(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5866117号
(P5866117)

(45)発行日　平成28年2月17日(2016.2.17)　(24)登録日　平成28年1月8日(2016.1.8)

(51)Int.Cl.		F I	
A61K 47/48	(2006.01)	A61K	47/48
A61K 38/43	(2006.01)	A61K	37/48
A61K 9/16	(2006.01)	A61K	9/16
A61K 9/19	(2006.01)	A61K	9/19

請求項の数 36　(全 25 頁)

(21)出願番号	特願2012-503772(P2012-503772)
(86)(22)出願日	平成22年4月5日(2010.4.5)
(65)公表番号	特表2012-522809(P2012-522809A)
(43)公表日	平成24年9月27日(2012.9.27)
(86)国際出願番号	PCT/US2010/029985
(87)国際公開番号	WO2010/117957
(87)国際公開日	平成22年10月14日(2010.10.14)
審査請求日	平成25年3月27日(2013.3.27)
(31)優先権主張番号	61/166,929
(32)優先日	平成21年4月6日(2009.4.6)
(33)優先権主張国	米国(US)

前置審査

(73)特許権者　501083115
メイヨ・ファウンデーション・フォー・メディカル・エデュケーション・アンド・リサーチ
アメリカ合衆国、ミネソタ州　５５９０５、ロチェスター、ファースト・ストリート・サウスウエスト　２００
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(74)代理人　100181674
弁理士　飯田　貴敏
(74)代理人　100181641
弁理士　石川　大輔

最終頁に続く

(54)【発明の名称】分子を送達するための方法および材料

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

ポリマーナノ粒子に結合した、酵素活性を有するポリペプチドを含む組成物であって、該ポリマーナノ粒子に結合した該ポリペプチドは、ポリマーナノ粒子に結合していない、該酵素活性を有するコントロールポリペプチドよりも、ヒト血清において酵素活性のより長い半減期を有し、該ポリマーナノ粒子は該ポリペプチドのＮ末端またはＣ末端のいずれかのみに結合している、組成物。

【請求項２】

前記ポリマーナノ粒子に結合した前記ポリペプチドは、ポリマーナノ粒子に結合していない前記コントロールポリペプチドの、少なくとも８５％のレベルの前記酵素活性を有する、請求項１に記載の組成物。

【請求項３】

前記ポリマーナノ粒子に結合した前記ポリペプチドは、ポリマーナノ粒子に結合していない前記コントロールポリペプチドの、少なくとも９５％のレベルの前記酵素活性を有する、請求項１に記載の組成物。

【請求項４】

前記ポリマーナノ粒子に結合した前記ポリペプチドは、ポリマーナノ粒子に結合していない前記コントロールポリペプチドと同じレベルの前記酵素活性を有する、請求項１に記載の組成物。

【請求項５】

前記ポリペプチドは、ガラクトセレブロシダーゼポリペプチドである、請求項１に記載の組成物。
【請求項６】
前記ポリマーナノ粒子は、ＣＯＯＨ－ＰＥＧ－ＰＬＡ、メトキシ－ＰＥＧ－ＰＬＡポリマー、マレイミド－ＰＥＧ－ＰＬＡポリマー、またはその任意の組み合わせから構築される、請求項１に記載の組成物。
【請求項７】
前記ポリペプチドは、共有結合によって前記ポリマーナノ粒子に結合される、請求項１に記載の組成物。
【請求項８】
前記ポリペプチドは、非共有結合によって前記ポリマーナノ粒子に結合される、請求項１に記載の組成物。
【請求項９】
凍結乾燥された組成物である、請求項１に記載の組成物。
【請求項１０】
前記ポリペプチドは、キレート化を介して、前記ポリマーナノ粒子に結合される、請求項８に記載の組成物。
【請求項１１】
血清において酵素活性を有するポリペプチドの酵素活性の半減期を増加させるための方法であって、該方法は、該ポリペプチドをポリマーナノ粒子に結合させて複合体を形成する工程を含み、ここで、該結合されたポリペプチドは、ポリマーナノ粒子に結合していない、該酵素活性を有するコントロールポリペプチドよりも、血清において酵素活性のより長い半減期を有し、該ポリマーナノ粒子は該ポリペプチドのＮ末端またはＣ末端のいずれかのみに結合している、方法。
【請求項１２】
前記ポリマーナノ粒子に結合した前記ポリペプチドは、ポリマーナノ粒子に結合していない前記コントロールポリペプチドの、少なくとも８５％のレベルの前記酵素活性を有する、請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
前記ポリマーナノ粒子に結合した前記ポリペプチドは、ポリマーナノ粒子に結合していない前記コントロールポリペプチドの、少なくとも９５％のレベルの前記酵素活性を有する、請求項１１に記載の方法。
【請求項１４】
前記ポリマーナノ粒子に結合した前記ポリペプチドは、ポリマーナノ粒子に結合していない前記コントロールポリペプチドと同じレベルの前記酵素活性を有する、請求項１１に記載の方法。
【請求項１５】
前記ポリペプチドは、ガラクトセレブロシダーゼポリペプチドである、請求項１１に記載の方法。
【請求項１６】
前記ポリマーナノ粒子は、ＣＯＯＨ－ＰＥＧ－ＰＬＡ、メトキシ－ＰＥＧ－ＰＬＡポリマー、マレイミド－ＰＥＧ－ＰＬＡポリマー、またはその任意の組み合わせから構築される、請求項１１に記載の方法。
【請求項１７】
前記ポリペプチドは、共有結合によって前記ポリマーナノ粒子に結合される、請求項１１に記載の方法。
【請求項１８】
前記ポリペプチドは、非共有結合によって前記ポリマーナノ粒子に結合される、請求項１１に記載の方法。
【請求項１９】

前記複合体を凍結乾燥させて、凍結乾燥された複合体を形成する工程を含む、請求項１１に記載の方法。

【請求項２０】

前記ポリペプチドは、キレート化を介して、前記ポリマーナノ粒子に結合される、請求項１８に記載の方法。

【請求項２１】

酵素活性を有するポリペプチドの保存の間の酵素活性の安定性を増加させるための方法であって、該方法は、該ポリペプチドをポリマーナノ粒子に結合させて複合体を形成する工程を含み、ここで該結合されたポリペプチドは、ポリマーナノ粒子に結合していない、該酵素活性を有するコントロールポリペプチドよりも高い安定性を有し、該ポリマーナノ粒子は該ポリペプチドのＮ末端またはＣ末端のいずれかのみに結合している、方法。

【請求項２２】

前記ポリマーナノ粒子に結合した前記ポリペプチドは、ポリマーナノ粒子に結合していない前記コントロールポリペプチドの、少なくとも８５％のレベルの前記酵素活性を有する、請求項２１に記載の方法。

【請求項２３】

前記ポリマーナノ粒子に結合した前記ポリペプチドは、ポリマーナノ粒子に結合していない前記コントロールポリペプチドの、少なくとも９５％のレベルの前記酵素活性を有する、請求項２１に記載の方法。

【請求項２４】

前記ポリマーナノ粒子に結合した前記ポリペプチドは、ポリマーナノ粒子に結合していない前記コントロールポリペプチドと同じレベルの前記酵素活性を有する、請求項２１に記載の方法。

【請求項２５】

前記ポリペプチドは、ガラクトセレブロシダーゼポリペプチドである、請求項２１に記載の方法。

【請求項２６】

前記ポリマーナノ粒子は、ＣＯＯＨ－ＰＥＧ－ＰＬＡ、メトキシ－ＰＥＧ－ＰＬＡポリマー、マレイミド－ＰＥＧ－ＰＬＡポリマー、またはその任意の組み合わせから構築される、請求項２１に記載の方法。

【請求項２７】

前記ポリペプチドは、共有結合によって前記ポリマーナノ粒子に結合される、請求項２１に記載の方法。

【請求項２８】

前記ポリペプチドは、非共有結合によって前記ポリマーナノ粒子に結合される、請求項２１に記載の方法。

【請求項２９】

前記複合体を凍結乾燥させて、凍結乾燥された複合体を形成する工程をさらに含む、請求項２１に記載の方法。

【請求項３０】

前記ポリペプチドは、キレート化を介して、前記ポリマーナノ粒子に結合される、請求項２８に記載の方法。

【請求項３１】

酵素活性を有するポリペプチドの凝集を抑制する方法であって、該方法は、ポリペプチドのＮまたはＣ末端のみを介して、該ポリペプチドをポリマーナノ粒子に結合させて複合体を形成する工程を含み、ここで該複合体の調製物は、該ポリペプチドのＮまたはＣ末端を介して該ポリペプチドに結合していないポリマーナノ粒子を有するコントロール調製物よりも低いポリペプチドの凝集を示す、方法。

【請求項３２】

前記ポリペプチドは、ガラクトセレブロシダーゼポリペプチドである、請求項３１に記

載の方法。
【請求項３３】
前記ポリマーナノ粒子は、ＣＯＯＨ－ＰＥＧ－ＰＬＡ、メトキシ－ＰＥＧ－ＰＬＡポリマー、マレイミド－ＰＥＧ－ＰＬＡポリマー、またはその任意の組み合わせから構築される、請求項３１に記載の方法。
【請求項３４】
前記ポリペプチドは、共有結合によって前記ポリマーナノ粒子に結合される、請求項３１に記載の方法。
【請求項３５】
前記ポリペプチドは、非共有結合によって前記ポリマーナノ粒子に結合される、請求項３１に記載の方法。
【請求項３６】
前記複合体を凍結乾燥させて、凍結乾燥された複合体を形成する工程をさらに含む、請求項３１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
本願は、２００９年４月６日に出願された米国仮特許出願第６１／１６６，９２９号への優先権の利益を主張する。
【０００２】
背景
１．技術分野
本文書は、分子を哺乳類に送達することに関与する方法および材料に関連する。例えば、本文書は、哺乳類に投与した分子の半減期または生物学的利用能を増加させるためにナノ粒子を使用する方法および材料を提供する。
【背景技術】
【０００３】
２．背景情報
例えばポリペプチド、小ペプチド、抗体、小分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、および抗癌剤、抗ウイルス剤、および抗生物質を含む分子の投与によって、様々な医学的疾患を治療するための方法が開発された。そのような治療の有効性は、体への送達の際に分子を分解する物質の存在によって制限され得る。例えば、プロテアーゼおよび他の内因性酵素は、正常な酵素機能の欠如または破壊によって特徴付けられる状態を治療するための酵素補充療法の過程で投与されたポリペプチドを分解し得る。
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００４】
要旨
本文書は、分子を哺乳類に送達するための方法および材料を提供する。本文書は、部分的には、哺乳類へ投与した分子の半減期を増加させる方法の発見に基づく。例えば、本文書は、ナノ粒子を用いて、酵素、ポリペプチド、ペプチド断片、核酸、および他の分子の半減期または生物学的利用能を増加させるための方法および材料を提供する。ある場合において、本明細書中で提供される方法および材料を、血液脳関門を横切っての送達を改善するために使用し得る。本文書はまた、正常な酵素機能の欠如または破壊によって特徴付けられる状態を治療するために、哺乳類に分子を送達するための方法および材料を提供する。例えば、本明細書中で提供される方法および材料を、中枢神経系における酵素レベルを増加させることによって、変性性神経疾患を治療するために使用し得る。ある場合において、血液脳関門を横切っての治療酵素の送達を増加させることによって、クラッベ病または他のリソソーム蓄積症に苦しむヒトを治療するために、本明細書中で提供される方法

および材料を、医師または他の専門家が使用し得る。

【０００５】

一般的に、本文書の１つの局面は、組成物を特色とする。その組成物は、ポリマーナノ粒子に結合した、酵素活性を有するポリペプチドを含む、または実質的にそれから成る。そのポリペプチドは、酵素活性を有し、そしてナノ粒子に結合していないコントロールポリペプチドよりも、ヒト血清においてより長い半減期を有し得る。そのポリペプチドは、ナノ粒子に結合していないコントロールポリペプチドの、少なくとも８５％のレベルの酵素活性を有し得る。そのポリペプチドは、ナノ粒子に結合していないコントロールポリペプチドの、少なくとも９５％のレベルの酵素活性を有し得る。そのポリペプチドは、ナノ粒子に結合していないコントロールポリペプチドと同じレベルの酵素活性を有し得る。そのポリペプチドは、ガラクトセレブロシダーゼポリペプチドであり得る。そのポリマーナノ粒子を、ＣＯＯＨ－ＰＥＧ－ＰＬＡ、メトキシ－ＰＥＧ－ＰＬＡポリマー、マレイミド－ＰＥＧ－ＰＬＡポリマー、またはそのあらゆる組み合わせから構築し得る。そのポリペプチドを、共有結合によってポリマーナノ粒子に結合させ得る。そのポリペプチドを、非共有結合によってポリマーナノ粒子に結合させ得る。そのポリペプチドを、ポリペプチドのＮまたはＣ末端によってナノ粒子に結合させ得る。

【０００６】

別の局面において、本文書は、血清において酵素活性を有するポリペプチドの半減期を増加させる方法を特色とする。その方法は、ポリペプチドをポリマーナノ粒子に結合させて複合体を形成することを含む、または実質的にそれから成る。結合したポリペプチドは、酵素活性を有し、そしてナノ粒子に結合していないコントロールポリペプチドよりも、血清においてより長い半減期を有し得る。ナノ粒子に結合したポリペプチドは、ナノ粒子に結合していないコントロールポリペプチドの、少なくとも８５％のレベルの酵素活性を有し得る。ナノ粒子に結合したポリペプチドは、ナノ粒子に結合していないコントロールポリペプチドの、少なくとも９５％のレベルの酵素活性を有し得る。ナノ粒子に結合したポリペプチドは、ナノ粒子に結合していないコントロールポリペプチドと同じレベルの酵素活性を有し得る。そのポリペプチドは、ガラクトセレブロシダーゼポリペプチドであり得る。そのポリマーナノ粒子を、ＣＯＯＨ－ＰＥＧ－ＰＬＡ、メトキシ－ＰＥＧ－ＰＬＡポリマー、マレイミド－ＰＥＧ－ＰＬＡポリマー、またはそのあらゆる組み合わせから構築し得る。そのポリペプチドを、共有結合によってポリマーナノ粒子に結合させ得る。そのポリペプチドを、非共有結合によってポリマーナノ粒子に結合させ得る。そのポリペプチドを、ポリペプチドのＮまたはＣ末端によってナノ粒子に結合させ得る。

【０００７】

別の局面において、本文書は、酵素活性を有するポリペプチドの安定性を増加させるための方法を特色とする。その方法は、ポリペプチドをポリマーナノ粒子に結合させて複合体を形成することを含む、または実質的にそれから成る。結合したポリペプチドは、酵素活性を有し、そしてナノ粒子に結合していないコントロールポリペプチドよりも高い安定性を有し得る。ナノ粒子に結合したポリペプチドは、ナノ粒子に結合していないコントロールポリペプチドの、少なくとも８５％のレベルの酵素活性を有し得る。ナノ粒子に結合したポリペプチドは、ナノ粒子に結合していないコントロールポリペプチドの、少なくとも９５％のレベルの酵素活性を有し得る。ナノ粒子に結合したポリペプチドは、ナノ粒子に結合していないコントロールポリペプチドと同じレベルの酵素活性を有し得る。そのポリペプチドは、ガラクトセレブロシダーゼポリペプチドであり得る。そのポリマーナノ粒子を、ＣＯＯＨ－ＰＥＧ－ＰＬＡ、メトキシ－ＰＥＧ－ＰＬＡポリマー、マレイミド－ＰＥＧ－ＰＬＡポリマー、またはそのあらゆる組み合わせから構築し得る。そのポリペプチドを、共有結合によってポリマーナノ粒子に結合させ得る。そのポリペプチドを、非共有結合によってポリマーナノ粒子に結合させ得る。その方法はさらに、複合体を凍結乾燥して凍結乾燥複合体を形成することを含み得る。そのポリペプチドを、ポリペプチドのＮまたはＣ末端によってナノ粒子に結合させ得る。

【０００８】

さらなる局面において、本文書はナノ粒子の凝集を抑制する方法を特色とする。その方法は、ポリペプチドのＮまたはＣ末端によって、ポリペプチドをポリマーナノ粒子に結合させて複合体を形成することを含み、または実質的にそれから成り、ここで複合体の調製物は、ポリペプチドのＮまたはＣ末端によってポリペプチドに結合していないポリマーナノ粒子を有するコントロール調製物よりも低いナノ粒子の凝集を示す。そのポリペプチドは、ガラクトセレブロシダーゼポリペプチドであり得る。そのポリマーナノ粒子を、ＣＯＯＨ－ＰＥＧ－ＰＬＡ、メトキシ－ＰＥＧ－ＰＬＡポリマー、マレイミド－ＰＥＧ－ＰＬＡポリマー、またはそのあらゆる組み合わせから構築し得る。そのポリペプチドを、共有結合によってポリマーナノ粒子に結合させ得る。そのポリペプチドを、非共有結合によってポリマーナノ粒子に結合させ得る。その方法はさらに、複合体を凍結乾燥して凍結乾燥複合体を形成することを含み得る。

【０００９】

他に定義しなければ、本明細書中で使用される全ての技術的および科学的用語は、本発明が属する当業者によって通常理解されるものと同じ意味を有する。本明細書中で記載されたものと同様のまたは同等の方法および材料を使用して本発明を実施し得るが、適当な方法および材料を下記に記載する。本明細書中で言及される全ての出版物、特許出願、特許、および他の参考文献は、その全体として参考文献に組み込まれる。対立する場合、定義を含めて本明細書が統制する。それに加えて、その材料、方法および例は単なる例証であり、そして制限することを意図しない。

【００１０】

本発明の１つ以上の実施態様の詳細を、付随する図面および下の記載において述べる。本発明の他の特色、目的、および利点が、その記載および図面から、および特許請求の範囲から明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【００１１】

【図１】図１は、ナノ粒子合成およびＧＡＬＣの共有結合の戦略を示す。（Ａ）それぞれ１０ｍｇのジブロックコポリマー界面活性剤、ＣＯＯＨ－ＰＥＧ－ＰＬＡおよびメトキシ－ＰＥＧ－ＰＬＡ（またはマレイミド－ＰＥＧ-ＰＬＡ）を、２ｍＬのジクロロメタンに溶解した。１０ｍＬの水の急速な追加および反復エマルション（ボルテックス／超音波処理）後、そのコポリマーはミセルに自己集合した。環境タッピングモード（ａｍｂｉｅｎｔ　ｔａｐｐｉｎｇ　ｍｏｄｅ）に設定し、そして１００μｍ^{2}の面積のデータを採取する、Ｍｕｌｔｉｍｏｄｅ　ＡＦＭを有するＮａｎｏｓｃｏｐｅＩＩＩ制御装置（Ｖｅｅｃｏ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｉｎｃ．）においてＡＦＭ画像を収集した。全てのＡＦＭ画像のスケールバーは、３０ｎｍに設定する。（Ｂ）カルボン酸官能基（－ＣＯＯＨ）を、活性化エステルに変換し、続いてＩＤＡと相互作用させ、そしてＣｕ$^{2+}$活性化を行なった。最後に、Ｃｕ$^{2+}$ＩＤＡ　ＮＰを、Ｈｉｓ６タグ付きＧＡＬＣとインキュベートした。（Ｃ）システインを含むペプチドを、ＮＰ表面のマレイミド官能基に結合する図式。

【図２】図２は、ウェスタンブロットおよびＧＡＬＣ活性分析の結果を含む。（Ａ）ＧＡＬＣまたはＮＰ－ＧＡＬＣ処理および取り込みの後のＨ４細胞溶解物のウェスタンブロット分析。１レーンあたり４０μｇの全タンパク質を添加し、そしてブロットをＵ１０２１一次抗体および抗ニワトリＩｇＹ二次抗体を用い、１分間曝露して調査した。８０ｋＤａのＧＡＬＣ前駆体タンパク質および５０ｋＤａの処理された断片の両方が検出され、このことはＧＡＬＣが正常な処理のためにＨ４細胞のリソソームに輸送されることを示す（ＮＴ＝未処理のＨ４細胞）。（Ｂ）（Ａ）で示したものと同じ溶解物からの対応するＧＡＬＣ活性アッセイ。

【図３】図３は、血液中のＧＡＬＣ寿命の薬物動態学的研究の結果を含む。時点は、ＧＡＬＣの尾静脈内注射後どれだけの時間に血液を採取したのかを示す。およその$t_{1/2}$値を示す。

【図４】図４は、ＧＡＬＣまたはＮＰ－ＧＡＬＣ投与後の脳ＧＡＬＣレベルのプロットを含む。ＧＡＬＣを、尾静脈内注射またはｉ．ｐ．注射のいずれかによって、１日おきに２

ｍｇ／ｋｇで投与した。投与した容積（μＬで）は、マウスの体重（グラムで）の５倍を超えることはなかった。脳組織を生後３９日、最後の注射の２４時間後に回収した。組織をホモジナイズし、タンパク質レベルに対して標準化し、そして酵素活性をアッセイするために使用した。

【図５】図５は、ＴＩＭＰ－１のＮＰ表面への共有結合のための、少し改変した戦略を示す。

【図６】図６は、ＴＩＭＰ－１酵素活性アッセイの結果を含む。（Ａ）ＴＩＭＰ－１のＮＰ表面への結合に関する洗浄工程の過程で検出されたＴＩＭＰ－１のパーセント。ＮＰの非存在下で、ＴＩＭＰ－１は遠心および透析の過程で濃縮されない。（Ｂ）ＮＰ結合後のＴＩＭＰ－１阻害活性。ＮＰ－ＴＩＭＰ１活性は、ＭＭＰ９阻害に対するＴＩＭＰ－１活性と直接対応する。

【図７】図７は、ＮＰ－ＧＡＬＣ免疫原性アッセイの結果を含む。ＥＬＩＳＡに基づくアッセイを用いて、血漿中の抗体力価を測定した。動物（ＣＤ－１マウス）に、尾静脈内投与を用いて、１０ｍｇ／ｋｇのＧＡＬＣまたはＮＰ－ＧＡＬＣを週１回投与した。

【図８】図８は、４℃での乾燥保存下におけるＮＰ－ＧＡＬＣおよびＧＡＬＣ単独の安定性分析の結果を含む。酵素処方物を調製した後６カ月まで、酵素活性を定期的に試験した。（＊）ＧＡＬＣ活性は６０および１２０日の間のどこかで検出不能になったが、ＮＰ－ＧＡＬＣ活性は、研究の期間１００％の活性を維持した。

【発明を実施するための形態】

【００１２】

詳細な説明

本文書は、分子を哺乳類に送達することに関連する方法および材料を提供する。例えば、本文書は、酵素および他の分子をナノ粒子に結合する方法および材料を提供する。本明細書中で記載するように、哺乳類へ投与する場合に、生理学的濃度を増加させる、生物学的利用能を延長する、および酵素および他の分子の血液脳関門を横切っての送達を改善するために、そのようなナノ粒子を使用し得る。ある場合において、そのような改善された性質を示すナノ粒子の組成物を、正常な酵素機能の欠如または破壊によって特徴付けられる状態を治療するために、分子を哺乳類へ送達するために使用し得る。本明細書中で使用される場合、「生物学的利用能」は、細胞、組織、または生物学的区画への送達および細胞、組織、または生物学的区画による取り込みのために利用可能な分子（例えば酵素、ペプチド）の濃度を指す。本明細書中で使用される場合、生物学的利用能の増加および／または延長は、細胞、組織、または生物学的区画へ送達される、または細胞、組織、または生物学的区画によって取り込まれる化合物の能力の増強を指す（例えば血液への吸収の増強、脳への送達の増強）。

【００１３】

従来の製造方法によって、かなりの量の薬剤（例えば生物学的製剤、酵素、抗体）収量が、薬剤の凝塊形成または凝集および分解のために失われ得る。凝集および分解の問題を代償する、および／または回避するために、従来の方法は、薬剤組成物への様々な賦形剤の添加を含む。しかし、多くの賦形剤の添加は、患者の転帰に有害であり得る。ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）は、酵素の製造において使用される賦形剤の１つの例である。ＰＥＧを無差別な方式で薬剤／酵素に加える、すなわち、ＰＥＧを酵素の無作為な部位において酵素に付加／結合させている。本明細書中で提供される方法および材料は、薬剤／酵素をナノ粒子（例えば本明細書中で記載されるＰＥＧ－ＰＬＧＡコポリマー）に結合させることを含み得、そのナノ粒子は酵素（またはある場合には、抗体、ポリペプチド、またはペプチド）のＮまたはＣ末端のいずれかに結合させている。ある場合において、ナノ粒子をポリペプチド（例えば酵素）のＮまたはＣ末端に結合させることにより、実質的に凝集を抑制し得、ポリペプチドの活性（例えば酵素活性）を影響されないまま維持し得、そして効果的なナノ粒子の収量を得る工程において使用することができる。本明細書中で提供された方法によって製造したナノ粒子は、溶液中、保存の間、および凍結乾燥および再懸濁の際に、安定性の大きな増加を示し得る。従って、本明細書中で提供された方法に

よって製造したナノ粒子は、実質的な臨床的価値を有し得る。

【００１４】

本明細書中で使用される場合、「安定な」および「安定性」という用語は、薬剤－ナノ粒子組成物（例えばポリマーナノ粒子）の、実質的に不変のままである能力を指す。薬剤－ナノ粒子安定性の１つの尺度は、薬剤－ナノ粒子組成物の、時間につれて凝塊形成および／または凝集物を形成しない能力である。薬剤－ナノ粒子安定性の別の尺度は、薬剤－ナノ粒子組成物の、時間につれて分解しない能力である。増加した安定性を有する薬剤－ナノ粒子は、時間につれて実質的に凝集物を形成するおよび／または実質的に分解する可能性が低い（例えば製造の間、保存の間、または溶液中で）。

【００１５】

本明細書中で使用される場合、「治療」という用語は、本明細書中で描写した疾患または障害（例えば、リソソーム蓄積症）の進展または進行を、低下、抑制、軽減、減少、停止、または安定化させる、その疾患または障害の重症度を低下させる、またはその疾患または障害に関連する症状を改善することを意味する。

【００１６】

本明細書中で使用される場合、「予防する」という用語は、本明細書中で描写された疾患または障害を発症する（例えばリソソーム蓄積症に関連する症状を発症する）可能性を低減すること、または本明細書中で描写された疾患または障害の再発（例えばリソソーム蓄積症に関連する再発する症状を経験すること）の可能性を低減することを指す。

【００１７】

本明細書中で提供されるナノ粒子は、ポリマーナノ粒子であり得る。あらゆる適当な方法によって合成されたポリマーを、ポリマーナノ粒子の構築に使用し得る。ある場合において、本明細書中で提供されるナノ粒子に適当なポリマーを、開環重合（ＲＯＰ）プロトコールを用いて合成し得る。例えば、ポリマー合成は、以前に記載されたプロトコールによって実施される開環重合であり得る（Ｚｈａｎｇら、Ｃｏｌｌｏｉｄ　Ｐｏｌｙｍ．Ｓｃｉ．２８２：１３２３－８（２００４）；ＤｏｎｇおよびＦｅｎｇ、Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ、２５（１４）：２８４３－９（２００４）；Ｚｈａｎｇら、Ｊ．Ｄｒｕｇ　Ｔａｒｇｅｔ　１４（５）：２８１－９０（２００６）を参照のこと）。

【００１８】

本明細書中で提供されたナノ粒子を、ポリマーの混合物から構築し得る。例えば、ポリマーナノ粒子を、ＣＯＯＨ－ＰＥＧ－ＰＬＡおよびメトキシ－ＰＥＧ－ＰＬＡポリマーの混合物から構築し得る。ある場合において、ポリマーナノ粒子を、ＣＯＯＨ－ＰＥＧ－ＰＬＡおよびマレイミド－ＰＥＧ－ＰＬＡポリマーの混合物から構築し得る。本明細書中で提供されたナノ粒子の構築に適当な他のポリマーは、ポリ（乳酸－ｃｏ－グリコール酸）（ＰＬＧＡ）、ポリ（アクリル酸）（ＰＡＡ）、ポリ（ブチルシアノアクリレート）（ＰＢＣＡ）、ポリ（ビニルアルコール）（ＰＶＡ）、ポリ（酢酸ビニル）、ポリ（エチレンオキシド）（ＰＥＯ）、ポリスチレン（ＰＳ）、およびポリエチレンイミン（ＰＥＩ）を含み得る。ポリマーナノ粒子を、あらゆる適当な方法によって構築し得る。ある場合において、ナノ粒子は、疎水性部分および親水性部分を両方含む個々の両親媒性ポリマーから、コア構造物およびシェル構造物へ自己集合して、固体ナノ粒子、コロイド性ナノ粒子、および高度可溶性のナノ粒子を形成し得る。ナノ粒子構築のための他の適当な方法は、乳化、超音波処理、１滴ずつの溶媒の添加、および逆ミセル法を含み得る。

【００１９】

分子を、共有結合相互作用、非共有結合相互作用（例えばキレート化）、静電気的相互作用、吸着、または単純な結合によって、ポリマーナノ粒子の表面またはコアに結合させ得る。本明細書中で記載されたように、酵素、ポリペプチド、または他の分子をナノ粒子に結合することにより、インビボまたはインビトロで、結合した分子の半減期を増加させ得る。例えば、ポリ（エチレングリコール）（ＰＥＧ）ナノ粒子は、治療薬の積荷（ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ　ｃａｒｇｏ）を酵素的分解から保護することによって、および細網内皮系による早すぎる取り込みを防止することによって、結合した治療分子の全身性循環

半減期を増加させ得る。ある場合において、ナノ粒子は、血清、血液、血漿、またはヒト体内における、結合していない状態の治療分子の半減期と比較して、血清、血液、血漿、またはヒト体内における、結合した治療分子の半減期を増加させ得る。ある場合において、生体適合性および生物分解性ポリマーであるポリ（ラクチド）（ＰＥＧ－ｂ－ＰＬＡ）を、ナノ粒子コアを形成するために使用し得る。ジブロックコポリマー（例えばポリ（エチレングリコール）－ブロック－ポリ（ラクチド））から形成されたポリマーナノ粒子は、安定でありそして生物学的に適合性であり得る。そのようなナノ粒子は、インビボで生物分解して、増加した半減期を有する結合酵素または他の積荷を放出し得る。例えば、ナノ粒子の生物分解後に放出された酵素を、静脈内注射後の２４時間を超えて、循環システムにおいて検出し得る。

【００２０】

あらゆる適当な生体分子を、ポリマーナノ粒子の表面またはコアに結合させ得る。例えば、酵素（例えば内因性酵素または組換え酵素）、ポリペプチド、抗体、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、ｓｉＲＮＡ、オリゴヌクレオチド、または小分子をポリマーナノ粒子に結合させ、その生体分子を哺乳類に送達することができる。ある場合において、１つを超える生体分子を、ナノ粒子の表面またはコアに結合させ得る。例えば、ナノ粒子を、治療薬の積荷、およびペプチド、抗体、オリゴヌクレオチド、小分子、および特定の細胞または臓器を特異的に認識する他の高分子のような、細胞標的化分子または臓器標的化分子で同時に修飾し得る。結果として、そのようなヘテロ官能化ナノ粒子を、哺乳類へ投与する場合、特定のインビボの位置へ送達し得る。ある場合において、細胞通過性ペプチド（ＣＰＰ）を、他の治療薬の積荷（例えば治療酵素、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド）に融合して、本明細書中で提供されるナノ粒子の細胞膜を横切った移行を増強し得、そしてそのような治療薬の標的細胞、組織、または生物学的区画への送達を促進し得る。ある場合において、ＴＩＭＰ－１のようなポリペプチド阻害剤をポリマーナノ粒子の表面またはコアに結合させ、そのポリペプチド阻害剤を哺乳類へ送達することができる。ある場合において、本明細書中で提供されるナノ粒子は、他の表面の化学作用部分を有し得る。例えば、表面の化学作用部分は、カルボン酸、ヒドロキシル、マレイミド、アミン、メトキシ、アミノ酸、ＮＨＳエステル、ＮＨＳ、スルフヒドリル（チオール）、カルバメート、アルキルハロゲン化物、イミノ二酢酸（Cu^{2+}）、またはニトロ三酢酸（Ni^{2+}）であり得る。

【００２１】

ある場合において、本明細書中で提供されるナノ粒子を凍結乾燥し得る。凍結乾燥物を形成するために、あらゆる適当な方法を使用し得る。例えば、凍結乾燥物を、凍結乾燥（凍結－乾燥）、窒素パージ、または遠心真空濃縮によって形成し得る。ある場合において、本明細書中で記載される方法のいずれかによる凍結乾燥の間に、賦形剤を使用し得る。例えば、メチルセルロース、シクロデキストリン、ポリエチレングリコール、ヒドロキシプロピルシクロデキストリン、および界面活性剤（例えばポリオキシエチレングリコールドデシルエーテル（Ｂｒｉｊ３５）またはドデシル硫酸ナトリウム）のような、あらゆる適当な賦形剤を使用し得る。賦形剤を、例えば約０．５から約１０％の範囲で使用し得る。凍結乾燥したナノ粒子を、すぐに使用し得るか、または後で使用するために保存し得る（例えば約１日、１週間、１ヶ月、２ヶ月、３ヶ月、４ヶ月、５ヶ月、または６ヶ月後に使用するために保存し得る）。保存は、例えば、あらゆる適当な条件下で（例えば乾燥保存）、あらゆる適当な温度（例えば４℃）においてであり得る。ある場合において、凍結乾燥したナノ粒子を、例えばナノ粒子凝集物の形成によるナノ粒子サイズの増加無しに、および／または酵素活性の喪失無しに、後に使用するために保存し得る。ある場合において、本明細書中で提供されるナノ粒子の凍結乾燥物を、使用前に再構成し得る。例えば、凍結乾燥したナノ粒子を、使用前に溶液で（例えば水または緩衝化溶液）再構成し得る。

【００２２】

本明細書中で提供されるナノ粒子を、あらゆる適当な治療目的のために、哺乳類に投与し得る。例えば、ナノ粒子を、酵素補充（ｅｎｚｙｍｅ　ｐｌａｃｅｍｅｎｔ）療法のた

めに、または抗癌治療、抗ウイルス治療、または抗生物質治療のために、哺乳類に投与し得る。ある場合において、分子を標的細胞、組織、または生物学的区画へ送達するために、本明細書中で提供されるナノ粒子を哺乳類に投与し得る。例えば、本明細書中で提供されるナノ粒子を、そのような分子がナノ粒子の表面またはコアに結合している場合に、生体分子（例えばポリペプチド、抗体、ペプチド、ｓｉＲＮＡ、またはオリゴヌクレオチド）または化学作用部分（例えばカルボン酸、ヒドロキシル、またはマレイミド（ｍａｌｅｍｉｄｅ））の送達を増加させるために使用し得る。ナノ粒子に結合する積荷の型は、そのナノ粒子を哺乳類に投与するための治療レジメの型に依存し得る。例えば、機能酵素の欠如または機能不全の酵素の存在によって特徴付けられる状態を有する哺乳類にそのような酵素を送達するために、酵素をポリマーナノ粒子の表面またはコアに結合させ得る。そのような治療レジメを、例えばクラッベ病、Ｉ型ゴーシェ病、ファブリー病、ハーラー症候群、ニーマン－ピックＢ病、ポンペ病、ファーバー病、サンフィリッポ症候群、またはテイ・サックス病のような疾患を治療または予防するために使用し得る。そのナノ粒子が適当である他の治療レジメは、例えば抗癌治療、抗ウイルス治療、および抗生物質治療を含み得る。癌を治療するために、化学療法の性質を有する小分子を、本明細書中で記載される方法によって使用するためにナノ粒子に結合させ得る。ウイルス感染症および細菌感染症を治療するために、それぞれ抗ウイルスの性質および抗生物質の性質を有する小分子またはペプチドを、本明細書中で記載される方法によって使用するためにナノ粒子に結合させ得る。ある場合において、潜在的治療分子のナノ粒子への結合は、その治療分子のみの投与と比較した場合、その治療分子の治療効果を増加させ得、そして／または望ましくない副作用を低減し得る。

【００２３】

あらゆる適当な哺乳類を、本明細書中で提供された方法および材料によって治療し得る。例えば、ヒト、非ヒト霊長類、ウマ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコ、モルモット、ラット、マウス、およびウサギを、本明細書中で提供される方法および材料によって治療し得る。ナノ粒子を使用して、分子を哺乳類の体内のあらゆる適当な標的へ送達し得る。例えば、酵素的または薬理学的活性を、特定の部位または組織へ局在化するために、ナノ粒子－分子複合体を、哺乳類の体内のあらゆる臓器、組織、細胞、細胞小器官、または生体分子（例えば核酸またはポリペプチド）へ標的化し得る。本明細書中で提供されるナノ粒子を、哺乳類の体のあらゆる部分へ投与し得る。例えば、ナノ粒子を、体腔、臓器、体の部分、または体液へ投与し得る。

【００２４】

あらゆる適当な濃度のナノ粒子を、哺乳類へ投与し得る。例えば、ナノ粒子を、約０．１ｍｇ／ｋｇから約１０００ｍｇ／ｋｇの濃度で哺乳類へ投与し得る。ある場合において、ナノ粒子をヘテロ官能化して、２つまたは複数の化合物を同時に投与し得る。ある場合において、ナノ粒子を溶液中に懸濁して、ナノ粒子の哺乳類への投与を促進し得る。例えば、ナノ粒子をｔｒｉｓベースの緩衝液、リン酸塩ベースの緩衝液、または炭酸塩ベースの緩衝液、水、食塩水、界面活性剤を含む溶液、ジメチルスルホキシドを含む溶液、または制限なしに、メチルセルロースを含むエマルション形成溶液中に懸濁し得る。あらゆる適当な投与方式を使用し得る。例えば、本明細書中で提供されるナノ粒子を、静脈内（ｉ．ｖ．）、腹腔内（ｉ．ｐ．）、または脳室内（ｉ．ｃ．ｖ．）注射によって、哺乳類に投与し得る。本明細書中で提供されるナノ粒子を、他の経路によって、例えば筋肉内、皮下、舌下、髄腔内（ｉｎｔｒａｔｈｅｃａｌｌｙ）、または皮内に、哺乳類に投与し得る。その投与経路は、治療目的のような様々な因子に依存し得る。

【００２５】

ある場合において、本明細書中で提供される方法および材料により、哺乳類において標的分子の生物学的利用能を増加または延長し得る。酵素または他の分子の改善された生物学的利用能を、コントロール組成物と比較して評価し得る。例えば、ナノ粒子に結合した分子は、ナノ粒子に結合していない場合の分子と比較して、インビボで改善したまたは延長した生物学的利用能を示し得る。例えば、ナノ粒子上に負荷した（ｌｏａｄｅｄ）分子

は、ナノ粒子に結合していない分子と比較して、低下した生物学的利用能を有する可能性があり、そのことを当業者に公知の方法によって決定し得る。例えば、血清中の分子の生物学的利用能を、最高血漿中薬剤濃度、最高薬剤濃度になる時間、および血漿中濃度－時間曲線下面積を決定することによって評価し得る。生物学的サンプルにおいて分子の生物学的利用能を測定する他のアッセイが、当該分野で公知である（Ｗｒｏｂｅｌら、Ｂｉｏｌ．Ｔｒａｃｅ　Ｅｌｅｍｅｎｔ　Ｒｅｓ．６８（２）：９７－１０６（１９９９）；Ｍｏｔｚｏｋら、Ｊ．Ａｓｓｏｃ．Ａｎａｌ．Ｃｈｅｍ．６１（４）：８８７－９３（１９７８）；Ｊｏｈｎｓｏｎ、Ｂｉｏｌ．Ｔｒａｃｅ　Ｅｌｅｍｅｎｔ　Ｒｅｓ．１９：３－１０（１９８９）；Ｈａｚｅｌら、Ｂｒｉｔｉｓｈ　Ｊ．Ｎｕｔｒ．５７：２２３－３３（１９８７）；Ｏｏｍｅｎら、Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｓｃｉ．Ｔｅｃｈ　３５：３３２６－３４（２００２））。

【００２６】

本文書はまた、酵素補充療法を用いて、哺乳類において酵素疾患を治療すること、または酵素レベルを増加させることに関連する方法および材料を提供する。酵素疾患は、ポリペプチドの酵素活性を部分的にまたは完全に無効にする遺伝欠損によって引き起こされ得る。酵素補充療法は、特定の酵素が欠損している、または欠如している被験体において、酵素を置換する医学的介入の形式である。本明細書中で提供される方法および材料を用いて治療し得る代表的な酵素疾患は、制限無しに、フェニルケトン尿症（ＰＫＵ）、鎌状赤血球貧血、嚢胞性線維症、およびある患者においては自閉症スペクトラム障害と共に現れるミトコンドリア疾患を含む。ある場合において、本明細書中で提供されるナノ粒子は、積荷として機能酵素を有し得る。そのようなナノ粒子は、本明細書中で記載されるように投与された場合に、哺乳類において酵素機能を回復または改善し得る。

【００２７】

ある場合において、本明細書中で提供される方法および材料を、中枢神経系における酵素レベルを増加させるために、および変性性神経疾患を治療するための酵素補充療法を提供するために使用し得る。例えば、本明細書中で提供されるナノ粒子を、哺乳類においてリソソーム蓄積症のような変性性神経疾患を治療するために使用し得る。ある場合において、そのリソソーム蓄積症は、クラッベ病である。本明細書中で提供される方法および材料を用いて治療し得る、他のリソソーム蓄積症は、制限無しに、Ｉ型ゴーシェ病、ファブリー病、ハーラー症候群、ニーマン－ピックＢ病、ポンペ病、ファーバー病、サンフィリッポ症候群、またはテイ・サックス病を含み得る。変性性神経疾患の治療のための酵素補充療法に、本明細書中で提供されるナノ粒子を使用することに関して、あらゆる適当な分子を、ナノ粒子（例えばポリマーナノ粒子）の表面またはコアに結合させ得る。例えば、酵素、ポリペプチド、抗体、ペプチド断片、ＰＮＡ、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、オリゴヌクレオチド、または小分子を、その分子を哺乳類へ送達するために、ポリマーナノ粒子に結合させ得る。ある場合において、その分子はペプチドまたはポリペプチドであり得る。ある場合において、ＴＩＭＰ－１のようなポリペプチド阻害剤を、そのポリペプチド阻害剤の哺乳類への送達のために、ナノ粒子（例えばポリマーナノ粒子）の表面またはコアに結合させ得る。

【００２８】

変性性神経疾患の治療のために、その疾患に関連する酵素を、ナノ粒子（例えばポリマーナノ粒子）の表面またはコアに結合させ得る。本明細書中で提供される方法および材料のための代表的な酵素は、ガラクトセレブロシダーゼ（ＧＡＬＣ）であり、この酵素はいくつかのリソソーム蓄積症において欠如している、または機能不全であり得る。本明細書中で提供される方法および材料に適した他の酵素は、制限無しに、ベーターグルコシダーゼ（ゴーシェ病Ｉ、ＩＩ、およびＩＩＩ型に関連する）、アルファーガラクトシダーゼＡ（ファブリー病に関連する）、セラミダーゼ（ファーバー病に関連する）、アルファーＬ－イズロニダーゼ（ハーラー症候群に関連する）、マルターゼ（ポンペ病に関連する）、スフィンゴミエリナーゼ（ニーマン－ピックＢ病に関連する）、ヘキソサミニダーゼ（テイ・サックス病に関連する）、スルファミダーゼ（ＳＧＳＨ）（サンフィリッポ症候群、

またはムコ多糖症ＩＩＩに関連する）、およびアリールスルファターゼＡ（ＡＲＳＡ）（異染性白質ジストロフィーに関連する）を含み得る。

【００２９】

分子が標的細胞、組織、または生物学的区画へうまく送達されるかどうかを決定するために実験を行い得る。例えば、本明細書中で提供されるナノ粒子の投与が、そのようなナノ粒子に結合した酵素または他の分子の生理学的濃度を増加させたか、または生物学的利用能を延長させたかどうかを決定するために、あらゆる適当なアッセイを行い得る。ある場合において、本明細書中で提供されるナノ粒子を投与する場合、酵素補充療法が成功したかどうかを決定するために、アッセイを行い得る。酵素補充療法の成功を、結合した酵素の体内分布を評価することによって、および治療した哺乳類の病理組織を評価することによって決定し得る。分子の哺乳類への送達の成功を決定する他の適当な方法は、ナノ粒子に結合した酵素または他のポリペプチドに対して向けられた抗体を用いたウェスタンブロッティング、ＥＬＩＳＡ、酵素活性の機能的アッセイ、および酵素のタンパク質分解の減少を検出するためのアッセイを含み得る。標的分子のタンパク質分解の減少は、その分子の生物学的利用能の増加を示し得る。分子の送達および生物学的利用能を検出するために使用し得る他のアッセイは、生物物理学的方法、分光法、顕微鏡検査、および細胞および組織のイメージングを含み得る。

【００３０】

本明細書中で提供されるナノ粒子を投与する場合、神経学的状態の治療の成功を決定するために、あらゆる適当な方法を使用し得る。ある場合において、ＧＡＬＣの脳への局在化を検出し得る。ある場合において、ＧＡＬＣの細胞下の局在を、シュワン細胞、肝細胞、および腎臓立方細胞において検出し得る。アフィニティー精製抗ＧＡＬＣポリクローナル抗体ＣＬ１４７５または組換えヒトＧＡＬＣタンパク質に対して産生された抗ＧＡＬＣモノクローナル抗体を、局在化アッセイのために使用し得る。ある場合において、切断産物のレベルの増加によって決定される、ＧＡＬＣ酵素活性の増加を、脳ホモジネートにおいて検出し得る。例えば、脳ホモジネートを、ＧＡＬＣ基質代謝回転反応によって分析し得る。細胞毒性ＧＡＬＣ基質であるプシコシンの蓄積の減少を、治療した哺乳類の脳において、そしてより具体的にはオリゴデンドロサイトおよびシュワン細胞のようなミエリン形成細胞において、質量分析（ｍａｓｓ　ｓｐｅｃｔｒａｌ　ａｎａｌｙｓｉｓ）によって検出し得る。本明細書中で提供される方法による酵素補充療法の成功は、坐骨神経の脱髄を抑制し得る。ある場合において、オリゴデンドロサイトの数の増加を、本明細書中で提供されるナノ粒子の投与後に検出し得る。ある場合において、軸索喪失、星状細胞グリオーシス、および多核性末梢マクロファージまたは「グロボイド細胞」の浸潤の減少を観察し得る。酵素補充療法の成功をまた、治療した哺乳類における臨床的表現型の改善によって決定し得る（例えば痙縮、外部刺激に対する易刺激性および過敏症、強直性発作性体位（ｏｐｉｓｔｈｏｔｏｎｉｃ　ｐｏｓｔｕｒｉｎｇ）、視覚障害、高緊張性発作、または腱反射の喪失の改善）。

【００３１】

本発明は、以下の実施例においてさらに説明され、それらは特許請求の範囲において記載される本発明の範囲を制限しない。

【実施例】

【００３２】

実施例１－ＧＡＬＣの末梢投与

ＧＡＬＣをトランスフェクトしたＨＥＫ２９３細胞から回収し、そしてアフィニティークロマトグラフィーによって精製した、組換えマウスＧＡＬＣの週１回の腹腔内（ｉ．ｐ．）注射を、ｔｗｉｔｃｈｅｒ（攣縮体）マウスに対してＰＮＤ１０または２０から開始した。ｔｗｉｔｃｈｅｒの神経病理の発症前および発症後の両方を模倣するために、これらの投与レジメを選択した。天然に存在するマウスモデルであるｔｗｉｔｃｈｅｒは、クラッベ病に対して酵素学的に真正（ａｕｔｈｅｎｔｉｃ）である。ｔｗｉｔｃｈｅｒマウスの表現型は、ＧＡＬＣ遺伝子における単一のＧ＞Ａ変異に由来し、それはＧＡＬＣの不

活性な形態を産生し、そして出生後日数（ＰＮＤ）２０までに、ＣＮＳおよび末梢神経系において脱髄を引き起こす。ｔｗｉｔｃｈｅｒマウスは、典型的には、成長不全、四肢の脱力および麻痺、および不随意の頭部攣縮を経験した後、ＰＮＤ４０－４２付近でその疾患状態のために死亡する。両方の酵素補充療法（ＥＲＴ）による治療は、ｔｗｉｔｃｈｅｒマウスの寿命を約４１から４６日に等しく増加させたが、それはヒトのものと比較してのこれらのマウスの急速および攻撃的な病理学的悪化を考慮すると、おそらく臨床的に顕著な改善である。体内分布研究は、その酵素がほとんど全て末梢に、特に肝臓に局在化していることを示した。しかし、酵素活性および免疫組織化学的方法の両方によって、低レベルの組換えＧＡＬＣが、脳内に検出された。まとめると、このデータは、末梢ＥＲＴは、クラッベ病の治療としての可能性を有するが、血液脳関門（ＢＢＢ）の通過度の増加およびより長い酵素半減期が、おそらく臨床結果を改善することを示している。

【００３３】

別の研究において、組換えＧＡＬＣの単回片側注射を受けたｔｗｉｔｃｈｅｒマウスが、注射部位から離れた領域を含む脳内で広範囲の酵素分布を示した。ＰＮＤ２０においてＧＡＬＣの単回用量脳室内（ｉ．ｃ．ｖ．）注射を受けた動物は、５２日まで生存し、それは約ＰＮＤ４０～４２までしか生存しなかったコントロールｔｗｉｔｃｈｅｒ動物と比較して有利である。単回用量のｉ．ｃ．ｖ．注射は臨床的に実行可能であるが、それはｉ．ｐ．またはｉ．ｖ．投与よりかなり侵襲的である。従って、慢性のｉ．ｃ．ｖ．によるＧＡＬＣ投与に基づく治療は可能性が低い。それにも関らず、これらのデータは、もしＧＡＬＣのＢＢＢ通過度が増加するなら、より積極的な臨床的効果があることを示唆する。

【００３４】

血漿中のＧＡＬＣ活性を定量するために、偽ＥＬＩＳＡに基づく方法を開発した。まず、吸着性プレート（Ｎｕｎｃ　Ｍａｘｉｓｏｒｐ）を、アフィニティー精製ニワトリ抗ＧＡＬＣ抗体（Ｕ１０２１）でコーティングした。血漿サンプルを、標準的な方法およびＥＤＴＡを用いて処理し、次いで直接プレートに加え、そこでＧＡＬＣを結合させた。徹底的に洗浄した後、反応緩衝液中のＧＡＬＣ比色定量基質を加えた。その反応を規定された間隔で停止し、そして吸光度をプレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ）によって読み取った。ｔｗｉｔｃｈｅｒマウス血漿（ＧＡＬＣ無し）に加えた既知量のＧＡＬＣを、同じプレートにおける標準曲線として使用して、血漿中のＧＡＬＣレベルを信頼性高く定量した。

【００３５】

実施例２－ＰＥＧ－ｂ－ＰＬＡナノ粒子合成

ナノ粒子はサイズが小さい（２－１００ｎｍ）ために、ナノ粒子は生物学的システムにおいて使用するのに適している。大きな表面対容積比により、同じようなサイズの生体分子を用いるカプセル封入または機能付与を受けることができ、それにより数種のコピーの同じ生体分子を、単一のＮＰコアに充填し得る、またはＮＰ表面に結合させ得る。ポリマーＮＰは、個々の両親媒性ポリマー（疎水性および親水性部分の両方を含む）からコア／シェル構造物に自己集合し；固体で、コロイド性で、高度に可溶性のＮＰを形成する。ＧＡＬＣの生体内安定性（ｂｉｏｓｔａｂｉｌｉｔｙ）および中枢神経系での生物学的利用能を改善するために、ＧＡＬＣに選択的に結合させたポリマーＰＥＧ－ｂ－ＰＬＡ　ＮＰを合成した。そのジブロックコポリマーであるＰＥＧ－ｂ－ＰＬＡを、以前に記載した（Ｚｈａｎｇら、Ｃｏｌｌｏｉｄ　Ｐｏｌｙｍ．Ｓｃｉ．２８２：１３２３－８（２００４）；ＤｏｎｇおよびＦｅｎｇ、Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ、２５（１４）：２８４３－９（２００４）；Ｚｈａｎｇら、Ｊ．Ｄｒｕｇ　Ｔａｒｇｅｔ　１４（５）：２８１－９０（２００６））をわずかに改変して合成した。簡単には、再蒸留Ｄ，Ｌ-ラクチドを、ワンポット、開環重合（ＲＯＰ）反応を用いて、Ｒ－ＰＥＧ３５００－ＯＨ上に重合した、ここでＲはメトキシ、カルボキシル、またはマレイミド部分を示す（図１Ａ）。ＲＯＰを、不活性雰囲気下で、１３０℃で４８時間進行させ、それは同様のサイズのＰＥＧポリマーブロックおよびＰＬＡポリマーブロックを生成するために最も良い条件であることが決定された。反応物および最終的なポリマーサイズを、ＮＭＲによってモニターした。ＮＰ

は、異なる比のメトキシ末端ポリマー、カルボキシル末端ポリマー、およびマレイミド末端ポリマーを用いた共溶媒エマルションの手法によって、自己集合した。ＮＰを、原子間力顕微鏡（ＡＦＭ）によって特徴付けし、そして直径約３０ｎｍであることが推定された（図１Ａ）。ＮＰ表面のＰＥＧ－カルボキシレートを、カルボジイミド（ＥＤＣ）結合化学反応を用いて、イミノ二酢酸（ＩＤＡ）へ選択的に変換し、次いで標準的な固定化金属アフィニティークロマトグラフィーによってＮＰ表面に捕捉された、Ｈｉｓ６タグ化ＧＡＬＣと混合して、ＮＰ－ＧＡＬＣ結合物を形成させた（図１Ｂ）。ＮＰ機能付与後、結合物を大規模透析（ｅｘｔｅｎｓｉｖｅ　ｄｉａｌｙｓｉｓ）および高速遠心分離にかけ、あらゆる過剰な試薬（未結合のＧＡＬＣを含む）を除去する（図１Ｃ）。

【００３６】

現在までに、この方法は、ＩＤＡに変換し、続いてＧＡＬＣに結合させることができるＣＯＯＨ－ＰＥＧ基からなる約５０％の表面被覆率を有する小規模調製物から、ＮＰ－ＧＡＬＣ結合物を再現性よく産生している。ＮＰ－ＧＡＬＣ調製物あたりのＮＰ濃度、またはＮＰあたりに結合したＧＡＬＣ分子の正確な数は確認されていないが、ＮＰ－ＧＡＬＣ結合物溶液は、高度に活性なＧＡＬＣを含む。ゲルに基づくアッセイ、または比色定量ＧＡＬＣ活性アッセイを用いることにより、ＮＰ－ＧＡＬＣの個々の調製物は２０～４０μｇ／ｍＬのＧＡＬＣ濃度を有した。ＧＡＬＣがＮＰ結合後にその活性を維持することに加えて、ＮＰ－ＧＡＬＣ結合物が、培養Ｈ４細胞（ヒト神経膠腫細胞系統）によって効率的に取り込まれることを実証した。コンフルエントなＨ４細胞を、１２穴プレートに７０～８０％の集密度で２４時間播種した。細胞を、２、４、または６μｇの全ＧＡＬＣのＮＰ－ＧＡＬＣ結合物で、または等しい濃度のＧＡＬＣ単独で、さらに２４時間処理した。細胞溶解物を、全タンパク質濃度に対して標準化し、そしてウェスタンブロット分析およびＧＡＬＣ活性アッセイによって分析した（図２）。ＧＡＬＣまたはＮＰ－ＧＡＬＣ処理および取り込み後に、ウェスタンブロッティングをＨ４細胞溶解物で行った。８０ｋＤａのＧＡＬＣ前駆体タンパク質および５０ｋＤａの処理断片の両方が検出され、このことはＧＡＬＣが正常なプロセシングのためにＨ４細胞のリソソームに輸送されたことを示している。さらに、ＮＰ－ＧＡＬＣ結合物が、ＧＡＬＣ単独と同じかまたはそれより高いレベルでＨ４細胞に輸送されたことが観察された。さらに、ウェスタンブロットによって検出されるように、ＮＰ－ＧＡＬＣ結合物は、ＧＡＬＣがその８０ｋＤａの形態から、はるかにより活性な５０ｋＤａ断片および３０ｋＤａ断片へプロセシングされる細胞内の部位である、細胞のリソソームに対して正しく標的化された。これらの予備実験は、ＮＰ－ＧＡＬＣ結合物の生体適合性、およびそのような結合物をＥＲＴの形式として使用する可能性を実証した。最初のデータは非常に有望であり、そしてＣＮＳ疾患を治療するためにポリマーナノ粒子技術を使用することの発展を支持した。

【００３７】

実施例３－ＮＰ－ＧＡＬＣ結合物のインビトロおよびインビボにおける特徴付け

予備実験により、ＣＯＯＨ－ＰＥＧ－ＰＬＡおよびメトキシ－ＰＥＧ-ＰＬＡポリマーの混合物から構築された、ＮＰ－ＧＡＬＣ結合物の再現性の良い生成がもたらされ、その結果、ＮＰ表面の約５０％が－ＣＯＯＨ部分で覆われ、そしてＧＡＬＣ結合のために利用可能であった。ＮＰ－ＧＡＬＣ結合物の形態およびサイズを、原子間力顕微鏡（ＡＦＭ）によって推定し、そして結合したＧＡＬＣの活性を検証した。ＮＰあたりに結合したＧＡＬＣの量をより正確に示すために、調製物の比活性をより正確に計算するために、および最適な安定性を可能にする一般的な保存条件を決定するために、ＮＰ－ＧＡＬＣ結合物のインビトロおよびインビボにおける特徴付けを行った。ＡＦＭを使用して、調製した懸濁液あたりに存在するＮＰの数を計算した。簡単には、広い範囲の希釈における（１０～１０，０００倍）１０μＬのＮＰ懸濁液を、３’－（アミノプロピル）－トリエトキシシラン（ＡＰＴＥＳ）で改変した、新しく調製した雲母断片（ｍｉｃａ　ｓｔｕｂ）上で、サンプルスポットが乾燥するまでインキュベートした。環境タッピングモード（ａｍｂｉｅｎｔ　ｔａｐｐｉｎｇ　ｍｏｄｅ）に設定した、Ｍｕｌｔｉｍｏｄｅ　ＡＦＭ（Ｖｅｅｃｏ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｉｎｃ．）を有するＮａｎｏｓｃｏｐｅ　ＩＩＩ制御装置

を使用して、１００μｍ^{2}領域の平均１０セクターに沈積したＮＰ（≧１０μｍ）の数を計測した。ＧＡＬＣをＮＰ調製物に１０μｇ／ｍＬで加えた。連続的な遠心分離（洗浄）の繰り返しの後、上清層を濃縮し、そして最終的な、４倍濃縮ＮＰ－ＧＡＬＣ溶液と一緒に、ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル電気泳動によって分析した。加えたほとんど全てのＧＡＬＣがＮＰに結合した；それは、ＮＰ－ＧＡＬＣ活性測定に基づく推定ＧＡＬＣ量、２０～４０μｇ／ｍＬとよく相関する。

【００３８】

血液中におけるＧＡＬＣの寿命を決定するために、薬物動態学的研究を行った。ＧＡＬＣの血漿半減期（$t_{1/2}$）を決定するために、ＧＡＬＣをＣＤ－１マウスに尾静脈内注射によって投与した。ＧＡＬＣのｉ．ｖ．尾静脈注射後０および１８０分の間の時点で、血液を採取した。結果は、静脈内注射後の血液中のＧＡＬＣの半減期は、約６０分であることを示した（図３）。ＮＰ－ＧＡＬＣおよびＰＥＧ－ＧＡＬＣの半減期は、それぞれ約１０５および３１分であった。これらの方法を、静脈内投与を用いたＧＡＬＣおよびＮＰ－ＧＡＬＣに対する薬物動態学的研究を行うために使用し得る。図４で実証するように、脳ＧＡＬＣ活性を、ＧＡＬＣまたはＮＰ－ＧＡＬＣのｉ．ｖ．またはｉ．ｐ．注射による投薬後に測定した。

【００３９】

実施例４－ＴＩＭＰ－１ナノ粒子

ナノ粒子結合後のポリペプチドの酵素活性を試験するために、ポリペプチド阻害剤ＴＩＭＰ－１を、ポリマーナノ粒子の表面に結合させた。ナノ粒子の構築のために、ＴＩＭＰ－１を、ナノ粒子表面の利用可能な部位の１／２に機能付与するために適当な濃度で、ナノ粒子調製物に加えた。ＴＩＭＰ－１を、ＮＨＳ－誘導バイオコンジュゲーション化学反応を用いて、ナノ粒子のカルボン酸部分に共有結合させた（そのアミン基を介して）（図５）。ナノ粒子結合後のＴＩＭＰ－１濃度を、ＴＩＭＰ－１に対する比色定量のサンドイッチＥＬＩＳＡアッセイを用いて検出した。図６Ａにおいて実証するように、ＮＰ－ＴＩＭＰ１精製の過程で測定したＴＩＭＰ－１の濃度に基づいて、結合効率は日常的に＞７５％であった。ＴＩＭＰ－１は、その天然タンパク質基質であるＭＭＰ－９の阻害によって証明されるように、ナノ粒子への結合後にその阻害活性を保持していることが観察された。さらに、ＮＰ－ＴＩＭＰ－１結合物は、用量依存的な様式でＭＭＰ－９を阻害した（図６Ｂ）。ナノ粒子単独は、ＭＭＰ－９阻害活性を示さなかった。

【００４０】

実施例５－ＴＩＭＰ－１、スルファミダーゼおよびアリールスルファターゼＡのナノ粒子結合

ナノ粒子結合後のポリペプチドの酵素活性を試験するために、以下のポリペプチドをポリマーナノ粒子の表面に結合した：ＴＩＭＰ－１、スルファミダーゼ（ＳＧＳＨ）、およびアリールスルファターゼＡ（ＡＲＳＡ）。ＴＩＭＰ－１を、ＣＯＯＨ－官能化ナノ粒子またはNH_2－官能化ナノ粒子のいずれかに共有結合させた。スルファミダーゼを、ナノ粒子表面のＣＯＯＨ－部分に共有結合した。アリールスルファターゼＡを、ナノ粒子表面のＣＯＯＨ－基を介して共有結合させた。タンパク質構造、立体障害、およびタンパク質動態の違いのために、異なるタンパク質は、独特の率で、そして様々な濃度でナノ粒子に結合する。よって、各タンパク質の結合条件を、標準的なナノ粒子調製手順を用いて、経験的に決定した。各結合に関して、バッチナノ粒子自己集合のために２０ミリグラム（ｍｇ）の全ポリマーを使用した：約１５ｍｇ（７５％）が利用可能な官能基（ＣＯＯＨ－およびNH_2）を有し、そして約５ｍｇが非反応性の末端（例えばＭｅＯ－）を有していた。ナノ粒子は、１０ｍＬの最終水容積の水または緩衝化溶液中で自己集合した。各結合物の調製条件を、表１にまとめる。表１および２は、結合後に酵素活性の著しい喪失無しにナノ粒子を得るために、異なるタンパク質濃度が必要であったことを示す。ＧＡＬＣは最も高い濃度でナノ粒子表面に結合し、一方ＴＩＭＰ－１はより低い濃度でナノ粒子表面に結合した。

【００４１】
表１．酵素活性の喪失無しに＞８０％のポリペプチド回収率を達成するためのポリペプチド結合プロトコール
【００４２】
【表１】

タンパク質	濃度	結合化学物質	調製の備考
GALC	1 mg	COOH-	2時間未満で完全な結合
ARSA	600 μg	COOH-	4℃、48時間で結合
SGSH	500 μg	COOH-	4℃、48時間で結合
TIMP-1	100 μg	COOH-	2時間未満で完全な結合
	20 μg	NH_2-	15分未満で完全な結合

表２．酵素活性の喪失無しにナノ粒子を産生するタンパク質濃度
タンパク質　結合後の活性
【００４３】
【表２】

タンパク質	結合後の活性
GALC (1 mg)	100%
ARSA (600 μg)	100%
SGSH (500 μg)	100%
TIMP-1 (100 μg; COOH-)	100%
(20 μg; NH_2-)	100%

実施例６－ナノ粒子結合物に対する免疫反応
ナノ粒子結合物の免疫原性を試験するために、マウス（ｎ＝８）にＧＡＬＣまたはＮＰ－ＧＡＬＣを投与した。ＣＤ－１マウスに、尾静脈ｉ．ｖ．投与を用いて、１０ｍｇ／ｋｇのＧＡＬＣまたはＮＰ－ＧＡＬＣを週１回投与した。ＧＡＬＣ単独およびＮＰ－ＧＡＬＣ結合物による６週間の投薬レジメの前および後に、抗体反応の存在をアッセイした。ＥＬＩＳＡに基づくアッセイを用いて、血漿中の抗体力価を測定した。図７に示すように、酵素単独およびＮＰ酵素処置動物の間に、免疫原性の有意差は認められなかった。これらのデータは、ナノ粒子－酵素結合物が、単独で投与した酵素より有意に高い程度にまで免疫原性を引き起こさないことを示唆する。
【００４４】
実施例７－ナノ粒子結合物の安定性分析
保存したナノ粒子－酵素結合物の安定性を試験するために、安定性分析を行った。ＮＰ－ＧＡＬＣを、上記で記載したように得た。ＮＰ－ＧＡＬＣおよびＧＡＬＣを凍結乾燥（ｌｙｏｐｈｉｌｉｚｅｄ）（凍結乾燥（ｆｒｅｅｚｅ－ｄｒｉｅｄ））し、そして凍結乾燥物として４℃で乾燥保存した。ＮＰ－ＧＡＬＣおよびＧＡＬＣ単独の酵素活性を、酵素処方物を調製した後６カ月まで定期的に試験した。図８に示すように、ＧＡＬＣ活性は、６０日および１２０日の間のどこかで検出不能になり、一方ＮＰ－ＧＡＬＣ活性は、研究の期間１００％の活性を維持した。これらのデータは、ナノ粒子－酵素結合物が、凍結乾燥した酵素単独よりも、これらの保存条件下でより安定であることを示唆する。
【００４５】
他の実施態様

本発明を、その詳細な説明とともに記載したが、上述の記載は、例証することを意図し、そして添付の特許請求の範囲によって定義される、本発明の範囲を制限しないことが理解される。他の局面、利点、および改変が、以下の特許請求の範囲内である。本発明は以下をも提供する。

（１）ポリマーナノ粒子に結合した、酵素活性を有するポリペプチドを含む組成物であって、該ナノ粒子に結合した該ポリペプチドは、該酵素活性を有し、そしてナノ粒子に結合していないコントロールポリペプチドよりも、ヒト血清においてより長い半減期を有する、組成物。

（２）前記ナノ粒子に結合した前記ポリペプチドは、ナノ粒子に結合していない前記コントロールポリペプチドの、少なくとも８５％のレベルの前記酵素活性を有する、項目１に記載の組成物。

（３）前記ナノ粒子に結合した前記ポリペプチドは、ナノ粒子に結合していない前記コントロールポリペプチドの、少なくとも９５％のレベルの前記酵素活性を有する、項目１に記載の組成物。

（４）前記ナノ粒子に結合した前記ポリペプチドは、ナノ粒子に結合していない前記コントロールポリペプチドと同じレベルの前記酵素活性を有する、項目１に記載の組成物。

（５）前記ポリペプチドは、ガラクトセレブロシダーゼポリペプチドである、項目１に記載の組成物。

（６）前記ポリマーナノ粒子は、ＣＯＯＨ－ＰＥＧ－ＰＬＡ、メトキシ－ＰＥＧ－ＰＬＡポリマー、マレイミド－ＰＥＧ－ＰＬＡポリマー、またはその任意の組み合わせから構築される、項目１に記載の組成物。

（７）前記ポリペプチドは、共有結合によって前記ポリマーナノ粒子に結合される、項目１に記載の組成物。

（８）前記ポリペプチドは、非共有結合によって前記ポリマーナノ粒子に結合される、項目１に記載の組成物。

（９）凍結乾燥された組成物である、項目１に記載の組成物。

（１０）前記ポリペプチドは、前記ポリペプチドのＮまたはＣ末端を介して、前記ナノ粒子に結合される、項目１に記載の組成物。

（１１）血清において酵素活性を有するポリペプチドの半減期を増加させるための方法であって、該方法は、該ポリペプチドをポリマーナノ粒子に結合させて複合体を形成する工程を含み、ここで、該結合されたポリペプチドは、該酵素活性を有し、そしてナノ粒子に結合していないコントロールポリペプチドよりも、血清においてより長い半減期を有する、方法。

（１２）前記ナノ粒子に結合した前記ポリペプチドは、ナノ粒子に結合していない前記コントロールポリペプチドの、少なくとも８５％のレベルの前記酵素活性を有する、項目１１に記載の方法。

（１３）前記ナノ粒子に結合した前記ポリペプチドは、ナノ粒子に結合していない前記コントロールポリペプチドの、少なくとも９５％のレベルの前記酵素活性を有する、項目１１に記載の方法。

（１４）前記ナノ粒子に結合した前記ポリペプチドは、ナノ粒子に結合していない前記コントロー
ルポリペプチドと同じレベルの前記酵素活性を有する、項目１１に記載の方法。

（１５）前記ポリペプチドは、ガラクトセレブロシダーゼポリペプチドである、項目１１に記載の方法。

（１６）前記ポリマーナノ粒子は、ＣＯＯＨ－ＰＥＧ－ＰＬＡ、メトキシ－ＰＥＧ－ＰＬＡポリマー、マレイミド－ＰＥＧ－ＰＬＡポリマー、またはその任意の組み合わせから構築される、項目１１に記載の方法。

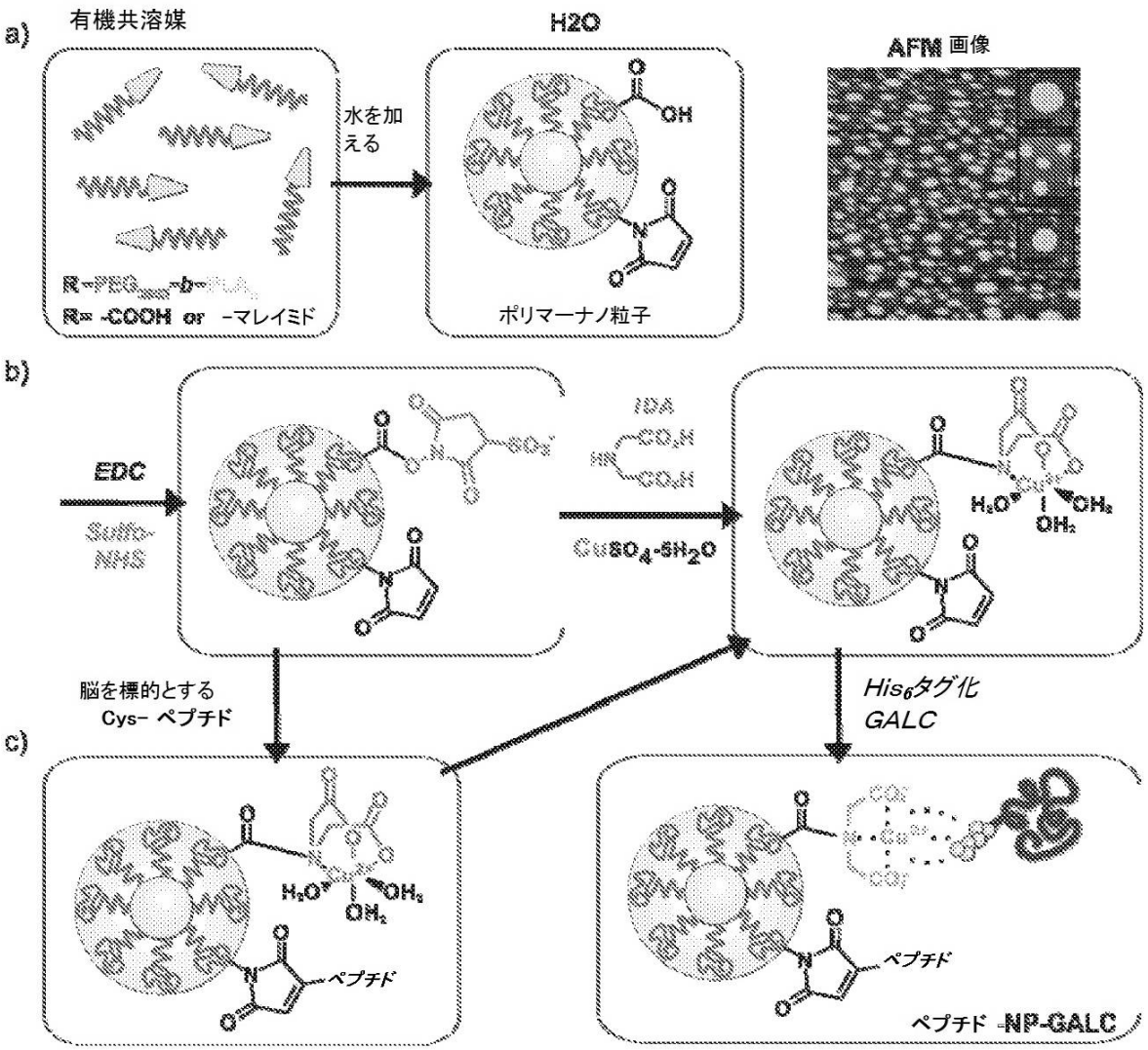
（１７）前記ポリペプチドは、共有結合によって前記ポリマーナノ粒子に結合される、項目１１に記載の方法。

（１８）前記ポリペプチドは、非共有結合によって前記ポリマーナノ粒子に結合される、

項目１１に記載の方法。
（１９）前記複合体を凍結乾燥させて、凍結乾燥された複合体を形成する工程を含む、項目１１に記載の方法。
（２０）前記ポリペプチドは、前記ポリペプチドのＮまたはＣ末端を介して、前記ナノ粒子に結合される、項目１１に記載の方法。
（２１）酵素活性を有するポリペプチドの安定性を増加させるための方法であって、該方法は、該ポリペプチドをポリマーナノ粒子に結合させて複合体を形成する工程を含み、ここで該結合されたポリペプチドは、該酵素活性を有し、そしてナノ粒子に結合していないコントロールポリペプチドよりも高い安定性を有する、方法。
（２２）前記ナノ粒子に結合した前記ポリペプチドは、ナノ粒子に結合していない前記コントロールポリペプチドの、少なくとも８５％のレベルの前記酵素活性を有する、項目２１に記載の方法。
（２３）前記ナノ粒子に結合した前記ポリペプチドは、ナノ粒子に結合していない前記コントロールポリペプチドの、少なくとも９５％のレベルの前記酵素活性を有する、項目２１に記載の方法。
（２４）前記ナノ粒子に結合した前記ポリペプチドは、ナノ粒子に結合していない前記コントロールポリペプチドと同じレベルの前記酵素活性を有する、項目２１に記載の方法。
（２５）前記ポリペプチドは、ガラクトセレブロシダーゼポリペプチドである、項目２１に記載の方法。
（２６）前記ポリマーナノ粒子は、ＣＯＯＨ－ＰＥＧ－ＰＬＡ、メトキシ－ＰＥＧ－ＰＬＡポリマー、マレイミド－ＰＥＧ－ＰＬＡポリマー、またはその任意の組み合わせから構築される、項目２１に記載の方法。
（２７）前記ポリペプチドは、共有結合によって前記ポリマーナノ粒子に結合される、項目２１に記載の方法。
（２８）前記ポリペプチドは、非共有結合によって前記ポリマーナノ粒子に結合される、項目２１に記載の方法。
（２９）前記複合体を凍結乾燥させて、凍結乾燥された複合体を形成する工程をさらに含む、項目２１に記載の方法。
（３０）前記ポリペプチドは、前記ポリペプチドのＮまたはＣ末端を介して、前記ナノ粒子に結合される、項目２１に記載の方法。
（３１）ナノ粒子の凝集を抑制する方法であって、該方法は、ポリペプチドのＮまたはＣ末端を介して、該ポリペプチドをポリマーナノ粒子に結合させて複合体を形成する工程を含み、ここで該複合体の調製物は、該ポリペプチドのＮまたはＣ末端を介して該ポリペプチドに結合していないポリマーナノ粒子を有するコントロール調製物よりも低いナノ粒子の凝集を示す、方法。
（３２）前記ポリペプチドは、ガラクトセレブロシダーゼポリペプチドである、項目３１に記載の方法。
（３３）前記ポリマーナノ粒子は、ＣＯＯＨ－ＰＥＧ－ＰＬＡ、メトキシ－ＰＥＧ－ＰＬＡポリマー、マレイミド－ＰＥＧ－ＰＬＡポリマー、またはその任意の組み合わせから構築される、項目３１に記載の方法。
（３４）前記ポリペプチドは、共有結合によって前記ポリマーナノ粒子に結合される、項目３１に記載の方法。
（３５）前記ポリペプチドは、非共有結合によって前記ポリマーナノ粒子に結合される、項目３１に記載の方法。
（３６）前記複合体を凍結乾燥させて、凍結乾燥された複合体を形成する工程をさらに含む、項目３１に記載の方法。

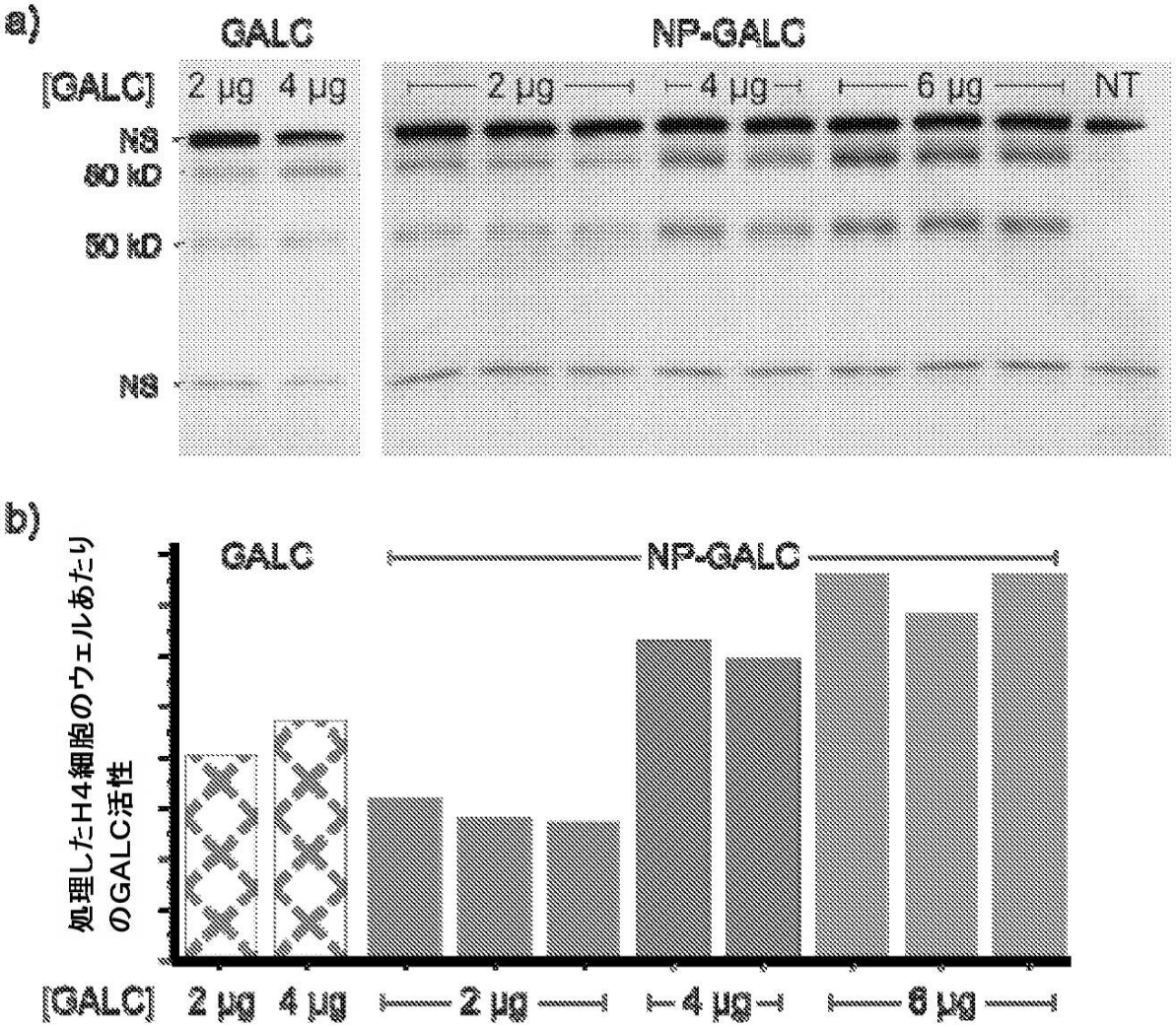
【図１】

FIGURE 1


a)
有機共溶媒
H2O
AFM 画像
水を加える
R=PEG-b-
R= -COOH or -マレイミド
ポリマーナノ粒子
b)
EDC
Sulfo-NHS
IDA
CuSO4-5H2O
c)
脳を標的とする
Cys- ペプチド
His6タグ化
GALC
ペプチド
ペプチド -NP-GALC

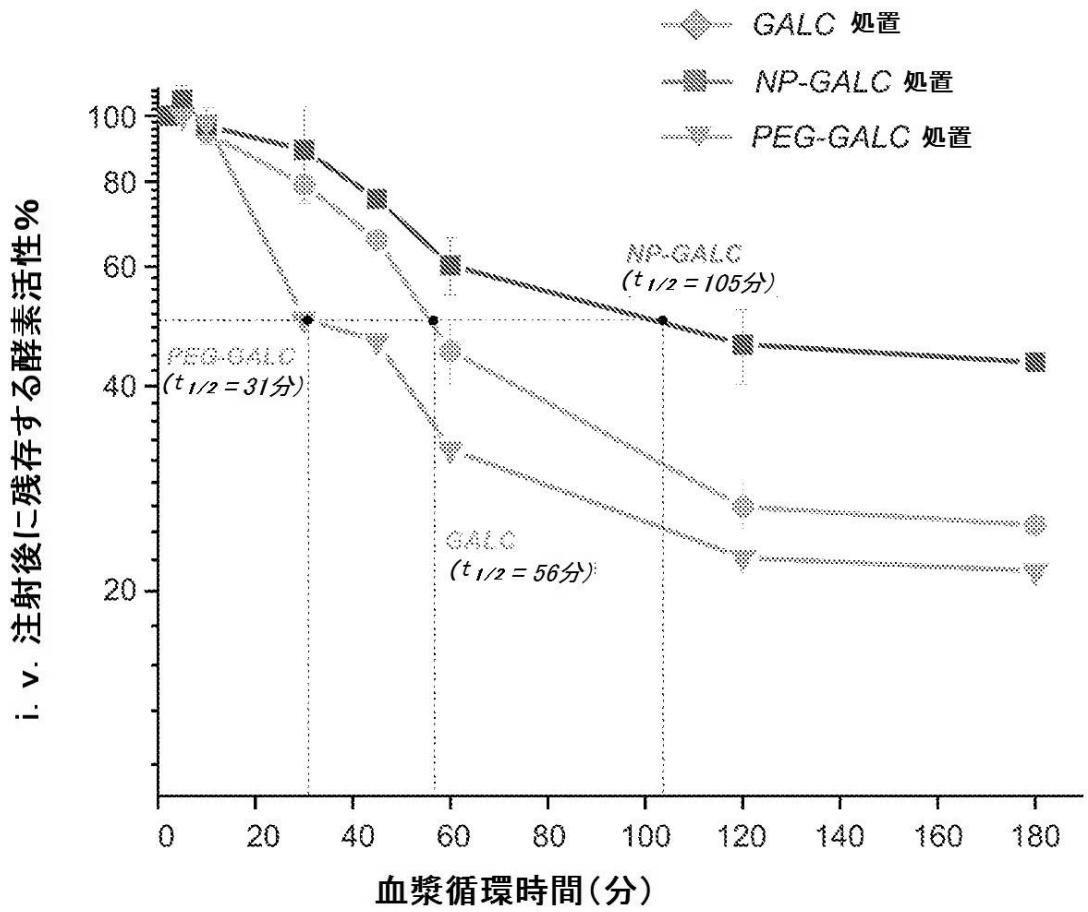
【図２】

FIGURE 2


a)
GALC
NP-GALC
[GALC]
2 µg
4 µg
2 µg
4 µg
6 µg
NT
NS
80 kD
50 kD
NS
b)
GALC
NP-GALC
処理したH4細胞のウェルあたりのGALC活性
[GALC]
2 µg
4 µg
2 µg
4 µg
6 µg

【図３】

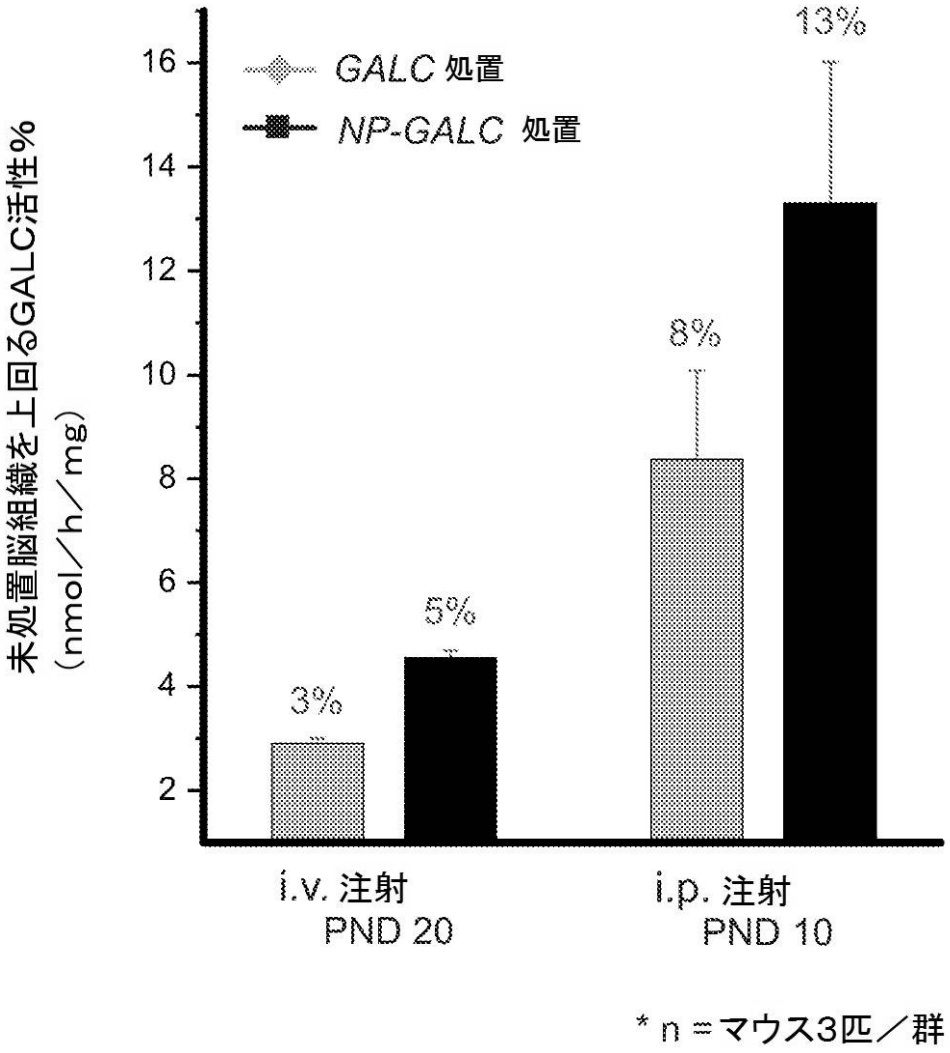
FIGURE 3



＊n＝マウス4匹／群

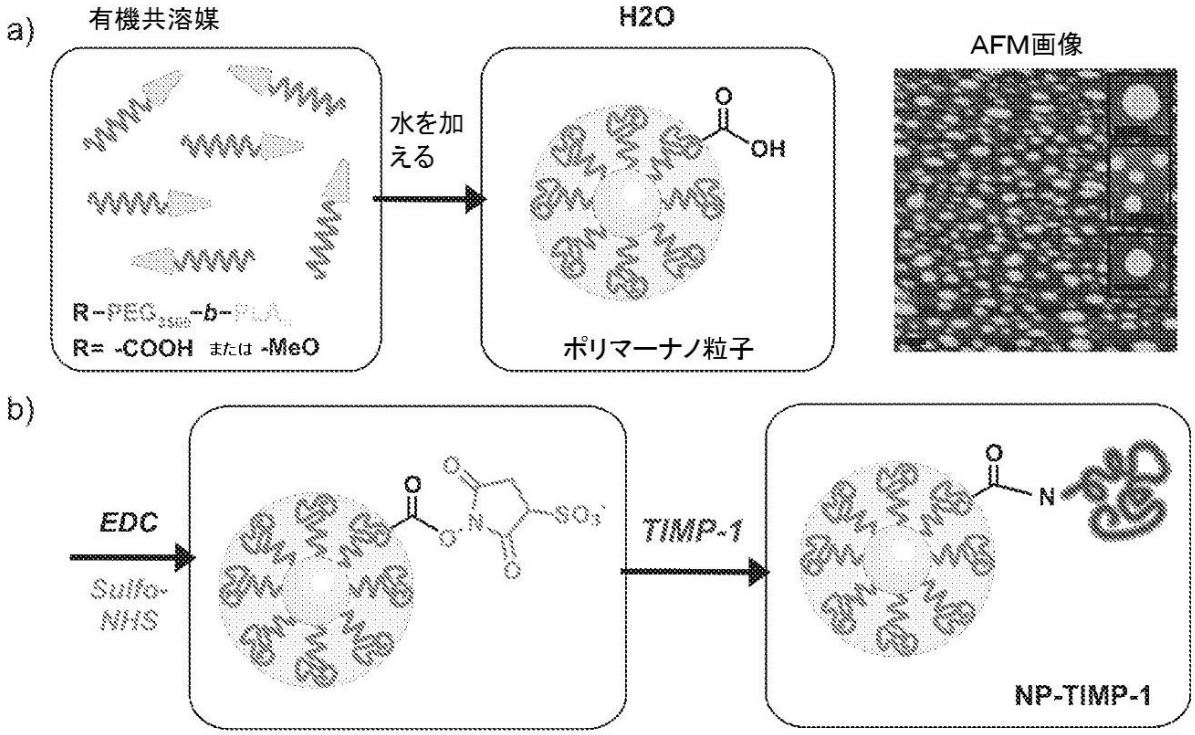
【図４】

FIGURE 4


未処置脳組織を上回るGALC活性%
（nmol／h／mg）
16
14
12
10
8
6
4
2
GALC 処置
NP-GALC 処置
3%
5%
8%
13%
i.v. 注射
PND 20
i.p. 注射
PND 10
* n＝マウス3匹／群

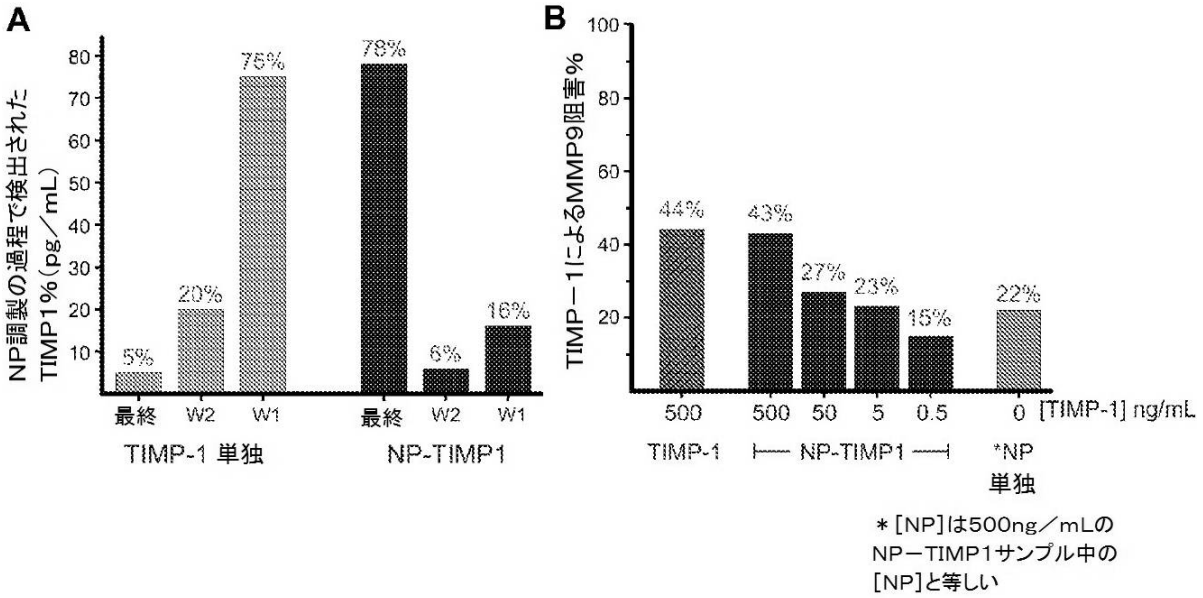
【図５】

FIGURE 5



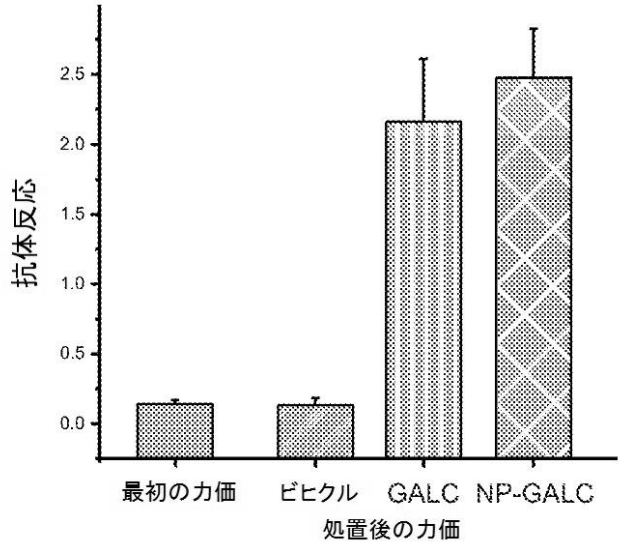
【図６】

FIGURE 6



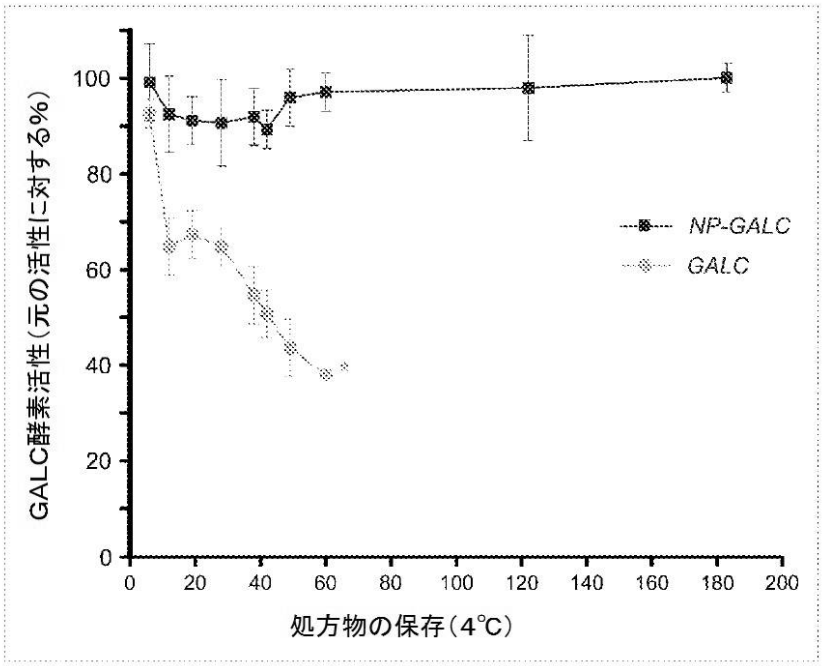
【図７】

FIGURE 7



【図８】

FIGURE 8



フロントページの続き

(74)代理人 230113332
弁護士 山本 健策
(72)発明者 エクマン, クリストファー ビー.
アメリカ合衆国 フロリダ ３２２４６, ジャクソンビル, パルメット グレイド ドライブ １３００４
(72)発明者 ハート, エイミー アール.
アメリカ合衆国 フロリダ ３２２５０, ジャクソンビル ビーチ, ヘーロン ドライブ エヌ. ３３７１

審査官 平井 裕彰

(56)参考文献 特表平０９－５０４０４２（ＪＰ，Ａ）
特表２００９－５０１２３７（ＪＰ，Ａ）
特表２００２－５２６３８３（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２００７／０９１１５９（WO，Ａ１）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ ９／００～ ９／７２
４７／００～４７／４８
３８／００～３８／５８