

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-527554

(P2017-527554A)

(43) 公表日 平成29年9月21日(2017.9.21)

| (51) Int. Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|--------------------------------|---------------|-----------------|
| A 6 1 K 47/64 (2017.01) | A 6 1 K 47/64 | 4 B 0 6 3 |
| A 6 1 K 9/51 (2006.01) | A 6 1 K 9/51 | 4 C 0 7 6 |
| A 6 1 K 9/16 (2006.01) | A 6 1 K 9/16 | 4 C 0 8 4 |
| A 6 1 K 47/22 (2006.01) | A 6 1 K 47/22 | 4 C 0 8 6 |
| A 6 1 K 47/56 (2017.01) | A 6 1 K 47/56 | 4 H 0 4 5 |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 | | (全 74 頁) 最終頁に続く |

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|---------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2017-509735 (P2017-509735) | (71) 出願人 | 500041019 |
| (86) (22) 出願日 | 平成27年8月19日 (2015. 8. 19) | | ノースウェスタン ユニバーシティ |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成29年3月22日 (2017. 3. 22) | | アメリカ合衆国 イリノイ 60208, |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2015/045971 | | エヴァンストン, クラーク ストリー |
| (87) 国際公開番号 | W02016/028940 | | ト 633 |
| (87) 国際公開日 | 平成28年2月25日 (2016. 2. 25) | (74) 代理人 | 100078282 |
| (31) 優先権主張番号 | 62/137, 183 | | 弁理士 山本 秀策 |
| (32) 優先日 | 平成27年3月23日 (2015. 3. 23) | (74) 代理人 | 100113413 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | 弁理士 森下 夏樹 |
| (31) 優先権主張番号 | 62/039, 608 | (74) 代理人 | 100181674 |
| (32) 優先日 | 平成26年8月20日 (2014. 8. 20) | | 弁理士 飯田 貴敏 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | (74) 代理人 | 100181641 |
| (31) 優先権主張番号 | 62/039, 340 | | 弁理士 石川 大輔 |
| (32) 優先日 | 平成26年8月19日 (2014. 8. 19) | (74) 代理人 | 230113332 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | 弁護士 山本 健策 |
| 最終頁に続く | | | |

(54) 【発明の名称】 タンパク質／オリゴヌクレオチドコアシェルナノ粒子治療薬

(57) 【要約】

本開示は、コアシェルナノ粒子、コアシェルナノ粒子を含む組成物、及びそれらの使用方法を対象とする。本発明は、コアシェルナノ粒子であって、前記コアが、単一タンパク質を含み、前記シェルが、複数のポリヌクレオチドを含み、前記ポリヌクレオチドが、前記タンパク質表面に共有結合を介して結合している、コアシェルナノ粒子を提供する。前記タンパク質は、触媒活性、シグナル伝達活性、治療活性、または輸送活性を呈する。前記複数のポリヌクレオチドの各々が同じである、請求項1または請求項2に記載のコアシェルナノ粒子。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

コアシェルナノ粒子であって、前記コアが、単一タンパク質を含み、前記シェルが、複数のポリヌクレオチドを含み、前記ポリヌクレオチドが、前記タンパク質表面に共有結合を介して結合している、コアシェルナノ粒子。

【請求項 2】

前記タンパク質が、触媒活性、シグナル伝達活性、治療活性、または輸送活性を呈する、請求項 1 に記載のコアシェルナノ粒子。

【請求項 3】

前記複数のポリヌクレオチドの各々が同じである、請求項 1 または請求項 2 に記載のコアシェルナノ粒子。

10

【請求項 4】

前記複数のポリヌクレオチドのうちの少なくとも 2 つが異なっている、請求項 1 または請求項 2 に記載のコアシェルナノ粒子。

【請求項 5】

前記タンパク質表面上のポリヌクレオチドの密度が、約 $2 \text{ pmol} / \text{cm}^2$ ~ 約 $200 \text{ pmol} / \text{cm}^2$ である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のコアシェルナノ粒子。

【請求項 6】

前記タンパク質表面上のポリヌクレオチドの密度が、約 $10 \text{ pmol} / \text{cm}^2$ ~ 約 $100 \text{ pmol} / \text{cm}^2$ である、請求項 5 に記載のコアシェルナノ粒子。

20

【請求項 7】

前記タンパク質表面上のポリヌクレオチドの密度が、約 $100 \text{ pmol} / \text{cm}^2$ である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のコアシェルナノ粒子。

【請求項 8】

前記複数のポリヌクレオチドのうちの少なくとも 1 つに共有結合または非共有結合している追加の薬剤を更に含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のコアシェルナノ粒子。

【請求項 9】

前記追加の薬剤が、ポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、リン脂質、オリゴ糖、金属複合体、小分子、治療薬、造影剤、またはこれらの組み合わせである、請求項 8 に記載のコアシェルナノ粒子。

30

【請求項 10】

前記追加の薬剤が、前記複数のポリヌクレオチドのうちの少なくとも 1 つにハイブリッド形成によって非共有結合している、請求項 8 または 9 に記載のコアシェルナノ粒子。

【請求項 11】

前記追加の薬剤が、前記複数のポリヌクレオチドのうちの少なくとも 1 つと共有結合している、請求項 8 または 9 に記載のコアシェルナノ粒子。

【請求項 12】

前記シェルの少なくとも 1 つのポリヌクレオチドが、前記タンパク質表面に前記タンパク質の表面アミノ基を介して結合している、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載のコアシェルナノ粒子。

40

【請求項 13】

前記表面アミノ基が、Lys 残基に由来する、請求項 12 に記載のコアシェルナノ粒子。

【請求項 14】

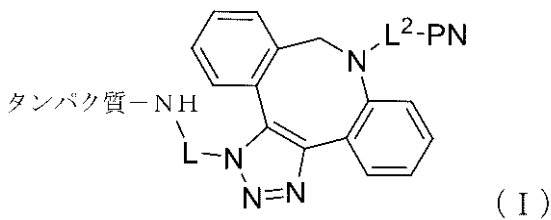
前記少なくとも 1 つのポリヌクレオチドが、(a) 前記表面アミノ基に結合しているアジド部分と、(b) 前記少なくとも 1 つのポリヌクレオチド上のアルキン官能基との反応から形成されるトリアゾール結合を介して結合している、請求項 12 または 13 に記載のコアシェルナノ粒子。

【請求項 15】

前記少なくとも 1 つのポリヌクレオチドが、前記タンパク質表面に結合し、式 (I)、

50

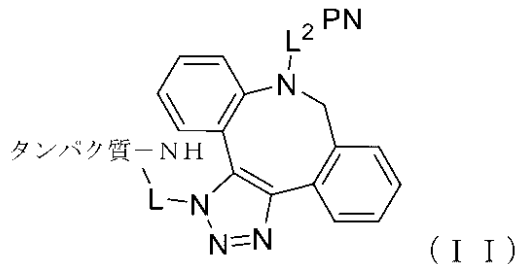
(I I)、またはその両方に示される結合を介してであり、
【化 9】



、及び

10

【化 10】



、L 及び L^2 が、各々独立して、 C_{1-10} アルキレン、 $-C(O)-C_{1-10}$ アルキレン-Y-、及び $-C(O)-C_{1-10}$ アルキレン-Y- C_{1-10} アルキレン-(CH_2CH_2)_m-Y- から選択され、

各 Y が、独立して、結合、C(O)、O、NH、C(O)NH、及び NHC(O) から成る群から選択され、

m が、0、1、2、3、4、または 5 であり、

PN が、前記少なくとも 1 つのポリヌクレオチドである、請求項 14 に記載のコアシェルナノ粒子。

【請求項 16】

前記シェルの少なくとも 1 つのポリヌクレオチドが、前記タンパク質表面に前記タンパク質の表面カルボキシル基を介して結合している、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載のコアシェルナノ粒子。

30

【請求項 17】

前記シェルの少なくとも 1 つのポリヌクレオチドが、前記タンパク質表面に前記タンパク質の表面チオール基を介して結合している、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載のコアシェルナノ粒子。

【請求項 18】

前記シェルの少なくとも 1 つのポリヌクレオチドが、標的ポリヌクレオチドに対して、前記標的ポリヌクレオチドとハイブリッド形成しその発現を阻害するのに十分に相補的である、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載のコアシェルナノ粒子。

【請求項 19】

前記追加の薬剤が、標的ポリヌクレオチドに対して、前記標的ポリヌクレオチドとハイブリッド形成しその発現を阻害するのに十分に相補的であるポリヌクレオチドである、請求項 8 ~ 17 のいずれか一項に記載のコアシェルナノ粒子。

40

【請求項 20】

請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載のコアシェルナノ粒子を複数含む、組成物。

【請求項 21】

前記複数のコアシェルナノ粒子が、結晶構造を形成する、請求項 20 に記載の組成物。

【請求項 22】

各コアシェルナノ粒子が、同じタンパク質を含む、請求項 20 または請求項 21 に記載の組成物。

50

【請求項 23】

少なくとも2つのコアシェルナノ粒子が、異なるタンパク質を含む、請求項20または請求項21に記載の組成物。

【請求項 24】

金属ナノ粒子を更に含む、請求項20～23のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 25】

前記金属ナノ粒子が、金、銀、白金、アルミニウム、パラジウム、銅、コバルト、インジウム、ニッケル、またはこれらの混合物を含む、請求項24に記載の組成物。

【請求項 26】

第1のコアシェルナノ粒子の複数のポリヌクレオチドが、第2のコアシェルナノ粒子の複数のポリヌクレオチドのポリヌクレオチド配列に対して、ハイブリッド形成して超格子構造を形成するのに十分に相補的である、ポリヌクレオチド配列を有する、請求項20～25のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 27】

反応を触媒する方法であって、反应用の1つ以上の試薬を請求項20～26のいずれか一項に記載の組成物と接触させることを含み、前記試薬と前記組成物との間の接触が、触媒されて前記反応の産物を形成する前記反応に繋がる、方法。

【請求項 28】

標的分子を検出する方法であって、前記標的分子を、請求項1～19のいずれか一項に記載のコアシェルナノ粒子または請求項20～26のいずれか一項に記載の組成物と接触させることを含み、前記標的分子と前記コアシェルナノ粒子または前記組成物との間の接触が、検出可能な変化に繋がる、方法。

20

【請求項 29】

前記検出がインピトロである、請求項28に記載の方法。

【請求項 30】

前記検出がインピボである、請求項28に記載の方法。

【請求項 31】

標的ポリヌクレオチドによってコードされる遺伝子産物の発現を阻害する方法であって、前記標的ポリヌクレオチドを、請求項1～19のいずれか一項に記載のコアシェルナノ粒子または請求項20～26のいずれか一項に記載の組成物と、前記遺伝子産物の発現を阻害するのに十分な条件下で接触させることを含み、方法。

30

【請求項 32】

前記遺伝子産物の発現がインピボで阻害される、請求項31に記載の方法。

【請求項 33】

前記遺伝子産物の発現がインピトロで阻害される、請求項31に記載の方法。

【請求項 34】

前記遺伝子産物の発現が少なくとも約5%阻害される、請求項31～33のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

治療用タンパク質を細胞に送達する方法であって、請求項1～19のいずれか一項に記載のコアシェルナノ粒子または請求項20～26のいずれか一項に記載の組成物を前記細胞に投与することを含み、

40

前記コアシェルナノ粒子の前記タンパク質が、前記治療用タンパク質である、方法。

【請求項 36】

インピトロである、請求項35に記載の方法。

【請求項 37】

インピボである、請求項35に記載の方法。

【請求項 38】

前記細胞が対象中にある、請求項35または請求項37に記載の方法。

【請求項 39】

50

前記対象が、前記治療用タンパク質を必要としている、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

前記方法が、前記治療用タンパク質のみの投与と比較して、前記対象において減少した免疫原性応答を提供する、請求項 38 または請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

前記方法が、前記治療用タンパク質のみの投与と比較して、増加した前記治療用タンパク質の細胞取り込みを提供する、請求項 35 ~ 40 のいずれか一項に記載の方法。

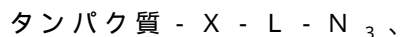
【請求項 42】

請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載のコアシェルナノ粒子を調製する方法であって、前記タンパク質を、複数のポリヌクレオチドと、前記複数のポリヌクレオチドを前記タンパク質の前記表面に共有結合させるのに十分な条件下で接触させることを含む、方法。

10

【請求項 43】

前記タンパク質が、以下の構造を有し



X が、前記タンパク質上の表面アミノ基、カルボン酸基、またはチオール基に由来し、L が、 C_{1-10} アルキレン、 $-Y-C(O)-C_{1-10}$ アルキレン-Y-、及び $-Y-C(O)-C_{1-10}$ アルキレン-Y- C_{1-10} アルキレン- $(OCH_2CH_2)_m-Y-$ から選択され、

各 Y が、独立して、結合、 $C(O)$ 、O、NH、 $C(O)NH$ 、及び $NHC(O)$ から成る群から選択され、

20

m が、0、1、2、3、4、または 5 である、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

少なくとも 1 つのポリヌクレオチドが、以下の構造を有し、



L^2 が、 C_{1-10} アルキレン、 $-C(O)-C_{1-10}$ アルキレン-Y-、及び $-C(O)-C_{1-10}$ アルキレン-Y- C_{1-10} アルキレン- $(OCH_2CH_2)_m-Y-$ から選択され、

各 Y が、独立して、結合、 $C(O)$ 、O、NH、 $C(O)NH$ 、及び $NHC(O)$ から成る群から選択され、

30

m が、0、1、2、3、4、または 5 であり、

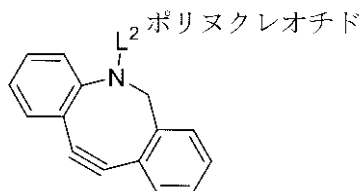
X が、結合であり、R が、H または C_{1-10} アルキルであり、

あるいは、X 及び R が、それらが結合する炭素と一緒に、8 ~ 10 員の炭素環式基または 8 ~ 10 員の複素環式基を形成する、請求項 42 または 43 に記載の方法。

【請求項 45】

前記少なくとも 1 つのポリヌクレオチドが、以下の構造を有する、請求項 44 に記載の方法。

【化 11】



40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2014年8月19日に提出された米国仮出願第 62 / 039, 340号、2014年8月20日に提出された米国仮出願第 62 / 039, 608号、及び 2015

50

年3月23日に出願された米国仮出願第62/137,183号の、35 U.S.C. § 119(e)のよりの優先権を主張し、これらの開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

政府支援に関する記述

本発明は、空軍科学研究所より与えられた助成金番号FA9550-12-1-0280及びFA9550-11-1-0275及び国防総省国防高等研究事業局より与えられた助成金番号HR0011-13-2-0018のもと、政府の支援を受けて行われた。政府は、本発明においてある特定の権利を有する。

電子提出資料の参照による組み込み

10

【0003】

本出願は、本開示の別の部分としてコンピュータ可読形態の配列リストを含み、その全体は参照により本明細書に組み込まれ、ファイル名：2014-104R__Seqlisting.txt、3、308バイト、作成日2015年8月19日として識別される。

【背景技術】

【0004】

タンパク質は、急成長している治療薬のクラスの代表であり、薬物送達、薬物標的化、癌治療、及び酵素補充療法における用途の可能性を持っている。しかしながら、不良な細胞取り込み、先天的な免疫応答の活性化、不良な生体利用性、細胞プロテアーゼによる分解、または保管が長期に及ぶ際の凝集及び不活性化などの問題により、タンパク質の治療的可能性は現在制限されている。

20

【0005】

剛性の構成単位を活用し、「原子価」が明確に定義された実体を創出するように配向オリゴヌクレオチドで機能化した、DNA媒介性組織化戦略[Mirkin et al., Nature 382(6592):607-609(1996)、Seeman, Mol Biotechnol 37(3):246-257(2007)]が、結晶質形成のプログラミングのための強力な新しい方法として出現した[Park et al., Nature 451(7178):553-556(2008)、Nykypanchuk et al., Nature 451(7178):549-552(2008)]。かかる方法を用いると、明確に定義された格子パラメータ[Hill et al., Nano Lett 8(8):2341-2344(2008)、Macfarlane et al., Angew Chem Int Ed Engl 49(27):4589-4592(2010)、Macfarlane et al., Science 334(6053):204-208(2011)、Xiong et al., Phys Rev Lett 102(1):015504(2009)、Auyeung et al., Nat Nanotechnol 7(1):24-28(2012)、Auyeung et al., Nature 505(7481):73-77(2014)、Zhang et al., Nat Mater 12(8):741-746(2013)]、対称性[Park et al., Nature 451(7178):553-556(2008)、Macfarlane et al., Science 334(6053):204-208(2011)、Auyeung et al., Nat Nanotechnol 7(1):24-28(2012)、Zhang et al., Nat Mater 12(8):741-746(2013)]、及び組成物[Auyeung et al., Nat Nanotechnol 7(1):24-28(2012)、Zhang et al., Nat Mater 12(8):741-746(2013)、Zhang et al., Nat Nanotechnol 8(11):865-872(2013)]を持つ構造を作製することができるが、これらは、これまで主に硬質の無機ナノ粒子または高度に分枝した純粋な核酸物質の使用[Seeman, Mol Biotechnol 37(3):246-257(2007)、Winfrey et al., Nature 394(6693):53

30

40

50

9 - 544 (1998)、Zheng et al., Nature 461 (7260) : 74 - 77 (2009)]に限定されてきた。対照的に、自然の最も強力かつ多用途であるナノ構造構成単位は、タンパク質であり、生物系におけるプロセスの大部分を可能にするために使用される [Mann, Angew Chem Int Ed 47 (29) : 5306 - 5320 (2008)]。ほとんどの無機ナノ粒子系とは異なり、タンパク質は、純粹かつ完全に単分散の形態で作製することができるため、これらは超分子組織化に対して理想的なシントンとなる。しかしながら、複数のタンパク質、またはタンパク質及び無機ナノ物質で構成される格子を操作する能力は限定的であり、タンパク質構成単位の選択は、構造的制約によって制限される場合が多く、このことは、これらの構造に組み込まれ得る触媒機能性を限定する。現在のところ、タンパク質格子を作製するための主な方法は、天然のタンパク質間相互作用 [Liljestrom et al., Nat Commun 5 : 4445 (2014)]、無機ナノ粒子 (NP) の表面におけるタンパク質とリガンドとの間の相互作用 [Liljestrom et al., Nat Commun 5 : 4445 (2014)]、Kostiaainen et al., Nat Nanotechnol 8 (1) : 52 - 56 (2013)]、金属配位化学 [Brodin et al., Nat Chem 4 (5) : 375 - 382 (2012)]、小分子リガンド - タンパク質間相互作用 [Dotan et al., Angew Chem Int Ed 38 (16) : 2363 - 2366 (1999)]、Ringler et al., Science 302 (5642) : 106 - 109 (2003)]、Sakai et al., Nat Commun 5 : 4634 (2014)]、Oohora et al., Chem Commun 48 (96) : 11714 - 11726 (2012)]、特定の対称性で遺伝子的に融合しているタンパク質複合体 [Padilla et al., Proc Natl Acad Sci USA 98 (5) : 2217 - 2221 (2001)]、Sinclair et al., Nat Nanotechnol 6 (9) : 558 - 562 (2011)]、またはウイルスのDNA媒介性組織化 [Strable et al., Nano Lett 4 (8) : 1385 - 1389 (2004)]、Cigler et al., Nat Mater 9 (11) : 918 - 922 (2010)]の使用に依存している。

10

20

30

40

50

【0006】

DNA指向性の組織化は、結晶質形態ナノスケール前駆体の構築のための強力な方法であることが分かっている。しかしながら、このアプローチの可用性を示す度重なる実証にも関わらず、研究されたこのシステムは、金属ナノ粒子に大きく限定されている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Mirkin et al., Nature 382 (6592) : 607 - 609 (1996)

【非特許文献2】Seeman, Mol Biotechnol 37 (3) : 246 - 257 (2007)

【非特許文献3】Park et al., Nature 451 (7178) : 553 - 556 (2008)

【非特許文献4】Nykypanchuk et al., Nature 451 (7178) : 549 - 552 (2008)

【非特許文献5】Hill et al., Nano Lett 8 (8) : 2341 - 2344 (2008)

【非特許文献6】Macfarlane et al., Angew Chem Int Ed Engl 49 (27) : 4589 - 4592 (2010)

【非特許文献7】Macfarlane et al., Science 334 (6053) : 204 - 208 (2011)

【非特許文献8】Xiong et al., Phys Rev Lett 102 (1

-) : 0 1 5 5 0 4 (2 0 0 9)
- 【非特許文献 9】Auyeung et al., Nat Nanotechnol 7 (1) : 24 - 28 (2012)
- 【非特許文献 10】Auyeung et al., Nature 505 (7481) : 73 - 77 (2014)
- 【非特許文献 11】Zhang et al., Nat Mater 12 (8) : 741 - 746 (2013)
- 【非特許文献 12】Zhang et al., Nat Nanotechnol 8 (11) : 865 - 872 (2013)
- 【非特許文献 13】Seeman, Mol Biotechnol 37 (3) : 246 - 257 (2007) 10
- 【非特許文献 14】Winfrey et al., Nature 394 (6693) : 539 - 544 (1998)
- 【非特許文献 15】Zheng et al., Nature 461 (7260) : 74 - 77 (2009)
- 【非特許文献 16】Mann, Angew Chem Int Ed 47 (29) : 5306 - 5320 (2008)
- 【非特許文献 17】Liljestrom et al., Nat Commun 5 : 4445 (2014)
- 【非特許文献 18】Kostiainen et al., Nat Nanotechnol 8 (1) : 52 - 56 (2013) 20
- 【非特許文献 19】Brodin et al., Nat Chem 4 (5) : 375 - 382 (2012)
- 【非特許文献 20】Dotan et al., Angew Chem Int Ed 38 (16) : 2363 - 2366 (1999)
- 【非特許文献 21】Ringler et al., Science 302 (5642) : 106 - 109 (2003)
- 【非特許文献 22】Sakai et al., Nat Commun 5 : 4634 (2014)
- 【非特許文献 23】Oohora et al., Chem Commun 48 (96) : 11714 - 11726 (2012) 30
- 【非特許文献 24】Padilla et al., Proc Natl Acad Sci USA 98 (5) : 2217 - 2221 (2001)
- 【非特許文献 25】Sinclair et al., Nat Nanotechnol 6 (9) : 558 - 562 (2011)
- 【非特許文献 26】Strable et al., Nano Lett 4 (8) : 1385 - 1389 (2004)
- 【非特許文献 27】Cigler et al., Nat Mater 9 (11) : 918 - 922 (2010)
- 【発明の概要】 40
- 【課題を解決するための手段】
- 【0008】

前述の問題を克服するために、本開示は、タンパク質の表面がオリゴヌクレオチドの高密度なシェルを化学的に機能化し、タンパク質/DNA コアシェルナノ粒子 (NP) を生成するための、産出物及び方法を開示する。タンパク質/DNA コアシェルナノ粒子は、タンパク質コア及びオリゴヌクレオチドの高密度なシェルから成る。これらのハイブリッド高分子を使用して、触媒活性タンパク質から結晶質を構築することができる。加えて、DNA 鋳型タンパク質結晶化の戦略を使用して、X線結晶学によるタンパク質構造決定に好適な結晶を組織化することができる。オリゴヌクレオチドシェルがタンパク質に付与する高密度かつ高度にアニオン性の表面は、機能化されたタンパク質の凝集及びアンフォー

ルドを防止し、細胞プロテアーゼによる分解を制限するバリアも提供することになることが企図される。核酸の高密度なシェルで修飾された他のナノ物質と同様に、本開示が提供する修飾されたタンパク質は、細胞に効率的に進入し、励起する免疫応答が最小限となる。更に、タンパク質-オリゴヌクレオチド抱合体は、酵素の自然の化学機能性及びオリゴヌクレオチドシェルの遺伝子調節能力が各々はっきり異なる治療応答を励起する、二機能性治療薬として働く。

【0009】

複数のナノスケールの構成単位、特に、化学特性及び物理特性が全く異なるもの、例えば、生体分子及び無機ナノ粒子の共同組織化を予測可能に制御する能力は、触媒作用、センシング、及びフォトニクスにおいて広範囲に及ぶ可能性を有するが、これらの粒子間の特定の接触を操作するための汎化可能な戦略は、解決されていない困難である。これは、可能性のある粒子間相互作用の種類が多数であり、多様であり、かつ複雑であるタンパク質の場合に特に当てはまる。本明細書では、界面化学がはっきり異なる2つの核酸機能化タンパク質を組織化して、触媒活性タンパク質、またはタンパク質及びDNAで修飾された金ナノ粒子の組み合わせで構成される6つの固有の格子にするために、タンパク質間相互作用をDNA間相互作用と交換する構想が提供される。この戦略において用いられるDNA間相互作用のプログラム可能な性質により、結果として得られる結晶の格子対称性及び単位セル定数ならびに組成及び晶癖の制御が可能となる。本開示は、機能性結晶質を組織化するためにタンパク質の多様な形態、界面化学、及び機能性を活用する、固有のクラス

10

20

【0010】

したがって、種々の態様において、本開示は、タンパク質間相互作用を相補的なオリゴヌクレオチド間相互作用と交換することによってタンパク質結晶化をもたらすための方法を提供する。適切なオリゴヌクレオチドで機能化された異なるタンパク質を、無機系のために導入される設計ルール [Macfarlane et al., Angew Chem Int Ed Engl 49(27): 4589-4592 (2010), Macfarlane et al., Science 334(6053): 204-208 (2011), Macfarlane et al., Angew Chem Int Ed 52(22): 5688-5698 (2013)] と共に使用することにより、本開示は、DNA機能化酵素ならびに酵素及び無機ナノ粒子の異なる組み合わせを意図的に組織化して、あらかじめ考えられた格子、及び一部の場合には明確に定義された晶癖にすることを示す。重要なことに、酵素は、その表面をDNAで大規模に修飾し、組織化して結晶性超格子にした後に、その自然の構造及び触媒機能性を保持する。本開示は、とりわけ、DNAが、多くの容易にアクセス可能な機能性タンパク質を、その原子組成に関わらず組織化して規則物質にするために使用され得ることを示す。

30

【0011】

タンパク質コア及び高密度なオリゴヌクレオチドシェルで構成される、あるクラスのタンパク質ベースの材料の合成を本明細書に開示する。オリゴヌクレオチドシェルは、酵素コアに安定性を付与するだけでなく、更なるオリゴヌクレオチドが共にハイブリッド形成することができる汎用骨格としても働き、最終的に、タンパク質の結晶質へのDNA指向性の組織化を提供する。タンパク質の超分子構造への組織化をプログラミングするための他のアプローチと比較して、本開示が提供するDNA鑄型戦略は、例えば、限定的ではなく、いずれのタンパク質にも汎化可能であり、タンパク質コアの遺伝子操作を必要とせず、複数の構成要素（例えば、複数のタンパク質、またはタンパク質及び無機ナノ構造の組み合わせ）を持つ格子を組織化して、規定の化学量及び相対配向を持つ物質にすることを可能にする。このアプローチを広範なタンパク質に用いることは、触媒作用及びセンシングにおける用途に繋がり、構造決定に好適なタンパク質の結晶を組織化する戦略として働くことが予期される。

40

【0012】

よって、一部の態様において、本開示は、コアシェルナノ粒子を提供し、コアは、単一

50

タンパク質を含み、シェルは、複数のポリヌクレオチドを含み、ポリヌクレオチドは、タンパク質表面に共有結合を介して結合している。種々の実施形態において、タンパク質は、触媒活性、シグナル伝達活性、治療活性、または輸送活性を呈する。一部の実施形態において、複数のポリヌクレオチドの各々は同じである。更なる実施形態において、複数のポリヌクレオチドのうちの少なくとも2つは異なる。

【0013】

一部の実施形態において、タンパク質表面上のポリヌクレオチドの密度は、約 $2 \text{ pmol} / \text{cm}^2$ ~ 約 $200 \text{ pmol} / \text{cm}^2$ である。更なる実施形態において、タンパク質表面上のポリヌクレオチドの密度は、約 $10 \text{ pmol} / \text{cm}^2$ である。また更なる実施形態において、タンパク質表面上のポリヌクレオチドの密度は、約 $100 \text{ pmol} / \text{cm}^2$ である。

10

【0014】

一部の実施形態において、本開示のコアシェルナノ粒子は、複数のポリヌクレオチドのうちの少なくとも1つに共有結合または非共有結合している追加の薬剤を更に含む。種々の実施形態において、この追加の薬剤は、ポリヌクレオチド、ペプチド、タンパク質、リン脂質、オリゴ糖、金属複合体、小分子、治療薬、造影剤、またはこれらの組み合わせである。一部の実施形態において、追加の薬剤は、複数のポリヌクレオチドのうちの少なくとも1つにハイブリッド形成によって非共有結合している。更なる実施形態において、追加の薬剤は、複数のポリヌクレオチドのうちの少なくとも1つに共有結合している。

【0015】

本開示はまた、シェルの少なくとも1つのポリヌクレオチドが、タンパク質表面にタンパク質の表面アミノ基を介して結合している実施形態を提供する。一部の実施形態において、表面アミノ基は Lys 残基に由来する。

20

【0016】

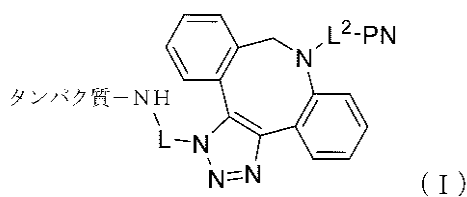
一部の実施形態において、少なくとも1つのポリヌクレオチドは、(a) 表面アミノ基に結合しているアジド部分と、(b) 少なくとも1つのポリヌクレオチド上のアルキン官能基との反応から形成されるトリアゾール結合を介して結合している。

【0017】

追加の実施形態において、少なくとも1つのポリヌクレオチドは、タンパク質表面に結合し、式(I)、(II)、またはその両方に示される結合を介してであり、

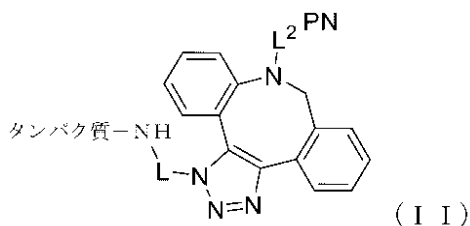
30

【化1】



、及び

【化2】



40

、L及び L^2 が、各々独立して、 C_{1-10} アルキレン、 $-C(O)-C_{1-10}$ アルキレン-Y-、及び $-C(O)-C_{1-10}$ アルキレン-Y- C_{1-10} アルキレン- $(OCH_2CH_2)_m$ -Y-から選択され、

各Yが、独立して、結合、 $C(O)$ 、O、NH、 $C(O)NH$ 、及び $NHC(O)$ から成る群から選択され、

50

mが、0、1、2、3、4、または5であり、
PNが、少なくとも1つのポリヌクレオチドである。

【0018】

また更なる実施形態において、シェルの少なくとも1つのポリヌクレオチドは、タンパク質表面にタンパク質の表面カルボキシル基を介して結合している。一部の実施形態において、シェルの少なくとも1つのポリヌクレオチドは、タンパク質表面にタンパク質の表面チオール基を介して結合している。追加の実施形態において、シェルの少なくとも1つのポリヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチドに対して、標的ポリヌクレオチドとハイブリッド形成しその発現を阻害するのに十分に相補的である。

【0019】

追加の薬剤は、一部の実施形態において、標的ポリヌクレオチドに対して、標的ポリヌクレオチドとハイブリッド形成しその発現を阻害するのに十分に相補的である、ポリヌクレオチドである。

【0020】

一部の態様において、本開示は、前述の請求項のいずれか一項に記載のコアシェルナノ粒子を複数含む組成物を提供する。一部の実施形態において、複数のコアシェルナノ粒子は結晶構造を形成する。

【0021】

一部の実施形態において、各コアシェルナノ粒子は、同じタンパク質を含む。更なる実施形態において、少なくとも2つのコアシェルナノ粒子は、異なるタンパク質を含む。

【0022】

追加の実施形態において、本組成物は、金属ナノ粒子を更に含む。種々の実施形態において、金属ナノ粒子は、金、銀、白金、アルミニウム、パラジウム、銅、コバルト、インジウム、ニッケル、またはこれらの混合物を含む。

【0023】

更なる実施形態において、第1のコアシェルナノ粒子の複数のポリヌクレオチドは、第2のコアシェルナノ粒子の複数のポリヌクレオチドのポリヌクレオチド配列に対して、ハイブリッド形成して超格子構造を形成するのに十分に相補的である。

【0024】

本開示の更なる態様においては、反応を触媒する方法が提供され、本方法は、反应用的試薬を本開示の組成物と接触させることを含み、試薬と本組成物との間の接触が反応の触媒に繋がる。

【0025】

追加の態様において、本開示は、標的分子を検出する方法を提供し、本方法は、標的分子をコアシェルナノ粒子または本開示の組成物と接触させることを含み、標的分子とコアシェルナノ粒子または本組成物との間の接触が検出可能な変化をもたらす。一部の実施形態において、検出はインピトロである。一部の実施形態において、検出はインピボである。

【0026】

一部の態様において、標的ポリヌクレオチドによってコードされる遺伝子産物の発現を阻止する方法が提供され、本方法は、標的ポリヌクレオチドを、コアシェルナノ粒子または本開示の組成物と、遺伝子産物の発現を阻害するのに十分な条件下で接触させることを含む。一部の実施形態において、遺伝子産物の発現はインピボで阻害される。一部の実施形態において、遺伝子産物の発現はインピトロで阻害される。一部の実施形態において、遺伝子産物の発現は、少なくとも約5%阻害される。

【0027】

本開示の更なる態様において、治療用タンパク質を細胞に送達する方法が提供され、本方法は、コアシェルナノ粒子または本開示の組成物を細胞に投与することを含み、このコアシェルナノ粒子のタンパク質は、治療用タンパク質である。一部の実施形態において、送達はインピトロ送達である。一部の実施形態において、送達はインピボ送達である。

10

20

30

40

50

【0028】

種々の実施形態において、細胞は対象中にある。更なる実施形態において、対象は治療用タンパク質を必要としている。

【0029】

本開示の一部の実施形態において、本方法は、治療用タンパク質のみの投与と比較して、対象において減少した免疫原性応答を提供する。更なる実施形態において、本方法は、治療用タンパク質のみの投与と比較して、増加した治療用タンパク質の細胞取り込みを提供する。

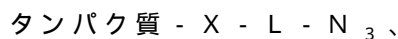
【0030】

一部の態様において、本開示は、コアシェルナノ粒子を調製する方法を提供し、本方法は、タンパク質を、複数のポリヌクレオチドと、複数のポリヌクレオチドをタンパク質の表面に共有結合させるのに十分な条件下で接触させることを含む。

10

【0031】

一部の実施形態において、本タンパク質は、以下の構造を有し



Xが、タンパク質上の表面アミノ基、カルボン酸基、またはチオール基に由来し、

Lが、 C_{1-10} アルキレン、 $-Y-C(O)-C_{1-10}$ アルキレン $-Y-$ 、及び $-Y-C(O)-C_{1-10}$ アルキレン $-Y-C_{1-10}$ アルキレン $-(OCH_2CH_2)_m-Y-$ から選択され、

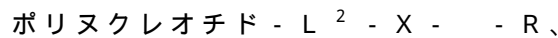
各Yが、独立して、結合、 $C(O)$ 、 O 、 NH 、 $C(O)NH$ 、及び $NHC(O)$ から成る群から選択され、

20

mが、0、1、2、3、4、または5である。

【0032】

更なる実施形態において、少なくとも1つのポリヌクレオチドは、以下の構造を有し



L^2 が、 C_{1-10} アルキレン、 $-C(O)-C_{1-10}$ アルキレン $-Y-$ 、及び $-C(O)-C_{1-10}$ アルキレン $-Y-C_{1-10}$ アルキレン $-(OCH_2CH_2)_m-Y-$ から選択され、

各Yが、独立して、結合、 $C(O)$ 、 O 、 NH 、 $C(O)NH$ 、及び $NHC(O)$ から成る群から選択され、

30

mが、0、1、2、3、4、または5であり、

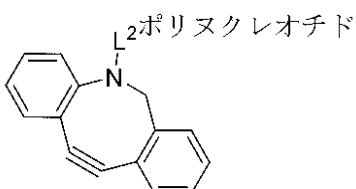
Xが、結合であり、Rが、Hまたは C_{1-10} アルキルであり、

あるいは、X及びRが、それらが結合する炭素と一緒にあって、8~10員の炭素環式基または8~10員の複素環式基を形成する。

【0033】

また更なる実施形態において、少なくとも1つのポリヌクレオチドは、以下の構造を有する。

【化3】



40

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1A】オリゴヌクレオチドのタンパク質の表面への共有結合のための戦略を描写する。(1a)は、ウシカタラーゼの図案表現である。一級アミンを含有するリジンアミノ酸が青色の棒として強調されている。(1b)は、オリゴヌクレオチドの高密度なシェルによるタンパク質表面の修飾のための反応スキームである。明確化のため、1つのみの表面

50

アミンが示される。外側の円は、抱合アジド（中央の構造）またはDNA（下部の構造）のシェルを表す。

【図1B】オリゴヌクレオチドのタンパク質の表面への共有結合のための戦略を描写する。(1a)は、ウシカタラーゼの図案表現である。一級アミンを含有するリジンアミノ酸が青色の棒として強調されている。(1b)は、オリゴヌクレオチドの高密度なシェルによるタンパク質表面の修飾のための反応スキームである。明確化のため、1つのみの表面アミンが示される。外側の円は、抱合アジド（中央の構造）またはDNA（下部の構造）のシェルを表す。

【図2】(1)（パネルa）及び(2)（パネルb）を用いたカタラーゼの表面修飾の程度の決定を示す。(2a)は、天然（左のスペクトル）及びアジド標識（右のスペクトル）カタラーゼのMALDI-TOF-MSスペクトルである。4190Daの分子量における差異は、当量約60の(1)による標識に対応する。(2b)は、天然の黒色及びDNA標識（最大300nmのピークを示すスペクトル）カタラーゼのUV可視スペクトルである。260nmでの吸光度における差異は、約64個のオリゴヌクレオチドの共有結合に対応する。405nmでの吸光度（挿入図）を使用して、タンパク質濃度を決定し、活性部位を取り囲むタンパク質構造の保持を確認した。

【図3A】タンパク質/DNAコアシェルナノ粒子の特性評価を示す。(3a)は、天然のアジド標識及びDNA標識カタラーゼの円偏光二色性スペクトルである。208nm及び222nmでの最小値は、タンパク質のらせん構造に対応する。DNAの共有結合後のスペクトルにおけるわずかな差異は、付加されるDNA鎖の特徴的なCD特質に起因する。(3b)は、 H_2O_2 の H_2O 及び O_2 への分解を測定するカタラーゼの酵素アッセイである。(3c)は、天然のアジド標識及びDNA標識カタラーゼの動的散乱スペクトルである。

【図3B】タンパク質/DNAコアシェルナノ粒子の特性評価を示す。(3a)は、天然のアジド標識及びDNA標識カタラーゼの円偏光二色性スペクトルである。208nm及び222nmでの最小値は、タンパク質のらせん構造に対応する。DNAの共有結合後のスペクトルにおけるわずかな差異は、付加されるDNA鎖の特徴的なCD特質に起因する。(3b)は、 H_2O_2 の H_2O 及び O_2 への分解を測定するカタラーゼの酵素アッセイである。(3c)は、天然のアジド標識及びDNA標識カタラーゼの動的散乱スペクトルである。

【図3C】タンパク質/DNAコアシェルナノ粒子の特性評価を示す。(3a)は、天然のアジド標識及びDNA標識カタラーゼの円偏光二色性スペクトルである。208nm及び222nmでの最小値は、タンパク質のらせん構造に対応する。DNAの共有結合後のスペクトルにおけるわずかな差異は、付加されるDNA鎖の特徴的なCD特質に起因する。(3b)は、 H_2O_2 の H_2O 及び O_2 への分解を測定するカタラーゼの酵素アッセイである。(3c)は、天然のアジド標識及びDNA標識カタラーゼの動的散乱スペクトルである。

【図4】約1.5のFITC分子及び約50個のCy5含有オリゴヌクレオチドで標識したカタラーゼの取り込みを示す、C8S細胞の警告顕微鏡写真を描出する。

【図5A】オリゴヌクレオチドのタンパク質の表面への共有結合のための戦略を描写する。(5a)は、ウシカタラーゼの図案表現である。一級アミンを含有するリジンアミノ酸が強調されている。(5b)は、コリネバクテリウムグルタミカム（「Cg」）カタラーゼの図案表現である。(5c)は、オリゴヌクレオチドの高密度なシェルによるタンパク質表面の修飾のための反応スキームである。明確化のため、1つのみの表面アミンが示される。外側の円は、抱合アジド（中央の構造）またはDNA（下部の構造）のシェルを表す。

【図5B】オリゴヌクレオチドのタンパク質の表面への共有結合のための戦略を描写する。(5a)は、ウシカタラーゼの図案表現である。一級アミンを含有するリジンアミノ酸が強調されている。(5b)は、コリネバクテリウムグルタミカム（「Cg」）カタラーゼの図案表現である。(5c)は、オリゴヌクレオチドの高密度なシェルによるタンパク

10

20

30

40

50

質表面の修飾のための反応スキームである。明確化のため、1つのみの表面アミンが示される。外側の円は、抱合アジド（中央の構造）またはDNA（下部の構造）のシェルを表す。

【図5C】オリゴヌクレオチドのタンパク質の表面への共有結合のための戦略を描写する。(5a)は、ウシカタラーゼの図案表現である。一級アミンを含有するリジンアミノ酸が強調されている。(5b)は、コリネバクテリウムグルタミカム(「Cg」)カタラーゼの図案表現である。(5c)は、オリゴヌクレオチドの高密度なシェルによるタンパク質表面の修飾のための反応スキームである。明確化のため、1つのみの表面アミンが示される。外側の円は、抱合アジド（中央の構造）またはDNA（下部の構造）のシェルを表す。

【図6】単一成分タンパク質超格子の組織化を描出する。(6a)は、自己相補性リンカーを使用するタンパク質の組織化のためのスキームである。図6b)は、自己相補性リンカーを添加した後のDNA標識ウシカタラーゼの写真である。凝縮していない試料(右)は、非自己相補的リンカーの添加が凝集をもたらさないことを示す。図6c)は、熱的に誘導されるタンパク質凝集体の分解及びその後のUV分光法である。

【図7】2成分系タンパク質超格子の組織化を示す。(7a)非自己相補的リンカーを使用するタンパク質の組織化のためのスキームである。図7b)は、自己相補的リンカーの添加時に形成される、ウシカタラーゼ及びCgカタラーゼ両方を含有するDNA鑄型凝集体の写真である。図7c)は、熱的に誘導される2成分系タンパク質凝集体の分解及びその後のUV分光法である。図7d)は、別の粒子型上のリンカーに相補的であるリンカーの添加時に形成される、ウシカタラーゼ及びAuNPを含有するDNA鑄型凝集体の写真である。図7e)は、熱的に誘導される2成分系タンパク質AuNP凝集体の分解及びその後のUV分光法である。

【図8】SAXSによるタンパク質格子の特性評価を示す。図8a)は、全てがタンパク質構成単位で構成される体心立方(BCC)単位セルの描出である。図8b)は、実験的(赤色)及び理論的(黒色)なBCC超格子の1-D SAXS散乱プロファイルである。図8c)は、タンパク質及びAuPAEの組み合わせから形成されるBCC単位セルの描出である。図8d)は、2成分系Au-タンパク質超格子の1-D SAXS散乱プロファイルである。

【図9】Cgカタラーゼで構成される結晶のSTEM顕微鏡写真を示す。低倍率画像(9a)をSEモードで、高倍率画像(9b)をZコントラストモードで収集した。

【図10】2成分系タンパク質-AuNP結晶で構成される結晶のSTEM顕微鏡写真を示す。低倍率画像(10a)をSEモードで、高倍率画像(10b)をZコントラストモードで収集した。

【図11】天然、AF647機能化、及びDNA機能化 - galのUV可視分光法を描出する。約650nmでの吸光度ピークは共有結合したAlexaFluor色素に由来し、これを、タンパク質をDNAで標識した後でタンパク質の濃度を測定するために使用した(最上の線)。DNAの濃度を260nmでの吸光度に基づいて決定した。

【図12】共焦点蛍光顕微鏡法によって決定した天然(左)及びDNA機能化(右) - galの細胞取り込みを描出する。細胞核をDAPIで染色して青色にした。タンパク質の表面に共有結合したAlexaFluor色素からの蛍光シグナルは赤色である。

【図13】トランスフェクトした細胞内の天然(左)及びDNA機能化(右) - galの触媒活性を示す。

【図14】タンパク質-DNA抱合体の追加の合成及び特性評価を描写する。図14a)は、ウシカタラーゼ及びCgカタラーゼの図案描写であり、これらは、その分子トポロジー及び表面接触可能なアミンの場所を示す。図14b)は、DNA機能化カタラーゼの合成及び組織化のためのスキームである。表面接触可能なアミンを、NHS及びN3部分を反対側の末端にて含有するアジドで修飾し(i)、その後、共有結合したアジドを、銅を含まない「クリック化学」反応によって2つのはっきり異なる5'-DBCO修飾DNA鎖に抱合させた(ii)。DNA機能化タンパク質とのリンカー鎖のハイブリッド形成(

10

20

30

40

50

i i i)、及びその後のタンパク質と相補的リンカーとの混合(i v)により、タンパク質のB C CまたはC s C l型単位セルへの組織化がもたらされた。図1 4 c) ~ e)は、D L Sによって決定した、天然(図1 4 c)、N 3機能化(図1 4 d)、及びD N A機能化(図1 4 e) C gカタラーゼの流体力学直径の比較である。(図1 4 f)は、天然(黒色の丸)、D N A機能化(赤色(鎖1)及び青色(鎖2)の四角)、及び結晶(シアン色の三角) C gカタラーゼによる基質濃度の関数としてのH₂O₂の不均化の酵素触媒速度の比較である。図1 4 g)は、C gカタラーゼで構成されるD N A鑄型凝集体の熱的融解転移である。

【図1 5】カタラーゼの直径に及ぼす表面修飾の影響を示す。図1 5 a)は、抱合体の流体力学直径に対するD N A、タンパク質、及びリンカーの相対的寄与を示す、D N A機能化C gカタラーゼの図案描写である。リンカー領域(シアン色)は、アジドリンカーからのテトラエチレングリコールスペーサー、及びD B C OとD B C O d T合成ホスホラミダイトのチミジン部分との間のスペーサーで構成される(挿入図)。2つのスペーサー1 8ホスホラミダイトもD N A設計に含まれたが、明確化のため、図案には描出しない。図1 5 b) ~ d)は、天然(b)、アジド機能化(c)、及びD N A機能化(d)ウシカタラーゼの動的光散乱(D L S)スペクトルである。図1 5 e)は、ウシカタラーゼ及びC gカタラーゼ、及びそのアジド機能化及びD N A機能化変異型の流体力学直径の要約である。図1 5 a)における距離は、P r o D r u g S e r v e rによって計算した、結晶状態にある塩基対あたりの距離ならびに理想結合距離及び角度を採用するリンカーに基づく推定であることに留意されたい[S c h u t t e l k o p f e t a l . , A c t a C r y s t a l l o g r D 6 0 : 1 3 5 5 - 1 3 6 3 (2 0 0 4)]。

【図1 6】M A L D I - M Sによるアジドを用いたタンパク質の標識の程度の決定を示す。アジドを用いた天然(左の線)及びN 3標識(右の線)ウシカタラーゼ(図1 6 a)及びC g(図1 6 b)カタラーゼの機能化の程度を、M A L D I - M Sによって決定した。タンパク質と反応する各アジドリンカーは、2 7 4 D aをその分子量に加える。三量体酵素は試料調製及び分析中にモノマーに解離するため、ここで観察された値は、単一のサブユニットに対するものである。D N Aを持つウシカタラーゼ(図1 6 c)及びC g(図1 6 d)カタラーゼのD N A : タンパク質比率を、オリゴヌクレオチド1(白い四角)及び2(塗りつぶした四角)で機能化し、念入りに洗浄して未反応D N Aを除去した後で、U V可視分光法によって決定した。2 6 0 n mでの差吸光度は、D N Aによるタンパク質の修飾に起因する。図1 6 e)は、アジド及び各オリゴヌクレオチドによるタンパク質機能化の程度の要約である。表面接触可能なリジンの数は、P y m o l M o l e c u l a r G r a p h i c s S y s t e m [T h e P y M O L M o l e c u l a r G r a p h i c s S y s t e m , V e r s i o n 1 . 5 . 0 . 4 S c h r o d i n g e r , L L C .]において生成した各タンパク質の表面表現から計算した。各アミンの実際の溶媒接触可能性は多様であり、このことが、観察された収率が理論的に可能な収率を下回った理由である可能性が高い。それでも、機能化アミンの数は、幾つかの標識反応にわたって高度に再現可能であった(ウシカタラーゼについて1 5 ~ 1 6、C gカタラーゼについて1 1 ~ 1 2)。ウシカタラーゼのオリゴ2についてのD N A鎖の見掛けの過剰さは、タンパク質濃度の推定における誤差、及び/またはタンパク質の表面上の込み合った環境におけるD N Aの消滅のわずかな変化、若しくは計算されたD N Aの消滅における不確実性に起因する可能性が高い。

【図1 7】天然及びD N A機能化ウシカタラーゼ(図1 7 a ~ c)及びC g(図1 7 d ~ f)カタラーゼの構造的な特性評価である。オリゴヌクレオチド1及び2による機能化前(白い丸)及び後(塗りつぶした丸)のウシカタラーゼ(図1 7 a)及びC g(図1 7 d)カタラーゼのU V可視吸光度スペクトル。D N A機能化タンパク質の可視吸光度スペクトルにおける変化は本質的には観察されず、活性部位を取り囲むタンパク質環境が、各D N A鎖によるいずれのタンパク質の機能化の後でも完全であることを示す。オリゴヌクレオチド1(図1 7 b及びe)またはオリゴヌクレオチド2(図1 7 c及びf)による機能化の前(白い丸)及び後(塗りつぶした丸)のウシ(図1 7 b ~ c)及びC g(図1 7 e

10

20

30

40

50

～ f) カタラーゼの円偏光二色性スペクトル。遊離オリゴヌクレオチド 1 及び 2 のスペクトルは、白い四角として表され、単一の DNA 分子の に予測される DNA : タンパク質比率を乗じた積である。塗りつぶした四角は、天然カタラーゼ及び各遊離オリゴヌクレオチドの CD スペクトルの合計を表す。計算したスペクトルと観察されたスペクトルとの間の合致は、吸光度スペクトルから計算した DNA : タンパク質比率が、実際の機能化の程度の適正な推定であることを示唆する。

【図 18】アジドリンカーによる機能化の前（白い丸）及び後（塗りつぶした丸）のウシカタラーゼ（図 18 a 及び b）及び「C g」（図 18 c 及び d）カタラーゼの構造の分光学的特性評価を示す。図 18 a）及び c）は、天然及び N3 機能化ウシカタラーゼ（図 18 a）及び C g（図 18 c）カタラーゼの UV 可視吸光度スペクトルである。天然酵素と比較した N3 機能化タンパク質変異型のほぼ同一の可視吸光度スペクトルにより、タンパク質の活性部位が機能化後にほとんど完全であることが確認される。405 : 280 比率の保持により、ヘムの損失が、機能化手順中に発生しないことが確認される。図 18 b）及び d）は、ウシカタラーゼ（図 18 b）及び C g（図 18 d）カタラーゼの CD スペクトルである。特徴的な吸光度特性及び強度の保持により、酵素が、アジドによる機能化の後でその二次構造を保持することが確認される。

【図 19 A】天然カタラーゼ、DNA 機能化カタラーゼ、及び C g カタラーゼ結晶による H_2O_2 の触媒分解を示す。天然（図 19 a 及び d）または DNA 機能化（図 19 b ~ c 及び e ~ f）C g（図 19 a ~ c）、及びウシ（図 19 d ~ f）カタラーゼの添加後の 240 nm での吸光度の変化を、 H_2O_2 のモル吸光係数 ($43 M^{-1} cm^{-1}$) で割ることによって分解した H_2O_2 の濃度に変換し、時間関数としてプロットした。各 H_2O_2 濃度に対する初期反応速度を計算し、図 14 f（C g カタラーゼ）及び 19 g（ウシカタラーゼ）にプロットした。図 19 h）は、各酵素変異型による H_2O_2 の分解に対する速度定数の要約である。図 19 i）は、種々の基質濃度での C g カタラーゼ結晶による H_2O_2 の分解である。図 19 j）は、酵素結晶のリサイクルである。下部の点及び上部の点は、それぞれ、上清及びペレットに対応する。図 19 k）5 周回の触媒、遠心分離、及び再懸濁前（最下部）及び後（最上部）のタンパク質結晶の構造である。

【図 19 B】天然カタラーゼ、DNA 機能化カタラーゼ、及び C g カタラーゼ結晶による H_2O_2 の触媒分解を示す。天然（図 19 a 及び d）または DNA 機能化（図 19 b ~ c 及び e ~ f）C g（図 19 a ~ c）、及びウシ（図 19 d ~ f）カタラーゼの添加後の 240 nm での吸光度の変化を、 H_2O_2 のモル吸光係数 ($43 M^{-1} cm^{-1}$) で割ることによって分解した H_2O_2 の濃度に変換し、時間関数としてプロットした。各 H_2O_2 濃度に対する初期反応速度を計算し、図 14 f（C g カタラーゼ）及び 19 g（ウシカタラーゼ）にプロットした。図 19 h）は、各酵素変異型による H_2O_2 の分解に対する速度定数の要約である。図 19 i）は、種々の基質濃度での C g カタラーゼ結晶による H_2O_2 の分解である。図 19 j）は、酵素結晶のリサイクルである。下部の点及び上部の点は、それぞれ、上清及びペレットに対応する。図 19 k）5 周回の触媒、遠心分離、及び再懸濁前（最下部）及び後（最上部）のタンパク質結晶の構造である。

【図 19 C】天然カタラーゼ、DNA 機能化カタラーゼ、及び C g カタラーゼ結晶による H_2O_2 の触媒分解を示す。天然（図 19 a 及び d）または DNA 機能化（図 19 b ~ c 及び e ~ f）C g（図 19 a ~ c）、及びウシ（図 19 d ~ f）カタラーゼの添加後の 240 nm での吸光度の変化を、 H_2O_2 のモル吸光係数 ($43 M^{-1} cm^{-1}$) で割ることによって分解した H_2O_2 の濃度に変換し、時間関数としてプロットした。各 H_2O_2 濃度に対する初期反応速度を計算し、図 14 f（C g カタラーゼ）及び 19 g（ウシカタラーゼ）にプロットした。図 19 h）は、各酵素変異型による H_2O_2 の分解に対する速度定数の要約である。図 19 i）は、種々の基質濃度での C g カタラーゼ結晶による H_2O_2 の分解である。図 19 j）は、酵素結晶のリサイクルである。下部の点及び上部の点は、それぞれ、上清及びペレットに対応する。図 19 k）5 周回の触媒、遠心分離、及び再懸濁前（最下部）及び後（最上部）のタンパク質結晶の構造である。

【図 19 D】天然カタラーゼ、DNA 機能化カタラーゼ、及び C g カタラーゼ結晶による

10

20

30

40

50

H₂O₂の触媒分解を示す。天然(図19a及びd)またはDNA機能化(図19b~c及びe~f)Cg(図19a~c)、及びウシ(図19d~f)カタラーゼの添加後の240nmでの吸光度の変化を、H₂O₂のモル吸光係数(43M⁻¹cm⁻¹)で割ることによって分解したH₂O₂の濃度に変換し、時間関数としてプロットした。各H₂O₂濃度に対する初期反応速度を計算し、図14f(Cgカタラーゼ)及び19g(ウシカタラーゼ)にプロットした。図19h)は、各酵素変異型によるH₂O₂の分解に対する速度定数の要約である。図19i)は、種々の基質濃度でのCgカタラーゼ結晶によるH₂O₂の分解である。図19j)は、酵素結晶のリサイクルである。下部の点及び上部の点は、それぞれ、上清及びペレットに対応する。図19k)5周回の触媒、遠心分離、及び再懸濁前(最下部)及び後(最上部)のタンパク質結晶の構造である。

10

【図19E】天然カタラーゼ、DNA機能化カタラーゼ、及びCgカタラーゼ結晶によるH₂O₂の触媒分解を示す。天然(図19a及びd)またはDNA機能化(図19b~c及びe~f)Cg(図19a~c)、及びウシ(図19d~f)カタラーゼの添加後の240nmでの吸光度の変化を、H₂O₂のモル吸光係数(43M⁻¹cm⁻¹)で割ることによって分解したH₂O₂の濃度に変換し、時間関数としてプロットした。各H₂O₂濃度に対する初期反応速度を計算し、図14f(Cgカタラーゼ)及び19g(ウシカタラーゼ)にプロットした。図19h)は、各酵素変異型によるH₂O₂の分解に対する速度定数の要約である。図19i)は、種々の基質濃度でのCgカタラーゼ結晶によるH₂O₂の分解である。図19j)は、酵素結晶のリサイクルである。下部の点及び上部の点は、それぞれ、上清及びペレットに対応する。図19k)5周回の触媒、遠心分離、及び再懸濁前(最下部)及び後(最上部)のタンパク質結晶の構造である。

20

【図19F】天然カタラーゼ、DNA機能化カタラーゼ、及びCgカタラーゼ結晶によるH₂O₂の触媒分解を示す。天然(図19a及びd)またはDNA機能化(図19b~c及びe~f)Cg(図19a~c)、及びウシ(図19d~f)カタラーゼの添加後の240nmでの吸光度の変化を、H₂O₂のモル吸光係数(43M⁻¹cm⁻¹)で割ることによって分解したH₂O₂の濃度に変換し、時間関数としてプロットした。各H₂O₂濃度に対する初期反応速度を計算し、図14f(Cgカタラーゼ)及び19g(ウシカタラーゼ)にプロットした。図19h)は、各酵素変異型によるH₂O₂の分解に対する速度定数の要約である。図19i)は、種々の基質濃度でのCgカタラーゼ結晶によるH₂O₂の分解である。図19j)は、酵素結晶のリサイクルである。下部の点及び上部の点は、それぞれ、上清及びペレットに対応する。図19k)5周回の触媒、遠心分離、及び再懸濁前(最下部)及び後(最上部)のタンパク質結晶の構造である。

30

【図19G】天然カタラーゼ、DNA機能化カタラーゼ、及びCgカタラーゼ結晶によるH₂O₂の触媒分解を示す。天然(図19a及びd)またはDNA機能化(図19b~c及びe~f)Cg(図19a~c)、及びウシ(図19d~f)カタラーゼの添加後の240nmでの吸光度の変化を、H₂O₂のモル吸光係数(43M⁻¹cm⁻¹)で割ることによって分解したH₂O₂の濃度に変換し、時間関数としてプロットした。各H₂O₂濃度に対する初期反応速度を計算し、図14f(Cgカタラーゼ)及び19g(ウシカタラーゼ)にプロットした。図19h)は、各酵素変異型によるH₂O₂の分解に対する速度定数の要約である。図19i)は、種々の基質濃度でのCgカタラーゼ結晶によるH₂O₂の分解である。図19j)は、酵素結晶のリサイクルである。下部の点及び上部の点は、それぞれ、上清及びペレットに対応する。図19k)5周回の触媒、遠心分離、及び再懸濁前(最下部)及び後(最上部)のタンパク質結晶の構造である。

40

【図19H】天然カタラーゼ、DNA機能化カタラーゼ、及びCgカタラーゼ結晶によるH₂O₂の触媒分解を示す。天然(図19a及びd)またはDNA機能化(図19b~c及びe~f)Cg(図19a~c)、及びウシ(図19d~f)カタラーゼの添加後の240nmでの吸光度の変化を、H₂O₂のモル吸光係数(43M⁻¹cm⁻¹)で割ることによって分解したH₂O₂の濃度に変換し、時間関数としてプロットした。各H₂O₂濃度に対する初期反応速度を計算し、図14f(Cgカタラーゼ)及び19g(ウシカタラーゼ)にプロットした。図19h)は、各酵素変異型によるH₂O₂の分解に対する

50

速度定数の要約である。図19 i)は、種々の基質濃度でのCgカタラーゼ結晶による H_2O_2 の分解である。図19 j)は、酵素結晶のリサイクルである。下部の点及び上部の点は、それぞれ、上清及びペレットに対応する。図19 k)5周回の触媒、遠心分離、及び再懸濁前(最下部)及び後(最上部)のタンパク質結晶の構造である。

【図19 I】天然カタラーゼ、DNA機能化カタラーゼ、及びCgカタラーゼ結晶による H_2O_2 の触媒分解を示す。天然(図19 a及びd)またはDNA機能化(図19 b~c及びe~f)Cg(図19 a~c)、及びウシ(図19 d~f)カタラーゼの添加後の240nmでの吸光度の変化を、 H_2O_2 のモル吸光係数($43 M^{-1} cm^{-1}$)で割ることによって分解した H_2O_2 の濃度に変換し、時間関数としてプロットした。各 H_2O_2 濃度に対する初期反応速度を計算し、図14 f(Cgカタラーゼ)及び19 g(ウシカタラーゼ)にプロットした。図19 h)は、各酵素変異型による H_2O_2 の分解に対する速度定数の要約である。図19 i)は、種々の基質濃度でのCgカタラーゼ結晶による H_2O_2 の分解である。図19 j)は、酵素結晶のリサイクルである。下部の点及び上部の点は、それぞれ、上清及びペレットに対応する。図19 k)5周回の触媒、遠心分離、及び再懸濁前(最下部)及び後(最上部)のタンパク質結晶の構造である。

【図19 J】天然カタラーゼ、DNA機能化カタラーゼ、及びCgカタラーゼ結晶による H_2O_2 の触媒分解を示す。天然(図19 a及びd)またはDNA機能化(図19 b~c及びe~f)Cg(図19 a~c)、及びウシ(図19 d~f)カタラーゼの添加後の240nmでの吸光度の変化を、 H_2O_2 のモル吸光係数($43 M^{-1} cm^{-1}$)で割ることによって分解した H_2O_2 の濃度に変換し、時間関数としてプロットした。各 H_2O_2 濃度に対する初期反応速度を計算し、図14 f(Cgカタラーゼ)及び19 g(ウシカタラーゼ)にプロットした。図19 h)は、各酵素変異型による H_2O_2 の分解に対する速度定数の要約である。図19 i)は、種々の基質濃度でのCgカタラーゼ結晶による H_2O_2 の分解である。図19 j)は、酵素結晶のリサイクルである。下部の点及び上部の点は、それぞれ、上清及びペレットに対応する。図19 k)5周回の触媒、遠心分離、及び再懸濁前(最下部)及び後(最上部)のタンパク質結晶の構造である。

【図19 K】天然カタラーゼ、DNA機能化カタラーゼ、及びCgカタラーゼ結晶による H_2O_2 の触媒分解を示す。天然(図19 a及びd)またはDNA機能化(図19 b~c及びe~f)Cg(図19 a~c)、及びウシ(図19 d~f)カタラーゼの添加後の240nmでの吸光度の変化を、 H_2O_2 のモル吸光係数($43 M^{-1} cm^{-1}$)で割ることによって分解した H_2O_2 の濃度に変換し、時間関数としてプロットした。各 H_2O_2 濃度に対する初期反応速度を計算し、図14 f(Cgカタラーゼ)及び19 g(ウシカタラーゼ)にプロットした。図19 h)は、各酵素変異型による H_2O_2 の分解に対する速度定数の要約である。図19 i)は、種々の基質濃度でのCgカタラーゼ結晶による H_2O_2 の分解である。図19 j)は、酵素結晶のリサイクルである。下部の点及び上部の点は、それぞれ、上清及びペレットに対応する。図19 k)5周回の触媒、遠心分離、及び再懸濁前(最下部)及び後(最上部)のタンパク質結晶の構造である。

【図20】DNA鑄型タンパク質凝集体の熱的融解転移の分析を示す。凝集体を、相補的付着末端またはタンパク質を保有するリンカーとハイブリッド形成した2つのタンパク質の可能な組み合わせの各々(図20 a~d)、及び10nmコアSNA-AuNP抱合体(図20 e-f)から組織化した。融解曲線を、温度を室温から45℃にゆっくりと(0.1℃/分)上昇させながら、凝集体を含有する溶液の260nmでの消滅における変化を追うことによって得た。全ての粒子の組み合わせは、オリゴヌクレオチドによる構成ナノ粒子の表面の高密度な被覆と一致する急激な融解転移を示した凝集体をもたらした。図20 g)は、融解温度、及び各融解曲線の第1の導関数の半値全幅の要約である。

【図21】タンパク質-タンパク質(図21 a~d)及びタンパク質-AuNP(図21 e~f)超格子についてのSAXSデータを示す。各パネルは、タンパク質を含有する超格子についての、実験で観察された1次元SAXSパターン(上部のトレース)と理論的予測(下部のトレース)との間の比較を示す。各超格子型の構成要素及び単位セルの概略が各パネルの最上部に示され、ここでは、Cgカタラーゼ、ウシカタラーゼ、及びAu

10

20

30

40

50

NPは、それぞれ、赤色の図案、シアン色の図案、または金色の球形として描出される。超格子は、図21a) BCC (青色の理論的トレース)とCsCl (黒色の理論的トレース)との混合物、(図21b~d) CsCl、及び(図21e~f)単純な立方と等構造である。

【図22】TEMによる単結晶超格子の特性評価を示す。Cgカタラーゼ-AuNPハイブリッド超格子の低倍率(図22a)及び高倍率(図22b)のTEM顕微鏡写真は、予測された菱形十二面体晶癖の均一な形成を示す。菱形十二面体の種々の配向の図案描写を、実験で観察された一致する配向を持つ超格子と並べて示す。(図22b)中の挿入図は、単結晶内のAuNP間の高度な短距離秩序を描出する。図c)~d)は、Cgカタラーゼで構成される超格子の低倍率及び高倍率TEM画像である。図22d)は、格子面が明確に可視であるCgカタラーゼ単結晶の高倍率TEM画像であり、その単結晶性質を示している。スケールバーは、(図22a)及び(図22c)については5µm、(図22b)については500nm、及び(図22d)については200nmである。

【図23】DNA機能化Cgカタラーゼ及びSNA-AuNP抱合体から組織化した単結晶超格子の代表的な低倍率顕微鏡写真を示す。スケールバーは10µmである。

【図24】相補的オリゴヌクレオチドによって機能化した粒子間のDNA媒介性相互作用を例示するスキームである。各粒子(タンパク質は赤紫色の図案、及びAuNPは金色の球形)は、粒子結合のための化学反応性部分(AuNP及びタンパク質に対して、それぞれ、チオール部分及びDBC部分)を含有する領域(i)と、PEGスパー(Sp)から成る短い柔軟性領域とから成るオリゴヌクレオチドによって機能化される。リンカー鎖の認識部分と付着末端部分との間にも含まれるこれらのスパーを含めることで、DNA相互接続の柔軟性を増大させ、高品質な結晶の形成を促進する。柔軟性領域は、両側に相補的リンカー鎖とハイブリッド形成する認識配列(ii)を有する(青色または黄色)。各リンカーの末端は、別の粒子型上の付着末端に相補的である短い付着末端(iii)から成る。明確化のため、1つのみのタンパク質-DNAまたはAuNP-DNA結合を示すが、タンパク質の表面は、多数の機能化できる可能性を持つリジン残基を含有する(青色の棒)。

【発明を実施するための形態】

【0035】

タンパク質は、その固有かつ多様な触媒機能性に起因して、機能性超分子物質のための前駆体のほぼ無限のセットを示す。しかしながら、単一タンパク質の規則超格子への組織化であっても、それをプログラミングすることは困難な作業であり、界面化学がはっきり異なる複数のタンパク質、またはタンパク質と無機ナノ粒子とを共同組織化するための汎化可能な戦略は、現在のところ存在しない。本明細書では、DNA間「結合」の高忠実度の相互作用特性を用いて、種々の実施形態において、2つのタンパク質の、単一タンパク質、複数のタンパク質、またはタンパク質及び金ナノ粒子のいずれかで構成される6つの固有の超格子への組織化を行う。重要なことに、DNA機能化タンパク質は、溶液中と結晶状態との両方において、その自然の触媒機能性を保持する。

【0036】

DNA媒介性ナノ粒子(NP)の組織化及び結晶化[Mirkin et al., Nature 382(6592):607-609(1996)、Park et al., Nature 451(7178):553-556(2008)、Nykypanchuk et al., Nature 451(7178):549-552(2008)]は、成分構成単位の表面を放射状配向オリゴヌクレオチドの高密度な単分子層で修飾することを必要とする。プログラム可能な原子等価物[Macfarlane et al., Angew Chem Int Ed 52(22):5688-5698(2013)]または球形核酸(SNA)-NP抱合体とも称されるこの構造により、短い相補的付着末端を保有するリンカー鎖とハイブリッド形成する粒子間の多価相互作用の形成ができるようになる(図1及び24)。相補的付着末端を保有するナノ粒子が組み合わせられ、これらの多価相互作用を分断するのに十分な温度に加熱された後、ゆっくりと室温に

10

20

30

40

50

冷却されるとき、個々としては弱い多くの粒子間相互作用の可逆的形成は、集合して、動態的に捕らわれた非晶質凝集体にわたる熱力学的に安定した単結晶超格子の形成に助力する [Auyeung et al., Nature 505 (7481): 73-77 (2014)]。機能性タンパク質をDNA媒介性超格子に含めることは、その表面が、その機能性を維持するのに不可欠であるその自然の構造を完全に残したまま、オリゴヌクレオチドで十分に機能化され得ることを条件とすれば可能である。オリゴヌクレオチドを緩和な条件下でタンパク質表面に付加するための2段階反応スキームを開発し、DNA機能化タンパク質を特性評価して、それらがその自然の構造及び機能を維持することを確実にし、その単結晶超格子へのDNA媒介性組織化を観察した。

【0037】

本開示は種々の用途を対象とし、これらの用途としては、タンパク質の表面をオリゴヌクレオチドの高密度なシェルで化学的に修飾するための方法、

細胞プロテアーゼによる分解または長期に及ぶ保管の際の分解に対する可能性のあるタンパク質ベースの治療薬の安定化、

欠損酵素の代置のため（例えば例えば、リポソーム保管障害のため）または毒性の代謝的変換のため（例えば、外傷性脳損傷または脳卒中後に H_2O_2 を分解するためのカタラーゼ）のタンパク質-オリゴヌクレオチド抱合体の適用、

細胞進入のためのオリゴヌクレオチド及び標的化のための他の化学部分（例えば、リポソームを標的化するためのマンノース6-リン酸）とのタンパク質の組み合わせた機能化、

タンパク質-オリゴヌクレオチド抱合体の多機能治療薬としての適用、が挙げられるが、これらに限定されない。

【0038】

本開示によって提供される利点としては、

コーティングとしてのオリゴヌクレオチドの使用により、共同治療戦略が可能となること；

酵素コアの使用により、オリゴヌクレオチドの送達のための他の方法と比較して、追加の機能性が得られること；

オリゴヌクレオチドシェルの配列を、特定の速度で分解し、タンパク質表面を露出させるように調整して、細胞プロセスの制御を可能にする（例えば、シグナル伝達カスケードに結合する受容体）ことが挙げられるが、これらに限定されない。

タンパク質の表面は、直交化学修飾的化学を持つ複数の官能基を提示する。このことにより、例えば、オリゴヌクレオチドシェルに加えて、複数のオリゴヌクレオチドまたは標的部分の抱合体によるタンパク質表面の修飾が可能となるはずである。

【0039】

本開示は、タンパク質治療薬の使用に関連する多くの困難（不良な細胞取り込み、先天的な免疫応答の活性化、不良な生体利用性、細胞プロテアーゼによる分解、または保管が長期に及ぶ際の凝集及び不活性化）の解決を提供する。

【0040】

開示の粒子は、多くの異なるタンパク質ベースの産出物までに拡大され得るコア技術である。あらゆる酵素の薬物動態特性を安定させ改善する可能性を有するため、数々の疾患の治療に適用され得る。加えて、DNA送達のための伝統的な骨格は支持としてしか機能しないのに対し、タンパク質ベースの骨格はそれ自体が治療薬として使用され得る。

【0041】

タンパク質-オリゴヌクレオチドのコアシェルNPは、オリゴヌクレオチドの高密度なシェルで化学的に修飾されたタンパク質コアから成る。タンパク質コアは、例えば、非限定的に、治療機能、触媒機能、シグナル伝達機能、または輸送機能を持つ広範なタンパク質から選択され得る。同様に、オリゴヌクレオチドシェルは、タンパク質コアが生理学的環境において機能的となるように、その治療的価値に対して、または調節可能な分解速度

10

20

30

40

50

を有するように、選択され得る。

【0042】

本発明により、機能性タンパク質の超分子物質への予測可能な組織化ができるようになる。これにより、2つ以上の構成要素（例えば、複数のタンパク質または、タンパク質及び無機ナノ構造）の規定の比率での物質の合成が可能となる。

【0043】

本技術の用途は、タンパク質/DNAコアシェルナノ粒子の合成のための一般的方法；室温での長期にわたる保管の際のタンパク質の安定化；酵素的に活性な結晶の組織化；直列型触媒作用における用途を有する1つ超のタンパク質を含有する結晶の組織化；タンパク質分子及び無機ナノ粒子で構成される多成分結晶の組織化；ならびに構造決定における使用のためのタンパク質の結晶化が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0044】

本技術の幾つかの利点としては、DNA二重鎖形成の高忠実度により、他の戦略の使用によってでは不可能な程度までオリゴヌクレオチド機能化タンパク質の組織化挙動を予測できること；タンパク質が、それ自体を機能的物質の組織化にとって理想的な構成単位にする多くの固有の特徴、例えば、均一な原子組成及び他のナノスケール物質と比較して高度な構造的均一性、直交型化学及び広範な触媒機能性を持つ複数の化学的に修飾可能な官能基を含有する表面の存在を有すること、が挙げられるが、これらに限定されない。

【0045】

本明細書に使用される、「複数」は、1つ超を意味する。ポリヌクレオチドとの関連において、複数とは、「シェル」を形成するのに十分な被覆を提供するタンパク質コア表面に結合しているポリヌクレオチドの数である。一部の場合、この複数は、ポリヌクレオチド密度によって測定される。

20

【0046】

本明細書に使用される、「生体分子」は、ポリヌクレオチド、ペプチド、タンパク質、リン脂質、オリゴ糖、小分子、治療薬、造影剤、及びこれらの組み合わせを含むように理解される。

【0047】

本明細書及び付属の特許請求の範囲に使用される、単数形「a」、「an」、及び「the」は、特に明確に記載のない限り、複数形の参照を含むことを、ここに記載しておく。

30

【0048】

また、本明細書に使用される「約」という用語は、およそを意味するように理解されることを記載しておく。

【0049】

コアシェルナノ粒子

本開示のコアシェルナノ粒子の基本的構成要素は、複数のポリヌクレオチド及び単一タンパク質である。コアシェルナノ粒子の種々の態様において、ポリヌクレオチドの全ては同じであり、あるいは代替的な態様においては、少なくとも2つのポリヌクレオチドは異なる。

40

【0050】

タンパク質

本明細書に使用される、タンパク質は、「ポリペプチド」と互換的に使用され、アミノ酸残基で構成されるポリマーを指す。本明細書に使用される「単一タンパク質」は、アミノ酸残基の連続的なポリマーを指す。本明細書に開示のタンパク質は、概して、コアシェルナノ粒子の「コア」として機能する。

【0051】

タンパク質は、当該技術分野で理解されており、抗体、酵素、構造タンパク質、及びホルモンを含むが、これらに限定されない。よって、本開示が企図するタンパク質は、触媒活性、シグナル伝達活性、治療活性、または輸送活性を有するものを含むが、これらに限

50

定されない。種々の実施形態において、触媒機能性は、生物医学的に関連した機能、例えば、リソソーム蓄積障害において欠乏している酵素（中でも、 α -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、 α -セレブロシダーゼ、 β -アグルコシダーゼ、 β -マンノシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、 β -グルコシダーゼ、 β -ヘキソサミニダーゼA、酸性リパーゼ、及びこれらの酵素の変異型）、胃腸障害において欠乏している酵素（ラクターゼ、リパーゼ、アミラーゼ、またはプロテアーゼ）、または免疫欠乏に關与している酵素（アデノシンデアミナーゼ）の代置を含み、あるいは技術的用途に適した酵素（ヒドロゲナーゼ、リパーゼ、プロテアーゼ、オキシゲナーゼ、またはラッカーゼ）を含み、これらは、種々の実施形態において、細胞内または細胞外で使用される。シグナル伝達タンパク質は、TNF- α またはカスパーゼなどの増殖因子を含む。ヒト血清アルブミンは、輸送タンパク質としての使用が企図され、ここでは、小分子治療薬または造影剤がコアにおいて結合し、DNAシェルが細胞取り込みシグナルとして働き得る。

10

【0052】

本開示のタンパク質は、天然または非天然のいずれかであり得る。タンパク質は、任意に、本明細書に記載のスペーサーを含む。

【0053】**天然タンパク質**

天然タンパク質としては、天然に存在するか、または例えば化学合成若しくは組み換え発現技法によって、天然に見られる形態で産出することができる生物学的に活性なタンパク質（抗体を含む）が挙げられるが、これらに限定されない。また、天然タンパク質としては、例えばグリコシル化タンパク質などであるがこれに限定されない、リポタンパク質及び翻訳後修飾タンパク質が挙げられる。

20

【0054】

本開示の方法及び組成物における使用が企図される抗体としては、インビボまたはインビトロのいずれかで標的分子を認識しそれと結合する抗体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0055】

本開示が企図する構造タンパク質としては、アクチン、チューブリン、コラーゲン、エラスチン、ミオシン、キネシン、及びダイニンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0056】**非天然タンパク質**

本開示が企図する非天然タンパク質としては、合成タンパク質、ならびに本明細書に定義される天然または非天然タンパク質の断片、類似体、及び変異型が挙げられるが、これらに限定されない。また、非天然タンパク質としては、D型アミノ酸、D若しくはL構成にある修飾、誘導体化、若しくは非天然アミノ酸、及び/またはその構造の一部としてのペプチド模倣体単位を有する、タンパク質またはタンパク性物質が挙げられる。「ペプチド」という用語は、典型的には、短いポリペプチド/タンパク質を指す。

30

【0057】

非天然タンパク質は、例えば、自動タンパク質合成器を使用するか、または代替的に、所望のタンパク質をコードする修飾ポリヌクレオチドを使用する組み換え発現技法を使用して、調製される。

40

【0058】

本明細書に使用される、タンパク質の「断片」は、完全長タンパク質またはタンパク質発現産物より小さい、タンパク質の任意の部分の指すことが意味される。

【0059】

本明細書に使用される、「類似体」は、構造が実質的に同様であり同じ生物学的活性を有するが、分子全体またはその断片のいずれかに対して種々の活性度を有し得る、2つ以上のタンパク質の任意のものを指す。類似体は、置換、欠失、挿入、及び/または1つ以上のアミノ酸の他のアミノ酸への添加に關与する1つ以上の変異に基づいて、そのアミノ酸配列の組成が異なる。置換は、代置されるアミノ酸及びそれを代置するアミノ酸の物理

50

化学的または機能的関連性に基づいて、保存的または非保存的であり得る。

【0060】

本明細書に使用される、「変異型」は、通常は分子の一部ではない追加の化学部分を含むように修飾されるタンパク質またはその類似体を指す。かかる部分は、例えば、非限定的に、分子の可溶性、吸収、及び/または生物学的半減期を調節してもよい。かかる効果を媒介することができる部分は、Remington's Pharmaceutical Sciences (1980)に開示されている。かかる部分を分子にカップリングするための手順は、当該技術分野で周知である。種々の態様において、タンパク質は、グリコシル化、ペグ化、及び/またはポリシアル化によって修飾される。

【0061】

融合タンパク質も企図され、これは、1つの融合構成要素が断片また模倣体である融合タンパク質を含む。本明細書に使用される、「模倣体」は、それが模倣するタンパク質と同等の生物学的活性を有するペプチドまたはタンパク質を意味する。例として、内皮細胞増殖因子模倣体が、自然の内皮細胞成長因子と同等の生物学的活性を有するペプチドまたはタンパク質である。この用語は、関心のタンパク質の天然リガンドの効果を増強することなどによって関心のタンパク質の活性を間接的に模倣する、ペプチドまたはタンパク質を更に含む。

【0062】

タンパク質は、抗体をそれらの断片及び誘導体と共に含み、これらとしては、Fab'断片、F(ab)2断片、Fv断片、Fc断片、1つ以上の相補性決定領域(CDR)断片、個々の重鎖、個々の軽鎖、二量体重鎖及び軽鎖(無傷抗体において見られるヘテロ四量体重鎖及び軽鎖に対立するものとして)、単鎖抗体(scAb)、ヒト化抗体(ならびにヒト化抗体の様式で修飾されたが、生じる抗体が非ヒト種における抗体によりよく似ている抗体)、キレート化組換え抗体(CRAB)、二重特異性抗体及び多特異性抗体、ならびに当該技術分野で知られている他の抗体誘導体または断片が挙げられるが、これらに限定されない。

【0063】

密度

タンパク質の被覆率、及び調製混合物中の出発構成要素、即ち、ポリヌクレオチドの量に応じて、提供されるコアシェルナノ粒子は、異なる密度を有するように企図される。よって、タンパク質は、一態様においては、ポリヌクレオチドで完全に被覆され、あるいは代替的な態様においては、ポリヌクレオチドで有意に被覆されるか、またはポリヌクレオチドで疎らに被覆される。タンパク質の被覆の密度は、一態様においては、表面全体にわたって均一であり、あるいは代替の態様においては、密度は、表面にわたって不均一である。

【0064】

一部の態様において、コアシェルナノ粒子のシェルを成すポリヌクレオチドの密度は、分解に対する耐性を増加させる。一態様において、細胞によるコアシェルナノ粒子の取り込みは、ナノ粒子と結合するポリヌクレオチドの密度により影響を受ける。全体が参照により本明細書に組み込まれるPCT/US2008/65366に記載されるように、ポリヌクレオチド機能化ナノ粒子の表面上の高密度なポリヌクレオチドは、細胞によるナノ粒子の取り込みの増加と関連する。この態様は、同様にコアシェルナノ粒子の特性であると企図され、これにおいては、コアシェルナノ粒子のシェルを構成する高密度なポリヌクレオチドは、細胞によるコアシェルナノ粒子の取り込みの増加と関連する。

【0065】

概して、少なくとも $2 \text{ pmol} / \text{cm}^2$ のポリヌクレオチドの面密度が、安定したコアシェルナノ粒子を提供するのに十分となる。一部の態様において、面密度は、少なくとも $15 \text{ pmol} / \text{cm}^2$ である。ポリヌクレオチドが、少なくとも $2 \text{ pmol} / \text{cm}^2$ 、少なくとも $3 \text{ pmol} / \text{cm}^2$ 、少なくとも $4 \text{ pmol} / \text{cm}^2$ 、少なくとも $5 \text{ pmol} / \text{cm}^2$ 、少なくとも $6 \text{ pmol} / \text{cm}^2$ 、少なくとも $7 \text{ pmol} / \text{cm}^2$ 、少なくとも 8

10

20

30

40

50

pmol/cm^2 、少なくとも 9 pmol/cm^2 、少なくとも 10 pmol/cm^2 、
 少なくとも約 15 pmol/cm^2 、少なくとも約 20 pmol/cm^2 、少なくとも約
 25 pmol/cm^2 、少なくとも約 30 pmol/cm^2 、少なくとも約 35 pmol
 $/\text{cm}^2$ 、少なくとも約 40 pmol/cm^2 、少なくとも約 45 pmol/cm^2 、少
 なくとも約 50 pmol/cm^2 、少なくとも約 55 pmol/cm^2 、少なくとも約 6
 0 pmol/cm^2 、少なくとも約 65 pmol/cm^2 、少なくとも約 70 pmol/cm^2 、少な
 くとも約 75 pmol/cm^2 、少なくとも約 80 pmol/cm^2 、少な
 くとも約 85 pmol/cm^2 、少なくとも約 90 pmol/cm^2 、少なくとも約 95
 pmol/cm^2 、少なくとも約 100 pmol/cm^2 、少なくとも約 125 pmol
 $/\text{cm}^2$ 、少なくとも約 150 pmol/cm^2 、少なくとも約 175 pmol/cm^2
 、少なくとも約 200 pmol/cm^2 、少なくとも約 250 pmol/cm^2 、少な
 くとも約 300 pmol/cm^2 、少なくとも約 350 pmol/cm^2 、少なくとも約 4
 00 pmol/cm^2 、少なくとも約 450 pmol/cm^2 、少なくとも約 500 pm
 $ol/cm}^2$ 、少なくとも約 550 pmol/cm^2 、少なくとも約 600 pmol/cm^2 、少な
 くとも約 650 pmol/cm^2 、少なくとも約 700 pmol/cm^2 、少な
 くとも約 750 pmol/cm^2 、少なくとも約 800 pmol/cm^2 、少なくとも
 約 850 pmol/cm^2 、少なくとも約 900 pmol/cm^2 、少なくとも約 950
 pmol/cm^2 、少なくとも約 1000 pmol/cm^2 、またはそれ以上の面密度で
 コアシェルナノ粒子中に存在する、組成物及び方法も提供される。

10

20

【0066】

ポリヌクレオチド

「ポリヌクレオチド」及び「オリゴヌクレオチド」という用語は、本明細書において互
 換的に使用される。ポリヌクレオチドは、コアシェル粒子のシェルの一部としてであつて
 も、または追加の薬剤としてであつても、本明細書に定義される、DNA、RNA、修飾
 形態、及びこれらの組み合わせを含むことが、本開示により企図される。したがって、一
 部の態様において、コアシェルナノ粒子はDNAを含む。一部の実施形態においては、D
 NAは二本鎖であり、更なる実施形態においては、DNAは一本鎖である。更なる態様
 において、コアシェルナノ粒子はRNAを含み、また更なる態様においては、コアシェルナ
 ノ粒子は二本鎖RNAを含み、特定の実施形態においては、二本鎖RNA薬剤は低分子干
 渉RNA (siRNA) である。「RNA」という用語は、2つの別個の鎖の二本鎖、及
 び一本鎖構造を含む。一本鎖RNAはまた、二次構造を持つRNAを含む。一態様におい
 て、ヘアピンループを有するRNAが企図される。

30

40

【0067】

本コアシェルナノ粒子は、種々の実施形態において、コアシェルナノ粒子の一部である
 ポリヌクレオチド及び標的ポリヌクレオチドのハイブリッド形成が生じるように、標的ポ
 リヌクレオチドの標的配列に十分に相補的である配列から成る複数のポリヌクレオチドを
 含む。二本鎖分子が、標的ポリヌクレオチドの一本鎖配列とハイブリッド形成する一本鎖
 配列を含む限り、種々の態様におけるポリヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖である。
 一部の態様において、コアシェルナノ粒子の一部であるポリヌクレオチドのハイブリッド
 形成により、二本鎖標的ポリヌクレオチドと三重鎖構造を形成することができる。別の態
 様において、三重鎖構造は、コアシェルナノ粒子の一部である二本鎖ポリヌクレオチドの
 一本鎖標的ポリヌクレオチドとのハイブリッド形成により形成することができる。三重鎖
 ポリヌクレオチド複合体の更なる説明は、全体が参照により本明細書に組み込まれるP
 C
 T / U S 2 0 0 6 / 4 0 1 2 4 において見い出される。

【0068】

一部の態様において、ポリヌクレオチドは、本明細書に記載のスペーサーを含有する。

【0069】

「ポリヌクレオチド」は、個別に重合されたヌクレオチドサブユニットを含むと当該技
 術分野では理解されている。本明細書に使用される、「ヌクレオチド」という用語、また
 はその複数形は、本明細書に記載されるように、修飾形態と互換性であり、当該技術分野

50

において公知である。ある特定の場において、当該技術は、天然のヌクレオチドを包含する「核酸塩基」という用語、及び修飾ヌクレオチドを含む非天然ヌクレオチドを使用する。よって、ヌクレオチドまたは核酸塩基は、天然の核酸塩基である、アデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、チミン(T)、及びウラシル(U)を意味する。非天然の核酸塩基としては、例えば、限定的ではなく、キサンチン、ジアミノプリン、8-オキソ-N6-メチルアデニン、7-デアザキサンチン、7-デアザグアニン、N4,N4-エタノシトシン、N',N'-エタノ-2,6-ジアミノプリン、5-メチルシトシン(mC)、5-(C3-C6)-アルキニル-シトシン、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、プソイドイソシトシン、2-ヒドロキシ-5-メチル-4-トリアゾロピリジン、イソシトシン、イソグアニン、イノシン、及び「非天然」の核酸塩基が挙げられ、これについては、Bennerらの米国特許第5,432,272号、及びSusan M. Freier and Karl-Heinz Altmann, 1997, Nucleic Acids Research, vol. 25: pp 4429-4443に記載されている。「核酸塩基」という用語はまた、既知のプリン及びピリミジン複素環だけでなく、複素環式類似体及びその互変異性体も含む。更なる天然及び非天然の核酸塩基としては、米国特許第3,687,808号(Meriganら)、Chapter 15 by Sanghvi, in Antisense Research and Application, Ed. S. T. Crooke and B. Lebleu, CRC Press, 1993、Englisch et al., 1991, Angewandte Chemie, International Edition, 30: 613-722(特に622~623ページ、及びConcise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, J. I. Kroschwitz Ed., John Wiley & Sons, 1990, pages 858-859、Cook, Anti-Cancer Drug Design 1991, 6, 585-607を参照し、これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)に開示されているものが挙げられる。種々の態様において、ポリヌクレオチドは、核酸塩基のように機能できる複素環式化合物等の化合物を含む、非天然ヌクレオチドの分類である、1つ以上の「ヌクレオチド塩基」または「塩基部」も含み、最も伝統的な意味でヌクレオチド塩基ではないが、ヌクレオチド塩基として機能する、ある特定の「普遍的塩基」を含む。普遍的塩基は、3-ニトロピロール、任意に、置換インドール(例えば、5-ニトロインドール)、及び任意に、置換ヒポキサンチンを含む。他の望ましい普遍的塩基としては、当該技術分野で公知の普遍的塩基を含む、ピロール、ジアゾール、またはトリアゾール誘導体が挙げられる。

【0070】

修飾ヌクレオチドは、EP 1 072 679号及び国際公開第97/12896号に記載されており、これらの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。修飾核酸塩基としては、5-メチルシトシン(5-me-C)、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、6-メチル及び他のアデニンとグアニンとのアルキル誘導体、2-プロピル及び他のアデニンとグアニンとのアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミン及び2-チオシトシン、5-ハロウラシル及びシトシン、5-プロピニルウラシル及びシトシンならびに他のピリミジン塩基のアルキニル誘導体、6-アゾウラシル、シトシン及びチミン、5-ウラシル(プソイドウラシル)、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシルならびに他の8-置換アデニン及びグアニン、5-ハロ、特に5-プロモ、5-トリフルオロメチルならびに他の5-置換ウラシル及びシトシン、7-メチルグアニン及び7-メチルアデニン、2-F-アデニン、2-アミノ-アデニン、8-アザグアニン及び8-アザアデニン、7-デアザグアニン及び7-デアザアデニン、ならびに3-デアザグアニン及び3-デアザアデニンが挙げられるが、これらに限定されない。更なる修飾塩基としては、フェノキサジンシチジン(1H-ピリミド[5,4-b][1,4]ベンゾキサジン-2(3H)-オン)等の三環ピリミジン、フェノチアジンシチジン(1H-ピリミド[

5, 4 - b][1, 4]ベンゾチアジン - 2 (3H) - オン)、置換フェノキサジンシチジン(例えば、9 - (2 - アミノエトキシ) - H - ピリミド[5, 4 - b][1, 4]ベンゾキサジン - 2 (3H) - オン)等のG - クランプ、カルバゾールシチジン(2H - ピリミド[4, 5 - b]インドール - 2 - オン)、ピリドインドールシチジン(H - ピリド[3', 2': 4, 5]ピロロ[2, 3 - d]ピリミジン - 2 - オン)が挙げられる。修飾された塩基は、プリンまたはピリミジン塩基が他の複素環、例えば、7 - デアザ - アデニン、7 - デアザグアノシン、2 - アミノピリジン、及び2 - ピリドンと置換されるものも含んでもよい。追加の核酸塩基としては、米国特許第3, 687, 808号に開示されているもの、The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858 - 859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990に開示されているもの、Englisch et al., 1991, Angewandte Chemie, International Edition, 30: 613によって開示されているもの、及びSanghvi, Y. S., Chapter 15, Antisense Research and Applications, pages 289 - 302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993によって開示されているものが挙げられる。これらの塩基の一部は、結合親和性を増加させるのに有用であり、5 - 置換ピリミジン、6 - アザピリミジン、ならびにN - 2、N - 6、及びO - 6置換プリンを含み、これは、2 - アミノプロピルアデニン、5 - プロピニルウラシル、及び5 - プロピニルシトシンを含む。5 - メチルシトシン置換は、0.6 ~ 1.2 で核酸二重鎖安定性を増加させることを示しており、ある特定の態様において、2' - O - メトキシエチル糖修飾と組み合わせられる。米国特許第3, 687, 808号、米国特許第4, 845, 205号、同第5, 130, 302号、同第5, 134, 066号、同第5, 175, 273号、同第5, 367, 066号、同第5, 432, 272号、同第5, 457, 187号、同第5, 459, 255号、同第5, 484, 908号、同第5, 502, 177号、同第5, 525, 711号、同第5, 552, 540号、同第5, 587, 469号、同第5, 594, 121号、同第5, 596, 091号、同第5, 614, 617号、同第5, 645, 985号、同第5, 830, 653号、同第5, 763, 588号、同第6, 005, 096号、同第5, 750, 692号、及び同第5, 681, 941号を参照されたい。これらの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0071】

所定の配列のポリヌクレオチドを作製する方法は周知である。例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed. 1989)、及びF. Eckstein (ed.) Oligonucleotides and Analogues, 1st Ed. (Oxford University Press, New York, 1991)を参照されたい。固相合成は、ポリリボヌクレオチド及びポリデオキシリボヌクレオチドの両方に好ましい(周知のDNA合成方法も、RNA合成に有用である)。ポリリボヌクレオチドは、酵素的に調製することもできる。非天然核酸塩基は、ポリヌクレオチドの中に組み込むこともできる。例えば、米国特許第7, 223, 833号、Katz, J. Am. Chem. Soc., 74: 2238 (1951)、Yamane, et al., J. Am. Chem. Soc., 83: 2599 (1961)、Kosturko, et al., Biochemistry, 13: 3949 (1974)、Thomas, J. Am. Chem. Soc., 76: 6032 (1954)、Zhang, et al., J. Am. Chem. Soc., 127: 74 - 75 (2005)、及びZimmermann, et al., J. Am. Chem. Soc., 124: 13684 - 13685 (2002)を参照されたい。

【0072】

本開示のポリヌクレオチドまたはその修飾形態は、概して、長さが約5ヌクレオチド ~

約100ヌクレオチドである。一般に、より長いポリヌクレオチドは、コアシェルナノ粒子のより遅い分解に繋がる。より具体的には、コアシェルナノ粒子は、長さが約5～約90ヌクレオチド、長さが約5～約80ヌクレオチド、長さが約5～約70ヌクレオチド、長さが約5～約60ヌクレオチド、長さが約5～約50ヌクレオチド、長さが約5～約45ヌクレオチド、長さが約5～約40ヌクレオチド、長さが約5～約35ヌクレオチド、長さが約5～約30ヌクレオチド、長さが約5～約25ヌクレオチド、長さが約5～約20ヌクレオチド、長さが約5～約15ヌクレオチド、長さが約5～約10ヌクレオチドであるポリヌクレオチド、及びポリヌクレオチドが所望の結果を達成することができる範囲内で具体的に開示される大きさの長さの中間である全てのポリヌクレオチドを含む。したがって、長さが5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、またはそれ以上のヌクレオチドのポリヌクレオチドが企図される。15～100ヌクレオチド、または15～60ヌクレオチド、または18～30ヌクレオチドを有するポリヌクレオチドが、具体的に本明細書で企図される。

10

【0073】

20

本明細書に定義されるポリヌクレオチドはまた、アプタマーを含む。アプタマーの産出及び使用は、当業者には既知である。一般に、アプタマーは、標的リガンドに強く結合し、それを厳密に区別することができる核酸またはペプチド結合種である[Yan et al., RNA Biol. 6(3)316-320(2009)、この全体は参照により本明細書に組み込まれる]。アプタマーは、一部の実施形態において、指数関数的増加によるリガンドの系統的展開(systematic evolution of ligands by exponential enrichment)(SELEX)プロセスと呼ばれる技法によって得てもよい[Tuerk et al., Science 249:505-10(1990)、米国特許第5,270,163号、及び米国特許第5,637,459号、これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる]。核酸アプタマーの概論は、例えば、限定的ではなく、Nucleic Acid and Peptide Aptamers: Methods and Protocols(Mayer編集、Humana Press、2009)、及びCrawford et al., Briefings in Functional Genomics and Proteomics 2(1):72-79(2003)において見い出される。アプタマーの更なる考察は、RNAアプタマーの選択、DNAアプタマーの選択、標的タンパク質に共有結合することができるアプタマーの選択、修飾アプタマーライブラリの使用、ならびに診断用薬剤及び治療薬としてのアプタマーの使用を非限定的に含めて、Molekulyarnaya Biologiya, Vol. 34, No. 6, 2000, pp. 1097-1113の翻訳であるKopylov et al., Molecular Biology 34(6):940-954(2000)中で提供されており、その全体は参照により本明細書に組み込まれる。種々の態様において、アプタマーは、長さが10～100ヌクレオチドである。

30

40

【0074】

スパーサー

ある特定の態様において、コアシェルナノ粒子がポリヌクレオチドを含み、このポリヌクレオチドがスパーサーを更に含む、コアシェルナノ粒子が企図される。

【0075】

本明細書に記載される「スパーサー」は、ポリヌクレオチドとポリヌクレオチドが結合するコアとの間の距離を増加させる働きをする部分を意味する。コアシェルナノ粒子が生

50

物学的活性のために使用される本開示の一部の態様において、スパーサーは、それが結合するポリヌクレオチドの活性に直接的に関与しないことが企図される。代替的な態様において、スパーサーは、全てにおいてまたは一部において標的ポリヌクレオチドに相補的であり得る。

【0076】

スパーサーは、種々の態様において、ポリヌクレオチドが同じ配列を有するか、または異なる配列を有するかに関わらず、直列型で個別のポリヌクレオチド間に位置するように更に企図される。一態様において、スパーサーは、存在する場合、有機部分である。別の態様において、スパーサーは、重合体であり、水溶性重合体、核酸、タンパク質、オリゴ糖、炭水化物、脂質、またはそれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない。

10

【0077】

スパーサーの長さは、種々の実施形態において、少なくとも約5ヌクレオチド、少なくとも約10ヌクレオチド、10~30ヌクレオチド、10~40ヌクレオチド、10~50ヌクレオチド、10~60ヌクレオチド、または更には60ヌクレオチド超である。スパーサーは、相互に相補的な配列、またはポリヌクレオチドの配列に相補的な配列を有すべきではない。特定の態様において、ポリヌクレオチドスパーサーの塩基は、全てアデニン、全てチミン、全てシチジン、全てグアニン、全てウラシル、または全て他の何らかの修飾塩基である。一部の実施形態において、スパーサーはヌクレオチドを含有せず、かかる実施形態においては、スパーサーの長さは、少なくとも約5ヌクレオチド、少なくとも約10ヌクレオチド、10~30ヌクレオチド、10~40ヌクレオチド、10~50ヌクレオチド、10~60ヌクレオチド、または更には60ヌクレオチド超に相当する。

20

【0078】

修飾ポリヌクレオチド

上で考察したように、コアシェルナノ粒子の産出における使用のための修飾ポリヌクレオチドが企図される。種々の態様において、本開示のポリヌクレオチドは、完全に修飾されるか、または部分的に修飾される。よって、種々の態様において、1つ以上若しくは全ての糖類及び/またはポリヌクレオチドにおけるヌクレオチド部の1つ以上若しくは全てのヌクレオチド間結合は、「非天然」群と置換される。

【0079】

一態様において、本開示は、ペプチド核酸(PNA)の使用を企図する。PNA化合物において、ポリヌクレオチドの糖骨格は、アミドを含有する骨格と置換される。例えば、米国特許第5,539,082号、同第5,714,331号、及び同第5,719,262号、ならびにNielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500を参照されたい。これらの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0080】

開示されるポリヌクレオチドについて企図されるヌクレオチドと非天然ヌクレオチドとの間の他の結合は、米国特許第4,981,957号、同第5,118,800号、同第5,319,080号、同第5,359,044号、同第5,393,878号、同第5,446,137号、同第5,466,786号、同第5,514,785号、同第5,519,134号、同第5,567,811号、同第5,576,427号、同第5,591,722号、同第5,597,909号、同第5,610,300号、同第5,627,053号、同第5,639,873号、同第5,646,265号、同第5,658,873号、同第5,670,633号、同第5,792,747号、及び同第5,700,920号、米国特許公開第20040219565号、国際特許公開第98/39352号及び第99/14226号、Mesmaeker et al., Current Opinion in Structural Biology 5:343-355 (1995)、ならびにSusan M. Freier and Karl-Heinz Altmann, Nucleic Acids Research, 25:4429-4443 (1997)に記載されているものを含み、これらの開示は、参照により本明細

40

50

書に組み込まれる。

【0081】

ポリヌクレオチドの特定の例としては、修飾された骨格または非天然ヌクレオシド間結合を含有するものが挙げられる。修飾された骨格を有するポリヌクレオチドは、骨格にリン原子を保持するもの、及び骨格にリン原子を持たないものを含む。ヌクレオシド間骨格にリン原子を持たない修飾されたポリヌクレオチドは、「ポリヌクレオチド」の意味内であるとみなされる。

【0082】

リン原子を含有する修飾されたポリヌクレオチド骨格は、例えば、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、メチル及び3'-アルキレンホスホネート、5'-アルキレンホスホネート、及びキラルホスホネートを含む他のアルキルホスホネート、ホスフィネート、3'-アミノホスホルアミデート及びアミノアルキルホスホルアミデートを含むホスホルアミデート、チオノホスホルアミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、正常3'-5'結合を有するセレノホスフェート及びボラノホスフェート、それらの2'-5'結合類似体、ならびに1つ以上のヌクレオチド間結合が3'-3'、5'-5'または2'-2'結合である反転極性を有するものを含む。3'末端ヌクレオチド間結合で単一3'-3'結合を含む反転極性を有するポリヌクレオチド、即ち、非塩基であってもよい(ヌクレオチドが欠損しているか、またはその位置にヒドロキシル基を有する)単一の反転ヌクレオシド残基も企図される。塩類、混合塩、及び遊離酸形態も企図される。

10

20

【0083】

上記のリン含有結合の調製を教示する代表的な米国特許としては、米国特許第3,687,808号、同第4,469,863号、同第4,476,301号、同第5,023,243号、同第5,177,196号、同第5,188,897号、同第5,264,423号、同第5,276,019号、同第5,278,302号、同第5,286,717号、同第5,321,131号、同第5,399,676号、同第5,405,939号、同第5,453,496号、同第5,455,233号、同第5,466,677号、同第5,476,925号、同第5,519,126号、同第5,536,821号、同第5,541,306号、同第5,550,111号、同第5,563,253号、同第5,571,799号、同第5,587,361号、同第5,194,599号、同第5,565,555号、同第5,527,899号、同第5,721,218号、同第5,672,697号、及び同第5,625,050号が挙げられ、これらの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0084】

リン原子を含まない修飾されたポリヌクレオチド骨格は、短鎖アルキル若しくはシクロアルキルヌクレオシド間結合、混合ヘテロ原子及びアルキル若しくはシクロアルキルヌクレオシド間連結、または1つ以上の短鎖ヘテロ原子若しくは複素環式ヌクレオシド間結合により形成される骨格を有する。これらは、モルホリノ結合、シロキサソ骨格、スルフィド、スルホキシド及びスルホン骨格、ホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格、メチレンホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格、リボアセチル骨格、アルケン含有骨格、スルファメート骨格、メチレンイミノ及びメチレンヒドラジノ骨格、スルホネート及びスルホンアミド骨格、アミド骨格、及び混合N、O、S及びCH₂構成要素を有する他のものを有するものを含む。また他の実施形態において、ポリヌクレオチドは、ホスホロチオエート骨格を用いて提供され、オリゴヌクレオチドはヘテロ原子を用いて提供され、-CH₂-NH-O-CH₂-、-CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-、-CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-、-CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂-、及び-O-N(CH₃)-CH₂-CH₂-を含み、これらは、米国特許第5,489,677号及び同第5,602,240号に記載されている。例えば、米国特許第5,034,506号、同第5,166,315号、同第5,185,444号、同第5,214,134

40

50

号、同第5, 216, 141号、同第5, 235, 033号、同第5, 264, 562号、同第5, 264, 564号、同第5, 405, 938号、同第5, 434, 257号、同第5, 466, 677号、同第5, 470, 967号、同第5, 489, 677号、同第5, 541, 307号、同第5, 561, 225号、同第5, 596, 086号、同第5, 602, 240号、同第5, 610, 289号、同第5, 602, 240号、同第5, 608, 046号、同第5, 610, 289号、同第5, 618, 704号、同第5, 623, 070号、同第5, 663, 312号、同第5, 633, 360号、同第5, 677, 437号、同第5, 792, 608号、同第5, 646, 269号、及び同第5, 677, 439号を参照されたい。これらの開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0085】

種々の形態において、ポリヌクレオチドにおける2つの連続したモノマー間の結合は、
 -CH₂-、-O-、-S-、-NRH-、>C=O、>C=NRH、>C=S、-Si
 (R")₂-、-SO-、-S(O)₂-、-P(O)₂-、-PO(BH₃)-、-P
 (O, S)-、-P(S)₂-、-PO(R")-、-PO(OCH₃)-、及び-PO
 (NHRH)-から選択される、2~4、望ましくは3基/原子から成り、RHは、水素
 及びC₁-4-アルキルから選択され、R"は、C₁-6-アルキル及びフェニルから選
 択される。かかる結合の事例は、-CH₂-CH₂-CH₂-、-CH₂-CO-CH₂-
 -、-CH₂-CHOH-CH₂-、-O-CH₂-O-、-O-CH₂-CH₂-、-
 O-CH₂-CH= (後続モノマーへの結合として使用される場合、R₅を含む)、-C
 H₂-CH₂-O-、-NRH-CH₂-CH₂-、-CH₂-CH₂-NRH-、-C
 H₂-NRH-CH₂-、-O-CH₂-CH₂-NRH-、-NRH-CO-O-、
 -NRH-CO-NRH-、-NRH-CS-NRH-、-NRH-C(=NRH)-N
 RH-、-NRH-CO-CH₂-NRH-O-CO-O-、-O-CO-CH₂-O-
 -、-O-CH₂-CO-O-、-CH₂-CO-NRH-、-O-CO-NRH-、-N
 RH-CO-CH₂-、-O-CH₂-CO-NRH-、-O-CH₂-CH₂-NRH
 -、-CH=N-O-、-CH₂-NRH-O-、-CH₂-O-N= (後続モノマーへ
 の結合として使用される場合、R₅を含む)、-CH₂-O-NRH-、-CO-NRH
 -CH₂-、-CH₂-NRH-O-、-CH₂-NRH-CO-、-O-NRH-CH
 2-、-O-NRH、-O-CH₂-S-、-S-CH₂-O-、-CH₂-CH₂-S
 -、-O-CH₂-CH₂-S-、-S-CH₂-CH= (後続モノマーへの結合として
 使用される場合、R₅を含む)、-S-CH₂-CH₂-、-S-CH₂-CH₂-O
 -、-S-CH₂-CH₂-S-、-CH₂-S-CH₂-、-CH₂-SO-CH₂-
 -、-CH₂-SO₂-CH₂-、-O-SO-O-、-O-S(O)₂-O-、-O-S
 (O)₂-CH₂-、-O-S(O)₂-NRH-、-NRH-S(O)₂-CH₂-;
 -O-S(O)₂-CH₂-、-O-P(O)₂-O-、-O-P(O, S)-O-、-
 O-P(S)₂-O-、-S-P(O)₂-O-、-S-P(O, S)-O-、-S-P
 (S)₂-O-、-O-P(O)₂-S-、-O-P(O, S)-S-、-O-P(S)
 2-S-、-S-P(O)₂-S-、-S-P(O, S)-S-、-S-P(S)₂-S
 -、-O-PO(R")-O-、-O-PO(OCH₃)-O-、-O-PO(O
 2CH₃)-O-、-O-PO(OCH₂CH₂S-R)-O-、-O-PO(BH₃
)-O-、-O-PO(NHRN)-O-、-O-P(O)₂-NRH H-、-NRH
 -P(O)₂-O-、-O-P(O, NRH)-O-、-CH₂-P(O)₂-O-、-
 O-P(O)₂-CH₂-、及び-O-Si(R")₂-O-であり; その中でも、-C
 H₂-CO-NRH-、-CH₂-NRH-O-、-S-CH₂-O-、-O-P(O)
 2-O-O-P(-O, S)-O-、-O-P(S)₂-O-、-NRH P(O)₂
 -O-、-O-P(O, NRH)-O-、-O-PO(R")-O-、-O-PO(CH
 3)-O-、及び-O-PO(NHRN)-O-が企図され、RHは、水素及びC₁-4
 -アルキルから選択され、R"は、C₁-6-アルキル及びフェニルから選択される。更
 なる事例は、Mesmaeker et al., 1995, Current Opin

20

30

40

50

ion in Structural Biology, 5: 343 - 355、及び Susan M. Freier and Karl-Heinz Altmann, 1997, Nucleic Acids Research, vol 25: pp 4429 - 4443 に提供されている。

【0086】

ポリヌクレオチドのまた他の修飾された形態は、米国特許公開第20040219565号に詳細に記載されており、この開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0087】

修飾されたポリヌクレオチドは、1つ以上の置換糖部分も含有し得る。ある特定の態様において、ポリヌクレオチドは、2'位置で、OH; F; O-、S-若しくはN-アルキル; O-、S-若しくはN-アルケニル; O-、S-若しくはN-アルキニル; またはO-アルキル-O-アルキルのうちの1つを含み、アルキル、アルケニル、及びアルキニルは、置換または非置換のC1~C10アルキルまたはC2~C10アルケニル及びアルキニルであってもよい。他の実施形態は、 $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$ 、 $O(CH_2)_nOCH_3$ 、 $O(CH_2)_nNH_2$ 、 $O(CH_2)_nCH_3$ 、 $O(CH_2)_nONH_2$ 、及び $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$ を含み、式中、n及びmは1~約10である。他のポリヌクレオチドは、2'位置で、以下のうちの1つを含む: C1~C10低級アルキル、置換低級アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリル、アラルキル、O-アルカリルまたはO-アラルキル、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリル、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、RNA切断基、レポーター基、介入物、ポリヌクレオチドの薬物動態特性を改善するための基、またはポリヌクレオチドの薬物動力特性を改善するための基、及び類似する特性を有する他の置換基。一態様において、修飾は、2'-メトキシエトキシ(2'-O-CH₂CH₂OCH₃、これは2'-O-(2-メトキシエチル)または2'-MOEとしても知られる)(Martin et al., 1995, Helv. Chim. Acta, 78: 486-504)、即ち、アルコキシアルコキシ基を含む。他の修飾は、2'-ジメチルアミノオキシエトキシ、即ち、2'-DMAOEとしても知られる $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$ 基、及び2'-ジメチルアミノエトキシエトキシ(当該技術分野では2'-O-ジメチル-アミノ-エトキシ-エチルまたは2'-DMAEOEとしても知られる)、即ち、2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₃)₂を含む。

【0088】

また他の修飾は、2'-メトキシ(2'-O-CH₃)、2'-アミノプロポキシ(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂)、2'-アリル(2'-CH₂-CH=CH₂)、2'-O-アリル(2'-O-CH₂-CH=CH₂)、及び2'-フルオロ(2'-F)を含む。2'-修飾は、アラビノ(上)位置またはリボ(下)位置であってもよい。一態様において、2'-アラビノ修飾は2'-Fである。同様の修飾は、ポリヌクレオチド上の他の位置、例えば、3'末端ヌクレオチド上の糖の3'位置、または2'-5'結合ポリヌクレオチド及び5'末端ヌクレオチドの5'位置でも行われ得る。ポリヌクレオチドは、ペントフラノシル糖の代わりに、シクロブチル部分等の糖模擬体も有してもよい。例えば、米国特許第4,981,957号、同第5,118,800号、同第5,319,080号、同第5,359,044号、同第5,393,878号、同第5,446,137号、同第5,466,786号、同第5,514,785号、同第5,519,134号、同第5,567,811号、同第5,576,427号、同第5,591,722号、同第5,597,909号、同第5,610,300号、同第5,627,053号、同第5,639,873号、同第5,646,265号、同第5,658,873号、同第5,670,633号、同第5,792,747号、及び同第5,700,920号を参照されたい。これらの開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

【0089】

一態様において、糖修飾は、2'-ヒドロキシル基が糖環の3'または4'炭素原子に結合され、これによって二環式糖部分を形成する、ロックされた核酸(LNA)を含む。特定の態様において、結合は、2'酸素原子と4'炭素原子を架橋するメチレン(-CH₂-)_n基であり、nは、1または2である。LNA及びその調製物は、国際公開第98/39352号及び第99/14226号に記載されており、これらの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0090】

ポリヌクレオチドの特徴

提供される各コアシェルナノ粒子は、複数のポリヌクレオチドを含む。その結果、各コアシェルナノ粒子は、十分に相補的な配列を有する複数の標的ポリヌクレオチドに結合する能力を有する。例えば、特異的ポリヌクレオチドを標的化する場合、単一のコアシェルナノ粒子は、同じ分子の複数のコピーに結合する能力を有する。一態様において、コアシェルナノ粒子が同一のポリヌクレオチドを含む、即ち、各ポリヌクレオチドが同じ長さ及び同じ配列を有する方法が提供される。他の態様において、コアシェルナノ粒子は、同一でない2つ以上のポリヌクレオチドを含む、即ち、コアシェルナノ粒子のポリヌクレオチドのうちの少なくとも1つが、異なる長さ及び/または異なる配列を有するという点において、コアシェルナノ粒子の少なくとも1つの他のポリヌクレオチドとは異なる。コアシェルナノ粒子が異なるポリヌクレオチドを含む態様において、これらの異なるポリヌクレオチドは、同じ単一の標的ポリヌクレオチドに異なる場所で結合するか、または異なる遺伝子産物をコードする異なる標的ポリヌクレオチドに結合する。したがって、種々の態様において、単一のコアシェルナノ粒子は、1つ超の遺伝子産物の発現を阻害するための方法において使用され得る。よって、ポリヌクレオチドを使用して、遺伝子発現の所望のレベルの阻害をもたらすために必要に応じて、標的ポリヌクレオチドにおける1つ以上の特異的領域にて、または標的ポリヌクレオチドの全長にわたって、特異的ポリヌクレオチドを標的にする。

【0091】

したがって、一態様においては、ポリヌクレオチドは、標的配列を知った上で設計される。代替的に、コアシェルナノ粒子中のポリヌクレオチドは、本明細書に記載の所望の効果を達成するために、標的ポリヌクレオチドとハイブリッド形成する必要がない。いずれにせよ、所定の配列のポリヌクレオチドを作製する方法は周知である。例えば、Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed., 1989)、及びF. Eckstein (ed.) *Oligonucleotides and Analogues*, 1st Ed. (Oxford University Press, New York, 1991)を参照されたい。固相合成は、オリゴリボヌクレオチド及びオリゴデオキシリボヌクレオチドの両方について企図される(周知のDNA合成方法も、RNA合成に有用である)。オリゴリボヌクレオチド及びオリゴデオキシリボヌクレオチドは、酵素的に調製することもできる。

【0092】

代替的に、ポリヌクレオチドは、ライブラリから選択される。この種のライブラリの調製は、当該技術分野で周知である。例えば、2005年9月29日公開の米国特許出願第20050214782号、オリゴヌクレオチドライブラリを参照されたい。

【0093】

コアシェルナノ粒子の産出について企図されるポリヌクレオチドは、種々の態様において、標的ポリヌクレオチドから発現される遺伝子産物の発現を調節するものを含む。したがって、標的ポリヌクレオチドとハイブリッド形成し、翻訳を阻害するアンチセンスポリヌクレオチド、標的ポリヌクレオチドにハイブリッド形成し、RNAse活性(例えば、RNAse H)を始動するsiRNAポリヌクレオチド、二本鎖ポリヌクレオチドとハイブリッド形成し、転写を阻害する三重らせん形成ポリヌクレオチド、及び標的ポリヌク

10

20

30

40

50

レオチドとハイブリッド形成し、翻訳を阻害するリボザイムが企図される。

【0094】

一部の態様において、コアシェルナノ粒子は、コアシェルナノ粒子の取り込みを可能にする。種々の態様において、ポリヌクレオチドは、コアシェルナノ粒子の取り込み効率を増加させるヌクレオチド配列を含む。本明細書に使用される、「効率」とは、細胞におけるノ細胞によるコアシェルナノ粒子の取り込みの数または割合を指す。コアシェルナノ粒子の細胞への進入及びそこから退出のプロセスは、動的なものであるため、効率は、多くのコアシェルナノ粒子を取り込むことにより、または細胞に進入するそれらのコアシェルナノ粒子を長期間保持することにより増加することができる。同様に、効率は、少ないコアシェルナノ粒子を取り込むことにより、または細胞に進入するそれらのコアシェルナノ粒子を短期間保持することにより低下させることができる。

10

【0095】

よって、ヌクレオチド配列は、所望される任意のヌクレオチド配列であってもよく、種々の態様において、コアシェルナノ粒子の細胞取り込み若しくは遺伝子制御の増加または減少のために選択することができる。ヌクレオチド配列は、一部の態様において、コアシェルナノ粒子が細胞によって取り込まれる効率に影響するホモポリマー配列を含む。したがって、ホモポリマー配列は、効率を増加または低下させる。また、種々の態様において、ヌクレオチド配列は、それが決してホモポリマー配列でないように核酸塩基の組み合わせであることも企図される。例えば、非限定的に、種々の態様において、ヌクレオチド配列は、交互になったチミジン及びウリジン残基、2つのチミジンの後に2つのウリジン、または増加した取り込みに影響する任意の組み合わせを含み、本開示によって企図される。一部の態様において、取り込み効率に影響するヌクレオチド配列は、追加の配列を含むポリヌクレオチド中にドメインとして含まれる。この「ドメイン」は、追加のヌクレオチド配列が、例えば、非限定的に、遺伝子発現を制御するのに役立つことになる一方、取り込み効率に影響する特徴として機能するのに役立つことになる。種々の態様において、ポリヌクレオチド中のドメインは、コアに対して、近位、遠位、または中心位置のいずれかであり得る。ポリヌクレオチドが、1つ超のドメインを含むことがまた企図される。

20

【0096】

ホモポリマー配列は、一部の実施形態において、細胞によるコアシェルナノ粒子の取り込みの効率を増加させる。一部の態様において、ホモポリマー配列は、チミジン残基（ポリT）またはウリジン残基（ポリU）の配列を含む。更なる態様において、ポリTまたはポリU配列は、2つのチミジンまたはウリジンを含む。種々の態様において、ポリTまたはポリU配列は、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、約55、約60、約65、約70、約75、約80、約85、約90、約95、約100、約125、約150、約175、約200、約250、約300、約350、約400、約450、約500、またはそれ以上のチミジン若しくはウリジン残基を含む。

30

【0097】

一部の実施形態において、ホモポリマー配列を含むポリヌクレオチドを含むコアシェルナノ粒子が、同じポリヌクレオチドを含むがホモポリマー配列を欠損するコアシェルナノ粒子よりも高い効率で、細胞によって取り込まれることが企図される。種々の態様において、ホモポリマー配列を含むポリヌクレオチドを含むコアシェルナノ粒子は、同じポリヌクレオチドを含むがホモポリマー配列を欠損するコアシェルナノ粒子よりも約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10倍、約20倍、約30倍、約40倍、約50倍、約100倍以上、より効率的に細胞によって取り込まれる。

40

【0098】

他の態様において、ドメインは、リン酸塩ポリマー（C3残基）である。一部の態様において、ドメインは、2つのリン酸から成るリン酸重合体（C3残基）を含む。種々の態

50

様において、C3残基は、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、約55、約60、約65、約70、約75、約80、約85、約90、約95、約100、約125、約150、約175、約200、約250、約300、約350、約400、約450、約500以上のリン酸塩を含む。

【0099】

一部の実施形態において、ドメインを含むポリヌクレオチドを含むコアシェルナノ粒子が、同じポリヌクレオチドを含むがドメインを欠損するコアシェルナノ粒子よりも低い効率で、細胞によって取り込まれることが企図される。種々の態様において、ドメインを含むポリヌクレオチドを含むコアシェルナノ粒子は、同じポリヌクレオチドを含むがドメインを欠損するコアシェルナノ粒子よりも約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10倍、約20倍、約30倍、約40倍、約50倍、約100倍以上、効率が悪く細胞によって取り込まれる。

【0100】

本明細書に使用される、「抱合部位」は、造影剤がそこに付着されるポリヌクレオチド上の部位を意味すると理解される。ある特定の態様において、本開示はまた、コアシェルナノ粒子の一部である1つ以上のポリヌクレオチドが抱合部位を含む一方、抱合部位を含まない同じコアシェルナノ粒子の一部である1つ以上のポリヌクレオチドを提供する。抱合部位を通る造影剤のコアシェルナノ粒子への抱合は、概して、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるPCT/US2010/44844号に記載される。本開示は、一態様において、ポリヌクレオチドを含むコアシェルナノ粒子を提供し、ポリヌクレオチドは、1～約10の抱合部位を含む。別の態様において、ポリヌクレオチドは、5つの抱合部位を含む。一般的に、ヌクレオチドのその骨格（リン酸基）及び核酸塩基の両方が修飾され得る。したがって、本開示は、 $2n$ 抱合部位が存在すると企図し、ここでは、 n = ポリヌクレオチド鑄型の長さである。一部の態様において、コアシェルナノ粒子の複数のポリヌクレオチドは、造影剤が1つ以上の抱合部位を通してそこに結合される少なくとも1つのポリヌクレオチド、ならびに本明細書に記載される遺伝子調節活性を有する少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む。

【0101】

ポリヌクレオチドコピー - 同じ/異なる配列

単一のポリヌクレオチドにおける単一の配列または単一のポリヌクレオチドにおける単一の配列の複数のコピーがコアシェルナノ粒子の一部であるものを含むコアシェルナノ粒子が提供される。よって、種々の態様において、直列している、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上の直列反復の単一の配列の複数のコピーを持つポリヌクレオチドが企図される。

【0102】

代替的に、コアシェルナノ粒子は、異なる配列を有する少なくとも2つのポリヌクレオチドを含む。上記のように、異なるポリヌクレオチド配列は、種々の態様において、直列で（即ち、単一のポリヌクレオチド上に）及び/または複数のコピーで（即ち、少なくとも2つのポリヌクレオチド上に）配列される。異なる配列を有するポリヌクレオチドがコアシェルナノ粒子の一部である方法において、本開示の態様は、異なるポリヌクレオチド配列が同じポリヌクレオチド上の異なる領域とハイブリッド形成するものを含む。代替的に、異なるポリヌクレオチド配列は、異なるポリヌクレオチドとハイブリッド形成する。

【0103】

追加の薬剤

本開示が提供するコアシェルナノ粒子は、任意に追加の薬剤を含む。追加の薬剤は、種々の実施形態において、単純に、コアシェルナノ粒子のシェルを構成している複数のポリヌクレオチドのうちの1つ以上と結合し、かつ/またはコアシェルナノ粒子のタンパク質

10

20

30

40

50

コアと結合する。この追加の薬剤は、一態様において、複数のポリヌクレオチドのうちの1つ以上と共有結合するか、または代替的な態様においては、複数のポリヌクレオチドのうちの1つ以上と非共有結合することが企図される。しかしながら、本開示は、1つ以上の追加の薬剤が複数のポリヌクレオチドのうちの1つ以上と共有的及び非共有的の両方で結合している、コアナノシェル粒子を提供することが理解される。非共有結合は、ハイブリッド形成（即ち、ポリヌクレオチド間）、タンパク質結合（即ち、結合することができるタンパク質間、またはタンパク質とアプタマーとの間）及び/または疎水性相互作用（即ち、脂質と十分に疎水性であるドメインを含む他の薬剤との間）を含むことも理解されることになる。

【0104】

本開示が企図する追加の薬剤としては、ポリヌクレオチド、ペプチド、検出可能なマーカー、リン脂質、オリゴ糖、金属複合体、小分子、造影剤、タンパク質（例えば、治療薬）、抗生物質、標的部分、及びこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。これらの追加の薬剤を本明細書で考察する。

【0105】

治療薬

本明細書に使用される、「治療薬」、「薬物」、または「活性剤」は、治療目的または診断目的に有用な任意の化合物を意味する。本明細書に使用される用語は、状態の治療のために患者に投与される任意の化合物を意味するように理解される。以下で企図される治療薬のいずれもタンパク質である限り、これらのタンパク質はまた、コアシェルナノ粒子の「単一タンパク質」としての使用が企図される。

【0106】

本開示は、送達が所望されるいずれの治療薬にも適用可能である。かかる活性剤及び疎水性薬物の非限定的な例は、全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第7,611,728号に見い出される。使用のために企図されている追加の治療薬は、全体が参照により本明細書に組み込まれる第PCT/US2010/55018号に見い出される。

【0107】

コアシェルナノ粒子が多数の治療薬を含む本明細書に開示のコアシェルナノ粒子及び方法が、種々の実施形態において提供される。一態様において、多数の治療薬がシェル内の1つ以上のポリヌクレオチドとの結合を介して1つのコアシェルナノ粒子に特異的に結合する、組成物及び方法が提供される。別の態様において、これらの多数の治療薬は、1つ超のコアシェルナノ粒子に特異的に結合する。

【0108】

治療薬としては、親水性化合物及び疎水性化合物が挙げられるが、これらに限定されない。

【0109】

タンパク質治療薬としては、異常な発現が1つ以上の障害をもたらす、ペプチド、酵素、構造タンパク質、受容体、及び他の細胞内または血中タンパク質、ならびにその断片及び誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。また治療薬としては、1つの特定の実施形態として、化学療法剤が挙げられる。また治療薬としては、種々の実施形態において、放射性物質が挙げられる。

【0110】

種々の態様において、タンパク質治療薬としては、サイトカインまたは造血因子が挙げられ、IL-1アルファ、IL-1ベータ、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-11、コロニー刺激因子-1(CSF-1)、M-CSF、SCF、GM-CSF、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、インターフェロン-アルファ(IFN-アルファ)、コンセンサスインターフェロン、IFN-ベータ、IFN-ガンマ、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、エリスロポエチン(EPO)、トロン

10

20

30

40

50

ボポエチン (T P O)、アンジオポイエチン、例えば、A n g - 1、A n g - 2、A n g - 4、A n g - Y、ヒトアンジオポイエチン様ポリペプチド、血管内皮増殖因子 (V E G F)、アンジオジェニン、骨形態形成タンパク質 - 1、骨形態形成タンパク質 - 2、骨形態形成タンパク質 - 3、骨形態形成タンパク質 - 4、骨形態形成タンパク質 - 5、骨形態形成タンパク質 - 6、骨形態形成タンパク質 - 7、骨形態形成タンパク質 - 8、骨形態形成タンパク質 - 9、骨形態形成タンパク質 - 10、骨形態形成タンパク質 - 11、骨形態形成タンパク質 - 12、骨形態形成タンパク質 - 13、骨形態形成タンパク質 - 14、骨形態形成タンパク質 - 15、骨形態形成タンパク質受容体 I A、骨形態形成タンパク質受容体 I B、脳由来神経栄養因子、毛様体神経栄養因子、毛様体神経栄養因子受容体、サイトカイン誘導性好中球走化因子 1、サイトカイン誘導性好中球、化学走化性因子 2、
 サイトカイン誘導性好中球走化性因子 2、
 内皮細胞成長因子、エンドセリン 1、上皮性増殖因子、上皮由来好中球誘引物質、線維芽細胞増殖因子 4、線維芽細胞増殖因子 5、線維芽細胞増殖因子 6、線維芽細胞増殖因子 7、線維芽細胞増殖因子 8、線維芽細胞増殖因子 8 b、線維芽細胞増殖因子 8 c、線維芽細胞増殖因子 9、線維芽細胞増殖因子 10、酸性線維芽細胞増殖因子、塩基性線維芽細胞増殖因子、グリア細胞株由来神経栄養因子受容体 1、グリア細胞株由来神経栄養因子受容体 2、増殖関連タンパク質、増殖関連タンパク質、増殖関連タンパク質、ヘパリン結合上皮性増殖因子、肝細胞増殖因子、肝細胞増殖因子受容体、インスリン様増殖因子 I、インスリン様増殖因子受容体、インスリン様増殖因子 I I、インスリン様増殖因子結合タンパク質、ケラチン生成増殖因子、白血病抑制因子、白血病抑制因子受容体、神経増殖因子、神経増殖因子受容体、ニューロトロフィン - 3、ニューロトロフィン - 4、胎盤増殖因子、胎盤増殖因子 2、血小板由来内皮細胞成長因子、血小板由来増殖因子、血小板由来増殖因子 A 鎖、血小板由来増殖因子 A A、血小板由来増殖因子 A B、血小板由来増殖因子 B 鎖、血小板由来増殖因子 B B、血小板由来増殖因子受容体、血小板由来増殖因子受容体、プレ B 細胞沿増殖刺激因子、幹細胞因子受容体、T N F 0、T N F 1、T N F 2 を含む T N F、形質転換増殖因子、形質転換増殖因子、形質転換増殖因子 1、形質転換増殖因子 1 . 2、形質転換増殖因子 2、形質転換増殖因子 3、形質転換増殖因子 5、潜在性形質転換増殖因子 1、形質転換増殖因子結合タンパク質 I、形質転換増殖因子結合タンパク質 I I、形質転換増殖因子結合タンパク質 I I I、腫瘍壊死因子受容体 I 型、腫瘍壊死因子受容体 I I 型、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子受容体、血管内皮増殖因子、及びキメラタンパク質、ならびにこれらの生物学的または免疫学的に活性な断片を含むが、これらに限定されない。生物剤の例としては、サイトカインなどの免疫調節タンパク質、腫瘍抗原に対するモノクローナル抗体、腫瘍抑制遺伝子、及び癌ワクチンが挙げられるが、これらに限定されない。本発明の組成物及び方法と併用され得るインターロイキンの例としては、インターロイキン 2 (I L - 2)、及びインターロイキン 4 (I L - 4)、インターロイキン 12 (I L - 12) が挙げられるが、これらに限定されない。サイトカイン以外の他の免疫調節剤としては、カルメットゲラン桿菌、レバミゾール、及びオクトレオチドが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 1 1 1 】

本開示に記載されるように、一部の態様において、治療薬は小分子を含む。「小分子」という用語は、本明細書に使用される場合、化合物、例えば、任意に誘導体化され得るペプチド模倣薬、または天然若しくは合成のいずれかである任意の他の低分子量有機化合物を指す。かかる小分子は、治療的に送達可能な物質であってもよく、または送達を促進するように更に誘導体化されてもよい。

【 0 1 1 2 】

「低分子量」によって、1000ダルトン未満、典型的に、300~700ダルトンの分子量を有する化合物が意味される。低分子量化合物は、種々の態様において、約100、約150、約200、約250、約300、約350、約400、約450、約500、約550、約600、約650、約700、約750、約800、約850、約900、または約1000ダルトンである。

【0113】

「薬物らしい分子」という用語は、当該技術分野で周知であり、医学的使用、例えば、非限定的に、医薬品中の活性剤として好適とする特徴を有する化合物の意味を含む。よって、例えば、非限定的に、薬物らしい分子は、有機化学の技法によってまたは分子生物学若しくは生化学の技法によって合成される分子であり、一部の態様においては、本明細書に定義される小分子である。薬物らしい分子は、種々の態様において、特定のタンパク質（単数または複数）と選択的に相互作用する特徴を更に呈し、生体可用性であり、かつ／あるいは、単独でまたは本開示の組成物または方法と組み合わせて、細胞膜を貫通することができる。

【0114】

種々の実施形態において、米国特許第7,667,004号（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている治療薬が、本明細書に開示の組成物及び方法における使用に対して企図され、アルキル化剤、抗生物質剤、代謝拮抗剤、ホルモン剤、植物性薬剤、及び生物剤が挙げられるが、これらに限定されない。

【0115】

アルキル化剤の例としては、ビスクロロエチルアミン（ナイトロジェンマスタード、例えば、クロラムブシル、シクロホスファミド、イホスファミド、メクロレタミン、メルファラン、ウラシルマスタード）、アジリジン（例えば、チオテパ）、アルキルアルコンスルホネート（例えば、ブスルファン）、ニトロソウレア（例えば、カルムスチン、ロムスチン、ストレプトゾシン）、非古典型アルキル化剤（アルトレタミン、ダカルバジン、及びプロカルバジン）、白金化合物（例えば、カルボプラスチン（carboplastin）、シスプラチン及び白金（IV）（Pt（IV）））が挙げられるが、これらに限定されない。

【0116】

抗生物質剤の例としては、アントラサイクリン（例えば、ドキソルビシン、ダウノルビシン、エピルビシン、イダルビシン、及びアントラセンジオン）、マイトマイシンC、ブレオマイシン、ダクチノマイシン、ピリカトマイシン（plicatomycin）が挙げられるが、これらに限定されない。追加の抗生物質剤を以下で詳細に考察する。

【0117】

代謝拮抗剤の例としては、フルオロウラシル（5-FU）、フロクスウリジン（5-FUdR）、メトトレキサート、ロイコボリン、ヒドロキシウレア、チオグアニン（6-TG）、メルカプトプリン（6-MP）、シタラビン、ペントスタチン、リン酸フルダラビン、クラドリビン（2-CDA）、アスパラギナーゼ、メシル酸イマチニブ（またはGLEEVEC（登録商標））、及びゲムシタピンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0118】

ホルモン剤の例としては、合成エストロゲン（例えば、ジエチルスチベストロール（diethylstilbestrol））、抗エストロゲン剤（例えば、タモキシフェン、トレミフェン、フルオキシメステロール（fluoxymesterol））、及びラロキシフェン）、抗アンドロゲン剤（ビカルタミド、ニルタミド、フルタミド）、アロマターゼ阻害剤（例えば、アミノグルテチミド、アナストロゾール、及びテトラゾール）、ケトコナゾール、酢酸ゴセレリン、ロイプロリド、酢酸メゲストロール、及びミフェプリストンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0119】

植物性薬剤の例としては、ピンカアルカロイド（例えば、ピンクリスチン、ピンプラスチン、ピンデシン、ピンゾリジン、及びピノレルピン）、ポドフィロトキシン（例えば、エトポシド（VP-16）及びテニポシド（VM-26））、カンプトテシン化合物（例えば、20（S）カンプトテシン、トポテカン、ルビテカン、及びイリノテカン）、タキサン（例えば、パクリタキセル及びドセタキセル）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0120】

10

20

30

40

50

使用が企図されている化学療法剤としては、非限定的にアルキル化剤が挙げられ、ナイトロジェンマスタード、例えば、メクロレタミン、シクロホスファミド、イホスファミド、メルファラン、及びクロラムブシル；ニトロソウレア、例えば、カルムスチン（BCNU）、ロムスチン（CCNU）、及びセムスチン（メチル-CCNU）；エチレンイミン/メチルメラミン、例えば、トリエチレンメラミン（TEM）、トリエチレン、チオホスホルアミド（チオテパ）、ヘキサメチルメラミン（HMM、アルトレタミン）；スルホン酸アルキル、例えば、ブスルファン；トリアジン、例えば、ダカルバジン（DTIC）；葉酸類似体、例えば、メトトレキサート及びトリメトトレキサート、ピリミジン類似体、例えば、5-フルオロウラシル、フルオロデオキシウリジン、ゲムシタピン、シトシンアラビノシド（AraC、シトラピン）、5-アザシチジン、2,2'-ジフルオロデオキシシチジン、プリン類似体、例えば、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、アザチオプリン、2'-デオキシコホルマイシン（ペントスタチン）、エリスロヒドロキシニルアデニン（EHNA）、リン酸フルダラビン、及び2-クロロデオキシアデノシン（クラドリビン、2-CD A）を含む代謝拮抗物質薬；細胞分裂抑制薬、例えば、パクリタキセル、ビンブラスチン（VLB）、ビンクリスチン、及びビノレルピンを含むピンカアルカロイド、タキソテル、エストラムスチン、ならびにリン酸エストラムスチンを含む天然産物；エピポドフィロトキシシン、例えば、エトポシド及びテニポシド；抗生物質、例えば、アクチモマイシン（actinomycin）D、ダウノマイシン（ルビモマイシン）、ドキシソルピシン、ミトキサントロン、イダルビシン、ブレオマイシン、プリカマイシン（ミトラマイシン）、マイトマイシC、及びアクチノマイシン；酵素、例えば、L-アスパラギナーゼ；生体応答修飾物質、例えば、インターフェロン-アルファ、IL-2、G-CSF、及びGM-CSF；白金配位複合体、例えば、シスプラチン、Pt（IV）、及びカルボプラチン、アントラセンジオン、例えば、ミトキサントロン、置換尿素、例えば、ヒドロキシウレア、N-メチルヒドラジン（MIH）及びプロカルバジンを含むメチルヒドラジン誘導体、副腎皮質抑制剤、例えば、ミトタン（o,p'-DDD）及びアミノグルテチミドを含む、様々な薬剤；副腎皮質ステロイド拮抗薬、例えば、プレドニゾン及び等価物、デキサメタゾン、ならびにアミノグルテチミドを含む、ホルモン及び拮抗薬；プロゲステロン、例えば、カプロン酸ヒドロキシプロゲステロン、酢酸メドロキシプロゲステロン、及び酢酸メゲストロール；エストロゲン、例えば、ジエチルスチルベストロール及びエチニルエストラジオール等価物；抗エストロゲン、例えば、タモキシフェン；プロピオン酸テストステロン及びフルオキシメステロン/等価物を含むアンドロゲン；抗アンドロゲン、例えば、フルタミド、ゴナドトロピン放出ホルモン類似体及びロイプロリド；ならびに非ステロイド系抗アンドロゲン、例えば、フルタミドを含む。

【0121】

マーカー/標識

本明細書に記載される、タンパク質、ポリヌクレオチド、または追加の薬剤は、種々の態様において、任意に検出可能な標識を含む。したがって、本開示は、複合体形成が検出可能な変化によって検出される組成物及び方法を提供する。一態様において、複合体形成は、肉眼で、または分光学的に観察される色の変化を生じさせる。

【0122】

生体分子複合体形成から生じる検出可能な変化を可視化するための方法はまた、非限定的に、蛍光顕微鏡法、マイクロタイタープレートリーダー、または蛍光励起細胞分取器（FACS）を含む、任意の蛍光検出法を含む。

【0123】

本開示によって企図される標識は、本明細書に記載されるフルオロフォアのいずれか、ならびに当技術分野で知られている他の検出可能な標識を含むことが理解されるであろう。例えば、標識にはまた、レドックスアクティブプローブ（redox active probe）、化学発光分子、放射性標識、色素、蛍光分子、リン光分子、以下に記載されるイメージング剤及び/または造影剤、量子ドット、ならびに分光学的手法を使用して検出され得る任意のマーカー、即ち、顕微鏡法及び細胞数測定を使用して検出可能なそれ

10

20

30

40

50

らのマーカーが挙げられるが、これらに限定されない。検出可能な標識が検出される本開示の態様において、本開示は、任意の発光、蛍光、若しくはリン光分子または粒子が、貴金属表面によって効率的に反応停止されることを提供する。したがって、分子の各型は、開示される組成物及び方法での使用が企図される。

【0124】

蛍光分子で生体分子を標識化し、蛍光を測定する方法は、当該技術分野で周知である。

【0125】

好適な蛍光分子もまた当技術分野でよく知られており、限定することなく、1, 8 - ANS (1 - アニリノナフタレン - 8 - スルホン酸)、1 - アニリノナフタレン - 8 - スルホン酸 (1, 8 - ANS)、5 - (及び - 6) - カルボキシ - 2', 7' - ジクロロフルオレセイン pH 9.0、5 - FAM pH 9.0、5 - ROX (5 - カルボキシ - X - ローダミン、トリエチルアンモニウム塩)、5 - ROX pH 7.0、5 - TAMRA、5 - TAMRA pH 7.0、5 - TAMRA - MeOH、6 JOE、6, 8 - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 4 - メチルクマリン pH 9.0、6 - カルボキシローダミン 6 G pH 7.0、6 - カルボキシローダミン 6 G、塩酸塩、6 - HEX、SE pH 9.0、6 - TET、SE pH 9.0、7 - アミノ - 4 - メチルクマリン pH 7.0、7 - ヒドロキシ - 4 - メチルクマリン、7 - ヒドロキシ - 4 - メチルクマリン pH 9.0、Alexa 350、Alexa 405、Alexa 430、Alexa 488、Alexa 532、Alexa 546、Alexa 555、Alexa 568、Alexa 594、Alexa 647、Alexa 660、Alexa 680、Alexa 700、Alexa Fluor 430 抗体抱合体 pH 7.2、Alexa Fluor 488 抗体抱合体 pH 8.0、Alexa Fluor 488 ヒドラジド - 水、Alexa Fluor 532 抗体抱合体 pH 7.2、Alexa Fluor 555 抗体抱合体 pH 7.2、Alexa Fluor 568 抗体抱合体 pH 7.2、Alexa Fluor 610R - フィコエリトリンストレプトアビジン pH 7.2、Alexa Fluor 647 抗体抱合体 pH 7.2、Alexa Fluor 647R - フィコエリトリンストレプトアビジン pH 7.2、Alexa Fluor 660 抗体抱合体 pH 7.2、Alexa Fluor 680 抗体抱合体 pH 7.2、Alexa Fluor 700 抗体抱合体 pH 7.2、アロフィコシアニン pH 7.5、AMCA 抱合体、アミノクマリン、APC (アロフィコシアニン)、Atto 647、BCECF pH 5.5、BCECF pH 9.0、BFP (青蛍光タンパク質)、BO - PRO - 1 - DNA、BO - PRO - 3 - DNA、BOBO - 1 - DNA、BOBO - 3 - DNA、ボディパイ 650 / 665 - X、MeOH、ボディパイ FL 抱合体、ボディパイ FL、MeOH、ボディパイ R 6 G SE、ボディパイ R 6 G、MeOH、ボディパイ TMR - X 抗体抱合体 pH 7.2、ボディパイ TMR - X 抱合体、ボディパイ TMR - X、MeOH、ボディパイ TMR - X、SE、ボディパイ TR - X ファラシジン pH 7.0、ボディパイ TR - X、MeOH、ボディパイ TR - X、SE、BOPRO - 1、BOPRO - 3、カルセイン、カルセイン pH 9.0、カルシウムクリムゾン、カルシウムクリムゾン Ca²⁺、カルシウムグリーン、カルシウムグリーン - 1 Ca²⁺、カルシウムオレンジ、カルシウムオレンジ Ca²⁺、カルボキシナフトフルオレセイン pH 10.0、カスケードブルー、カスケードブルー - BSA pH 7.0、カスケードイエロー、カスケードイエロー抗体抱合体 pH 8.0、CFDA、CFP (シアン蛍光タンパク質)、CI - NERF pH 2.5、CI - NERF pH 6.0、シトリン、クマリン、Cy 2、Cy 3、Cy 3.5、Cy 5、Cy 5.5、Cy QUANTGR - DNA、ダンシルカダベリン、ダンシルカダベリン、MeOH、DAPI、DAPI - DNA、ダポキシル (Dapoxyl) (2 - アミノエチル) スルホンアミド、DDAO pH 9.0、Di - 8 ANEPPS、Di - 8 - ANEPPS - 脂質、Di I、Di O、DM - NERF pH 4.0、DM - NERF pH 7.0、Ds レッド、DTAF、dToma to、eCFP (高感度シアン蛍光タンパク質)、eGFP (高感度緑蛍光タンパク質)、エオシン、エオシン抗体抱合体 pH 8.0、エリスロシン - 5 - イソチオシアン酸塩 pH 9.0、エチジウム臭化物、エチジウムホモ二量体、エチジウムホモ二量体 - 1 - DNA、eYFP (高感度黄色蛍光タンパク質)

、FDA、FITC、FITC抗体抱合体pH8.0、FlAsH、Fluo-3、Fluo-3Ca²⁺、Fluo-4、フルオロ(Fluor)-ルビー、フルオレセイン、フルオレセイン0.1M NaOH、フルオレセイン抗体抱合体pH8.0、フルオレセインデキストランpH8.0、フルオレセインpH9.0、フルオロ-エメラルド、FM1-43、FM1-43脂質、FM4-64、FM4-64、2%CHAPS、FuraレッドCa²⁺、Furaレッド、高Ca、Furaレッド、低Ca、Fura-2Ca²⁺、Fura-2、高Ca、Fura-2、Caなし、GFP(S65T)、Hcレッド、ヘキスト33258、ヘキスト33258-DNA、ヘキスト33342、Indo-1Ca²⁺、Indo-1、Caを含まない、Indo-1、Ca飽和、JC-1、JC-1pH8.2、リサミンローダミン、LOLO-1-DNA、ルシファーイエロー、CH、ライソセンサー(LysoSensor)ブルー、ライソセンサーブルーpH5.0、ライソセンサーグリーン、ライソセンサーグリーンpH5.0、ライソセンサーイエローpH3.0、ライソセンサーイエローpH9.0、ライソトラッカー(LysoTracker)ブルー、ライソトラッカーグリーン、ライソトラッカーレッド、マグネシウムグリーン、マグネシウムグリーンMg²⁺、マグネシウムオレンジ、マリーナブルー、mBanana、mCherry、mHoneydew、ミトトラッカー(MitoTracker)グリーン、ミトトラッカーグリーンFM、MeOH、ミトトラッカーオレンジ、ミトトラッカーオレンジ、MeOH、ミトトラッカーレッド、ミトトラッカーレッド、MeOH、mOrange、mPlum、mRFP、mStrawberry、mTangerine、NBD-X、NBD-X、MeOH、NeuroTrace500/525、緑蛍光ニッスル染色-RNA、ナイルブルー、EtOH、ナイルレッド、ナイルレッド-脂質、ニッスル、オレゴングリーン488、オレゴングリーン488抗体抱合体pH8.0、オレゴングリーン514、オレゴングリーン514抗体抱合体pH8.0、パシフィックブルー、パシフィックブルー抗体抱合体pH8.0、フィコエリトリン、ピコグリーンdsDNA定量化試薬、PO-PRO-1、PO-PRO-1-DNA、PO-PRO-3、PO-PRO-3-DNA、POPO-1、POPO-1-DNA、POPO-3、ヨウ化プロピジウム、ヨウ化プロピジウム-DNA、R-フィコエリトリンpH7.5、ReAsH、レゾルフィン、レゾルフィンpH9.0、Rhod-2、Rhod-2Ca²⁺、ローダミン、ローダミン110、ローダミン110pH7.0、ローダミン123、MeOH、ローダミングリーン、ローダミンファロイジンpH7.0、ローダミンレッド-X抗体抱合体pH8.0、ローダミンネン(Rhodaminen)グリーンpH7.0、Rhodolグリーン抗体抱合体pH8.0、サファイア、SBFI-Na⁺、ナトリウムグリーンNa⁺、スルホローダミン101、EtOH、SYBRグリーンI、SYPROルビー、SYTO13-DNA、SYTO45-DNA、SYTOXブルー-DNA、テトラメチルローダミン抗体抱合体pH8.0、テトラメチルローダミンデキストランpH7.0、テキサスレッド-X抗体抱合体pH7.2、TO-PRO-1-DNA、TO-PRO-3-DNA、TOTO-1-DNA、TOTO-3-DNA、TRITC、X-Rhod-1Ca²⁺、YO-PRO-1-DNA、YO-PRO-3-DNA、YOYO-1-DNA、ならびにYOYO-3-DNAを含む。

10

20

30

40

【0126】

一部の態様において蛍光タンパク質が使用されることも本開示によって企図される。当該技術分野で既知のいずれのタンパク質も本開示の方法において有用であり、一部の態様において、これは蛍光タンパク質であり、EGFP、ECFP、及びEYFPを含むが、これらに限定されない。

【0127】

造影剤

種々の態様において、コアシェルナノ粒子を含む方法及び組成物が本明細書で開示され、ここでポリヌクレオチドは、抱合部位を介して造影剤に抱合される。更なる態様において、造影剤は、本明細書に記載のタンパク質または追加の薬剤に抱合される。本明細書で使用される、「造影剤」は、様々な器官及び組織の見かけ密度の差を生成させ、描かれ

50

た隣接する体組織及び器官の観察をより容易にするために、細胞に導入される化合物または他の物質である。

【0128】

一部の実施形態において、造影剤は、ガドリニウム、キセノン、酸化鉄、マンガンキレート (Mn-DPDP)、及び銅から成る群から選択される。よって、一部の実施形態において、造影剤は常磁性化合物であり、一部の態様において、常磁性化合物はガドリニウムである。

【0129】

ある特定の実施形態において、造影剤は、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{18}F 、 ^{64}Cu 、 ^{68}Ge 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、及び ^{82}Ru から成る群から選択される標識を含む陽電子放出断層撮影法 (PET) 造影剤を含む。特定の実施形態において、造影剤は、 ^{11}C コリン、 ^{11}C フルオロデオキシグルコース (FDG)、 ^{11}C メチオニン、 ^{11}C コリン、 ^{11}C アセテート、 ^{18}F フルオロコリン、 ^{64}Cu キレート、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ キレート、及び ^{18}F ポリエチレングリコールスチルベンから成る群から選択される PET 造影剤である。

10

【0130】

本開示はまた、PET 造影剤がポリヌクレオチド合成プロセス中にポリヌクレオチド内に導入されるか、あるいはポリヌクレオチド合成後にヌクレオチドに抱合される方法を提供する。例えば、限定することなく、リン原子のうちの一つが ^{32}P または ^{33}P と置換される、リン酸基中の酸素原子のうちの一つが ^{35}S と置換される、または水素原子のうちの一つ以上が ^3H と置換されるヌクレオチドが合成され得る。放射性核種を含有する官能基はまた、抱合部位を介してヌクレオチドに抱合され得る。

20

【0131】

MRI 造影剤には、ポジティブ造影剤及び/またはネガティブ造影剤が挙げられるが、これらに限定されない。ポジティブ造影剤は、 T_1 緩和時間の減少 (T_1 加重画像に対するシグナル強度の増加) を引き起こす。それら (MRI 上で明るく見えるもの) は、典型的に、活性元素としてガドリニウム、マンガン、または鉄を含有する小分子量化合物である。特殊な群のネガティブ造影剤 (MRI 上で暗く見えるもの) には、パーフルオロカーボン (パーフルオロ化学薬品) が挙げられ、これは、その存在が MRI イメージングにおいてシグナルに關与する水素原子を排除するためである。

30

【0132】

本開示の組成物は、種々の態様において、約 50 ~ 約 2.5×10^6 の造影剤を含むコアシェルナノ粒子を含むように企図される。一部の実施形態において、コアシェルナノ粒子は約 500 ~ 約 1×10^6 の造影剤を含む。

【0133】

標的化部分

「標的化部分」という用語は、本明細書で使用される場合、特定の標的、標的領域への結合、あるいはそこへの限局化、標的細胞 (複数可) への進入、または標的受容体への結合において、化合物または他の分子を支援する任意の分子構造を指す。例えば、非限定的に、標的化部分はタンパク質を含んでもよく、所望の標的部位に生体内または生体外で結合することができる抗体及びタンパク質断片、ペプチド、小分子、抗癌剤、ポリヌクレオチド結合剤、炭水化物、細胞表面受容体のためのリガンド、アプタマー、脂質 (カチオン性、中性、及びステロイド性脂質、ピロソーム、及びリボソームを含む)、抗体、レクチン、リガンド、糖、ステロイド、ホルモン、及び栄養素が挙げられ、標的化部分として機能し得る。標的化部分は、コアシェルナノ粒子の特異細胞型及び/または器官、ならびに細胞内位置への送達に有用である。

40

【0134】

一部の実施形態において、標的化部分はタンパク質である。本開示の組成物のタンパク質部分は、一部の態様において、コアシェルナノ粒子を標的細胞に標的化することができるタンパク質である。本開示の標的化タンパク質は、受容体、基質、抗原決定基、または

50

標的細胞上の他の結合部位若しくは他の標的部位に結合することができる。

【0135】

標的化タンパク質として有用な抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナルであり得る。特異型の細胞に結合する多くのモノクローナル抗体(MAb)が開発されている。遺伝子工学またはタンパク質工学によって派生した抗体も、同様に使用され得る。

【0136】

本開示において標的化薬剤として使用される抗体は、無傷分子、その断片、またはその機能等価物であり得る。本開示の組成物において有用な抗体断片の例は、これらは従来の方法によって、または遺伝子若しくはタンパク質工学によって生成され得るF(ab')₂、Fab'Fab、及びFv断片である。

10

【0137】

一部の実施形態において、コアシェルナノ粒子のポリヌクレオチド部分は、追加のまたは補助的な標的化部分として機能し得る。ポリヌクレオチド部分は、細胞外標的化を支援するように、または細胞内の標的化部分として機能するように選択または設計され得る。つまり、ポリヌクレオチド部分は、標的細胞を探し求めるDNAプローブとして機能し得る。一部の実施形態において、この追加の標的化能力は、組成物の標的細胞への送達における特異性を改善するのに役立つであろう。ポリヌクレオチドは、更にまたは代替的に、標的細胞内の組成物を標的とするように選択または設計され得るが、一方、標的化タンパク質は、抱合体を細胞外で標的とする。

【0138】

標的化部分は、種々の実施形態において、コアシェルナノ粒子と結合され得ることが企図される。したがって、一部の態様において、標的化部分は、コアシェル粒子のタンパク質、コアシェルナノ粒子のポリヌクレオチド、またはその両方のいずれかに結合されることが企図される。

20

【0139】

リン脂質

本開示は、リン脂質を含むコアシェルナノ粒子も企図する。リン脂質生体分子は、ある特定の態様において、任意のスペーサー構成要素を含む。

【0140】

本開示は、脂質及びリン脂質由来のホルモンを企図し、これらの化合物は、リノール酸及びアラキドン酸などの脂質ならびにリン脂質に由来する。主なクラスは、コレステロール及びエイコサノイドに由来するステロイドホルモンである。

30

【0141】

金属複合体

本明細書に使用される、「金属複合体」は、金属を指し、本明細書に記載の白金化合物、ゲルマニウム(IV)、チタニウム(IV)、スズ(IV)、ルテニウム(III)、金(III)、及び銅(II)が挙げられるが、これらに限定されない。金属複合体は、任意に、本明細書に記載のスペーサーを含む。

【0142】

オリゴ糖

オリゴ糖は、約2～約10個の単糖、またはそれ以上のアルファ若しくはベータグリコシド結合のいずれかによって接続している単糖を含むいずれかの炭水化物も含む。オリゴ糖は、遊離形態及び結合形態の両方で自然に広く見られる。オリゴ糖は、任意に、本明細書で上に記載したスペーサーを含む。

40

【0143】

無機ナノ粒子

本開示は、金属ナノ粒子を含む組成物を企図する。よって、米国特許出願第20030147966号に記載されているように、金属、半導体物質、またはセラミックが挙げられるがこれらに限定されない、種々の無機物質を含む、ナノ粒子が企図される。例えば、金属ベースのナノ粒子としては、本明細書に記載のナノ粒子が挙げられる。セラミックナ

50

ノ粒子物質としては、ブラッシュ石、リン酸三カルシウム、アルミナ、シリカ、及びジルコニアが挙げられるが、これらに限定されない。ナノ粒子が産出される有機物質としては、炭素が挙げられる。ナノ粒子重合体としては、ポリスチレン、シリコーンゴム、ポリカーボネート、ポリウレタン、ポリプロピレン、ポリメチルメタクリレート、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリエーテル、及びポリエチレンが挙げられる。ナノ粒子の産出に使用するための生分解性の生重合体（例えば、BSAなどポリペプチド、多糖等）、他の生体物質（例えば、炭水化物）、及びノまたは重合化合物も企図される。

【0144】

一部の実施形態において、ナノ粒子は金属性であり、種々の態様において、ナノ粒子はコロイド性金属である。よって、種々の実施形態において、本方法の実施において有用なナノ粒子は、金属（例えば、金、銀、白金、アルミニウム、パラジウム、銅、コバルト、鉄、インジウム、ニッケル、またはナノ粒子形成に適した任意の他の金属が挙げられるが、これらに限定されない）、半導体（例えば、CdSe、CdS、及びCdSまたはZnSでコーティングされるCdSeが挙げられる、これらに限定されない）、及び磁性（例えば、強磁性）コロイド性物質が挙げられる。本発明の実施において有用な他のナノ粒子としては、ZnS、ZnO、Ti、TiO₂、Sn、SnO₂、Si、SiO₂、Fe、Fe⁺⁴、Fe₃O₄、Fe₂O₃、Ag、Cu、Ni、Al、鋼、コバルト-クロム合金、Cd、チタン合金、AgI、AgBr、HgI₂、PbS、PbSe、ZnTe、CdTe、In₂S₃、In₂Se₃、Cd₃P₂、Cd₃As₂、InAs、及びGaAsが挙げられるが、同様にこれに限定されない。ZnS、ZnO、TiO₂、AgI、AgBr、HgI₂、PbS、PbSe、ZnTe、CdTe、In₂S₃、In₂Se₃、Cd₃P₂、Cd₃As₂、InAs、及びGaAsナノ粒子を作製する方法は、当該技術分野でも既知である。例えば、Weller, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 32, 41 (1993)、Henglein, Top. Curr. Chem., 143, 113 (1988)、Henglein, Chem. Rev., 89, 1861 (1989)、Brus, Appl. Phys. A., 53, 465 (1991)、Bahncmann, in Photochemical Conversion and Storage of Solar Energy (eds. Pelizzetti and Schiavello 1991), page 251、Wang and Herron, J. Phys. Chem., 95, 525 (1991)、Olshavsky, et al., J. Am. Chem. Soc., 112, 9438 (1990)、Ushida et al., J. Phys. Chem., 95, 5382 (1992)を参照されたい。

【0145】

金属、半導体、及び磁性ナノ粒子を作製する方法は、当該技術分野で周知である。例えば、Schmid, G. (ed.) Clusters and Colloids (VCH, Weinheim, 1994)、Hayat, M. A. (ed.) Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications (Academic Press, San Diego, 1991)、Massart, R., IEEE Transactions On Magnetics, 17, 1247 (1981)、Ahmadi, T. S. et al., Science, 272, 1924 (1996)、Henglein, A. et al., J. Phys. Chem., 99, 14129 (1995)、Curtis, A. C., et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 27, 1530 (1988)を参照されたい。調製されるポリアルキルシアノアクリレートナノ粒子の調製は、Fattal, et al., J. Controlled Release (1998) 53: 137-143、及び米国特許第4,489,055号に記載されている。ポリ(D-グルカルアミドアミン(glucaramidoamine))を含むナノ粒子を作製するための方法は、Liu, et al., J. Am. Chem. Soc. (2004) 126: 7422-7423に記載されている。重合メチルメタクリレート(MMA)を含むナ

10

20

30

40

50

ノ粒子の調製は、Tondelli, et al., Nucl. Acids Res. (1998) 26: 5425-5431に記載され、デンドリマーノ粒子の調製は、例えば、Kukowska-Latallo, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996) 93: 4897-4902 (星形ポリアミドアミンデンドリマー)に記載されている。

【0146】

米国特許出願第20030147966号に記載されているように、本明細書に記載の物質を含むナノ粒子は、例えば、Ted Pella, Inc. (金)、Amersham Corporation (金)、及び Nanoprobe, Inc. (金) から市販されており、あるいは本ナノ粒子は、溶液中の進行性核形成から (例えば、コロイド反応により)、またはスパッタ蒸着法等の種々の物理及び化学蒸着プロセスにより、産出され得る。例えば、Hayashi, (1987) Vac. Sci. Technol. July/August 1987, A5(4): 1375-84、Hayashi, (1987) Physics Today, December 1987, pp. 44-60、MRS Bulletin, January 1990, pgs. 16-47を参照されたい。

10

【0147】

米国特許出願第20030147966号に更に記載されているように、企図されるナノ粒子は、当該技術分野で既知の方法を使用して、 HAuCl_4 及びクエン酸還元剤を使用して産出される。例えば、Marinakos et al., (1999) Adv. Mater. 11: 34-37、Marinakos et al., (1998) Chem. Mater. 10: 1214-19、Enustun & Turkevich, (1963) J. Am. Chem. Soc. 85: 3317を参照されたい。分散凝集粒径が約140nmの酸化錫ナノ粒子は、日本の千葉県のVacuum Metallurgical Co., Ltd.から市販されている。種々の組成及びサイズ展開の他の市販のナノ粒子は、例えば、カリフォルニア州バーリンゲームのVector Laboratories, Inc.から入手可能である。

20

【0148】

種々の態様において、提供される組成物及び方法は、大きさが、平均直径約1nm~約250nm、平均直径約1nm~約240nm、平均直径約1nm~約230nm、平均直径約1nm~約220nm、平均直径約1nm~約210nm、平均直径約1nm~約200nm、平均直径約1nm~約190nm、平均直径約1nm~約180nm、平均直径約1nm~約170nm、平均直径約1nm~約160nm、平均直径約1nm~約150nm、平均直径約1nm~約140nm、平均直径約1nm~約130nm、平均直径約1nm~約120nm、平均直径約1nm~約110nm、平均直径約1nm~約100nm、平均直径約1nm~約90nm、平均直径約1nm~約80nm、平均直径約1nm~約70nm、平均直径約1nm~約60nm、約1nm~約50nm、平均直径約1nm~約40nm、平均直径約1nm~約30nm、または平均直径約1nm~約20nm、平均直径約1nm~約10nmの範囲であるナノ粒子を利用するものを含む。他の態様において、ナノ粒子の大きさは、約5nm~約150nm (平均直径)、約5~約50nm、約10~約30nmである。ナノ粒子の大きさは、約5nm~約150nm (平均直径)、約30~約100nm、約40~約80nmである。本方法に使用されるナノ粒子の大きさは、それらの特定の使用または用途に応じて変動する。大きさの変動は、ナノ粒子のある特定の物理的特徴、例えば、本明細書に記載されるように誘導体化することができる、光学特性または表面積の量を最適化するように有利に使用される。

30

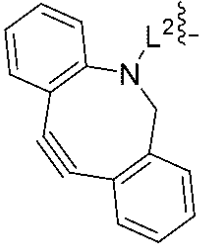
40

【0149】

コアシェルナノ粒子合成

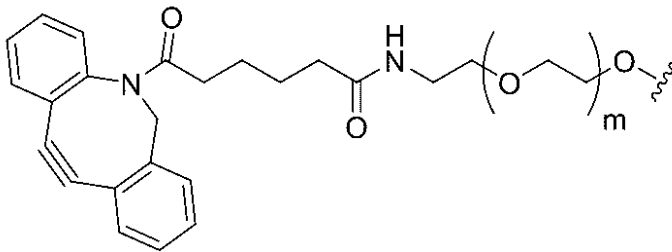
ポリヌクレオチドは、アルキン部分、例えば、タンパク質表面のアジドとの反応のためのDBC O型部分によって末端にて修飾され得、

【化4】



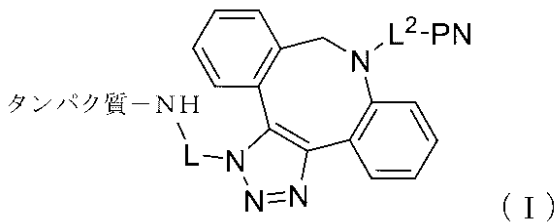
式中、Lは、ポリヌクレオチドの末端へのリンカーである。L²は、C₁-10アルキレン、-C(O)-C₁-10アルキレン-Y-、及び-C(O)-C₁-10アルキレン-Y-C₁-10アルキレン-(OCH₂CH₂)_m-Y-であることができ、式中、Yは、独立して、結合、C(O)、O、NH、C(O)NH、及びNH₂C(O)から成る群から選択され、mは、0、1、2、3、4、または5である。例えば、DBCO官能基は、構造

【化5】



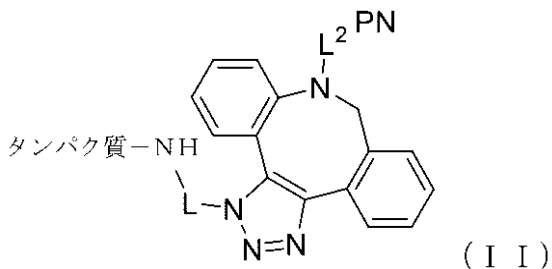
を有するリンカーを介して結合し、末端「O」は、ポリヌクレオチド上の末端ヌクレオチドに由来する。このDBCO型部分の使用により、表面アミンが修飾される場合、ポリヌクレオチド及びタンパク質間の構造

【化6】



及び

【化7】



がもたらされ、式中、L及びL²は、各々独立して、C₁-10アルキレン、-C(O)-C₁-10アルキレン-Y-、及び-C(O)-C₁-10アルキレン-Y-C₁-10アルキレン-(OCH₂CH₂)_m-Y-から選択され、各Yは、独立して、結合、C(O)、O、NH、C(O)NH、及びNH₂C(O)から成る群から選択され、mは、0、1、2、3、4、または5であり、PNは、ポリヌクレオチドである。タンパク質の表面チオールまたは表面カルボキシレートが修飾される同様の構造を同様の様式で作製して

、同等の結合構造をもたらすことができる。

【0150】

タンパク質は、表面官能基（例えば、表面アミン、表面カルボキシレート、表面チオール）にて、アジド官能基で終結するリンカーを用いて修飾することができる：タンパク質 - X - L - N₃、Xは、タンパク質上の表面アミノ基（例えば、-NH-）、カルボン酸基（例えば、-C(O)-または-C(O)O-）、またはチオール基（例えば、-S-）に由来し；Lは、C₁₋₁₀アルキレン、-Y-C(O)-C₁₋₁₀アルキレン-Y-、及び-Y-C(O)-C₁₋₁₀アルキレン-Y-C₁₋₁₀アルキレン-(OCH₂CH₂)_m-Y-から選択され；各Yは、独立して、結合、C(O)、O、NH、C(O)NH、及びNHC(O)から成る群から選択され；mは、0、1、2、3、4、または5である。「L-N₃」官能基のタンパク質の表面部分への導入は、周知の技法を使用して達成することができる。例えば、タンパク質の表面アミンを、末端N₃を有するリンカーの活性エステルと反応させて、タンパク質のアミンとリンカー試薬の活性エステルのカルボキシレートとの間のアミド結合を形成することができる。

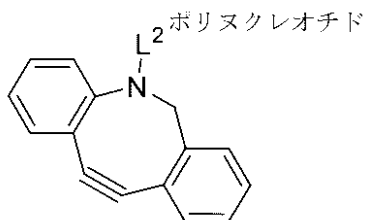
10

【0151】

ポリヌクレオチドの末端にてアルキン官能基を含むようにポリヌクレオチドを修飾することができる：ポリヌクレオチド - L² - X - R；L²は、C₁₋₁₀アルキレン、-C(O)-C₁₋₁₀アルキレン-Y-、及び-C(O)-C₁₋₁₀アルキレン-Y-C₁₋₁₀アルキレン-(OCH₂CH₂)_m-Y-から選択され；各Yは、独立して、結合、C(O)、O、NH、C(O)NH、及びNHC(O)から成る群から選択され；mは、0、1、2、3、4、または5であり；Xは、結合であり、Rは、HまたはC₁₋₁₀アルキルであり；あるいはX及びRは、それらが結合する炭素と一緒にあって、8~10員の炭素環式基または8~10員の複素環式基を形成する。一部の 경우에는、ポリヌクレオチドは、構造

20

【化8】



30

を有する。

【0152】

表面修飾アジドを持つタンパク質、及び末端がアルキンを含むように修飾されたポリヌクレオチドを、銅(II)塩、及び銅(I)塩をインサイツで生成するための還元剤の存在下で共に反応させて、トリアゾール環を形成することができる。一部の 경우에는、銅(I)塩は、直接添加される。企図される還元剤としては、アスコルビン酸、アスコルビン酸塩、水素化ホウ素ナトリウム、2-メルカプトエタノール、ジチオスレイトール(DTT)、ヒドラジン、水素化アルミニウムリチウム、水素化ジイソブチルアルミニウム、シュウ酸、リンドラ-触媒、亜硫酸塩化合物、第一スズ化合物、第一鉄化合物、ナトリウムアマルガム、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン、ヒドロキノ、及びこれらの混合物が挙げられる。

40

【0153】

タンパク質の表面官能基は、他の結合化学を使用してポリヌクレオチドに結合させることができる。例えば、表面アミンをポリヌクレオチドの末端にてカルボキシレートまたは活性エステルに抱合させて、アミド結合を形成させることができる。表面カルボキシレートをポリヌクレオチドの末端上でアミンに抱合させて、アミド結合を形成することができる。代替的に、表面カルボキシレートを、ジアミンと反応させて、表面カルボキシレートにてアミド結合を、他の末端にてアミンを形成し得る。その後、この末端アミンを、タン

50

パク質の表面アミンのための様式と同様の様式で修飾することができる。表面チオールをポリヌクレオチド上のチオール部分と抱合させて、ジスルフィド結合を形成することができる。代替的に、チオールをポリヌクレオチドの末端上の活性エステルと抱合させて、チオカルボキシレート形成し得る。

【0154】

薬学的組成物

本明細書に記載の組成物のいずれも、所望の治療効果を達成するために治療上有効量で哺乳動物に投与し得ることが理解される。

【0155】

本明細書に使用される、「治療上有効量」という用語は、識別された疾病または病状を治療する、軽減する、若しくは防止する、または認識できる治療効果、予防効果、若しくは阻害作用を示すのに十分な組成物の量を指す。効果は、例えば、臨床状態の改善、症状の低減、または本明細書に記載されるアッセイにより認めることができる。対象に対する正確な有効量は、対象の体重、体の大きさ、及び一般の健康状態、病状の性質及び程度、ならびに投与に選択される組成物または組成物の組み合わせに依存することになる。所与の状態の治療上有効量は、臨床医の技能及び判断の内である日常の実験により決定することができる。本明細書に記載される組成物は、薬学的に許容される賦形剤、担体、または希釈剤とともに、薬学的組成物に製剤化されてもよい。化合物または組成物は、疾患、障害、または感染の治療を可能にする任意の経路により投与することができる。好ましい投与経路は経口投与である。

10

20

【0156】

複数のコアシェル粒子の組成物

更に、複数のコアシェル粒子を含む組成物を本明細書に開示する。一部の 경우에는、1つのコアシェル粒子の少なくとも1つのポリヌクレオチド及び第2のコアシェル粒子の少なくとも1つのポリヌクレオチドは、ハイブリッド形成して超格子構造を形成するのに十分に相補的である。種々の場合には、1つのコアシェル粒子のコアのタンパク質は、第2のコアシェル粒子のコアのタンパク質とは異なる。他の場合には、複数のコアシェル粒子全てのコアのタンパク質は同じである。

【0157】

種々の場合には、本組成物のコアシェル粒子は、非共有的に相互作用して（例えば、シエルの相補的ポリヌクレオチドのハイブリッド形成によって）、または共有的に相互作用して（例えば、ポリヌクレオチドの相溶性である反応性の機能性部分間の直接結合の形成によって）、超格子構造を形成することができる。他の場合には、複数のコアシェルナノ粒子は、共有的にも非共有的にも相互作用しないが、単に同じ組成物内である。

30

【0158】

種々の場合において、1つのコアシェル粒子は、化学反応のための酵素を含むことができ、第2のコアシェル粒子は、第2の化学反応のための第2の酵素を含むことができる。更なる場合には、1つ以上の追加のコアシェル粒子は、第1及び/または第2のコアシェル粒子中に存在する酵素と同じかまたは異なる更なる酵素（複数可）を含む。

【0159】

使用方法

標的ポリヌクレオチドを検出する方法

本開示は、標的分子（例えば、標的ポリヌクレオチド）を検出する方法を提供し、本方法は、標的分子を本明細書に記載のコアシェルナノ粒子と接触させることを含む。この接触により、種々の態様において、本開示が提供する遺伝子発現の調節ができるようになる。別の態様において、この接触により検出可能な変化がもたらされ、ここでは、この検出可能な変化は標的分子の検出を示す。検出可能な標識の検出は、本明細書に記載の方法のいずれかによって行われ、この検出可能な標識は、コアシェルナノ粒子の一部である分子上であるか、または標的分子上にあることができる。

40

【0160】

50

種々の態様において、本方法は、標的ポリヌクレオチドに100%相補的、即ち、完全一致であるポリヌクレオチドの使用を含むが、他の態様においては、ポリヌクレオチドは、標的遺伝子産物の所望の阻害を達成することができる程度に、ポリヌクレオチドの長さにわたって少なくとも(つまり、それ以上)約95%ポリヌクレオチドに相補的であり、ポリヌクレオチドの長さにわたって少なくとも約90%、少なくとも約85%、少なくとも約80%、少なくとも約75%、少なくとも約70%、少なくとも約65%、少なくとも約60%、少なくとも約55%、少なくとも約50%、少なくとも約45%、少なくとも約40%、少なくとも約35%、少なくとも約30%、少なくとも約25%、少なくとも約20%ポリヌクレオチドに相補的である。

【0161】

一部の実施形態において、本開示のコアシェルナノ粒子は、ナノフレア技術において有用である。ナノフレアは、生細胞内部の標的分子レベルの蛍光検出のためのポリヌクレオチド機能化ナノ粒子との関連において既に説明されている[全体が参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2008/098248号に記載されている]。本系において、「フレア」は、検出可能に標識され、入ってくる標的ポリヌクレオチドによってコアシェルナノ粒子から移動または放出される。よって、ナノフレア技術は、本明細書に記載のコアシェルナノ粒子との関連において有用であることが企図される。

【0162】

標的分子

本開示は、本明細書に記載の組成物のいずれかを使用して標的分子を検出し得ることを企図する。種々の態様において、標的分子は、ポリヌクレオチドであり、このポリヌクレオチドは、真核性、原核性、またはウイルス性のいずれかである。標的分子は、同様に当該技術分野で既知であるように、細胞、組織試料、または体液中にあり得る。

【0163】

ポリヌクレオチドが少量で存在する場合、ポリヌクレオチドを、当該技術分野で既知の方法によって増幅してもよい。例えば、Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed., 1989)、及びB. D. Hames and S. J. Higgins, Eds., *Gene Probes 1* (IRL Press, New York, 1995)を参照されたい。概して、非限定的に、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅を行うことで、標的核酸の濃度を、その検出をより容易にし得る程度まで増加させることができる。

【0164】

種々の実施形態において、提供される方法は、標的ポリヌクレオチドが遺伝子産物をコードしているmRNAであり、遺伝子産物の翻訳が阻害されるか、あるいは標的ポリヌクレオチドが遺伝子産物をコードしている遺伝子中のDNAであり、遺伝子産物の転写が阻害される方法を含む。標的ポリヌクレオチドがDNAである方法において、ポリヌクレオチドは、ある特定の態様では、阻害される遺伝子産物をコードするDNAである。他の方法において、DNAは、遺伝子産物に対するコード領域に相補的である。また他の態様において、DNAは、遺伝子産物の発現に必要な調製要素をコードする。「調節要素」としては、エンハンサー、プロモーター、サイレンサー、ポリアデニル化シグナル、調節タンパク質結合要素、調節イントロン、及び/またはリボソーム進入部位が挙げられるが、これらに限定されない。また別の態様において、標的ポリヌクレオチドは、内因性の複製に求められる配列である。更なる実施形態において、標的分子はマイクロRNA(miRNA)である。

【0165】

遺伝子発現を阻害する方法

本開示によって提供される更なる方法は、標的ポリヌクレオチドから発現される遺伝子産物の発現を阻害する方法を含み、遺伝子産物の発現を阻害するために十分である、標的ポリヌクレオチドを本明細書に記載されるコアシェルナノ粒子または組成物に接触することを含む。遺伝子産物の阻害は、本開示のコアシェルナノ粒子または組成物と標的ポリヌ

10

20

30

40

50

クレオチドとのハイブリダイゼーションによって生じる。

【0166】

コアシェルナノ粒子の一部であるポリヌクレオチドの配列は、標的ポリヌクレオチドと特異的にハイブリッド形成するために、その標的ポリヌクレオチドのものに100%相補的である必要がないことが当技術分野において理解される。その上、コアシェルナノ粒子の一部であるポリヌクレオチドは、1つ以上のセグメントにわたって標的ポリヌクレオチドとハイブリッド形成することができ、介在性のまたは隣接するセグメントはハイブリダイゼーション事象（例えば、限定することなく、ループ構造またはヘアピン構造）に関与しない。パーセント相補性は、コアシェルナノ粒子の一部であるポリヌクレオチドの長さによって判定される。例えば、ポリヌクレオチドの20ヌクレオチドの18個が、全長100ヌクレオチドの標的ポリヌクレオチド中の20ヌクレオチド領域に相補的であるポリヌクレオチドを含むコアシェルナノ粒子を所与として、コアシェルナノ粒子の一部であるポリヌクレオチドは、90パーセント相補的であることになる。この例において、残りの非相補的なヌクレオチドは、相補的なヌクレオチドと密集しているか、あるいは相補的なヌクレオチドが散在していてもよく、互いにまたは相補的なヌクレオチドに近接する必要はない。標的ポリヌクレオチドの領域を有するコアシェルナノ粒子の一部であるポリヌクレオチドのパーセント相補性は、BLASTプログラム（基本局所配列検索ツール（basic local alignment search tool））、及び当技術分野で知られているPowerBLASTプログラム（Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410、Zhang and Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656）を使用して、日常的に判定され得る。

10

20

【0167】

提供される遺伝子産物発現を阻害する方法には、標的遺伝子産物の発現が、コアシェルナノ粒子の不在下における遺伝子産物発現と比較して、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%阻害されるものが挙げられる。言い換えると、提供される方法は、基本的に標的遺伝子産物の発現のいかなる程度の阻害を生じるものを包含する。

30

【0168】

阻害の程度は、体液試料から、若しくは生検試料からインピボで、または当該技術分野で周知の画像処理技術によって判定される。代替的に、阻害の程度は、概して、本明細書に記載される組成物の使用により生体内で生じると予期され得る阻害の程度の予測可能な測定として、細胞培養アッセイ中の生体外で判定される。標的ポリヌクレオチドの阻害は、所与の細胞上での阻害の効果を評価するために使用されることが、本開示によって企図される。非限定的な例として、遺伝子産物の阻害の効果を研究することができ、ここでは、遺伝子産物はシグナル伝達経路の一部である。代替的に、遺伝子産物の阻害を研究することができ、ここでは、遺伝子産物はアポトーシス経路に関与すると仮定される。

40

【0169】

本明細書に記載される方法のいずれかが、所望の結果を達成するために組み合わせで使用されてもよいことが理解されるであろう。例えば、非限定的に、本明細書に記載される方法は、標的ポリヌクレオチドの検出ならびにその発現の制御の両方ができるように組み合わせられ得る。一部の実施形態において、この組み合わせは、インピト口またはインピボのいずれかで経時的に標的ポリヌクレオチド発現の阻害を定量化するように使用され得る。経時的な定量化は、一態様において、特定の時点で細胞を培養物から除去し、かつ各時点で標的ポリヌクレオチドの発現の相対レベルを評価することによって達成される。一

50

態様において、検出可能な標識の可視化を介して評価される標的ポリヌクレオチド量の減少は、標的ポリヌクレオチドの阻害の速度を経時的に示す。

【0170】

よって、標的ポリヌクレオチドとハイブリッド形成し、かつその発現を阻害する所与のポリヌクレオチドの有効性を判定すること、ならびに細胞上の所与のポリヌクレオチドの阻害の効果を判定することは、企図される態様である。

【0171】

反応を触媒する方法

開示のコアシェル粒子またはその複合体を化学反応の触媒として使用して1つ以上の試薬を産出物へと転換する方法が本明細書に提供される。本方法は、反応の1つ以上の試薬を本明細書に開示される複数のコアシェル粒子の組成物と接触させることを含み、その結果、試薬(単数または複数)の組成物との接触によって反応が触媒されて反応産出物が形成され、ここで、コアシェル粒子のタンパク質は化学反応のための酵素である。

【実施例】

【0172】

実施例1

タンパク質/オリゴヌクレオチドコアシェルナノ粒子の合成

材料及び機器：ウシカタラーゼをSigmaから購入し、提供時のまま使用した。NH₂-PEG₄-アジドをThermo Scientificから、修飾ホスホラミダイトをGlen Researchから購入した。C8S星状膠細胞をATCCから入手した。オリゴヌクレオチドをMerMade 48(MM48)自動オリゴヌクレオチド合成器(BioAutomation)上で合成した。オリゴヌクレオチドを、水性NaOH中(DBCO含有オリゴヌクレオチド)またはメタノール中の0.05Mの炭酸カリウム中(Cy5含有オリゴヌクレオチド)で12時間室温にてインキュベートすることによって脱保護した。脱保護したオリゴヌクレオチドをVarian Prostarクロマトグラフィーステーション上で逆相HPLCによって精製した後、その配列をマトリックス支援飛行時間型質量分析法(MALDI-TOF-MS)によって確認し、その濃度をUV分光法によって決定した。円偏光二色性(CD)スペクトルをJasco J-18分光光度計上で測定した。Cy5で標識したオリゴヌクレオチドの細胞取り込みを、Zeiss LSM 510倒立レーザ走査共焦点顕微鏡上での蛍光共焦点顕微鏡法によって監視した。

【0173】

タンパク質/オリゴヌクレオチドコアシェルナノ粒子の合成：ウシカタラーゼ(図1a)を、図1bに示すように、オリゴヌクレオチドの高密度なシェルで修飾した。表面が露出したアミンを、50μMのカタラーゼを50mMの(1)(図1)と2時間室温で反応させることによってアジドに変換させた。典型的な反応は、MALDI質量分析によって決定して60+/−1のアミンのアジドへの変換をもたらした(図2a)。アジド修飾タンパク質を以下のDNA配列で共有的に修飾した。

- 1) 5' DBCO Sp18₂ AAG AAT TTA TAA GCA GAA ($_{260nm} = 199, 900 M^{-1} cm^{-1}$) (配列番号1)
- 2) 5' DBCO Sp18₂ AAC AAT TAT ACT CAG CAA ($_{260nm} = 187, 700 M^{-1} cm^{-1}$) (配列番号2)
- 3) 5' DBCO T₁₀-Cy5-T₁₀ ($_{260nm} = 172, 600 M^{-1} cm^{-1}$) (配列番号3)

【0174】

1μMのアジドで標識したカタラーゼ及び1mMの5'-DBCOで修飾したDNAを含有する溶液を3日間室温でインキュベートした。その後、Amicon Ultra Centrifugal Filter Units(Millipore)を使用して過剰なDNAを溶液から除去した後、DNAによる標識の程度を以下のように決定した。まず、酵素濃度を、ベールの法則、及び405nmで324,000M⁻¹cm⁻¹のモ

ル吸光係数に従って決定した。その後、DNAによる標識の程度を、260nmでの吸光の変化を測定することによって決定した(図2b)。典型的な反応により、約60~70個のオリゴヌクレオチド/タンパク質を得た。アジドの数と比較してわずかに過剰なオリゴヌクレオチドは、少数の非共有結合オリゴヌクレオチドの保持、または用いたオリゴヌクレオチド配列について計算したモル吸光度の概算のわずかな誤差に起因する可能性が高い。

【0175】

タンパク質/オリゴヌクレオチドコアシェルナノ粒子の特性評価。N3-PEG-アジド及びDNAの共有結合時のウシカタラーゼの二次構造の保持をCD分光法によって監視した。全てのスペクトルを、1 μ Mのカタラーゼを含有する溶液を使用して測定した(図3a)。天然及びDNAで標識したカタラーゼの酵素活性を、H₂O₂の分解を追うことによって監視した(図3b)。オリゴヌクレオチドのカタラーゼの表面への共有結合を確認した後、酵素の大きさの変化をDLSによって測定した(図3c)。約11nmから約25nmへの推移は、オリゴヌクレオチドの単層の酵素表面への共有結合と一致した。

【0176】

タンパク質/DNAコアシェルナノ粒子の細胞取り込み。DNAによる修飾の前に、カタラーゼを約1.5のFITC分子で標識した。その後、この抱合体を、上記のように、5'DBCO及び内部Cy5ホスホラミダイトを含有するT20オリゴヌクレオチドで標識した(配列番号3)。二重標識戦略により、細胞取り込みの際のタンパク質コア及びオリゴヌクレオチドシェル両方の細胞内運命を追跡することができた。タンパク質トランスフェクション実験を、10%の加熱不活性化したウシ胎仔血清と共にATCC細胞培養ガイドラインに従って培養し、5%のCO₂中37℃で維持したC8S細胞(ATCC, VA, USA)を使用して行った。カタラーゼの添加の前に、細胞を無血清培地に移し、1nMのタンパク質/DNAコアシェルナノ粒子と共に4時間インキュベートした後、コアシェルナノ粒子の取り込みを蛍光共焦点顕微鏡法によって測定した(図4)。

【0177】

実施例2

追加のタンパク質/オリゴヌクレオチドコアシェルナノ粒子の合成

材料及び機器。全ての酵素をSigmaから購入し、提供時のまま使用した。NHS-PEG4-アジドをThermo Scientificから、修飾ホスホラミダイトをGlen Researchから購入した。オリゴヌクレオチドをMerMade 48(MM48)自動オリゴヌクレオチド合成器(BioAutomation)上で合成した。オリゴヌクレオチドを、水性NaOH中でインキュベートすることによって脱保護した。その後、脱保護したオリゴヌクレオチドをVarian Prostarクロマトグラフィーステーション上で逆相HPLCによって精製した後、その配列をマトリックス支援飛行時間型質量分析法(MALDI-TOF-MS)によって確認し、その濃度をUV分光法によって決定した。円偏光二色性(CD)スペクトルをJasco J-18分光光度計上で測定した。小角X線散乱実験を、DuPont-Northwestern Down Collaborative Access Team beamlineを使用して、Argonne National Labsにて行った。走査電子顕微鏡法(SEM)をHitachi S4800-II cFEG SEM上で行い、走査型透過電子顕微鏡法(STEM)の顕微鏡写真を、Hitachi HD-2300 STEMを使用して収集した。

【0178】

タンパク質/オリゴヌクレオチドコアシェルナノ粒子の合成：ウシカタラーゼ及びCgカタラーゼ(図5a及び5b)を、図5cに示すように、オリゴヌクレオチドの高密度なシェルで修飾した。表面が露出したアミンを、50 μ Mのカタラーゼを50mMの(1)と2時間室温で反応させることによってアジドに変換させた。典型的な反応は、MALDI質量分析によって決定して、それぞれウシカタラーゼ及びCgカタラーゼについて、60または48のアミンのアジドへの変換をもたらした(図2a)。アジド修飾タンパク質

を以下のDNA配列で共有的に修飾した。

1) 5' DBCO Sp18₂ AAG AAT TTA TAA GCA GAA (260nm = 199, 900 M - 1 cm - 1) (配列番号1)

2) 5' DBCO Sp18₂ AAC AAT TAT ACT CAG CAA (260nm = 187, 700 M - 1 cm - 1) (配列番号2)

【0179】

1 μMのアジドで標識したカタラーゼ及び1 mMの5' - DBCOで修飾したDNAを含有するDNA標識反応を3日間室温でインキュベートした。その後、Amicon Ultra Centrifugal Filter Units (Millipore) を使用して過剰なDNAを溶液から除去した後、DNAによる標識の程度を以下のように決定した。まず、酵素濃度を、ベールの法則、及び405 nmで324, 000 M - 1 cm - 1のモル吸光係数に従って決定した。その後、タンパク質1つあたりのDNA分子の数を、260 nmでの吸光の変化を測定することによって決定した(図2b)。典型的な反応により、約60~70個及び40~50個のDNA鎖それぞれウシカタラーゼまたはCgカタラーゼを得た。アジドの数と比較してわずかに過剰なDNA鎖は、少数の非共有結合DNA鎖の保持、またはDNA鎖について計算したモル吸光度のわずかな誤差に起因する可能性が高い。

10

【0180】

DNA抱合タンパク質の組織化。2つの異なる種類のDNA鎖を使用して、タンパク質を組織化してより高次の構造とした。まず、自己相補的リンカーを使用して、単一タンパク質を図6に示すように組織化した。DNA媒介性凝集体を分解した後、DNA二本鎖と比較した一本鎖DNAの過色素性質に起因して生じる、260 nmでの吸光度の増加を測定した。急激な融解転移は、DNAで高密度に修飾したナノ粒子間で達成される多価相互作用の特徴である。

20

【0181】

互いに相補的であるがそれ自体ではないリンカーを使用することで、2つの異なる酵素、または酵素及びAuNPのいずれかを含有している2成分系格子の組織化が可能となる(図7)。

【0182】

タンパク質結晶の形成及び小角X線散乱(SAXS)によるタンパク質超格子の特性評価。タンパク質結晶を、タンパク質DNA抱合体またはAuNPあたり当量100のリンカーDNAを添加することによって組織化した。リンカーDNAを添加した後、凝集体をその融解温度を上回る温度に加熱し、試料をサーマルサイクラー中で1/10分の速度で冷却することによって、結晶を形成させた(図8)。

30

【0183】

SEM及びSTEMによるタンパク質格子の特性評価。タンパク質のみを含有する結晶を、結晶を含有する溶液の5 μLのアリコートに炭素コーティングしたグリッドにドロップキャストし、酢酸ウラニルの2%溶液で染色することによる撮像のために調製した(図9a~b)。2成分系タンパク質 - AuNP結晶をシリカ中に包埋させた後、結晶を含有する溶液の5 μLのアリコートに炭素コーティングしたグリッドにドロップキャストした。画像を図10a~bに示す。

40

【0184】

実施例3

ベータ - ガラクトシダーゼタンパク質 / オリゴヌクレオチドコアシェルナノ粒子の合成

ベータガラクトシダーゼ(β-gal)をSigmaから購入し、使用前にサイズ排除クロマトグラフィーによって精製した。ベータガラクトシダーゼの表面を、以下の修飾を用いて、本質的には前述したように(図1b)、ポリヌクレオチドで修飾した。アジドによる修飾の前に、β-galを発色団AlexaFluor 647(Life Technologies)で機能化して、細胞輸送を撮像し、タンパク質濃度を決定するための手段を提供した。9.75 μMのタンパク質及び28 μMのフルオロフォアを含有する

50

反応により、タンパク質 1 個あたりのフルオロフォアが約 2.6 個である抱合体を得た (図 1 1)。その後、 β -gal をアジドで修飾し、続いてポリヌクレオチドと反応させて、タンパク質 1 個あたりの DNA 鎖が約 3.8 個である抱合体を得た (図 1 1)。

【 0 1 8 5 】

UV 可視吸光度分光法によって決定する β -ガラクトシダーゼ表面の DNA による機能化。 β -ガラクトシダーゼをまず発色団 AlexaFluor 647 と抱合せた後、2 つの異なる DNA 配列で機能化した。機能化収率を、647 nm (抱合フルオロフォアから) での吸光度及び 260 nm (DNA から) での吸光度の比率に基づいて決定した。両方の DNA 鎖を約 3.5 : 1 の比率で酵素の表面に抱合せた。

【 0 1 8 6 】

DNA 修飾 β -gal の細胞取り込みを共焦点蛍光顕微鏡法によって測定した。C8S 細胞を 100 nM の天然または DNA 修飾 β -gal と共に 12 時間インキュベートし、1 倍 PBS で洗浄し、共焦点顕微鏡によって撮像した (図 1 2)。蛍光シグナルは、タンパク質の表面に共有結合した AlexaFluor 色素から生じ、DNA 修飾 β -gal の細胞取り込みを裏付ける。

【 0 1 8 7 】

天然及び DNA 機能化 β -ガラクトシダーゼの細胞取り込みも、C166、HaCat、及び SKOV3 細胞におけるフローサイトメトリーによって決定した。これらのデータは、DNA 機能化酵素の取り込みが天然タンパク質と比較して増強され、取り込みが複数の細胞株にわたって持続することを示した。

【 0 1 8 8 】

ベータ-ガラクトシダーゼが DNA による機能化の後で折り畳まれたままであることの円偏光二色性分光法による検証。天然 β -ガラクトシダーゼと DNA 機能化 β -ガラクトシダーゼとの抱合体のスペクトルを決定した。全てのスペクトルを濃度について補正した。220 nm での信号の減少は、DNA からの寄与に起因するものであり、タンパク質のアンフォールドに起因するものではなかった。天然 β -ガラクトシダーゼと DNA 機能化 β -ガラクトシダーゼ抱合体による、発蛍光性ベータ-ガラクトシダーゼ基質であるカルボキシウンベリフェリル-D-ガラクトピラノシドの酵素加水分解も示された。

【 0 1 8 9 】

トランスフェクトした β -gal の触媒活性を、モデル基質である 5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-D-ガラクトピラノシド (X-gal) の加水分解を測定する β -gal 染色キット (Life Technologies) を使用して決定した。加水分解の際、この化合物は、光学顕微鏡法によって視覚化することができる青色の沈殿物を形成した。これらの実験のために、細胞を 100 nM の天然または DNA 修飾 β -gal と 12 時間インキュベートし、1 倍 PBS で洗浄し、凝固させた後、製造業者の推奨に従ってアッセイを行った。X-gal と共にインキュベートした後、細胞を洗浄し、光学顕微鏡上で撮像すると (図 1 3)、天然 β -gal と比較して DNA 機能化 β -gal の増強した活性が示された。

【 0 1 9 0 】

実施例 4

タンパク質の DNA 媒介性組織化。

材料及び方法。全てのオリゴヌクレオチドを、Glen Research から入手した試薬を使用して Mermade 48 (MM48) オリゴヌクレオチド合成器において固体支持体上で合成し、逆相拘束液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) によって精製した。クエン酸塩で覆った公称径 10 nm の金ナノ粒子 (AuNP) を Ted Pella から入手し、既に説明されているように [Park et al., Nature 451 (7178) : 553 - 556 (2008), Macfarlane et al., Science 334 (6053) : 204 - 208 (2011)] DNA で機能化した。端的には、AuNP 1 mL あたり約 5 nmol の適切な 5' -チオール化オリゴヌクレオチドを添加した後、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を最終濃度が 0.01 %

10

20

30

40

50

になるまで添加し、結果として得られた溶液を室温で4時間インキュベートした。5 MのNaClのアリコートをして3時間かけて0.1 Mのステップで溶液に添加し、0.5 MのNaClの最終濃度に到達させた。その後、この溶液を室温で一晩インキュベートさせて、AuNPの表面上のDNAローディングを最大化した。DNA機能化粒子を3周回の16000 rpmでの遠心分離によって精製した後、結果として得られたペレットを1 mLのリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中に再懸濁させた。粒子濃度を、 $9.55 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ のモル吸光係数(520)(Ted Pella提供)を使用するUV可視吸光度スペクトル(Varian Cary 5000)に基づいて決定した。

【0191】

ウシ及びコリネバクテリウムグルタミクム(「Cg」)カタラーゼ(Sigma)を限外濾過(Amicon Ultra、100 kDa)によってPBS中に交換し、その純度を、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)によって確認した。両タンパク質は、予期された分子量(約60 kDa/モノマー)の単一分子種として動作したため、受け取ったままで使用した。化学的機能化の前に、各タンパク質を濃縮し、限外濾過によって100 mMの重炭酸ナトリウムを含む緩衝液(pH 9、0.5 MのNaCl)中に交換した。タンパク質濃度を、 $324,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ のモル吸光係数(405)を使用するUV可視吸光度分光法によって決定した[Samejima et al., J Biol Chem 238(10):3256-61(1963)]。

【0192】

100 mMの重炭酸ナトリウム緩衝液(pH 9、0.5 MのNaCl)中の50 μM のタンパク質を含有する100 μL の溶液に約6 mgのリンカー-NHS-PEG4-N3(Thermo Scientific、図15、挿入図)を添加した。表面アミンとNHS-PEG4-N3とを1000 rpmで振盪しながら25 °Cで2時間反応させた。アジド機能化タンパク質を、PBS(pH 7.4)で平衡化したNAP10カラム(GE Healthcare)を使用するサイズ排除クロマトグラフィーによって精製した。結合したリンカーの数を、274 Da/リンカーの付加質量に基づくBruker Autoflex III質量分析計(図16)上でのマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析(MALDI-MS)によって決定した。

【0193】

各アジド修飾タンパク質を、5'末端ジベンゾシクロオクチン(DBCO)部分を含有する2つのはっきり異なるオリゴヌクレオチドで別々に機能化した。典型的な反応物は、PBS(0.5 MのNaCl)中、3 nmolのタンパク質及び1 μmol の示されるオリゴヌクレオチドを含有した。反応物を1000 rpmで振盪しながら25 °Cで3日間インキュベートした後、未反応のDNAを10周回の限外濾過(Millipore Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units)によって反応溶液から除去した。各DNA機能化タンパク質のオリゴヌクレオチド:タンパク質比率を、UV可視吸光度分光法によって決定した(図16)。

【0194】

動的光散乱(DLS)実験をMalvern Zetasizer Nano上で行った。各試料は、1 μM の天然のアジド機能化またはDNA機能化カタラーゼを含有した。報告するスペクトル及び流体力学直径(図1c~e及び15)は、強度分布に基づき、3回の測定の平均である。

【0195】

UV可視吸光度及びCD分光法を用いて、天然のN3機能化及びDNA機能化カタラーゼ変異型の構造をプローブした(図17及び18)。UV可視吸光度スペクトルを、PBS(0.5 MのNaCl)中の約1 μM のタンパク質の溶液を含有する経路長1 cmのキュベットにおいて記録した。CDスペクトルを、経路長1 mmのキュベットにおいてJasco J-818分光光度計上で記録した。全てのタンパク質含有試料を、PBS(0.5 MのNaCl)中で300 nMの濃度で調製した。原楕円率値(mdeg)を (

10

20

30

40

50

$\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$) に変換し、結果として得られたスペクトルを、Igor Pro (Wavemetrics) において Savitzky-Golay アルゴリズムを使用して平滑化した。アジド機能化タンパク質のスペクトルをその天然の対応物と直接比較した (図 18)。図 3 a 及び図 18 b からの円偏光二色性シグナルの差異は、アジド標識タンパク質のスペクトルが比較的不安定であることに起因する。図 18 b について、スペクトルは標識化実験を完了したその日のうちに収集し、修飾タンパク質は 4 で保管した。図 3 a については、アジド抱合タンパク質は、抱合反応を完了した後で長期間室温で放置し、部分的にアンフォールドした。

【0196】

非抱合 5' DBCO 含有オリゴヌクレオチドの CD スペクトルを、約 $15 \mu\text{M}$ の濃度にて調製した試料から収集した。その後、各 DNA 鎖の 値に、各タンパク質変異体について計算した DNA : タンパク質比率を乗じた (表 1)。各 DNA 機能化タンパク質の理論的スペクトルを、天然タンパク質のスペクトル及び DNA のスペクトルの合計に予測される DNA : タンパク質比率を乗じることによって計算した (図 17)。

【0197】

分光光度法による H_2O_2 の H_2O 及び O_2 に対する不均化を、本質的には [Beers et al., J Biol Chem 195 (1) : 133 - 140 (1952)] に既に記載されているように続けた。端的には、天然または DNA 機能化カタラーゼの $10 \mu\text{L}$ のアリコート、原液 (100nM) から、 $1000 \mu\text{L}$ の PBS (0.5M の NaCl) 中の示す濃度の H_2O_2 を含む攪拌したキュベットに添加した。カタラーゼの添加後、 240nm での吸光度を 1 分間連続的に監視した。その後、反応速度を、 $43 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ の H_2O_2 $_{240}$ 値を使用して、これらのトレースの初期直線部分の勾配から計算した。各データ点は、3 つの試験の平均を表す (図 19)。標準速度定数 (k_{app}) を各 H_2O_2 濃度について計算し、平均を図 19 h に報告する。観察された触媒活性が、遊離ポルフィリン、またはアンフォールドされたタンパク質及び DNA のマトリックス中に包埋されたポルフィリンではなく、完全な折り畳まれたカタラーゼの存在に起因するものであったのかどうかを試験するために、10 分間 60 でのインキュベーションによってアンフォールドした DNA 機能化タンパク質を使用して酵素アッセイを行った (図 19)。

【0198】

タンパク質結晶 (以下に記載のように組織化したもの) を、4 周回の $5,000 \text{rpm}$ での遠心分離によって単離した。精製した結晶中に含有されるタンパク質の総濃度を、その 40 での UV 可視吸光度スペクトルを記録することによって決定した。その後、結晶を 100nM の最終タンパク質濃度に希釈し、その触媒活性を試験した (図 14 f 及び 19)。酵素結晶のリサイクル可能率を試験するために、結晶を、10 分間 15mM の H_2O_2 と共にインキュベートし、遠心分離させて残りの不溶性物質を収集した。この処理の後、上清と不溶性物質との両方を触媒活性について試験した (図 19 j)。このプロセスを 5 回繰り返した後、SAXS スペクトルを収集して、結晶格子が完全なままであることを確実にした (図 19 k)。

【0199】

当量 100 の適切なリンカーを、PBS (0.5M の NaCl) 中 300nM の示すタンパク質を含有する溶液に添加することによって、DNA 機能化タンパク質及び AuNP-SNA 抱合体を相補的リンカー鎖とハイブリッド形成した。2 つの異なるリンカー、各々が一方に相補的であるリンカーとハイブリッド形成した 2 つの異なる DNA 機能化タンパク質、または相補的リンカーと別々にハイブリッド形成した DNA 機能化タンパク質及び SNA-AuNP 抱合体と別々にハイブリッド形成した単一 DNA 機能化タンパク質を混合することによって、タンパク質含有凝集体を組織化した。結果として得られる凝集体を、 15nM の最終粒子濃度になるまで $1000 \mu\text{L}$ の PBS (0.5M の NaCl) に添加し、その融解温度を UV 可視吸光分光法によって決定した (図 14 g 及び 20)。各融解曲線の第 1 の導関数を計算して、 T_m 、及び各試料の半値全幅 (FWHM) を決定した

10

20

30

40

50

。

【0200】

リンカーとハイブリッド形成したDNA機能化タンパク質、またはリンカーとハイブリッド形成したタンパク質とSNA-AuNPとの抱合体のいずれかで構成されるDNA鑄型凝集体を、その融解温度(43)を上回る温度で加熱して、それらを0.01/分の速度で室温までゆっくりと冷却することによって、結晶を組織化した。この手順は、多結晶超格子よりも単結晶の形成を好むことが最近示された[Auyeung et al., Nature 505(7481):73-77(2014)]。

【0201】

SAXS実験を、Argonne National LaboratoryにあるAdvanced Photon Source(APS)のDuPont-Northwestern-Dow Collaborative Access Team(DND-CAT)beamlineにて行った。実験は、ベヘン酸銀標準に対して校正した10keV(波長1.24)の平行X線を用いて行った。試料を1.5mmの石英キャピラリー(Charles Supper)に移し、その2D散乱パターンをCCD面積検出器上でインサイトで記録した。使用した露出時間は、Au-タンパク質ハイブリッド及びタンパク質のみの格子について、それぞれ0.5秒及び5秒であった。図21に提示する1次元散乱データを2次元データの径方向平均化によって得て、散乱ベクトルの関数 q としての散乱強度のプロットを得た。

【数1】

$$q = 4\pi \sin \theta / \lambda$$

【0202】

式中、 θ は散乱角の半分であり、 λ は使用したX線の波長である。

【0203】

全ての理論的X線回折パターンは、Federal Institute for Materials Research and Testingよりインターネット上で無料で利用可能なPowderCellソフトウェアパッケージを使用して計算した。このソフトウェアは、当初、格子についての構造係数を原子構成要素に基づいて計算するために開発されたが、実験データと十分に一致するナノ粒子超格子についての理論的散乱パターンを生成することも示されている。結果として得られる散乱パターンがAuNPによって占められ、かつ単純な立方格子を特徴とする、タンパク質及びAuNPから組織化した2成分系超格子については、原子選択は任意である。単一タンパク質で構成されるBC型格子にも同じことが言える。単一タンパク質または2つのタンパク質で構成されるCsCl型格子の模擬回折パターンを生成するために、同様の電子密度の原子を選択した。模擬散乱パターンにおける回折ピークの位置は、実験で観察されたものと十分に一致した。

。

【0204】

各格子型についての最近隣距離 d を、以下の方程式

【数2】

$$d = \left(\frac{1}{10} \right) \left(\frac{C}{q_0} \right)$$

【0205】

を使用して第1の散乱ピーク q_0 の位置に基づいて計算し、式中、 d は、2つの粒子間の距離(単位nm)であり、 q_0 は、1/における初期散乱ピークの位置であり、 C は、最近隣の2つのナノ粒子間の距離と、第1の散乱ピークと関連する[hkl]平面間の距離とを相関させる定数である。 C 、 q_0 、 d 、及び格子パラメータの値を表2で要約する。

【0206】

10

20

30

40

50

TEM撮像を、SEまたはZコントラストモードで200keVにて操作するHitachi HD2300走査型透過電子顕微鏡上で行った。SNA-AuNP抱合体及びDNA機能化タンパク質で構成される2成分系超格子を、既に説明されているように[Auyeung et al., Nature 505(7481):73-77(2014)、Auyeung et al., Adv Mater 24(38):5181-5186(2012)]、非晶質シリカ中に包埋させた。この手順は、DNA媒介性格子が試料調製及び真空下での撮像中に崩壊することを防止するのに必要である。これらのシリカに包埋させた超格子の5 μ Lのアリコート、炭素コーティングした銅線メッシュグリッド上にドロップキャストし、過剰な液体をWhatman濾紙で吸い取ることで除去した。DNA機能化タンパク質のみで構成される超格子を酢酸ウラニルの2%溶液で染色して、撮像に十分なコントラストを得た。

10

【0207】

結果。四量体のヘム含有酵素であるカタラーゼ(ウシカタラーゼ及びCgカタラーゼ)の2つの変異型を、タンパク質のDNA媒介性組織化を研究するためのモデル系として用いた(図14)。各カタラーゼ変異型は、同様の分子トポロジーを共有するが、化学反応性の表面接触可能なアミン官能基のはっきり異なるパターンを特徴とする。N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)エステルとアジド部分とを反対側の末端に含有する(図14bのi及び15の挿入図)大幅に過剰な(タンパク質濃度と比べて約3000倍)テトラエチレングリコールリンカーを添加することによって、これらの表面接触可能なアミンは、質量分析によって決定して、高い収率(Cg及びウシカタラーゼについての四量体タンパク質複合体あたり、それぞれ、全ての溶媒接触可能な一級アミンの75%及び83%)でアジドに変換された(図16)。タンパク質のアジドによる機能化は、3つの異なるバッチのタンパク質を使用する5回の独立した反応にわたって極めて再現性が高かった(ウシカタラーゼ及びCgカタラーゼについて、それぞれ、 15.3 ± 0.3 及び 12.2 ± 0.6 の標識)。その後、アジド修飾タンパク質を、合成オリゴヌクレオチドの5'末端における表面結合アジド部分とジベンゾシクロオクチン(DBCO)部分との間の歪みで促進される付加環化反応(Cuを含まない「クリック化学」)を介して、2つの異なるオリゴヌクレオチド(以下の表1)で別々に機能化した(図14bのii)。この戦略により、各タンパク質-DNA抱合体のUV吸光度スペクトルにおける変化によって決定して、 $30 \sim 50 \text{ pmol/cm}^2$ のDNA機能化密度を得た(図16)。これらの値は、DNA媒介性結晶化スキームにおいて既に用いられている同様にサイズ決定された無機ナノ物質[Zhang et al., Nat Mater 12(8):741-746(2013)、Hurst et al., Anal Chem 78(24):8313-8318(2006)]によって達成される値と同等である。動的光散乱(DLS)による各タンパク質抱合体の更なる特性評価により、その流体力学直径が、DNA機能化後に、ウシカタラーゼ及びCgカタラーゼについて、それぞれ、 11.7 nm または 12 nm から 24.3 nm 及び 25 nm へと増大したことが明らかとなり、これは、タンパク質コアから径方向に配向されるオリゴヌクレオチドのシェル形成と一貫する(図14c~e及び図15)。理論に束縛されるものではないが、リンカーがある程度タンパク質と相互作用する可能性が高く、このことは、流体力学直径が予期されたほど増大しない理由を説明する。同様に、DNAは、CD分光法から明らかのように、超格子におけるDNAと配座的に同一ではない可能性が高く、周辺の鎖を持つ追加の二次構造を採用する(図17)。

20

30

40

【表 1】

| 種類 | 配列 (5' - 3') | $\epsilon_{260} (M^{-1} \cdot cm^{-1})$ |
|---------|--|---|
| DBCO修飾1 | DBCO dT-Sp ₂ -AAG ACG AA T ATT TAA GAA (配列番号4) | 200, 50 0 |
| DBCO修飾2 | DBCO DT-Sp ₂ -AAC GAC TC A TAT TAA CAA (配列番号5) | 188, 30 0 |
| チオール修飾1 | C6 SS-SP ₂ -AAG ACG AAT ATT TAA GAA (配列番号6) | 200, 50 0 |
| リンカー1 | TTCCTT-Sp-TTC TTA AAT ATT CGT CTT (配列番号7) | 213, 30 00 |
| リンカー2 | AAGGAA-Sp-TTG TTA ATA TGA GTC GTT (配列番号8) | 248, 20 0 |

10

20

30

1. DBCO dTは、Glen Research製造のジベンゾシクロオクチン修飾ホスホラミダイトを指す

2. Spは、Glen Research製造のヘキサエチレングリコール修飾ホスホラミダイト、スパーサー18を指す

表1. 本開示で使用するオリゴヌクレオチドの配列

40

【0208】

アジド修飾タンパク質及びDNA修飾タンパク質を幅広く特性評価して、それらが折り畳まれ機能的なままであることを確実にした。各タンパク質の構造をUV可視分光法及び円偏光二色性(CD)分光法によってプローブすることにより、それぞれタンパク質のヘム活性部位及びグローバル二次構造を取り囲む環境に関する構造情報が提供された(図17及び18)。両技法は、天然タンパク質構造が、アジドまたはDNAによる機能化時に主に完全なままであることを示唆する。DNA機能化タンパク質の触媒機能性の保持を、過酸化水素(H_2O_2 、 $\epsilon_{240} = 43 M^{-1} cm^{-1}$)のその H_2O 及び O_2 へのカタラーゼ触媒性不均化時のUV吸光度(240nmにて)における減少を監視することによって、分光光度的に決定した(図14f及び19)[Beers et al., J B

50

iol Chem 195(1):133-140(1952)]。この反応の初期速度は、基質のmM濃度及び酵素の比較的低い(nM)濃度を用いるときに、H₂O₂濃度に関して一次的である。標準的な速度定数は、DNA機能化酵素及びその天然の対応物について同様であり、既刊のレポート[Beers et al., J Biol Chem 195(1):133-140(1952)]と十分に合致し、このことは、各カタラーゼ変異型の表面に付加されるDNAの高密度なシェルが、活性部位への基質のアクセスに大きな影響を及ぼさず、あるいはその構造に決定的な変化を引き起こさないことを示す。対照的に、DNA機能化タンパク質がアッセイの前にそのアンフォールド温度を上回って加熱されるときには、H₂O₂分解は観察されなかった(図19)。この発見は、DNA機能化タンパク質の存在下で観察された速度増強が、遊離ヘム、またはアンフォールドしたタンパク質及びDNAのマトリックス中に包埋したヘムに起因するペルオキシダーゼ活性ではなく、完全な活性部位に由来することを示す。

10

【0209】

実施例5

次に、タンパク質-DNA抱合体がSNA-無機NP抱合体に特徴的なDNA依存性特性を採用したかどうかを決定した。これらの抱合体は、相補的オリゴヌクレオチドを保有する粒子と多価相互作用を形成し、これらの相互作用は、温度の漸進的な上昇時の組織化状態と分解状態との間の高度に協力的な転移によって特徴付けられる。各タンパク質-DNA抱合体は、一本鎖の付着末端配列(5'-AAGGA-3'または5'-TTCTT-3'、図14bのiii及び表1)を保有する相補的オリゴヌクレオチドと独立してハイブリッド形成した。相補的付着末端を持つタンパク質を担持するリンカーを組み合わせさせたとき、またはいずれかのタンパク質が相補的付着末端を持つSNA-金ナノ粒子(AuNP)(直径10nm)抱合体と組み合わせさせたとき、溶液の濁度の急激な増加及び凝集体の漸進的な蓄積が観察された。重要なことに、この凝集事象は、非相補的付着末端を持つ粒子を組み合わせさせたときには発生しなかったため、タンパク質間、タンパク質及びAuNP表面間、またはタンパク質及びDNA間の非特異的相互作用の可能性を排除する。これらのDNA鑄型凝集体を含有する溶液をゆっくりと加熱すると、260nmでのその消滅における急激な増大がもたらされた(図14g及び20)。DNA機能化タンパク質のみを含有する凝集体については、この転移は、凝集体の解離の際の二本鎖DNAの過色素性一本鎖DNAへのハイブリッド形成に由来し、一方で、DNA機能化タンパク質とSNA-AuNP抱合体との混合物を含有する凝集体については、消滅の増大は、AuNPの光学特性の変化に主に起因する。これらの転移の融解温度及び半値全幅値は、無機コアを持つSNA-NP抱合体について観察されたもの[Zhang et al., Nat Mater 12(8):741-746(2013)、Hurst et al., Anal Chem 78(24):8313-8318(2006)]と同様であった。

20

30

【0210】

次に、SNA-無機NP抱合体に対して開発された設計ルール[Macfarlane et al., Science 334(6053):204-208(2011)、Macfarlane et al., Angew Chem Int Ed 52(2):5688-5698(2013)]がDNA機能化タンパク質の組織化にも適用されるかどうかを決定した。大きさが同一である球形SNA-AuNP抱合体が、非自己相補的付着末端を保有するリンカーで別々に機能化される場合、熱力学的に好ましい格子は体心立方であることが既に示されている。これらの格子は、それらのはっきり異なるDNA配列で機能化されるにもかかわらずコアナノ粒子が同一であるため、CsClではなくBCC型として定義される。DNA機能化タンパク質が同様の格子を形成するかどうかを試験するために、等モル比の2つのタンパク質を含有する凝集体、またはタンパク質及びSNA-AuNP抱合体から成る2成分系を、その融点を上回る温度であるがタンパク質のアンフォールドが開始する温度を下回る温度に加熱し、0.01/分の速度でゆっくりと20に冷却して、熱力学的に安定した産出物の形成を促進した。その融解温度をわ

40

50

ずかに下回る温度でアニールされる代替的な手順と比較して、解離状態からナノ粒子を含有する溶液をゆっくりと冷却することは、多結晶凝集体よりも単結晶の形成に有利に働くことが示されている [Auyeung et al., Nature 505 (7481) : 73 - 77 (2014)]。0.01 /分の速度は、より早い冷却速度がよく定義されていない単結晶または多結晶凝集体をもたらしたことを観察した後で、実験に基づいて決定した。この手順を使用して、Cgカタラーゼを組織化して、径方向平均化1D小角X線散乱 (SAXS) パターンから決定した体心立法 (BCC) 対称性及び25.6 nmの粒子間隔を持つ超格子にした (図21a)。この粒子間隔は、DNA修飾Cgカタラーゼの測定された流体力学直径と一致した (図14e及び15)。0.022⁻¹での追加の回折ピーク及び0.03⁻¹でのショルダーも観察され、これは、塩化セシウム (CsCl) と等構造である別個の格子の存在を示唆する。3つの追加のタンパク質 - タンパク質の組み合わせから形成した結晶もCsCl型格子に特徴的な散乱パターンを産出したが、同様の粒子間隔を持つBCC格子の存在を排除することはできない (図21b ~ d、表2)。ほぼ同一のタンパク質変異型からのBCC対称性ではなくCsCl型対称性を持つ格子の形成は、各々固有の格子位置に存在するタンパク質が、予測したように8個の最近隣のものとの接続を形成しているが、それらは、はっきり異なる配向も採用することを示唆する。この観察は、タンパク質の構成単位の独特な形状の異方性及び非均一界面化学が、伝統的なSNA-NP抱合体を使用してでは観察されていなかったDNA媒介性超格子組織化に影響し、新規の対称性を持つ格子を形成するための設計努力に活用されるであろうことを示す。

10

20

30

40

50

【表2】

| 粒子A | 粒子B | 格子対称性 | [hkl] 平面 | q ₀ (1/ Å) | d _{NP} (n m) | 格子パラ メータ (nm) | C |
|-------------|-------------|-------|-------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------|---------------|
| Cgカタ ラーゼ | Cgカタ ラーゼ | BCC | [110] | 0.0 303 | 25. 3 | 29.2 | $\sqrt{6}\pi$ |
| Cgカタ ラーゼ | Cgカタ ラーゼ | CsCl | [100] | 0.0 222 | 24. 5 | 28.3 | $\sqrt{3}\pi$ |
| ウシカタ ラーゼ | ウシカタ ラーゼ | BCC | [110] | 0.0 294 | 26. 2 | 30.2 | $\sqrt{6}\pi$ |
| ウシカタ ラーゼ | ウシカタ ラーゼ | CsCl | [100] | 0.0 208 | 26. 1 | 30.1 | $\sqrt{3}\pi$ |
| Cgカタ ラーゼ | ウシカタ ラーゼ | BCC | [110] | 0.0 299 | 25. 6 | 29.6 | $\sqrt{6}\pi$ |
| Cgカタ ラーゼ | ウシカタ ラーゼ | CsCl | [100] | 0.0 212 | 25. 2 | 29.1 | $\sqrt{3}\pi$ |
| ウシカタ ラーゼ | Cgカタ ラーゼ | BCC | [110] | 0.0 299 | 25. 6 | 29.6 | $\sqrt{6}\pi$ |
| ウシカタ ラーゼ | Cgカタ ラーゼ | CsCl | [100] | 0.0 212 | 25. 2 | 29.1 | $\sqrt{3}\pi$ |
| Cgカタ ラーゼ | AuNP | SC | [100] | 0.0 205 | 26. 4 | 30.6 | 2π |
| ウシカタ ラーゼ | AuNP | SC | [100] | 0.0 198 | 27. 4 | 31.7 | 2π |

表2. 格子パラメータの計算及び概要。

【0211】

AuNPに対するタンパク質の散乱断面積はごくわずかであるため、タンパク質 - AuNP 2成分系格子は、格子内のAuNPの配列にのみ依存する散乱パターンを産出することが予期される。実際に、DNA機能化タンパク質を、相補的付着末端を持つリンカーを保有するSNA-AuNP抱合体と1:1の比率で組み合わせたとき、結果として得られたCsCl型格子は、単純な立方散乱パターンを産出した (図21e ~ f)。これらの格

子において、タンパク質は、さもなければ AuNP によって占有され得る格子位置を効果的に欠失させる 3 次元スパーサーとして働く。柔らかいタンパク質ベースの構成単位の小型の 3D 構造を大きく改変することなく、かかる物理特性及び化学特性が全く異なる 2 つの型のナノ物質を組み合わせることができる能力は、DNA 媒介性組織化の幅広い一般化可能性を強調し、多機能性物質の組織化に有用である。

【0212】

タンパク質結晶の微小規模形態を、シリカに包埋させた (2 成分系タンパク質 - Au 系について) または負染色した (DNA 機能化タンパク質のみで構成される格子について) 標本の走査型透過電子顕微鏡法 (STEM) によって調査した (図 22 及び 23)。両試料の顕微鏡写真は、各寸法が 1 ~ 7 μm の単結晶の均一な形成を示す。2 成分系タンパク質 - AuNP 結晶は、明確なファセットならびに六角形及び四角形のドメインを示し、これらは、菱形十二面体へと組織化する SNA - AuNP 抱合体について既に観察されているものと同様である [Auyeung et al., Nature 505 (7481) : 73 - 77 (2014)]。これは、Au - タンパク質 2 成分系結晶に関して、タンパク質スパーサーの包含により AuNP の単純な立方配列がもたらされるにもかかわらず、発生する。2 成分系タンパク質 - AuNP 複合体を持つ単結晶の高倍率画像 (図 22 b) により、個々のナノ粒子のスタックが明確に認識できる卓越した秩序度が明らかとなった (図 22 b の挿入図)。同様に、格子平面は、Cg カタラーゼ結晶から調製した負染色標本において可視化することができた (図 22 d)。

10

【0213】

Cg カタラーゼで構成される結晶を、上記のように H_2O_2 分解アッセイにおいて用いて、酵素が結晶化プロセス後に活性なままであったかどうかを決定した。溶液中で遊離している天然または DNA 機能化酵素について、結晶による H_2O_2 分解の速度は、基質濃度に対する一時従属を示した (図 19 i) が、見掛けの速度定数は約 20 の因数によって減少した。触媒効率の同様の減少は、結晶への拡散が制限因子である結晶酵素調製、特に高効率の酵素に関する研究において既に観察されている [Mozzarelli et al., Annu Rev Bioph Biom 25 : 343 - 365 (1996)]。重要なことに、これらの酵素は、遠心分離による触媒作用の後で容易にリサイクルすることができ、少なくとも 5 周回の触媒にわたって完全な触媒活性を保持した (図 19 j)。最終回の触媒後の SAXS による不溶性物質の分析により、結晶格子が完全なままであることを確認した (図 19 k)。

20

30

【0214】

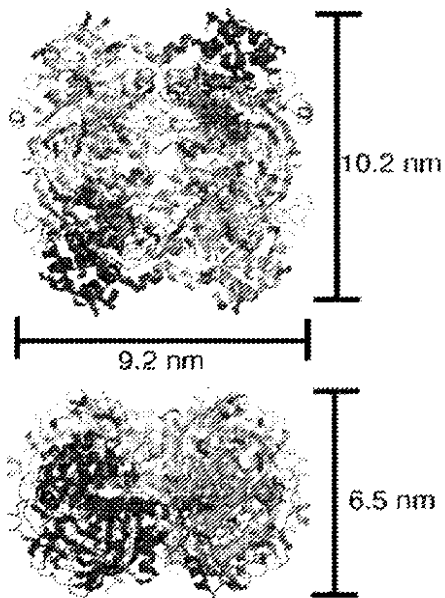
結論。最近の成果 [King et al., Science 336 (6085) : 1171 - 1174 (2012)、King et al., Nature 510 (7503) : 103 - 108 (2014)] にもかかわらず、特に二量体複合体を超える超分子構造を形成するためのタンパク質 - タンパク質相互作用の新たな設計は、普遍的相互作用モチーフの欠如に起因して困難なままである [Stranges et al., Protein Sci 22 (1) : 74 - 82 (2013)]。対照的に、オリゴヌクレオチド塩基対合相互作用は、十分に理解されており、高忠実度で形成され、タンパク質またはタンパク質ベースのウイルスカプシドを含む外部分子の組織化を体系化するための骨格として作用し得る多様な超分子形状を組織化するための手段として広く用いられている [Wilner et al., Nat Nanotechnol 4 (4) : 249 - 254 (2009)、Zhang et al., Angew Chem Int Ed 51 (14) : 3382 - 3385 (2012)、Rusling et al., Angew Chem Int Ed 53 (15) : 3979 - 3982 (2014)、Yan et al., Science 301 (5641) : 1882 - 1884 (2003)、Wang et al., ACS Nano 8 (8) : 7896 - 7904 (2014)、Coyle et al., J Am Chem Soc 135 (13) : 5012 - 5016 (2013)]。タンパク質間相互作用の形成をオリゴヌクレオチドハイブリッド形成で代置することによって、本開示は、結晶超格子が、単一タ

40

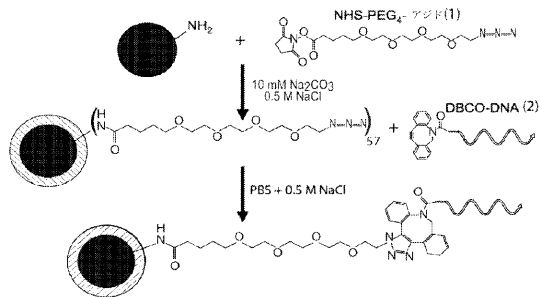
50

ンパク質、複数のタンパク質、またはタンパク質と AuNP との組み合わせから組織化され得ることを示した。この戦略は、とりわけ、複雑な生体物質（例えば、酵素カスケードまたはハイブリッド無機 - 有機格子）の機能タンパク質からの組織化を、そのアミノ酸組成または分子トポロジーにかかわらずプログラムするための手段を提供する。

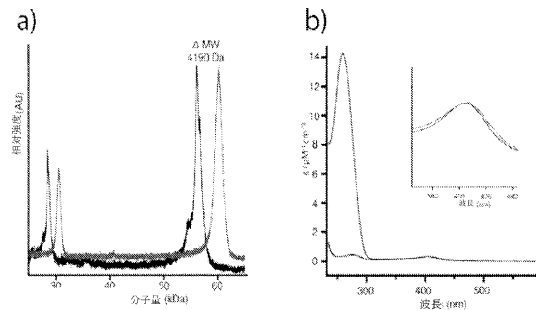
【 図 1 A 】



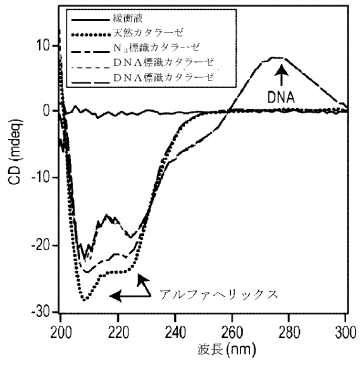
【 図 1 B 】



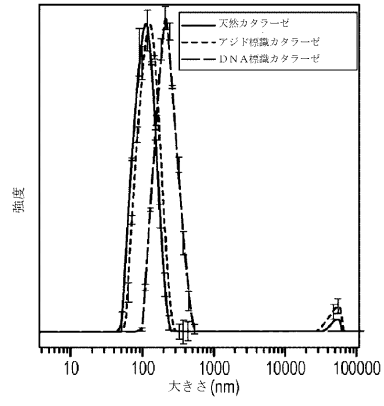
【 図 2 】



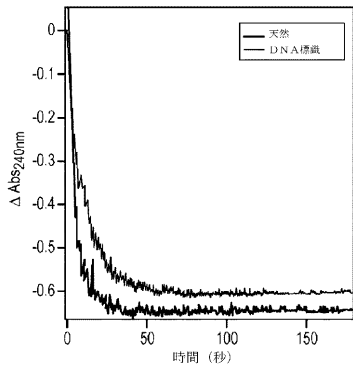
【 図 3 A 】



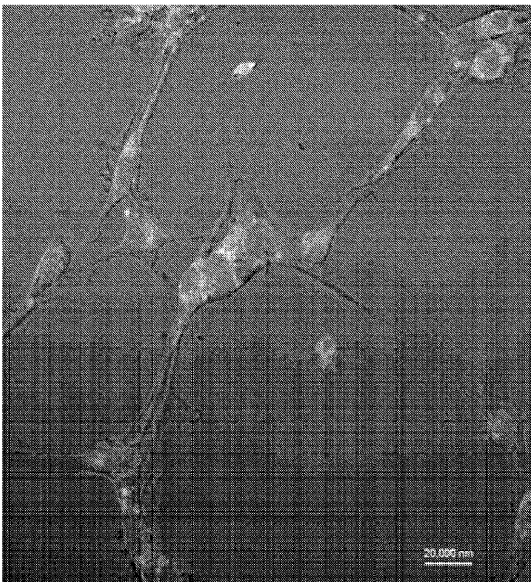
【 図 3 C 】



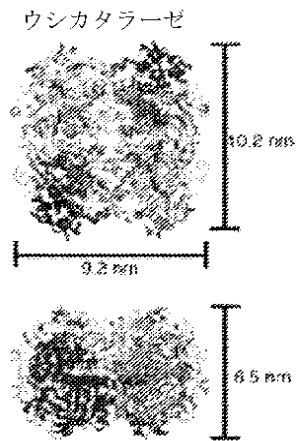
【 図 3 B 】



【 図 4 】

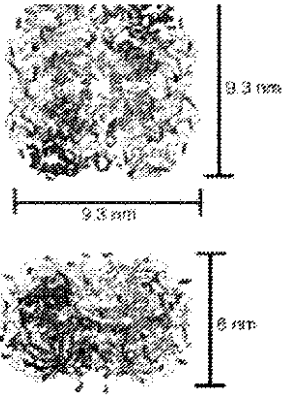


【 図 5 A 】

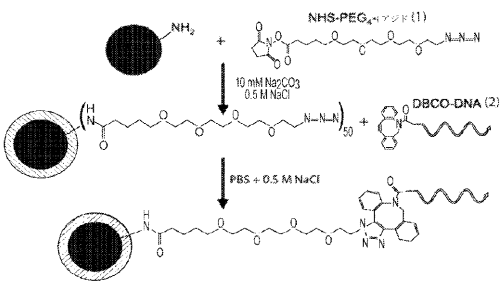


【 図 5 B 】

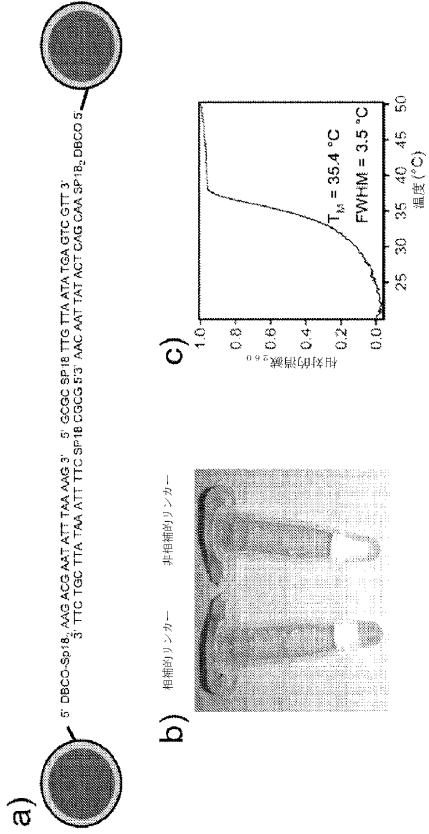
コリネバクテリウムグルタミンムカタラーゼ



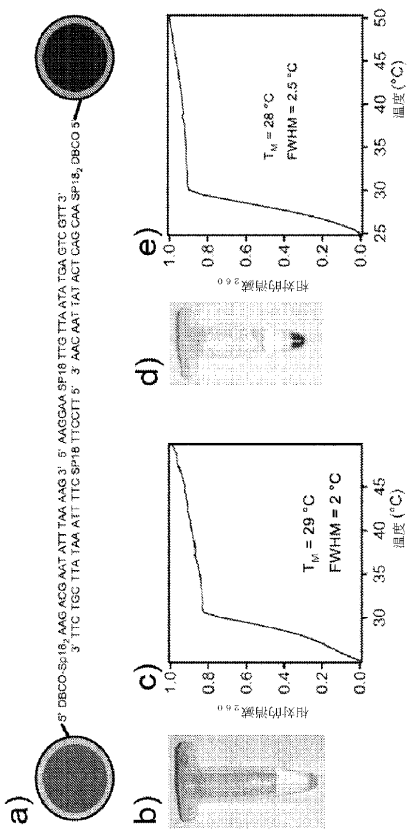
【 図 5 C 】



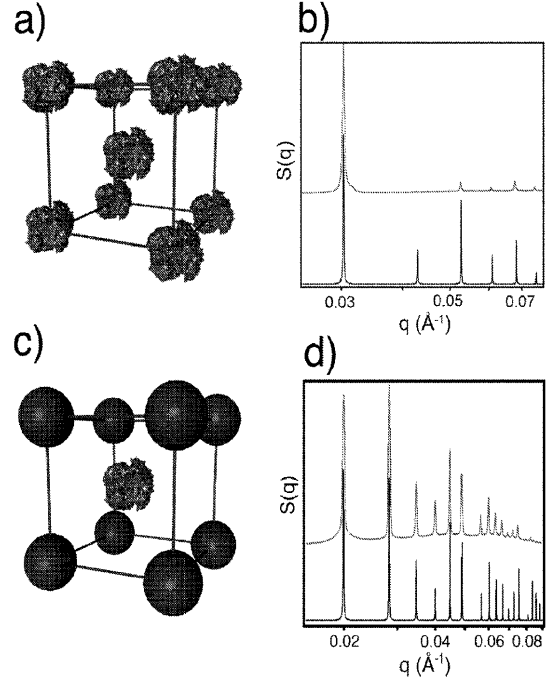
【 図 6 】



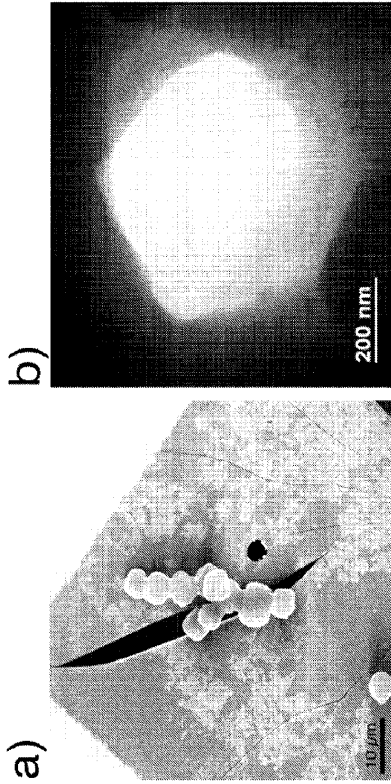
【 図 7 】



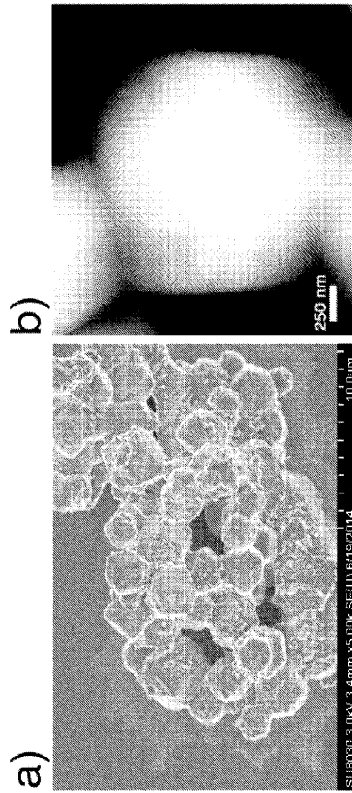
【 図 8 】



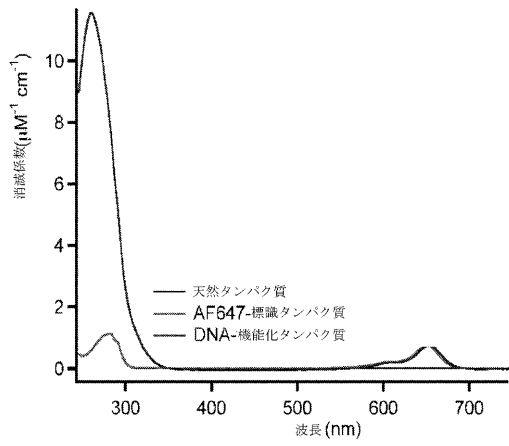
【 図 9 】



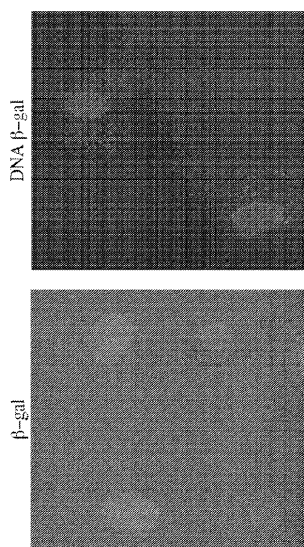
【 図 10 】



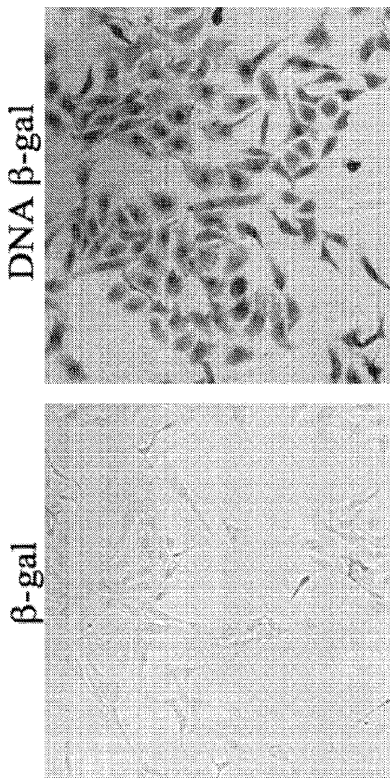
【 図 11 】



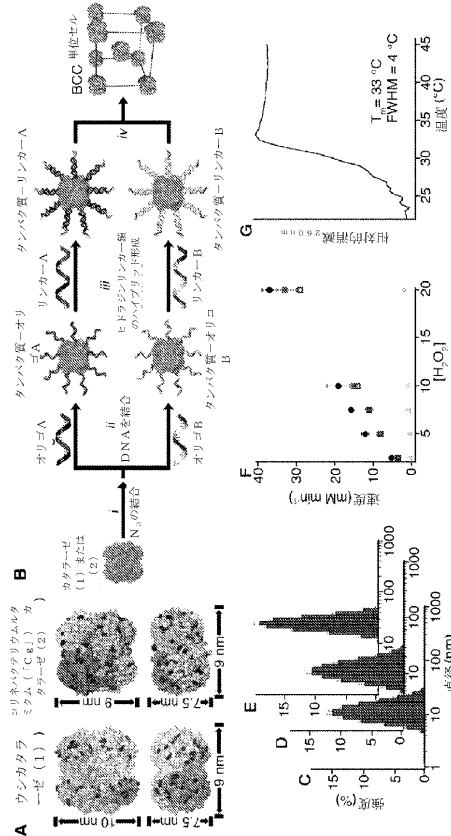
【 図 12 】



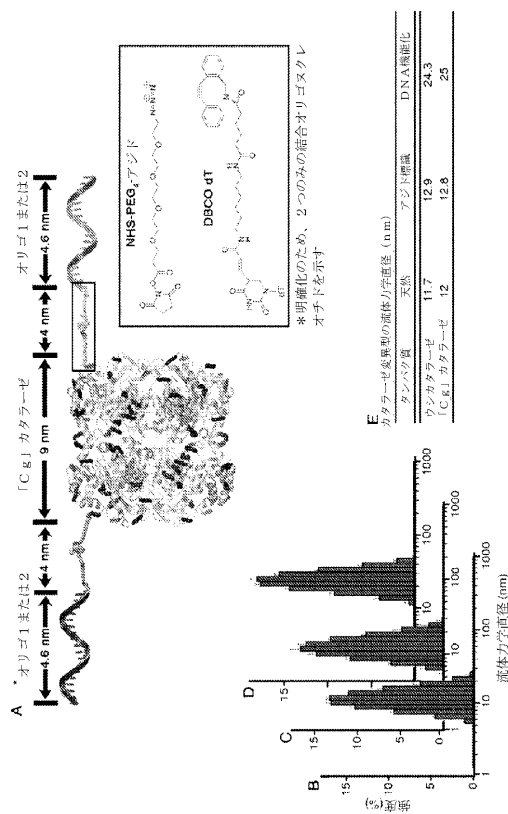
【図 1 3】



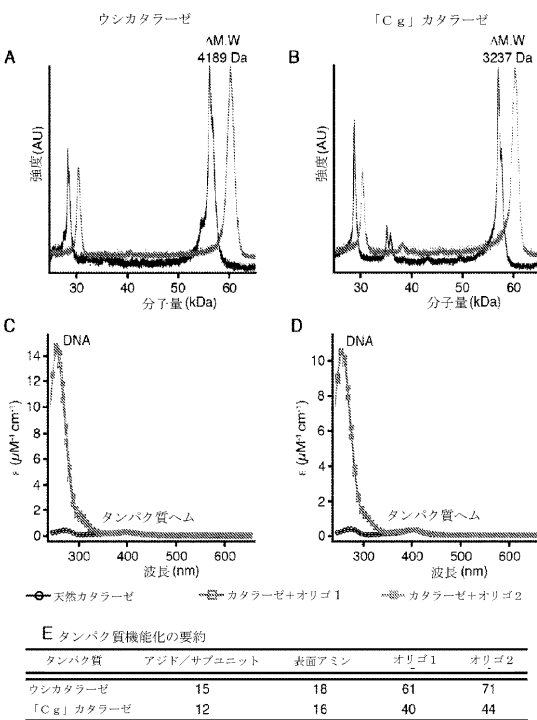
【図 1 4】



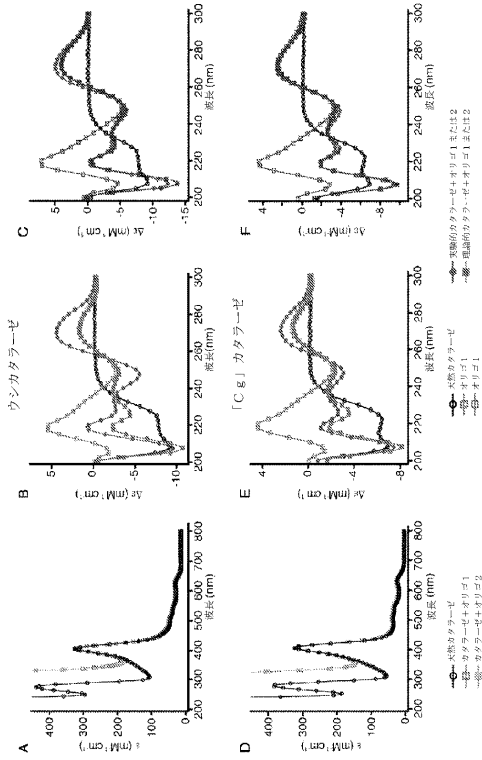
【図 1 5】



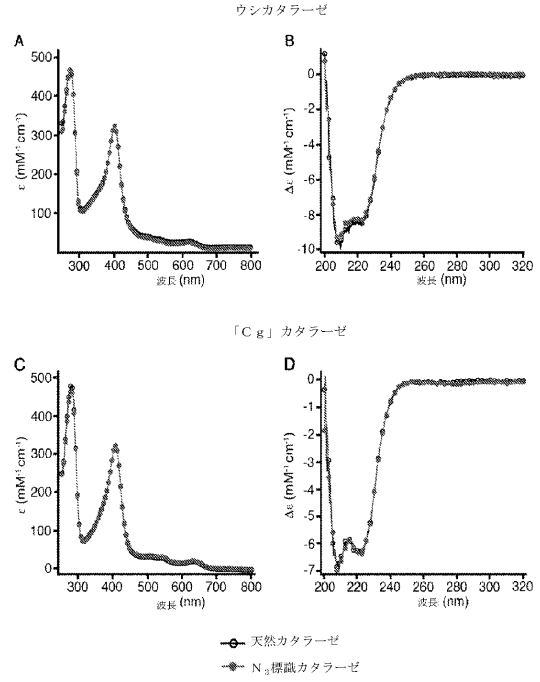
【図 1 6】



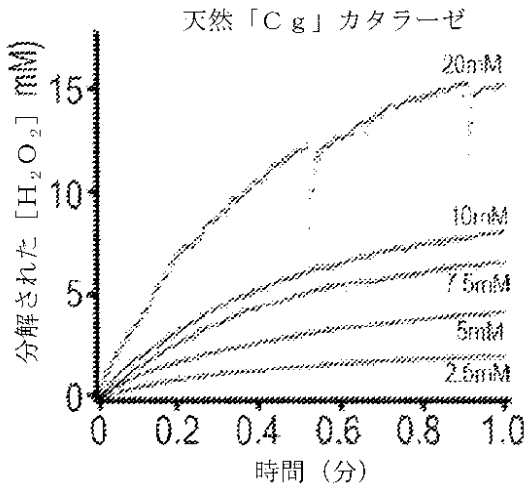
【 図 1 7 】



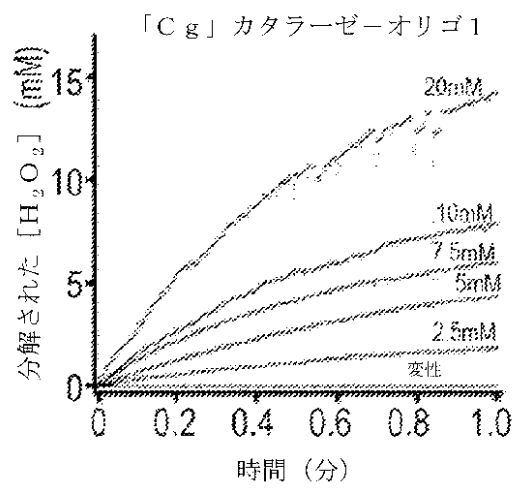
【 図 1 8 】



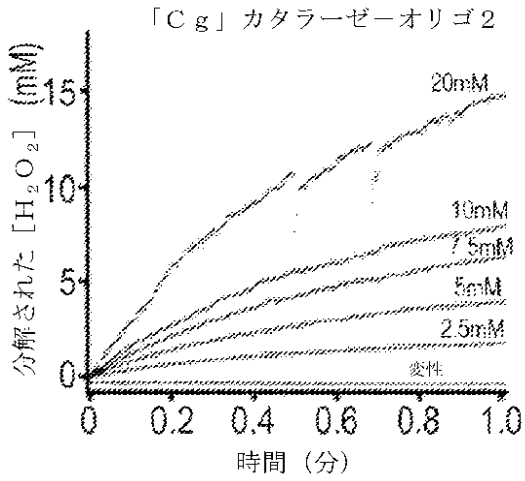
【 図 1 9 A 】



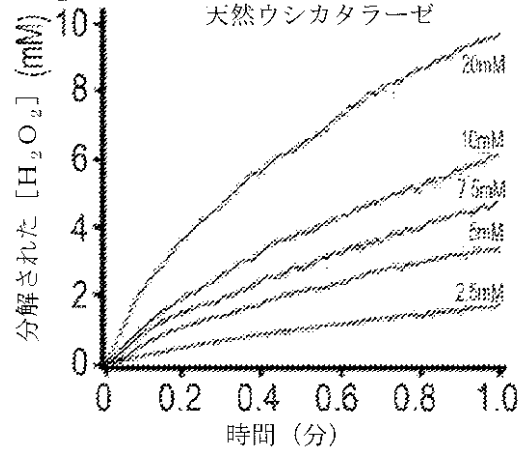
【 図 1 9 B 】



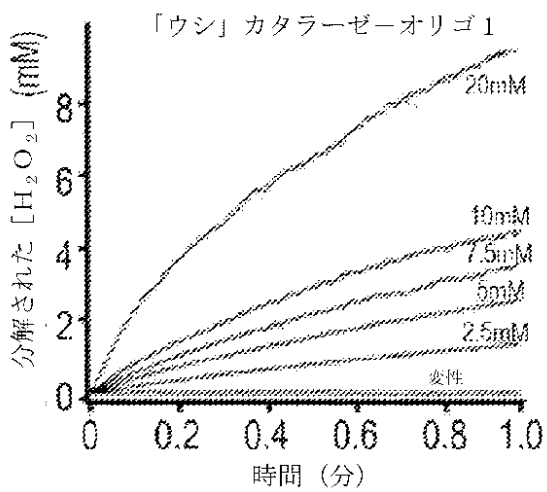
【図19C】



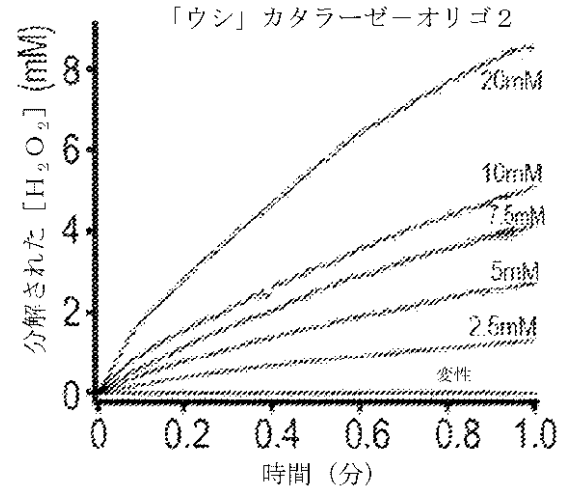
【図19D】



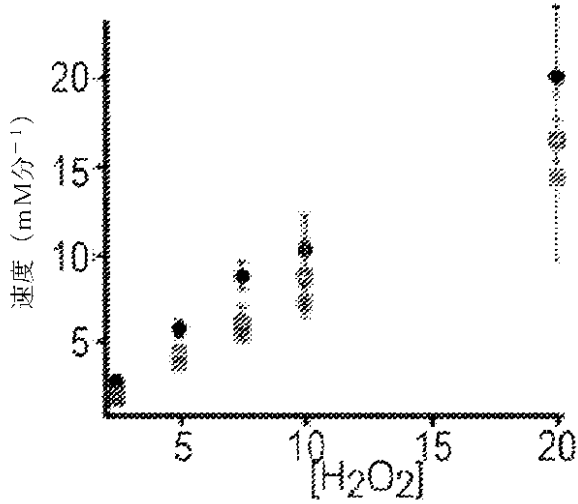
【図19E】



【図19F】



【図19G】

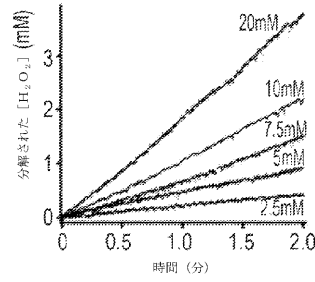


【図19H】

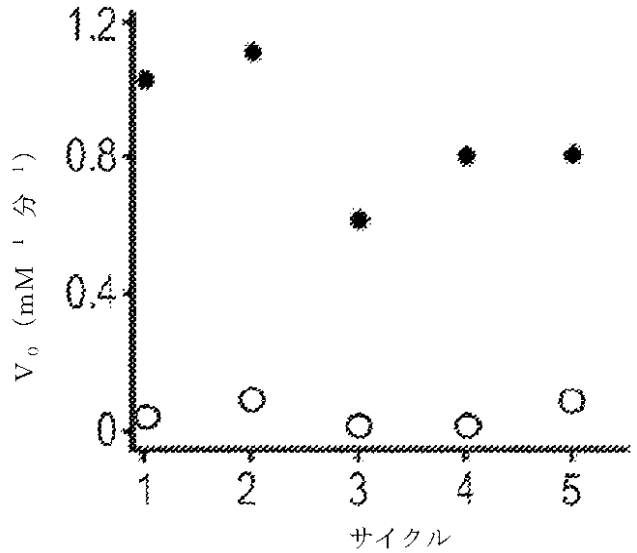
SH₂O₂分解に対する標準速度定数の要約

| タンパク質 | $K_S (M^{-1} s^{-1} \times 10^7)$ |
|---------------------|-----------------------------------|
| 天然「Cg」カタラーゼ | 3.4 ± 0.2 |
| 「Cg」カタラーゼオリゴスクレオチド1 | 2.4 ± 0.1 |
| 「Cg」カタラーゼオリゴスクレオチド2 | 2.5 ± 0.10 |
| 天然ウシカタラーゼ | 1.6 ± 0.1 |
| ウシカタラーゼオリゴスクレオチド1 | 1.19 ± 0.03 |
| ウシカタラーゼオリゴスクレオチド2 | 1.38 ± 0.06 |

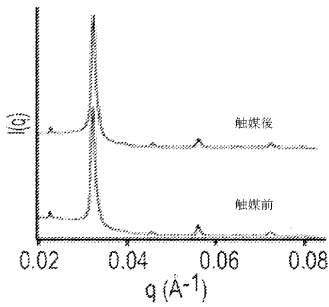
【図19I】



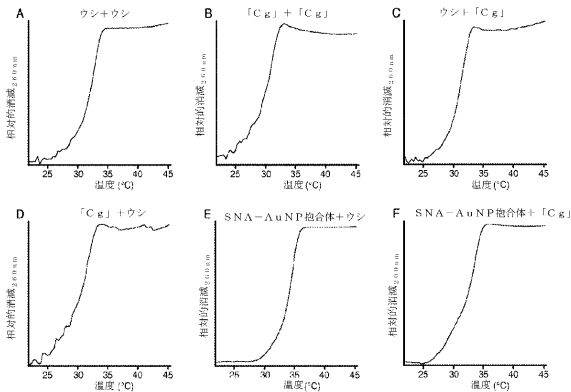
【図19J】



【図19K】



【図20】

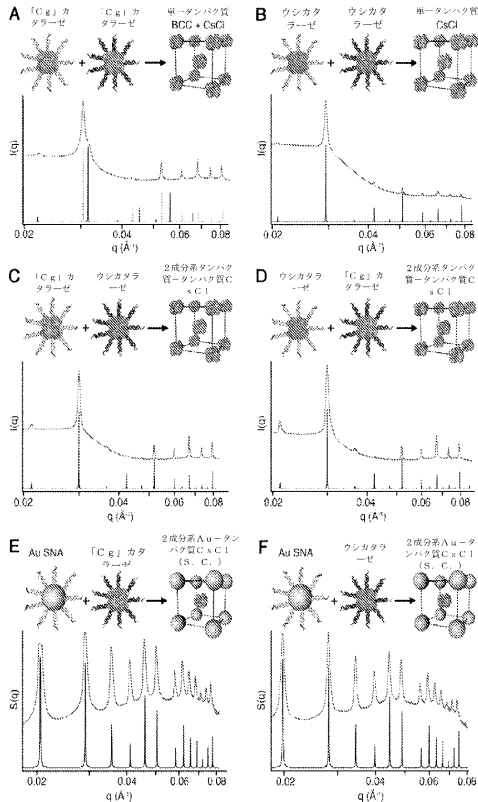


G

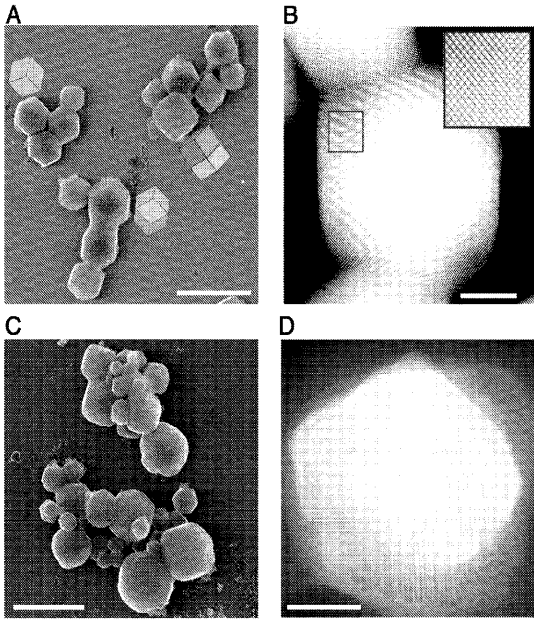
DNA型タンパク質置換生体の解離挙動

| 粒子A | 粒子B | $T_d (°C)$ | FWHM (°C) |
|-----------|-----------|------------|-----------|
| ウシカタラーゼ | ウシカタラーゼ | 33 | 2 |
| 「Cg」カタラーゼ | 「Cg」カタラーゼ | 31 | 2 |
| ウシカタラーゼ | 「Cg」カタラーゼ | 31 | 2 |
| 「Cg」カタラーゼ | ウシカタラーゼ | 31 | 2 |
| Au SNA | ウシカタラーゼ | 34 | 1 |
| Au SNA | 「Cg」カタラーゼ | 33 | 3 |

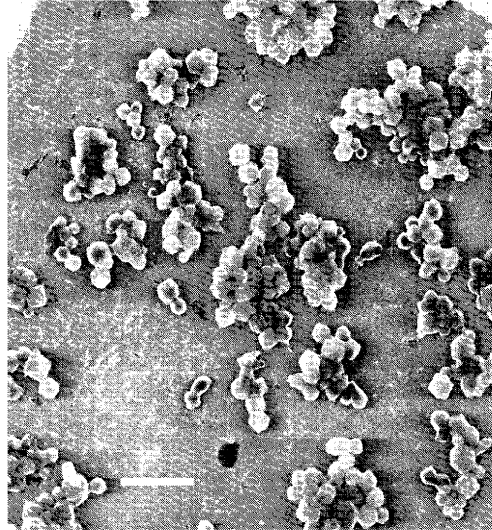
【図21】



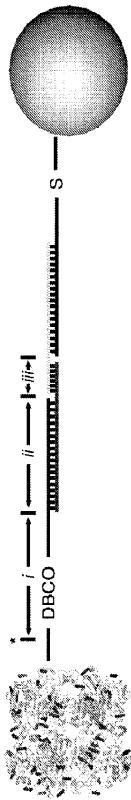
【 図 2 2 】



【 図 2 3 】



【 図 2 4 】



* 明確化のため、1つのみの結合を示す

【配列表】

2017527554000001.app

【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/US15/45971 | | | | | | | | | | | | |
|--|--|---|--|--|-----------------------|---|---|-------------------|---|---|-------------------|---|--|-------------------|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 47/48; B82Y 5/00; C12N 15/11 (2015.01) CPC - A61K 47/48953; B82Y 5/00; C12N 15/11 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | | | | | | | | | | | | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): A61K 47/48; B82Y 5/00; C12N 15/11 (2015.01) CPC: A61K 47/48953; B82Y 5/00; C12N 15/11; USPC: 424/78.17; 977/906, 915; 514/1.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatSear (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPADOC); Google Patent; Google; Google Scholar; ProQuest; polynucleotide, protein, core shell, nano, covalent | | | | | | | | | | | | | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Category*</th> <th style="width: 70%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width: 20%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>US 2010/0310872 A1 (NAKAMURA, M) 09 December 2010; paragraphs [0018]-[0024]</td> <td>1-2, 3/1-2, 4/1-2</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2006/0148124 A1 (WILSON, R) 06 July 2006; paragraph [0004]</td> <td>1-2, 3/1-2, 4/1-2</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2013/0330839 A1 (SUH, YD et al.) 12 December 2013; paragraph [0042]</td> <td>1-2, 3/1-2, 4/1-2</td> </tr> </tbody> </table> | | | Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. | A | US 2010/0310872 A1 (NAKAMURA, M) 09 December 2010; paragraphs [0018]-[0024] | 1-2, 3/1-2, 4/1-2 | A | US 2006/0148124 A1 (WILSON, R) 06 July 2006; paragraph [0004] | 1-2, 3/1-2, 4/1-2 | A | US 2013/0330839 A1 (SUH, YD et al.) 12 December 2013; paragraph [0042] | 1-2, 3/1-2, 4/1-2 |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. | | | | | | | | | | | | |
| A | US 2010/0310872 A1 (NAKAMURA, M) 09 December 2010; paragraphs [0018]-[0024] | 1-2, 3/1-2, 4/1-2 | | | | | | | | | | | | |
| A | US 2006/0148124 A1 (WILSON, R) 06 July 2006; paragraph [0004] | 1-2, 3/1-2, 4/1-2 | | | | | | | | | | | | |
| A | US 2013/0330839 A1 (SUH, YD et al.) 12 December 2013; paragraph [0042] | 1-2, 3/1-2, 4/1-2 | | | | | | | | | | | | |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex. | | | | | | | | | | | | | | |
| <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;"> * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width: 50%; border: none;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table> | | | * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family | | | | | | | | | | |
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family | | | | | | | | | | | | | |
| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report | | | | | | | | | | | | | |
| 20 October 2015 (20.10.2015) | 25 NOV 2015 | | | | | | | | | | | | | |
| Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300 | Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774 | | | | | | | | | | | | | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US15/45971

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: 5-45
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | | F I | テーマコード(参考) |
|-------------|-------------------|-----------------|------------|
| A 6 1 K | 45/00 (2006.01) | A 6 1 K 45/00 | |
| A 6 1 K | 38/16 (2006.01) | A 6 1 K 38/16 | |
| A 6 1 K | 47/02 (2006.01) | A 6 1 K 47/02 | |
| A 6 1 P | 43/00 (2006.01) | A 6 1 P 43/00 | 1 0 5 |
| A 6 1 K | 31/7088 (2006.01) | A 6 1 K 31/7088 | |
| C 1 2 N | 15/09 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 | Z N A A |
| C 1 2 Q | 1/68 (2006.01) | C 1 2 Q 1/68 | A |
| C 1 2 Q | 1/02 (2006.01) | C 1 2 Q 1/02 | |
| G 0 1 N | 33/53 (2006.01) | G 0 1 N 33/53 | D |
| C 0 7 K | 14/47 (2006.01) | C 0 7 K 14/47 | |

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 ミルキン, チャド エー.

アメリカ合衆国 イリノイ 6 0 0 9 1, ウィルメット, ウェスト ブラックホーク ロード
2 7 3 7

(72)発明者 プロディン, ジェフリー ディー.

アメリカ合衆国 イリノイ 6 0 2 0 1, エバンストン, グローブ ストリート 6 1 7

Fターム(参考) 4B063 QA18 QA20 QQ02 QQ08 QQ42 QQ79 QR32 QR48 QR72 QR77

QS28 QS36 QX01

4C076 AA32 AA65 AA94 AA95 CC41 DD21 DD60 DD66 EE41 FF34

4C084 AA01 AA19 BA35 BA42 MA38 MA41 NA11 NA13 NA14 ZB211

4C086 AA01 EA16 MA02 MA05 MA38 MA41 NA11 NA13 NA14 ZB21

4H045 AA30 BA10 BA50 CA40 DA89 EA20 EA50

| | | | |
|-------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 蛋白质/寡核苷酸核壳纳米颗粒治疗药物 | | |
| 公开(公告)号 | JP2017527554A | 公开(公告)日 | 2017-09-21 |
| 申请号 | JP2017509735 | 申请日 | 2015-08-19 |
| 申请(专利权)人(译) | 西北大学 | | |
| [标]发明人 | ミルキンチャドエー プロデインジェフリーディー | | |
| 发明人 | ミルキン, チャド エー. プロデイン, ジェフリー ディー. | | |
| IPC分类号 | A61K47/64 A61K9/51 A61K9/16 A61K47/22 A61K47/56 A61K45/00 A61K38/16 A61K47/02 A61P43/00 A61K31/7088 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/02 G01N33/53 C07K14/47 | | |
| CPC分类号 | A61K38/44 A61K38/47 A61K47/549 A61K47/6921 A61P43/00 B82Y5/00 C07K19/00 C12N9/0065 C12N9/2471 C12N9/96 C12Y111/01006 C12Y302/01023 Y02P20/582 C12P3/00 C12P19/02 C12P19 /14 | | |
| FI分类号 | A61K47/64 A61K9/51 A61K9/16 A61K47/22 A61K47/56 A61K45/00 A61K38/16 A61K47/02 A61P43/00. 105 A61K31/7088 C12N15/00.ZNA.A C12Q1/68.A C12Q1/02 G01N33/53.D C07K14/47 | | |
| F-TERM分类号 | 4B063/QA18 4B063/QA20 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063 /QR48 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS28 4B063/QS36 4B063/QX01 4C076/AA32 4C076/AA65 4C076/AA94 4C076/AA95 4C076/CC41 4C076/DD21 4C076/DD60 4C076/DD66 4C076/EE41 4C076 /FF34 4C084/AA01 4C084/AA19 4C084/BA35 4C084/BA42 4C084/MA38 4C084/MA41 4C084/NA11 4C084/NA13 4C084/NA14 4C084/ZB211 4C086/AA01 4C086/EA16 4C086/MA02 4C086/MA05 4C086 /MA38 4C086/MA41 4C086/NA11 4C086/NA13 4C086/NA14 4C086/ZB21 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA50 4H045/CA40 4H045/DA89 4H045/EA20 4H045/EA50 | | |
| 代理人(译) | 夏木森下 飯田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作 | | |
| 优先权 | 62/137183 2015-03-23 US 62/039608 2014-08-20 US 62/039340 2014-08-19 US | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本公开涉及核 - 壳纳米颗粒，包含核 - 壳纳米颗粒的组合物及其使用方法。本发明涉及核 - 壳纳米颗粒，其中核包含单一蛋白质，壳包含多个多核苷酸，并且多核苷酸通过共价键与蛋白质表面结合，核壳纳米颗粒子。蛋白质表现出催化活性，信号传导活性，治疗活性或运输活性。3. 根据权利要求1或2所述的核 - 壳纳米颗粒，其中所述多个多核苷酸中的每一个是相同的。

| (19) 日本国特許庁 (JP) | (12) 公表特許公報 (A) | (11) 特許出願公表番号 特表2017-527554 (P2017-527554A) (43) 公表日 平成29年9月21日 (2017. 9. 21) |
|--------------------------|------------------------------|--|
| (51) Int. Cl. | F 1 | テーマコード (参考) |
| A 6 1 K 47/64 (2017. 01) | A 6 1 K 47/64 | 4 B 0 6 3 |
| A 6 1 K 9/51 (2006. 01) | A 6 1 K 9/51 | 4 C 0 7 6 |
| A 6 1 K 9/16 (2006. 01) | A 6 1 K 9/16 | 4 C 0 8 4 |
| A 6 1 K 47/22 (2006. 01) | A 6 1 K 47/22 | 4 C 0 8 6 |
| A 6 1 K 47/56 (2017. 01) | A 6 1 K 47/56 | 4 H 0 4 5 |
| | 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 | (全 74 頁) 最終頁に続く |
| (21) 出願番号 | 特願2017-509735 (P2017-509735) | (71) 出願人 |
| (86) (22) 出願日 | 平成27年8月19日 (2015. 8. 19) | ノースウェスタン ユニバーシティ |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成29年3月22日 (2017. 3. 22) | アメリカ合衆国 イリノイ 60208、 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2015/045971 | エヴァンストン、 クラーク ストリ- |
| (87) 国際公開番号 | W02016/028940 | ト 6 3 3 |
| (87) 国際公開日 | 平成28年2月25日 (2016. 2. 25) | (74) 代理人 |
| (31) 優先権主張番号 | 62/137, 183 | 弁理士 山本 秀策 |
| (32) 優先日 | 平成27年3月23日 (2015. 3. 23) | (74) 代理人 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | 弁理士 森下 夏樹 |
| (31) 優先権主張番号 | 62/039, 608 | 弁理士 飯田 貴敏 |
| (32) 優先日 | 平成26年8月20日 (2014. 8. 20) | (74) 代理人 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | 弁理士 石川 大輔 |
| (31) 優先権主張番号 | 62/039, 340 | (74) 代理人 |
| (32) 優先日 | 平成26年8月19日 (2014. 8. 19) | 弁理士 山本 健作 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | |