

(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2019-529571

(P2019-529571A)

(43) 公表日 令和1年10月17日 (2019. 10. 17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/56 (2017. 01)	A 6 1 K 47/56	4 C 0 7 6
A 6 1 K 45/00 (2006. 01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/7088 (2006. 01)	A 6 1 K 31/7088	4 C 0 8 6
A 6 1 K 48/00 (2006. 01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 43/00 (2006. 01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 51 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2019-538580 (P2019-538580)
 (86) (22) 出願日 平成29年10月3日 (2017. 10. 3)
 (85) 翻訳文提出日 令和1年5月27日 (2019. 5. 27)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/054884
 (87) 国際公開番号 W02018/067526
 (87) 国際公開日 平成30年4月12日 (2018. 4. 12)
 (31) 優先権主張番号 62/403, 595
 (32) 優先日 平成28年10月3日 (2016. 10. 3)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(71) 出願人 519115989
 イーオーエス バイオサイエンス、イ
 ンコーポレイテッド
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州 90
 067, センチュリー シティ、スイー
 ト 1100, 1999 アベニュー オ
 ブ ザ スターズ
 (74) 代理人 100114775
 弁理士 高岡 亮一
 (74) 代理人 100121511
 弁理士 小田 直
 (74) 代理人 100202751
 弁理士 岩堀 明代
 (74) 代理人 100191086
 弁理士 高橋 香元

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 機能性RNAと小分子薬の治療用複合体、およびナノ粒子送達ビヒクル

(57) 【要約】

機能性RNAと複合体形成した小分子薬を含む治療用複合体が本出願で開示される。さらに、キャリアポリペプチドと、小分子薬と複合体形成した機能性RNA分子と、を含むナノ粒子を含む組成物であって、キャリアポリペプチドが、細胞標的化セグメント、細胞透過性セグメント、およびオリゴヌクレオチド結合セグメントを含む、組成物、ならびに、当該ナノ粒子を作製する方法および使用する方法が本出願で開示される。さらに、癌を有する対象を治療する方法であって、キャリアポリペプチドと、小分子の化学療法薬と複合体形成した機能性RNA分子と、を含むナノ粒子を含む組成物の有効量を上記対象に投与することを含み、上記キャリアポリペプチドが、細胞標的化セグメント、細胞透過性セグメント、およびオリゴヌクレオチド結合セグメントを含む、方法が説明される。また、説明されるナノ粒子を含む、医薬組成物、製品、およびキットも説明される。

【選択図】 図 1

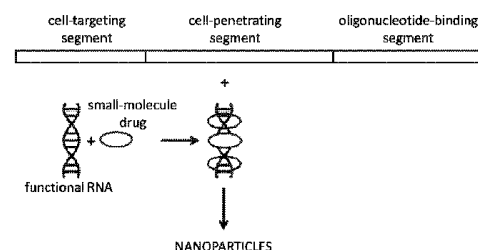


FIG. 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

小分子薬と複合体形成した機能性 RNA 分子を含む組成物であって、前記機能性 RNA 分子が標的タンパク質の発現を調節する、組成物。

【請求項 2】

小分子薬がインターカレートした少なくとも 1 つの相補領域を含む機能性 RNA 分子を含む、組成物。

【請求項 3】

前記機能性 RNA 分子が、標的タンパク質の発現を調節する、請求項 2 に記載の組成物。

10

【請求項 4】

前記機能性 RNA 分子と前記小分子薬とを含むリボソームを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 5】

前記リボソームが、細胞標的化セグメントを含む、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 6】

キャリアポリペプチドと、小分子薬と複合体形成した機能性 RNA 分子と、を含むナノ粒子を含む組成物であって、前記キャリアポリペプチドが、細胞透過性セグメントおよびオリゴヌクレオチド結合セグメントを含む、組成物。

20

【請求項 7】

前記組成物におけるキャリアポリペプチド対機能性 RNA 分子のモル比が、約 3 : 1 ~ 約 8 : 1 である、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記小分子薬が、前記機能性 RNA 分子にインターカレートされており、前記機能性 RNA 分子が、少なくとも 1 つの相補領域を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 9】

前記細胞透過性セグメントが、ペントンベースポリペプチドまたはそのバリエーションを含む、請求項 6 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の組成物。

30

【請求項 10】

前記オリゴヌクレオチド結合セグメントが、正に荷電している、請求項 6 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 11】

前記オリゴヌクレオチド結合セグメントが、ポリリジンを含む、請求項 6 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 12】

前記オリゴヌクレオチド結合セグメントが、デカリジンを含む、請求項 6 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 13】

前記組成物中のナノ粒子の大きさの平均が、約 100 nm 以下である、請求項 6 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の組成物。

40

【請求項 14】

前記キャリアポリペプチドが、細胞標的化セグメントをさらに含む、請求項 6 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 15】

前記細胞標的化セグメントが、癌細胞と結合する、請求項 5 または 14 に記載の組成物。

【請求項 16】

前記細胞標的化セグメントが、細胞の表面上の受容体と結合する、請求項 5、14 および 15 のいずれか 1 項に記載の組成物。

50

【請求項 17】

前記細胞標的化セグメントが、HER3またはc-METと結合する、請求項5および14～16のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 18】

前記細胞標的化セグメントが、

i. ヘレグリン配列もしくはそのバリエーション、または

ii. インターナリンB配列もしくはそのバリエーション

を含む、請求項5および14～17のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 19】

前記細胞標的化セグメントが、ヘレグリンの受容体結合ドメインを含む、請求項5および14～18のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 20】

前記機能性RNA分子の少なくとも一部が、二本鎖である、請求項1～19のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 21】

前記機能性RNA分子が、一本鎖であり、少なくとも1つの自己相補的な領域を含む、請求項1～20のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 22】

前記機能性RNA分子が、siRNA分子またはshRNA分子である、請求項1～21のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 23】

前記機能性RNA分子が、約10ヌクレオチド長～約100ヌクレオチド長である、請求項1～22のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 24】

前記機能性RNA分子が、免疫チェックポイントタンパク質の発現を減少させる、請求項1～23のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 25】

前記組成物における機能性RNA分子対小分子薬のモル比が、約1:1～約1:60である、請求項1～24のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 26】

前記組成物における機能性RNA分子対小分子薬のモル比が、約1:5～約1:60である、請求項1～25のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 27】

前記小分子薬が、化学療法剤である、請求項1～26のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 28】

前記小分子薬が、アントラサイクリン、アルキル化剤、またはアルキル化様作用剤である、請求項1～27のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 29】

前記小分子薬が、ドキソルビシンである、請求項1～28のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 30】

前記組成物が無菌である、請求項1～29のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 31】

前記組成物が、凍結乾燥されている、請求項30に記載の組成物。

【請求項 32】

請求項1～31のいずれか1項に記載の組成物を含む医薬組成物であって、薬学的に許容される賦形剤をさらに含む、医薬組成物。

【請求項 33】

請求項1～32のいずれか1項に記載の組成物をバイアル内に含む、製品。

【請求項 34】

10

20

30

40

50

請求項 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の組成物または請求項 3 3 に記載の製品と、使用説明書と、を含むキット。

【請求項 3 5】

対象において癌を治療する方法であって、請求項 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の組成物の有効量を前記対象に投与することを含む、方法。

【請求項 3 6】

標的タンパク質の発現の調節と細胞の増殖の阻害とを同時に行う方法であって、請求項 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の組成物の有効量を前記細胞に投与することを含む、方法。

【請求項 3 7】

癌を有する対象において免疫応答の刺激と癌細胞の殺滅とを同時に行う方法であって、請求項 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の組成物の有効量を前記対象に投与することを含む、方法。

【請求項 3 8】

小分子薬を機能性 RNA 分子と組み合わせることを含む、組成物を作製する方法であって、前記小分子薬が前記機能性 RNA 分子にインターカレートする、方法。

【請求項 3 9】

キャリアポリペプチド、機能性 RNA 分子、および小分子薬を組み合わせることを含む、ナノ粒子組成物を作製する方法であって、前記キャリアポリペプチドが、細胞透過性セグメントおよびオリゴヌクレオチド結合セグメントを含む、方法。

【請求項 4 0】

前記機能性 RNA 分子を前記小分子薬と組み合わせて、前記小分子薬を前記機能性 RNA 分子と複合体形成させることと、

前記キャリアポリペプチドを、前記小分子薬と複合体形成した機能性 RNA 分子と組み合わせることと、
を含む、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記小分子薬が前記機能性 RNA 分子にインターカレートする、請求項 3 9 または 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

結合していない小分子薬を除去することを含む、請求項 3 9 ~ 4 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記ナノ粒子組成物を凍結乾燥することをさらに含む、請求項 3 9 ~ 4 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連案件との相互参照

本出願は、2016年10月3日に出願された「DRUG - DELIVERY NANOPARTICLES WITH RNA AND SMALL - MOLECULE CARGOS」なる表題の米国仮出願第62 / 403, 595号に対する優先権の利益を主張するものであり、この仮出願は、全ての目的のために参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

ASCIIテキストファイルでの配列表の提出

以下のASCIIテキストファイルでの提出物の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる：コンピュータ可読形式(CRF)の配列表(ファイル名：761542000840SEQLIST.txt；記録日：2017年10月3日、サイズ：14KB)。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 3 】

発明の分野

本発明は、癌の治療のための方法およびナノ粒子組成物に関する。本発明はさらに、核酸 - 薬物複合体に関する。

【 背景技術 】

【 0 0 0 4 】

ターゲティング療法の現在の戦略には、抗体で標的化された化学療法剤（すなわちイムノコンジュゲート）、ターゲットトキシン（targeted toxins）、シグナル遮断抗体、および抗体で標的化されたりポソーム（すなわちイムノリポソーム）が包含される。たとえば、トラスツズマブは、HER2/neuシグナリングを妨害するモノクローナル抗体であり、一般にHER2+乳癌の治療に使用されている。しかしながら、治療の開始後にトラスツズマブ耐性癌が生じる可能性もあり、この治療薬の有効性が制限されている。

10

【 0 0 0 5 】

ドキソルビシンなどの小分子化学療法薬もまた、特定の癌を治療するために一般的に使用されている。しかし、ドキソルビシンはまた、心筋症および癌の耐性という大きなリスクを有している。リポソーム（Lipodoxなど）の使用を介したドキソルビシンなどの小分子薬の送達、特定の癌に対する薬物の投与の有効性を向上させている。それでも、多くの抗癌剤の毒性のせいで、有効な低用量治療薬が、差し迫って必要とされている。

【 0 0 0 6 】

本明細書において言及される全ての刊行物、特許、および特許出願の開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

20

【 発明の概要 】

【 0 0 0 7 】

一部の態様では、小分子薬と複合体形成した機能性RNA分子を含む組成物であって、機能性RNA分子が標的タンパク質の発現を調節する、組成物を提供する。

【 0 0 0 8 】

別の態様では、小分子薬がインターカレートした少なくとも1つの相補領域を含む機能性RNA分子を提供する。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、標的タンパク質の発現を調節する。

【 0 0 0 9 】

30

上記の組成物の一部の実施形態では、組成物は、機能性RNA分子と小分子薬とを含むリポソームを含む。一部の実施形態では、リポソームは、細胞標的化セグメントを含む。

【 0 0 1 0 】

別の態様では、キャリアポリペプチドと、小分子薬と複合体形成した機能性RNA分子と、を含むナノ粒子を含む組成物であって、上記キャリアポリペプチドが細胞透過性セグメントおよびオリゴヌクレオチド結合セグメントを含む、組成物を提供する。一部の実施形態では、キャリアポリペプチドは、細胞標的化セグメントをさらに含む。

【 0 0 1 1 】

一部の実施形態では、小分子薬が、RNA分子にインターカレートされる。一部の実施形態では、RNA分子の少なくとも一部は、二本鎖である。一部の実施形態では、RNA分子は一本鎖であり、少なくとも1つの自己相補的な領域を含む。一部の実施形態では、RNA分子は、siRNA、shRNA、miRNA、環状RNA（circRNA）、rRNA、piRNA（Piwi-interacting RNA）、tsRNA（toxic small RNA）、またはリボザイムである。一部の実施形態では、RNA分子は、アンチセンスRNA分子である。一部の実施形態では、RNA分子は、少なくとも1つの三リン酸の5'末端を有する。一部の実施形態では、RNA分子は、約10ヌクレオチド長～約100ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、ナノ粒子組成物におけるRNA分子対小分子薬のモル比は、約1:1～約1:60である。一部の実施形態では、組成物における機能性RNA分子対小分子薬のモル比は、約1:5～約1:60である。

40

50

【 0 0 1 2 】

一部の実施形態では、機能性RNA分子は、免疫チェックポイントタンパク質の発現を減少させる。

【 0 0 1 3 】

一部の実施形態では、小分子薬は、化学療法剤である。一部の実施形態では、小分子薬は、アントラサイクリンである。一部の実施形態では、小分子薬はドキソルビシンである。一部の実施形態では、小分子薬はアルキル化剤またはアルキル化様作用剤 (alkylating-like agent) である。一部の実施形態では、小分子薬は、カルボプラチン、カルムスチン、シスプラチン、シクロホスファミド、メルファラン、プロカルバジン、またはチオテパである。

10

【 0 0 1 4 】

一部の実施形態では、組成物におけるキャリアポリペプチド対RNA分子のモル比は、約3:1~約8:1である。一部の実施形態では、組成物におけるキャリアポリペプチド対RNA分子のモル比は、約4:1~約5:1である。一部の実施形態では、組成物におけるキャリアポリペプチド対RNA分子のモル比は、約4:1である。

【 0 0 1 5 】

一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、哺乳類細胞と結合する。一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、疾患状態の細胞と結合する。一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、癌細胞と結合する。一部の実施形態では、この癌細胞はHER3+癌細胞またはc-MET+癌細胞である。一部の実施形態では、この癌細胞は、頭頸部癌細胞、膀胱癌細胞、乳癌細胞、グリアの癌細胞、卵巣癌細胞、子宮頸癌細胞、胃癌細胞、皮膚癌細胞、結腸癌細胞、直腸癌細胞、肺癌細胞、腎臓癌細胞、前立腺癌細胞、または甲状腺癌細胞である。

20

【 0 0 1 6 】

一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、細胞の表面上の標的分子と結合する。一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、細胞の表面上の受容体と結合する。一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、HER3またはc-METと結合する。

【 0 0 1 7 】

一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、細胞の表面上に発現した受容体に特異的に結合するリガンドを含む。一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、ヘレグリン配列もしくはそのバリエーション；またはインターナリンB (Internalin B) 配列もしくはそのバリエーションを含む。一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、ヘレグリンの受容体結合ドメインを含む。

30

【 0 0 1 8 】

一部の実施形態では、細胞透過性セグメントは、ペントンベースポリペプチドまたはそのバリエーションを含む。

【 0 0 1 9 】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド結合セグメントは、正に荷電している。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド結合セグメントは、ポリリジンを含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド結合セグメントは、デカリジンを含む。

40

【 0 0 2 0 】

一部の実施形態では、キャリアポリペプチドは、HerPBK10である。

【 0 0 2 1 】

一部の実施形態では、組成物中のナノ粒子の大きさの平均は、約100nm以下である。

【 0 0 2 2 】

一部の実施形態では、組成物は、無菌である。一部の実施形態では、組成物は、液体の組成物である。一部の実施形態では、組成物は、乾燥した組成物である。一部の実施形態では、組成物は、凍結乾燥されている。

【 0 0 2 3 】

50

別の態様では、細胞標的化セグメント、細胞透過性セグメントおよびオリゴヌクレオチド結合セグメントを含むキャリアポリペプチドと、小分子薬と複合体形成した機能性RNA分子と、を含むナノ粒子を含む医薬組成物であって、薬学的に許容される賦形剤をさらに含む医薬組成物を提供する。

【0024】

別の態様では、細胞標的化セグメント、細胞透過性セグメントおよびオリゴヌクレオチド結合セグメントを含むキャリアポリペプチドと、小分子薬と複合体形成した機能性RNA分子と、を含むナノ粒子を含む組成物をバイアル内に含む製品を提供する。一部の実施形態では、このバイアルは密閉されている。

【0025】

別の態様では、細胞標的化セグメント、細胞透過性セグメントおよびオリゴヌクレオチド結合セグメントを含むキャリアポリペプチドと、小分子薬と複合体形成した機能性RNA分子と、を含むナノ粒子を含む組成物ならびに使用説明書を含むキットを提供する。

【0026】

別の態様では、対象において癌を治療する方法であって、細胞標的化セグメント、細胞透過性セグメントおよびオリゴヌクレオチド結合セグメントを含むキャリアポリペプチドと、小分子薬と複合体形成した機能性RNA分子と、を含むナノ粒子を含む組成物の有効量を上記対象に投与することを含む方法を提供する。一部の実施形態では、この癌は、HER3+癌またはc-MET+癌である。一部の実施形態では、この癌は、頭頸部癌、膀胱癌、乳癌、卵巣癌、グリアの癌、子宮頸癌、胃癌、皮膚癌、結腸癌、直腸癌、肺癌、腎臓癌、前立腺癌細胞、または甲状腺癌である。

【0027】

別の態様では、標的タンパク質の発現の調節と細胞の増殖の阻害とを同時に行う方法であって、上述の組成物のいずれかを上記細胞に投与することを含む方法を提供する。

【0028】

別の態様では、癌を有する対象において免疫応答の刺激と癌細胞の殺滅とを同時に行う方法であって、上述の組成物の有効量を上記対象に投与することを含む方法を提供する。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、免疫チェックポイントタンパク質の発現を減少させる。

【0029】

別の態様では、小分子薬を機能性RNA分子と組み合わせることを含む、組成物を作製する方法であって、上記小分子薬が機能性RNA分子にインターカレートする、方法を提供する。一部の実施形態では、キャリアポリペプチド、機能性RNA分子、および小分子薬を組み合わせることを含む、ナノ粒子組成物を作製する方法であって、キャリアポリペプチドが細胞透過性セグメントおよびオリゴヌクレオチド結合セグメントを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、本方法は、RNA分子を小分子薬と組み合わせ、小分子薬を機能性RNA分子と複合体形成させることと、キャリアポリペプチドを、小分子薬と複合体形成した機能性RNA分子と組み合わせることと、を含む。一部の実施形態では、本方法は、結合していない小分子薬を除去することを含む。一部の実施形態では、小分子薬は、RNA分子にインターカレートする。一部の実施形態では、本方法は、ナノ粒子組成物を滅菌ろ過することをさらに含む。一部の実施形態では、本方法は、ナノ粒子組成物を凍結乾燥することをさらに含む。

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1】図1は、細胞標的化ドメイン、細胞透過性ドメイン、およびオリゴヌクレオチド結合ドメインを含むキャリアポリペプチドの概略図を例示する。キャリアポリペプチドを、小分子薬に結合した機能性RNA分子と組み合わせると、ナノ粒子が形成される。

【図2】図2は、ろ過前のdox:sirNA1複合体およびdox:sirNA2複体の試料（レーン2および3）、ならびに10K MWCOフィルターを使用したろ過後の残余分（レーン5および6）およびろ過物（レーン7および8）をローディングした1

10

20

30

40

50

%のアガロースゲルを示す。ろ過前の複合体および残余分はs i R N Aを含むのに対し、ろ過物はこれを含んでいない。

【図3】図3は、10K MWCOフィルターでのろ過後の、dox : s i R N A 1複合体(上部)およびdox : s i R N A 2複合体(下部)由来の残余分およびろ過物の吸収スペクトルを示す。両複体の残余分は、約480nmに最大ピークを有し、ドキソルビシンが残余分に存在していたことを表している。ろ過物は、480nmに有意なピークを有しておらず、ろ過物にドキソルビシンがほとんどないことを表している。

【図4】図4は、10K MWCOフィルターでのろ過後の、dox : s i S c r m 1複合体、dox : s i R N A 1複合体、dox : s i R N A 2複合体、およびdox : D N A o l i g o複合体由来の残余分およびろ過物の吸収スペクトルを示す。4つすべての複体の残余分は、約480nmに最大ピークを有し、ドキソルビシンが残余分に存在していたことを表している。ろ過物は、480nmに有意なピークを有しておらず、ろ過物にドキソルビシンがほとんどないことを表している。

【図5A】図5A~Cは、3つの異なる用量のs i S c r m 1、s i R N A 1、s i R N A 2、dox : s i S c r m 1複合体、dox : s i R N A 1複合体、dox : s i R N A 2複合体、dox : D N A o l i g o複合体、またはドキソルビシン単独でトランスフェクトしてから24時間後(図5A)、48時間後(図5B)、または72時間後(図5C)の、J I M T 1細胞の細胞生存率を示す。

【図5B】同上。

【図5C】同上。

【図6A】図6Aは、3つの異なる濃度のs i S c r m 1、s i R N A 1、s i R N A 2、dox : s i S c r m 1複合体、dox : s i R N A 1複合体、dox : s i R N A 2複合体、dox : D N A o l i g o複合体、またはドキソルビシン単独でJ I M T 1(トラスツズマブ(trastuzumab)耐性ヒト乳癌)細胞をトランスフェクトしてから24時間後の、s i R N A 1の標的のm R N A (q P C Rにより測定)の相対的なm R N Aのノックダウンを示す。

【図6B】図6Bは、3つの異なる濃度のs i S c r m 1、s i R N A 1、s i R N A 2、dox : s i S c r m 1複合体、dox : s i R N A 1複合体、dox : s i R N A 2複合体、dox : D N A o l i g o複合体、またはドキソルビシン単独でJ I M T 1細胞をトランスフェクトしてから24時間後の、s i R N A 2の標的のm R N A (q P C Rにより測定)の相対的なm R N Aのノックダウンを示す。

【図7】図7は、10K MWCOフィルターでのろ過後のdox : s i S c r m 2複合体およびdox : s i R N A 3複合体由来の残余分およびろ過物の吸収スペクトルを示す。両複体の残余分は、約480nmに最大ピークを有し、ドキソルビシンが残余分に存在していたことを表している。ろ過物は、480nmに有意なピークを有しておらず、ろ過物にドキソルビシンがほとんどないことを表している。

【図8】図8は、3つの異なる用量のs i S c r m 2、s i R N A 3、dox : s i S c r m 2複合体、dox : s i R N A 3複合体、またはドキソルビシン単独でのトランスフェクトから24時間後の、4 T 1 - F l u c - N e o / e G F P - P u r o細胞の細胞生存率を示す。4 T 1 - F l u c - N e o / e G F P - P u r o細胞は、F l u cおよびe G F Pを安定して発現するマウスの乳房腫瘍細胞株である。4 T 1細胞株は、トリプルネガティブ乳癌細胞株とみなされている。

【発明を実施するための形態】

【0031】

本明細書中で、小分子薬(化学療法剤など)と複合体形成した機能性R N A分子(二本鎖機能性R N A分子 s i R N A分子など)を含む治療用複合体を、提供する。一部の実施形態では、小分子薬は、機能性R N A分子にインターカレートされている。この治療用複合体は、細胞を標的とし得るリボソームまたはナノ粒子の送達ビヒクルの使用を介するなどした統合型の単一送達パッケージとして、細胞に送達することができる。たとえば、一部の態様では、治療用複合体は、細胞に当該複合体を(すなわちリボフェクションを介

10

20

30

40

50

して)送達することができるリボソームに含まれている。特定の態様では、キャリアポリペプチドと、小分子薬と複合体形成した機能性RNA分子とを含むナノ粒子を含む組成物を提供する。このキャリアポリペプチドは、細胞透過性セグメントおよびオリゴヌクレオチド結合セグメントを含み、治療用複合体と組み合わせると自然にナノ粒子になることができる。一部の態様では、ナノ粒子組成物または治療用複合体の有効量は、癌を治療するため癌を有する対象に投与される。

【0032】

細胞(癌細胞など)に機能性RNA分子および小分子薬の両方を同時に送達することは、幅広い全身性の免疫応答などの望ましくない副作用を限定しながら有効な疾患の治療を可能にする。小分子薬および機能性RNA分子の共送達は、腫瘍増殖の遅延、またはさらには腫瘍の退縮をもたらすように相乗的に作用し得る。従来、*siRNA*およびドキシソルビシンの送達のためのシステム、たとえばLiu et al., *Co-delivery of doxorubicin and siRNA by a simplified platform with oligodeoxynucleotides as a drug carrier*, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 126, pp. 531-540 (2015)に記載されるものなどは、ドキシソルビシンを、CGA反復を含む特異的に設計したDNAオリゴヌクレオチド(すなわちCGA-DNAオリゴヌクレオチド)にインターカレートすること、ならびにdox:DNA複合体をPEI、CMCS-PEG-NGR、および*siRNA*と混合して、二重の積み荷(*dual-cargo*)粒子(すなわちdox:DNAの積み荷および機能性RNAの積み荷)を形成することに依存していた。本明細書中さらに詳述されるように、ドキシソルビシンなどの小分子薬は、機能性RNA分子にインターカレートすることができ、この複合体は、機能性RNA分子および小分子薬の両方の機能的な特性を保持することが見いだされている。さらに、機能性RNA分子と複合体化した小分子薬は、単独で投与される小分子薬と比較して、小分子薬の効力が増大する。この予期せぬ知見は、小分子薬が、注意深く設計したCGA-DNAオリゴヌクレオチド以外の核酸分子と結合できることを示している。この知見が小分子薬のRNA分子への直接的な結合を可能にしているため、RNA分子は、たとえばタンパク質発現を調節(すなわち増大もしくは減少)する、および/または生物学的な作用(抗癌作用など)を有するように、機能的であるように設計することができる。さらに、小分子薬が機能性RNA分子と直接結合できるとの知見により、dox:DNA複合体および*siRNA*の混合物よりも単純な、一つの複合体の送達が可能となる。

10

20

30

【0033】

一部の実施形態では、複合体は、キャリアポリペプチドを用いて細胞に送達され、これらはナノ粒子となり得る。たとえば、本明細書中で、キャリアポリペプチドと、小分子薬と複合体形成した機能性RNA分子とを含むナノ粒子を含むナノ粒子組成物であって、上記キャリアポリペプチドが、細胞標的化セグメント、細胞透過性セグメント、およびオリゴヌクレオチド結合セグメントを含む、ナノ粒子組成物を提供する。ナノ粒子のキャリアポリペプチドは、癌細胞などの標的の細胞に対して、機能性RNA分子および小分子薬を保護、輸送、および標的化することができる。キャリアポリペプチドは、細胞の内部への機能性RNA分子および小分子薬の送達を可能にする、細胞透過性セグメントを含む。よって、本ナノ粒子は、効率的な治療用複合体の標的化した送達を確保して、対象へ投与される有効な用量を少なくすることができる。さらに、キャリアポリペプチドは、細胞外ヌクレアーゼまたは機能性RNA分子を分解し得る他の因子から機能性RNA分子を保護する。

40

【0034】

一部の実施形態では、標的タンパク質の発現の調節および細胞増殖の阻害を同時に行う方法であって、小分子薬(化学療法薬など)と複合体形成した機能性RNA分子を含む組成物の有効量を上記細胞に投与するステップを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、二本鎖の機能性RNA分子(二本鎖の*siRNA*など)である

50

。一部の実施形態では、小分子薬は、機能性RNA分子にインターカレートされている。

【0035】

一部の実施形態では、標的タンパク質の発現の調節および細胞増殖の阻害を同時に行う方法であって、キャリアポリペプチドと、小分子薬（化学療法薬など）と複合体形成した機能性RNA分子とを含むナノ粒子を含む組成物の有効量を上記細胞に投与するステップを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、二本鎖の機能性RNA分子（二本鎖のsiRNAなど）である。一部の実施形態では、小分子薬は、機能性RNA分子にインターカレートされている。

【0036】

一部の実施形態では、細胞を殺滅する方法であって、機能性RNA分子および小分子薬（化学療法薬など）を含む複合体で上記細胞をトランスフェクトするステップを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、二本鎖の機能性RNA分子（二本鎖のsiRNAなど）である。一部の実施形態では、小分子薬は、機能性RNA分子にインターカレートされている。

10

【0037】

一部の実施形態では、細胞を殺滅する方法であって、キャリアポリペプチドと、小分子薬（化学療法薬など）と複合体形成した機能性RNA分子とを含むナノ粒子を含む組成物を上記細胞に投与するステップを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、二本鎖の機能性RNA分子（二本鎖のsiRNAなど）である。一部の実施形態では、小分子薬は、機能性RNA分子にインターカレートされている。

20

【0038】

一部の実施形態では、細胞のアポトーシスを誘導する方法であって、機能性RNA分子および小分子薬を含む複合体で上記細胞をトランスフェクトするステップを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、二本鎖の機能性RNA分子である。一部の実施形態では、小分子薬は化学療法剤である。一部の実施形態では、小分子薬は、機能性RNA分子にインターカレートされている。

【0039】

一部の実施形態では、細胞のアポトーシスを誘導する方法であって、キャリアポリペプチドと、小分子薬（化学療法薬など）と複合体形成した機能性RNA分子とを含むナノ粒子を含む組成物を上記細胞に投与するステップを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、二本鎖の機能性RNA分子である。一部の実施形態では、小分子薬は化学療法剤である。一部の実施形態では、小分子薬は、機能性RNA分子にインターカレートされている。

30

【0040】

一部の実施形態では、細胞の壊死を誘導する方法であって、機能性RNA分子および小分子薬を含む複合体で上記細胞をトランスフェクトするステップを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、二本鎖の機能性RNA分子である。一部の実施形態では、小分子薬は、化学療法剤である。一部の実施形態では、小分子薬は、機能性RNA分子にインターカレートされている。

【0041】

一部の実施形態では、細胞の壊死を誘導する方法であって、キャリアポリペプチドと、小分子薬（化学療法薬など）と複合体形成した機能性RNA分子とを含むナノ粒子を含む組成物を上記細胞に投与するステップを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、二本鎖の機能性RNA分子である。一部の実施形態では、小分子薬は化学療法剤である。一部の実施形態では、小分子薬は、機能性RNA分子にインターカレートされている。

40

【0042】

一部の実施形態では、癌細胞を化学療法薬に感作させる方法であって、キャリアポリペプチドと、化学療法薬と複合体形成した機能性RNA分子とを含むナノ粒子を含む組成物を上記癌細胞に投与するステップを含み、上記機能性RNA分子が、化学療法薬に対する

50

癌細胞の感受性を上げる、方法を提供する。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、二本鎖の機能性RNA分子（二本鎖のsiRNAなど）である。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、薬物排出、化学療法薬の耐性、または化学療法薬の感受性に関連するタンパク質の発現を減少させるsiRNA分子である。一部の実施形態では、化学療法薬は、機能性RNA分子にインターカレートされている。

【0043】

一部の実施形態では、癌細胞を化学療法薬に感作させる方法であって、機能性RNA分子および化学療法薬を含む複合体で上記細胞をトランスフェクトするステップを含み、上記機能性RNA分子が、化学療法薬に対する癌細胞の感受性を上げる、方法を提供する。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、二本鎖の機能性RNA分子（二本鎖のsiRNAなど）である。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、薬物排出、化学療法薬の耐性、または化学療法薬の感受性に関連するタンパク質の発現を減少させるsiRNA分子である。一部の実施形態では、化学療法薬は、機能性RNA分子にインターカレートされている。

10

【0044】

一部の実施形態では、免疫応答の調節および癌細胞の殺滅を同時に行う方法であって、キャリアポリペプチドと、小分子薬（化学療法薬など）と複合体形成した機能性RNA分子とを含むナノ粒子を含む組成物の有効量を上記細胞に投与するステップを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、二本鎖の機能性RNA分子（二本鎖のsiRNAなど）である。たとえば、一部の実施形態では、機能性RNA分子は、免疫チェックポイントタンパク質の発現を減少させるsiRNA分子である。一部の実施形態では、小分子薬は、機能性RNA分子にインターカレートされている。

20

【0045】

一部の実施形態では、免疫応答の調節および癌細胞の殺滅を同時に行う方法であって、機能性RNA分子および小分子薬（化学療法薬など）を含む複合体で上記細胞をトランスフェクトするステップを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、二本鎖の機能性RNA分子（二本鎖のsiRNAなど）である。たとえば、一部の実施形態では、機能性RNA分子は、免疫チェックポイントタンパク質の発現を減少させるsiRNA分子である。一部の実施形態では、小分子薬は、機能性RNA分子にインターカレートされている。

30

【0046】

一部の実施形態では、癌を有する対象において、免疫応答の調節および癌細胞の殺滅を同時に行う方法であって、キャリアポリペプチドと、小分子薬（化学療法薬など）と複合体形成した機能性RNA分子とを含むナノ粒子を含む組成物の有効量を上記対象に投与するステップを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、二本鎖の機能性RNA分子（二本鎖のsiRNAなど）である。たとえば、一部の実施形態では、機能性RNA分子は、免疫チェックポイントタンパク質の発現を減少させるsiRNA分子である。一部の実施形態では、小分子薬は、機能性RNA分子にインターカレートされている。

40

【0047】

一部の実施形態では、癌を有する対象において、免疫応答の調節および癌細胞の殺滅を同時に行う方法であって、キャリアポリペプチドと、小分子薬（化学療法薬など）と複合体形成した機能性RNA分子とを含むナノ粒子を含む組成物の有効量を上記対象に投与するステップを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、二本鎖の機能性RNA分子である。たとえば、一部の実施形態では、機能性RNA分子は、免疫チェックポイントタンパク質の発現を減少させるsiRNA分子である。一部の実施形態では、小分子薬は、化学療法剤である。一部の実施形態では、小分子薬は、機能性RNA分子にインターカレートされている。

【0048】

一部の実施形態では、対象の癌を治療する方法であって、機能性RNA分子および小分

50

子薬を含む複合体の有効量を上記対象に投与するステップを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、二本鎖の機能性RNA分子である。一部の実施形態では、小分子薬は化学療法剤である。一部の実施形態では、小分子薬は、機能性RNA分子にインターカレートされている。一部の実施形態では、この複合体は、リボソーム、ナノ粒子、またはキャリアポリペプチドなどの担体を使用して、輸送される。

【0049】

一部の実施形態では、対象の癌を治療する方法であって、キャリアポリペプチドと、小分子薬（化学療法薬など）と複合体形成した機能性RNA分子とを含むナノ粒子を含む組成物の有効量を上記対象に投与するステップを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、二本鎖の機能性RNA分子である。一部の実施形態では、小分子薬は化学療法剤である。一部の実施形態では、小分子薬は、機能性RNA分子にインターカレートされている。

10

【0050】

本明細書中で使用する場合、単数形「a」、「an」、および「the」は、明らかに文脈が他の意味を表さない限り複数形を含む。

【0051】

本明細書中の「約」の値またはパラメータに対する言及は、当該値またはパラメータ自体を対象とする変分を含む（および変分を表す）。たとえば、「約X」を表す説明は、「X」の説明を含む。さらに、「約X～Y」との言及は、「約X～約Y」に相当し、「約X～YまたはY～Z」は、「約X～約Y、または約Y～約Z」に相当する。さらに、「約X、Y、またはZ以下」との言及は、「約X以下、約Y以下、または約Z以下」に相当し、「約X、Y、またはZ以上」との言及は、「約X以上、約Y以上、または約Z以上」に相当する。

20

【0052】

用語「有効な」は、他の意味が示されていない限り、これを使用する文脈の中で使用する場合に、当該結果が感染症もしくは疾患状態の治療に関連するかまたは本明細書中他で記載されているものかどうかにかかわらず、意図する結果をもたらすまたは生じさせる量の化合物または成分を説明するために、本明細書中で使用されている。

【0053】

本明細書中で使用する場合、用語「薬学的に許容される」は、本化合物または本組成物が、疾患の重症度および本明細書中に記載の治療の必要性の観点から過度に有害な副作用をもたらすことなく当該治療を達成するように、ヒトの対象を含む対象への投与に適していることを意味している。

30

【0054】

用語「対象」または「患者」は、哺乳類を説明するように本明細書中同義で使用されている。対象の例として、ヒトまたは動物（限定するものではないが、イヌ、ネコ、げっ歯類（マウス、ラット、もしくはハムスターなど）、ウマ、ヒツジ、ウシ、ブタ、ヤギ、ロバ、ウサギ、または霊長類（サル、チンパンジー、オラウータン、ヒヒ、もしくはマカクなど）を含む）が、挙げられる。

【0055】

用語「～を治療する（treat）」、「～を治療すること（treating）」、および「治療（treat）」は、少なくとも1つの症状の緩和、阻害、抑制、もしくは排除、疾患進行の遅延、疾患再発の遅延、または疾患の阻害を介した病態の改善を含む、疾患状態または病態を罹患した対象に有益性を提供するいずれかの作用を表すように、本明細書中同意語として使用されている。

40

【0056】

特定のタンパク質に関してアップレギュレートした発現（たとえばHER3+またはc-MET+）を呈する細胞は、当該細胞が、当該タンパク質に関してアップレギュレートしていない細胞と比較して多くのタンパク質を提示する場合に、アップレギュレートされていると言われる。

50

【 0 0 5 7 】

本明細書中記載の本発明の態様およびバリエーションは、当該態様およびバリエーション「を構成する (c o n s i s t i n g) 」および/または「から本質的になる (c o n s i s t i n g e s s e n t i a l l y o f) 」ものを含むことが理解されている。

【 0 0 5 8 】

本明細書中記載の様々な実施形態の特性のうちの1つ、一部、またはすべてを組み合わせることで本発明の他の実施形態を形成することが可能であることを、理解すべきである。

【 0 0 5 9 】

本明細書中使用されるセクションの見出しは、単に効率化のためのものであり、記載の主題を限定すると解釈すべきではない。

【 0 0 6 0 】

機能性RNAおよび小分子薬の複合体

本治療用複合体は、小分子薬と複合体形成した機能性RNA分子を含む。小分子薬は、たとえば、静電相互作用により、または機能性RNA分子にインターカレートすることにより、機能性RNA分子と複合体形成することができる。

【 0 0 6 1 】

機能性RNA分子は、たとえばタンパク質発現の阻害（たとえばRNAi経路を介する）、タンパク質発現の増大（たとえば、機能性RNA分子としてのmRNAの使用を介する）、または1つ以上のサイトカイン（I型インターフェロン（たとえばIFN- α 、IFN- γ ）、IL-6、もしくはIL-8）などの発現の変化を引き起こすといった、生物学的な機能を提供することができる。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、抗HER2のsiRNAである。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、腫瘍細胞により発現した免疫系チェックポイントのタンパク質（たとえばPD-L1 (p r o g r a m m e d c e l l d e a t h p r o t e i n l i g a n d 1) 、またはPD-1 (p r o g r a m m e d c e l l d e a t h p r o t e i n 1) 、またはCTLA-4 (c y t o t o x i c T - l y m p h o c y t e - a s s o c i a t e d p r o t e i n 4)) の発現を調節する。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、免疫系チェックポイントのタンパク質の発現を減少させるsiRNA分子である。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、薬物排出または薬物耐性に関連するタンパク質（モノカルボン酸トランスポーター (M C T) 、多剤耐性タンパク質 (M D R) 、P糖タンパク質、多剤耐性関連タンパク質 (M R P) 、ペプチドトランスポーター (P E P T) 、またはNa⁺リン酸トランスポーター (N P T) など）の発現を調節する。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、薬物排出または薬物の耐性に関連するタンパク質（モノカルボン酸トランスポーター (M C T) 、多剤耐性タンパク質 (M D R) 、P糖タンパク質、多剤耐性関連タンパク質 (M R P) 、ペプチドトランスポーター (P E P T) 、またはNa⁺リン酸トランスポーター (N P T) など）の発現を減少させるsiRNA分子である。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、MADD (M A P k i n a s e - a c t i v a t i n g d e a t h d o m a i n) タンパク質、Smad3、またはSmad4などの、薬剤の感受性の減少に関連するタンパク質の発現を調節する。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、MADD (M A P k i n a s e - a c t i v a t i n g d e a t h d o m a i n) タンパク質、Smad3、またはSmad4などの、薬剤の感受性の減少に関連するタンパク質の発現を減少させるsiRNA分子である。一部の実施形態では、上記の活性のいずれかを伴う機能性RNA分子は、化学療法的な効果を提供する。

【 0 0 6 2 】

小分子薬と複合体形成した機能性RNA分子は、機能性RNA分子の機能的な活性を保持している。一部の実施形態では、小分子薬と複合体形成した機能性RNA分子は、小分子薬と複合体形成していない機能性RNA分子の活性の約50%以上（たとえば約60%、70%、80%、90%、95%、または100%以上）を保持している。

【 0 0 6 3 】

例示的な機能性RNA分子として、siRNA、shRNA、miRNA、環状RNA(circRNA)、rRNA、piRNA(Piwi-interacting RNA)、tsRNA(toxic small RNA)、またはリボザイムが挙げられる。一部の実施形態では、RNA分子は、アンチセンスのRNA分子である。機能性RNA分子は、機能性RNAの機能的な構成要素の5'末端または3'末端に結合し得る、機能的ではない構成要素を含むことができる。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、抗癌剤、たとえば遺伝子発現を調節すること、1つ以上の免疫系チェックポイントのタンパク質を制御することにより免疫応答を調節すること、またはサイトカインの発現を制御することにより機能し得る抗癌剤である。

【0064】

10

一部の実施形態では、機能性RNA分子は二本鎖である。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、一本鎖であり、少なくとも1つの自己相補的な領域を含む。機能性RNA分子は、たとえばステムループ構造を含み、ここでRNA分子のステム部分が自己相補的な領域を含む。二本鎖の機能性RNA分子は、完全な対形成を必要とせず、一部の実施形態では、1つ以上のバルジ、ループ、ミスマッチ、または他の二次的な構造を含む。一部の実施形態では、本ヌクレオチドの約80%以上が対形成されているか、本ヌクレオチドの約85%以上が対形成されているか、本ヌクレオチドの約90%以上が対形成されているか、または本ヌクレオチドの約95%が対形成されているか、または本ヌクレオチドの約100%が対形成されている。

【0065】

20

一部の実施形態では、機能性RNAは、T7転写したRNAなどの、1つ以上の三リン酸の5'末端を含む。三リン酸の5'末端は、I型インターフェロンの内在的な発現をもたらすことができ、これにより癌細胞死をさらに高めることができる。一部の実施形態では、RNAは、合成的に産生されるか、または1つ以上の三リン酸の5'末端を含まない。

【0066】

一部の実施形態では、機能性RNA分子は、約10~100ヌクレオチド長、たとえば約10~30、20~40、30~50、40~60、50~70、60~80、70~90、または80~100ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、約25~35ヌクレオチド長、たとえば約25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、または35ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、約25~35ヌクレオチド長、たとえば約25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、または35ヌクレオチド長である。

30

【0067】

機能性RNA分子は、化学療法剤などの小分子薬と複合体形成している。例示的な小分子薬として、アントラサイクリン(ドキソルビシン、ダウノルビシン、エピルビシン、イダルビシン、ミトキサントロン、バルルビシンなど)、またはアルキル化剤もしくはアルキル化様作用剤(カルボプラチン、カルムスチン、シスプラチン、シクロホスファミド、メルファラン、プロカルバジン、もしくはチオテパなど)が挙げられる。一部の実施形態では、小分子の化合物は、約1500ダルトン以下、たとえば約1000ダルトン、900ダルトン、800ダルトン、700ダルトン、600ダルトン、500ダルトン、400ダルトン、または300ダルトン以下である。一部の実施形態では、小分子の化合物は、約100~1500ダルトン(約100~200ダルトン、200~300ダルトン、300~400ダルトン、400~500ダルトン、500~600ダルトン、600~700ダルトン、700~800ダルトン、800~900ダルトン、900~1000ダルトン、1000~1100ダルトン、1100~1200ダルトン、1200~1300ダルトン、1300~1400ダルトン、または1400~1500ダルトンなど)である。

40

【0068】

一部の実施形態では、小分子薬は、約50mg/mL以下(たとえば約25mg/mL

50

、10 mg/mL、5 mg/mL、2 mg/mL、1 mg/mL、0.5 mg/mL、0.25 mg/mL、0.1 mg/mL、0.05 mg/mL、0.025 mg/mL、0.01 mg/mL、0.005 mg/mL、0.0025 mg/mL、または0.001 mg/mL以下)の溶解度(約25、pH7の水で測定)を有する。一部の実施形態では、小分子薬は、約0.0001~50 mg/mL(約0.0001~0.0005 mg/mL、0.0005~0.001 mg/mL、0.001~0.0025 mg/mL、0.0025~0.005 mg/mL、0.005~0.01 mg/mL、0.01~0.025 mg/mL、0.025~0.05 mg/mL、0.05~0.1 mg/mL、0.1~0.25 mg/mL、0.25~0.5 mg/mL、0.5~1 mg/mL、1~2 mg/mL、2~5 mg/mL、5~10 mg/mL、10~25 mg/mL、または25~50 mg/mLなど)の溶解度(約25、pH7の水で測定)を有する。

10

【0069】

一部の実施形態では、治療用複合体における小分子薬の機能性RNA分子に対するモル比は、約60:1以下、たとえば約50:1、40:1、30:1、20:1、10:1、5:1、4:1、3:1、2:1、または1:1以下である。一部の実施形態では、治療用複合体における小分子薬の機能性RNA分子に対するモル比は、約1:1~約60:1、たとえば約1:1~10:1、5:1~20:1、10:1~30:1、20:1~40:1、30:1~50:1、または40:1~60:1である。一部の実施形態では、治療用複合体における小分子薬の機能性RNA分子に対するモル比は、約1:1、5:1、10:1、20:1、30:1、40:1、50:1、または60:1である。

20

【0070】

小分子薬は、機能性RNA分子と複合体形成している。一部の実施形態では、小分子薬は、静電相互作用、共有結合(ジスルフィド結合など)により、またはRNAにインターカレートすることにより、機能性RNA分子と複合体形成している。機能性RNA分子に対する小分子薬の複合体形成は、配列に特異的ではない。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、相補的RNA(たとえば二本鎖のRNAまたは自己相補的な部分を有する一本鎖のRNAにおける相補的RNA)に対して対形成しており、これにより、対となる塩基間での小分子薬のインターカレーションが可能となる。一部の実施形態では、機能性RNA分子における塩基対あたりの小分子薬のモル比の平均は、約1:1~1:120(たとえば、約1:2~1:120、1:2~1:4、1:4~1:8、1:8~1:16、1:16~1:32、1:32~1:64、1:64~1:100、または1:100~1:120)である。塩基およびその相補体が、機能性RNA分子における塩基対あたりの小分子薬のモル比を考慮する場合に、2つの塩基対とみなされることが理解されている。

30

【0071】

一部の実施形態では、小分子薬と複合体形成した機能性RNA分子(二本鎖のsiRNA分子など)を含む複合体を提供する。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、1つ以上のタンパク質の発現を調節する。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、少なくとも1つの相補領域を含むか、または二本鎖のRNA分子である。一部の実施形態では、小分子薬は、機能性RNA分子にインターカレートする。一部の実施形態では、RNA分子の小分子薬に対するモル比は、約1:10~約1:60である。一部の実施形態では、小分子薬は、化学療法剤、たとえばアントラサイクリン(たとえばドキソルビシン)またはアルキル化剤もしくはアルキル化様作用剤である。

40

【0072】

一部の実施形態では、治療用複合体を含むリボソームであって、上記治療用複合体が、小分子薬と複合体形成した機能性RNA分子(二本鎖のsiRNA分子など)を含む、リボソームを提供する。一部の実施形態では、リボソームは、このリボソームがある細胞(癌細胞など)を標的とすることができる、標的化セグメントを含む。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、1つ以上のタンパク質の発現を調節する。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、少なくとも1つの相補領域を含むか、または二本鎖のRNA分子で

50

ある。一部の実施形態では、小分子薬は、機能性RNA分子にインターカレートする。一部の実施形態では、RNA分子の小分子薬に対するモル比は、約1:10~約1:60である。一部の実施形態では、小分子薬は、化学療法剤、たとえばアントラサイクリン（たとえばドキソルピシン）またはアルキル化剤もしくはアルキル化様作用剤である。

【0073】

治療用複合体は、小分子薬（化学療法剤など）と機能性RNA分子を組み合わせることにより形成することができ、これにより、配列に特異的ではない方法で、小分子薬を機能性RNA分子に結合またはインターカレートすることができる。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、二本鎖のRNA分子であり（または二本鎖のセグメントを含む）、小分子薬は、二本鎖の機能性RNA分子にインターカレートする。一部の実施形態では、小分子薬および機能性RNA分子は、約60:1、50:1、40:1、30:1、20:1、10:1、5:1、4:1、3:1、2:1、または1:1以下の比（小分子薬:機能性RNA分子）で組み合わせられている。一部の実施形態では、小分子薬および機能性RNA分子は、約1:1~約60:1、たとえば約1:1~10:1、5:1~20:1、10:1~30:1、20:1~40:1、30:1~50:1、または40:1~60:1の比（小分子薬:機能性RNA分子）で組み合わせられている。一部の実施形態では、小分子薬および機能性RNA分子は、約1:1、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40、1:45、1:50、1:55、または1:60の比（小分子薬:機能性RNA分子）で組み合わせられている。

【0074】

機能性RNA分子および小分子薬を組み合わせた後、この混合物をインキュベートすることができ、これによって、たとえば小分子薬を機能性RNA分子にインターカレートさせることにより、小分子薬および機能性RNA分子を複合体にすることができる。結合していない小分子薬は、たとえばろ過膜を使用して複合体を遠心分離することにより、複合体から分離することができる。残余分は複合体を含み、これは保持することができ、対してろ過物は、結合していない小分子薬を含む。

【0075】

一部の実施形態では、治療用複合体は、たとえば滅菌性のフィルターを使用することにより、滅菌されている。一部の実施形態では、治療用複合体は、凍結乾燥されている。一部の実施形態では、凍結乾燥した治療用複合体は、投与用に製剤化する前または担体（たとえばリボソームもしくはナノ粒子）と共に製剤化する前に、再構成されている。

【0076】

形成した治療用複合体は、リボソームまたはナノ粒子などの担体に充填することができる。よって、一部の実施形態では、治療用複合体を含むリボソームを含む組成物であって、上記治療用複合体が、機能性RNAおよび小分子薬を含む、組成物を提供する。本リボソームは、陽イオン性脂質（リポフェクタミンなど）を含み得、これは、治療用複合体の機能性RNA分子の負の電荷に結合することができる。一部の実施形態では、治療用複合体は、ナノ粒子の中、たとえば細胞透過性セグメントおよびオリゴヌクレオチド結合セグメントを含むキャリアポリペプチドを含むナノ粒子の中に、充填されている。一部の実施形態では、この担体は、抗体または受容体結合ドメインなどの標的化セグメントを含む標的の担体である。

【0077】

機能性RNAおよび小分子薬を含む治療用複合体は、細胞（たとえば癌細胞）の殺滅、細胞（たとえば癌細胞）のアポトーシスの誘導、または患者の癌の治療に、有用であり得る。

【0078】

一部の実施形態では、細胞（たとえば癌細胞）に治療用複合体を送達する方法であって、機能性RNA分子（二本鎖のsiRNA分子など）および小分子薬を含む複合体で上記細胞をトランスフェクトするステップを含む、方法が存在する。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、1つ以上のタンパク質の発現を調節する。一部の実施形態では、機能

性RNA分子は、少なくとも1つの相補領域を含むか、または二本鎖のRNA分子である。一部の実施形態では、小分子薬は、機能性RNA分子にインターカレートする。一部の実施形態では、RNA分子の小分子薬に対するモル比は、約1:10~約1:60である。一部の実施形態では、小分子薬は、化学療法剤、たとえばアントラサイクリン（たとえばドキソルビシン）またはアルキル化剤もしくはアルキル化様作用剤である。

【0079】

一部の実施形態では、細胞（たとえば癌細胞）に治療用複合体を送達する方法であって、治療用複合体を含むリボソームを含む組成物と上記細胞を接触させるステップを含み、上記治療用複合体が、小分子薬と複合体形成した機能性RNA分子（二本鎖のsiRNA分子など）を含む、方法が存在する。一部の実施形態では、リボソームは、このリボソームが上記細胞を標的とすることができる、標的化セグメントを含む。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、1つ以上のタンパク質の発現を調節する。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、少なくとも1つの相補領域を含むか、または二本鎖のRNA分子である。一部の実施形態では、小分子薬は、機能性RNA分子にインターカレートする。一部の実施形態では、RNA分子の小分子薬に対するモル比は、約1:10~約1:60である。一部の実施形態では、小分子薬は、化学療法剤、たとえばアントラサイクリン（たとえばドキソルビシン）またはアルキル化剤もしくはアルキル化様作用剤である。

10

【0080】

一部の実施形態では、細胞（たとえば癌細胞）を殺滅する方法であって、機能性RNA分子および小分子薬（たとえば化学療法薬）を含む複合体で上記細胞をトランスフェクトするステップを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、1つ以上のタンパク質の発現を調節する。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、少なくとも1つの相補領域を含むか、または二本鎖のRNA分子である。一部の実施形態では、小分子薬は、機能性RNA分子にインターカレートする。一部の実施形態では、RNA分子の小分子薬に対するモル比は、約1:10~約1:60である。一部の実施形態では、小分子薬は、化学療法剤、たとえばアントラサイクリン（たとえばドキソルビシン）またはアルキル化剤もしくはアルキル化様作用剤である。

20

【0081】

一部の実施形態では、細胞（たとえば癌細胞）を殺滅する方法であって、治療用複合体を含むリボソームを含む組成物を上記細胞と接触させるステップを含み、上記治療用複合体が、小分子薬と複合体形成した機能性RNA分子（二本鎖のsiRNA分子など）を含む、方法を提供する。一部の実施形態では、リボソームは、このリボソームが上記細胞を標的とすることができる、標的化セグメントを含む。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、1つ以上のタンパク質の発現を調節する。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、少なくとも1つの相補領域を含むか、または二本鎖のRNA分子である。一部の実施形態では、小分子薬は、機能性RNA分子にインターカレートする。一部の実施形態では、RNA分子の小分子薬に対するモル比は、約1:10~約1:60である。一部の実施形態では、小分子薬は、化学療法剤、たとえばアントラサイクリン（たとえばドキソルビシン）またはアルキル化剤もしくはアルキル化様作用剤である。

30

【0082】

一部の実施形態では、細胞（たとえば癌細胞）のアポトーシスを誘導する方法であって、機能性RNA分子および小分子薬を含む複合体で上記細胞をトランスフェクトするステップを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、1つ以上のタンパク質の発現を調節する。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、少なくとも1つの相補領域を含むか、または二本鎖のRNA分子である。一部の実施形態では、小分子薬は、機能性RNA分子にインターカレートする。一部の実施形態では、RNA分子の小分子薬に対するモル比は、約1:10~約1:60である。一部の実施形態では、小分子薬は、化学療法剤、たとえばアントラサイクリン（たとえばドキソルビシン）またはアルキル化剤もしくはアルキル化様作用剤である。

40

【0083】

50

一部の実施形態では、細胞（たとえば癌細胞）のアポトーシスを誘導する方法であって、治療用複合体を含むリボソームを含む組成物と上記細胞を接触させるステップを含み、上記治療用複合体が、小分子薬と複合体形成した機能性RNA分子（二本鎖のsiRNA分子など）を含む、方法を提供する。一部の実施形態では、リボソームは、このリボソームが上記細胞を標的とすることができる、標的化セグメントを含む。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、1つ以上のタンパク質の発現を調節する。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、少なくとも1つの相補領域を含むか、または二本鎖のRNA分子である。一部の実施形態では、小分子薬は、機能性RNA分子にインターカレートする。一部の実施形態では、RNA分子の小分子薬に対するモル比は、約1:10～約1:60である。一部の実施形態では、小分子薬は、化学療法剤、たとえばアントラサイクリン（たとえばドキソルビシン）またはアルキル化剤もしくはアルキル化様作用剤である。

10

【0084】

一部の実施形態では、対象の癌を治療する方法であって、機能性RNA分子および小分子の化学療法薬を含む複合体の有効量を上記対象に投与するステップを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、1つ以上のタンパク質の発現を調節する。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、少なくとも1つの相補領域を含むか、または二本鎖のRNA分子である。一部の実施形態では、小分子の化学療法薬は、機能性RNA分子にインターカレートする。一部の実施形態では、RNA分子の小分子薬に対するモル比は、約1:10～約1:60である。一部の実施形態では、小分子の化学療法薬は、アントラサイクリン（たとえばドキソルビシン）、アルキル化剤またはアルキル化様作用剤である。一部の実施形態では、癌の治療に使用するための治療用複合体であって、上記治療用複合体が、小分子の化学療法薬と複合体形成した機能性RNA分子を含む、治療用複合体を提供する。さらに本明細書中において、癌の治療用の医薬の製造に使用するための治療用複合体であって、上記治療用複合体が、小分子の化学療法薬と複合体形成した機能性RNA分子を含む、治療用複合体を提供する。

20

【0085】

一部の実施形態では、対象の癌を治療する方法であって、治療用複合体を含むリボソームを含む組成物の有効量を上記対象に投与するステップを含み、上記治療用複合体が、小分子の化学療法薬と複合体形成した機能性RNA分子を含む、方法を提供する。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、1つ以上のタンパク質の発現を調節する。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、少なくとも1つの相補領域を含むか、二本鎖のRNA分子である。一部の実施形態では、小分子の化学療法薬は、機能性RNA分子にインターカレートする。一部の実施形態では、RNA分子の小分子薬に対するモル比は、約1:10～約1:60である。一部の実施形態では、小分子の化学療法薬は、アントラサイクリン（たとえばドキソルビシン）、アルキル化剤またはアルキル化様作用剤である。一部の実施形態では、癌の治療に使用するためのリボソームであって、上記リボソームが、小分子の化学療法薬と複合体形成した機能性RNA分子を含む治療用複合体を含む、リボソームを提供する。さらに本明細書中において、癌の治療用の医薬の製造に使用するためのリボソームを含む組成物であって、上記リボソームが、小分子の化学療法薬と複合体形成した機能性RNA分子を含む治療用複合体を含む、組成物を提供する。

30

40

【0086】

ナノ粒子組成物

本明細書中記載のナノ粒子組成物は、細胞透過性セグメントおよびオリゴヌクレオチド結合セグメントを含むキャリアポリペプチドを含む。一部の実施形態では、本明細書中記載のナノ粒子組成物は、細胞標的化セグメント、細胞透過性セグメント、およびオリゴヌクレオチド結合セグメントを含むキャリアポリペプチドを含む。さらにナノ粒子は、小分子薬と複合体形成した機能性RNA分子を含む。機能性RNA分子は、キャリアポリペプチドのオリゴヌクレオチド結合セグメントと結合することができる。機能性RNA分子にキャリアポリペプチドが結合すると、ナノ粒子が自然に形成する。

【0087】

50

機能性RNA分子は、たとえばタンパク質発現の阻害（たとえばRNAi経路を介する）、タンパク質発現の増大（たとえば、機能性RNA分子としてのmRNAの使用を介する）、または1つ以上のサイトカイン（I型インターフェロン（たとえばIFN- α 、IFN- γ ）、IL-6、もしくはIL-8）などの発現の変化を引き起こすといった、生物学的な機能を提供することができる。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、抗HER2のsiRNAである。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、腫瘍細胞により発現した免疫系チェックポイントのタンパク質（たとえばPD-L1（programmed cell death protein ligand 1）、またはPD-1（programmed cell death protein 1）、またはCTLA-4（cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4））の発現を調節する。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、免疫系チェックポイントのタンパク質の発現を減少させるsiRNA分子である。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、薬物排出または薬物耐性に関連するタンパク質（モノカルボン酸トランスポーター（MCT）、多剤耐性タンパク質（MDR）、P糖タンパク質、多剤耐性関連タンパク質（MRP）、ペプチドトランスポーター（PEPT）、またはNa⁺リン酸トランスポーター（NPT）など）の発現を調節する。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、薬物排出または薬物の耐性に関連するタンパク質（モノカルボン酸トランスポーター（MCT）、多剤耐性タンパク質（MDR）、P糖タンパク質、多剤耐性関連タンパク質（MRP）、ペプチドトランスポーター（PEPT）、またはNa⁺リン酸トランスポーター（NPT）など）の発現を減少させるsiRNA分子である。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、MADD（MAP kinase-activating death domain）タンパク質、Smad3、またはSmad4などの、薬剤の感受性の減少に関連するタンパク質の発現を調節する。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、MADD（MAP kinase-activating death domain）タンパク質、Smad3、またはSmad4などの、薬剤の感受性の減少に関連するタンパク質の発現を減少させるsiRNA分子である。一部の実施形態では、上記の活性のいずれかを伴う機能性RNA分子は、化学療法的な効果を提供する。

【0088】

例示的な機能性RNA分子として、siRNA、shRNA、miRNA、環状RNA（circRNA）、rRNA、piRNA（Piwi-interacting RNA）、tsRNA（toxic small RNA）、またはリボザイムが挙げられる。一部の実施形態では、RNA分子は、アンチセンスのRNA分子である。機能性RNA分子は、機能性RNA分子の機能的な構成要素の5'末端または3'末端に結合し得る、非機能的な構成要素を含むことができる。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、抗癌剤、たとえば遺伝子発現を調節することまたはサイトカインの発現を制御することにより機能できる抗癌剤である。

【0089】

小分子薬と複合体形成した機能性RNA分子は、機能性RNA分子の機能的な活性を保持している。一部の実施形態では、小分子薬と複合体形成した機能性RNA分子は、小分子薬と複合体形成していない機能性RNA分子の活性の約50%以上（たとえば約60%、70%、80%、90%、95%、または100%以上）を保持している。

【0090】

一部の実施形態では、機能性RNA分子は二本鎖である。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、一本鎖であり、少なくとも1つの自己相補的な領域を含む。機能性RNA分子は、たとえばステムループ構造を含み、ここでRNA分子のステム部分が自己相補的な領域を含む。二本鎖の機能性RNA分子は、完全な対形成を必要とせず、一部の実施形態では、1つ以上のバルジ、ループ、ミスマッチ、または他の二次的な構造を含む。一部の実施形態では、本ヌクレオチドの約80%以上が対形成されているか、本ヌクレオチドの約85%以上が対形成されているか、本ヌクレオチドの約90%以上が対形成さ

10

20

30

40

50

れているか、本ヌクレオチドの約 95% が対形成されているか、または本ヌクレオチドの約 100% が対形成されている。

【0091】

一部の実施形態では、機能性 RNA は、T7 転写した RNA などの、1 つ以上の三リン酸の 5' 末端を含む。三リン酸の 5' 末端は、I 型インターフェロンの内在的な発現をもたらすことができ、これにより癌細胞死をさらに高めることができる。一部の実施形態では、RNA は、合成的に産生されるか、または 1 つ以上の三リン酸の 5' 末端を含まない。

【0092】

一部の実施形態では、機能性 RNA 分子は、約 10 ヌクレオチド長から約 100 ヌクレオチド長、たとえば約 10 ~ 100 ヌクレオチド長、たとえば約 10 ~ 30、20 ~ 40、30 ~ 50、40 ~ 60、50 ~ 70、60 ~ 80、70 ~ 90、または 80 ~ 100 ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、約 25 ~ 35 ヌクレオチド長、たとえば約 25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、または 35 ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、約 15 ~ 25 ヌクレオチド長、たとえば約 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または 25 ヌクレオチド長である。

【0093】

ナノ粒子における機能性 RNA 分子は、化学療法剤などの小分子薬と複合体形成している。小分子薬は、たとえば静電相互作用により、または機能性 RNA 分子にインターカレートすることにより、機能性 RNA 分子と複合体形成することができる。例示的な小分子薬として、アントラサイクリン（ドキソルビシン、ダウノルビシン、エピルビシン、イダルビシン、ミトキサントロン、パルルビシンなど）、またはアルキル化剤もしくはアルキル化様作用剤（カルボプラチン、カルムスチン、シスプラチン、シクロホスファミド、メルファラン、プロカルバジン、もしくはチオテパなど）が挙げられる。一部の実施形態では、小分子の化合物は、約 1500 ダルトン以下、たとえば約 1000 ダルトン、900 ダルトン、800 ダルトン、700 ダルトン、600 ダルトン、500 ダルトン、400 ダルトン、または 300 ダルトン以下である。一部の実施形態では、小分子の化合物は、約 100 ~ 1500 ダルトン（約 100 ~ 200 ダルトン、200 ~ 300 ダルトン、300 ~ 400 ダルトン、400 ~ 500 ダルトン、500 ~ 600 ダルトン、600 ~ 700 ダルトン、700 ~ 800 ダルトン、800 ~ 900 ダルトン、900 ~ 1000 ダルトン、1000 ~ 1100 ダルトン、1100 ~ 1200 ダルトン、1200 ~ 1300 ダルトン、1300 ~ 1400 ダルトン、または 1400 ~ 1500 ダルトンなど）である。

【0094】

一部の実施形態では、小分子薬は、約 50 mg/mL 以下（たとえば約 25 mg/mL、10 mg/mL、5 mg/mL、2 mg/mL、1 mg/mL、0.5 mg/mL、0.25 mg/mL、0.1 mg/mL、0.05 mg/mL、0.025 mg/mL、0.01 mg/mL、0.005 mg/mL、0.0025 mg/mL、または 0.001 mg/mL 以下）の溶解度（約 25、pH 7 の水で測定）を有する。一部の実施形態では、小分子薬は、約 0.0001 ~ 50 mg/mL（約 0.0001 ~ 0.0005 mg/mL、0.0005 ~ 0.001 mg/mL、0.001 ~ 0.0025 mg/mL、0.0025 ~ 0.005 mg/mL、0.005 ~ 0.01 mg/mL、0.01 ~ 0.025 mg/mL、0.025 ~ 0.05 mg/mL、0.05 ~ 0.1 mg/mL、0.1 ~ 0.25 mg/mL、0.25 ~ 0.5 mg/mL、0.5 ~ 1 mg/mL、1 ~ 2 mg/mL、2 ~ 5 mg/mL、5 ~ 10 mg/mL、10 ~ 25 mg/mL、または 25 ~ 50 mg/mL など）の溶解度（約 25、pH 7 の水で測定）を有する。

【0095】

一部の実施形態では、治療用複合体における小分子薬の機能性 RNA 分子に対するモル比は、約 60 : 1 以下、たとえば約 50 : 1、40 : 1、30 : 1、20 : 1、10 : 1

10

20

30

40

50

、5 : 1、4 : 1、3 : 1、2 : 1、または1 : 1以下である。一部の実施形態では、治療用複合体における小分子薬の機能性RNA分子に対するモル比は、約1 : 1 ~ 約60 : 1、たとえば約1 : 1 ~ 10 : 1、5 : 1 ~ 20 : 1、10 : 1 ~ 30 : 1、20 : 1 ~ 40 : 1、30 : 1 ~ 50 : 1、または40 : 1 ~ 60 : 1である。一部の実施形態では、治療用複合体における小分子薬の機能性RNA分子に対するモル比は、約1 : 1、5 : 1、10 : 1、20 : 1、30 : 1、40 : 1、50 : 1、または60 : 1である。

【0096】

小分子薬は、機能性RNA分子と複合体形成している。一部の実施形態では、小分子薬は、静電相互作用、共有結合（ジスルフィド結合など）により、またはRNAにインターカレートすることにより、機能性RNA分子と複合体形成している。たとえば、機能性RNAは、相補的RNA（たとえば二本鎖のRNAまたは自己相補的な部分を有する一本鎖のRNAにおける相補的RNA）に対して対形成することができ、これにより、塩基対間での小分子薬のインターカレーションが可能となる。一部の実施形態では、機能性RNA分子における塩基対あたりの小分子薬のモル比の平均は、約1 : 1 ~ 1 : 120（たとえば、約1 : 2 ~ 1 : 120、1 : 2 ~ 1 : 4、1 : 4 ~ 1 : 8、1 : 8 ~ 1 : 16、1 : 16 ~ 1 : 32、1 : 32 ~ 1 : 64、1 : 64 ~ 1 : 100、または1 : 100 ~ 1 : 120）である。塩基およびその相補体が、機能性RNA分子における塩基対あたりの小分子薬のモル比を考慮する場合に、2つの塩基対とみなされることが理解されている。

【0097】

細胞標的化セグメント、細胞透過性セグメント、およびオリゴヌクレオチド結合セグメントは、1つのキャリアポリペプチドにまとめて融合している。本明細書中記載のセグメントは、モジュール状であり、様々な組み合わせで組み合わせることができる。すなわち、キャリアポリペプチドは、記載の細胞標的化セグメント、細胞透過性セグメント、またはオリゴヌクレオチド結合セグメントのいずれかを含むことができる。図1は、細胞標的化セグメント、細胞透過性セグメント、およびオリゴヌクレオチド結合セグメントを伴うキャリアペプチドを例示する。図1にさらに示されているように、機能性RNA分子とキャリアペプチドを組み合わせることにより、ナノ粒子の形成がもたらされる。任意選択で、機能性RNA分子は、ナノ粒子を形成する前に、小分子薬とあらかじめ結合している。

【0098】

本ナノ粒子は、機能性RNA分子とキャリアポリペプチドを組み合わせることにより、形成することができる。一部の実施形態では、キャリアポリペプチドを、機能性RNA分子と、約8 : 1以下（たとえば約3 : 1 ~ 8 : 1、3 : 1 ~ 3.5 : 1、3.5 : 1 ~ 4 : 1、4 : 1 ~ 4.5 : 1、4.5 : 1 ~ 5 : 1、5 : 1 ~ 5.5 : 1、5.5 : 1 ~ 6 : 1、6 : 1 ~ 6.5 : 1、6.5 : 1 ~ 7 : 1、7 : 1 ~ 7.5 : 1、または7.5 : 1 ~ 8 : 1）のモル比で組み合わせることにより、ナノ粒子組成物を形成する。一部の実施形態では、キャリアポリペプチドは、約4 : 1、4.5 : 1、5 : 1、5.5 : 1、6 : 1、6.5 : 1、7 : 1、7.5 : 1、または8 : 1のモル比で機能性RNA分子と組み合わせられている。よって、一部の実施形態では、ナノ粒子組成物は、約8 : 1以下（たとえば約3 : 1 ~ 8 : 1、3 : 1 ~ 3.5 : 1、3.5 : 1 ~ 4 : 1、4 : 1 ~ 4.5 : 1、4.5 : 1 ~ 5 : 1、5 : 1 ~ 5.5 : 1、5.5 : 1 ~ 6 : 1、6 : 1 ~ 6.5 : 1、6.5 : 1 ~ 7 : 1、7 : 1 ~ 7.5 : 1、または7.5 : 1 ~ 8 : 1）のモル比で、キャリアポリペプチドおよび機能性RNA分子を含む。一部の実施形態では、キャリアポリペプチドは、約4 : 1、4.5 : 1、5 : 1、5.5 : 1、6 : 1、6.5 : 1、7 : 1、7.5 : 1、または8 : 1のモル比で、機能性RNA分子と組み合わせられている。

【0099】

一部の実施形態では、ナノ粒子組成物は、キャリアポリペプチド : 機能性RNA分子が均一なモル比であるナノ粒子を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子は、約8 : 1、7 : 1、6 : 1、5 : 1、4 : 1、または3 : 1のモル比でキャリアポリペプチドおよび機能性RNA分子を含む。

10

20

30

40

50

【0100】

一部の実施形態では、ナノ粒子組成物中のナノ粒子は、約100nm以下（たとえば約90nm、80nm、70nm、60nm、50nm、または40nm以下）の大きさの平均を有する。一部の実施形態では、ナノ粒子は、約30nm～約100nm（たとえば約30～40nm、40～50nm、50～60nm、60～70nm、70～80nm、80～90nm、または90～100nm）の大きさの平均を有する。

【0101】

細胞標的化セグメントは、細胞の表面に存在する標的の分子に結合することができる。この細胞標的化セグメントによる分子の結合により、ナノ粒子は細胞を標的とすることができる。よって、細胞に存在する標的の分子は、標的の細胞に依存し得る。一部の実施形態では、標的の分子は、癌抗原などの抗原である。一部の実施形態では、癌細胞は、標的分子の発現がアップレギュレートされている。アップレギュレートした発現は、約10%、20%、30%、40%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、またはそれ以上の増大であり得る。一部の実施形態では、標的の分子は、細胞表面の受容体、たとえばHER3またはc-METである。一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、4-IBB、5T4、腺癌抗原、フェトプロテイン、BAFF、C242抗原、CA-125、炭酸脱水酵素9(CA-IX)、c-MET、CCR4、CD152、CD19、CD20、CD200、CD22、CD221、CD23(IgE受容体)、CD28、CD30(TNFRSF8)、CD33、CD4、CD40、CD44v6、CD51、CD52、CD56、CD74、CD80、CEA、CNT0888、CTLA-4、DR5、EGFR、EpCAM、CD3、FAP、フィブロネクチンエクストラドメイン(fibronectin extra domain)-B、葉酸受容体1、GD2、GD3ガングリオシド、糖タンパク質75、GPNMB、肝細胞増殖因子(HGF)、ヒト散乱因子受容体キナーゼ(human scatter factor receptor kinase)、IGF-1受容体、IGF-I、IgG1、L1-CAM、IL-13、IL-6、インスリン様増殖因子I受容体、インテグリン51、インテグリン3、MORAb-009、MS4A1、MUC1、ムチンCanAg、N-グリコリルノイラミン酸、NPC-1C、PDGF-Ra、PDL192、ホスファチジルセリン、前立腺癌細胞、RANKL、RON、ROR1、SCH900105、SDC1、SLAMF7、TAG-72、テネイシンC、TGF2、TGF-30、TRAIL-R1、TRAIL-R2、腫瘍抗原CTAA16.88、VEGF-A、VEGFR-1、VEGFR2、ビメンチン、インターナリンB、細菌のインペイシン(Iny)のタンパク質、またはそれらのフラグメントに結合する。

【0102】

一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、抗体、抗体フラグメント(Fabフラグメント、F(ab')₂フラグメント、Fab'フラグメント、または一本鎖の可変性(scFv)フラグメントなど)、サイトカイン、または受容体リガンドを含む。

【0103】

一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、細胞の表面上に発現した受容体に特異的に結合するリガンドを含む。例示的なリガンドとして、ヘレグリン配列（もしくはそのバリエーション）、またはインターナリンB配列（もしくはそのバリエーション）が挙げられる。ヘレグリン配列は、たとえば、ヘレグリン配列、たとえばヘレグリンの受容体結合ドメインとすることができる。ヘレグリンの受容体結合ドメインは、IG様ドメインおよびEGF様ドメインを含む。リガンドのバリエーションは、標的の分子に対する特異的な結合性を保持している。ヘレグリン（「Her」と呼ぶことができる）は、HER3と特異的に結合することができる。配列番号2は、例示的な野生型のHer配列であり、ヘレグリンの受容体結合配列のIG様ドメインおよびEGF様ドメインを含む。インターナリンBは、c-METと特異的に結合することができ、「InlB」と呼ぶこともできる。

【0104】

一部の実施形態では、細胞標的化セグメントにより標的化された細胞は、哺乳類の細胞

、たとえばヒトの細胞である。一部の実施形態では、この細胞は、疾患状態にある細胞、たとえば癌細胞である。一部の実施形態では、この細胞は、HER3+癌細胞またはc-MET+癌細胞である。一部の実施形態では、この細胞は、頭頸部癌細胞、膀胱癌細胞、乳癌細胞、グリアの癌細胞、卵巢癌細胞、子宮頸癌細胞、胃癌細胞、皮膚癌細胞、結腸癌細胞、直腸癌細胞、肺癌細胞、腎臓癌細胞、前立腺癌細胞、または甲状腺癌細胞である。細胞標的化セグメントは、標的の細胞の表面に存在する分子と結合することができ、よって標的の細胞がナノ粒子の標的となる。

【0105】

キャリアポリペプチドの細胞透過性セグメントは、細胞標的化セグメントにより標的化された細胞へのナノ粒子の侵入を促進する。一部の実施形態では、細胞透過性セグメントは、ペントンベース(「PB」)タンパク質またはそのバリエーションを含む(および一部の実施形態では、ペントンベースタンパク質またはそのバリエーションである)。例として、一部の実施形態では、細胞透過性セグメントは、アデノウイルス血清型5(Ad5)のペントンベースタンパク質を含む(および一部の実施形態では、当該タンパク質である)。一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、アミノ酸の差異または欠失を伴うペントンベースタンパク質を含む(および一部の実施形態では当該タンパク質である)。アミノ酸の差異は、保存的な変異とすることができる。一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、切断型のペントンベースタンパク質である。

10

【0106】

細胞透過性セグメントは、キャリアポリペプチドの細胞内での局在化を高める1つ以上のバリエーションを含むことができる。たとえば、一部の実施形態では、細胞透過性セグメントは、キャリアポリペプチドを、細胞質または核に優先的に局在させる1つ以上のバリエーションを含む。キャリアポリペプチドが機能性RNA分子(それ自体が小分子薬と複合体形成している)に結合している実施形態では、バリエーションの細胞透過性セグメントは、機能性RNA分子および小分子薬を細胞質または核に優先的に局在させる。優先的な細胞内への局在化は、特定の小分子薬にとって特に好適であり得る。たとえば、多くの化学療法剤は、癌細胞の核に局在するDNAに結合することにより、機能する。核を優先的に標的とすることにより、結合した薬物が、機能する位置に集中する。他の小分子薬は、細胞質で機能し得、細胞質を優先的に標的とすることにより、薬物の効力を高めることができる。

20

【0107】

細胞内での局在化を高める例示的な細胞透過性セグメントの変異は、国際特許公開公報第2014/022811号に論述されている。ペントンベースタンパク質におけるLeu60Trpの変異は、細胞の細胞質に優先的に局在化することが示されている。よって、一部の実施形態では、細胞透過性セグメントは、Leu60Trp変異を含むペントンベースタンパク質である。Lys375Glu、Val449Met、およびPro469Serの変異は、細胞の核に優先的に局在化することが示されている。よって、一部の実施形態では、細胞透過性セグメントは、Lys375Glu、Val449Met、またはPro469Serの変異を含むペントンベースタンパク質である。一部の実施形態では、細胞透過性セグメントは、Lys375Glu、Val449Met、およびPro469Serの変異を含むペントンベースタンパク質である。アミノ酸の番号付けは、野生型のペントンベースポリペプチドである配列番号1に準拠してなされている。

30

40

【0108】

オリゴヌクレオチド結合セグメントは、本ナノ粒子の機能性RNA分子の構成要素と結合する。オリゴヌクレオチド結合セグメントは、たとえば静電結合、水素結合、またはイオン結合を介して、機能性RNA分子と結合することができる。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド結合セグメントは、RNA結合ドメインまたは二本鎖のRNA結合ドメインである。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド結合セグメントは、陽イオン性の(すなわち正に荷電した)ドメインである。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド結合セグメントは、ポリリジン配列を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド結合セグメントは、約3~約30個の長さのアミノ酸、たとえば約3~約10、約5~約15、

50

約 10 ~ 約 20、約 15 ~ 約 25、または約 20 ~ 約 30 個の長さのアミノ酸である。1 つの例示的な実施形態では、オリゴヌクレオチド結合セグメントは、デカリジン（すなわち、10 個の連続したリジンのアミノ酸、または配列番号 4 に示される「K10」）を含む（一部の実施形態では、デカリジンである）。

【0109】

例示的なキャリアポリペプチドは、Her（またはそのバリエーション）、ペントンベース（またはそのバリエーション）、および正に荷電したオリゴヌクレオチド結合セグメントを含む。一部の実施形態では、キャリアポリペプチドは、Her、ペントンベースのセグメント、およびポリリジンのオリゴヌクレオチド結合セグメントを含む。一部の実施形態では、キャリアポリペプチドは、Her、ペントンベースのセグメント、およびデカリジンのオリゴヌクレオチド結合セグメント、たとえば HerPBK10（配列番号 3）を含む。他の例示的な実施形態は、InlB、ペントンベース（またはそのバリエーション）、および正に荷電したオリゴヌクレオチド結合セグメント、たとえば InlBPBK10 を含む。

10

【0110】

一部の実施形態では、ナノ粒子は、動的散乱法により測定される場合、直径約 50 nm 以下（たとえば約 45 nm、40 nm、35 nm、または 30 nm 以下）である。一部の実施形態では、ナノ粒子は、動的散乱法により測定される場合、直径約 25 ~ 50 nm、25 ~ 30 nm、30 ~ 35 nm、35 ~ 40 nm、または 45 ~ 50 nm である。

【0111】

一態様では、キャリアポリペプチドと、小分子薬と複合体形成した機能性 RNA 分子とを含むナノ粒子を含む組成物であって、上記キャリアポリペプチドが、細胞標的化セグメント、細胞透過性セグメント、およびオリゴヌクレオチド結合セグメントを含む、組成物を提供する。一部の実施形態では、機能性 RNA 分子は、約 10 ヌクレオチド長から約 100 ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、ナノ粒子組成物における機能性 RNA 分子の小分子薬に対するモル比は、約 1 : 1 ~ 約 1 : 60 である。一部の実施形態では、本組成物におけるキャリアポリペプチドの機能性 RNA 分子に対するモル比は、約 3 : 1 ~ 約 8 : 1（約 4 : 1 など）である。一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、疾患状態の細胞（癌細胞など）であり得る哺乳類の細胞に結合する。一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、細胞の表面にある標的分子と結合し、この標的分子は受容体（HER3 または c-MET など）であり得る。一部の実施形態では、細胞透過性セグメントは、ペントンベースポリペプチドまたはそのバリエーションを含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド結合セグメントは、正に荷電しており、たとえばポリリジンである。一部の実施形態では、キャリアポリペプチドは、HerPBK10 である。一部の実施形態では、本組成物中のナノ粒子の大きさの平均は、約 100 nm 以下（約 60 nm 以下または約 50 nm 以下など）である。

20

30

【0112】

別の態様では、キャリアポリペプチドと、機能性 RNA 分子にインターカレートされた小分子薬とを含むナノ粒子を含む組成物であって、上記キャリアポリペプチドが、細胞標的化セグメント、細胞透過性セグメント、およびオリゴヌクレオチド結合セグメントを含む、組成物を提供する。一部の実施形態では、機能性 RNA 分子は、約 10 ヌクレオチド長から約 100 ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、ナノ粒子組成物における機能性 RNA 分子の小分子薬に対するモル比は、約 1 : 1 ~ 約 1 : 60 である。一部の実施形態では、本組成物におけるキャリアポリペプチドの機能性 RNA 分子に対するモル比は、約 3 : 1 ~ 約 8 : 1（約 4 : 1 など）である。一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、疾患状態の細胞（癌細胞など）であり得る哺乳類の細胞に結合する。一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、細胞の表面にある標的分子と結合し、この標的分子は受容体（HER3 または c-MET など）であり得る。一部の実施形態では、細胞透過性セグメントは、ペントンベースポリペプチドまたはそのバリエーションを含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド結合セグメントは、正に荷電しており、たとえばポリリジンである。一部の実施形態では、キャリアポリペプチドは、HerPBK10 である。一

40

50

部の実施形態では、本組成物中のナノ粒子の大きさの平均は、約100nm以下（約60nm以下または約50nm以下など）である。

【0113】

別の態様では、キャリアポリペプチドと、二本鎖のsiRNA分子にインターカレートした小分子薬とを含むナノ粒子を含む組成物であって、上記キャリアポリペプチドが、細胞標的化セグメント、細胞透過性セグメント、およびオリゴヌクレオチド結合セグメントを含む、組成物を提供する。一部の実施形態では、siRNA分子は、約10ヌクレオチド長から約100ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、ナノ粒子組成物におけるsiRNA分子の小分子薬に対するモル比は、約1:1～約1:60である。一部の実施形態では、本組成物におけるキャリアポリペプチドのsiRNA分子に対するモル比は、約3:1～約8:1（約4:1など）である。一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、疾患状態の細胞（癌細胞など）であり得る哺乳類の細胞に結合する。一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、細胞の表面にある標的分子と結合し、この標的分子は受容体（HER3またはc-METなど）であり得る。一部の実施形態では、細胞透過性セグメントは、ペントンベースポリペプチドまたはそのバリエーションを含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド結合セグメントは、正に荷電しており、たとえばポリリジンである。一部の実施形態では、キャリアポリペプチドは、HerPBK10である。一部の実施形態では、本組成物中のナノ粒子の大きさの平均は、約100nm以下（約60nm以下または約50nm以下など）である。

【0114】

別の態様では、キャリアポリペプチドと、二本鎖のsiRNA分子にインターカレートした小分子薬とを含むナノ粒子を含む組成物であって、上記キャリアポリペプチドが、細胞標的化セグメント、細胞透過性セグメント、およびオリゴヌクレオチド結合セグメントを含み、siRNAが、少なくとも1つの5'三リン酸の末端を含む、組成物を提供する。一部の実施形態では、siRNA分子は、約10ヌクレオチド長から約100ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、ナノ粒子組成物におけるsiRNA分子の小分子薬に対するモル比は、約1:1～約1:60である。一部の実施形態では、本組成物におけるキャリアポリペプチドのsiRNA分子に対するモル比は、約3:1～約8:1（約4:1など）である。一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、疾患状態の細胞（癌細胞など）であり得る哺乳類の細胞に結合する。一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、細胞の表面にある標的分子と結合し、この標的分子は受容体（HER3またはc-METなど）であり得る。一部の実施形態では、細胞透過性セグメントは、ペントンベースポリペプチドまたはそのバリエーションを含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド結合セグメントは、正に荷電しており、たとえばポリリジンである。一部の実施形態では、キャリアポリペプチドは、HerPBK10である。一部の実施形態では、本組成物中のナノ粒子の大きさの平均は、約100nm以下（約60nm以下または約50nm以下など）である。

【0115】

別の態様では、キャリアポリペプチドと、二本鎖のsiRNA分子にインターカレートした小分子の化学療法剤とを含むナノ粒子を含む組成物であって、上記キャリアポリペプチドが、細胞標的化セグメント、細胞透過性セグメント、およびオリゴヌクレオチド結合セグメントを含み、siRNAが、少なくとも1つの5'三リン酸の末端を含む、組成物を提供する。一部の実施形態では、siRNA分子は、約10ヌクレオチド長から約100ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、ナノ粒子組成物におけるsiRNA分子の化学療法剤に対するモル比は、約1:1～約1:60である。一部の実施形態では、本組成物におけるキャリアポリペプチドのsiRNA分子に対するモル比は、約3:1～約8:1（約4:1など）である。一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、疾患状態の細胞（癌細胞など）であり得る哺乳類の細胞に結合する。一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、細胞の表面にある標的分子と結合し、この標的分子は受容体（HER3またはc-METなど）であり得る。一部の実施形態では、細胞透過性セグメントは

、ペントンベースポリペプチドまたはそのバリエーションを含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド結合セグメントは、正に荷電しており、たとえばポリリジンである。一部の実施形態では、キャリアポリペプチドは、HerPBK10である。一部の実施形態では、本組成物中のナノ粒子の大きさの平均は、約100nm以下（約60nm以下または約50nm以下など）である。一部の実施形態では、化学療法剤は、アントラサイクリン（ドキソルビシンなど）、またはアルキル化剤もしくはアルキル化様作用剤である。

【0116】

別の態様では、キャリアポリペプチドと、二本鎖のsiRNA分子にインターカレートした小分子の化学療法剤とを含むナノ粒子を含む組成物であって、上記キャリアポリペプチドが、細胞標的化セグメント、細胞透過性セグメント、およびオリゴヌクレオチド結合セグメントを含み、siRNAが、少なくとも1つの5'三リン酸の末端を含み、細胞標的化セグメントが、HER3+癌細胞を標的とする、組成物を提供する。一部の実施形態では、siRNA分子は、約10ヌクレオチド長から約100ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、ナノ粒子組成物におけるsiRNA分子の化学療法剤に対するモル比は、約1:1～約1:60である。一部の実施形態では、本組成物におけるキャリアポリペプチドのsiRNA分子に対するモル比は、約3:1～約8:1（約4:1など）である。一部の実施形態では、細胞透過性セグメントは、ペントンベースポリペプチドまたはそのバリエーションを含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド結合セグメントは、正に荷電しており、たとえばポリリジンである。一部の実施形態では、キャリアポリペプチドは、HerPBK10である。一部の実施形態では、本組成物中のナノ粒子の大きさの平均は、約100nm以下（約60nm以下または約50nm以下など）である。一部の実施形態では、化学療法剤は、アントラサイクリン（ドキソルビシンなど）、またはアルキル化剤もしくはアルキル化様作用剤である。一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、ヘレグリン配列またはそのバリエーションを含む。

【0117】

別の態様では、キャリアポリペプチドと、二本鎖のsiRNA分子にインターカレートした小分子の化学療法剤とを含むナノ粒子を含む組成物であって、上記キャリアポリペプチドが、細胞標的化セグメント、細胞透過性セグメント、およびオリゴヌクレオチド結合セグメントを含み、siRNAが、少なくとも1つの5'三リン酸の末端を含み、細胞標的化セグメントが、c-MET+癌細胞を標的とする、組成物を提供する。一部の実施形態では、siRNA分子は、約10ヌクレオチド長から約100ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、ナノ粒子組成物におけるsiRNA分子の化学療法剤に対するモル比は、約1:1～約1:60である。一部の実施形態では、本組成物におけるキャリアポリペプチドのsiRNA分子に対するモル比は、約3:1～約8:1（約4:1など）である。一部の実施形態では、細胞透過性セグメントは、ペントンベースポリペプチドまたはそのバリエーションを含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド結合セグメントは、正に荷電しており、たとえばポリリジンである。一部の実施形態では、キャリアポリペプチドは、HerPBK10である。一部の実施形態では、本組成物中のナノ粒子の大きさの平均は、約100nm以下（約60nm以下または約50nm以下など）である。一部の実施形態では、化学療法剤は、アントラサイクリン（ドキソルビシンなど）、またはアルキル化剤もしくはアルキル化様作用剤である。一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、インターナリンB配列またはそのバリエーションを含む。

【0118】

別の態様では、HerPBK10と、二本鎖のsiRNA分子にインターカレートした小分子の化学療法剤とを含むナノ粒子を含む組成物であって、siRNAが、少なくとも1つの5'三リン酸の末端を含む、組成物を提供する。一部の実施形態では、siRNA分子は、約10ヌクレオチド長から約100ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、ナノ粒子組成物におけるsiRNA分子の化学療法剤に対するモル比は、約1:1～約1:60である。一部の実施形態では、本組成物におけるキャリアポリペプチドのsiRNA分子に対するモル比は、約3:1～約8:1（約4:1など）である。一部の実施形

態では、本組成物中のナノ粒子の大きさの平均は、約 100 nm 以下（約 60 nm 以下または約 50 nm 以下など）である。一部の実施形態では、化学療法剤は、アントラサイクリン（ドキソルビシンなど）、またはアルキル化剤もしくはアルキル化様作用剤である。

【0119】

ナノ粒子の作製

本明細書中記載のナノ粒子は、機能性 RNA 分子および小分子薬と複数のキャリアポリペプチドを組み合わせることにより、生産することができる。一部の実施形態では、キャリアポリペプチド、機能性 RNA 分子、および小分子薬をまとめてインキュベートして、本ナノ粒子を形成する。一部の実施形態では、機能性 RNA 分子を、キャリアポリペプチドと組み合わせる前に、小分子薬とあらかじめインキュベートする。キャリアポリペプチドおよび機能性 RNA 分子を組み合わせると、本ナノ粒子は自然に構築する。

10

【0120】

一部の実施形態では、一本鎖の相補的（または部分的に相補的または自己相補的）な RNA 分子をアニーリングして、本ナノ粒子を形成するために使用される機能性 RNA 分子を形成する。オリゴヌクレオチドのアニーリングは、たとえば RNA 分子を組み合わせ、RNA 分子を（たとえば約 80 以上に）加熱し、この混合物を（たとえば室温で）冷却することにより、起こり得る。

【0121】

小分子薬は、小分子薬および機能性 RNA 分子を組み合わせることにより、機能性 RNA 分子に結合する。一部の実施形態では、小分子薬および機能性 RNA 分子を、約 60 : 1、50 : 1、40 : 1、30 : 1、20 : 1、10 : 1、5 : 1、4 : 1、3 : 1、2 : 1、または 1 : 1 以下のモル比で組み合わせる。一部の実施形態では、小分子薬および機能性 RNA 分子を、約 1 : 1 ~ 約 60 : 1、たとえば約 1 : 1 ~ 10 : 1、5 : 1 ~ 20 : 1、10 : 1 ~ 30 : 1、20 : 1 ~ 40 : 1、30 : 1 ~ 50 : 1、または 40 : 1 ~ 60 : 1 のモル比で組み合わせる。一部の実施形態では、小分子薬および機能性 RNA 分子を、約 1 : 1、1 : 10、1 : 15、1 : 20、1 : 25、1 : 30、1 : 35、1 : 40、1 : 45、1 : 50、1 : 55、または 1 : 60 のモル比で組み合わせる。小分子薬は、アニーリング工程の前、間、または後で、RNA 分子と混合することができる。小分子薬および機能性 RNA 分子を組み合わせた後、小分子薬は、たとえば機能性 RNA 分子にインターカレートすることにより、または静電相互作用により、機能性 RNA 分子に結合する。

20

30

【0122】

機能性 RNA 分子および小分子薬（あらかじめまとめて複合体形成されていてもよい）を、キャリアペプチドと組み合わせ、本ナノ粒子を形成する。一部の実施形態では、キャリアペプチドおよび機能性 RNA 分子を、約 8 : 1 以下（たとえば約 3 : 1 ~ 8 : 1、3 : 1 ~ 3.5 : 1、3.5 : 1 ~ 4 : 1、4 : 1 ~ 4.5 : 1、4.5 : 1 ~ 5 : 1、5 : 1 ~ 5.5 : 1、5.5 : 1 ~ 6 : 1、6 : 1 ~ 6.5 : 1、6.5 : 1 ~ 7 : 1、7 : 1 ~ 7.5 : 1、または 7.5 : 1 ~ 8 : 1）のモル比で組み合わせる。一部の実施形態では、キャリアポリペプチドおよび機能性 RNA 分子を、約 4 : 1、4.5 : 1、5 : 1、5.5 : 1、6 : 1、6.5 : 1、7 : 1、7.5 : 1、または 8 : 1 のモル比で組み合わせる。一部の実施形態では、キャリアポリペプチドおよび機能性 RNA 分子を、約 4 ~ 約 22、たとえば約 4 ~ 15、または 4 ~ 10 でインキュベートする。一部の実施形態では、キャリアポリペプチドおよび機能性 RNA 分子を、約 30 分未満、約 30 分以上、約 1 時間以上、または約 2 時間以上の間、インキュベートする。機能性 RNA 分子とキャリアポリペプチドを組み合わせた後、本ナノ粒子は自然に形成する。

40

【0123】

一部の実施形態では、過剰なオリゴヌクレオチド、小分子薬、またはキャリアポリペプチドを、ナノ粒子を含む組成物から除去する。たとえば、一部の実施形態では、ナノ粒子組成物を、サイズ排除クロマトグラフィーなどの精製ステップに供する。一部の実施形態では、結合していない構成要素を、超遠心分離法によりナノ粒子から分離する。たとえば

50

、一部の実施形態では、本組成物を、約100kD、80kD、70kD、60kD、50kD、40kD、30kD、20kD、10kD、または5kD以下の分子量カットオフを伴う遠心分離フィルターに加える。

【0124】

任意選択で、結果として得られたナノ粒子組成物を、たとえば透析、超遠心分離、またはタンジェンシャルフロー過によるバッファー交換に供する。一部の実施形態では、本ナノ粒子を、たとえば超遠心分離法により、濃縮する。

【0125】

本ナノ粒子組成物に、さらなる処理ステップを行うことができる。たとえば一部の実施形態では、ナノ粒子組成物を、たとえば滅菌ろ過により、滅菌する。一部の実施形態では、ナノ粒子組成物を、バイアルに分注する（その後密閉されてもよい）。一部の実施形態では、ナノ粒子組成物を、凍結乾燥し、これにより、乾燥ナノ粒子組成物を形成する。一部の実施形態では、ナノ粒子組成物を、たとえば1つ以上の薬学的に許容される賦形剤を添加することにより、医薬組成物を形成するように製剤化する。

【0126】

一態様では、ナノ粒子組成物を作製する方法であって、キャリアポリペプチド、機能性RNA分子、および小分子薬を組み合わせるステップを含み、上記キャリアポリペプチドが、細胞標的化セグメント、細胞透過性セグメント、およびオリゴヌクレオチド結合セグメントを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、小分子薬は、RNA分子にインターカレートする。一部の実施形態では、ナノ粒子組成物を滅菌ろ過するか、または凍結乾燥する。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、約10ヌクレオチド長から約100ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、機能性RNA分子および小分子薬を、約1:1~約1:60のモル比で準備する。一部の実施形態では、キャリアポリペプチドおよび機能性RNA分子を、約3:1~約8:1（約4:1など）のモル比で準備する。一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、疾患状態の細胞（癌細胞など）であり得る哺乳類細胞に結合するように構成されている。一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、受容体（HER3またはc-METなど）であり得る、細胞の表面にある標的分子に結合するように構成されている。一部の実施形態では、細胞透過性セグメントは、ペントンベースポリペプチドまたはそのバリエーションを含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド結合セグメントは、正に荷電しており、たとえばポリリジンである。一部の実施形態では、キャリアポリペプチドは、HerpBK10である。一部の実施形態では、結果として得られるナノ粒子の大きさの平均は、約100nm以下（約60nm以下または約50nm以下など）である。

【0127】

別の態様では、ナノ粒子組成物を作製する方法であって、小分子薬と機能性RNA分子を組み合わせ、小分子薬-RNA分子を複合体形成するステップと、小分子薬と複合体形成したRNA分子とキャリアポリペプチドを組み合わせるステップとを含み、上記キャリアポリペプチドが、細胞標的化セグメント、細胞透過性セグメント、およびオリゴヌクレオチド結合セグメントを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、小分子薬をRNA分子にインターカレートする。一部の実施形態では、ナノ粒子組成物を、滅菌ろ過または凍結乾燥する。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、約10ヌクレオチド長から約100ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、機能性RNA分子および小分子薬を、約1:1~約1:60のモル比で準備する。一部の実施形態では、キャリアポリペプチドおよび機能性RNA分子を、約3:1~約8:1（約4:1など）のモル比で準備する。一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、疾患状態の細胞（癌細胞など）であり得る哺乳類細胞に結合するように構成されている。一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、受容体（HER3またはc-METなど）であり得る、細胞の表面にある標的分子に結合するように構成されている。一部の実施形態では、細胞透過性セグメントは、ペントンベースポリペプチドまたはそのバリエーションを含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド結合セグメントは、正に荷電しており、たとえばポリリジンである。一部

10

20

30

40

50

の実施形態では、キャリアポリペプチドは、HerPBK10である。一部の実施形態では、結果として得られるナノ粒子の大きさの平均は、約100nm以下（約60nm以下または約50nm以下など）である。

【0128】

別の態様では、ナノ粒子組成物を作製する方法であって、小分子薬と二本鎖のsiRNA分子を組み合わせて、小分子薬-siRNA分子を複合体形成するステップと、小分子薬と複合体形成したsiRNA分子とキャリアポリペプチドを組み合わせるステップとを含み、上記キャリアポリペプチドが、細胞標的化セグメント、細胞透過性セグメント、およびオリゴヌクレオチド結合セグメントを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、小分子薬をsiRNA分子にインターカレートする。一部の実施形態では、ナノ粒子組成物を、滅菌ろ過または凍結乾燥する。一部の実施形態では、siRNA分子は、約10ヌクレオチド長から約100ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、siRNA分子および小分子薬を、約1:1~約1:60のモル比で準備する。一部の実施形態では、キャリアポリペプチドおよびsiRNA分子を、約3:1~約8:1（約4:1など）のモル比で準備する。一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、疾患状態の細胞（癌細胞など）であり得る哺乳類細胞に結合するように構成されている。一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、受容体（HER3またはc-METなど）であり得る、細胞の表面にある標的分子に結合するように構成されている。一部の実施形態では、細胞透過性セグメントは、ペントンベースポリペプチドまたはそのバリエーションを含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド結合セグメントは、正に荷電しており、たとえばポリリジンである。一部の実施形態では、キャリアポリペプチドは、HerPBK10である。一部の実施形態では、結果として得られるナノ粒子の大きさの平均は、約100nm以下（約60nm以下または約50nm以下など）である。

【0129】

別の態様では、ナノ粒子組成物を作製する方法であって、小分子の化学療法剤と二本鎖のsiRNA分子を組み合わせて、化学療法剤-siRNA分子を複合体形成するステップと、小分子の化学療法剤と複合体形成したsiRNA分子とキャリアポリペプチドを組み合わせるステップとを含み、上記キャリアポリペプチドが、細胞標的化セグメント、細胞透過性セグメント、およびオリゴヌクレオチド結合セグメントを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、化学療法剤を、siRNA分子にインターカレートする。一部の実施形態では、ナノ粒子組成物を、滅菌ろ過または凍結乾燥する。一部の実施形態では、siRNA分子は、約10ヌクレオチド長から約100ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、siRNA分子および小分子の化学療法剤を、約1:1~約1:60のモル比で準備する。一部の実施形態では、キャリアポリペプチドおよびsiRNA分子を、約3:1~約8:1（約4:1など）のモル比で準備する。一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、疾患状態の細胞（癌細胞など）であり得る哺乳類細胞に結合するように構成されている。一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、受容体（HER3またはc-METなど）であり得る、細胞の表面にある標的分子に結合するように構成されている。一部の実施形態では、細胞透過性セグメントは、ペントンベースポリペプチドまたはそのバリエーションを含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド結合セグメントは、正に荷電しており、たとえばポリリジンである。一部の実施形態では、キャリアポリペプチドは、HerPBK10である。一部の実施形態では、結果として得られるナノ粒子の大きさの平均は、約100nm以下（約60nm以下または約50nm以下など）である。一部の実施形態では、化学療法剤は、アントラサイクリン（ドキソルビシンなど）、またはアルキル化剤もしくはアルキル化様作用剤である。

【0130】

別の態様では、ナノ粒子組成物を作製する方法であって、小分子の化学療法剤と、少なくとも1つの5'三リン酸の末端を含む二本鎖のsiRNA分子を組み合わせて、化学療法剤-siRNA分子を複合体形成するステップと、小分子の化学療法剤と複合体形成したsiRNA分子とキャリアポリペプチドを組み合わせるステップとを含み、上記キャリ

アポリペプチドが、細胞標的化セグメント、細胞透過性セグメント、およびオリゴヌクレオチド結合セグメントを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、化学療法剤を、*s i R N A*分子にインターカレートする。一部の実施形態では、ナノ粒子組成物を、滅菌ろ過または凍結乾燥する。一部の実施形態では、*s i R N A*分子は、約10ヌクレオチド長から約100ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、*s i R N A*分子および小分子の化学療法剤を、約1:1~約1:60のモル比で準備する。一部の実施形態では、キャリアポリペプチドおよび*s i R N A*分子を、約3:1~約8:1(約4:1など)のモル比で準備する。一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、疾患状態の細胞(癌細胞など)であり得る哺乳類細胞に結合するように構成されている。一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、受容体(HER3またはc-METなど)であり得る、細胞の表面にある標的分子に結合するように構成されている。一部の実施形態では、細胞透過性セグメントは、ペントンベースポリペプチドまたはそのバリエーションを含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド結合セグメントは、正に荷電しており、たとえばポリリジンである。一部の実施形態では、キャリアポリペプチドは、HerPBK10である。一部の実施形態では、結果として得られるナノ粒子の大きさの平均は、約100nm以下(約60nm以下または約50nm以下など)である。一部の実施形態では、化学療法剤は、アントラサイクリン(ドキソルビシンなど)、またはアルキル化剤もしくはアルキル化様作用剤である。

10

【0131】

別の態様では、ナノ粒子組成物を作製する方法であって、小分子の化学療法剤と、二本鎖の*s i R N A*分子を組み合わせ、化学療法剤-*s i R N A*分子を複合体形成するステップと、小分子の化学療法剤と複合体形成した*s i R N A*分子とHerPBK10を組み合わせるステップとを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、化学療法剤を、*s i R N A*分子にインターカレートする。一部の実施形態では、ナノ粒子組成物を、滅菌ろ過または凍結乾燥する。一部の実施形態では、*s i R N A*分子は、約10ヌクレオチド長から約100ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、*s i R N A*分子および小分子の化学療法剤を、約1:1~約1:60のモル比で準備する。一部の実施形態では、キャリアポリペプチドおよび*s i R N A*分子を、約3:1~約8:1(約4:1など)のモル比で準備する。一部の実施形態では、結果として得られるナノ粒子の大きさの平均は、約100nm以下(約60nm以下または約50nm以下など)である。一部の実施形態では、化学療法剤は、アントラサイクリン(ドキソルビシンなど)、またはアルキル化剤もしくはアルキル化様作用剤である。

20

30

【0132】

癌治療

本明細書に記載の治療用複合体または本明細書に記載のナノ粒子組成物を含む組成物は、ナノ粒子を含む組成物の有効量を対象に投与することにより癌細胞を殺滅することによって、当該対象の癌の治療に有用とすることができる。キャリアポリペプチドの細胞標的化セグメントは、癌細胞の表面にある分子を標的とし、これにより化学療法剤(たとえば機能性RNA分子および小分子薬)を癌細胞に送達することができる。一部の実施形態では、この癌は転移性である。一部の実施形態では、治療用複合体またはナノ粒子組成物は、癌の治療のための医薬の製造に使用される。

40

【0133】

一部の実施形態では、この癌はHER3+癌である。Her細胞標的化セグメントは、たとえば、本ナノ粒子の標的が癌細胞となるために、HER3+癌細胞の表面に存在するHER3と結合することができる。一部の実施形態では、この癌は、c-MET+癌である。In1B細胞標的化セグメントは、たとえば、本ナノ粒子が癌細胞を標的とするために、c-MET+癌細胞の表面に存在するc-METと結合することができる。

【0134】

一部の実施形態では、本ナノ粒子を含む組成物の有効量を、頭頸部癌、膀胱癌、乳癌、卵巣癌、グリアの癌、子宮頸癌、胃癌、皮膚癌、結腸癌、直腸癌、肺癌、腎臓癌、前立腺癌

50

、または甲状腺癌を治療するために対象に投与する。多くの癌は、特定の細胞表面分子に関する発現がアップレギュレートされている。このようなアップレギュレートされた分子のうちの1つ以上は、キャリアタンパク質の細胞標的化セグメントにとって好ましい標的である。

【0135】

一部の実施形態では、癌を有する対象を治療する方法は、さらに、放射線療法または外科手術などの二次的な治療を含む。よって、一部の実施形態では、本明細書中記載のナノ粒子を含む組成物は、ネオアジュバント療法として、癌を有する対象に投与される。

【0136】

一部の実施形態では、対象は、本明細書中記載のナノ粒子の投与の前に、化学療法または放射線療法を経験していない。一部の実施形態では、対象は、化学療法または放射線療法を経験している。

【0137】

一部の実施形態では、本明細書中記載のナノ粒子組成物を、対象に投与する。一部の実施形態では、本ナノ粒子組成物を、*in vivo*における標的の細胞への送達のために、対象に投与する。一般的に、本ナノ粒子組成物の用量および投与経路は、対象の大きさおよび状態により、標準的な医薬の実務にしたがい、決定される。一部の実施形態では、本ナノ粒子組成物を、経口投与、経皮投与、吸入による投与、静脈内投与、動脈内投与、筋肉内投与、創傷部位への直接的な塗布、外科部位への適用、腹腔内投与、坐薬による投与、皮下投与、皮内投与、経皮投与、噴霧療法による投与、胸膜内投与、脳室内投与、関節内投与、眼内投与、または脊髄内投与を含むいずれかの経路を介して、対象に投与する。一部の実施形態では、本組成物を、静脈内投与により、対象に投与する。

【0138】

一部の実施形態では、本ナノ粒子組成物の投与は、単回投与または反復投与である。一部の実施形態では、この投与は、1日に1回、1日に2回、1日に3回、または1日に4回以上、対象に提供される。一部の実施形態では、1週間に約1回以上（たとえば約2、3、4、5、6、または7回以上）の投与を提供する。一部の実施形態では、本組成物を、1週間に1回、2週間ごとに1回、3週間ごとに1回、4週間ごとに1回、3週間のうち2週間の間は週に1回、または4週間のうち3週間の間は週に1回、投与する。一部の実施形態では、数日、数週間、数か月、または数年の治療課程にわたり、複数回の投与を提供する。一部の実施形態では、治療課程は、約1回以上の投与（たとえば約2、2、3、4、5、7、10、15、または20回以上の投与）である。

【0139】

一部の実施形態では、投与される本ナノ粒子組成物の用量は、小分子薬が約200 mg / m²、150 mg / m²、100 mg / m²、80 mg / m²、70 mg / m²、60 mg / m²、50 mg / m²、40 mg / m²、30 mg / m²、20 mg / m²、15 mg / m²、10 mg / m²、5 mg / m²、またはmg / m²またはそれ以下である。

【0140】

一態様では、対象の癌を治療する方法であって、キャリアポリペプチドと、小分子薬と複合体形成した機能性RNA分子とを含むナノ粒子を含む組成物の有効量を上記対象に投与するステップを含み、上記キャリアポリペプチドが、細胞標的化セグメント、細胞透過性セグメント、およびオリゴヌクレオチド結合セグメントを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、この癌は、頭頸部癌、膀胱癌、乳癌、卵巣癌、グリアの癌、子宮頸癌、胃癌、皮膚癌、結腸癌、直腸癌、肺癌、腎臓癌、または甲状腺癌である。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、約10ヌクレオチド長から約100ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、本ナノ粒子組成物における機能性RNA分子の小分子薬に対するモル比は、約1:1～約1:60である。一部の実施形態では、本組成物におけるキャリアポリペプチドの機能性RNA分子に対するモル比は、約3:1～約8:1（約4:1など）である。一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、癌細胞と結合する。一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、癌細胞の表面にある標的分子と結合し、この標的分子

子は受容体（HER3またはc-METなど）であり得る。一部の実施形態では、細胞透過性セグメントは、ペントンベースポリペプチドまたはそのバリエーションを含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド結合セグメントは、正に荷電しており、たとえばポリリジンである。一部の実施形態では、キャリアポリペプチドは、HerPBK10である。一部の実施形態では、本組成物中のナノ粒子の大きさの平均は、約100nm以下（約60nm以下または約50nm以下など）である。

【0141】

一態様では、対象のHER3+癌を治療する方法であって、キャリアポリペプチドと、小分子薬と複合体形成した機能性RNA分子とを含むナノ粒子を含む組成物の有効量を上記対象に投与するステップを含み、上記キャリアポリペプチドが、細胞標的化セグメント、細胞透過性セグメント、およびオリゴヌクレオチド結合セグメントを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、この癌は、頭頸部癌、膵癌、乳癌、卵巣癌、グリアの癌、子宮頸癌、胃癌、皮膚癌、結腸癌、または直腸癌である。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、約10ヌクレオチド長から約100ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、本ナノ粒子組成物における機能性RNA分子の小分子薬に対するモル比は、約1:1～約1:60である。一部の実施形態では、本組成物におけるキャリアポリペプチドの機能性RNA分子に対するモル比は、約3:1～約8:1（約4:1など）である。一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、HER3+癌細胞と結合する。一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、HER3と結合する。一部の実施形態では、細胞透過性セグメントは、ペントンベースポリペプチドまたはそのバリエーションを含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド結合セグメントは、正に荷電しており、たとえばポリリジンである。一部の実施形態では、キャリアポリペプチドは、HerPBK10である。一部の実施形態では、本組成物中のナノ粒子の大きさの平均は、約100nm以下（約60nm以下または約50nm以下など）である。

【0142】

一態様では、対象のc-MET+癌を治療する方法であって、キャリアポリペプチドと、小分子薬と複合体形成した機能性RNA分子とを含むナノ粒子を含む組成物の有効量を上記対象に投与するステップを含み、上記キャリアポリペプチドが、細胞標的化セグメント、細胞透過性セグメント、およびオリゴヌクレオチド結合セグメントを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、この癌は、頭頸部癌、膵癌、乳癌、卵巣癌、胃癌、結腸癌、直腸癌、肺癌、腎臓癌、または甲状腺癌である。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、約10ヌクレオチド長から約100ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、本ナノ粒子組成物における機能性RNA分子の小分子薬に対するモル比は、約1:1～約1:60である。一部の実施形態では、本組成物におけるキャリアポリペプチドの機能性RNA分子に対するモル比は、約3:1～約8:1（約4:1など）である。一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、c-MET+癌細胞と結合する。一部の実施形態では、細胞標的化セグメントは、c-METと結合する。一部の実施形態では、細胞透過性セグメントは、ペントンベースポリペプチドまたはそのバリエーションを含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド結合セグメントは、正に荷電しており、たとえばポリリジンである。一部の実施形態では、本組成物中のナノ粒子の大きさの平均は、約100nm以下（約60nm以下または約50nm以下など）である。

【0143】

一態様では、対象のHER3+癌を治療する方法であって、HerPBK10と、小分子薬と複合体形成した機能性RNA分子とを含むナノ粒子を含む組成物の有効量を上記対象に投与するステップを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、この癌は、頭頸部癌、膵癌、乳癌、卵巣癌、グリアの癌、子宮頸癌、胃癌、皮膚癌、結腸癌、前立腺癌、腎臓癌、または直腸癌である。一部の実施形態では、機能性RNA分子は、約10ヌクレオチド長から約100ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、本ナノ粒子組成物における機能性RNA分子の小分子薬に対するモル比は、約1:1～約1:60である。一部の実施形態では、本組成物におけるキャリアポリペプチドの機能性RNA分子に対するモ

ル比は、約 3 : 1 ~ 約 8 : 1 (約 4 : 1 など) である。一部の実施形態では、本組成物中のナノ粒子の大きさの平均は、約 100 nm 以下 (約 60 nm 以下または約 50 nm 以下など) である。

【 0 1 4 4 】

医薬組成物

一部の実施形態では、本明細書中記載の組成物は、本明細書中記載の複数のナノ粒子および薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物として、製剤化されている。

【 0 1 4 5 】

一部の実施形態では、医薬組成物は、散剤などの固体である。この散剤は、たとえば本ナノ粒子を含む液剤を凍結乾燥することにより、形成することができる。この散剤は、たとえば、当該散剤を水系の液体 (たとえば水またはバッファー) と混合することにより、再構成することができる。一部の実施形態では、医薬組成物は、液体、たとえば水系の溶液 (生理食塩水またはリンガー液など) に懸濁されたナノ粒子である。一部の実施形態では、医薬組成物は、薬学的に許容される賦形剤、たとえば充填剤、結合剤、コーティング剤、保存剤、潤滑剤、香料、甘味剤、着色剤、溶媒、緩衝剤、キレート剤、または安定剤を含む。

10

【 0 1 4 6 】

薬学的に許容される充填剤の例として、セルロース、リン酸水素カルシウム、炭酸カルシウム、結晶セルロース、スクロース、ラクトース、グルコース、マンニトール、ソルビトール、マルトール、アルファ化デンプン、コーンスターチ、またはポテトスターチが挙げられる。薬学的に許容される結合剤の例として、ポリビニルピロリドン、デンプン、ラクトース、キシリトール、ソルビトール、マルチトール、ゼラチン、スクロース、ポリエチレングリコール、メチルセルロース、またはセルロースが挙げられる。薬学的に許容されるコーティング剤の例として、ヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC)、シェラック、トウモロコシタンパク質のゼイン、またはゼラチンが挙げられる。薬学的に許容される崩壊剤の例として、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロース、またはグリコール酸でん粉ナトリウムが挙げられる。薬学的に許容される潤滑剤の例として、ポリエチレングリコール、ステアリン酸マグネシウム、またはステアリン酸が挙げられる。薬学的に許容される保存剤の例として、メチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン、安息香酸、またはソルビン酸が挙げられる。薬学的に許容される甘味剤の例として、スクロース、サッカリン、アスパルテーム、またはソルビトールが挙げられる。薬学的に許容される緩衝剤の例として、炭酸塩、クエン酸塩、グルコン酸塩、酢酸塩、リン酸塩、または酒石酸塩が挙げられる。

20

30

【 0 1 4 7 】

製品およびキット

本明細書中記載の組成物を適切なパッケージングで含む製品も提供される。本明細書中記載の組成物に適切なパッケージングは、当該分野で知られており、たとえば、バイアル (密閉されたバイアルなど)、容器、アンプル、ビン、ジャー、可塑性パッケージ (たとえば密閉されたマイラーまたはプラスチックのバッグ) などが挙げられる。これらの製品は、さらに滅菌および / または密閉されていてもよい。

40

【 0 1 4 8 】

また本発明は、本明細書中記載の組成物 (または製品) を含むキットを提供し、本明細書中記載の使用などの本組成物を使用する方法に関する説明書をさらに含み得る。本明細書中記載のキットは、商業的観点およびユーザの観点から望ましい他の材料をさらに含んでもよく、これは、他の緩衝剤、希釈剤、フィルター、ニードル、シリンジ、および本明細書中記載のいずれかの方法を行うための説明書を伴う添付文書を含む。

【 0 1 4 9 】

例示的な実施形態

実施形態 1 . 小分子薬と複合体形成した機能性 RNA 分子を含む組成物であって、前記機能性 RNA 分子が、標的タンパク質の発現を調節する、組成物。

50

【 0 1 5 0 】

実施形態 2 . 小分子薬がインターカレートした少なくとも 1 つの相補領域を含む機能性 R N A 分子を含む、組成物。

【 0 1 5 1 】

実施形態 3 . 前記機能性 R N A 分子が、標的タンパク質の発現を調節する、実施形態 2 に記載の組成物。

【 0 1 5 2 】

実施形態 4 . 前記機能性 R N A 分子と前記小分子薬とを含むリボソームを含む、実施形態 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【 0 1 5 3 】

実施形態 5 . 前記リボソームが、細胞標的化セグメントを含む、実施形態 4 に記載の組成物。

【 0 1 5 4 】

実施形態 6 . キャリアポリペプチドと、小分子薬と複合体形成した機能性 R N A 分子と、を含むナノ粒子を含む組成物であって、前記キャリアポリペプチドが細胞透過性セグメントおよびオリゴヌクレオチド結合セグメントを含む、組成物。

【 0 1 5 5 】

実施形態 7 . 前記組成物におけるキャリアポリペプチドの機能性 R N A 分子に対するモル比が、約 3 : 1 ~ 約 8 : 1 である、実施形態 6 に記載の組成物。

【 0 1 5 6 】

実施形態 8 . 前記小分子薬が、前記機能性 R N A 分子にインターカレートされており、前記機能性 R N A 分子が、少なくとも 1 つの相補領域を含む、実施形態 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【 0 1 5 7 】

実施形態 9 . 前記細胞透過性セグメントが、ペントンベースポリペプチドまたはそのバリエーションを含む、実施形態 6 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【 0 1 5 8 】

実施形態 1 0 . 前記オリゴヌクレオチド結合セグメントが、正に荷電している、実施形態 6 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【 0 1 5 9 】

実施形態 1 1 . 前記オリゴヌクレオチド結合セグメントが、ポリリジンを含む、実施形態 6 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【 0 1 6 0 】

実施形態 1 2 . 前記オリゴヌクレオチド結合セグメントが、デカリジンを含む、実施形態 6 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【 0 1 6 1 】

実施形態 1 3 . 前記組成物中のナノ粒子の大きさの平均が、約 1 0 0 n m 以下である、実施形態 6 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【 0 1 6 2 】

実施形態 1 4 . 前記キャリアポリペプチドが、細胞標的化セグメントをさらに含む、実施形態 6 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【 0 1 6 3 】

実施形態 1 5 . 前記細胞標的化セグメントが、哺乳類細胞と結合する、実施形態 5 または 1 4 に記載の組成物。

【 0 1 6 4 】

実施形態 1 6 . 前記細胞標的化セグメントが、疾患状態の細胞と結合する、実施形態 5 、 1 4 、または 1 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【 0 1 6 5 】

実施形態 1 7 . 前記細胞標的化セグメントが、癌細胞と結合する、実施形態 5 、 および 1 4 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【 0 1 6 6 】

実施形態 18 . 前記癌細胞が、H E R 3 + 癌細胞または c - M E T + 癌細胞である、実施形態 17 に記載の組成物。

【 0 1 6 7 】

実施形態 19 . 前記癌細胞が、頭頸部癌細胞、膵癌細胞、乳癌細胞、グリアの癌細胞、卵巣癌細胞、子宮頸癌細胞、胃癌細胞、皮膚癌細胞、結腸癌細胞、直腸癌細胞、肺癌細胞、腎臓癌細胞、前立腺癌細胞、または甲状腺癌細胞である、実施形態 17 または 18 に記載の組成物。

【 0 1 6 8 】

実施形態 20 . 前記細胞標的化セグメントが、細胞の表面にある標的分子と結合する、実施形態 5、および 14 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の組成物。

10

【 0 1 6 9 】

実施形態 21 . 前記細胞標的化セグメントが、細胞の表面にある受容体と結合する、実施形態 5、および 14 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【 0 1 7 0 】

実施形態 22 . 前記細胞標的化セグメントが、H E R 3 または c - M E T と結合する、実施形態 5、および 14 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【 0 1 7 1 】

実施形態 23 . 前記細胞標的化セグメントが、細胞の表面に発現した受容体に特異的に結合するリガンドを含む、実施形態 5、および 14 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の組成物。

20

【 0 1 7 2 】

実施形態 24 . 前記細胞標的化セグメントが、
i . ヘレグリン配列もしくはそのバリエーション、または
i i . インターナリン B 配列もしくはそのバリエーション
を含む、実施形態 5、および 14 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【 0 1 7 3 】

実施形態 25 . 前記細胞標的化セグメントが、ヘレグリン の受容体結合ドメインを含む、実施形態 5、および 14 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【 0 1 7 4 】

実施形態 26 . 前記機能性 R N A 分子の少なくとも一部が、二本鎖である、実施形態 1 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の組成物。

30

【 0 1 7 5 】

実施形態 27 . 前記機能性 R N A 分子が、一本鎖であり、少なくとも 1 つの自己相補的な領域を含む、実施形態 1 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【 0 1 7 6 】

実施形態 28 . 前記機能性 R N A 分子が、s i R N A、s h R N A、m i R N A、環状 R N A (c i r c R N A)、r R N A、p i R N A (P i w i - i n t e r a c t i n g R N A)、t s R N A (t o x i c s m a l l R N A)、またはリボザイムである、実施形態 1 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の組成物。

40

【 0 1 7 7 】

実施形態 29 . 前記機能性 R N A 分子が、s i R N A 分子または s h R N A 分子である、実施形態 1 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【 0 1 7 8 】

実施形態 30 . 前記機能性 R N A 分子が、少なくとも 1 つの三リン酸の 5 ' 末端を有する、実施形態 1 ~ 29 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【 0 1 7 9 】

実施形態 31 . 前記機能性 R N A 分子が、約 10 ヌクレオチド長から約 100 ヌクレオチド長である、実施形態 1 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【 0 1 8 0 】

50

実施形態 32 . 前記組成物における機能性 RNA 分子の小分子薬に対するモル比が、約 1 : 1 ~ 約 1 : 60 である、実施形態 1 ~ 31 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【0181】

実施形態 33 . 前記組成物における機能性 RNA 分子の小分子薬に対するモル比が、約 1 : 5 ~ 約 1 : 60 である、実施形態 1 ~ 32 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【0182】

実施形態 34 . 前記組成物における機能性 RNA 分子の小分子薬に対するモル比が、約 1 : 10 ~ 約 1 : 60 である、実施形態 1 ~ 33 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【0183】

実施形態 35 . 前記小分子薬が、化学療法剤である、実施形態 1 ~ 34 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【0184】

実施形態 36 . 前記小分子薬が、アントラサイクリンである、実施形態 1 ~ 35 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【0185】

実施形態 37 . 前記小分子薬が、ドキソルピシンである、実施形態 1 ~ 36 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【0186】

実施形態 38 . 前記小分子薬が、アルキル化剤またはアルキル化様作用剤である、実施形態 1 ~ 36 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【0187】

実施形態 39 . 前記小分子薬が、カルボプラチン、カルムスチン、シスプラチン、シクロホスファミド、メルファラン、プロカルバジン、またはチオテパである、実施形態 1 ~ 36 および 38 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【0188】

実施形態 40 . 前記組成物が無菌である、実施形態 1 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【0189】

実施形態 41 . 前記組成物が液体の組成物である、実施形態 1 ~ 40 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【0190】

実施形態 42 . 前記組成物が、乾燥した組成物である、実施形態 1 ~ 41 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【0191】

実施形態 43 . 前記組成物が、凍結乾燥されている、実施形態 42 に記載の組成物。

【0192】

実施形態 44 . 薬学的に許容される賦形剤をさらに含む、実施形態 1 ~ 43 のいずれか 1 項に記載の組成物を含む医薬組成物。

【0193】

実施形態 45 . バイアル内に実施形態 1 ~ 44 のいずれか 1 項に記載の組成物を含む製品。

【0194】

実施形態 46 . 前記バイアルが密閉されている、実施形態 45 に記載の製品。

【0195】

実施形態 47 . 実施形態 1 ~ 44 のいずれか 1 項に記載の組成物と、使用説明書とを含むキット。

【0196】

実施形態 48 . 対象の癌を治療する方法であって、実施形態 1 ~ 44 のいずれか 1 項に記載の組成物の有効量を前記対象に投与するステップを含む、方法。

【0197】

10

20

30

40

50

実施形態 49 . 前記癌が、HER3 + 癌または c - MET + 癌である、実施形態 48 に記載の方法。

【0198】

実施形態 50 . 前記癌が、頭頸部癌、膀胱癌、乳癌、卵巣癌、グリアの癌、子宮頸癌、胃癌、皮膚癌、結腸癌、直腸癌、肺癌、腎臓癌、前立腺癌、または甲状腺癌である、実施形態 48 または 49 に記載の方法。

【0199】

実施形態 51 . 組成物を作製する方法であって、機能性 RNA 分子と小分子薬を組み合わせるステップであって、前記小分子薬は、前記機能性 RNA 分子にインターカレートする、ステップを含む、方法。

10

【0200】

実施形態 52 . ナノ粒子組成物を作製する方法であって、キャリアポリペプチド、機能性 RNA 分子、および小分子薬を組み合わせるステップを含み、前記キャリアポリペプチドが、細胞透過性セグメントおよびオリゴヌクレオチド結合セグメントを含む、方法。

【0201】

実施形態 53 . 前記小分子薬と前記機能性 RNA 分子を組み合わせ、前記小分子薬 - 前記機能性 RNA 分子を複合体形成するステップと、

前記小分子薬と複合体形成した機能性 RNA 分子と、前記キャリアポリペプチドを組み合わせるステップとを含む、実施形態 52 に記載の方法。

20

【0202】

実施形態 54 . 前記小分子薬を、前記機能性 RNA 分子にインターカレートする、実施形態 52 または 53 に記載の方法。

【0203】

実施形態 55 . 結合していない小分子薬を除去するステップを含む、実施形態 51 ~ 54 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0204】

実施形態 56 . 前記ナノ粒子組成物を滅菌処理するステップをさらに含む、実施形態 51 ~ 55 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0205】

実施形態 57 . 前記ナノ粒子組成物を凍結乾燥するステップをさらに含む、実施形態 51 ~ 56 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【0206】

実施形態 58 . 標的タンパク質の発現の調節および細胞増殖の阻害を同時に行う方法であって、実施形態 1 ~ 44 のいずれか 1 項に記載の組成物の有効量を前記細胞に投与するステップを含む、方法。

【0207】

実施形態 59 . 細胞を殺滅する方法であって、実施形態 1 ~ 44 のいずれか 1 項に記載の組成物の有効量を前記細胞に投与するステップを含む、方法。

40

【0208】

実施形態 60 . 免疫応答の刺激および細胞の殺滅を同時に行う方法であって、実施形態 1 ~ 44 のいずれか 1 項に記載の組成物の有効量を前記細胞に投与するステップを含み、前記機能性 RNA 分子が、免疫チェックポイントタンパク質の発現を調節する、方法。

【0209】

実施例

本明細書中提供される実施例は、単に説明のために含まれており、本発明の範囲を限定するようには意図されていない。

【0210】

実施例 1 : ナノ粒子の構築

キャリアポリペプチド、機能性 RNA 分子、および小分子薬 (ドキシソルピシンなど) を

50

含むナノ粒子は、以下の方法を使用して構築することができる。

【0211】

一本鎖の siRNA およびその相補的 RNA 分子を、各オリゴヌクレオチドを等モル比で、沸騰水において5分間インキュベートすることにより、アニーリングすることができる。次に、オリゴヌクレオチドを、室温で30分間冷却することができる。

【0212】

次に、二本鎖のアニーリングした siRNA 分子を、ドキソルピシン HCl と、1 : 40 (RNA : Dox) のモル比で、室温で30分間インキュベートすることができる。

【0213】

次に、ドキソルピシンと結合した siRNA 分子を、Her 細胞標的化セグメント、P B 細胞透過性セグメント、およびデカリジン (「K10」) オリゴヌクレオチド結合セグメントを含むキャリアポリペプチド (Her PBK10 など) と、HEPES 緩衝生理食塩水 (HBS) において4 : 1 (Her PBK10 : siRNA - ドキソルピシン) のモル比 (よって、4 : 1 : 40 (Her PBK10 : siRNA : ドキソルピシン) のモル比) でインキュベートすることができる。キャリアポリペプチドおよびドキソルピシンと結合した siRNA の混合物を、氷上で2時間振とうすることにより、ナノ粒子を形成することができる。

10

【0214】

結果得られるナノ粒子を、超遠心分離法に供することができる。具体的には、滅菌性 HBS 12 mL を、滅菌性の10%のグリセロールにおいて24時間ブレインキュベートすることができるカットオフが50 kD の Centrifugal Filter (Amicon Ultra-15) に添加することができる。このナノ粒子混合物を、遠心フィルターにおける冷却した HBS に添加することができる。フィルターチューブを、最終的な体積が200 μ L ~ 500 μ L となるまで Beckman の J6-HC 遠心分離器で、2500 RPM (5000 \times g) で10 ~ 20分間回転させることができる。次に、濃縮したナノ粒子を、1.7 mL のマイクロチューブに移すことができる。

20

【0215】

ナノ粒子薬を含まないナノ粒子を、小分子薬と複合体形成していない siRNA と Her PBK10 をインキュベートすることにより調製することができる (たとえば米国特許出願第2012/0004181号参照)。他の比較上のナノ粒子を、たとえば小分子薬と複合体形成している二本鎖の DNA と Her PBK10 をインキュベートすることにより形成することができる (たとえば米国特許第9,078,927号参照)。

30

【0216】

実施例2：癌細胞および化学療法薬耐性癌細胞を殺滅するためのナノ粒子の使用

ドキソルピシンと結合した siRNA を含むナノ粒子、siRNA を含むがドキソルピシンを含まないナノ粒子、またはドキソルピシンと結合した dsDNA を含むナノ粒子を、様々な種類の癌細胞を殺滅するこれらの特性に関して、比較することができる。

【0217】

様々な用量のナノ粒子を、MDA-MB-435 (ヒト癌) 細胞、BT474 (ヒト乳癌) 細胞、U251 (ヒトグリオーマ) 細胞、SKOV3 (ヒト卵巣癌) 細胞、LNCaP-GFP (ヒト前立腺癌) 細胞、またはRANKL (ヒト骨転移性前立腺癌) 細胞のいずれかと共に、インキュベートすることができる。

40

【0218】

記載の組成物へ曝露した後の相対的な細胞生存を、細胞生存率アッセイを使用して測定することができる。この細胞を、壁が黒く底が透明な96ウェルプレートに載置することができる。48時間後に、培地を吸引し、完全培地および指定の濃度のナノ粒子と、最終体積40 μ L で交換することができる。プレートを5%のCO₂下、37℃で4時間振とうことができ、次に完全培地60 μ L を各ウェルに添加して、最終体積を100 μ L にすることができる、インキュベーションを、振とうすることなく、5%CO₂下、37℃で44時間続行した。インキュベーション終了時に、相対的な細胞生存率を、製造社の指

50

示にしたがいMTSアッセイ(Promega)を介して決定することができる。具体的には、培地をウェルから除去することができ、100 μ Lの新鮮な完全培地を各ウェルに添加することができる。調製したMTS試薬20 μ Lを各ウェルに添加することができる。次に、プレートと、振とうしながら、5%のCO₂下、37℃でインキュベートすることができ、分光光度計にて1時間目、2時間目、および3時間目に、490nmでプレートの読み取りを行った。この結果を、以下の比率：未処置の群で生存した細胞の数で除算した処置群で生存した細胞の数の観点から、示すことができる。よって、1.0の細胞生存は、処置した細胞および未処置の細胞が同じ割合で生存したことを表しており、対して0.2の比率は、未処置の細胞の群と比較して、処置した細胞の20%のみが生存したことを意味している。

10

【0219】

実施例3：二本鎖siRNAにインターカレートされたドキソルビシンを伴う治療用複合体の構築

2つの異なる治療用複合体を、二本鎖のsiRNA(「siRNA1」(21塩基長)、および「siRNA2」(21塩基長))とドキソルビシンを組み合わせることにより形成した。第1の治療用複合体では、10 μ Lのドキソルビシン-HCl(Sigma-Aldrich; 10mMの保存溶液)および5.2 μ LのsiRNA1(0.48mMの保存溶液)を、465 μ LのHEPES緩衝生理食塩水(HBS)と組み合わせた。第2の治療用複合体では、10 μ Lのドキソルビシン(10mMの保存溶液)および25 μ LのsiRNA1(0.1mMの保存溶液)を、484.8 μ LのHBSと組み合わせた。各治療用複合体の試料を、振とうしながら室温で30分間インキュベートした後に、10K MWCOフィルターを使用して遠心分離を行い、未結合のドキソルビシンを除去した。対照として、10 μ Lのドキソルビシン(10mMの保存溶液)を、490 μ LのHBSに添加したが、フィルターを通さなかった。ろ過前の治療用複合体、残余分(retentate)、およびろ過物の試料(10 μ L)を、図2に示すように、1%のアガロースゲル上で解析した。レーンおよび対応する試料を、表1に表す。

20

【表1】

表1：図2のレーンの試料

30

レーン	試料
1	ラダー
2	Dox:siRNA2 ろ過前
3	Dox:siRNA1 ろ過前
4	空
5	Dox:siRNA2 残余分
6	Dox:siRNA1 残余分
7	Dox:siRNA2 ろ過物
8	Dox:siRNA1 ろ過物

40

【0220】

図2に示されているように、siRNAは、レーン2、3、5、および6で検出されているが、レーン7および8では検出されていない。このことは、両複合体(Dox:siRNA1およびDox:siRNA2)のsiRNAが、残余分に保持されており、フィルターを介してろ過物へと通らなかったことを表している。

【0221】

また、各試料の残余分(retentate)(100 μ L)およびろ過物(filtrate)(100 μ L)に関して、400nm~700nmの吸光度を測定した。これらの結果を図3に

50

示す（黒丸は残余分を表し、白丸はろ過物を表す）。Dox : siRNA 1 複合体および Dox : siRNA 2 複合体の両方において、残余分は、約 480 nm で約 0.21 の最大吸光度を有し、これはドキソルビシンに関する吸光度の最大値である。対照的に、Dox : siRNA 1 および Dox : siRNA 2 の複合体のろ過物は、約 490 nm に有意なピークを有さなかった。このことは、試料におけるドキソルビシンは、残余分で保持されており、よって、siRNA と複合体形成したことを表している。

【0222】

実施例 4：治療用複合体を使用した遺伝子のサイレンシングおよび細胞生存率の減少

ドキソルビシンと複合体形成した、寄せ集めた非機能性の二本鎖の RNA 分子（「siScrm1」（21 塩基長））、二本鎖の機能性 siRNA（「siRNA1」（21 塩基長）、もしくは「siRNA2」（21 塩基長））、または二本鎖 DNA（「DNA oligo」（30 塩基長））を含む複合体を、2.5 nmol の RNA または DNA とドキソルビシン 100 nmol を組み合わせることにより形成した。第 1 の複合体では、10 μ L のドキソルビシン-HCl（Sigma-Aldrich；10 mM の保存溶液）および 25 μ L の siScrm1（0.2 mM の保存溶液）を、365 μ L の HBS と組み合わせた。第 2 の複合体では、10 μ L のドキソルビシン（20 mM の保存溶液）および 5.2 μ L の siRNA1（0.48 mM の保存溶液）を、384.8 μ L の HBS と組み合わせた。第 3 の複合体では、10 μ L のドキソルビシン（20 mM の保存溶液）および 25 μ L の siRNA2（0.1 mM の保存溶液）を、365 μ L の HBS と組み合わせた。第 4 の複合体では、10 μ L のドキソルビシン（20 mM の保存溶液）および 2.5 μ L の DNA oligo（1 mM の保存溶液）を、387.5 μ L の HBS と組み合わせた。各試料を、振とうしながら室温で 30 分間インキュベートした後、10 K MWC O フィルターを使用して遠心分離を行い、未結合のドキソルビシンを除去した。各試料の残余分（retantate）（100 μ L）およびろ過物（100 μ L）に関して、400 nm ~ 700 nm の吸光度を同様に測定した。これらの結果を、図 4 に示す（黒色の記号は残余分を表し、白色の記号は、ろ過物を表す）。各残余分の試料は、約 480 nm に吸光度のピークを有した（Dox : siScrm1 の最大吸光度 ~ 0.9；Dox : siRNA1 の最大吸光度 ~ 0.7；Dox : siRNA2 の最大吸光度 ~ 1.4；Dox : DNA oligo の最大吸光度 ~ 1.1）。各試料のろ過物は、有意なピークを有しておらず、これは、実質的な量のドキソルビシンがないことを表している。ドキソルビシンは、DNA または RNA と複合体化した残余分において、検出された。ドキソルビシンおよび DNA または RNA に関する収量を、表 2 に示すように計算した。ドキソルビシンの収量を、ドキソルビシンの標準曲線を使用して 480 nm での吸光度に基づき決定した。核酸（RNA または DNA）の収量を、試料を 85 に加熱した後の 260 nm での吸光度に基づき決定した。

【表 2】

表 2：複合体におけるドキソルビシンおよび DNA/RNA の収量

	Dox の収量	核酸の収量	Dox/核酸の比
Dox:DNA oligo	70 nmol	3 nmol	23.3
Dox:siScrm1	50 nmol	3 nmol	16.7
Dox:siRNA1	40 nmol	3 nmol	16.0
Dox:siRNA2	90 nmol	2 nmol	45

【0223】

細胞生存率に関するこれら複合体の効果を測定するために、形成した複合体を、JIM T1 細胞（トラスツズマブ（trastuzumab）耐性ヒト乳癌）にトランスフェクトした。ウェルあたり約 10,000 個の細胞を、96 ウェルプレートにプレーティングし

、10%のウシ胎児血清、100 U/mLのペニシリン、100 µg/mLのストレプトマイシンを含むRPMI 1640培地において、5%のCO₂下、37℃で維持した。24時間後に、培養培地を、Opti-MEM I血清低減培地(Invitrogen Life Technologies)と交換した。RNAiMaxリポフェクタミン(Invitrogen Life Technologies)を、siRNA、Dox:siRNA複合体、およびDox:DNA oligo複合体の送達のための担体として使用した。対照の試料に、ドキソルビシンを、リポフェクタミンを用いずに投与した。トランスフェクションから3時間後に、各試料の培地を完全培養培地と交換した。24時間後、48時間後、または72時間後に、相対的な細胞生存率を、製造社の指示にしたがいCelltiter Glo Luminescent Cell Viability Kit(Promega)を使用してATPを定量化することにより、決定した。実験を3重に行った。結果を図5A(24時間)、5B(48時間)、および5C(72時間)に示す。

10

【0224】

RNA単独(siScrm1、siRNA1、またはsiRNA2のいずれか)は、細胞生存率にほとんどまたは全く効果がなかった。72時間後に、細胞生存率が小さく減少したが、これは用量依存的ではなく、実験課程の間の自然な細胞死が原因である。ドキソルビシンと複合体形成した二本鎖のRNA、またはドキソルビシン単独は、24時間後、48時間後、および72時間後に、用量依存的な細胞生存率の減少を示した。予想外なことに、siRNAおよびドキソルビシンを含む治療用複合体は、ドキソルビシン単独と比較して有意な細胞生存率の減少をもたらした(特に48時間目および72時間目の時点で視認可能)。このことは、細胞に投与したDox:siRNA2複合体のドキソルビシンの用量が、ドキソルビシン単独の用量と比較して実質的に低かったことを考慮すると、さらに驚くべきものである(0.3/0.9/3.0 nmolと比較して、0.05/0.2/0.9 nmol)。さらに、Dox:siRNA複合体は、低い用量のドキソルビシンを投与した場合であっても、少なくともDox:DNA oligo複合体と同様の細胞生存率の減少をもたらした。

20

【0225】

ドキソルビシンと複合体形成したsiRNAが、トランスフェクション後に機能性を保持していたことを確かにするために、siRNA分子のRNA標的を、qPCRを使用して定量化した。総RNAを、TriZol試薬(Invitrogen Life Technologies)を使用して、トランスフェクションから24時間後に、トランスフェクトしたJIMT1細胞から抽出した。製造社の指示にしたがいiScript(商標)cDNA Synthesis Kit(Bio-Rad)を使用して、逆転写を、総RNA 1 µgで行った。特定のプライマー(Bio-Rad)およびSYBR Greenのセットを、増幅に使用した。qPCR反応を、以下(95℃で30秒、次に、95℃で10秒および60℃で30秒を40サイクル)の通りに、Bio-Rad CFX Connect(商標)の器具(Bio-Rad)で行った。この反応の特異性を、融解曲線分析により検証した。試料を、Ct法を使用してHPRT1に対して正規化した。結果を、図6A(siRNA1)および6B(siRNA2)に示す。

30

40

【0226】

予測されるように、siScrm1およびsiRNA2は、siRNA1の標的のmRNAの値を減少させず、対して、siRNA1は、mRNAの値を減少させている。さらに、dox:siScrm1、dox:siRNA2、およびdox:DNA oligoの複合体は、siRNA1の標的のmRNAの値に影響を与えていない。対照的に、dox:siRNA1複合体は、siRNA1の標的のmRNAの値の有意な減少を引き起こしており、これは、siRNA分子がドキソルビシンと複合体形成していたとしても、複合体におけるsiRNA1が機能的なままであることを表している。図6Bは、siRNA2の標的のmRNAに関して同様の結果を示しており、siRNA2分子単独およびdox:siRNA2複合体のみが、siRNA2の標的のmRNAのより完全なサイレ

50

ンシングをもたらしている。

【0227】

これら組み合わせの結果は、dox : siRNA複合体が形成されていること、および siRNA およびドキソルビシンが、細胞に投与した後も機能的なままであることを表している。

【0228】

実施例5：治療用複合体を使用した遺伝子のサイレンシングおよび細胞生存率の減少

ドキソルビシンと複合体形成した、寄せ集めた非機能性の二本鎖のRNA分子(「siScrm2」(21塩基長))、または二本鎖の機能性siRNA(「siRNA3」(21塩基長))を含む複合体を、2.5nmolのRNAとドキソルビシン100nmolを組み合わせるにより形成した。第1の複合体では、20μLのドキソルビシン-HCl(Sigma-Aldrich; 5mMの保存溶液)および50μLのsiScrm2(0.05mMの保存溶液)を、350μLのHBSと組み合わせた。第2の複合体では、20μLのドキソルビシン(5mMの保存溶液)および50μLのsiRNA3(0.05mMの保存溶液)を、350μLのHBSと組み合わせた。各試料を、振とうしながら室温で30分間インキュベートした後に、10K MWCOフィルターを使用して遠心分離を行い、未結合のドキソルビシンを除去した。各試料の残余分(retentate)(100μL)およびろ過物(100μL)に関して、400nm~700nmの吸光度を、同様に測定した。これらの結果を、図7に示す(黒色の記号は残余分を表し、白色の記号はろ過物を表す)。各残余分の試料は、約480nmに吸光度のピークを有していた(Dox:siScrm2の最大吸光度 ~ 0.95; Dox:siRNA3の最大吸光度 ~ 0.85)。各試料のろ過物は、有意なピークを有しておらず、このことは、実質的な量のドキソルビシンがないことを表している。残余分で検出されたドキソルビシンは、DNAまたはRNAと複合体形成していた。ドキソルビシンおよびRNAの収量を、表3に示すように計算した。ドキソルビシンの収量を、ドキソルビシンの標準曲線を使用して480nmでの吸光度に基づき決定した。RNAの収量を、試料を85℃に加熱した後の260nmでの吸光度に基づき、決定した。

【表3】

表3：複合体におけるドキソルビシンおよびRNAの収量

	Dox の収量	核酸の収量	Dox/RNA の比
Dox:siScrm2	72 nmol	1.8 nmol	40:1
Dox:siRNA3	63.6 nmol	2 nmol	31.8:1

【0229】

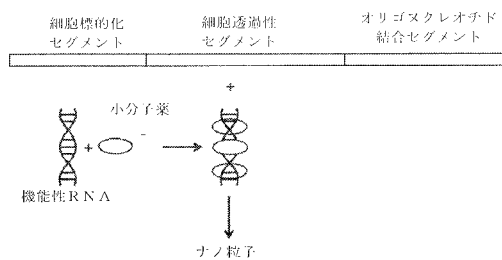
細胞生存率に関するこれら複合体の効果を測定するために、形成した複合体を、4T1-Fluc-Neo/eGFP-Puro細胞(安定してFlucおよびeGFPを発現するマウスの乳癌細胞)にトランスフェクトした。ウェルあたり約10,000個の細胞を、96ウェルプレートにプレーティングし、10%のウシ胎児血清、100U/mLのペニシリン、100μg/mLのストレプトマイシンを含むRPMI 1640培地において、5%CO₂下、37℃で維持した。24時間後に、培養培地を、Opti-MEM I血清低減培地(Invitrogen Life Technologies)と交換した。RNAiMaxリポフェクタミン(Invitrogen Life Technologies)を、siScrm2、dox:siScrm2、siRNA3、またはdox:siRNA3の送達のための担体として使用した。対照の試料に、ドキソルビシンを、リポフェクタミンを用いずに投与した。トランスフェクションから3時間後に、各試料の培地を、完全培養培地と交換した。24時間後に、相対的な細胞生存率を、製造社の指示にしたがいCelltiter Glo Luminescent Cell

Viability Kit (Promega) を使用して ATP を定量化することにより、決定した。実験を 3 重に行った。結果を図 8 に示す。

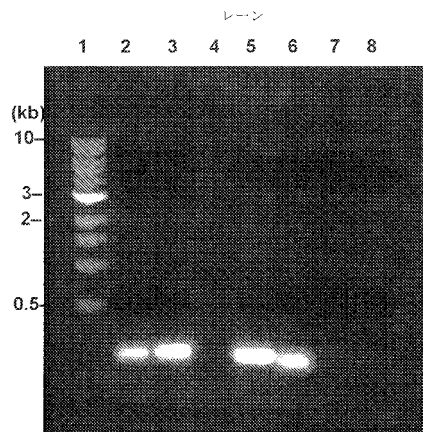
【0230】

RNA 単独 (siScrm2 または siRNA3) は、細胞生存率にほとんどまたは全く効果がなかった。ドキソルビシンと複合体形成した二本鎖の RNA、またはドキソルビシン単独は、24 時間後に、用量依存的な細胞生存率の減少を示した。

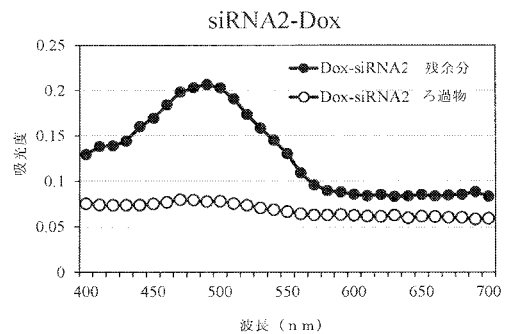
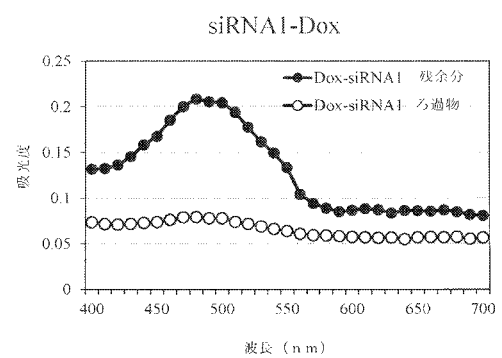
【図 1】



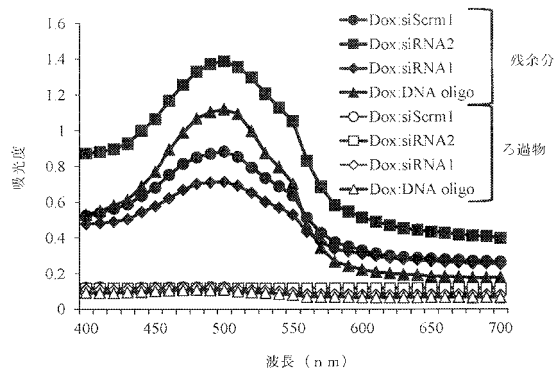
【図 2】



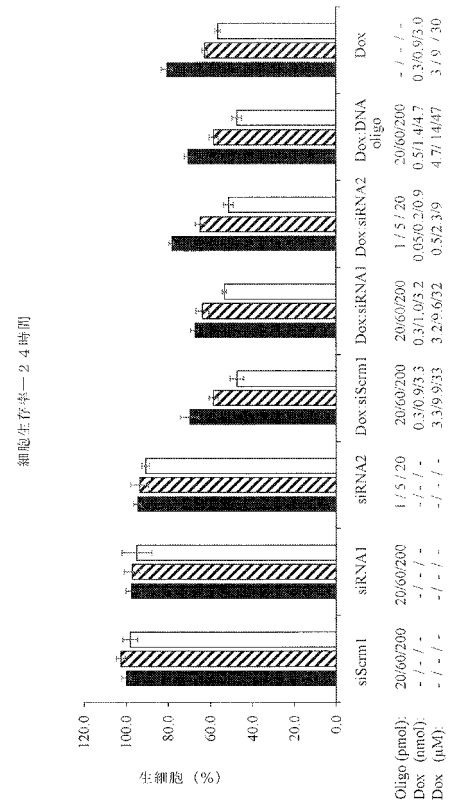
【図 3】



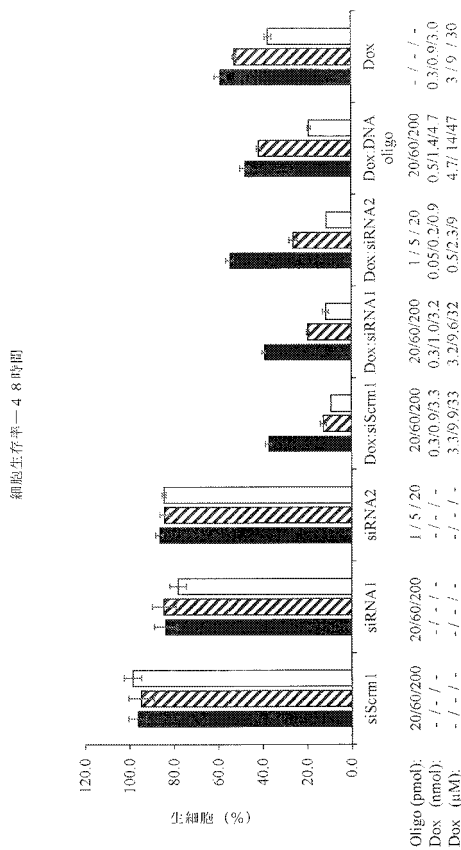
【図 4】



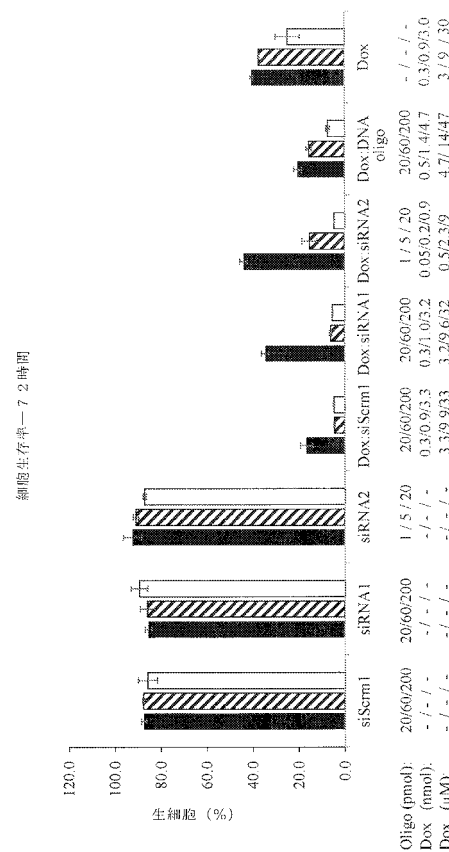
【図 5 A】



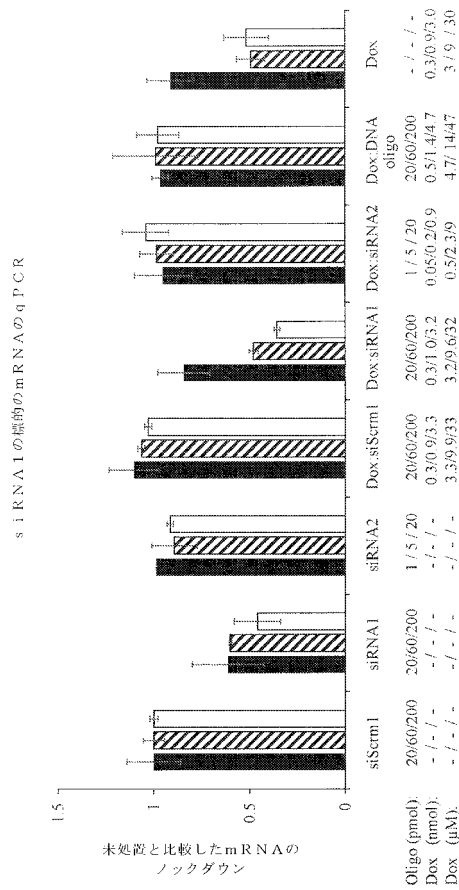
【図 5 B】



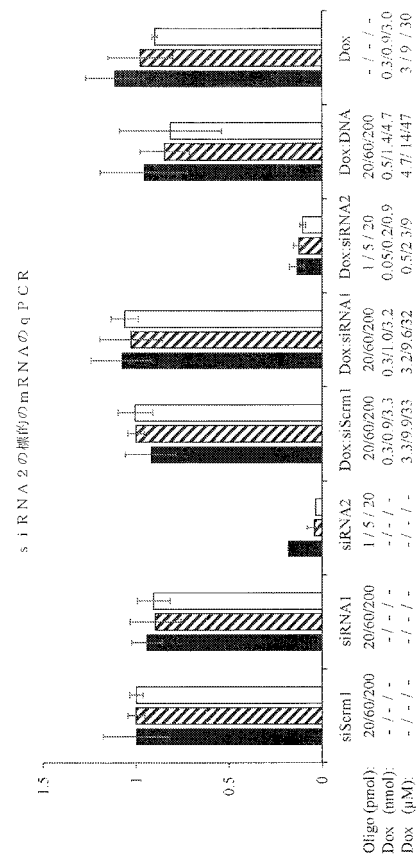
【図 5 C】



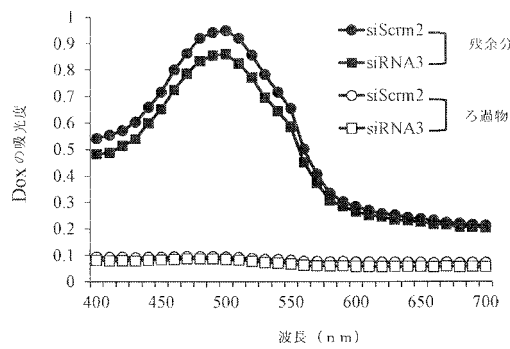
【図 6 A】



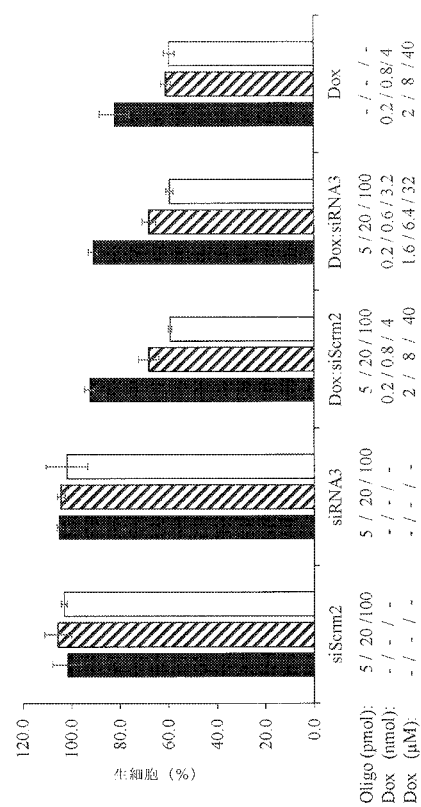
【図 6 B】



【図 7】



【図 8】



【手続補正書】

【提出日】令和1年6月5日(2019.6.5)

【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】

2019529571000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 17/54884

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 31/7088, A61K 38/17, A61K 47/42 (2018.01)

CPC - C07K 14/005, C07K 2319/035, C12N 15/111

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History Document

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

See Search History Document

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

See Search History Document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2012/0004181 A1 (MEDINA-KAUWE) 05 January 2012 (05.01.2012) para [0009]-[0011]; [0023]; [0028]; [0045]-[0047]; [0064]-[0069]; [0071]; [0135].	1-7
A	WO 2015/109264 A1 (CEDARS SINAI MEDICAL CENTER) 23 July 2015 (23.07.2015) para [0003]; [0037]-[0043]; [0093]; [0123].	1-7

☐ 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

23 January 2018

Date of mailing of the international search report

06 FEB 2018

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300

PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 17/54884

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 17/54884

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 8-37, 43
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

Group I, claims 1-7, directed to a composition.

Group II, claims 38-42, directed to a method of making a composition.

The inventions listed as Groups I-II do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

—continued on first extra sheet—

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-7

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 17/54884

--continued from Box III: Observations where unity of invention is lacking--

Special technical features:

Group I has the special technical feature of a composition, comprising a functional RNA molecule complexed with a small-molecule drug, that is not required by Group II.

Group II has the special technical feature of combining a small-molecule drug with a functional RNA molecule, that is not required by Group I.

Common technical features:

Groups I-II share the common technical feature of a composition comprising nanoparticles comprising a carrier polypeptide and a functional RNA molecule complexed with a small-molecule drug, wherein the carrier polypeptide comprises a cell-penetrating segment and an oligonucleotide-binding segment, wherein the small-molecule drug is intercalated with the functional RNA molecule. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because this shared technical feature is made obvious by WO 2015/109264 A1 to CEDARS SINAI MEDICAL CENTER, (hereinafter CSMC).

CSMC teaches a composition (para [0003] "the invention relates to compositions that deliver (therapeutic agents)" comprising nanoparticles (para [0038] "the drug delivery molecules disclosed herewith form nanoparticles") comprising a carrier polypeptide (para [0037] "The drug delivery molecule includes a ligand that targets a cell surface molecule, a membrane penetration domain and a payload binding domain. The ligand in the drug delivery molecule delivers the molecule to the target cell, such as a cancer cell. The membrane penetration domain mediates cytosolic penetration of the target cell. The payload binding domain forms a complex with a therapeutic agent. The drug delivery molecule in complex with the therapeutic molecule delivers the therapeutic agent to the target cell"; [0040] "the ligand is a...polypeptide") and a functional nucleotide molecule complexed with a small-molecule drug (para [0044] "the payload that binds to the payload binding domain binds is a nucleic acid...ribonucleic acid (RNA), messenger ribonucleic acid (mRNA)"; [0123] "Doxorubicin (Dox) is an FDA approved cytotoxic agent that is used for a broad range of cancer types. If such drugs could be targeted mainly to tumor cells, it would be beneficial in terms of reducing side effects. In this approach, first Dox is intercalated into a double stranded oligo to form DNA-Dox"), wherein the carrier polypeptide comprises a cell-penetrating segment and an oligonucleotide-binding segment (para [0037] "The drug delivery molecule includes a ligand that targets a cell surface molecule, a membrane penetration domain and a payload binding domain. The ligand in the drug delivery molecule delivers the molecule to the target cell, such as a cancer cell. The membrane penetration domain mediates cytosolic penetration of the target cell. The payload binding domain forms a complex with a therapeutic agent. The drug delivery molecule in complex with the therapeutic molecule delivers the therapeutic agent to the target cell"; [0040] "the ligand is a...polypeptide"; [0042]-[0043] "the membrane penetration domain is the penton base protein or a fragment thereof from Adenovirus...As used herein, "PB" refers to a penton base segment...the payload binding domain is a...polypeptide"), wherein the small-molecule drug is intercalated with a functional nucleotide molecule (para [0123] "Doxorubicin (Dox)...If such drugs could be targeted mainly to tumor cells, it would be beneficial in terms of reducing side effects. In this approach, first Dox is intercalated into a double stranded oligo to form DNA-Dox"), yet does not specifically teach the functional nucleotide molecule complexed with a small-molecule drug is RNA. However, since CSMC does teach delivery of functional RNA (para [0093] "PBK10 mediates mRNA delivery"), and because one of ordinary skill in the art at the time would have readily appreciated that Dox and other similar small molecule drugs would intercalate with RNA as well as DNA, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to have used the taught therapeutic RNAs with the taught intercalating small molecule drugs in order to enhance delivery of the combined therapeutic agents.

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Group I-II inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

NOTE, claims 8-37, 43 are held unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	37/04	(2006.01)	A 6 1 P	37/04	
A 6 1 K	9/127	(2006.01)	A 6 1 K	9/127	
A 6 1 K	47/42	(2017.01)	A 6 1 K	47/42	
A 6 1 K	38/18	(2006.01)	A 6 1 K	38/18	
A 6 1 K	38/16	(2006.01)	A 6 1 K	38/16	
A 6 1 K	31/713	(2006.01)	A 6 1 K	31/713	
A 6 1 K	31/7105	(2006.01)	A 6 1 K	31/7105	
A 6 1 K	31/704	(2006.01)	A 6 1 K	31/704	
A 6 1 K	9/19	(2006.01)	A 6 1 K	9/19	
A 6 1 K	9/51	(2006.01)	A 6 1 K	9/51	
C 1 2 N	15/113	(2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z N A Z
C 1 2 N	15/88	(2006.01)	C 1 2 N	15/88	Z

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(72)発明者 ハファー , オマー ケー .

アメリカ合衆国 , カリフォルニア州 9 0 0 6 7 , センチュリー シティ , スイート 1 1 0 0 , 1 9 9 9 アベニュー オブ ザ スターズ , イーオーエス バイオサイエンス , インコーポレイテッド内

F ターム(参考) 4C076 AA19 AA65 AA95 CC07 CC27 EE41 EE59 FF34
 4C084 AA13 AA19 DB53 DC50 MA24 MA37 NA13 ZB09 ZB26 ZC75
 4C086 AA01 AA02 EA10 EA16 MA02 MA03 MA04 MA05 MA24 MA37
 NA13 ZB09 ZB26 ZC75