

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 3 部門第 2 区分

【発行日】平成25年2月21日 (2013.2.21)

【公開番号】特開2012-97094(P2012-97094A)

【公開日】平成24年5月24日 (2012.5.24)

【年通号数】公開・登録公報2012-020

【出願番号】特願2011-268234(P2011-268234)

【国際特許分類】

| | | |
|---------|---------|-----------|
| A 6 1 K | 47/42 | (2006.01) |
| C 1 2 Q | 1/68 | (2006.01) |
| A 6 1 K | 8/64 | (2006.01) |
| A 6 1 K | 47/36 | (2006.01) |
| A 6 1 K | 8/60 | (2006.01) |
| A 6 1 K | 47/48 | (2006.01) |
| A 6 1 K | 31/7088 | (2006.01) |
| A 6 1 K | 31/7105 | (2006.01) |
| A 6 1 K | 31/713 | (2006.01) |
| A 6 1 K | 48/00 | (2006.01) |
| A 6 1 K | 49/00 | (2006.01) |
| A 6 1 K | 49/04 | (2006.01) |
| A 6 1 K | 51/00 | (2006.01) |
| A 6 1 K | 39/395 | (2006.01) |
| A 6 1 K | 45/00 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 25/04 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 11/06 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 31/12 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 25/24 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 3/10 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 31/10 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 1/08 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 9/12 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 15/10 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 29/00 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 35/00 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 31/18 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 25/22 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 15/16 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 15/18 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 15/08 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 7/02 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 5/00 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 3/02 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 37/06 | (2006.01) |
| A 6 1 K | 47/34 | (2006.01) |
| C 1 2 N | 15/09 | (2006.01) |

【 F I 】

| | | |
|---------|-------|-------|
| A 6 1 K | 47/42 | Z N A |
| C 1 2 Q | 1/68 | Z |
| A 6 1 K | 8/64 | |

| | | |
|---------|---------|---|
| A 6 1 K | 47/36 | |
| A 6 1 K | 8/60 | |
| A 6 1 K | 47/48 | |
| A 6 1 K | 31/7088 | |
| A 6 1 K | 31/7105 | |
| A 6 1 K | 31/713 | |
| A 6 1 K | 48/00 | |
| A 6 1 K | 49/00 | |
| A 6 1 K | 49/04 | |
| A 6 1 K | 49/02 | |
| A 6 1 K | 39/395 | C |
| A 6 1 K | 39/395 | L |
| A 6 1 K | 45/00 | |
| A 6 1 P | 25/04 | |
| A 6 1 P | 11/06 | |
| A 6 1 P | 31/12 | |
| A 6 1 P | 25/24 | |
| A 6 1 P | 3/10 | |
| A 6 1 P | 31/10 | |
| A 6 1 P | 1/08 | |
| A 6 1 P | 9/12 | |
| A 6 1 P | 15/10 | |
| A 6 1 P | 29/00 | |
| A 6 1 P | 35/00 | |
| A 6 1 P | 31/18 | |
| A 6 1 P | 25/22 | |
| A 6 1 P | 15/16 | |
| A 6 1 P | 15/18 | |
| A 6 1 P | 15/08 | |
| A 6 1 P | 7/02 | |
| A 6 1 P | 5/00 | |
| A 6 1 P | 3/02 | |
| A 6 1 P | 37/06 | |
| A 6 1 K | 47/34 | |
| C 1 2 N | 15/00 | A |

【手続補正書】**【提出日】**平成24年1月6日(2012.1.6)**【手続補正 1】****【補正対象書類名】**明細書**【補正対象項目名】**0 0 0 9**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【0 0 0 9】**

【図 1】図 1 は本発明において用いられる化合物の概略図である (G 3 R 7 は配列番号 : 1 の配列である)。

【図 2】図 2 は本発明のいくつかの態様の概略図である。

【図 3】図 3 ~ 1 0 は、実施例 4 に記載するような治療薬の経皮送達を表す写真である。

【図 4】図 3 ~ 1 0 は、実施例 4 に記載するような治療薬の経皮送達を表す写真である。

【図 5】図 3 ~ 1 0 は、実施例 4 に記載するような治療薬の経皮送達を表す写真である。

【図 6】図 3 ~ 10 は、実施例 4 に記載するような治療薬の経皮送達を表す写真である。
 【図 7】図 3 ~ 10 は、実施例 4 に記載するような治療薬の経皮送達を表す写真である。
 【図 8】図 3 ~ 10 は、実施例 4 に記載するような治療薬の経皮送達を表す写真である。
 【図 9】図 3 ~ 10 は、実施例 4 に記載するような治療薬の経皮送達を表す写真である。
 【図 10】図 3 ~ 10 は、実施例 4 に記載するような治療薬の経皮送達を表す写真である。

【図 11】図 11 ~ 12 は、実施例 5 に記載するような治療用処方ターゲットングを表す写真である。

【図 12】図 11 ~ 12 は、実施例 5 に記載するような治療用処方ターゲットングを表す写真である。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0010

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0010】

(発明の開示)

一般的記載

本発明は、イメージング剤、遺伝子または他の治療薬の選択的、持続的な送達のための成分ベースのシステムを提供する。組成物の個々の特性は、臨床処方において所望の成分を指定することにより選択できる。さらに、イメージングおよび特異的ターゲットング部分は、別の負に帯電した主鎖上に提供され、これは正の主鎖と非共有イオン結合を形成する。これらの成分を負に帯電した主鎖上に配置することにより、本発明は成分を他の方法（立体的制限のために有効な組み合わせがないレベルまで、複雑さおよび費用を増大させ、効率を低下させる）において用いられるような正の主鎖上の正確な位置に結合させる必要性がなくなり。本発明は図 1 を参照してさらに理解される。この図において、成分は（1）結合した正に帯電した基（暗色線と結合した黒丸として示される効率基とも称する）、例えば、 $(Gly)_{n_1} - (Arg)_{n_2}$ （配列番号：2 - 7）（式中、下付き文字 n_1 は 3 ~ 約 5 の整数であり、下付き文字 n_2 は約 7 ~ 約 17 の奇数である）または T A T ドメインを有する強固な主鎖；（2）結合したイメージング部分（淡色線に結合した白抜き三角）を有する短い負に帯電した主鎖；（3）結合したターゲットング剤および/または治療薬（淡色線に結合した白抜き丸）を有する短い負に帯電した主鎖；（4）オリゴヌクレオチド、RNA、DNA または cDNA（薄くクロスハッチされた棒）；および（5）残存因子をエンコードする DNA（黒っぽくクロスハッチされた棒）として示される。図 2 は多成分組成物の様々な例を表し、図中、基は図 1 において記載したように図示される。例えば、図 2 において、第一の多成分組成物は、正に帯電した主鎖がイメージング成分、ターゲットング成分、オリゴヌクレオチドおよび残存因子と結合している。診断/徴候イメージングのために設計される第二の多成分組成物が図示される。この組成物において、正に帯電した主鎖はイメージング成分およびターゲットング成分の両方と錯体を形成する。最後に、遺伝子送達に有用な第三の多成分系を示す。この系において、正に帯電した主鎖、ターゲットング成分、関心のある遺伝子および残存因子をエンコードする DNA 間で複合体が形成される。本発明は、以下にさらに詳細に記載されるが、治療および診断プログラムにおいて有用な多くのさらなる組成物を提供する。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0016】

前記の主鎖のそれぞれにおいて、正に帯電した基を有する側鎖基を結合させることがで

きる。例えば、スルホンアミド結合主鎖（ $-SO_2NH-$ および $-NH-SO_2-$ ）は窒素原子に結合した側鎖を有し得る。同様に、ヒドロキシエチレン（ $-CH(OH)CH_2-$ ）結合はヒドロキシ置換基に結合した側鎖基を有し得る。当業者は、標準的合成法を用いて正に帯電した側鎖基を得るために他の結合化学を容易に採用することができる。

特に好ましい例において、正に帯電した主鎖は、 $-(gly)_{n1}-(arg)_{n2}$ （配列番号：8-18）、 $HIV-TAT$ またはそのフラグメントを含む枝分かれ基（効率基とも称する）を有するポリペプチドであり、ここにおいて、下付き文字 $n1$ は $0 \sim 20$ の整数であり、より好ましくは $0 \sim 8$ であり、さらにより好ましくは $2 \sim 5$ であり、下付き文字 $n2$ は約 $5 \sim 25$ の奇数であり、より好ましくは約 $7 \sim 17$ であり、最も好ましくは約 $7 \sim 13$ である。 $HIV-TAT$ フラグメントは式 $(gly)_p-RGRDDRQR-R-(gly)_q$ （配列番号：19）または $(gly)_p-YGRKKRQR-R-(gly)_q$ （配列番号：20）（式中、下付き文字 p および q はそれぞれ独立して $0 \sim 20$ の整数である）を有し、フラグメントはフラグメントの C-末端または N-末端のいずれかにより主鎖に結合している例もさらに好ましい。好ましい $HIV-TAT$ フラグメントは下付き文字 p および q がそれぞれ独立して $0 \sim 8$ 、より好ましくは $2 \sim 5$ の整数であるものである。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0017

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0017】

もう一つの特に好ましい例において、主鎖部分はポリリシンであり、正に帯電した枝分かれ基はリシン側鎖アミノ基に結合している。この特に好ましい例において用いられるポリリシンは商業的に入手可能な（Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA）任意のポリリシン、例えば、 $MW > 70000$ を有するポリリシン、 $70000 \sim 150000$ の MW を有するポリリシン、 $MW > 300000$ を有するポリリシンである。ポリリシンの適当な選択は、組成物の残存する成分に依存し、組成物に全体的に正味の電荷を提供し、負に帯電した成分の合計長さの好ましくは $1 \sim 4$ 倍の長さを提供するために十分である。好ましい正に帯電した枝分かれ基または効率基としては、例えば、 $-gly-gly-gly-arg-arg-arg-arg-arg-arg-arg-(Gly)_3Arg_7$ （配列番号：1）または $HIV-TAT$ が挙げられる。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0044

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0044】

実施例 2

この実施例は、細胞毒性遺伝子を担うイメージ化された腫瘍特異性複合体である本発明の組成物の調製を説明する。

次の成分を調製する：

1. Lys の側鎖アミノ末端により Gly_3Arg_7 （配列番号：1）のカルボキシ末端と 20% の飽和度で結合した Gly_3Arg_7 （配列番号：1）を有するポリリシンからなる正に帯電した主鎖。リン酸塩緩衝塩溶液（PBS）中 1.5 mg/mL の濃度で主鎖部分の溶液を調製する。

2. サイトメガロウイルス（CMV）プロモーターの制御下で単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼを発現する cDNA を、PBS 中 0.5 mg/mL 濃度で使用する。

3. デキストラン-DOTA-ガドリニウム錯体を PBS 中 $1:2$ の希釈度で使用する。

。

4. 前記「2」の成分に対して1:2の負電荷比を得るために選択されたサイズ範囲およびPBS中濃度のデキストランに対して5%の飽和度の所望の腫瘍抗原に対して特異性の接合Fabフラグメント。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0046

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0046】

実施例3

この実施例は、細胞培養におけるトランスフェクションの多成分法の使用を説明する。

この実施例において、成分ベースの方法の一回分を評価するために6-ウェルプレートを使用した。グリシンの末端のカルボキシルをリシン側鎖の遊離アミンと18%の飽和度(すなわち、それぞれ100のリシン残基の内18をGly₃Arg₇(配列番号:1)と接合させる)で接合させることにより、-Gly₃Arg₇(配列番号:1)をポリリシン15000と接合することにより、正に帯電した主鎖を調製した。結果として得られた主鎖をNUNU-01と命名した。

次の混合物を調製した:

- 1) CMVプロモーターにより駆動される青色蛍光蛋白を発現するプラスミドの0.5 mg/mL溶液に対して4:1の電荷比のポリリシン(15000)。
- 2) CMVプロモーターにより駆動される青色蛍光蛋白を発現するプラスミドの0.5 mg/mL溶液に対して15:1の比のNUNU-01。
- 3) CMVプロモーターにより駆動される青色蛍光蛋白を発現するプラスミドの0.5 mg/mL溶液に対して10:1の比のNUNU-01。
- 4) CMVプロモーターにより駆動される青色蛍光蛋白を発現するプラスミドの0.5 mg/mL溶液に対して4:1の比のNUNU-01。
- 5) CMVプロモーターにより駆動される青色蛍光蛋白を発現するプラスミドの0.5 mg/mL溶液に対して1.25:1の比のNUNU-01。
- 6) CMVプロモーターにより駆動される青色蛍光蛋白を発現するプラスミドの0.5 mg/mL溶液に対して5:1の比の製造業者の推奨に従ったSuperfect(Quiaagen)。

【手続補正7】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

a) 正に帯電した主鎖と;

b) i) 複数の結合したイメージング部分を有する第一の負に帯電した主鎖;

ii) 複数の結合したターゲティング剤を有する第二の負に帯電した主鎖;

iii) RNA、DNA、リボザイム、修飾オリゴヌクレオチドおよび選択された導入遺伝子をエンコードするcDNAからなる群から選択される少なくとも一つの要素;

iv) 少なくとも一つの残存因子をエンコードするDNA; および

v) 複数の結合した生物学的薬剤を有する第三の負に帯電した主鎖

からなる群から選択される少なくとも二つの要素と

の非共有結合複合体を含む組成物であって、その結合複合体が正味正電荷を有し、b)群からの前記の二つの要素のうちの少なくとも一つがi)、iii)またはv)群から選択される、組成物。