

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成22年7月29日(2010.7.29)

【公表番号】特表2006-508896(P2006-508896A)

【公表日】平成18年3月16日(2006.3.16)

【年通号数】公開・登録公報2006-011

【出願番号】特願2004-501585(P2004-501585)

【国際特許分類】

A 6 1 K 47/18 (2006.01)

A 6 1 K 31/7088 (2006.01)

A 6 1 K 47/28 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 P 31/00 (2006.01)

A 6 1 P 31/04 (2006.01)

A 6 1 P 31/12 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

A 6 1 K 47/18

A 6 1 K 31/7088

A 6 1 K 47/28

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 31/00

A 6 1 P 31/04

A 6 1 P 31/12

A 6 1 P 43/00 1 0 5

C 1 2 N 15/00 A

【誤訳訂正書】

【提出日】平成22年6月7日(2010.6.7)

【誤訳訂正1】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0009

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0009】

1つの局面において、本発明は、核酸、エンドソーム溶解性 (endosomolytic) スペルミン (コレステロールまたは脂肪酸を含む)、および標的指向性 (targeting) スペルミン (細胞表面分子に対するリガンドを含む) を含む組成物を特徴とする。組成物の正電荷と負電荷との比は0.5から1.5までの範囲にある；エンドソーム溶解性 スペルミンは組成物中のスペルミン含有分子の少なくとも20%を占める；さらに標的指向性スペルミンは組成物中のスペルミン含有分子の少なくとも10%を占める。正電荷と負電荷との比は0.8から1.2までの範囲 (例えば、0.8から0.9までの範囲) であることが望ましい。

【誤訳訂正2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0010

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0010】

核酸がDNAを含む場合には、エンドソーム溶解性スペルミンが組成物中のスペルミン含有分子の40%から90%までの範囲を占めること、および／または、標的指向性スペルミンが組成物中のスペルミン含有分子の10%から60%までの範囲を占めることが望ましい。核酸がRNAである場合には、エンドソーム溶解性スペルミンが組成物中のスペルミン含有分子の20%から90%までの範囲を占める、および／または標的指向性スペルミンが組成物中のスペルミン含有分子の10%から80%までの範囲を占める。望ましい態様において、標的指向性スペルミンは組成物中のスペルミン含有分子30%から40%までの範囲を占め、エンドソーム溶解性スペルミンは組成物中のスペルミン含有分子の60%から70%までの範囲を占める。標的指向性スペルミンが組成物中のスペルミン含有分子の35%を占め、エンドソーム溶解性スペルミンが組成物中のスペルミン含有分子の65%を占めることが望ましい。

【誤訳訂正3】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0014

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0014】

いくつかの態様において、1つのエンドソーム溶解性スペルミンは、コレステロールを2つ、脂肪酸を2つ、またはコレステロール1つと脂肪酸1つを含む。脂肪酸は同じでも異なってもよい。さまざまな態様において、標的指向性スペルミンは細胞表面分子に対するリガンドを2つ含む。リガンドは同じでも異なってもよい。望ましい態様において、組成物は少なくとも2つの異なるエンドソーム溶解性スペルミンおよび／または少なくとも2つの異なる標的指向性スペルミンを含む。2種類またはそれ以上の標的指向性スペルミンの使用により、特定の細胞種に対する組成物の特異性は少なくとも25、50、75、100、200、500、または700%高めることが好ましい。いくつかの態様において、1つのエンドソーム溶解性スペルミンはコレステロールを1つ含み、1つのエンドソーム溶解性スペルミンは脂肪酸を1つ含む。このような組成物はコレステロール部分 (moiety) を脂肪酸部分よりも多く含むことが望ましい。さまざまな態様において、リガンドは、ペプチド (例えば、100、50、もしくは10アミノ酸未満のペプチド、またはRGDモチーフを有するペプチド)、抗体、ビオチン、葉酸受容体リガンド、ラクトース、フコース (例えば、M細胞または癌細胞の表面のフコース受容体に対するリガンド) またはマンノース部分である。リガンドがスペルミン中の第二級アミンとリンカーを介して結合していること、および／またはコレステロール中のC3位の酸素がスペルミン中の第二級アミンとリンカーを介して結合していることが望ましい。脂肪酸はスペルミン中の第二級アミンと直接結合していて、しかも遊離カルボン酸基 (COOH) を有することが望ましい。例となるリンカーは、3個から12個までの範囲の炭素原子、例えばC₃からC₁₂までの範囲の飽和型または不飽和型の炭化水素部分を含む。望ましい態様において、リンカーは炭素原子を3個もしくは4個含んでいて二重結合は含まない、リンカーは炭素原子を5個もしくは6個含んでいて二重結合を最大1個含む、またはリンカーは炭素原子を7個から12個までの範囲で含んでいて二重結合を最大2個含む。リンカーが炭素原子を5個含んでいることが望ましい。望ましい態様において、リンカーは非分枝型アルキル基である。いくつかの態様において、リンカーは分枝型または非分枝型のPEGである。リンカーは、末端のカルボキシル、アミノ、ヒドロキシル、スルフィドリル、アルキル、カルボキサミド、カルバメート、チオカルバメートまたはカルバモイル架橋基を介してスペルミンの第二級アミン基と結合していることが望ましい。

【誤訳訂正4】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0054

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0054】

「インターフェロン応答またはdsRNAストレス応答が抑制または阻止される条件下」と

は、細胞毒性、細胞死、抗増殖性応答またはdsRNAがPTGSイベントもしくはTGSイベントを遂行する能力の低下を伴う、1つまたは複数のインターフェロン応答または細胞RNAストレス応答が阻止または抑制される条件のことを意味する。これらの応答には、インターフェロン誘導（I型およびII型の両方）、インターフェロンにより賦活される1つまたは複数の遺伝子の誘導、PKR活性化、2'5'-OAS活性化、ならびにこれらの応答の1つまたは複数の活性化／誘導に起因する、下流での任意の細胞性および／または生物体性の二次的結果が非制限的に含まれる。「生体性の二次的結果（organismal sequelae）」とは、ストレス応答によって引き起こされる、動物個体、臓器またはより局所的な（例えば、注射部位での）任意の影響のことを意味する。徴候の例には、サイトカイン産生の上昇、局所炎症および壊死が含まれる。これらの応答を抑制する条件は、本発明の組成物を用いずに導入した細胞（例えば、本発明の標的指向性スperlミンおよびエンドソーム溶解性スperlミンにも水中油型エマルションにも曝露されていない同じ細胞種）に比して、細胞の95%、90%、80%、75%、60%、40%、または25%以下、最も望ましくは10%以下が細胞毒性、細胞死またはPTGS、TGSもしくは別の遺伝子サイレンシングイベントを遂行する能力の低下を来すようなものであることが望ましい。

【誤訳訂正5】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0067

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0067】

「エンドソーム溶解性スperlミン」とは、コレステロールまたは脂肪酸の共有結合によって修飾された、エンドソーム小胞の破壊を促すスperlミンのことを意味する。例えば、エンドソーム溶解性スperlミンはエンドソーム小胞の膜内に挿入されてそれを不安定化することができる。エンドソーム溶解性スperlミンはエンドソーム小胞の破壊を非修飾スperlミンよりも少なくとも20、40、60、80、100、200、500、1000、または5000%増大させることが望ましい。

【誤訳訂正6】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0070

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0070】

利点

本発明の組成物および方法にはさまざまな利点がある。例えば、本組成物は一般に、細胞における毒性（仮にあるとしても）をわずかしき引き起こさない。特に、本組成物は細胞培養物の細胞増殖速度にわずかな影響しか及ぼさず、このことは本組成物がほとんど毒性を引き起こさないことを意味する。スperlミン含有分子を標的指向性分子およびエンドソーム溶解性分子として用いると、より多くのアミン基を有する他のポリアミンを用いた場合よりも生じる毒性が少ない。スperlミンよりも多数のアミン基を有するポリアミンはDNAとより高い親和性で結合するため、組成物中の核酸と結合したまま保たれ、細胞または動物に導入された後に核酸の所望の生物学的機能を抑制する可能性が高い。すなわち、スperlミンは、細胞および動物への機能的核酸の導入が容易になるような、核酸に対する（より望ましい）弱い親和性を有する。

【誤訳訂正7】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0071

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0071】

本発明の組成物中に1つまたは複数の標的指向性スペルミンを用いることにより、動物体内の所望の細胞または組織に対する組成物の特異性が向上する。エンドソーム溶解性スペルミンを用いると、投与された核酸がエンドソーム小胞から放出されて所望の生物学的機能を発揮する能力が高まる。これに対して、修飾抗体を用いて核酸を細胞に送達するためのある従来の方法では、DNA取込みの高度の特異性および効率がこれらの検討で示されたものの、コードされているタンパク質を発現したのは細胞の5%に過ぎなかった（Mohrら、Hepatology（1999）29: 82-89）。

【誤訳訂正8】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0074

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0074】

本発明の1つの組成物は、核酸、エンドソーム溶解性スペルミン（コレステロールまたは脂肪酸を含む）および標的指向性スペルミン（細胞表面分子に対するリガンドを含む）を含む。組成物の正電荷と負電荷との比は0.5から1.5までの範囲にある。エンドソーム溶解性スペルミンは組成物中のスペルミン含有分子の少なくとも20%を占める。さらに標的指向性スペルミンは組成物中のスペルミン含有分子の少なくとも10%を占める。標的指向性スペルミンは組成物を目的の特定の細胞または組織に局在させるように設計されている。エンドソーム溶解性スペルミンはエンドサイトーシス過程で組成物を封入するエンドソーム小胞を破壊し、エンドソーム小胞から細胞の細胞質中または核内への核酸の放出を促す。

【誤訳訂正9】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0108

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0108】

本明細書に記載の送達システムは、核酸分子と、それと複合体を形成して粒子を形成する2種類のポリアミン分子（すなわち、受容体特異的なポリアミンリガンド分子とエンドソーム膜を攪乱させるエンドソーム溶解性ポリアミン分子）との相互作用により完全に主導される自己集合過程によって形成される、1ミクロン未満の構造（20～100nm粒子）を生じさせる。これらの粒子の構築様式はそれらの機能にとって非常に重要である。集合過程では、ナノ粒子の構築に用いられるモノマー単位および自己-自己-自己集合の速度が構築様式を規定し、それによってこれらの粒子の機能を規定する。このような場合に、モノマー単位は、それらがDNAと相互作用してこれらの微小担体中へのDNAの配合量を増加させ、それによってDNA分子自体の構造的な関与を伴う構造を形成する能力に基づいて作製されている。送達媒体のモノマー単位と核酸との間の個々の相互作用はすべて極めて弱く、容易に転換される。

【誤訳訂正10】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0112

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0112】

本発明者らのターゲティングシステムは、ポリアミン骨格、より詳細にはスペルミン骨格を基盤とする。本発明者らは2つのタイプのスペルミン誘導体を開発しており、その一方はポリアミンの窒素原子と結合した標的指向性リガンドを有する誘導体であり、もう一方はポリアミンの窒素原子と結合したエンドソーム膜破壊促進成分（例えば、コレステロールまたは脂肪酸）を有する誘導体である。標的指向性リガンドおよびエンドソーム膜破

壊促進成分はそれぞれのポリアミンと、適したリンカー基を介して、例えばPEGスペーサーアームを介して、または例えばアルキル、カルボキシアミド、カルバメート、チオカルバメートもしくはカルバモイル架橋原子団を介して結合してよい。エンドソーム溶解性分子および標的指向性分子はそれぞれ、選択されたリンカーを介してスペルミン分子の第二級窒素と結合している。2種類のスペルミン誘導体を種々の比で混合することにより、さまざまな構築様式を有する複合体がDNAとの間に形成されうことは合理的に説明されている。これらの構築様式のいくつかは、所望の生物活性特性、例えば効率的かつ選択的な核酸取込みおよびエンドソーム回避性を有すると思われる。この核酸複合体は、両方のスペルミン誘導体がDNA分子と同程度かつ同時に相互作用すると思われるため、多機能性である（標的指向性およびエンドソーム溶解性の両方を示す）と予想される。

【誤訳訂正 1 1】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 1 2 1

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 1 2 1】

標的指向性抗原提示細胞（APC）、エクスピボ試験およびインスピボ試験

本発明の1つの局面において、その目標は、マクロファージなどの抗原提示細胞を標的として核酸送達を行わせる多機能性粒子を開発することにある。マクロファージ細胞膜はマンノース受容体を含む。このため、マンノースを標的指向性リガンドとして含むリガンド性スペルミンを設計した。合成が容易になるように、ビス-マンノース-スペルミンを最初に調製した。本発明者らはコレステロールをエンドソーム破壊性部分として選択した。上述の通り、生体膜は平衡状態にある。添加した脂質に定常状態の膜を破壊する能力がなくても、エンドソーム膜はエンドソームが成熟してリソソームになる際に変化を来す。膜を破壊する能力は、成熟過程にあるエンドソームのように膜が再配列する場合にみられる。コレステロールは通常、膜と会合している。コレステロールなどの平面分子は、それがなければ流動的である膜の環境に局所的な剛性を与える。しかし、膜内にコレステロールが過剰に存在することは、それが側方流動性の妨げとなるために破壊的である。このため、本発明者らはコレステリルスペルミンをエンドソーム溶解性ポリアミン物質として選択した。コレステロールは、6～10個の炭素原子からなるスペーサーを介したスペルミンの第二級窒素との結合（カルバモイル結合またはアミド結合）により、スペルミン分子の3-3-OH位に付加された。質量分析およびNMRにより、この化合物の純度は98%を上回ることが示された。元素分析も行われた。

【誤訳訂正 1 2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 1 2 4

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 1 2 4】

範例となる条件および範囲

DNA発現構築物を利用する必要がある用途では、プラスミドが望ましい態様であり、超らせん状DNAも同様である。DNAは開環状でも剪断状でもよい。望ましい正電荷と負電荷との比は0.5から1.5までの範囲にある。正電荷と負電荷との比は0.8から0.12までの範囲にあることが望ましい。標的指向性スペルミン（望ましくはマンノシルスペルミン、ラクトシルスペルミン、葉酸スペルミンまたはビオチン化スペルミン）とエンドソーム溶解性スペルミン（例えば、LPHDスペルミンまたはコレステリルスペルミン）との最適比は0.35：0.65（モル比）である。標的指向性スペルミンとエンドソーム溶解性スペルミンとの比の許容範囲は0.10：0.90から0.50：0.50までである。混合物は、例えば30mMクエン酸塩を含む緩衝液（pH 6.9）中にて調製しうる（緩衝剤は例えば、クエン酸塩、コハク酸塩またはリン酸塩であってよく、5～50mMおよびpH 6.0～8.2の範囲でありうる）。EDTAを0.1m

M（または最大5mM）含んでよく、NaClを1mM～200mM含んでよい。最終的なDNA濃度は1mg/mLであることが望ましく、この範囲は10 μ g/mL～10mg/mLでありうる。注射容量は100 μ Lであることが望ましく、この範囲は10 μ L～1.0mLでありうる。本発明による核酸組成物を含む多機能性分子複合体は、一般に約1ng～約1000 μ gのDNAを含むことが好都合である。いくつかの望ましい態様において、複合体は10ngから800 μ gまでの範囲のDNAを含む。より望ましい態様において、複合体は0.1 μ gから500 μ gまでの範囲のDNAを含む。さらにより望ましい態様において、複合体は1 μ gから350 μ gまでの範囲のDNAを含む。さらにより望ましい態様において、複合体は25 μ gから250 μ gまでの範囲のDNAを含む。最も望ましい態様において、複合体は約100 μ gのDNAを含む。望ましい投与方法は腹腔内、静脈内、筋肉内、皮内、皮下および吸入である。他の配合変化物と併用する場合、またはエマルジョン中で用いる場合には、複合体を経口的に送達することもできる。

【誤訳訂正 1 3】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 1 2 7

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 1 2 7】

本発明の1つの局面においては、標的細胞に対する核酸組成物の導入のための自己集合性送達システムであって、単純な混合によって一つに併せて分子複合体へと自己集合させることが可能な以下の別個の構成要素を含む自己集合性送達システムが提供される：(i) 導入しようとする1つまたは複数の核酸；ならびに(ii) それぞれが核酸と結合しうる2種類のカチオン性ポリアミン要素、この際、2つのカチオン性ポリアミン要素は標的指向性スペルミンおよびエンドソーム溶解性スペルミンである。標的指向性スペルミンは、適したリンカー基を介してスペルミンの窒素原子と結合した標的指向性リガンドを含む。1つの望ましい態様において、標的指向性リガンドは第二級窒素原子と結合している。標的指向性リガンドは、例えば、葉酸、フォルリン酸、5-メチルテトラヒドロ葉酸、D-ビオチン、マンノース、 α -3'-プロピオニルチオマンノシド、 α -3'プロピオニルプロピオニルチオマンノシド-6-リン酸；ラクトース；または細胞膜タンパク質と特異的に結合する抗体でありうる。エンドソーム溶解性スペルミンは、エンドソーム破壊促進成分、望ましくはコレステリル部分または脂肪酸部分が、適したリンカー基を介してスペルミンの窒素原子と結合したものを有する。1つの望ましい態様において、エンドソーム破壊促進成分は第二級窒素原子と結合している。標的指向性リガンドおよびエンドソーム膜破壊促進成分はそれぞれのポリアミンと、適したリンカー基を介して、例えばPEGスペーサーアームを介して、または例えばアルキル、カルボキシアミド、カルバメート、チオカルバメートもしくはカルバモイル架橋原子団を介して結合している。エンドソーム溶解性分子および標的指向性分子はそれぞれ、選択されたリンカーを介してスペルミン分子の第二級窒素と結合していることが望ましい。