

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6753843号  
(P6753843)

(45) 発行日 令和2年9月16日 (2020.9.16)

(24) 登録日 令和2年8月24日 (2020.8.24)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/85 (2006.01)

C 1 2 N 15/85 Z N A Z

C 1 2 N 15/87 (2006.01)

C 1 2 N 15/87 Z

A 6 1 K 31/713 (2006.01)

A 6 1 K 31/713

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 K 47/60 (2017.01)

A 6 1 K 47/60

請求項の数 14 (全 52 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-512466 (P2017-512466)  
 (86) (22) 出願日 平成27年5月14日 (2015.5.14)  
 (65) 公表番号 特表2017-521090 (P2017-521090A)  
 (43) 公表日 平成29年8月3日 (2017.8.3)  
 (86) 国際出願番号 PCT/IL2015/050514  
 (87) 国際公開番号 W02015/173824  
 (87) 国際公開日 平成27年11月19日 (2015.11.19)  
 審査請求日 平成30年5月11日 (2018.5.11)  
 (31) 優先権主張番号 61/993, 110  
 (32) 優先日 平成26年5月14日 (2014.5.14)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 米国 (US)

(73) 特許権者 517300143  
 タルグルムーネ セラピューティクス エー  
 ジー  
 スイス国、バセル シーエイチー 4 0 5 1  
 、エリザベータンストラッセ 4 3  
 (74) 代理人 110000877  
 龍華国際特許業務法人  
 (72) 発明者 レビツキ、アレックス  
 イスラエル国、エルサレム 9 3 7 1 4 1  
 1 ナヨット イェフダ ブーラ ストリ  
 ート 1 1 / 6 アレックス レビツキ  
 マネジメント アンド ホールディングス  
 リミテッド内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改善されたポリエチレンイミンポリエチレングリコールベクター

(57) 【特許請求の範囲】

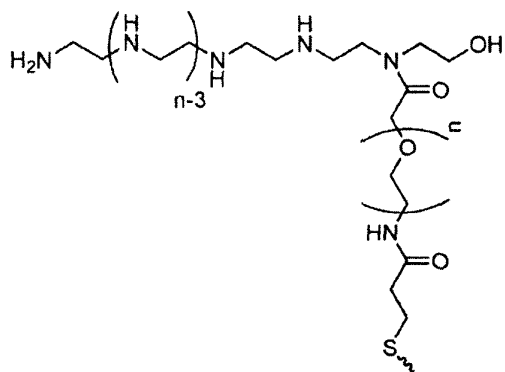
【請求項 1】

2 本鎖 RNA ( d s RNA ) とポリマー抱合体とのポリプレックスであって、前記 d s RNA が、ポリイノシン - ポリシチジル酸の 2 本鎖 RNA ( ポリ I : C ) であり、前記ポリマー抱合体が、1 つの P E G 部分 ( L P E I - P E G 1 : 1 ) または 3 つの P E G 部分 ( L P E I - P E G 1 : 3 ) に共有結合された直鎖ポリエチレンイミン ( L P E I ) からなり、各 P E G 部分が、癌抗原に結合することができる標的部分にリンカーを介して抱合されており、前記標的部分は H E R 2 アフィボディであり、

前記ポリマー抱合体が、前記標的部分 ( 単数 / 複数 ) に連結される、式 ( I ) ~ ( V I I ) の二抱合体である、ポリプレックス。

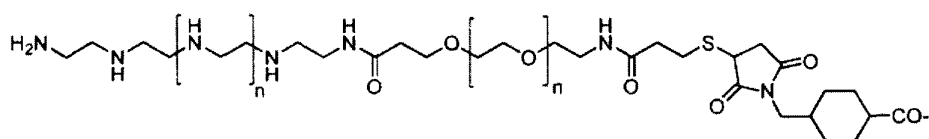
( I )

## 【化 1】



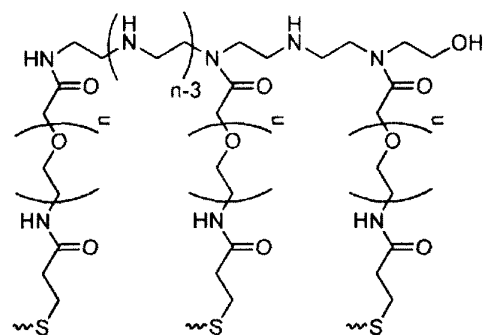
10

、  
 ( I I )  
 【化 2】



20

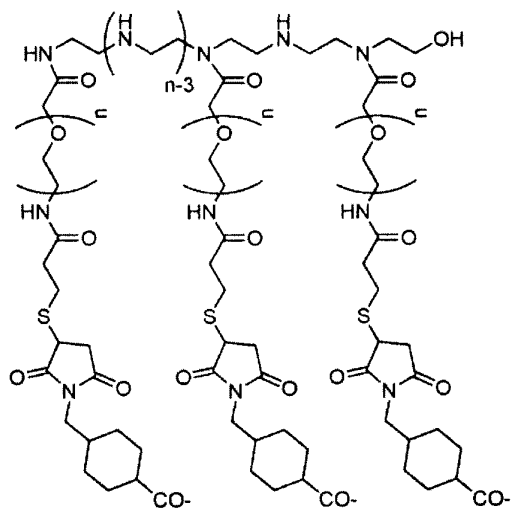
、  
 ( I I I ) - ( NH - ( CH<sub>2</sub> )<sub>7</sub> - CO ) - P h e - P h e - ( NH - CH<sub>2</sub> - CH  
 ( NH<sub>2</sub> ) - CO ) - A s p - C y s - P E G<sub>2 k</sub> - L P E I、  
 ( I V ) - ( NH - ( CH<sub>2</sub> )<sub>7</sub> - CO ) - P h e - G l y - T r p - T r p - G l y  
 - C y s - P E G<sub>2 k</sub> - L P E I、  
 ( V )  
 【化 3】



30

、  
 ( V I )

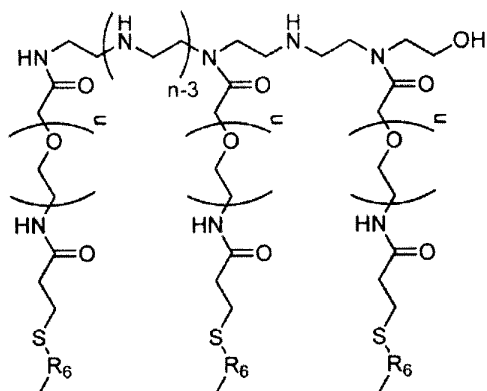
## 【化 4】



10

( V I I )

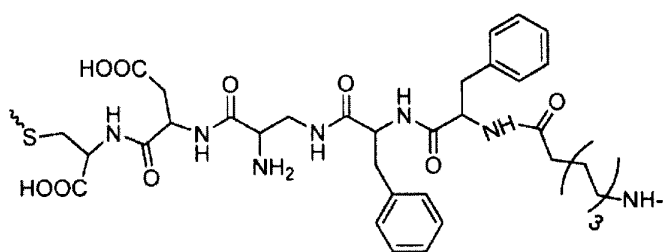
## 【化 5】



20

( 式中、 $R_6$  が、

## 【化 6】

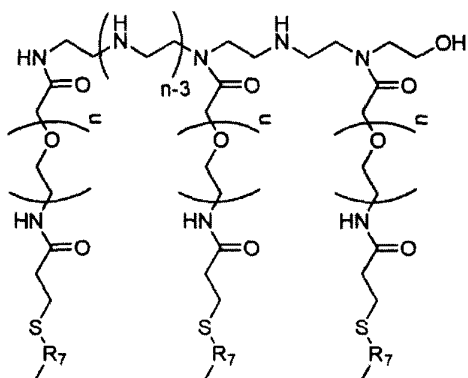


30

である)、または  
( V I I I )

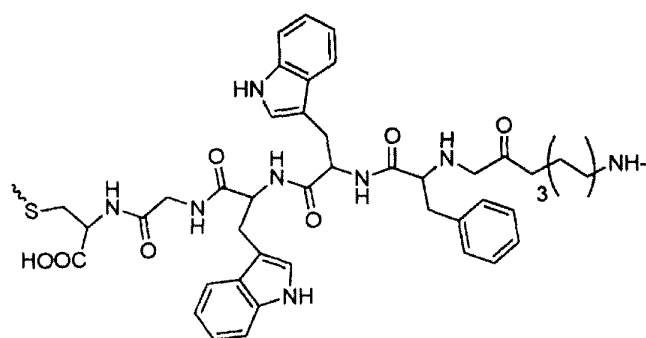
40

## 【化 7】



(式中、R<sub>7</sub>が、

【化 8】



である)。

**【請求項 2】**

前記HER2アフィボディが、配列番号5に記載されるアミノ酸配列のものである、請求項1に記載のポリプレックス。

【請求項 3】

薬学的に許容される担体および請求項 1 または 2 に記載のポリプレックスを含む、薬学的組成物。

【請求項4】

HER2 過剰発現細胞を特徴とする癌の治療に使用するための、請求項 1 または 2 に記載のポリプレックス。

**【請求項 5】**

HER2 過剰発現細胞を特徴とする癌の治療に使用するための、請求項 3 に記載の薬学的組成物。

**【請求項 6】**

前記癌はHER2過剰発現細胞を特徴とする癌であり、前記癌は乳癌、卵巣癌、胃癌、および子宮の漿液性子宮内膜癌などの侵襲性形態の子宮癌から選択される、請求項4に記載のポリプレックス。

【請求項 7】

前記HER2過剰発現細胞を特徴とする癌が、ハーセプチン/トラスツズマブ耐性癌である、請求項6に記載のポリプレックス。

【請求項 8】

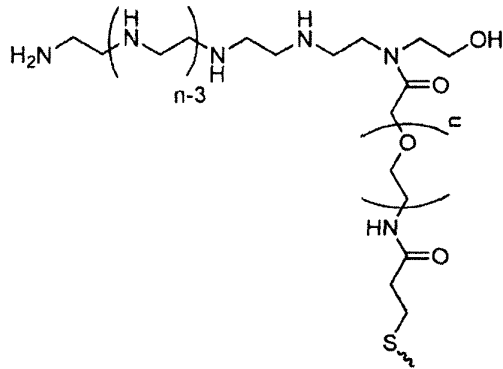
前記ポリプレックスが、下記 ( a )、または ( b ) において定義される通りである、請求項 6 または 7 に記載のポリプレックス：

(a) 前記標の部分、HER2 アフィボディであり、前記ポリマー-抱合体が、下記式 (I)

( I )



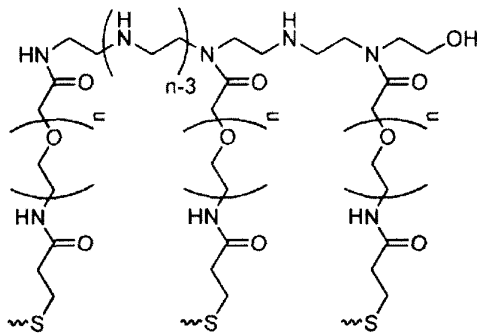
## 【化 9】



10

のものであり、前記 H E R 2 アフィボディが、そのメルカプト基を介して連結される、  
 ( b ) 前記標的部分が、H E R 2 アフィボディであり、前記ポリマー抱合体が、下記式  
 ( V )  
 ( V )

## 【化 1 0】



20

のものであり、前記 H E R 2 アフィボディが、そのメルカプト基を介して連結される。

## 【請求項 9】

請求項 1、2、4、6、7 および 8 のいずれか一項に記載のポリプレックスであって、  
 H E R 2 過剰発現細胞を特徴とする癌を治療するために、必要とする対象に投与される、  
 ポリプレックス。

30

## 【請求項 1 0】

H E R 2 過剰発現細胞を特徴とする癌を治療するための、薬学的に許容される担体および請求項 1、2、4、6、7、8 および 9 のいずれか一項に記載のポリプレックスを含む、  
 薬学的組成物。

## 【請求項 1 1】

免疫細胞と組み合わせて使用するための、請求項 1、2、4 および請求項 6 から 9 のいずれか一項に記載のポリプレックス。

## 【請求項 1 2】

免疫細胞と組み合わせて使用するための、請求項 1 0 に記載の薬学的組成物。

40

## 【請求項 1 3】

前記免疫細胞が、腫瘍浸潤 T 細胞 ( T - T I L )、腫瘍特異的遺伝子操作 T 細胞、または末梢血単核球 ( P B M C ) である、請求項 1 1 に記載のポリプレックス。

## 【請求項 1 4】

前記免疫細胞が、腫瘍浸潤 T 細胞 ( T - T I L )、腫瘍特異的遺伝子操作 T 細胞、または末梢血単核球 ( P B M C ) である、請求項 1 2 に記載の薬学的組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

本発明は、癌抗原に結合することができる標的部分に抱合された非ウイルス性ポリエチ

50

レンイミン系ポリプレックスに関する。

【背景技術】

【0002】

分子医学が直面する障害の1つは、DNAまたはRNA分子などの治療薬の標的送達である。新たな戦略は、核酸を結合および縮合するカチオン性ポリマーおよびカチオン性脂質などの非ウイルス性ベクターの構築である。これらの非ウイルス性カチオン性ベクターは、非免疫原性、非発癌性であり、および合成が容易であるため、ウイルス遺伝子ベクターに勝る多くの利点を有する[1~4]。現在、いくつかの合成ポリカチオン性ポリマーが核酸送達用に関連されている。これらの中でも、ポリエチレンイミン(PEI)は、遺伝子送達の有望な薬剤と考えられている[5]。

10

【0003】

PEIは、直鎖構造および分枝状構造の両方として利用可能な水溶性の有機巨大分子である[6]。PEIは、それらの骨格鎖中の3つ目ごとの原子がアミノ窒素であり、これがプロトン化され得るため、広範囲のpHにわたってそれらのイオン化度を変更する。PEI中の約55%の窒素が生理学的pHでプロトン化される[7]。これらは、高いカチオン電荷密度を有し、したがって、核酸と非共有結合複合体を形成することができる。更に、それらの物理化学的および生物学的特性は、様々な化学修飾により変更することができる[8]。PEI系複合体(ポリプレックスとしても知られる)は、多くの細胞型によってエンドサイトーシスにより取り込まれ得る[9]。ポリプレックスの内在化後、エンドソーム放出および高効率遺伝子導入が「プロトンスポンジ効果」により駆動される[10]。PEIがDNAを縮合する能力は、大きいDNA構築物を多くの細胞型内に送達する際の重要な要因であるように思われる。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

送達担体としてPEIを利用する際の主な懸念は、非特異的結合につながる可能性があるそれらの高い表面正電荷に起因する毒性である[11]。最近、非ウイルス性ベクターの選択性および生体適合性を改善するという試みが行われてきた。これは、PEI粒子を保護するために、ポリエチレングリコール(PEG)でPEI分子を修飾することにつながった[12]。ヘテロ二機能性PEG基のPEIへの抱合は、同族受容体を保有する細胞内への効率的な遺伝子送達をもたらす、PEIの標的リガンドへの共役を容易にする[12]。我々は、以前に、標的ベクターの生成を説明し、分枝状PEI(brPEI-EGF)と標的ベクターとしてEGFに繋がれる直鎖PEI(LPEI)との間の相違を示した[13、国際公開第2004/045491号、国際公開第2010/073247号]。現在の合成方法は、十分に均質ではない製品をもたらすという点で不十分である。よって、癌を治療するための方法において確実に使用することができる均質な製品のバッチを製造する再現可能な方法で、標的部分のLPEI-PEGへの効率的な抱合をもたらすことができる方法が早急に必要とされる。

30

【課題を解決するための手段】

【0005】

一態様では、本発明は、2本鎖RNA(dsRNA)とポリマー抱合体とのポリプレックスに関し、該ポリマー抱合体は、1つ以上のポリエチレングリコール(PEG)部分に共有結合された直鎖ポリエチレンイミン(LPEI)からなり、各PEG部分は、癌抗原に結合することができる標的部分にリンカーを介して抱合されているが、但し、標的部分がマウスEGF(mEGF)または配列YHWYGYTPQNV I(GE11)(配列番号1)のペプチドでないことを条件とする。

40

【0006】

別の態様では、本発明は、薬学的に許容される担体および本明細書に定義される本発明のポリプレックスを含む薬学的組成物を提供する。

【0007】

50

また別の態様では、本発明は、EGFR過剰発現細胞を特徴とする癌、HER2過剰発現細胞を特徴とする癌、および前立腺癌から選択される癌の治療に使用するための、本明細書で定義される本発明のポリプレックス、またはポリプレックスを含む薬学的組成物を提供する。

【0008】

更に別の態様では、本発明は、EGFR過剰発現細胞を特徴とする癌、HER2過剰発現細胞を特徴とする癌、および前立腺癌からなる群から選択される癌を治療するための方法に関し、本方法は、本明細書に定義される本発明のポリプレックスを、必要とする対象に投与することを含む。

【0009】

更なる態様では、本発明は、EGFR過剰発現細胞を特徴とする癌、HER2過剰発現細胞を特徴とする癌、および前立腺癌から選択される癌の治療のための、薬学的に許容される担体および本発明のポリプレックスを含む薬学的組成物に関する。

【0010】

本発明のポリプレックスは、免疫細胞と組み合わせて使用され得る。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】PEG化の程度が異なる主に2つのコポリマーネットワークをもたらす、LPEI（約22kDa）とNH<sub>2</sub>-PEG-OPSS（約2kDa）との抱合を示す。コポリマーLPEI-（PEG<sub>2k</sub>-OPSS）<sub>3</sub>（「二抱合体1：3」）は、平均して1モルのLPEIと3モルのPEGからなり、一方、コポリマーLPEI-PEG<sub>2k</sub>-OPSS（「二抱合体1：1」）は、平均して1モル比のLPEIと1モルのPEGからなった。（LPEI：PEGの割合は、<sup>1</sup>H-NMR分析により決定された。）

【図2】LPEI-PEG<sub>2k</sub>-OPSS（二抱合体1：1）およびLPEI-（PEG<sub>2k</sub>-OPSS）<sub>3</sub>（二抱合体1：3）の2つの二抱合体の<sup>1</sup>H-NMR分析を示す。PEG基のLPEIへの共役は、3.7ppmでエチレングリコールの水素（a）、約3.0ppmでエチレンイミンの水素（b）と相関する化学シフトの存在によって示された。これらのピークの積分値は、PEG対LPEIのモル比を提供し、それから二抱合体1：1（A）および二抱合体1：3（B）の図示される構造が推定された。

【図3】2つの異なってPEG化された三抱合体の生成をもたらす、ジスルフィド交換によるコポリマーネットワーク（二抱合体1：1および二抱合体1：3）のアフィボディ（「Her-2」）への抱合のスキームを示す[20]。

【図4】DTTの不在下および存在下の、精製されたアフィボディ、二抱合体、および三抱合体のSDS/PAGEを示す。DTTの存在下で、アフィボディは、三抱合体から放出され、精製されたアフィボディと並んで移動する（10kDaよりも若干上）。

【図5】HBG緩衝液（pH7.4）中での、プラスミドpGreenfire1と複合体を形成するLPEI、二抱合体、および三抱合体のDLS測定を用いた粒子サイズ測定を示す。

【図6】プラスミドpGreenfire1と複合体を形成したLPEI、二抱合体、および三抱合体の電位分布を示す。ゼータ電位は、DLSにより測定され、スモルコフスキー方程式により計算された。

【図7A】両ポリプレックスに関してHBG緩衝液（pH7.4）中で実施された測定から得た原子間力顕微鏡（AFM）画像を示す。（A）三抱合体1：1ポリプレックス、（B）三抱合体1：3ポリプレックス。スケールバーは1μmである。

【図7B】両ポリプレックスに関してHBG緩衝液（pH7.4）中で実施された測定から得た原子間力顕微鏡（AFM）画像を示す。（A）三抱合体1：1ポリプレックス、（B）三抱合体1：3ポリプレックス。スケールバーは1μmである。

【図8】異なってPEG化されたポリプレックスがプラスミドpGreenfire1をDNase I分解から保護することを示す、寒天ゲルを示す。単独または三抱合体ポリプレックス：1：1および1：3中の1μgのプラスミド（pGreenfire1）を

10

20

30

40

50

、DNase I (2 IU) と共に、またはそれなしで処理した。超らせんプラスミド (s.c.)、開環状プラスミド (o.c.)。

【図9A】それぞれ、1:1および1:3の割合のLPEI:PEGを含有する三抱合体1:1ポリプレックスおよび三抱合体1:3ポリプレックスを使用した、pGFP-LUCのHer-2媒介遺伝子導入を示す。2つのポリプレックスを生成するために、10000個のBT474およびMDA-MB-231乳癌細胞/ウェルを、pGFP-LUC (1 µg/ml) と複合体を形成した三抱合体1:1および1:3で48時間処理した。PEI窒素/DNAリン酸比はHBS中において6 (N/P = 6) であった。(A) ルシフェラーゼ活性の測定は、BT474と比較して、MDA-MB-231細胞において大幅に減少したpGreenFire1送達、および三抱合体1:1と比較したとき、三抱合体1:3ポリプレックスにより媒介された遺伝子送達の減少を示した (\* p < 0.001)。平均 + 標準偏差として相対的ルシフェラーゼ単位 (RLU) として示されるルシフェラーゼ活性は、48時間後に3連で測定された。(B) ポリプレックスで処理された細胞の蛍光画像。画像は、X10倍率で示され、実施された3つの実験を代表する。(C) メチレンブルーアッセイは、未処置 (UT) 細胞と比較した細胞生存のパーセントを示す。

10

【図9B】それぞれ、1:1および1:3の割合のLPEI:PEGを含有する三抱合体1:1ポリプレックスおよび三抱合体1:3ポリプレックスを使用した、pGFP-LUCのHer-2媒介遺伝子導入を示す。2つのポリプレックスを生成するために、10000個のBT474およびMDA-MB-231乳癌細胞/ウェルを、pGFP-LUC (1 µg/ml) と複合体を形成した三抱合体1:1および1:3で48時間処理した。PEI窒素/DNAリン酸比はHBS中において6 (N/P = 6) であった。(A) ルシフェラーゼ活性の測定は、BT474と比較して、MDA-MB-231細胞において大幅に減少したpGreenFire1送達、および三抱合体1:1と比較したとき、三抱合体1:3ポリプレックスにより媒介された遺伝子送達の減少を示した (\* p < 0.001)。平均 + 標準偏差として相対的ルシフェラーゼ単位 (RLU) として示されるルシフェラーゼ活性は、48時間後に3連で測定された。(B) ポリプレックスで処理された細胞の蛍光画像。画像は、X10倍率で示され、実施された3つの実験を代表する。(C) メチレンブルーアッセイは、未処置 (UT) 細胞と比較した細胞生存のパーセントを示す。

20

30

【図9C】それぞれ、1:1および1:3の割合のLPEI:PEGを含有する三抱合体1:1ポリプレックスおよび三抱合体1:3ポリプレックスを使用した、pGFP-LUCのHer-2媒介遺伝子導入を示す。2つのポリプレックスを生成するために、10000個のBT474およびMDA-MB-231乳癌細胞/ウェルを、pGFP-LUC (1 µg/ml) と複合体を形成した三抱合体1:1および1:3で48時間処理した。PEI窒素/DNAリン酸比はHBS中において6 (N/P = 6) であった。(A) ルシフェラーゼ活性の測定は、BT474と比較して、MDA-MB-231細胞において大幅に減少したpGreenFire1送達、および三抱合体1:1と比較したとき、三抱合体1:3ポリプレックスにより媒介された遺伝子送達の減少を示した (\* p < 0.001)。平均 + 標準偏差として相対的ルシフェラーゼ単位 (RLU) として示されるルシフェラーゼ活性は、48時間後に3連で測定された。(B) ポリプレックスで処理された細胞の蛍光画像。画像は、X10倍率で示され、実施された3つの実験を代表する。(C) メチレンブルーアッセイは、未処置 (UT) 細胞と比較した細胞生存のパーセントを示す。

40

【図10】Poly ICと複合体を形成したPEI-PEG-Her2アフィボディ (PPHA) がHer2過剰発現乳癌細胞BT474を阻害することを示す。複合型ベクターは、ハーセプチン/トラスツズマブ耐性細胞を含む、Her2過剰発現細胞を阻害する。

【図11】ヌードマウスに注入されたHer2を過剰発現するMCF7細胞の阻害を示す。

【図12A】(B) PPEと比較した(A) PEI-PEG-EGFRアフィボディ (P

50

P E アフィボディ)の有効性を示す。

【図12B】(B)P P Eと比較した(A)P E I - P E G - E G F Rアフィボディ(P P Eアフィボディ)の有効性を示す。

【図13】未処置(U T)、p I C / P P E、p I / P P E、p I / P P E A、およびp I C / P P E A低(複合体において $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  p I C)と比較したときのインビボにおけるP o l y I C / P P Eアフィボディの活性を示す。

【図14】S c h a f f e r t D, K i s s M, R o d l W, S h i r A, L e v i t z k i A, O g r i s M, W a g n e r E. (2011) P o l y (I : C) - m e d i a t e d t u m o r g r o w t h s u p p r e s s i o n i n E G F - r e c e p t o r o v e r e x p r e s s i n g t u m o r s u s i n g E G F - p o l y e t h y l e n e g l y c o l - l i n e a r p o l y e t h y l e n i m i n e a s c a r r i e r. P h a r m R e s. 28:731-41に記載される、P o l y I C / m P P E (マウス)の適用と比較したときの、P o l y I C / L P E I - P E G - h E G F複体の異なる濃度の適用後のU 8 7 M G、U 8 7 M G w t E G F R細胞の生存を示す。

【図15】P E I - P E G (P P) - D U P A (P P D) / P o l y I CがL N C a PおよびV C a P細胞に対して高度に有効であることを示す。生存率は曝露96時間後に測定された。

【図16A】サイトカイン(A)I P - 10、(B)P o l y I C / P P DをトランスフェクトされたL N C a P細胞によるR A N T E Sの生成を示す。

【図16B】サイトカイン(A)I P - 10、(B)P o l y I C / P P DをトランスフェクトされたL N C a P細胞によるR A N T E Sの生成を示す。

【図17】L N C a P細胞で条件付けされた培地が、P B M Cにおいてサイトカインの発現を刺激することを示す。発現は24時間のインキュベーション後に測定された。

【図18】P o l y I C / P P D処理されたL N C a P細胞とP S M Aを発現しないP C 3 - ルシフェラーゼ細胞の同時インキュベーションが、バイスタンダー効果により、最大70%のP C 3 - ルシフェラーゼ細胞の死滅をもたらしたことを示す。健康なヒトP B M Cの付加は、効果を強く増強し、90%のP C 3細胞の死滅につながる。

【図19】インビボでの皮下L N C a P腫瘍に対するP o l y I C / P P Dの効果を示す。U T、未処置。

【発明を実施するための形態】

【0012】

ポリカチオン、特にP E Iは、遺伝子トランスフェクションの薬剤として集中的に研究されてきた。最適なトランスフェクションの有効性は、ポリマー性ナノ粒子複合体が、全体的に、細胞表面上の負に帯電しているヘパリン硫酸プロテオグリカンに結合することを可能にする正電荷を有するときに得られる[28]。以前の研究は、直鎖P E I (L P E I)が遺伝子トランスフェクションにおいて分枝状P E I (b r P E I)よりも有効であるが[29~31][32、33、国際公開第2010/073247号]、L P E Iがより高い正電荷を有し、したがってより毒性であることを示した。正電荷、そして結果としての毒性を低下させようと、P E G [12]、ポリ-(エチレンオキシド)-ポリ(プロピレンオキシド)-ポリ(エチレンオキシド)(P E O - P P O - P E O) [18、34]およびポリ(エチレンオキシド) [35]などの様々な保護実体がカチオン性ポリマーに抱合されてきた。実際、P E Iを様々な長さのP E G基で保護することにより、トランスフェクションの効率を維持する一方で、毒性が大幅に低下した[12、13、36]。

【0013】

本発明によると、L P E IのP E G<sub>2k</sub>との抱合は、様々な比率のL P E I対P E G<sub>2k</sub>を含む二抱合体コポリマーをもたらすことが分かった。これらの二抱合体は、抱合された異なる数のP E G<sub>2k</sub>基を反映する電荷の相違により、陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて互いに分離することができる。<sup>1</sup>H-NMR分析は、二抱合体がL P E I単位

10

20

30

40

50

当たりの  $PEG_{2k}$  単位の平均数で互いに異なり、二抱合体 1 : 1 が 1 : 1 の  $LPEI : PEG_{2k}$  の比率を有し、二抱合体 1 : 3 が 1 : 3 の  $LPEI : PEG_{2k}$  の比率を有したことを裏付けた。Her-2 標的アフィボディの精製された二抱合体の各々への抱合は、適切な分子量の三抱合体生成物をもたらした、すなわち、二抱合体 1 : 1 から、 $LPEI : PEG_{2k} : Her-2$  が 1 : 1 : 1 に等しい「三抱合体 1 : 1」を得、二抱合体 1 : 3 から、1 : 3 : 3 の比率の「三抱合体 1 : 3」を得た。このプロトコルは、再現可能な方法で、標的アフィボディの  $LPEI - PEG$  への抱合がほぼ完了した状態で、均質な生成物を得ることを可能にした。

#### 【0014】

$PEG$  化が、二抱合体または三抱合体がプラスミド DNA と複合体を形成する時に得られるポリプレックス粒子のサイズに強く影響を及ぼすことが観察された。二抱合体 1 : 3 および三抱合体 1 : 3 のポリプレックスは、二抱合体 1 : 1 および三抱合体 1 : 1 のポリプレックスよりも大きい平均粒子サイズを有した。我々は、単一カチオン鎖上の  $PEG$  化の量を増加することにより、ポリマー鎖がプラスミドをより小さい粒子に縮合することを防止する立体障害をもたらすと考える。これは、裸  $LPEI$  ポリプレックスが最小粒子を有した知見と一致する。更に、三抱合体 1 : 1 および 1 : 3 の両方は  $DNAse I$  から複合体を形成したプラスミドを保護し、3 抱合された 1 : 3 ポリプレックスは、おそらく立体障害の増加により、より良い保護を提供した。

#### 【0015】

以前の研究は、カチオン性ポリマーに抱合された  $PEG$  単位の分子量を増加させることが、核酸と複合体を形成したときに得られるポリプレックスの表面電荷の減少につながることを示唆した [13]。我々のデータは、類似する分子量の  $PEG$  基の数の増加が電位分布により定義されるように、表面電荷の減少をもたらすことを示す。実際、最高表面電荷はプラスミドと複合体を形成した裸  $LPEI$  によって示された。これらの結果は、中性実体がより多く化学ベクターに存在するほど、表面電荷が低くなるという考えを支持する。驚くべきことに、アフィボディに抱合された三抱合体ポリプレックスが二抱合体ポリプレックスよりも低い表面電荷を有し、Her-2 アフィボディ（それ自体がわずかに正電荷を有する）も粒子の表面電荷を減少させたことを示した。我々は、より多くの標的部分が表面上の電荷を覆うことで、Her-2 アフィボディが粒子のトポグラフィーを変更し、表面電荷の減少をもたらすと考えた。

#### 【0016】

ポリプレックスの形状は、薬物送達の候補としてのその性能に対して有意な効果を有するが [37、38]、どのポリプレックス形状が有効な薬物送達に望ましいかはまだ分かっていない。ポリプレックス形状に対する  $PEG$  化の作用は、我々の知る限りでは、今まで研究されなかった。AFM 写真では、三抱合体 1 : 1 ポリプレックス（遺伝子送達においてより有効であった）は、形状均一性を示し、一方、三抱合体 1 : 3 はより不均一であり、多くの非対称の楕円形粒子を有した。

#### 【0017】

カチオン性ポリマーを使用する選択的遺伝子導入は、主な課題のままである。以前の研究は、EGF またはトランスフェリンでの  $LPEI$  および  $LPEI - PEG$  抱合体の標的がそれらの選択性を増加させ、インビトロおよびインビボ両方での非特異的相互作用を減少させたことを示した [39、40]。例えば、我々の Her-2 標的三抱合体 1 : 1 および 1 : 3 ポリプレックスの選択性を検査するために、Her-2 を差次的に発現する 2 つの乳癌細胞を利用した。ルシフェラーゼ活性および GFP 発現により示されるように、遺伝子送達は、細胞表面上に 100 倍低い Her-2 受容体を発現する MDA-MB-231 細胞よりも、Her-2 受容体を高度に過剰発現する BT474 細胞において有意に高かった。したがって、データは、三抱合体 1 : 1 および 1 : 3 の両方が Her-2 過剰発現細胞に対して高度に選択的であることを示す（図 10）。

#### 【0018】

以前の研究は、高レベルの  $PEG$  化が遺伝子トランスフェクションの減少をもたらし得

10

20

30

40

50

ることを示した[41]。これらの結果は、高度にPEG化された三抱合体1:3ポリプレックスが、あまりPEG化されない三抱合体1:1ポリプレックスと比較したとき、ルシフェラーゼ活性およびGFP発現によって示されるように、遺伝子送達において大幅な減少を示したという我々の観察と一致する。低PEG化三抱合体1:1ポリプレックスによる遺伝子送達の増加は、軽度の細胞毒性により達成されたが、その高い表面電荷による可能性が高い。

#### 【0019】

この研究に従事する前の我々の作業仮説は、LPEI単位当たりの標的部分の数を増加させることにより、改善された遺伝子送達および/または選択性がもたらされるだろうということであった。我々は、1モルのLPEI当たり3モルのHer-2アフィボディ分子を抱合させた三抱合体1:3が増加した受容体媒介粒子の内在化を示すだろうと推測した。しかしながら、三抱合体1:3ポリプレックスは、低い電位、大きな粒子サイズ、および不均一で非球形状を示し、その特徴のすべては、実際に観察されたトランスフェクション効率の減少の一因となった可能性がある。我々の結果は、Her-2過剰発現細胞への選択的かつ効率的な遺伝子送達の媒介において、あまりPEG化されない三抱合体1:1がより多くPEG化された三抱合体1:3よりも優れていることを示す。

#### 【0020】

本発明によると、LPEI系ポリプレックスのPEG化は、表面電荷の減少、ポリプレックスサイズの増加、および形状不均一性の増加につながり、これらの特性が標的遺伝子送達に対して大きな作用を有し得ることが分かった。我々の簡略化された合成は、再現可能な方法で均質な生成物の精製を可能にし、これは、今や、様々な標的部分を使用して、異なる三抱合体の生成に拡大することができる。

#### 【0021】

上記を考慮して、一態様では、本発明は、2本鎖RNA(dsRNA)およびポリマー抱合体のポリプレックスを提供し、該ポリマー抱合体は、1つ以上のポリエチレングリコール(PEG)部分と共有結合された直鎖ポリエチレンイミン(LPEI)からなり、各PEG部分は、リンカーを介して癌抗原に結合することができる標的部分に抱合されているが、但し、標的部分が、mEGFまたは配列YHWYGYTPQNV I(GE11)(配列番号1)のペプチドでないことを条件とする。

#### 【0022】

ある特定の実施形態では、癌抗原は、上皮成長因子受容体(EGFR)、ヒト上皮成長因子受容体2(HER2)、前立腺表面膜抗原(PSMA)、インスリン様成長因子1受容体(IGF1R)、血管内皮成長因子受容体(VEGFR)、血小板由来成長因子受容体(PDGFR)、または線維芽細胞成長因子受容体(FGFR)であってよいが、これらに限定されない。標的部分は、癌抗原のうちのいずれか1つに対して、天然、自然もしくは修飾されたりガンドもしくはそのパラログ、または抗体、単鎖可変断片(scFv)、もしくはアフィボディなどの抗体模倣物などの非天然リガンドであってよい。アフィボディは、タンパク質AのZドメイン(免疫グロブリンG結合ドメイン)に基づき、独特な結合特性は、親タンパク質ドメインの結合活性に關与する2つのアルファ-ヘリックスに位置する13個のアミノ酸の無作為化によって取得される。

#### 【0023】

ある特定の実施形態では、dsRNAは、ポリイノシン-ポリシチジル酸の2本鎖RNA(poly I:C)であり、ポリマー抱合体は、1つのPEG部分(LPEI-PEG1:1)または3つのPEG部分(LPEI-PEG1:3)に共有結合されたLPEIからなり、癌抗原は、EGFR、HER2、またはPSMAである。

#### 【0024】

PEGの分子量は、2~8kDaの範囲、特に2kDaであってよく、LPEIの分子量は、10~30kDaの範囲、特に22kDaであってよく、本発明のポリプレックスのpoly I:Cは、各々少なくとも22、好ましくは少なくとも45リボヌクレオチドを含むRNA鎖から構成され得る。ある特定の実施形態では、各鎖は、20~300の範

10

20

30

40

50

圈内のいくつかのリボヌクレオチドを有する。

【0025】

ある特定の実施形態では、1つ以上のPEG部分は各々独立して、LPEIと-NH-CO-結合、およびリンカーと、-NH-CO-、-CO-NH-、-S-C-、-S-S-、-O-CO-、または-CO-O-から選択される結合を形成する。特に、1つ以上のPEG部分の1つ1つは、LPEIおよびリンカーと-NH-CO-結合を形成する。

【0026】

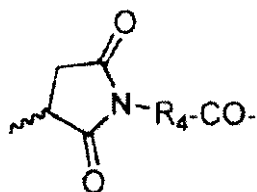
ある特定の実施形態では、リンカーは、標的部分と-S-S-、NH-CO-、-CO-NH-、-S-C-、O-CO-、-CO-O-、または尿素(-NH-CO-NH)結合を形成する。リンカーは、-CO-R<sub>2</sub>-R<sub>x</sub>-R<sub>3</sub>または3~7個のアミノ酸残基からなるペプチド部分から選択されてよく、式中、

R<sub>2</sub>は、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキレン、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)アルケニレン、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)アルキニレン、(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)アリーレン-ジイル、またはヘテロアリーレンジイルから選択され、

R<sub>x</sub>は、不在であるか、または-S-であり、

R<sub>3</sub>は、不在であるか、または式

【化1】



のものであり、

R<sub>4</sub>は、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキレン、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)アルケニレン、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)アルキニレン、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキレン-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)シクロアルキレン、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)アルケニレン-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)シクロアルキレン、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)アルキニレン-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)シクロアルキレン、(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)アリーレン-ジイル、ヘテロアリーレンジイル、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキレン-(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)アリーレン-ジイル、または(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキレン-ヘテロアリーレンジイルから選択され、

該(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキレン、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)アルケニレン、または(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)アルキニレンの1つ1つは、任意に、ハロゲン、-COR<sub>5</sub>、-COOR<sub>5</sub>、-OCOOR<sub>5</sub>、-OCON(R<sub>5</sub>)<sub>2</sub>、-CN、-NO<sub>2</sub>、-SR<sub>5</sub>、-OR<sub>5</sub>、-N(R<sub>5</sub>)<sub>2</sub>、-CON(R<sub>5</sub>)<sub>2</sub>、-SO<sub>2</sub>R<sub>5</sub>、-SO<sub>3</sub>H、-S(=O)R<sub>5</sub>、(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)アリール、(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)アルキレン-(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)アリール、ヘテロアリール、または(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)アルキレン-ヘテロアリールから各々独立して選択される1つ以上の基によって置換され、更に任意に、S、O、もしくはNから選択される1つ以上の同一もしくは異なるヘテロ原子、および/または-NH-CO-、-CO-NH-、-N(R<sub>5</sub>)-、-N(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>アリール)-、(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)アリーレン-ジイル、またはヘテロアリーレンジイルから各々独立して選択される、少なくとも1つの基によって中断され、

R<sub>5</sub>は、Hまたは(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキルである。

【0027】

ある特定の実施形態では、R<sub>2</sub>は、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキレン、好ましくは(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)アルキレンから選択され、任意に、ハロゲン、-COH、-COOH、-OCOOH、-OCONH<sub>2</sub>、-CN、-NO<sub>2</sub>、-SH、-OH、-NH<sub>2</sub>、-CONH<sub>2</sub>、-SO<sub>2</sub>H、-SO<sub>3</sub>H、-S(=O)H、(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)アリール、(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)アルキレン-(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)アリール、ヘテロアリール、または(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)アルキレン



- ヘテロアリールから各々独立して選択される1つ以上の基によって置換され、更に任意に、S、O、もしくはNから選択される1つ以上の同一もしくは異なるヘテロ原子、および/または -NH-CO-、-CO-NH-、-NH-、-N(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル)-、-N(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>アリール)-、(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)アリーレン-ジイル、もしくはヘテロアリーレンジイルから各々独立して選択される少なくとも1つの基によって中断される。特に、R<sub>2</sub>は、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキレン、好ましくは(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)アルキレンから選択される。

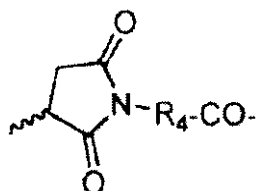
【0028】

ある特定の実施形態では、R<sub>x</sub>は-S-である。

【0029】

ある特定の実施形態では、R<sub>3</sub>は、不在であるか、または

【化2】



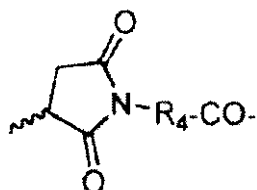
であり、式中、

R<sub>4</sub>は、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキレン-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)シクロアルキレン、好ましくは(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)アルキレン-(C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>)シクロアルキレンである。

【0030】

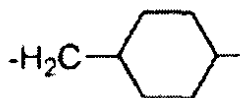
ある特定の実施形態では、上記に定義されるポリプレックスにおいて、R<sub>2</sub>は-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-であり、R<sub>x</sub>は-S-であり、R<sub>3</sub>は、不在であるか、または

【化3】



であり、式中、R<sub>4</sub>は

【化4】



である。

【0031】

ある特定の実施形態では、リンカーは、フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン、またはホモフェニルアラニンなどの、少なくとも1個、特に、2または3個の芳香族性アミノ酸残基を含むペプチド部分である。ある特定の実施形態では、ペプチド部分は、そのメルカプト基を介して標的部分に連結される、-(NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-CO)-Phe-Gly-Trp-Trp-Gly-Cys-(配列番号2)または-(NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-CO)-Phe-Phe-(NH-CH<sub>2</sub>-CH(NH<sub>2</sub>)-CO)-Asp-Cys-(配列番号3)である。

【0032】

ある特定の実施形態では、ポリマー抱合体は、標的部分(単数/複数)に連結される、

10

20

30

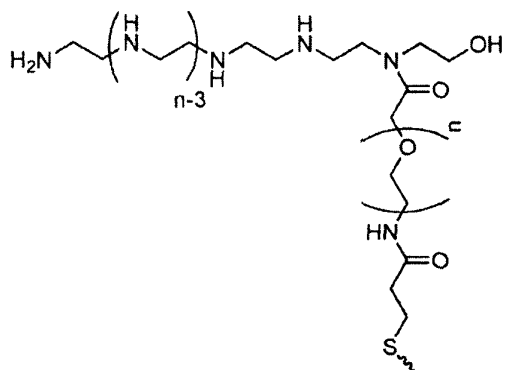
40

50

式 ( I ) ~ ( V I I I ) の二抱合体である :

( I )

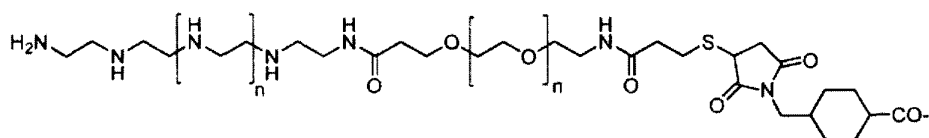
【化 5】



10

( I I )

【化 6】

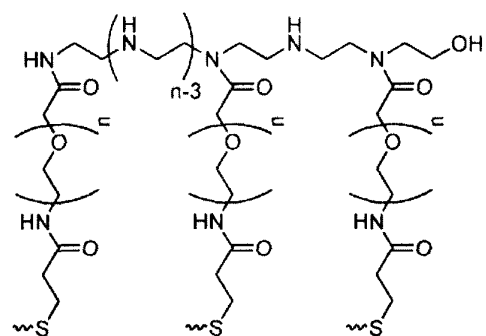


20

( I I I ) - ( NH - ( CH<sub>2</sub> )<sub>7</sub> - CO ) - P h e - P h e - ( NH - CH<sub>2</sub> - CH  
( NH<sub>2</sub> ) - CO ) - A s p - C y s - P E G<sub>2 k</sub> - L P E I 、  
( I V ) - ( NH - ( CH<sub>2</sub> )<sub>7</sub> - CO ) - P h e - G l y - T r p - T r p - G l y  
- C y s - P E G<sub>2 k</sub> - L P E I 、

( V )

【化 7】

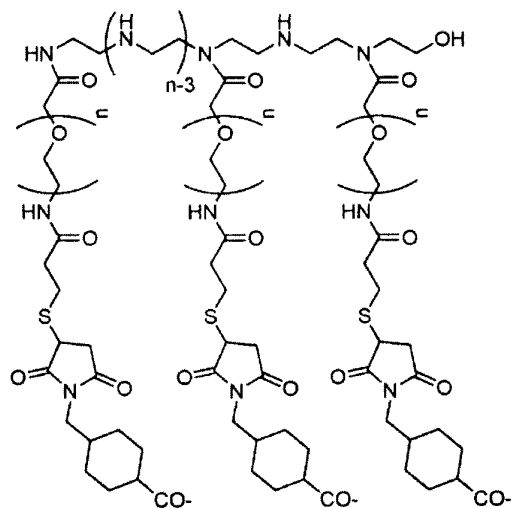


30

( V I )

40

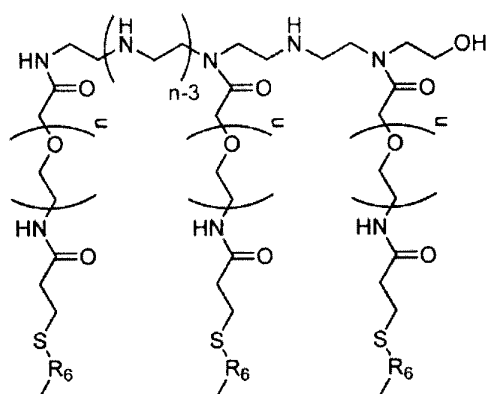
【化 8】



10

、  
( V I I )

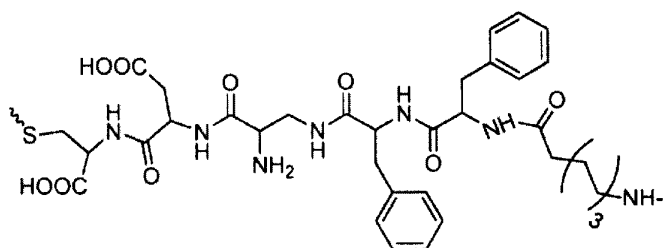
【化 9】



20

、  
( 式中、R<sub>6</sub> は

【化 10】



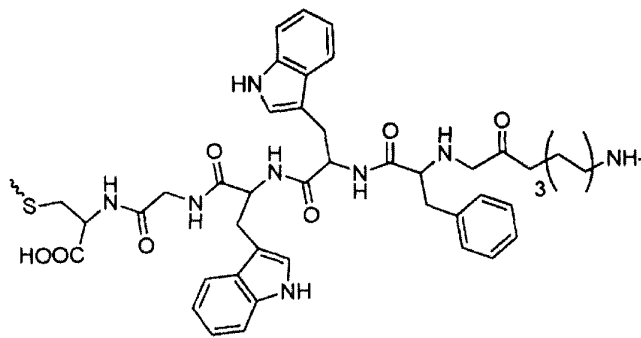
30

である)、または  
( V I I I )

40

The chemical structure shows a central polyether segment,  $(\text{HN}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N})_{n-3}$ , where the nitrogen atoms are part of amide groups. This segment is flanked by two side chains. Each side chain consists of a repeating unit of a polyether segment,  $(\text{HN}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N})_c$ , which is terminated by a thioether group,  $-\text{S}-\text{R}_7$ . The amide groups in the side chains are also part of the polyether segment, with the nitrogen atoms being part of the repeating unit.

10



20

特定の実施形態では、ポリプレックスは、

30

40

50

式 (V I I) のものである、ポリプレックス、

( i ) 標的部分が  $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_2 - \text{CH}(\text{COOH}) - \text{NH} - \text{CO} - \text{NH} - \text{CH}(\text{COOH}) - (\text{CH}_2)_2 - \text{CO} - (\text{DUPA残基})$  であり、ポリマー抱合体が上記の式 (I V) のものである、ポリプレックス、または

( j ) 標的部分が  $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_2 - \text{CH}(\text{COOH}) - \text{NH} - \text{CO} - \text{NH} - \text{CH}(\text{COOH}) - (\text{CH}_2)_2 - \text{CO} - (\text{DUPA残基})$  であり、ポリマー抱合体が上記の式 (V I I I) のものである、ポリプレックスから選択される。

【 0 0 3 4 】

本発明のポリプレックスにより形成されたナノ粒子のサイズは、 $120 \sim 150 \text{ nm}$  の範囲、特に  $135 \sim 148 \text{ nm}$ 、または  $142 \text{ nm}$  であり得る。

10

【 0 0 3 5 】

本発明に使用されるポリマー抱合体を調製するための手順の非限定的な方法は、以下の実施例に例示される。

【 0 0 3 6 】

ある特定の実施形態では、E G F R アフィボディは、配列番号 4 に記載されるようなアミノ酸配列のものであり、H E R 2 アフィボディは、配列番号 5 に記載されるようなアミノ酸配列のものであり、h E G F は、配列番号 6 に記載されるようなアミノ酸配列のものである。

【 0 0 3 7 】

別の態様では、本発明は、薬学的に許容される担体および上記に定義されるポリプレックスを含む薬学的組成物に関する。

20

【 0 0 3 8 】

また別の態様では、本発明は、E G F R 過剰発現細胞を特徴とする癌、H E R 2 過剰発現細胞を特徴とする癌、および前立腺癌から選択される癌の治療に使用するための、本明細書で定義される、本発明のポリプレックス、またはポリプレックスを含む薬学的組成物を提供する。

【 0 0 3 9 】

ある特定の実施形態では、E G F R 過剰発現細胞を特徴とする癌は、非小細胞肺癌、乳癌、膠芽腫、頭頸部扁平上皮癌、結腸直腸癌、腺癌、卵巣癌、膀胱癌、または前立腺癌、およびこれらの転移癌から選択される。ある特定の実施形態では、E G F R 過剰発現細胞を特徴とする癌の治療に使用されるポリプレックスは、上記に定義される ( c )、( d )、( e )、または ( f ) のポリプレックスから選択される。

30

【 0 0 4 0 】

ある特定の実施形態では、H E R 2 過剰発現細胞を特徴とする癌は、乳癌、卵巣癌、胃癌、および子宮の漿液性子宮内膜癌などの侵襲性形態の子宮癌から選択される。ある特定の実施形態では、H e r 2 過剰発現細胞は、ハーセプチン/トラスツズマブ耐性細胞である。よって、本発明のポリプレックスは、ハーセプチン/トラスツズマブ耐性癌、すなわち、ハーセプチン/トラスツズマブへの曝露に応答しない、または応答の程度が低い細胞を含む癌の治療に使用するためであり得る。

【 0 0 4 1 】

特に、H E R 2 過剰発現細胞を特徴とする癌の治療に使用されるポリプレックスは、上記に定義されるポリプレックス ( a )、( b )、( e )、または ( f ) から選択される。

40

【 0 0 4 2 】

ある特定の実施形態では、癌は前立腺癌であり、前立腺癌の治療に使用されるポリプレックスは、上記に定義される ( g )、( h )、( i )、または ( j ) から選択される。

【 0 0 4 3 】

更に別の態様では、本発明は、E G F R 過剰発現細胞を特徴とする癌、H E R 2 過剰発現細胞を特徴とする癌、および前立腺癌からなる群から選択される癌を治療するための方法に関し、本方法は、本明細書に定義される本発明のポリプレックスを、必要とする対象に投与することを含む。

50

## 【0044】

更なる態様では、本発明は、EGFR過剰発現細胞を特徴とする癌、HER2過剰発現細胞を特徴とする癌、および前立腺癌から選択される癌の治療のための、薬学的に許容される担体および本発明のポリプレックスを含む薬学的組成物に関する。

## 【0045】

また更なる態様では、本発明は、免疫細胞と組み合わせて使用するための、本発明のポリプレックス、方法、または薬学的組成物を目的とする。

## 【0046】

また更なる態様では、本発明は、本明細書において上記に定義されるポリプレックスを目的とし、dsRNAは、適切なプロモーターおよびターミネーターなどの要素を制御するように動作可能に連結されたタンパク質コードされた核酸配列を含むプラスミドなどのDNA分子で置換される。

10

## 【0047】

ある特定の実施形態では、免疫細胞は、腫瘍浸潤T細胞(T-TIL)、腫瘍特異的遺伝子操作T細胞、または末梢血単核球(PBMC)である。

## 【0048】

本明細書で使用されるとき、用語「ポリプレックス」は、核酸とポリマーとの間の複合体を指す。核酸は、非共有結合または共有結合、特に、静電結合を介してポリマーに結合される。用語「ポリプレックス」は、核酸を細胞に輸送および送達するのに有用なベクター、すなわち、非ウイルス性ベクターを指す。

20

## 【0049】

用語「患者」、「対象」、または「個人」は、互換的に使用され、ヒトまたは非ヒト動物のいずれかを指す。

## 【0050】

本明細書で使用されるとき、用語「(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキル」は典型的には、1~8個の炭素原子を有する直鎖または分枝状炭化水素ラジカルを意味し、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、sec-ブチル、イソブチル、tert-ブチル、n-ペンチル、2,2-ジメチルプロピル、n-ヘキシル、n-ヘプチル、n-オクチルなどを含む。

## 【0051】

用語「(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキレン」は、1~8個の炭素原子を有する直鎖または分枝状の二価の炭化水素ラジカルを指し、例えば、メチレン、エチレン、プロピレン、ブチレン、ペンタニレン(pentanylene)、ヘキサニレン(hexanylene)、ヘプタニレン(heptanylene)、オクタニレン(octanylene)などを含む。用語「(C<sub>2</sub>-C<sub>2</sub>)アルケニレン」および「(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)アルキニレン」は典型的には、2~8個の炭素原子およびそれぞれ1つ以上の2重もしくは3重結合を有する直鎖または分枝状の二価の炭化水素ラジカルを意味する。このようなラジカルの非限定的な例としては、エテニレン、プロペニレン、1-および2-ブテニレン、1-および2-ペンテニレン、1-、2-、および3-ヘキセニレン、1-、2-、および3-ヘプテニレン、1-、2-、3-、および4-オクテニレン、エチニレン、プロピニレン、1-および2-ブチニレン、2-メチルプロピレン、1-および2-ペンチニレン、2-メチルブチレン、1-、2-、および3-ヘキシニレン、1-、2-、および3-ヘプチニレン、1-、2-、3-、および4-オクチニレンなどが挙げられる。

30

40

## 【0052】

用語「(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)アリール」は、限定されないが、フェニルおよびナフチルなどの単環または縮合された複数の環からなる、6~10個の炭素原子を有する芳香族炭素環式基を表し、用語「(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)アリーレン-ジイル」は、限定されないが、フェニレンおよびナフチレンなどの単環または縮合された複数の環のいずれかからなる、6~10個の炭素原子を有する二価の芳香族炭素環式基を表す。

## 【0053】

50

用語「ヘテロアリール」は、N、O、またはSから選択される1～3個、好ましくは1～2個のヘテロ原子を含有する5～10員の単環式もしくは多環式芳香族複素環に由来するラジカルを指す。単環式ヘテロアリールの例としては、ピロリル、フリル、チエニル、チアジニル、ピラゾリル、ピラジニル、イミダゾリル、オキサゾリル、イソキサゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、ピリジル、ピリミジニル、1, 2, 3 - トリアジニル、1, 3, 4 - トリアジニル、および1, 3, 5 - トリアジニルが挙げられるが、これらに限定されない。多環式ヘテロアリールラジカルは、好ましくは、限定されないが、ベンゾフリル、イソベンゾフリル、ベンゾチエニル、インドリル、キノリニル、イソキノリニル、イミダゾ[1, 2 - a]ピリジル、ベンズイミダゾリル、ベンズチアゾリル、ベンゾキサゾリル、ピリド[1, 2 - a]ピリミジニル、および1, 3 - ベンゾジオキシニルなどの2つの環から構成される。ヘテロアリールは、任意に、ハロゲン、-OH、-COOH、-CN、-NO<sub>2</sub>、-SH、または-CONH<sub>2</sub>から各々独立して選択される1つ以上の基によって置換され得る。多環式ヘテロアリールが置換される場合、置換は、炭素環式環および/または複素環式環のいずれにあってもよいことも理解する。用語「ヘテロアリーレンジル」は、環原子のいずれかから2個の水素原子を除去することによる、本明細書において定義される「ヘテロアリール」に由来する二価のラジカルを表す。

10

**【0054】**

本明細書で使用されるとき、用語「ハロゲン」は、フルオロ、クロロ、ブロモ、またはヨードを指す。

**【0055】**

20

用語「(C<sub>3</sub> - C<sub>8</sub>)シクロアルキレン」は、3～8個の炭素を含有する単環式または2環式の飽和二価環式炭化水素ラジカルを表す。このようなラジカルの非限定的な例としては、1, 2 - シクロプロパン - ジイル、1, 2 - シクロブタン - ジイル、1, 3 - シクロブタン - ジイル、1, 2 - シクロペンタン - ジイル、1, 3 - シクロペンタン - ジイル、1, 2 - シクロヘキサン - ジイル、1, 3 - シクロヘキサン - ジイル、1, 4 - シクロヘキサン - ジイル、1, 2 - シクロヘプタン - ジイル、1, 3 - シクロヘプタン - ジイル、1, 4 - シクロヘプタン - ジイル、1, 2 - シクロオクタン - ジイル、1, 3 - シクロオクタン - ジイル、1, 4 - シクロオクタン - ジイル、1, 5 - シクロオクタン - ジイルなどが挙げられる。

**【0056】**

30

本明細書で使用されるとき、用語「アミノ酸残基」は、そのL - およびD - 両方の立体異性体において、任意の自然の、または合成の、すなわち、非自然のアミノ酸残基を指す。自然のアミノ酸は、典型的にはタンパク質において生じる20個のアミノ酸残基のうちのいずれか1つであるが、用語合成/非自然アミノ酸は、20個の自然のアミノ酸のうちの1つではない、任意のアミノ酸、修飾アミノ酸、および/またはそれらの類似体を指す。自然アミノ酸の非限定的な例としては、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、リジン、バリン、フェニルアラニン、グルタミン酸、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン、アルギニン、ヒスチジン、プロリン、セリン、チロシン、メチオニン、スレオニン、およびトリプトファンが挙げられる。非自然アミノ酸の例としては、オルニチン、ホモリジン、2, 4 - ジアミノ酪酸(DABA)、2, 3 - ジアミノプロピオン酸(DAP)、8 - アミノオクタン酸(EAO)、ホモフェニルアラニン、ホモバリン、ホモロイシンなどが挙げられるが、これらに限定されない。

40

**【0057】**

本発明による薬学的組成物は、1つ以上の生理学的に許容される担体および/または賦形剤を使用して、従来の方法で製剤化され得る。担体(複数可)は、組成物の他の成分と適合性があり、そのレシピエントに有害ではないという意味で「許容可能」でなければならない。

**【0058】**

担体、投与様式、剤形などの以下の例示は、担体、投与様式、剤形などが本発明と共に使用するために選択され得る既知の可能性として列記される。しかしながら、当業者は、

50

任意の所与の製剤および選択される投与様式が所望の結果を達成することを決定するために最初に試験されるべきであることを理解するだろう。

【0059】

投与方法は、非経口、例えば、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、粘膜（例えば、口腔、鼻孔内、頬側、膣、直腸、眼内）、くも膜下腔内、局所、および皮内経路を含むが、これらに限定されない。投与は全身または局所であり得る。ある特定の実施形態では、薬学的組成物は、脳内投与用に適応される。

【0060】

用語「担体」は、希釈剤、アジュバント、賦形剤、または活性剤が投与されるビヒクルを指す。薬学的組成物中の担体は、微結晶セルロース、ポリビニルピロリドン（ポリビドンまたはポビドン）、トラガントガム、ゼラチン、デンプン、ラクトースもしくはラクトースー水和物などの結合剤、アルギン酸、トウモロコシデンプンなどの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウムもしくはラウリル硫酸ナトリウムなどの滑沢剤または界面活性剤、およびコロイド状の二酸化ケイ素などの滑剤を含み得る。

10

【0061】

組成物は、注射により、例えば、ボーラス注射または連続注入により非経口的投与用に製剤化され得る。注射用製剤は、単位剤形、例えば、アンプルまたは多投与容器で提示され得、防腐剤が添加される。組成物は、懸濁液、油中溶液もしくはエマルジョン、または水生ビヒクルなどの形態を取ることができ、懸濁剤、安定剤、および/または分散剤などの製剤用作用物質を含有し得る。別の方法としては、活性成分は、使用前に、好適なビヒクル、例えば、滅菌発熱性物質除去蒸留水と構成する粉末形態であり得る。

20

【0062】

吸入による投与に関して、例えば、鼻投与に関して、本発明による組成物は、便宜上、好適な噴射剤、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素、または他の好適なガスの使用により、加圧パックまたはネブライザからのエアロゾルスプレー供給の形態で送達される。加圧エアロゾルの場合、投与単位は、計量した量を送達するためのバルブを提供することによって決定され得る。化合物の粉末ミックスおよびラクトースまたはデンプンなどの好適な粉末基材を含有する、吸入器または注入器において使用するための、例えばゼラチンのカプセルおよびカートリッジが製剤化され得る。

30

【0063】

ある特定の実施形態では、薬学的組成物は、上述の任意の既知の方法による投与用に製剤化される。本明細書において想定される特定の投与方法は、静脈内および脳内（脳内（intracerebral））投与である。

【0064】

上記に定義される実施形態のうちのいずれか1つによる薬学的組成物は、静脈内、脳内（脳内）、口腔、皮内、筋肉内、皮下、経皮、経粘膜、鼻孔内、または眼内投与用に製剤化され得る。

【0065】

本発明は、ここで、以下の非限定的な実施例により図示される。

40

【実施例】

【0066】

材料および方法（M & M）

化学物質

PDP-PEG-NHS（PDP：ピリジルジチオプロピオン酸塩）とも称される、NHS-PEG-OPSS（オルト-ピリジジスルフィド-ポリエチレングリコール-N-ヒドロキシルスクシンイミドエステル）（約2 kDaの分子量）は、Creative Peptide Works（Winston, USA）から購入した。ポリ（2-エチル-2-オキサゾリン）（約50 kDaの平均分子量（Mn））、および無水ジメチルスルホキシド（DMSO）は、Sigma Aldrich（Israel）から購入した。無水エ

50



タノールは、Romical (Israel) から購入した。すべての溶媒は、更に精製することなく使用された。

#### 【0067】

約22kDaのLPEI（遊離塩基形態）の合成

カチオン性ポリマーの直鎖ポリエチレンイミン（LPEI）は、前述のように合成された[16]。簡潔に、8.0g（0.16mmol）のポリ（2-エチル-2-オキサゾリン）を、100mlの濃縮HCl（37%）で加水分解し、48時間還流して、白色の沈殿物を得た。減圧下で過剰のHClを除去し、残りの固体を50mlの水に溶解し、凍結乾燥させた（5g、78%、<sup>1</sup>H-NMR、D<sub>2</sub>O-d<sub>6</sub>、400MHz：一重項3.5ppm）。水性NaOH（3M）を添加することによって、得られたLPEI塩酸塩（4.5g）をアルカリ性にし、得られた白色の沈殿物を濾過し、中性になるまで水で洗浄した。次に、固体を水に溶解し、更に凍結乾燥して、白色の固体（2g、81%）を得た。

10

#### 【0068】

LPEI-PEG<sub>2k</sub>-OPSS二抱合体の合成

174mg（8μmol）のLPEIを2.7mlの無水EtOHに溶解し、室温で15分間撹拌した。5倍のモル過剰のOPSS-PEG<sub>2k</sub>-CONHS（79mg、39.5μmol）を500μLの無水DMSOに溶解し、少しずつLPEI混合物に導入した。反応ミックスを、室温で3時間、ボルテックス撹拌機で、約800rpmで撹拌した。MacroPrep High S樹脂（BioRad）で充填されたHR10/10カラムを使用して、陽イオン交換クロマトグラフィーにより、異なるPEG置換LPEIを分離した。二抱合体の溶出画分の純度は、1ml/分の流量で25分にわたって5%~95%アセトニトリルの直線勾配を用いて、分析用Vydac C-8モノマー5μmカラム（300、4.6×150mm）を装備した逆相HPLCを使用して評価された。95%以上の純度の画分を組み合わせた。組み合わせた画分を20mMのHEPES（pH7.4）に対して更に透析した。二抱合体においてLPEIに抱合されたPEG<sub>2k</sub>基の比率は、<sup>1</sup>H-NMRにより決定された。ポリエチレン-（CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O）-およびLPEI-（CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH）-からの水素の積分値は、2つの抱合されたコポリマー間の比率を決定するために使用された。陽イオン交換から得られた様々な生成物のうち、LPEI-PEG<sub>2k</sub>-OPSS（二抱合体1：1、LPEI対PEGのモル比は約1：1）およびLPEI-（PEG<sub>2k</sub>）<sub>3</sub>-（OPSS）<sub>3</sub>（二抱合体1：3、モル比は約1：3）の2つの生成物が三抱合体の生成用に選択された。コポリマーの濃度を評価するために、銅アッセイを使用した[17]。簡潔に、コポリマーをCuSO<sub>4</sub>（23mgを100mlのアセテート緩衝液に溶解した）と20分間インキュベートし、285nmでのそれらの吸光度を測定した。

20

30

#### 【0069】

タンパク質のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）

サンプル（30μL）を、100mMのDTTと共に、またはそれなしでSDSタンパク質サンプル緩衝液中に希釈し、次に、トリシゲル（13%ポリアクリルアミド）に適用した。カソード緩衝液（0.1Mのトリス、0.1Mのトリシン、および0.1%のSDS（pH8.25））およびアノード緩衝液（0.21Mのトリス（pH8.9））を用いて電気泳動を実施し、InstantBlue（商標）で染色することによって、タンパク質バンドを可視化した。

40

#### 【0070】

アフィボディ発現および精製

Her-2アフィボディ遺伝子をプラスミドpET28aにクローン化し、N末端ヘキサヒスチジル（His<sub>6</sub>）タグに融合されたZ：2891アフィボディおよびC末端にCys残基をコードするベクターを生成した。アフィボディを、以下のように大腸菌BL21（DE3）中に発現させた：37℃で、細胞を約0.7のOD<sub>600</sub>に成長させた。0.5mMの最終濃度にIPTGを添加し、続いて30℃で4時間インキュベートした。細

50

胞ペレットを - 80 °C で保管した。アフィボディを精製するために、細胞ペレットを緩衝液 A ( 20 mM HEPES ( pH 7.4 )、500 mM NaCl、10 % グリセロール、10 mM イミダゾール、および 2 mM β-メルカプトエタノール ) に再懸濁し、製造者の指示に従いマイクロ流動化装置プロセッサ M - 110 EHI を用いて破碎した。4 °C で 10 分間、12,000 X g で遠心分離することにより、可溶性画分を回収した。得られた画分を Ni 親和性カラム ( Clontech, Mountain View, CA ) に充填した。カラムを 14 カラム容量 ( cv ) の緩衝液 A で洗浄した。その後、緩衝液 B ( 20 mM HEPES ( pH 7.4 )、500 mM NaCl、10 % グリセロール、500 mM イミダゾール、および 2 mM β-メルカプトエタノール )、5 cv の 6 % 緩衝液 B、1.5 cv の 10 % 緩衝液 B、2 cv の 30 % 緩衝液 B の増加濃度を用いて、段階的勾配溶離を実施した。結合タンパク質を 5 cv の 100 % 緩衝液 B で溶出した ( タンパク質精製施設 Wolfson centre, Israel )。次に、溶出した画分を Amicon フィルタ ( 3 kDa カットオフ ) で濃縮し、ゲル濾過カラム Superdex 30 prep グレード ( 120 ml ) ( GE healthcare ) 上に充填した。精製したタンパク質を SDS - PAGE で更に分析し、抗アフィボディ抗体 ( Abcam ) を用いて、ウェスタンブロット解析を使用して確認した。前述の逆相 HPLC ( Merck - Hitachi モデル L - 7100 ) により、純度を更に評価した。

#### 【 0071 】

PEI - PEG - リガンドアフィボディ ( 三抱合体 1 : 1 および 1 : 3 ) の合成

4.97 mg の各二抱合体 ( 1 : 1 および 1 : 3 ) を 940 μl の 20 mM HEPES ( pH 7.4 ) に溶解した。次に、HBS 中の 3.4 mg の Her - 2 アフィボディを反応物に滴下して添加した。溶解度を増加させるために、4 ml の 20 mM HEPES と 700 μL のアセトニトリル ( HPLC グレード ) を反応ミックスに導入した。A<sub>340</sub> が完全なターンオーバーを示すまで、反応物を、室温で更にボルテックスにかけた ( 800 rpm )。得られた三抱合体を、MacroPrep High S 樹脂 ( BioRad ) で充填した HR10 / 10 カラム上で陽イオン交換クロマトグラフィーにより ( 3 M NaCl を含む、20 mM HEPES ( pH 7.4 ) ~ 20 mM HEPES の 3 段階勾配溶離を使用して ) 精製した。溶出した画分を分析用 RP - HPLC に導入して、三抱合体の純度を評価し、95 % 以上の純度の画分は組み合わせられ、- 80 °C に維持された。三抱合体の濃度は銅アッセイ ( 上記の通り ) により決定された。抱合したタンパク質の量は、Nano - Drop 2000 を使用して、A<sub>280</sub> により決定された。

#### 【 0072 】

標的タンパク質に抱合された化学ベクターの検証および純度

三抱合体を SDS - PAGE で電気泳動し、Instant Blue ( 商標 ) で染色して、アフィボディの LPEI - PEG<sub>2k</sub> への抱合を確認した。三抱合体の純度は、220 nm で監視しながら、1 ml / 分で、分析用 Vydac C - 8 モノマー 5 μm カラム ( 300 、 4.6 x 150 mm ) を使用して、逆相 HPLC により確認された。移動相として 0.1 % TFA を含有する 3 回蒸留した水 ( TDW ) で 25 分間、アセトニトリル 5 % ~ 95 % での勾配溶離が HPLC 分析に使用された。

#### 【 0073 】

ポリプレックスの形成

ホタルのルシフェラーゼおよび GFP ( System Biosciences, Inc ) をコードするプラスミド pGreenFire1 を、大腸菌において増幅し、製造者のプロトコルに従い、Qiagen Plasmid Maxi Kits ( Qiagen, Valencia, CA, USA ) により精製した。三抱合体 1 : 1 または三抱合体 1 : 3 は、HEPES 緩衝液グルコース中 N / P = 6 の比率で ( N = LPEI からの窒素、P = DNA からのリン酸 ) プラスミドと複合体を形成し、2つのポリプレックスを生成した。ポリプレックス粒子の完全な形成を可能にするために、サンプルを室温で 30 分間インキュベートした。ポリプレックスサンプルにおける最終プラスミド濃度は 100 μg / ml であり、一方、DNase 保護アッセイおよびルシフェラーゼアッセイに関しては

10

20

30

40

50

、プラスミドの最終濃度は  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  であった。

#### 【0074】

##### 電位およびサイズ測定

H B G 緩衝液中への分散後に得たポリプレックス粒子のサイズは、容量分布計算を用いて、Nano-ZSゼータ電位測定装置 (Malvern, UK) を使用して、動的光散乱により、25 で測定された。装置は633nmレーザーを装備し、光散乱は、後方散乱技術 (NIBS, Non-Invasive Back-Scatter) により173°で検出された。各サンプルは3連で行われた。電位測定もNano-ZSゼータ電位測定装置 (Malvern, UK) を使用して、25 で実施された。電位は、H B G 緩衝液 (pH 7.4) 中でポリプレックスをインキュベートした後に評価された。移動粒子からの光散乱は17°で検出され、スモルコフスキーモデルはヘンリー関数の値を決定するために使用された。

10

#### 【0075】

##### 原子間力顕微鏡

A F M 測定に関して、ポリプレックスを、新しく切断したMicaディスク (V1 12mm, Ted Pella USA) 上に設置した。撮像は、QI (商標) モードで、商業用A F M のNanoWizard (登録商標) 3 (JPK instrument, Berlin, Germany) を使用して、25 のH B G 緩衝液において実行された。10~30 pN nm<sup>-1</sup> の範囲のパネ定数のSi<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (MSNL-10シリーズ、Bruker) カンチレバーは、約10%の絶対誤差の上限で熱揺動方法 (A F M ソフトウェアに含まれる) により較正された。QI (商標) 設定は次の通りである：Z長：0.1 μm；加えた力：0.5 nN；速度：50 μm/秒。

20

#### 【0076】

##### D N a s e 保護アッセイ

D N a s e I 保護アッセイは前述のように行われた [18]。簡潔に、単独、ポリプレックス1:1、またはポリプレックス1:3を伴う1 μg のpGreenFire1 DNAを、H B S 溶液中50 μl の最終容量に混合した。室温で30分間インキュベートした後、2 μL のD N a s e I (2単位) またはP B S を10 μL の各サンプルに添加し、37 で15分間インキュベートした。D N a s e I 活性は、室温で10分間、5 μL の100 mM E D T A を添加することにより停止された。三抱合体からプラスミドを解離するために、10 μL の5 mg/mL ヘパリン (Sigma, St. Louis, MO) を添加し、チューブを室温で2時間インキュベートした。サンプルを0.8%アガロースゲル上で電気泳動し、臭化エチジウムで染色した。Gel Doc EZ Imager (Bio Rad Laboratories, Inc) を使用して、画像を取得した。

30

#### 【0077】

##### 細胞培養

Her-2 過剰発現 B T 4 7 4 細胞を、10%ウシ胎児血清 (FBS)、 $10^4$  U/L ペニシリン、および10 mg/L のストレプトマイシンで補足したRPMI培地中で、37 で、5%CO<sub>2</sub> 下で培養した。MDA-MB-231ヒト乳癌細胞を、10%FBS、 $10^4$  U/L ペニシリン、および10 mg/L ストレプトマイシンを有するLeibovitz L-15培地中で、CO<sub>2</sub> なしで37 で培養した。細胞系はATCCからであり、細胞培養試薬はBiological Industries, Bet Ha'emek, Israel からであった。

40

#### 【0078】

##### ルシフェラーゼアッセイおよび共焦点顕微鏡

10000個のB T 4 7 4 およびMDA-MB-231細胞を、3連で、96ウェルプレートで平板培養した。処理の48時間後、細胞を、プラスミドと複合体を形成した三抱合体1:1および三抱合体1:3で処理し、細胞をP B S で洗浄し、ウェル当たり30 μl の細胞溶解緩衝液 (Promega, Mannheim, Germany) で溶解した

50

。製造者の推奨に従い、ルシフェラーゼアッセイ系 (Promega) を用いて、ルシフェラーゼ活性を  $25 \mu\text{l}$  の溶解物のサンプルにおいて測定した。Luminoskan (商標) Ascent Microplate Luminometer (Thermo Scientific) を用いて、測定を実施した。相対的光単位 (RLU) における値は、3 連サンプルからのルシフェラーゼ活性の平均および標準偏差として表される。GFP を可視化するために、共焦点顕微鏡 (FV-1200 Olympus) を使用し、これはプラスミド pGreenFire1 の内在化を反映するためにとられた。写真は  $\times 10$  倍率で撮られた。

#### 【0079】

##### 細胞生存率の定量化

細胞生存率は、前述のメチレンブルーを用いた比色分析アッセイにより測定された [19]。簡潔に、10000 個の BT474 および MDA-MB-231 細胞を、3 連で、96 ウェルプレートで平板培養した。細胞を、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  の pGreenFire1 を含有するポリプレックス 1 : 1 および 1 : 3 で処理した。処理の 48 時間後、細胞を PBS (pH 7.4) 中 1% ホルムアルデヒドで固定し、DDW で洗浄し、次に、ホウ酸塩緩衝液中 1% (wt/vol) 溶液のメチレンブルーで 1 時間染色した。その後、染色を 0.1 M HCl で抽出し、染色溶液の光学密度を、マイクロプレートリーダー (ELx800 BIO-TEK instruments Inc.) において、630 nm で読み取った。

#### 【0080】

##### 実施例 1 - チオール反応性コポリマーの合成

3.1. 以前の研究は、LPEI の PEG 化および EGFR 標的部分へのその抱合を示した [13]。しかしながら、単一 LPEI 鎖上の PEG 化の量は完全に特徴付けされていない。差次的に PEG 化されたコポリマーを生成するために、LPEI 上の二級アミンを PEG 上の保護基に直交する末端 NHS エステルに抱合した。N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) エステルは、LPEI の二次骨格アミンと自然発生的に反応性であり、LPEI の効率的な PEG 化を提供する。更に、PEI のアミンとの NHS-PEG OPSS の反応は、安定した不可逆的なアミド結合の形成をもたらす (図 1)。

#### 【0081】

PEG 化された生成物は、陽イオン交換クロマトグラフィーにより精製された。1 つは  $120 \text{ mS}/\text{cm}$  で、もう 1 つは  $132 \text{ mS}/\text{cm}$  での (データ示さず)、2 つのピークが高濃度の NaCl で溶出された。2 つの生成物は、それらの LPEI : PEG の比率において、およびその結果としてそれらの正味の正電荷において異なると推定された。 $^1\text{H}$ -NMR スペクトルは、PEG (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-) 上の水素原子の相対的な積分値 (図 2)、および LPEI (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-) 上の水素原子の積分値 (図 2) を使用して分析された。この分析は、第 1 ピークにおいて溶出された材料が、LPEI の各モルが PEG の約 3 モルに抱合されたコポリマーからなったことを示した。この生成物は、LPEI - (PEG<sub>2k</sub>)<sub>3</sub> - (OPSS)<sub>3</sub> (「二抱合体 1 : 3」) と命名された。第 2 のピークは、等モルの PEG が LPEI に抱合されたコポリマーからなり、LPEI - PEG<sub>2k</sub> - OPSS (「二抱合体 1 : 1」) と命名された (図 2)。

#### 【0082】

実施例 2 . 三抱合体 LPEI - PEG<sub>2k</sub> - Her2 アフィボディ (三抱合体 1 : 1) および LPEI - (PEG<sub>2k</sub>) - (Her2)<sub>3</sub> アフィボディ (三抱合体 1 : 3) の合成

この研究の主な目的は、Her-2 過剰発現腫瘍細胞を標的とするであろうカチオン性ポリマーを開発することであった。Her-2 は「オーファン受容体」であるため、Her-2 受容体を標的とするアフィボディ分子 (リガンドではなく) は、Her-2 標的三抱合体を生成するために使用された。我々は、更なる抱合を可能にするために、C-末端に Cys 残基を有する Her-2 アフィボディを発現および精製した。チオール反応性コポリマーの二抱合体 1 : 1 および 1 : 3 は、その末端 Cys 残基を通して Her-2 アフ

10

20

30

40

50

ィボディに抱合され、それぞれ、三抱合体 1 : 1 および 1 : 3 を生成した ( 図 3 )。三抱合体を生成するために、反応は、低濃度のアフィボディで ( 凝集を阻止するため )、および溶解度増加のために有機極性溶媒として 10 % アセトニトリル ( A C N ) の存在下で実施されなければならなかった。両三抱合体反応の反応物収率は、銅アッセイにより決定されたとき、約 33 % であった。アフィボディの二抱合体への抱合を確認するために、三抱合体生成物を D T T で還元し、S D S - P A G E 上で分離した。クマシーブルー染色は、還元した三抱合体がアフィボディを放出したことを確認した ( 図 4 )。三抱合体中に存在する H e r - 2 アフィボディの量は、 $A_{280}$  を測定することにより決定された。銅アッセイを使用して、我々は L P E I を定量化した。上述のように、 $^1\text{H-NMR}$  分析は、精製した二抱合体の L P E I : P E G の比率が 1 : 1 または 1 : 3 であったことを示した。H e r - 2 アフィボディおよび L P E I のモル比を比較することにより、我々は、三抱合体 1 : 1 における H e r - 2 アフィボディ対 L P E I の平均比率が 1 : 1 であり、三抱合体 1 : 3 では、平均比率が 3 : 1 であったと決定した。よって、我々は、アフィボディの L P E I - P E G へのほぼ完全な抱合が達成されたと結論付けた。

10

#### 【 0 0 8 3 】

ポリプレックスを生成するために、材料および方法において記載されるように、純粋な二抱合体および三抱合体 ( 1 : 1 および 1 : 3 ) はプラスミド D N A と複合体を形成した ( 図 3 )。

#### 【 0 0 8 4 】

実施例 3 . ポリプレックスの 電位およびサイズ測定

20

我々は、次に、動的光散乱 ( D L S ) を使用して、サイズおよび表面電荷に関してポリプレックスを特徴付けた。ポリプレックスのサイズは、その送達特性に大きな影響を有する [ 21 ]。ポリプレックスのサイズに対する標的リガンドの作用を検証するために、我々は、二抱合体 1 : 1 および 1 : 3 の両方をプラスミドと複合体を形成させ、それらのサイズを測定することに決めた。二抱合体 1 : 1 は、 $115.2 \pm 8.2 \text{ nm}$  の平均粒子サイズを有し、二抱合体 1 : 3 は、 $253.1 \pm 9.5 \text{ nm}$  の平均粒子サイズを有した。プラスミドを有する三抱合体 1 : 1 から生成されたポリプレックスは、 $141 \pm 5.8 \text{ nm}$  の平均粒子サイズをもたらし、一方、プラスミドと複合体を形成した三抱合体 1 : 3 は、 $256 \pm 24.2 \text{ nm}$  の平均粒子サイズを有した ( 図 5 )。最小粒子 (  $73.9 \pm 3.0 \text{ nm}$  ) は、プラスミドを L P E I 単独と複合体を形成することにより生成されたポリプレックスにおいて得られた。アフィボディの二抱合体への抱合は、粒子サイズに対して少ししか影響がなかった。しかしながら、P E G 基の数は、粒子サイズに影響を及ぼし、P E G 基が立体障害をもたらし、プラスミド縮合に干渉することを示唆した。

30

#### 【 0 0 8 5 】

表面正電荷は負に帯電している細胞表面へのポリプレックス結合を容易にするが、過剰な正電荷は非特異的結合および顕著な毒性につながる可能性がある [ 12 ]。図 6 に示される様々な複合体の 電位は、P E G 単位の数増加に伴い 電位の減少を示した以前の研究と一致した [ 13 ]。我々の化学ベクターの表面電荷に対する P E G 基の作用を評価するために、我々は、プラスミド D N A の、前駆体である二抱合体 1 : 1 および 1 : 3、ならびに三抱合体 1 : 1 および 1 : 3 との複合体形成により形成されたポリプレックスの

40

電位を測定した。二抱合体ポリプレックス 1 : 1 は  $27.0 \pm 0.1 \text{ mV}$  の平均 電位を有し、二抱合体ポリプレックス 1 : 3 は  $20.0 \pm 1.0 \text{ mV}$  の平均 電位を有した。三抱合体ポリプレックス 1 : 1 は平均  $17.1 \pm 0.7 \text{ mV}$  の 電位を示し、一方、三抱合体ポリプレックス 1 : 3 は平均  $10.2 \pm 0.44 \text{ mV}$  を示した ( 図 6 )。サイズと違い、ポリプレックスの 電位は、P E G 基の数および H e r - 2 アフィボディの抱合の両方により影響を受けた。最小で、最も正に帯電しているポリプレックスが裸 L P E I で得られたが、これらの粒子は極めて毒性である [ 22 ]。我々は、P E G 基および標的部分の付加が毒性を低減するだろうと予測したが、ポリプレックスはそれでもサイズが比較的小さいため、核酸送達ベクターとしてのそれらの効率は損なわれまいと期待した。

#### 【 0 0 8 6 】

50

#### 実施例 4 . 原子間力顕微鏡を使用したポリプレックス形状の評価 .

粒子形状およびその送達特性に対する影響の重要性は重要視されている [ 2 3 ] . 我々は、原子間力顕微鏡 ( A F M ) を使用して、溶液中の三抱合体で得たポリプレックスの形態を分析した。三抱合体 1 : 1 および 1 : 3 ポリプレックスの直径は両方ともナノサイズ範囲 ( 図 7 A 、 図 7 B ) であり、 D L S により得られた結果と一致した。三抱合体 1 : 1 ポリプレックスは、主に楕円形の粒子を示した。大半の粒子は直径が 1 0 1 n m ~ 1 7 8 n m の範囲であり、平均粒子直径は 1 4 2 n m であった。少数の粒子は格別に大きく、一部は > 2 5 0 n m にも達した ( 図 7 A ) 。三抱合体 1 : 3 ポリプレックスは、形状がより不均一であり、更に、未定義の粒子形状を有する大きな凝集体をもたらした ( 図 7 B ) 。これらは、長さが 1 5 0 n m ~ 6 5 0 n m の範囲であり、平均粒子長は 3 1 2 n m であり、その幅は 8 5 n m ~ 4 0 0 n m の範囲であり、平均幅は 1 7 5 n m であった。

10

#### 【 0 0 8 7 】

#### 実施例 5 . D N A s e 保護アッセイ .

成功裏のインビボ遺伝子送達は、ヌクレアーゼからの効率的な保護に依存する。分解からプラスミドを保護し、効率的な遺伝子送達を可能にする三抱合体の能力を決定するために、ポリプレックスを D N a s e I で処理し、ゲル電気泳動を使用して分析した。図 8 に示されるように、裸プラスミド p G r e e n F i r e 1 D N A は、2 単位の D N a s e I と共に 1 0 分間インキュベートした後、完全に分解された。対照的に、ポリプレックスがプラスミドと三抱合体を混合することによって生成された場合、プラスミドは D N a s e I による分解から保護された。プラスミドの完全な保護は三抱合体ポリプレックス 1 : 3 において観察されたが、プラスミドの超らせん ( s . c . ) から開環 ( o . c . ) 形態へのシフトにより示されるように、ある程度のニッキングが三抱合体ポリプレックス 1 : 1 において生じた。三抱合体ポリプレックス 1 : 3 によって付与された D N a s e I からの強い保護は、これらの複合体における追加の P E G - タンパク質単位により提供された立体障害の増加に起因し得る。実際、以前の研究は、酵素および血清因子とのそれらの相互作用を妨げることににより、P E I の P E G 化がポリプレックスを安定させ、血中におけるそれらの循環を増加させることができることを示した [ 2 4 , 2 5 ] 。

20

#### 【 0 0 8 8 】

#### 実施例 6 . 標的三抱合体ポリプレックスの生物活性

ポリプレックスのサイズおよび電位は、標的 D N A 送達および遺伝子発現の効率に影響を及ぼすが、サイズの作用は、特定の抱合体に依存するように思われる [ 2 ] [ 2 1 ] 。三抱合体ポリプレックス 1 : 1 および 1 : 3 のトランスフェクションの特異性および効率を評価するために、H e r - 2 を差示的に発現する 2 つの乳癌細胞系が利用された。三抱合体 1 : 1 および 1 : 3 のポリプレックスは、p G r e e n F i r e 1 を用いて形成され、M D A - M B - 2 3 1 細胞 ( 約  $9 \times 10^3$  H e r - 2 受容体 / 細胞を発現する [ 2 6 ] ) および B T 4 7 4 細胞 ( 約  $1 \times 10^6$  H e r - 2 受容体 / 細胞を発現する [ 2 7 ] ) にトランスフェクトされた。異なるルシフェラーゼ活性がトランスフェクションの 4 8 時間後に観察された。三抱合体ポリプレックス 1 : 1 および 1 : 3 の両方は、B T 4 7 4 細胞において、M D A - M B - 2 3 1 よりも 3 0 0 倍を超える高いルシフェラーゼ活性をもたらした ( \* p < 0 . 0 0 1 ) ( 図 9 A ) 。B T 4 7 4 へのより効率的な遺伝子送達は、共焦点顕微鏡により見られるように、G F P 発現によって確認された ( 図 9 B ) 。これらの結果は、ポリプレックスの選択性が H e r - 2 発現に依存することを示す。

30

40

#### 【 0 0 8 9 】

三抱合体ポリプレックス 1 : 1 による B T 4 7 4 細胞への標的送達は、三抱合体 1 : 3 がより多くの標的部分を有したにも関わらず、三抱合体ポリプレックス 1 : 3 による送達よりも 1 0 倍効率的であった ( 図 9 A 、 B ) 。これは、三抱合体ポリプレックス 1 : 1 のより高い電位およびより下位サイズを反映し得る。

#### 【 0 0 9 0 】

正に帯電している L P E I 系化学ベクターは顕著な毒性と関係する。したがって、我々は、次に、三抱合体ポリプレックス 1 : 1 および 1 : 3 での処理後の M D A - M B - 2 3

50

1 および B T 4 7 4 細胞の生存を試験した。メチレンブルーアッセイにおいて、いずれのポリプレックスも M D A - M B - 2 3 1 細胞において細胞毒性作用を示さなかった。類似する結果が三抱合体ポリプレックス 1 : 3 で処理した B T 4 7 4 細胞において観察された。しかしながら、細胞の細胞毒性において、わずかな増加が三抱合体ポリプレックス 1 : 1 で処理した B T 4 7 4 において観察された (図 9 C)。まとめると、これらの結果は、サイズが小さく、電位が高い三抱合体ポリプレックス 1 : 1 が、毒性のわずかな増加を伴って、効率的な標的送達特性を付与することを示す。よって、三抱合体 1 : 1 のポリプレックスは、遺伝子送達において、より保護された三抱合体ポリプレックス 1 : 3 よりも優れている。

#### 【 0 0 9 1 】

実施例 7 . P E I - P E G - H e r 2 アフィボディの抗腫瘍活性

ポリイノシン - ポリシトシン ( P o l y I C ) と複合体を形成する P E I - P E G - H e r 2 アフィボディ ( P P H A ) は強い抗腫瘍活性を有する。H e r - 2 を過剰発現する乳癌細胞系は、P o l y I C との P E I - P E G - H e r 2 アフィボディの複合体により強く阻害されることが分かった。強い阻害は、トラスツズマブ耐性 H e r 2 過剰発現乳癌細胞系のもので観察された。

#### 【 0 0 9 2 】

図 1 0 は、ベクター / ポリプレックスがハーセプチン / トラスツズマブ耐性細胞を含む、H e r 2 過剰発現細胞を阻害することを示す。

#### 【 0 0 9 3 】

0 . 5 × 1 0 <sup>6</sup> M C F - 7 H E R - 2 細胞をヌードマウスに皮下注射した。腫瘍が平均 1 0 0 m m <sup>3</sup> に達した後、処置を開始した。1 m g / k g の p I C / P P H A を 2 4 時間ごとに静脈内注射した。2 つのマウス群に、週に 1 回 ( 矢印で示される )、トラスツズマブを静脈内投与した。腫瘍成長は週に 2 回測定された。複合体 P o l y I C / P P H A は、図 1 1 に例示されるように、これらの細胞系がヌードマウスに移植されたマウスモデルにおいて、強い抗腫瘍活性を有することが分かった。

#### 【 0 0 9 4 】

実施例 8 . L P E I - P E G - E G F R アフィボディの合成

5 m g ( 2 × 1 0 <sup>-4</sup> m m o l ) の L P E I - P E G <sub>2 k</sub> - O P S S ( 二抱合体 1 : 1 ) を、1 m l の 2 0 m M H E P E S ( p H 7 . 4 ) に溶解した。次に、H B S 中の 3 . 4 m g ( 3 . 8 × 1 0 <sup>-4</sup> m m o l 、約 2 当量) の E G F R アフィボディを滴下して反応物に添加した。溶解度を増加させるために、4 m l の 2 0 m M H E P E S と 7 0 0 μ L のアセトニトリル ( H P L C グレード ) を反応ミックスに導入した。A <sub>343</sub> が完全なターンオーバーを示すまで、反応物を室温および暗条件で更にボルテックスにかけた ( 8 0 0 r p m ) 。M a c r o P r e p H i g h S 樹脂 ( B i o R a d ) で充填された H R 1 0 / 1 0 カラム上で、陽イオン交換クロマトグラフィーにより ( 2 0 m M H E P E S ( p H 7 . 4 ) から 3 M N a C l を含有する 2 0 m M H E P E S の 3 段階勾配溶離を使用する ) 、得られた三抱合体を精製した。溶出した画分を分析用 R P - H P L C に導入して、L P E I - P E G - E G F R 三抱合体の純度を評価し、9 5 % 以上の純度の画分は組み合わせられ、- 8 0 ° C に維持された。三抱合体の濃度は銅アッセイにより決定された。抱合したタンパク質の量は、N a n o - D r o p 2 0 0 0 を使用して、A <sub>280</sub> により決定された。

#### 【 0 0 9 5 】

実施例 9 . P E I - P E G - E G F R アフィボディの抗腫瘍活性

P o l y I C と複合体を形成する P E I - P E G - E G F R アフィボディ ( P P E A ) は強い抗腫瘍活性を有する。E G F R を過剰発現する様々な細胞系は、ポリイノシン / ポリシトシン ( P o l y I C ) と複合体を形成する P E I - P E G - E G F R アフィボディ ( P P E A ) の複合体によって強く阻害されることが分かった。P P E A の有効性は P P E よりも高いことが分かる ( 図 1 2 A 、図 1 2 B ) 。

#### 【 0 0 9 6 】

複合体  $\text{Poly IC} / \text{PPEA}$  は、これらの細胞系がヌードマウスに移植されたマウスモデルにおいて、強い抗腫瘍活性を有することが分かった。

【0097】

5 周齢の 65 匹の雌のヌードマウスに、200 万個の A431 細胞を皮下注射した。7 日後、平均体積が  $136 \text{ mm}^3$  の腫瘍が成長し、以下のようにマウスを 6 つの群 (7 ~ 8 匹のマウス / 群) に分けた: UT;  $\text{pIC} / \text{PPEA}$ 、25 グラムのマウスに関して  $0.75 \text{ mg} / \text{kg} = 250 \mu\text{l}$  の  $\text{pIC}$ 、IC、6 / 週;  $\text{pI} / \text{PPEA}$ 、 $0.75 \text{ mg} / \text{kg}$  IV、6 / 週;  $\text{pIC} / \text{PPEA}$  低、25 グラムのマウスに関して  $0.1 \text{ mg} / \text{kg} = 250 \mu\text{l}$  の  $0.01 \mu\text{g} / \mu\text{l}$   $\text{pf pIC}$ 、IC、6 / 週。 $\text{pIC}$ 、 $\text{pI}$  ならびに  $\text{PPE}$  および  $\text{PPEA}$  は、複合体において通常 ( $0.1 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ ) よりも低い濃度の  $\text{pIC}$  を得るために、混合前に希釈された。図 13 は、インビボにおける  $\text{Poly IC} / \text{PPE fibrody}$  の活性を示す。同じく、 $\text{PPEA} / \text{Poly IC}$  の有効性は  $\text{Poly IC} / \text{PPE}$  よりも高い。

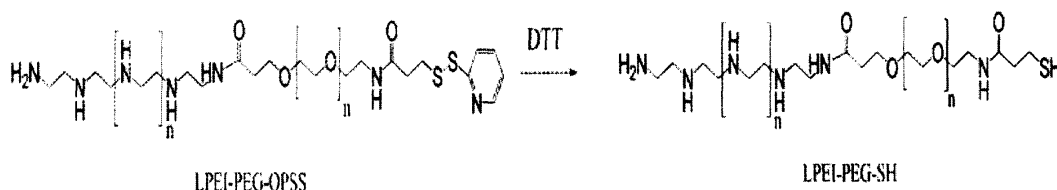
10

【0098】

実施例 10.  $\text{LPEI} - \text{PEG} - \text{h/mEGF}$  の合成

10.1.  $\text{LPEI} - \text{PEG} - \text{SH}$  中間体の合成

【化 13】



20

5 ml の 20 mM  $\text{HEPES}$  ( $\text{pH} 7.4$ ) 緩衝液中の 5 mg の  $\text{LPEI} - \text{PEG} - \text{OPSS}$  ( $0.2 \mu\text{mol}$ 、 $24000 \text{ g/mol}$  により) に、50 倍モル過剰のジチオスレイトール ( $\text{DTT}$ ;  $0.1 \text{ mmol}$ 、 $1.5 \text{ mg}$ ) を添加し、15 ml のプラスチック製遠心分離チューブ中で、室温で 20 分間、ボルテックスにより混合した。還元した二抱合体を、5 ml のサンプルループを使用して、 $\text{Sephadex G-25}$  カラム ( $20 \text{ ml}$ 、 $4 \times 5 \text{ ml}$ ) 上で分離し、溶出を、 $1.0 \text{ ml/分}$  の流量で、20 mM  $\text{HEPES}$  ( $\text{pH} 7.4$ ) を用いて実施し、上述と同じ条件および方法を用いて  $\text{HPLC}$  により

30

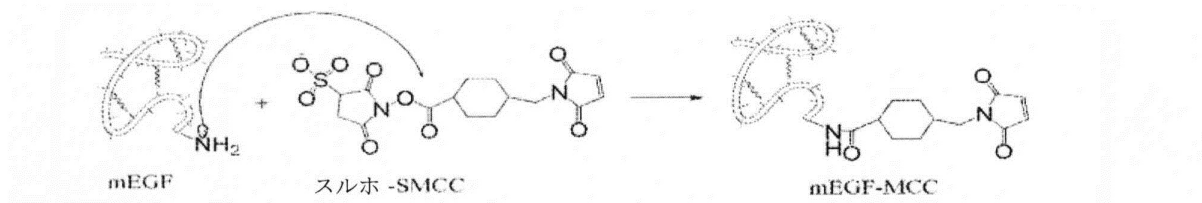
【0099】

エルマンアッセイは、 $\text{LPEI} - \text{PEG} - \text{SH}$  中間体におけるスルフヒドリル基濃度を評価するために使用された。 $\text{SH}$  基の濃度は、エルマン試薬と定量的に反応する遊離チオールにより放出される、発色団 6 - ニトロ - 3 - チオキソシクロヘキサ - 1, 4 - ジエン - 1 - カルボン酸の濃度と正比例する。発色団は、サンプルまたはエルマン試薬からいずれの干渉もなく、 $412 \text{ nm}$  での吸光度を介して測定された。

【0100】

10.2  $\text{m/hEGF} - \text{MCC}$  中間体の合成

【化 14】



40

合成概要.  $\text{h/mEGF}$  (ヒト/マウス上皮成長因子) を  $\text{h/mEGF} - \text{MCC}$  ( $\text{EGF} - 4 - (\text{N} - \text{マレイミドメチル}) \text{シクロヘキサ} - 1 - \text{カルボン酸}$ ;  $\text{MCC}$ ) に修飾し、後に  $\text{LPEI} - \text{PEG} - \text{SH}$  との抱合に使用するために精製した。 $\text{MCC}$  基を付加することによって  $\text{h/mEGF}$  を活性化することにより、 $\text{DTT}$  によるタンパク質の減少を回

50



避け、h/mEGFの過酷な条件への曝露を回避することを可能にする。このように、抱合反応の効率は改善され、更に、-EGF-MCCは、数週間、-80 で保管することができる安定した材料である。

#### 【0101】

hEGF-MCCの合成：1mgのhEGF(160nmol)を0.5mlの水中で再構築し、次にアルゴンで脱気した。hEGFの量は、nano-drop 2000を使用して、280nmで決定された。激しく混合しながら、溶液を0.5mlの200mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)および60%エタノールに添加した。アルゴン下で、溶液を、0.5mlの100%エタノール中の10当量の4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸3-スルホ-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルナトリウム塩(スルホ-SMCC)と混合した。わずかに酸性pHの反応混合物(pH6)は、hEGFのN末端アミノ基を選択的に修飾するために必要であった。室温で4時間後、官能化されたペプチドを、1時間1Lで3回、次いで一晩にわたって1Lで、HBS(100mM)に対して透析バック(3.5kカットオフ)により精製した。HPLC-質量スペクトル(MS)を使用して、hEGF-MCCを分析し、スルホ-SMCCのhEGFへの抱合が1つ存在することを示す、6435.7g/molの分子量を有した。HPLC-MS分析は、逆相C-18カラム(phenomenex, Aeris, 3.6μm, 2.1mm×50mm, 100Å)を装備したThermo Scientific/LCQ Fleetを使用して実施された。

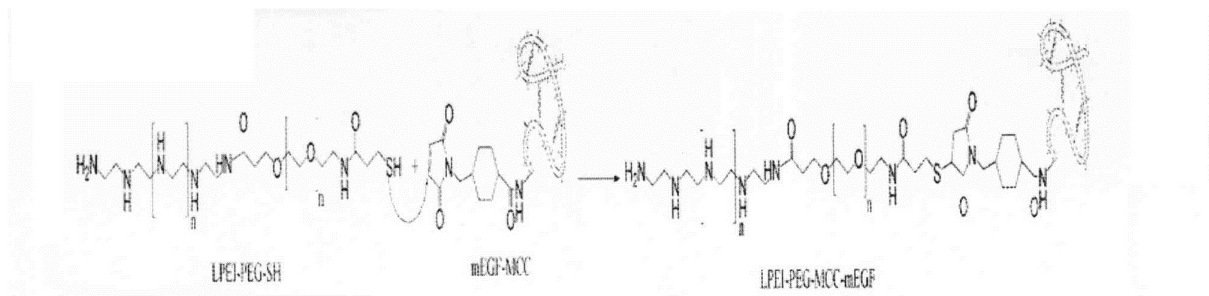
#### 【0102】

mEGF-MCCの合成：0.5mg(0.088μmol総量)のマウスEGF(PeproTech)を、2100μLの20mM HEPES緩衝液に溶解し、透明で粘稠な溶液を形成した。1mgのスルホ-SMCC(30当量, Ornate, IL)を、0.9mLの無水EtOHに溶解し、合計3.0mLの容量中30%EtOHの最終濃度を達成するように、EGF溶液とゆっくり混合した。短時間の混合は透明な溶液をもたらした。反応槽を周囲温度で4時間振盪させた。その期間後、溶液は透明のままであった。mEGF-MCCを、Sephadex G-25カラム(4×5mL)上で最初に分離し、溶出を、1.0mL/分の流量で、20mM HEPES(pH7.4)を用いて実施し、更に精製し、LPEI-PEG-OPSSに関して上述した同じ条件および標準方法を用いてHPLCにより分析した。

#### 【0103】

##### 10.3 LPEI-PEG-h/mEGFの合成

#### 【化15】



hEGF-MCCまたはmEGF-MCCの当量の1.5を、1.0当量のLPEI-PEG-SHと混合した。反応混合物を、最初に室温で2時間攪拌し、次に、ゆっくり振盪させながら、+4 で4日間インキュベートした。0.5mL/分の流量で、A18緩衝液注入口を介して勾配ポンプを使用して、ならびに溶媒A：20mM HEPES(pH7.4)および溶媒B：20mM HEPES(pH7.4)NaCl 3.0Mを使用して、陽イオン交換クロマトグラフィー(10/1cm Tricorn GE Healthcareカラムにおいて7.8cm MacroPrep High S樹脂(BioRad))により、反応生成物(LPEI-PEG-hEGFまたはLPEI-PEG-mEGF)を分離した。精製したLPEI-PEG-hEGFまたはLPEI-P

EG-mEGF三抱合体をHPLCにより分析し、「銅アッセイ」およびEGF光度アッセイにより定量化して、それぞれ、[LPEI]および[EGF]濃度を測定した。

#### 【0104】

10.4 LPEI-PEG-hEGFの生物活性.

我々が通常利用する細胞アッセイを使用して、PolyIC/LPEI-PEG-hEGF複合体(PPEm)の活性を、Schaffert D, Kiss M, Rodl W, Shir A, Levitzki A, Ogris M, Wagner E., 2011 (Poly(I:C)-mediated tumor growth suppression in EGF-receptor overexpressing tumors using EGF-polyethylene glycol-linear polyethylenimine as carrier. Pharm Res. 28:731-41)に記載されるPolyIC/mPPE(マウス)と比較した。新しいHEGF抱合体はEGFR過剰発現細胞の死滅においてより有効であることが分かった(図14)。適量のEGFR分子をそれらの表面上に発現する細胞(U87MG細胞は80,000個のEGFR/細胞を発現する)は、莫大な量を過剰発現する細胞(U87MGwtEGFR細胞は1,000,000個のEGFR/細胞を発現する)よりも治療にあまり感受性ではない。

#### 【0105】

実施例11. DUPA類似体-DyLight 680の合成

固体支持体としてのFmoc-Cys(trt)ワング樹脂に対して標準的なFmoc固相ペプチド合成(SPPS)手順を使用して、ペプチドを合成した。膨潤:ジクロロメタン中で少なくとも2時間、樹脂を膨潤させた。Fmocの除去:ジメチルホルムアミド(DMF)中20%ピペリジンの溶液で樹脂を最初に処理し(2×20分)、次に、DMF(5×2分)で洗浄した。Fmoc-Asp(OtBu)-OHのカップリング:3当量のFmoc-Asp(OtBu)-OH、3当量の(1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1,2,3-トリアゾロ[4,5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロホスフェート)(HATU)を15mLのDMFに溶解し、8当量のN,N-ジイソプロピルエチルアミン(DIEAまたはDIEA)を混合物に添加した。1時間、樹脂に添加する前に、溶液を室温で10分間混合した(事前活性化)。アスパラギン酸の完全なカップリングを確実にするために、新しい混合物でカップリングを2回繰り返した。完全なカップリングを確実にするために、カイザー試験を実施した。樹脂を、DMF(3×2分)およびジクロロメタン(DCM)(2×2分)で洗浄した。カップリング:樹脂を無水酢酸(10当量)およびDMF中のDIEA(8当量)の溶液で20分間処理し、DMF(3×2分)で洗浄した。Fmocの除去:DMF中20%ピペリジンの溶液で樹脂を最初に処理し(2×20分)、次に、DMFで洗浄した(5×2分)。Fmoc-ジアミノプロピオン(DAP)酸のカップリング:3当量のFmoc-ジアミノプロピオン(DAP)酸、3当量のHATU、および8当量のDIEAを、15mLのDMFに溶解した。1時間、樹脂に添加する前に、溶液を室温で10分間混合した(事前活性化)。完全なカップリングを確実にするために、カイザー試験を実施した。樹脂を、DMF(3×2分)およびDCM(2×2分)で洗浄した。ペプチド伸長:次の化合物を以下の順序で樹脂にカップリングした:(1)Fmoc-Phe-OH、(2)Fmoc-Phe-OH、(3)Fmoc-8-アミノオクタン(EAO)酸、および(4)OtBu-Glu(Fmoc)-OH。Fmocの除去:DMF中20%ピペリジンの溶液で樹脂を処理し(2×20分)、次に、DMF(5×2分)およびDCM(3×2分)で洗浄した。DUPAリガンドのカップリング:0.9mLのトリエチルアミン(6.6mmol)を、15mLのDCM中の0.9グラム(3mmol)のL-グルタミン酸ジ-tertブチルエステル塩酸塩と組み合わせた。この溶液を、45分にわたって0.5mLのDCMおよびトリホスゲン(0.35g、1.1mmol)の溶液に滴下して添加した。更に50分間攪拌した後、混合物を追加の0.9mLのトリエチルアミンと共に樹脂に添加した。樹脂を含む反応混合物を3時間振盪し、DMF(3×2分)で洗浄した。完全な切

10

20

30

40

50

断：樹脂をDCMで洗浄し（3×2分）、真空下で乾燥させた。0 のトリフルオロ酢酸（TFA）中の2.5%TDWおよび2.5%トリイソプロピルシランの溶液を添加した。反応を室温で4時間進ませ、濾過し、エーテル/ヘキサン1：1の冷却した溶液で処理し、遠心分離によりペプチドを沈殿させた。粗ペプチドをアセトニトリル/TDW1：1溶液に溶解し、凍結乾燥させた。分取逆相（RP）HPLCにより、粗生成物を精製した。DyLight 680カップリング：アルゴン雰囲気下で、1mgのDyLight（商標）680（Life Technologies、カタログ番号46418）を、50当量の無水ジイソプロピルエチルアミンを含有する無水ジメチルスルホキシド（DMSO；100μL）に溶解した。無水DMSO（100μL）に溶解された2倍モル過剰のDUPAペプチドリナーを上記の混合物に添加し、室温で撹拌した。生成物の形成は、液体クロマトグラフィー-質量分析（LC-MS）により確認された。次に、粗DUPA近赤外（NIR）プローブを分取RP-HPLCにより精製した。

10

#### 【0106】

##### 実施例12．Dup a類似体-薬物リードの合成

固体支持体としてのFmoc-Cys（trt）ワング樹脂に対して標準的なFmoc SPPS手順を使用して、ペプチドを合成した。膨潤：ジクロロメタン中で少なくとも2時間、樹脂を膨潤させた。Fmocの除去：DMF中20%ピペリジンの溶液で樹脂を処理し（2×20分）、次に、DMFで洗浄した（5×2分）。Fmoc-Gly-OHのカップリング：3当量のFmoc-Gly-OHおよび3当量のHATUを15mLのDMFに溶解し、続いて8当量のDIEAを添加した。1時間、樹脂に添加する前に、溶液を室温で10分間混合した（事前活性化）。新しい混合物でカップリングを2回繰り返した。完全なカップリングを確実にするために、カイザー試験を実施した。樹脂を、DMF（3×2分）およびDCM（2×2分）で洗浄した。カップリング：樹脂を無水酢酸（10当量）およびDMF中のDIEA（8当量）の溶液で20分間処理し、DMF（3×2分）で洗浄した。Fmocの除去：DMF中20%ピペリジンの溶液で樹脂を処理し（2×20分）、次に、DMFで洗浄した（5×2分）。Fmoc-Trp（Boc）-OHのカップリング：3当量のFmoc-Trp（Boc）-OH、3当量のHATU、および8当量のDIEAを15mLのDMFに溶解した。1時間、樹脂に添加する前に、溶液を室温で10分間混合した（事前活性化）。完全なカップリングを確実にするために、カイザー試験を実施した。樹脂を、DMF（3×2分）およびDCM（2×2分）で洗浄した。ペプチド伸長：次の化合物を以下の順序で樹脂にカップリングした：（1）Fmoc-Trp（Boc）-OH、（2）Fmoc-Gly-OH、（3）Fmoc-Phe-OH、（4）Fmoc-8-アミノオクタン（EAO）酸、および（5）OtBu-Glu（Fmoc）-OH。Fmocの除去：DMF中20%ピペリジンの溶液で樹脂を処理し（2×20分）、次に、DMF（5×2分）およびDCM（3×2分）で洗浄した。DUPAリガンドのカップリング：0.9mLのトリエチルアミン（6.6mmol）を、15mLのDCM中の0.9グラム（3mmol）のL-グルタミン酸ジ-tertブチルエステル塩酸塩と組み合わせた。この溶液を、45分にわたって0 の5mLのDCMおよびトリホスゲン（0.35g、1.1mmol）の溶液に滴下して添加した。更に50分間撹拌した後、混合物を追加の0.9mLのトリエチルアミンと共に樹脂に添加した。樹脂を含む反応混合物を3時間振盪し、DMF（3×2分）で洗浄した。完全な切断：樹脂をDCMで洗浄し（3×2分）、真空下で乾燥させた。0 のトリフルオロ酢酸（TFA）中の2.5%TDWおよび2.5%トリイソプロピルシランの溶液を添加した。反応を室温で4時間進ませ、濾過し、エーテル/ヘキサン1：1の冷却した溶液で処理し、遠心分離によりDUPA類似体を含有するペプチドを沈殿させた。粗ペプチドをアセトニトリル/TDW1：1溶液に溶解し、凍結乾燥させた。粗生成物を分取RP-HPLCにより精製した。PEI-PEG-DUPA類似体の合成：4.37mg（1.2×10<sup>-4</sup>mmol）の二抱合体1：1または1：3（上記の本明細書の実施例1に説明されるように調製された）を、940μLの20mM HEPES（pH7.4）に溶解した。次に、1：1の比率の2mLのアセトニトリル（ACN；HPLCグレード）/（20

20

30

40

50

mM HEPES (pH 7.4) に溶解した、1 mg ( $9.1 \times 10^{-4}$  mmol、約 5 当量) の DUPA 類似体を、反応物に滴下して添加した。次に、反応物中概算約 10 % 全濃度の ACN に達するように、追加の 4 mL の 20 mM を反応混合物に導入した。波長 343 ( $A_{343}$ ) での吸収が完全なターンオーバーを示すまで、室温の暗所で、反応物を更にボルテックスにかけた (800 rpm)。Macro Prep High S 樹脂 (BioRad) で充填された HR10/10 カラム上で、陽イオン交換クロマトグラフィーにより (20 mM HEPES (pH 7.4) から 3 M NaCl を含有する 20 mM HEPES の 3 段階勾配溶離を使用する)、得られた三抱合体を精製した。溶出した画分を分析用 RP-HPLC に導入して、三抱合体の純度を評価した。95 % 以上の純度を有する画分は組み合わせられ、 $-80^{\circ}\text{C}$  で維持された。三抱合体の濃度は銅アッセイにより決定された。抱合された DUPA 類似体の量は、発色団 (Trp アミノ酸) 吸収により決定された。

10

#### 【0107】

実施例 13. PolyIC / LPEI - PEG - DUPA は前立腺癌を標的とする。

前立腺表面膜抗原 (PSMA) は、転移性前立腺癌において過剰発現される。これは大半の固形腫瘍の新生血管系においても見られる。PSMA はリガンド結合時に内在化されるため、我々は、これを標的として選択し、PolyIC PSMA 標的ベクターを設計および合成する。実際、DUPA - Daylight 680 は、PSMA 過剰発現細胞 (LNCaP) に内在化されるが、MCF7 (過剰発現 Her2) (図示せず) には内在化されない。

20

#### 【0108】

図 15 は、PEI - PEG - DUPA (PPD) / PolyIC が LNCaP および VCaP 細胞に対して高度に有効であることを示す。生存率は曝露の 96 時間後に測定された。PPD はサイトカインの生成も誘導する (図 16 A、図 16 B)。図 17 において、LNCaP 細胞により条件付けされた培地が、条件付けされた倍中で成長した PBMC において、サイトカイン INF- $\gamma$ 、IL-2、および TNF- $\alpha$  の発現を刺激することを示す。その後、PolyIC / PPD 処理された LNCaP 細胞と、PSMA を発現しない PC3 - ルシフェラーゼ細胞の同時インキュベーションが、バースタンダー効果により、最大 70 % の PC3 - ルシフェラーゼ細胞の死滅をもたらしたことを示した。健康なヒト PBMC の付加は、効果を強く増強し、90 % の PC3 細胞の死滅につながる (図 18)。

30

#### 【0109】

実施例 14. インビボでの癌治療。

PolyIC / PPD は、SCID マウスで試験された際、顕著な抗腫瘍作用を有する (図 19)。腫瘍阻害は、実験マウスにおける免疫系の欠如により完了していない。

#### [項目 1]

2 本鎖 RNA (dsRNA) とポリマー抱合体とのポリプレックスであって、ポリマー抱合体が、1 つ以上のポリエチレングリコール (PEG) 部分に共有結合された直鎖ポリエチレンイミン (LPEI) からなり、各 PEG 部分が、癌抗原に結合することができる標的部分にリンカーを介して抱合されているが、但し、標的部分が、マウス EGFR または配列 YHWYGYTPQNV I (GE11) (配列番号 1) のペプチドでないことを条件とする、ポリプレックス。

40

#### [項目 2]

dsRNA が、ポリイノシン - ポリシチジル酸の 2 本鎖 RNA (ポリ I : C) であり、ポリマー抱合体が、1 つの PEG 部分 (LPEI - PEG 1 : 1) または 3 つの PEG 部分 (LPEI - PEG 1 : 3) に共有結合された LPEI からなり、癌抗原が、上皮成長因子受容体 (EGFR)、ヒト上皮成長因子受容体 2 (HER2)、または前立腺表面膜抗原 (PSMA) である、項目 1 に記載のポリプレックス。

#### [項目 3]

1 つ以上の PEG 部分が各々独立して、LPEI と -NH-CO- 結合、およびリンカ

50

-と、-NH-CO-、-CO-NH-、-S-C-、-S-S-、-O-CO-、または-CO-O-から選択される結合を形成する、項目1に記載のポリプレックス。

[ 項目 4 ]

1つ以上のPEG部分の1つ1つが、LPEIおよびリンカーと-NH-CO-結合を形成する、項目3に記載のポリプレックス。

[ 項目 5 ]

リンカーが、標的部分と-S-S-、NH-CO-、-CO-NH-、-S-C-、O-CO-、-CO-O-、または尿素(-NH-CO-NH)結合を形成する、項目1から項目4のいずれか一項に記載のポリプレックス。

[ 項目 6 ]

リンカーが、-CO-R<sub>2</sub>-R<sub>x</sub>-R<sub>3</sub>、または3～7個のアミノ酸残基からなるペプチド部分から選択され、

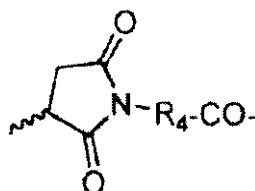
式中、

R<sub>2</sub>が、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキレン、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)アルケニレン、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)アルキニレン、(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)アリーレン-ジイル、またはヘテロアリーレンジイルから選択され、

R<sub>x</sub>が、不在であるか、または-S-であり、

R<sub>3</sub>が、不在であるか、または式

[ 化 1 ]



のものであり、

R<sub>4</sub>が、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキレン、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)アルケニレン、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)アルキニレン、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキレン-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)シクロアルキレン、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)アルケニレン-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)シクロアルキレン、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)アルキニレン-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)シクロアルキレン、(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)アリーレン-ジイル、ヘテロアリーレンジイル、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキレン-(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)アリーレン-ジイル、または(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキレン-ヘテロアリーレンジイルから選択され、

(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキレン、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)アルケニレン、または(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)アルキニレンの1つ1つが、任意に、ハロゲン、-COR<sub>5</sub>、-COOR<sub>5</sub>、-OCOOR<sub>5</sub>、-OCON(R<sub>5</sub>)<sub>2</sub>、-CN、-NO<sub>2</sub>、-SR<sub>5</sub>、-OR<sub>5</sub>、-N(R<sub>5</sub>)<sub>2</sub>、-CON(R<sub>5</sub>)<sub>2</sub>、-SO<sub>2</sub>R<sub>5</sub>、-SO<sub>3</sub>H、-S(=O)R<sub>5</sub>、(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)アリール、(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)アルキレン-(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)アリール、ヘテロアリール、または(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)アルキレン-ヘテロアリールから各々独立して選択される1つ以上の基によって置換され、更に任意に、S、O、もしくはNから選択される1つ以上の同一もしくは異なるヘテロ原子、および/または-NH-CO-、-CO-NH-、-N(R<sub>5</sub>)-、-N(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)アリール-、(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)アリーレン-ジイル、もしくはヘテロアリーレンジイルから各々独立して選択される少なくとも1つの基によって中断され、

R<sub>5</sub>が、Hまたは(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキルである、項目5に記載のポリプレックス。

[ 項目 7 ]

R<sub>2</sub>が、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキレン、好ましくは(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)アルキレンから選択され、任意に、ハロゲン、-COH、-COOH、-OCOOH、-OCONH<sub>2</sub>、-CN、-NO<sub>2</sub>、-SH、-OH、-NH<sub>2</sub>、-CONH<sub>2</sub>、-SO<sub>2</sub>H、-SO<sub>3</sub>H、-S(=O)H、(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)アリール、(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)アルキレン-(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)

アリール、ヘテロアリール、または ( $C_1 - C_4$ ) アルキレン - ヘテロアリールから各々独立して選択される 1 つ以上の基によって置換され、更に任意に、S、O、もしくはNから選択される 1 つ以上の同一もしくは異なるヘテロ原子、および / または  $-NH-CO-$ 、 $-CO-NH-$ 、 $-NH-$ 、 $-N(C_1 - C_8 \text{ アルキル})-$ 、 $-N(C_6 - C_{10} \text{ アリール})-$ 、( $C_6 - C_{10}$ ) アリーレン - ジイル、もしくはヘテロアリーレンジイルから各々独立して選択される少なくとも 1 つの基によって中断される、項目 6 に記載のポリプレックス。

[ 項目 8 ]

$R_2$  が、( $C_1 - C_8$ ) アルキレン、好ましくは ( $C_1 - C_4$ ) アルキレンから選択される、項目 7 に記載のポリプレックス。

10

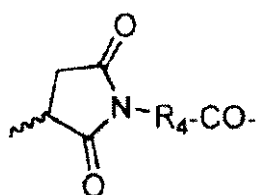
[ 項目 9 ]

$R_x$  が、 $-S-$  である、項目 6 に記載のポリプレックス。

[ 項目 10 ]

$R_3$  が、不在であるか、または

[ 化 2 ]



20

であり、式中、

$R_4$  が、( $C_1 - C_8$ ) アルキレン - ( $C_3 - C_8$ ) シクロアルキレン、好ましくは ( $C_1 - C_4$ ) アルキレン - ( $C_5 - C_6$ ) シクロアルキレンである、項目 6 に記載のポリプレックス。

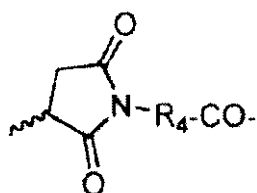
[ 項目 11 ]

$R_2$  が、 $-CH_2-CH_2-$  であり、

$R_x$  が、 $-S-$  であり、

$R_3$  が、不在であるか、または

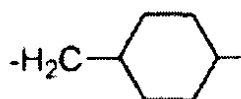
[ 化 3 ]



30

であり、式中、 $R_4$  が、

[ 化 4 ]



40

である、項目 6 から項目 10 のいずれか一項に記載のポリプレックス。

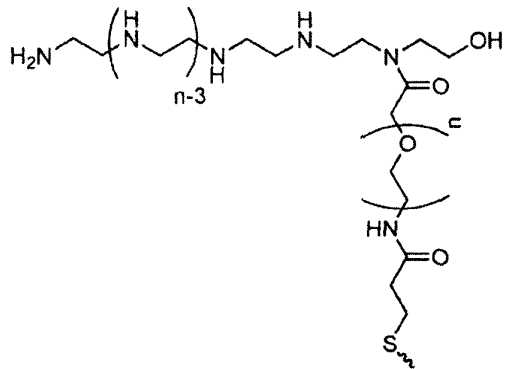
[ 項目 12 ]

ペプチド部分が、そのメルカプト基を介して標的部分に連結される、 $-(NH-(CH_2)_7-CO)-Phe-Gly-Trp-Trp-Gly-Cys-$  (配列番号 2) または  $-(NH-(CH_2)_7-CO)-Phe-Phe-(NH-CH_2-CH(NH_2)-CO)-Asp-Cys-$  (配列番号 3) である、項目 6 に記載のポリプレックス。

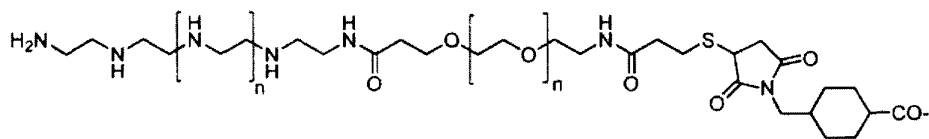
50

[ 項目 1 3 ]

ポリマー-抱合体が、標的部分（単数／複数）に連結される、式（Ⅰ）～（ⅤⅠⅠⅠ）の二抱合体である、項目 1 から項目 1 2 のいずれか一項に記載のポリプレックス：

（Ⅰ）[ 化 5 ]

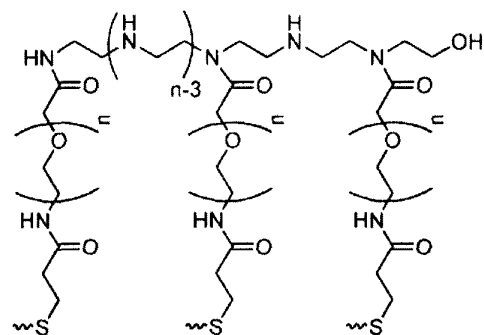
10

（ⅠⅠ）[ 化 6 ]

20

（ⅢⅢ）-（NH-（CH<sub>2</sub>）<sub>7</sub>-CO）-Phe-Phe-（NH-CH<sub>2</sub>-CH（NH<sub>2</sub>）-CO）-Asp-Cys-PEG<sub>2k</sub>-LPEI、

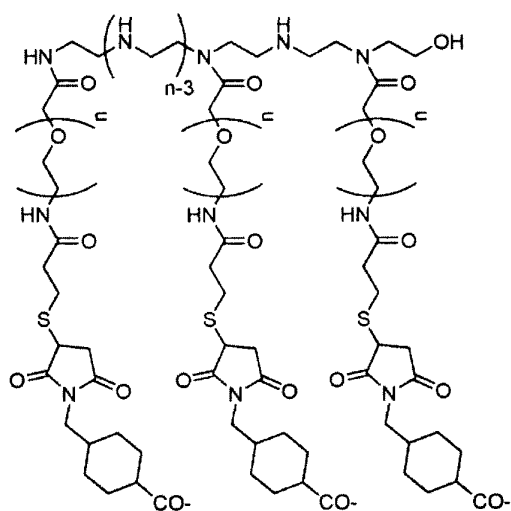
（ⅣⅣ）-（NH-（CH<sub>2</sub>）<sub>7</sub>-CO）-Phe-Gly-Trp-Trp-Gly-Cys-PEG<sub>2k</sub>-LPEI、

（Ⅴ）[ 化 7 ]

30

（ⅤⅠ）[ 化 8 ]

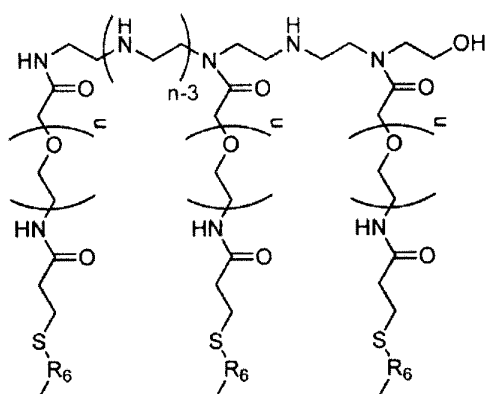
40



10

(VII)

[化9]

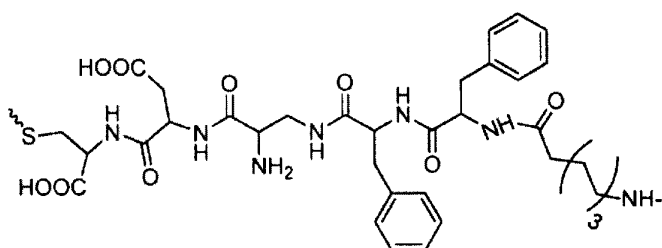


20

(式中、R<sub>6</sub>が、

[化10]

30



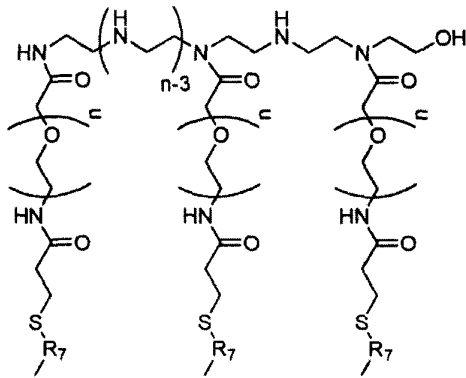
である)、または

(VIII)

[化11]

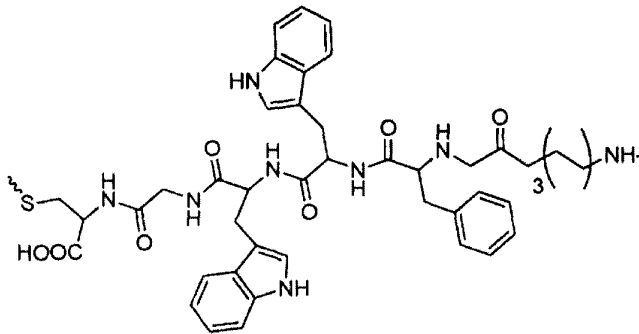
40





10

(式中、 $R_7$  が、  
[ 化 1 2 ]



20

である)。

[ 項 目 1 4 ]

( a ) 標的部分が、HER2 アフィボディであり、ポリマー抱合体が、式 ( I ) のものであり、HER2 アフィボディが、そのメルカプト基を介して連結される、

( b ) 標的部分が、HER2 アフィボディであり、ポリマー抱合体が、式 ( V ) のものであり、HER2 アフィボディが、そのメルカプト基を介して連結される、

( c ) 標的部分が、EGFR アフィボディであり、ポリマー抱合体が、式 ( I ) のものであり、EGFR アフィボディが、そのメルカプト基を介して連結される、

30

( d ) 標的部分が、EGFR アフィボディであり、ポリマー抱合体が、式 ( V ) のものであり、EGFR アフィボディが、そのメルカプト基を介して連結される、

( e ) 標的部分が、hEGF であり、ポリマー抱合体が、式 ( I I ) のものであり、hEGF が、そのアミノ基を介して連結される、

( f ) 標的部分が、hEGF であり、ポリマー抱合体が、式 ( V I ) のものであり、hEGF が、そのアミノ基を介して連結される、

( g ) 標的部分が、 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_2 - \text{CH}(\text{COOH}) - \text{NH} - \text{CO} - \text{NH} - \text{CH}(\text{COOH}) - (\text{CH}_2)_2 - \text{CO} - (\text{DUPA 残基})$  であり、ポリマー抱合体が、式 ( I I I ) のものである、

40

( h ) 標的部分が、 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_2 - \text{CH}(\text{COOH}) - \text{NH} - \text{CO} - \text{NH} - \text{CH}(\text{COOH}) - (\text{CH}_2)_2 - \text{CO} - (\text{DUPA 残基})$  であり、ポリマー抱合体が、式 ( V I I ) のものである、

( i ) 標的部分が、 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_2 - \text{CH}(\text{COOH}) - \text{NH} - \text{CO} - \text{NH} - \text{CH}(\text{COOH}) - (\text{CH}_2)_2 - \text{CO} - (\text{DUPA 残基})$  であり、ポリマー抱合体が、式 ( I V ) のものである、あるいは

( j ) 標的部分が、 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_2 - \text{CH}(\text{COOH}) - \text{NH} - \text{CO} - \text{NH} - \text{CH}(\text{COOH}) - (\text{CH}_2)_2 - \text{CO} - (\text{DUPA 残基})$  であり、ポリマー抱合体が、式 ( V I I I ) のものである、項目 1 3 に記載のポリプレックス。

[ 項 目 1 5 ]

50

E G F R アフィボディが、配列番号 4 に記載されるアミノ酸配列のものであり、H E R 2 アフィボディが、配列番号 5 に記載されるアミノ酸配列のものである、項目 1 4 に記載のポリプレックス。

[ 項目 1 6 ]

薬学的に許容される担体および項目 1 から項目 1 5 のいずれか一項に記載のポリプレックスを含む、薬学的組成物。

[ 項目 1 7 ]

E G F R 過剰発現細胞を特徴とする癌、H E R 2 過剰発現細胞を特徴とする癌、および前立腺癌から選択される癌の治療に使用するための、項目 1 4 または項目 1 5 に記載のポリプレックス。

10

[ 項目 1 8 ]

E G F R 過剰発現細胞を特徴とする癌、H E R 2 過剰発現細胞を特徴とする癌、および前立腺癌から選択される癌の治療に使用するための、項目 1 6 に記載の薬学的組成物。

[ 項目 1 9 ]

E G F R 過剰発現細胞を特徴とする癌が、非小細胞肺癌、乳癌、膠芽腫、頭頸部扁平上皮癌、結腸直腸癌、腺癌、卵巣癌、膀胱癌、または前立腺癌、およびこれらの転移癌から選択される、項目 1 7 に記載のポリプレックス。

[ 項目 2 0 ]

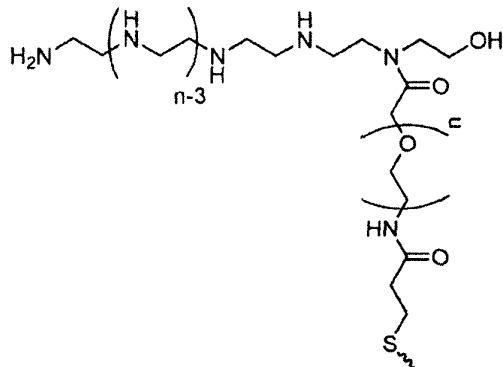
ポリプレックスが、下記 ( c )、( d )、( e )、または ( f ) において定義される通りである、項目 1 9 に記載のポリプレックス：

20

( c ) 標的部分が、E G F R アフィボディであり、ポリマー-抱合体が、下記式 ( I )

( I )

[ 化 1 3 ]



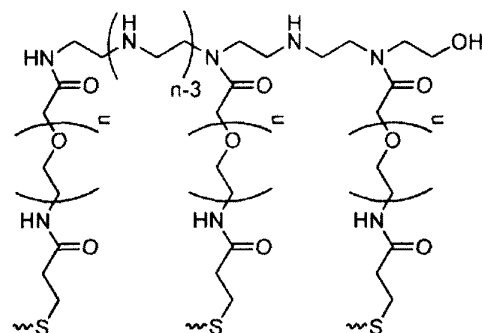
30

のものであり、E G F R アフィボディが、そのメルカプト基を介して連結される、

( d ) 標的部分が、E G F R アフィボディであり、ポリマー-抱合体が、下記式 ( V )

( V )

[ 化 1 4 ]



40

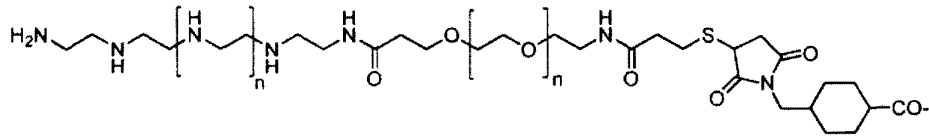
のものであり、E G F R アフィボディが、そのメルカプト基を介して連結される、

( e ) 標的部分が、h E G F であり、ポリマー-抱合体が、下記式 ( I I )

( I I )

50

## [ 化 1 5 ]



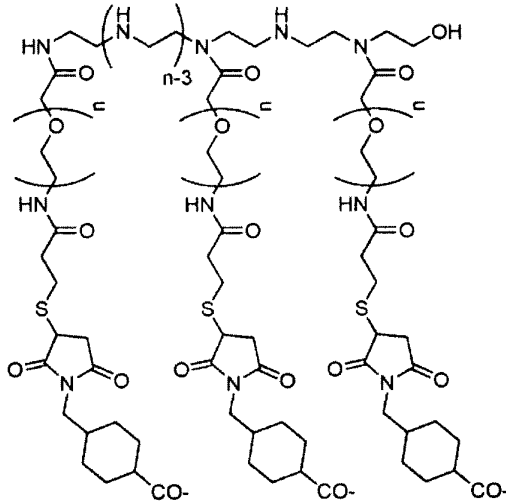
のものであり、h E G F が、そのアミノ基を介して連結される、

( f ) 標的部分が、h E G F であり、ポリマー-抱合体が、下記式 ( V I )

( V I )

## [ 化 1 6 ]

10



20

のものであり、h E G F が、そのアミノ基を介して連結される。

## [ 項目 2 1 ]

H E R 2 過剰発現細胞を特徴とする癌が、乳癌、卵巣癌、胃癌、および子宮の漿液性子宮内膜癌などの侵襲性形態の子宮癌から選択される、項目 1 7 に記載のポリプレックス。

## [ 項目 2 2 ]

H E R 2 過剰発現細胞を特徴とする癌が、ハーセプチン/トラスツズマブ耐性癌である、項目 2 1 に記載のポリプレックス。

30

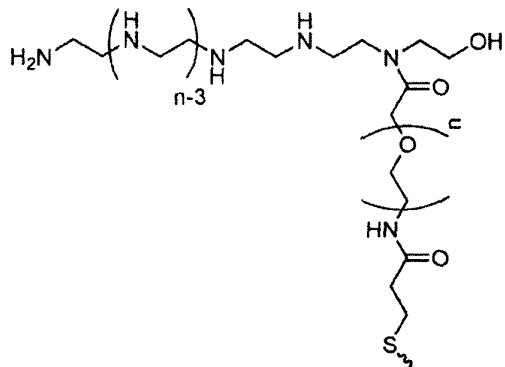
## [ 項目 2 3 ]

ポリプレックスが、下記 ( a )、( b )、( e )、または ( f ) において定義される通りである、項目 2 1 または項目 2 2 に記載のポリプレックス：

( a ) 標的部分が、H E R 2 アフィボディであり、ポリマー-抱合体が、下記式 ( I )

( I )

## [ 化 1 7 ]



40

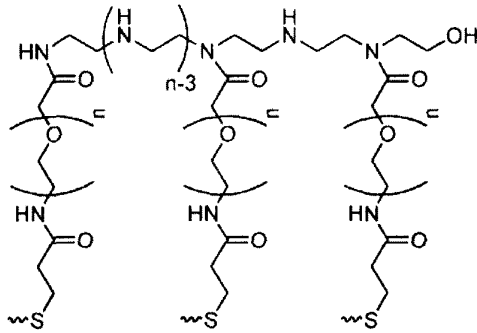
のものであり、H E R 2 アフィボディが、そのメルカプト基を介して連結される、

( b ) 標的部分が、H E R 2 アフィボディであり、ポリマー-抱合体が、下記式 ( V )

( V )

50

## [ 化 1 8 ]



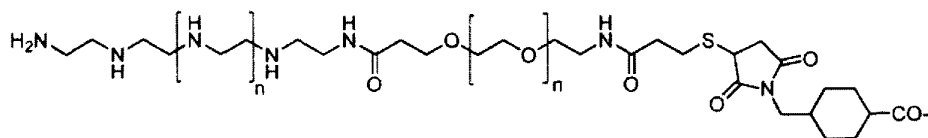
10

のものであり、HER2アフィボディが、そのメルカプト基を介して連結される、

(e) 標的部分が、hEGFであり、ポリマー抱合体が、下記式(II)

(II)

## [ 化 1 9 ]



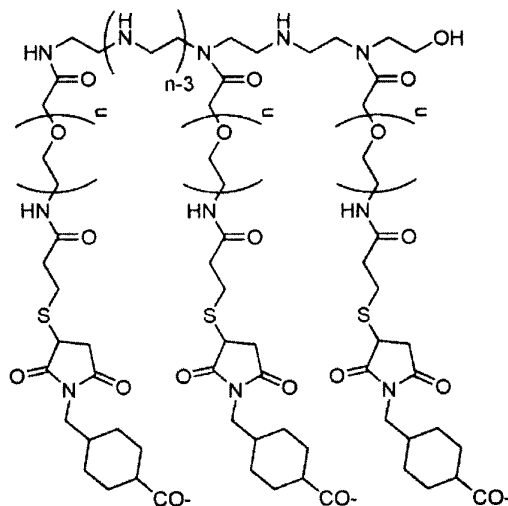
20

のものであり、hEGFが、そのアミノ基を介して連結される、

(f) 標的部分が、hEGFであり、ポリマー抱合体が、下記式(VI)

(VI)

## [ 化 2 0 ]



30

のものであり、hEGFが、そのアミノ基を介して連結される。

## [ 項目 2 4 ]

40

癌が、前立腺癌であり、ポリプレックスが、下記(g)、(h)、(i)、または(j)において定義される通りである、項目17に記載のポリプレックス：

(g) 標的部分が、 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_2 - \text{CH}(\text{COOH}) - \text{NH} - \text{CO} - \text{NH} - \text{CH}(\text{COOH}) - (\text{CH}_2)_2 - \text{CO} - (\text{DUPA残基})$ であり、ポリマー抱合体が、下記式(III)

(III)  $-(\text{NH} - (\text{CH}_2)_7 - \text{CO}) - \text{Phe} - \text{Phe} - (\text{NH} - \text{CH}_2 - \text{CH}(\text{NH}_2) - \text{CO}) - \text{Asp} - \text{Cys} - \text{PEG}_{2k} - \text{LPEI}$

のものである、

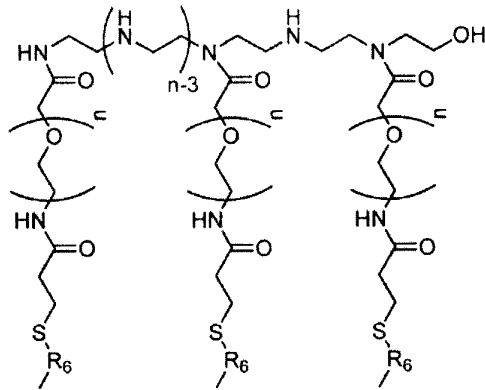
(h) 標的部分が、 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_2 - \text{CH}(\text{COOH}) - \text{NH} - \text{CO} - \text{NH} - \text{CH}(\text{COOH}) - (\text{CH}_2)_2 - \text{CO} - (\text{DUPA残基})$ であり、ポリマー抱合体が、下

50

記式 ( V I I )

( V I I )

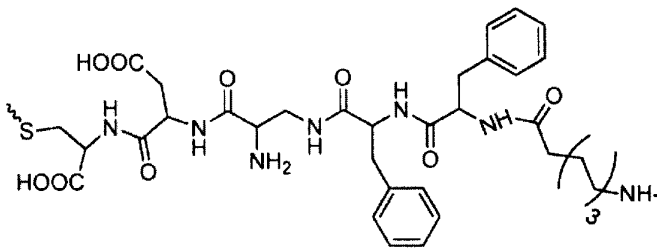
[ 化 2 1 ]



10

( 式中、 $R_6$  が、

[ 化 2 2 ]



20

である) のものである、

( i ) 標的部分が、 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_2 - \text{CH}(\text{COOH}) - \text{NH} - \text{CO} - \text{NH} - \text{CH}(\text{COOH}) - (\text{CH}_2)_2 - \text{CO} - (\text{DUPA残基})$  であり、ポリマー抱合体が、下記式 ( IV )

( IV ) -  $(\text{NH} - (\text{CH}_2)_7 - \text{CO}) - \text{Phe} - \text{Gly} - \text{Trp} - \text{Trp} - \text{Gly} - \text{Cys} - \text{PEG}_{2k} - \text{LPEI}$

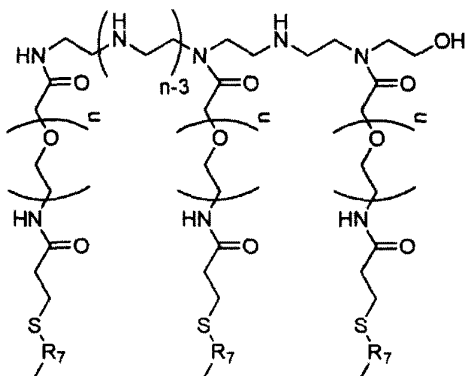
30

のものである、

( j ) 標的部分が、 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_2 - \text{CH}(\text{COOH}) - \text{NH} - \text{CO} - \text{NH} - \text{CH}(\text{COOH}) - (\text{CH}_2)_2 - \text{CO} - (\text{DUPA残基})$  であり、ポリマー抱合体が、下記式 ( V I I I )

( V I I I )

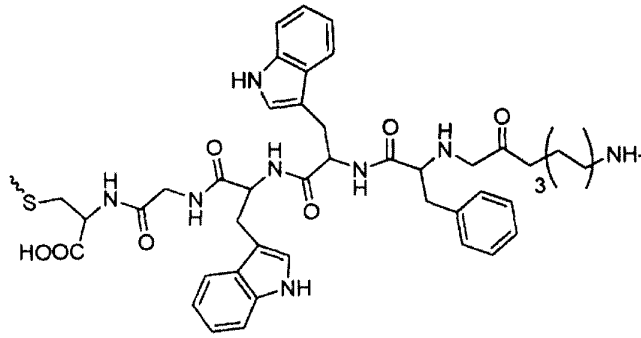
[ 化 2 3 ]



40

( 式中、 $R_7$  が、

[ 化 2 4 ]



10

である)のものである。

[ 項目 2 5 ]

項目 2 から項目 1 5 のいずれか一項に記載のポリプレックスであって、E G F R 過剰発現細胞を特徴とする癌、H E R 2 過剰発現細胞を特徴とする癌、および前立腺癌からなる群から選択される癌を治療するために、必要とする対象に投与される、ポリプレックス。

[ 項目 2 6 ]

E G F R 過剰発現細胞を特徴とする癌、H E R 2 過剰発現細胞を特徴とする癌、および前立腺癌から選択される癌を治療するための、薬学的に許容される担体および項目 2 から項目 1 5 のいずれか一項に記載のポリプレックスを含む、薬学的組成物。

[ 項目 2 7 ]

免疫細胞と組み合わせて使用するための、項目 1 7 および項目 1 9 から項目 2 4 のいずれか一項に記載のポリプレックス。

20

[ 項目 2 8 ]

免疫細胞と組み合わせて使用するための、項目 2 6 に記載の薬学的組成物。

[ 項目 2 9 ]

免疫細胞が、腫瘍浸潤 T 細胞 ( T - T I L )、腫瘍特異的遺伝子操作 T 細胞、または末梢血単核球 ( P B M C ) である、項目 2 7 に記載のポリプレックス。

[ 項目 3 0 ]

免疫細胞が、腫瘍浸潤 T 細胞 ( T - T I L )、腫瘍特異的遺伝子操作 T 細胞、または末梢血単核球 ( P B M C ) である、項目 2 8 に記載の薬学的組成物。

30

【 0 1 1 0 】

参考文献

1 . B o u s s i f , O . , e t a l . , A v e r s a t i l e v e c t o r f o r g e n e a n d o l i g o n u c l e o t i d e t r a n s f e r i n t o c e l l s i n c u l t u r e a n d i n v i v o : p o l y e t h y l e n i m i n e . P r o c N a t l A c a d S c i U S A , 1 9 9 5 . 9 2 ( 1 6 ) : p . 7 2 9 7 - 3 0 1 .

2 . W a g n e r , E . , e t a l . , T r a n s f e r r i n - p o l y c a t i o n - D N A c o m p l e x e s : t h e e f f e c t o f p o l y c a t i o n s o n t h e s t r u c t u r e o f t h e c o m p l e x a n d D N A d e l i v e r y t o c e l l s . P r o c N a t l A c a d S c i U S A , 1 9 9 1 . 8 8 ( 1 0 ) : p . 4 2 5 5 - 9 .

40

3 . L i t t l e , S . R . , e t a l . , P o l y - b e t a a m i n o e s t e r - c o n t a i n i n g m i c r o p a r t i c l e s e n h a n c e t h e a c t i v i t y o f n o n v i r a l g e n e t i c v a c c i n e s . P r o c N a t l A c a d S c i U S A , 2 0 0 4 . 1 0 1 ( 2 6 ) : p . 9 5 3 4 - 9 .

4 . D a v i s , M . E . , Z . G . C h e n , a n d D . M . S h i n , N a n o p a r t i c l e t h e r a p e u t i c s : a n e m e r g i n g t r e a t m e n t m o d a l i t y f o r c a n c e r . N a t R e v D r u g D i s

50

cov, 2008. 7(9): p. 771 - 82.

5. Remy, J. S., et al., Targeted gene transfer into hepatoma cells with lipopolyamine-condensed DNA particles presenting galactose ligands: a stage toward artificial viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(5): p. 1744 - 8.

6. Jager, M., et al., Branched and linear poly(ethylene imine)-based conjugates: synthetic modification, characterization, and application. *Chem Soc Rev*, 2012. 41(13): p. 4755 - 67.

7. Ziebarth, J. D. and Y. Wang, Understanding the protonation behavior of linear polyethylenimine in solutions through Monte Carlo simulations. *Biomacromolecules*, 2010. 11(1): p. 29 - 38.

8. Hobel, S., et al., Maltose- and maltotriose-modified, hyperbranched poly(ethylene imine)s (OM-PEIs): Physicochemical and biological properties of DNA and siRNA complexes. *J Control Release*, 2011. 149(2): p. 146 - 58.

9. Rejman, J., A. Bragonzi, and M. Conese, Role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipopolyplexes. *Mol Ther*, 2005. 12(3): p. 468 - 74.

10. Behr, J. P., The proton sponge: A trick to enter cells the viruses did not exploit. *Chimia*, 1997. 51(1-2): p. 34 - 36.

11. Suh, J., H. J. Paik, and B. K. Hwang, Ionization of Poly(Ethylenimine) and Poly(Allylamine) at Various Phs. *Bioorganic Chemistry*, 1994. 22(3): p. 318 - 327.

12. Ogris, M., et al., PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther*, 1999. 6(4): p. 595 - 605.

13. Schaffert, D., et al., Poly(I:C)-mediated tumor growth suppression in EGF-receptor overexpressing tumors using EGF-polyethylene glycol-linear polyethylenimine as carrier. *Pharm Res*, 2011. 28(4): p. 731 - 41.

14. Nilsson, B., et al., A synthetic IgG-binding domain based on staphylococcal protein A. *Protein Eng*, 1987. 1(2): p. 107 - 13.

15. Lofblom, J., et al., Affibody molecules : engineered proteins for therapeutic, diagnostic and biotechnological applications. *FEBS Lett*, 2010. 584 (12): p. 2670 - 80.

16. Brissault, B., et al., Synthesis, characterization, and gene transfer application of poly(ethylene glycol-b-ethylenimine) with high molar mass polyamine block. *Biomacromolecules*, 2006. 7 (10): p. 2863 - 70.

17. Ungaro, F., et al., Spectrophotometric determination of polyethylenimine in the presence of an oligonucleotide for the characterization of controlled release formulations. *J Pharm Biomed Anal*, 2003. 31 (1): p. 143 - 9.

18. Gebhart, C.L., et al., Design and formulation of polyplexes based on pluronic-polyethylenimine conjugates for gene transfer. *Bioconjug Chem*, 2002. 13 (5): p. 937 - 44.

19. Dent, M.F., et al., The methylene blue colorimetric microassay for determining cell line response to growth factors. *Cytotechnology*, 1995. 17 (1): p. 27 - 33.

20. Eigenbrot, C., et al., Structural basis for high-affinity HER2 receptor binding by an engineered protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107 (34): p. 15039 - 44.

21. Ogris, M., et al., The size of DNA/transferrin-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells. *Gene Ther*, 1998. 5 (10): p. 1425 - 33.

22. Chollet, P., et al., Side-effects of a systemic injection of linear polyethylenimine-DNA complexes. *J Gene Med*, 2002. 4 (1): p. 84 - 91.

23. Champion, J.A., Y.K. Katare, and S. Mitra gotri, Particle shape: A new design parameter for micro- and nanoscale drug delivery carriers. *Journal of Controlled Release*, 2007. 121 (1-2): p. 3 - 9.

24. Kleemann, E., et al., Nano-carriers for DNA delivery to the lung based upon a TAT-derived peptide covalently coupled to PEG-PEI. *J Control Release*, 2005. 109 (1-3): p. 299 - 316.

25. Rudolph, C., et al., Nonviral gene delivery to the lung with copolymer-protected and transferrin-modified polyethylenimine. *Biochim Biophys Acta*, 2002. 1573 (1): p.

10

20

30

40

50



75 - 83 .

26. Aguilar, Z., et al., Biologic effects of heregulin/neu differentiation factor on normal and malignant human breast and ovarian epithelial cells. *Oncogene*, 1999. 18(44): p. 6050 - 62.

27. Park, J.W., et al., Anti-HER2 immunoliposomes: enhanced efficacy attributable to targeted delivery. *Clin Cancer Res*, 2002. 8(4): p. 1172 - 81.

10

28. Rabenstein, D.L., Heparin and heparan sulfate: structure and function. *Nat Prod Rep*, 2002. 19(3): p. 312 - 31.

29. Seib, F.P., A.T. Jones, and R. Duncan, Comparison of the endocytic properties of linear and branched PEIs, and cationic PAMAM dendrimers in B16f10 melanoma cells. *J Control Release*, 2007. 117(3): p. 291 - 300.

30. Jeong, G.J., et al., Biodistribution and tissue expression kinetics of plasmid DNA complexed with polyethylenimines of different molecular weight and structure. *J Control Release*, 2007. 118(1): p. 118 - 25.

20

31. Kawakami, S., et al., Evaluation of proinflammatory cytokine production induced by linear and branched polyethylenimine/plasmid DNA complexes in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006. 317(3): p. 1382 - 90.

32. Goula, D., et al., Polyethylenimine-based intravenous delivery of transgenes to mouse lung. *Gene Ther*, 1998. 5(9): p. 1291 - 5.

30

33. Bragonzi, A., et al., Comparison between cationic polymers and lipids in mediating systemic gene delivery to the lungs. *Gene Ther*, 1999. 6(12): p. 1995 - 2004.

34. Lee, K., et al., Pluronic/polyethylenimine shell crosslinked nanocapsules with embedded magnetite nanocrystals for magnetically triggered delivery of siRNA. *Macromol Biosci*, 2010. 10(3): p. 239 - 45.

40

35. Zheng, M., et al., Poly(ethylene oxide) grafted with short polyethylenimine gives DNA polyplexes with superior colloidal stability, low cytotoxicity, and potent in vitro gene transfection under serum conditions. *Biomacromolecules*, 2012. 13(3): p. 881 - 8.

36. Petersen, H., et al., Polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol) copolymers: i

50

nfluence of copolymer block structure on DNA complexation and biological activities as gene delivery system. *Bioconjug Chem*, 2002. 13(4): p. 845 - 54.

37. Champion, J. A., Y. K. Katare, and S. Mitra gotri, Particle shape: a new design parameter for micro- and nanoscale drug delivery carriers. *J Control Release*, 2007. 121(1 - 2): p. 3 - 9.

38. Liu, Y., et al., The shape of things to come: importance of design in nanotechnology for drug delivery. *Ther Deliv*, 2012. 3(2): p. 181 - 94.

39. Kloeckner, J., et al., Photochemically enhanced gene delivery of EGF receptor-targeted DNA polyplexes. *J Drug Target*, 2004. 12(4): p. 205 - 13.

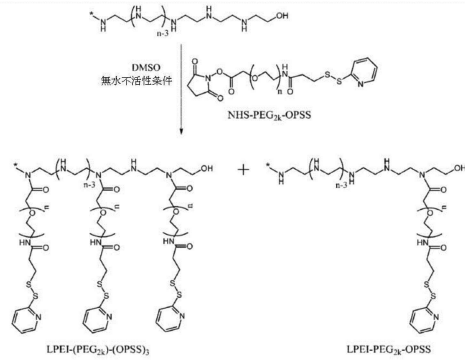
40. Kircheis, R., et al., Polyethylenimine/DNA complexes shielded by transferrin target gene expression to tumors after systemic application. *Gene Ther*, 2001. 8(1): p. 28 - 40.

41. Ogris, M., et al., DNA/polyethylenimine transfection particles: influence of ligands, polymer size, and PEGylation on internalization and gene expression. *AAPS PharmSci*, 2001. 3(3): p. E21.

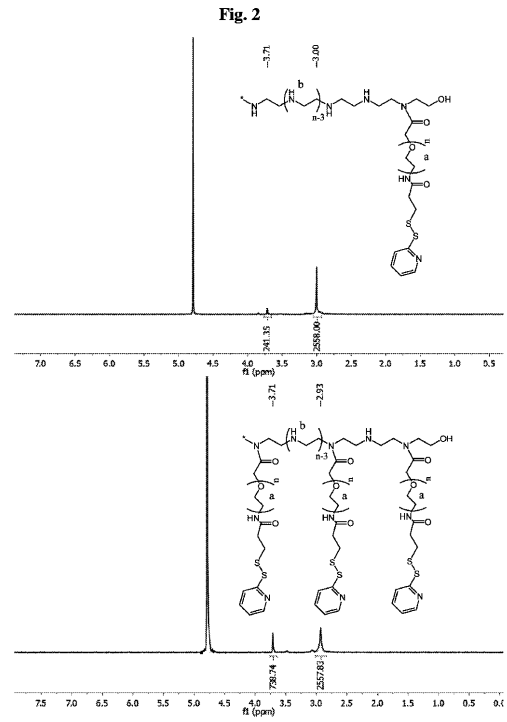
10

20

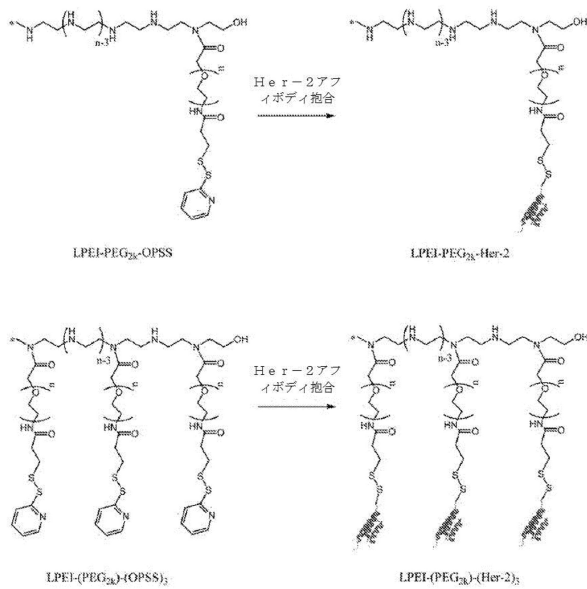
【図 1】



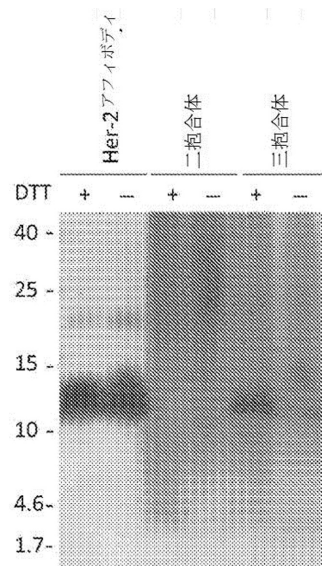
【図 2】



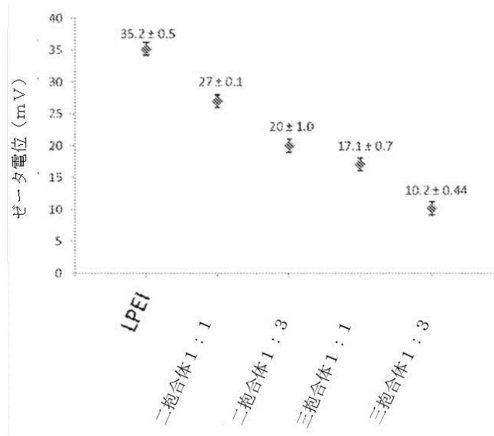
【図 3】



【図 4】

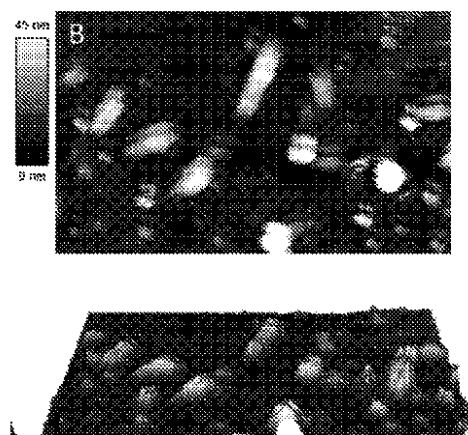


【圖 6】



【 図 7 B 】

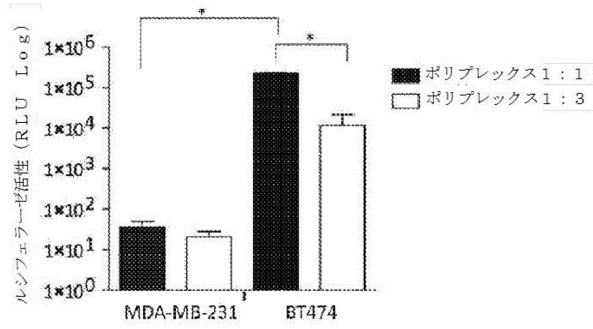
**Fig. 7B**



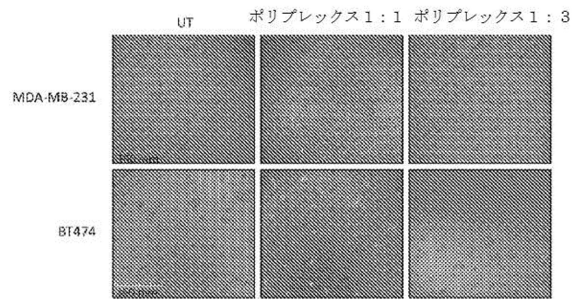
【圖 8】

割合LPEI : PEG	ポリブレンクス				プラスミド	
	1:1	1:3	1:1	1:3	+	-
DNAse	+	+	-	-	+	-
OC	+	+	+	+	+	+
SC	+	+	+	+	+	+

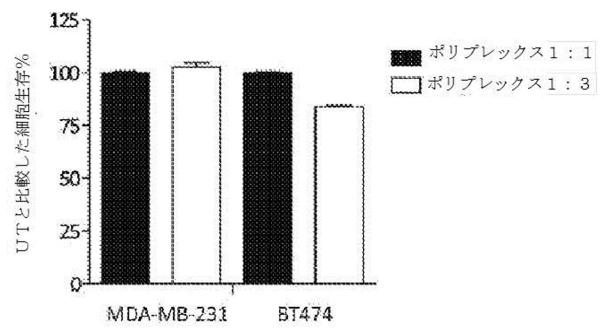
【図 9 A】



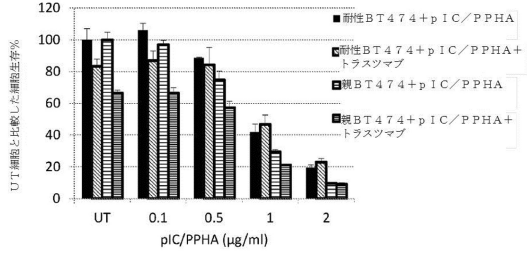
【図 9 B】



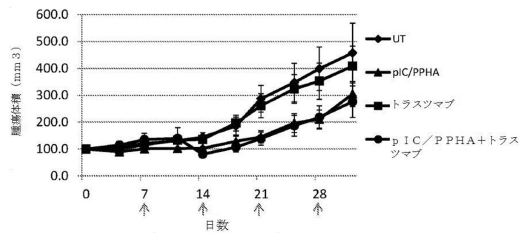
【図 9 C】



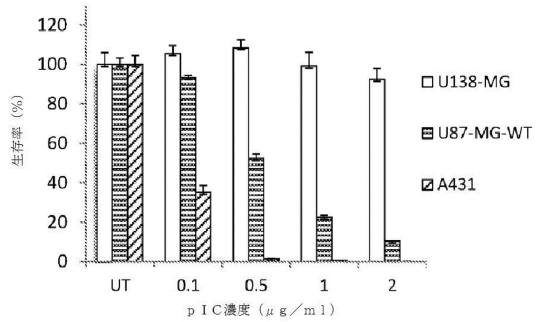
【図 10】



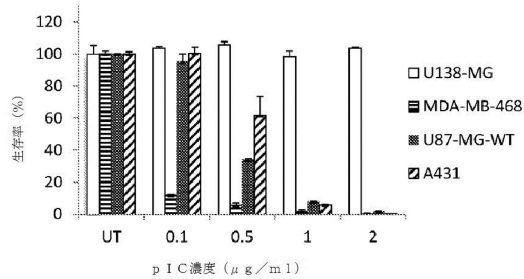
【図 11】



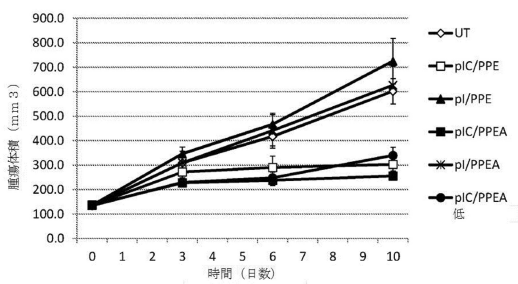
【図 12 B】



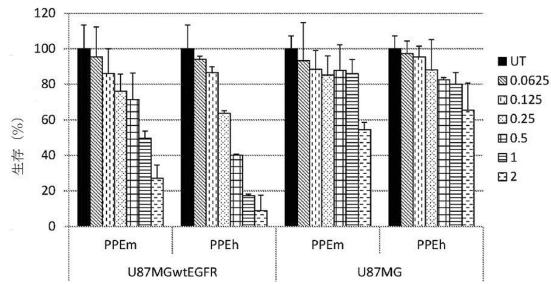
【図 12 A】



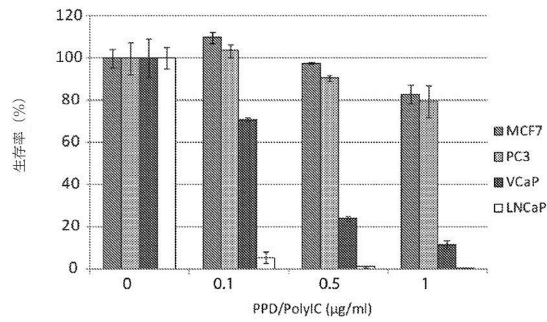
【図 13】



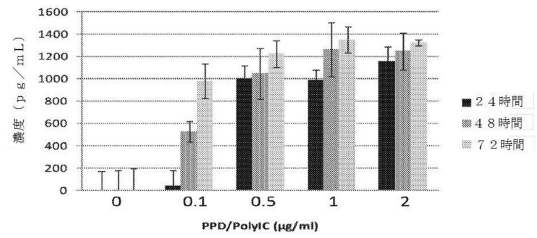
【図 14】



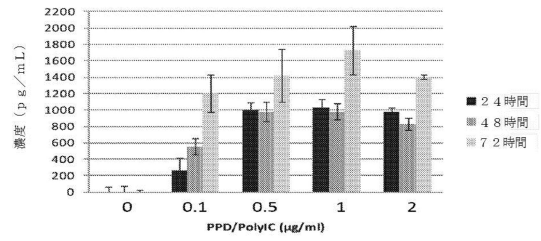
【図 15】



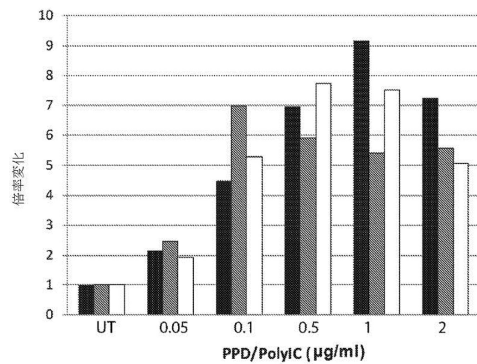
【図 16 A】



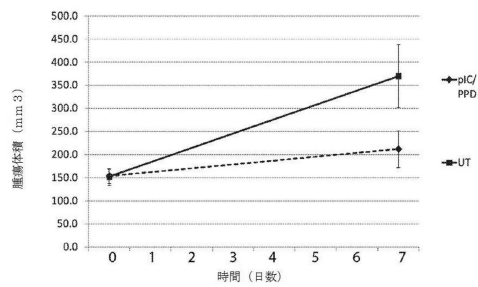
【図 16 B】



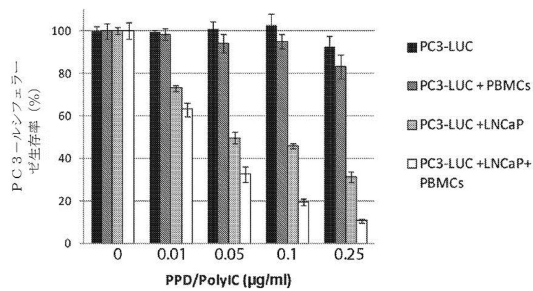
【図 17】



【図 19】



【図 18】



【配列表】

0006753843000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 35/17 (2015.01)		A 6 1 K 35/17	Z
A 6 1 K 35/15 (2015.01)		A 6 1 K 35/15	Z

(72)発明者 ジュブラン、サリム  
 イスラエル国、エルサレム 9 3 7 1 4 1 1 ナヨット イェフダ ブーラ ストリート 1 1 /  
 6 アレックス レビツキ マネジメント アンド ホールディングス リミテッド内

(72)発明者 シル、アレクセイ  
 イスラエル国、エルサレム 9 3 7 1 4 1 1 ナヨット イェフダ ブーラ ストリート 1 1 /  
 6 アレックス レビツキ マネジメント アンド ホールディングス リミテッド内

(72)発明者 ジグラー、マヤ  
 イスラエル国、エルサレム 9 3 7 1 4 1 1 ナヨット イェフダ ブーラ ストリート 1 1 /  
 6 アレックス レビツキ マネジメント アンド ホールディングス リミテッド内

(72)発明者 タルハミ、アラール  
 イスラエル国、エルサレム 9 3 7 1 4 1 1 ナヨット イェフダ ブーラ ストリート 1 1 /  
 6 アレックス レビツキ マネジメント アンド ホールディングス リミテッド内

(72)発明者 ラングット、ヤエル  
 イスラエル国、エルサレム 9 3 7 1 4 1 1 ナヨット イェフダ ブーラ ストリート 1 1 /  
 6 アレックス レビツキ マネジメント アンド ホールディングス リミテッド内

審査官 小倉 梢

(56)参考文献 特表 2 0 1 2 - 5 1 3 2 1 0 ( J P , A )  
 Molecular Cancer Therapeutics , 2 0 1 3 年 , Vol. 12, No. 11 , B243  
 Biochim. Biophys. Acta , 2 0 0 4 年 , Vol. 1674 , p. 149-157  
 J. Biomed. Mater. Res. A , 2 0 1 3 年 , Vol. 101A , p. 1857-1864

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)  
 C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0  
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )  
 W P I D S / W P I X ( S T N )