

【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3区分

【発行日】平成21年2月5日(2009.2.5)

【公表番号】特表2008-542500(P2008-542500A)

【公表日】平成20年11月27日(2008.11.27)

【年通号数】公開・登録公報2008-047

【出願番号】特願2008-514756(P2008-514756)

【国際特許分類】

C 0 8 G 81/00 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

A 6 1 K 31/7105 (2006.01)

A 6 1 K 31/711 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 9/10 (2006.01)

A 6 1 P 41/00 (2006.01)

A 6 1 K 47/42 (2006.01)

A 6 1 K 47/22 (2006.01)

A 6 1 K 9/50 (2006.01)

A 6 1 K 47/34 (2006.01)

A 6 1 K 47/32 (2006.01)

A 6 1 K 47/36 (2006.01)

【F I】

C 0 8 G 81/00 Z N A

C 1 2 N 15/00 A

A 6 1 K 31/7105

A 6 1 K 31/711

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 9/10

A 6 1 P 41/00

A 6 1 K 47/42

A 6 1 K 47/22

A 6 1 K 9/50

A 6 1 K 47/34

A 6 1 K 47/32

A 6 1 K 47/36

【手続補正書】

【提出日】平成20年12月3日(2008.12.3)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0089

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0089】

【図1】内部移行およびエンドソーム回避は、siRNA送達的主要な制限である。本発明は、細胞内部移行および/またはエンドソーム回避の2つの可能な経路(i)内部移行を増強することが見出されているHIVのTATドメインRKRRQRR(残基48～57位)[30,31]および(ii)界

面活性剤として作用し、エンドソーム膜を乱しうるPEG-PPSポリマーを含みうる。

【図2】トリブロックコポリマーの一つの態様は、核酸、例えばsiRNAを酵素分解から遮蔽するPEGのタンパク質抵抗性特性をうまく利用する。siRNAはTATペプチドに結合しており、複合体は、PEGおよびPPSにより提供される疎水性/親水性相互作用によりさらに安定化される。

【図3】ポリ(エチレングリコール)-ポリ(プロピレンスルフィド)-ペプチド(PEG-PPS-ペプチド)の合成スキームである。PEG-チオアセテート(A)はナトリウムメトキシレートにより活性化され、プロピレンスルフィドの陰イオン性重合を作用してBを形成することができるスルフィドを形成する。2,2'-ジピリジルジスルフィドは、末端キャッピング剤として用いられ、混合されたピリジルジスルフィドを有するABジブロックコポリマーを生成した(C)。ペプチドTAT(CGGWRKKRRQRRR)およびK9(CGGWKKKKKKKKK)は、ジスルフィド交換反応を介してCと反応し、示されたABCトリブロックコポリマーを生成した(D)。トリブロックコポリマーの形成は、ピリジンチオンの放出に対応する342nmにおける吸光度を記録することによりモニターされた(E)。

【図4】D-クロロホルムにおける<sup>1</sup>H-NMRおよびTHFにおける気体透過クロマトグラフィーが、合成経路における各中間生成物が100%変換で合成されたことを測定するために用いられた。得られたプロトン比および分子量は予想値と一致した。

【図5】水にトリブロックコポリマーを溶解すると(10mg/mL)、ポリマーは粒子へと凝集した。PEG-PPS<sub>5,10</sub>-TAT(A)およびPEG-PPS<sub>5,10</sub>-K9(D)の平均直径が示されている。ポリマーは、siRNAと、それらの臨界ミセル濃度より下の濃度で混合され、結果として生じた凝集体は、サイズ(B、E)、および電荷比の関数としてのゼータ電位(C、F)について分析された。GおよびHは、異なるPPSドメインサイズを有するトリブロックポリマーがどのように異なって凝集しうるかを示す。

【図6】PEG<sub>45</sub>-PPS<sub>5</sub>-TATおよびPEG<sub>45</sub>-PPS<sub>5</sub>-K<sub>9</sub>のプラスミドDNAと自己集合する能力はゲル電気泳動によって評価された。TBS中のDNA溶液(20 μg/mL)へ少量の凝縮ポリマーを加えた。各添加後、一部分を取り出し、複合体形成の程度を評価するためにゲルに流した。(A)TATペプチド(B)K<sub>9</sub>ペプチド(C)REG<sub>45</sub>-PPS<sub>5</sub>-TATトリブロックポリマー(D)REG<sub>45</sub>-PPS<sub>5</sub>-K<sub>9</sub>トリブロックポリマー。ゲルは、トリブロックコポリマーがDNAと自己集合して、アガロースゲルにおいて移動しない粒子を形成することができることを示している。トリブロックポリマーがsiRNAとの凝縮した構造を形成したことをさらに証明するために、蛍光低下アッセイが用いられた。siRNA-EtBrの相対蛍光強度は、添加されることになっているPEG<sub>45</sub>-PPS<sub>5,10</sub>-TAT(E)またはPEG<sub>45</sub>-PPS<sub>5,10</sub>-K<sub>9</sub>(F)の増加する量に関して測定された。蛍光強度は、粒子が形成されたことを示すプラトーが達成されるまで、より多くのポリマーが加えられるにつれて減少した。点線は、アガロースゲル電気泳動における複合体移動が停止した電荷比を示す。

【図7】10%血清(A)および0%血清(C)の存在下における4時間に渡るsiRNA-Cy5/PEG<sub>45</sub>-PPS<sub>5,10</sub>-TATポリマーのHeLa細胞内部移行のFACS解析である。バーは、陰性対照がゲートにおける細胞の5%を占めるように陽性ゲートが設定された場合の複合体を内部移行した細胞のパーセントを表す。平均蛍光強度は、10%血清(B)または0%血清(D)について示されている。リポフェクタミン2000は陽性対照として用いられた。蛍光顕微鏡法は、細胞内部移行結果をさらに確認するために用いられ、(E)はPEG<sub>45</sub>-PPS<sub>5</sub>-TATにより媒介された内部移行を示し、(F)はTATペプチドによる内部移行を示す。

【図8】10%血清(A)および0%血清(C)の存在下における4時間に渡るsiRNA-Cy5/PEG<sub>45</sub>-PPS<sub>5,10</sub>-K<sub>9</sub>ポリマー複合体のHeLa細胞内部移行である。グラフ挿入部分において示されているように、バーは、陰性対照がゲートにおける細胞の5%を占めるように陽性ゲートが設定された場合の複合体を内部移行した細胞のパーセントを表す。平均蛍光強度は、10%血清(B)または0%血清(D)について示されている。LF2000は陽性対照として用いられた。蛍光顕微鏡法は、細胞内部移行結果をさらに確認するために用いられ、(E)はPEG<sub>45</sub>-PPS<sub>5</sub>-K<sub>9</sub>により媒介された内部移行を示し、(F)はK<sub>9</sub>ペプチドにより媒介された内部移行を示す。

【図9】トリブロックコポリマーが毒性かどうかを測定するために、MTTアッセイ法が用

いられた。対照としてLF2000を用いる、(A)PEG-PPS<sub>5,10</sub>-TATポリマーおよび(B)PEG-PPS<sub>5,10</sub>-K9ポリマーについてのMTT毒性アッセイが示されている。リポフェクタミンを用いるトランスフェクションは結果として、10pmolより多いsiRNAが用いられる場合、有意な毒性を生じたが、本発明のすべてのABCトリブロックポリマーについて、毒性は、100pmol siRNA、用いられた最高濃度、まで極小であったことに注目されたい。

【図10】siRNA GAPDH下方制御アッセイ法である。HeLa細胞に、血清の存在下または非存在下において、TATに基づいたポリマー(A)またはK9に基づいたポリマー(B)を用いてGAPDH酵素をコードするsiRNAをトランスフェクションした。LF2000は対照として用いられた。統計学的解析は、多重比較およびテューキー解析を用いて行われた。記号\*および\*\*は、それぞれ、 $p<0.05$ および $p<0.001$ のレベルにおける統計学的有意性を示す。記号†は、少なくとも $p<0.05$ の有意性を示す。

【図11】異なるsiRNA濃度：10pmol、20pmol、または100pmolにおけるsiRNA GAPDH送達である。100pmolにおけるLF2000でのトランスフェクションは試みられたが、極度の毒性のためにいずれの細胞も生存しなかった。PEG-PPS<sub>5,10</sub>-TAT(A)およびPEG-PPS<sub>5,10</sub>-K9(B)についてのトランスフェクションは、複合体の最低濃度から開始して下方制御が可能であることを示している。100pmol siRNAにおいて、PEG-PPS<sub>5</sub>-K9は、この送達ストラテジーの効果を示す見事な90.5% GAPDHサイレンシングを達成することができた。