェロン、GaINAc、ガラクトース、マンノース、マンノース-6P、糖クラスター、例えばGaINAcクラスター、マンノースクラスター、ガラクトースクラスター、アプタマー、インテグリン受容体リガンド、ケモカイン受容体リガンド、セロトニン受容体リガンド、PSMA、エンドセリン、GCP11、ソマトスタチン、細胞壁透過ペプチド、GALAペプチド、EALAペプチド、INF-7ペプチド、Inf HA-2ペプチド、diINF-7ペプチド、diINF-3ペプチド、GLFペプチド、GALA-INF3ペプチド、INF-5ペプチド、ベネトラチンペプチド、Tatフラグメント48-60、PVECペプチド、トランスポートン(transportan)ペプチド、LL-37ペプチド、セクロピンP1ペプチド、-デフェンシンペプチド、-デフェンシンペプチド、PR-39ペプチド、インドリシジンペプチド、RFGFペプチド、RFGFアナログ、バクテネシン、セクロピン、リコトキシン(lcyotoxin)、パラダキシン(paradaxin)、ブフォリン(buforin)、CPF、ボンビニン(bombinin)様ペプチド(BLP)、カテリシジン、セラトトキシン、S.クラバ(S. clava)ペプチド、ヌタウナギ腸内抗菌ペプチド(HFIAP)、マガイニン、ブレビニン(brevinin)-2、デルマセプチン、メリチン、リューロシジン、H<sub>2</sub>Aペプチド、アフリカツメガエルペプチド、エスクレンチニス(esculentinis)-1、カエリン(caerin)、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される。

10

20

30

40

50

## 【0139】

いくつかの態様において、リガンドは、活性剤を含み得る。本明細書で使用される場合、「活性剤」は、細胞に送達される分子を表す。したがって、非限定的に、活性剤は、有機または無機低分子、単糖、二糖、三糖、オリゴ糖、多糖、生体高分子、例えば、ペプチド、タンパク質、ペプチドアナログおよびそれらの誘導体、ペプチド模倣体、核酸、核酸アナログおよび誘導体、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、酵素、生物学的物質、例えば細菌、植物、真菌または動物細胞もしくは組織から得られる抽出物、天然に存在するまたは合成性の組成物、微粒子、またはそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される。活性剤は、電荷中性であり得、または正味電荷を含み得る。例えば、活性剤はアニオン性もしくはカチオン性である。さらに、活性剤は、疎水性、親水性または両親媒性であり得る。いくつかの態様において、活性剤は、少なくとも1つのアリールまたはヘテロアリール基を含む。

10

## 【0140】

本明細書で使用される場合、「微粒子」という用語は、本来的に比較的小さな形態で存在する、および、例えば、粉碎(grinding)、破碎(shredding)、断片化(fragmenting)、微粉碎(pulverizing)、微粒化(atomizing)またはそれ以外の、大きな形態の材料から比較的小さな形態への細分化によって形成され得る、粒子、粉末、フレーク等を表す。

20

## 【0141】

本明細書で使用される場合、「低分子」という用語は、「天然産物様」である化合物を表し得るが、この「低分子」という用語は「天然産物様」化合物に限定されない。そうではなく、低分子は、典型的に、いくつかの炭素-炭素結合を含み、かつ5000ダルトン(5kD)未満、好ましくは3kD未満、さらにより好ましくは2kD未満、最も好ましくは1kD未満の分子量を有する点で特徴づけられる。いくつかの場合において、低分子は、700ダルトンに等しいまたはそれ未満の分子質量を有することが非常に好ましい。

20

## 【0142】

いくつかの態様において、活性剤は、ペプチドまたはタンパク質であり得る。本明細書で使用される場合、「ペプチド」という用語は、その最も広義の意味において、ペプチド結合または修飾ペプチド結合によって相互に接続された2つまたはそれ以上のアミノ酸、アミノ酸等価物またはその他の非アミノ基を含む化合物を表すために使用される。ペプチド等価物は、関連する有機酸(例えば、PABA)、アミノ酸等による1つもしくは複数のアミノ酸の置き替え、または側鎖もしくは官能基の置換もしくは修飾によって通常のペプチドと相違し得る。ペプチドは、いかなるサイズの長さであってもよいが；いくつかの態様においては、20またはそれ未満の総アミノ酸を有するペプチドが好ましい。加えて、ペプチドは、直鎖状または環状であり得る。本明細書に具体的に示されているペプチド配列は、左側がアミノ末端、右側がカルボキシ末端となるよう記載されている。加えて、「ペプチド」という用語は、広義には、一般的にはポリペプチドであるタンパク質を含む。本明細書で使用される場合、「タンパク質」という用語は、タンパク質およびそのフラグメントを表すために使用される。したがって、3次元構造を示す任意のアミノ酸鎖が、「タンパク質」という用語に含まれ、タンパク質フラグメントもそれに従って包含される。

30

## 【0143】

ペプチド模倣体は、天然ペプチドと同様に定義された3次元構造に折り畳むことができる分子である。

40

## 【0144】

本明細書で使用される場合、「核酸」という用語は、天然に存在する塩基、糖および糖間連結からなるヌクレオチドまたはヌクレオシドモノマーのポリマー(ポリヌクレオチド)またはオリゴマー(オリゴヌクレオチド)を表す。「核酸」という用語はまた、同様に機能する、天然に存在しないモノマーを含むポリマーもしくはオリゴマーまたはその一部分を含む。そのような修飾または置換された核酸は、多くの場合、例えば強化された細胞取り込みおよびヌクレアーゼ存在下での向上した安定性等の特性から、ネイティブ形態よ

50

りも好ましい。

【0145】

核酸は、1本鎖または2本鎖であり得る。1本鎖核酸は2本鎖領域を有し得、2本鎖核酸は1本鎖領域を有し得る。例示的な核酸は、構造遺伝子、制御および終結領域を含む遺伝子、自己複製システム、例えばウイルスまたはプラスミドDNA、1本鎖および2本鎖siRNAおよびその他のRNA干渉試薬（RNAi剤またはiRNA剤）、ショートヘアピンRNA（shRNA）、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、マイクロRNA、マイクロRNA模倣体、アプタマー、アンチミール（antimir）、アンタゴミール（antagomir）、3重鎖形成オリゴヌクレオチド、RNA活性化因子、免疫刺激オリゴヌクレオチド、およびデコイオリゴヌクレオチドを含むがこれらに限定されない。10

【0146】

いくつかの態様において、活性剤は、生物学的に活性であるかまたは生物学的活性を有する。本明細書で使用される場合、「生物学的活性」または「生物活性」という用語は、生物学的サンプルに対して影響を及ぼす化合物の能力を表す。生物学的活性は、非限定的に、生物学的アッセイにおける分子、細胞、組織または臓器レベルでの刺激性、阻害性、調節性、毒性または致死性の応答の惹起を含み得る。例えば、生物学的活性は、酵素の効果／活性を示すまたは調整する、受容体をブロックする、受容体を刺激する、1つもしくは複数の遺伝子の発現レベルを調整する、細胞増殖を調整する、細胞分裂を調整する、細胞形態を調整する、またはそれらの任意の組み合わせの化合物の能力を表し得る。いくつかの例において、生物学的活性は、生物学的サンプルにおいて毒性効果を生じる化合物の能力を表し得、またはそれは、標的分子もしくは細胞を化学的に修飾する能力を表し得る。20

【0147】

いくつかの態様において、活性剤は、治療剤である。本明細書で使用される場合、「治療剤」という用語は、対象における有害な状態を処置する、治癒する、緩和する、または予防するために使用される生物学的または化学的な剤を表す。「治療剤」という用語はまた、対象の疾患、状態または障害に対抗する物質および剤を含み、そしてそれは薬物、診断剤および器具を含む。「治療剤」はまた、医学的診断においてまたは生理学的機能の回復、矯正もしくは修正において使用されるものを含む。「治療剤」および「薬学的に活性な剤」という用語は、本明細書で言い換え可能に使用される。30

【0148】

治療剤は、処置目標および望まれる生物学的作用に従い選択され得る。したがって、治療剤は、その治療目標に適した任意のクラスから選択され得る。さらに、治療剤は、一定期間にわたり治療活性を提供するよう選択および準備され得る。

【0149】

例示的な薬学的に活性な化合物は、Harrison's Principles of Internal Medicine, 13<sup>th</sup> Edition, Eds. T.R. Harrison McGraw-Hill N.Y., NY; Physicians Desk Reference 5<sup>th</sup> Edition, 1997, Oradell New Jersey, Medical Economics Co.; Pharmacological Basis of Therapeutics, 8<sup>th</sup> Edition, Goodman and Gilman, 1990; United States Pharmacopeia, The National Formulary, USP XII NF XVII, 1990; Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeuticsの現行版; The Merck Indexの現行版で見いだされるものを含むがこれらに限定されず、これらすべての内容の全体が参照により本明細書に組み入れられる。40

【0150】

例示的な薬学的に活性な剤は、ステロイドおよび非ステロイド抗炎症剤、抗再狭窄薬、抗菌剤、血管新生因子、カルシウムチャネルブロッカー、血栓溶解剤、降圧剤、抗凝固剤、抗不整脈剤、強心配糖体等を含むがこれらに限定されない。

【0151】

いくつかの態様において、治療剤は、サリチル酸および誘導体（アスピリン）、パラ-アミノフェノールおよび誘導体（アセトアミノフェン）、アリールプロピオン酸（イブプロ

10

20

30

40

50

ロフェン)、コルチコステロイド、ヒスタミン受容体アンタゴニストおよびプラジキニン受容体アンタゴニスト、ロイコトリエン受容体アンタゴニスト、プロスタグランジン受容体アンタゴニスト、血小板活性化因子受容体アンタゴニスト、スルホンアミド、トリメトプリム-スルファメトキサゾール、キノロン、ペニシリン、セファロスポリン、塩基性線維芽細胞成長因子(FGF)、酸性線維芽細胞成長因子、血管内皮成長因子、血管新生性トランスクォーミング成長因子 および 、腫瘍壞死因子、アンジオポエチン、血小板由来成長因子、ジヒドロピリジン(例えば、ニフェジピン、ベンゾジアゼピン、例えばジルチアゼム(diltazem)、およびフェニルアルキルアミン、例えばベラパミル)、ウロキナーゼプラスミノゲン活性化因子、ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害剤、スピロノラクトン、組織プラスミノゲン活性化因子(tPA)、利尿剤、チアジド、抗アドレナリン剤、クロニジン、プロパノロール(propanolol)、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、カプトプリル、アンジオテンシン受容体アンタゴニスト、ロサルタン、カルシウムチャネルアンタゴニスト、ニフェジン(nifedine)、ヘパリン、ワルファリン、ヒルジン、ダニ抗凝固ペプチド、および低分子量ヘパリン、例えばエノキサパリン、リドカイン、プロカインアミド、エンカイニド、フレカイニド、アドレナリンプロッカー、プロプラノロール、アミオダロン、ベラパミル(verpamil)、ジルチアゼム、塩化ニッケル、強心配糖体、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、アンジオテンシン受容体アンタゴニスト、ニトロ血管拡張剤、脂質低下剤(例えば、ニコチン酸、プロブコール等)、胆汁酸結合樹脂(例えば、コレステラミンおよびフィブリン酸誘導体、例えばクロフィブラーート)、HMG CoAレダクター阻害剤、HMG CoAシンターゼ阻害剤、スクアレンシンターゼ阻害剤、スクアレンエポキシダーゼ阻害剤、スタチン(例えば、ロバスタチン、セリバスタチン、フルバスタチン、プラバスタチン、シンバスタチン(simvastatin)等)、抗精神病剤、SSRI、抗けいれん薬、避妊薬、全身および局所鎮痛剤(慢性痛、骨成長/再形成因子(骨芽細胞/破骨細胞動員および刺激因子)、神経伝達物質(L-DOPA、ドパミン、神経ペプチド)、気腫薬、TGF-)、ラパマイシン、ナロキソン、パクリタキセル、アンホテリシン、デキサメタゾン、フルタミド、バンコマイシン、フェノバルビタール、シメチジン、アテノロール、アミノグリコシド、ホルモン(例えば、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン、p-ニトロフェニル-セロペントオサイド(p-nitrophenyl beta-celllopentaoside)および黄体ホルモン放出ホルモン)、ピンクリスチン、アミロライド、ジゴキシン、モルヒネ、プロカインアミド、キニジン、キニーネ、ラニチジン、トリアムテレン、トリメトプリム、バンコマイシン、アミノグリコシド、およびベニシリン、ならびにそれらの薬学的に許容される塩からなる群より選択される。

#### 【0152】

いくつかの態様において、活性剤は、siRNA、ショートヘアピンRNA(shRNA)、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、マイクロRNA、マイクロRNA模倣体、アプタマー、アンチミール、アンタゴミール、3重鎖形成オリゴヌクレオチド、RNA活性化因子、免疫刺激オリゴヌクレオチド、デコイオリゴヌクレオチド、プラスミド、またはDNAベクターである。

#### 【0153】

いくつかの態様において、治療剤は、放射性物質である。適当な放射性物質は、例えば<sup>90</sup>イットリウム、<sup>192</sup>イリジウム、<sup>198</sup>金、<sup>125</sup>ヨウ素、<sup>137</sup>セシウム、<sup>60</sup>コバルト、<sup>55</sup>コバルト、<sup>56</sup>コバルト、<sup>57</sup>コバルト、<sup>57</sup>マグネシウム、<sup>55</sup>鉄、<sup>32</sup>リン、<sup>90</sup>ストロンチウム、<sup>81</sup>ルビジウム、<sup>206</sup>ビスマス、<sup>67</sup>ガリウム、<sup>77</sup>臭素、<sup>129</sup>セシウム、<sup>73</sup>セレニウム、<sup>72</sup>セレニウム、<sup>72</sup>ヒ素、<sup>103</sup>パラジウム、<sup>123</sup>鉛、<sup>111</sup>インジウム、<sup>52</sup>鉄、<sup>167</sup>ツリウム、<sup>57</sup>ニッケル、<sup>62</sup>亜鉛、<sup>62</sup>銅、<sup>201</sup>タリウムおよび<sup>123</sup>ヨウ素を含む。学説による制約を望まないが、放射性物質を含む粒子は、疾患組織、例えば腫瘍、動静脈奇形等を処置するために使用され得る。

#### 【0154】

いくつかの態様において、活性剤は、画像化剤である。本明細書で使用される場合、「画像化剤」という用語は、状態、病理学的障害および/または疾患の存在および/または

10

20

30

40

50

進行の検出、画像化および／またはモニタリングを可能にする要素または分子内の官能基を表す。画像化剤は、音波源物質（液体もしくは気体のいずれか）、非金属同位体、光学レポーター、ホウ素中性子吸収体、常磁性金属イオン、強磁性金属、 $\gamma$ 線放射性の放射性同位体、陽電子放射性の放射性同位体またはX線吸収体であり得る。学説による制約を望まないが、画像化剤は、そのような画像化剤を含む組成物の追跡を可能にする。

#### 【0155】

適当な光学レポーターは、蛍光レポーターおよび化学発光基を含むがこれらに限定されない。幅広い蛍光レポーター色素が当技術分野で公知である。典型的に、フルオロフォアは、芳香族または複素環式芳香族化合物であり、ピレン、アントラセン、ナフタレン、アクリジン、スチルベン、インドール、ベンゾインドール、オキサゾール、チアゾール、ベンゾチアゾール、シアニン、カルボシアニン、サリチレート、アントラニレート、クマリン、フルオレセイン、ローダミンまたはその他の類似化合物であり得る。適当な蛍光レポーターは、キサンテン色素、例えばAlexa Fluor（登録商標）色素（InvitrogenCorp.; Carlsbad, Calif.）、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、Oregon Green（商標）、ローダミン、テキサスレッド、テトラローダミンイソチオシアネート（TRITC）、5-カルボキシフルオレセイン（FAM）、2'7'-ジメトキシ-4'5'-ジクロロ-6-カルボキシフルオレセイン（JOE）、テトラクロロフルオレセイン（TET）、6-カルボキシローダミン（R6G）、N,N,N,N'-テトラメチル（tetramethyl）-6-カルボキシローダミン（TAMRA）、6-カルボキシ-X-ローダミン（ROX）を含むがこれらに限定されないフルオレセインまたはローダミン色素を含む。適当な蛍光レポーターはまた、一位または二位にアミノ基を有するナフチルアミン色素を含む。例えば、ナフチルアミノ化合物は、1-ジメチルアミノ-ナフチル-5-スルホネート、1-アニリノ-8-ナフタレンスルホネート、2-p-トルイジニル-6-ナフタレンスルホネート、および5-(2'-アミノエチル)アミノナフタレン-1-スルホン酸（EDANS）を含む。他の蛍光レポーター色素は、クマリン、例えば3-フェニル-7-イソシアナトクマリン；アクリジン、例えば9-イソチオシアナトアクリジンおよびアクリジンオレンジ；N-(p(2-ベンゾキサゾリル)フェニル)マレイミド；シアニン、例えばCy2、インドジカルボシアニン3（Cy3）、インドジカルボシアニン5（Cy5）、インドジカルボシアニン5.5（Cy5.5）、3-(-カルボキシ-ペンチル)-3'エチル-5,5'-ジメチルオキサカルボシアニン（CyA）；1H,5H,11H,15H-キサンテノ[2,3,4-ij:5,6,7-i'j']ジキノリジン-18-イウム、9-[2(または4)-[[[6-[2,5-ジオキソ-1-ピロリジニル)オキシ]-6-オキソヘキシリ]アミノ]スルホニル]-4(または2)-スルホフェニル]-2,3,6,7,12,13,16,17オクタヒドロ-内塩（TRまたはテキサスレッド）；BODIPY（商標）色素；ベンゾキサジアゾール；スチルベン；ピレン等を含む。これらの蛍光化合物の多くの適当な形態が入手可能でありかつ使用することができる。

#### 【0156】

画像化剤としての使用に適した蛍光タンパク質の例は、緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質（例えば、DsRed）、黄色蛍光タンパク質、シアン色蛍光タンパク質、青色蛍光タンパク質およびそれらの変種を含むがこれらに限定されない（例えば、米国特許第6,403,374号、同第6,800,733号および同第7,157,566号を参照のこと）。GFP変種の具体例は、高感度GFP（EGFP）、不安定化EGFP、Doan et al, Mol. Microbiol., 55: 1767-1781 (2005)に記載されるGFP変種、Cramer et al, Nat. Biotechnol., 14: 315319 (1996)に記載されるGFP変種、Rizzo et al, Nat. Biotechnol., 22: 445 (2004)およびTsien, Annu. Rev. Biochem., 67: 509 (1998)に記載される濃青色（cerulean）蛍光タンパク質、ならびにNagal et al, Nat. Biotechnol., 20: 87-90 (2002)に記載される黄色蛍光タンパク質を含むがこれらに限定されない。DsRed変種は、例えば、Shaner et al, Nat. Biotechnol., 22: 1567-1572 (2004)に記載されており、mStrawberry、mCherry、mOrange、mBanana、mHoneydewおよびmTangerineを含む。追加のDsRed変種は、例えば、Wang et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 101: 16745-16749 (2004)に記載されており、mRaspberryおよびmPlumを含む。DsRed変種のさらなる例は、Fischer et al, FEBS Lett., 577: 227-232 (2004)に記載されるmRFPmarsおよびFischer et al, FEBS Lett., 580: 2495-2502 (2006)

10

20

30

40

50

に記載されるmRFPubyを含む。

【0157】

適當な音波源気体は、六フッ化硫黄またはパーカルオロカーボン気体、例えばパーカルオロメタン、パーカルオロエタン、パーカルオロプロパン、パーカルオロブタン、パーカルオロシクロブタン、パーカルオロペンタン、またはパーカルオロヘキサンを含むがこれらに限定されない。

【0158】

適當な非金属同位体は、<sup>11</sup>C、<sup>14</sup>C、<sup>13</sup>N、<sup>18</sup>F、<sup>123</sup>I、<sup>124</sup>Iおよび<sup>125</sup>Iを含むがこれらに限定されない。適當な放射性同位体は、<sup>99</sup>mTc、<sup>95</sup>Tc、<sup>111</sup>In、<sup>62</sup>Cu、<sup>64</sup>Cu、Ga、<sup>68</sup>Gaおよび<sup>153</sup>Gdを含むがこれらに限定されない。適當な常磁性金属イオンは、Gd(III)、Dy(III)、Fe(III)およびMn(II)を含むがこれらに限定されない。適當なX線吸収体は、Re、Sm、Ho、Lu、Pm、Y、Bi、Pd、Gd、La、Au、Au、Yb、Dy、Cu、Rh、AgおよびIrを含むがこれらに限定されない。いくつかの態様において、放射性核種は、凝集体に付加されるキレート化剤またはキレート化剤-リンカーに結合される。直接コンジュゲートさせるのに適した放射性核種は、非限定的に、<sup>18</sup>F、<sup>124</sup>I、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>Iおよびそれらの混合物を含む。キレート化剤と共に使用するのに適した放射性核種は、非限定的に、<sup>47</sup>Sc、<sup>64</sup>Cu、<sup>67</sup>Cu、<sup>89</sup>Sr、<sup>86</sup>Y、<sup>87</sup>Y、<sup>90</sup>Y、<sup>105</sup>Rh、<sup>111</sup>Ag、<sup>111</sup>In、<sup>117</sup>mSn、<sup>149</sup>Pm、<sup>153</sup>Sm、<sup>166</sup>Ho、<sup>177</sup>Lu、<sup>186</sup>Re、<sup>88</sup>Re、<sup>211</sup>At、<sup>212</sup>Biおよびそれらの混合物を含む。適當なキレート化剤は、DOTA、BAD、ETA、DTPA、EDTA、NTA、HDTA、それらのホスホネートアナログ、およびそれらの混合物を含むがこれらに限定されない。当業者は、放射性核種、キレート化剤、およびキレート化剤-リンカーを粒子に付加する方法に精通しているであろう。

【0159】

検出可能な応答は、概して、観察または機器のいずれかにより検出可能なシグナルの変化または発生を表す。特定の例において、検出可能な応答は、蛍光または蛍光の変化、例えば、蛍光強度、蛍光の励起または発光波長の分布、蛍光の寿命および/もしくは蛍光偏光の変化である。当業者は、対象またはサンプルにおける標識の程度および/または位置が標準または対照（例えば、健常な組織または臓器）と比較され得ることを理解するであろう。特定の他の例において、検出可能な応答は、放射性物質、例えば放射性核種によって放射される 粒子、 粒子、核子、電子、陽電子、ニュートリノおよび 線を含む、放射活性（すなわち、放射線放射）である。

【0160】

蛍光、例えばフルオロフォアまたは蛍光タンパク質からの蛍光のインビボ検出に関する当技術分野で公知の具体的な装置または方法は、インビボ近赤外蛍光（例えば、Frangioni, Curr. Opin. Chem. Biol., 7: 626-634 (2003)を参照のこと）、Maestro（商標）インビボ蛍光画像化システム（Cambridge Research & Instrumentation, Inc.; Woburn, Mass.）、フライングスポットスキャナーを用いるインビボ蛍光画像化（例えば、Ramanujam et al, IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 48: 1034-1041 (2001)を参照のこと）等を含むがこれらに限定されない。光学的応答を検出するための他の方法または装置は、非限定的に、目視検査、CCDカメラ、映像カメラ、写真フィルム、レーザースキャナ装置、蛍光光度計、光ダイオード、量子カウンター、落射蛍光顕微鏡、走査型顕微鏡、フローサイトメーター、蛍光マイクロプレートリーダーまたは光電子増倍管を用いるシグナル增幅を含む。

【0161】

対象内での放射性核種の放射線の放射を検出する当技術分野で公知の任意の装置または方法が、本発明における使用に適する。例えば、回転式ガンマカメラを用いて単一光子線を放射する放射性核種からの放射線を検出する単一光子放射断層撮影（SPECT）およびシンチレーションガンマカメラを用いて組織、臓器または体組織における放射性核種画像またはその分布の連続画像集を取得する放射性核種シンチグラフィー等の方法が、放射性標識された凝集体から放射される放射線を検出するために使用され得る。陽電子放出断層撮影（PET）は、対象において放射線を検出する別の適當な技術である。

10

20

30

40

50

## 【0162】

いくつかの態様において、リガンドは、細胞表面受容体リガンドである。本明細書で使用される場合、「細胞表面受容体リガンド」は、細胞の外表面に結合することができる分子を表す。例示的な細胞表面受容体リガンドは、例えば、細胞表面受容体結合ペプチド、細胞表面受容体結合糖ペプチド、細胞表面受容体結合タンパク質、細胞表面受容体結合糖タンパク質、細胞表面受容体結合有機化合物、および細胞表面受容体結合薬を含む。

## 【0163】

細胞表面受容体リガンドは、サイトカイン、成長因子、ホルモン、抗体、および血管新生因子を含むがこれらに限定されない。

## 【0164】

いくつかの態様において、細胞表面受容体リガンドは、トランスフェリンまたはEGFである。

## 【0165】

選択された標的に対する強化された親和性を提供するリガンドは、本明細書において、標的指向性リガンドとも呼ばれる。本明細書で使用される場合、「標的指向性リガンド」という用語は、標的分子と結合または相互作用する分子を表す。典型的に、相互作用または結合の性質は、非共有結合的であり、例えば、水素、静電気、またはファンデルワールス相互作用によるものであるが、しかし、結合は共有結合的でもあり得る。

## 【0166】

本明細書で使用される場合、「エンドソーム溶解リガンド」という用語は、エンドソーム溶解特性を有する分子を表す。エンドソーム溶解リガンドは、本発明の組成物もしくはその成分の溶解を、および/または細胞区画、例えばエンドソーム、リソソーム、小胞体(ER)、ゴルジ体、微小管、ペルオキシソームもしくはその他の細胞内小胞体から細胞の細胞質へのそれらの輸送を促進する。いくつかの例示的なエンドソーム溶解リガンドは、イミダゾール、ポリまたはオリゴイミダゾール、直鎖または分枝鎖ポリエチレンイミン(PEI)、直鎖および分枝鎖ポリアミン、例えばスペルミン、カチオン性の直鎖および分枝鎖ポリアミン、ポリカルボキシレート、ポリカチオン、マスクされたオリゴまたはポリカチオンまたはアニオン、アセタール、ポリアセタール、ケタール/ポリケタール、オルトエステル、マスクされたまたはマスクされていないカチオンまたはアニオン電荷を有する直鎖または分枝鎖ポリマー、マスクされたまたはマスクされていないカチオンまたはアニオン電荷を有するデンドリマー、ポリアニオンペプチド、ポリアニオンペプチド模倣体、pH感受性ペプチド、天然および合成の融合性脂質、天然および合成のカチオン性脂質を含むがこれらに限定されない。

## 【0167】

本明細書で使用される場合、「PK調整リガンド」および「PKモジュレーター」という用語は、本発明の組成物の薬物動態を調整することができる分子を表す。いくつかの例示的なPKモジュレーターは、親油性分子、胆汁酸、ステロール、リン脂質アナログ、ペプチド、タンパク質結合剤、ビタミン、脂肪酸、フェノキサシン、アスピリン、ナブロキセン、イブプロフェン、スプロフェン、ケトプロフェン、(S)-(+)-プラノプロフェン、カルプロフェン、PEG、ビオチン、およびトランスクレチン(transthyretin)結合リガンド(例えば、テトラヨードチロ酢酸(tetraiodothyroacetic acid)、2,4,6-トリヨードフェノールおよびフルフェナム酸)を含むがこれらに限定されない。

## 【0168】

いくつかの態様において、両親媒性ペプチドは、少なくとも1つ(例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つまたはそれ以上)のリガンドコンジュゲートを含む。2つまたはそれ以上のリガンドが存在する場合、リガンドはすべて同一の特性を有してもよく、すべて異なる特性を有してもよく、またはいくつかのリガンドが同一の特性を有し、他が異なる特性を有してもよい。例えば、リガンドは、標的指向性特性を有しても、エンドソーム溶解活性を有しても、またはPK調整特性を有してもよい。したがって、2つまたはそれ以上のリガンドは、同一のリガンドであってもよく、異なるリガンドであってもよく、同一タイプのリ

10

20

30

40

50

ガンド（例えば、標的指向性リガンド、エンドソーム溶解リガンド、PKモジュレーター）であってもよく、異なるタイプのリガンドであってもよく、またはそれらの任意の組み合わせであってもよい。いくつかの態様において、すべてのリガンドが異なる特性を有する。

#### 【0169】

いくつかの態様において、両親媒性ペプチドは、ポリ(エチレングリコール)、ポリ(エチレンオキシド)、ポリ(プロピレングリコール)、ポリ(エチレンオキシド-コ-プロピレンオキシド)、ヒアルロン酸、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、ヘパリン、ポリビニル(ピロリドン)、コンドロイチン硫酸、キトサン、グルコサミノグルカン、デキストラン、デキストリン、デキストラン硫酸、酢酸セルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、セルロース系物質、ポリ(トリメチレングリコール)、ポリ(テトラメチレングリコール)、ポリペプチド、ポリアクリルアミド、ポリアクリルイミド、ポリ(エチレンアミン)、ポリ(アリルアミン)、およびそれらのブレンドからなる群より選択される親水性ポリマーを含み、そして親水性ポリマーは、疎水性ペプチジルセグメントに共有結合により連結される。

10

#### 【0170】

##### ペプチドへの連結

分子（例えば、リガンド）は、当業者に公知の任意の様々な方法を用いてペプチドにコンジュゲートされ得る。分子は、共有結合または非共有結合によりペプチドにカップリングまたはコンジュゲートされ得る。分子とペプチドとの間の共有結合連結は、リンカーによって媒介され得る。分子とペプチドとの間の非共有結合連結は、イオン相互作用、ファンデルワールス相互作用、双極子間相互作用、水素結合、静電気相互作用、および／または形状認識相互作用に基づくものであり得る。

20

#### 【0171】

非限定的に、リガンドは、様々な場所で、例えば、N末端、C末端、および／または中間位置（例えば、アミノ酸の側鎖）でペプチドにカップリングされ得る。2つまたはそれ以上のリガンドが存在する場合、リガンドはペプチドの反対端部（例えば、N末端およびC末端）に存在し得る。

#### 【0172】

概して、リガンドは、疎水性ペプチジルセグメントから最も離れた末端部（例えば、その端部から数えて1、2、3、4、5、6、7、8、9または10位）に配置される。学説による制約を望まないが、これにより、リガンドは、両親媒性ペプチドの自己凝集によって形成される粒子の表面または表面付近に位置するようになる。

30

#### 【0173】

いくつかの態様において、リガンドは、親水性ペプチジルセグメントの、疎水性ペプチジルセグメントと連結されていない末端に配置される。例えば、親水性ペプチジルセグメントのN末端が疎水性ペプチジルセグメントに連結される場合、リガンドは、親水性ペプチジルセグメントのC末端から数えて1、2、3、4、5、6、7、8、9、10位に配置される。あるいは、親水性ペプチジルセグメントのC末端が疎水性ペプチジルセグメントに連結される場合、リガンドは、親水性ペプチジルセグメントのN末端から数えて1、2、3、4、5、6、7、8、9、10位に配置される。

40

#### 【0174】

いくつかの態様において、リガンドは、リンカーを介してペプチドに付加される。リガンドは、モノマーが合成時にペプチドに組み込まれる際、そのモノマー上に存在し得る。いくつかの態様において、リガンドは、「前駆体」モノマーがペプチドに組み込まれた後に、その「前駆体」モノマーにカップリングを介して組み込まれ得る。例えば、アミノ末端リンカーを例えれば有する（すなわち、リガンドを伴わない）モノマー、例えば、モノマー-リンカー-NH<sub>2</sub>がペプチドに組み込まれ得る。その後の作業において、すなわち、前駆体モノマーがペプチドに組み込まれた後に、求電子基を有するリガンド、例えばペンタフルオロフェニルエステルまたはアルデヒド基を有するリガンドが、その後に、リガンドの

50

求電子基と前駆体モノマーのテザー部の末端求核基とのカップリングにより、前駆体モノマーに付加され得る。別の非限定的な例において、求電子基を有するリガンドは、N末端、C末端、または中間の側鎖アミノ基に付加され得る。別の例において、ペプチドがシステインを含む場合、チオール含有リガンドが、ジスルフィドリンクによってペプチドに連結され得る。

#### 【0175】

##### リンカー

本明細書で使用される場合、「リンカー」という用語は、化合物の2つの部分を接続する有機部分を意味する。リンカーは典型的に、直接結合または原子、例えば酸素もしくは硫黄、原子団、例えばNH、C(O)、C(O)NH、SO、SO<sub>2</sub>、SO<sub>2</sub>NH、SS、または原子鎖、例えば置換もしくは未置換C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル、置換もしくは未置換C<sub>2</sub>～C<sub>6</sub>アルケニル、置換もしくは未置換C<sub>2</sub>～C<sub>6</sub>アルキニル、置換もしくは未置換C<sub>6</sub>～C<sub>12</sub>アリール、置換もしくは未置換C<sub>5</sub>～C<sub>12</sub>ヘテロアリール、置換もしくは未置換C<sub>5</sub>～C<sub>12</sub>ヘテロシクリル、置換もしくは未置換C<sub>3</sub>～C<sub>12</sub>シクロアルキルを含み、ここで、1つまたは複数のメチレンはO、S、S(O)、SO<sub>2</sub>、NH、C(O)によって分断されているまたはこれらで終結していることがある。

10

#### 【0176】

いくつかの態様において、リンカーは、分枝リンカーである。分枝リンカーの分枝点は、少なくとも3価であり得るが、4価、5価または6価の原子またはそのような多価性を提示する基であり得る。いくつかの態様において、分枝点は、-N、-N(R)-C、-O-C、-S-C、-SS-C、-C(O)N(R)-C、-OC(O)N(R)-C、-N(R)C(O)-Cまたは-N(R)C(O)O-Cであり、ここで、Rはそれぞれの場合で独立してHまたは置換されてもよいアルキルである。いくつかの態様において、分枝点は、グリセロールまたはその誘導体である。

20

#### 【0177】

いくつかの態様において、リンカーは、切断可能な連結基を含む。本明細書で使用される場合、「切断可能な連結基」は、細胞外では十分に安定であるが、標的細胞に侵入した際には切断され、リンカーがひとまとめにして保持している2つの部分を放出する化学部分である。好ましい態様において、切断可能な連結基は、標的細胞においてまたは第1の参考条件下（例えば、細胞内条件を模倣または代理するよう選択され得る）で、対象の血液中もしくは血清中または第2の参考条件下（例えば、血液もしくは血清において見出される条件を模倣または代理するよう選択され得る）よりも、少なくとも10倍またはそれ以上、好ましくは少なくとも100倍速く切断される。

30

#### 【0178】

切断可能な連結基は、切断作用物質に対して、例えばpH、酸化還元電位または分解性分子の存在に対して易反応性である。一般に、切断作用物質は、血清または血液中よりも細胞内でより多く見られるまたはより高レベルもしくは高活性で見出される。そのような分解作用物質の例は、例えば、酸化もしくは還元酵素または還元物質、例えばメルカプタンを含む、特定の基質に対して選択されたまたは基質特異性を有さない、細胞中に存在する、酸化還元切断可能な連結基を還元により切断することができる、酸化還元物質；エステラーゼ；アミダーゼ；エンドソームまたは酸性環境を形成し得る物質、例えば5またはそれ未満のpHにするもの；一般的な酸として機能することによって酸切断可能な連結基を加水分解または分解することができる酵素、ペプチダーゼ（基質特異的であり得る）およびプロテアーゼ、ならびにホスファターゼを含む。

40

#### 【0179】

リンカーは、特定の酵素によって切断可能である切断可能な連結基を含み得る。リンカーに組み込まれる切断可能な連結基のタイプは、標的となる細胞に依存し得る。例えば、肝臓を標的指向する場合、切断可能な連結基は、エステル基を含み得る。肝細胞にはエステラーゼが豊富であり、したがってリンカーは、エステラーゼ豊富でない細胞型よりも肝細胞においてより効率的に切断される。他のエステラーゼ豊富な細胞型は、肺、腎皮質、および精巣の細胞を含む。

#### 【0180】

50

ペプチド結合を含有するリンカーは、ペプチダーゼ豊富な細胞型、例えば肝細胞および滑膜細胞を標的指向する場合に使用され得る。

#### 【0181】

いくつかの態様において、切断可能な連結基は、細胞中（または細胞内条件を模倣するよう選択されたインビトロ条件下）で、血液または血清中（または細胞外条件を模倣するよう選択されたインビトロ条件下）と比較して、少なくとも1.25、1.5、1.75、2、3、4、5、10、25、50または100倍速く切断される。いくつかの態様において、切断可能な連結基は、血液中（または細胞外条件を模倣するよう選択されたインビトロ条件下）において、細胞中（または細胞内条件を模倣するよう選択されたインビトロ条件下）と比較して、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%または1%未満が切断される。

10

#### 【0182】

例示的な切断可能な連結基は、酸化還元切断可能な連結基（例えば、-S-S-および-C(R)<sub>2</sub>-S-S-、ここで、RはHまたはC<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキルであり、少なくとも1つのRはC<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル、例えばCH<sub>3</sub>またはCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>である）；リン酸ベースの切断可能な連結基（例えば、-O-P(O)(OR)-O-、-O-P(S)(OR)-O-、-O-P(S)(SR)-O-、-S-P(O)(OR)-O-、-O-P(O)(OR)-S-、-S-P(O)(OR)-S-、-O-P(S)(ORk)-S-、-S-P(S)(OR)-O-、-O-P(O)(R)-O-、-O-P(S)(R)-O-、-S-P(O)(R)-O-、-S-P(S)(R)-O-、-S-P(O)(R)-S-、-O-P(S)(R)-S-、-O-P(O)(OH)-O-、-O-P(S)(OH)-O-、-O-P(S)(SH)-O-、-S-P(O)(OH)-O-、-O-P(O)(OH)-S-、-S-P(O)(OH)-S-、-O-P(S)(OH)-S-、-S-P(S)(OH)-O-、-O-P(O)(H)-O-、-O-P(S)(H)-O-、-S-P(O)(H)-O-、-S-P(S)(H)-O-、-S-P(O)(H)-S-および-O-P(S)(H)-S-、ここで、Rは置換されてもよい直鎖または分枝鎖のC<sub>1</sub>～C<sub>10</sub>アルキルである）；酸切断可能な連結基（例えば、ヒドラゾン、エステルおよびアミノ酸のエステル、-C=NN-ならびに-OC(O)-）；エステルベースの切断可能な連結基（例えば、-C(O)O-）；ペプチドベースの切断可能な連結基（例えば、細胞中の酵素、例えばペプチダーゼおよびプロテアーゼによって切断される連結基、例えば、-NHCHR<sup>A</sup>C(O)NHCHR<sup>B</sup>C(O)-、ここで、R<sup>A</sup>およびR<sup>B</sup>は2つの隣接するアミノ酸のR基である）を含むがこれらに限定されない。ペプチドベースの切断可能な連結基は、2つまたはそれ以上のアミノ酸を含む。いくつかの態様において、ペプチドベースの切断可能な連結は、細胞中で見出されるペプチダーゼまたはプロテアーゼの基質であるアミノ酸配列を含む。

20

#### 【0183】

いくつかの態様において、酸切断可能な連結基は、pHが約6.5もしくはそれ未満（例えば、約6.0、5.5、5.0もしくはそれ未満）の酸性環境下でまたは一般的な酸として機能し得る酵素等の物質によって切断可能である。

30

#### 【0184】

共有結合連結に加えて、化合物の2つの部分は、親和性結合対によってひとつに連結され得る。「親和性結合対」または「結合対」という用語は、互いに特異的に結合する第1および第2の分子を表す。結合対の一方のメンバーは、連結させたい第1の部分にコンジュゲートされ、第2のメンバーは、連結させたい第2の部分にコンジュゲートされる。本明細書で使用される場合、「特異的結合」という用語は、結合対の第1のメンバーが、他の分子に対するよりも高い親和性および特異性で結合対の第2のメンバーに結合することを表す。

40

#### 【0185】

例示的な結合対は、任意のハプテン性または抗原性化合物と対応する抗体またはその結合部分もしくはフラグメントの組み合わせ（例えば、ジゴキシゲニンおよび抗ジゴキシゲニン；マウス免疫グロブリンおよびヤギ抗マウス免疫グロブリン）ならびに非免疫学的結合対（例えば、ビオチン-アビジン、ビオチン-ストレプトアビジン、ホルモン〔例えば、サイロキシンおよびコルチゾール-ホルモン結合タンパク質、受容体-受容体アゴニスト、受容体-受容体アンタゴニスト（例えば、アセチルコリン受容体-アセチルコリンまたはそのアナログ）、IgG-プロテインA、レクチン-炭水化物、酵素-酵素補因子、酵素-酵素阻害剤、ならびに核酸2重鎖を形成することができる相補的なオリゴヌクレオチド対等を含む

50

。結合対はまた、負に荷電した第1の分子と正に荷電した第2の分子を含み得る。

【0186】

結合対によるコンジュゲートを使用する1つの例は、ビオチン-アビジンまたはビオチン-ストレプトアビジンのコンジュゲートである。このアプローチにおいて、分子またはペプチドの一方はビオチン化され、そして他方はアビジンまたはストレプトアビジンとコンジュゲートされる。タンパク質等の分子のビオチン化に関しては多くの市販のキットも入手可能である。

【0187】

結合対によるコンジュゲートを使用する別の例は、ビオチンサンドイッチ法である。例えば、Davis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103: 8155-60 (2006) を参照のこと。  
10 コンジュゲートによりひとつにされる2つの分子はビオチン化され、その後にリンカーとして4価のストレプトアビジンを用いてひとつにコンジュゲートされる。

【0188】

結合対によるコンジュゲートを使用するさらに別の例は、2本鎖核酸によるコンジュゲートである。このアプローチにおいて、連結させたい第1の部分は2本鎖核酸の第1の鎖にコンジュゲートされ、そして連結させたい第2の部分は2本鎖核酸の第2の鎖にコンジュゲートされる。核酸は、非限定的に、ヌクレオチド、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、ヌクレオチドアナログ、修飾ヌクレオチド、ならびに骨格修飾、分枝点および非ヌクレオチド残基、基または架橋を含むヌクレオチドを含む、定義された配列セグメントおよび配列を含み得る。  
20

【0189】

ペプチド粒子

本発明者はまた、本明細書に記載される両親媒性ペプチドが自己凝集を起こして超分子凝集体を形成することを発見した。したがって、別の局面において、本発明は、本明細書に記載される両親媒性ペプチドを含むペプチド粒子を提供する。いくつかの態様において、ペプチド粒子は、複数の本明細書に記載される両親媒性ペプチドを含む。例えば、ペプチド粒子は、少なくとも約2つ、少なくとも約3つ、少なくとも約4つ、少なくとも約5つ、少なくとも約6つ、少なくとも約7つ、少なくとも約8つ、少なくとも約9つ、少なくとも約10、少なくとも約20、少なくとも約25、少なくとも約50、少なくとも約75、少なくとも約100、少なくとも約150、少なくとも約200、少なくとも約250、少なくとも約500、少なくとも約750、少なくとも約1000、少なくとも約2500、少なくとも約5000、少なくとも約10,000またはそれ以上の本明細書に記載される両親媒性ペプチドを含み得る。ペプチド粒子中に存在する複数の両親媒性ペプチドは、本明細書に記載される両親媒性ペプチドの1つの態様、または本明細書に記載される両親媒性ペプチドの少なくとも2つの異なる態様を含み得る。  
30

【0190】

「粒子」という用語は、スフェア；ナノロッド体；およびプリズム体を含む。本明細書に記載されるペプチド粒子は、ミセル、リポソーム、およびその他の粒子（壁形成物質として機能する明確な外殻部（例えば、脂質層）を含み、それがその外殻内に位置する被包媒体を取り囲んでいるもの）とは異なる。本明細書に記載される粒子は、中実の粒子である。粒子は、例えば、単分散系または多分散系であり得、所定の分散系の粒子の直径のばらつきは様々であり得る。しかし、均一サイズの両親媒性ペプチドを得ることができるので、本明細書に記載される粒子は通常单分散系である。したがって、いくつかの態様において、本明細書に記載される粒子の直径は、平均直径の±2.5%内、±5%内、±10%内、±15%内、±20%内、±25%内、±30%内または±35%内である。  
40

【0191】

いくつかの態様において、本明細書に記載されるペプチド粒子は、ナノ粒子である。本明細書で使用される場合、「ナノ粒子」という用語は、 $10^{-9}$ または10億分の1メートルのオーダーであり、 $10^{-6}$ または100万分の1メートルより小さいサイズの粒子を表す。

【0192】

10

20

30

40

50

概して、ペプチド粒子は、約5nm～約5000nmの平均直径を有する。いくつかの態様において、粒子は、約50nm～約2500nmの平均直径を有する。いくつかの態様において、粒子は、約100nm～約2000nmの平均直径を有する。いくつかの態様において、粒子は、約150nm～約1700nmの平均直径を有する。いくつかの態様において、粒子は、約200nm～約1500nmの平均直径を有する。いくつかの態様において、粒子は、約260nmの平均直径を有する。1つの態様において、粒子は、約30nm～約150nmの平均直径を有する。学説による制約を望まないが、粒子サイズは、ペプチド粒子を製作するために使用される溶液中の両親媒性ペプチドの濃度を変更することによって調整することができる。

#### 【0193】

いくつかの態様において、本明細書に記載されるペプチド粒子は、完全にマスクされた両親媒性ペプチドと、部分的にマスクされた両親媒性ペプチドまたはマスクされていない両親媒性ペプチドとの混合物を含む。本明細書で使用される場合、「マスクされていないペプチド」は、N末端アミノ基および親水性ペプチジルセグメントの側鎖アミノ基がいずれも窒素保護基またはアミノ保護基とコンジュゲートしていない両親媒性ペプチドを表す。

#### 【0194】

完全にマスクされたペプチド 対 部分的にマスクされたペプチドまたはマスクされていないペプチドの比を変更することによって、ペプチド粒子の正味電荷を変化させることができる。学説による制約を望まないが、完全にマスクされたペプチドの比が大きいほど粒子の安定性は高くなり得、一方、部分的にマスクされたおよび／またはマスクされていないペプチドの比が大きいほどアニオン電荷を保有する分子（例えば、核酸、例えばDNAまたはsiRNAを含むRNA）の充填量が増加し得、細胞膜を透過する能力が高くなり得る。

#### 【0195】

いくつかの態様において、ペプチド粒子は、完全にマスクされた両親媒性ペプチド（例えば、完全にアセチル化された両親媒性ペプチド）を含み得る。本明細書で使用される「完全にアセチル化された両親媒性ペプチド」という用語は、N末端アミノ基および親水性ペプチジルセグメントの側鎖アミノ基がすべてアセチル化されている両親媒性ペプチドを表す。

#### 【0196】

いくつかの態様において、ペプチド粒子は、完全にマスクされた（例えば、完全にアセチル化された）ペプチドと、部分的にマスクされた（例えば、部分的にアセチル化された）ペプチドとの混合物を含み得る。本明細書で使用される場合、「部分的にアセチル化された両親媒性ペプチド」という用語は、N末端アミノ基と親水性ペプチジルセグメントの側鎖アミノ基とのうち少なくとも1つがアセチル化されているが、すべてがアセチル化されているのではない両親媒性ペプチドを表す。いくつかの態様において、部分的にアセチル化された両親媒性ペプチドは、その両親媒性ペプチドのN末端アミノ基がアセチル化されているが、親水性ペプチジルセグメントの側鎖アミノ基はいずれもアセチル化されていないものであり得る。いくつかの態様において、部分的にアセチル化された両親媒性ペプチドは、親水性ペプチジルセグメントの側鎖アミノ基の少なくとも1つ（少なくとも2つまたはそれ以上を含む）がアセチル化されているが、その両親媒性ペプチドのN末端アミノ基はアセチル化されていないものであり得る。いくつかの態様において、部分的にアセチル化された両親媒性ペプチドは、その両親媒性ペプチドのN末端アミノ基と、親水性ペプチジルセグメントの側鎖アミノ基のすべてではないが少なくとも1つ（少なくとも2つまたはそれ以上を含む）との両方がアセチル化されたものであり得る。

#### 【0197】

いくつかの態様において、ペプチド粒子は、完全にマスクされた（例えば、完全にアセチル化された）両親媒性ペプチドと、マスクされていない（例えば、アセチル化されていない）両親媒性ペプチドとの混合物を含み得る。本明細書で使用される場合、「アセチル化されていない両親媒性ペプチド」という用語は、N末端アミノ基および親水性ペプチジルセグメントの側鎖アミノ基がいずれもアセチル化されていない両親媒性ペプチドを表す。

10

20

30

40

50

。いくつかの態様において、ペプチド粒子は、完全にマスクされた（例えば、完全にアセチル化された）両親媒性ペプチドと、部分的にマスクされた（例えば、部分的にアセチル化された）両親媒性ペプチドと、マスクされていない（例えば、アセチル化されていない）両親媒性ペプチドとの混合物を含み得る。

#### 【0198】

いくつかの態様において、ペプチド粒子は、完全にマスクされた両親媒性ペプチドを含まない。例えば、その粒子は、部分的にマスクされた両親媒性ペプチドを含むかまたは部分的にマスクされたペプチドの混合物を含む。いくつかの態様において、ペプチド粒子は、部分的にマスクされたペプチドとマスクされていないペプチドとの混合物を含む。

#### 【0199】

非限定的に、ペプチド粒子内での完全にマスクされたペプチド 対 部分的にマスクされたペプチドまたはマスクされていないペプチドの比は、約100:1～約1:100の範囲であり得る。いくつかの態様において、ペプチド粒子内での完全にマスクされたペプチド 対 部分的にマスクされたペプチドまたはマスクされていないペプチドの比は、約95:5～約1:1の範囲である。

#### 【0200】

本明細書に記載される粒子は、薬物送達のために使用することができる。したがって、幅広い治療剤が、本明細書に記載される粒子中に含まれ得る。したがって、いくつかの態様において、本明細書に記載されるペプチド粒子は、本明細書に記載される活性剤を含み得る。活性剤は、ペプチド粒子の成分、例えば両親媒性ペプチドに、共有結合により連結され得る。いくつかの態様において、本明細書に記載されるペプチド粒子中の活性剤は、粒子の成分に共有結合により連結されるのではない。非限定的に、活性剤は、粒子の表面に吸收／吸着され得、粒子中に被包され得、または粒子全体に（均一にまたは不均一に）分配され得る。

#### 【0201】

通常、活性剤 対 両親媒性ペプチドの任意の比が、本明細書に記載されるペプチド粒子に存在し得る。したがって、いくつかの態様において、活性剤 対 両親媒性ペプチドの比は、約100:1～約1:100,000の範囲である。いくつかの態様において、活性剤 対 両親媒性ペプチドの比は、約1:1～約1:100,000の範囲である。いくつかの態様において、活性剤 対 両親媒性ペプチドの比は、約1:1～約1:10,000の範囲である。いくつかの態様において、活性剤 対 両親媒性ペプチドの比は、約1:1～約1:1000の範囲である。いくつかの態様において、活性剤 対 両親媒性ペプチドの比は、約1:1～約1:100の範囲である。いくつかの態様において、活性剤 対 両親媒性ペプチドの比は、約1:1～約1:10の範囲である。いくつかの態様において、活性剤 対 両親媒性ペプチドの比は、約50:1～約1:500の範囲である。いくつかの態様において、活性剤 対 両親媒性ペプチドの比は、約10:1～約1:25の範囲である。

#### 【0202】

いくつかの態様において、ペプチド粒子は、リガンドを含み得る。非限定的に、リガンドは、粒子の成分、例えば両親媒性ペプチドに、共有結合により連結され得る。いくつかの態様において、リガンドは、粒子の成分に共有結合により連結されるのではなく、例えば、リガンドは粒子の表面に吸收／吸着され、リガンドは粒子中に被包され、またはリガンドは粒子全体に（均一にまたは不均一に）分配される。いくつかの態様において、リガンドは、標的指向性リガンドである。

#### 【0203】

いくつかの態様において、リガンドは、ペプチド粒子の表面に層を形成する。例えば、リガンドは、粒子の周囲にコロナを形成する。リガンドが粒子の表面に層を形成する場合、層の厚みは、約1nm～約100nmの範囲であり得る。いくつかの態様において、層の厚みは約10nmである。

#### 【0204】

通常、リガンド 対 両親媒性ペプチドの任意の比が、粒子に存在し得る。したがって、

10

20

30

40

50

いくつかの態様において、リガンド 対 両親媒性ペプチドの比は、約1000:1～約1:1,000,000の範囲である。いくつかの態様において、リガンド 対 両親媒性ペプチドの比は、約1:10～約1:1,000,000の範囲である。いくつかの態様において、リガンド 対 両親媒性ペプチドの比は、約500:1～約1:500の範囲である。いくつかの態様において、リガンド 対 両親媒性ペプチドの比は、約100:1～約1:250の範囲である。いくつかの態様において、リガンド 対 両親媒性ペプチドの比は、約1:10～約1:1000の範囲である。

#### 【0205】

いくつかの態様において、ペプチド粒子は、活性剤（例えば、治療剤）およびリガンドの両方を含み得る。いくつかの態様において、ペプチド粒子は、粒子内に分配された活性剤（例えば、治療剤）および粒子の外表面上のリガンドを含み得る。

10

#### 【0206】

非限定的に、異なるタイプのペプチド粒子が製作され得る。例えば、(1) 両親媒性ペプチドのみから形成される粒子；(2) 関心対象の分子、例えば活性剤もしくはリガンドが吸收／吸着しているまたはそれらがその両親媒性ペプチドのコアに対するコーティングを形成している、両親媒性ペプチドから形成される粒子；(3) 両親媒性ペプチドの層でコーティングされた関心対象の分子によって、例えば活性剤またはリガンドによって形成されるコアから形成される粒子；(4) 関心対象の分子、例えば活性剤またはリガンドが共有結合により連結されている、両親媒性ペプチドから形成される粒子；(5) 関心対象の分子（例えば、活性剤またはリガンド）と両親媒性ペプチドとの混合物から形成される粒子；ならびに(6) 関心対象の分子、例えば活性剤またはリガンドと両親媒性ペプチドとのほぼ均一な混合物を含むように形成される粒子、またはそれらの任意の組み合わせである。例えば、ペプチド粒子は、関心対象の第1の分子、例えば活性剤またはリガンドが吸收／吸着しているまたはそれらがその両親媒性ペプチドのコアに対するコーティングを形成している両親媒性ペプチドから形成され得、両親媒性ペプチドのコアはさらに、関心対象の第2の分子、例えば活性剤を含む。これらの態様において、関心対象の第2の分子は、関心対象の第1の分子と同一であってもまたは異なっていてもよい。

20

#### 【0207】

いくつかの態様において、ペプチド粒子はさらに、ポリマー、例えば生体適合性ポリマーを含み得る。本明細書で使用される場合、「生体適合性」という用語は、原則的に体液または組織と接触している間に細胞傷害性または免疫原性を示さないことを意味する。本明細書で使用される場合、「ポリマー」という用語は、オリゴマー、コオリゴマー、ポリマーおよびコポリマー、例えば、ランダムプロック、マルチプロック、スター、グラフト、グラジエントコポリマー、ならびにそれらの組み合わせを表す。

30

#### 【0208】

「生体適合性ポリマー」という用語は、対象の体内で使用されたときに非毒性、化学的に不活性および実質的に非免疫原性であり、かつ実質的に血液不溶性であるポリマーを表す。生体適合性ポリマーは、非生分解性または好ましくは生分解性のいずれかであり得る。好ましくは、生体適合性ポリマーはまた、インサイチューで使用されるときに非炎症性である。

40

#### 【0209】

生分解性ポリマーは、当技術分野で開示されている。適当な生分解性ポリマーの例は、直鎖ポリマー、例えば、ポリラクチド、ポリグリコリド、ポリカプロラクトン、ポリ乳酸およびポリグリコール酸のコポリマー、ポリ無水物、ポリイブシロンカプロラクトン、ポリアミド、ポリウレタン、ポリエステルアミド、ポリオルトエステル、ポリジオキサン、ポリアセタール、ポリケタール、ポリカーボネート、ポリオルトカーボネート、ポリジヒドロピラン、ポリホスファゼン、ポリヒドロキシブチレート、ポリヒドロキシバレート、ポリアルキレンオキサレート、ポリアルキレンスクシネット、ポリ(リンゴ酸)、ポリ(アミノ酸)、ポリビニルピロリドン、ポリエチレングリコール、ポリヒドロキシセルロース、ポリメチルメタクリレート、キチン、キトサン、ポリ乳酸およびポリグリコール酸のコポリマー、ポリ(グリセロールセバケート)(PGS)、ならびに上記の1つまたは複数を含

50

むコポリマー、ターポリマーおよびコポリマーを含むがこれらに限定されない。他の生分解性ポリマーは、例えば、ゼラチン、コラーゲン、シルク、キトサン、アルギネート、セルロース、ポリ核酸 (poly-nucleic acid) 等を含む。

#### 【0210】

適当な非生分解性・生体適合性ポリマーは、例として、酢酸セルロース(二酢酸セルロースを含む)、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリブチレン、ポリエチレンテレフタレート(PET)、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、ポリアミド、ナイロン、ポリカーボネート、ポリスルフィド、ポリスルホン、ヒドロゲル(例えば、アクリル系)、ポリアクリロニトリル、ポリ酢酸ビニル、酢酸酪酸セルロース、ニトロセルロース、ウレタン/カーボネートのコポリマー、スチレン/マレイン酸のコポリマー、ポリ(エチレンイミン)、ポロキサマー(例えば、プルロニック、例えばポロキサマー407および188)、ヒアルロン、ヘパリン、アガロース、プルラン、ならびに上記の1つまたは複数を含むコポリマー、例えばエチレン/ビニルアルコールコポリマー(EVOH)を含む。

10

#### 【0211】

ペプチド粒子はまた、インビボでの粒子の寿命を延長できる追加の部分を含み得る。例えば、ペプチド粒子は、血液中での粒子のインビボ寿命を強化する機能的部分を含み得る。インビボ寿命を増加させる1つの例示的な部分は、ポリエチレングリコールである。したがって、ペプチド粒子は、両親媒性ペプチドに加えてポリエチレングリコールを含み得る。

20

#### 【0212】

##### ペプチド粒子の追加の態様

1つの態様において、本明細書に記載されるペプチド粒子は、本明細書に記載される両親媒性ペプチドの特定の態様を含む。ペプチド粒子のこの態様に存在する両親媒性ペプチドは、疎水性ペプチジルセグメントと親水性ペプチジルセグメントとを含み、疎水性ペプチジルセグメントは、 $(Trp-Leu)_m-(Trp)_n$ または $(Leu-Trp)_p-(Leu)_q$ のアミノ酸配列を含み、ここで、各TrpはD-TrpまたはL-Trpであり、かつ各LeuはD-LeuまたはL-Leuであり、mおよびpは独立して1~5の整数であり、かつnおよびqは独立して0または1であるが、ただし、TrpがD-Trpの場合、LeuはL-Leuであり、かつTrpがL-Trpの場合、LeuはD-Leuであり、またはその逆も同様であり；かつ親水性ペプチジルセグメントは、 $(Lys)_r$ のアミノ酸配列を含み、ここで、rは1~15の整数であり、かつペプチド粒子は、その外表面に本明細書に記載されるリガンドをさらに含む。

30

#### 【0213】

いくつかの態様において、ペプチド粒子は、前出の「例示的な両親媒性ペプチド」の節に記載される両親媒性ペプチドの1つまたは複数の態様を含み得る。1つの態様において、ペプチド粒子は、

(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-X  
のアミノ酸配列を有する両親媒性ペプチドを含み得、ここで、Xは存在しないかまたはNH<sub>2</sub>である。前記のように、いくつかの態様において、親水性ペプチジルセグメントのLys残基の少なくとも1つまたは両親媒性ペプチドのN末端アミノ基は、アセチル化されている。いくつかの態様において、親水性ペプチジルセグメントのLys残基のすべてが、アセチル化されている。いくつかの態様において、両親媒性ペプチドのN末端アミノ基と親水性ペプチジルセグメントのLys残基のすべてとが、アセチル化されている。

40

#### 【0214】

ペプチド粒子の外表面に存在するリガンドは、ペプチド粒子を結合および/または相互作用させる標的分子のタイプ(例えば、細胞、細菌、タンパク質および/または核酸であるがこれらに限定されない)に基づき選択され得る。例えば、本明細書に記載されるペプチド粒子の細胞への送達を容易にするため、細胞表面受容体に特異的なリガンドが選択され、それによって、例えばエンドサイトーシスを介した、細胞によるペプチド粒子の取り込みが促進され得る。したがって、本明細書に記載されるペプチド粒子のいくつかの態様は、同ペプチド粒子を送達担体またはビヒクルとして使用する本明細書に記載される任意

50

の活性剤の標的指向性送達のために使用され得る。1つの態様において、ペプチド粒子は、単独で送達されるときには細胞不透過性である活性剤を、細胞に送達するために使用され得る。

#### 【0215】

前記のように、いくつかの態様において、ペプチド粒子は、完全にマスクされた（例えば、完全にアセチル化された）本明細書に記載される両親媒性ペプチドと、部分的にマスクされた（例えば、部分的にアセチル化された）本明細書に記載される両親媒性ペプチドとを含み得る。これらの態様において、完全にアセチル化された両親媒性ペプチド 対 部分的にマスクされた両親媒性ペプチドの比は、約95:5～約1:1の範囲であり得る。特定の態様において、粒子はさらに、マスクされていない（例えば、アセチル化されていない）両親媒性ペプチドを含み得る。

10

#### 【0216】

したがって、完全にアセチル化された両親媒性ペプチドと、部分的にアセチル化された両親媒性ペプチドまたはアセチル化されていない両親媒性ペプチドとを含む混合ペプチド粒子もまた、本明細書に提供される。特定の態様において、混合ペプチド粒子は、第1の両親媒性ペプチドと第2の両親媒性ペプチドとを含み、第1および第2の両親媒性ペプチドは、各々独立して疎水性ペプチジルセグメントと親水性ペプチジルセグメントとを含み、疎水性ペプチジルセグメントは $(Trp-Leu)_m-(Trp)_n$ または $(Leu-Trp)_p-(Leu)_q$ のアミノ酸配列を含み、ここで、各TrpはD-TrpまたはL-Trpであり、かつ各LeuはD-LeuまたはL-Leuであり、mおよびpは独立して1～5の整数であり、かつnおよびqは独立して0または1であるが、ただし、TrpがD-Trpの場合、LeuはL-Leuであり、かつTrpがL-Trpの場合、LeuはD-Leuであり、またはその逆も同様であり；親水性ペプチジルセグメントは、(Lys)<sub>r</sub>のアミノ酸配列を含み、ここで、rは1～15の整数である。加えて、第1の両親媒性ペプチドのLys残基のすべておよびN末端アミノ基がアセチル化されており；一方で、第2の両親媒性ペプチドの少なくともN末端アミノ基または1つのLys残基がアセチル化されていない。いくつかの態様において、第2の両親媒性ペプチドのN末端アミノ基およびLys残基はいずれもアセチル化されていない。

20

#### 【0217】

いくつかの態様において、混合ペプチド粒子は、複数（例えば、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つまたはそれ以上）の第1の両親媒性ペプチドと、複数（例えば、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つまたはそれ以上）の第2の両親媒性ペプチドとを含み得る。

30

#### 【0218】

特定の態様において、第1の両親媒性ペプチドおよび第2の両親媒性ペプチドは、前出の「例示的な両親媒性ペプチド」の節に記載される両親媒性ペプチドの任意の1つまたは複数の態様から選択され得る。いくつかの態様において、第1および第2の両親媒性ペプチドは、各々独立して、

$(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-X$  のアミノ酸配列を含み得、ここで、Xは存在しないかまたはNH<sub>2</sub>である。

40

#### 【0219】

第1の両親媒性ペプチド 対 第2の両親媒性ペプチドの比は、多くの因子、例えば、非限定的に、ペプチド粒子の所望の溶解性および／もしくは安定性ならびに／またはその中に充填される活性剤の特性に基づき変更され得る。いくつかの態様において、第1の両親媒性ペプチド 対 第2の両親媒性ペプチドの比は、約1:1000～約1000:1の範囲であり得る。いくつかの態様において、第1の両親媒性ペプチド 対 第2の両親媒性ペプチドの比は、約1:1～約1000:1の範囲であり得る。いくつかの態様において、第1の両親媒性ペプチド 対 第2の両親媒性ペプチドの比は、約2:1～約500:1の範囲であり得る。いくつかの態様において、第1の両親媒性ペプチド 対 第2の両親媒性ペプチドの比は、約3:1～約200:1の範囲であり得る。他の態様において、第1の両親媒性ペプチド 対 第2の両親媒性ペプチドの比は、約5:1～約100:1の範囲であり得る。

50

## 【0220】

いくつかの態様において、混合ペプチド粒子はさらに、本明細書に記載される活性剤を含み得る。活性剤は、例えばペプチド粒子の充填容量および／または第1もしくは第2の両親媒性ペプチドの結合能力に依存して、任意の量で混合ペプチド粒子中に存在し得る。いくつかの態様において、活性剤 対 第2の両親媒性ペプチドの比は、約1:1000～1:1の範囲であり得る。いくつかの態様において、活性剤 対 第2の両親媒性ペプチドの比は、約1:100～約1:10であり得る。いくつかの態様において、活性剤 対 第2の両親媒性ペプチドの比は、約1:50～約1:5の範囲であり得る。いくつかの態様において、活性剤 対 第2の両親媒性ペプチドの比は、約1:10～約1:2の範囲であり得る。

## 【0221】

10

いくつかの態様において、混合ペプチド粒子はさらに、その外表面に本明細書に記載されるリガンドを含み得る。前記のように、リガンドの選択は、混合ペプチド粒子を結合させる標的分子（例えば、細胞、細菌、タンパク質、核酸であるがこれらに限定されない）に基づき決定され得る。リガンドの非限定的な例は、細胞表面受容体リガンド、またはタンパク質、例えば抗体を含み得る。いくつかの態様において、リガンドは、第1および第2の両親媒性ペプチドの少なくとも1つ、例えば第1および第2の両親媒性ペプチドの少なくとも1つにおける親水性ペプチジルセグメントに、共有結合により連結され得る。

## 【0222】

20

本明細書に記載される混合ペプチド粒子は、本明細書に記載される任意の活性剤を被包するため使用され得る。学説による制約を望まないが、混合ペプチド粒子における第2の両親媒性ペプチドの存在は、アニオン性の核酸分子との結合のためにカチオン電荷を提供し得る。したがって、いくつかの態様において、活性剤は、核酸分子を含み得る。

## 【0223】

30

本明細書に提供されるさらなる局面は、細胞への核酸分子の送達のための、本明細書に記載される第1の両親媒性ペプチドと第2の両親媒性ペプチドとを含む混合ペプチド粒子の1つまたは複数の態様の使用に関する。したがって、いくつかの態様において、細胞への核酸分子の送達において使用するための混合ペプチド粒子は、第1の両親媒性ペプチド、第2の両親媒性ペプチド、および核酸分子を含む。いくつかの態様において、混合ペプチド粒子は、複数（例えば、少なくとも2つまたはそれ以上）の核酸分子またはオリゴヌクレオチド（例えば、DNA、またはsiRNA、shRNA、miRNAもしくはそれらの任意の混合物を含むがこれらに限定されないRNA）を含み得る。いくつかの態様において、核酸分子またはオリゴヌクレオチドは、治療的介入において、例えば遺伝子療法またはsiRNA療法において使用されるように設計され得る。

## 【0224】

40

ペプチド粒子集合体

本明細書に記載されるペプチド粒子は、1工程手順によって集合させることができる。例えば、ペプチド粒子は、溶解させた両親媒性ペプチドから水の添加によって簡便に集合させることができ；3成分混合物（ペプチド、有機溶媒、H<sub>2</sub>O）が2相領域（ペプチド、H<sub>2</sub>O）に移行するのに伴い乳濁物が自然に形成される。この乳化プロセスはウーザ効果（ouzo effect）に類似するが、両親媒性ペプチド滴は有機溶媒が除かれると硬化して中実の粒子になる。中性および荷電分子は、分散相に効果的に移動し、粒子形成の間に捕捉される。

## 【0225】

50

概して、活性剤およびリガンドを含むペプチド粒子は、本明細書で概説される手順を用いて約15分以内に集合させることができる。加えて、このシステムは、粒子サイズの直接的な調節を可能にし、かつ活性剤を非常に高密度で捕捉する。

## 【0226】

学説による制約を望まないが、このシステムおよび形成プロトコルの単純さは、ペプチド粒子のすべての関連成分の協調的相互作用から来ている：両親媒性ペプチドは、マトリックスの材料であるというだけでなく、それらがリガンドおよび／または活性剤等の他の

成分に対して高い親和性を有しているために、被包ルーチンに取って代わるものである。この活性剤被包プロセスは、活性剤が水相から逃がれペプチド滴中に蓄積する2相液体抽出に類似すると考えるのが最も妥当である。加えて、このペプチドの穏やかな有機溶媒に対する溶解性は、すべての関連成分の同時溶解および自己集合を可能にする。ペプチドの乳化時にリガンドが存在するため、リガンドコロナが形成され得る。加えて、リガンドの存在は、その表面活性により粒子サイズの直接的な調節、そしてそれによるペプチド乳濁物の早期安定化を実現する。

### 【0227】

#### 薬学的組成物

対象への投与のために、本明細書に記載されるペプチド粒子および活性剤-両親媒性ペプチド複合体は、薬学的に許容される組成物として提供され得る。これらの薬学的に許容される組成物は、1つまたは複数の薬学的に許容される担体（添加物）および／または希釈剤と共に製剤化された粒子または活性剤-両親媒性ペプチド複合体を含む。以下に詳細に記載されるように、本明細書に記載される薬学的組成物は、以下に適合された投与を含む、固体または液体形態での投与のために特別に製剤化され得る：（1）経口投与、例えば、水薬（水性または非水性の溶液または懸濁物）、強制栄養薬（gavage）、ロゼンジ、糖衣錠、カプセル、丸剤、錠剤（例えば、頬側、舌下および全身吸収を目的とするもの）、ボーラス、粉末、顆粒、舌に適用するためのペースト；（2）非経口投与、例えば滅菌溶液もしくは懸濁物または持続放出製剤として、例えば皮下、筋内、静脈内または硬膜外注射による；（3）局所適用、例えば皮膚に適用されるクリーム、軟膏または制御放出パッチまたはスプレーとして；（4）腔内または直腸内、例えば坐薬、クリームまたはフォームとして；（5）舌下；（6）眼内；（7）経皮；（8）経粘膜；または（9）鼻内。加えて、化合物は、薬物送達システムを用いて患者に移植または注射され得る。例えば、そのすべての内容が参照により本明細書に組み入れられる、Urquhart, et al., Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 24: 199-236 (1984); Lewis, ed. "Controlled Release of Pesticides and Pharmaceuticals" (Plenum Press, New York, 1981); 米国特許第3,773,919号；および米国特許第35 3,270,960号を参照のこと。

### 【0228】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される」という用語は、妥当な医学的判断の範囲内で、過剰な毒性、刺激、アレルギー反応またはその他の問題もしくは合併症を伴わずに、合理的な利益／危険比が保たれる、ヒトおよび動物の組織と接触させて使用するのに適した、化合物、材料、組成物および／または剤形を表す。

### 【0229】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」という用語は、1つの臓器または身体の一部から別の臓器または身体の一部への対象化合物の運搬または輸送に関する、薬学的に許容される材料、組成物またはビヒクル、例えば、液体または固体增量剤、希釈剤、賦形剤、製造補助剤（例えば、滑沢剤、タルクマグネシウム、ステアリン酸カルシウムもしくは亜鉛、またはステアリン酸（steric acid））または溶媒被包材料を意味する。各々の担体は、製剤の他の成分と適合しかつ患者に有害でないという意味で「許容される」ものでなければならない。薬学的に許容される担体として機能し得る材料のいくつかの例は、（1）糖、例えば、ラクトース、グルコースおよびスクロース；（2）デンプン、例えば、トウモロコシデンプンおよびジャガイモデンプン；（3）セルロースおよびその誘導体、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、エチルセルロース、微結晶セルロースおよび酢酸セルロース；（4）トラガカント末；（5）麦芽；（6）ゼラチン；（7）滑沢剤、例えば、ステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウムおよびタルク；（8）賦形剤、例えば、カカオバターおよび坐剤用ワックス；（9）油、例えば、ピーナツ油、綿実油、紅花油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油およびダイズ油；（10）グリコール、例えば、プロピレングリコール；（11）ポリオール、例えば、グリセリン、ソルビトール、マンニトールおよびポリエチレングリコール（PEG）；（12）エステル、例えば、オレイン酸エチルおよびラウリン酸エチル；（13）寒天；（

10

20

30

40

50

14) 緩衝剤、例えば、水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウム；(15) アルギン酸；(16) 発熱物質非含有水；(17) 等張食塩水；(18) リンガー溶液；(19) エチルアルコール；(20) pH緩衝溶液；(21) ポリエステル、ポリカーボネートおよび／またはポリ無水物；(22) バルク剤、例えば、ポリペプチドおよびアミノ酸(23) 血清成分、例えば、血清アルブミン、HDLおよびLDL；(22) C<sub>2</sub>～C<sub>12</sub>アルコール、例えば、エタノール；ならびに(23) 薬学的製剤において使用されるその他の非毒性、適合性の物質を含む。湿潤剤、着色剤、放出剤、コーティング剤、甘味剤、香味剤、芳香剤、保存剤および抗酸化物質もまた、製剤中に存在し得る。「賦形剤」、「担体」、「薬学的に許与される担体」等の用語は、本明細書において言い換え可能に使用される。

## 【0230】

10

本明細書で使用される場合、「投与」という用語は、組成物を所望の部位に少なくとも部分的に局在化させる方法または経路によりその組成物を対象内に投入し、所望の効果を生じさせることを表す。投与経路は、局所および全身の両方の投与を含む。通常、局所投与は、対象のからだ全体に対して特定の位置により多くの治療剤を送達するものであり、他方、全身投与は、治療剤を本質的に対象のからだ全体に送達するものである。

## 【0231】

対象への投与は、静脈内、筋内、皮下、経皮、気道(エアゾール)、肺、鼻、直腸、および局所(頸側および舌下を含む)投与を含む経口または非経口経路を含むがこれらに限定されない、当技術分野で公知の任意の適当な経路によるものであり得る。

## 【0232】

20

例示的な投与経路は、注射、注入、滴下、吸入または摂取を含むがこれらに限定されない。「注射」は、非限定的に、静脈内、筋内、動脈内、くも膜下腔内、脳室内、囊内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、囊下、くも膜下、脊髄内、脳脊髄内および胸骨内注射および注入を含む。本明細書に記載される局面のいくつかの態様において、投与は、静脈内注入または注射によるものである。

## 【0233】

30

本明細書で使用される場合、「対象」は、ヒトまたは動物を意味する。通常、動物は、脊椎動物、例えば靈長類、げっ歯類、家畜動物または狩猟動物である。靈長類は、チンパンジー、カニクイザル、クモザルおよびマカク、例えばアカゲザルを含む。げっ歯類は、マウス、ラット、マーモット、フェレット、ウサギおよびハムスターを含む。家畜および狩猟動物は、ウシ、ウマ、ブタ、シカ、バイソン、バッファロー、ネコ種、例えばイエネコ、イヌ種、例えばイヌ、キツネ、オオカミ、鳥種、例えばニワトリ、エミュー、ダチョウ、ならびに魚、例えばマス、ナマズおよびサケを含む。患者または対象は、前記の任意の部分集合、例えば、ヒト、靈長類、またはげっ歯類などの1つまたは複数の群または種を除く上記のすべてを含む。本明細書に記載される局面の特定の態様において、対象は、哺乳動物、例えば靈長類、例えばヒトである。「患者」および「対象」という用語は、本明細書において言い換え可能に使用される。「患者」および「対象」という用語は、本明細書において言い換え可能に使用される。対象は、オスまたはメスであり得る。

## 【0234】

40

好ましくは、対象は哺乳動物である。哺乳動物は、ヒト、非ヒト靈長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマまたはウシであり得るが、これらの例に限定されない。ヒト以外の哺乳動物は、自己免疫疾患または炎症に関連する障害の動物モデルとなる対象として使用できる利点がある。加えて、本明細書に記載される方法および組成物は、家畜化された動物および／またはペットを処置するために使用され得る。

## 【0235】

キット

本明細書に提供されるさらなる局面は、ペプチド粒子、ペプチド粒子を含む製剤、またはペプチド粒子もしくは本明細書に記載されるペプチド粒子を含む製剤を製造するための要素を含む、キットに関する。

## 【0236】

50

いくつかの態様において、ペプチド粒子または混合ペプチド粒子の1つまたは複数の態様を製造するための組成物またはキットが、本明細書に提供される。いくつかの態様において、組成物またはキットは、本明細書に記載される両親媒性ペプチドを含み得る。組成物またはキットに提供される両親媒性ペプチドは、容器で提供され得る。本明細書に記載のペプチド粒子または混合粒子のどれを製造するかの使用者の選択に依存して、いくつかの態様において、組成物またはキットは、本明細書に記載される第1の両親媒性ペプチドと第2の両親媒性ペプチドとを含み得る。両親媒性ペプチドは、粉末または凍結乾燥粉末として提供され得る。いくつかの態様において、組成物またはキットはさらに、例えば粉末化された両親媒性ペプチドの再構成のため、粒子集合体混合物の乳化のため、またはその両方のために、少なくとも1つの試薬を含み得る。いくつかの態様において、組成物またはキットはさらに、例えば別の容器で提供される、本明細書に記載されるリガンドを含み得る。いくつかの態様において、組成物またはキットはさらに、ペプチド粒子に被包される活性剤を含み得る。活性剤は、別の容器で提供され得る。

10

#### 【0237】

上記の要素に加えて、キットは、情報資料を含み得る。情報資料は、本明細書に記載される方法および／または本明細書に記載される方法における凝集体の使用に関する解説、指示、広告またはその他の資料であり得る。例えば、情報資料は、対象に粒子を投与する方法を解説するものである。キットはまた、送達装置を含み得る。

20

#### 【0238】

1つの態様において、情報資料は、製剤を適当な様式で、例えば、適当な用量、剤形または投与様式（例えば、本明細書に記載される用量、剤形または投与様式）で投与するための指示書を含み得る。別の態様において、情報資料は、適切な対象、例えばヒト、例えば成人を特定するための指示書を含み得る。キットの情報資料は、その形態に関して限定されない。多くの場合、情報資料、例えば、指示書は、印刷物、例えば、印刷された文書、図面および／または写真、例えば、ラベルまたは印刷シートとして提供される。しかし、情報資料はまた、他の形態、例えば、点字、コンピューター読み取り可能な資料、映像記録または音声記録で提供され得る。別の態様において、キットの情報資料は、キットの使用者がその製剤化および／または本明細書に記載される方法におけるその使用に関する十分な情報を入手することができるリンクまたは連絡先情報、例えば、現実の住所、電子メールのアドレス、ハイパーリンク、ウェブサイトまたは電話番号である。当然、情報資料はまた、任意の組み合わせ形態で提供され得る。

30

#### 【0239】

いくつかの態様において、製剤の個々の成分は、1つの容器で提供され得る。あるいは、製剤の成分を2つまたはそれ以上の容器で別々に、例えば、両親媒性ペプチド調製用の1つの容器および担体化合物用の少なくとも別の容器で提供することが望ましい場合がある。異なる成分は、例えばキットと共に提供される指示書に従い、組み合わされ得る。成分は、例えば薬学的組成物を調製し投与するために、本明細書に記載される方法に従い組み合わされ得る。

#### 【0240】

製剤に加えて、キットの組成物は、他の成分、例えば、溶媒もしくは緩衝液、安定剤もしくは保存剤、および／または本明細書に記載される状態もしくは障害を処置するための第2の剤を含み得る。あるいは、他の成分は、製剤とは異なる組成物または容器として、キットに含まれ得る。そのような態様において、キットは、製剤および他の成分を混合するため、またはオリゴヌクレオチドを他の成分と共に使用するための指示書を含み得る。

40

#### 【0241】

製剤は、任意の形態、例えば液体、乾燥または凍結乾燥形態で提供され得る。製剤が実質的に純粋および／または無菌であることが好ましい。製剤が液体溶液で提供される場合、その液体溶液は好ましくは水性溶液であり、滅菌水性溶液が好ましい。製剤が乾燥形態で提供される場合、再構成は通常、適当な溶媒の添加による。溶媒、例えば滅菌水または緩衝液は、必要に応じてキットに提供され得る。

50

## 【0242】

いくつかの態様において、キットは、製剤および情報資料のための別々の容器、仕切りまたは区画を含む。例えば、製剤は、ボトル、バイアルまたはシリンジに収納され得、そして情報資料は、プラスチックスリーブまたは小包に収納され得る。他の態様において、キットの別々の要素は、単一の、仕切りされていない容器に収納され得る。例えば、製剤は、ラベルの形態で情報資料が添付されたボトル、バイアルまたはシリンジに収納される。

## 【0243】

いくつかの態様において、キットは、各々が1つまたは複数の単位剤形の製剤を含む、複数の、例えば1パックの個々の容器を含む。例えば、キットは、各々が1回分の単位用量の製剤を含む、複数のシリンジ、アンプル、ホイル小包またはブリストーパックを含む。キットの容器は、気密性および/または防水性であり得る。

10

## 【0244】

本明細書に記載される様々な局面の態様は、以下の番号が付された項目によって例示することができる。

1. 疎水性ペプチジルセグメントと親水性ペプチジルセグメントとを含む両親媒性ペプチドを含み、かつ自身の外表面にリガンドをさらに含むペプチド粒子であって、

疎水性ペプチジルセグメントが $(Trp-Leu)_m-(Trp)_n$ または $(Leu-Trp)_p-(Leu)_q$ のアミノ酸配列を含み、各TrpがD-TrpまたはL-Trpであり、かつ各LeuがD-LeuまたはL-Leuであり、mおよびpが独立して1~5の整数であり、かつnおよびqが独立して0または1であるが、ただし、TrpがD-Trpの場合、LeuはL-Leuであり、かつTrpがL-Trpの場合、LeuはD-Leuであり、またはその逆も同様であり；かつ

20

親水性ペプチジルセグメントが $(Lys)_r$ のアミノ酸配列を含み、rが1~15の整数である、前記ペプチド粒子。

2. rが2~5の整数である、第1項記載のペプチド粒子。

3. rが3の整数である、第1または2項記載のペプチド粒子。

4. 親水性ペプチジルセグメントにおける少なくとも1つのLys残基または両親媒性ペプチドにおけるN末端アミノ基がアセチル化されている、第1~3項のいずれか一項記載のペプチド粒子。

20

5. 親水性ペプチジルセグメントのLys残基のすべてがアセチル化されている、第1~4項のいずれか一項記載のペプチド粒子。

30

6. 両親媒性ペプチドのN末端アミノ基がアセチル化されている、第1~5項のいずれか一項記載のペプチド粒子。

7. 疎水性ペプチジルセグメントが、親水性ペプチジルセグメントのC末端に連結されている、第1~6項のいずれか一項記載のペプチド粒子。

8. LeuがD-Leuである、第1~7項のいずれか一項記載のペプチド粒子。

9. TrpがL-Trpである、第1~8項のいずれか一項記載のペプチド粒子。

10. LysがL-Lysである、第1~9項のいずれか一項記載のペプチド粒子。

11. mまたはpが1~3の間である、第1~10項のいずれか一項記載のペプチド粒子。

40

12. mまたはpが3である、第1~11項のいずれか一項記載のペプチド粒子。

13. nまたはqが1である、第1~12項のいずれか一項記載のペプチド粒子。

14. 両親媒性ペプチドが

$(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-X$

のアミノ酸配列を含み、Xが存在しないかまたはNH<sub>2</sub>である、第1~13項のいずれか一項記載のペプチド粒子。

15. L-Lys残基の少なくとも1つがアセチル化されている、第14項記載のペプチド粒子。

16. 両親媒性ペプチドのN末端アミノ基がアセチル化されている、第14または15項記載のペプチド粒子。

17. 両親媒性ペプチドが、約5~約25アミノ酸残基の長さを有する、第1~16項のいずれか一項記載のペプチド粒子。

50

18. 両親媒性ペプチドにおける少なくとも1つの骨格アミド連結がアミド代替連結である、第1～17項のいずれか一項記載のペプチド粒子。
19. 両親媒性ペプチドが-L-アミノ酸、D-アミノ酸、またはそれらの組み合わせを含む、第1～18項のいずれか一項記載のペプチド粒子。
20. 疎水性ペプチジルセグメントまたは親水性ペプチジルセグメントのうち、少なくとも1つが、少なくとも1つの点変異を含む、第1～19項のいずれか一項記載のペプチド粒子。
21. リガンドが細胞表面受容体リガンドまたは抗体を含む、第1～20項のいずれか一項記載のペプチド粒子。
22. 細胞表面受容体リガンドが、トランスフェリン、EGF、フォレート、またはそれらの任意の組み合わせを含む、第21項記載のペプチド粒子。 10
23. ペプチド粒子の外表面に存在するリガンドの厚みが約1nm～約100nmの範囲である、第1～22項のいずれか一項記載のペプチド粒子。
24. ペプチド粒子の外表面に存在するリガンドの厚みが約10nmである、第23項記載のペプチド粒子。
25. リガンドが両親媒性ペプチドに共有結合により連結されている。第1～24項のいずれか一項記載のペプチド粒子。
26. リガンドが、両親媒性ペプチドの親水性ペプチジルセグメントに共有結合により連結されている、第1～25項のいずれか一項記載のペプチド粒子。
27. リガンド 対 両親媒性ペプチドの比が約1:10～約1:1,000,000の範囲である、第1～2 20 項のいずれか一項記載のペプチド粒子。
28. 約5nm～約5,000nmのサイズを有する、第1～27項のいずれか一項記載のペプチド粒子。
29. 約30nm～約150nmのサイズを有する、第28項記載のペプチド粒子。
30. 第1～29項のいずれか一項記載の完全にアセチル化された両親媒性ペプチドと、第1～29項のいずれか一項記載の部分的にアセチル化された両親媒性ペプチドとの混合物を含む、第1～29項のいずれか一項記載のペプチド粒子。
31. 完全にアセチル化された両親媒性ペプチド 対 部分的にアセチル化された両親媒性ペプチドの比が約95:5～約1:1の範囲である、第30項記載のペプチド粒子。 30
32. アセチル化されていない両親媒性ペプチドをさらに含む、第30～31項のいずれか一項記載のペプチド粒子。
33. 活性剤をさらに含む、第1～32項のいずれか一項記載のペプチド粒子。
34. 活性剤が粒子内に分散されている、第33項記載のペプチド粒子。
35. 活性剤が正味電荷を有さない、第33～34項のいずれか一項記載のペプチド粒子。
36. 活性剤が正味電荷を有する、第33～34項のいずれか一項記載のペプチド粒子。
37. 活性剤が、タンパク質、ペプチド、抗原、抗体またはその一部分、抗体様分子、酵素、核酸、アブタマー、低分子、抗生物質、薬学的に活性な剤、治療剤、造影剤、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、第33～36項のいずれか一項記載のペプチド粒子。
38. 活性剤が薬学的に活性な剤または治療剤である、第33～37項のいずれか一項記載のペプチド粒子。 40
39. 活性剤が核酸分子である、第33～38項のいずれか一項記載のペプチド粒子。
40. 核酸分子が、siRNA、miRNA、shRNA、またはそれらの任意の組み合わせを含む、第39項記載のペプチド粒子。
41. 核酸分子がDNAである、第39項記載のペプチド粒子。
42. 活性剤 対 両親媒性ペプチドの比が約1:1～約1:10,000の範囲である、第33～41項のいずれか一項記載のペプチド粒子。
43. 活性剤 対 両親媒性ペプチドの比が約1:1～約1:100または約1:1～約1:10の範囲である、第42項記載のペプチド粒子。
44. 活性剤の標的指向性送達のための、第33～43項のいずれか一項記載のペプチド粒子 50

の使用。

45. 活性剤が、単独で細胞に送達されるときには細胞不透過性である、第44項記載の使用。

46. 細胞透過剤またはトランスフェクト剤として正に荷電した両親媒性ペプチドを含む組成物の使用であって、

正に荷電した両親媒性ペプチドが、疎水性ペプチジルセグメントと親水性ペプチジルセグメントとを含み、

疎水性ペプチジルセグメントが $(Trp-Leu)_m-(Trp)_n$ または $(Leu-Trp)_p-(Leu)_q$ のアミノ酸配列を含み、各TrpがD-TrpまたはL-Trpであり、かつ各LeuがD-LeuまたはL-Leuであり、mおよびpが独立して1～5の整数であり、かつnおよびqが独立して0または1であるが、ただし、TrpがD-Trpの場合、LeuはL-Leuであり、かつTrpがL-Trpの場合、LeuはD-Leuであり、またはその逆も同様であり；

親水性ペプチジルセグメントが $(Lys)_r$ のアミノ酸配列を含み、rが1～15の整数であり；かつ

Lys残基の少なくとも1つまたは両親媒性ペプチドのN末端アミノ基がアセチル化されていない、

前記使用。

47. Lys残基のすべておよび両親媒性ペプチドのN末端アミノ基がアセチル化されていない、第46項記載の使用。

48. rが2～5の整数である、第46または47項記載の使用。

49. rが3の整数である、第46～48項のいずれか一項記載の使用。

50. 疎水性ペプチジルセグメントが、親水性ペプチジルセグメントのC末端に連結されている、第46～49項のいずれか一項記載の使用。

51. LeuがD-Leuである、第46～50項のいずれか一項記載の使用。

52. TrpがL-Trpである、第46～51項のいずれか一項記載の使用。

53. LysがL-Lysである、第46～52項のいずれか一項記載の使用。

54. mまたはpが1～3の間である、第46～53項のいずれか一項記載の使用。

55. mまたはpが3である、第46～54項のいずれか一項記載の使用。

56. nまたはqが1である、第46～55項のいずれか一項記載の使用。

57. 両親媒性ペプチドが、約5～約25アミノ酸残基の長さを有する、第46～56項のいずれか一項記載の使用。

58. 両親媒性ペプチドにおける少なくとも1つの骨格アミド連結がアミド代替連結である、第46～57項のいずれか一項記載の使用。

59. 両親媒性ペプチドが -アミノ酸、-アミノ酸、またはそれらの組み合わせを含む、第46～58項のいずれか一項記載の使用。

60. 疎水性ペプチジルセグメントまたは親水性ペプチジルセグメントのうち、少なくとも1つが、少なくとも1つの点変異を含む、第46～59項のいずれか一項記載の使用。

61. 粒子が約5nm～約5,000nmのサイズを有する、第46～60項のいずれか一項記載の使用。

62. 粒子が約30nm～約150nmのサイズを有する、第61項記載の使用。

63. 両親媒性ペプチドが

$(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-X$  のアミノ酸配列を含み、Xが存在しないかまたはNH<sub>2</sub>である、第46～62項のいずれか一項記載の使用。

64. 組成物が、細胞内へと送達される核酸分子をさらに含む、第46～63項のいずれか一項記載の使用。

65. 第1の両親媒性ペプチドと第2の両親媒性ペプチドとを含むペプチド粒子であって、

第1および第2の両親媒性ペプチドが、各々独立して疎水性ペプチジルセグメントと親水性ペプチジルセグメントとを含み、

疎水性ペプチジルセグメントが $(Trp-Leu)_m-(Trp)_n$ または $(Leu-Trp)_p-(Leu)_q$ のアミノ酸

10

20

30

40

50

配列を含み、各TrpがD-TrpまたはL-Trpであり、かつ各LeuがD-LeuまたはL-Leuであり、mおよびpが独立して1～5の整数であり、かつnおよびqが独立して0または1であるが、ただし、TrpがD-Trpの場合、LeuはL-Leuであり、かつTrpがL-Trpの場合、LeuはD-Leuであり、またはその逆も同様であり；かつ

親水性ペプチジルセグメントが(Lys)<sub>r</sub>のアミノ酸配列を含み、rが1～15の整数であり、かつ

第1の両親媒性ペプチドのLys残基のすべておよびN末端アミノ基がアセチル化されており；かつ

第2の両親媒性ペプチドの少なくともN末端アミノ基または1つのLys残基がアセチル化されていない、10

前記ペプチド粒子。

66. 第2の両親媒性ペプチドのN末端アミノ基およびLys残基がいずれもアセチル化されていない、第65項記載のペプチド粒子。

67. 活性剤をさらに含む、第65または66項記載のペプチド粒子。

68. 活性剤が核酸分子を含む、第67項記載のペプチド粒子。

69. 活性剤 対 第2の両親媒性ペプチドの比が約1:1000～1:1または約1:100～約1:10の範囲である、第65～68項のいずれか一項記載のペプチド粒子。

70. 活性剤 対 第2の両親媒性ペプチドの比が約1:10～約1:2の範囲である、第69項記載のペプチド粒子。

71. 第1の両親媒性ペプチド 対 第2の両親媒性ペプチドの比が約1:1～約1000:1または約5:1～約100:1の範囲である、第65～70項のいずれか一項記載のペプチド粒子。20

72. 自身の外表面にリガンドをさらに含む、第65～71項のいずれか一項記載のペプチド粒子。

73. リガンドが細胞表面受容体リガンドまたは抗体を含む、第72項記載のペプチド粒子。

。

74. 細胞表面受容体リガンドが、トランスフェリン、EGF、フォレート、またはそれらの任意の組み合わせを含む、第73項記載のペプチド粒子。

75. ペプチド粒子の外表面に存在するリガンドの厚みが約1nm～約100nmの範囲である、第65～74項のいずれか一項記載のペプチド粒子。

76. ペプチド粒子の外表面に存在するリガンドの厚みが約10nmである、第75項記載のペプチド粒子。30

77. リガンドが、第1および第2の両親媒性ペプチドの少なくとも1つに共有結合により連結されている、第65～76項のいずれか一項記載のペプチド粒子。

78. リガンドが、第1および第2の両親媒性ペプチドの少なくとも1つにおける親水性ペプチジルセグメントに共有結合により連結されている、第65～77項のいずれか一項記載のペプチド粒子。

79. リガンド 対 両親媒性ペプチドの比が約1:10～約1:1,000,000の範囲である、第65～78項のいずれか一項記載のペプチド粒子。

80. rが2～5の整数である、第65～79項のいずれか一項記載のペプチド粒子。

81. rが3の整数である、第65～80項のいずれか一項記載のペプチド粒子。40

82. 疎水性ペプチジルセグメントが、親水性ペプチジルセグメントのC末端に連結されている、第65～81項のいずれか一項記載のペプチド粒子。

83. LeuがD-Leuである、第65～82項のいずれか一項記載のペプチド粒子。

84. TrpがL-Trpである、第65～83項のいずれか一項記載のペプチド粒子。

85. LysがL-Lysである、第65～84項のいずれか一項記載のペプチド粒子。

86. mまたはpが1～3の間である、第65～85項のいずれか一項記載のペプチド粒子。

87. mまたはpが3である、第65～86項のいずれか一項記載のペプチド粒子。

88. nまたはqが1である、第65～87項のいずれか一項記載のペプチド粒子。

89. 第1および第2の両親媒性ペプチドが、各々独立して約5～約25アミノ酸残基の長さを有する、第65～88項のいずれか一項記載のペプチド粒子。50

90. 第1または第2の両親媒性ペプチドにおける少なくとも1つの骨格アミド連結がアミド代替連結である、第65～89項のいずれか一項記載のペプチド粒子。
91. 第1および第2の両親媒性ペプチドの少なくとも1つが-D-アミノ酸、-L-アミノ酸、またはそれらの組み合わせを含む、第65～90項のいずれか一項記載のペプチド粒子。
92. 疎水性ペプチジルセグメントまたは親水性ペプチジルセグメントのうち、少なくとも1つが、少なくとも1つの点変異を含む、第65～91項のいずれか一項記載のペプチド粒子。
93. 約5nm～約5,000nmのサイズを有する、第65～92項のいずれか一項記載のペプチド粒子。
94. 約30nm～約150nmのサイズを有する、第93項記載のペプチド粒子。 10
95. 第1および第2の両親媒性ペプチドが、各自独立して  
(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-X  
のアミノ酸配列を含み、Xが存在しないかまたはNH<sub>2</sub>である、第65～94項のいずれか一項記載のペプチド粒子。
96. 核酸分子を細胞に送達するための、第65～95項のいずれか一項記載のペプチド粒子の使用。
97. 核酸分子が、siRNA、miRNA、shRNA、またはそれらの任意の組み合わせを含む、第96項記載の使用。
98. 核酸分子がDNAを含む、第96項記載の使用。
99. 疎水性ペプチジルセグメントと親水性ペプチジルセグメントとを含む両親媒性ペプチドであって、 20  
疏水性ペプチジルセグメントが、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン(Leu)、フェニルアラニン、チロシンまたはトリプトファン(Trp)から選択される2～10個の交互に並ぶD-およびL-アミノ酸の配列を含み、  
親水性ペプチジルセグメントが、荷電アミノ酸もしくは非荷電であるが極性のアミノ酸またはそれらの誘導体を含む、  
前記両親媒性ペプチド。
100. 疎水性ペプチジルセグメントが(Trp-Leu)<sub>m</sub>-(Trp)<sub>n</sub>または(Leu-Trp)<sub>p</sub>-(Leu)<sub>q</sub>のアミノ酸配列を含み、各TrpがD-TrpまたはL-Trpであり、かつ各LeuがD-LeuまたはL-Leuであり、mおよびpが独立して1～20の整数であり、かつnおよびqが独立して0または1であるが、ただし、TrpがD-Trpの場合、LeuはL-Leuであり、かつTrpがL-Trpの場合、LeuはD-Leuであり、またはその逆も同様である、第99項記載の両親媒性ペプチド。 30
101. 親水性ペプチジルセグメントが、N末端かまたはアミノ酸残基かのいずれかに存在する少なくとも1つの電荷を含む、第99または100項記載の両親媒性ペプチド。
102. 少なくとも1つの電荷がカチオン電荷またはアニオン電荷のいずれかである、第101項記載の両親媒性ペプチド。
103. 親水性ペプチジルセグメントが、非荷電であるが極性のアミノ酸を含む、第99または100項記載の両親媒性ペプチド。
104. 親水性ペプチジルセグメントが、少なくとも1つの電荷と、少なくとも1つの非荷電であるが極性のアミノ酸とを含む、第99～103項のいずれか一項記載の両親媒性ペプチド。 40
105. ポリマーが疎水性ペプチジルセグメントに共有結合により連結されている、第99～104項のいずれか一項記載の両親媒性ペプチド。
106. 両親媒性ペプチドにおける少なくとも1つのアミノ基がアセチル化されている、第99～105項のいずれか一項記載の両親媒性ペプチド。
107. 少なくとも1つのカチオン電荷が、Lys、Arg、His、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるアミノ酸残基に存在する、第102項記載の両親媒性ペプチド。
108. 少なくとも1つのアニオン電荷が、AspまたはGlu、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるアミノ酸残基に存在する、第102項記載の両親媒性ペプチド 50

。

109. 少なくとも1つの非荷電であるが極性のアミノ酸残基が、Ser、Thr、AsnまたはGln、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、第103項記載の両親媒性ペプチド。

110. ポリマーが、PEG、PGG、PEO、ポリカプロラクトン、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリヒドロキシアルカノエート、デキストラン、ポリ無水物、PLA-PGA、ポリオルトエステル、ポリフマレート、ヒドロゲル、任意の当技術分野で知られている生体適合性および／または生分解性ポリマー、ならびにそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、第105項記載の両親媒性ペプチド。

111. 親水性ペプチジルセグメントが(Lys)<sub>r</sub>のアミノ酸配列を含み、rが1～15の整数である、第99～110項のいずれか一項記載の両親媒性ペプチド。 10

112. rが3である、第111項記載の両親媒性ペプチド。

113. 前記少なくとも1つのアミノ基が、両親媒性ペプチドのN末端アミノ基である、第99～112項のいずれか一項記載の両親媒性ペプチド。

114. 前記少なくとも1つのアミノ基が、親水性ペプチジルセグメントのLys残基に存在する、第99～113項のいずれか一項記載の両親媒性ペプチド。

115. 親水性ペプチジルセグメントのアミノ基のすべてがアセチル化されている、第99～114項のいずれか一項記載の両親媒性ペプチド。

116. 両親媒性ペプチドのN末端アミノ基と親水性ペプチジルセグメントのアミノ基の少なくとも1つがアセチル化されている、第99～115項のいずれか一項記載の両親媒性ペプチド。 20

117. 両親媒性ペプチドのN末端アミノ基と親水性ペプチジルセグメントのアミノ基のすべてとがアセチル化されている、第99～116項のいずれか一項記載の両親媒性ペプチド。

118. 疎水性ペプチジルセグメントが、親水性ペプチジルセグメントのC末端に連結されている、第99～117項のいずれか一項記載の両親媒性ペプチド。

119. LeuがD-Leuである、第99～118項のいずれか一項記載の両親媒性ペプチド。

120. TrpがL-Trpである、第99～119項のいずれか一項記載の両親媒性ペプチド。

121. LysがL-Lysである、第99～120項のいずれか一項記載の両親媒性ペプチド。

122. mまたはpが1～3の間である、第99～121項のいずれか一項記載の両親媒性ペプチド。 30

。

123. mまたはpが3である、第122項記載の両親媒性ペプチド。

124. nまたはqが1である、第99～123項のいずれか一項記載の両親媒性ペプチド。

125.

(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)のアミノ酸配列を含み、L-Lys残基の少なくとも1つがアセチル化されている、第99～124項のいずれか一項記載の両親媒性ペプチド。

126.

Ac-(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)のアミノ酸配列を含む、第99～125項のいずれか一項記載の両親媒性ペプチド。

127. L-Lys残基の少なくとも1つがアセチル化されている、第126項記載の両親媒性ペプチド。 40

128.

Ac-(L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-(L-

Lys(Ac))-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-X

のアミノ酸配列を含み、Xが存在しないかまたはNH<sub>2</sub>である、第99～127項のいずれか一項記載の両親媒性ペプチド。

129. 約5～約25アミノ酸残基の長さを有する、第99～128項のいずれか一項記載の両親媒性ペプチド。

130. 少なくとも1つの骨格アミド連結がアミド代替連結である、第99～129項のいずれか 50

一項記載の両親媒性ペプチド。

131. 少なくとも1つの<sup>-</sup>アミノ酸、<sup>-</sup>アミノ酸、またはそれらの任意の組み合わせを含む、第99～130項のいずれか一項記載の両親媒性ペプチド。

132. 疎水性ペプチジルセグメントまたは親水性ペプチジルセグメントのうち、少なくとも1つが、少なくとも1つの点変異を含む、第99～131項のいずれか一項記載の両親媒性ペプチド。

133. 1つまたは複数の第99～132項のいずれか一項記載の両親媒性ペプチドを含む、粒子。

134. リガンドをさらに含む、第133項記載の粒子。

135. リガンドが細胞表面受容体リガンドまたは抗体である、第133または134項記載の粒子。  
10

136. 細胞表面受容体リガンドが、トランスフェリンまたはEGFまたはフォレートである、第135項記載の粒子。

137. 粒子の外表面にリガンドが存在する、第133～136項のいずれか一項記載の粒子。

138. 粒子の外表面にリガンドが吸着されている、第133～137項のいずれか一項記載の粒子。

139. 粒子の外表面に存在するリガンドの厚みが約1nm～約100nmの範囲である、第137または138項記載の粒子。

140. 粒子の外表面に存在するリガンドの厚みが約10nmである、第139項記載の粒子。

141. リガンドが両親媒性ペプチドに共有結合により連結されている、第133～140項のいずれか一項記載の粒子。  
20

142. リガンドが、両親媒性ペプチドの親水性ペプチジルセグメントに共有結合により連結されている、第133～141項のいずれか一項記載の粒子。

143. 活性剤をさらに含む、第133～142項のいずれか一項記載の粒子。

144. 活性剤が粒子内に分散されている、第143項記載の粒子。

145. 活性剤が正味電荷を有さない、第143～144項のいずれか一項記載の粒子。

146. 活性剤が正味電荷を有する、第143～144項のいずれか一項記載の粒子。

147. 活性剤が少なくとも1つの芳香族基を含む、第143～146項のいずれか一項記載の粒子。

148. 活性剤が、タンパク質、ペプチド、抗原、抗体またはその一部分、抗体様分子、酵素、核酸、アブタマー、低分子、抗生物質、薬学的に活性な剤、治療剤、造影剤、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、第143～147項のいずれか一項記載の粒子。  
30

149. 活性剤が薬学的に活性な剤である、第143～148項のいずれか一項記載の粒子。

150. 活性剤が核酸分子である、第143～149項のいずれか一項記載の粒子。

151. 核酸分子が、siRNA、miRNA、またはshRNAである、第150項記載の粒子。

152. 核酸分子がDNAである、第150項記載の粒子。

153. 活性剤 対 両親媒性ペプチドの比が1:1～1:100,000の範囲である、第143～152項のいずれか一項記載の粒子。

154. 活性剤 対 両親媒性ペプチドの比が1:1～約1:1,000の範囲である、第153項記載の粒子。  
40

155. リガンド 対 両親媒性ペプチドの比が約1:10～約1:1,000,000の範囲である、第134～154項のいずれか一項記載の粒子。

156. 約5nm～約5,000nmのサイズを有する、第133～155項のいずれか一項記載の粒子。

157. 約30nm～約150nmのサイズを有する、第156項記載の粒子。

158. 第99～132項のいずれか一項記載の完全にアセチル化された両親媒性ペプチドと、第99～132項のいずれか一項記載の部分的にアセチル化された両親媒性ペプチドとの混合物を含む、第133～157項のいずれか一項記載の粒子。

159. 完全にアセチル化された両親媒性ペプチド 対 部分的にアセチル化された両親媒性ペプチドの比が約95:5～約1:1の範囲である、第158項記載の粒子。  
50

160. アセチル化されていない両親媒性ペプチドをさらに含む、第133～159項のいずれか一項記載の粒子。

161. 両親媒性ペプチド化合物を送達システムとして使用する方法。

162. 送達システムが標的指向性送達システムである、第161項記載の方法。

163. 送達システムが治療目的または診断目的のものである、第161または162項記載の方法。

164. 細胞透過ペプチドまたはトランスフェクト剤のそれぞれとしてのペプチド組成物の使用。

#### 【0245】

##### いくつかの選択された定義

10

そうでないことが示されていない限り、またはそれが文脈から暗示されていない限り、以下の用語およびフレーズは以下に提供される意味を含んでいる。そうでないことが明示的に示されていない限り、またはそれが文脈から明白でない限り、以下の用語およびフレーズは、その用語またはフレーズがそれらの属する技術分野において獲得している意味を排除しない。これらの定義は、本明細書に記載される局面の個々の態様の説明を補助するために提供されるものであり、特許請求の範囲に記載の発明を限定することは意図されておらず、本発明の範囲は特許請求の範囲によってのみ限定される。さらに、そうでないことが文脈によって必要とされない限り、単数形の用語はその複数形を包含し、複数形の用語はその单数形を包含している。

#### 【0246】

20

本明細書で使用される場合、「含む (comprising)」または「含む (comprise)」という用語は、その発明に必須となる組成物、方法およびそれらの各成分を参照する際に使用されるが、特定されていない要素についても、それが必須であるかそうでないかによらず、含む余地を残している。加えて、「含む」という用語は、「から本質的になる」および「からなる」を包含する。

#### 【0247】

本明細書で使用される場合、「から本質的になる」という用語は、所定の態様に必要とされる要素を表す。この用語は、その発明のその態様の基本的かつ新規のまたは機能的な特徴に実質的に影響を与えない追加の要素の存在を許容する。

#### 【0248】

30

「からなる」という用語は、本明細書に記載される組成物、方法および各成分を表し、その態様の説明の中で言及されていないあらゆる要素に対して排他的である。

#### 【0249】

実施例を実行する以外では、またはそうでないことが示されていない場合、本明細書で使用される成分の量または反応条件を表すすべての数値は、すべての場合において、「約」という用語によって修飾されるべきことを理解されたい。「約」という用語は、百分率に関連して使用される場合、±1%を意味し得る。

#### 【0250】

単数形の用語「1つの (a)」、「1つの (an)」および「その (the)」は、文脈が明らかにそうでないことを示していない限り、複数の参照を包含する。同様に、「または」という单語は、文脈が明らかにそうでないことを示していない限り、「および」を包含することが意図されている。

40

#### 【0251】

この開示の実施または試験においては、本明細書に記載されているのと同様または同等の方法および材料を使用することができるが、以下には適当な方法および材料が記載されている。「含む」という用語は、「包含する (include)」を意味する。「例えば (e.g.)」という略語は、ラテン語の *exempli gratia* を語源とするものであり、本明細書においては非限定的な例を示すのに使用される。したがって、「例えば (e.g.)」という略語は、「例えば (for example)」という用語の同義語である。

#### 【0252】

50

「統計的に有意」または「有意」という用語は、統計的有意性を表し、概して参照レベルを2標準偏差(2SD)上回るまたは下回ることを意味する。この用語は、そこに差が存在することの統計的証拠を表す。これは、帰無仮説が実際に真であったときにその帰無仮説を却下する決定が為される蓋然性と定義される。この決定はしばしば、p値を用いて行われる。

## 【0253】

「ナノスフェア」という用語は、最大3:1のアスペクト比を有する粒子を意味する。「アスペクト比」という用語は、目的物の最長の軸 対 目的物の最短の軸の比を意味し、ここでこれらの軸は直交している必要はない。

## 【0254】

粒子の「最長寸法」という用語は、粒子の最長の直線路(direct path)を意味する。「直線路」という用語は、粒子の表面上の2点間の、粒子内に含まれる最短の経路を意味する。例えば、らせん状の粒子は、それをまっすぐな線状に延ばしたときにそのらせんの長さに対応する最長寸法を有すると考えられる。

## 【0255】

「ナノロッド体」という用語は、最大200nmの最長寸法を有しあつ3:1~20:1のアスペクト比を有する粒子を意味する。

## 【0256】

「ナノプリズム体」という用語は、共通の辺によって接続された少なくとも2つ平行でない面を有する粒子を表す。

## 【0257】

粒子の「長さ」は、その粒子の最長寸法を意味する。

## 【0258】

粒子の「幅」は、その粒子の幅の平均を意味し；粒子の「直径」は、その粒子の直径の平均を意味する。

## 【0259】

複数の粒子の「平均」寸法は、複数存在するその寸法の平均を意味する。例えば、複数個のナノスフェアの「平均直径」は、それら複数個のナノスフェアの直径(ここで、1個のナノスフェアの直径はそのナノスフェアの複数の直径の平均である)の平均を意味する。

## 【0260】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される塩」という用語は、化合物の従来的な非毒性の塩または第4級アンモニウム塩、例えば、非毒性の有機または無機酸由来の塩を表す。これらの塩は、インサイチューで、投与ビヒクルまたは剤形製造プロセスの中で、または、その遊離塩基もしくは酸形態の精製された化合物を適当な有機もしくは無機酸もしくは塩基と別途反応させ、それによって形成される塩をその後の精製の間に単離することによって、調製され得る。従来的な非毒性の塩は、硫酸、スルファミン酸、リン酸、硝酸等の無機酸から得られるもの；および酢酸、プロピオン酸、コハク酸、グリコール酸、ステアリン酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、アスコルビン酸、パルミチン酸、マレイン酸、ヒドロキシマレイン酸、フェニル酢酸、グルタミン酸、安息香酸、サリチル酸(salicylic)、スルファニル酸、2-アセトキシ安息香酸、フマル酸、トルエンスルホン酸、メタンスルホン酸、エタンジスルホン酸、シュウ酸、イソチオノン酸等の有機酸から調製される塩を含む。例えば、その内容の全体が参照により本明細書に組み入れられる、Berge et al., "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66: 1-19 (1977)を参照のこと。

## 【0261】

本明細書に記載される局面のいくつかの態様において、代表的な塩は、臭化水素酸塩、塩酸塩、硫酸塩、重硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩、酢酸塩、コハク酸塩、吉草酸塩、オレイン酸塩、パルミチン酸塩、ステアリン酸塩、ラウリン酸塩、安息香酸塩、乳酸塩、リン酸塩、トシリル酸塩、クエン酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、ナフ

10

20

30

40

50

タレート (naphylate)、メシリ酸塩、グルコヘプトン酸塩、ラクトビオン酸塩およびラウリル硫酸塩等を含む。

#### 【0262】

本明細書で使用される場合、比は、モル比 (mole ratio) または重量比またはモル比 (molar ratio) であり得る。

#### 【0263】

本明細書で使用される場合、「細胞透過ペプチド (cell penetration peptide)」または「細胞透過程ペプチド (cell penetrating peptide)」は、膜透過性を有し生体膜または生理学的障壁を通過することができるペプチドと定義される。細胞透過ペプチド (CPP) はまた、細胞透過性ペプチド、タンパク質形質導入ドメイン (PTD) または膜移行配列 (MTS) とも呼ばれる。CPPは、インビトロおよび / またはインビボで哺乳動物細胞膜を移行して細胞内に進入する能力を有し、コンジュゲートさせた関心対照の化合物、例えば薬物またはマーカーを、所望の細胞内目的地、例えば、細胞質 (細胞質ゾル、小胞体、ゴルジ体等) または核内に移動させる。したがって、CPPは、リン脂質、ミトコンドリア、エンドソームまたは核膜を越える関心対照の化合物の透過を実現または促進し得る。CPPはまた、関心対照の化合物を細胞外から細胞膜を通じて細胞質内または細胞内の所望の場所、例えば、核、リボソーム、ミトコンドリア、小胞体、リソソームまたはペルオキシソームに移動させることができる。代わりにまたは加えて、CPPは、関心対照の化合物を、血液-脳、経粘膜、血液網膜、皮膚、胃腸および / または肺障壁を越えて移動させることができる。

10

20

30

#### 【0264】

生体膜または生理学的障壁を越える透過は、様々なプロセスによって、例えば、マーカーとコンジュゲートさせたCPPを培養細胞の存在下で最初にインキュベートする工程を有し、固定する工程、およびその後に細胞内におけるマークされたペプチドの存在の顕在化が続く細胞透過試験によって、決定することができる。別の態様において、顕在化工程は、CPPに対する標識抗体の存在下でのCPPのインキュベートと、その後に続く、細胞質におけるもしくは細胞核の近隣部におけるまたはその内部における、CPPのアミノ酸配列と標識抗体との間の免疫学的反応の検出とによって、行われ得る。顕在化はまた、CPP内のアミノ酸配列をマークし、細胞区画におけるそのマークの存在を検出することによっても行われ得る。細胞透過試験は当業者に周知である。しかし、例えば、細胞透過試験は、上記の特許出願第W097/02840号に記載されている。

#### 【0265】

本明細書で使用される場合、「トランスフェクト剤」または「トランスフェクト試薬」という用語は、化合物に結合または化合物と複合化し、その細胞侵入を亢進させる化合物を表す。通常、トランスフェクト剤という用語は、細胞内への核酸の送達を亢進させる化合物に対して使用される。

30

#### 【0266】

本明細書で説明され例示されている様々な態様の任意の1つは、ここまでに示されなかった範囲にまでさらに改変されて、本明細書に開示される他の態様のいずれかに示された特徴を組み入れることができることが当業者に理解されるであろう。

40

#### 【0267】

以下の実施例は、本発明のいくつかの態様および局面を例示するものである。関連分野の当業者には、本発明の精神または範囲を変更することなく様々な改変、付加、置換等を行うことができること、およびそのような改変物および派生物は添付の特許請求の範囲で定義される本発明の範囲に包含されることが、理解されるであろう。以下の実施例は、いかなる面においても、本発明を限定するものではない。

#### 【実施例】

#### 【0268】

例示的な材料および方法（実施例1～2について）

例示的な材料：ローズベンガル (RB) (Aldrich 330000, 95%) および5-カルボキシ-フ

50

ルオレセイン (CF) (Sigma-Aldrich C0537, 99%) を含むすべての化合物および試薬は、Sigma-Aldrichから入手し、そしてそうでないことが以下に記述されていない限り、さらなる精製を行うことなく使用した。Fmoc保護アミノ酸およびカップリング試薬は、IRIS BiotechおよびNovabiochemから購入した。24ウェル結晶化プレートはHampton Researchから購入した (Cryschem Plate)。

## 【0269】

ペプチドの合成：すべてのペプチドを、Fmoc保護基化学を用いて固相上で合成した。合成の個々の工程は表1に列挙されている。Rink Amide AM樹脂 (200mg、充填量 : 0.4 mmol/g ~ 0.8 mmol/g) を、10mLシリングにおいて、固相として使用した。すべての反応を、遊離アミンの量を減らすために事前に酸化アルミニウムで処置したジメチルホルムアミド (DMF) 中で行った。合成の前に、Fmocアミノ酸をDMF (0.5M) に溶解させた。Fmoc保護基を、各カップリング工程につき2回、DMF中ピペリジン (40%) を用いて除去した。1H-ベンゾトリアゾリウム 1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-5クロロ-,ヘキサフルオロホスフェート(1-)、3-オキシド (HCTU) をカップリング剤として使用し、1-メチル-2-ピロリジノン (NMP) に溶解させたN,N-ジイソプロピルエチルアミン (DIPEA) を塩基として使用した。すべてのカップリングを、樹脂の充填容量に対して4等量 (eq) のアミノ酸、HCTU (4eq) およびDIPEA (12eq) を用いて行った。各カップリング工程の後に、未反応の末端アミノ基を、無水酢酸 (5eq) およびDMF中DIPEA (5eq) の溶液を用いたアセチル化によってキャップした。

## 【0270】

(表1) バッチFmoc固相ペプチド合成の自動化された工程

[工程]	溶媒/試薬	反復回数	時間 (分)	説明
1	40 %ピペリジン/DMF	1	5	Fmoc 脱保護
2	40 %ピペリジン/DMF	1	10	Fmoc 脱保護
3	DMF	5	1	洗浄
4	4 eq Fmoc保護アミノ酸, 4 eq HCTU, 12 eq DIPEA	1	60	カップリング <sup>(a)</sup>
5	DMF	2	1	洗浄
6	5 eq無水酢酸, 5 eq DIPEA	1	20	末端キャッピング <sup>(b)</sup>
7	DMF	3	1	洗浄

<sup>(a)</sup> DMF Alox/NMP中 ; <sup>(b)</sup> DMF Alox中 ; DMF Aloxは事前に酸化アルミニウムで処置されたDMFである。

## 【0271】

同じプロトコルをRink Amide AM樹脂 (5g) を用いるスケールアップ合成に適用し、反応を500mLの固相ガラスリアクタにおいて3eqのアミノ酸およびカップリング試薬を用いて行った。pHは、反応を通して9で一定に維持し、そして各カップリングおよび切断工程の後にカイザー試験およびトリニトロベンゼンスルホネート試験 (TNBS) を用いて樹脂を遊離アミノ基について調査した。共溶媒としてのNMPは必要なかった。

## 【0272】

全体収率は、概して、固相ペプチド合成に典型的な、約95%の純度で10%~15%の範囲である。

## 【0273】

10

20

30

40

50

合成の後、ペプチド樹脂を、DMF、イソプロピルアルコール、DMF、ジクロロメタンおよびジエチルエーテルで洗浄し、その後にこれを真空ラインで一晩乾燥させた。樹脂からのペプチドの切断および保護基の除去は、冷TFA(95%)、トリメチルシラン(2.5%)およびH<sub>2</sub>O(2.5%)を用いて行った。氷冷した切断混合物を樹脂に添加し、室温で2時間～3時間インキュベートした。ろ過した切断カクテルを冷ジイソプロピルエーテル(40mL)中で沈降させ、洗浄した。白色の固体物を真空ラインで一晩乾燥させた。

#### 【0274】

ペプチドの精製：すべてのペプチドを、Shimadzu Prominence HPLCにおいて、表2に列挙されるパラメータを用いて精製した。粗ペプチドを粉碎し、DMFおよびアセトニトリルの混合物(4mL、1:1)に溶解させ、H<sub>2</sub>O(0.1% TFA)で希釈して、20mLの最終容積にした。粗生成物のゲル化はこれらの溶媒条件下では排除される。その後、サンプルを、0.45μmのPTFEシリングフィルターを通してろ過し、4mL/分の流速でMerck LiChrospher 100、RP-18eカラム(5μm、250-10)に送り、アセトニトリル(MeCN)に対する水(0.1% TFA)の直線勾配により溶出させた。サンプルの溶出に続いて280nmでの吸光度測定を行い、5mLの固定画分容積に従い回収した。ペプチド生成物の存在を、質量分析により定性し(図1A)、分析用HPLCを実施して定量した(図1B)。80%超の生成物を含む画分(A<sub>280</sub>)を、水相に酢酸(2%)を使用して実施した同じクロマトグラフィー材料による2回目の精製工程に適用した。95%超の生成物を含む画分をまとめ、アンモニアで中和し、そして凍結乾燥させた。

#### 【0275】

(表2) HPLC精製のパラメータ

特徴	分取用	分析用
溶媒A	再蒸留H <sub>2</sub> O、0.1% TFAまたは2% AcOH	再蒸留H <sub>2</sub> O、0.1% TFA
溶媒B	MeCN	MeCN
カラム	LiChrospher 100、RP-18e(5μm), 250-10	LiChrospher 100、RP-18e(5μm), 250-4.6
勾配	5%B → 95%B、120分	20%B → 70%B、30分
注入	必要に応じて	25 μL
容積		
流速	5 mL/分	1.5 mL/分
検出	A <sub>280</sub>	A <sub>280</sub>
分画	λ > 500 mAU	-
画分サイズ	5 mL	-

#### 【0276】

精製後の修飾：N末端およびリジンの第1級アミンのアセチル化は、DMF中に溶解させた精製ペプチドに40倍過剰の無水酢酸およびDIPEAを適用することによって行った。反応混合物を前記の手順に従い再精製する前に、質量分析によって反応の完遂を管理した。

#### 【0277】

ビーズの形成および共集合：CD3acおよびローズベンガル(RB)を1:1比のH<sub>2</sub>O:EtOHに溶解させ、最終RB濃度が61.5 × 10<sup>-6</sup> M、184.5 × 10<sup>-6</sup> M、307.5 × 10<sup>-6</sup> M、615 × 10<sup>-6</sup> Mおよび922.5 × 10<sup>-6</sup> Mとなるよう混合した。CD3acの濃度は、615 × 10<sup>-6</sup> Mで一定に維持した。H<sub>2</sub>Oへの溶媒交換を、24ウェルシッティングドロップ(sitting drop)結晶化プレートにおけるカウンターエバポレートにより行い；CD3acおよびRBの事前混合液50 μLをシッティングドロップウェルに適用し、16時間の間、1mLのH<sub>2</sub>Oに対して4回カウンターエバ

10

20

30

40

50

ポレートを行った。すべての実験を3連で行った。CD3acスフェアは約30分後に沈降し、その後5時間の間沈殿した。

#### 【0278】

被包されたRBの量を定量するために、ビーズのペレットを溶媒の平衡化の後に再懸濁し、 $100\text{ }\mu\text{L}$ の最終容積になるよう $\text{H}_2\text{O}$ で標準化した。その後、すべてのサンプルを $20\text{ 000g}$ で30分間遠心分離した後、 $80\text{mL}$ の上清を分離した。残りのペレット画分を $20\text{ }\mu\text{L}$ のDMSOで1:1希釈して、ペプチド集合体を溶解させた。ペレットおよび上清画分のRB濃度を吸収測定によって決定し、残った $20\text{ }\mu\text{L}$ のペレット画分中のRBについて補正した。

#### 【0279】

ビーズ容積および分配係数の概算：CD3ac沈降物の密度を概算するため、可視光の回折限界を大きく超えるようビーズを調製した（ $307.5 \times 10^{-6}\text{ M}$ のCD3ac出発濃度）。共焦点蛍光顕微鏡観察によりビーズ直径（ $1.35\text{ }\mu\text{m}$ ）を概算するためおよび血球計（Hausser Scientific）での計数を容易にするため、低濃度のRB（ $10 \times 10^{-6}\text{ M}$ ）を共沈させた。平均72個のビーズが、観察した $250,000\text{ }\mu\text{m}^3$ のセル容積において計数され、これは $3.71 \times 10^{-4}$ のビーズ容積分率に相当する。したがって $50\text{ }\mu\text{L}$ の $307.5 \times 10^{-6}\text{ M}$  CD3ac溶液は、 $18.6\text{nL}$ の総ビーズ容積を含み、CD3acの密度は（ $\text{CD3ac } 1.35\text{g/cm}^3$ ）と決定することができる。CD3acビーズの水性溶液におけるRBの対数分配係数は、

$$\log P_{\text{CD3ac/H}_2\text{O}} = \log\left(\frac{[\text{RB}]_{\text{CD3ac}}}{[\text{RB}]_{\text{H}_2\text{O}}}\right) \quad (1)$$

10

20

に従い計算した。

#### 【0280】

紫外-可視分光：吸収測定は、Nanodrop 1000 (Thermo Scientific)において行った。 $\text{H}_2\text{O}$ ：エタノール：DMSO 1:1:2においてCD3ac ( $21,780\text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 、 $280\text{nm}$ ) および $\text{H}_2\text{O}$ ：DMSO 1:1においてローズベンガル ( $11,639\text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 、 $562\text{nm}$ ) の減衰係数を得た。集合後の沈降したCD3acを溶解させるために、および測定するサンプル容積がわずか $4\text{ }\mu\text{L}$ であるため調製時の溶媒の蒸発を減らすために、DMSOを使用した。機器の線形範囲内で吸収強度を得るために、必要に応じて、サンプルを $\text{H}_2\text{O}$ ：EtOH：DMSO 1:1:2でさらに希釈した。RB濃度を、共集合の前に、計量（weigh-in）によって決定した。CD3acおよびRBの共沈の後、ペレットおよび上清画分をDMSOで1:1希釈した（集合したCD3acは $\text{H}_2\text{O}$ ：DMSO 1:1の溶液に溶解する）。

30

#### 【0281】

円偏光二色性（CD）：CD実験は、Applied Photophysics ChirascanにおいてQSキュベット（1mm経路長）を用いて行った。サンプル濃度を、測定する波長範囲で $300\text{V} \sim 500\text{V}$ の間のダイノード値となるよう調節した。プランクの測定は、サンプルの測定の直前に水を用いて行った。各スペクトルを、2つの独立したサンプル調製物の各々についての1nmの波長間隔の3回のスキャンから平均化した。すべてのスペクトルを、2次サビツキー-ゴーレイアルゴリズムを適用して平滑化した。CDデータはモル単位（ $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ ）で報告され、モル楕円率の度合いとして示される。

30

#### 【0282】

走査型電子顕微鏡観察：走査型電子顕微鏡観察（SEM）は、Hitachi S-4800において行った。SEMサンプルホルダーを-196℃に冷却し、その後にその冷却した金属表面にビーズ懸濁物の滴を直接適用した。その後、プレート上の凍結したサンプルを凍結乾燥し、白金を用いてスパッタし、そして分析した。

40

#### 【0283】

動的光散乱：動的光散乱は、ALV/-5000/E相関器および $30^\circ \sim 150^\circ$ の間の散乱角で $633\text{nm}$  ( $35\text{mW}$ ) の波長を有するArgon-Ionレーザーを搭載したALV/CGS-8Fプラットフォームベースのゴニオメーターシステムにおいて測定した。ALV-5000/E相関器は、光子強度自己相関関数 $g_2(t)$ を計算する。すべての実験を、 $T=293\text{K}$ で行い、（SEMにより事前に決定された球形の粒子形状を考慮しつつ）2次キュムラントフィットによって評価した。多分散性は、

50

全ての角度においてコンチン(contin)アルゴリズムによって決定し、そしてそれは0.11を超えることがなかった。角度依存的測定は、30°～150°まで10°刻みで行った。多重散乱の影響を避けるために、濃度依存的実験を行った。角度依存および濃度依存の両方において、流体力学半径を以下のストークス式から計算した：

$$r_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (2)$$

式中、 $r_h$ は球形粒子の流体力学半径であり、Dは拡散定数であり、 $k_B$ はボルツマン定数であり、Tは絶対温度であり、 $\eta$ は水の粘度である。1/ $r_h$ 対角度(濃度)のグラフをプロットし、流体力学半径( $r_{h0}$ )は濃度および角度測定の両方がゼロであると推定することによって計算した。

10

#### 【0284】

質量分析：質量分析は、LTQ-Orbitrap(Thermo Scientific)において行った。5 μLのCD3ac溶液( $10 \times 10^{-6}$  M、H<sub>2</sub>O:MeCN 2:1)を、Magic C18 AQ(粒子直径3 μm)を敷き詰めた100 μmキャピラリーカラムに充填した。粒子を、H<sub>2</sub>O(4%ギ酸)からMeCNへの30分間の勾配により溶出させた。オービトラップ(orbitrap)はポジティブモードおよび分解能10,000に設定した。

20

#### 【0285】

共焦点顕微鏡観察：共焦点顕微鏡画像は、DIC、位相差および落射蛍光用光学機器、488 nm、568nmおよび647nmのレーザー光線で共焦点となるYokogawa CSU-10回転ディスクを搭載したNikon Ti電動倒立顕微鏡において取得した。Hamamatsu ORCA-AG冷却CCDカメラを共焦点のために使用し、Hamamatsu ORCA-R2を広視野画像化のために使用した。CD3ac( $615 \times 10^{-6}$  M)を、(a)RB( $10 \times 10^{-6}$  M)、(b)CF( $10 \times 10^{-6}$  M)ならびに(c)RBおよびCF(両方とも $10 \times 10^{-6}$  M)と共に、各々容積50 μLの50% EtOHに共溶解させ、水に対しカウンターエバポレートを行った。得られた懸濁物を、H<sub>2</sub>Oを用いてサンプルあたり50 μLの総容積に標準化し、その後に共焦点顕微鏡に適用した。

20

#### 【0286】

#### 実施例1：中実ペプチドCD3acナノ粒子 - 構造的特徴

従来的な疎水性ペプチドは一般に合成および精製が困難であり、かつそれらはまた一般に溶解させるのが困難であり水性溶液で沈降してアモルファス構造になる傾向がある。本明細書に記載される様々な局面および態様に従い、以下の10アミノ酸からなるデノボ設計ペプチドCD3acは、他のペプチド物質と異なる特性を示す：

30



式中、LK(Ac)=アセチル化されたL-リジン；LW=L-トリプトファン；DL=D-ロイシンである。CD3acはほとんどの有機溶媒(EtOH、iPrOH、DMSO、DMF、MeCN)に直ちに溶解し、水への溶媒交換によって均一構造のビーズ様スフェアに沈降する(図2A)。

30

#### 【0287】

CD3acペプチド(質量1652.910 g/mol；純度>95%、A280)は、その配列が、交互に並ぶL-トリプトファンおよびD-ロイシンからなる疎水性ブロックと、アセチル化された3つのL-リジンからなる親水性ブロックとの、2つのセクションに分かれていることから、両親媒性とみなすことができる。本明細書で使用される「親水性」および「疎水性」という用語は、絶対的なものではなく、アミノ酸配列内、例えばCD3acのアミノ酸配列内での相対的な極性を表している。CD3acペプチドは、疎水性を有するにもかかわらず、従来的な疎水性ペプチドと比較して高収率で合成することができかつ逆相C18クロマトグラフィー材料(前記の材料および方法のセクションを参照のこと)による標準的な手順を用いて精製することができる。

40

#### 【0288】

CD3acは、コロイドサイズ範囲の球形の凝集体に沈降させることができ、そしてそれを確実かつ再現可能な様式で行うことができる。溶媒交換は、透析により、または材料消費を減らすために、24ウェル結晶化プレートにおける水に対するカウンターエバポレートに

50

より、行った。得られたペプチドビーズ懸濁物のサイズ分布を、走査型電子顕微鏡（SEM、図2A～2C）ならびに濃度および角度依存的動的光散乱（DLS、図3A～3B）により測定した。両方の方法とも、約260nmの粒子半径を示した。このスフェアの半径は、（溶媒交換前の）最初に溶解させるCD3acの濃度に影響を受け得、 $61.5 \times 10^{-6}$  M～ $923 \times 10^{-6}$  Mの間の初期CD3ac濃度に対して約200nm～約1500nmの間のサイズ範囲となる。図3A～3Bに示されるDLSデータは、 $123 \times 10^{-6}$  Mの初期溶解CD3acから形成されたCD3ac粒子を表している。得られたペプチド粒子（ビーズ）は、例えば脂質懸濁物中での狭いサイズ分布を達成するために一般的に適用されるサイジング手順、例えば超音波処理または押し出しの必要なしに、低い多分散性を示す。

## 【0289】

10

2次構造は、部分的に、CD3acビーズの集合において重要な役割を果たし得る。学説による制約を望まないが、直径が50nmより大きい粒子を含むコロイド懸濁物の定量可能な円偏光二色性データを取得することは、光の散乱のために困難であり得る。そのため、アセチル化されていない、したがって荷電し水溶性である（表3を参照のこと）CD3acの4つの構造誘導体（CD1、CD2、CD3およびCD4）を合成した。

## 【0290】

（表3）例示的な合成ペプチドおよびその誘導体のアミノ酸配列および分子量

[名称]	配列	MW (Da)
CD1	H-LK-LW-DL-LW-DL-LW-DL-LW-NH <sub>2</sub>	1228.680
CD2	H-LK-LK-LW-DL-LW-DL-LW-DL-LW-NH <sub>2</sub>	1356.775
CD3	H-LK-LK-LK-LW-DL-LW-DL-LW-DL-LW-NH <sub>2</sub>	1484.870
CD4	H-LK-LK-LK-LK-LW-DL-LW-DL-LW-DL-LW-NH <sub>2</sub>	1612.965
CD3ac	Ac-LK(Ac)-LK(Ac)-LK(Ac)-LW-DL-LW-DL-LW-DL-LW-NH <sub>2</sub>	1652.910
LCD3	H-LK-LK-LK-LW-LL-LW-LL-LW-LL-LW-NH <sub>2</sub>	1484.870
LCD3ac	Ac-LK(Ac)-LK(Ac)-LK(Ac)-LW-LL-LW-LL-LW-LL-LW-NH <sub>2</sub>	1652.910

## 【0291】

20

図4は、CD1～CD4の水中での円偏光二色性スペクトルを示している。概して、荷電したポリL-リジンペプチドは、ランダムコイル2次構造をとり、180nm～210nmの間で負の橋円率を示し；本明細書では、より短いオリゴリジン配列を有するペプチドがこの波長範囲で大きな橋円率を示すことが示されている。また、典型的なランダムコイルのスペクトルは、210nmより上では橋円率にほとんど～全く影響を与える；したがって、210nm～260nmの間の波長範囲のほぼ全体を、交互に並ぶL-TrpおよびD-Leuの配列の影響に割り当てることができる。例えば、223nmのピークの強度および位置は、付加されるリジン残基の数が変化してもほぼ不变のままであり、このことは、LW-DLの反復単位の2次構造がN末端に付加されるオリゴリジンの長さによって影響を受けないまたはほとんど影響を受けないと考えられること）を示している。

40

## 【0292】

CD4～CD1シリーズの円偏光二色性スペクトルから、約196nmおよび223nmで最大値を有するスペクトルを示すリジンを含まない架空のCD0を理論的に推定することができる。同様のスペクトルは、これまでの合成疎水性ペプチドでは観察されていないが、土壤生息細菌バチルス・ブレビス（*Bacillus brevis*）由来の15アミノ酸抗生ペプチドであるグラミシジンAの構造研究において以前に報告されている[16, 17]。

## 【0293】

グラミシジンの2次構造モチーフは、自然界ではめったに観察されないワイドヘリックスであり、その環境の誘電率に依存して[19]ヘリックスピッチ、掌性およびダイマー構

50

成（4次構造）に多様性がみられる[17c,18]。グラミシジンAは交互に並ぶL-TrpおよびD-Leuのモチーフを含んでいるが、本明細書に示されるCD3acは様々な局面、例えば、ペプチド配列および長さ、グラミシジンに存在する末端付加されたホルミルおよびエタノールアミンによる大幅な修飾、の点でグラミシジンと異なっている。例えば、グラミシジン配列は全体を通して疎水性であるが、本明細書に示されるCD3acは、少なくとも1つのL-リジン（例えば、1つのL-リジン、2つのL-リジンまたは3つのL-リジン）のN末端付加および両親媒性ペプチドにおける少なくとも1つのアミノ基のアセチル化により、両親媒性である。

#### 【0294】

学説による制約を望まないが、LW-DLの反復配列は、孤立した -ヘリックス、 -シートおよびランダムコイルにおいて観察されるのとは明らかに異なるファイ角およびブサイ角のセットをもたらし得、そしてそれは立体障害によって支配されると考えるのが最も妥当であり；比較的短いペプチドではときどき安定な分子内水素結合が観察され得る[20]。CD3acにはそのような2次構造および分子内水素結合が存在し得るが、CD3acはそれ自身に折り畳まれるには短すぎると考えられる。

#### 【0295】

ビーズ様集合における2次構造の重要性は、同一構成（アミノ酸配列）であるが全体がL-アミノ酸で構築されているペプチドであるLCD3acによって実証された。LCD3acは、沈降してマイクロメートル範囲のアモルファス構造になり（図5A）、荷電したLCD3の円偏光二色性スペクトルは、 -ヘリックス優位の特徴を有する（図5B）。SEMおよび円偏光二色性を合わせたデータは、球形の沈降物の特徴が少なくとも部分的にD-Leuの存在およびそれによって誘導される特定の2次構造に依存することを示している。

#### 【0296】

#### 実施例2：中実ペプチドCD3acナノ粒子 - カーゴの被包

CD3acは、Fmoc化学によって初めて合成された、ナノおよびマイクロメートルサイズ範囲の中実粒子を形成する、薬物送達用途で有望なペプチドである。沈降させたCD3acスフェアは、いくつかの態様において、概して相互に接着せず、かつガラスまたはプラスチック表面に対する観察可能な親和性を有さないが、それらは、それらの形成時にカーゴ分子を被包することができる。CD3acを、 $10 \times 10^{-6}$  Mの5-カルボキシフルオレセイン（CF）、 $10 \times 10^{-6}$  Mの4,5,6,7-テトラクロロ-2',4',5',7'-テトラヨードフルオレセイン（RB）および両色素の等モル混合物のそれぞれと共に溶解させた。この実験は、RBは荷電するがCFは大部分がプロトン化し、水性溶液において低い溶解性を示すpH 5で行った。溶媒の容積をカウンターエバポレートの後に50 μLに再調節し、バックグランドとペプチドビーズとの間の蛍光のコントラストにより少なくとも定性的にスフェア内へのカーゴの蓄積を決定できるようにした。

#### 【0297】

CFおよびRBは、色素の荷電状態に非依存的に、CD3acビーズによって取り込まれる（図6A～6C）。しかし、CF充填ビーズは凝集してブドウ様の集合体になるのに対して（図6B）、RB充填スフェアは、おそらく荷電したRBがビーズ表面上またはその付近に提示されるために、相互に接着しない（図6A）。

#### 【0298】

CFのような疎水性の色素およびRBのような比較的親水性の色素の両方とも、CD3acビーズによって被包され得る。学説による制約を望まないが、ゲスト分子は、（溶液中で）早い段階でCD3acと事前会合し、そしてエタノールの除去により集合し得る。事前会合の程度、したがって共集合の効率は、ホスト化合物とゲスト化合物の親和性に依存し； CFおよびRB等のキサンテン誘導体の場合、非局在化された環構造の相互作用がそれらのCD3acとの事前会合に寄与し得る。

#### 【0299】

充填されたCD3acビーズのモル組成を分析するため、RB充填CD3acビーズの色素含有量を定量した。RBは、容易に入手可能でありかつエタノールおよび水に溶解する。学説による

10

20

20

30

40

50

制約を望まないが、水への溶解は、溶媒交換の際にカーゴがペプチドビーズの外で沈降するのを避けるために必須である。加えて、RBの光吸収は水およびDMSOの混合物中で強く消光されず、そのため光学密度による簡便かつ正確な定量が可能である。

#### 【0300】

簡単に説明すると、CD3acおよびRBを、様々な濃度比で50% EtOHに共溶解させた。各々50 μLを24ウェル結晶化プレートに適用し、16時間の間、1mL H<sub>2</sub>Oに対するカウンターエバポレートを4回行った。すべての実験を3連で行った。CD3acスフェアは、通常、RBの濃度に依存して約30分以降に沈降する。溶媒の平衡化の後、形成されたビーズのペレットを再懸濁し、100 μLの最終容積になるようH<sub>2</sub>Oを用いて標準化した。サンプルを、20,000gで30分間遠心分離し、その後に80 μLの上清を分離した。その後、残りのペレット画分を20 μLのDMSOで1:1希釈し、ペプチド集合体を溶解させた。エタノールとは異なり、DMSOの使用は、サンプルの蒸発を減らす助けをし、少なくとも5分間にわたり安定な吸収値を示す(UV-Vis実験のサンプル容積は4 μLである、前記の例示的な材料および方法のセクションを参照のこと)。

10

#### 【0301】

共集合体の定量データが図7Aにまとめられている。CD3acの濃度は、本明細書に記載される実験において $615 \times 10^{-6}$  Mで一定に維持した。色素 対 ペプチドの初期溶解モル比は、[RB]<sub>i</sub> / [CD3ac]<sub>i</sub>として示されている。例えば、実験開始条件として[RB]<sub>i</sub> / [CD3ac]<sub>i</sub> = 1の場合、ビーズ形成後、スフェアのモル組成( $nRB_p/nCD3ac_p$ )の約3分の1がRBであり(図7Aに示される白丸)、おおまかに初期溶解色素の25%がCD3acビーズに充填された( $nRB_p/nRB_i$ 、図7Aに示される白三角)。図7Bに示されるように、280nmにおけるペレットおよび上清画分の吸収(トリプトファンの吸収最大値)は、CD3acが幅広い濃度範囲のRBの存在下で(本明細書に記載される実験におけるRB対CD3acのモル比[RB]<sub>i</sub> / [CD3ac]<sub>i</sub>は、1.5の広がりがある)ほぼ定量的に沈降することを示している。より高いRB濃度の添加により、より多くの色素分子がCD3acビーズ内に共集合され得るが；初期溶解RBと共集合RBの関係は、直線的に比例せず、共集合の効率( $nRB_p/nRB_i$ )は、飽和限界に達する。

20

#### 【0302】

CD3acビーズへのRBの被包効率は、分析した濃度比において、少なくとも約30% w/wもしくは少なくとも約40mol-%またはそれ以上に達し、これはRB濃度の約900倍増加またはCD3ac/H<sub>2</sub>OにおけるRBの対数分配係数2.95に相当する。疎水性のカーゴ分子の場合は同様またはさらに高い効率が予想されるが；水不溶性の化合物の正確な定量は、カーゴが溶媒交換の際にペプチドビーズの外で沈降するため、不自然になる傾向があり得る。

30

#### 【0303】

RBと効果的に事前会合および共沈するCD3acの能力は、少なくとも部分的に、RBが二価に荷電し水溶性であることを考えると、注目すべきものである。事実、その水中での溶解性は、エタノール中でのそれよりも約5倍高い。本明細書に示されるように、CD3acのビーズ集合は、等モル濃度のRBの存在によって阻害されず、そして、学説による制約を望まないが、ペプチドおよび色素は主として芳香族相互作用により相互作用し、(例えば、アビジン/ビオチンと比較して)むしろ非特異的な結合をもたらすと考えられる。この機能は、中実の脂質ナノ粒子および小胞システムの被包特性を補足するものであり得る。

40

#### 【0304】

本明細書には、高収率および十分量(preparative quantities)で合成および精製された10アミノ酸の高疎水性配列が提供される。このペプチド(CD3ac)は、鋳型ストラテジーを使用せずとも低いサイズ多分散性の均一形状のビーズに集合させることができる。CD3acの荷電誘導体の円偏光二色性測定は、D,L-ヘリカルグラミシジンとの構造的関連性およびその特定の2次構造におけるD-Leuの必須の役割を示している。排他的にL-アミノ酸のみを含むLCD3は、-ヘリックスの特徴を示し、そのアセチル化状態ではアモルファスに沈降する。CD3acは、親水性および疎水性の両方の化合物を、既存の被包ストラテジーを超える効率、例えば少なくとも2.95の対数分配係数となる効率で被包することができ[15]、その被包効率は、それが飽和限界に達しない限り、溶液中の親水性種の濃度によって

50

制限されない。

#### 【0305】

本明細書に記載される様々な局面および態様に従い、中実のペプチド粒子の状態は、カーゴの被包の効率の高さと共に、纖細かつ高価な医薬の分解を減らすために利用することができ、細胞に高用量を送達するために適用することができる。そのようなペプチド薬物送達システムは、簡便な1工程手順でゲスト分子（例えば、活性剤）を捕捉および蓄積することができる。したがって、本明細書には、現在のコロイド種の道具箱を拡充することができ、医学用途で有望な、天然アミノ酸の構成ブロックおよびFmoc化学による合成に基づく非ポリマー薬物送達システムが提供される。

#### 【0306】

実施例3：細胞への薬物送達のためのタンパク質コロナを有するCD3acナノ粒子

実施例1および2に記載されるように、CD3acペプチドナノ粒子は、溶解させたCD3acから水の添加によって集合させることができ；3成分混合物（CD3ac、有機溶媒、H<sub>2</sub>O）が2相領域（CD3ac、H<sub>2</sub>O）に移行するのに伴い乳濁物が自然に形成される。この乳化プロセスはウーノ効果に類似する（8）が、CD3ac滴は有機溶媒が除かれると硬化して中実の粒子になる。実施例1および2は、粒子形成の際に中性のおよび荷電した芳香族分子が分散相に移動し捕捉され得ることを実証している（5）。

#### 【0307】

実施例3では、CD3acペプチドマトリックス、捕捉されたカーゴ（Flutax-2）および、可視化の目的でAlexa Fluor 568によって任意で標識された（Tfn-AF568）トランスフェリンのコロナからなる新規の薬物送達システムが提供される。自己集合したCD3ac粒子における試薬の空間的配置を評価するため、CD3acペプチドを、Flutax-2およびTfn-AF568と共に50% EtOHに溶解させ、そしてEtOHの量を後述の例示的な材料および方法に示されるように段階的に減少させた。図8A～8Iは、得られたCD3acペプチド薬保持ナノ粒子の蛍光画像を示している。この態様において、CD3acナノ粒子は、従来的な光学顕微鏡によってコアおよび表面の蛍光の分布を識別できる十分な大きさとなるよう設計されたサイズである、直徑約3 μmであった。制約されることを望まないが、より小さなまたはより大きなCD3acペプチドナノ粒子を製造することができる。Tfn-AF568は、粒子の周辺部に明るい蛍光のリングを示し、Flutax-2蛍光は粒子全体に均一に分布している（図8A～8C）。捕捉効率を、ペプチド粒子と水との間のFlutax-2の分配係数を決定することによって測定した（図9A～9D）。ペプチド粒子と水との間のFlutax-2の分配係数は、5.25であると決定された、すなわち、適用した実験条件の下で、共溶解させたFlutax-2の80%超が水相から逃れ、粒子に捕捉される。そのような分配係数値は、水溶性の化合物として顕著に高いものである。

#### 【0308】

タンパク質は一般に表面活性を有し、固体-液体界面に吸着し得る。したがって、タンパク質溶液と接触させた粒子が「タンパク質コロナ」と称されるタンパク質の相で覆われ得るかどうかを決定することを試みた（10）。そのために、赤色蛍光の明瞭な辺縁部がTfn-AF568からなるコロナを表すものなのかどうかを評価した。これを評価するため、本明細書に記載される粒子を50 μg/mLのトリプシン中で6時間インキュベートした。Flutax-2カーゴの空間的分布が不变のまま、辺縁部が見えなくなった（図8D～8F）。グレイレベルプロファイルの定量は、辺縁部Tfn-AF568の強度がトリプシンインキュベート後に3倍減少したことを示した（図8G）。同時に、Flutax-2の緑色蛍光は、当初はTfn-AF568の吸収とFlutax-2の発光のスペクトルが重複していたが、Tfn-AF568コロナが除去されることで、13倍増加した（図8H）。まとめると、これらの実験は、CD3ac、Flutax-2およびTfn-AF568の自己集合により、捕捉されたFlutax-2および表面に吸着したTfn-AF568のコロナを含む粒子が形成されることを示している。自己集合させた粒子のトリプシン処理は、Tfn-AF568をタンパク質分解し、そのフラグメントを表面から脱離させ得る（図8I）。

#### 【0309】

薬物送達粒子は、一般に、そのサイズ範囲が腎臓および肝臓によって排除される可能性が低いという理由で、直径8nm～200nmの間である（4）。また、標的指向性薬物含有粒子

10

20

30

40

50

の取り込みメカニズムの候補である、受容体媒介エンドサイトーシスは、サイズ依存的であり、約150nmより小さい粒子に対してより効果的である(11)。CD3acの粒子サイズを小さくするために、より低いペプチド濃度を乳化前に溶解させた：図10A～10Cは、10 μg/mLのTfn-AF568の存在下で集合させた492 μM、246 μMおよび123 μMのCD3acから調製されたペプチド粒子の蛍光顕微鏡画像を示している。生じたサイズ差が、粒子に付随する蛍光の強度プロファイルによって図10Dにまとめられている。492 μMでは確認できる特徴的なリングは、それより小さな粒子では、可視光の回折限界のために観察することができないが、光学顕微鏡により、300nmより小さい粒子上にTfn-AF568が存在することが確認される(図10E)。ナノ粒子(d<100nm)上でのTfn-AF568のコロナ形成を確認するため、透過型電子顕微鏡(TEM)を適用した。

10

### 【0310】

簡潔に説明するために、本明細書では、カーゴ(例えば、本明細書で使用されるFlutax-2)およびコロナ(例えば、本明細書で使用されるTfn-AF568)の存在下で自己集合させたCD3acペプチドナノ粒子の頭字表記として、

$PNP_{\text{Flutax-2}}$   
カーゴ

が使用される。図10F～10Iは、様々な構成のPNP粒子のTEM画像を示している： $PNP_{\text{Flutax-2}}$ (図10F～10G)および

$PNP_{\text{Flutax-2}}$   
 $Tfn-AF568$

20

(図10H～10I)。両方のサンプルを、明色の粒子と暗色のバックグラウンドとに分ける酢酸ウラニルで染色した。 $PNP_{\text{Flutax-2}}$ は多数検出され、カーボンフィルム上に均一に分布していた(図10F)。対照的に、

$PNP_{\text{Flutax-2}}$   
 $Tfn-AF568$

30

サンプルではわずかな粒子しか検出できず；代わりに、それらはクラスター化してまとまっており(図10H)、これは、サンプル調製時のディウェッティング(de-wetting)および残留水のエバボレートのプロセス、したがって疎水性のカーボン支持体に対する異なる親和性を示している。より高倍率の画像(図10I)は、ナノ粒子の境界面に中間コントラストの辺縁部が存在することを示している。その平均厚9.85nm(標準偏差=2.1、n=99)は、推定されるタンパク質の直径と一致している(12)。両方のサンプルは同じプロトコルによって調製されたが、 $PNP_{\text{Flutax-2}}$ の平均直径(100nm、図10J)は、

$PNP_{\text{Flutax-2}}$   
 $Tfn-AF568$

40

の平均直径(51nm、コロナを除く、図10K)の2倍であった。学説による制約を望まないが、ペプチド粒子の平均サイズは、部分的にペプチド濃度に依存するだけでなく、部分的に相分離プロセスにおいて乳濁物を早期に安定化させる表面活性分子の存在にも依存する(8)。したがって、これらの電子顕微鏡分析は、ペプチド粒子の直径が、例えば様々なプロセスパラメータ、例えば、非限定的に、ペプチド濃度ならびに/または表面活性分子の濃度および/もしくはタイプを調整することによって、数十ナノメートルまで制御できることを示している。図8A～8Fの蛍光顕微鏡画像と合わせて、TEM画像は、PNP上にTfn-AF568コロナが存在することを示している。

40

### 【0311】

実施例4：タンパク質コロナを有するCD3acナノ粒子によるCHO細胞へのFlutax-2の送達

トランスフェリン受容体(TfR)への選択的結合は、タンパク質コロナの機能性に依存し；その機能は、タンパク質変性、立体障害(クラウディング(crowding))またはPNP表面からの好ましくない配向により弱体化し得る。細胞表面へのPNPの蓄積は、特異的なコロナ-受容体相互作用および/または非特異的な会合によるものであり得る。例えば、静電気的(クーロン)および電気力学的(ファンデルワールス)力は、非特異的な会合に寄与し得る(13～15)。検出されたコロナの特異的結合の媒介における機能性を試験するため、a)溶液中のTfnによるPNP結合；およびb)TfR発現チャイニーズハムスター卵巣

50

(CHO)細胞と、内因性のTfRを欠いているがTfR2を発現するチャイニーズハムスター卵巣組織から得られたTRVb細胞(16)との間のPNP結合の比較の、2つの独立した実験プロトコルを用いて、細胞表面に会合したPNPの数を、利用可能なTfRの密度と相関付けた。図11A～11Hは、

$PNP_{Flutax-2}^{Tfn-AF568}$

と共に1時間インキュベートしたCHO細胞の顕微鏡画像を示している。PNPの有意な蓄積が、突き出た細胞周囲部で検出され(図11A～C)、これはCHO細胞を17μMの未標識Tfnと共にインキュベートすることによってブロックすることができた(図11D～11F)。このことは、細胞表面とのPNPの相互作用が、空いている結合可能なTfRに依存することを示している。図11Gは、TRVbにおけるより低いTfR密度が

$PNP_{Flutax-2}^{Tfn-AF568}$

の会合率を有意に減少させることを示している。17μMの未標識のTfnとのTRVbのインキュベートは

$PNP_{Flutax-2}^{Tfn-AF568}$

の結合をブロックし、このことは、これらの細胞において

$PNP_{Flutax-2}^{Tfn-AF568}$

は大部分が豊富でない受容体TfR2を介して相互作用することを示している。過剰なTfnの適用は、TfRに関してPNPと競合するだけでなく、粒子コロナ中の蛍光性のTfn-AF568を非蛍光性のTfnに交換していることが考えられる。この可能性を評価するため、17μMのTfnの存在下および非存在下、37℃でインキュベートされた $PNP^{Tfn-AF568}$ の24時間後の蛍光強度分布を比較したところ、有意でない差しか見られなかった(図9C～9D)。このことは、細胞表面に対するPNPのTfR媒介結合の速度がPNP表面上でのタンパク質交換よりもずっと速いことを示している。図11A～11Hに提供される結果と合わせて、PNPがTfn-AF568コロナを介してTfRに特異的に結合することが示されている。

### 【0312】

TfRとの相互作用を介して

$PNP_{Flutax-2}^{Tfn-AF568}$

は細胞に結合することができるが、Tfnはインターナライズが起こる前にPNPコロナから脱離することが考えられる、および/または単一のTfnタンパク質とNPとの間のサイズの違いが細胞取り込みに影響を与える可能性がある。したがって、次に、この粒子が細胞によってインターナライズされ得るかどうかを決定することを試みた。会合したPNPとインターナライズされたPNPとの区別は、表面に付着した細胞の平らな形状および光学顕微鏡の限られたz分解能のために、直接的に行うことができない。前記のように、粒子表面からのTfn-AF568の離脱は、緑色蛍光対赤色蛍光の比(G/R)の明確なシフトによって検出することができる。そのため、図12A～12Mのそれぞれに示されるように、G/R分布を、会合したPNPと細胞内にインターナライズされたPNPとを区別するために測定した。CHO細胞を固定し、かつ

$PNP_{Flutax-2}^{Tfn-AF568}$

との1時間のインキュベート後(図12A～12E)および6時間のインキュベート後(図12G～12K)に画像化した。1時間後、G/R分布は、細胞周囲部の内側(図12E、黒色のバー)および外側(図12E、灰色のバー)の両方のPNPにおいて、1.5前後に密集するピークを示した。図12Kに示されるように、6時間後、細胞周囲部内側のPNPの集団(黒色バー)は、高G/R値側への有意なシフトを示し、一方、細胞周囲部外側のPNPのG/R分布(灰色バー)は、1.5前後に拘束されたままであった。学説による制約を望まないが、1時間のインキュベート

10

20

30

40

50

の後、大部分のPNPはいまだリソソーム区画に到達しておらず、そしてインターナライズされたPNPは依然としてTfn-AF568を含有するインタクトなコロナを有しており；6時間後には、大多数のPNPがリソソームに輸送され、それらのタンパク質コロナがタンパク質分解により消化されたと考えられる。小さくなつた分解産物は、ファンデルワールス力が弱いために粒子表面から脱離し得る(17)。トリプシンによるコロナ除去後のG/Rの増大(図8H)と同様、リソソームにおけるPNPコロナのタンパク質分解消化は、インターナライズされたPNPのG/R値を増大させ得る。このことは、ガラス表面上で検出されたPNPのG/R値が不变であったことにより裏付けられる。G/Rの変化は、本明細書において、Tfn-AF568コロナを有するPNPが例えればTfRを介したクラスリン媒介エンドサイトーシス(18)によって細胞に侵入または細胞によって取り込まれ得ることを実証する上で、(消化速度が比較的遅いために)インターナライズされたPNPの定性的な指標として使用され得る。

10

## 【0313】

PNPの結合およびインターナライズにより低分子カーゴの選択的輸送がなされ得るかどうかを評価するため、被包されたFlutax-2の細胞への放出を、細胞への

$PNP_{Flutax-2}^{Tfn-AF568}$

の添加から24時間後に分析した(図13A～13I)。Flutax-2は、癌療法において適用される有糸分裂阻害剤である(20)パクリタキセルのオレゴングリーン(OG)修飾誘導体である(19)。その未標識形態と異なり、Flutax-2は、荷電しており、適用される濃度で水溶性であり、そのため、細胞膜を透過しない。したがってこれを、PNPによる細胞質ゾルへの低分子送達の効率および特異性を調査するためのモデル化合物として使用した。CHO細胞を、培地に溶解させたか(図13A～13C)または

20

$PNP_{Flutax-2}^{Tfn-AF568}$

に捕捉させたか(図13D～13G)のいずれかの0.67 μMのFlutax-2と共に、24時間インキュベートした。細胞質ゾルにおけるFlutax-2の発光を平均化し、細胞に送達された化合物の量を定量した。溶解させたFlutax-2の細胞膜を通じた直接透過は、生じた蛍光が自己蛍光のレベルを超えていたため、検出できなかった(図13Bおよび13I)。他方、

30

$PNP_{Flutax-2}^{Tfn-AF568}$

とのインキュベートは、強い拡散した緑色蛍光シグナルを生じ(図13Eおよび13G)、Flutax-2の細胞質ゾルへの送達が示された。この送達は、細胞培養培地中の17 μMの溶解させた未標識のTfnとのPNP-細胞相互作用の競合によって有意に減少した(図13H)。また、全体的な送達率は、TfR2のみを発現するTRVb細胞において有意に低かった(図13H)。

## 【0314】

本明細書には、本明細書に記載される1つまたは複数の態様に従い、CD3acペプチドマトリックス、カーゴとして細胞膜不透過性のFlutax-2および特異的細胞表面受容体リガンドとしてTfn-AF568からなる標的指向性薬物送達システムが提供される。1工程手順(例えは、約15分間の単一の工程)の適用により、3つの成分のすべてを自己集合させて薬物充填・機能化粒子を形成させることができる。制約されることを望まないが、このシステムおよび形成プロトコルの単純さは、すべての関連成分の協調的相互作用から来るものであり、CD3acは、マトリックスの材料であるというだけでなく、それらが小さな芳香族分子に対して高い親和性を有しているために、被包ルーチンに取って代わるものである。このカーゴ取り込みプロセスは、おそらくトリプトファンの非局在化された環系とFlutax-2との間の高い親和性によってFlutax-2が水相から逃がれペプチド滴中に蓄積する2相液体抽出に類似すると考えるのが最も妥当である。加えて、このペプチドの穏やかな有機溶媒に対する溶解性は、すべての関連成分の同時溶解および自己集合を可能にする。CD3acの乳化時にTfn-AF568が存在するため、PNPをTfRに対して標的指向させるタンパク質コロナが形成され得る。加えて、粒子表面上のタンパク質の存在は、その表面活性により粒子サイズの調整、そしてそれによるペプチド乳濁物の早期安定化を実現する。PNPがリソソーム区

40

50

画にインターナライズされると、数時間の時間規模のタンパク質分解消化によりコロナが除去され得、そして数日の時間規模で捕捉されていたカーゴが細胞質ゾルに放出され得る。被包された緑色（例えば、本明細書で使用されるFlutax-2）および表面に接着した赤色の色素（例えば、Tfn-AF568）の蛍光比は、コロナが除去されると高い値側にシフトし得（例えば、13倍）、このシフトは細胞の粒子取り込みの定性的な描写を可能にし得る。TfRに対するPNPの結合および粒子のサイズ範囲は、例えばクラスリン媒介エンドサイトーシスを介した、粒子の取り込みを示す。学説による制約を望まないが、カーゴの放出は、リソームにおけるPNPのタンパク質分解まで遡ることができる。荷電したCD3ac分解産物の構造物は、脂質膜を透過すると考えられ、そしてリソームを破壊する可能性がある（21）。 10

### 【0315】

例示的な材料および方法（実施例3～4について）

ストック溶液：CD3acの合成および精製については、実施例1～2についての例示的な材料および方法に記載されている（例えば、Dittrich and Meier (2010) Macromolecular Bioscience 10: 1406を参照のこと）。簡単に説明すると、ペプチドを、Fmoc保護基化学を用いて固相上で合成し、そしてC18逆相（RP）クロマトグラフィー材料上でアセトニトリルおよび水の勾配を適用して精製した。純度は、 $A^{280}$ におけるRP-HPLC溶出プロファイルのピーク積分によって決定し、95%を超えていた。CD3acストック溶液は、ペプチドをEtOH:H<sub>2</sub>O (1:1 v/v) に溶解させることによって調製した。その濃度は、 $A_{280}=21780$ として、EtOH:H<sub>2</sub>O:DMSO 1:1:2混合物中、280nmにおける吸収（Thermo Scientific Nanodrop 2000）によって決定した。ペプチドの濃度を、EtOH:H<sub>2</sub>O (1:1 v/v) を用いて742 μMに調節し、そして200 μLのアリコートを、さらに使用するまで-80 ℃で保存した。Tfn-AF568 ( Invitrogen、T-23365 ) は、500 μg/mLの濃度となるよう溶解させ、+4 ℃で保存した。Flutax-2 ( Invitrogen、P22310 ) は、40 μMの濃度となるようH<sub>2</sub>O:EtOH (1:1) に溶解させ、-80 ℃で保存した。 20

### 【0316】

粒子の集合、充填およびコロナ形成：PNPは、H<sub>2</sub>O:EtOH (1:1, v/v) 中での終濃度が123 μM CD3ac、6 μM Flutax-2および10 μg/mL Tfn-AF568となるようCD3ac、Tfn-AF568およびFlutax-2のストック溶液を混合することによって集合させた。乳化は、第1希釈工程 (1:1、H<sub>2</sub>O) と続く15分間の平衡化期間によって誘導し、その後にエタノール含有量を第2希釈工程 (1:1、H<sub>2</sub>O) によってさらに25%まで低下させた。得られた懸濁物の50 μLアリコートを24ウェルシッティングドロップ結晶化プレート（Hampton Research, Cryschem）に適用し、6時間の間、1mLのH<sub>2</sub>Oに対して3回カウンターエバポレートを行った。 30

### 【0317】

培養細胞実験：CHO細胞株は、F12:DMEM 1:1 ( Cellgro、10-090 ) プラス10%ウシ胎仔血清（Gibco）中で成長させた。0.5mL培地中の $2 \times 10^4$ 個の細胞を、24ウェルプレート（Falcon、353047）上でカバーガラス（VWR、89015-724）に播種し、16時間インキュベートした。細胞をPBSで1回洗浄し、そしてHam's F12培地（Cellgro、10-080）中でさらに30分間インキュベートした後、250 μLのF12中50 μLの（上記のようにして調製された）ナノ粒子（NP）溶液を適用した。したがって細胞インキュベートに使用したCD3acの濃度は、会合しているFlutax-2およびTfn-AF568の重量を無視すれば、8.3 μg/mLに相当する。競合アッセイでは、細胞を、17 μMのTfn ( Sigma、T1283 ) を含有するF12培地の中で30分間事前インキュベートした後、17 μMのTfnを含有する250 μLのF12中50 μLのPNPの溶液を添加した。サンプルをPBS中3%パラホルムアルデヒド（Sigma、P6148）によって固定し、蛍光マウンティング培地（Dako、S3023）を用いてガラススライド上にマウントし、そして24時間以内に分析した。 40

### 【0318】

蛍光分析：蛍光実験は、BMG FLUOstar Omegaプレートリーダーにおいて、黒色384ウェルプレート（MP100-1、Matrical）上で行った。Tfn-AF568およびFlutax-2の希釈群をH<sub>2</sub>O:DMSO:FBS 6:3:1 ( V:V:V ) 中で測定し、そのデータ点について直線当てはめを行った。 50

## 【0319】

(表4) 線形データ回帰から決定された例示的なパラメータ

	Tfn-AF568		Flutax-2	
	値	標準誤差	値	標準誤差
切片	4501.69	234.76	4809.00	85.56
勾配	$1.011 \times 10^6$	5750.49	$5.573 \times 10^{10}$	$2.515 \times 10^8$
R <sup>2</sup>	0.99977		0.99986	

## 【0320】

Flutax-2の被包効率を決定するため、PNPを、上記の手順を用いて、固定濃度のTfn-AF568 ( $10 \mu\text{g/mL}$ ) および様々な量のFlutax-2 ( $1.6 \mu\text{M}$ 、 $4 \mu\text{M}$ 、 $8 \mu\text{M}$ 、 $12.5 \mu\text{M}$  および  $16 \mu\text{M}$ ) の存在下で集合させた。結晶化プレート(上記参照)において集合させた後、PNPサンプルをH<sub>2</sub>Oで $100 \mu\text{L}$ に標準化し、 $16,000\text{g}$ で1時間遠心分離した後、 $80 \mu\text{L}$ をペレット画分から分離した。両方の画分をH<sub>2</sub>O:DMSO:FBS 6:3:1 (v:v:v) で $133.3 \mu\text{L}$ に標準化した後、 $120 \mu\text{L}$ をウェルプレートに適用し、その蛍光強度を測定した。

## 【0321】

透過型電子顕微鏡観察：PNPサンプルを上記のようにして調製した。 $5 \mu\text{L}$ のH<sub>2</sub>Oに懸濁したPNPを、カーボンフィルムコートされた銅製グリッド(400スクウェアメッシュ、Electron Microscopy Sciences)に適用し、乾燥させた。このサンプルを、1分間の間、 $10 \mu\text{L}$ の1%酢酸ウラニルで染色した。過剰な染料をろ紙で除去し、その後にTecnai G<sup>2</sup> Spirit Bio TWINに適用した。

## 【0322】

顕微鏡観察：固定した細胞を、60x Plan Apo NA 1.4対物レンズを搭載したNikon Ti倒立顕微鏡において分析した。DAPIの蛍光は、360/40フィルターを用いて励起し、460/50発光フィルターを用いて回収した。オレゴングリーンの蛍光は、360/40を用いて励起し、480/40発光フィルターを用いて回収した。AF568の蛍光は、545/30を用いて励起し、620/60発光フィルターを用いて回収した。画像は、MetaMorph 7ソフトウェア制御の下、Hamamatsu ORCA R2冷却CCDカメラを用いて取得した。ガンマ、ブライトネスおよびコントラストは、ImageJソフトウェアを用いて表示された画像上で調節した(比較画像セットについても同じ)。zシリーズの光学断面を、Prior Proscan IIフォーカスモーターを用いて、ガラススライドから最も高い検出可能なPNPの範囲まで $0.25 \mu\text{m}$ の刻み幅で回収した。1時間および6時間のPNPインキュベートの後に観察したサンプルは、AF568およびオレゴングリーン(OG)チャネルの最大スタックプロジェクション(を組み合わせたもの)である。24時間後に観察したサンプルは、オレゴングリーン蛍光の平均プロジェクションおよびAF-568スタックの最大プロジェクションにより得た。OGの平均プロジェクションを、細胞質ゾルにおけるFlutax-2蛍光の差を定量するために使用した。細胞周囲部を、DIC画像において手作業で細分化した。最大蛍光点を、ImageJ(v. 1.43u)により、パブリッククラスのMaximumFinderにおいて50のノイズトレランスを用いて抽出した。

## 【0323】

実施例5：CD3acナノ粒子の1つまたは複数の態様を用いたHeLa細胞へのノコダゾールの送達

図16Aは、EGF(可視化の目的でテキサスレッドによって任意で標識される)が細胞標的指向性リガンドであるCD3acナノ粒子の1つの態様を示している。リガンドとしてEGFを有するそのようなCD3acナノ粒子は、図16Bに示されるように、細胞によって取り込まれ得る。ノコダゾールを被包したCD3acビーズを製造するために、いくつかの態様において、 $21 \mu\text{M}$ のCD3ac、 $2 \mu\text{g/mL}$ の(可視化の目的でテキサスレッドで標識された)EGFおよび $20 \sim 40 \mu\text{M}$ のノコダゾールを有機溶媒に溶解させた(図17Aまたは17G)。水との溶媒交換により、乳濁物、したがってノコダゾールおよびEGFを含有するCD3ac中実ナノ粒子を形成することができる。いくつかの態様において、EGFの少なくとも一部分はCD3acビーズ内に被包された。加えて、EGFはCD3acビーズの外表面に吸着し、EGF機能化CD3acビーズを生成し得る

。

## 【0324】

2種類の異なる濃度のノコダゾール(20 μMまたは40 μM)を被包したそのようなCD3ac粒子を含有する培地の中でHeLa細胞をインキュベートした後の蛍光顕微鏡画像(図17B～17Fおよび17H～17K)は、EGF機能化CD3ac粒子がHeLa細胞によって取り込まれたこと、およびEGF機能化CD3ac粒子で処置されたこれらのHeLa細胞の微小管が大いに脱重合されたことを示している。しかし、事前インキュベートおよび遠心分離されたCD3ac懸濁物の上清で処置されたHeLa細胞は、依然としてインタクトな微小管を含んでいる。このことは、ノコダゾールをEGF機能化CD3ac粒子によって細胞内に送達できることを示している。

## 【0325】

学説による制約を望まないが、ビーズの結合および細胞による取り込みは、CD3ac粒子の表面に吸着されたEGFとHeLa細胞上に存在するEGFRの相互作用を通じて起こり得る。

## 【0326】

実施例6：IgGを用いたCD3acナノ粒子の標的指向化

IgGによって標的指向化されるCD3acナノ粒子は、本明細書に記載される1工程手順で調製することができる。図18Aは、IgG抗体(例えば、非限定的に、抗トランスフェリンIgGまたは抗ウサギIgG)がCD3acナノ粒子に取り込まれることを示している。加えて、図18Bに示されるように、抗トランスフェリンIgG機能化CD3acナノ粒子とトランスフェリンA-546とのインキュベートは、(白点によって示される)蛍光シグナルを生じ、IgGがCD3acナノ粒子表面に存在することおよびこのIgGとトランスフェリンA-546との結合が可能であることを示している。同様に、抗トランスフェリンIgG機能化CD3acナノ粒子と2次抗体(例えば、抗トランスフェリンIgGがウサギによって惹起されたものである場合、抗ウサギIgGが使用され得る)とのインキュベートもまた、CD3acナノ粒子表面に存在するIgGと2次抗体との結合を生じた(図18Cにおいて白点によって示されている)。ナノ粒子界面におけるIgGの配向は、等方性(「ランダム」)である、例えば、抗原結合部位および/または2次抗体にとってのエピトープが露出しておりアクセス可能であると考えられる。

## 【0327】

実施例7：ペプチド粒子(例えば、CD3ペプチド粒子またはCD3acおよびCD3ペプチドを含有する混合ペプチド粒子)による核酸分子(例えば、DNAまたはRNA)の送達

DNA/siRNAのトランスフェクトは、i)荷電したおよびii)安定なペプチド粒子によって達成され得る。CD3ac粒子(表3に示されるペプチド配列)は水に不溶であるが、それらは通常荷電しておらず、したがって核酸分子(例えば、DNAまたはsiRNAを含むがこれに限定されないRNA)に結合しない可能性がある。CD3ペプチド(表3に示されるペプチド配列)は、荷電またはアセチル化のいずれかがなされ得る4つの第1級アミン(3つのリジン+1つのN末端)を含んでいる。

## 【0328】

CD3ペプチドを用いた細胞のトランスフェクト効率を評価するために、HeLa細胞を、約3.7:1(CD3:ssDNA)のモル比で細胞培養培地に溶解された、(表3に示されるペプチド配列を有する)CD3ペプチドおよびアニオン性の核酸分子(例えば、1本鎖DNA)の混合物と共にインキュベートした。細胞内のssDNAの存在を容易に可視化するため、細胞培養培地に添加するssDNAの一部を検出可能な標識(例えば、Alexa Fluor 488; AF488)で標識した。図19A～19Bに示されるように、細胞培養培地にCD3ペプチドが存在した場合、細胞質ゾルにおける蛍光(図19A)が、対照(図19B)と比較して増大する。したがって、正に荷電した本明細書に記載される両親媒性ペプチド(例えば、CD3ペプチド)およびアニオン性の核酸分子(例えば、DNAまたはsiRNAを含むがこれに限定されないRNA)の混合物は、核酸分子による細胞のトランスフェクトの効率を、正に荷電した本明細書に記載される両親媒性ペプチド(例えば、CD3ペプチド)の非存在下での細胞のトランスフェクトと比較して上昇させることができる。学説による制約を望まないが、本明細書に記載されるペプチド(例えば、CD3ペプチド)の両親媒性の構造およびカチオン性のヘッド基のおかげで、本明細書に記載される両親媒性ペプチド(例えば、CD3ペプチド)のいくつかの態様は、細

10

20

30

40

50

胞透過ペプチドまたは細胞トランスフェクト剤として使用することができる。

【0329】

次に、アセチル化されていない両親媒性ペプチド（例えば、CD3ペプチド）が核酸分子の存在下で自己集合し核酸含有ペプチド物質を形成できるかどうかを決定することを試みた。この目的で、CD3ペプチド、ssDNAおよびトランスフェリンの混合物をアガロース中の電気泳動に供した（任意の形成されたペプチド粒子は大きすぎるためアガロース中を移動できない）。混合物中の一部のssDNAを、アガロースゲル中でのその移動の可視化のために標識し、ペプチド粒子の存在をモニターするために標識されたトランスフェリン（例えば、AF568-Tfn）をペプチド-核酸混合物に添加した。（前の実施例3～6に記載されるように、ペプチド混合物に添加されたリガンド（例えば、トランスフェリン）は概してペプチド粒子の外表面を形成する。）図20Aに示されるように、約40分間の電気泳動後のアガロースの投入ゾーンにおけるTfn-AF568シグナルおよびssDNA-AF488シグナルの共局在化は、ペプチド粒子がCD3ペプチドおよび核酸分子（例えば、AF488-ssDNA）を含む混合物から形成されたこと、したがって経時的にアガロースゲル中を移動できなかつたこと、一方、他の過剰なタンパク質分子（例えば、ssDNAおよびTfn）はアノード側に移動したことを示している。

10

【0330】

アセチル化されていない両親媒性ペプチド（例えば、CD3ペプチド）および核酸分子（例えば、ssDNA）の共沈の効率もまた、例えばHP-WAX（弱アニオン交換）クロマトグラフィー法によって、評価および定量した。例えば、CD3ペプチドおよびssDNAを共沈させてssDNA含有ペプチド粒子を形成させ、その後に遠心分離して上清およびペレットを分離し、次いでその両方をHP-WAXクロマトグラフィー機器に供した。図20Bに示されるように、CD3ペプチドおよびssDNAの大部分は、上清における量と比較して、ペプチド粒子のペレット中で検出され、共沈法によるssDNA含有ペプチド粒子の形成が高い効率であることが示された。

20

【0331】

CD3ペプチドおよび核酸分子の混合物は純水中で自己集合して安定な粒子を形成し得るが、それらは一般には安定でなく、塩強度の増加およびより高い温度に応じて溶解することに留意されたい。

30

【0332】

非限定的に、核酸（例えば、DNAまたはsiRNAを含むRNA）含有ペプチドナノ粒子の溶解性を低下させる例示的な方法は2つある。例えば、第1のアプローチは、粒子集合時に、完全にアセチル化されたペプチド（例えば、表3に示されるペプチド配列を有するCD3ac）ならびに部分的にアセチル化されたおよび／またはアセチル化されていないペプチド（例えば、表3に示されるペプチド配列を有するCD3）の混合物を必要とするものであり得る。CD3は水に対して溶解性であるが、それはCD3acと共に共沈し得る。したがって、ペプチドナノ粒子の正味電荷は、例えば、部分的にアセチル化されたおよび／またはアセチル化されていないペプチド（例えば、CD3）ならびに完全にアセチル化されたペプチド（例えば、CD3ac）の濃度またはモル比を制御することによって、容易に調整され得る。例にすぎないが、CD3acを多くすると粒子の安定性が増大し得、CD3を多くするとsiRNA/DNAの充填容量がより高くなりかつその正味電荷により細胞膜を透過する能力がより高くなり得る。当業者は、個々の用途、例えば、siRNAまたはDNAの送達のために、混合ペプチドナノ粒子における最適なCD3対CD3ac比を決定することができる。いくつかの態様において、部分的にアセチル化されたおよび／またはアセチル化されていないペプチド（例えば、CD3）は、混合ペプチドナノ粒子中に5 mole%～50 mole%存在し得る。いくつかの態様において、完全にアセチル化されたペプチド（例えば、CD3ac）は、混合ペプチドナノ粒子中に50 mole%～95 mole%存在し得る。様々な態様において、部分的にアセチル化されたおよび／またはアセチル化されていないペプチド（例えば、CD3）対完全にアセチル化されたペプチド（例えば、CD3ac）の濃度またはモル比は、約1:100～約50:1または約1:50～約10:1または約1:20～約1:1の範囲であり得る。

40

50

## 【0333】

したがって、いくつかの態様において、完全にアセチル化された両親媒性ペプチド（例えば、CD3acペプチド）、部分的にアセチル化されたまたはアセチル化されていない両親媒性ペプチド（例えば、CD3ペプチド）および核酸分子の混合物が、核酸分子（例えば、DNAまたはsiRNAを含むRNA）を含有する安定なペプチド粒子を形成するために調製され得る。例えば、生理学的条件下で安定な核酸含有ペプチド粒子の形成を実証するため、CD3acペプチドを、CD3ペプチドおよび1本鎖DNA（ssDNA）の混合物に、約11:1.8:1（CD3ac:CD3:ssDNA）のモル比で添加した。CD3acペプチドの存在は、生理学的条件下でssDNA含有ペプチド粒子を安定化することが決定された。3つの成分はすべて共沈してssDNA含有ペプチド粒子を形成し、これは対応する塩強度で安定であった。

10

## 【0334】

いくつかの態様において、リガンド（例えば、トランスフェリン）もまた、そのリガンドが結合するタンパク質に対する核酸含有安定ペプチド粒子を形成するために、完全にアセチル化された両親媒性ペプチド（例えば、CD3acペプチド）、部分的にアセチル化されたまたはアセチル化されていない両親媒性ペプチド（例えば、CD3ペプチド）および核酸分子（例えば、DNAまたはsiRNAを含むRNA）を含む混合物に添加され得る（例えば、活性剤の標的指向性送達のために使用する本明細書に記載されるペプチド粒子のいくつかの態様に関する実施例3~6を参照のこと）。例えば、トランスフェリン（画像化による可視化を容易にするためにAF568で標識されたTfn）を混合物に添加し、細胞表面に存在するトランスフェリン受容体に対する核酸含有安定ペプチド粒子を形成した。実施例3で議論されているように、リガンド（例えば、Tfn）は概して、ペプチド粒子の外表面に存在する。

20

## 【0335】

核酸含有ペプチド粒子の細胞への送達効率を決定するために、HeLa細胞を、（例えば、上記のようにCD3acペプチド、CD3ペプチドおよびssDNAの混合物から形成された）核酸含有ペプチド粒子と共にインキュベートした。前記のように、画像化による可視化を容易にするために、混合物中の一部のssDNAを検出可能な標識（例えば、AF488）で標識した。加えて、形成されたペプチド粒子を可視化する手段としてTfn-AF568を添加して核酸含有ペプチド粒子を形成した。図21に示されるように、形成されたペプチド粒子からのTfn-AF568蛍光シグナルを、細胞質ゾルにおけるAF488-ssDNAと共に共局在化し、それによりssDNA含有ペプチド粒子が生理学的条件下で安定であり細胞（例えば、HeLa細胞）に送達されることが示された。

30

## 【0336】

次に、核酸含有ペプチド粒子の正味電荷が生理学的条件下、例えば血清中でのそれらの安定性に与える影響を決定することを試みた。以下の表5に示されるように、安定なペプチド粒子は、概して、核酸含有ペプチド粒子のカチオン電荷 対 アニオン電荷の比がゼロに近い（例えば、約5~約0の間または約3~約0の間である）場合に形成される。電荷比は、ペプチド集合混合物におけるアニオン性の核酸分子（例えば、ssDNA）とカチオン性の本明細書に記載される両親媒性ペプチド（例えば、部分的にアセチル化されたまたはアセチル化されていない両親媒性ペプチド、例えばCD3）のモル比によって調節することができる。学説による制約を望まないが、ペプチド粒子の負の正味電荷（例えば、1未満のカチオン電荷 対 アニオン電荷の比）は、粒子の凝集を防ぐ助けとなり得る。

40

## 【0337】

学説による制約を望まないが、核酸含有ペプチド物質の正味電荷は生理学的条件下での粒子の安定性に影響を与えるが、アセチル化されていない両親媒性ペプチド（例えば、CD3ペプチド）と比べた、完全にアセチル化された両親媒性ペプチド（例えば、CD3acペプチド）の量もまた粒子の安定性に寄与し得る。例えば、前記のように、アセチル化されていない両親媒性ペプチド（例えば、CD3ペプチド）および核酸分子の混合物は自己集合して粒子を形成し得るが；それらは通常安定でなく、塩強度の増加およびより高い温度に応じて溶解する。対照的に、完全にアセチル化された両親媒性ペプチド（例えば、CD3acペプチド）から形成されたペプチド粒子は、より安定である。したがって、完全にアセチル

50

化された両親媒性ペプチド（例えば、CD3ac）対アセチル化されていない両親媒性ペプチド（例えば、CD3）のモル比を高くすることにより、得られたペプチド粒子の生理学的条件下での、例えば血清中での安定性を高めることができ、それは表5に示されるデータと符合する。

【0338】

（表5）得られたペプチド粒子の血清中での安定性に対する、ペプチド混合物における電荷比（またはモル比）の影響

ペプチド集合混合物の組成	モル比 (ssDNA: CD3ac: CD3)	電荷比 (カチオン:アニオン)	血清中での 安定性
CD3 1.23e-04 M	1:200:200	33.065	より不安定
CD3ac 1.23e-04 M			
ssDNA 6.20e-07 M			
CD3 1.23e-05 M	1:200:20	3.306	安定
CD3ac 1.23e-04 M			
ssDNA 6.20e-07 M			
CD3 1.23e-06 M	1:200:2	0.331	安定
CD3ac 1.23e-04 M			
ssDNA 6.20e-07 M			

【0339】

DNA/siRNA含有ペプチドナノ粒子の溶解性を低下させる第2のアプローチは、例えば、本明細書に記載される両親媒性ペプチドの親水性ペプチジルセグメントにおける少なくとも1つのアミノ基のアセチル化から本明細書に記載される両親媒性ペプチドの親水性ペプチジルセグメントにおけるすべてのアミノ基の完全なアセチル化まで様々なアセチル化度を有する単一のペプチドのカスタム合成を含み得る。例にすぎないが、両親媒性ペプチドは、CD3とCD3acとの間のアセチル化度を有するようカスタム合成され得る。例えば、両親媒性ペプチドは、例えはそのN末端に、少なくとも2つの荷電したもしくはアセチル化されていない基または少なくとも3つの荷電したもしくはアセチル化されていない基を含む、少なくとも1つの荷電したまたはアセチル化されていない基を有するようカスタム合成され得る。1つの態様において、両親媒性ペプチドは、その分子に両親媒性の特性を付与するために、そのN末端側またはN末端上の電荷を（例えは、アセチル化により）調整することによって（例えは、siRNAまたはDNAの送達のために）カチオン性となるよう設計され得る。例えば、記載される両親媒性ペプチドの親水性ペプチジルセグメントの少なくとも1つのアミノ基（例えは、親水性ペプチジルセグメントに存在するアミノ基の数に依存して、1つ、2つ、3つ、4つ、5つまたはそれ以上のアミノ基）がアセチル化されていない状態で維持され得、記載される両親媒性ペプチドの親水性ペプチジルセグメントの少なくとも1つのアミノ基（例えは、親水性ペプチジルセグメントに存在するアミノ基の数に依存して、1つ、2つ、3つ、4つ、5つまたはそれ以上のアミノ基）がアセチル化されていてもよい。

特定の態様において、そのような両親媒性ペプチドは、  
H-LK(Ac)-LK(Ac)-LK(Ac)-LW-DL-LW-DL-LW-DL-NH<sub>2</sub>

のアミノ酸配列を含み得る。いくつかの態様において、両親媒性ペプチドは、

H-LK-LK(Ac)-LK(Ac)-LW-DL-LW-DL-LW-DL-NH<sub>2</sub>

のアミノ酸配列を含み得る。代わりの態様において、両親媒性ペプチドは、

H-LK-LK-LK(Ac)-LW-DL-LW-DL-LW-DL-NH<sub>2</sub>

のアミノ酸配列を含み得る。両親媒性ペプチドにおけるアセチル化されたアミノ基対アセチル化されていないアミノ基の比は、本明細書に記載される両親媒性ペプチドのカチオン性およびアニオン性の特性を制御し得る。いくつかの態様において、両親媒性ペプチドにおけるアセチル化されたアミノ基対アセチル化されていないアミノ基の比は、1より

10

20

30

40

50

小さい、約1または1より大きいものであり得る。

【0340】

実施例8：核酸含有ペプチド粒子（例えば、CD3ペプチド粒子またはCD3acおよびCD3ペプチドを含む混合ペプチド粒子）の安定性

核酸含有CD3ペプチド粒子の安定性を、純水中で特徴づけた。以下は、核酸分子（例えば、ssDNA）およびリガンド（例えば、トランスフェリン、Tfn）をさらに含む例示的なCD3ペプチド粒子の処方である：

ペプチド粒子の処方1 ( CD3 + ssDNA + Tfn )

21 μM CD3 (H-LK-LK-LK-LW-DL-LW-DL-LW-NH<sub>2</sub>)<sup>4+</sup>

5.4 μM (5'-TTGTGCCGCCTTGCAGGTGTATC-3')<sup>24-</sup>

0.24 μM (AF488-5'-TTGTGCCGCCTTGCAGGTGTATC-3')<sup>24-</sup>

4.14 ug/mL Tfn-AF568

【0341】

処方1から形成されたペプチド粒子（PNP1）の水中での安定性を評価するために、ペプチド粒子PNP1のサンプルを、ほぼ室温または約37 のいずれかで約15分間、水を含むエッペンドルフチューブ内で振盪した。次いでPNP1サンプルを遠心分離してペプチド粒子をスピンダウンし、その上清をさらなる分析のために回収した。上清におけるTfn-AF568の濃度を蛍光強度によって測定および定量した。図22Aに示されるように、ほぼ室温よりも約37 の温度で振盪したPNP1サンプル由来の上清において、より高濃度のTfn-AF568が検出され、これにより、水中でのPNP1粒子の安定性が温度依存的であり、より高温でより多くのPNP1粒子が解離し、それによってより多量のTfn-AF568を上清に放出する傾向があることが示された。

【0342】

水中でのPNP1の安定性の経時的研究も行った。PNP1粒子のサンプルを、約4 または約37 のいずれかの温度で、水を含むエッペンドルフチューブ内で振盪した。次いで、（図22Bに示される）各々の事前に決定された時点において、PNP1サンプルを遠心分離してペプチド粒子をスpinダウンし、その上清をさらなる分析のために回収した。上清におけるTfn-AF568の濃度を蛍光強度によって測定および定量した。図22Aと同様、図22Bは、PNP1粒子の水中での安定性が温度依存的であることおよびPNP1粒子がより高い温度で、例えば4 よりも高い温度でより速く解離する傾向があることを示している。

【0343】

次に、細胞培養培地、例えば約10%血清を含有する細胞培養培地において、PNP1粒子と以下に示される処方2から形成されたペプチド粒子（PNP2）の安定性を比較することを試みた。

ペプチド粒子の処方2 ( CD3ac + CD3 + ssDNA + Tfn )

123μM CD3ac (Ac-LK(Ac)-LK(Ac)-LK(Ac)-LW-DL-LW-DL-LW-NH<sub>2</sub>)

21 μM CD3 (H-LK-LK-LK-LW-DL-LW-DL-LW-NH<sub>2</sub>)<sup>4+</sup>

5.4 μM (5'-TTGTGCCGCCTTGCAGGTGTATC-3')<sup>24-</sup>

0.24 μM (AF488-5'-TTGTGCCGCCTTGCAGGTGTATC-3')<sup>24-</sup>

4.14 ug/mL Tfn-AF568

【0344】

HeLa細胞を、約4 および37 の温度で約30分間、PNP1またはPNP2のいずれかの粒子と共にインキュベートした。HeLa細胞は通常、約37 でクラスリン媒介エンドサイトーシスを行うので、培地に溶解させた任意のTfn-AF568は、細胞によってインターナライズされるであろうが、約4 ではそれは行われない。そのため、インキュベートの後、細胞を、画像化および蛍光強度の検出のためにパラホルムアルデヒドで固定した。図22Cの上パネ

10

20

30

40

50

ルに示されるように、細胞を約37℃でPNP1粒子と共にインキュベートした場合、約4℃でインキュベートされた細胞において検出されたより点状のTfn-AF568蛍光と比較して、拡散したより強いTfn-AF568蛍光シグナルが細胞質ゾルにおいて検出された。しかし、この対比は、図22Cの下パネルに示されるように、PNP2粒子と共にインキュベートされた細胞では観察されなかった。代わりに、PNP2粒子の存在下、約4℃および約37℃でインキュベートされた両方の細胞において、点状の同等のTfn-AF568蛍光シグナルが観察された。これらの発見は、PNP1粒子は約37℃で解離して培養培地中にTfn-AF568を放出する傾向があり、その後にこれらは細胞にインターナライズされるが；PNP2粒子は少なくとも約30分間、約37℃の血清（例えば、約10%血清）中でより安定であり、Tfn-AF568の大部分をPNP2粒子中および／またはPNP2粒子の表面上で保持するようであることを示している。

10

#### 【0345】

図22Cの細胞を図22Dに示される陰性対照（すなわち、CD3またはCD3acペプチドを用いずにssDNAの存在下でインキュベートされた細胞）と比較すると、陰性対照におけるAF488-ssDNAの蛍光強度は、ssDNA含有PNP1またはPNP2粒子と共にインキュベートされた細胞におけるそれよりも有意に低い。このことは、PNP1またはPNP2粒子が細胞のトランスフェクトを容易にするためおよび核酸分子（例えば、DNAまたはRNA）を細胞に送達するために使用できることを示している。AF488-ssDNAの蛍光は、PNP1またはPNP2粒子の存在下、約4℃でインキュベートされた細胞においても検出されたことに注目されたい。学説による制約を望まないが、PNP1またはPNP2粒子の存在下、約4℃での細胞のトランスフェクトは、TfR（トランスフェリン受容体）依存的でないようであり、それは実施例7で議論されるようにCD3ペプチドの存在下での細胞膜を通じた受動輸送によって引き起こされるものと考えられる。

20

#### 【0346】

参考文献（実施例1～2について）

- [1] H. Goesmann, C. Feldmann, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, 49, 1362.
- [2] [2a] Y. Kakizawa, R. Nishio, T. Hirano, Y. Koshi, M. Nukiwa, M. Koiwa, J. Michizoe, N. Ida, *J. Control Release* 142, 8; [2b] K. Kita-Tokarczyk, J. Grumelard, T. Haefele, W. Meier, *Polymer* 2005, 46, 3540; [2c] L. Zhang, J. M. Chan, F. X. Gu, J.-W. Rhee, A. Z. Wang, A. F. Radovic-Moreno, F. Alexis, R. Langer, O. C. Farokhzad, *ACS Nano* 2008, 2, 1696; [2d] A. Blanazs, S. P. Armes, A. J. Ryan, *Macromol. Rapid Commun.* 2009, 30, 267; [2e] T. Smart, H. Lomas, M. Massignani, M. V. Flores-Merino, L. R. Perez, G. Battaglia, *Nano Today* 2008, 3, 38. 10
- [3] J. N. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces: With Applications to Colloidal and Biological Systems*, American Chemical Society, 1985, p. 296.
- [4] [4a] S. Rai, R. Paliwal, P. N. Gupta, K. Khatri, A. K. Goyal, B. Vaidya, S. P. Vyas, *Curr. Nanosci.* 2008, 4, 30; [4b] Y. Liu, K. Li, J. Pan, B. Liu, S.-S. Feng, *Biomaterials* 2009, 31, 330. 20
- [5] D. Nishit, M. Samir, *Adv. Funct. Mater.* 2009, 9999, NA-NA.
- [6] C. Lo Presti, H. Lomas, M. Massignani, T. Smart, G. Battaglia, *J. Mater. Chem.* 2009, 19, 3576.
- [7] U. K. Slotta, S. Rammensee, S. Gorb, T. Scheibel, *Angew. Chem., Int. Ed.* 2008, 47, 4592.
- [8] S. Raman, G. Machaidze, A. Lustig, U. Aebi, P. Burkhard, *Nanomedicine* 2006, 2, 95.
- [9] [9a] M. Nigen, C. Gaillard, T. Croguennec, M.-N. Madec, S. Bouhallab, *Biophys. Chem.* 2009, 146, 30; [9b] M. Nigen, T. Croguennec, D. Renard, S. Bouhallab, *Biochemistry* 2007, 46, 1248. 30
- [10] T. E. Rajapaksa, M. Stover-Hamer, X. Fernandez, H. A. Eckelhoefer, D. D. Lo, T. E. Rajapaksa, *J. Control Release* 2009.

- [11] [11a] Q. Sun, S. Cai, B. R. Peterson, Q. Sun, *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 10064.  
 [11b] S. Yang, D. J. Coles, A. Esposito, D. J. Mitchell, I. Toth, R. F. Minchin, S. Yang, *J. Controlled Release* 2009, 135, 159.
- [12] M. G. Ryadnov, A. Bella, S. Timson, D. N. Woolfson, *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 13240.
- [13] [13a] L. Aulisa, H. Dong, J. D. Hartgerink, *Biomacromolecules* 2009, 10, 2694; [13b] K. J. Channon, G. L. Devlin, C. E. MacPhee, *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 12520; [13c] J. Ryu, C. B. Park, *Angew. Chem., Int. Ed.* 2009, 48, 4820, S4820/4821-S4820/4826; [13d] H. Dong, S. E. Paramonov, J. D. Hartgerink, *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 13691; [13e] Y. Zimenkov, S. N. Dublin, R. Ni, R. S. Tu, V. Breedveld, R. P. Apkarian, V. P. Conticello, *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 6770. 10
- [14] Vydac, <http://www.nestgrp.com/pdf/Vapp/AN9802.pdf> 2010.
- [15] [15a] H. M. Redhead, S. S. Davis, L. Illum, *J. Controlled Release* 2001, 70, 353; [15b] W. Lin, M. C. Garnett, S. S. Davis, E. Schacht, P. Ferruti, L. Illum, *J. Controlled Release* 2001, 71, 117. 20
- [16] W. R. Veatch, E. T. Fossel, E. R. Blout, *Biochemistry* 1974, 13, 5249.
- [17] [17a] D. A. Kelkar, A. Chattopadhyay, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 2007, 1768, 2011; [17b] R. D. Hotchkiss, R. Dubos, *J. Biol. Chem.* 1940, 132, 791; [17c] R. D. Hotchkiss, R. Dubos, *J. Biol. Chem.* 1940, 132, 793.
- [18] [18a] D. W. Urry, D. F. Mayers, J. Haider, *Biochemistry* 1972, 11, 487; [18b] Y. Chen, A. Tucker, B. A. Wallace, *J. Mol. Biol.* 1996, 264, 757; [18c] D. A. Doyle, B. A. Wallace, *J. Mol. Biol.* 1997, 266, 963. 30
- [19] [19a] F. Heitz, A. Heitz, Y. Trudelle, *Biophys. Chem.* 1986, 24, 149; [19b] S. V. Sychev, N. A. Nevskaya, S. Iordanov, E. N. Shepel, A. I. Miroshnikov, V. T. Ivanov, *Bioorg. Chem.* 1980, 9, 121.
- [20] L. Eidenschink, B. L. Kier, K. N. L. Huggins, N. H. Andersen, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* 2009, 75, 308.
- 【 0 3 4 7 】
- 参考文献（実施例3～4について） 40
- (1) Multifunctional nanocarriers. *Adv Drug Deliv* 58, 1532-1555 (2006).
  - (2) Stark. Nanoparticles in Biological Systems, *Angew Chem Int Ed*, n-a, doi:10.1002/anie.200906684 (2011).
  - (3) Soussan, E., Cassel, S., Blanzat, M. & Rico-Lattes, I. Drug delivery by soft matter: matrix and vesicular carriers. *ACIE* 48, 274-288, doi:10.1002/anie.200802453 (2009).

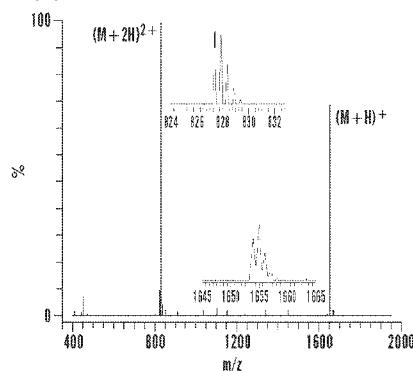
- (4) Nel, A. E. et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat Mater* 8, 543-557, doi:10.1038/nmat2442 (2009).
- (5) Dittrich, C. & Meier, W. Solid Peptide Nanoparticles: Structural Characterization and Quantification of Cargo Encapsulation. *Macromolecular Bioscience* 10, 1406-1415, doi:10.1002/mabi.201000221 (2010).
- (6) Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J Am* 85, 2149-2154, doi:10.1021/ja00897a025 (1963). 10
- (7) Nilsson, B. L., Soellner, M. B. & Raines, R. T. Chemical synthesis of proteins. *Annu Rev Bioph Biom* 34, 91-118, doi:10.1146/annurev.biophys.34.040204.144700 (2005).
- (8) Sitnikova, N. L., Sprik, R., Wegdam, G. & Eiser, E. Spontaneously formed trans-anethol/water/alcohol emulsions: mechanism of formation and stability. *LAGMUIR* 21, 7083-7089, doi:10.1021/la046816l (2005).
- (9) Ashley, C. E. et al. The targeted delivery of multicomponent cargos to cancer cells by nanoporous particle-supported lipid bilayers. *Nature*, doi:10.1038/nmat2992 (2011). 20
- (10) Monopoli, M. P. et al. Physical-Chemical Aspects of Protein Corona: Relevance to in Vitro and in Vivo Biological Impacts of Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 2525-2534, doi:10.1021/ja107583h (2011).
- (11) Ehrlich, M. et al. Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits. *CEL* 118, 591-605, doi:10.1016/j.cell.2004.08.017 (2004).
- (12) MacGillivray, R. T. A. et al. Two High-Resolution Crystal Structures of the Recombinant N-Lobe of Human Transferrin Reveal a Structural Change Implicated in Iron Release. *Biochemistry* 37, 7919-7928, doi:10.1021/bi980355j (1998). 30
- (13) Min, Y., Akbulut, M., Kristiansen, K., Golan, Y. & Israelachvili, J. The role of interparticle and external forces in nanoparticle assembly. *Nat. Mater.* 7, 527-538, doi:10.1038/nmat2206 (2008).
- (14) Fleck, C. C. & Netz, R. R. Electrostatic colloid-membrane binding. *Europhys. Lett.* 67, 314-320, doi:10.1209/epl/i2004-10068-x (2004).
- (15) Dagastine, R. R. et al. Dynamic Forces Between Two Deformable Oil Droplets in Water. *Science (Washington, DC, United States)* 313, 210-213, doi:10.1126/science.1125527 (2006). 40
- (16) McGraw, T. E., Greenfield, L. & Maxfield, F. R. Functional expression of the human transferrin receptor cDNA in Chinese hamster ovary cells deficient in endogenous transferrin receptor. *JCB* 105, 207-214, doi:10.2307/1612534 (1987).

- (17) Parhi, P., Golas, A., Barnthip, N., Noh, H. & Vogler, E. A. Volumetric interpretation of protein adsorption: Capacity scaling with adsorbate molecular weight and adsorbent surface energy. *Biomaterials* 30, 6814-6824, doi:10.1016/j.biomaterials.2009.09.005 (2009).
- (18) Harding, C., Heuser, J. & Stahl, P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *JCB* 97, 329-339, doi:10.2307/1610388 (1983). 10
- (19) Lillo, M. P., Cañadas, O., Dale, R. E. & Acuña, A. U. Location and properties of the taxol binding center in microtubules: a picosecond laser study with fluorescent taxoids. *Biochemist* 41, 12436-12449 (2002).
- (20) Jordan, M. A. & Wilson, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Can* 4, 253-265, doi:10.1038/nrc1317 (2004).
- (21) Stewart, K. M., Horton, K. L. & Kelley, S. O. Cell-penetrating peptides as delivery vehicles for biology and medicine. *Org Biomol Chem* 6, 2242-2255, doi:10.1039/b719950c (2008). 20
- (22) Hyuk, I. S., Jeong, U. & Xia, Y. Polymer hollow particles with controllable holes in their surfaces. *Nat. Mater.* 4, 671-675, doi:10.1038/nmat1448 (2005).

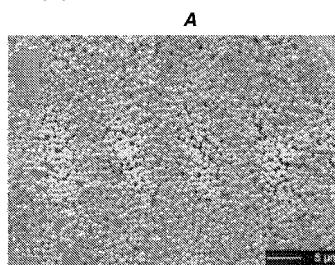
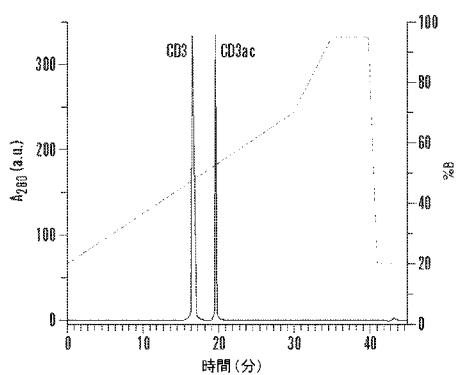
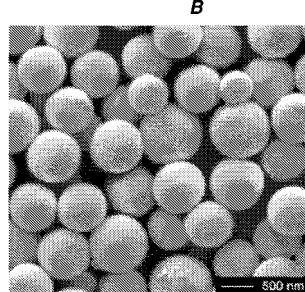
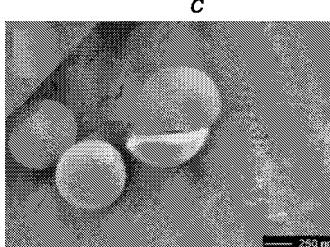
## 【 0 3 4 8 】

本明細書で特定されているすべての特許およびその他の刊行物の内容は、すべての目的のために、明示的に参照により本明細書に組み入れられる。これらの刊行物は、単に本願の出願日より前にそれらが開示されていたことから提供されるにすぎない。これに関連するいかなる事情も、先行発明であることを理由としてまたは任意のその他の理由から本発明者らがそのような開示よりも先の日付を主張する資格を有さないことの承認として扱われるべきではない。これらの書類の日付に関する言及または内容に関する表示はすべて、出願人が入手し得た情報に基づいており、これらの書類の日付または内容の正確さに関する承認となるものではない。

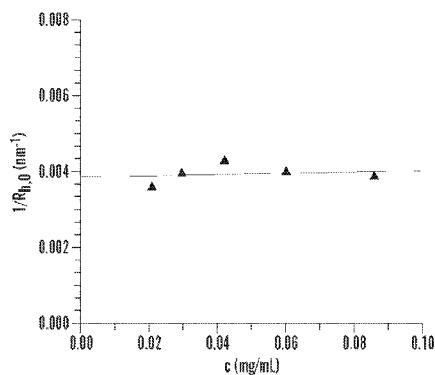
【図1】

**A**

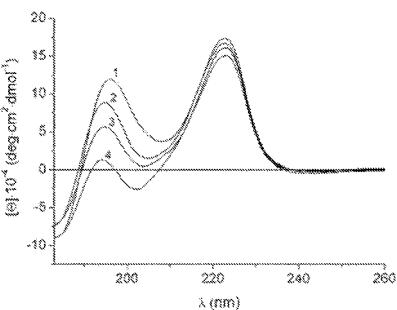
【図2】

**A****B****B****C**

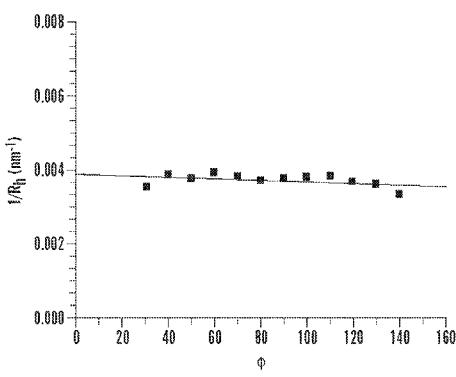
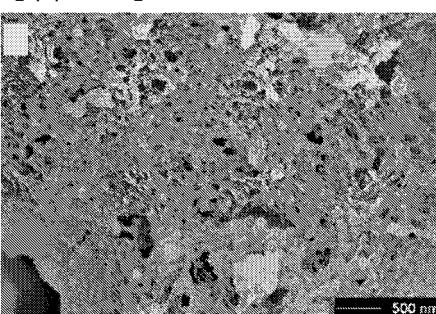
【図3】

**A**

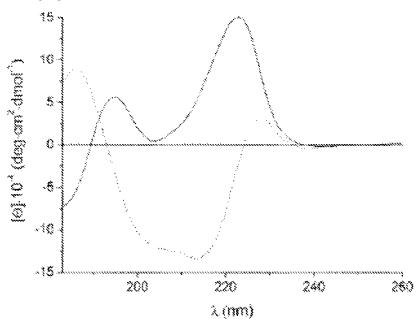
【図4】



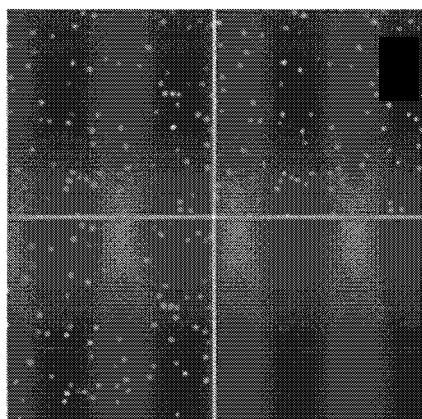
【図5 A】

**B**

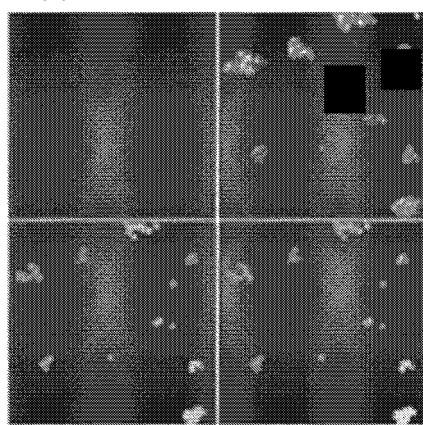
【図 5 B】



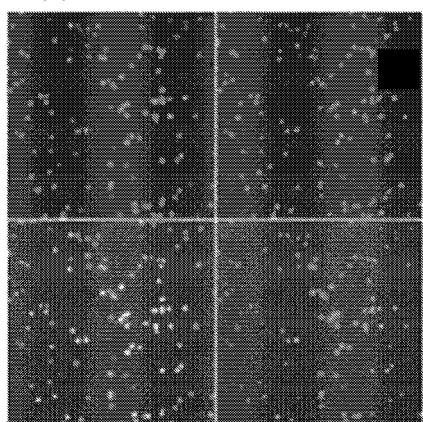
【図 6 A】



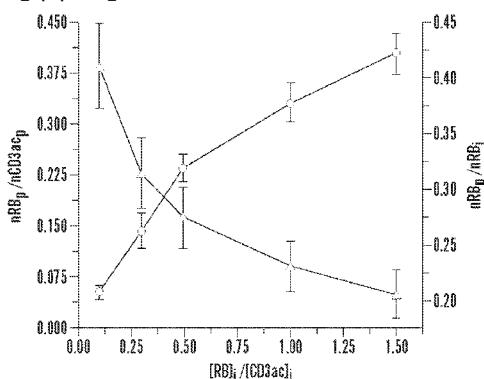
【図 6 B】



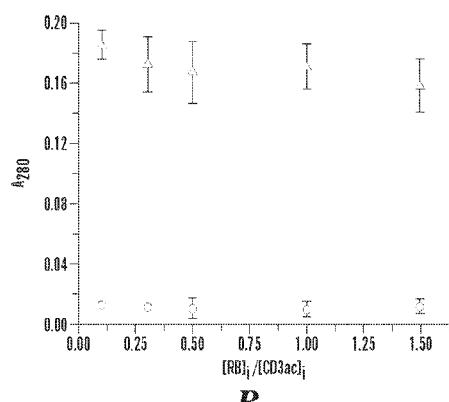
【図 6 C】



【図 7】

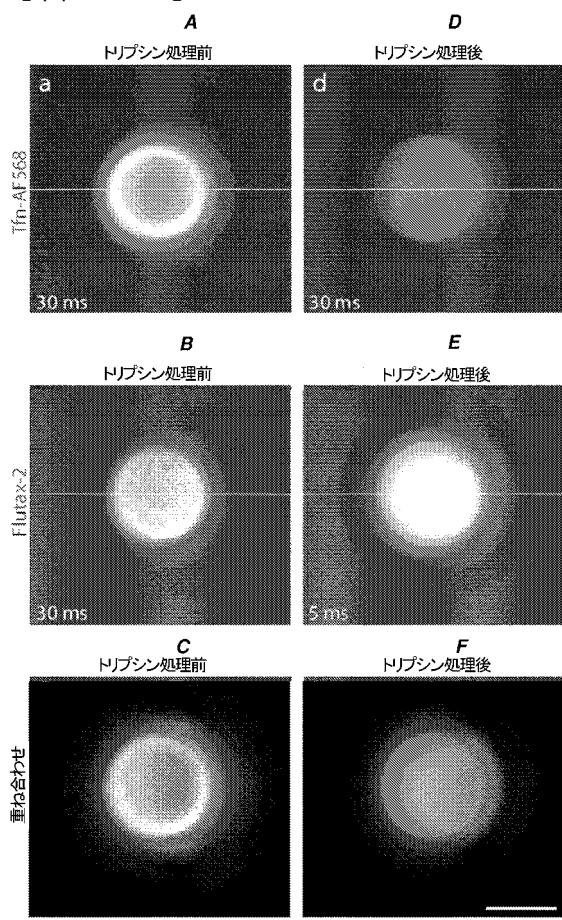


A

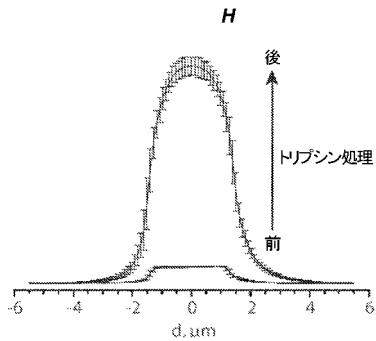
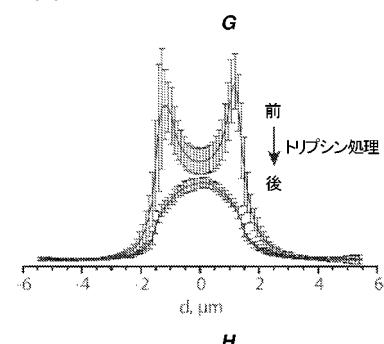


B

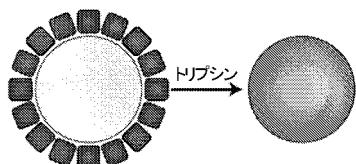
【図 8 - 1】



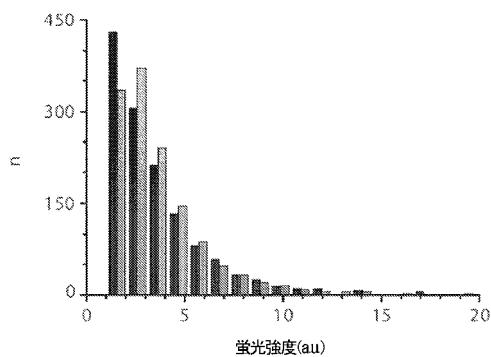
【図 8 - 2】



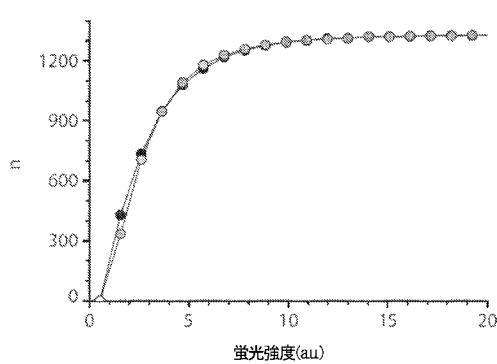
I



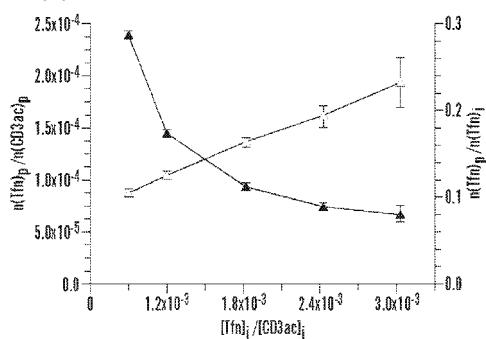
【図 9 C】



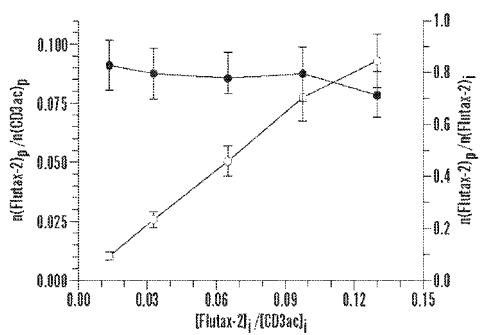
【図 9 D】



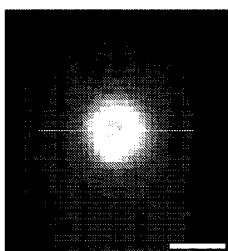
【図 9 A】



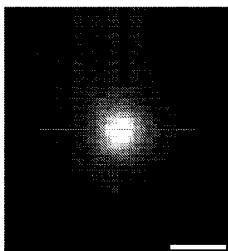
【図 9 B】



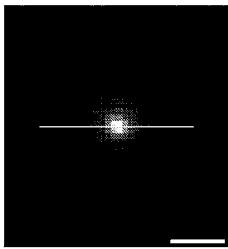
【図 10 A】



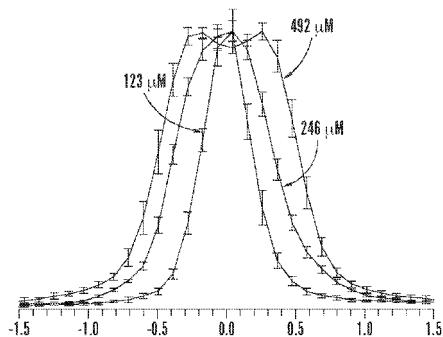
【図 10 B】



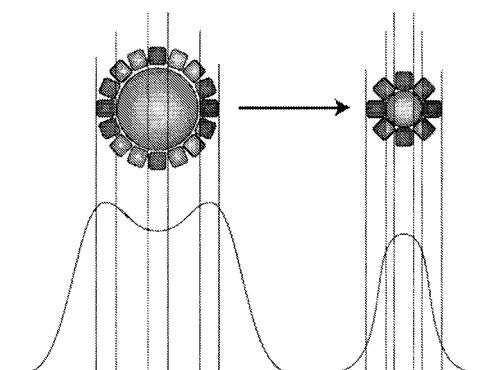
【図 10 C】



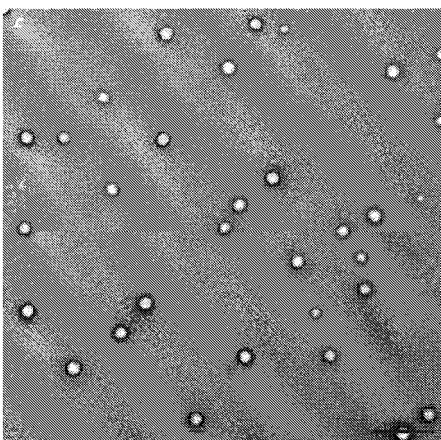
【図 10 D】



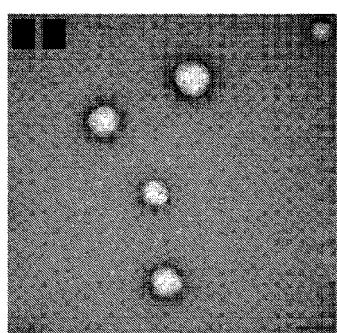
【図 10 E】



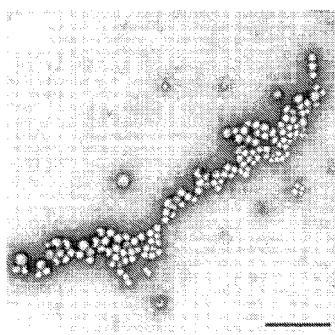
【図 10 F】



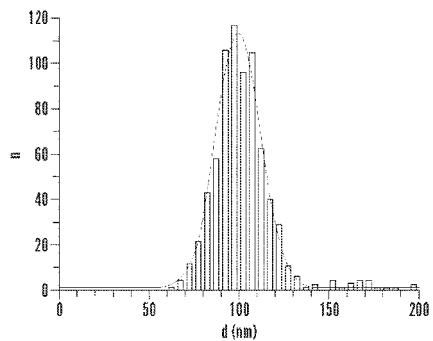
【図 10 G】



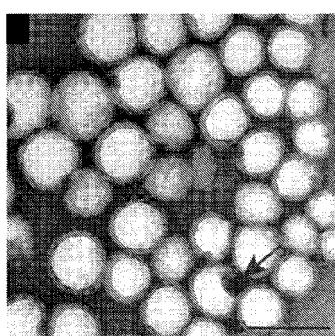
【図 10 H】



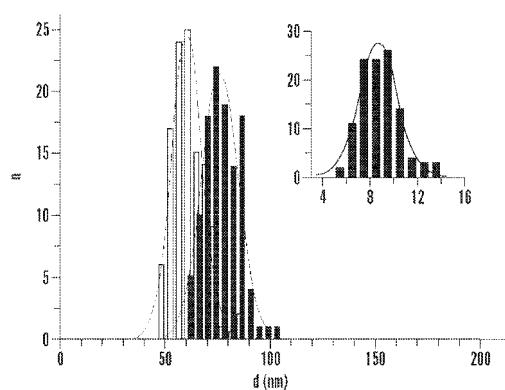
【図 10 J】



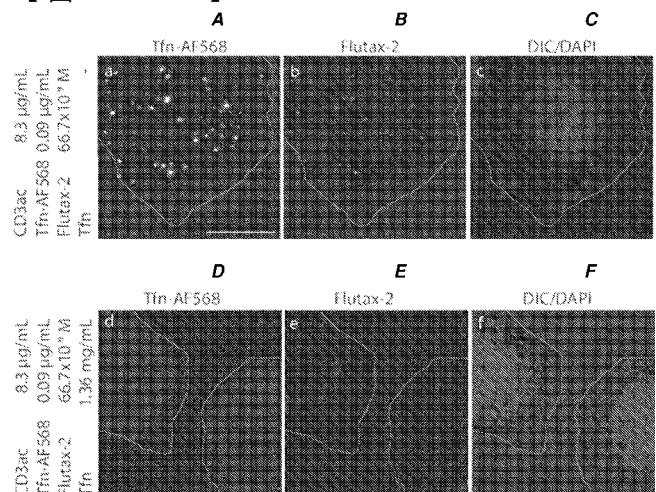
【図 10 I】



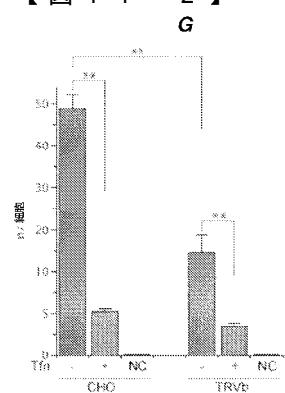
【図 10 K】



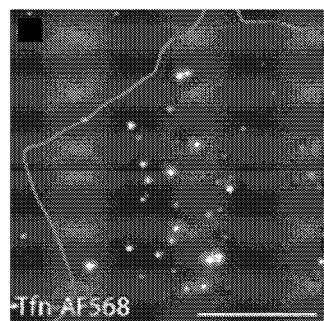
【図 1 1 - 1】



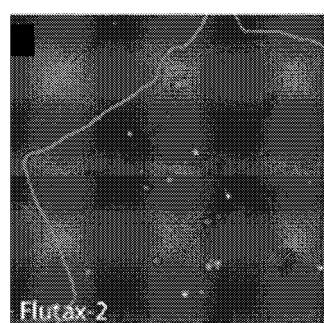
【図 1 1 - 2】



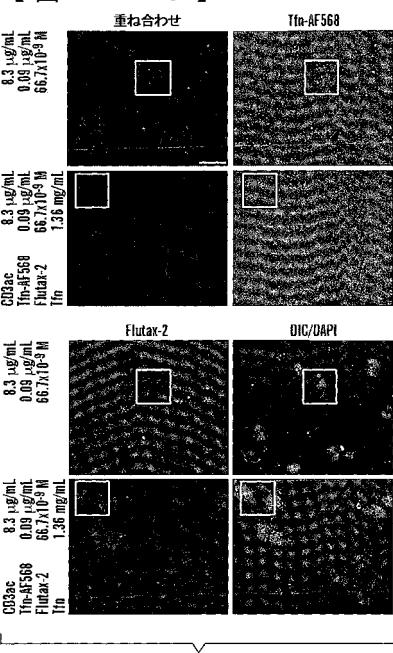
【図 1 2 A】



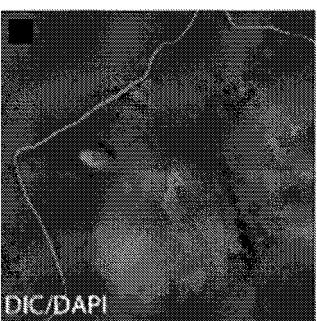
【図 1 2 B】



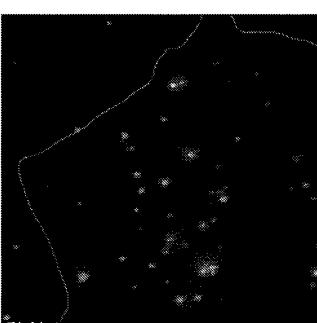
【図 1 1 - 3】



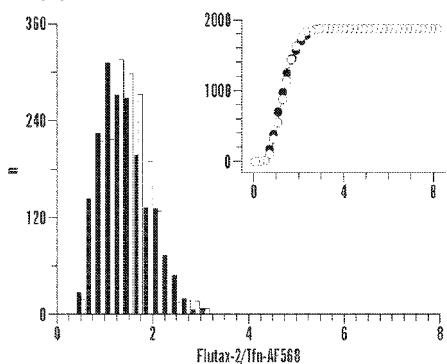
【図 1 2 C】



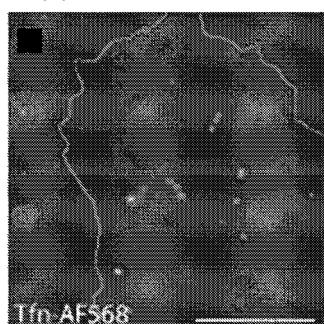
【図 1 2 D】



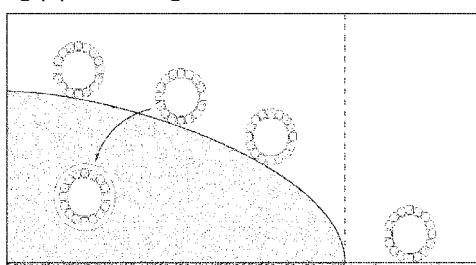
【図 1 2 E】



【図 1 2 G】



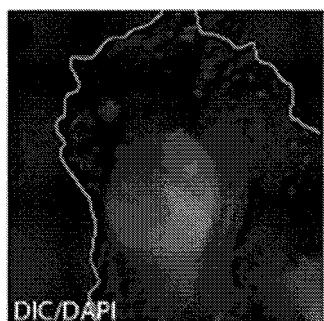
【図 1 2 F】



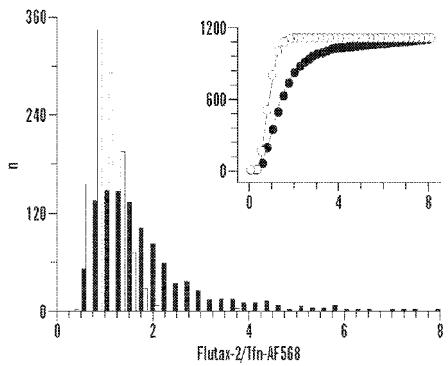
【図 1 2 H】



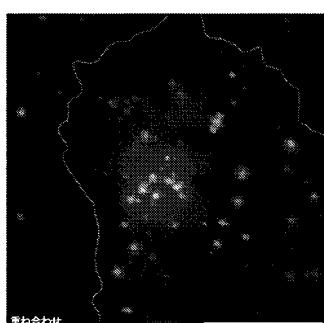
【図 1 2 I】



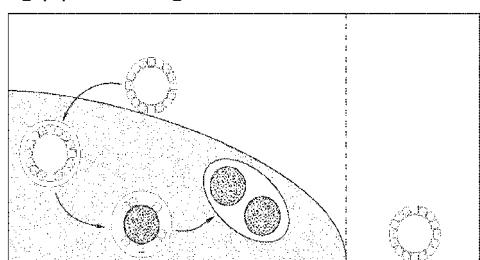
【図 1 2 K】



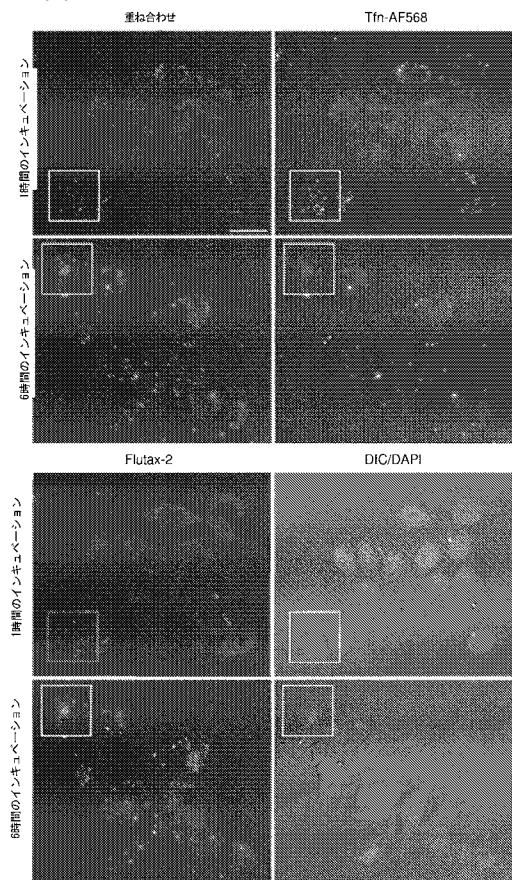
【図 1 2 J】



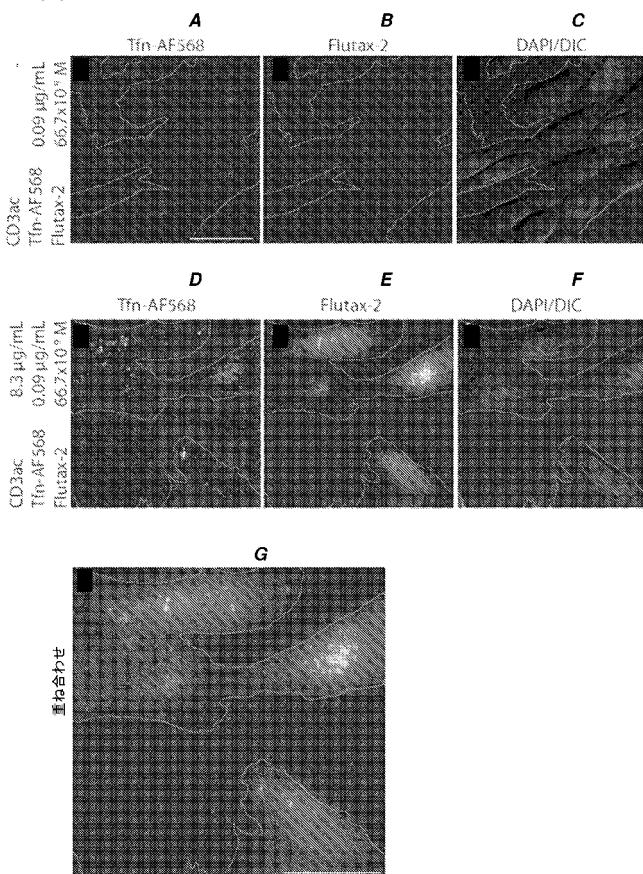
【図 1 2 L】



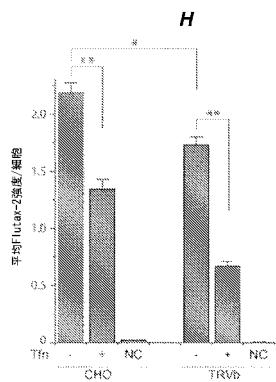
【図 1 2 M】



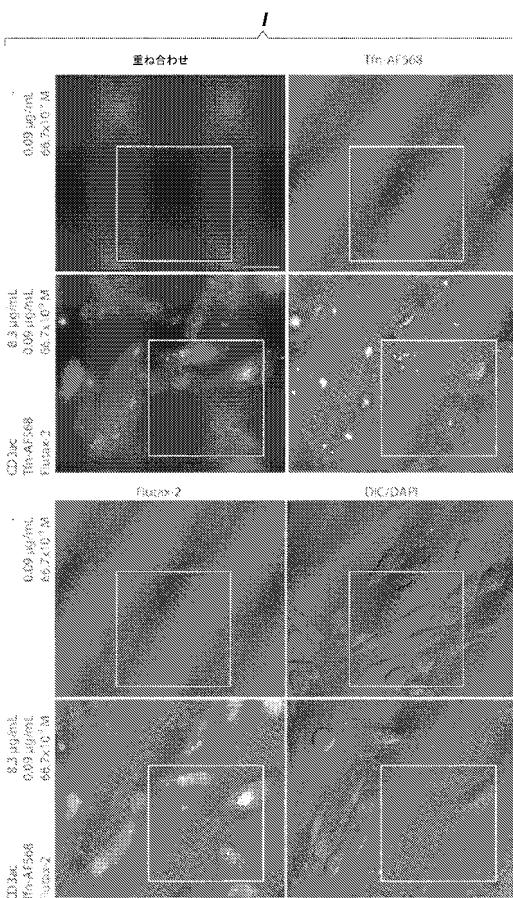
【図 1 3 - 1】



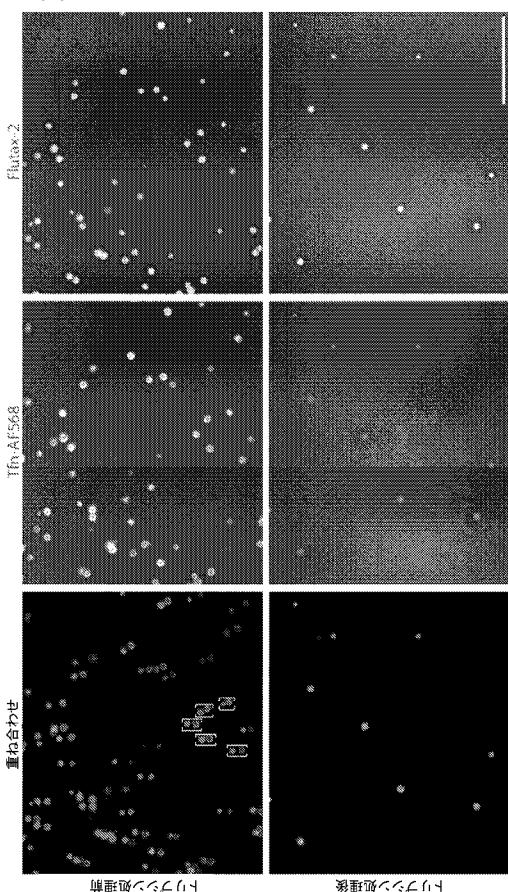
【図 1 3 - 2】



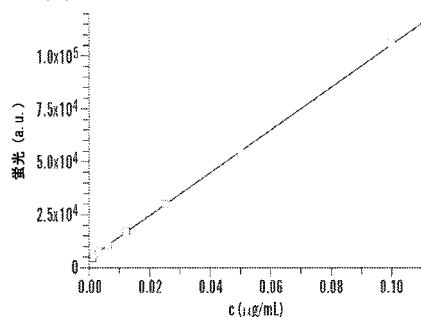
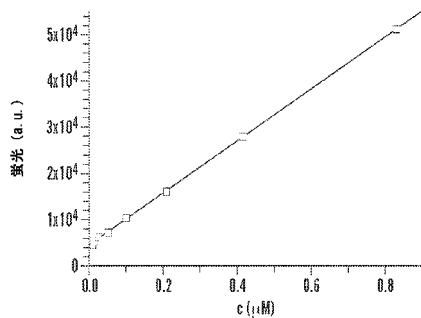
【図 1 3 - 3】



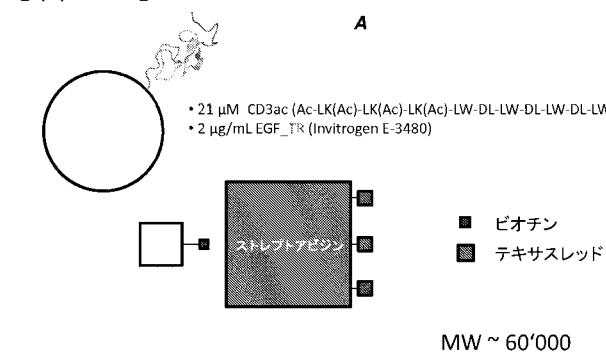
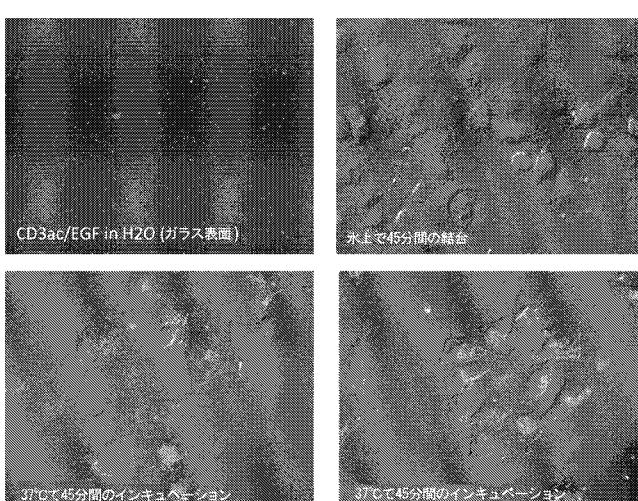
【図 14】



【図 15】

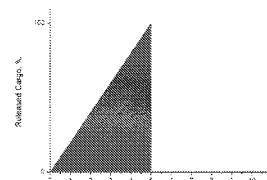
**A****B**

【図 16】

**B**

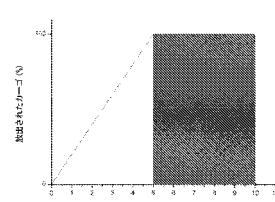
【図 17 A】

- PB1e**
- 21  $\mu\text{M}$  CD3ac (Ac-LK(Ac)-LK(Ac)-LK(Ac)-LW-DL-LW-DL-LW-NH<sub>2</sub>)
  - 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  EGF<sub>TR</sub>
  - 20  $\mu\text{M}$  ノコダゾール
  - DMEM/PBS
- 陰性対照 (NC)**
- DMEM/PBS

PB1e上清対照 (PB1e<sub>sup</sub>)

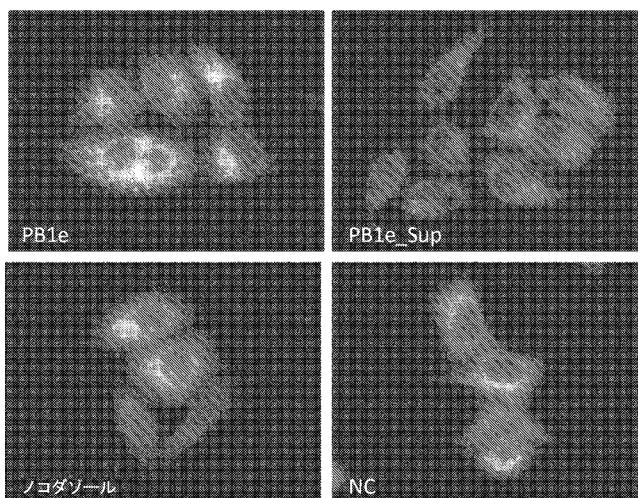
ノコダゾール(NOC)

- 21  $\mu\text{M}$  CD3ac (Ac-LK(Ac)-LK(Ac)-LK(Ac)-LW-DL-LW-DL-LW-NH<sub>2</sub>)
- 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  EGF<sub>TR</sub>
- 20  $\mu\text{M}$  ノコダゾール
- DMEM/PBS
- 37 °Cで5時間インキュベート
- 16,000g, 30分間スピンドラウ
- 上清を細胞に適用



【図 17B】

37°Cで1時間のインキュベーション



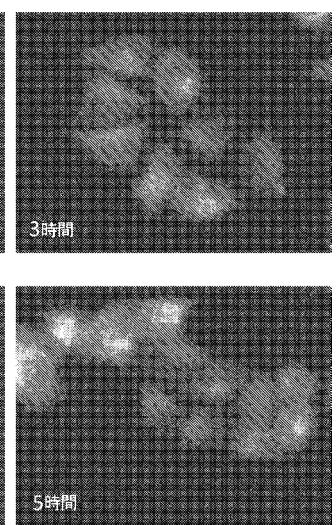
【図 17C】

2時間

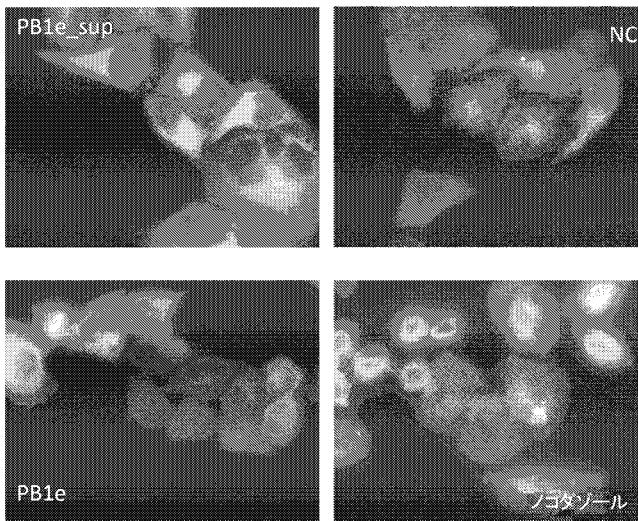
3時間

4時間

5時間



【図 17D】



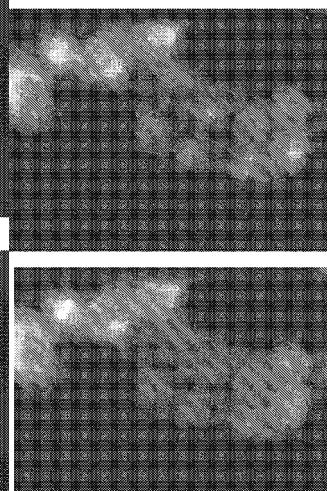
【図 17E】

PB1e

PB1e\_sup

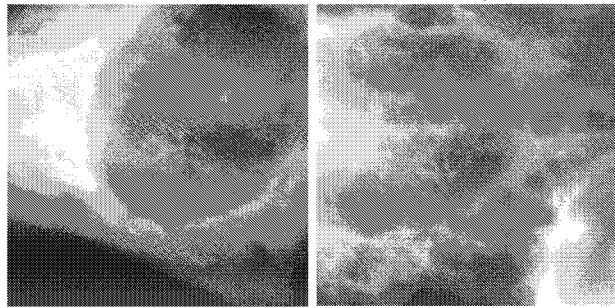
NC

NodA source



【図 17 F】

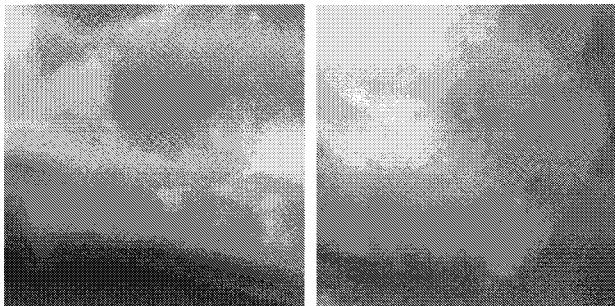
PB1e\_sup



NC

PB1e

ノコダゾール



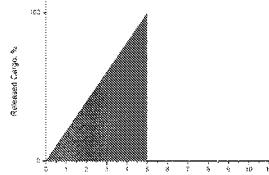
【図 17 G】

PB1e

陰性対照 (NC)

- 21  $\mu$ M CD3ac (Ac-LK(Ac)-LK(Ac)-LK(Ac)-LW-DL-LW-DL-LW-NH<sub>2</sub>)
- 2  $\mu$ g/mL テキサスレッド標識EGF(EGF\_TR)
- 40  $\mu$ M ノコダゾール
- DMEM/PBS

- DMEM/PBS

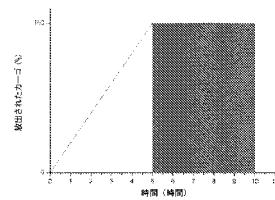


PB1e 上清対照 (PB1e\_sup)

ノコダゾール(NOC)

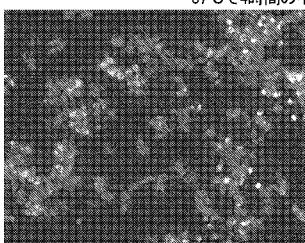
- 21  $\mu$ M CD3ac (Ac-LK(Ac)-LK(Ac)-LK(Ac)-LW-DL-LW-DL-LW-NH<sub>2</sub>)
- 2  $\mu$ g/mL EGF\_TR
- 40  $\mu$ M ノコダゾール
- DMEM/PBS
- 37 °C で5時間インキュベート
- 16,000g, 30分間スピンドラウン
- 上清を細胞に適用

- 40  $\mu$ M ノコダゾール
- DMEM/PBS

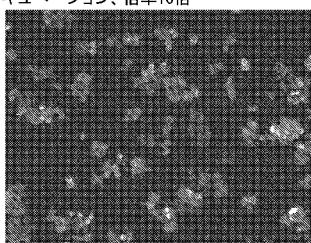


【図 17 H】

37°Cで4時間のインキュベーション、倍率10倍



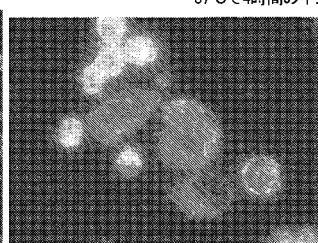
PB1e



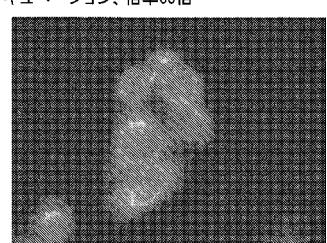
PB1e\_sup

【図 17 I】

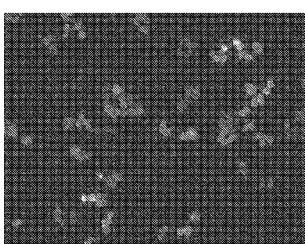
37°Cで4時間のインキュベーション、倍率60倍



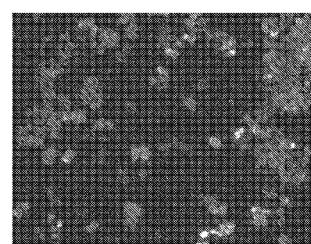
PB1e



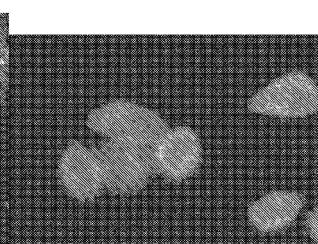
PB1e\_sup



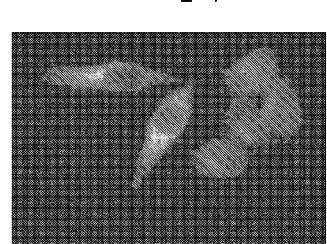
ノコダゾール



NC



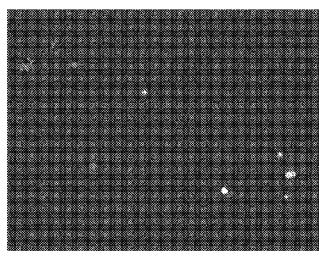
ノコダゾール



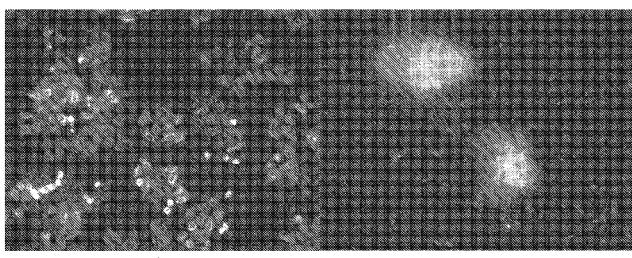
NC

【図 17 J】

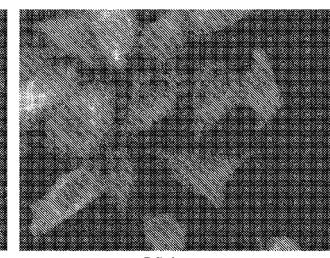
37°Cで24時間のインキュベーション、倍率10倍



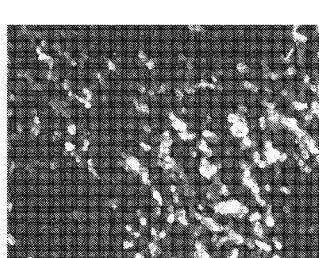
PB1e



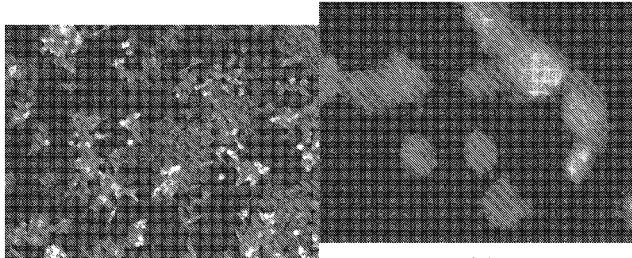
PB1e\_sup



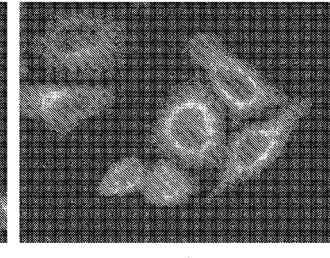
PB1e



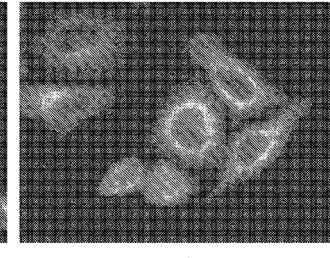
ノコダゾール



NC

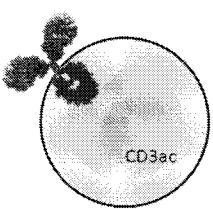
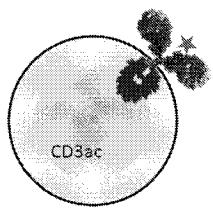


ノコダゾール

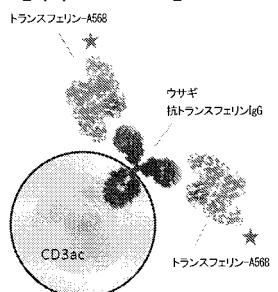


NC

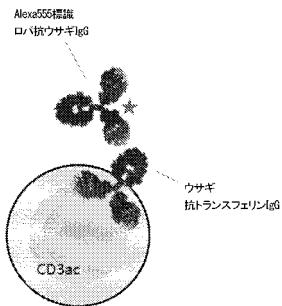
【図 18 A】

CD3acおよび1次抗体  
(例えば、ウサギ抗トランスフェリンIgG)CD3acおよび2次抗体  
(例えば、ロバ抗ウサギIgG  
(注意で、Alexa 555等の  
蛍光分子で標識される))

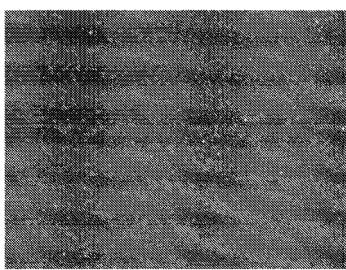
【図 18 B】

トランスフェリン-A568  
ウサギ  
抗トランスフェリンIgG  
トランスフェリン-A568

【図 18 C】

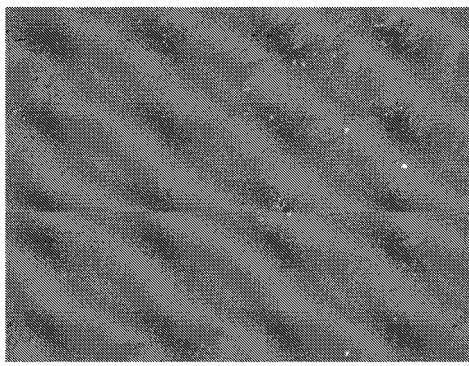
Alexa555標識  
ロバ抗ウサギIgGウサギ  
抗トランスフェリンIgG

【図 19 A】



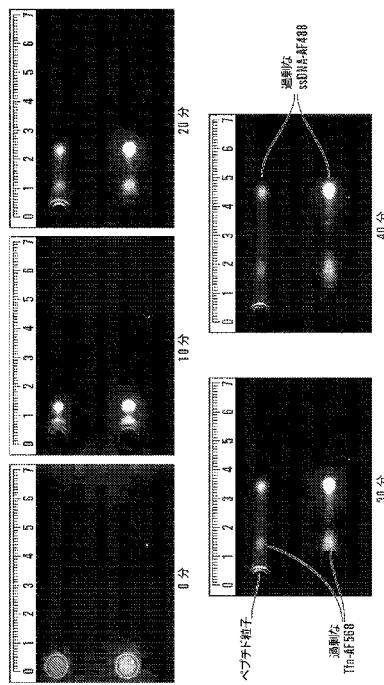
- 21 μM CD3 (H-LK-LK-LW-DL-LW-DL-LW-DL-LW-NH<sub>2</sub>)<sup>4+</sup>
- 5.4 μM (5'-TTGTGCCCTTGAGGTGTATC-3')<sup>24-</sup>
- 0.24 μM (A<sub>F<sub>34</sub></sub>-5'-TTGTGCCCTTGAGGTGTATC-3')<sup>24-</sup>

【図 19 B】

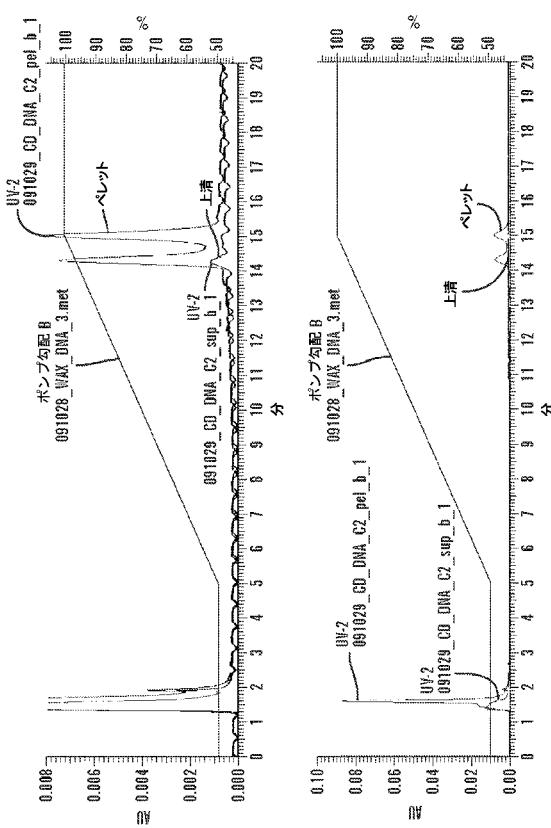


• 5.4 μM (5'-TTGTGCCGCTTGCAAGGTGTATC-3')<sup>24</sup>  
• 0.24 μM (AF<sub>488</sub>-5'-TTGTGCCGCTTGCAAGGTGTATC-3')<sup>24</sup>

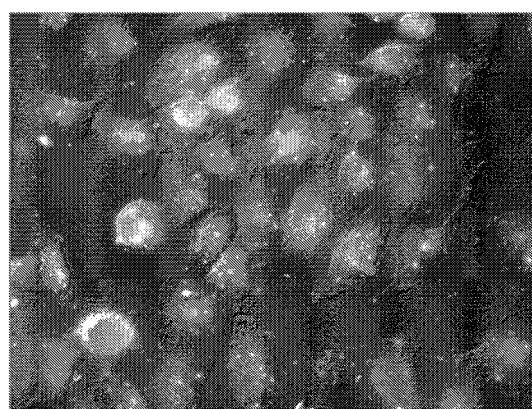
【図 20 A】



【図 20 B】

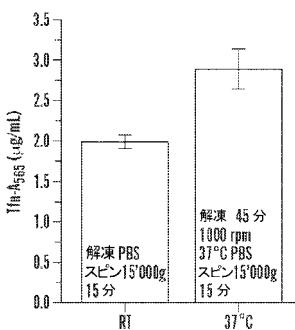


【図 21】

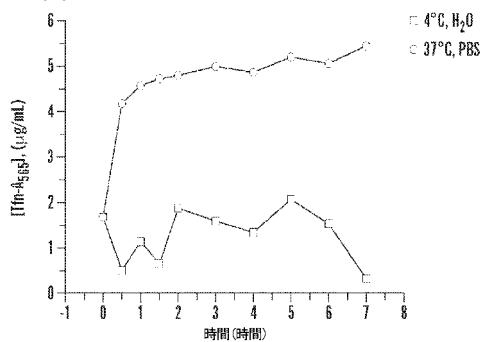


5.13 μM CD3ac (Ac-LK(Ac)-LK(Ac)-LK(Ac)-LW-DL-LW-DL-LW-NH<sub>2</sub>)  
0.83 μM CD3 (H-LK-LK-LK-LW-DL-LW-DL-LW-NH<sub>2</sub>)<sup>24</sup>  
0.45 μM (5'-TTGTGCCGCTTGCAAGGTGTATC-3')<sup>24</sup>  
20 nM (AF488-5'-TTGTGCCGCTTGCAAGGTGTATC-3')<sup>24</sup>  
4.14 μg/ml Tfn-AF568

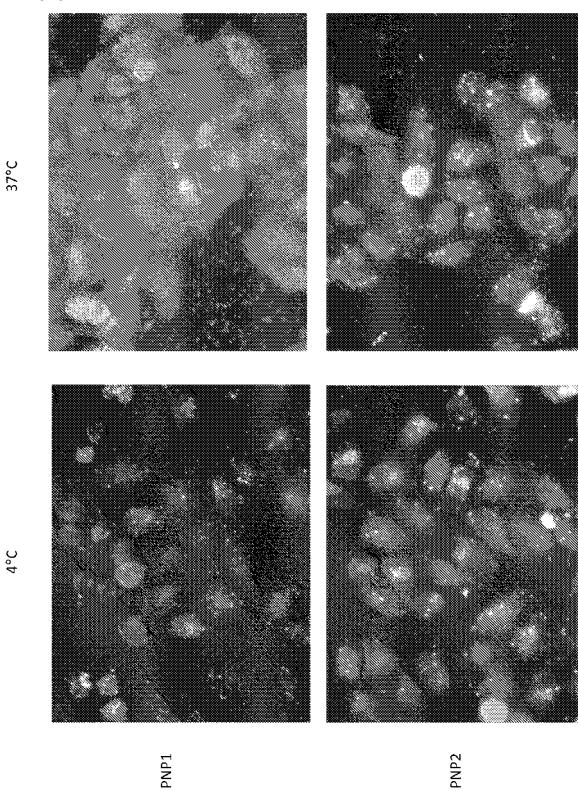
【図 22 A】



【図 2 2 B】



【図 2 2 C】



【図 2 2 D】



【手続補正書】

【提出日】平成26年6月9日(2014.6.9)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2014524477000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2012/052027

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. C07K7/06 C07K7/08 C07K14/00  
ADD.

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)  
C07K

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

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

EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	C DITTRICH & W MEIER: "Solid peptide nanoparticles -structural characterization and quantification of cargo encapsulation", MACROMOLECULAR BIOSCIENCE, vol. 10, 2010, pages 1406-1415, XP002688084, Weinheim, DE the whole document ----- -/-	1,2, 5-10, 12-17, 19,20

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

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

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

28 November 2012

10/12/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Masturzo, Pietro

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2012/052027
---

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	L COLLINS ET AL.: "Self-assembly of peptides into spherical nanoparticles for delivery of hydrophilic molecules into the cytosol", ACS NANO, vol. 4, no. 5, 2010, pages 2856-2864, XP002688085, ACS ISSN: 1530-6984 the whole document -----	3,11,17
A	WO 2009/109428 A2 (ALPHA-0 PEPTIDES) 11 September 2009 (2009-09-11) the whole document -----	1-20
X,P	C DITTRICH ET AL.: "Delivery of membrane impermeable cargo into CHO cells by peptide nanoparticles targeted by a protein corona", BIOMATERIALS., vol. 33, 9 January 2012 (2012-01-09), pages 2746-2753, XP002688086, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING. ISSN: 0142-9612 the whole document -----	1-20

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No  
PCT/US2012/052027

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2009109428	A2	11-09-2009	AU 2009221419 A1	11-09-2009
			CA 2713879 A1	11-09-2009
			CN 101932594 A	29-12-2010
			EP 2235043 A2	06-10-2010
			JP 2011511773 A	14-04-2011
			RU 2010135965 A	10-03-2012
			US 2011020378 A1	27-01-2011
			WO 2009109428 A2	11-09-2009

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/42 C 1 2 N 15/113	(2006.01) (2010.01)	A 6 1 K 47/42 C 1 2 N 15/00 G

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

(74)代理人 100142929  
弁理士 井上 隆一  
(74)代理人 100148699  
弁理士 佐藤 利光  
(74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一  
(74)代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦  
(74)代理人 100130845  
弁理士 渡邊 伸一  
(74)代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人  
(74)代理人 100114889  
弁理士 五十嵐 義弘  
(74)代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥  
(72)発明者 ディットリッチ クリストイアン  
スイス連邦 ヴィンタートゥール ミュージアムシュトラーセ 3  
(72)発明者 ダヌセール ガウデンツ  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケンブリッジ プレンティス ストリート 65  
F ターム(参考) 4B024 AA01 CA11 GA11 HA17  
4C076 AA31 EE41N FF34  
4C084 AA13 NA13  
4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA05 NA13  
4H045 BA01 BA15 EA20 FA10