

【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3～10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4】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5】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のターゲティ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のターゲティ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ティング部分は、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）<sub>n1</sub>-（Arg）<sub>n2</sub>（配列番号：2-7）（式中、下付き文字n1は3～約5の整数であり、下付き文字n2は約7～約17の奇数である）またはTAT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）結合したターゲティング剤および/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、ターゲティング成分、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ティ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、ターゲティング成分、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

きる。例えば、スルホンアミド結合主鎖（-SO<sub>2</sub>NH-および-NHSO<sub>2</sub>-）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<sub>2</sub>-）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、- (g<sub>1</sub>y)<sub>n<sub>1</sub></sub> - (arg)<sub>n<sub>2</sub></sub>（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n<sub>1</sub>は0～20の整数であり、より好ましくは0～8であり、さらにより好ましくは2～5であり、下付き文字n<sub>2</sub>は約5～約25の奇数であり、より好ましくは約7～約17であり、最も好ましくは約7～約13である。HIV-TATフラグメントは式(g<sub>1</sub>y)<sub>p</sub>-RGRRDRRQRRR-(g<sub>1</sub>y)<sub>q</sub>（配列番号：19）または(g<sub>1</sub>y)<sub>p</sub>-YGRKKRRQRRR-(g<sub>1</sub>y)<sub>q</sub>（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0～20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0～8、より好ましくは2～5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、70000～150000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正の電荷を提供し、負に帯電した成分の合計長さの好ましくは1～4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、-g<sub>1</sub>y-g<sub>1</sub>y-g<sub>1</sub>y-arg-arg-arg-arg-arg-arg-arg（-G<sub>1</sub>y<sub>3</sub>A<sub>7</sub>）（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G<sub>1</sub>y<sub>3</sub>A<sub>7</sub>（配列番号：1）のカルボキシ末端と20%の飽和度で結合したG<sub>1</sub>y<sub>3</sub>A<sub>7</sub>（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1.5mg/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0.5mg/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P B S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的接合F a b 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G l y<sub>3</sub> A r g<sub>7</sub>（配列番号：1）と接合させる）で接合させることにより、-G l y<sub>3</sub> A r g<sub>7</sub>（配列番号：1）をポリリシン150000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N U N U - 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0.5m g / mL溶液に対して4:1の電荷比のポリリシン（150000）。
- 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0.5m g / mL溶液に対して15:1の比のN U N U - 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0.5m g / mL溶液に対して10:1の比のN U N U - 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0.5m g / mL溶液に対して4:1の比のN U N U - 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0.5m g / mL溶液に対して1.25:1の比のN U N U - 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0.5m g / mL溶液に対して5:1の比の製造業者の推奨に従ったSuperfect（Quia gene）。

【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；
  - i i) 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；
    - i i i) 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；
    - i v) 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2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2つの要素のうちの少なくとも1つがi)、i i i)またはv)群から選択される、組成物。