

【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20年9月4日 (2008.9.4)

【公表番号】特表2004-513075(P2004-513075A)

【公表日】平成16年4月30日 (2004.4.30)

【年通号数】公開・登録公報2004-017

【出願番号】特願2002-513506(P2002-513506)

【国際特許分類】

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

A 6 1 K 47/42 (2006.01)

A 6 1 K 47/48 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 P 3/10 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 K 38/00 (2006.01)

A 6 1 K 38/28 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 0 7 K 7/00 (2006.01)

C 0 7 K 14/00 (2006.01)

【 F I 】

A 6 1 K 45/00

A 6 1 K 47/42

A 6 1 K 47/48

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 3/10

A 6 1 P 43/00 1 1 1

A 6 1 K 37/02

A 6 1 K 37/26

C 1 2 N 15/00 A

C 0 7 K 7/00

C 0 7 K 14/00

【手続補正書】

【提出日】平成20年7月18日 (2008.7.18)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

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

【請求項2】 生物学的薬剤が治療薬であるところの、請求項1記載の組成物。

【請求項3】 治療薬が、VEGF、ボツリヌス毒素、VEGFのブロッカーおよびインスリンからなる群から選択されるところの、請求項2記載の組成物。

【請求項4】 生物学的薬剤が化粧剤であるところの、請求項1記載の組成物。

【請求項5】 化粧剤が上皮増殖因子であるところの、請求項4記載の組成物。

【請求項6】 i)からv)の群から選択される少なくとも3つの要素を含む、請求項1記載の組成物。

【請求項7】 i)、ii)、iii)およびiv)の群のそれぞれからの少なくとも1つの要素を含む、請求項1記載の組成物。

【請求項8】 i)およびii)の群のそれぞれからの少なくとも1つの要素を含む、請求項1記載の組成物。

【請求項9】 ii)、iii)およびiv)の群のそれぞれの少なくとも1つの要素を含む、請求項1記載の組成物。

【請求項10】 正に帯電した主鎖が、b)群からの要素の合計した長さの約1~4倍の長さを有する、請求項1記載の組成物。

【請求項11】 正に帯電した主鎖が、結合した正に帯電した枝分かれ基を有するポリマーを含む、請求項1記載の組成物。

【請求項12】 ポリマーがペプチドであり、正に帯電した枝分かれ基が、 $-(gly)_n - arg - arg - arg - arg - arg - arg - arg$ (下付き文字nは0~20の整数である) (配列番号: 9)、HIV-TATおよびそのフラグメントからなる群から選択されるところの、請求項11記載の組成物。

【請求項13】 nが0~8の整数であるところの、請求項12記載の組成物。

【請求項14】 nが2~5の整数であるところの、請求項12記載の組成物。

【請求項15】 HIV-TATフラグメントが、式: $(gly)_p - RGRDDRRQR - (gly)_q$ (配列番号: 19) または $(gly)_p - YGRKKRRQR - (gly)_q$ (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0~20の整数である) で示され、そのHIV-TATフラグメントがC-末端またはN-末端のいずれかにより正に帯電した主鎖と結合するところの、請求項12記載の組成物。

【請求項16】 下付き文字pおよびqがそれぞれ独立して0~8の整数であるところの、請求項15記載の組成物。

【請求項17】 下付き文字pおよびqがそれぞれ独立して2~5の整数であるところの、請求項15記載の組成物。

【請求項18】 ポリマーがポリリシンであって、正に帯電した枝分かれ基が、リシン側鎖アミノ基と結合し、 $-gly - gly - gly - arg - arg - arg - arg - arg - arg - arg$ (配列番号: 1) およびHIV-TATからなる群から選択されるところの、請求項11記載の組成物。

【請求項19】 少なくとも一つの結合した効率基ならびにRNA、DNA、リボザイム、修飾された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核酸要素を有する正に帯電した主鎖の非共有複合体を含む組成物。

【請求項20】 正に帯電した主鎖がポリリシンであるところの、請求項19記載の組成物。

【請求項21】 効率基が、 $(Gly)_{n_1} - (Arg)_{n_2}$ (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) およびTATドメインからなる群から選択されるところの、請求項19記載の組成物。

【請求項 22】 少なくとも一つの結合した効率基を有する正に帯電した主鎖が、複数の結合した Gly₃Arg₇ (配列番号：1) 基を有する 150000 ~ 300000 ポリリシン主鎖であり、リシンの飽和度が約 5% ~ 約 30% であるところの、請求項 19 記載の組成物。

【請求項 23】 核酸要素が選択された導入遺伝子をエンコードする cDNA であるところの、請求項 19 記載の組成物。

【請求項 24】 核酸要素が検出可能な産物を発現するプラスミドの一部であるところの、請求項 19 記載の組成物。

【請求項 25】 検出可能な産物が蛍光蛋白であるところの、請求項 24 記載の組成物。

【請求項 26】 検出可能な産物が青色蛍光蛋白であるところの、請求項 24 記載の組成物。

【請求項 27】 プラスミドがさらに CMV プロモーターを含むところの、請求項 24 記載の組成物。

【請求項 28】 対象における細胞表面に生物学的薬剤を送達する方法であって：

(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) 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；および

(iii) 複数の結合した治療薬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一つの生物学的薬剤と；

(c) 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を含む組成物を該対象に投与することを含み、ここで該組成物が正に帯電した主鎖、生物学的薬剤および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の非共有結合複合体であり、正味正電荷を有するところの、方法。

【請求項 29】 生物学的薬剤がオリゴヌクレオチドまたは選択された導入遺伝子をエンコードする cDNA であり、組成物がさらに少なくとも一つの残存因子をエンコードする DNA を含むところの、請求項 28 記載の方法。

【請求項 30】 生物学的薬剤が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であるところの、請求項 28 記載の方法。

【請求項 31】 生物学的薬剤が複数の結合した治療薬を有する第三の負に帯電した主鎖であるところの、請求項 28 記載の方法。

【請求項 32】 投与が静脈内投与であるところの、請求項 28 記載の方法。

【請求項 33】 投与が経皮投与であるところの、請求項 28 記載の方法。

【請求項 34】 投与が血管形成バルーンを用いて行われるところの、請求項 28 記載の方法。

【請求項 35】 投与がカテーテルを用いて行われるところの、請求項 28 記載の方法。

【請求項 36】 投与が腹膜内投与であるところの、請求項 28 記載の方法。

【請求項 37】 組成物がゲル処方であるところの、請求項 28 記載の方法。

【請求項 38】 医薬組成物の調製法であって、正に帯電した主鎖成分と、

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) 複数の結合した治療薬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 つの要素とを、医薬的に許容される担体と合わせて、正味正電荷を有する非共有結合複合体を形成する；ただし、i) ないし v) 群からの

2つの要素のうち少なくとも1つはi)、i i i)またはv)から選択されるものとする、ことを含む方法。

【請求項39】 医薬送達組成物を処方するためのキットであって、
正に帯電した主鎖成分と、
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1つの要素；
i v) 少なくとも1つの残存因子をエンコードするDNA；および
v) 複数の結合した治療薬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、
医薬送達組成物を調製するための説明書と
を含むキット。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0009

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0009】

(図面の簡単な記載)

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(G3R7は配列番号：1の配列である)。

図2は本発明のいくつかの態様の概略図である。

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11～12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3】

【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、 $(Gly)_{n1} - (Arg)_{n2}$ (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4】

【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、 $-(gly)_{n_1}-(arg)_{n_2}$ (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_1 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_2 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 $(gly)_p-RGRDDRQRQR-(gly)_q$ (配列番号: 19) または $(gly)_p-YGRKKRRQRQR-(gly)_q$ (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0~20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5】

【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1~4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、 $-(gly-gly-gly-arg-arg-arg-arg-arg-arg-arg-(gly)_3(Arg)_7)$ (配列番号: 1) またはHIV-TATが挙げられる。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】 0 0 4 4

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 0 4 4 】

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 7】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 4 6

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 0 4 6 】

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 Gly_3Arg_7 (配列番号：1) と接合させる) で接合させることにより、 $-\text{Gly}_3\text{Arg}_7$ (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 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 (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 0.5 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 (Quigagen)。