

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6802157号  
(P6802157)

(45) 発行日 令和2年12月16日(2020.12.16)

(24) 登録日 令和2年11月30日(2020.11.30)

(51) Int.Cl.	F 1
A 61 K 9/48	(2006.01)
A 61 K 47/54	(2017.01)
A 61 K 9/51	(2006.01)
A 61 K 38/00	(2006.01)
C 07 K 1/113	(2006.01)
A 61 K	9/48
A 61 K	47/54
A 61 K	9/51
A 61 K	38/00
C 07 K	1/113

請求項の数 17 (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-528090 (P2017-528090)
(86) (22) 出願日	平成27年11月20日 (2015.11.20)
(65) 公表番号	特表2017-535581 (P2017-535581A)
(43) 公表日	平成29年11月30日 (2017.11.30)
(86) 國際出願番号	PCT/US2015/061838
(87) 國際公開番号	W02016/085808
(87) 國際公開日	平成28年6月2日 (2016.6.2)
審査請求日	平成30年11月19日 (2018.11.19)
(31) 優先権主張番号	62/084,887
(32) 優先日	平成26年11月26日 (2014.11.26)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)

(73) 特許権者	506115514 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94607-5200, オークランド、フランクリン ストリート 1111, 12番 フロア
(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕幸
(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】タンパク質送達のためのステルス性ナノカプセル

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

タンパク質の循環半減期を延長する方法であって、  
前記タンパク質の循環半減期が延長されるように、  
タンパク質を重合性アクリロイル基とコンジュゲートすることと；  
該コンジュゲートを含む溶液中で 2 - メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンを  
インサイチュー重合させて、前記タンパク質が該アクリロイル基を介してポリ(2 - メタ  
クリロイルオキシエチルホスホリルコリン) (pMPC) の層にコンジュゲートした、該  
pMPC でカプセル化されたタンパク質を得ることと  
を含み、

該カプセル化されたタンパク質が、その活性の少なくとも 95 % を、37 ℃ で少なくとも 90 分間、0.1 mg / mL のトリプシンとインキュベートされた場合に保持する、  
前記方法。

## 【請求項 2】

前記 pMPC の層が、N , N' - メチレンビスマクリルアミド (BIS) 架橋剤と重合  
した複数の 2 - メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンモノマー (MPC) を含む  
、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記カプセル化されたタンパク質が、その活性の少なくとも 90 % を、37 ℃ で少なくとも 5 日間インキュベートされた場合に保持する、請求項 1 に記載の方法。

10

20

**【請求項 4】**

前記カプセル化されたタンパク質が、ポリエチレングリコールに結合されていない、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記タンパク質を p M P C の層でカプセル化することが、インビボでの免疫系による前記タンパク質のクリアランスを遅延させる、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記タンパク質を p M P C の層でカプセル化することが、インビボでのオプソニンとの、マクロファージとの、または抗体とのタンパク質結合を減少させる、請求項 5 に記載の方法。 10

**【請求項 7】**

前記 p M P C の層が、前記カプセル化されたタンパク質に双性イオン構造を付与するように選択される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記 p M P C の層が、8 ~ 11 nm の厚さを有する、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 9】**

タンパク質ナノカプセルを形成する方法であって、

タンパク質を重合性アクリロイル基とコンジュゲートすることと；

該コンジュゲートを含む溶液中で 2 - メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンを 20  
インサイチュー重合させて、前記タンパク質が該アクリロイル基を介してポリ(2 - メタ  
クリロイルオキシエチルホスホリルコリン) (p M P C) の層にコンジュゲートした、該  
p M P C でカプセル化されたタンパク質を得ることと  
を含み、

該カプセル化されたタンパク質が、その活性の少なくとも 95 % を、37 ℃ で少なくとも 90 分間、0.1 mg / mL のトリプシンとインキュベートされた場合に保持する、前記方法。

**【請求項 10】**

前記 p M P C の層が、複数の 2 - メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンモノマー (M P C) を N , N ' - メチレンビスアクリルアミド (B I S) 架橋剤と重合させることにより形成される、請求項 9 に記載の方法。 30

**【請求項 11】**

前記 p M P C の層が、8 ~ 11 nm の厚さを有する、請求項 9 に記載の方法。

**【請求項 12】**

カーゴ物質；及び

ポリ(2 - メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン) (p M P C) からなる物質を含む組成物であって、

前記カーゴ物質は、重合性アクリロイル基とコンジュゲートされており、

前記カーゴ物質は、該アクリロイル基を介して前記 p M P C の層にコンジュゲートして  
、該 p M P C でカプセル化されており、 40

該カプセル化されたカーゴ物質が、その活性の少なくとも 95 % を、37 ℃ で少なくとも 90 分間、0.1 mg / mL のトリプシンとインキュベートされた場合に保持する、前記組成物。

**【請求項 13】**

前記カーゴ物質が、タンパク質またはポリペプチドである、請求項 12 に記載の組成物。

**【請求項 14】**

前記 p M P C が、N , N ' - メチレンビスアクリルアミド (B I S) 架橋剤と重合した複数の 2 - メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンモノマー (M P C) を含む、請求項 12 に記載の組成物。

**【請求項 15】**

前記 p M P C の層が、8 ~ 11 nm の厚さを有する、請求項 1\_2 に記載の組成物。

【請求項 1\_6】

タンパク質の循環半減期を延長する方法であって、

タンパク質の循環半減期が延長されるように、

前記タンパク質を、重合性アクリロイル基とコンジュゲートすることと；

該コンジュゲートを含む溶液中で 2 - メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンをインサイチュー重合させて、前記タンパク質が該アクリロイル基を介してポリ(2 - メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン) (p M P C) の層にコンジュゲートした、該 p M P C でカプセル化されたタンパク質を得ることと

を含み、

10

該カプセル化されたタンパク質が、その活性の少なくとも 95 % を、37 ℃ で少なくとも 90 分間、0.1 mg / mL のトリプシンとインキュベートされた場合に保持する、前記方法。

【請求項 1\_7】

カーゴ物質；及び

ポリ(2 - メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン) (p M P C) からなる物質を含む組成物であって、

前記カーゴ物質は、重合性アクリロイル基を介して p M P C にコンジュゲートされて、該 p M P C が前記カーゴ物質をカプセル化しており；

該カプセル化されたカーゴ物質が、その活性の少なくとも 95 % を、少なくとも 90 分間トリプシンとインキュベートされた場合に保持する、前記組成物。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の参照

本出願は、米国特許法第 119 条(e)の下で、Yunfeng Lu による「ST EALTH NANOCAPSULES FOR PROTEIN DELIVERY」と題した 2014 年 11 月 26 日出願の米国特許仮出願第 62/084,887 号の優先権を主張し、その内容が参考によって本明細書に組み込まれる。

30

【0002】

技術分野

本発明は、タンパク質ナノカプセル及び特にタンパク質の循環半減期を延長することに関する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

タンパク質療法は、個体において存在しないかまたは不十分である可能性のあるタンパク質を治療レベルで送達するため、多くの不治の疾患に対する最終的な希望であると考えられる。しかしながら、ペプチド薬物及び治療用タンパク質の適用は、生理的環境におけるそれらの不十分な安定性及び透過性により制限される。したがって、治療用タンパク質を送達するための担体として機能することができるナノ構造を設計することにより、これらの問題を回避する取り組みが増加している。

40

【0004】

治療用タンパク質の全身送達のために、ナノ粒子は、それらの構造及び特性制御の容易さゆえに、理想的な担体として長きにわたり望まれてきた。さらに、ナノ粒子は、治療剤を特定の病理学的部位に標的送達するために使用される場合があり、これは所望の部位における用量効果の増加を可能にし、加えて任意の副作用を低減させる。しかしながら、現時点では臨床的な使用または臨床試験における使用を認可されているナノ製剤はほとんどない。ナノ粒子のインビオ使用における 1 つの主な障害は、免疫系によるナノ粒子の急速

50

なクリアランスであり、これは望ましくない薬物動態及び生体内分布を招く。この問題は、大半の標的化戦略を無効にし、認可されたナノ製剤及び開発中のそれらの両方の有効性を減少させる。

#### 【0005】

現在、ナノ粒子の循環時間を延長するための主な戦略は、粒子をポリエチレングリコールでコーティング（PEG化）し、細胞のグリコカリックスを模倣する「ステルス性」ブラシを作製することである。事実、PEG化は、インビボで粒子の循環時間を延長することが分かっている。しかしながら、最大で25%の患者が、処置前に抗PEG抗体を示すこと、またはPEG化ナノ粒子の初回投与後に抗PEG抗体を発現することが分かっている。したがって、ナノ粒子のPEG化は、ナノ粒子に基づく治療薬の開発において実用的なヒブルとなる見込みはほとんどない。10

#### 【発明の概要】

#### 【0006】

本発明は、循環時間を延長する方法及び/または静脈内に投与される治療用タンパク質の免疫原性を低下させる方法に関する。複数の実施形態では、異種タンパク質のインビボ循環寿命を、そのタンパク質をポリ(2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン)（pMPC）でカプセル化することにより有意に延ばす。タンパク質をカプセル化することにより、タンパク質表面は、オプソニン及び細胞への接着を最小限に抑えるpMPCシェルにより完全に覆われて、免疫認識及びクリアランスの劇的な遅延をもたらす。以下の実施例セクションでさらに記載されるように、生体内分布研究では、ある種の実施形態においてpMPCでカプセル化された注入タンパク質（pMPC-タンパク質）の50%超が、器官内に捕捉される代わりに血流中に留まることを見出した（例えば、pMPCでカプセル化された注入タンパク質の50%超が、少なくとも1、2、3、または4時間血流中に留まる）。したがって、これらの方法は、治療剤の静脈内送達に対する従来のポリエチレングリコール（PEG）に基づく戦略に、より良い代替案を提供する。20

#### 【0007】

本発明の一態様では、タンパク質の循環半減期を延長する方法が提供される。本方法は、タンパク質を不飽和ビニル基とコンジュゲートすること、及びタンパク質をポリ(2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン)（pMPC）の層でカプセル化することを含む。1つ以上の実施形態では、pMPCの層は、N,N'-メチレンビスアクリルアミド（BIS）架橋剤と重合した複数の2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンモノマー（MPC）を含む。典型的には、不飽和ビニル基は、重合性アクリロイル基である。一実施形態では、pMPCの層は、カプセル化されたタンパク質に双性イオン構造を付与するように選択される。1つ以上の実施形態では、pMPCの層は、8~11nmの厚さを有する。その他の実施形態では、mMPCの層は、1、2、3、4、または5nm未満の厚さを有する。30

#### 【0008】

一実施形態では、タンパク質をpMPCの層でカプセル化することは、インビボでのタンパク質の半減期を延長する。別の実施形態では、タンパク質をpMPCの層でカプセル化することは、インビボでの免疫系によるタンパク質のクリアランスを遅延させる。さらなる実施形態では、タンパク質をpMPCの層でカプセル化することは、インビボでオプソニンとの、マクロファージとの、または抗体とのタンパク質結合の可能性を減少させる。一例では、カプセル化されたタンパク質は、その活性の少なくとも95%を、少なくとも90分間トリプシンとインキュベートされた場合に保持する。別の例では、カプセル化されたタンパク質は、その活性の少なくとも90%を、37度少なくとも5日間インキュベートされた場合に保持する。40

#### 【0009】

本発明の別の態様では、タンパク質ナノカプセルを形成する方法が提供される。本方法は、タンパク質を不飽和ビニル基とコンジュゲートすること、及びタンパク質をポリ(2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン)（pMPC）の層でカプセル化するこ50

とを含む。1つ以上の実施形態では、pMPCの層は、複数の2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンモノマー(MPC)をN,N'-メチレンビスアクリルアミド(BIS)架橋剤と重合させることにより形成される。典型的には、タンパク質は、重合性アクリロイル基とコンジュゲートされる。一実施形態では、pMPCの層は、カプセル化されたタンパク質に双性イオン構造を付与するように選択される。1つ以上の実施形態では、pMPCの層は、8~11nmの厚さを有する。その他の実施形態では、mMPCの層は、1、2、3、4、または5nm未満の厚さを有する。

#### 【0010】

本発明の別の態様では、物質の組成物が提供される。組成物は、カーゴ物質及びポリ(2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン)(pMPC)を含み、pMPCはカーゴ物質をカプセル化する。1つ以上の実施形態では、カーゴ物質は、タンパク質またはポリペプチドである。一実施形態では、pMPCは、N,N'-メチレンビスアクリルアミド(BIS)架橋剤と重合した複数の2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンモノマー(MPC)を含む。典型的には、カーゴ物質は、重合性アクリロイル基とコンジュゲートされる。1つ以上の実施形態では、pMPCの層は、8~11nmの厚さを有する。その他の実施形態では、mMPCの層は、1、2、3、4、または5nm未満の厚さを有する。一例では、カプセル化されたタンパク質またはポリペプチドは、その活性の少なくとも95%を、少なくとも90分間トリプシンとインキュベートされた場合に保持する。別の例では、カプセル化されたタンパク質またはポリペプチドは、その活性の少なくとも90%を、37で少なくとも5日間インキュベートされた場合に保持する。

#### 【0011】

##### [本発明1001]

タンパク質の循環半減期を延長する方法であって、  
タンパク質を不飽和ビニル基とコンジュゲートすることと;  
前記タンパク質をポリ(2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン)(pMPC)の層でカプセル化することと  
を含む、前記方法。

##### [本発明1002]

前記pMPCの層が、N,N'-メチレンビスアクリルアミド(BIS)架橋剤と重合した複数の2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンモノマー(MPC)を含む、本発明1001の方法。

##### [本発明1003]

前記不飽和ビニル基が重合性アクリロイル基である、本発明1001の方法。

##### [本発明1004]

カプセル化された前記タンパク質が、その活性の少なくとも95%を、少なくとも90分間トリプシンとインキュベートされた場合に保持する、本発明1001の方法。

##### [本発明1005]

カプセル化された前記タンパク質が、その活性の少なくとも90%を、37で少なくとも5日間インキュベートされた場合に保持する、本発明1001の方法。

##### [本発明1006]

カプセル化されたタンパク質が、ポリエチレングリコールに結合されていない、本発明1001の方法。

##### [本発明1007]

前記タンパク質をpMPCの層でカプセル化することが、インビボでの免疫系による前記タンパク質のクリアランスを遅延させる、本発明1001の方法。

##### [本発明1008]

前記タンパク質をpMPCの層でカプセル化することが、インビボでのオプソニンとの、マクロファージとの、または抗体とのタンパク質結合を減少させる、本発明1007の方法。

##### [本発明1009]

10

20

30

40

50

前記 p M P C の層が、カプセル化された前記タンパク質に双性イオン構造を付与するよう選択される、本発明1001の方法。

[本発明1010]

前記 p M P C の層が、8~11 nm の厚さを有する、本発明1001の方法。

[本発明1011]

タンパク質ナノカプセルを形成する方法であって、

タンパク質を不飽和ビニル基とコンジュゲートすることと；

前記タンパク質をポリ(2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン)(p M P C)の層でカプセル化することと  
を含む、前記方法。

10

[本発明1012]

前記 p M P C の層が、複数の2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンモノマー(M P C)をN,N'-メチレンビスアクリルアミド(B I S)架橋剤と重合させることにより形成される、本発明1011の方法。

[本発明1013]

前記タンパク質が、重合性アクリロイル基とコンジュゲートされる、本発明1010の方法。

[本発明1014]

前記 p M P C の層が、8~11 nm の厚さを有する、本発明1010の方法。

[本発明1015]

カーゴ物質；及び

ポリ(2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン)(p M P C)  
からなる、物質の組成物であって、

前記 p M P C が前記カーゴ物質をカプセル化する、前記組成物。

[本発明1016]

前記カーゴ物質が、タンパク質またはポリペプチドである、本発明1015の組成物。

[本発明1017]

前記 p M P C が、N,N'-メチレンビスアクリルアミド(B I S)架橋剤と重合した複数の2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンモノマー(M P C)を含む、本発明1015の組成物。

30

[本発明1018]

前記カーゴ物質が、重合性アクリロイル基とコンジュゲートされる、本発明1015の組成物。

[本発明1019]

カプセル化された前記タンパク質または前記ポリペプチドが、その活性の少なくとも95%を、少なくとも90分間トリプシンとインキュベートされた場合に保持する、本発明1016の組成物。

[本発明1020]

前記 p M P C の層が、8~11 nm の厚さを有する、本発明1014の組成物。

本発明のその他の目的、特徴、及び利点は、以下の詳細な説明から当業者に明らかとなるだろう。しかしながら、詳細な説明及び特定の実施例は、本発明のいくつかの実施形態を示す一方で、限定ではなく実例として与えられていることが理解されるべきである。本発明の範囲内で多くの変更及び修正がその趣旨から逸脱することなく行われてよく、本発明は全てのこののような修正を含む。

40

【図面の簡単な説明】

【0012】

ここで図面を参照し、これらの図面において同様の参照番号は、全体を通して対応する部分を表す。

【図1】本発明の1つ以上の実施形態に従った、p M P C タンパク質ナノカプセル(p M P C - n タンパク質)の合成に関する概略図である。タンパク質の p M P C によるカプセ

50

ル化は、2ステップにより達成される。タンパク質は、コンジュゲート反応により表面上で重合性アクリロイル基と結合され(I)；その後、タンパク質は、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンのインサイチュー重合によりpMPCポリマーネットワークで包まれる(II)。得られたタンパク質ナノカプセルは、完全にpMPCシェルにより覆われて、これはオプソニンタンパク質(i)、マクロファージを含む様々な種類の細胞(iii)、及び抗体(iii)に付着することはない。

【図2】図2A～図2Fは、本発明の1つ以上の実施形態に従って、pMPCタンパク質ナノカプセルの構造及び独特な特性を示す。図2A及び図2Bは、透過型電子顕微鏡写真を示し、これは均一なサイズのpMPC-nEGFP(a)及びpMPC-nOVA(b)を示している。図2Cは、HRP、GOx、UOx、及びAOxの、それらの天然型とこれらのpMPCタンパク質ナノカプセルとの間の活性比較を示す。これらの酵素で、カプセル化後に有意な活性損失を示すものはない。図2Dは、37℃でインキュベートする場合の天然AOx及びpMPC-nAOxの熱安定性を示す。図2Eは、37℃で0.1mg/mLのトリプシンに曝露した場合の天然UOx及びpMPC-nUOxの活性変化を示す。図2Fは、マウス全血清とのインキュベーション後、pMPC-nEGFP、pAAm-nEGFP、及び天然EGFPにより吸着されたタンパク質量を示す。データは、3回の独立した実験からの平均±標準誤差(SEM)(2C、2D、及び2E)ならびに平均±標準誘導(derivation)(SD)(2F)を表す。

【図3】図3A～図3Hは、本発明の1つ以上の実施形態に従って、pMPC-カプセル化によるタンパク質の細胞取り込み及び食作用の減少を示す。図3Aは、天然OVA及びpMPC-nOVAと24時間インキュベートした後の細胞生存率アッセイを示す。細胞増殖率は、同じ条件で培養した未処理細胞の増殖率で正規化した。生存率は、Cell1T iter Blueを用いてアッセイした。図3Bは、U87細胞による天然トランスフェリン(Tf)及びpMPC-nTfの受容体媒介エンドサイトーシス(RME)レベルを示す。TfのRMEは、カプセル化により大幅に阻害される。図3Cは、天然EGFP及び異なる表面を有するEGFPナノカプセルの細胞取り込みレベルを示す。図3Dは、J774A.1マウスマクロファージ細胞との1時間のインキュベーション後、天然OVA(i)では食作用を示すが、pMPC-nOVA(iii)では食作用を示さない蛍光画像を示す。マウス血清を含む場合(+MS)のオプソニン化が、天然OVA(iii)の食作用を高めるのに対して、血清とのインキュベーション後のpMPC-nOVAからは有意な食作用を観察することができない。細胞は、細胞核を撮像するためにヘキスト33342で染色した。スケールバー：50μm。図3Eは、天然OVA、天然OVA+MS、pMPC-nOVA、及びpMPC-nOVA+MSとインキュベートした後に、マクロファージの蛍光支援細胞選別(FACS)分析から得た平均蛍光強度を比較するヒストグラムである。図3Fは、6人のドナーからの静止及び刺激ヒト末梢血単核細胞(PBMC)の両方によるOVA及びpMPC-nOVA取り込みの定量分析を示す。図3G及び図3Hは、PBS(ブランク)、天然OVA及びpMPC-nOVAで処理されたマウスの血液IgG、IgE、OVA特異的IgG(OVA-sIgG)、及びOVA-sIgEのレベル比較を示し、カプセル化後のOVAは免疫原性が低下していることを示している。データは、3回の独立した実験からの平均±SEM(3A)、FACSデータからの平均±%ロバスト変動係数(CV)(3E)、いくつかの独立した実験からの平均±SD(3B、3Cについてはn=6；3F、3G、3Hについてはn=5)を表す。

【図4】図4A～図4Dは、本発明の1つ以上の実施形態に従って、インビボでのpMPCタンパク質ナノカプセルの長期循環及び低免疫原性を示す。図4Aは、放射性<sup>125</sup>I-pMPC-nEGFPの静脈内投与後、異なる時間での動物の単一光子放射型コンピュータ断層撮影/X線コンピュータ断層撮影(SPECT/CT)画像を示す。図4Bは、異なる時間での血中及び器官内における<sup>125</sup>I-pMPC-nEGFPの相対量の定量分析を示す。全ての放射活性強度は、各動物の3時間での心臓における強度で正規化した。図4Cは、注入後の異なる時間におけるpMPC-nEGFPの総量と比較した、血中及びその他の主要器官内に分布したpMPC-nEGFPの相対量をまとめたヒストグラ

10

20

30

40

50

ムである。図4Dは、全身投与後のマウスにおける天然AOx、pAAm-nAOx、及びpMPC-nAOxの薬物動態(PK)プロファイルを示す。データは、独立した実験からの平均±SEM(4B及び4Cについてはn=3、ならびに4Dについてはn=4)を表す。

【図5】図5A～図5Kは、本発明の1つ以上の実施形態に従って、様々なpMPCタンパク質ナノカプセルのサイズ分布を示す。図5Aは、pMPC-nEGFP(平均粒径：12.16nm)を示し、図5Bは、pMPC-nEGFP(+) (平均粒径：11.62nm)を示し、図5Cは、pAAm-nEGFP(平均粒径：13.25nm)を示し、図5Dは、pAAm-nEGFP(+) (平均粒径：10.82nm)を示し、図5Eは、pMPC-nHRP(平均粒径：12.46nm)を示し、図5Fは、pMPC-nGOx(平均粒径：10.61nm)を示し、図5Gは、pMPC-nTf(平均粒径：10.78nm)を示し、図5Hは、pMPC-nOVA(平均粒径：13.46nm)を示し、図5Iは、pMPC-nUOx(平均粒径：9.556nm)を示し、図5Jは、pMPC-nAOx(平均粒径：10.68nm)を示し、図5Kは、pAAm-nAOx(平均粒径：10.54nm)を示す。

【図6】図6A～図6Dは、本発明の1つ以上の実施形態に従って、pMPC-nEGFP、pMPC-nOVA、pMPC-nUOx、及びpMPC-nAOxならびにそれらの対応する天然タンパク質で処理された細胞の生存率を示す。

【図7】図7Aおよび図7Bは、本発明の1つ以上の実施形態に従って、pMPC-nBSAの生体内分布を示す。図7Aは、異なる時間での血中及び器官内における<sup>125</sup>I-pMPC-nBSAの相対量の定量分析を示す。全ての放射活性強度は、各動物の3時間での心臓における強度で正規化した。図7Bは、注入後の異なる時間におけるpMPC-nBSAの総量と比較した、血中及びその他の主要器官内に分布したpMPC-nBSAの相対量をまとめたヒストグラムである。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0013】

##### 発明の詳細な説明

本明細書で記載または参照される技術及び手順の多くは、当業者により十分に理解され、従来の手法を使用して一般的に用いられる。好ましい実施形態の記載において、添付図面を参照してよく、図面はその一部を形成し、図面において本発明が実施される場合もある特定の実施形態が実例として示される。その他の実施形態が利用されてよく、構造変化が本発明の範囲から逸脱することなく行われてよいことが理解されるべきである。

##### 【0014】

別段の規定がない限り、本明細書で使用される技術に関する全ての用語、表記及びその他の科学用語または専門用語は、本発明が関連する当業者によって一般的に理解される意味を有することを意図する。いくつかの場合には、一般的に理解される意味を有する用語は、明確にするために、及び/または迅速な参照のために本明細書で定義され、本明細書におけるこのような定義の包含が、必ずしも当該技術分野において一般に理解されるものとの実質的な差を表すと解釈されるべきではない。

##### 【0015】

今まで、ナノ粒子に基づく治療薬は、不溶性かつ脆弱なタンパク質の安定化を可能にする画期的な送達戦略として大きな可能性を示してきた。しかしながら、ナノ粒子の適用は、免疫系によるそれらのクリアランスに起因する短いインビオ循環時間によって通常は制限される。タンパク質に基づく治療薬の循環時間を延ばす現在の方法は、主にPEG化により達成され、例えば米国特許第4,179,337号に記載されている。しかしながら、大半の人々が、食品及び化粧品におけるPEGの広範な使用に部分的に起因して、抗PEG応答を発現する傾向があることが分かっている。

##### 【0016】

体からのナノ粒子の除去(すなわち、クリアランス)は、主に細網内皮系(RES)としても知られる単核食細胞系(MPS)により達成される。MPSのマクロファージは、

10

20

30

40

50

外来粒子を直接識別する、または外来粒子の表面に結合したオプソニンタンパク質によりそれらを認識するかのいずれかを行うことができる。明らかに、どちらの経路もナノ粒子とマクロファージ及びオプソニンなどの生物学的内容物との結合により開始される。したがって、結合の可能性を最小限に抑えることにより、血液からのナノ粒子のMPSクリアランスを遅延させ、それによってそれらの循環寿命を延ばし、それらの免疫原性を抑制することが可能である。

#### 【0017】

一態様では、本明細書で開示される本発明は、血中において任意のタンパク質またはポリペプチドの循環寿命を延ばすことができるタンパク質及びポリペプチドナノカプセルの合理的な設計を提供する。さらなる態様では、単純な湿式化学手法を使用することにより、非付着性タンパク質ナノカプセルが広範囲な臨床応用に提供される。一般に、これはタンパク質をポリ(2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン)(pMPC)の薄層でカプセル化し、タンパク質の最上部に非付着性表面を作製することにより達成される。

#### 【0018】

pMPCカプセル化タンパク質ナノ粒子(pMPC-nタンパク質)の合成戦略は、タンパク質カプセル化技術の修正版を使用することにより達成される。図1に示されるように、1つ以上の実施形態では、pMPC-nタンパク質の合成戦略は、2ステップ法で達成される。タンパク質を最初に不飽和ビニル基とコンジュゲートし(I)、次いでモノマー(2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン、MPC)と架橋剤(N,N'-メチレンビスアクリルアミド、BIS)とを水溶液中で共重合させることによりpMPCポリマーネットワークで包む(II)。pMPCの耐吸着特性ゆえに、pMPCコーティングは、オプソニン(i)、マクロファージ(ii)、または抗体(iii)とのタンパク質結合の可能性を有意に減少させ、それによって免疫系によるクリアランスを遅延させて、それらの循環半減期を延長する。さらに、pMPCコーティングはまた、内部タンパク質が直接プロテアーゼと相互作用するのを防ぐことで、血流での循環中にタンパク質の安定性を高める(それによってタンパク質を投与した個体におけるタンパク質の循環半減期の時間を延長する)。

#### 【0019】

本発明は、多くの治療用タンパク質について血液循環半減期の延長及び免疫原性の低下などの利点を提供する。以下の実施例セクションに示されるように、本発明は、静脈内に投与された治療用タンパク質の循環時間を有意に増加させることができる。本発明はまた、投与された後に免疫系による識別をより困難にさせる生体適合性材料を利用する。このタンパク質療法技術は、様々な疾患(例えば、痛風)ならびに組織再構築及び組織再生に適用されてよい。現在の技術(例えば、従来のPEG化戦略)と比較して、本発明は、より安定した構造を提供し、使用される材料が十分に生体適合性であって免疫応答を引き起こすことがない。結果として、本発明は、治療用タンパク質がより有利な薬物動態プロファイル及びより高いバイオアベイラビリティを有することを可能にする。

#### 【0020】

本発明の一態様では、タンパク質の循環半減期を延長する方法が提供される。本方法は、タンパク質を不飽和ビニル基とコンジュゲートすること、及びタンパク質をポリ(2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン)(pMPC)の層でカプセル化することを含む。1つ以上の実施形態では、pMPCの層は、N,N'-メチレンビスアクリルアミド(BIS)架橋剤と重合した複数の2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンモノマー(MPC)を含む。典型的には、不飽和ビニル基は、重合性アクリロイル基である。一実施形態では、pMPCの層は、カプセル化されたタンパク質に双性イオン構造を付与するように選択される。1つ以上の実施形態では、pMPCの層は、8~11nmの厚さを有する。その他の実施形態では、mMPCの層は、1、2、3、4、または5nm未満の厚さを有する。

#### 【0021】

10

20

30

40

50

一実施形態では、タンパク質を p M P C の層でカプセル化することは、インビボでのタンパク質の半減期を延長する。別の実施形態では、タンパク質を p M P C の層でカプセル化することは、インビボでの免疫系によるタンパク質のクリアランスを遅延させる。さらなる実施形態では、タンパク質を p M P C の層でカプセル化することは、インビボでオブソニンとの、マクロファージとの、または抗体とのタンパク質結合の可能性を減少させる。一例では、カプセル化されたタンパク質は、その活性の少なくとも 95% を、少なくとも 90 分間トリプシンとインキュベートされた場合に保持する。別の例では、カプセル化されたタンパク質は、その活性の少なくとも 90% を、37° で少なくとも 5 日間インキュベートされた場合に保持する。

## 【0022】

10

本発明の別の態様では、タンパク質ナノカプセルを形成する方法が提供される。本方法は、タンパク質を不飽和ビニル基とコンジュゲートすること、及びタンパク質をポリ(2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン) (p M P C) の層でカプセル化することを含む。1つ以上の実施形態では、p M P C の層は、複数の 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンモノマー (M P C) を N, N'-メチレンビスアクリルアミド (B I S) 架橋剤と重合させることにより形成される。典型的には、タンパク質は、重合性アクリロイル基とコンジュゲートされる。一実施形態では、p M P C の層は、カプセル化されたタンパク質に双性イオン構造を付与するように選択される。1つ以上の実施形態では、p M P C の層は、8 ~ 11 nm の厚さを有する。その他の実施形態では、m M P C の層は、1、2、3、4、または 5 nm 未満の厚さを有する。

20

## 【0023】

本発明の別の態様では、物質の組成物が提供される。組成物は、カーゴ物質及びポリ(2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン) (p M P C) を含み、p M P C はカーゴ物質をカプセル化する。1つ以上の実施形態では、カーゴ物質は、タンパク質またはポリペプチドである。一実施形態では、p M P C は、N, N'-メチレンビスアクリルアミド (B I S) 架橋剤と重合した複数の 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンモノマー (M P C) を含む。典型的には、カーゴ物質は、重合性アクリロイル基とコンジュゲートされる。1つ以上の実施形態では、p M P C の層は、8 ~ 11 nm の厚さを有する。その他の実施形態では、m M P C の層は、1、2、3、4、または 5 nm 未満の厚さを有する。一例では、カプセル化されたタンパク質またはポリペプチドは、その活性の少なくとも 95% を、少なくとも 90 分間トリプシンとインキュベートされた場合に保持する。別の例では、カプセル化されたタンパク質またはポリペプチドは、その活性の少なくとも 90% を、37° で少なくとも 5 日間インキュベートされた場合に保持する。

30

## 【実施例】

## 【0024】

実施例 1 : p M P C シェルによるカプセル化は、タンパク質構造を損なうことがない

p M P C タンパク質ナノカプセル調製の成功を、高感度緑色蛍光タンパク質 (E G F P) 及びオボアルブミン (O V A) を使用して実証した。p M P C によるカプセル化後、タンパク質ナノカプセルは、p M P C - n E G F P (図 2 A) 及び p M P C - n O V A (図 2 B) の透過型電子顕微鏡 (T E M) 画像によると、平均粒径が 25 ± 5 nm の均一な球状形態を示した。E G F P 及び O V A の粒子サイズがおよそ 8 nm であることを考慮すると、p M P C シェルの平均厚さは、およそ 8 ~ 11 nm である。p M P C コーティングは、水性媒体中において非常に穏やかな反応を使用して形成されるため、内部にカプセル化されるタンパク質は、それらの構造及び生物学的機能を保持することができる。

40

## 【0025】

これを検証するために、西洋ワサビペルオキシダーゼ (H R P)、グルコースオキシダーゼ (G O X)、ウリカーゼ (U O X)、及びアルコールオキシダーゼ (A O X) を含む4つの酵素を同じ方法でカプセル化し、それらの酵素活性をそれらの天然対応物とそれぞれ比較した。図 2 C は、p M P C - n タンパク質をそれらの天然型と比較した相対触媒効率を示す。結果によると、カプセル化の前後で全体的な触媒効率に有意差はなかったが、

50

全ての p M P C カプセル化酵素が、それらの天然型と比較してわずかに低い活性を示した。この活性損失は、基質が p M P C シェルを通り抜けて移動し、内部の酵素と結合する場合に、拡散率を低減させる 8 nm 厚の p M P C コーティングに起因する可能性があり、これは見かけのミカエリス定数 ( K M ) の増加をもたらす ( 表 1 )。 K M の増加及び酵素活性において有意な損失がないことのどちらも、カプセル化がタンパク質構造を損なうことがないことを示唆している。これはさらに、 p M P C - カプセル化方法が、大半のタンパク質及び酵素に対して、それらの生物学的機能を損なうことなく一般に適用できることを示している。

#### 【 0 0 2 6 】

( 表 1 ) p M P C - n H R P 、 p M P C - n G O x 、 p M P C - n U O x 、 p M P C - n A O x 、 及びそれらの天然対応物の動態パラメータ

試料	( )	( $\text{min}^{-1}$ )	/		%
			-1	-1	
天然 HRP	0.0925±0.0213	$4.03 \times 10^2$	4356.7±989.0	100±22.7	
pMPC-nHRP	0.121±0.0340	$4.80 \times 10^2$	3966.9±1114.7	91.1±28.1	
天然 GOx	18.00±6.21	87.9	4.883±1.684	100±34.5	
pMPC-nGOx	21.56±6.70	77.6	3.600±1.119	73.7±31.1	
天然 UOx	0.0219±0.0017	3.36	153.4±11.8	100±7.7	20
pMPC-nUOx	0.0259±0.0043	3.59	138.6±22.9	90.4±16.5	
天然 AOx	3.109±0.720	18.8	6.047±1.428	100±23.61	
pMPC-nAOx	5.120±1.433	23.4	4.570±1.279	75.6±28.00	

#### 【 0 0 2 7 】

実施例 2 : p M P C シェルによるカプセル化は、タンパク質の安定性を高める

スキームで示すように、タンパク質の外側を包んだ p M P C シェルは、 M P C モノマーから直接合成する。タンパク質をコーティングするための従来の自己組織化及び「グラフトオン」法とは異なり、この重合法は、剪断力が高く、生理学的状態が継続的に変化しているような血中における循環中でも、内部タンパク質を完全に覆うことを確実にする架橋した密なポリマーネットワークを調製する。結果として、本明細書で開示されるナノカプセルは、内部のタンパク質に安定した微小環境を提供し、効果的にその安定性を高める。

#### 【 0 0 2 8 】

これを検証するために、タンパク質ナノカプセルの安定性を最初に熱変性で試した。モデルタンパク質として A O x を使用し、天然 A O x 及び p M P C - n A O x を 37 ℃ で 5 日間インキュベートし、それらの酵素活性を異なる時間でモニターした。活性比較 ( 図 2 D ) によると、天然 A O x は、その活性の 60 % 超を損失し、これはその構造がインキュベーション中に損なわれたことを示唆している。しかしながら、 p M P C - n A O x は、その活性の 90 % を保持し、これはカプセル化が実際にタンパク質の安定性を高めたことを示している。

#### 【 0 0 2 9 】

実施例 3 : p M P C シェルによるカプセル化は、タンパク質分解を防ぎ、タンパク質の吸着を低下させる

p M P C シェルはさらに、カプセル化されたタンパク質を外部環境から分離する。循環中、タンパク質、細胞、組織及び器官は、内部タンパク質表面の代わりに p M P C シェルと相互作用せざるを得なく、このことは分子レベルでタンパク質の循環寿命を延ばすのに 2 つの主な利益を提供する。第 1 に、 p M P C シェルは、プロテアーゼの結合を阻害することによりタンパク質をタンパク質分解から防ぐ。 U O x で例示すると ( 図 2 E )、天然 U O x は、その活性を、トリプシンとインキュベートした場合に 40 分以内で完全に損失したのに対して、 p M P C - n U O x は、その活性の 95 % 超を、 90 分のインキュベーション後でも保持した。第 2 に、 p M P C シェルは、タンパク質表面を双性イオン構造に

10

20

30

40

50

置き換えることで、pMPCタンパク質ナノカプセル上へのタンパク質吸着の低下をもたらす。図2Fでは、37でマウス血清(MS)と30分間インキュベートした後に、異なるEGFP試料により吸着されたタンパク質の量を比較している。明らかに、天然EGFPが多量の血清タンパク質を吸着したのに対して、pMPC-nEGFPは、対照と比較して有意なタンパク質吸着を示さなかった。予想通り、非双性イオンポリマーによるカプセル化(pAAm-nEGFP)はまた、血清タンパク質の有意な吸着を招き、pMPCシェルがタンパク質吸着の低下に重要な役割を果たすことを確認した。タンパク質吸着が、通常はMPSクリアランスを促進させるオプソニン化及び凝集をもたらすことを考慮すると、pMPCコーティングは、マクロファージによるカプセル化されたタンパク質の識別を著しく遅延させて、それにより体内でのカプセル化されたタンパク質の循環半減期を延長するのだろう。10

#### 【0030】

##### 実施例4：pMPCシェルによるカプセル化は、生体適合性を改善する

pMPCシェルはまた、タンパク質ナノカプセルに良好な生体適合性を付与し、これは送達戦略にとって最小限の副作用で確実に送達を成功させるために重要である。pMPCは非毒性かつ生体適合性の材料であるため、pMPCによるカプセル化が、さらなる毒性をもたらすことはない。これを例示的な実験で確認し、この実験では、天然タンパク質及びpMPC-nタンパク質にそれぞれ24時間曝露した後、ごくわずかな細胞生存率の差を示した(例えば、図3Aを参照のこと)。さらに、pMPCカプセル化は、タンパク質が細胞表面と直接相互作用するのを防ぎ、細胞内へのそれらの内在化を有意に遅延させる。例えば、トランスフェリン(Tf)は、受容体媒介エンドサイトーシス(RME)によりU87細胞内に内在化できるタンパク質である。しかしながら、pMPCカプセル化は、TfとTf受容体(TfR)との間の結合をブロックしてRMEの阻害をもたらし、それによってU87細胞内へのTf内在化の量を減少させる(図3B)。20

#### 【0031】

pMPCタンパク質ナノカプセルと細胞表面との間の相互作用に関するさらなる調査を、U87細胞と、等量の天然EGFPならびに異なる表面材料及びゼータ電位を有するEGFPナノカプセルとをそれぞれインキュベートすることにより達成した。図3Cでは、インキュベーション後に細胞内に内在化したEGFPの量を比較している。結果によると、負荷電表面を有するナノカプセル(pAAm-nEGFP(-)及びpMPC-nEGFP(-))は、細胞取り込みにとって好ましくなく、文献で報告されていることと一致する。正荷電表面については、pAAm-nEGFP(+)が高レベルの細胞取り込みを示したのに対して、pMPC-nEGFP(+)は、両方の正荷電ナノカプセル上に有する正電荷がほぼ同量(pAAm-nEGFP(+)、 $= +1.27 \text{ mV}$ ; pMPC-nEGFP(+)、 $= +1.08 \text{ mV}$ )であるにもかかわらず、対照(EGFPなし)及び天然EGFPのレベルと比較して、有意ではない非常に低レベルの取り込みを示した。明白に、pMPCシェルは細胞取り込みを遅延させ、これはナノカプセルが細胞膜と結合するのを防ぐその非付着性の特徴に起因する可能性がある。安定した結合なしに、細胞が高曲率の膜を安定させるのは不可能であり、これはエンドソームの形成に必須である。30

#### 【0032】

##### 実施例5：pMPCシェルによるカプセル化は、食作用を遅延させる

pMPCシェルが細胞取り込みを遅延させることができるので加えて、オプソニン化も阻害することができるという事実に基づいて、pMPC-カプセル化を使用し、オプソニンの存在にかかわらずマクロファージの食作用も遅延させる可能性があると考えられる。これを検証するために、J744A.1マウスマクロファージ細胞、ローダミンB(RhB)標識天然OVA、及びRhB標識pMPC-nOVAを用いて、食作用のレベルを評価した。天然OVA及びpMPC-nOVAの両方を、マクロファージに曝露する前にそれぞれPBS(-MS)及びマウス血清(+MS)とインキュベートした。

#### 【0033】

予想通り、これらの試料はマクロファージとの1時間のインキュベーション後、食作用50

レベルに大きな差をもたらした。顕微鏡画像(図3D)によると、天然OVA試料の両方は、明白にローダミンB蛍光シグナルを示し(図3D、i及びii)、これは高レベルの食作用を示している。対照的に、pMPC-nOVA試料では非常に低レベルの食作用を観察した(図3D、iii及びiv)。マウス血清とインキュベートした後、天然OVA試料からは有意な食作用の強化も観察し、これは天然OVAのオプソニン化が食作用を促進させたことを示唆している。しかしながら、血清インキュベーション後のpMPC-nOVA試料では、pMPCシェルの非付着性能がナノカプセルをオプソニン化から防いだために、明白な食作用レベルの差を観察することなく、これはまた、その低タンパク質吸着によって確認した(図2F)。蛍光活性化細胞選別(FACS)分析は、それぞれ天然OVA+MS/-MSで処理したマクロファージと比較して、pMPC-nOVA+MS/-MSで処理したマクロファージの平均蛍光強度を最大で6倍低減させたことを示した(図3E、及び表2)。これはまた、オプソニン化の阻害及び食作用の遅延におけるpMPC-カプセル化の有効性を裏付ける。食作用はナノカプセルのMPSクリアランスにとって重大であるため、pMPC-カプセル化によりタンパク質の循環半減期を延長することが可能である。

#### 【0034】

(表2) FACS結果の概要

試料	イベント	%ゲート	%RhB-	%RhB+	平均蛍光	%ロバストCV
対照	10000	43.5	99.8	0.207	217	54.9
天然 OVA	10000	20.3	5.03	95	2558	51.3
天然 OVA + MS	10000	44.1	0.159	99.8	5229	49.8
pMPC-nOVA	10000	38.9	63.7	36.3	810	45.4
pMPC-nOVA + MS	14508	29.1	48.2	51.8	946	48.5

10

20

30

#### 【0035】

##### 実施例6：pMPCシェルによるカプセル化は、免疫原性を低減させる

MPCクリアランスに加えて、異種タンパク質及びそれらのナノ製剤はまた、適応免疫系により効果的に排除され得、免疫系は対応する抗体を生成することにより異物を識別して中和することができる。さらに、適応免疫は通常、抗原を直接識別して迅速に抗体を產生することができるメモリーB細胞を生成することで、異物の血液クリアランスの促進(ABC)をもたらす。今まで、広く使用されているPEG化ナノ構造を含む、大半の静脈内ナノ製剤がABC現象に悩まされている。しかしながら、適応免疫系の活性化及びメモリーB細胞の生成は、初めて異物を取り入れる場合には抗原提示と呼ばれる不可欠なステップを必要とする。抗原提示は、抗原提示細胞(APC)による抗原の識別、貪食、及び消化により開始される。したがって、APCによる取り込みを阻害するナノ製剤は、免疫活性化を回避することができ、免疫原性の低減、最小限のABC現象の発生、及びそれゆえ血液循環寿命の有意な延長をもたらす。

#### 【0036】

pMPC-nタンパク質の貪食を評価するために、6人のドナーからの静止及び刺激ヒト末梢血単核細胞(PBMC)の両方を用いて、RhB標識天然OVA及びRhB標識pMPC-nOVAのそれぞれとインキュベートした。図3Fは結果をまとめたもので、これらはpMPC-カプセル化が、刺激後であってもPBMCによるOVAの貪食を効果的に妨害することができることを示している。PBMCが多くの主要な種類のAPCからなることを考慮すると、pMPC-nタンパク質は最小限の免疫原性を提示するだろうと予

40

50

想して、次いで、マウスへの pMPC-nOVA 及び天然OVA のインビポ投与後に抗体レベル ( IgG 及び IgE ) を測定することによりこれを得た。図 3 G は、 PBS ( 対照 ) 、天然OVA、及び pMPC-nOVA で処理したマウス ( BALB/C ) の IgG 及び IgE レベルを比較している。OVA の強力な免疫原性ゆえに、天然OVA で処理したマウスは、注入後に高レベルの IgG 及び IgE を発現した。しかしながら、 pMPC-nOVA 処理群では、 IgG 及び IgE レベルの有意な上昇を観察することはなく、これは pMPC カプセル化が実際に免疫活性化を抑制したことを示唆している。OVA 特異的 IgG 及び IgE レベル ( OVA - sIgG 及び OVA - sIgE ) でも同様の結果 ( 図 3 H ) を観察し、これは OVA の外側を包んでいる pMPC シェルが、 APC によるその提示をブロックしたことを見出している。マクロファージ及び APC の食作用及び貪食を最小限に抑えることにより、 pMPC-n タンパク質は、 MPS クリアランス及び適応免疫を含む主なクリアランス経路による識別及び中和を回避することに成功した。したがって、 pMPC-n タンパク質は、静脈内投与後に血液循環半減期の延長、及び理想的な生体内分布を示すことが可能である。

#### 【 0037 】

##### 実施例 7 : pMPC でカプセル化したタンパク質のインビポ循環能の評価

pMPC-n タンパク質のインビポ循環能を評価するために、 pMPC-nEGFP を放射性 <sup>125</sup>I で標識し、ナノカプセルをマウス ( Chinese Kun Ming マウス ) に、それらの尾静脈から注入した。 pMPC-nEGFP の分布及び循環を単一光子放射型コンピュータ断層撮影 ( SPECT ) で追跡した。7 日以内に収集した SPECT / X 線コンピュータ断層撮影 ( CT ) 画像を図 4 A に示す。画像 ( 図 4 A ) 及びヒストグラム ( 図 4 B ) から、注入後 72 時間で血流中の pMPC-nEGFP 循環において有意な部分を明らかに観察した。 pMPC-nEGFP 循環挙動のさらなる理解のために、異なる組織及び器官での放射活性強度をそれらの対応する総放射活性強度で正規化し、異なる時間での pMPC-nEGFP の生体内分布を得た ( 図 4 C ) 。明らかに、血中及び器官内の pMPC-nEGFP の分布は、異なる時間でもほぼ同一であり、血中の pMPC-nEGFP 量は、肝臓、脾臓、及び腎臓で検出した量よりも有意に高かった。これは、現在の全てのナノ粒子に基づく送達戦略の中でも非常に特有な生体内分布であり、典型的には投与直後の器官内における蓄積によりナノ製剤の 90 % を損失する。

#### 【 0038 】

現在のナノ粒子に基づくビヒクルとの主な差は、 pMPC-n タンパク質が、高密度で安定した非付着性の、すぐに内部タンパク質を完全にカプセル化する pMPC シェルを有することである。前述したように、この pMPC シェルは、マクロファージによる食作用を遅延させることができ、マクロファージは主として肝臓、腎臓、脾臓、肺、リンパ節、及び中枢神経系に位置する。食作用の遅延は、タンパク質ナノカプセルが捕捉される可能性を低減し、それによって器官内におけるそれらの蓄積を減少させ、血中ににおけるそれらの循環半減期を延長する。 pMPC-nBSA でも同様の結果が得られ ( 図 7 A ~ 図 7 B ) 、特有の循環及び分布挙動は、カプセル化されたタンパク質ではなく、 pMPC シェルに起因していたことを確認した。

#### 【 0039 】

さらにこれを検証するために、 pMPC-nAOx をマウス ( C57BL/6 ) に注入し、その薬物動態 ( PK ) を注入後 72 時間以内に血中の AOx 活性を測定することにより決定した。比較として、天然AOx 及び pAAm-nAOx の PK も並行して測定した。図 4 D は結果をまとめたもので、これらは天然AOx 及び pAAm-nAOx で処理したマウスと比較して、 pMPC-nAOx 処理マウスの血清 AOx 濃度がはるかに高いことを示している。2 コンパートメントモデルによるデータ分析 ( 表 3 ) により、 pMPC-nAOx の消失半減期 ( t<sub>1/2</sub> 、 相 = 2.134 時間、 t<sub>1/2</sub> 、 相 = 88.11 時間 ) が、天然AOx の消失半減期 ( t<sub>1/2</sub> 、 相 = 0.6074 時間、 t<sub>1/2</sub> 、 相 = 0.6087 時間 ) 及び pAAm-nAOx の消失半減期 ( t<sub>1/2</sub> 、 相 = 0.4297 時間、 t<sub>1/2</sub> 、 相 = 13.83 時間 ) と比較して 6 倍高いことが明らかとな

10

20

30

40

50

り、pMPC-nタンパク質の長期循環能を確認し、これはSPECT/CT結果と一致する。さらに、PK研究では、pMPCシェルがカプセル化したタンパク質の生物活性を保持することができることも裏付け、これは治療用タンパク質の送達に必須である。

#### 【0040】

(表3) 天然AOx及びナノカプセルの薬物動態パラメータ

パラメータ	天然AOx	pAAm-nAOx	pMPC-nAOx
$k_\alpha$ 相(h <sup>-1</sup> )	1.141	1.613	0.3248
$t_{1/2,\alpha}$ 相(h)	0.6074	0.4297	2.134
$\tau_\alpha$ 相(h)	0.8763	0.6199	3.079
$k_\beta$ 相(h <sup>-1</sup> )	1.139	0.05013	0.007867
$t_{1/2,\beta}$ 相(h)	0.6087	13.83	88.11
$\tau_\beta$ 相(h)	0.8782	19.95	127.1

#### 【0041】

結論として、治療用タンパク質をpMPCでカプセル化することにより、治療用タンパク質の循環半減期を延長するという一般的かつ実用的な戦略を実証した。この戦略を用いると、循環半減期の延長及び免疫原性の抑制において現在のステルス性戦略よりも優れている、密で安定した非付着性pMPCシェルでタンパク質をカプセル化することができる。多数の治療用タンパク質及び酵素が、それらの低バイオアベイラビリティ及び強力な免疫原性ゆえに臨床的に使用できないことを考慮すると、pMPC-カプセル化方法は、多くの疾患に対する臨床治療薬としてそれらの開発を促進させることができる単純明快な解決策を提供する。さらに、長期循環を特定の組織及び器官内における治療剤の蓄積を達成するための、ナノ担体の極めて重要な特性として証明したので、本明細書で提供されるpMPC-カプセル化方法は、高度な標的送達戦略の設計におけるこの根本的な問題の対処に役立ち得る。

#### 【0042】

##### 実施例8：方法

###### タンパク質吸着の定量化

異なる試料のタンパク質吸着量を以下の方法で決定した。EGFPを上記の方法及びこれまでの報告により、それぞれpMPC及びポリアクリルアミド(pAAm)でカプセル化した。10 μLのPBS(対照)、pMPC-nEGFP(1mg/mL)、pAAm-nEGFP(1mg/mL)、及び天然EGFP(1mg/mL)を30 μLのマウス全血清と混合し、37℃で30分間インキュベートした。インキュベーション後、試料を濾過して遠心濾過(分画分子量、MWC O = 100kDa)を用いてPBSで3回洗浄し、非吸収血清タンパク質を除去した。50 μLのPBSで再構成した後、全ての試料におけるEGFP量を、450nmの波長におけるそれらの吸光度をナードロップで測定することにより決定した。吸着タンパク質量のより良い定量化のために、特定量の天然EGFPを試料それぞれに添加して全試料中のEGFP濃度を確実に同じにした。最後に、吸着したタンパク質量を、標準物としてBSAを使用するBCAアッセイを用いて各試料の総タンパク質濃度を測定することにより決定した。統計分析を一元配置ANOVAに続いてテューキーのポスト検定を使用して実施した。P < 0.05またはそれ未満を有意とした。

#### 【0043】

###### 細胞取り込み及び食作用研究

Tfの受容体媒介エンドサイトシス(RME)に関する研究を、蛍光標識した天然Tf及びpMPC-nTfをU87細胞とインキュベートすることにより達成し、次いで細胞蛍光強度を測定することにより取り込みを評価した。簡潔に述べると、U87細胞を天然Tf及びpMPC-nTfに曝露する1日前に5k細胞/ウェルで96ウェルプレートに播種した。37℃で4時間のインキュベーション後、細胞をPBS(1倍)で3回すすぎ、過剰な試料及び培養培地を除去した。細胞の蛍光強度をプレートリーダー(富士フイ

10

20

30

40

50

ルム製B A S - 5 0 0 0 )を使用して読み取った。蛍光の測定後、細胞を細胞溶解緩衝液で溶解し、各ウェルの細胞における総タンパク質濃度を、標準物としてB S Aを使用するB C Aアッセイを用いて決定した。次いで、各ウェルの蛍光強度を対応するタンパク質濃度で正規化した。異なる表面を有するE G F Pの細胞取り込みを同様の方法で達成し、これを補足情報で詳述している。全ての統計分析を一元配置A N O V Aに続いてテューキーのポスト検定を使用して実施した。P < 0 . 0 5またはそれ未満を有意と見なした。

#### 【 0 0 4 4 】

モデル細胞としてJ 7 7 4 A . 1マウスマクロファージを使用し、モデルタンパク質としてローダミンB ( R h B )標識天然O V A / p M P C - n O V Aを使用して食作用を研究した。マクロファージ細胞を標準的なプロトコール ( 1 0 % F B Sを含有するD M E M 、 3 7 、 5 %二酸化炭素 )により培養し、食作用研究の2 4時間前に9 6ウェルプレートに播種した ( 5 k 細胞 / ウェル )。J 7 7 4 A . 1細胞は、補体受容体 ( C 3 R )を発現するので、オプソニン化の主な種類である補体活性化も、マクロファージ細胞に曝露する前に天然O V A及びp M P C - n O V Aを、それぞれ3 7 で3 0分間マウス全血清 ( 天然O V A + M S及びp M P C - n O V A + M S )とインキュベートすることにより試験した。次いで、天然O V A、天然O V A + M S、p M P C - n O V A及びp M P C - n O V A + M Sをそれぞれ細胞培養物に添加し、1時間インキュベートした。良好な撮像のために、ヘキスト3 3 3 4 2を細胞の各ウェルに添加し、さらに2 0分間インキュベートして細胞核を染色した。インキュベーション後、細胞をP B S ( 1倍 )で3回すすぎ、蛍光顕微鏡 ( C a r l Z e i s s 製A x i o O b s e r v e r )を使用して観察した。食作用のより良い定量化のために、本発明者らはまた、J 7 7 4 A . 1細胞を2 4ウェルプレート中において3 0 k 細胞 / ウェルの密度で培養し、次いでこれらの細胞を上記4種類のO V Aに基づく試料に曝露した。スクレーピングにより細胞を剥離した後、食作用レベルをフローサイトメトリー分析 ( B D L S R F o r t e s s a細胞分析装置 )で得た。全てのフローサイトメトリーデータは、F l o w J oを使用して分析した。

#### 【 0 0 4 5 】

##### 薬物動態研究及びデータ分析

天然A O x、p A A m - n A O x、及びp M P C - n A O xの薬物動態 ( P K )プロファイルを、静脈内投与後の血漿中における残存A O x活性をモニターすることにより得た。簡潔に述べると、1 2匹のマウス ( C 5 7 B L / 6 )を3つの群に分けて、それぞれ1 0 0 μ g の天然A O x、p A A m - n A O x、及びp M P C - n A O x ( 1 m g / m L )を尾静脈から注入した。陰性対照として、別の3匹のマウスに1 0 0 μ LのP B Sを注入した。次いで、血液試料 ( 2 0 μ L )を注入後1時間、2時間、4時間、8時間、2 4時間、及び7 2時間で尾部から採取した。次いで、血液試料を2 0 k r p mで5分間遠心分離して血液細胞を除去し、血漿中のA O x活性を、A O x酵素活性アッセイを使用して測定した。詳細な実験手順及びA O x活性測定値を補足情報で提供する。P Kデータ分析を、Y 0 < 0 . 1の制約 ( 最大A O x濃度は、0 . 1 m g / m Lよりも高くできない ) 及びプラトード = 0 . 0 0 5 3 5 4 ( 陰性対照からの平均バックグラウンド値 ) を用いた2相指數関数的減衰モデルを使用してデータをフィッティングすることにより達成した。

#### 【 0 0 4 6 】

##### オボアルブミン ( O V A ) 及びトランスフェリン ( T f ) の蛍光標識

撮像のために、2種類のタンパク質、すなわちO V A及びT fをローダミンB ( R h B )及び蛍光 ( F I T C )でそれぞれ蛍光標識した。これらのタンパク質の蛍光標識は、コンジュゲーション方法を使用して達成した。簡潔に述べると、最初にタンパク質を水で溶解し、炭酸ナトリウム緩衝液 ( 2 0 m M、p H 8 . 5 )に対して透析し、通常ストックタンパク質粉末中に存在する硫酸アンモニウムを全て除去した。透析後、タンパク質を炭酸ナトリウム緩衝液 ( 2 0 m M、p H 8 . 5 )で5 m g / m lまで希釈した。ローダミンBイソチオシアネート ( R h B - T I C )及び蛍光イソチオシアネート ( F I T C )をD M S Oで溶解し、それぞれ1 % ( w / v )ストック溶液を作製した。次いで、R h B - T I C及びF I T Cストック溶液をO V A及びT f溶液に、それぞれ5 : 1 ( 色素 : タンパク )

10

20

30

40

50

質)のモル比で添加した。反応物を4で一晩置き、次いで炭酸ナトリウム緩衝液(20 mM、pH 8.5)に対して透析し、非コンジュゲート色素を除去した。

#### 【0047】

##### タンパク質のアクリロキシ化

pMPCポリマーナノカプセル中へのタンパク質の組み込みを可能にするために、最初にタンパク質をN-アクリロキシスクシンイミド(NAS)とコンジュゲートし、アクリロイル基をそれらの表面上に取り付けた。コンジュゲーションの典型的な手順を以下の通りに記載する。最初にタンパク質(約10mg/mL)を炭酸ナトリウム緩衝液(20mM、pH 8.5)に対して透析し、通常ストックタンパク質粉末中に存在する硫酸アンモニウムを全て除去した。透析後、タンパク質溶液を炭酸ナトリウム緩衝液(20mM、pH 8.5)で5mg/mLまで希釈し、続いてNAS溶液(DMSO中10%、m/v)を添加してコンジュゲーションを実施した。使用したNASの量は、20:1のモル比(NAS対タンパク質)であり、反応物を4で1時間置くことによりコンジュゲーションを達成する。次いで、溶液をpH 7.0のリン酸緩衝液(20mM)に対して透析チューブ膜(MWCO = 10kDa、Sigma-Aldrich)を用いて完全に透析し、未反応のNASを全て除去した。アクリロイル化酵素溶液を4でさらなる使用のために保存した。

#### 【0048】

タンパク質上にコンジュゲートしたアクリロイル基の平均数を、タンパク質分子上の残留(未反応)リジンをフルオレスアミンアッセイで測定することにより決定した。簡潔に述べると、最初にフルオレスアミンを無水DMSO中に溶解し、3mg/mLのストック溶液を作製した。天然タンパク質及びそのアクリロイル化対応物を、0.1Mのリン酸緩衝液(pH = 7.0)を用いてそれぞれ1mg/mLの溶液として調製した。次いで、天然及びアクリロイル化タンパク質を0.1Mのリン酸緩衝液(pH = 7)で希釈し、濃度が0.00781、0.01563、0.03125、0.0625、0.125、0.25、0.5、及び1mg/mLの一連の溶液を作製し；100μLの各溶液をそれぞれ不透明96ウェルプレートにピペットで分注した。次いで、30μLのフルオレスアミン溶液を各ウェルに添加し；次いで、プレートを1時間室温(25)でインキュベートした。インキュベーション後、蛍光強度(Ex = 360nm、Em = 465nm)をプレートリーダーで読み取った。次いで、残留リジン数をアクリロイル化酵素と天然酵素の蛍光強度を比較することにより推定した。タンパク質上にコンジュゲートしたアクリロイル基の数を表4に列挙する。

#### 【0049】

(表4) タンパク質にコンジュゲートしたアクリロイル基の平均数

タンパク質	Lysの総数	未反応Lys(%)	コンジュゲートしたアクリロイル基の平均数
EGFP	20	42.24%	11.55
OVA	20	22.27%	15.55
HRP	5	13.71%	4.32
GOx	15	44.47%	8.33
UOx	26	34.69%	16.98
AOx	38	53.15%	17.80
Tf	58	68.27%	18.40
BSA	59	71.64%	16.73

#### 【0050】

pMPC-nEGFP、pMPC-nOVA、pMPC-nHRP、pMPC-nGOx、pMPC-nUOx、pMPC-nAOx、pMPC-nTf、及びpMPC-nBSAの合成

アクリロキシ化後、インサイチュー重合法を使用してタンパク質をpMPCでカプセル

10

20

30

40

50

化した。重合のために、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン（MPC）及びビス-メタクリルアミド（BIS）を、それぞれD I水及び無水DMSO中の10%（w/v）ストック溶液として最初に調製した。次いで、MPC及びBISを特定のモル比（表5に列挙した）でカプセル化するタンパク質の溶液に添加した。最終タンパク質濃度をリン酸緩衝液（50mM、pH7.0）で希釈することにより1mg/mLに調整した。重合を過硫酸アンモニウム（APS）及びテトラメチルエチレンジアミン（TEMED）の添加により開始し、室温で2時間置いた。重合後、溶液をPBSに対して透析し、未反応モノマー及び副生成物を除去した。pMPC-nEGFP、pMPC-nOVA、pMPC-nHRP、pMPC-nGOx、pMPC-nUOx、pMPC-nAOx、pMPC-nTf、及びpMPC-nBSAの詳細な合成パラメータを表5に列挙した。

10

## 【0051】

(表5) 様々なpMPCタンパク質ナノカプセルの合成パラメータ

試料	アクリロキシル タンパク質	MPC	BIS	APS	TEMED
pMPC-nEGFP	1	3000	400	250	500
pMPC-nOVA	1	3000	400	400	800
pMPC-nHRP	1	3000	400	300	600
pMPC-nGOx	1	16000	2400	800	1600
pMPC-nUOx	1	10000	1400	600	1200
pMPC-nAOx	1	80000	11000	4000	8000
pMPC-nTf	1	3000	400	400	800
pMPC-nBSA	1	3000	400	400	800

\* 全ての数値はモル比を示す。

## 【0052】

## 正荷電pMPC-nEGFP(+)の合成

正荷電pMPC-nEGFP(+)の合成は、pMPC-nEGFPの合成と同様である。モノマーとしてMPCのみを使用する代わりに、MPCとN-(3-アミノプロピル)メタクリルアミド塩酸塩(APm)との混合物を9:1のモル比でモノマーとして重合ステップで用いた。モノマー対EGFPの最終モル比を3000:1として維持した。EGFP濃度をリン酸緩衝液（50mM、pH7.0）で1.0mg/mLに調整した後、APS/TEMED（1:250:500、EGFP:APS:TEMED、n/n/n）を使用して重合ステップを開始し、反応物を室温で2時間置いた。次いで、反応溶液をPBSに対して透析し、反応副生成物を除去した。

20

## 【0053】

## pAAm-nEGFP及びpAAm-nAOxの合成

pAAm-nEGFP及びpAAm-nAOxを、本発明者らが以前に記載した方法を使用して調製する。本明細書では、アクリルアミド(AAm)をモノマーとしてEGFP及びAOxのカプセル化に用いた。簡潔に述べると、アクリロキシル-EGFP及びアクリロキシル-AOxをAAm及びBISと、それぞれ特定の比(EGFP:AAm:BIS=1:2000:300、AOx:AAm:BIS=1:50000:7000)で最初に混合した。タンパク質濃度をリン酸緩衝液（50mM、pH7.0）で1.0mg/mLに調整した後、APS/TEMED(EGFP:APS:TEMED=1:250:500、AOx:APS:TEMED=1:4000:8000、n/n/n)をそれぞれ使用して反応を開始し、反応物を室温で2時間置いた。次いで、反応溶液をPBSに対して透析し、反応副生成物を除去した。

30

## 【0054】

## 正荷電pAAm-nEGFP(+)の合成

正荷電pAAm-nEGFP(+)の調製をpAAm-nEGPFの合成と同様の方法で達成した。AAmとAPmとの混合物を9:1のモル比でモノマーとしてカプセル化に用いた。モノマーをEGFPと混合した後、EGFP及び2種類のモノマーの最終モル比

40

50

は、1：1800：200（EGFP：AAm：APm）である。タンパク質濃度をリン酸緩衝液（50mM、pH7.0）で1.0mg/mLに調整した後、APS/TEMED（EGFP：APS：TEMED=1：250：500、n/n/n）を使用して重合ステップを開始し、反応物を室温で2時間置いた。次いで、反応溶液をPBSに対して透析し、反応副生成物を除去した。

#### 【0055】

##### タンパク質ナノカプセルの精製

透析後、タンパク質ナノカプセルを重力によりカラムを通過させて非カプセル化タンパク質を除去した。異なる物理的特性に基づいて、pMPCに基づくタンパク質ナノカプセル及びpAAmに基づくタンパク質ナノカプセルを、それぞれ疎水性相互作用カラム（Phenyl-Sepharose CL-4B）及びサイズ排除カラム（Sepharose-6B）で精製した。pMPC-nタンパク質の精製のために、5mLのPhenyl-Sepharose CL-4Bをガラスカラム内にピペットで分注することによりカラムを調製した。試料を負荷する前に、カラムを2.5Mの硫酸ナトリウムであらかじめ平衡化した。pMPC-タンパク質を硫酸ナトリウム粉末と最初に混合し、硫酸ナトリウムの最終濃度を2.5Mにした。次いで、試料をカラム上に負荷し、2.5Mの硫酸ナトリウム溶液で溶出した。pMPC-タンパク質粒子は超親水性表面（pMPC）を有するため、それらのカラムに対する結合親和性は、特に高塩濃度（2.5Mの硫酸ナトリウム）のような条件では、天然タンパク質よりもはるかに弱い。したがって、pMPCカプセル化タンパク質は、2.5Mの硫酸ナトリウムで溶出するのに対して、天然タンパク質はカラム上に結合する。2.5Mの硫酸ナトリウムによる溶出液を収集し、遠心濾過を使用して濃縮した。次いで、試料をPBSに対して透析し、硫酸ナトリウムを除去して4でさらなる研究のために保存した。  
10

#### 【0056】

pAAm-nタンパク質の精製を、本発明者らが以前に記載した方法を使用して達成した。これは、試料を重力によりSepharose-6Bカラムを通過させることにより達成した。5mLのSepharose-6Bビーズをガラスカラム内にピペットで分注することによりSepharoseカラムを調製した。次いで、カラムをPBSであらかじめ平衡化した。平衡化後、試料をカラム内に負荷し、次いでPBSで溶出した。Sepharose-6Bの分画範囲は10,000~4,000,000Daであるため、カプセル化されたタンパク質（pAAm-nタンパク質）は、Sepharoseビーズの孔を通り抜けるには大きすぎて、結果として、溶出中に最初に溶出する。溶出液を画分当たり100μLの体積で収集し、280nmでの各画分の吸光度を、バックグラウンドとして溶出緩衝液（PBS）を使用することによりUV/VISメーターで測定した。カプセル化されたタンパク質の画分（最初のA280ピーク）を収集して組み合わせ、次いで遠心濾過を使用して濃縮した。タンパク質ナノ複合体溶液を4でさらなる研究のために保存した。  
20

#### 【0057】

##### タンパク質濃度の測定

pMPC-nOVA、pMPC-nEGFP、pMPC-nEGFP（+）、pAAm-nEGFP、pAAm-nEGFP（+）、pMPC-nHRP、pMPC-nGOx、pMPC-nUOx、pMPC-nAOx、pAAm-nAOx、及びpMPC-nTfを含む、タンパク質ナノカプセルのタンパク質濃度を、BCAマイクロアッセイを使用して測定した。試験前に、2種類のBCA試薬を、以下のレシピを使用して調製した。試薬Aは、10mLのDI水中に0.1gのビシンコニン酸二ナトリウム塩水和物（BCA）、0.32gの炭酸ナトリウム、0.01gの酒石酸を溶解させて、続いてpHを1MのNaOH溶液で11.25に調整することにより調製した。試薬Bは、5mLのDI水中に0.2gの  
40

CuSO4\*5H2O

を溶解させることにより調製した。BCAワーキング溶液（BWS）は、50体積の試薬

50

A 及び 1 体積の試薬 B を合わせて混合することにより調製した。

#### 【0058】

各タンパク質の標準曲線を、一連の濃度 (0.0078125, 0.015625, 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 mg / mL) を有する天然タンパク質を使用して確立した。これは、384ウェルプレート中において PBS の 1 mg / mL タンパク質溶液の 2 倍希釈を繰り返すことにより達成した。BCA アッセイは、異なる濃度を有する 10 μL の天然タンパク質溶液を、それぞれ 384 ウェルプレートの各ウェルに添加し、続いて 10 μL の BCA ワーキング溶液 (BWS) を添加することにより実施した。その間に、10 μL のタンパク質ナノカプセル溶液も同じプレートに添加し、続いて 10 μL の BWS を添加した。次いで、プレートを 65 °C で 1 時間インキュベートした。550 nm での各ウェルの吸光度を、プレートリーダーを使用することにより読み取った。カプセル化されたタンパク質の濃度を、550 nm でのその吸光度及び同じ条件で確立した標準曲線を使用することにより算出した。  
10

#### 【0059】

タンパク質ナノカプセルの TEM 及び DLS 研究

TEM 試料を、炭素コーティングした銅グリッド上にそれぞれ 2 μL の pMPC-nEGFP 溶液及び pMPC-nOVA をドロップコーティングすることにより調製した。試料の液滴をグリッドと 45 秒間接触させて、次いで過剰量の試料をキムワイプで除去した。次いで、グリッドをすすぎ、pH 7.0 の 1% リンタンゲステン酸ナトリウムで染色した。次いで、グリッドを再度すすぎ、続いて過剰な染色剤をキムワイプで除去した。グリッドを真空下で乾燥し、FEI Tecnai T12 透過型電子顕微鏡で観察した。  
20

#### 【0060】

DLS 測定値を、Malvern 製 Zetasizer Nano 機器を用いて 173 ° の散乱角で得た。DLS から得られた粒子サイズを図 5A ~ 図 5K にまとめた。

#### 【0061】

pMPC-nHRP、pMPC-nGOx、pMPC-nUOx、及び pMPC-nAOx の活性アッセイ及び安定性

pMPC-nHRP 及び天然 HRP の活性を、過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) を基質として使用し、3,3',5,5' - テトラメチルベンジジン (TMB) の酸化速度をモニターすることにより決定した。簡潔に述べると、0.001%、0.002%、0.003%、0.004%、0.006%、0.008% (w/v) の濃度を有する一連の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ストック溶液を、0.5 mM の TMB を含む 0.1 M の酢酸緩衝液 (pH 5.01) で 50% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (w/v) を希釈することにより調製した。1 mL の基質溶液を 1 μL の pMPC-nHRP (0.1 mg / mL) または天然 HRP と混合した後、655 nm での反応溶液の吸光度 (A655) を UV-VIS 分光計で 3 分間モニターした。吸収曲線を時間に対してプロットし、曲線の直線部から A655 / 分を算出した。活性アッセイを一連の濃度の基質で繰り返して触媒速度を得て、Lineweaver-Burk プロットにより K<sub>M</sub><sup>app</sup> 及び k<sub>cat</sub><sup>app</sup> を得た。  
30

#### 【0062】

天然 GOx、pMPC-nGOx、天然 AOx、及び pMPC-nAOx の活性を同様の方法で決定した。簡潔に述べると、反応初速度を、それぞれ異なる濃度の基質を含むアッセイ溶液とインキュベートした場合の GOx 及び AOx による TMB の酸化速度をモニターすることにより決定した。天然 GOx 及び pMPC-nGOx については、アッセイ溶液を、0.1 M のリン酸緩衝液 (pH 7.0) 中で TMB (0.5 mM)、天然 HRP (0.001 mg / mL)、及び異なる量の D-グルコース (glucose) (0.005%、0.010%、0.015%、0.020%、0.030%、0.040%、w/v) を混合することにより調製した。天然 AOx 及び pMPC-nAOx については、アッセイ溶液を、0.1 M のリン酸緩衝液 (pH 7.0) 中の TMB (0.5 mM)、天然 HRP (0.001 mg / mL)、及び異なる量のエタノール (0.0025%、0.005%、0.0075%、0.010%、0.020%、0.030%、w/v)  
40  
50

により構成した。測定値は、 $1 \mu\text{L}$  の天然酵素または pMPC-n タンパク質（天然 GOx 及び pMPC-n GOx については  $0.5 \text{ mg/mL}$ 、天然 AOX 及び pMPC-n AOX については  $1 \text{ mg/mL}$ ）とそれらの対応するアッセイ溶液とのインキュベーション中に反応溶液の A655 をモニターすることにより得た。

#### 【0063】

天然 UOX 及び pMPC-n UOX 活性を、 $1 \mu\text{L}$  の天然 UOX または pMPC-n UOX ( $0.714 \text{ mg/mL}$ ) と一連の尿酸溶液 (pH = 8,  $0.1 \text{ M}$  のホウ酸緩衝液、尿酸濃度:  $0.005\%$ 、 $0.010\%$ 、 $0.015\%$ 、 $0.020\%$ 、 $0.030\%$ 、 $0.040\%$ 、w/v) とのインキュベーション中に UV 分光計で A290 の低下をモニターすることにより決定した。初速度は、 $290 \text{ nm}$  での吸収を時間に対してプロットし、曲線の直線部 (linear portion) から A290 / 分を算出することにより得た。10

#### 【0064】

天然 AOX 及び pMPC-n AOX の熱安定性を、以下の手順を使用して実施した：天然 AOX 及び pMPC-n AOX の溶液 ( $1 \text{ mg/mL}$ 、 $10 \text{ mM}$  のリン酸緩衝液、pH 7.0) を 37 度一定時間 (1 ~ 96 時間) 最初にインキュベートし、続いて氷浴でクエンチしてから室温に戻した。次いで、AOX 活性アッセイをこれらの試料で実施し、天然 AOX 及び pMPC-n AOX の残存活性を決定した。

#### 【0065】

プロテアーゼに対する天然 UOX 及び pMPC-n UOX の安定性を、以下のプロトコールを使用して実施した：天然 UOX 及び pMPC-n UOX の溶液 ( $0.714 \text{ mg/mL}$ 、 $10 \text{ mM}$  のホウ酸緩衝液、pH 8.0、 $10 \text{ mM}$  の Ca<sup>2+</sup>) をトリプシンストック溶液 ( $10 \text{ mg/mL}$ ) と混合し、最終トリプシン濃度を  $0.1 \text{ mg/mL}$  にした。天然 UOX 及び pMPC-n UOX 溶液の対照群は、ストック溶液をトリプシン溶液の体積と同じ体積の PBS と混合することにより調製した。これらの 4 種類の溶液調製を氷浴中で実施して、トリプシンの活性化を回避した。調製後、4 種類の溶液を 37 度一定時間 (20 ~ 180 分) インキュベートし、続いて氷浴でクエンチした。次いで、UOX 活性アッセイをこれらの試料で実施し、天然 UOX 及び pMPC-n UOX の残存活性を決定した。20

#### 【0066】

##### 細胞生存率アッセイ

pMPC-n EGF P、pMPC-n OVA、pMPC-n UOX、及び pMPC-n AOX を含む、pMPC-n タンパク質の毒性を、U87 細胞と異なる量の pMPC-n タンパク質 ( $0.01 \text{ mg/mL}$ 、 $0.05 \text{ mg/mL}$ 、 $0.10 \text{ mg/mL}$ 、 $0.20 \text{ mg/mL}$ ) との 24 時間のインキュベーション後に細胞生存率を測定することにより評価した。より良い比較のために、天然 EGF P、OVA、UOX、及び AOX の毒性も同じ方法で試験した。U87 細胞を 96 ウェルプレート中に播種し ( $10^4$  細胞 / ウェル、 $100 \mu\text{L}$  / ウェル)、試料に曝露する前に DMEM (培地中のグルコースは通常レベルで、 $10\% \text{ FBS}$  を含有する) 中で 1 日培養した。pMPC-n タンパク質及びそれらの天然対応物をそれぞれ添加した後、細胞をさらに 24 時間インキュベートした。インキュベーション後、CellTiter-Blue ( $20 \mu\text{L}$ ) を各ウェルに添加し、さらに 3 時間インキュベートした。次いで、プレートを振盪台に載せて  $150 \text{ rpm}$  で 5 分間、溶液を完全に混合した。生細胞は CellTiter-Blue を減少させて、赤みを帯びた蛍光色を示す。細胞生存率の定量化は、蛍光強度をプレートリーダーで測定することにより達成した ( $\text{Ex} = 535 \text{ nm}$ 、 $\text{Em} = 585 \text{ nm}$ )。未処理細胞の生存率を 100 % としてデータ分析中に使用した。40

#### 【0067】

##### 異なる表面を有する EGF P タンパク質ナノ粒子の細胞取り込み

タンパク質ナノカプセルの、それらの細胞内在化における表面特性の効果を評価するために、本発明者らは EGF P を pAAM 及び pMPC でカプセル化し、それぞれ pAAM

10

30

30

40

50

- n E G F P (ゼータ電位 = - 3 . 3 8 mV) 及び p M P C - n E G F P (ゼータ電位 = - 0 . 2 2 2 mV) を得て、重合中に A P m を導入することにより、正荷電 p A A m - n E G F P (+) (ゼータ電位 = + 1 . 2 7 mV) 及び p M P C - n E G F P (+) (ゼータ電位 = + 1 . 0 8 mV) も調製した。研究は、U 8 7 細胞をこれらの E G F P ナノカプセルとインキュベートすることにより達成した。U 8 7 細胞を 9 6 ウエルプレート中に播種し (10<sup>4</sup> 細胞 / ウエル、100 μL / ウエル)、試料に曝露する前に D M E M (培地中のグルコースは通常レベルで、10% F B S を含有する) 中で 1 日培養した。次いで、p A A m - n E G F P 、p A A m - n E G F P (+) 、p M P C - n E G F P 、及び p M P C - n E G F P (+) を含む、E G F P ナノカプセルを細胞に添加して (10 μg / ウエル)、37° で 4 時間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を P B S (1 倍) で 3 回すすぎ、過剰な試料及び培養培地を除去した。細胞の蛍光強度をプレートリーダー (富士フィルム製 B A S - 5 0 0 0 ) を使用して読み取った。蛍光の測定後、細胞を細胞溶解緩衝液で溶解し、各ウェルの細胞における総タンパク質濃度を、標準物として B S A を使用する B C A アッセイを用いて決定した。次いで、各ウェルの蛍光強度を対応するタンパク質濃度で正規化した。全ての統計分析を一元配置 A N O V A に続いてテューキーのポスト検定を使用して実施した。P < 0 . 0 5 またはそれ未満を有意と見なした。  
10

#### 【 0 0 6 8 】

ヒト血液末梢細胞 (P B M C) による p M P C - n O V A の貪食

天然 O V A 及び p M P C - n O V A を、観察及び定量化のためにローダミン B で最初に標識した。識別情報のないヒト P B M C を、U C L A C e n t e r f o r A I D S R e s e a r c h ( C F A R ) V i r u s o l o g y C o r e L a b o r a t o r y から U C L A I n s t i t u t i o n a l R e v i e w B o a r d ( I R B ) 承認のプロトコールに従って、I R B 承認の書面による同意書と共に入手した。3人のドナーからの P B M C を leukopack から F i c o l l により導入の 4 8 時間前に単離した。細胞の半分を R P M I 培地、20% F B S 、1% G P S ( L - グルタミン / ペニシリソウ / ストレプトマイシン ) 中で培養して静止状態を 2 日間維持したのに対して、他方の半分は、R P M I 培地、20% F B S 、1% G P S 中で 20 単位 / mL の I L - 2 及び 25 μg / mL の P H A で 2 日間刺激した。P B M C を、O p t i - M E M 培地中 1 ウエル当たり細胞 1 × 1 0 5 個の密度で 4 8 ウエルプレートに播種した。P B M C に P B S 、天然 O V A 、及び p M P C - n O V A をそれぞれ 4 時間導入した。細胞を F A C S 緩衝液中で 2 回洗浄し、P B S 中の 2% ホルムアルデヒドで固定した。蛍光強度を L S R F o r t e s s a ( B D B i o s c i e n c e s ) 上で検査した。データを F l o w J o ( T r e e S t a r ) ソフトウェアにより分析した。生細胞ゲートでは、リンパ球集団を F S C - A 対 F S C - H プロット及び F S C - A 対 S S C - A プロットに基づいて分離した。蛍光分析をリンパ球集団内で実施した。ローダミン B 陽性ゲート ( R h B + ) を P B S 処理対照試料に基づいて設定した。  
20  
30

#### 【 0 0 6 9 】

マウスにおける p M P C - n A O x の薬物動態研究

天然 A O x 、p A A m - n A O x 、及び p M P C - n A O x の薬物動態 ( P K ) プロファイルを、静脈内投与後の血漿中の残存 A O x 活性をモニターすることにより得た。簡潔に述べると、12匹のマウス ( C 5 7 B L / 6 ) を 3 つの群に分けて、それぞれ 1 0 0 μg の天然 A O x 、p A A m - n A O x 、及び p M P C - n A O x ( 1 mg / mL ) を尾静脈から注入した。陰性対照として、別の 3 匹のマウスに 1 0 0 μL の P B S を注入した。次いで、血液試料 ( 2 0 μL ) を注入後 1 時間、2 時間、4 時間、8 時間、24 時間、及び 72 時間で尾部から採取した。次いで、血液試料を 2 0 k r p m で 5 分間遠心分離して血液細胞を除去し、血漿中の A O x 活性を、A O x 酵素活性アッセイを使用して測定した。残存 A O x 活性を、1 μL の血漿と 1 0 0 μL のアッセイ溶液 ( 0 . 1 M のリン酸緩衝液、p H = 7 . 0 中の 1% E t O H 、0 . 0 2 mg / mL の H R P 、及び 0 . 5 mM の T M B ) とをインキュベートし、6 2 0 nm での吸光度変化をプレートリーダーでモニター  
40  
50

することにより決定した。次いで、異なる濃度（0.4688 μg/mL、0.9375 μg/mL、1.875 μg/mL、3.75 μg/mL、7.5 μg/mL、15 μg/mL 及び 30 μg/mL）を有する一連の天然AOxストック溶液を調製し、これらを使用して反応速度とAOx濃度との間の関連性を確立した。

#### 【0070】

PKデータ分析を、 $Y_0 < 0.1$  の制約（最大AOx濃度は、0.1 mg/mLよりも高くできない）及びプラトー = 0.005354（陰性対照からの平均バックグラウンド値）を用いた2相指数関数的減衰モデルを使用してデータをフィッティングすることにより達成した。全てのデータ分析は、Graphpad Prismを使用して達成した。

#### 【0071】

マウスにおけるpMPC-nEGFP、pMPC-nBSA、pAAm-nBSA、及びpAAm-nBSA (+) の生体内分布

マウスにおけるpMPC-nEGFP、pMPC-nBSA、pAAm-nBSA、及びpAAm-nBSA (+) の生体内分布を、単一光子放射型コンピュータ断層撮影 (SPECT) / X線コンピュータ断層撮影 (CT) 撮像方法を使用して得た。注入後に試料の追跡を可能にするために、pMPC-nEGFP、pMPC-nBSA、pAAm-nBSA、及びpAAm-nBSA (+) を、注入前にヨードゲン (iodogen) 法を使用して<sup>125</sup>Iで放射性標識した。次いで、試料をマウス (KM) に尾静脈から動物1匹当たりそれぞれ 100 μL (約 0.1 mg タンパク質) の投与量で注入した。次いで、動物を投与後 3 時間、24 時間、72 時間、120 時間、及び 168 時間で画像した。撮像のために、最初に動物を 100 μL のペントバルビタールナトリウム (2.5%) の腹腔内注射により麻酔し、次いで CT (平均で約 7 分)、続いて SPECT 走査 (平均で約 24 分) により撮像した。CT 及び SPECT 走査で使用した詳細なパラメータを以下の通りに記載した。CT：フレーム解像度、256 × 512；管ボテージ (voltage) 、45 kVp；電流、0.15 mA；露光時間、500 ms / フレーム。収集画像のリアルタイム 3D 再構成を、Nucoline ソフトウェア (v1.02、Mediso、ハンガリー) を使用して実施した。SPECT：高解像度のための、9つのピンホールプローブを備えた円錐コリメータ；エネルギーピーク、28 keV；ウインドウ幅、10%；解像度、1 mm / ピクセル；マトリックス、256 × 256；投影、24；走査時間、60 秒 / 投影。サブセット化による期待値最大化 3 次元画像を、HiSPECT (Bioscann、米国) を使用して再構成した。再構成アルゴリズムには 4 つのサブセット及び 6 次反復法を含み、解像度は 0.4 mm / ピクセルであった。

#### 【0072】

マウスにおけるpMPC-nOVAの免疫原性研究

pMPC-nOVAの免疫原性を、pMPC-nOVA注入後のマウスにおける IgG、IgE、OVA特異的 IgG (OVA-sIgG)、及び OVA 特異的 IgE (OVA-sIgE) の血清濃度を測定することにより得た。簡潔に述べると、3つのマウス群 (BALB/C、1群当たり 5 匹の動物) に PBS (プランク対照)、100 μg の天然 OVA (陽性対照)、及び 100 μg の pMPC-nOVA (重量は、OVA タンパク質の重量を示す) をそれぞれ尾静脈から投与した。次いで、血液試料を各動物から注入後 15 日目に採取した。次いで、血液試料を遠心分離して血液細胞を除去し、IgE、IgG、OVA-sIgE、OVA-sIgG の濃度を ELISA アッセイで決定した。

#### 【0073】

結論

これは、本発明の好ましい実施形態の記載を結論付ける。本発明の 1 つ以上の実施形態に関する前述の記載は、例示及び説明の目的で提示されている。網羅的であること、または本発明を開示される正確な形態に制限することを意図するものではない。上記の教示に照らして、多くの修正及び変更が可能である。

#### 【0074】

本明細書で引用された全ての刊行物、特許、及び特許出願は、あらゆる目的のためにそ

10

20

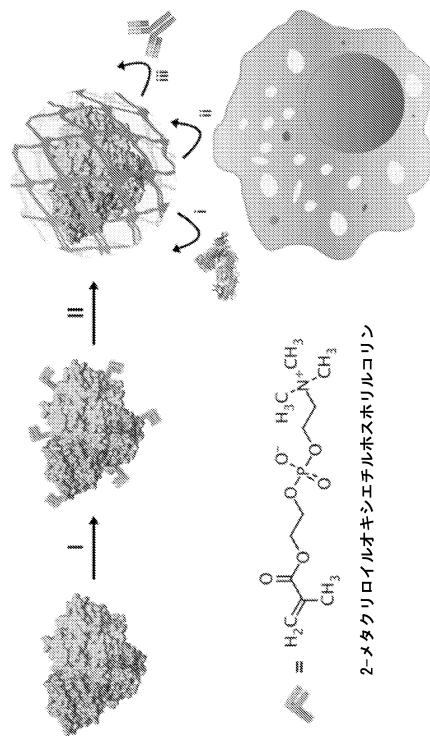
30

40

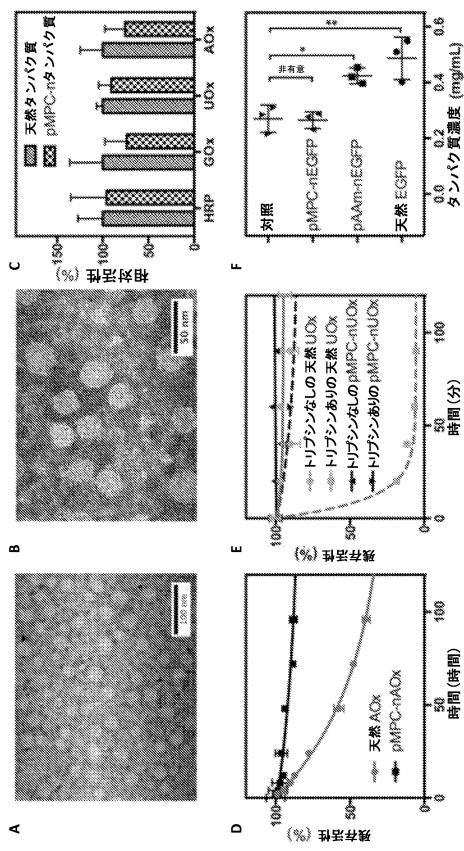
50

の内容全体が、参照によって本明細書に組み込まれる。

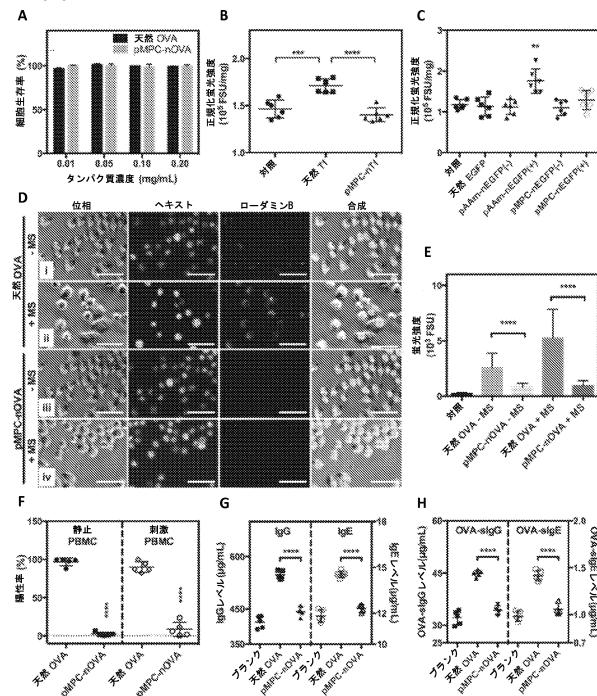
【図1】



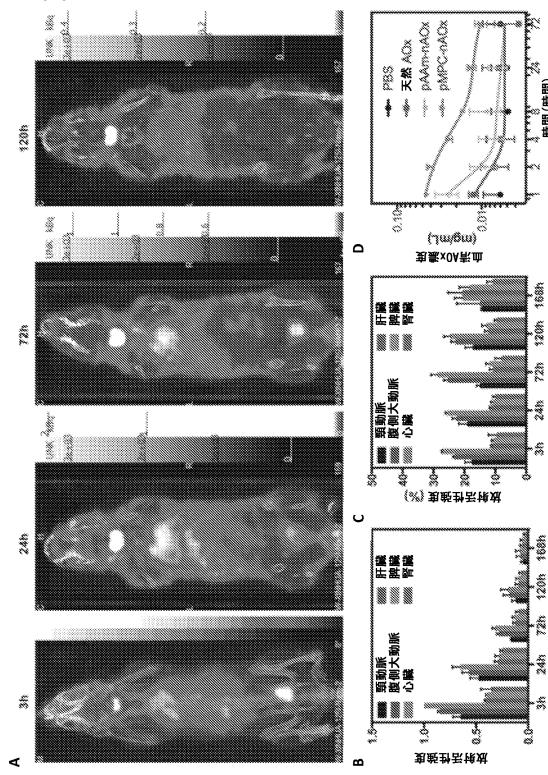
【図2】



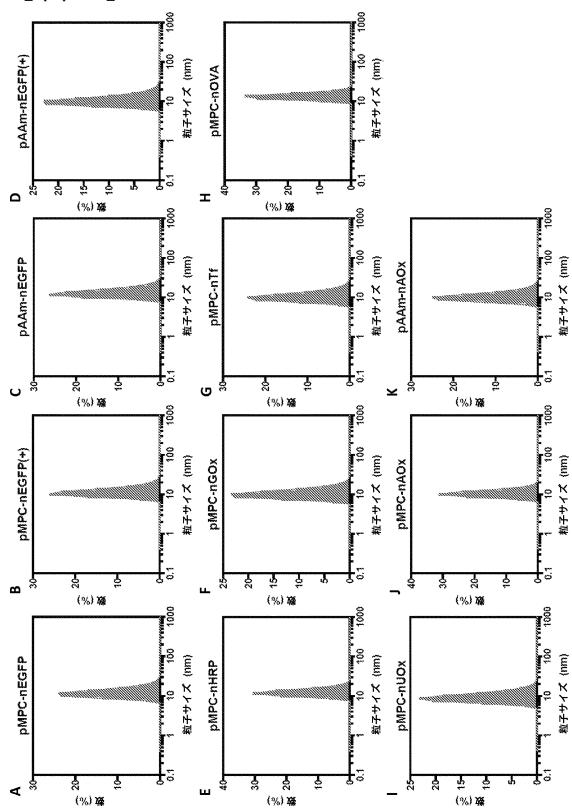
【図3】



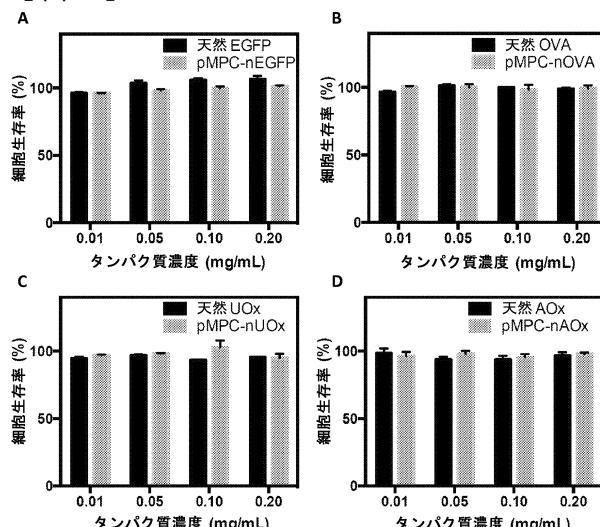
【図4】



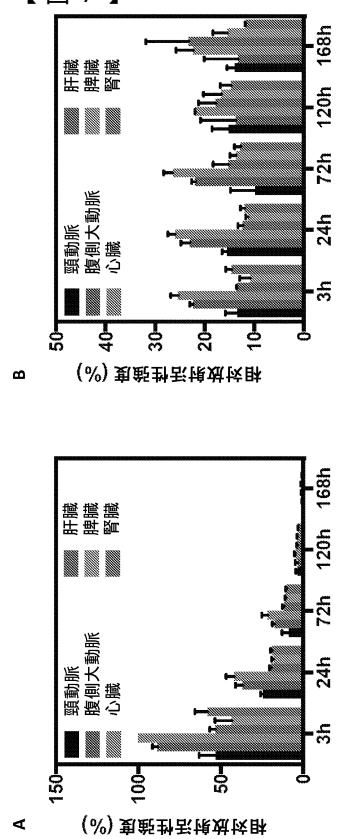
【図5】



【図6】



【図7】



---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
C 0 7 K 14/485 (2006.01) C 0 7 K 14/485

(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 100205707  
弁理士 小寺 秀紀  
(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 ルー ユンフェン  
アメリカ合衆国 9 0 2 3 0 カリフォルニア州 カルバー シティ クラーモン プレイス 1  
0 7 8 9  
(72)発明者 リュー ヤン  
アメリカ合衆国 9 0 0 3 4 カリフォルニア州 ロサンゼルス ローズ アベニュー 1 1 1 3  
0 アパートメント 1 0 1  
(72)発明者 ウエン チン  
アメリカ合衆国 9 0 2 3 0 カリフォルニア州 カルバー シティ クラーモン プレイス 1  
0 7 8 9  
(72)発明者 リュー ガン  
アメリカ合衆国 9 0 0 2 4 カリフォルニア州 ロサンゼルス ランドフェア アベニュー 5  
0 0

審査官 渡邊 潤也

(56)参考文献 國際公開第2008/098930 (WO, A1)  
Nature Nanotechnology, 2010年 1月, 5, p.48-53  
Bioconjugate Chemistry, 2008年, 19(11), p.2144-2155

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
A 6 1 K 9 / 0 0  
A 6 1 K 4 7 / 0 0  
A 6 1 K 3 8 / 0 0  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )