(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7644105号
(P7644105)

(45)発行日　令和7年3月11日(2025.3.11)

(24)登録日　令和7年3月3日(2025.3.3)

(51)国際特許分類		FI		
C07K 19/00 (2006.01)		C07K	19/00	ZNA
C12N 15/113 (2010.01)		C12N	15/113	Z
C12N 15/87 (2006.01)		C12N	15/87	Z
A61K 9/51 (2006.01)		A61K	9/51	
A61K 31/7088 (2006.01)		A61K	31/7088	

請求項の数　20　（全16頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-520803(P2022-520803)
(86)(22)出願日　令和2年10月5日(2020.10.5)
(65)公表番号　特表2022-550901(P2022-550901A)
(43)公表日　令和4年12月5日(2022.12.5)
(86)国際出願番号　PCT/US2020/054251
(87)国際公開番号　WO2021/067930
(87)国際公開日　令和3年4月8日(2021.4.8)
審査請求日　令和5年10月5日(2023.10.5)
(31)優先権主張番号　62/915,450
(32)優先日　令和1年10月15日(2019.10.15)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/910,760
(32)優先日　令和1年10月4日(2019.10.4)
最終頁に続く

(73)特許権者　509127310
サーナオミクス インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 メリーランド ２０８７６，ジャーマンタウン，セニカ メドーズ パークウェイ ２０５１１，スイート ２００
(74)代理人　110002077
園田・小林弁理士法人
(72)発明者　ルー，シャオヤン
アメリカ合衆国 メリーランド ２０８７９，ゲイザースバーグ，プロフェッショナル ドライブ ４０１，スイート ２８０，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　ルー，パトリック ワイ.
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　核酸治療薬のための腫瘍標的化ポリペプチドナノ粒子送達システム

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

核酸結合ドメイン、ポリマースペーサー分子及び細胞特異的標的化リガンドを含む線状又は分岐状ペプチドであって、前記核酸結合ドメインが、ＫＨＨＨＫＨＨＨＫＨＨＨＫＨＨＨＫＳＳＳＣ（配列番号：１１）、（ＫＨＨＨ）$_4$ＫＳＳＣ（配列番号：１３）、（ＫＨＨＨＫＨＨＨＫＨＨＨＫＨＨＨ）$_2$ＫＣＳＳＣ、ＫＨＨＨＫＨＨＨＫＨＨＨＫＨＨＨＫＣＳＳＣ（配列番号：１２）、又はＫ（ＨＨＨＫ）$_4$ＣＳＳＣ（配列番号：１）を含む、ペプチド。

【請求項２】

ポリマースペーサー分子が、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を含み、かつ核酸結合ドメインと細胞特異的標的化リガンドの間に配置されている、請求項１に記載のペプチド。

【請求項３】

細胞特異的標的化リガンドが、低分子、ペプチド、タンパク質、抗体及びアプタマーからなる群から選択される、請求項１又は２のいずれか一項に記載のペプチド。

【請求項４】

標的化リガンドの数が１～４である、請求項３に記載のペプチド。

【請求項５】

標的化リガンドが、環状（ｃ）ＲＧＤ、ＡＰＲＰＧ（配列番号：２）、ＮＧＲ、Ｆ３ペプチド、ＣＧＫＲＫ（配列番号：３）、ＬｙＰ－１、ｉＲＧＤ、ｉＮＧＲ、Ｔ７ペプチド（ＨＡＩＹＰＲＨ（配列番号：４））、ＭＭＰ２－切断可能オクタペプチド（ＧＰＬＧＩ

ＡＧＱ（配列番号：５））、ＣＰ１５（ＶＨＬＧＹＡＴ（配列番号：６））、ＦＳＨ（ＦＳＨ－β、３３～５３アミノ酸）、ＹＴＲＤＬＶＫＤＰＡＲＰＫＩＱＫＴＣＴＦ（配列番号：７）、ＬＨＲＨ（ＱＨＴＳＹｋｃＬＲＰ（配列番号：８））、ガストリン放出ペプチド（ＧＲＰ）（ＣＧＧＮＨＷＡＶＧＨＬＭ（配列番号：９））及びＲＶＧ（ＹＴＷＭＰＥＮＰＲＰＧＴＰＣＤＩＦＴＮＳＲＧＫＲＡＳＮＧ（配列番号：１０））からなる群から選択される、請求項３に記載のペプチド。

【請求項６】

標的化リガンドが、葉酸、ＲＧＤ又はＧａｌＮＡｃである、請求項４に記載のペプチド。

【請求項７】

請求項１に記載のペプチド、並びにヒスチジン（Ｈ）及びリジン（Ｋ）リッチな反復単位を有する分岐状ポリペプチドを含む、組成物であって、分岐状ポリペプチドが、Ｋ（ＨＨＨＫ）４（配列番号：１４）又はＫＨＨＨＫＨＨＨＨＫＨＨＨＫＨＨＨＫ反復単位（配列番号：１８）の４分岐を含む、組成物。

【請求項８】

請求項１に記載のペプチドと核酸を含む、組成物。

【請求項９】

核酸が、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、アンチセンスオリゴヌクレオチド、プラスミド、ｍＲＮＡ、ＲＮＡｚｙｍｅ、ＤＮＡｚｙｍｅ及びアプタマー配列からなる群から選択される、請求項８に記載の組成物。

【請求項１０】

第２の核酸をさらに含む、請求項８又は９に記載の組成物。

【請求項１１】

第１の核酸配列がｓｉＲＮＡであり、第２の核酸がｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、アンチセンスオリゴ、プラスミド、ｍＲＮＡ、ＲＮＡｚｙｍｅ、ＤＮＡｚｙｍｅ又はアプタマー配列である、請求項１０に記載の組成物。

【請求項１２】

請求項１に記載のペプチドと核酸を含む、核酸を哺乳動物細胞に送達するためのキット。

【請求項１３】

核酸がｉｎ　ｖｉｔｒｏで細胞に送達される、請求項１２に記載のキット。

【請求項１４】

核酸がｉｎ　ｖｉｖｏで細胞に送達される、請求項１２に記載のキット。

【請求項１５】

哺乳動物細胞がヒト細胞である、請求項１２に記載のキット。

【請求項１６】

治療的有効量の請求項８から１１のいずれか一項に記載の組成物を含む、哺乳動物を治療するための医薬。

【請求項１７】

哺乳動物がヒトである、請求項１６に記載の医薬。

【請求項１８】

ａ）請求項１に記載のペプチドを核酸と混合して、複合体を形成する工程、ｂ）ヒスチジン（Ｈ）及びリジン（Ｋ）リッチな反復単位を有する分岐状ポリペプチドであって、Ｋ（ＨＨＨＫ）４（配列番号：１４）又はＫＨＨＨＫＨＨＨＨＫＨＨＨＫＨＨＨＫ反復単位（配列番号：１８）の４分岐を含む分岐状ポリペプチドを規定の比率で混合物に添加して、ナノ粒子を形成する工程、及びｃ）ナノ粒子を回収する工程を含む、請求項８に記載の組成物の製造方法。

【請求項１９】

ナノ粒子サイズが５０～３００ｎｍである、請求項１８に記載の方法。

【請求項２０】

核酸がｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、アンチセンスオリゴ、プラスミド、ｍＲＮＡ、ＲＮＡｚｙｍｅ、ＤＮＡｚｙｍｅ又はアプタマー配列である、請求項１８又は１９に記載の方法。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願への相互参照
本出願は、３５ Ｕ．Ｓ．Ｃ．§１１９（ｅ）の下、２０１９年１０月４日出願の、米国仮特許出願第６２／９１０，７６０号及び２０１９年１０月１５日出願の米国仮特許出願第６２／９１５，４５０号の優先権を主張するものであり、その内容全体が参照により本明細書に組み入れられる。
配列表
本出願は、ＡＳＣＩＩ形式で電子的に提出された配列表を含み、参照によりその全体が本出願に組み込まれる。２０２０年１２月１１日に作成された前記ＡＳＣＩＩの写しは、4690_0026i_SL.txtという名前であり、サイズは５，７３２バイトである。
【０００２】
核酸の送達システム及び使用方法が提供され、核酸分子の標的化送達又は局所的送達の方法が含まれる。
【背景技術】
【０００３】
治療薬の標的化送達は、有効性を上昇させながら、副作用を低減させ、腫瘍処置を改善するために、大きな興味及び利益を引き寄せている。腫瘍中のナノ粒子（ＮＰ）の集積は、血管透過性滞留性亢進（ＥＰＲ）効果によるものであると考えられている（Ｍａｅｄａ、Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、２１：７９７～８０２（２０１０））。そのため、腫瘍送達は、粒子を腫瘍局在性リガンドでコーティングすることにより改善し得る。リガンドがカーゴ（例えばｓｉＲＮＡ）の抗腫瘍有効性を上昇させる機構は未だ議論されている。腫瘍表面マーカーへの結合が増強すれば、非標的化組織と比較して、腫瘍におけるＮＰの集積を上昇させ得る。他の研究者は、腫瘍細胞内の標的化及び非標的化ＮＰの集積が同等であると主張してきた。標的化ＮＰの有効性の上昇は、受容体介在性のエンドサイトーシスの増強及びｓｉＲＮＡ治療薬の細胞内局在の上昇により引き起こされると示唆された。Ｂａｒｔｌｅｔｔら、（２００７）：Ｐｒｏｃ． Ｎａｔ’ｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、１０４：１５５４９～１５５５４（２００７）。両方の機構が、リガンド標的化治療及び有効性において必須の役割を果たしている可能性が最も高い。
【０００４】
ｉｎ ｖｉｖｏにおけるｓｉＲＮＡの標的化送達は挑戦的であり、これは、血清ヌクレアーゼによる分解及び急速なクリアランス、エンドソーム捕捉、並びにナノ粒子（ＮＰ）による自然免疫刺激によるものである。近年、ｓｉＲＮＡの標的化送達について、前臨床及び臨床治験において非常に限定的な方法が開発されている。１つの手法は、Ａｌｎｙｌａｍによるものである。これにより、合成トリアンテナリーＮ－アセチルガラクトサミン（ＧａＬＮＡｃ）ベースのリガンドが化学修飾されたｓｉＲＮＡにコンジュゲートしているＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡが開発された。これにより、ＡＳＧＰＲ介在性の肝細胞への効率的な送達が可能になった。Ｍａｊａら；Ｎａｔｕｒｅ Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ、９：７２３（２０１８）。ＧａＬＮＡｃは、肝臓において、肝臓特異的アシアロ糖タンパク質受容体（ＡＳＧＰＲ）を標的とする。他の例は、Ｓａｎｏｆｉ Ｇｅｎｚｙｍｅによる、血友病及び希少出血性疾患（ＲＢＤ）の治療のためのＦｉｔｕｓｉｒａｎ（ＡＬＮ－ＡＴ３、第二相臨床治験、Ａｌｎｙｌａｍ）である。これは、皮下投与され、ＲＮＡｉ治療薬は、アンチトロンビン（ＡＴ）を標的とすることを目的としている。別の事例では、標的化リガンドが、複数の成分がｓｉＲＮＡと共に共組織化したときに、リポソーム製剤に組み込まれた。この種類のシステムは、リポソームの安定性、生体適合性、毒性、大規模の製造及び長期保存の点で、課題を多く保持している。Ｌｅｎｇら、Ｊ． Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ、ＩＤ６９７１２９７、（２０１７）。最も近年には、ポリペプチド／ポリマー及びｓｉＲＮＡにより形成されたナノ粒子が、ｉｎ ｖｉｖｏにおいてｓｉＲＮＡを効率的に送達し、これらの生成物のいくつかは、早期臨床治験に入っている。例えば

、ヒスチジン（Ｈ）－リジン（Ｋ）リッチなポリペプチドは、二重ｓｉＲＮＡをその標的に安全かつ有効に送達し、その治療的有効性を達成している。リード薬物の１つは、第ＩＩａ相臨床治験で試験されている。参照：Ｚｈｏｕら、Ｏｎｃｏｔａｒｇｅｔ、８：８０６５１～８０６６５（２０１７）；国際公開第２０１１／１４０２８５号。

発明の概要

【図面の簡単な説明】

【０００５】

【図１】腫瘍標的化ＨＫＣ／ＨＫＰ又はＨＫＰ（＋Ｈ）ポリペプチドナノ粒子送達システムを示す図である。グラフは、（Ａ）特異的なヒスチジン／リジン配列を有する分岐状ポリペプチドＨ３Ｋ４Ｂ（ＨＫＰ）又はＨ３Ｋ（＋Ｈ）４ｂ又は（ＨＫＰ（＋Ｈ））、（Ｂ）腫瘍標的化リガンド、例えばＲＧＤ、葉酸、又はＳｍＡｂ等を有する末端システインによって官能化された線状ポリペプチドと、選択されたｓｉＲＮＡとの間の腫瘍標的化ポリペプチドナノ粒子の形成及びＨＫＣポリペプチド－ｓｉＲＮＡナノプレックス形成を示す。

【図２】ＨＫＣ－ＰＥＧ－標的化リガンド官能化ポリペプチド（ＨＫＣ＝ＨＫＣ１、ＨＫＣ２又はＨＫ２Ｃ、図３参照）の調製の概略図である。ＨＫＣは、穏やかな条件下でチオール／マレイミド付加反応を介してマレイミド官能化ＰＥＧ連結標的化モチーフ、例えば（葉酸、ＲＧＤ、ｍＡｂ等）とコンジュゲートした末端システインを有する。

【図３】Ｈ３Ｋ４ｂ（略語ＨＫＰ）分岐状ペプチドの構造、末端部位に１つのシステインを有するＨ３Ｋ４Ｃ（略語ＨＫＣ１又はＨＫＣ）の構造、及び配列中に２つのシステインを有するＨＫＣ２の構造を示す図である。配列［（ＫＨＨＨ）$_4$］$_2$ＫＸＣを有する２分岐システイン含有ペプチドＨＫ２Ｃ。図３の（ａ）は配列番号：１５を開示し、図３の（ｃ）は配列番号：１６を開示する。

【図３Ｂ】ＨＫＣのＨＰＬＣクロマトグラム、逆相Ａｌｌｔｉｍａ（商標）カラムＣ－１８（４．６ｘ２５０ｍｍ）、室温における溶出＝１５．１９６、水（０．０６５％ＴＦＡ）及びアセトニトリル（０．０５％ＴＦＡ）の勾配による、＞９１％を示す図である。

【図３Ｃ】１３３５．６［Ｍ］$^{2+}$に二重電荷分子イオンピークが観察された、ＨＫＣ１化合物の質量分析（ＥＳＩ－ＭＳ、正）を示す図である。

【図４】ＨＫＣ２－Ｐｅｇ$_{1000}$－葉酸の調製経路を示す図であり、ＨＫＣ１は、塩基性条件下のチオール／マレイミド付加反応を介してマレイミド－ＰＥＧ－葉酸と反応し、コンジュゲーション生成物が得られた。溶媒を除き、次いで透析による精製の後、ＨＫＣ１－Ｐｅｇ$_{1000}$－葉酸が得られた。

【図５】^{1}Ｈ　ＮＭＲによるＨＫＣ２－ＰＥＧ１ｋ－葉酸の特徴づけを示す図であり、（上）Ｄ$_2$Ｏ中のＨＫＣ２及び（中央）ＤＭＳＯ－ｄ$_6$中のＨＫＣ２－ＰＥＧ１ｋ－葉酸及び（下）葉酸－ＰＥＧ１ｋ－Ｍａｌである。ＨＫＣは、葉酸－ＰＥＧ１ｋ－Ｍａｌと共有結合し、７．０ｐｐｍにおけるマレイミド二重結合の特徴的なシグナルは、システインとの反応後消失した。

【図６】水中のＨＫＣ２－ＰＥＧ１ｋ－葉酸（上部、赤色曲線）及び葉酸－ＰＥＧ１ｋ－Ｍａｌ（下部、灰色曲線）のＵＶ／Ｖｉｓ（水、２５℃）分光分析を示す図である。ペプチドについては２２０ｎｍ及び葉酸については２７５ｎｍにおける特徴的な吸収度が生成物スペクトルにおいて観察された。

【図７】ＨＫＣ２－ＰＥＧ１ｋ－葉酸のＭＡＬＤＩ－ＭＳ（正）分光分析を示す図であり、４３０２Ｍ$^+$周辺の分子イオンピークは、カップリング反応からのＨＫＣ２の変換が成功していることを示す。

【図８】２工程のＨＫＣ２－ＰＥＧ２ｋ－ＲＧＤの調製を示す図である。第１の工程は、ｃ（ＲＧＤｆｋ）とＮ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）及びマレイミド（Ｍａｌ）官能基を有する二官能性ＰＥＧ分子の間のカップリングであって、アミンとＮＨＳの間のカップリングを介してアミド結合が形成される。第２の工程において、ＨＫＣ（配列番号：１７）のチオールは、ＲＧＤ－ＰＥＧ２０００－Ｍａｌのマレイミドと反応し、ＲＧＤ結合ＰＥＧリンカーポリペプチドＨＫＣ２－ＰＥＧ２０００－ＲＧＤが得られる。

【図９】^{1}Ｈ　ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－ｄ６、２５℃）分光分析によるＲＧＤ－ＰＥＧ２ｋ－

Ｍａｌ中間体の特徴づけを示す図である。８．５～７．２ｐｐｍにおけるＲＧＤシグナル及び７．００ｐｐｍにおけるマレイミドシグナル、約３．５ｐｐｍにおけるＰＥＧエチレンのブロードピークを観察し得る。

【図１０】ＲＧＤ標的化リガンドによるＨＫＣ２誘導体化の^{1}Ｈ　ＮＭＲ分光分析によるＨＫＣ２－ＰＥＧ－ＲＧＤの特徴づけのスタックプロット比較を示す図である。

【図１１】システイン上のチオールとＭａｌの間のカップリングを介したＳ－Ｃ結合を形成する、ＨＫＣ１とマレイミド（Ｍａｌ）官能基を有する三価ＧａｌＮＡｃ－ＰＥＧ分子とのコンジュゲーションからのＨＫＣ１－ＰＥＧｎ－ＧａｌＮＡｃ（ｎ＝６、１２、２４）の調製を示す図である。当該図は、配列番号：１１としてＫＨＨＨＫＨＨＨＫＨＨＨＫＨＨＨＫＳＳＳＣを開示する。

【図１２】ナノ粒子形態のＨＫＣ：ＨＫＰ：ＴＧＦβ１の製剤及びそのサイズ分布を示す図である。ＨＫＣ＝ＨＫＣ２＝Ｋ（ＨＨＨＫ）$_{4}$ＣＳＳＣ（配列番号：１）、ＨＫＰ＝Ｈ３Ｋ４ｂ。

【図１３】ナノ粒子形態のＨＫＣ：ＨＫＰ：ＴＧＦβ１の製剤及びその多分散指数を示す図である。ＨＫＣ＝ＨＫＣ２＝Ｋ（ＨＨＨＫ）$_{4}$ＣＳＳＣ（配列番号：１）、ＨＫＰ＝Ｈ３Ｋ４ｂ。

【図１４】ＨＫＰ単独又は種々の量のＨＫＰ及びＨＫＣ２と組み合わせて製剤化したＣｅｌｌ　Ｄｅａｔｈ　ｓｉＲＮＡによる処置のヒト膠芽細胞腫Ｔ９８Ｇ細胞の生存率に対する効果を示す図である。ＨＫＣ２（１６０ｎｇ／μＬ）、ＨＫＰ（３２０ｎｇ／μＬ）及びｓｉＲＮＡ（８０ｎｇ／μＬ）の水溶液を規定の比率で混合し、室温で３０分間インキュベーションした。トランスフェクション複合体を、ＯＰＴＩ－ＭＥＭで希釈し、新鮮な培地を補充した培地１００μＬ中の細胞に添加した。トランスフェクション培地を、６時間後に１０％ＦＢＳ／ＤＭＥＭ又はＥＭＥＭに交換した。トランスフェクションの７２時間後に、生細胞の数を、ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ　Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ細胞生存率アッセイ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用して評価した。未処置の細胞から得た値（ブランク）を１００％に設定した。全ての値は、ＮＳ－非サイレンシングｓｉＲＮＡ、ＣＤ－Ｃｅｌｌ　Ｄｅａｔｈ　ｓｉＲＮＡの４反復の±Ｓ．Ｄ．の平均を表す。

【図１５】ＨＫＰ単独又は種々の量のＨＫＰ及びＨＫＣ２と組み合わせて製剤化したＣｅｌｌ　Ｄｅａｔｈ　ｓｉＲＮＡによる処置のヒト肝細胞癌ＨｅｐＧ２細胞の生存率に対する効果を示す図である。ＨＫＣ２（１６０ｎｇ／μＬ）、ＨＫＰ（３２０ｎｇ／μＬ）及びｓｉＲＮＡ（８０ｎｇ／μＬ）の混合物の水溶液を室温で３０分間インキュベートした。トランスフェクション複合体は、ＯＰＴＩ－ＭＥＭで希釈し、新鮮な培地を補充した培地１００μＬ中の細胞に添加した。トランスフェクション培地は、６時間後に１０％ＦＢＳ／ＤＭＥＭ又はＥＭＥＭに交換した。トランスフェクションの７２時間後に、生細胞の数を、ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ　Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ細胞生存率アッセイ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用して評価した。未処置の細胞から得た値（ブランク）を１００％に設定した。全ての値は、ＮＳ－非サイレンシングｓｉＲＮＡ、ＣＤ－Ｃｅｌｌ　Ｄｅａｔｈ　ｓｉＲＮＡの４反復の±Ｓ．Ｄ．の平均を表す。

【図１６】ＨＫＣ２－ＰＥＧ１ｋ－葉酸、Ｈ３Ｋ４ｂ（ＨＫＰ）及びｓｉＲＮＡの間での自己組織化を介した製剤及びナノ粒子形成を示す図である。ＴＧＦβ１を、水中で８０ｎｇ／μＬで使用し、等容積の水中ＨＫＣ及びＨＫＰと混合した。

【図１７】ＨＫＣ１－ＰＥＧ－葉酸、Ｈ３Ｋ４ｂ（ＨＫＰ）及びｓｉＲＮＡの間での自己組織化を介したナノ粒子形成の多分散指数を示す図である。ＴＧＦβ１（水中８０ｎｇ／μＬ）と等容積の水中ＨＫＣ及びＨＫＰを混合した。

【発明を実施するための形態】

【０００６】

ｉｎ　ｖｉｔｒｏ及びｉｎ　ｖｉｖｏ送達のために核酸を腫瘍標的化するための新規の手法が提供される。本明細書で使用する、ヒスチジン（Ｈ）－リジン（Ｋ）リッチなポリペプチド（ＨＫＰ）は、核酸結合ドメインを含み、非細胞特異的形質導入機能（例えば、細胞膜を非選択的に通過する能力）を提供する４分岐反復（Ｈ３Ｋ）４単位を含む、正に荷

電したペプチドを記載するのに使用した。Ｃｈｏｕら、Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ、３５、８４６～８５５（２０１４）。Ｈ３Ｋの４反復単位及び、末端の標的化リガンドを有する線状ペプチド（略語ＨＫＣ）を使用した。このペプチドは、核酸結合ドメイン及び細胞特異的標的化機能の両方を含むため、物質が細胞膜を通過し、特異的に核酸を特定の細胞種に送達するのを補助し得る。

【０００７】

いくつかの実施形態において、目的の標的細胞に核酸を送達するための組成物及び方法が提供される。いくつかの実施形態において、組成物は、分岐状ポリペプチド（ＨＫＰ）及び線状ペプチド（ＨＫＣ）を含む。さらなる別の実施形態において、この組成物は、１つ又は複数の核酸を含む。いくつかの実施形態において、組成物は、薬学的に許容される担体を含む。

【０００８】

いくつかの実施形態において、４分岐ヒスチジン－リジンリッチなポリペプチドは、ａ）核酸を１つ又は複数の特定の細胞種への標的化、及びｂ）標的化された核酸の特定の細胞内相互作用部位への送達に有効な担体である特定の構造及び機能的な性質を有する線状ペプチドを有する製剤において使用する。いくつかの実施形態において、線状ペプチドは、細胞特異的な標的化リガンド（例えば、低分子又は環状ペプチドベースのホーミングドメイン）を含み、これは、核酸に結合し、かつ標的化された細胞のサイトゾルに核酸を送達するのを補助する細胞配向及び輸送性質を提供する正に荷電した線状ＨＫＣペプチドとコンジュゲートされている。

【０００９】

他の態様において、直接的な共有結合性連結戦略によって担体を送達するための標的化リガンドをコンジュゲートするための方法が提供される。いくつかの実施形態において、標的化リガンド（例えば、葉酸、ＲＧＤ又はペプチド）は、共有結合の形成による化学反応を介した、線状ヒスチジン－リジンリッチなシステイン含有（ＨＫＣ）ペプチドと効果的にコンジュゲートされていた。この方法は、種々の標的化リガンドを、標的核酸を保護するための送達システムに導入するための多用途プラットフォームを提供する。正に荷電したペプチドＨＫＣとリガンドとの間の化学的コンジュゲーションは、ジスルフィド結合、チオール／マレイミドからの硫黄－炭素結合、又は任意の他の共有結合又はヒドラジン及びアミド等の生分解性結合でもよいが、この種類に必ずしも限定されるものではない。

【００１０】

さらに他の態様において、標的化リガンドを有する線状ペプチドであるポリペプチド（ＨＫＰ）、及び腫瘍標的化のためのｓｉＲＮＡのナノ粒子製剤化のための新規の方法が提供される。いくつかの実施形態において、核酸は、細胞標的に結合するモチーフを含む標的化線状ポリペプチド及び分岐状ポリペプチドを含む複合体中で送達される。２つのペプチドを、ナノ粒子形態で、標的核酸との混合物中で規定の比率で製剤化する。いくつかの実施形態において、ペプチド／核酸複合体の負電荷（例えば核酸から）の正電荷（例えば、ペプチド及びポリペプチド）に対する比率は、複合体の非細胞特異的な形質導入性質の強さに影響を与え得る。

【００１１】

他の態様において、１つ又は複数の核酸を細胞標的に送達するための組成物及び方法が提供される。いくつかの実施形態において、ペプチド／核酸複合体において、１つ又は複数の核酸は、同時にナノ粒子内で送達された。いくつかの実施形態において、化学療法薬物は、ナノ粒子複合体内で共製剤化し得る。これは、腫瘍の治療のための組合せ両方に利点及び利益を提供する。

【００１２】

したがって、これら及び他の態様は、任意の目的の細胞を標的化するために、任意の種類の標的化モチーフを導入し得るシステムである送達プラットフォームを提供する。いくつかの実施形態において、リンカー（例えば、ｐｅｇ又はポリマー）を介して標的リガンドをペプチドにコンジュゲーションする段階的な方法が開発され、本出願で提示されてい

る。種々の標的化リガンドは、目的の任意の細胞種に対する特異的な形質導入性質を提供する。いくつかの実施形態において、ＨＫ正反復単位を有するペプチド中の結合ドメインは、ヒスチジンとホスフェートとの間の水素結合及びプロトン化したリジンとホスホネートとの間のイオン－イオン相互作用を介して負に荷電した核酸に結合する。核酸は保護され、目的の細胞の標的化された領域に送達された。

【００１３】

標的化リガンドの観点において、ペプチドは、環状（ｃ）ＲＧＤ、ＡＰＲＰＧ（配列番号：２）、ＮＧＲ、Ｆ３ペプチド、ＣＧＫＲＫ（配列番号：３）、ＬｙＰ－１、ｉＲＧＤ、ｉＮＧＲ、Ｔ７ペプチド（ＨＡＩＹＰＲＨ（配列番号：４））、ＭＭＰ２－切断可能オクタペプチド（ＧＰＬＧＩＡＧＱ（配列番号：５））、ＣＰ１５（ＶＨＬＧＹＡＴ（配列番号：６））、ＦＳＨ（ＦＳＨ－β、３３～５３アミノ酸、ＹＴＲＤＬＶＫＤＰＡＲＰＫＩＱＫＴＣＴＦ（配列番号：７））、ＬＨＲＨ（ＱＨＴＳＹｋｃＬＲＰ（配列番号：８））、ガストリン放出ペプチド（ＧＲＰ）（ＣＧＧＮＨＷＡＶＧＨＬＭ（配列番号：９））、ＲＶＧ（ＹＴＷＭＰＥＮＰＲＰＧＴＰＣＤＩＦＴＮＳＲＧＫＲＡＳＮＧ（配列番号：１０））でもよい。いくつかの実施形態において、標的化リガンドは、さらなる有効性のために１つのシステム内で二価又は三価のホモ又はヘテロペプチドリガンドの組合せに組み込むことができる。

【００１４】

したがって、本発明の態様は、モジュール性であり、任意の核酸を任意の目的の細胞に送達するのに適用し得る送達プラットフォームを提供する。いくつかの実施形態において、多価ペプチド成分と、ｓｉＲＮＡ、ｍＲＮＡ又はＤＮＡとを含み、ナノ粒子を形成する組成物が提供される。複合体形成は、有効にｓｉＲＮＡ、ｍＲＮＡ又はＤＮＡを保護し、細胞に送達する。いくつかの実施形態において、核酸は可逆的にペプチド担体に結合しており、これによって腫瘍特異的細胞に貫通し、核酸をエンドソームから放出し、標的遺伝子に到達させることが可能になる。

【００１５】

本明細書に記載するｓｉＲＮＡ送達担体の生成は、分岐状ポリペプチド（ＨＫＰ）、線状ペプチド（ＨＫＣ）及びｓｉＲＮＡを組み合わせることによって生じてよく、（ａ）正に荷電した線状ペプチド、例えば標的化基又は他の機能的部分を連結するための官能基を有するペプチドＨＫＣを調製し；（ｂ）生成物の共有結合及び回収を介して標的化リガンドの線状ペプチドＨＫＣへ結合させ；（ｃ）分岐状ポリペプチド（ＨＫＰ）、工程（ｂ）の標的化リガンドを有する線状ペプチドＨＫＣ及びｓｉＲＮＡを安定的に組み合わせて均一なナノ粒子を生成する工程を含む方法によって実施し得る。上記の方法において、工程は、同時に行って、それにより好ましい相互作用及びナノ粒子形成を可能にするものであってもよい。この方法によるポリマー性ナノ粒子は、水溶液の種々のｓｉＲＮＡと複合体を有効に形成してポリナノ粒子を形成し、これは、標的化効果を介して特定の疾患に選択的に集積させることができる。好ましくは、本明細書に記載するポリナノ粒子のサイズは、記載する生成方法に基づいて、１０ｎｍ～３０００ｎｍの範囲でもよい。前臨床試験によれば、好ましいサイズは、動的光散乱法によって決定される４０～３００ｎｍであろう。

【００１６】

さらに、本明細書に記載するＨＫＣポリペプチド－核酸送達システムは、薬学的組成物の有効成分として使用し得る。したがって、治療的有効用量のＨＫＣペプチド及び核酸を混合物形態で含む薬学的組成物が提供される。これは、投与方法と共に本明細書に記載されている、ＨＫＣポリペプチド－核酸送達システムに加えて、１つ又は複数の種類の薬学的に適合性のポリマー又は担体を含み得る。

【００１７】

得られた生成物は、例えば、散剤、液剤、固相、カプセル剤、又は注入可能な形態等の形態で製剤化されてよく、これは、核酸－ペプチドポリナノ粒子の安定性及び有効性を維持するために１つ又は複数の有効な成分、例えば食塩水溶液、バッファー溶液又は他の適合性の成分と混合されてもよい。

【００１８】
本明細書に記載する薬学的組成物は、標準的な方法、例えば経口又は非経口投与によって投与し得る。
【実施例】
【００１９】
実施例１．ペプチド　ＨＫＣ１及びＨＫＣ２の合成
ＨＫＣ１の設計したペプチド配列（配列：ＫＨＨＨＫＨＨＨＫＨＨＨＫＨＨＨＫＳＳＳＣ（配列番号：１１））を、固相合成装置によって図３に記載するように合成した。生成物を水（０．０６５％ＴＦＡ）及びアセトニトリル（０．０５％ＴＦＡ）を使用したＨＰＬＣによって精製し、ＨＰＬＣのクロマトグラムを図３Ａに示す。Ｈ３Ｋ４Ｃ（略語ＨＫＣ１）の構造は、末端部位に１つのシステインを有する。構造を図３Ｂに示すように質量分析によってさらに確認した。
【００２０】
ＨＫ２Ｃの第２の設計したペプチド配列（配列：（ＫＨＨＨＫＨＨＨＫＨＨＨＫＨＨＨ）$_2$ＫＣＳＳＣ）を、固相合成装置によって図３Ｂに示すように同様の方法で合成した。
【００２１】
ＨＫＣ２の第３の設計したペプチド配列（配列：ＫＨＨＨＫＨＨＨＫＨＨＨＫＨＨＨＫＣＳＳＣ（配列番号：１２））を、例えば米国特許第７，０７０，８０７号、同第７，１６３，６９５号及び同第７，７７２，２０１号に記載するように固相合成した。
【００２２】
実施例２．スルフィドマレイミドカップリング反応を介したＨＫＣ２ペプチドの架橋
図２は、カップリングの一般的なスキームを示す。Ｈ３Ｋ４Ｃ－ＰＥＧ－標的化リガンド官能化ポリペプチドの調製には、標的化モチーフで官能化されたＰＥＧを使用する。標的化モチーフ、例えば葉酸、ＲＧＤ及び／又はモノクローナル抗体を有するこのようなＰＥＧは、市販のものであっても、又は当技術分野において周知の方法を使用して事前に調製していてもよい。末端システインを有するＨＫＣを、マレイミド官能化ＰＥＧ連結標的化モチーフ、例えば（葉酸、ＲＧＤ、ｍＡｂ等）に、図２に示すように穏やかな条件下のチオール／マレイミド付加反応を介してコンジュゲートした。
【００２３】
実施例３．ＨＫＣ２ペプチドの葉酸との架橋
標的化リガンドを、カップリング反応におけるチオールとマレイミドとの間の共有結合の形成を介して、ＨＫＣペプチド上に取り付けた。図４は、ＨＫＣ２－ＰＥＧ１０００－葉酸を調製するためのスキームを示す。葉酸－ＰＥＧ１０００－Ｍａｌ（６．０ｍｇ、３．７ｍｍｏｌ）を無水ＤＭＦ（２．０ｍＬ）に溶解した後、無水ＤＭＦ中のトリメチルアミン（５２ｕＬ、０．７２６ｇ／ｍＬ）を添加した。脱気した水（１００μＬ）及びＤＭＦ（３００μＬ）の混合物中のＨＫＣ（１０．０ｍｇ、３．７ｍｍｏｌ）を、超音波処理及び撹拌によって、窒素下、２５℃で混合物に添加した。得られた混合物を窒素下、暗所、２５℃で１５時間撹拌した。ＨＰＬＣ分析によって、出発物質である葉酸－ＰＥＧ１０００－Ｍａｌが完全に消費され、反応が完了していることが示された。反応混合物を冷ジエチルエーテル溶液に注いで、黄色沈殿物を得た。混合物を４０００ｒｐｍで１０分間遠心分離し、最上部の透明の上清を廃棄した。黄色沈殿物をアセトン（５．０ｍＬ）で洗浄して再度遠心分離し、上清を廃棄した後の生成物を回収した。生成物をさらに分取ＲＰ－ＨＬＰＣ又は水中での透析によって精製し、純粋な生成物を得た。生成物の溶液を凍結乾燥させ、前記生成物を黄色粉末として得た（１２ｍｇ、収率７５％）。
【００２４】
実施例４．^{1}Ｈ　ＮＭＲによるＨＫＣ２－ＰＥＧ－葉酸の特徴づけ
ＨＫＣ２－ＰＥＧ－葉酸の構造は、ＤＭＳＯ－ｄ$_6$中の^{1}Ｈ　ＮＭＲによって特徴づけ、結果を図５に示す。試料約５ｍｇをＤ$_2$Ｏ又はＤＭＳＯ－ｄ$_6$に溶解し、ｎｍｒスペクトルを４００ＭＨｚで記録した。３つのスペクトルを重ね合わせ、差異を明確に見た。Ｄ$_2$Ｏ中のＨＫＣ２が上部、ＤＭＳＯ－ｄ$_6$中のＨＫＣ２－ＰＥＧ－葉酸を中央、葉酸－Ｐｅ

ｇ１０００－Ｍａｌを下部に示す。ＨＫＣは葉酸－Ｐｅｇ１０００－Ｍａｌに共有結合しており、７．０ｐｐｍにおけるマレイミド二重結合の特徴的なシグナルは、システインとの反応後に消失した。ＰＥＧ基のCH_2プロトンは、３．５ｐｐｍ領域に存在し、ペプチドプロトンは、ＨＫＣ２－ＰＥＧ－葉酸の６．０～９．０ｐｐｍに位置する。

【００２５】

実施例５．ＵＶ／Ｖｉｓ分光分析によるＨＫＣ２－ＰＥＧ－葉酸の特徴づけ

ＨＫＣ２－ＰＥＧ－葉酸の構造をさらにＵＶ／Ｖｉｓ分光分析によって特徴づけ、結果を図６に示す。ＨＫＣ２－ＰＥＧ－葉酸（上部、赤色曲線）及び葉酸－ＰＥＧ－Ｍａｌ（下部、灰色曲線）のＵＶ／Ｖｉｓ分光分析は、室温、水中で測定された。生成物スペクトルでは、ペプチドについては２２０ｎｍ、及び葉酸については２７５ｎｍに特徴的な吸光度が観察された。

【００２６】

実施例６．質量分析によるＨＫＣ２－ＰＥＧ－葉酸の特徴づけ

ＨＫＣ２－ＰＥＧ－葉酸のＭＡＬＤＩ－ＭＳ（正）分光分析は、Ｂｒｕｋｅｒ　Ａｕｔｏｆｌｅｘ　Ｓｐｅｅｄ分光計を使用して記録した。$4302M^+$付近の分子イオンピークの存在は、カップリング反応からのＨＫＣ１の変換が成功したことを示す。図７を参照のこと。

【００２７】

実施例７．ＨＫＣ２－ＰＥＧ２ｋ－ＲＧＤとしてＲＧＤリガンドを含むＨＫＣ２の調製

第１の工程：ｃ（ＲＧＤｆｋ）とＮ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）及びマレイミド（Ｍａｌ）官能基を有する二官能性ＰＥＧ分子との間でカップリングを行い、アミンとＮＨＳエステルとの間のカップリングを介してアミド結合を形成する。図８を参照のこと。ｃ（ＲＧＤｆｋ）（５．０ｍｇ、８．２８μｍｏｌ）を無水ＤＭＦ（１ｍＬ）に溶解し、トリエチルアミン（１０μＬ）を添加した。得られた混合物を室温、N_2下で３０分間撹拌した後、Ｍａｌ－ＰＥＧ２ｋ－ＮＨＳ（１０ｍｇ、８．２８μｍｏｌ）を１回で添加し、１２時間２５℃で撹拌した。反応混合物を冷ジエチルエーテル（２０ｍＬ）に注いだ。混合物を４０００ｒｐｍで１０分間、５℃で遠心分離し、最上部の透明な上清を廃棄した。白色沈殿をアセトンに再懸濁し、冷ジエチルエーテル（１０ｍＬ）を添加し、５分間超音波処理した。４０００ｒｐｍ、５℃で１０分間再び遠心分離することによって、白色沈殿の回収が可能になった。減圧下で乾燥させて、ＲＧＤ－ＰＥＧ２ｋ－Ｍａｌ（１２ｍｇ、収率８０％）を得た。^1H　ＮＭＲスペクトル（４００ＭＨｚ、$DMSO-d_6$）は、７．０ｐｐｍにおいてマレイミドに割り当てられたピークの存在を示したが、ＮＨＳエステル（２．８ｐｐｍ）についてのピークは存在しないことが示された。図９を参照のこと。

【００２８】

この物質を第２の工程に直接使用し、ここで、ＨＫＣ中のチオールが、ＲＧＤ－ＰＥＧ２ｋ－Ｍａｌのマレイミドと反応し、ＲＧＤ結合ＰＥＧリンカーポリペプチドＨＫＣ２－ＰＥＧ２ｋ－ＲＧＤを得た。ＨＫＣ２（５．４ｍｇ、２．０μｍｏｌ）をＤＭＦ（０．６ｍＬ）と脱気した水（１００μＬ）との混合物に溶解した。ＨＫＣ２の溶液を、無水ＤＭＦ（１ｍＬ）に溶解したＲＧＤ－ＰＥＧ２ｋ－Ｍａｌ（５．０ｍｇ、１．６９μｍｏｌ）に撹拌しながら添加した。トリエチルアミン（１００ｕＬ、無水ＤＭＦ中１０μｇ／μＬ）を次いで添加し、混合物をN_2下、２５℃で１５時間撹拌した。反応混合物を冷ジエチルエーテル（２０ｍＬ）に注いだ。混合物を４０００ｒｐｍ、５℃で１０分間遠心分離し、最上部の透明な上清を廃棄した。クルードな生成物を、水を交換しながら、水に対して２日間透析した。減圧下で乾燥させた後、生成物であるＨＫＣ２－ＰＥＧ２ｋ－ＲＧＤを得た（７．１ｍｇ、収率７５％）。生成物を^1H　ＮＭＲ（図１０参照）及び質量分析を含む分光分析法によって特徴づけた。

【００２９】

実施例８．ＨＫＣ－ＰＥＧｎ－ＧａｌＮＡｃとして三価ＧａｌＮＡｃリガンドを含むＨＫＣの調製

ＨＫＣ１（（ＫＨＨＨ）４ＫＳＳＣ（配列番号：１３））、１８．０ｍｇ、６．７５μｍｏｌ）をガラスバイアル中のリン酸バッファー、ｐＨ＝７．２に溶解した。無水ＤＭＦ（３００μＬ）中のＧａｌＮＡｃ３－ＰＥＧ６－Ｍａｌ（２９．３ｍｇ、１．５６μｍｏｌ）を５分間にわたってＨＫＣ１溶液にスプリンジ針によって添加した。得られた混合物を窒素雰囲気下で１６時間撹拌した。ＨＰＬＣモニタリングにより、出発物質ＧａｌＮＡｃが完全に消費されたことが示された後、クルード生成物をＰｉｅｒｃｅ デキストラン脱塩カラムを用いて精製し、純粋な生成物ＧａｌＮＡｃ３－ＰＥＧ６－ＨＫＣ１を１９ｍｇ、収率８０％で白色固体として得た。生成物を、質量分析により（ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ 正）ｍ／ｚ４５９５．８２４［Ｍ＋Ｈ］、計算ＭＷ＝４５９５．９と特徴づけた。ＨＰＬＣ分析により、純度＞９０％が示された。ＧａｌＮＡｃ－ＰＥＧ１２－ＨＫＣ１及びＧａｌＮＡｃ－ＰＥＧ２４－ＨＫＣ１を、ＧａｌＮＡｃ３－ＰＥＧ６－Ｍａｌを対応するＧａｌＮＡｃ－ＰＥＧ１２－Ｍａｌ及びＧａｌＮＡｃ－ＰＥＧ２４－Ｍａｌに置き換えることによって同様の方法で調製した。（図１１に示す反応スキーム）。

【００３０】

実施例９．ナノ粒子の形成におけるＨＫＣ：ＨＫＰ：ＴＧＦβ１の製剤及びそのサイズ分布。ＨＫＣ＝ＨＫＣ２＝Ｋ（ＨＨＨＫ）$_4$ＣＳＳＣ（配列番号：１）。ＨＫＰ＝Ｈ３Ｋ４ｂ。（図１３）。

ＨＫＣ２、ＨＫＰ、ｓｉＲＮＡ（ＴＧＦβ１）のナノ粒子形成を、種々の比率で評価した。ＨＫＣ２をＨＫＰ／ｓｉＲＮＡ製剤に添加すると、同等のナノ粒子サイズが維持されたが、コントロールＨＫＰ／ｓｉＲＮＡ（Ｎ：Ｐ質量比＝４：１）と比較して、有意に多分散指数（ＰＤＩ）が狭くなった。ＨＫＣ２／ＨＫＰ／ｓｉＲＮＡは、質量比０：４：１、１：４：１、１：３：１、２：３：１、２：２：１、３：１：１で製剤化した。ＨＫＣ２（１６０ｎｇ／μＬ）、ＨＫＰ（３２０ｎｇ／μＬ）及びｓｉＲＮＡ（８０ｎｇ／μＬ）の水溶液を規定の比率で混合し、３０分間室温でインキュベートした。次いで、得られた試料を、Ｎａｎｏｐｌｕｓ９０を用いた動的光散乱法により測定した。動的半径及び多分散指数を記録し、図１１及び図１２に示す。図１２から、サイズが、１２０ｎｍ（ＨＫＰ：ｓｉＲＮＡ＝４：１）から１００～１１３ｎｍ（ＨＫＣ２／ＨＫＰ／ｓｉＲＮＡ＝１：４：１、１：３：１、２：３：１）へとわずかに減少した。比率が２：２：１、３：１：１に上昇した場合、ナノ粒子サイズも１４０ｎｍ及び１８０ｎｍに上昇した。別の観点では、ＰＤＩは０．２２から０．１１～０．１７に低下しており、これはＨＫＣが被覆表面を充填していることによる利点である（図１３を参照）。

【００３１】

実施例１０．ＨＫＰ単独又は種々の量のＨＫＰ及びＨＫＣ２と組み合わせて製剤化したＣｅｌｌ Ｄｅａｔｈ ｓｉＲＮＡによる処置のヒト膠細胞腫Ｔ９８Ｇ細胞の生存率に対する効果

ＨＫＣ２（１６０ｎｇ／μＬ）、ＨＫＰ（３２０ｎｇ／μＬ）及びｓｉＲＮＡ（８０ｎｇ／μＬ）の水溶液を規定の比率（ＨＫＣ２／ＨＫＰ／ｓｉＲＮＡは質量比率０：４：１、０：３：１、１：３：１、２：３：１、０：２：１、２：２：１で製剤化した）で混合し、３０分間室温でインキュベートした。トランスフェクション複合体をＯＰＴＩ－ＭＥＭで希釈し、新鮮な培地を補充した培地１００μＬ中の細胞に添加した。トランスフェクション培地は６時間後に１０％ＦＢＳ／ＤＭＥＭ又はＥＭＥＭに交換した。トランスフェクションの７２時間後に、生細胞の数をＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ細胞生存率アッセイ（Ｐｒｏｍｅｇａ）によって評価した。未処置の細胞に由来する値（ブランク）を１００％と設定した。全ての値は、ＮＳ－非サイレンシングｓｉＲＮＡ、ＣＤ－ＣｅｌｌＤｅａｔｈ ｓｉＲＮＡの４反復の±Ｓ．Ｄ．の平均を表す。リポフェクタミン及びＨＫＰ／ｓｉＲＮＡ（４：１）を、ポジティブコントロールとして使用した。２：３：１及び２：２：１の製剤におけるＨＫＣ２の添加は、コントロールの０：３：１及び０：２：１と比較して、細胞生存率の点で同等又はさらに良好な細胞死を示した（図１４）。

【００３２】

実施例１１．ＨＫＰ単独又は種々の量のＨＫＰ及びＨＫＣ２と組み合わせて製剤化したＣｅｌｌ　Ｄｅａｔｈ　ｓｉＲＮＡによる処置のヒト肝細胞癌ＨｅｐＧ２細胞の生存率に対する効果

ＨＫＣ２（１６０ｎｇ／μＬ）、ＨＫＰ（３２０ｎｇ／μＬ）及びｓｉＲＮＡ（８０ｎｇ／μＬ）の混合物の水溶液を規定の比率（ＨＫＣ２／ＨＫＰ／ｓｉＲＮＡは質量比率０：４：１、０：３：１、１：３：１、２：３：１、０：２：１、２：２：１で製剤化した）で混合し、室温で３０分間インキュベートした。トランスフェクション複合体をＯＰＴＩ－ＭＥＭで希釈し、新鮮な培地を補充した培地１００μＬ中の細胞に添加した。トランスフェクション培地は６時間後に１０％ＦＢＳ／ＤＭＥＭ又はＥＭＥＭに交換した。トランスフェクション７２時間後にＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ　Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ細胞生存率アッセイ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を用いて生細胞の数を評価した。未処置細胞に由来する値（ブランク）を１００％と設定した。全ての値は、ＮＳ－非サイレンシングｓｉＲＮＡ、ＣＤ－ＣｅｌｌＤｅａｔｈ　ｓｉＲＮＡの４反復の±Ｓ．Ｄ．の平均を表す。リポフェクタミン及びＨＫＰ／ｓｉＲＮＡ（４：１）は、ポジティブコントロールとして使用した（図１５）。ＨＫＣ２を２：３：１及び２：２：１の製剤に添加すると、細胞生存率の点でコントロールの０：３：１及び０：２：１と比較して同等又はそれ以上の細胞死パーセンテージを示したが、全体的な細胞生存率はヒト膠芽細胞腫Ｔ９８Ｇ細胞株試験と比較して、より高い。

【００３３】

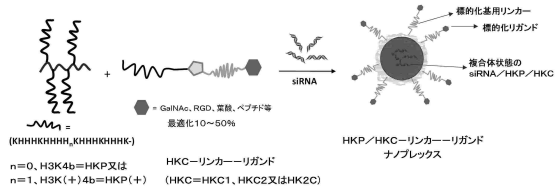
登録済み特許及び公開特許出願を含む本明細書で特定される全ての出版物、及びＵＲＬアドレス又は寄託番号で特定される全てのデータベースエントリは、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【００３４】

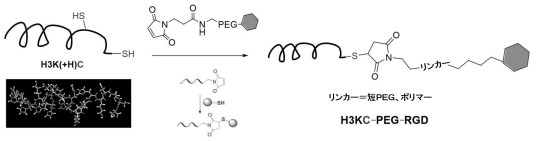
本発明は、その特定の実施形態に関連して記載され、多くの詳細が説明目的で示されているが、本発明は、追加の実施形態の影響を受け、本明細書に記載された詳細の一部が本発明の基本原理から逸脱することなく変化し得ることは、当業者には明らかであろう。

【図面】

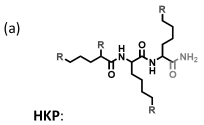
【図１】



【図２】



【図３】



HKP:
R =KHHHKHHHKHHHKHHHK
HKP(+H):
R= KHHHKHHHHKHHHKHHHK

(a)

(b) **KHHHKHHHH$_n$KHHHKHHHKC-X-C**

〈n＝0又は1であり、Xはスペーサーリンカー、例えば
X＝SSである。特許HKC2の実施例において、
n＝0、x＝ssである〉

HKC2

(c) **KHHHKHHHH$_n$KHHHKHHHKC**

〈n＝0又は1であり、Xはスペーサーリンカーであり、
Zはさらなる誘導体化基である〉

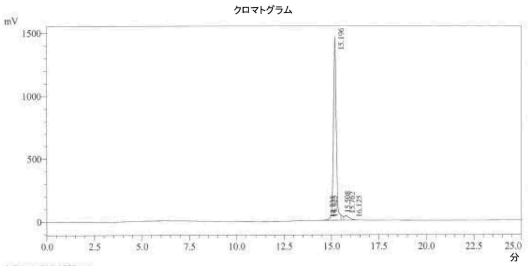
HKC1

(d) **(KHHHKHHHH$_n$KHHHKHHHK)$_2$K-X-C**

〈2分枝ペプチド、n＝0又は1であり、Xはスペーサーリンカー、
例えば、X＝SS、SSS、SSSSである。特許HKC2の
実施例において、n＝0、X＝SSである。〉

HK2C

【図３Ｂ】

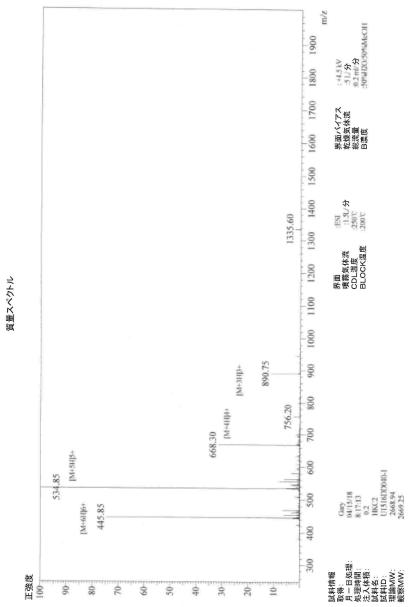


ピーク表

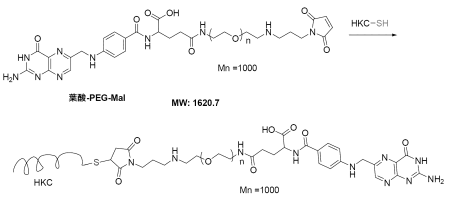
検出器 A Ch1 220nm

ピーク数	保持時間	面積	高さ	面積%
1	14.725	25758	2699	0.158
2	14.825	40635	9138	0.250
3	15.196	15212006	1461350	93.493
4	15.508	291117	41088	1.789
5	15.762	656035	37077	4.032
6	16.125	45119	5902	0.277
合計		16270670	1557254	100.000

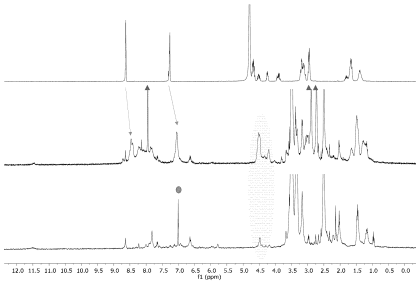
【図３Ｃ】



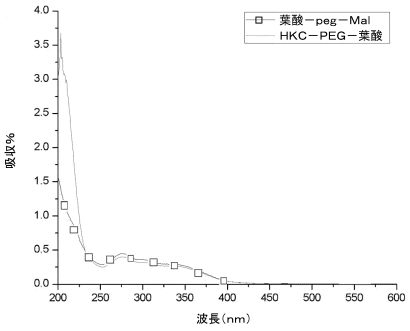
【図４】


HKC−SH
Mn =1000
葉酸-PEG-Mal
MW: 1620.7
HKC
Mn =1000

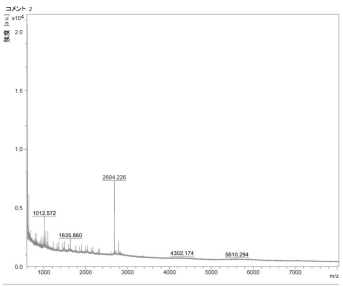
【図５】



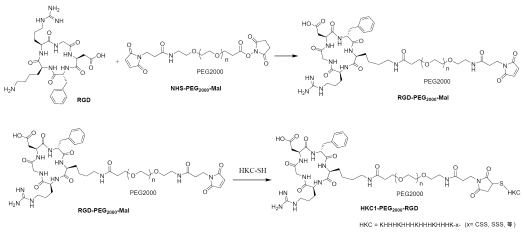
【図６】


葉酸−peg−Mal
HKC−PEG−葉酸
吸収%
波長(nm)

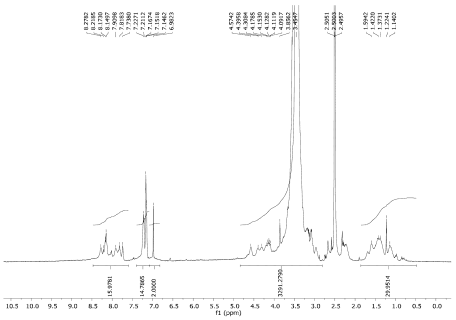
【図７】



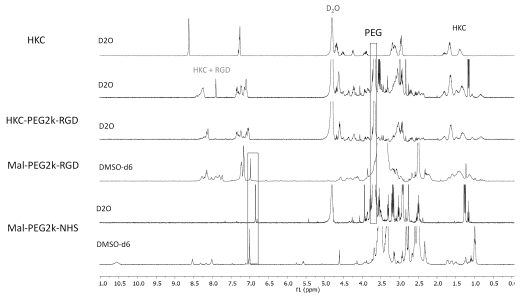
【図８】



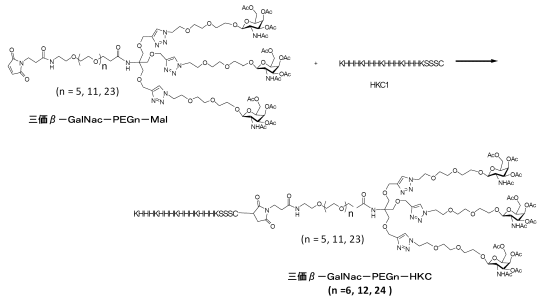
【図９】



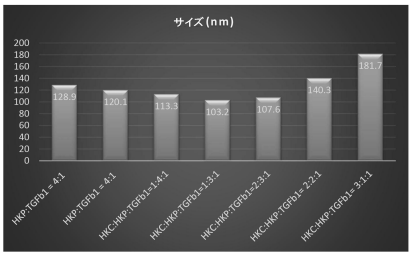
【図１０】



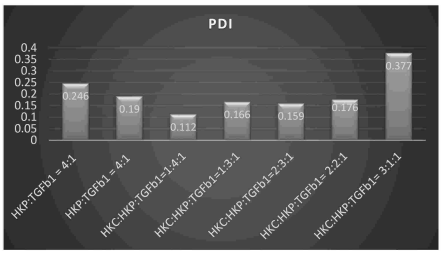
【図１１】



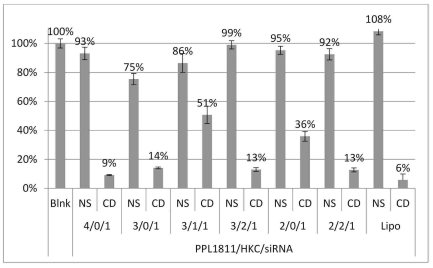
【図１２】



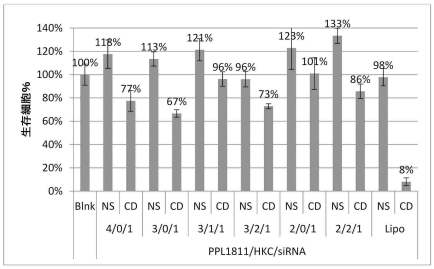
【図１３】



【図１４】

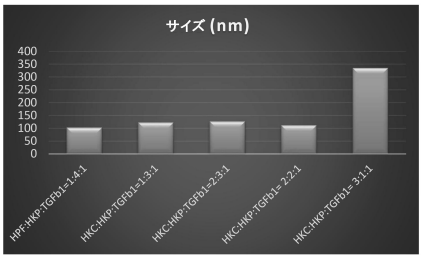


【図１５】

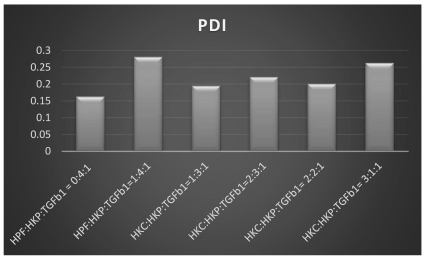


HKP単独又は組合せで製剤化したCell Death siRNAによる処置の効果

【図１６】



【図１７】



【配列表】

0007644105000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類

Ａ６１Ｋ　31/7105(2006.01)	Ａ６１Ｋ　31/7105
Ａ６１Ｋ　31/711(2006.01)	Ａ６１Ｋ　31/711
Ａ６１Ｋ　31/713(2006.01)	Ａ６１Ｋ　31/713
Ａ６１Ｋ　39/395(2006.01)	Ａ６１Ｋ　39/395　Ｄ
Ａ６１Ｋ　45/00　(2006.01)	Ａ６１Ｋ　39/395　Ｎ
Ａ６１Ｋ　47/18　(2017.01)	Ａ６１Ｋ　45/00
Ａ６１Ｋ　47/22　(2006.01)	Ａ６１Ｋ　47/18
Ａ６１Ｋ　47/26　(2006.01)	Ａ６１Ｋ　47/22
Ａ６１Ｋ　47/42　(2017.01)	Ａ６１Ｋ　47/26
Ａ６１Ｋ　47/69　(2017.01)	Ａ６１Ｋ　47/42
Ａ６１Ｋ　48/00　(2006.01)	Ａ６１Ｋ　47/69
Ａ６１Ｐ　43/00　(2006.01)	Ａ６１Ｋ　48/00
Ａ６１Ｐ　35/00　(2006.01)	Ａ６１Ｐ　43/00　１０５
	Ａ６１Ｐ　35/00

(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 ２０８７９， ゲイザースバーグ， プロフェッショナル ドライブ ４０１， スイート ２８０， 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 ２０８７９， ゲイザースバーグ， プロフェッショナル ドライブ ４０１， スイート ２８０， シー／オー サーナオミクス インコーポレイテッド

審査官　岡部 佐知子

(56)参考文献

国際公開第２０１１／０１１６３１（WO，Ａ２）

特表平１０－５０１９６３（ＪＰ，Ａ）

米国特許出願公開第２０１２／００７１５４０（ＵＳ，Ａ１）

特表２００８－５２０２０９（ＪＰ，Ａ）

特許第７５１２２０７（ＪＰ，Ｂ２）

特表２０２２－５４８０８５（ＪＰ，Ａ）

Chou ST. et al.，Selective modification of HK peptides enhances siRNA silencing of tumor targets in vivo.，Cancer Gene Therapy，2011年10月，18, 10，707-716

Leng Q. et al.，Histidine-lysine peptides as carriers of nucleic acids.，Drug News & Perspectives，2007年03月，20, 2，77-86

Leng Q. et al.，Targeted delivery of siRNA therapeutics to malignant tumors.，Journal of Drug Delivery，2017年11月09日，2017，Article ID 6971297

(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)

Ｃ０７Ｋ

Ｃ１２Ｎ

Ａ６１Ｋ

Ａ６１Ｐ

ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）

ＵｎｉＰｒｏｔ／ＧｅｎｅＳｅｑ