

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2023-504186
(P2023-504186A)

(43)公表日 令和5年2月1日(2023.2.1)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/87 (2006.01)	C 1 2 N	15/87	Z	4 B 0 6 5
A 6 1 K	31/7105(2006.01)	A 6 1 K	31/7105		4 C 0 5 7
A 6 1 K	31/711(2006.01)	A 6 1 K	31/711		4 C 0 7 6
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		4 C 0 8 4
A 6 1 P	35/04 (2006.01)	A 6 1 P	35/04		4 C 0 8 6
		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2022-533064(P2022-533064)			(71)出願人	509127310
(86)(22)出願日	令和2年12月7日(2020.12.7)				サーナオミクス インコーポレイテッド
(85)翻訳文提出日	令和4年7月26日(2022.7.26)				アメリカ合衆国 メリーランド州 2 0 8
(86)国際出願番号	PCT/US2020/063676				7 9 ゲイザーズバーグ プロフェッショ
(87)国際公開番号	WO2021/113851				ナル ドライブ 4 0 1 スイート 2 8 0
(87)国際公開日	令和3年6月10日(2021.6.10)			(74)代理人	110002077
(31)優先権主張番号	62/945,042				園田・小林弁理士法人
(32)優先日	令和1年12月6日(2019.12.6)			(72)発明者	ルー, シャオヤン
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 8 7
(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,				9, ゲイザーズバーグ, プロフェッショナル
	最終頁に続く				ショナル ドライブ 4 0 1, スイート 2 8 0 シー／オー サーナオミクス イン
				(72)発明者	コーポレイテッド
					ルー, バトリック ワイ.
					アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 8 7
					最終頁に続く

(54)【発明の名称】 標的化された核酸送達のためのペプチドドッキング賦形剤

(57)【要約】

s i R N A分子などの治療化合物及び標的化リガンドを含有するペプチドドッキング賦形剤組成物が、それらの調製及び使用のための方法と共に提供される。組成物及び方法は、増強された治療の利益をもたらすために標的化リガンドを化合物に連結することによって、対象への治療化合物の標的化された細胞／組織送達を可能にする。対象は、動物又はヒトであり得る。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 標的化部分及び (b) 第 1 の治療用オリゴヌクレオチドに共有結合的に連結したペプチドドッキング賦形剤 (PD o V) を含む化学的構成体。

【請求項 2】

第 1 の治療用オリゴヌクレオチドと同じ又は異なる第 2 の治療用オリゴヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の構成体。

【請求項 3】

PD o V がヒスチジン及びリジンの複数の反復単位を含む、請求項 1 から 2 のいずれか一項に記載の構成体。

【請求項 4】

標的化部分がアシアロ糖タンパク質受容体に結合する、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の構成体。

【請求項 5】

オリゴヌクレオチドが、s i R N A、アンチセンスオリゴヌクレオチド、m i R N A、s a R N A、s h R N A、アプタマー、RNA ザイム、DNA ザイム、デコイオリゴヌクレオチド、又は Cp G モチーフを含む、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の構成体。

【請求項 6】

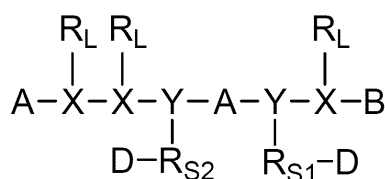
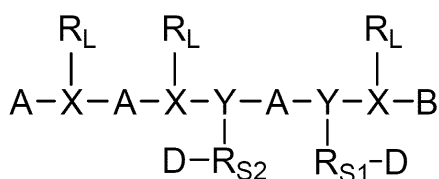
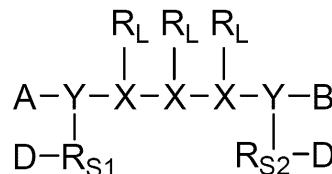
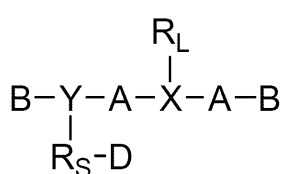
前記治療用オリゴヌクレオチドが s i R N A 又は m i R N A 分子である、請求項 5 に記載の構成体。

【請求項 7】

PD o V 構成体が、同じ若しくは異なる少なくとも 2 つの標的化部分及び／又は同じ若しくは異なる少なくとも 2 つの治療用オリゴヌクレオチドを含むエンドソーム放出モチーフを含む、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の構成体。

【請求項 8】

以下に示される構造のうちの 1 つを有し、式中、X 型部位は、標的化リガンドをコンジュゲートするために使用され、Y 型部位は、オリゴヌクレオチドをコンジュゲートするために使用され、X 及び Y は、同じであっても異なってもよく、A は、H、K、R、H H、H H H、H H H H、H H K、H H H K のペプチド配列、又は最大約 5 個のアミノ酸を含む任意の他のエンドソーム放出の短いペプチドであり、B は、H、K、R、H H、H H H、H H H H、H H K、H H H K のペプチド配列、又は最大約 5 個のアミノ酸を含む任意の他の短いペプチド、任意の他のアミノ酸、若しくはリンカーとのアミノ酸の組み合わせであり、D はオリゴヌクレオチドであり、R_L はリガンドであり、R_S は、オリゴヌクレオチドに対するリンカーである、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の構成体。

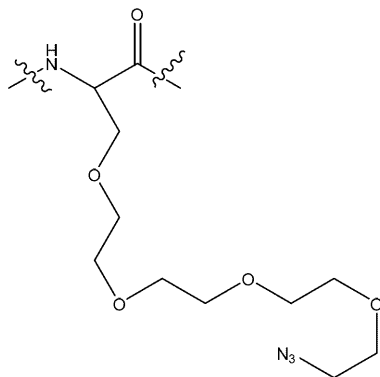


【請求項 9】

D が s i R N A、m R N A 又はアプタマーである、請求項 8 に記載の構成体。

【請求項 10】

PDovペプチド構成体が、KHHHCKH、HKHHHCKH、HHKHHHCKH、HHHKHHHKCHHHKHHH、HHHKHHCKHHH、HHHKHHCHHHH、HKHHCKH、HKHCH、HKHCKH、HKHC、HHHK(S)HHCKHHH及びHHK(S)HHKCHH(S)HHHからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む構造を有し、R_Lがシステイン残留物の側鎖に結合し、R_Sがリジン残留物の側鎖に結合しており、(S)が：



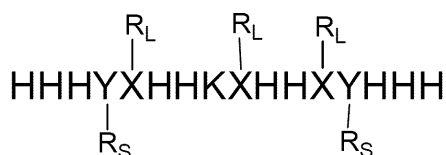
10

20

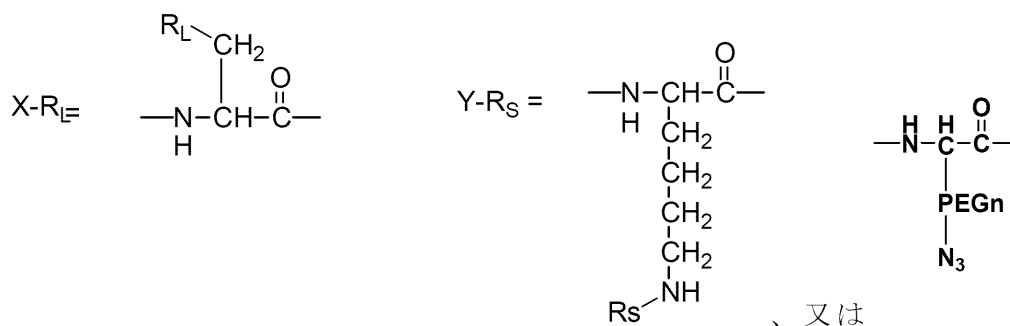
である、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の構成体。

【請求項 10】

PD_oVペプチド構成体が以下の構造を有し、



30

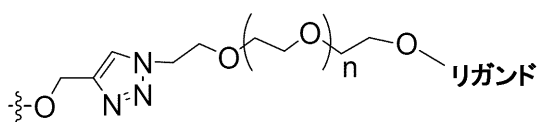


40

リガンドのうちの3つがペプチドにおいて個々にコンジュゲートされている、請求項1から9のいずれか一項に記載の構成体。

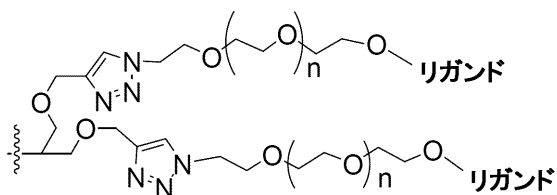
【請求項 1 1】

リガンド部分 R_L が、リンカー - 1 を含み、リンカー - 1 が、以下の構造：



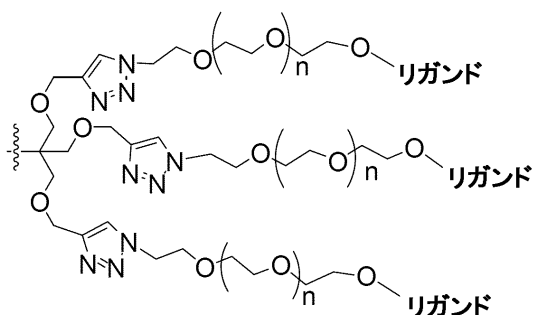
50

式中、 n は 1、2 又は 3 であり、 OCH_2 単位を有する 1, 5-トリアゾール環を介して架橋に結合されているか、又は



10

式中、 n は 1、2 又は 3 であり、 CH_2OCH_2 単位を有する 1, 5-トリアゾール環を介して架橋に結合されているか、又は



20

式中、 n は 1、2 又は 3 であり、 CH_2OCH_2 単位を有する 1, 5-トリアゾール環を介して架橋に結合している、
 のうちの 1 つを含む、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の構成体。

【請求項 12】

PDOV ペプチドに結合したリガンド間のリンカーが、ポリエチレングリコール鎖 - $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ - 又は - $(\text{CH}_2\text{CH}_2)_n$ - 鎖を含み、 n が 2 ~ 15 の整数である、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の構成体。

30

【請求項 13】

リガンド R_L が、チオエーテル、アミド、又はトリアゾール結合を含むリンカーを介して PDOV ペプチドに結合している、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の構成体。

【請求項 14】

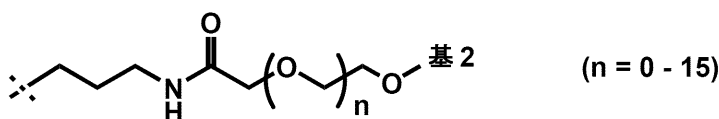
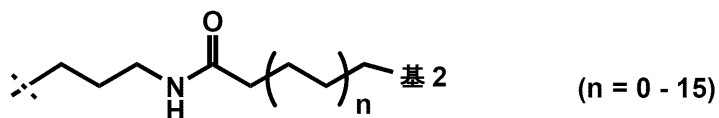
オリゴヌクレオチドが、構造 R_s - リンカー 2 - オリゴヌクレオチドを有する部分を介して連結されており、リンカー 2 が、脂肪族鎖、ポリエチレングリコール鎖、疎水性脂質鎖又は親水性鎖であり、末端部位の基 2 は、siRNA 末端との化学的コンジュゲーションのための反応部位である、請求項 1 に記載の構成体。

【請求項 15】

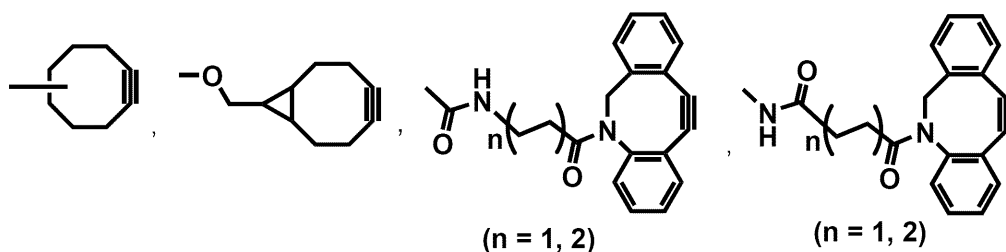
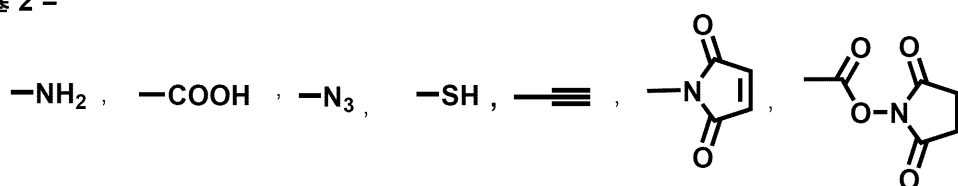
40

50

リンカー 2 =



基 2 =



である、請求項 15 に記載の構成体。

【請求項 16】

オリゴヌクレオチドが、10～29の長さを有する一本鎖オリゴヌクレオチドである RNA 分子である、請求項 1 に記載の構成体。

【請求項 17】

オリゴヌクレオチドが、それぞれ 10～29 塩基又は 19～27 塩基の長さを有する 2 つの相補的な一本鎖オリゴヌクレオチドの二重鎖を含む siRNA 分子である、請求項 6 に記載の構成体。

【請求項 18】

オリゴヌクレオチドがデオキシリボヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の構成体。

【請求項 19】

オリゴヌクレオチドがリボヌクレオチドを含む、請求項 1 から 17 のいずれか一項に記載の構成体。

【請求項 20】

ヌクレオチドがデオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含む、請求項 1 から 19 のいずれか一項に記載の構成体。

【請求項 21】

オリゴヌクレオチドが、2' 位に少なくとも 1 つ以上の化学修飾ヌクレオチドを含む siRNA 分子を含む、請求項 1 から 19 のいずれか一項に記載の構成体。

【請求項 22】

化学修飾ヌクレオチドが、2'-O-メチル又は 2'-フルオロ、2'-O-メトキシエ

10

20

30

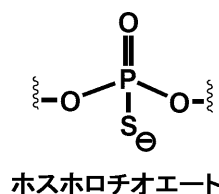
40

50

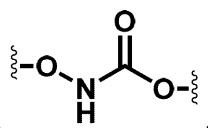
チル、2'-O-アリル又は2'-H修飾ヌクレオチドを含む、請求項28に記載の構成体。

【請求項23】

オリゴヌクレオチドが、



又は



10

である、少なくとも1つの化学修飾結合を含むsiRNA分子を含む、請求項1から2のいずれか一項に記載の構成体。

【請求項24】

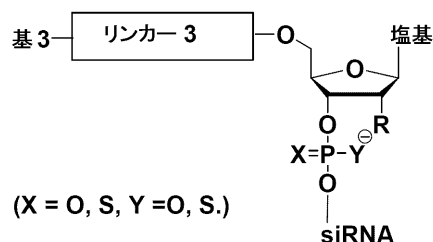
siRNA又はオリゴヌクレオチドが、位置5'又は3'でリンカー3でさらに化学修飾されており、リンカー3が、リンカー2と共有結合的に反応してリガンドPDov及びヌクレオチドを連結することができる相補的なコンジュゲーション部位の基3を含有する、請求項1から23のいずれか一項に記載の構成体。

【請求項25】

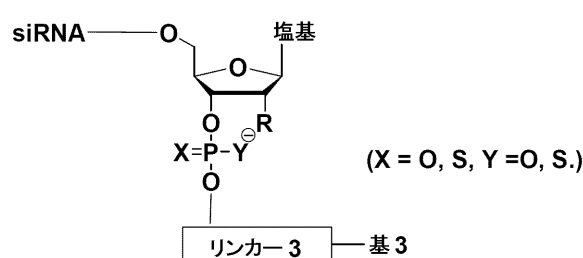
以下に示す

20

5' コンジュゲーション



3' コンジュゲーション



30

の構造を含む、請求項24に記載の構成体。

【請求項26】

標的化リガンドが、N-アセチル-ガラクトサミン (GalNAc)、ガラクトース、ガラクトサミン、N-ホルマール-ガラクトサミン、N-プロピオニル-ガラクトサミン、N-ブタノイルガラクトサミン、及びアプタマーからなる群から選択される、請求項1から32のいずれか先行する一項に記載の構成体。

【請求項27】

標的化リガンドがN-アセチル-ガラクトサミン (GalNAc) である、請求項26に記載の構成体。

40

【請求項28】

標的化リガンドが、環状 (c) RGD、APRPG、NGR、F3ペプチド、CGKRK、LyP-1、iRGD (CRGDRCPDC)、iNGR、T7ペプチド (HAIPRH)、MMP2切断可能オクタペプチド (GPLGIAGQ)、CP15 (VHLGYAT)、FSH (FSH-β、33~53アミノ酸、YTRDLVKDPA RPKIQKTCTF)、LHRH (QHTSYKcLRP)、ガストリン放出ペプチド (GRP) (CGGNHWAVGHL M)、RVG (YTWMPENPRPGT PCDIF TNSRGKRASNG)、FMDV20ペプチド配列 (NAV PNLRGDLQVLAQKVAR T)、及びGLPからなる群から選択されるペプチドであるか、又は葉酸である、請求

50

項 1 に記載の構成体。

【請求項 29】

標的化リガンドが R G D 又は G L P である、請求項 28 に記載の構成体。

【請求項 30】

請求項 1 から 29 のいずれか一項に記載の構成体と、薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物。

【請求項 31】

薬学的に許容される担体が、ヒスチジン-リジンリッチポリペプチド H K P、H K P (H)、又はリポフェクタミンを含む、請求項 30 に記載の薬学的組成物。

【請求項 32】

薬学的に許容される担体が、水と、リン酸カリウム一塩基性無水 N F、塩化ナトリウム U S P、リン酸ナトリウム二塩基性七水和物 U S P、グルコース、及びリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) からなる群の 1 つ又は複数とを含む、請求項 30 に記載の薬学的組成物。

【請求項 33】

細胞にオリゴヌクレオチドを送達する方法であって、細胞を請求項 1 に記載の構成体と接触させることを含む、方法。

【請求項 34】

肝細胞の細胞にオリゴヌクレオチドを送達する方法であって、細胞を請求項 4 に記載の構成体と接触させることを含む、方法。

【請求項 35】

オリゴヌクレオチドが s i R N A 分子であり、i n v i v o で哺乳動物の細胞又は肝細胞に送達される、請求項 33 又は請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

細胞がヒト細胞である、請求項 33 から 35 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 37】

哺乳動物の細胞又は肝細胞がヒト細胞又は肝細胞である、請求項 41 から 45 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 38】

哺乳動物における遺伝子治療の方法であって、治療的有効量の請求項 1 から 29 のいずれか一項に記載の構成体、又は請求項 30 から 32 に記載の組成物を哺乳動物に投与することを含み、哺乳動物が場合によりヒトである、方法。

【請求項 39】

ペプチドが、アミノ酸配列 - H H K、- K H H、- H H H、- H H H K、- K H H H、- H H H H K、- K H H H H、- K (H H H K) n (n = 1 ~ 8)、- K (H H H H K) n (H H H K) m (n = 1 ~ 4、m = 1 ~ 8)、K (H H H H K) n (H H H K) m - (n = 1 ~ 4、m = 1 ~ 8) を含む、請求項 1 から 29 のいずれか一項に記載の構成体。

【請求項 40】

配列 - K (H H H H K) n (H H H K) m 又は K (H H H H K) n (H H H K) m - を有するペプチドを含み、式中 n は 1 であり、m は 3 である、請求項 39 に記載の構成体。

【請求項 41】

ペプチドがエンドソーム放出ペプチドである、請求項 52 に記載の構成体。

【請求項 42】

ペプチドが細胞透過性ペプチドである、請求項 52 に記載の構成体。

【請求項 43】

式 (H_nK_m)_oX_pY_q を有するペプチドであり、式中、H はヒスチジンであり、K はリジンであり、X 及び Y はアミノ酸及びリンカーから選択される官能性単位であり、n は 1 ~ 10 であり、m は 1 ~ 10 であり、o は 1 ~ 10 であり、p は 1 ~ 5 であり、q は 1 ~ 4 である、ペプチド。

【請求項 44】

標的化リガンドを結合させるための少なくとも 2 つのコンジュゲーション部位を含む、

10

20

30

40

50

請求項 43 に記載のペプチド。

【請求項 45】

コンジュゲーション部位がリジン又はシステインである、請求項 44 に記載のペプチド。

【請求項 46】

オリゴヌクレオチドを結合させるための少なくとも 2 つのコンジュゲーション部位を含む、請求項 43 から 45 のいずれか一項に記載のペプチド。

【請求項 47】

請求項 43 から 46 のいずれか一項に記載のペプチドと、ペプチドに少なくとも 1 つのコンジュゲーション部位で連結された少なくとも 1 つの標的化リガンドとを含む化学的構成体。

10

【請求項 48】

請求項 43 から 46 のいずれか一項に記載のペプチド又は請求項 47 に記載の構成体と、ペプチドに少なくとも 1 つのコンジュゲーション部位で連結された少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドとを含む、化学的構成体。

【請求項 49】

標的化リガンドが、環状 (c) RGD、APRPG、NGR、F3 ペプチド、CGKRK、LyP-1、iRGD (CRGDRCPDC)、iNGR、T7 ペプチド (HAIFYPRH)、MMP2 切断可能オクタペプチド (GPLGLIAGQ)、CP15 (VHLGYAT)、FSH (FSH- β 、33~53 アミノ酸、YTRDLVKDPARPKIQKTCTF)、LHRH (QHTSYKcLRP)、ガストリン放出ペプチド (GRP) (CGGNHWAVGHLM)、RVG (YTWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKRASNG)、FMDV20 ペプチド配列 (NAVPNLRGDLQVLAQKVART)、及び GLP からなる群から選択される、請求項 1 から 29 のいずれか一項に記載の化学的構成体。

20

【請求項 50】

オリゴヌクレオチドが、siRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、miRNA、saRNA、shRNA、アプタマー、RNA ザイム、DNA ザイム、デコイオリゴヌクレオチド、及び CpG モチーフからなる群から選択される、請求項 1 から 29 又は 49 のいずれか一項に記載の化学的構成体。

30

【請求項 51】

オリゴヌクレオチドが、siRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、又は miRNA である、請求項 50 に記載の化学的構成体。

【請求項 52】

請求項 1 から 29 又は 49 から 51 のいずれか一項に記載の構成体の治療的有効量を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物においてがんを治療する方法。

【請求項 53】

がんが固形腫瘍である、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 54】

がんが、肝臓がん、結腸がん、及び膵臓がんからなる群から選択される、請求項 52 に記載の方法。

40

【請求項 55】

がんが肝臓がんであり、肝細胞癌、転移性結腸がん、及び転移性膵臓がんからなる群から選択される、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 56】

哺乳動物がヒトである、請求項 52 から 55 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 57】

構成体が、がん細胞を含む腫瘍に直接注射される、請求項 52 から 56 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

単一又は複数の核酸がエンドソーム放出ペプチドに共有結合的にコンジュゲートされ、さらに少なくとも1つの小分子リガンドに共有結合的に連結される送達システムが提供される。重要な新規組成物が、それらの調製及び使用のための方法と共に提供される。選択されたりリガンド及びリンカーを用いて、組成物及びシステムは、肝臓及び他の組織への核酸分子の標的化された送達を提供する。

【背景技術】

【0002】

二本鎖RNAは遺伝子発現をサイレンシングすることが示されており（Fire et al., Nature 391: 806–811 (1998), and Elbashir et al., Nature, 411, 494–498 (2001)）、この現象はRNA干渉又は「RNAi」、又は干渉RNA分子（RNAi）と呼ばれている。短い干渉RNA（siRNA）誘導RNAi調節は、がんから、薬になり得ない他の伝統的な疾患までの多種多様なヒトの疾患を治療する大きな潜在可能性を示している。RNAベースの治療薬には、従来の小分子及び抗体治療薬を上回る3つの主な利点がある。第1に、特定の細胞型又は組織への送達が考案されると（例えば、肝細胞へのsiRNA／アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）送達、中枢神経系へのASO送達）、その細胞型におけるすべての疾患促進遺伝子が標的化され得る見込みがある。第2に、RNA治療薬は単一遺伝子を選択的に標的とすることができ、オフターゲット遺伝子の調節を回避するよう

10

20

【0003】

この分野では、ASO、RNAi及びmRNAのケミストリーが進歩し、安定性の改善を可能にし、自然免疫応答を回避している。それはまた、抗体又は小分子の開発と比較して、比較的低コストでの自動合成による大規模での治療用ASO及びRNA化合物の工業規模の生産を可能にする。しかし、2つの領域、（a）特定の細胞型又は組織へのこれらの分子の標的化、（b）非毒性エンドソーム脱出剤の考案が、依然としてさらなる開発を必要としている。Dowdy, Nature Biotechnology, 35: 222–229 (2017)。

30

【0004】

市販のASO又はRNAi薬物では、2種類の有効な送達方法が使用されている。1つは、複数の成分を含有するリポソームと呼ばれる脂質ベースのナノ粒子を使用する。もう1つは、GalNAc分子コンジュゲートASGPR標的化（アジアロ糖タンパク質受容体）手法を使用する。

【0005】

RNAベースの治療薬の主な課題は、細胞への送達のための全経路が最終的にエンドソーム脱出をもたらすことである。肝へのASO及びsiRNA送達は、肝細胞への高分子薬物送達によく適したASGPRの特性に起因して、ASGPR標的化GalNAc-siRNAコンジュゲートを使用して、達成することができる。特に、肝細胞は、細胞の表面に数百万コピーのASGPRを発現し、これは10～15分毎の急速な速度で循環する。これらの特性は、エンドソーム脱出率が0.01%未満であると推定される場合でも、GalNAcベースの送達アプローチを有効にする。対照的に、ASO又はRNAの他の組織への効果的な送達は達成されていない。他のリガンド受容体系は、ASGPRのような高いレベルで受容体を発現せず、エンドソームへの急速なサイクルもない。実際、ほとんどの細胞の表面の受容体は、細胞あたり10,000～100,000（又はそれ未満

40

50

）の範囲で発現され、カベオリン及びクラスリン媒介性エンドサイトーシスは、典型的には90分毎に再利用される。Juliano, Nucleic Acids Res. 44, 6518-6548 (2016)を参照されたい。

【0006】

エンドソーム脱出は、依然として、すべてのRNAベースの治療に当てはまる問題である。肝細胞を超える細胞又は組織を標的とするためには、新しいケミストリー及び材料を開発することによりエンドソーム脱出を増強することが必要である。クロロキンなどの小分子エンドソーム溶解剤は、エンドソームを破壊又は溶解するために使用されてきたが、有効濃度では、これらの薬剤は細胞内のすべての種類のエンドソームを常に溶解し、実質的な毒性をもたらす。

【0007】

代替的なエンドソーム脱出手法は、エンドソーム分解ペプチド又は分子をRNAに直接コンジュゲートさせることであり、これはRNA治療薬を含有するエンドソームへのそれらの作用を厳密に制限する。エンドソームから脱出するためにコレステロール又は溶解性メリチンペプチドを含有する二分子動的ポリコンジュゲート(DPC)系を使用する様々な臨床試験は、毒性作用のために終了した。Wooddell, et al., Mol. Ther. 21, 973-985 (2013); Hou et al., Biotechnol. Adv. 33, 931-940 (2015)。

【0008】

以下に記載される組成物及び方法は、オリゴヌクレオチド及び標的化リガンドにコンジュゲートしたエンドソーム放出ペプチドを使用する。構成体は、非毒性の様式で細胞の細胞質へのオリゴヌクレオチドカーゴの脱出を増強する。本発明の構成体は、本明細書では「ペプチドドッキング賦形剤」(PDov)と呼ばれる。

【発明の概要】

【0009】

提供されるのは、(a)標的化部分及び(b)第1の治療用オリゴヌクレオチドに共有結合的に連結したペプチドドッキング賦形剤(PDov)を含む化学的構成体である。構成体は、第1の治療用オリゴヌクレオチドと同じ又は異なる第2の治療用オリゴヌクレオチドを含有してもよい。PDovは、ヒスチジン及びリジンの複数の反復単位を含み得る。一実施形態において、標的化部分はアシアロ糖タンパク質受容体に結合する。オリゴヌクレオチドは、siRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、miRNA、saRNA、shRNA、アプタマー、RNAザイム、DNAザイム、デコイオリゴヌクレオチド、又はCpGモチーフを含むことができる。

【0010】

これらの構成体において、PDov構成体は、同じ若しくは異なる少なくとも2つの標的化部分及び／又は同じ若しくは異なる少なくとも2つの治療用オリゴヌクレオチドを含むエンドソーム放出モチーフを含むことができる。

【0011】

構成体は、以下に示される構造のうちの1つを有し得て、式中、X型部位が、標的化リガンドをコンジュゲートさせるために使用され、Y型部位は、オリゴヌクレオチドをコンジュゲートするために使用され、X及びYは、同じであっても異なってもよく、Aは、H、K、R、HH、HHH、HHHH、HHK、HHHKのペプチド配列、又は最大約5個のアミノ酸を含む任意の他のエンドソーム放出の短いペプチドであり、Bは、H、K、R、HH、HHH、HHHH、HHK、HHHKのペプチド配列、又は最大約5個のアミノ酸を含む任意の他の短いペプチド、任意の他のアミノ酸、若しくはリンカーとのアミノ酸の組み合わせであり、Dはオリゴヌクレオチドであり、RLはリガンドであり、RSは、オリゴヌクレオチドに対するリンカーである。

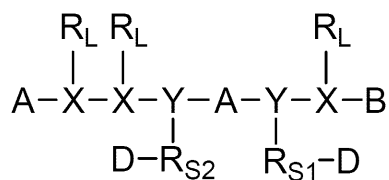
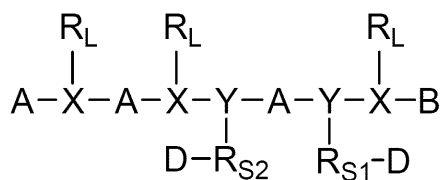
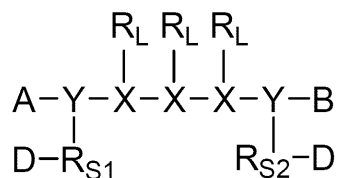
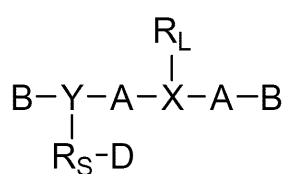
10

20

30

40

50



10

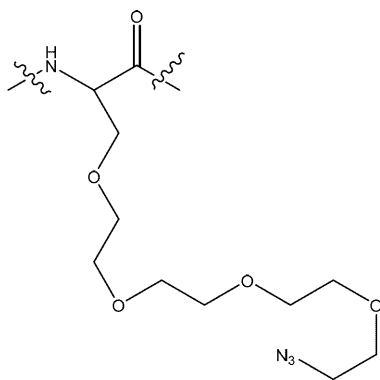
【0012】

Dは、s i R N A、m R N A又はアプタマーであり得る。

【0013】

これらの構成体において、P D o Vペプチド構成体は、K H H H C K H、H K H H H C K H、H H K H H H C K H、H H H K H H H K C H H H K H H H、H H H K H H C K H H H、H H H K H H C R H H H、H K H H C K H、H K H C H、H K H C K H、H K H C、H H H K (S) H H C K H H H及びH H K (S) H H K C H H (S) H H Hからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む構造を有し得て、 R_L がシステイン残留物の側鎖に結合し、 R_S がリジン残留物の側鎖に結合しており、(S)が

20



30

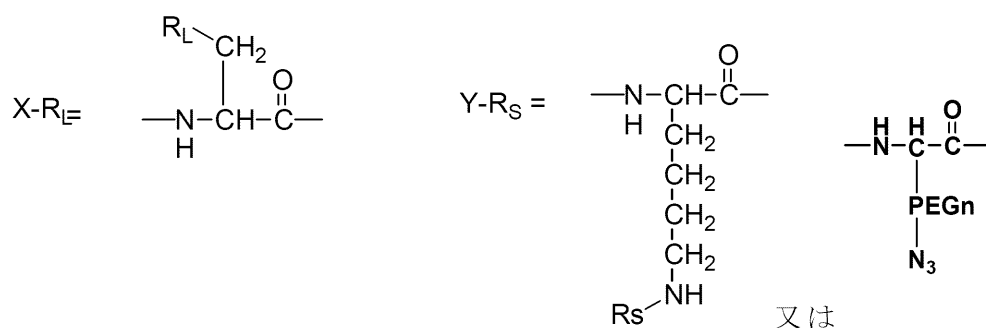
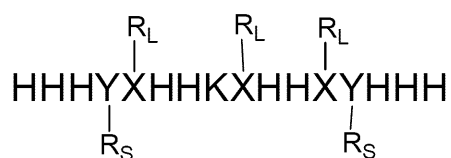
である。

【0014】

他の実施形態において、P D o Vペプチド構成体が以下の構造を有し得て、

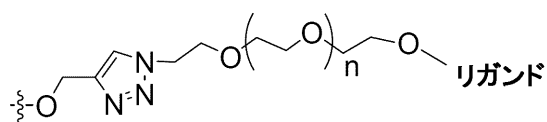
40

50

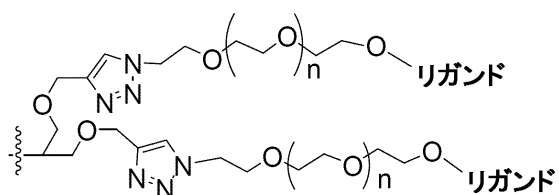


リガンドのうちの3つがペプチドにおいて個々にコンジュゲートされている。
【0015】

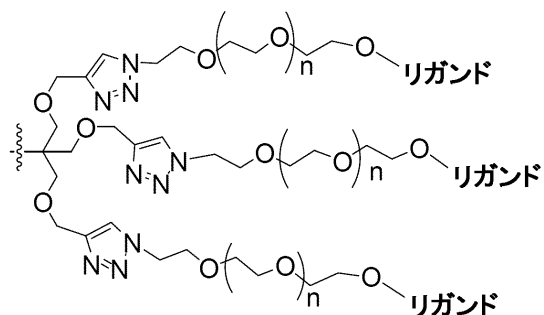
リガンド部分 R_L が、リンカー - 1 を含み得、リンカー - 1 が、以下の構造：



式中、nは1、2又は3であり、 OCH_2 単位を有する1,5-トリアゾール環を介して架橋に結合されているか、又は



式中、nは1、2又は3であり、 CH_2OCH_2 単位を有する1,5-トリアゾール環を介して架橋に結合されているか、又は



式中、 n は 1、2 又は 3 であり、 CH_2OCH_2 単位を有する 1, 5-トリアゾール環を介して架橋に結合している
 のうちの 1 つを含むことができる。

【0016】

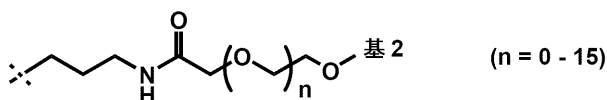
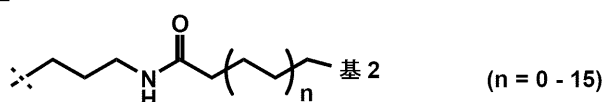
PDOV ペプチドに結合したリガンド間のリンカーが、ポリエチレングリコール鎖 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ 又は $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_n-$ 鎖を含み得、 n が 2 ~ 15 の整数である。リガンド R_L は、チオエーテル、アミド、又はトリアゾール結合を含み得るリンカーを介して PDOV ペプチドに結合され得る。

【0017】

他の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、構造 R_s -リンカー-2-オリゴヌクレオチドを有する部分を介して連結され、式中、リンカー-2 は、脂肪族鎖、ポリエチレングリコール鎖、疎水性脂質鎖、又は親水性鎖である。末端部位の基 2 は、siRNA 末端との化学的コンジュゲーションのための反応部位である。

10

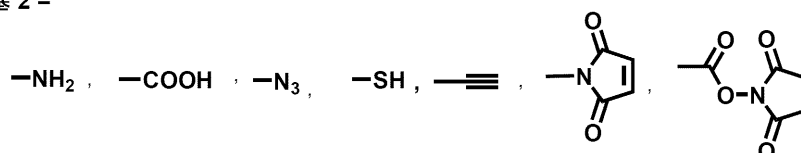
リンカー-2 =



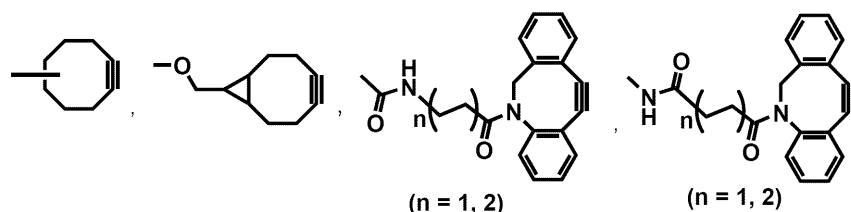
20



基 2 =



30



【0018】

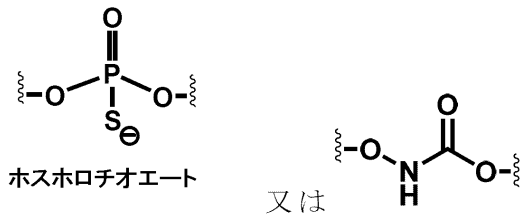
オリゴヌクレオチドは、10 ~ 29 の長さを有する一本鎖オリゴヌクレオチドである RNAi 分子であってもよく、又はそれぞれ 10 ~ 29 塩基又は 19 ~ 27 塩基の長さを有する 2 つの相補的な一本鎖オリゴヌクレオチドの二重鎖であってもよい。オリゴヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド及び／又はリボヌクレオチドを含有し得る。オリゴヌクレオチドは、2' 位に少なくとも 1 つ以上の化学修飾ヌクレオチドを含有する siRNA 分子を含有し得、式中、例えば、化学修飾ヌクレオチドは、2'-O-メチル又は 2'-フルオロ、2'-O-メトキシエチル、2'-O-アリル又は 2'-H 修飾ヌクレオチドを含む。

40

【0019】

他の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、

50



である少なくとも1つの化学修飾結合を含有する siRNA 分子を含有し得る。

【0020】

10

他の実施形態において、siRNA 又はオリゴヌクレオチドが、位置5'又は3'でリンカー3でさらに化学修飾されており、リンカー3が、リンカー2と共有結合的に反応してリガンド-POV及びヌクレオチドを連結することができる相補的なコンジュゲーション部位の基3を含有する。

【0021】

さらなる実施形態では、構成体は、以下

5' コンジュゲーション

3' コンジュゲーション



20

に示すような構造を有し得る。

【0022】

これらの構成体の各々において、標的化リガンドが、N-アセチル-ガラクトサミン (GalNAc)、ガラクトース、ガラクトサミン、N-ホルマール-ガラクトサミン、N-プロピオニル-ガラクトサミン、N-ブタノイルガラクトサミン、及びアプタマーからなる群から選択され得る。他の実施形態において、標的化リガンドは、環状 (c) RGD、APRPG、NGR、F3ペプチド、CGKRK、LyP-1、iRGD (CRGDRCPDC)、iNGR、T7ペプチド (HAIFYPRH)、MMP2切断可能オクタペプチド (GPLGLIAGQ)、CP15 (VHLGYAT)、FSH (FSH-β、33~53アミノ酸、YTRDLVKDPA RPKIQKTCTF)、LHRH (QHTSYkcLRP)、ガストリン放出ペプチド (GRP) (CGGNHWAVGHL M)、RVG (YTWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKRASNG)、FMDV20ペプチド配列 (NAVPNLRGDLQVLAQKVART)、及びGLPからなる群から選択されるペプチドであるか、又は葉酸である。

30

40

【0023】

これらの構成体のいずれにおいても、ペプチドは、アミノ酸配列-HHK、-KHH、-HHH、-HHHK、-KHHH、-HHHHK、-KHHHH、-K(HHHK)n (n=1~8)、-K(HHHHK)n(HHHK)m (n=1~4、m=1~8)、K(HHHHK)n(HHHK)m- (n=1~4、m=1~8)を含み得、例えば、構成体は、配列-K(HHHHK)n(HHHK)m又はK(HHHHK)n(HHHK)m-を有するペプチドを含み得、nは1であり、mは3である。ペプチドは、エンドソーム放出ペプチドであってもよく、又は細胞透過性ペプチドであってもよい。

【0024】

50

式 $(H_n K_m) \circ X_p Y_q$ を有するペプチドであり、式中、Hはヒスチジンであり、Kはリジンであり、X及びYはアミノ酸及びリンカーから選択される官能性単位であり、nは1～10であり、mは1～10であり、oは1～10であり、pは1～5であり、qは1～4である、ペプチドがまた、提供される。ペプチドは、標的化リガンドを結合させるための少なくとも2つのコンジュゲーション部位を含むことができる。有利には、コンジュゲーション部位はリジン又はシステインである。ペプチドは、オリゴヌクレオチドを結合させるための少なくとも2つのコンジュゲーション部位を含み得る。構成体は、式 $(H_n K_m) \circ X_p Y_q$ のペプチドと、少なくとも1つのコンジュゲーション部位を介してペプチドに連結された少なくとも1つの標的化リガンドとを含み得る。少なくとも1つのオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのコンジュゲーション部位を介してペプチドに連結され得る。標的化リガンドは、環状(c) RGD、APRPG、NGR、F3ペプチド、CGKRRK、LyP-1、iRGD (CRGDRCPDC)、iNGR、T7ペプチド (HAIYPRH)、MMP2切断可能オクタペプチド (GPLGIAGQ)、CP15 (VHLGYAT)、FSH (FSH-β、33～53アミノ酸、YTRDLVKDPA RP KIQKTCTF)、LHRH (QHTSYkcLRP)、ガストリン放出ペプチド (GRP) (CGGNHWAVGHL M)、RVG (YTWMPENPRPGT PCDIF TNSRGKRASNG)、FMDV20ペプチド配列 (NAV PNLRGDLQVLA QKVART)、及びGLPからなる群から選択され得る。オリゴヌクレオチドが、siRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、miRNA、saRNA、shRNA、アプタマー、RNAザイム、DNAザイム、デコイオリゴヌクレオチド、及びCpGモチーフからなる群から選択され得る。

10

20

【0025】

上記請求項に記載の構成体及び薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物も提供される。薬学的に許容される担体は、ヒスチジン-リジンリッチポリペプチドHKP、HKP(H)、又はリポフェクタミンを含むように、及び／又は水、並びにリン酸カリウム-塩基性無水NF、塩化ナトリウムUSP、リン酸ナトリウム二塩基性七水和物USP、グルコース、及びリン酸緩衝生理食塩水(PBS)からなる群の1つ又は複数を含むようによい。

【0026】

細胞を上記の構成体又は薬学的組成物と接触させることを含む、細胞にオリゴヌクレオチドを送達する方法も提供される。

30

【0027】

上記のような構成体と細胞を接触させることを含む、オリゴヌクレオチドを肝細胞の細胞に送達する方法も提供される。

【0028】

これらの方法では、オリゴヌクレオチドがsiRNA分子であり得、in vivoで哺乳動物細胞又は肝細胞に送達され得る。細胞はヒト細胞であり得る。

【0029】

治療的有効量の上記の構成体を哺乳動物に投与することによる、哺乳動物における遺伝子治療の方法も提供され、哺乳動物は任意選択的にヒトである。

40

【0030】

上記のような構成体の治療的有効量を哺乳動物に投与することを含む、ヒトなどの哺乳動物のがんを治療する方法も提供される。がんは固形腫瘍であり得る。がんは、肝臓がん、結腸がん、又は膵臓がんであり得る。肝臓がんは、肝細胞癌、転移性結腸がん、又は転移性膵臓がんであり得る。構成体は、がん細胞を含む腫瘍に直接注射され得る。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】 [GalNAc] ペプチドドッキング賦形剤 (G-PDoV) の設計のイラストの表現を示す。三価GalNAcを1つのドッキング部位Aに共有結合的にコンジュゲートさせた。オリゴヌクレオチド又はsiRNAを他の1つ又は2つのドッキング部位Bに

50

それぞれコンジュゲートさせた。

【図 2】「リガンド」ペプチドドッキング賦形剤の代替設計のイラストの表現を示す。一価の $G a l N A c$ を 1 ～ 4 つのドッキング部位 A に共有結合的にコンジュゲートさせた。オリゴヌクレオチド又は $s i R N A$ をそれぞれ他の 1 つ又は 2 つのドッキング部位 B にコンジュゲートさせた。

【図 3】ペプチドドッキング賦形剤 ($P D o V$) の設計を示す。それは、ヒスチジン (H)、リジン (K) 並びに官能性単位 X 及び Y (アミノ酸又は機能性リンカー) の複数の反復単位有する ($H_n K_m$) $o X_p Y_q$ ペプチド骨格を有し、式中 $n = 1 \sim 10$ 、 $m = 1 \sim 10$ 、 $o = 1 \sim 10$ 、 $p = 1 \sim 5$ 、 $q = 1 \sim 5$ である。 $H K$ 反復単位は良好な細胞透過能を有することが示されており、エンドソームの放出を促進するために、リジン又は様々な官能性単位 X 若しくは Y がリガンドのコンジュゲーションのためのドッキング部位として採用され、 Y が異なる共有結合を介したオリゴヌクレオチドのコンジュゲーションのためのドッキング部位として採用される。例えば、部位 1 は、 $G a l N A c$ 又は他の標的化リガンドなどのリガンドの存在下でのみ反応できる。部位 3 は、特定の条件下でのみ、オリゴヌクレオチド及び $s i R N A$ とコンジュゲートすることができる。

【図 4】3 つのリガンドコンジュゲーション部位及びマルチオリゴヌクレオチド部位を有するペプチドドッキング賦形剤 ($P D o V$) の設計を示す。($H_n K_m$) $o X_p Y_q$ ペプチド骨格は、ヒスチジン (H)、リジン (K) 並びに官能性単位 X 及び Y (アミノ酸又は機能性リンカー) の多重反復単位を有し、式中 $n = 1 \sim 10$ 、 $m = 1 \sim 10$ 、 $o = 1 \sim 10$ 、 $p = 1 \sim 5$ 、 $q = 1 \sim 5$ である。 $H K$ 反復単位は、良好な細胞透過能を有し、エンドソームの放出を促進することが実証されている。リジン残留物又は様々な官能性単位 X は、リガンドのコンジュゲーションのためのドッキング部位として適合され、 Y は、異なる共有結合を介したオリゴヌクレオチドのコンジュゲーションのためのドッキング部位として適合される。例えば、部位 1 は、 $G a l N A c$ 又は他の標的化リガンドなどのリガンドの存在下でのみ反応することができる。部位 3 は、特定の条件下でのみオリゴヌクレオチド及び $s i R N A$ とコンジュゲートすることができる。

【図 5】 $P D o V$ 構成体の構造を示す。 $P D o V$ 構成体は、複数のコンジュゲーション部位 X 及び Y が挿入された細胞透過性／エンドソーム放出ペプチドである。部位 X は、標的化リガンドをコンジュゲートするために使用され、部位 Y は、複数のオリゴヌクレオチド又は核酸をコンジュゲートするために使用される。 $P D o V$ のいくつかの構成体の例としては、 A がペプチド配列 K 、 R 、 H 、 HH 、 HHH 、 $HHHH$ 、 HHK 、 $HHHK$ 又は他の短いペプチドを表す場合、 B が、ペプチド配列 K 、 R 、 H 、 HH 、 HHH 、 $HHHH$ 、 HHK 、 $HHHK$ 、又は他の短いペプチド、他のアミノ酸若しくは組み合わせを表す場合、 D が、オリゴヌクレオチド、 $s i R N A$ 、 $m R N A$ 、アプタマーを表す場合、 $R L$ がリガンドを表す場合、及び $R S$ がオリゴヌクレオチドに対するリンカーを表す場合が挙げられる。

【図 6】1 つ又は 2 つのオリゴヌクレオチド部位及び 1 つのリガンドコンジュゲーション部位を含む第 1 発生 $P D o V$ の構造の例を示す。

【図 7】2 つのオリゴヌクレオチド部位及び 1 つの多価リガンドコンジュゲーション部位を含む第 2 発生 $P D o V$ の構造の例を示す。

【図 8】2 つのオリゴヌクレオチド部位及び 1 つの多価リガンドコンジュゲーション部位を含む $P D o V$ の代替構造の例を示す。リガンドは、 $P D o V$ 骨格に 1 つずつ個々にコンジュゲートすることができる。

【図 9 A】コンジュゲーション部位の結合選択を示す。化学基 $R s$ は、オリゴヌクレオチドを $P D o V$ ペプチド賦形剤とコンジュゲートするための「クリック」様反応性部分を表す。反応性部分は、アミン、ヒドラジン、 N -ヒドロキシスクシンイミド、アジド、アルキン、カルボン酸、チオール、マレイミド、又は当該技術分野で公知の他の化学反応性部分であり得る。

【図 9 B】リンケージの代表的な例を示す。

【図 9 C】いかように、コンジュゲーション R -リンカー 2- $s i R N A$ のリンカー 2 は

、ペプチドとコンジュゲーション部位との間にある化学的なスペーサーであり、コンジュゲーション部位をリンカーの末端部位に結合させているかを示す。リンカー 2 は、脂肪族鎖若しくはポリエチレングリコール鎖、又は他の疎水性脂質若しくは親水性鎖であり得る。末端部位の基 2 は、s i R N A 末端との化学的コンジュゲーションのための反応部位である。

【図 1 0】リガンドコンジュゲーション部位の連結の選択の一例を示す。リガンドコンジュゲーション R_L の結合は、一価の G a l N A c 分子、二価の G a l N A c 分子及び三価の G a l N A c 分子に基づく選択であり得る。コンジュゲーション部位は、マレイミド／チオールであり得るか、又は図 9 に示される基 2 のリストから選択され得る。

【図 1 1】s i R N A - P D o V - リガンド化合物 1 の構築の代表例を示す。

【図 1 2】s i R N A - P D o V - リガンド化合物 2 の構築の代表例を示す。

【図 1 3】s i R N A - P D o V - リガンド化合物 3 の構築の代表例を示す。

【図 1 4】いくつかの可能な s i R N A 配列及び構造修飾のリストを示す。

【図 1 5 A】m T T R 1 - P D o V 3 - G a l N A c 3 のコンジュゲートの i n v i t r o 段階希釈データを示す。

【図 1 5 B】m T T R 1 - P D o V 2 - G a l N A c 3 コンジュゲートの i n v i t r o での段階希釈データを示す。

【図 1 5 C】m T T R 2 - G a l N A c 3 ポジティブコントロールコンジュゲートの段階希釈データを示す。

【図 1 5 D】A h a 1 - G a l N A c 3 ポジティブコントロールコンジュゲートの i n v i t r o での段階希釈データを示す。

【発明を実施するための形態】

【0 0 3 2】

定義：

本明細書で使用される場合、「オリゴヌクレオチド」は、1 0 0 ヌクレオチド未満（例えば、5 0 ヌクレオチド未満、3 0 ヌクレオチド未満、又は 2 5 ヌクレオチド未満）の長さを有する化学修飾又は非修飾核酸分子（RNA 又は DNA）を指す。それは、s i R N A、マイクロ RNA、抗マイクロ RNA、マイクロ RNA 模倣物、d s R N A、s s R N A、アプタマー、三重鎖形成オリゴヌクレオチド、アプタマーであり得る。一実施形態では、オリゴヌクレオチドは RNA i 剤である。

【0 0 3 3】

本明細書で使用される場合、「s i R N A 分子」又は「RNA i 分子」は、分子が細胞に導入された後に、細胞内の遺伝子の発現に干渉する二重鎖オリゴヌクレオチド、すなわち短い二本鎖ポリヌクレオチドである。例えば、s i R N A 分子は、一本鎖標的 RNA 分子の相補的ヌクレオチド配列を標的として結合する。慣例により、s i R N A 分子が特定のヌクレオチド配列によって同定される場合、配列は二重鎖分子のセンス鎖を指す。分子を含むリボヌクレオチドの 1 つ又は複数は、当該技術分野で公知の技術によって化学的に修飾することができる。その個々のヌクレオチドの 1 つ以上のレベルで修飾されることに加えて、オリゴヌクレオチドの骨格を修飾することができる。さらなる修飾には、s i R N A 分子へのコンジュゲーションのための小分子（例えば糖分子）、アミノ酸、ペプチド、コレステロール、及び他の大きな分子の使用が含まれる。

【0 0 3 4】

「ペプチドドッキング賦形剤」（P D o V）は、1 つ以上の標的化リガンド及び 1 つ以上のオリゴヌクレオチドとのコンジュゲーションを可能にする複数のコンジュゲーション部位を含む定義された配列の合成ペプチドを指す。それは、細胞へのコンジュゲート P D o V の送達後に細胞のエンドソームの内部に捕捉されたオリゴヌクレオチドペイロードの放出を促進する、疎水性鎖又は pH 感受性残留物などの官能基を含有する。

【0 0 3 5】

治療上の利益が増強された干渉 RNA 分子を使用する組成物及び方法が提供される。組成物及び方法は、標的化リガンドを化合物に連結することによって、s i R N A 分子など

10

20

30

40

50

の治療化合物の対象への標的化された細胞／組織送達を可能にする。対象は、動物又はヒトであり得る。

【0036】

いくつかの実施形態において、本明細書中に記載されるような標的化リガンドは、直交型バイオコンジュゲーション法によってエンドソーム放出ペプチドにコンジュゲート化され得る。標的化リガンドは、特に、肝臓などの選択された標的へのRNAi分子の送達を改善するために使用され得る。他の実施形態では、標的化リガンドは、RNAi分子の他の組織、例えば皮膚や脳への標的化された送達を可能にする。

【0037】

本明細書に記載の標的化リガンドは、1つ以上の標的化部分及び1つ以上のリンカーを含み得る。リンカーは、クリックケミストリー、チオール／マレイミドケミストリー、又は他の生体直交ケミストリーによってsiRNA及び標的化リガンドと共有結合的にコンジュゲートされる。リンカーは有利には親水性であり、例えば、十分に安定的であり、1つ又は複数の標的化部分間の潜在的な相互作用を制限する水溶性可撓性ポリエチレングリコール(PEG)であり得る。PEGは、臨床研究から安全であり、治療目的に適合することが確認されている。いくつかの実施形態では、リンカーは、エステル結合が酵素的又は加水分解的に不安定である、定義された分子量のポリ(L-ラクチド)n(n=5~20)であり得る。

【0038】

標的化リガンドは、1つ以上の標的化部分、リンカー反応性接続部分を有する1つ以上の基を含み得る。それらは、クリックケミストリー、チオール／マレイミドケミストリー、又は他の生体直交ケミストリーによってsiRNA及び標的化リガンドと共有結合的にコンジュゲートされる。リンカー反応性接続部分は、チオール-マレイミド結合、アルキンとアジドとの反応によって形成されるトリアゾール結合、及びアミン-NHSエステル結合から形成されるアミドであってもよいが、これらに限定されない。これらの結合の各々は、標的化リガンドと治療化合物の両方を共有結合的に連結させるのに適している。

【0039】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される標的化リガンドは、1つ以上の標的化部分、反応性接続部分を有する1つ以上のリンカーを含む。リンカーは、チオール部分又はマレイミド部分、カルボン酸又はアミン、アジド基、アルキン基などを含む。

【0040】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される標的化特異的RNA化合物は、RNAの3'又は5'末端を介してエンドソーム放出ドッキングペプチドに直接コンジュゲートすることができる。標的化リガンド(例えば、N-アセチル-ガラクトサミン)も、適合する方法で同じドッキングペプチドとコンジュゲートされる。

【0041】

いくつかの態様では、本明細書に開示される標的化特異的RNA化合物は、例えばRNAの3'又は5'末端を介して、標的化リガンド(例えばN-アセチル-ガラクトサミン)に直接コンジュゲートすることもできる。いくつかの態様では、RNAは、3'-OMe、3'-F、又は3'-MOEなどの1つ又は複数の修飾ヌクレオチドを含み得る。いくつかの実施形態では、RNAは、RNAi剤、例えば二本鎖RNAi剤であり得る。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される標的化リガンドは、二本鎖RNAi剤のセンス鎖の5'若しくは3'末端、又は二本鎖RNAi剤のアンチセンス鎖の5'若しくは3'末端に連結される。あるいは、標的化リガンドは、二本鎖RNAi剤のセンス鎖及びアンチセンス鎖の両方の3'／3'、3'／5'又は5'／5'末端に連結されてもよい。

【0042】

標的化リガンドは、例えば、二本鎖RNAi剤のセンス鎖の3'又は5'末端のリン酸基、ホスホロチオエート基又はホスホネート基を介してRNAi分子に共有結合的に結合され得る。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される標的化特異的RNA化合物は、TGFβ1又はApob100、mRNA発現阻害特異的化合物である。

10

20

30

40

50

【0043】

PDOVは、その高分子カーゴの細胞質への脱出を非毒性の様式で促進する。これにより、例えばRNAi治療薬の効果的な送達が可能になる。

【0044】

非毒性の様式で細胞質への高分子カーゴ、例えばsiRNA分子の脱出を増強するエンドソーム脱出ペプチド(PDOV)が提供される。PDOVプラットフォームの様々な例を図1～図4に示す。PDOVでは、エンドソーム脱出ペプチドは、RNA及び標的化リガンドのドッキング部位リンカー両方として作用する。複数のRNA分子を同じ構成体とコンジュゲートさせて、異なる標的mRNAに対するsiRNA分子の同時送達を達成することができ、それにより、多疾患関連遺伝子をサイレンシングするための相乗的利益をもたらす。ヒスチジン及びリジンリッチポリペプチド又は線状ヒスチジン及びリジンリッチペプチドは、RNAの送達において効果的な細胞透過性及びエンドソーム剥離剤であることが示されてきた。ペプチドはヒスチジンリッチドメインを含有し、それにおいてヒスチジン残留物のイミダゾール環はより低いpHの値(pH<約6)でプロトン化され、エンドソームの内側でプロトンスポンジとして作用し、エンドソーム脂質二重層の溶解及びRNAの放出をもたらす。PDOVのコンジュゲーション部位は、以下に、より詳細に記載される。

10

【0045】

次のいくつかのセクションでは、RNAi剤、標的化リガンド、RNAiとペプチドとの間のリンカー、リガンドとペプチドとの間のリンカー、及びエンドソーム放出ドッキングペプチドを含む各成分を詳細に考察する。

20

【0046】

RNAi剤

RNAi分子は二本鎖化合物である。例えば、二本鎖siRNAは、抗TGFβ1又は抗Apob100であり得、2'位において、例えば、2'-OC₃H₇、2'-F、若しくは2'-O-MOEで、又は5'位において、-P(O)₂=Sで、非修飾又は化学修飾され得る。他の化学修飾は当該技術分野で公知であり、例えば、RNAiの全体的な安定性及びバイオアベイラビリティを改善するためのペグ化又は脂質官能化を含み得る。

【0047】

特定の実施形態では、二本鎖siRNAは、図14の二重鎖のいずれか1つ又は複数の24、23、22、21、20、19、18、17又は16個の近接する塩基対からなる導出された二重鎖であり得る。

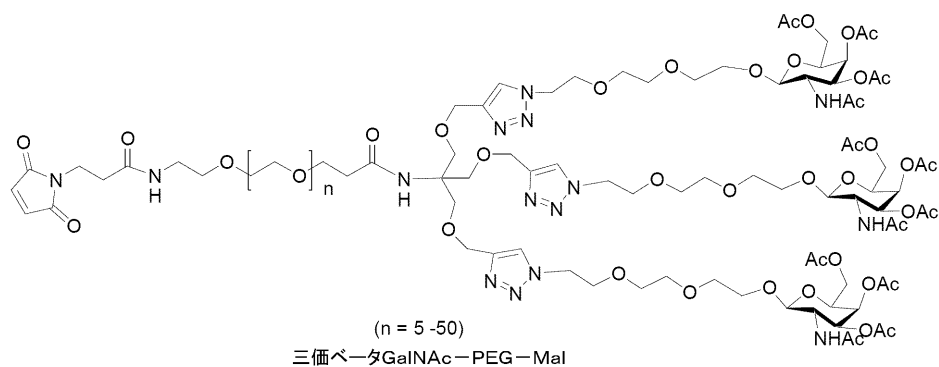
30

【0048】

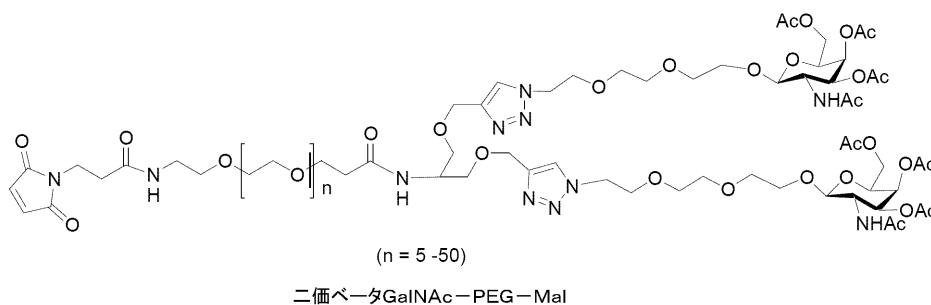
標的化リガンド

標的化リガンド部分は、例えば、N-アセチル-ガラクトサミン(GalNAc)、ガラクトース、ガラクトサミン、N-ホルマール-ガラクトサミン、N-プロピオニル-ガラクトサミン、N-ブタノイルガラクトサミン、cRGD、GLPペプチド又は他の小分子であり得る。標的化リガンドは、共有結合によってペプチドに共有結合的にカップリングする。リガンドの数は、1、2又は3であり得る。ここに開示されている標的化リガンドは、以下によって表される構造を有していた：

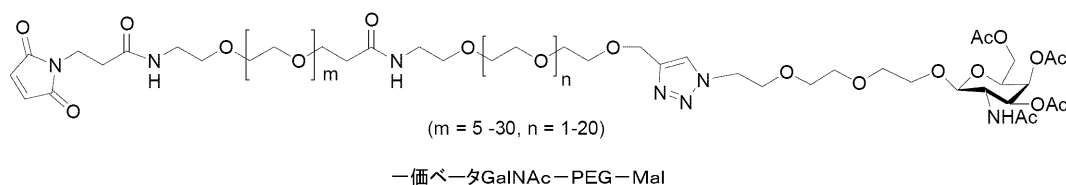
40



10



20



【0049】

RNA i とペプチドとの間のリンカー

30

リガンドコンジュゲーションRsの連結：化学基Rsは、オリゴヌクレオチドをPD o Vペプチド賦形剤とコンジュゲートさせるために使用される様々な「クリック」様反応性部分の1つであり得る。Rsは、アミン、ヒドラジン、N-ヒドロキシスクシンイミド、アジド、アルキン、カルボン酸、チオール若しくはマレイミド、又は当該技術分野で公知の他の化学反応性部分であり得る。代表的な例を図9に示す。

【0050】

コンジュゲーションR-リンカー2-s i RNAのリンカー2は、ペプチドとコンジュゲーション部位との間に配置された化学的なスペーサーであり、コンジュゲーション部位をリンカーの末端部位に結合させる。リンカー2は、脂肪族鎖若しくはポリエチレングリコール鎖、又は他の疎水性脂質若しくは親水性鎖であり得る。末端部位の基2は、s i RNA末端との化学的コンジュゲーションのための反応部位である。

40

【0051】

リガンドとペプチドとの間のリンカー

本明細書に開示される標的化リガンド及びRNA i部分はリンカー1を含み、それはs i RNA（センス鎖の3'又は5'末端）を直接接続し、リンカー3-リガンドを含む架橋が、センス鎖の3'又は5'末端によってRNA iに連結する。リンカー1の間隔は、直鎖ポリエチレングリコール、式中nは1から50のエチレングリコール単位の数であり得る、又はポリ(L-ラクチド、式中nは1から50の間のエチルエステルの反復単位の数又は100から3500の平均分子量であり得る、から選択される構造である。コンジュゲーション部位は、マレイミド／チオールであり得るか、又は図10の基2のリス

50

トから選択され得る。

【0052】

エンドソーム放出ドッキングペプチド

ペプチドドッキング賦形剤 (PD_oV) は、有利には、複数のオリゴヌクレオチド部位と共に1つのリガンドコンジュゲーション部位を有する。PD_oVは、ヒスチジン (H)、リジン (K) 並びに官能性単位 X 及び Y (式中、X 又は Y はアミノ酸、又はリンカー 1 及び図 10 に示される官能基から選択されるアミノ酸誘導体であり、 $n = 1 \sim 10$ 、 $m = 1 \sim 10$ 、 $o = 1 \sim 10$ 、 $p = 1 \sim 5$ 、及び $q = 1 \sim 5$ である) の複数の反復単位を有する一般構造体: $(H_n K_m)_o X_p Y_q$ を有するペプチド骨格を有する。PD_oV の文脈における Y は、アミノ酸チロシンを意味せず、むしろ機能性アミノ酸又はリンカーを定義することに留意されたい。HK 反復単位は、エンドソームの放出を促進することが実証されている。リジン残留物又は官能性単位 X は、リガンドのコンジュゲーションのためのドッキング部位として使用され得、Y は、異なる共有結合を介したオリゴヌクレオチドのコンジュゲーションのためのドッキング部位を提供する。図 3 は、PD_oV がどのようにコンジュゲートされ得るかの概略図を示す。例えば、部位 1 は、GalNAc などのリガンド又は他の標的化リガンドの存在下でのみ反応することができる。部位 3 は、図 10 に例示されるように、選択された条件下でのみオリゴヌクレオチド及び siRNA とコンジュゲートすることができる。

10

【0053】

あるいは、PD_oV は、3つのリガンドコンジュゲーション部位及びマルチオリゴヌクレオチド部位を有し得る (図 4 を参照のこと)。 $(H_n K_m)_o X_p Y_q$ ペプチド骨格は、ヒスチジン (H)、リジン (K) 並びに官能性単位 X 及び Y (アミノ酸又は機能性リンカー) の多重反復単位を有し、式中 $n = 1 \sim 10$ 、 $m = 1 \sim 10$ 、 $o = 1 \sim 10$ 、 $p = 1 \sim 5$ 、 $q = 1 \sim 5$ である。HK 反復単位は、良好な細胞透過能を有し、エンドソームの放出を促進することが実証されている。リジン又は様々な官能性単位 X は、リガンドのコンジュゲーションのためのドッキング部位として適合され、Y は、異なる共有結合を介したオリゴヌクレオチドのコンジュゲーションのためのドッキング部位として適合される。例えば、部位 1 は、GalNAc 又は他の標的化リガンドなどのリガンドの存在下でのみ反応することができる。部位 3 は、特定の条件下でのみオリゴヌクレオチド及び siRNA とコンジュゲートすることができる。図 4 を参照されたい。

20

30

【0054】

構造設計において、PD_oV 構成体は、複数のコンジュゲーション部位 X 及び Y が挿入されたエンドソーム放出ペプチドである。部位 X は、標的化リガンドをコンジュゲートするために使用され、部位 Y は、複数のオリゴヌクレオチド又は核酸をコンジュゲートするために使用される。PD_oV のための構成体のいくつかの例を図 5 に示しており、式中、A はペプチド配列 K、R、H、HH、HHH、HHHH、HHK、HHHK 又は他の短いペプチドを表すし、B は、ペプチド配列 K、R、H、HH、HHH、HHHH、HHK、HHHK、又は他の短いペプチド若しくは他のアミノ酸若しくは組み合わせを表し、D は、オリゴヌクレオチド、siRNA、mRNA 又はアプタマーを表し、RL はリガンドを表し、RS は、オリゴヌクレオチドに対するリンカーを表す。いくつかの実施形態では、ペプチドは、5 ~ 15 アミノ酸を含む。

40

【0055】

いくつかの実施形態では、PD_oV は、図 6 に示すような構造を有する。

【実施例】

【0056】

実施例 1

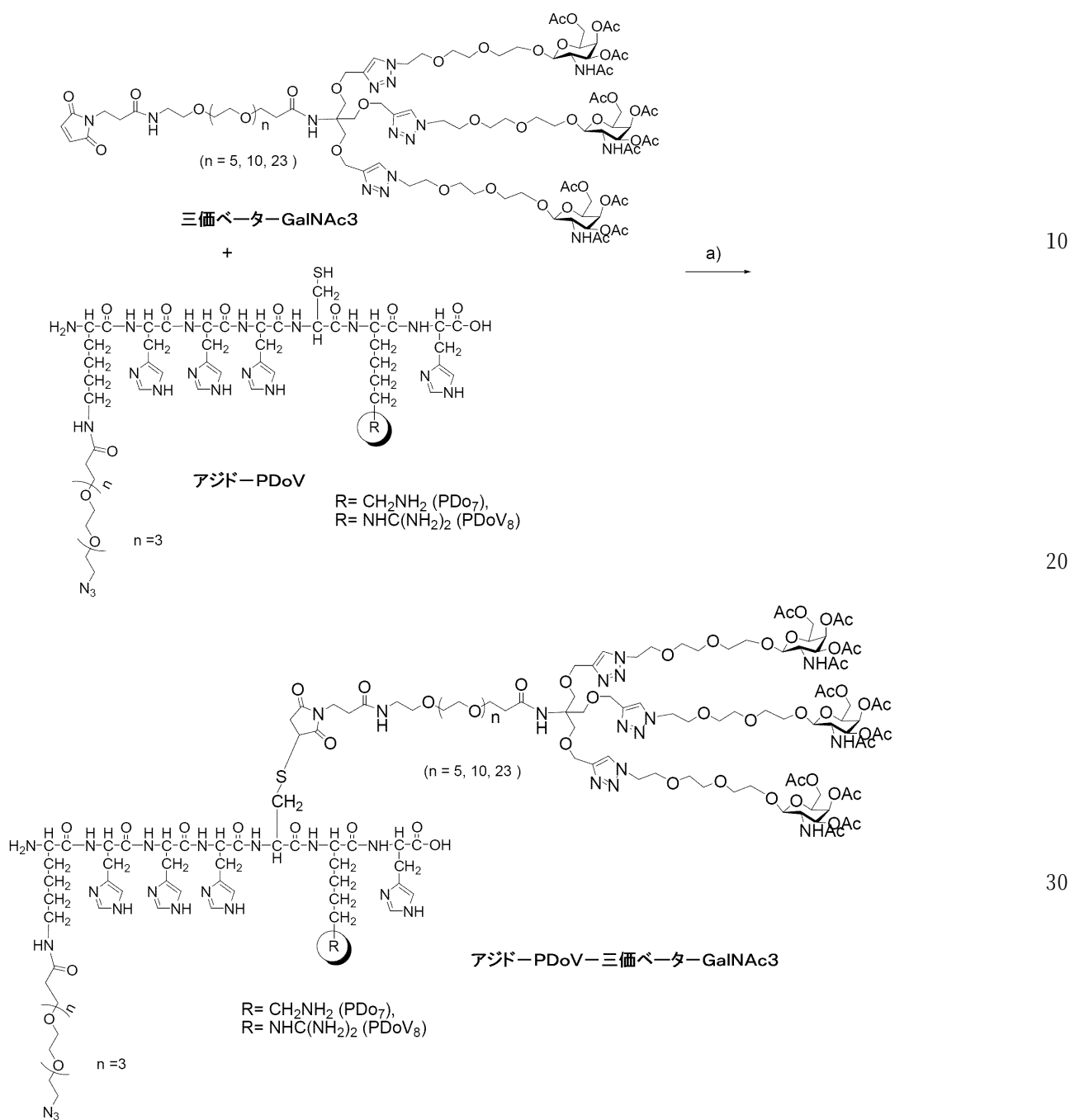
siRNA-PD_oV-リガンド化合物の構築の模式的代表例。siRNA 分子の 1 つ又は 2 つは、PD_oV ペプチドとコンジュゲートすることができる。

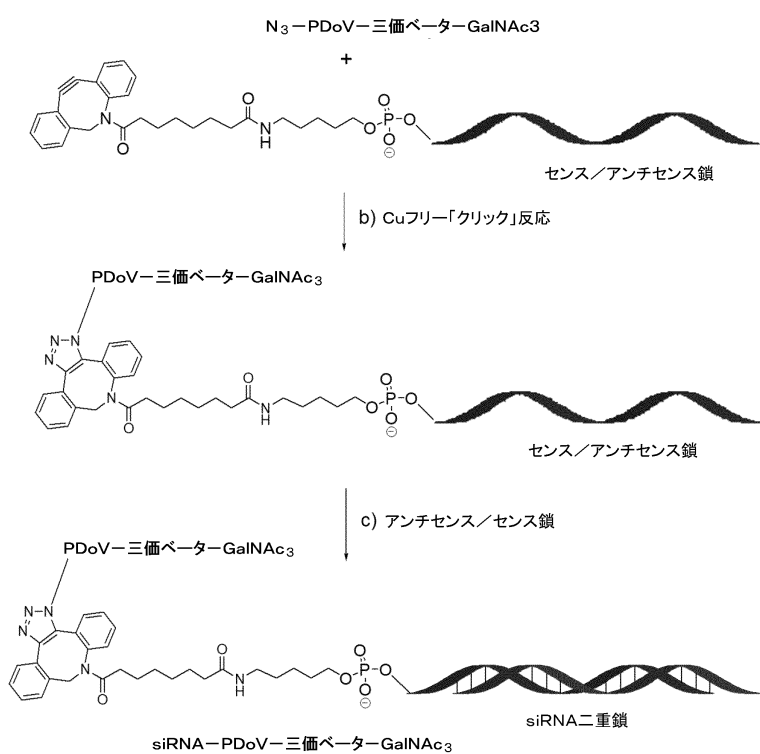
工程 1. ペプチドアジド修飾:

50



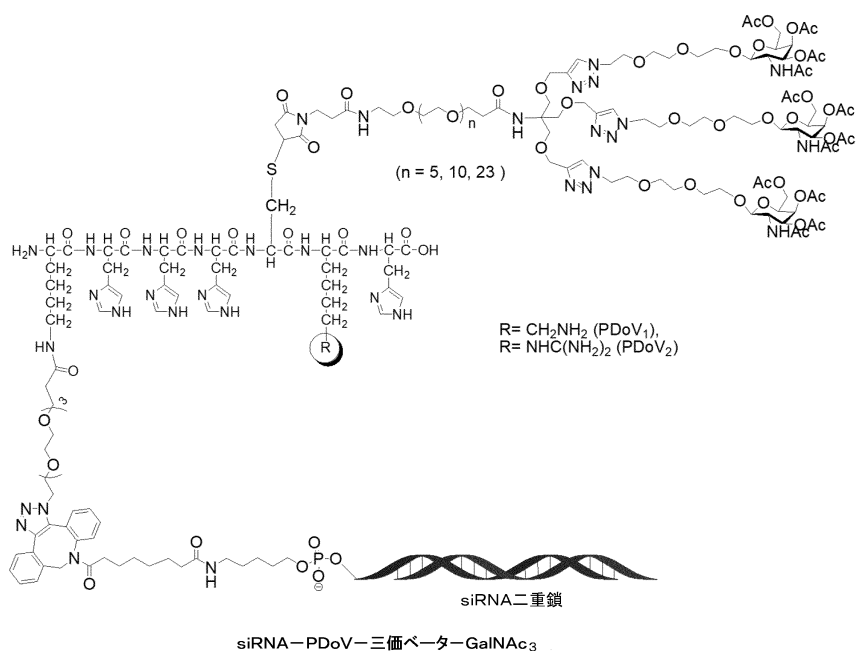
工程 2 . 標的化リガンドとペプチドとのコンジュゲーション





10

20



30

40

【0057】

実施例 2

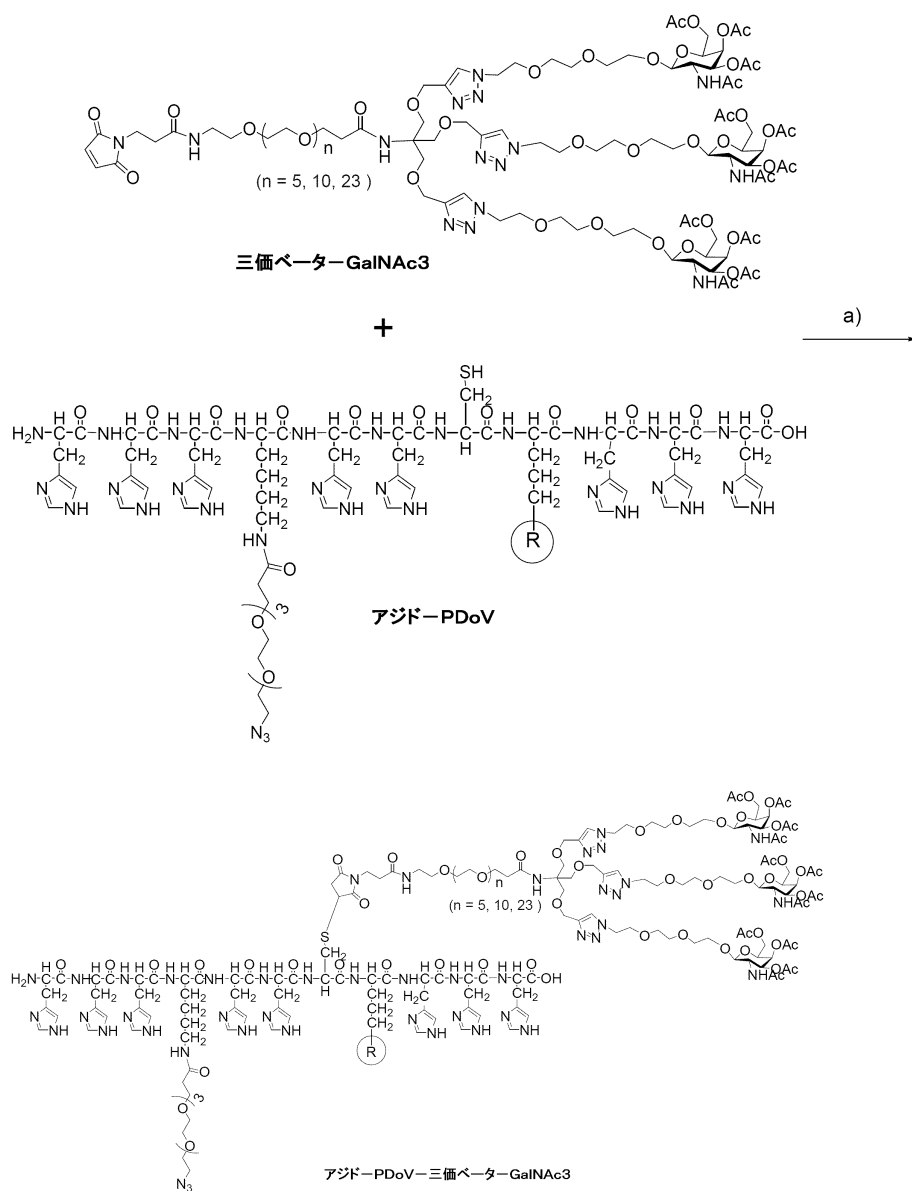
siRNA-PDoV-リガンド化合物の構築の模式的代表例。

工程 1. ペプチドアジド修飾

50



工程 2 . 標的化リガンドとペプチドのコンジュゲーション



10

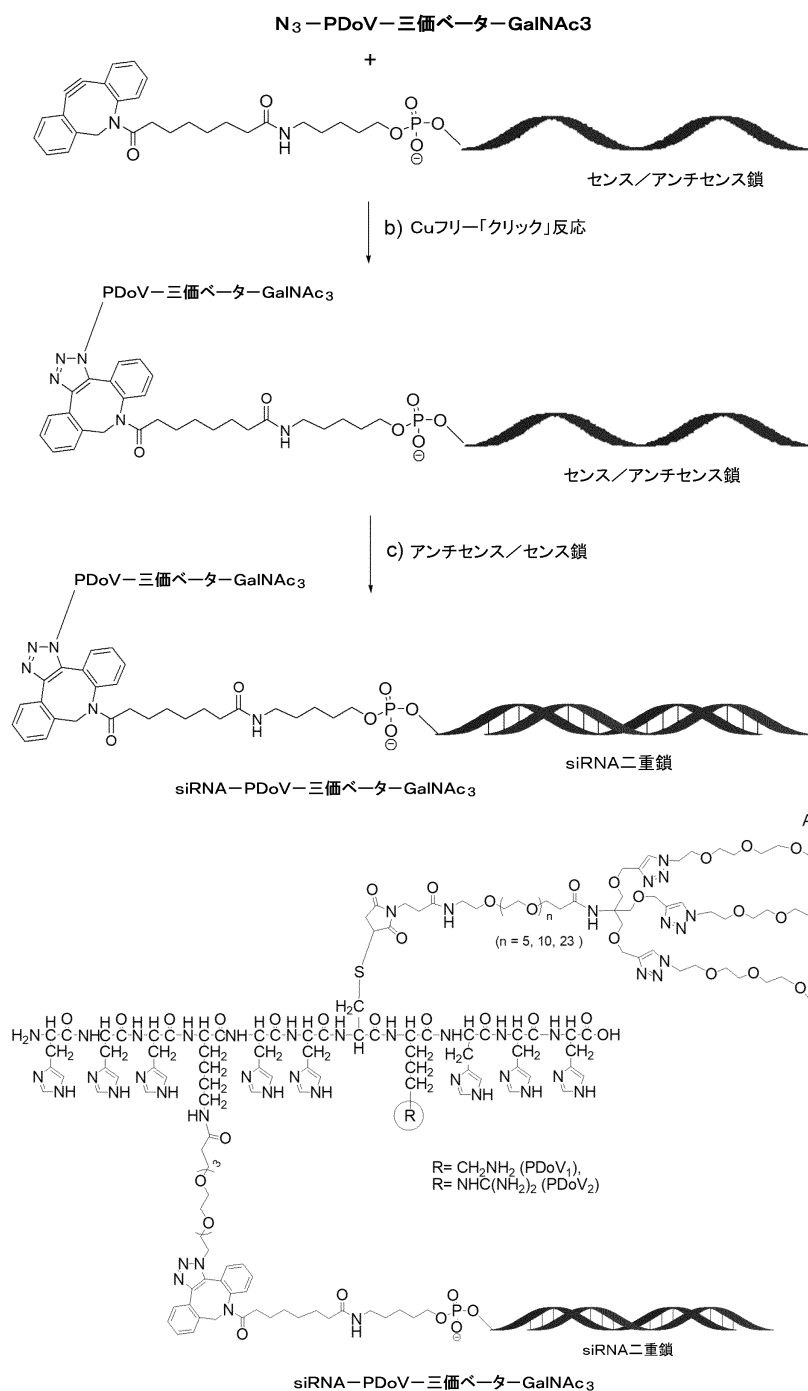
20

30

40

工程 3 及び 工程 4 . アジド-PDOV-GalNAc3 とのオリゴヌクレオチドコンジュゲーション

50



10

20

30

40

【0058】

実施例 3

アジド-PDoV1 (1) の合成及び特徴づけ：

ペプチドアジド-PDoV1 (配列 HHH {LYS (PEG4-N3)} HHCKHH) を、短縮されたサービスにより、配列の標準アミノ酸及びリジン-PEG4-N3 修飾剤を使用して、自動ペプチド合成装置によって合成した。ペプチドを C-18 逆相 HPLC によって精製し、質量分析及び ¹H NMR によって特徴を明らかにした。分析データはすべて、予想される構造と一致していた。

【0059】

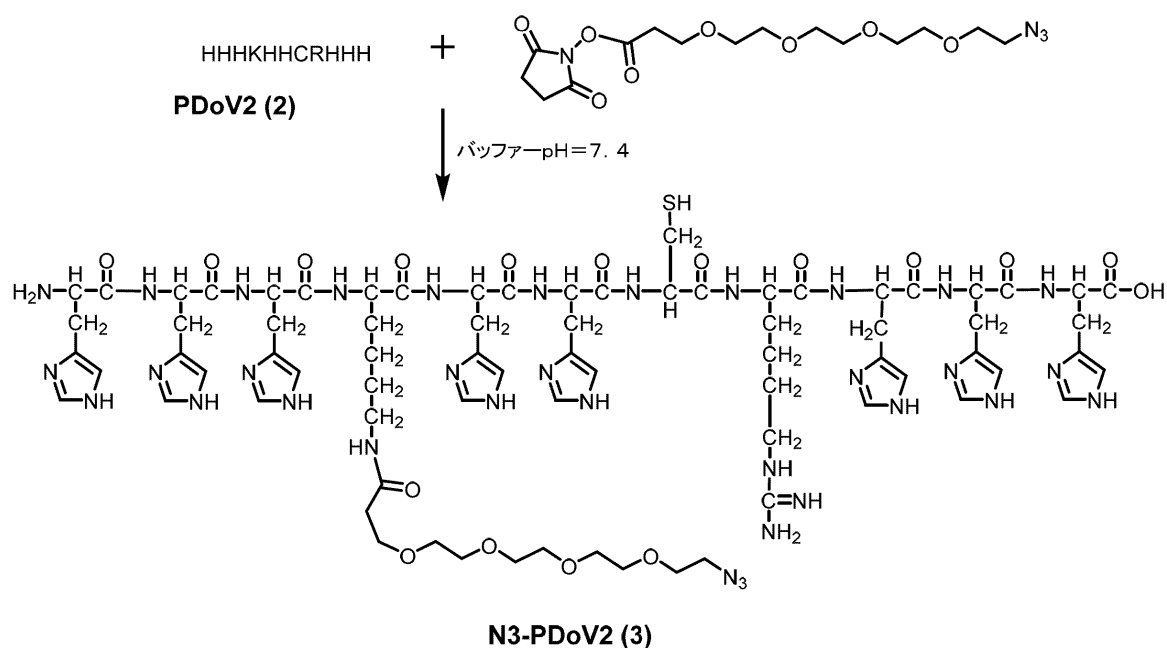
50

実施例 4

P D o V 2 及びアジド-P D o V 2 の合成：

P D o V 2 (2) 、配列 H H H K H H C R H H H の合成。ペプチド P D o V 2 (H H H K H H C R H H H) を、短縮されたサービスにより、配列の標準アミノ酸を使用して、自動ペプチド合成装置によって合成した。ペプチドを C - 1 8 逆相 H P L C によって精製し、質量分析によって特徴を明らかにした。分析データはすべて、予想される構造と一致していた。

アジド-P D o V 2 (3) の合成：



10

20

【0060】

アジドリンカーのエステル活性化カルボン酸と P D o V 2 (2) のリジン側鎖の第一級アミンとの間のアミド結合形成を介して、アジドリンカーをペプチドドッキング賦形剤 2 (P D o V 2) に結合させて、化合物 3 を形成した。P D o V 2 ペプチド H H H K H H C R H H H (4 2 m g 、 0 . 0 2 8 0 m m o l) を 1 . 0 m L の D M F に懸濁した。トリエチルアミン (3 9 μ L 、 1 0 当量) を添加し、混合物を室温で 2 0 分間攪拌した。アジド-P e g 4 - N H S エステル (5 4 m g 、 0 . 1 4 0 m m o l 、 5 当量) を含む 2 0 μ L の D M F の溶液を、反応混合物に添加した。反応混合物は 3 0 分間にわたってゆっくりと透明な溶液に変化し、室温で 1 6 時間さらに攪拌した。反応混合物の T L C プロファイル

30

40

【0061】

反応混合物を水 (2 0 0 μ L) でクエンチし、ロータリーエバポレーターを使用して濃縮し、粗物質を、10～90%のバッファーB (アセトニトリル中0.1%のTFA)の増加勾配を使用する半分取R P - C 1 8 カラムでの H P L C を通して、精製した。アジド-P D o V 2 (2) を 1 0 . 5 ～ 1 1 . 5 分の保持時間で主要生成物として単離した。試料の画分を凍結乾燥させ、化合物 2 の透明な残留油 (4 4 m g 、 収率 8 8 %) を得た。そのプロトン及びMS分析は以下の通りであった：¹H NMR (4 0 0 M H z 、 D 2 O 、 図 2) δ 8 . 7 4 (b r d d 、 8 H) 及び δ 7 . 3 5 (b r d d 、 8 H) は、 δ 6 . 0 0 p p m を超えるペプチドでの 8 のヒスチジントラゾールに関連する芳香族水素と一致する。 δ 4 . 7 5 ～ 4 . 3 0 (b r d t 、 1 1 H) の全 1 1 アミノ酸のアルファ炭素に

50

おけるメチン水素、 δ 3.90～3.75 (m、100H) でのポリエチレン基に結合したエチレン水素、 δ 3.6～2.75 (m、53H) 及び δ 1.8～1.3 (m、12H) のエチレン水素は、リジン、アルギニン及びシステインの側鎖プロトンと会合している。合計で104の水素が非芳香族領域において観察され、41の水素が過剰である。これらの余分な水素は、2個のアジド-PEG4基と等価である。NMRデータはESI-MSデータと一致している：予想の m/z 1775.9 Da 及び観測された m/z 2323.5 Da (図3)。観測された質量電荷比は、予想した値よりも547.6 Da 単位大きい。余分な質量単位は、2つのアジドリンカーの質量と一致する。

【0062】

実施例 5

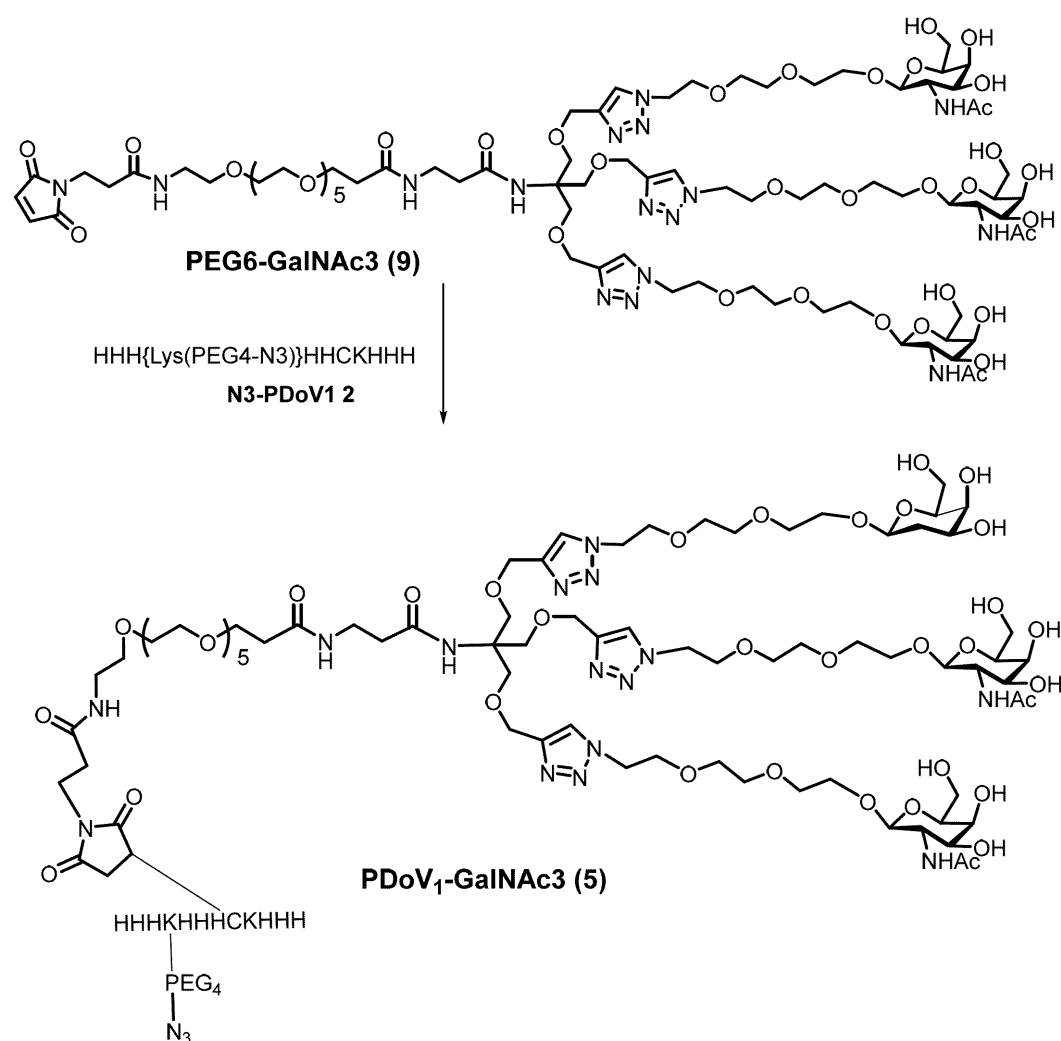
アジド-PDoV3 ペプチド (4) の合成及び特徴づけ

ペプチドアジド-PDoV3 ({ L Y S (P E G 4 - N 3) } H H H C H H) を、配列の標準アミノ酸+リジン-PEG4-N3修飾剤を使用する固相自動合成を使用して合成した。ペプチドをC-18逆相HPLCによって精製し、 H^1 NMR及び質量分析によって特徴を明らかにした。分析データはすべて、予想される構造と一致していた。

【0063】

実施例 6

PDoV1-GalNAc3 (5) の合成及び特徴づけ



スキーム1：PDoV1-GalNAc3 (5) の合成

【0064】

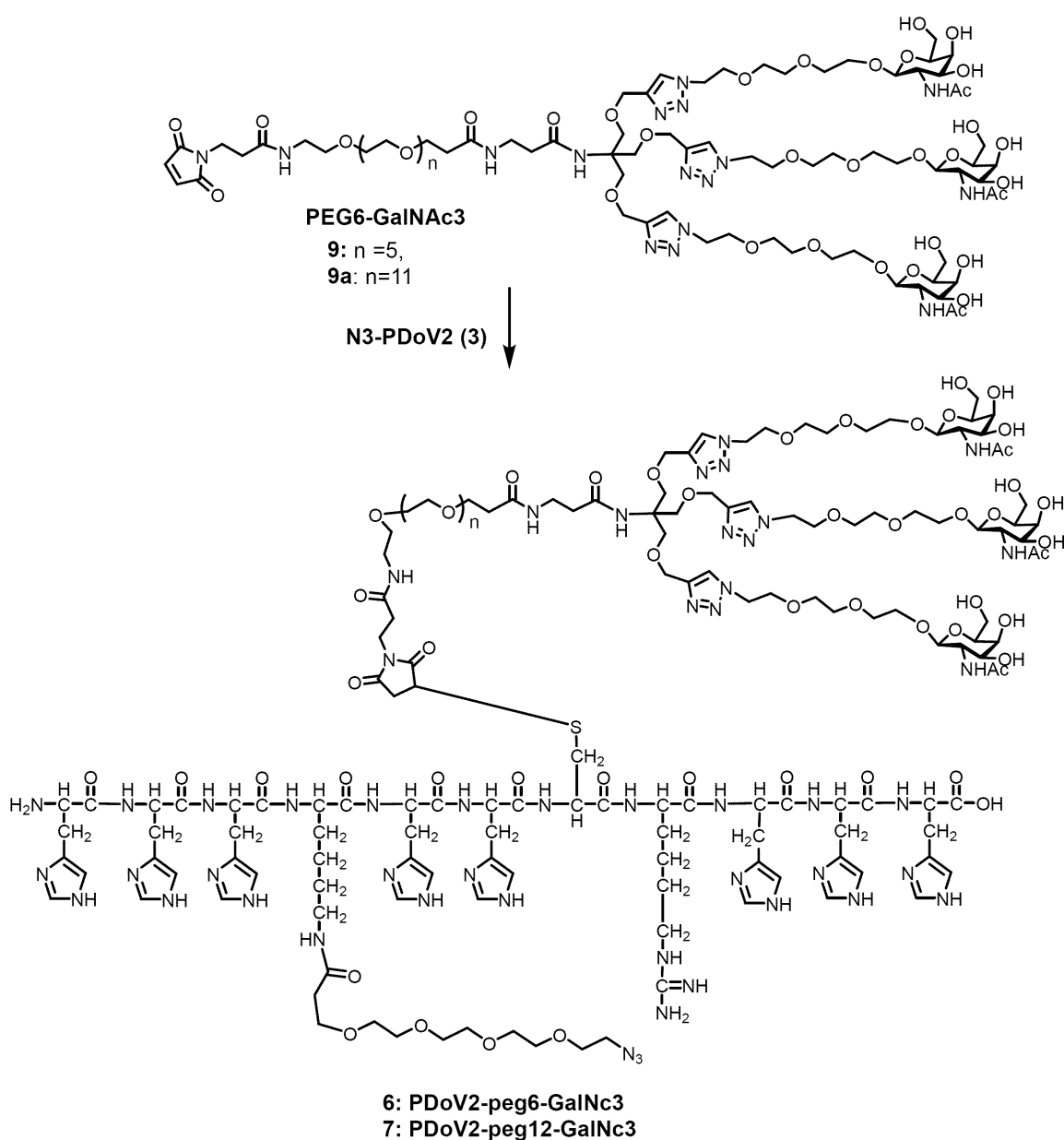
乾燥DMF (400 μ L) のPEG6-GalNAc3 (9) (3.0 mg、1.56 μ mol) を、リン酸バッファー (1 mL、pH=7.4) のN3-PDoV12 (3.54 mg、2.03 μ mol) の溶液に添加した。得られた混合物を窒素下で、25℃にて一晩攪拌した。溶媒を減圧下で除去した後、試料を脱塩し、PD-10カラムによって精製して、純粋な生成物PDoV1-GalNAc35 (5.1 mg、白色固体、収率90%) を得た。生成物を、逆相C18カラム、溶媒0.1%のTFA水及び0.1%アセトニトリルによる勾配溶出を使用してHPLCによって分析した。保持時間は R_t =4.877分、純度>90%。マスペクトル分析 (ESI、陽性) : C154H240N48O55Sの計算値3673.7、実測値3674.8。

10

【0065】

実施例7

PDoV2-GalNAc36及び7の合成及び特徴づけ



20

30

40

【0066】

PDoV2-Peg6-GalNAc3 (化合物6) の調製：求核種である化合物2 (49.8mg、0.0243mmol) をpH7.4の脱気させたPBSバッファー1.0mLに溶解した。三価GalNAcリガンド(9) (30.8mg、0.0160mmol) を溶解し、400μLの乾燥DMFに送達した。反応混合物を乾燥アルゴン下で再び脱気し、室温で一晩攪拌した。反応混合物を水(100μL)でクエンチし、Glen Researchが推奨するプロトコールに従って1.0μmolのセファデックスナップカラムを通して脱塩した。溶出剤を凍結乾燥し、粗物質を、10~90%のバッファーB (アセトニトリル及び水における0.1%のTFA (図7) の勾配を増加させながら、半分取C18逆相カラムを介してHPLCで溶出した。生成物は4.0分の保持時間を持し、油(39mg、収率60%)として単離した。修飾されたオリゴの質量分析により、PDoV2-peg6-GalNAc3構成体の合成が成功したことが確認された。

10

【0067】

PDoV2-Peg12-GalNAc3 (化合物7) の調製：化合物7アジド-PDoV2 (4.9mg、2.74μmol) を1.0mLの脱気させたPBSバッファーpH7.4に溶解した。GalNAcリガンド(3.0mg、1.37μmol) を溶解し、400μLの乾燥DMFに送達した。反応混合物を乾燥窒素下で再び脱気し、室温で一晩攪拌した。反応混合物を水(100μL)でクエンチし、Glen Researchが推奨するプロトコールに従って、1.0μmolのセファデックスナップカラムを通して脱塩した。溶出剤を凍結乾燥し、粗物質を、10~90%のバッファーB (アセトニトリル及び水における0.1%のTFA (図4) の勾配を増加させながら、半分取C18逆相カラムを介してHPLCで溶出した。生成物は主生成物として排他的に形成され、保持時間は4.2分であり、白色粉末として単離された(4.4mg、収率81%)。プロトンNMR及びMS分析：HNMR (400MHz、D₂O、) δ7.94 (s、3H、トリアゾール)、δ8.57-δ7.19 (m、18H、8ヒスチジン芳香族)、δ4.75-4.30 (m、14H、アミノ酸)、δ4.5 (d、3H、ガラクトース)、δ2.05 (s、9H)、NMRデータはESI-MSデータと一致している。ESI-MS (正モード、m/z) C₁₆H₂₆N₅O₆Sについて計算値3968.2、観測値は3968.2。

20

【0068】

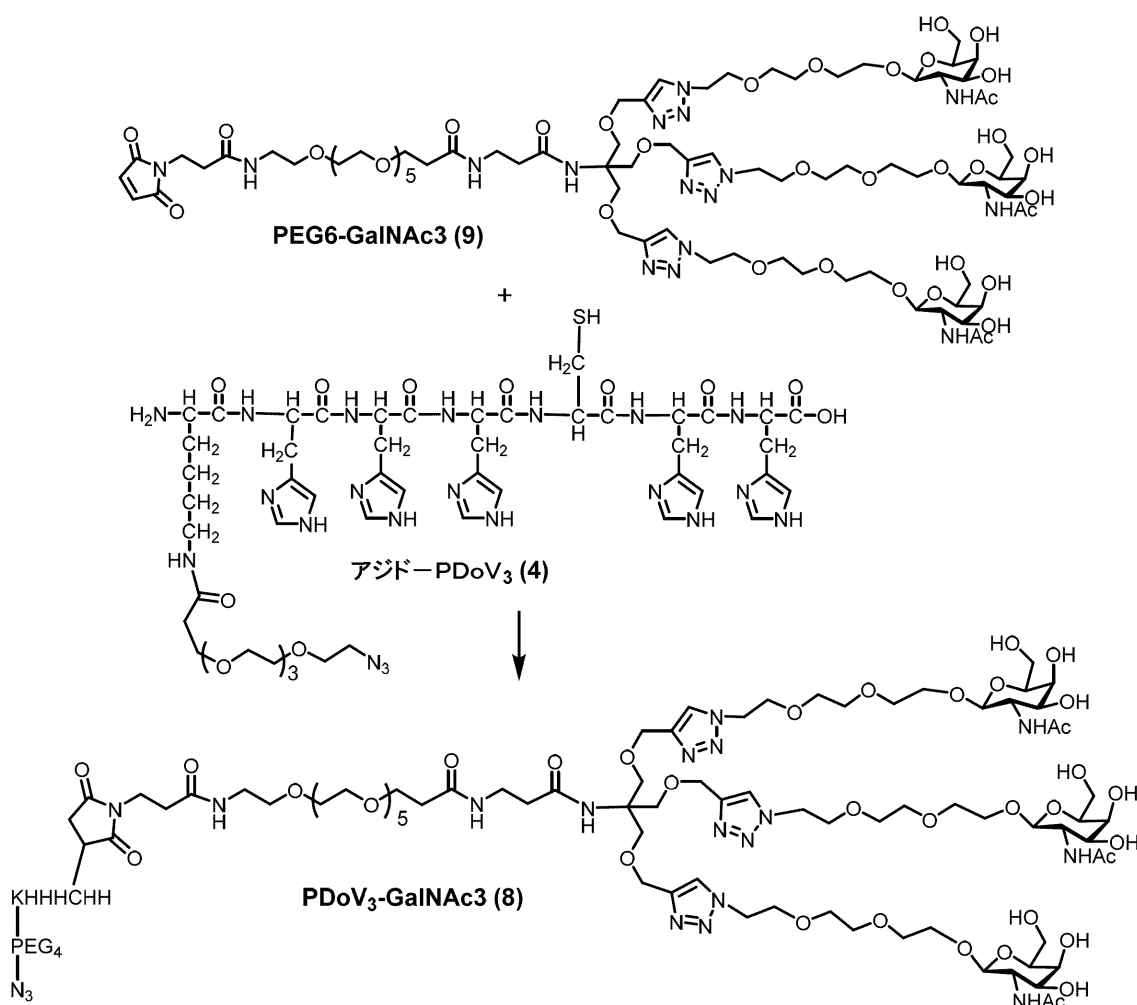
30

実施例8

PDoV3-GalNAc3 (8) の合成

40

50



スキーム3：PDoV3-GalNAc3 (8) の合成

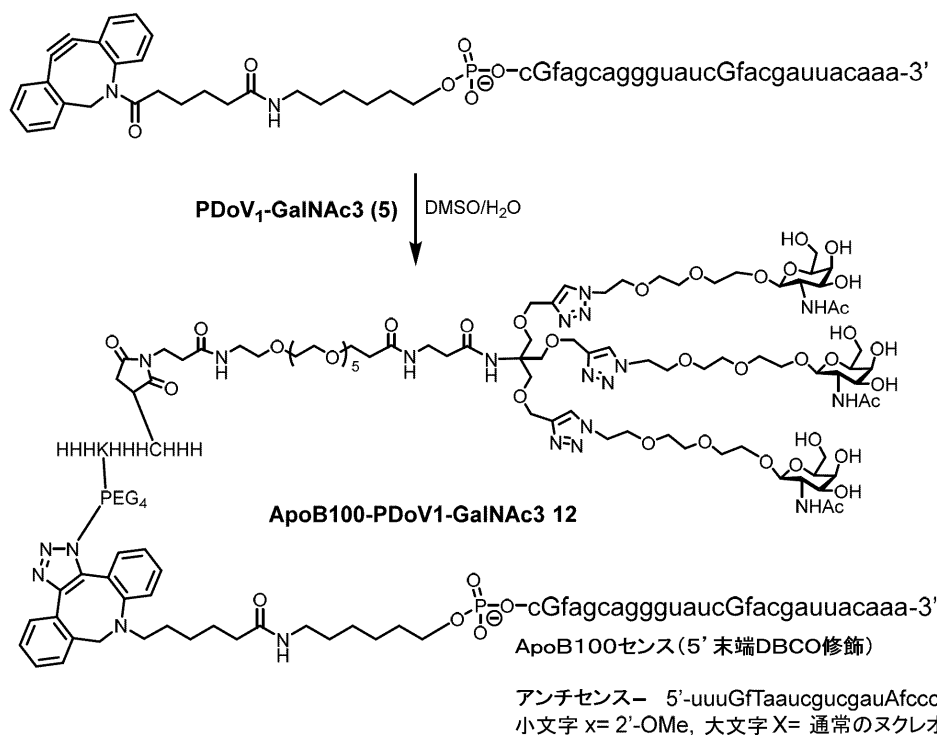
【0069】

PDoV3-GalNAc3 (化合物8) の合成：DMF (1.5 mL) のアジド-PDoV3 化合物4 (47.0 mg、38.9 μmol) を、窒素下のリン酸バッファー (4 mL、pH 7.4) の三価GalNAc (9) (50.0 mg、25.9 μmol) の混合物に、25℃で添加した。得られた反応混合物を25℃で12時間攪拌した。GalNAc 9が完全に消費されるまで、HPLCによって反応をモニターした。溶媒を凍結乾燥によって除去し、粗物質をゲル浸透カラムクロマトグラフPD-10カラムによって精製して、純粋な生成物PDoV3-GalNAc3 化合物8 (70 mg、収率86.4%) を得た。HPLCは、逆相C-18カラムで、水における0.1%のTFAの溶媒、及びアセトニトリルにおける0.1%のTFAの溶媒の勾配溶出によって、 $R_t = 5.038$ 分で行った。MS (ESI、陽性モード)、正確な質量：式に対して3134.45、 $C_{130}H_{207}N_{37}O_{51}S$ 、実測値：3136.35。分析データはすべて、予想される構造と一致していた。

【0070】

実施例9

コントロール3-GalNAc3 (11) の合成



10

20

30

40

50

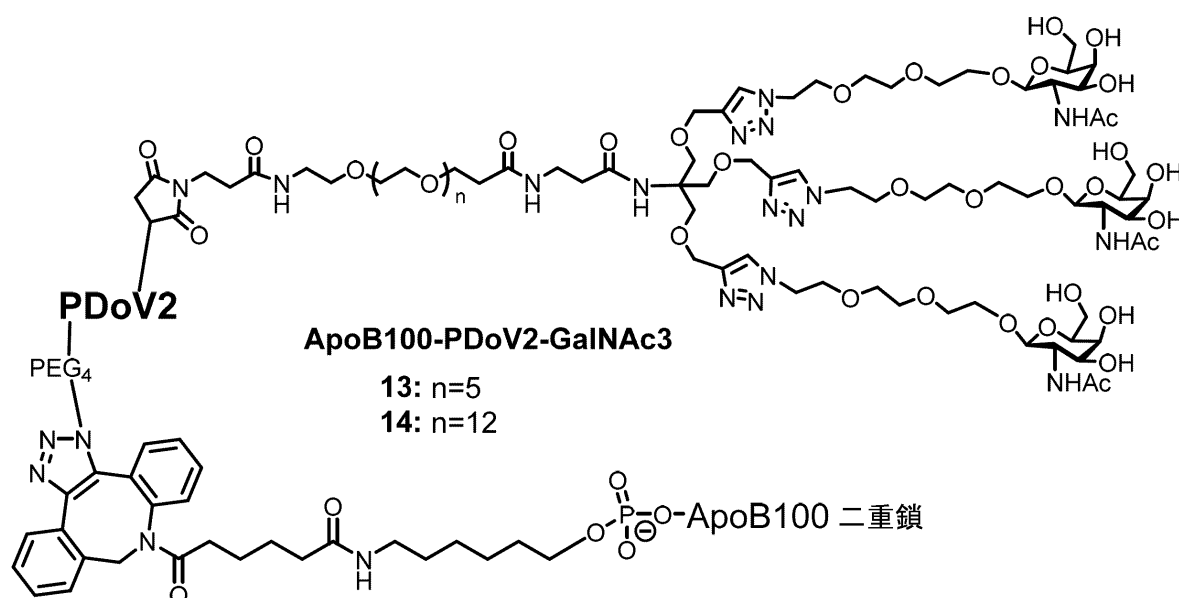
スキーム5. ApoB100-PDoV1-GalNAc3 (12) の合成 【0073】

DMF (95 μ L) におけるPDoV1-GalNAc3 5 (381 μ g、0.104 μ mol) を、RNAseを含まない水 (250 μ L) のApoB100-センス5'-DBCO (500 μ g、0.069 μ mol) の溶液に加えた。得られた混合物を25℃で2時間攪拌した。溶媒を減圧下で除去した後、粗物質をGlen Gel Pakカラムクロマトグラフによって精製して、純粋な生成物センスApoB100-PDoV1-GalNAc3化合物12 (0.66 mg、収率88%) を得た。HPLCは、pH=11、Rt=13.015分、純度>85%のリン酸バッファーを使用してPA200イオン交換カラムで行った。MS (ESI、陽性モード) 式：C₃₈₈H₅₁₀N₁₂₅O₂₀₈P₂₂Sについて計算値10911.66。実測値：10929.3 [M+H₂O]。ApoB100アンチセンス鎖で1:1アニーリング (95℃で5分間、約1℃/分で室温まで冷却した後、-20℃で保存) を行った後、最終的なコンジュゲート二重鎖ApoB100-PDoV1-GalNAc3 (12) を得た。色素Alex-647で標識されたApoB100-PDoV1-GalNAc3を、ApoB100アンチセンスを色素標識アンチセンスApoB100-Alexa647 (5'-uuuGfTaaucgucgauAfcccgucgucg-Alexia647-3') に置き換えることによって、調製した。生成物をHPLC及びMSによって特徴を明らかにした。分析データはすべて、予想される構造と一致していた。

【0074】

実施例11

ApoB100-PDoV2-GalNAc3の合成及び特徴づけ



10

PDoV2-GalNAc (6又は7、0.0341 μmol 、1.5当量)とAPOB100-SS-5' C6NHS (DBCO) (0.0227 μmol)とを反応させることにより、ApoB100-PDoV2-GalNAc3 13を、ApoB100-PDoV1-GalNAc3 12と同様の方法で調製した。アジド-PDoV2-GalNAcを、最初にDMSO150 μL あたり1mgのアジドの比率でDMSOに溶解した。次いで、得られたアジド溶液を、100 μL のRNase非含有水において100Dの5'-DBCO標識オリゴに添加した。次いで、反応溶液混合物を室温で3~4時間インキュベートした。次いで、コンジュゲートされたオリゴをGlen Gel-Pak (商標) 脱塩カラムで脱塩して、有機溶媒及び任意の非コンジュゲートのペプチドを除去した。例として、PDoV2-PEG12-GalNAc7が反応物質であったとき、最終的なApoB100-PDoV2-GalNAc3 14が白色の固体として収率77%で得られた。HPLCは、pH=11、 $R_t=12.077$ 分、純度>85%のリン酸バッファーを使用して、PA200イオン交換カラムで行った。MS (ESI、陽性モード)、計算値の計算11551.4、実測値: 11553.5。アンチセンスでの1:1アニーリング(95℃で5分間、約1℃/分で室温まで冷却した後、-20℃で保存)により、最終的なコンジュゲート二重鎖ApoB100-PDoV2-GalNAc3 (14)が得られた。

20

30

【0075】

色素Alexa-647標識ApoB100-PDoV1-GalNAc3は、ApoB100アンチセンスを色素標識アンチセンスApoB100-Alexa647 (5'-uuuGfTaaucgucgauAfccugcucg-Alexia 647-3')で置換することによって調製した。生成物をHPLC及びMSによって特徴を明らかにした。分析データはすべて、予想される構造と一致していた。

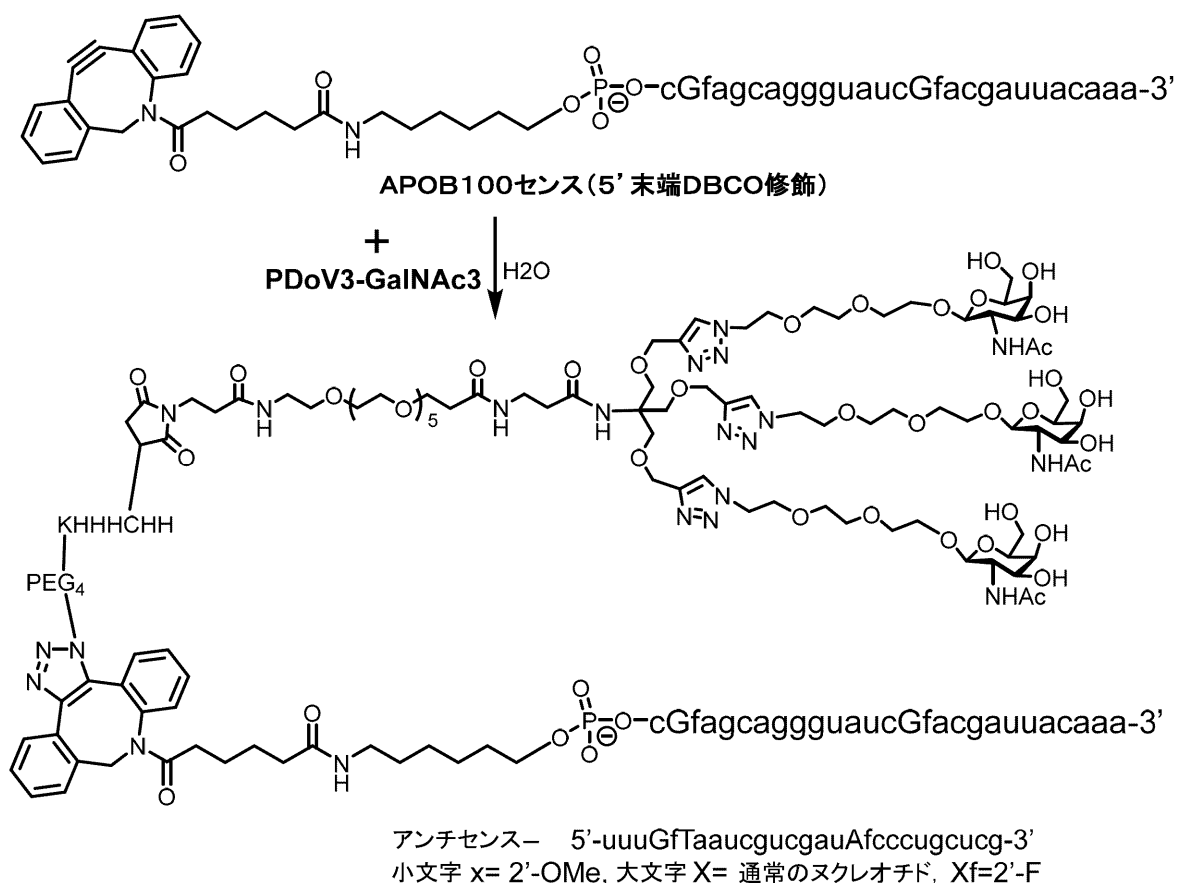
40

【0076】

実施例12

ApoB100-PDoV3-GalNAc3 15の合成及び特徴づけ

50



10

20

30

40

【0077】

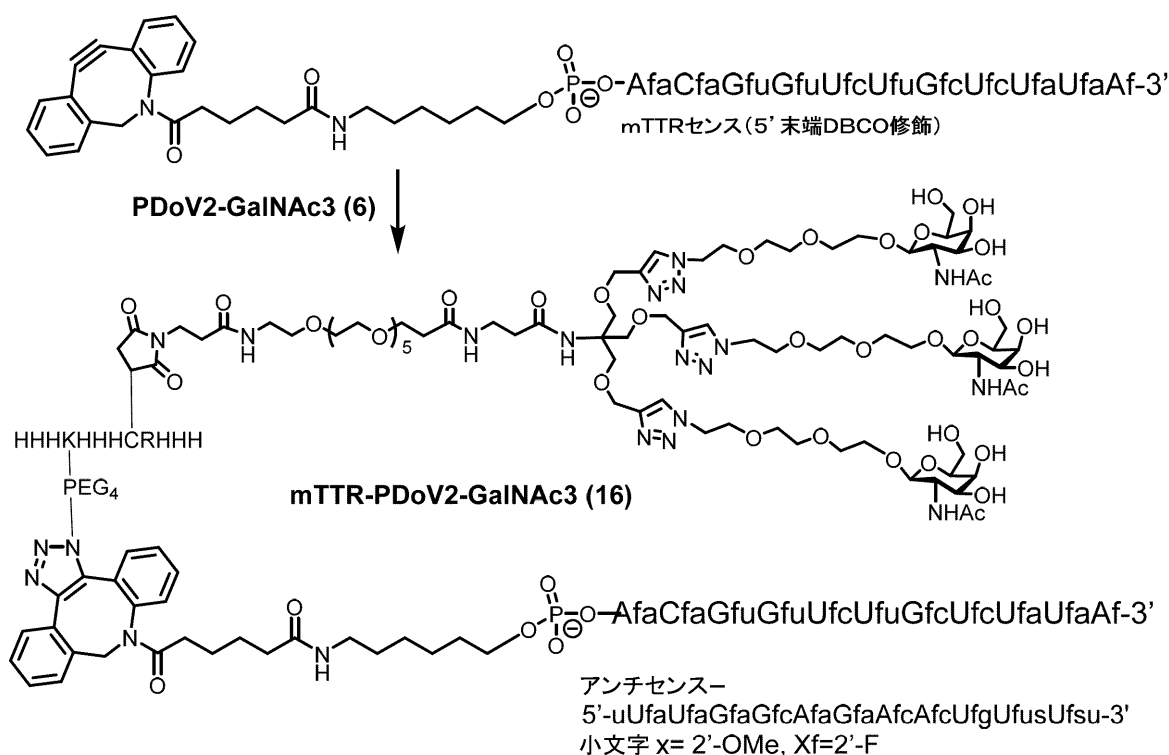
PDoV3-GalNAc3 8 (150 μg、0.148 μmol) を、RNAse を含まない水 (200 μL) の 5'-DBCO-C6HN-APOB100センス鎖 (230.7 μg、0.0319 μmol) の溶液に加えた。混合物を 25℃で3時間攪拌した。溶媒を凍結乾燥によって除去した後、粗物質を Glen Gel Pak カラムによって精製して、純粋な生成物センス ApoB100-PDoV3-GalNAc3 化合物 15 (298 μg、収率90%) を得た。HPLC は、pH=11、Rt=12.002 分、純度>89% のリン酸バッファーを使用して PA200 イオン交換カラムで行った。アンチセンスでの 1:1 アニリング (95℃で5分間、約1℃/分で室温まで冷却、-20℃で保存) により、最終的なコンジュゲート二重鎖 ApoB100-PDoV3-GalNAc3 を得た。色素 Alexa-647 標識 ApoB100-PDoV1-GalNAc3 は、ApoB100 アンチセンスを色素標識アンチセンス ApoB100-Alexa647 (5'-uuuGfTaaucgucgauAfcccugcucg-Alexa647-3') で置換することによって調製した。生成物を HPLC 及び MS によって特徴を明らかにした。分析データはすべて、予想される構造と一致していた。

【0078】

実施例 13

mTTR1-PDoV2-GalNAc3 (16) の合成及び特徴づけ

50



10

20

30

40

50

【0079】

mTTR1-PDoV2-GalNAc3は、DMSO／水の溶媒におけるPDoV2-peg6-GalNAc6 (0.547mg、0.1374 μ mol) 及びDBCO標識mTTR1センス鎖 (0.5mg、0.0687 μ mol) を使用することによる、mTTR1-PDoV3-GalNAc3の合成と同様の手順に従って、調製した。粗物質をゲル浸透カラムクロマトグラフG25カラムによって精製して純粋な生成物を得た。収率は約78%であった。アンチセンス鎖での1：1アニーリング (95℃で5分間、約1℃／分で室温まで冷却した後、-20℃で保存) の後、最終コンジュゲート二重鎖mTTR1-PDoV2-GalNAc3 (16) を得た。

【0080】

実施例14

mTTR1-PDoV3-GalNAc3 17の合成及び特徴づけ



40

50

a 6 4 7) を *in vitro* の細胞取り込み実験で使用した。リポフェクタミン送達 A l e x a 6 4 7 標識 *siRNA* を対照として使用した。A S G P R 過剰発現の H e p G 2 細胞及び H u h 7 細胞を使用して、トランスフェクション実験における野生型細胞と比較した。5 0 0 0 の細胞を 9 6 ウェルプレートに一晩播種した。細胞を 5 0 n M の *siRNA* で 2 時間、2 4 時間及び 4 8 時間トランスフェクトした。核を H o e c h s t 色素で染色し、細胞を P B S 中の C y t a t i o n イメージングステーションで画像化した。画像を 2 0 倍の倍率で取得した。得られたデータは、A S G P R を過剰発現する H e p G 2 細胞が、過剰発現した A S G P R を欠く野生型 H e p G 2 細胞よりもはるかに大きい蛍光性に標識された物質の取り込みを示したことを示した。

【0083】

A S G P R を過剰発現する H u h 7 細胞はまた、A S G P R 受容体を過剰発現しない H u h 7 細胞と比較して増加した取り込みを示したが、標識は野生型 H e p G 2 細胞ほど強くなかった。

【0084】

P D O V 1 及び P D O V 2 は両方とも、A S G P R を過剰発現する H e p G 2 細胞への標識された *siRNA* の送達を実証したが、野生型細胞の標識はほとんど又はまったくなかった。構成体での G a l N a c の非存在下では、本発明者らは、A S G P R 過剰発現細胞への取り込みを何ら認めなかった。

【0085】

その後の実験で、本発明者らは、A S G P R を過剰発現する H u h 7 の P D O V 1、2 及び 3 のバリエーションによる送達を調べた。P D o V 2 及び 3 は、野生型細胞と比較して、これらの細胞への取り込みのいくらかの特異性を示した。P D o V 1 はまた、これらの細胞へのいくらかの送達を示したが、P D o V 2 及び P D o V 3 ほど大きくはなかった。P D o V 2 は、2 4 時間の曝露後に顕著な取り込みを示した。

【0086】

実施例 16

初代マウス肝細胞における m T T R - P D o V x - G a l N A c の *in vitro* の研究

標的 T T R について初代マウス肝細胞を使用して、G a l N A c コンジュゲート化 *siRNA* (m T T R 1 - P D o V 3 - G a l N A c 3、m T T R 1 - P D o V 2 - G a l N A c 3、m T T R 2 - G a l N A c 3 ポジティブコントロール、m T T R 2 - G a l N A c 3 ポジティブコントロール) についての用量応答スクリーニングを行った。細胞密度は 4 0 0 0 0 細胞 / 9 6 ウェルであった。濃度は、最高 5 倍希釈物 1 μ M から最低 3 p M までであった。細胞を 7 2 時間の直接的なインキュベーションによってトランスフェクトした。データを b D N A アッセイによって読み出した。データを X L f i t ソフトウェアによって分析した。G a p d h に対して正規化された T T R シグナル、四連の平均、模擬処理細胞セット = 1、I C 5 0 値の計算に対し X l f i t であった。使用した初代肝細胞は、ドイツの P r i m a c y t (ロット M H 1 8 1 2 1 9) から購入し、C D 1 マウスから誘導され、融解直後に *siRNA* で処理した。

【0087】

2 つの *siRNA* を両方とも 3' 末端で三価 G a l N A c クラスターにコンジュゲートさせた (m T T R 2 *siRNA* 配列は完全に修飾された配列であり、m T T R 1 よりもオリゴヌクレオチドにおいて 4 つ多い P S 結合修飾であった。(N a i r, e t a l., J. A m. C h e m. S o c. 1 3 6 : 1 6 9 5 8 - 1 6 9 6 1 (2 0 1 4)。A h a 1 - G a N A c 3 ポジティブコントロールを、ハウスキーパー a h s a 1 を標的とする標準対照として使用した。これをネガティブコントロール及びポジティブコントロールの両方として使用し、細胞溶解物をスクリーニング標的又は a h s a 1 特異的プローブのいずれかにハイブリダイズさせた。表 e 1 は、2 つのコントロール *siRNA* の配列及び G a l N A c クラスターの構造を列挙している。

10

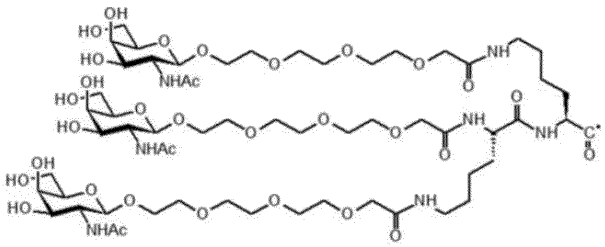
20

30

40

50

表 e1. コントロール siRNA 配列 及び 標的

コンジュゲート	標 的	配 列
mTTR2－GaNAc3ポジティブ コントロール	マウス T TR	センス：5'－AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaU faAf(NHC6)(GaINAc3)－3' アンチセンス：5'－usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfc UfgUfususu－3'
Aha1－GaNAc3ポジティブコ ントロール	AHSA1	センス：5'－uscsUfcGfuGfgCfcUfuAfaUfgAfaAf (NHC6)(GaINAc3)－3' アンチセンス：5'－UfsUfsuCfaUfuAfaGfgCfcAfcGf aGfasusu－3'
コントロールコンジュゲートでの 三価 GaINAc3リガンド		

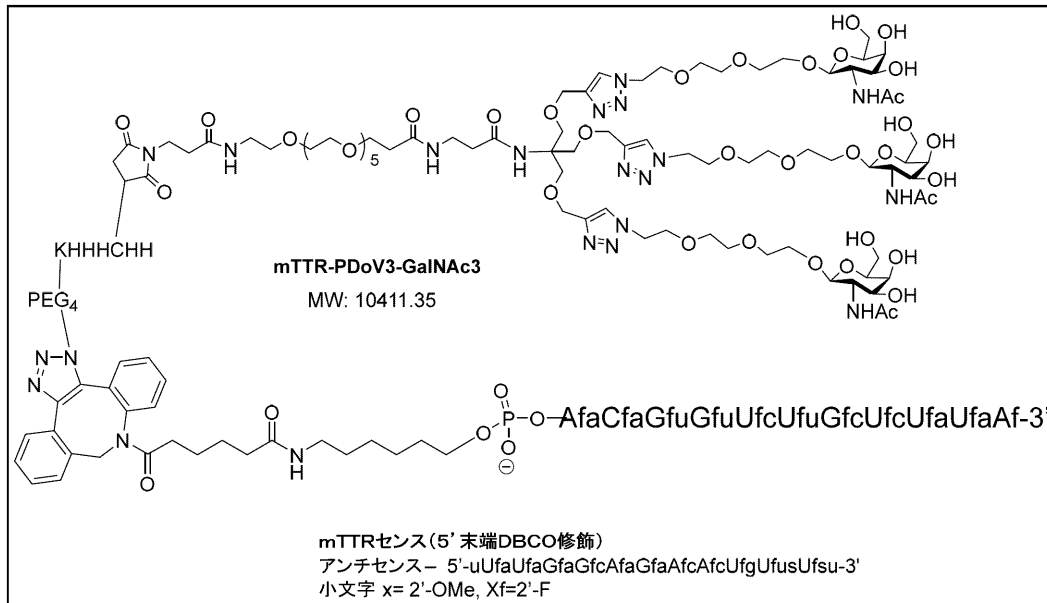
10

20

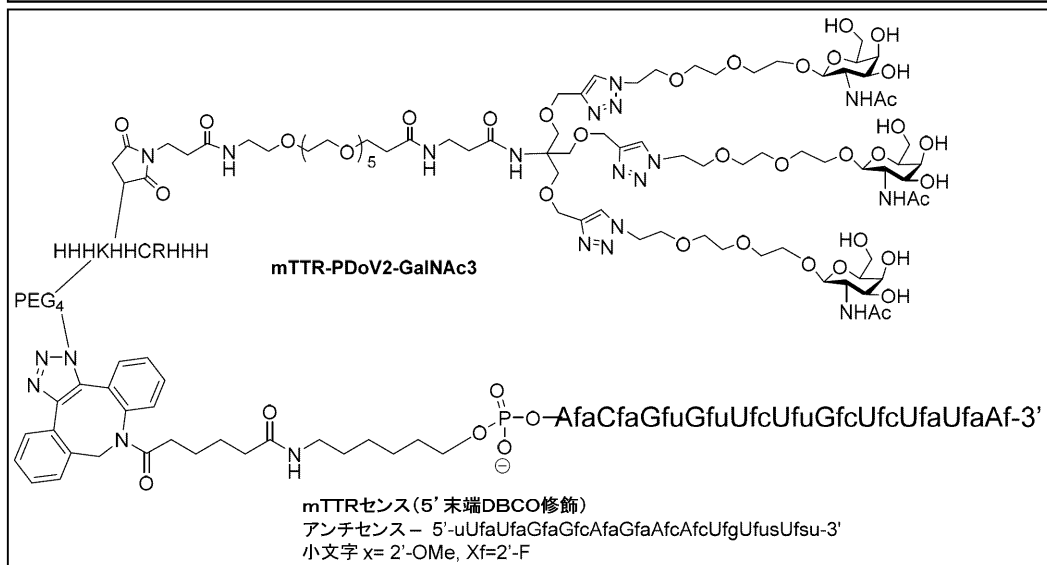
30

40

50



10



20

30

表 e 2. GalNAc コンjugate 化 siRNA の in vitro スクリーニングの用量応答の概要

化合物	IC ₅₀ (μM)	IC ₈₀ (μM)	最大KD (%)
mTTR1-PDoV3-GalNAc3	0.0018	0.0048	97%
mTTR1-PDoV2-GalNAc3	0.0026	0.0071	97%
mTTR2-GalNAc3 ポジティブコントロール	0.0001	0.0003	96%
aha1-GalNAc3 ポジティブコントロール	0.0015	0.0059	96%

40

【0088】

mTTR1-PDoV3-GalNAc3 のコンjugate の in vitro での重大な希釈データ-図 15A を参照: IC₅₀ = 1.82 nM は、同じ siRNA 配列 21 及びオリゴヌクレオチドに対する化学修飾についての IC₅₀ = 1.39 nM の文献報告 (Naïr ら、前出) と同等である。図 15B は、mTTR1-PDoV2-GalNAc3 コンjugate の in vitro での段階希釈データを示す。図 15C は、mTTR2-GalNAc3 ポジティブコントロールコンjugate の in vitro での段階

50

階希釈データの段階希釈データを示す：mTTR2 siRNA配列は完全に修飾された配列であり、オリゴヌクレオチドにさらに4個のPS結合修飾を有する（前掲のNair）。図15Dは、Aha1-GalNAc3ポジティブコントロールコンジュゲートのin vitroでの段階希釈データを示す。

【0089】

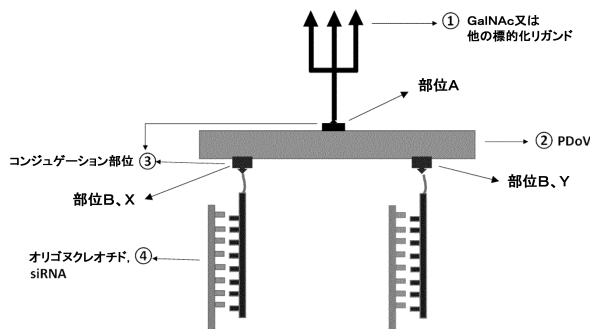
発行された特許及び公開された特許出願を含む、本明細書で特定されるすべての刊行物、及びurlのアドレス又は寄託番号によって特定されるすべてのデータベースエントリは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0090】

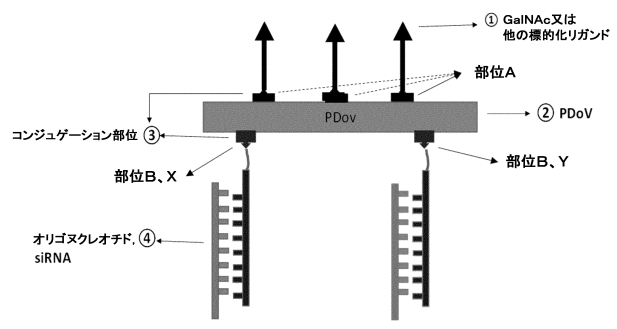
本発明は、その特定の実施形態に関連して説明されており、例示の目的で多くの詳細が記載されているが、本発明は追加の実施形態の影響を受けやすく、本明細書に記載の特定の詳細は、本発明の基本原則から逸脱することなく変更することができることは当業者には明らかであろう。

【図面】

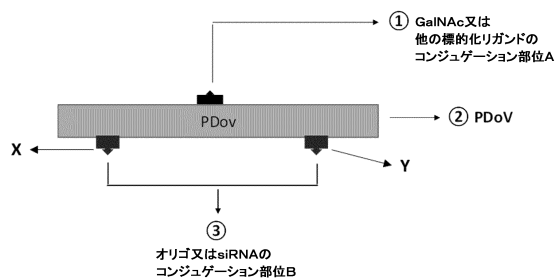
【図1】



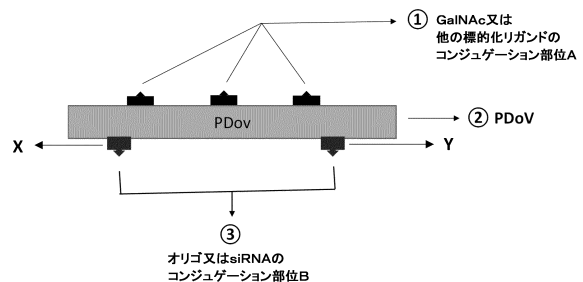
【図2】



【図3】



【図4】



10

20

30

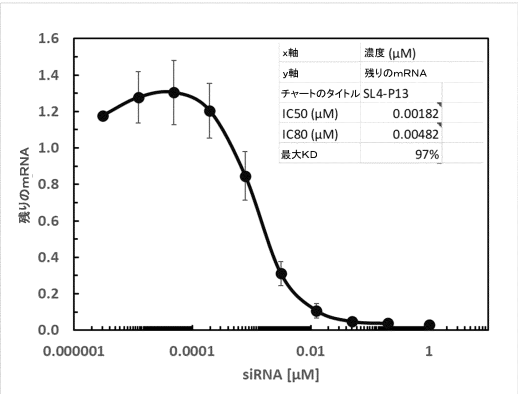
40

50

【図 1 4】

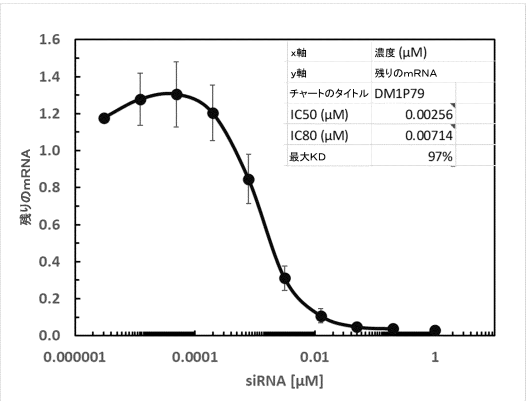
siRNA sequence and structure modifications.	
配列	配列と修飾
ApoB100a センス	5'-(DBCO-C6NHS)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAA-3' (5' 末端 DBCO修飾)
ApoB100a アンチセンス	5'-uuGGAUCAAAuAuAAGAuUCccu-3'
ApoB100b センス	S: 5'-(DBCO-C6NHS)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAA-3' (5' 末端 DBCO修飾)
ApoB100b アンチセンス	AS: 5'-uuGGAUCAAAuAuAAGAuUCccu-(Fluor647フルオロ)-3'
完全に修飾された ApoB100c センス:	センス 5'-(DBCO-C6NHS)(NHC6)ggaaucUfuAfuAfuuuugaucacaa-3'
ApoB100c アンチセンスー色素	アンチセンス 5'-uUfggaUfcfaaaauuAfaGfaucuccu-3'
mTTR1 センス:	5'-(DBCO-C6NHS)(NHC6)AfaCfaGfaGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfaAf-3'
mTTR1 アンチセンス	5'-uUfaUfaGfaGfaGfaGfaAfaUfgUfusUfsu-3'
mTTR2 センス:	5'-(DBCO-C6NHS)(NHC6)AfsasCfaGfuGfuUfCUfuGfcUfcUfaUfaAf-3'
mTTR2 アンチセンス	5'-usUfsaUfaGfaGfaGfaGfaAfaUfcUfusUfsu-3'
25 NSC コントロール センス:	5'- DBCO-C6NHS)(NHC6)cG/agcaggguaucG/acgaauacaaa-3'
25 NSC コントロール アンチセンス:	5'-uuuGfTaaucgucgauA/fccucgucg-3'
21 NSC コントロール センス:	センス-5'-(DBCO-C6NHS)(NHC6)caggguAfuCfGfAfcgaauacaaa-3'
21 NSC コントロール アンチセンス:	アンチセンス 5'- uUfuguAfaucgucgAfuAfcucg-3'
注記	すべての配列での2'—修飾 大文字は2'—OHを示す 小文字は、2'—O—メチル(2'—OMe)修飾、大文字X=通常のスクレオチド、Xf=2'—F修飾を示す

【図 1 5 A】

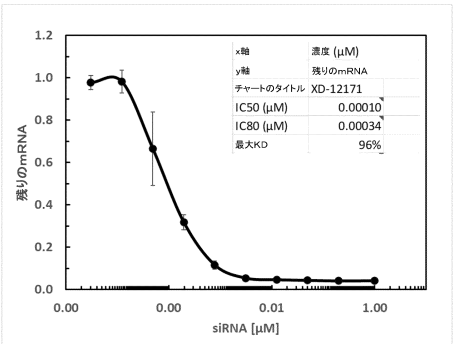


10

【図 1 5 B】



【図 1 5 C】

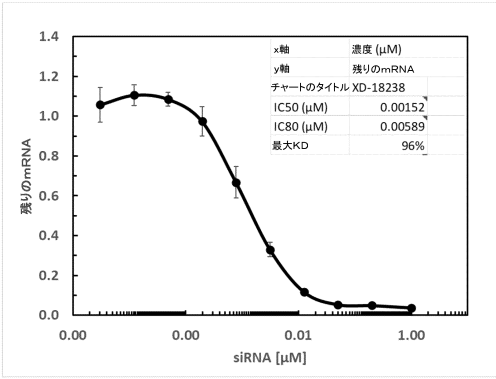


30

40

50

【図 15 D】



10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/63676

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - A61K 35/17; C07K 14/705 (2021.01)

CPC - A61K 35/17; A61P 35/00; A61P 35/02; A61P 37/04

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 -- Y -- A	MA et al. "Peptide-Drug Conjugate: A Novel Drug Design Approach", Current Medicinal Chemistry. 2017. Vol. 24, pp 1-24, especially: abstract; pg 2, Fig. (1); pg 2, col 2, para 2; pg 6, para 5; pg 12, col 1, para 2; pg 12, col 1, para 5; pg 13, Table 4, Linkers used in PDCs, row 8, Gly-Phe-Leu-Gly; pg 14, col 1, para 2.	1,33 2-3,16,18,28-29 14-15
Y -- A	WO 2019/226940 A1 (SIRNAOMICS INC) 28 November 2019 (28.11.2019), especially: abstract; pg 1, ln 13-23; pg 1, ln 24-33; pg 8, ln 5-12; pg 8, ln 15-17; pg 11, ln 15 to pg 12, ln 2; pgs 21-23, Tables 1-3.	2-3,16,18,28-29 14-15
A	WINKLER "Oligonucleotide conjugates for therapeutic applications", Ther. Deliv. 2013. Vol. 4(7), pp 791-809, entire document.	1-3,14-16,18,28-29,33
A	YU et al. "Targeted Delivery Systems for Oligonucleotide Therapeutics", The AAPS Journal. 2009. Vol. 11(1), entire document.	1-3,14-16,18,28-29,33

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" 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

4 May 2021

Date of mailing of the international search report

MAY 21 2021

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 Young

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/63676

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.: 4-13, 17, 19-27, 30-32, 34-42, 47-57
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:
(see 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.:
1-3, 14-16, 18, 28-29 and 33

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 20/63676

-BOX III - LACK OF UNITY-

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 searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I: Claims 1-3, 14-16, 18, 28-29 and 33, directed to a chemical construct comprising a Peptide Docking Vehicle (PDV) covalently linked to (a) a targeting moiety, and (b) a first therapeutic oligonucleotide.

Group II: Claims 43-46, directed to a peptide with the formula (HnKm)OXpYq, wherein H is histidine, K is lysine, X and Y are functional units selected from an amino acid and a linker, n is 1-10, m is 1-10, o is 1-10, p is 1-5, and q is 1-4.

Special Technical Features

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

Group I requires a chemical construct comprising a Peptide Docking Vehicle (PDV) covalently linked to (a) a targeting moiety, and (b) a first therapeutic oligonucleotide, which is not required by Group II.

Group II requires a peptide with the formula (HnKm)OXpYq, which is not required by Group I.

Shared Common Features

The only feature shared by Groups I and II that would otherwise unify the groups is a peptide. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is anticipated by WO 2019/226940 A1 to Simaomics Inc (hereinafter 'SIMAOMICS'). Simaomics teaches a peptide (abstract, The present invention provides certain peptides and polypeptides useful in the preparation of nanoparticles for delivering nucleic acids and pharmaceutical drugs to mammalian cells and to humans and other mammals).

As the technical features were known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups. Groups I and II therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Notes:

Claims 4-13, 17, 19-27, 30-32, 34-42 and 47-57 are unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Claim 15 is a self-dependent claim. For the purposes of the search and opinion it was assumed that claim 15 depends from claim 14.

Claim 22 depends from claim 28, claim 37 depends from 41-45, and claims 41-42 depend from claim 52, all of which is improper. For the purposes of the search and opinion it was assumed that claim 22 depends from claim 21, 37 depends from any of claims 33-35, and 41-42 depend from claim 40.

フロントページの続き

(51)国際特許分類		F I	テーマコード (参考)	
A 6 1 K	31/7125(2006.01)	A 6 1 K	31/7125	4 H 0 4 5
A 6 1 K	31/712 (2006.01)	A 6 1 K	31/712	
A 6 1 K	47/04 (2006.01)	A 6 1 K	47/04	
A 6 1 K	47/26 (2006.01)	A 6 1 K	47/26	
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 0 5
A 6 1 K	47/65 (2017.01)	A 6 1 K	47/65	
A 6 1 K	47/54 (2017.01)	A 6 1 K	47/54	
C 0 7 H	21/04 (2006.01)	C 0 7 H	21/04	Z
A 6 1 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 P	1/16	
C 0 7 H	21/02 (2006.01)	C 0 7 H	21/02	
C 0 7 K	5/117(2006.01)	C 0 7 K	5/117	
C 0 7 K	7/08 (2006.01)	C 0 7 K	7/08	
C 0 7 K	7/06 (2006.01)	C 0 7 K	7/06	
C 1 2 N	15/11 (2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z Z N A
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	

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,N
E,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,IT,JO,JP,K
E,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,N
G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

9, ゲイザースバーグ, プロフェッショナル ドライブ 4 0 1, スイート 2 8 0 シー／オー
サーナオミクス インコーポレイテッド

(72)発明者 エヴァンズ, デーヴィッド エム.

アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 8 7 9, ゲイザースバーグ, プロフェッショナル ドライブ
4 0 1, スイート 2 8 0 シー／オー サーナオミクス インコーポレイテッド

F ターム (参考) 4B065 AA91X AA93X AB01 BA01
4C057 AA30 CC03 DD01 MM02 MM04 MM05 MM09
4C076 AA11 AA95 BB11 CC09 CC27 CC41 DD26 DD67 EE41 EE59
FF70
4C084 AA13 MA16 MA66 NA05 NA13 NA14 ZA75 ZB26
4C086 AA01 AA10 EA16 MA01 MA02 MA04 MA05 MA16 MA66 NA05
NA13 NA14 ZA75 ZB26
4H045 AA10 AA30 BA13 BA14 BA15 BA16 BA17 BA51 BA54 EA60
FA34