

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7068173号

(P7068173)

(45)発行日 令和4年5月16日(2022.5.16)

(24)登録日 令和4年5月6日(2022.5.6)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 31/4745(2006.01)

A 6 1 K 31/4745

A 6 1 K 9/10 (2006.01)

A 6 1 K 9/10

A 6 1 K 9/12 (2006.01)

A 6 1 K 9/12

A 6 1 K 9/72 (2006.01)

A 6 1 K 9/72

A 6 1 K 31/282(2006.01)

A 6 1 K 31/282

請求項の数 29 (全123頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-535362(P2018-535362)

(86)(22)出願日 平成29年1月6日(2017.1.6)

(65)公表番号 特表2019-501198(P2019-501198  
A)

(43)公表日 平成31年1月17日(2019.1.17)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/012625

(87)国際公開番号 WO2017/120537

(87)国際公開日 平成29年7月13日(2017.7.13)

審査請求日 令和1年12月16日(2019.12.16)

(31)優先権主張番号 62/276,634

(32)優先日 平成28年1月8日(2016.1.8)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(73)特許権者 506115514

ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシテ  
ィ オブ カリフォルニアThe Regents of the U  
niversity of Califo  
rniaアメリカ合衆国, カリフォルニア州 9  
4 6 0 7 - 5 2 0 0 , オークランド, フ  
ランクリン ストリート 1 1 1 1 , 1 2  
番 フロア

(74)代理人 100108453

弁理士 村山 靖彦

(74)代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(74)代理人 100133400

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 カーゴ送達のための、脂質二重層コーティングを備えたメソ多孔性シリカナノ粒子

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

a) 表面を有し、かつ分子をその中に収容するために適した多数の空孔を画定するシリカナノ粒子；

b) 前記表面をコーティングする脂質二重層であって、リン脂質及びコレステロール(C H O L)を含む脂質二重層；

c) 前記多数の空孔を含む空孔内に配置されたプロトン化剤であって、トリエチルアンモニウムスクロースオクタスルファート(T E A<sub>8</sub> S O S)であるプロトン化剤；及び

d) 前記多数の空孔内で前記プロトン化剤と会合する、イリノテカンを含むカーゴを含むナノ粒子薬物担体。

## 【請求項 2】

前記薬物が、前記多数の空孔内で、S O S<sup>8-</sup>と会合したゲル様沈澱物としてプロトン化及び捕捉されている、請求項1に記載のナノ粒子薬物担体。

## 【請求項 3】

1 ミクロン未満の最大寸法を有するサブミクロン構造を有する、請求項1または2に記載のナノ粒子薬物担体。

## 【請求項 4】

少なくとも約20 w / w %の薬物負荷容量を有する、請求項1から3のいずれか一項に記載のナノ粒子薬物担体。

## 【請求項 5】

少なくとも約 40 w / w % の薬物負荷容量を有する、請求項 4 に記載のナノ粒子薬物担体。

【請求項 6】

前記脂質二重層が、前記ナノ粒子表面を包囲する実質的に連続的な二重層を形成している、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のナノ粒子薬物担体。

【請求項 7】

前記脂質二重層が、前記多数の空孔を安定的に密閉している、請求項 6 に記載ナノ粒子薬物担体。

【請求項 8】

pH 7.4 を有する生物学的緩衝液中で、37℃ で、20 時間にわたって約 15 % 未満の薬物漏出を有する、請求項 7 に記載のナノ担体薬物担体。

10

【請求項 9】

前記脂質二重層がリン脂質、コレステロール、及び m P E G リン脂質を含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載のナノ粒子薬物担体。

【請求項 10】

前記脂質二重層がリン脂質 50 ~ 90 mol % : コレステロール 10 ~ 50 mol % : m P E G リン脂質 1 ~ 10 mol % を含む、請求項 9 に記載のナノ粒子薬物担体。

【請求項 11】

前記脂質二重層が、D S P C / C h o l / D S P E - P E G を約 3 : 2 : 0.15 のモル比で含む、請求項 1 に記載のナノ粒子薬物担体。

【請求項 12】

20

前記シリカナノ粒子がメソ多孔性シリカナノ粒子である、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載のナノ粒子薬物担体。

【請求項 13】

懸濁液中の前記薬物担体の集団が、実質的に単峰性のサイズ分布を示す；及び／または、約 0.2 未満の P D I を示す、請求項 1 に記載のナノ粒子薬物担体。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の多数のナノ粒子薬物担体；及び薬学的に許容される担体を含む、医薬製剤。

【請求項 15】

30

乳剤、分散剤、または懸濁剤である、請求項 14 に記載の製剤。

【請求項 16】

前記懸濁剤、乳剤、または分散剤が、4℃ で貯蔵した場合に少なくとも 1 カ月、または少なくとも 2 カ月、または少なくとも 3 カ月、または少なくとも 4 カ月、または少なくとも 5 カ月、または少なくとも 6 カ月にわたって安定している、請求項 15 に記載の製剤。

【請求項 17】

前記製剤中の前記ナノスケール薬物担体が、実質的に単峰性のサイズ分布を示す、請求項 14 に記載の製剤。

【請求項 18】

前記製剤中の薬物担体が、約 0.2 未満、または約 0.1 未満の P D I を示す、請求項 15 に記載の製剤。

40

【請求項 19】

静脈内投与、動脈内投与、脳内投与、髄腔内投与、経口投与、エアロゾル投与、吸入を介する投与（鼻腔内及び気管内送達を含む、カニューレを介しての頭蓋内投与、ならびに皮下または筋肉内デポ一沈着からなる群から選択される経路による投与のために製剤化されている、請求項 17 に記載の製剤。

【請求項 20】

無菌注射可能である、請求項 19 に記載の製剤。

【請求項 21】

単位投与製剤である、請求項 14 に記載の製剤。

50



## 【請求項 2 2】

がんの治療における使用のための、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の多数のナノ粒子薬物担体を含む組成物。

## 【請求項 2 3】

前記ナノ粒子薬物担体が多剤化学療法レジメンの 1 成分である、請求項 2 2 に記載の組成物。

## 【請求項 2 4】

前記多剤化学療法レジメンが、イリノテカン ( I R I N )、オキサリプラチン ( O X )、5 - フルオロウラシル ( 5 - F U )、及びロイコボリン ( L V ) からなる群から選択される少なくとも 2 つの薬物を含む、請求項 2 3 に記載の組成物。

10

## 【請求項 2 5】

前記がんが、膵臓癌、結腸直腸癌、乳癌、肺癌、肝臓癌、脳幹膠腫、又は黒色腫である、請求項 2 2 に記載の組成物。

## 【請求項 2 6】

前記がんが、膵臓管状腺癌 ( P D A C ) である、請求項 2 2 に記載の組成物。

## 【請求項 2 7】

がんの治療のための医薬の製造における、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載のナノ粒子薬物担体の使用。

## 【請求項 2 8】

前記がんが、膵臓癌、結腸直腸癌、乳癌、肺癌、肝臓癌、脳幹膠腫、又は黒色腫である、請求項 2 7 に記載の使用。

20

## 【請求項 2 9】

前記がんが、膵臓管状腺癌 ( P D A C ) である、請求項 2 7 に記載の使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、2016 年 1 月 8 日出願の米国特許出願第 6 2 / 2 7 6 , 6 3 4 号の利益及びそれに対する優先権を主張し、その出願は、あらゆる目的のためにその全体で参照によって本明細書に組み込まれる。

30

## 【0 0 0 2】

政府支援の言明

本発明は、米国国立衛生研究所 / 米国国立がん研究所によって授与された認可番号 R 0 1 C A 1 3 3 6 9 7 及び U O 1 C A 1 9 8 8 4 6 の下で、政府支援により成された。政府は、本発明において一定の権利を有する。

## 【背景技術】

## 【0 0 0 3】

膵臓管状腺癌 ( P D A C ) は、5 年生存率が 6 % 未満である致命的な疾患である ( S i e g e l e t a l . ( 2 0 1 4 ) C A C a n c e r J . C l i n . 6 4 ( 1 ) : 9 - 2 9 ) 。現在、化学療法での主要な処置レジメンは、単一試薬、ゲムシタビン ( G E M ) 、または 4 剤レジメン、) のいずれかを含む。F O L F I R I N O X は、G E M よりも良好な奏効率 ( 3 1 . 6 % に対して 9 . 4 % ) を、改善された生存 ( 1 1 カ月に対して 6 . 8 カ月 ) と共に有するが、前者の組合せは、毒性がかなり高く、良好なパフォーマンスステータスを有する少数の P D A C 患者に限定される ( C o n r o y e t a l . ( 2 0 1 1 ) N . E n g l . J . M e d . 3 6 4 ( 1 9 ) : 1 8 1 7 - 1 8 2 5 ) 。イリノテカンが、骨髄 (例えば、好中球減少症)、肝臓 (例えば、壊死及び脂肪症) 及び胃腸 ( G I ) 管 (例えば、嘔吐、下痢) に対する重篤な影響を含む、この毒性にかなり寄与している ( C o n r o y e t a l . ( 2 0 1 1 ) N . E n g l . J . M e d . 3 6 4 ( 1 9 ) : 1 8 1 7 - 1 8 2 5 ; U e n o e t a l . ( 2 0 0 7 ) C a n c e r C h e m o t h e r . P h a r m a c o l . 5 9 ( 4 ) : 4 4 7 - 4 5 4 ; L o u p a k i s e t a l .

40

50

(2013) Br. J. Cancer, 108(12): 2549 - 2556)。したがって、PDACでの第一選択治療のために利用可能な薬物を改善することを目的として、イリノテカン毒性を改善する処置レジメンに対する多大な要求が存在する。

#### 【0004】

有効性を維持しながらイリノテカン毒性を低下させるためのアプローチの1つは、全身的な薬物放出を低減しながら、がん部位へと保護送達することを伴う、ナノ担体への高用量薬物封入である。ポリマー粒子及びリポソームを含む種々の担体種が使用されており、イリノテカン送達が多量成功している(Chou et al. (2003) J. Biosci. Bioeng., 95(4): 405 - 408; Onishi et al. (2003) Biol. Pharmaceut. Bull. 26(1): 116 - 119; Messerer et al. (2004) Clin. Cancer Res, 10(19): 6638 - 6649; Drummond et al. (2006) Cancer Res., 66(6): 3271 - 3277; Valencia et al. (2013) Nanomed. 8(5): 687 - 698; Sadzuka et al. (1998) Cancer Lett., 127(1): 99 - 106; Ramsay et al. (2008) Eur. J. Pharm. Biopharm. 68(3): 607 - 617; Liet al. (2015) Adv. Func. Mat. 25(5): 788 - 798)。しかしながら、ポリマーナノ粒子は有望なインビトロ結果、イリノテカンを負荷する限られた容量(<1w/w%)及び早期薬物放出(例えば、5時間で40%)を示す一方で、このナノ粒子は、腫瘍内薬物送達を改善しながらも、必要な毒性低下を達成することはできなかった(Valencia et al. (2013) Nanomed. 8(5): 687 - 698)。リポソームは、硫酸アンモニウムまたはプロトン捕捉剤の使用によって、高いイリノテカン負荷容量を達成することができた(Chou et al. (2003) J. Biosci. Bioeng., 95(4): 405 - 408; Messerer et al. (2004) Clin. Cancer Res, 10(19): 6638 - 6649; Drummond et al. (2006) Cancer Res., 66(6): 3271 - 3277; Sadzuka et al. (1998) Cancer Lett., 127(1): 99 - 106; Ramsay et al. (2008) Eur. J. Pharm. Biopharm. 68(3): 607 - 617)、せん断及び浸透ストレス下での担体不安定性、さらには血清タンパク質による二重層の破壊は、早期薬物放出及び毒性をもたらした(Liu et al. (2000) In: Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 172(1-3): 57 - 67; Heurtault et al. (2003) Biomaterials, 24(23): 4283 - 4300; Sabin et al. (2006) Eur. Phys. J. E. 20(4): 401 - 408)。

#### 【0005】

上記のとおり、治験または治療状況において制がん薬を送達するための多くの試みは、リポソーム(Messerer et al. (2004) Clin. Cancer Res, 10(19): 6638 - 6649; Cancer Res. 2006, 66, 3271)またはポリマーベースの系(Onishi et al. (2003) Biol. Pharm. Bull. 26(1): 116 - 119)をベースとしている。これらの担体の多くは、球形粒子であるか、または超分子が80~200nmの範囲のサイズに集合しており、多くの場合に、循環半減期を延長するために表面上にPEGコーティングを含有し、かつ典型的には、約5w/w%(例えば、ポリマーベースのナノ粒子)~約50w/w%(例えば、リポソーム担体)の負荷容量を示す。前臨床レベルでは、マウスPDACモデルを含む動物研究におけるこれらのナノ担体の潜在的な利益は、インビボ毒性の低下、抗腫瘍有効性の増強、及び生存率の改善を含むことが示されている。

#### 【0006】

しかしながら、少数のナノ担体しか、PDAC患者のための治験に進んでいない。イオノ

10

20

30

40

50

フォアを含むナノ担体 (A 2 3 1 8 7、カリマイシンとしても公知) は、イリノテカン送達リポソーム製剤 (Irinophore C) 及びプロトン化剤 (protonating agent) イリノテカン送達リポソーム製剤 (MM - 3 9 8) (Baker et al. (2008) Clin. Cancer Res. 14: 7260 - 7271; Drummond et al. (2006) Cancer Res. 15 (66): 3271 - 3277) を可能にした。Irinophore C 製剤 (Champions Biotechnology) は、イオノフォア、A 2 3 1 8 7、または硫酸アンモニウムを使用して、膜貫通プロトン勾配の生成による能動的イリノテカン負荷を利用するリポソーム担体である (Ramsay et al. (2008) Eur. J. Pharm. Biopharm. 68: 607 - 617)。Irinophore C 製剤は、2011年に始まった臨床試験で使用されたが、試験または結果の成果についての情報は更新されていない。

10

#### 【0007】

最新の第3相治験で、Merrimackによるイリノテカン用のリポソーム担体 (MM - 3 9 8) の開発が、第2選択処置オプションとして、PDACにおいて延命効果の改善を示したが、比較的高率のGI管及び骨髄毒性が、重篤かつ生命を脅かす下痢及び好中球減少症についての黒枠警告を招いた (Von Hoff et al. (2013) Br. J. Cancer, 109 (4): 920 - 925; www.fda.gov/news events/newsroom/pressannouncements/ucm468654.htm)。MM - 3 9 8 治験に参加したヒト対象も、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) を含む肝臓酵素の有意な上昇を示した (例えば、www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\_docs/label/2015/207793LB.pdfを参照されたい)。それにもかかわらず、MM - 3 9 8 は、GEM療法に対して応答し得ない患者についてPDACで使用するためのFDAの承認を得て、Onivyde (登録商標) として販売されている (例えば、www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm468654.htmを参照されたい)。

20

#### 【0008】

MM - 3 9 8 リポソーム製剤 (Merrimack Pharmaceuticals) は、ポリアニオン系捕捉剤の援助で塩酸イリノテカンを組み込んでいる (ESMO GI 2014, www.merrimackpharma.com)。より具体的には、MM - 3 9 8 リポソームへのイリノテカン負荷は、多価アニオン系捕捉剤であるトリエチルアンモニウムスクロースオクタスルファート (TEASOS) のリポソーム内薬物封入によって達成された。この薬品は、受動的薬物封入によって達成され得る負荷の10倍超のイリノテカンプロトン化及び捕捉をもたらす (Drummond et al. (2006) Cancer Res. 66 (6): 3271 - 3277)。MM - 3 9 8 リポソームのIV投与は、転移性腫瘍病巣の阻害を含めて、マウスにおける様々なPDAC腫瘍モデルで完全な腫瘍退縮を誘導することが示されている (Paz et al. (2102) Cancer Res. 72 (12 Suppl): Abstract A63)。MM - 3 9 8 は現在、第3相治験中であり、動物及びヒト試験において、遊離イリノテカンと比較して、腫瘍阻害、薬物動態及び有効性の改善をもたらすと主張している (Kalra (2012) AACR meeting, Abstract #5622)。これは、マウス異種移植片試験において20mg/kgの用量のMM - 3 9 8 (ヒト等価用量60~120mg/m<sup>2</sup>) を使用しての完全なPDAC退縮を主張する実験データを含む (Paz et al. (2102) Cancer Res. 72 (12 Suppl): Abstract A63)。MM - 3 9 8 はまた、マウスにおいて遊離イリノテカンの最大耐量 (MTD) を80から324mg/kgに増加させる (Drummond et al. (2006) Cancer Res. 66 (6): 3271 - 3277)。加えて、417人のPDAC患者を含むMerrimack Pharmaceuticalsによる第3相治験で (Hoff et al. ESMO GI 2014, www.merrimackpha

30

40

50

rma.com)、MM-398、5-FU及びロイコボリンの組合せは、6.1か月の全生存期間(OS)をもたらしたが、これは、5-FU及びロイコボリンを与えられた対照アームよりも1.9カ月長い。しかしながら、MM-398リボソーム製剤へのイリノテカンの能動的負荷は受動的封入手順よりも薬物負荷容量を増強するが、この合成技術は多数のステップを必要とし、リボソーム担体は、本明細書において提供するLB-MSNプラットフォームと比較して、同じコロイド安定性または同量の細胞内放出を提供することはない。それにもかかわらず、MM-398は、GEM療法に対して応答し得ない患者についてPDACで使用するためのFDAの承認を得て、ONIVYDE(登録商標)として販売されている。リボソームへの薬物捕捉を増加させるためのポリアニオン系ポリマーの使用は、約80nmの薬物沈殿をもたらす(Zhu et al.(1996)39(1):138-142; Colbern et al.(1998)Clin.Cancer Res.4(12):3077-3082)、このことが、LB-MSNプラットフォームと比較して、ゆっくりとしたイリノテカンのリボソーム担体からの放出の理由の1つを構成している。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【文献】米国特許第8,992,984B1号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0010】

したがって、安全範囲の改善及び毒性の低下を伴って、イリノテカン化学療法などの化学療法を含む効率的な薬物送達を可能にするナノ担体及び送達方法がなお、満たされずに必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0011】

膵臓管状腺癌(PDAC)の5年生存率を改善するために、緊急に介入することが必要とされている。4剤レジメンであるFOLFIRINOX(イリノテカン(IRIN)、5-フルオロウラシル(5-FU)、オキサリプラチン(OX)、及びロイコボリン(LV)から構成される)は、より頻繁に使用されるゲムシタピン(GEM)よりも良好な生存結果を有するが、前者の処置レジメンは、高度に毒性であり、良好なパフォーマンスステータスを有する患者における使用に制限される。イリノテカンが、FOLFIRINOX毒性(骨髄及び胃腸管)に著しく寄与するので、本発明の具体的な目的の1つは、前者の薬物の毒性を、特注設計されたメソ多孔性シリカナノ粒子(MSNP)プラットフォームで低下させることであり、この特注設計されたメソ多孔性シリカナノ粒子(MSNP)プラットフォームは、コーティングされた脂質二重層(LB)を越えての高用量イリノテカン負荷のためにプロトン勾配を使用する。例えば、免疫適格性マウスにおけるKras由来同所PDACモデルにおいてリボソーム同等物と比較した場合に、LBコーティングされたMSN(LB-MSN)担体の安定性の改善は、より良好に保護されたイリノテカン送達及び腫瘍薬物濃度の上昇を可能にする。LB-MSNナノ担体は、腫瘍転移を処置するためにも、より効率的である。同様に重要なことに、LB-MSN担体による漏出の減少及びよりゆっくりとした薬物放出速度が、リボソーム担体と比較して、骨髄、胃腸及び肝臓毒性の率を劇的に減少させる。LB-MSN担体による高い有効性及び毒性の低下の組合せは、第一選択治療としてのイリノテカンの使用を促進して、PDAC生存を改善する。

30

40

【0012】

概して、本発明の一態様では、表面を有し、かつ分子をその中に収容するために適した多数の空孔を画定するシリカ体と、表面をコーティングする脂質二重層(例えば、リン脂質二重層)と、コーティングされた脂質二重層によって空孔中に含まれるカーゴ捕捉剤とを含むナノ担体であって、サブミクロン構造が1ミクロン未満の最大寸法を有し、リン脂質

50

二重層が多数の空孔を安定的に密閉し、かつ追加のパッケージング、標的化、イメージング、及び機能化のためのベースとして役立ち得るナノ担体を提供する。

【0013】

本発明の重要な一態様は、改善されたカーゴ/薬剤（例えば、イリノテカンまたは本明細書に記載の化学構造を有する他の分子（複数可））ナノ担体を作成する新たな方法を含む。これらの方法は概して、分子をその中に収容するために適した多数の空孔を備えた表面を有するシリカ体を含む未負荷ナノ担体を得ることと、脂質二重層（例えば、リン脂質二重層）によってカーゴ捕捉剤、標的化剤、またはイメージング剤を空孔内に封入することを含む。以下で詳細に論述するとおり、実施例には、これだけに限られないが、濃縮イリノテカンナノ担体を作成する新たな方法が含まれる。特定の実施形態では、これらの方法は、イリノテカン分子の拡散に特異的に影響を及ぼす、及び/またはそれを捕捉する能力を有する薬剤（例えば、トリエチルアンモニウムスクロースオクタスルファート）も選択し、それを多数の空孔内に配置する。ナノ担体及び空孔は、脂質二重層で完全にコーティングされる（例えば、音波処理プロセスを使用）。典型的には、シリカ体ナノ担体を乾燥させない、及び/またはこのコーティングステップの直前に洗浄する。任意選択で、特定の実施形態では、この脂質二重層は、ナノ担体機能を促進するように選択された1つまたは複数の生理活性分子を含み得る（ポリエチレングリコール、及び/または標的化リガンド、及び/またはパクリタキセル及び/または活性化イリノテカン、SN38など）。次いで、このコーティングステップの後に、イリノテカンは、脂質二重層を越えて空孔内に移動することができ、そこで捕捉される。これは、「遠隔薬物負荷（remote drug loading）」としても知られている。この方法で、驚くべき高い負荷容量を有するイリノテカンナノ担体（例えば、40重量%または40%超の薬物/MSNP）が形成され得る。これらの高い薬物負荷容量に加えて、これらの方法を使用して形成されるイリノテカンナノ担体は、一群の他の望ましい特性を有し、例えば、pH 7.4を有する生物学的緩衝液中で、37℃で、24時間にわたって<5%のイリノテカン漏出を示す。

本明細書において企図される様々な実施形態には、これらだけに限られないが、次の1つまたは複数が含まれ得る。

【0014】

実施形態1：

表面を有し、かつ分子をその中に収容するために適した多数の空孔を画定するシリカナノ粒子；

表面をコーティングする脂質二重層；

前記多数の空孔を構成する空孔内のカーゴ捕捉剤；及び

前記空孔内で前記カーゴ捕捉剤と会合する、薬物を含むカーゴ

を含むナノ粒子薬物担体であって、

サブミクロン構造が1ミクロン未満の最大寸法を有し、脂質二重層が多数の空孔を安定的に密閉する、ナノ粒子薬物担体。

【0015】

実施形態2：前記脂質二重層がリン脂質、コレステロール（CHOL）、及びmPEGリン脂質を含む、実施形態1のナノ粒子薬物担体。

【0016】

実施形態3：前記リン脂質が、C14～C20炭素鎖を有する飽和脂肪酸、及び/またはC14～C20炭素鎖を有する不飽和脂肪酸、及び/またはC12～C20炭素鎖を有する脂肪酸の混合物を含む天然脂質を含む、実施形態1～2のいずれか1つによるナノ粒子薬物担体。

【0017】

実施形態4：前記リン脂質が、ホスファチジルコリン（DPPC）、ジミリスチルホスファチジルコリン（DMPc）、ジステアロイルホスファチジルコリン（DSPC）、及

びジアクチル (diacyl) ホスファチジルコリン (DAPC) からなる群から選択される飽和脂肪酸を含む、実施形態 3 のナノ粒子薬物担体。

【0018】

実施形態 5 : 前記リン脂質が、卵ホスファチジルコリン (卵 PC)、及び大豆ホスファチジルコリン (大豆 PC) からなる群から選択される天然脂質を含む、実施形態 3 のナノ粒子薬物担体。

【0019】

実施形態 6 : 前記リン脂質が、1, 2 - ジミリストレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン、1, 2 - ジパルミトレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DOPC)、及び 1, 2 - ジエイコセノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリンからなる群から選択される不飽和脂肪酸を含む、実施形態 3 のナノ粒子薬物担体。

10

【0020】

実施形態 7 : 前記脂質二重層が、リン脂質 C14 ~ C18 炭素鎖、及び約 350 Da ~ 5000 Da の範囲の PEG 分子量を有する mPEG リン脂質を含む、実施形態 1 ~ 6 のいずれか 1 つによるナノ粒子薬物担体。

【0021】

実施形態 8 : 前記脂質二重層が 1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - PEG (DSPE - PEG) を含む、実施形態 7 のナノ粒子薬物担体。

【0022】

実施形態 9 : 前記脂質二重層が DPPC / Chol / DSPE - PEG または DSPC / Chol / DSPE - PEG を含む、実施形態 2 のナノ粒子薬物担体。

20

【0023】

実施形態 10 : 前記脂質二重層が DSPC / Chol / DSPE - PEG を含む、実施形態 9 のナノ粒子薬物担体。

【0024】

実施形態 11 : 前記脂質二重層が DSPC / Chol / DSPE - PEG 2000 を含む、実施形態 10 のナノ粒子薬物担体。

【0025】

実施形態 12 : 前記脂質二重層が、リン脂質、コレステロール、及び mPEG リン脂質を、リン脂質 50 ~ 90 mol% : CHOL 10 ~ 50 mol% : mPEG リン脂質 1 ~ 10 mol% の比で含む、実施形態 1 ~ 11 のいずれか 1 つによるナノ粒子薬物担体。

30

【0026】

実施形態 13 : 前記脂質二重層が、DSPC / Chol / DSPE - PEG を約 3 : 2 : 0.15 のモル比で含む、実施形態 10 のナノ粒子薬物担体。

【0027】

実施形態 14 : 前記脂質二重層が、ナノ粒子全体を包囲する実質的に連続的な二重層を形成している、実施形態 1 ~ 13 のいずれか 1 つによるナノ粒子薬物担体。

【0028】

実施形態 15 : 前記脂質二重層が、ナノ粒子全体を包囲する実質的に均一かつ無傷の二重層を形成している、実施形態 1 ~ 14 のいずれか 1 つによるナノ粒子薬物担体。

40

【0029】

実施形態 16 : 前記シリカナノ粒子がメソ多孔性シリカナノ粒子である、実施形態 1 ~ 15 のいずれか 1 つによるナノ粒子薬物担体。

【0030】

実施形態 17 : 前記シリカナノ粒子がゾル - ゲル合成されたメソ多孔性シリカナノ粒子を含む、実施形態 16 のナノ粒子薬物担体。

【0031】

実施形態 18 : 前記メソ多孔性シリカナノ粒子がサイズ制御されている、実施形態 16 ~ 17 のいずれか 1 つによるナノ粒子薬物担体。

50

## 【 0 0 3 2 】

実施形態 19：前記メソ多孔性シリカナノ粒子がコロイド的に安定している、実施形態 16～18のいずれか 1 つによるナノ粒子薬物担体。

## 【 0 0 3 3 】

実施形態 20：前記メソ多孔性シリカが、約 1～約 20 nm、または約 1～約 10 nm、または約 2～約 8 nm の範囲である平均空孔サイズを有する、実施形態 16～19のいずれか 1 つによるナノ粒子薬物担体。

## 【 0 0 3 4 】

実施形態 21：前記メソ多孔性シリカナノ粒子が、約 50 nm～約 300 nm、または約 50～約 200 nm、または約 50～約 150 nm、または約 50～約 100 nm、または約 50～約 80 nm、または約 50～約 70 nm、または約 60～約 70 nm の範囲の平均サイズを有する、実施形態 1～20のいずれか 1 つによるナノ粒子薬物担体。

10

## 【 0 0 3 5 】

実施形態 22：前記薬物との反応前のカーゴ捕捉剤が、トリエチルアンモニウムスクロースオクタスルファート (TEASOS)、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、アンモニウム塩、トリメチルアンモニウム塩、及びトリエチルアンモニウム塩からなる群から選択される、実施形態 1～21のいずれか 1 つによるナノ粒子薬物担体。

## 【 0 0 3 6 】

実施形態 23：前記カーゴ捕捉剤が  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  を含む、実施形態 22 のナノ粒子薬物担体。

20

## 【 0 0 3 7 】

実施形態 24：前記カーゴ捕捉剤が、硫酸アンモニウム；アンモニウムスクロースオクタスルファート、アンモニウム - シクロデキストリンスルファート、アンモニウム - シクロデキストリンスルファート、アンモニウム - シクロデキストリンスルファート、リン酸アンモニウム；アンモニウム - シクロデキストリンホスファート、アンモニウム - シクロデキストリンホスファート、アンモニウム - シクロデキストリンホスファート、クエン酸アンモニウム、及び酢酸アンモニウムからなる群から選択されるアンモニウム塩を含む、実施形態 22 のナノ粒子薬物担体。

## 【 0 0 3 8 】

実施形態 25：前記カーゴ捕捉剤が、トリメチルアンモニウムスルファート、トリメチルアンモニウムスクロースオクタスルファート、トリメチルアンモニウム - シクロデキストリンスルファート、トリメチルアンモニウム - シクロデキストリンスルファート、トリメチルアンモニウム - シクロデキストリンスルファート、トリメチルアンモニウムホスファート、トリメチルアンモニウム - シクロデキストリンホスファート、トリメチルアンモニウム - シクロデキストリンホスファート、トリメチルアンモニウムシトラート、及びトリメチルアンモニウムアセタートからなる群から選択されるトリメチルアンモニウム塩を含む、実施形態 22 に記載のナノ粒子薬物担体。

30

## 【 0 0 3 9 】

実施形態 26：前記カーゴ捕捉剤が、トリエチルアンモニウムスルファート、トリエチルアンモニウムスクロースオクタスルファート、トリエチルアンモニウム - シクロデキストリンスルファート、トリエチルアンモニウム - シクロデキストリンスルファート、トリエチルアンモニウム - シクロデキストリンスルファート、トリエチルアンモニウムホスファート、トリエチルアンモニウム - シクロデキストリンホスファート、トリエチルアンモニウム - シクロデキストリンホスファート、トリエチルアンモニウムシトラート、及びトリエチルアンモニウムアセタートからなる群から選択されるトリエチルアンモニウム塩を含む、実施形態 22 のナノ粒子薬物担体。

40

## 【 0 0 4 0 】

実施形態 27：前記薬物との反応前のカーゴ捕捉剤がトリエチルアンモニウムスクロース

50

オクタスルファート ( T E A 8 S O S ) である、実施形態 22 のナノ粒子薬物担体。

【 0 0 4 1 】

実施形態 28 : 前記薬物が、前記空孔内で、S O S 8 - と会合したゲル様沈澱物としてプロトン化及び捕捉されている、実施形態 27 のナノ粒子薬物担体。

【 0 0 4 2 】

実施形態 29 : 前記薬物が、プロトン化され得る少なくとも 1 個の弱塩基性基を含み、カーゴ捕捉剤が少なくとも 1 個の陰イオン基を含む、実施形態 1 ~ 28 のいずれか 1 つによるナノ粒子薬物担体。

【 0 0 4 3 】

実施形態 30 : 前記薬物が、7 を上回り、かつ 11 を下回る p K a を有するように選択される、実施形態 1 ~ 29 のいずれか 1 つによるナノ粒子薬物担体。

10

【 0 0 4 4 】

実施形態 31 : 前記薬物が、第一級、第二級、及び第三級アミンを含む、実施形態 1 ~ 30 のいずれか 1 つによるナノ粒子薬物担体。

【 0 0 4 5 】

実施形態 32 : 前記薬物が、約 5 ~ 約 25 m g / m L の水溶性指数 ( w a t e r   s o l u b i l i t y   i n d e x ) を有するように選択される、実施形態 1 ~ 31 のいずれか 1 つによるナノ粒子薬物担体。

【 0 0 4 6 】

実施形態 33 : カーゴが、約 - 3 . 0 ~ 約 3 . 0 のオクタノール / 水分配係数または l o g P 値を有するように選択される、実施形態 1 ~ 32 のいずれか 1 つによるナノ粒子薬物担体。

20

【 0 0 4 7 】

実施形態 34 : カーゴが 2 ~ 8 n m であり、シリカナノ粒子の空孔の平均または中央サイズ未満であるように選択される、実施形態 1 ~ 33 のいずれか 1 つによるナノ粒子薬物担体。

【 0 0 4 8 】

実施形態 35 : 前記カーゴが抗がん薬を含む、実施形態 29 ~ 34 のいずれか 1 つによるナノ粒子薬物担体。

【 0 0 4 9 】

30

実施形態 36 : 前記カーゴがイリノテカンを含む、実施形態 35 のナノ粒子薬物担体。

【 0 0 5 0 】

実施形態 37 : 前記カーゴが、トポイソメラーゼ阻害薬、抗腫瘍アンスラサイクリン抗生物質、有糸分裂阻害薬、アルカロイド、アルカリ性アルキル化薬、プリンまたはピリミジン誘導体、及びプロテインキナーゼ阻害薬からなる群から独立に選択される 1 つまたは複数の薬物を含む、実施形態 35 のナノ粒子薬物担体。

【 0 0 5 1 】

実施形態 38 : 前記担体が、トポテカンを含むトポイソメラーゼ阻害薬を含む、実施形態 37 のナノ粒子薬物担体。

【 0 0 5 2 】

40

実施形態 39 : 前記担体が、トポテカン、10 - ヒドロキシカンプトテシン、ベロテカン、ルピテカン、ピノレルピン、及び L A Q 8 2 4 からなる群から選択されるアルカロイドを含む、実施形態 37 のナノ粒子薬物担体。

【 0 0 5 3 】

実施形態 40 : 前記担体が、ドキシソルピシン、及びミトキサントロンからなる群から選択される抗腫瘍アンスラサイクリン抗生物質を含む、実施形態 37 のナノ粒子薬物担体。

【 0 0 5 4 】

実施形態 41 : 前記担体が、ピンブラスチン、及びピノレルピンからなる群から選択される有糸分裂阻害薬を含む、実施形態 37 のナノ粒子薬物担体。

【 0 0 5 5 】

50



実施形態 4 2 : 前記担体が、シクロフォスファミド、メクロレタミン、及びテモゾロミドからなる群から選択されるアルカリ性アルキル化薬を含む、実施形態 3 7 のナノ粒子薬物担体。

【 0 0 5 6 】

実施形態 4 3 : 前記担体が、5 - フルオロウラシル、5 ' - デオキシ - 5 - フルオロウリジン、及びゲムシタピンからなる群から選択されるプリンまたはピリミジン誘導体を含む、実施形態 3 7 のナノ粒子薬物担体。

【 0 0 5 7 】

実施形態 4 4 : 前記担体が、イマチニブ、オシメルチニブ及びスニチニブパゾパニブ、エンザスタウリン、バンデタニブ、エルロチニブ、ダサチニブ、及びニロチニブからなる群から選択されるプロテインキナーゼ阻害薬を含む、実施形態 3 7 のナノ粒子薬物担体。

10

【 0 0 5 8 】

実施形態 4 5 : 標的化部分、融合性ペプチド、及び輸送ペプチドからなる群から選択される部分にコンジュゲートしている、実施形態 1 ~ 4 4 のいずれか 1 つによるナノ粒子薬物担体。

【 0 0 5 9 】

実施形態 4 6 : がん細胞または腫瘍血管上の受容体に結合するペプチドにコンジュゲートしている、実施形態 4 5 のナノ粒子薬物担体。

【 0 0 6 0 】

実施形態 4 7 : i R G D ペプチドにコンジュゲートしている、実施形態 4 6 のナノ粒子薬物担体。

20

【 0 0 6 1 】

実施形態 4 8 : 表 2 に示されている標的化ペプチドにコンジュゲートしている、実施形態 4 6 のナノ粒子薬物担体。

【 0 0 6 2 】

実施形態 4 9 : トランスフェリン、及び / または A p o E、及び / または葉酸にコンジュゲートしている、実施形態 4 5 ~ 4 8 のいずれか 1 つによるナノ粒子薬物担体。

【 0 0 6 3 】

実施形態 5 0 : がんマーカーに結合する抗体を含む標的化部分にコンジュゲートしている、実施形態 4 5 ~ 4 9 のいずれか 1 つによるナノ粒子薬物担体。

30

【 0 0 6 4 】

実施形態 5 1 : 表 1 に示されているがんマーカーに結合する抗体を含む標的化部分にコンジュゲートしている、実施形態 5 0 のナノ粒子薬物担体。

【 0 0 6 5 】

実施形態 5 2 : 前記カーゴが、抗生物質、抗ウイルス薬、または抗真菌薬を含む、実施形態 2 9 ~ 3 4 のいずれか 1 つによるナノ粒子薬物担体。

【 0 0 6 6 】

実施形態 5 3 : 前記カーゴが、シプロフロキサシン、及びレボフロキサシンからなる群から選択される抗生物質を含む、実施形態 5 2 のナノ粒子薬物担体。

【 0 0 6 7 】

実施形態 5 4 : 前記カーゴが H I V 抗ウイルス薬を含む、実施形態 5 2 のナノ粒子薬物担体。

40

【 0 0 6 8 】

実施形態 5 5 : 前記カーゴが、テノフォビル、ジソプロキシシル、及びフマラートからなる群から選択される抗ウイルス薬を含む、実施形態 5 4 のナノ粒子薬物担体。

【 0 0 6 9 】

実施形態 5 6 : 前記カーゴが、アンホテリシン B、アニデュラファンギン、カスポファンギン、フルコナゾール、フルシトシン、イサブコナゾール、イトラコナゾール、ミカファンギン、ボサコナゾール、及びポリコナゾールからなる群から選択される抗真菌薬を含む、実施形態 5 2 のナノ粒子薬物担体。

50

## 【 0 0 7 0 】

実施形態 57：pH 7.4 を有する生物学的緩衝液中で、37℃ で、24 時間にわたって約 20 % 未満、または約 15 % 未満、または約 10 % 未満、または約 5 % 未満のカーゴ漏出を示す、実施形態 1 ~ 56 のいずれか 1 つによるナノ粒子薬物担体。

## 【 0 0 7 1 】

実施形態 58：少なくとも約 8 w / w %、または少なくとも約 10 w / w %、または少なくとも約 20 w / w %、または少なくとも約 30 w / w %、または約 40 w / w % 超、または約 50 w / w % 超、または約 60 w / w % 超、または約 70 w / w % 超、または約 80 w / w % 超の薬物負荷容量を有する、実施形態 1 ~ 57 のいずれか 1 つによるナノ粒子薬物担体。

10

## 【 0 0 7 2 】

実施形態 59：前記薬物担体が、少なくとも 80 w / w % の薬物負荷容量を有する、実施形態 1 ~ 57 のいずれか 1 つによるナノ粒子薬物担体。

## 【 0 0 7 3 】

実施形態 60：脂質二重層が疎水性薬物を含む、実施形態 1 ~ 59 のいずれか 1 つによるナノ粒子薬物担体。

## 【 0 0 7 4 】

実施形態 61：脂質二重層が、パクリタキセル、エリブチシン、カンプトテカン (camptothecin)、SN-38、及び脂質プロドラッグ (例えば、アシクロビルジホスファートジミリスチルグリセロール、ドキシソルピシンがコンジュゲートしたリン脂質プロドラッグ、ヌクレオシド類似体のリン脂質誘導体、リン脂質が結合したクロラムブシルなど) からなる群から選択される疎水性薬物を含む、実施形態 60 のナノ粒子薬物担体。

20

## 【 0 0 7 5 】

実施形態 62：脂質二重層がパクリタキセルを含む、実施形態 60 のナノ粒子薬物担体。

## 【 0 0 7 6 】

実施形態 63：懸濁液中の前記薬物担体が、4℃ で貯蔵した場合に少なくとも 1 カ月、または少なくとも 2 カ月、または少なくとも 3 カ月、または少なくとも 4 カ月、または少なくとも 5 カ月、または少なくとも 6 カ月にわたって安定している、実施形態 1 ~ 61 のいずれか 1 つによるナノ粒子薬物担体。

## 【 0 0 7 7 】

実施形態 64：懸濁液中の前記薬物担体の集団が、幅において約 30 nm 未満、または約 20 nm 未満、または約 10 nm 未満、または約 5 nm 未満、または約 3 nm 未満、または約 2 nm 未満の、サイズ分布範囲 (半値全幅) を示す、実施形態 1 ~ 63 のいずれか 1 つによるナノ粒子薬物担体。

30

## 【 0 0 7 8 】

実施形態 65：懸濁液中の前記薬物担体の集団が実質的に単峰性のサイズ分布を示す、実施形態 1 ~ 64 のいずれか 1 つによるナノ粒子薬物担体。

## 【 0 0 7 9 】

実施形態 66：懸濁液中の前記薬物担体の集団が約 0.2 未満、または約 0.1 未満の PDI を示す、実施形態 1 ~ 65 のいずれか 1 つによるナノ粒子薬物担体。

40

## 【 0 0 8 0 】

実施形態 67：懸濁液中の前記薬物担体の集団が、サイズにおいて約 0.1 未満または約 0.05 未満、または約 1.7 / 120 未満の変動係数を示す、実施形態 1 ~ 66 のいずれか 1 つによるナノ粒子薬物担体。

## 【 0 0 8 1 】

実施形態 68：前記ナノ粒子薬物担体の約 3 % 以上が、IV 注射で腫瘍部位を現像するために分布している、実施形態 1 ~ 67 のいずれか 1 つによるナノ粒子薬物担体。

## 【 0 0 8 2 】

実施形態 69：凍結乾燥後の再水和で、安定な懸濁液を形成する、実施形態 1 ~ 68 のいずれか 1 つによるナノ粒子薬物担体。

50

## 【 0 0 8 3 】

実施形態 7 0 : 抗がん薬を負荷された場合に、同所 P D A C モデルにおいて、遊離薬物、または前記薬物を含有するリボソームよりも有効ながん細胞死滅をもたらす、実施形態 1 ~ 6 9 のいずれか 1 つによるナノ粒子薬物担体。

## 【 0 0 8 4 】

実施形態 7 1 : 抗がん薬を負荷された場合に、遊離薬物及び / またはリボソーム中の薬物と比較すると、薬物毒性の低下を示す、実施形態 1 ~ 7 0 のいずれか 1 つによるナノ粒子薬物担体。

## 【 0 0 8 5 】

実施形態 7 2 : 前記ナノ粒子薬物担体が、p H 7 . 4 を有する生理液中でコロイド安定性を有し、全身生体内分布を可能にする単分散性のままであり、かつ血管漏出 ( E P R 効果 ) またはトランスサイトーシスによって疾患部位に進入することができる、実施形態 1 ~ 7 1 のいずれか 1 つによるナノ粒子薬物担体。

10

## 【 0 0 8 6 】

実施形態 7 3 :

実施形態 1 ~ 7 2 のいずれか 1 つによる多数のナノ粒子薬物担体 ; 及び薬学的に許容される担体を含む、医薬製剤前記製剤。

## 【 0 0 8 7 】

実施形態 7 4 : 乳剤、分散剤、または懸濁剤である、実施形態 7 3 の製剤。

20

## 【 0 0 8 8 】

実施形態 7 5 : 前記懸濁剤、乳剤、または分散剤が、4 で貯蔵した場合に少なくとも 1 カ月、または少なくとも 2 カ月、または少なくとも 3 カ月、または少なくとも 4 カ月、または少なくとも 5 カ月、または少なくとも 6 カ月にわたって安定している、実施形態 7 4 の製剤。

## 【 0 0 8 9 】

実施形態 7 6 : 前記製剤中のナノスケール薬物担体が、実質的に単峰性のサイズ分布を示す、実施形態 7 3 ~ 7 5 のいずれか 1 つによる製剤。

## 【 0 0 9 0 】

実施形態 7 7 : 前記懸濁剤、乳剤、または分散剤中の薬物担体が、約 0 . 2 未満、または約 0 . 1 未満の P D I を示す、実施形態 7 3 ~ 7 6 のいずれか 1 つによる製剤。

30

## 【 0 0 9 1 】

実施形態 7 8 : 静脈内投与、動脈内投与、脳内投与、髄腔内投与、経口投与、エアロゾル投与、吸入を介する投与 ( 鼻腔内及び気管内送達を含む、カニユーレを介しての頭蓋内投与、ならびに皮下または筋肉内デポー沈着 ( d e p o t d e p o s i t i o n ) からなる群から選択される経路による投与のために製剤化されている、実施形態 7 3 ~ 7 7 のいずれか 1 つによる製剤。

## 【 0 0 9 2 】

実施形態 7 9 : 無菌注射用製剤である、実施形態 7 3 ~ 7 7 のいずれか 1 つによる製剤。

## 【 0 0 9 3 】

実施形態 8 0 : 単位投与製剤である、実施形態 7 3 ~ 7 9 のいずれか 1 つによる製剤。

40

## 【 0 0 9 4 】

実施形態 8 1 :

それを必要とする対象に、実施形態 1 ~ 5 1 もしくは 5 7 ~ 7 2 のいずれか 1 つによるナノ粒子薬物担体、または実施形態 7 3 ~ 8 0 のいずれか 1 つによる医薬製剤の有効量を投与することを含み、前記ナノ粒子薬物担体及び / または前記医薬製剤中の薬物が抗がん薬を含む、がんを処置する方法。

## 【 0 0 9 5 】

実施形態 8 2 : 前記ナノ粒子薬物担体及び / または前記医薬製剤が、化学療法薬レジメンにおける一次治療である、実施形態 8 1 の方法。

50

## 【 0 0 9 6 】

実施形態 8 3 : 前記ナノ粒子薬物担体及び/または前記医薬製剤が多剤化学療法レジメンの 1 成分である、実施形態 8 1 の方法。

## 【 0 0 9 7 】

実施形態 8 4 : 前記多剤化学療法レジメンが、イリノテカン ( I R I N )、オキサリプラチン ( O X )、5 - フルオロウラシル ( 5 - F U )、及びロイコボリン ( L V ) からなる群から選択される少なくとも 2 つの薬物を含む、実施形態 8 3 の方法。

## 【 0 0 9 8 】

実施形態 8 5 : 前記多剤化学療法レジメンが、イリノテカン ( I R I N )、オキサリプラチン ( O X )、5 - フルオロウラシル ( 5 - F U )、及びロイコボリン ( L V ) からなる群から選択される少なくとも 3 つの薬物を含む、実施形態 8 3 の方法。

10

## 【 0 0 9 9 】

実施形態 8 6 : 前記多剤化学療法レジメンが、少なくともイリノテカン ( I R I N )、オキサリプラチン ( O X )、5 - フルオロウラシル ( 5 - F U )、及びロイコボリン ( L V ) を含む、実施形態 8 3 の方法。

## 【 0 1 0 0 】

実施形態 8 7 : 前記がんが、膵臓管状腺癌 ( P D A C ) である、実施形態 8 1 ~ 8 6 のいずれか 1 つによる方法。

## 【 0 1 0 1 】

実施形態 8 8 : 前記がんが、急性リンパ芽球性白血病 ( A L L )、急性骨髄性白血病 ( A M L )、副腎皮質癌、A I D S 関連がん (例えば、カポジ肉腫、リンパ腫)、肛門癌、虫垂癌、神経膠星状細胞腫、非定型奇形様/横紋筋肉腫様腫瘍、胆管癌、肝外癌、膀胱癌、骨癌 (例えば、ユーイング肉腫、骨肉腫、悪性線維性組織球腫)、脳幹膠腫、脳腫瘍 (例えば、神経膠星状細胞腫、脳及び脊髄腫瘍、脳幹膠腫、中枢神経系非定型奇形様/横紋筋肉腫様腫瘍、中枢神経系胎児性腫瘍、中枢神経系生殖細胞腫瘍、頭蓋咽頭腫、脳室上衣細胞腫、乳癌、気管支腫瘍、パーキットリンパ腫、類癌腫 (例えば、小児期、胃腸)、心臓腫瘍、子宮頸癌、脊索腫、慢性リンパ球性白血病 ( C L L )、慢性骨髄性白血病 ( C M L )、慢性骨髄増殖性障害、結腸癌、結腸直腸癌、頭蓋咽頭腫、皮膚 t 細胞リンパ腫、腺管癌、例えば (胆管、肝臓外)、腺管上皮内癌 ( D C I S )、胎児性腫瘍、子宮内膜癌、脳室上衣細胞腫、食道癌、感覚神経芽細胞腫、頭蓋外胚細胞腫瘍、性腺外胚細胞腫瘍、肝臓外胆管癌、眼癌 (例えば、眼内黒色腫、網膜芽細胞腫)、骨の線維性組織球腫、悪性、及び骨肉腫、胆嚢癌、胃癌、胃腸類癌腫、消化管間質腫瘍 ( G I S T )、生殖細胞腫瘍 (例えば、卵巣癌、睾丸癌、頭蓋外癌、生殖腺外癌、中枢神経系)、妊娠性絨毛腫瘍、脳幹癌、ヘアリーセル白血病、頭頸部癌、心臓癌、肝細胞 (肝) 癌、組織球増殖症、ランゲルハンス細胞癌、ホジキンリンパ腫、下咽頭癌、眼内黒色腫、島細胞腫瘍、膵臓神経内分泌腫瘍、カポジ肉腫、腎臓癌 (例えば、腎臓細胞、ウィルムス腫瘍、及び他の腎臓腫瘍)、ランゲルハンス細胞組織球増殖症、喉頭癌、白血病、急性リンパ芽球性 ( A L L )、急性骨髄性 ( A M L )、慢性リンパ球性 ( C L L )、慢性骨髄性 ( C M L )、ヘアリーセル白血病、口唇及び口腔癌、肝臓癌 (原発性)、上皮内小葉癌 ( L C I S )、肺癌 (例えば、小児期、非小細胞、小細胞)、リンパ腫 (例えば、A I D S 関連、パーキット (例えば、非ホジキンリンパ腫)、皮膚 T 細胞 (例えば、菌状息肉症、セザリー症候群)、ホジキン、非ホジキン、原発性中枢神経系 ( C N S ) )、マクログロブリン血症、ワルデンストローム、男性乳癌、骨の悪性線維性組織球腫及び骨肉腫、黒色腫 (例えば、小児期、眼内 (目))、メルケル細胞癌、中皮腫、転移性扁平上皮頸部癌、正中線管癌腫、口腔癌、多発性内分泌腺腫症、多発性骨髄腫/形質細胞新生物、菌状息肉症、骨髄異形成症候群、慢性骨髄性白血病 ( C M L )、多発性骨髄腫、鼻腔及び副鼻腔癌、鼻咽頭癌、神経芽細胞腫、口腔癌、口唇及び口咽頭癌、骨肉腫、卵巣癌、膵臓癌、膵臓神経内分泌腫瘍 (島細胞腫瘍)、乳頭腫症、傍神経節腫、副鼻腔及び鼻腔癌、副甲状腺癌、陰茎癌、咽頭癌、褐色細胞腫、下垂体腫瘍、形質細胞新生物、胸膜肺芽細胞腫、原発性中枢神経系 ( C N S ) リンパ腫、前立腺癌、直腸癌、腎臓細胞 (腎臓) 癌、腎盂及び尿管、移行細胞癌、横紋筋肉腫、唾

20

30

40

50

液腺癌、肉腫（例えば、ユーイング、カポジ、骨肉腫、横紋筋肉腫、軟部組織、子宮）、セザリー症候群、皮膚癌（例えば、黒色腫、メルケル細胞癌、基底細胞癌、非黒色腫）、小腸癌、扁平上皮細胞癌、潜在性原発を伴う扁平上皮頸部癌、胃癌、睾丸癌、咽頭癌、胸腺腫及び胸腺癌、甲状腺癌、栄養膜腫瘍、尿管及び腎盂癌、尿道癌、子宮癌、子宮内膜癌、子宮肉腫、陰癌、外陰癌、ワルデンストロームマクログロブリン血症、ならびにウィルムス腫瘍からなる群から選択されるがんである、実施形態 8 1 ~ 8 6 のいずれか 1 つによる方法。

【 0 1 0 2 】

実施形態 8 9 : 前記ナノ粒子薬物担体が i R G D ペプチドにコンジュゲートしておらず、ナノ粒子薬物担体を i R G D ペプチドと併せて投与する、実施形態 8 1 ~ 8 8 のいずれか 1 つによる方法。

10

【 0 1 0 3 】

実施形態 9 0 :

それを必要とする対象に、実施形態 1 ~ 3 4 もしくは 5 2 ~ 5 6 のいずれか 1 つによるナノ粒子薬物担体、または実施形態 7 3 ~ 8 0 のいずれか 1 つによる医薬製剤の有効量を投与することを含み、前記ナノ粒子薬物担体及び/または前記医薬製剤中の薬物が抗微生物薬を含む、感染を処置する方法。

【 0 1 0 4 】

実施形態 9 1 : 前記感染が、薬剤耐性細菌、ウイルス、または真菌による感染を含む、実施形態 8 1 の方法。

20

【 0 1 0 5 】

実施形態 9 2 : 前記ナノ粒子薬物担体及び/または医薬製剤を、静脈内投与、動脈内投与、脳内投与、髄腔内投与、経口投与、エアロゾル投与、吸入を介する投与（鼻腔内及び気管内送達を含む、カニューレを介しての頭蓋内投与、ならびに皮下または筋肉内デポー沈着からなる群から選択される経路によって投与する、実施形態 8 1 ~ 9 1 のいずれか 1 つによる方法。

【 0 1 0 6 】

実施形態 9 3 : 前記ナノ粒子薬物担体及び/または医薬製剤を、注射として、I V ドリッパバッグから、または薬物送達カニューレを介して投与する、実施形態 8 1 ~ 9 1 のいずれか 1 つによる方法。

30

【 0 1 0 7 】

実施形態 9 4 : 前記対象がヒトである、実施形態 8 1 ~ 9 3 のいずれか 1 つによる方法。

【 0 1 0 8 】

実施形態 9 5 : 前記対象が非ヒト哺乳類である、実施形態 8 1 ~ 9 3 のいずれか 1 つによる方法。

【 0 1 0 9 】

実施形態 9 6 : ナノ粒子薬物担体を作成する方法であって、表面を有し、薬物分子をその中に収容するために適した多数の空孔を画定するシリカを含むナノ粒子を得ること；捕捉剤を、前記多数の空孔を構成する空孔に配置すること（この際、前記捕捉剤は、前記薬物を前記空孔内に捕捉するその能力で選択される）；ナノ粒子の空孔を脂質二重層でコーティングすること；及び脂質二重層でコーティングされた前記ナノ粒子を、前記二重層を通過することができる薬物と接触させるか、またはそれで浸漬すること（この際、前記薬物が前記空孔に進入し、前記捕捉剤と反応し、二重層の内部に保持される）を含む方法。

40

【 0 1 1 0 】

実施形態 9 7 : 前記脂質二重層が、リン脂質、コレステロール（C H O L）、及び m P E G リン脂質を含む、実施形態 9 6 の方法。

【 0 1 1 1 】

実施形態 9 8 : 前記リン脂質が、C 1 4 ~ C 2 0 炭素鎖を有する飽和脂肪酸、及び/または C 1 4 ~ C 2 0 炭素鎖を有する不飽和脂肪酸、及び/または C 1 2 ~ C 2 0 炭素鎖を有する脂肪酸の混合物を含む天然脂質を含む、実施形態 9 6 ~ 9 7 のいずれか 1 つによる方

50

法。

【0112】

実施形態99：前記リン脂質が、ホスファチジルコリン（DPPC）、ジミリストイルホスファチジルコリン（DMP C）、ジステアロイルホスファチジルコリン（DSPC）、及びジアクチル（diacyl）ホスファチジルコリン（DAPC）からなる群から選択される飽和脂肪酸を含む、実施形態98の方法。

【0113】

実施形態100：前記リン脂質が、卵ホスファチジルコリン（卵PC）、及び大豆ホスファチジルコリン（大豆PC）からなる群から選択される天然脂質を含む、実施形態98の方法。

10

【0114】

実施形態101：前記リン脂質が、1,2-ジミリストレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1,2-ジパルミトレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DOPC）、及び1,2-ジエイコセノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリンからなる群から選択される不飽和脂肪酸を含む、実施形態98の方法。

【0115】

実施形態102：前記脂質二重層が、リン脂質C14～C18炭素鎖、及び約350Da～5000Daの範囲のPEG分子量を有するmPEGリン脂質を含む、実施形態96～101のいずれか1つによる方法。

20

【0116】

実施形態103：前記脂質二重層が1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-PEG（DSP E-PEG）を含む、実施形態102のナノ粒子薬物担体。

【0117】

実施形態104：前記脂質二重層がDPPC/Chol/DSP E-PEGまたはDSPC/Chol/DSP E-PEGを含む、実施形態97の方法。

【0118】

実施形態105：前記脂質二重層がDSPC/Chol/DSP E-PEGを含む、実施形態104の方法。

30

【0119】

実施形態106：前記脂質二重層がDSPC/Chol/DSP E-PEG 2000を含む、実施形態105の方法。

【0120】

実施形態107：前記脂質二重層が、リン脂質、コレステロール、及びmPEGリン脂質を、リン脂質50～90mol%：CHOL10～50mol%：mPEGリン脂質1～10mol%の比で含む、実施形態96～106のいずれか1つによる方法。

【0121】

実施形態108：前記脂質二重層が、DSPC/Chol/DSP E-PEGを約3：2：0.15のモル比で含む、実施形態105の方法。

40

【0122】

実施形態109：前記脂質二重層を構成する脂質を、前記ナノ粒子と、ナノ粒子全体にわたって連続的な二重層が形成するために十分な比で組み合わせる、実施形態96～108のいずれか1つによる方法。

【0123】

実施形態110：前記脂質二重層を構成する脂質を、前記ナノ粒子と、約1.0：3.0からの範囲の粒子：脂質比で組み合わせる、実施形態96～109のいずれか1つによる方法。

【0124】

実施形態111：前記脂質二重層を構成する脂質を、前記ナノ粒子と、約1.0：1.1

50

の粒子：脂質比で組み合わせる、実施形態 96 ~ 109 のいずれか 1 つによる方法。

【0125】

実施形態 112：前記脂質二重層が、ナノ粒子全体を包囲する実質的に連続的な二重層を形成する、実施形態 96 ~ 111 のいずれか 1 つによる方法。

【0126】

実施形態 113：前記脂質二重層が、ナノ粒子全体を包囲する実質的に均一かつ無傷の二重層を形成する、実施形態 96 ~ 112 のいずれか 1 つによる方法。

【0127】

実施形態 114：前記シリカナノ粒子がメソ多孔性シリカナノ粒子である、実施形態 96 ~ 113 のいずれか 1 つによる方法。

【0128】

実施形態 115：前記シリカナノ粒子がゾル - ゲル合成されたメソ多孔性シリカナノ粒子を含む、実施形態 114 の方法。

【0129】

実施形態 116：前記メソ多孔性シリカナノ粒子がサイズ制御されている、実施形態 96 ~ 115 のいずれか 1 つによる方法。

【0130】

実施形態 117：前記メソ多孔性シリカナノ粒子がコロイド的に安定している、実施形態 96 ~ 116 のいずれか 1 つによる方法。

【0131】

実施形態 118：前記メソ多孔性シリカが、約 1 ~ 約 20 nm、または約 1 ~ 約 10 nm、または約 2 ~ 約 8 nm の範囲である平均空孔サイズを有する、実施形態 96 ~ 117 のいずれか 1 つによる方法。

【0132】

実施形態 119：前記メソ多孔性シリカナノ粒子が、約 50 nm ~ 約 300 nm、または約 50 ~ 約 200 nm、または約 50 ~ 約 150 nm、または約 50 ~ 約 100 nm、または約 50 ~ 約 80 nm、または約 50 ~ 約 70 nm、または約 60 ~ 約 70 nm の範囲の平均サイズを有する、実施形態 96 ~ 118 のいずれか 1 つによる方法。

【0133】

実施形態 120：前記薬物との反応前のカーゴ捕捉剤が、トリエチルアンモニウムスクロースオクタスルファート (TEA8SO8)、(NH4)2SO4、アンモニウム塩、トリメチルアンモニウム塩、及びトリエチルアンモニウム塩からなる群から選択される、実施形態 96 ~ 119 のいずれか 1 つによる方法。

【0134】

実施形態 121：前記カーゴ捕捉剤が (NH4)2SO4 を含む、実施形態 120 の方法。

【0135】

実施形態 122：前記カーゴ捕捉剤が、硫酸アンモニウム；アンモニウムスクロースオクタスルファート、アンモニウム - シクロデキストリンスルファート、アンモニウム - シクロデキストリンスルファート、アンモニウム - シクロデキストリンスルファート、リン酸アンモニウム；アンモニウム - シクロデキストリンホスファート、アンモニウム - シクロデキストリンホスファート、アンモニウム - シクロデキストリンホスファート、クエン酸アンモニウム、及び酢酸アンモニウムからなる群から選択されるアンモニウム塩を含む、実施形態 120 の方法。

【0136】

実施形態 123：前記カーゴ捕捉剤が、トリメチルアンモニウムスルファート、トリメチルアンモニウムスクロースオクタスルファート、トリメチルアンモニウム - シクロデキストリンスルファート、トリメチルアンモニウム - シクロデキストリンスルファート、トリメチルアンモニウム - シクロデキストリンスルファート、トリメチルアンモニウムホスファート、トリメチルアンモニウム - シクロデキストリンホスファート、トリメチルアンモニウム - シクロデキストリンホスファート、トリメチルアンモニウム - シク

10

20

30

40

50

ロデキストリンホスファート、トリメチルアンモニウムシトラート、及びトリメチルアンモニウムアセタートからなる群から選択されるトリメチルアンモニウム塩を含む、実施形態 120 の方法。

【0137】

実施形態 124：前記カーゴ捕捉剤が、トリエチルアンモニウムスルファート、トリエチルアンモニウムスクロースオクタスルファート、トリエチルアンモニウム - シクロデキストリンスルファート、トリエチルアンモニウム - シクロデキストリンスルファート、トリエチルアンモニウムホスファート、トリエチルアンモニウム - シクロデキストリンホスファート、トリエチルアンモニウム - シクロデキストリンホスファート、トリエチルアンモニウム - シクロデキストリンホスファート、トリエチルアンモニウムシトラート、及びトリメチルアンモニウムアセタートからなる群から選択されるトリメチルアンモニウム塩を含む、実施形態 120 の方法。

10

【0138】

実施形態 125：前記薬物との反応前のカーゴ捕捉剤がトリエチルアンモニウムスクロースオクタスルファート (TEASOS) である、実施形態 120 の方法。

【0139】

実施形態 126：前記薬物が、前記空孔内で、SOS<sup>8</sup> - と会合したゲル様沈澱物としてプロトン化及び捕捉されている、実施形態 125 の方法。

【0140】

実施形態 127：前記薬物が、プロトン化され得る少なくとも 1 個の弱塩基性基を含み、カーゴ捕捉剤が少なくとも 1 個の陰イオン基を含む、実施形態 96 ~ 126 のいずれか 1 つによる方法。

20

【0141】

実施形態 128：前記薬物が、7 を上回り、かつ 11 を下回る pKa を有するように選択される、実施形態 96 ~ 127 のいずれか 1 つによる方法。

【0142】

実施形態 129：前記薬物が、第一級、第二級、第三級または第四級アミンを含む、実施形態 96 ~ 128 のいずれか 1 つによる方法。

【0143】

実施形態 130：前記薬物が、約 5 ~ 約 25 mg/mL の水溶性指数を有するように選択される、実施形態 96 ~ 129 のいずれか 1 つによる方法。

30

【0144】

実施形態 131：カーゴが、約 - 3.0 ~ 約 3.0 のオクタノール / 水分配係数または log P 値を有するように選択される、実施形態 96 ~ 130 のいずれか 1 つによる方法。

【0145】

実施形態 132：カーゴが、2 ~ 8 nm であり、シリカナノ粒子の空孔の平均または中央サイズ未満であるように選択される、実施形態 96 ~ 131 のいずれか 1 つによる方法。

【0146】

実施形態 133：前記カーゴが抗がん薬を含む、実施形態 127 ~ 132 のいずれか 1 つによる方法。

40

【0147】

実施形態 134：前記カーゴがイリノテカンを含む、実施形態 133 の方法。

【0148】

実施形態 135：前記カーゴが、トポイソメラーゼ阻害薬、抗腫瘍アンスラサイクリン抗生物質、有糸分裂阻害薬、アルカロイド、アルカリ性アルキル化薬、プリンまたはピリミジン誘導体、及びプロテインキナーゼ阻害薬からなる群から独立に選択される 1 つまたは複数の薬物を含む、実施形態 133 の方法。

【0149】

実施形態 136：前記担体が、トポテカンを含むトポイソメラーゼ阻害薬を含む、実施形

50



態 1 3 5 の方法。

【 0 1 5 0 】

実施形態 1 3 7 : 前記担体が、トポテカン、1 0 - ヒドロキシカンブトテシン、ペロテカン、ルピテカン、ビノレルピン、及び L A Q 8 2 4 からなる群から選択されるアルカロイドを含む、実施形態 1 3 5 の方法。

【 0 1 5 1 】

実施形態 1 3 8 : 前記担体が、ドキソルピシン、及びミトキサントロンからなる群から選択される抗腫瘍アンスラサイクリン抗生物質を含む、実施形態 1 3 5 の方法。

【 0 1 5 2 】

実施形態 1 3 9 : 前記担体が、ピンブラスチン、及びビノレルピンからなる群から選択される有糸分裂阻害薬を含む、実施形態 1 3 5 の方法。

10

【 0 1 5 3 】

実施形態 1 4 0 : 前記担体が、シクロフォスファミド、メクロレタミン、及びテモゾロミドからなる群から選択されるアルカリ性アルキル化薬を含む、実施形態 1 3 5 の方法。

【 0 1 5 4 】

実施形態 1 4 1 : 前記担体が、5 - フルオロウラシル、5 ' - デオキシ - 5 - フルオロウリジン、及びゲムシタピンからなる群から選択されるプリンまたはピリミジン誘導体を含む、実施形態 1 3 5 の方法。

【 0 1 5 5 】

実施形態 1 4 2 : 前記担体が、イマチニブ、オシメルチニブ及びスニチニブ パゾパニブ、エンザスタウリン、バンデタニブ、エルロチニブ、ダサチニブ、及びニロチニブからなる群から選択されるプロテインキナーゼ阻害薬を含む、実施形態 1 3 5 の方法。

20

【 0 1 5 6 】

実施形態 1 4 3 : 前記薬物担体が、標的化部分、融合性ペプチド、及び輸送ペプチドからなる群から選択される部分にコンジュゲートしている、実施形態 9 6 ~ 1 4 2 のいずれか 1 つによる方法。

【 0 1 5 7 】

実施形態 1 4 4 : 実施形態 1 ~ 7 2 のいずれか 1 つによるナノ粒子薬物担体を生成する、実施形態 9 6 ~ 1 4 3 のいずれか 1 つによる方法。

【 0 1 5 8 】

実施形態 1 4 5 : 前記薬物担体が、がん細胞上の受容体に結合するペプチドにコンジュゲートしている、実施形態 1 4 3 の方法。

30

【 0 1 5 9 】

実施形態 1 4 6 : 前記薬物担体が、i R G D ペプチドにコンジュゲートしている、実施形態 1 4 5 の方法。

【 0 1 6 0 】

実施形態 1 4 7 : 前記薬物担体が、表 2 に示されている標的化ペプチドにコンジュゲートしている、実施形態 1 4 5 の方法。

【 0 1 6 1 】

実施形態 1 4 8 : 前記薬物担体が、トランスフェリン、及び / または A p o E、及び / または葉酸にコンジュゲートしている、実施形態 1 4 3 ~ 1 4 7 のいずれか 1 つによる方法。

40

【 0 1 6 2 】

実施形態 1 4 9 : 前記薬物担体が、がんマーカーに結合する抗体を含む標的化部分にコンジュゲートしている、実施形態 1 4 3 ~ 1 4 8 のいずれか 1 つによる方法。

【 0 1 6 3 】

実施形態 1 5 0 : 前記薬物担体が、表 1 に示されているがんマーカーに結合する抗体を含む標的化部分にコンジュゲートしている、実施形態 1 4 9 の方法。

【 0 1 6 4 】

実施形態 1 5 1 : 前記カーゴが抗生物質を含む、実施形態 1 2 7 ~ 1 3 2 のいずれか 1 つによる方法。

50

## 【 0 1 6 5 】

実施形態 1 5 2 : 前記カーゴが、シプロフロキサシン、レボフロキサシン、及び H I V 抗レトロウイルス薬 (例えば、テノフォビル、ジソプロキシル、フマラートなど) からなる群から選択される抗生物質を含む、実施形態 1 5 1 の方法。

## 【 0 1 6 6 】

実施形態 1 5 3 : 前記薬物担体が、少なくとも約 3 0 w / w %、または約 4 0 w / w % 超、または約 5 0 w / w % 超、または約 6 0 w / w % 超、または約 7 0 w / w % 超、または約 8 0 w / w % 超の容量まで負荷されている、実施形態 9 6 ~ 1 5 2 のいずれか 1 つによる方法。

## 【 0 1 6 7 】

実施形態 1 5 4 : 前記薬物担体が、少なくとも 8 0 w / w % の容量まで負荷されている、実施形態 9 6 ~ 1 5 2 のいずれか 1 つによる方法。

## 【 0 1 6 8 】

実施形態 1 5 5 : 脂質二重層が疎水性薬物を含む、実施形態 9 6 ~ 1 5 4 のいずれか 1 つによる方法。

## 【 0 1 6 9 】

実施形態 1 5 6 : 脂質二重層が、パクリタキセル、エリブチシン、カンプトテカン、S N - 3 8、及び脂質プロドラッグ (例えば、アシクロビルジホスファートジミリスチルグリセロール、ドキシソルピシンがコンジュゲートしたリン脂質プロドラッグ、ヌクレオシド類似体のリン脂質誘導体、リン脂質が結合したクロラムブシルなど) からなる群から選択される疎水性薬物を含む、実施形態 1 5 5 の方法。

## 【 0 1 7 0 】

実施形態 1 5 7 : 脂質二重層がパクリタキセルを含む、実施形態 1 5 5 の方法。

## 【 0 1 7 1 】

実施形態 1 5 8 : イリノテカンナノ担体を作成する方法であって、イリノテカンをその中に収容するために適した多数の空孔を含む表面を有するシリカ体を含むナノ担体を得ること、イリノテカンを捕捉するその能力で選択された薬剤を多数の空孔内に配置すること ; ナノ担体の空孔を、リン脂質二重層でコーティングすること (任意選択で、音波処理プロセスを使用) ; 及びイリノテカン、リン脂質二重層コーティングされた空孔に導入して、リン脂質二重層コーティングされたイリノテカンナノ担体を作成することを含む、方法。

## 【 0 1 7 2 】

実施形態 1 5 9 : 前記シリカ体が、ゾル - ゲル合成され、サイズ制御され、かつコロイド的に安定なシリカ体を含む、実施形態 1 5 8 の方法。

## 【 0 1 7 3 】

実施形態 1 6 0 : イリノテカン捕捉剤が、トリエチルアンモニウムスクロースオクタスルファート (T E A 8 S O S) である、実施形態 1 5 8 の方法。

## 【 0 1 7 4 】

実施形態 1 6 1 : ナノ担体が ( a ) 少なくとも 2 0 w / w % (または 3 0 w / w % または 4 0 w / w %) のイリノテカン負荷容量を有する ; 及び / または ( b ) p H 7 . 4 を有する生物学的緩衝液中で、3 7 ° C で、2 4 時間にわたって < 5 % (または < 1 0 %) のイリノテカン漏出を示す、実施形態 1 6 0 の方法。

## 【 0 1 7 5 】

実施形態 1 6 2 : ナノ担体が、p H 7 . 4 を有する生理液中でコロイド安定性を有し、全身生体内分布を可能にする単分散性のままであり、かつ血管漏出 (E P R 効果) またはトランスサイトーシスによって疾患部位に進入することができる、実施形態 1 6 1 の方法。

## 【 0 1 7 6 】

実施形態 1 6 3 : リン脂質二重層がコレステロール及び / またはパクリタキセルを含む、実施形態 1 6 1 の方法。

## 【 0 1 7 7 】

実施形態 1 6 4 : ナノ担体を作成する方法であって、表面を有し、かつ分子をその中に収

10

20

30

40

50

容するために適した多数の空孔を画定するシリカ体と、表面をコーティングするリン脂質二重層とを含む未負荷ナノ担体を得ること；カーゴ捕捉剤をリン脂質二重層内に封入することを含む、方法。

【0178】

実施形態165：ナノ担体を、カーゴ捕捉剤と相互作用するように選択されたカーゴに曝露することをさらに含む、実施形態164に記載の方法。

【0179】

実施形態166：カーゴが、7を上回り、かつ11を下回るpKaを有し、プロトン化され得るように選択され、カーゴ捕捉剤が、少なくとも1個の陰イオン基を含む、実施形態165の方法。

【0180】

実施形態167：カーゴがイリノテカンであり、カーゴ捕捉剤が、トリエチルアンモニウムスクロースオクタスルファート(TEASOS)である、実施形態165の方法。

【0181】

実施形態168：カーゴが、トポイソメラーゼI阻害薬、トポテカン；1つもしくは複数の抗腫瘍アンスラサイクリン抗生物質、ドキソルビシン及びミトキサントロン；1つもしくは複数の有糸分裂阻害薬、ビンブラスチン及びピノレルピン；または1つもしくは複数のチロシン-キナーゼ阻害薬イマチニブ、オシメルチニブ及びスニチニブである、実施形態165の方法。

【0182】

実施形態169：ナノ担体が、少なくとも30w/w%の薬物負荷容量を有する、実施形態165の方法。

【0183】

実施形態170：表面を有し、かつ分子をその中に収容するために適した多数の空孔を画定するシリカ体；表面をコーティングするリン脂質二重層；及びリン脂質二重層内のカーゴ捕捉剤を含み；サブミクロン構造が1ミクロン未満の最大寸法を有し、リン脂質二重層が多数の空孔を安定的に密閉している、ナノ担体。

【0184】

実施形態171：さらに、カーゴをリン脂質二重層内に含む、実施形態170のナノ担体。

【0185】

実施形態172：カーゴがカーゴ捕捉剤と会合している、実施形態171のナノ担体。

【0186】

実施形態173：カーゴが、プロトン化され得る少なくとも1個の弱塩基性基を含み、カーゴ捕捉剤が少なくとも1個の陰イオン基を含む、実施形態172のナノ担体。

【0187】

実施形態174：カーゴが、7を上回り、かつ11を下回るpKaを有するように選択される、実施形態171のナノ担体。

【0188】

実施形態175：カーゴが、第一級、第二級、第三級または第四級アミンを含む、実施形態171のナノ担体。

【0189】

実施形態176：カーゴが、約5～約25mg/mLの水溶性指数を有するように選択される、実施形態171のナノ担体。

【0190】

実施形態177：カーゴが、約-3.0～約3.0のオクタノール/水分配係数またはlogP値を有するように選択される、実施形態171のナノ担体。

【0191】

実施形態178：カーゴが、2～8nmであり、ナノ粒子の空孔のサイズ未満であるように選択される、実施形態171のナノ担体。

【0192】

10

20

30

40

50

実施形態 179：カーゴがイリノテカンであり、カーゴ捕捉剤がトリエチルアンモニウムスクロースオクタスルファート (TEASOS) である、実施形態 171 のナノ担体。

【0193】

実施形態 180：カーゴが、トポイソメラーゼ I 阻害薬、トポテカン；1 つもしくは複数の抗腫瘍アンスラサイクリン抗生物質、ドキソルピシン及びミトキサントロン；1 つもしくは複数の有糸分裂阻害薬、ビンブラスチン及びビノレルビン；または 1 つもしくは複数のチロシン - キナーゼ阻害薬イマチニブ、オシメルチニブ及びスニチニブである、実施形態 171 のナノ担体。

【0194】

実施形態 181：pH 7.4 を有する生物学的緩衝液中で、37 で、24 時間にわたって 5 % 未満のカーゴ漏出を有する、実施形態 171 のナノ担体。

10

【0195】

実施形態 182：少なくとも 30 w/w % の薬物負荷容量を有する、実施形態 171 のナノ担体。

【0196】

実施形態 183：少なくとも 80 w/w % の薬物負荷容量を有する、実施形態 171 のナノ担体。

【0197】

実施形態 184：リン脂質二重層がパクリタキセルを含む、実施形態 170 のナノ担体。

【0198】

20

本発明の他の目的、特徴及び利点は、次の詳細な説明から、当業者には明らかになるであろう。しかしながら、いくつかの本発明の実施形態を示しているが、詳細な説明及び具体例は実例として与えられており、限定ではないことは理解されるべきである。本発明の意図から逸脱することなく、本発明の範囲内で多くの変化及び変更が成されてもよく、本発明は、そのような変更すべてを含む。

【0199】

定義

「対象」、「個体」、及び「患者」という用語は、互換的に使用されてよく、ヒト、さらには、非ヒト哺乳類（例えば、非ヒト霊長類、イヌ、ウマ、ネコ、ブタ、ウシ、有蹄類、ウサギなど）を指す。様々な実施形態では、対象は、院内で、外来患者として、または他の臨床状況で、医師または他の医療従事者の看護下にあるヒト（例えば、成人男性、成人女性、青年期男性、青年期女性、男児、女児）であり得る。特定の実施形態では、対象は、医師または他の医療従事者の看護または処方下になくてもよい。

30

【0200】

本明細書で使用される場合、「それを必要とする対象」という語句は、本明細書に記載のナノ粒子薬物担体（シリカソーム (silicasomes)）が向けられる病態に罹患しているか、またはそのリスクを有する、上記で記載したとおりの対象を指す。したがって、例えば、特定の実施形態では、対象は、がん（例えば、膵臓管状腺癌 (PDAC)、乳癌（例えば、薬剤耐性乳癌）、結腸癌、脳癌など）を有する対象である。特定の実施形態では、対象は、これらだけに限定されないが、薬剤耐性微生物感染を含む、微生物感染を有する対象である。

40

【0201】

「処置する」という用語は、例えば、病態または疾患を処置することに関して使用する場合、その病態もしくは疾患の 1 つもしくは複数の症状の緩和及び/もしくは除去、ならびに/または進行の遅延ならびに/またはその病態もしくは疾患の 1 つもしくは複数の症状の発症速度もしくは重症度の低減、及び/または病態もしくは疾患の予防を指す。治療する、という用語は、病態または疾患の発症の遅延または発症の予防を含む予防的処置を指し得る。

【0202】

「同時投与」または「～と併せての投与」または「共処置」という用語は、第 1 の化合物

50

(例えば、イリノテカンを含有するシリカソーム)及び第2の化合物(例えば、iRGDペプチド)の同時投与に関して使用する場合、第1の化合物及び第2の化合物を投与して、それらが投与された生体内において、第1の化合物及び第2の化合物の生物学的活性の少なくとも多少の時系列的重複が存在するようにすることを示す。同時投与は、同期投与または連続投与を含み得る。連続投与では、それらの生物学的活性が重複する限り、第1の化合物と第2の化合物との投与の間に、多少の実質的な遅延(例えば、数分または数時間)が存在してもよい。特定の実施形態では、同時投与は、第1の化合物及び第2の化合物が生体に対して治療または予防効果の増強をもたらすことを可能にする時間枠を超える。特定の実施形態では、効果の増強は、相乗効果である。

【0203】

10

「ナノ担体」及び「ナノ粒子薬物担体」及び「シリカソーム」という用語は、互換的に使用され、本明細書で使用されるとおりの「多孔性ナノ粒子」という用語、及び多孔性粒子核を包む(または包囲する、または囲う)脂質二重層と互換的である多孔性粒子核を有するナノ構造を指す。特定の実施形態では、シリカナノ粒子は、多孔性シリカナノ粒子(例えば、メソ多孔性シリカナノ粒子(MSNP))である。

【0204】

本明細書で使用される場合、「脂質」という用語は、従来の脂質、リン脂質、コレステロール、PEG及びリガンドの結合のための化学的官能化脂質を指す。

【0205】

本明細書で使用される場合、「脂質二重層」または「LB」という用語は、炭化水素テイルが内部に面して連続非極性相を形成している配向両親媒性脂質分子の任意の二重層を指す。

20

【0206】

本明細書で使用される場合、「リポソーム」という用語は、従来定義されているとおりの、脂質二重層によって囲まれた水性コンパートメントを指す(例えば、Stryer(1981)Biochemistry, 2d Edition, W.H. Freeman & Co., p. 213を参照されたい)。

【0207】

シリカソームにおいて定義した脂質二重層と比較して、リポソームにおける脂質二重層は「非担持脂質二重層」と称され得て、リポソーム自体(未負荷の場合)は、「空のリポソーム」と称され得る。シリカソームの脂質二重層は、シリカソームにおける脂質二重層が多孔性粒子核上に位置し、それによって担持されているので、「担持脂質二重層」と称され得る。特定の実施形態では、脂質二重層は、約6nm~約7nmの範囲の厚さを有し得、これは、疎水性核の厚さ3~4nm、加えて、水和親水性ヘッド基層(それぞれ約0.9nm)及びそれぞれ約0.3nmの2つの部分的水和領域を含む。

30

【0208】

本明細書で使用される場合、「選択的標的化」または「特異的結合」という用語は、シリカソーム(空または負荷済み)の表面上、特に、シリカソームの脂質二重層の表面上で標的化リガンドを使用することを指し、この場合、リガンドは、標的、例えば、目的の細胞表面上に発現される受容体または他の生体分子成分と特異的/選択的に相互作用する。標的化リガンドには、ペプチド、抗体、アプタマー、標的化ペプチド、多糖などの分子及び/または物質が含まれ得る。

40

【0209】

標的化リガンドを有するシリカソームは、「標的化されたシリカソーム」と称され得る。

【0210】

「シリカソーム」という用語は、シリカナノ粒子が脂質二重層(例えば、リン脂質二重層)で完全に被覆されている薬物含有(薬物送達)シリカナノ粒子を指す。特定の実施形態では、シリカナノ粒子は、多孔性シリカナノ粒子(例えば、メソ多孔性シリカナノ粒子)である。

【0211】

50

「約」または「およそ」という用語は、本明細書で使用される場合、当技術分野の通常の技能を有するものが決定するような、特定の値について許容される誤差範囲内であることを指し、これは、一部では、その値が測定または決定される方法、すなわち、測定系の限界、すなわち、医薬製剤などの特定の目的に必要とされる精度に依存する。例えば、「約」は、当技術分野での実施によって、1以内または1を上回る標準偏差を意味する。別法では、「約」は、所与の値の最高20%、好ましくは最高10%、より好ましくは最高5%、よりさらに好ましくは最高1%の範囲を意味し得る。別法では、特に、生物系またはプロセスに関しては、この用語は、値の1桁以内、好ましくは5倍以内、より好ましくは2倍以内を意味し得る。特定の値が本出願及び請求項において記載されている場合、別段に述べない限り、特定の値について許容される誤差範囲内を意味する「約」という用語が推測されるべきである。

10

#### 【0212】

「薬物」という用語は、本明細書で使用される場合、動物及びヒトにおいて治療効果を示す、小さい、及び大きな、天然に存在するか、または合成の様々な分子サイズの化学成分を指す。薬物には、これらだけに限定されないが、有機分子（例えば、小さな有機分子）、治療用タンパク質、ペプチド、抗原、または他の生体分子、オリゴヌクレオチド、siRNA、CRISPR-cas9成分をコードするコンストラクト、及び任意選択で1つまたは複数のガイドRNAなどが含まれ得る。

#### 【0213】

「薬学的に許容される担体」は、本明細書で使用される場合、標準的な薬学的に許容される担体のいずれかと定義される。本発明の医薬組成物は、薬学的に有用な組成物を調製するために公知の方法によって製剤化することができる。薬学的に許容される担体には、希釈剤、アジュバント、及びビヒクル、さらには担体、ならびに本発明の活性成分と反応しない不活性な非毒性固体または液体増量剤、希釈剤、または封入材料が含まれ得る。例には、これらだけに限定されないが、リン酸緩衝食塩水、生理食塩水、水、及びエマルジョン、例えば、油/水エマルジョンが含まれる。担体は、例えば、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど）、その適切な混合物、及び植物油を含有する溶媒または分散媒体であってよい。処方は、当業者には周知で、かつ容易に利用可能ないくつかの情報源に記載されている。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences (Martin E W [1995] Easton Pa., Mack Publishing Company, 19th ed.) は、本明細書に記載のシリカソームに関連して使用することができる処方を記載している。

20

30

#### 【0214】

本明細書で使用される場合、「抗体」は、標的に（例えば、標的ポリペプチドに）結合する（例えば、特異的に結合する）ことができる、免疫グロブリン遺伝子または免疫グロブリン遺伝子の断片によって実質的にコードされるか、またはそれに由来する1つまたは複数のポリペプチドからなるタンパク質を指す。認められている免疫グロブリン遺伝子には、カッパ、ラムダ、アルファ、ガンマ、デルタ、イプシロン及びミュー定常領域遺伝子、さらには、無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が含まれる。軽鎖は、カッパまたはラムダのいずれかに分類される。重鎖は、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはイプシロンとして分類され、次いでこれらが、免疫グロブリン群、それぞれIgG、IgM、IgA、IgD及びIgEを定義する。

40

#### 【0215】

典型的な免疫グロブリン（抗体）構造単位は、四量体を含むことが公知である。各四量体は、2つの同一のポリペプチド鎖の対から構成され、それぞれの対は、1つの「軽鎖」（約25kD）及び1つの「重鎖」（約50~70kD）を有する。各鎖のN末端が、主に抗原認識を担う約100~110またはそれ以上のアミノ酸の可変領域を画定する。可変軽鎖（VL）及び可変重鎖（VH）という用語はそれぞれ、これらの軽鎖及び重鎖を指す。

#### 【0216】

50

抗体は、インタクトな免疫グロブリンとして、または様々なペプチダーゼでの消化によって生成される、いくつかのよく特徴づけられている断片として存在する。したがって、例えば、ペプシンは、ヒンジ領域のジスルフィド結合の下で抗体を消化して、 $F(a b)'_2$ 、 $F a b$ の二量体を生成し、これ自体は、ジスルフィド結合によって $V_H - C_H 1$ に結合している軽鎖である。 $F(a b)'_2$ を穏やかな条件下で還元させると、ヒンジ領域のジスルフィド結合を分解して、それによって、 $(F a b')_2$ 二量体を $F a b'$ 一量体に変換することができる。 $F a b'$ 一量体は本質的に、ヒンジ領域の一部を有する $F a b$ である（他の抗体断片のより詳細な説明については、*Fundamental Immunology*, W. E. Paul, ed., Raven Press, N. Y. (1993)を参照されたい）。様々な抗体断片が、インタクトな抗体の消化の点において定義されているが、当業者であれば、そのような $F a b'$ 断片を新規に化学的に、または組換えDNA法を利用することによって合成することができることが分かるであろう。したがって、抗体という用語は、本明細書で使用される場合、全抗体の修飾によって生産されるか、または組換えDNA法を使用して新規に合成される抗体断片も含む。いくつかの好ましい抗体には、一本鎖抗体（単一ポリペプチド鎖として存在する抗体）、より好ましくは、可変重鎖及び可変軽鎖と一緒に結合して（直接、またはペプチドリンカーを介して）連続するポリペプチドを形成している一本鎖 $F_v$ 抗体（ $s F_v$ または $s c F_v$ ）が含まれる。一本鎖 $F_v$ 抗体は、直接結合しているか、ペプチド・コードリンカーによって結合している $V_H$ -及び $V_L$ -コード配列を含む核酸から発現され得る、共有結合した $V_H - V_L$ ヘテロ二量体である。*Huston, et al. (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85: 5879-5883*。 $V_H$ 及び $V_L$ は単一ポリペプチド鎖として相互に連結しているが、 $V_H$ 及び $V_L$ ドメインは、非共有結合している。繊維状ファージの表面上に発現される第1の機能性抗体分子は一本鎖 $F_v' s (s c F_v)$ であったが、しかしながら、代替の発現戦略も成功している。例えば、鎖（重鎖または軽鎖）の一方が $g 3$ カプシドタンパク質に融合し、相補的鎖が可溶性分子としてペリプラズムに送出するならば、 $F a b$ 分子をファージ上にディスプレイすることができる。この2つの鎖は、同じか、または異なるレプリコン上にコードされ得る；重要なポイントは、各 $F a b$ 分子の2つの抗体鎖が翻訳後に集合し、その二量体が、例えば、 $g 3 p$ への鎖の一方の連結によって、ファージ粒子へと組み込まれることである（例えば、米国特許第5733743号）。 $s c F_v$ 抗体及びいくつかの他の構造が、抗体 $V$ 領域からの、天然に凝集するが、化学的に分離された軽鎖及び重鎖ポリペプチド鎖を、抗原結合部位の構造と実質的に同様の三次元構造に折り畳まれる分子に変換することは、当業者に知られている（例えば、米国特許第5,091,513号、同第5,132,405号、及び同第4,956,778号を参照されたい）。特定の実施形態では、抗体は、ファージ上にディスプレイされているすべてを含むはずである（例えば、 $s c F_v$ 、 $F_v$ 、 $F a b$ 及びジスルフィド結合した $F_v$ （例えば、*Reiter et al. (1995) Protein Eng. 8: 1323-1331*を参照されたい）、さらには、アフイボディ、ユニボディなど。

#### 【0217】

「特異的に結合する」という用語は、本明細書で使用される場合、生体分子（例えば、タンパク質、核酸、抗体など）に関する場合、分子（例えば、タンパク質及び他の生物製剤）の不均一な集団中で、ある生体分子の存在を決定する結合反応を指す。したがって、指定の条件（例えば、抗体の場合にはイムノアッセイ条件、または核酸の場合にはストリンジェントなハイブリッド形成条件）下で、規定のリガンドまたは抗体は、その特定の「標的」分子に結合し、そのサンプル中に存在する他の分子には、有意な量では結合しない。

#### 【0218】

次に、図面を参照するが、その際、同じ参照番号は、全体を通して、対応する部分を表す。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0219】

【図1A - 1】図1A ~ 1Eは、本明細書に記載の1つまたは複数の実施形態による、薬物負荷のためにプロトン化剤を使用するLB-MSNP及びリボソームイリノテカン担体

の調製を示している。図 1 A は、合成方法及び L B - M S N P 及びリポソームによるイリノテカンの負荷を示す概略図を示している ( 図 1 A 、 パネル A 1 ) 。 T E A g S O S を M S N P 粒子に浸漬した後に、空孔を、脂質バイオフィルムの音波処理に由来する L B によって密閉する ( L u e t a l . ( 2 0 0 7 ) S m a l l , 3 : 1 3 4 1 - 1 3 4 6 ) 。 図 1 A 、 パネル A 2 : T E A g S O S 浸漬された粒子をイリノテカン溶液中でインキュベートすると、T E A g S O S によるプロトン化のために、両親媒性薬物が脂質二重層を越えて拡散することが可能になる ( T E A g S O S + 8 T E A + 2 0 H + + S O S ^{8-} ) 。脂質可溶性 T E A は粒子から出るが、H + は、イリノテカン、L B を越えることができない親水性誘導体に変換する。プロトン化された薬物は、S O S ^{8-} と相互作用して、ゲル様沈澱物を形成し、これは、空孔内に保持される。図 1 A 、 パネル A 3 : 同じ技術を使用して、イリノテカン捕捉のためにリポソーム同等物を生成した ( D r u m m o n d e t a l . ( 2 0 0 6 ) C a n c e r R e s . , 6 6 ( 6 ) : 3 2 7 1 - 3 2 7 7 ) 。

【図 1 A - 2】図 1 A - 1 の続きである。

【図 1 B】I r - M S N P 及び I r - リポソーム担体の薬物負荷容量 ( D L C ) の評価。D L O [ イリノテカンの全量 ( m \_ 0 ) - 非封入イリノテカン ( m \_ 1 ) ] / [ 粒子の全量 ( m M S N P または m 脂質 ) × 1 0 0 % 。 T E A g S O S の包含は、粒子の流体力学的サイズ及びゼータ電位に対して無視できる作用を有した。流体力学的サイズ及びゼータ電位のデータは、表 3 に示されている ( 実施例 2 ) 。

【図 1 C】空の、コーティングされていない M S N P 、 I r - M S N P 及び I r - リポソーム担体の C r y o E M イメージ。この技術は、リポソーム中でのイリノテカン沈殿を可視化するために十分な感度を有する。

【図 1 D】担体安定性を、1 0 0 % 血清中で、3 7 ° C で 2 4 時間にわたってインキュベートし、H P L C によって薬物漏出を決定することによって評価した。

【図 1 E】凍結乾燥及び水再懸濁後の流体力学的直径及び薬物漏出 % の変化によって決定されるとおりの担体安定性。

【図 2 A】図 2 A ~ 2 D は、本明細書に記載の 1 つまたは複数の実施形態による I r - L B - M S N P 及び I r - リポソームの生体内分布を示している。図 2 A : K P C 由来同所腫瘍部位に I V 注射された N I R 標識担体の生体内分布を比較するための 4 8 時間にわたる I n t e r v a l I V I S イメージング ( n = 3 ) 。 N I R 標識 L B - M S N P またはリポソーム 1 0 0 m g / k g の I V 注射後の、代表動物における N I R 蛍光イメージが示されている。

【図 2 B】同じ実験における外植臓器のエキスビイメージング；動物を 2 4 時間後にと殺した。共焦点顕微鏡法によって、腫瘍部位で、リポソームと比較して N I R 標識 L B - M S N P のより高い存在度が確認された。

【図 2 C】イリノテカン腫瘍含有率を、同所 K P C 由来異種移植片モデルで決定した ( n = 3 ) 。動物に、異なる薬物製剤で 6 0 m g / k g のイリノテカン用量当量の I V 注射を与えた。2 4 時間後の動物と殺の後に、腫瘍組織を、H P L C によってイリノテカン含有率を測定するために収集した。イリノテカン含有率を、腫瘍組織 1 グラム当たりの全注射用量 % ( % I D / g ) として表した。データは、平均 ± S D 、 \* p < 0 . 0 5 を表している。

【図 2 D】同じ実験における血漿中イリノテカン濃度の H P L C 測定。データは、平均 ± S D 、 \* p < 0 . 0 5 を表す。

【図 3 A】図 3 A ~ 3 E は、本明細書に記載の 1 つまたは複数の実施形態による、K P C 由来同所腫瘍モデルにおける遊離薬物及び封入イリノテカン担体の示差的腫瘍阻害効果を示す。図 3 A : N C I プロトコルを使用しての、短期間用量設定試験における M T D の評価。

【図 3 B】4 日ごとに 8 回投与まで 4 0 m g / k g 遊離薬物または封入イリノテカンを I V 投与した後の、B 6 / 1 2 9 マウスにおける K P C 由来同所腫瘍の増殖阻害。I n t e r v a l I V I S イメージングを腫瘍増殖を監視するために使用したが、これは、オペレーター定義された ( o p e r a t o r - d e f i n e d ) R O I でイメージ強度によっ

10

20

30

40

50



て定量的に表された。

【図 3 C】処置後の動物（40～47日目にと殺）の原発性腫瘍部位でのアポトーシスの定量分析（切断されたカスパーゼ - 3 では I H C 染色を使用）。

【図 3 D】周囲転移に対する処置の影響を示すための、瀕死の動物（40～47日目にと殺）での生物発光強度の代表的な検死結果及びエクスビボイメージング。目に見える転移性の展開を胃、小腸、肝臓、脾臓、腎臓、横隔膜、及び腹壁に見ることができた。心臓または肺の浸潤はなかった。

【図 3 E】（図 3 D）における定量エクスビボイメージングによって決定された腫瘍展開の比較分析をまとめるためのヒートマップディスプレイ。データは、平均 ± S E M、\*  $p < 0.05$  を表している。

10

【図 4 A】図 4 A～4 E は、本明細書に記載の 1 つまたは複数の実施形態による、I r - L B - M S N P 対 I r - リポソームによる毒性低下の比較分析を示している。図 4 A：図 3 B に示されている実験からの組織を使用して、代表の瀕死動物（40～47日目にと殺）から得た肝臓組織診。H & E 染色された切片での矢印は、壊死肝臓組織を指している一方で、アスタリスクでマークされた部位は脂肪を示している。棒線は  $200 \mu\text{m}$  である。

【図 4 B】 $60 \text{ mg} / \text{kg}$  の用量当量で異なるイリノテカン製剤を与えられ、続いて、24 時間目にと殺された動物の肝臓における切断されたカスパーゼ - 3（アポトーシスマーカー、赤色）及び F 4 / 8 0（K C マーカー、緑色）の二重 I H C 染色。核は、H o e c h s t 33342（青色）で染色された。棒線 =  $100 \mu\text{m}$ 。

【図 4 C】図 3 B で試験された同じ処置動物群における、アポトーシスの展開及び腸絨毛の鈍化を明らかにするための H & E 対比染色と共に、切断されたカスパーゼ - 3 のための I H C 染色。棒線は  $100 \mu\text{m}$  を表す。

20

【図 4 D】2 日ごとに 3 回 I V 注射されるイリノテカンの  $40 \text{ mg} / \text{kg}$  用量当量を使用して、胸骨骨髓に対する影響を試験した別の実験。胸骨を包埋、脱石灰化及び H & E 染色のために 7 日目に収集した。棒線は  $200 \mu\text{m}$  を表す。

【図 4 E】肝臓における I r - L B - M S N P 及び I r - リポソーム製剤の示差的肝毒性を説明する図。具体的な理論に結び付けられることはないが、注射されたナノ担体は初めに、K C によって取り込まれ、そこで、担体の分解が、バースタンダー肝細胞へのイリノテカン放出につながると考えられる。担体分解及び肝細胞への薬物放出のその後の速度によって、イリノテカンが代謝され、不活性になる規模を決定することができる。さらに、リポソーム担体のより高い不安定性が、より安定な I r - L B - M S N P よりも急速な薬物放出につながっていると仮定され、このことが、アポトーシス及び壊死の違いを説明する。

30

【図 5】図 5 は、本発明の 1 つまたは複数の実施形態による、脂質二重層コーティングされたメソ多孔性シリカナノ粒子（L B - M S N P）の合成手順及び T E A g S O S 媒介性イリノテカン（I R I N）負荷の機構を示すスキームを示している。M S N P を、ゾル/ゲル化学を使用して合成した。T E A g S O S（社内で合成）を初めに、M S N P と共にインキュベートした。これに、本発明者らのバイオフィルム技術（M e n g e t a l . (2015) A C S N a n o , 9 (4) : 3540 - 3557）を使用して、L B コートの沈積を続けた。T E A g S O S 浸漬した M S N P を、無水脂質バイオフィルムに添加し（例えば、3 : 2 : 0 . 15 のモル比での D S P C / コレステロール / D S P E - P E G）、続いて、音波処理で空孔を密閉した。遊離捕捉剤の除去後に、T E A g S O S 負荷された L B - M S N P をイリノテカンと共にインキュベートした。これによって、遊離の親油性イリノテカンが、粒子中に拡散してプロトン化され、空孔中に捕捉される。この反応は次のとおりに進行する：L B - M S N P の内部に捕捉剤が存在することによって、「T E A g S O S + 8 T E A - H + + S O S 8 -」の平衡が粒子インキュベーション媒体への脂質透過性トリエチルアミン（T E A）の流出をもたらす。粒子内部への H + 放出が pH 勾配を生み、それが、L B を介して拡散する親油性イリノテカンのプロトン化をもたらす。脂質不透過性であるプロトン化 I R I N は、S O S 8 - と相互作用して、沈澱物を形成し、したがって、L B - M S N P での効率的な I R I N 捕捉をもたらす。

40

50

【図6A】図6A及び6Bは、本明細書に記載の1つまたは複数の実施形態による、捕捉試薬を含有するイリノテカン負荷されたLB-MSN(P(+SOS))及び捕捉試薬を使用してイリノテカン負荷されたリポソーム(Ir-Lipo(+SOS))の形態及び薬物放出プロファイルを示している。図6A: Ir-LB-MSN(P(+SOS)) (上のパネル) 及び Ir-Lipo(+SOS) (下のパネル) の CryoEM イメージ (TF20、FET)。MSN(P) 表面上にコーティングされた脂質二重層は、透明に見え得る。上のズームインイメージは、粒子表面上に無傷の脂質コーティングを備えたMSN(P)を示している一方で、多孔性の内部は、TEOGSOSとイリノテカンとの間の高密度複合体の存在を示している。同様に、リポソームイメージ(下のパネル)では、イリノテカン-捕捉剤複合体を、内部上の高密度沈澱物として見る事ができる(赤い矢印でマーク)。

10

【図6B】PBS(pH=7.4)及びファゴリソーム模擬流体(PSF、pH4.5)中でのIr-LB-MSN(P(+SOS))及びIr-Lipo(+SOS)の薬物放出プロファイル。薬物放出測定では、NPをPBSまたはPSF(1mL、イリノテカン0.1mg/mL)中で調製し、続いて、37℃で振盪した。示されている時点で、放出されたイリノテカンを遠心フィルターユニットによって、30kDのサイズカットオフで、NPから分離した。濾液中のイリノテカン濃度をマイクロプレートリーダーによって360nmのODによって決定した。実験を少なくとも2回繰り返した。

【図7】図7は、本明細書に記載の1つまたは複数の実施形態による、共焦点顕微鏡によって決定されたとおりのIr-LB-MSN(P(+SOS))及びIr-Lipo(+SOS)の細胞取り込み及び細胞内を示している。LB-MSN(P)及びリポソームを、脂質二重層において0.1w/w% Texas Red-DHPEによって蛍光標識した。両方の粒子を24時間にわたってPANC-1細胞と共にインキュベートし、次いで、PBS中で3回洗浄した。細胞を固定し、PBSで洗浄した後に、細胞膜をWGA488で、核をHoechst色素で染色した。スライドを、共焦点顕微鏡を使用して可視化した。

20

【図8】図8、パネルA~Fは、本発明の1つまたは複数の実施形態による、Ir-LB-MSN(P(+SOS))対Ir-Lipo(+SOS)または遊離薬物の比較細胞傷害性分析を示している。図8、パネルA~C: PANC-1細胞の細胞生存率を、示されている濃度の遊離IRIN、Ir-LB-MSN(P(+SOS))及びIr-Lipo(+SOS)で処置した後にMTSアッセイによって決定した。実験をまた、種々の時間間隔(24時間、48時間及び72時間)で実施した。図8、パネルD~F: PANC-1細胞で記載したとおりの種々の薬物濃度及び時点で遊離IRIN、Ir-LB-MSN(P(+SOS))及びIr-LB-MSN(P(+SOS))で処置した後のBxPC-3細胞の細胞生存率。

30

【図9】図9は、本明細書に記載の1つまたは複数の実施形態による、骨髄の組織学的分析を示している。遊離IRIN、Ir-Lipo(+SOS)及びIr-LB-MSN(P(+SOS))で処置した後の骨髄組織診。雄のBALB/cマウスに、IRIN、Ir-Lipo(+SOS)またはIr-LB-MSN(P(+SOS))を60mg/kgの薬物用量でIV注射した。24時間後に、マウスをと殺し、胸骨を収集し、10%ホルマリン中で固定した。切片をヘマトキシリン-エオシン(H&E)で染色し、光学顕微鏡法によって検査した。データは、LB-MSN(P)及びリポソーム製剤の両方がイリノテカンによって誘導される骨髄枯渇を減少させたことを示している。重篤な骨髄損傷及びアポトーシスが、遊離薬物群において見られ得る。

40

【図10】図10は、本明細書に記載の1つまたは複数の実施形態による、腎臓の組織学的分析を示している。遊離IRIN、Ir-Lipo(+SOS)及びIr-LB-MSN(P(+SOS))で処置した後の腎臓の組織学的分析。雄のBALB/cマウスに、IRIN、Ir-Lipo(+SOS)またはIr-LB-MSN(P(+SOS))を60mg/kgの薬物用量でIV注射した。24時間後に、マウスをと殺し、腎臓を収集し、10%ホルマリンで固定し、続いて、パラフィン包埋した。4µm厚の組織切片をガラススライド上に乗せた。切片をヘマトキシリン-エオシン(H&E)で染色し、光学顕微鏡法に

50

よって検査した。ボーマン隙の腫脹及び浮腫（矢印でマーク）を示す代表的な組織学的イメージが、遊離 I R I N または I r - L i p o ( + S O S ) 処置動物で観察された。これらの病変は、急性糸球体炎症を示している。I r - L B - M S N P ( + S O S ) 群では、有意な腎臓異常は見い出されなかった。

【図 1 1】図 1 1 は、本発明の 1 つまたは複数の実施形態による、代表的なイリノテカン負荷 L B - M S N P の低解像度 c r y o E M イメージを示している。棒線は 1 0 0 n m を表している。約 5 0 0 個の粒子の外観検査によって、> 9 9 % の粒子のコーティングの成功と共に、L B の構造的完全性が確認された。

【図 1 2】図 1 2、パネル A ~ F は、本発明の 1 つまたは複数の実施形態による、B 6 / 1 2 9 マウスに移植してから 5 週間後の周辺臓器への K P C 由来腫瘍の浸潤を示すための H & E 染色を示している。代表的なイメージは、膵臓（パネル A）、肝臓（パネル B）、脾臓（パネル C）、腎臓（パネル D）、小腸（パネル E）、及び胃（パネル F）の浸潤を示すために取り込まれている。棒線サイズは 2 0 0  $\mu$ m である。

10

【図 1 3】図 1 3 は、本明細書に記載の 1 つまたは複数の実施形態による、図 2 A の K P C 由来モデルにおける N I R 標識粒子の I V 注射から 4 8 時間後に取り込まれたエクスビボ I V I S イメージを示している。これは、同等の粒子用量では、標識リボソームと比較して、腫瘍部位での L B - M S N P の存在度の上昇が存在することを実証している。

【図 1 4】図 1 4 は、本発明の 1 つまたは複数の実施形態による、L B - M S N P ( 1 0 0 m g / k g ) の I V 注射及び 2 4 時間目での動物と殺後の B 6 / 1 2 9 マウス ( n = 3 ) における K P C 由来同所腫瘍モデルでの L B - M S N P の生体内分布を示している。腫瘍組織及び主要臓器を収集し、誘導結合プラズマ発光分光法を使用して、S i 含有率を測定した。粒子生体内分布は、各位置について、注射された全 S i 用量の % ( % I D ) として表される。データは、平均  $\pm$  S D を表す。

20

【図 1 5 A】図 1 5 A は、ヌードマウス ( n = 3 ) において、皮下 P A N C - 1 異種移植片モデルで決定されたイリノテカン腫瘍含有率を示す。動物に、異なる薬物製剤で 6 0 m g / k g のイリノテカン用量当量の I V 注射を与えた。2 4 時間後に動物をと殺した後に、腫瘍組織を収集して、H P L C によってイリノテカン含有率を測定した。イリノテカン含有率は、腫瘍組織 1 グラム当たりの全注射用量 % ( % I D / g ) として表された。データは、他の群と比較して、M S N P での平均  $\pm$  S D、\* p < 0 . 0 5 を表している。

【図 1 5 B】N I R 標識 L B - M S N P 1 0 0 m g / k g の I V 注射から 2 4 時間後の代表動物での N I R 蛍光イメージを示している。

30

【図 1 6】図 1 6 は、B 6 / 1 2 9 マウスにおける周囲臓器でのイリノテカン含有率の H P L C 定量化を示している。動物に、異なる薬物製剤 ( n = 3 ) で、6 0 m g / k g のイリノテカン用量当量の I V 注射を与えた。2 4 時間後の動物と殺の後に、組織を収集して、H P L C によってイリノテカン含有率を測定した。イリノテカン含有率は、組織 1 グラム当たりの全注射用量 % ( % I D / g ) として表された。データは、平均  $\pm$  S D、\* p < 0 . 0 5 を表す。

【図 1 7】図 1 7 は、図 3 B に記載の実験での各動物群 ( 4 0 ~ 4 7 日目にと殺 ) における原発性腫瘍部位から得られた原発性腫瘍部位で、切断されたカスパーゼ - 3 ( アポトーシスマーカー ) での I H C 染色を示すための代表的なイメージを示している。アポトーシス細胞 ( 茶色 ) が、赤色の矢印で示されている。棒線 = 5 0  $\mu$ m。

40

【図 1 8】図 1 8 は、本発明の 1 つまたは複数の実施形態による、図 3 B に記載の有効性試験の各処置群における死亡率を示している。x 軸上の矢印は、注射した日を示している。マウスを頻繁に監視し、自発死ではなく「瀕死基準」( Z u c k e r e t a l . ( 2 0 0 9 ) J . C o n t r o l . R e l e a s e , 1 3 9 ( 1 ) : 7 3 - 8 0 ) に基づきと殺した。イリノテカン負荷された L B - M S N P は、食塩水及び遊離イリノテカンと比較して、有意な ( p < 0 . 0 1、S P S S 1 9 . 0、I B M S P S S S t a t i s t i c s、U S A を使用するロジランク検定によって比較 ) 生存の改善をもたらした。I r - リボソームと比較して、I r - L B - M S N P では、良好な生存結果が観察された。

【図 1 9】図 1 9 は、本発明の 1 つまたは複数の実施形態による、全血球数分析が図 4 D

50

に記載の実験から得られたサンプルで行われたことを示している。示差的白血球数は、遊離薬物またはIr-リポソーム処置群で行われた好中球絶対数の有意な減少を示した。対照的に、Ir-LB-MSN Pでの処置は、好中球数の僅かな、しかし有意ではない低下を示した。データは平均±SEM、対照と比較しての\* $p < 0.05$ 、LB-MSN P群と比較しての# $p < 0.05$ を表している。

【図20】図20は、本明細書に記載の1つまたは複数の実施形態による、異なる薬物担体での肝臓におけるイリノテカン含有率のHPLC定量化を示している。動物に、異なる薬物製剤で60mg/kgのイリノテカン用量当量のIV注射を与えた( $n = 3$ )。それぞれ0.5、4、24時間後の動物と殺の後に、肝臓組織を収集して、HPLCによってイリノテカン含有率を測定した。イリノテカン含有率は、肝臓組織1グラム当たりの全注射用量%(%ID/g)として表された。データは、平均±SD、\* $p < 0.05$ を表す。

10

【図21A】図21A及び21Bは、薬物負荷のためのシリカソームの合成及び特性解析ならびに可視化を示している。図21A：上のパネルは、シリカソームを構築するための合成ステップ及び遠隔薬物負荷を示す図を提供している(実施例1及びLiu et al. (2016) ACS Nano. 10(2): 2702-2715を参照されたい)。

簡単に述べると、MSN P核をゾル-ゲル化学によって合成し、プロトン化剤、TEAGSOSを含有する溶液に浸漬した。これらの粒子を、脂質バイオフィルムの存在下で音波処理手順を使用して、LBでコーティングした(同書)。これに、TEAGSOSによって提供されるプロトン勾配を越えての遠隔イリノテカン負荷を続けた。ボックス1：種々のシリカソーム成分の図。ボックス2：システイン修飾されたiRGDペプチドをDSP E-PEG2000-マレイミドに結合するためにチオール-マレイミド反応を使用する、LBとのiRGDペプチドのコンジュゲーション。ボックス3：約10nmのAu核の埋め込み(TEM可視化のため)を伴う、及び伴わない裸の粒子及びシリカソームを示すCryo-EMイメージ。合成手順は、実施例3の補足物質及び方法に記載する。棒線=50nm。

20

【図21B】免疫適格性B6/129マウスにおけるKPC由来同所PDACモデルの検死及びIVISイメージ。同所移植は、 $2 \times 10^6$ のKPC-luc細胞を脾臓の尾部に注入するための小手術を伴う(左のパネル)。検死及び生物発光イメージングは、1~2週間後の原発性腫瘍の増殖、続く、3~5週間による腫瘍転移を表している。マクロ転移が矢印でマークされている。

30

【図22A】図22A及び22Bは、同時投与されたiRGDが、KPC由来同所モデルにおいて、IV注射されたシリカソームの腫瘍生体内分布を増強したことを示している。図22A：腫瘍担持マウスに、(i)8µmol/kg遊離iRGDの同時投与と共に、IV50mg/kgのNIR標識シリカソームIV( $n = 3$ 、「シリカソーム+iRGD」と称される)、(ii)50mg/kgのNIR標識された、iRGD-コンジュゲートしたシリカソーム( $n = 3$ 、「シリカソーム-iRGD」と称される)、または(iii)iRGDを伴わずに、50mg/kgのNIR標識シリカソームを与えた。動物を注射から24時間後に殺し、IVISを使用するエクスピボNIRイメージングを続けた。

【図22B】NIR蛍光強度及びSi含有率を使用して、同所腫瘍におけるナノ粒子含有率を定量化した。データは、平均±SD、\* $p < 0.05$ を表す。

40

【図23A】図23A~23Eは、iRGD同時投与がKPC由来同所モデルにおいてIr-シリカソームの取り込み及び有効性を増強することを示している。図23A：ルシフェラーゼ発現KPC由来同所腫瘍モデルにおける有効性試験のスケジュール( $n = 6$ )。選択されたIr-シリカソーム用量(イリノテカン40mg/kg; MSNP80mg/kg)は、先行する有効性試験に基づく(Liu et al. (2016) ACS Nano. 10(2): 2702-2715)。この用量のIr-シリカソームを、iRGD8µmol/kgの同時投与を伴って、または伴わずにIV注射した。注射を、3日毎に合計4回の投与で繰り返した。対照は、同一用量の遊離iRGDまたはIr-シリカソームのみを与えられる動物群を含んだ。

【図23B】原発性腫瘍量及び転移を示すための、と殺前のマウスにおける生物発光強度

50

の代表的なエキスピボイメージング。イメージは、i R G D 同時投与がシリカソーム有効性を増強し得たことを示している。

【図 2 3 C】図 2 3 B における腫瘍及び腫瘍転移阻害に対する影響をまとめたヒートマップ。

【図 2 3 D】i R G D 同時投与は、カプラン - マイヤー分析によって示されたとおり、I r - シリカソームの生存影響を改善した。シリカソームのみの効果は、P B S 及び遊離 i R G D と比較して、高度に有意である ( $p = 0.001$ )。i R G D 同時投与は、生存をさらに増強する ( $p = 0.027$ )。

【図 2 3 E】i R G D  $8 \mu\text{mol} / \text{kg}$  の同時投与を伴って、または伴わずに I r - シリカソームの 1 回用量 (薬物  $40 \text{mg} / \text{kg}$ ) を注射してから 24 時間後の腫瘍におけるイリノテカン含有率の H P L C 分析。データは、平均  $\pm$  S D ( $n = 3$ )、 $* p < 0.05$  を表す。

10

【図 2 4 A】図 2 4 A 及び 2 4 C は、i R G D - 媒介性シリカソーム取り込みが腫瘍血管系上での N R P - 1 発現を必要とすることを示している。図 2 4 A : i R G D がナノ粒子トランスサイトosisを開始する機構を実証する図。

【図 2 4 B】K P C 由来腫瘍切片における N R P - 1 (緑色) 及び C D 3 1 (赤) の多色 I H C 染色、加えて、核染色 (青色)。I H C 染色法は、方法のセクションに記載する。N R P - 1 は、腫瘍組織及び血管の両方の上に発現される。合成イメージは、高い程度の C D 3 1 との N R P - 1 の同時局在 ( $94.2\%$ ) を示している；同時局在比 (C R) は、I m a g e J ソフトウェアによって決定した。棒線 =  $100 \mu\text{m}$ 。

20

【図 2 4 C】i R G D - 媒介性シリカソーム生体内分布に対する抗 N R P - 1 抗体の干渉。N I R - シリカソーム  $50 \text{mg} / \text{kg}$  + 遊離 i R G D  $8 \mu\text{mol} / \text{kg}$  の I V 注射の 15 分前に、 $50 \mu\text{g}$  の遮断抗体または対照 I g G を I V 注射した ( $n = 3$ )。24 時間後のナノ粒子生体内分布を示すエキスピボ N I R イメージ。N I R 強度及び S i 含有率を使用して、同所腫瘍部位でのナノ粒子取り込みを定量化した。データは、平均  $\pm$  S D、 $* p < 0.05$  を表す。

【図 2 5 A】図 2 5 A ~ 2 5 C は、i R G D 同時投与によって開始されるシリカソーム輸送システムの超微細構造表示を提供する。図 2 5 A : 同所腫瘍を担持するマウスに、A u - シリカソーム  $50 \text{mg} / \text{kg}$  を、i R G D  $8 \mu\text{mol} / \text{kg}$  の同時投与を伴って、または伴わずに注射した。腫瘍を 24 時間目に採取し、ただちに T E M 分析のために固定した。各群において少なくとも 10 の目的の領域を表示して、血管内皮細胞において、群化した連続小胞 (黄色の矢印) の存在度を定量的に表した。本発明者らは、細胞内表面積  $1 \mu\text{m}^2$  あたりの小胞の数を計算した (左のパネル)。データは、平均  $\pm$  S D、 $* p < 0.05$  を表す。高倍率及び低倍率での代表的な T E M 写真が示されている。L = 内腔；R = 赤血球。

30

【図 2 5 B】A u - シリカソーム  $50 \text{mg} / \text{kg}$  を与えられ、次いで、24 時間後にと殺された腫瘍担持マウスにおけるシリカソームトランスサイトosisの T E M 表示。電子顕微鏡写真は、( i ) 腫瘍血管の内腔 (赤色の矢印)、( i i ) 内皮小胞の輸送 (ピンク色の矢印)、及び腫瘍間質中の沈積 (青色の矢印) におけるシリカソームを示している。領域「1」~「3」の高倍率イメージが、パネルの右側に提示されている。E = 内皮細胞；L = 内腔；P = 周細胞；R = 赤血球。

40

【図 2 5 C】がん細胞内部の核周囲分布におけるシリカソームの存在を示す T E M イメージ。N = 核；M = ミトコンドリア。

【図 2 6 A】図 2 6 A ~ 2 6 B は、N S G マウスにおける、患者由来異種移植片での i R G D 誘導シリカソーム生体内分布を示している。図 2 6 A : 間質存在度は一致するが、N R P - 1 発現のレベルが異なる対の腫瘍 (X W R # 8 及び X W R # 187) を、i R G D 同時投与の非存在及び存在下での生体内分布試験のために選択した。マッソン三色染色は、両方の腫瘍において同等レベルのコラーゲン発現を示している。多色 I H C 染色 (N R P - 1 では緑色の蛍光抗体、C D 3 1 では赤色の蛍光抗体) を使用して、N R P - 1 発現の比存在度、及び i m a g e J ソフトウェアを使用して内皮細胞との重複の程度を決定

50

した。データは、平均 $\pm$ SD、\*  $p < 0.05$ を表す。

【図26B】腫瘍担持動物に、iRGD  $8 \mu\text{mol} / \text{kg}$ の同時投与を伴って、または伴わずにNIR標識シリカソーム  $50 \text{mg} / \text{kg}$ のIV注射を与えた。動物を24時間後にと殺した( $n = 3$ )。NIR蛍光強度及びSi含有率によって決定されたとりのシリカソームの取り込みのエクスピボ評価。データは、平均 $\pm$ SD、\*  $p < 0.05$ を表す。

【図27】図27、パネルA~Cは、シリカソーム上の脂質二重層にiRGDを成功裏に共有結合によってコンジュゲートさせるためのチオール-マレイミド反応の使用を示している。共有結合によるコンジュゲーションの成功を確認するために、Ruoslahti博士によって提供された反応性フルオレセイン(FAM)標識iRGDペプチド(Sugahara et al. (2009) Cancer Cell, 16:510-520)をDSPE-PEG-マレイミドへの結合について使用した。詳細な方法は、実施例3の方法セクションに記載する。パネルA:  $100 \mu\text{g} / \text{mL}$ で懸濁された初期状態及びFAM-iRGD-シリカソームの蛍光スペクトルを488nmの励起波長でマイクロプレートリーダー(Molecular Device M5e)で得、洗浄及び精製されたFAM-iRGD-シリカソームでの蛍光シグナルの有意な保持によって、コンジュゲーション反応の成功が確認される(Cancer cell 2009, 16:510)。パネルB及びC:シリカソームへのiRGDコンジュゲーションの効果を、細胞取り込みに対するその影響について試験した。シリカソーム-iRGDのバッチを、方法セクションに記載されているとおり、MSNPフレームワークのNIR標識(DyLight 680)と共に合成した。KPC細胞を  $100 \mu\text{g} / \text{mL}$ の粒子濃度で37 で2時間にわたって処理し、取り込みをフローサイトメトリー(パネルB)、及び共焦点顕微鏡法(パネルC)によって決定した。同様の標識効率を有するiRGD遊離NIR-シリカソームを対照として使用した。データは、平均 $\pm$ SD、\*  $p < 0.05$ を表す。共焦点顕微鏡法によって、結果が確認された(細胞膜は、コムギ麦芽凝集素で緑色染色され、核はHoechst 33342で青色染色された)。棒線 =  $20 \mu\text{m}$ 。

【図28】図28、パネルA~Bは、IVシリカソーム生体内分布に対する非機能性ペプチド(CendRモチーフが欠如)の効果の評価を示している。パネルA:本発明者らは、非CendRペプチド、シクロ(RGDfK)を使用して、図22に示されている同所モデルにおいて生体内分布実験を繰り返した。簡単に述べると、腫瘍担持動物に、PBSまたは遊離シクロ(RGDfK)  $8 \mu\text{mol} / \text{kg}$ と同時に投与して、NIR標識シリカソーム  $50 \text{mg} / \text{kg}$ のIV注射を与え、続いて、24時間目に動物をと殺した( $n = 3$ )。代表的なエクスピボ臓器NIR蛍光イメージを、ナノ粒子生体内分布を示すために得た。パネルB:NIR蛍光強度分析(IVISソフトウェアによって)及びSi含有率の決定(ICP-OESによる)は、非CendRペプチドが腫瘍部位でのシリカソーム取り込みを改善することはできないことを示した。データは、平均 $\pm$ SDを表す。

【図29】図29、パネルA~Bは、共焦点顕微鏡法による、腫瘍におけるシリカソーム輸送の評価を示している。パネルA:腫瘍切片は図22での実験から得た。SP2-1P-FCS、Leica顕微鏡下で633nmレーザーを使用して、代表的な共焦点イメージを得て、NIR標識シリカソーム存在度の腫瘍内存在度を評価した。Sugahara et al. (2010) Science, 328:1031-1035)によって記載された方法を使用して、血管の存在(CD31は緑色)及び核の存在(DAPIは青色で染色)を検査するために同じ切片をIHC染色することで、本発明者らは腫瘍組織におけるナノ粒子の存在及び遊走を決定することができた。棒線 =  $20 \mu\text{m}$ 。パネルB:Image Jソフトウェアを使用して、最も近い腫瘍血管からのシリカソームの透過距離の計算値は、約15血管と推定された。箱ひげ図(Originソフトウェア)を展開して、中央値(水平線)、25~75パーセンタイル(箱)、平均(中空の正方形)及びSD(ひげ)を示した。\*、 $p < 0.05$ 、シリカソームのみまたはシリカソーム-iRGDと比較。

【図30】図30は、図22で使用した動物から得られた臓器を使用し、ICP-OES分析によって決定された肝臓(左)及び脾臓(右)におけるSi含分を示している。デー

タは、平均 $\pm$ SDを表している。 $* p < 0.05$ 、シリカソームまたは「シリカソーム + iRGD」群と比較。

【図31】図31は、iRGD同時投与を伴わずにAu包埋シリカソーム50mg/kgを注射する(24時間)前の動物からのKPC由来腫瘍の代表的なTEMイメージを示している。このイメージは、内腔側の粒子沈積と共にトランスサイトーシス小胞の非存在を実証している。E = 内皮細胞、L = 内腔。

【図32】図32は、プロトセルとシリカソーム技術との比較結果を示している。

【発明を実施するための形態】

【0220】

治療効力を維持する、または増加させながら、高率の毒性に対処するために、全身毒性を引き起こし得る遊離薬物の量を限定しながら標的部位(例えば、腫瘍部位、感染部位など)での薬物送達(例えば、化学療法薬、抗微生物薬など)を増強する薬物送達ナノ担体を提供する。毒性を予防し、有効性を改善するために、担体自体が安定な薬物負荷を維持することが望ましい。様々ながん細胞から確立された動物腫瘍モデルにおいて化学療法薬を送達するためのナノ担体の使用は、遊離薬物当量と比較して、薬物循環半減期を延長し、高い薬物濃度を腫瘍部位に送達して細胞傷害性死滅を改善する、さらには、全身毒性を減少させるそのようなナノ担体の能力を実証している(例えば、Messerer et al. (2004) Clin. Cancer Res. 10(19): 6638 - 6649; Drummond et al. (2006) Cancer Res. 66(6): 3271 - 3277; Ramsay et al. (2008) Clin. Cancer Res. 14(4): 1208 - 1217を参照されたい)。

【0221】

多くのリポソーム担体がイリノテカンなどの高毒性薬物の安全性を改善することができないことを考慮して、新規のナノ粒子薬物担体を本明細書において提供するが、これは、シリカナノ粒子(例えば、メソ多孔性シリカナノ粒子(MSNP))に施与された脂質二重層(LB)を使用し、それによって、担持脂質二重層を得ている。これらの脂質二重層コーティングされた多孔性シリカナノ粒子(シリカソームとしても公知)は、リポソームよりも著しく漏出性が低い薬物担体を提供する(Meng et al. (2013) ACS Nano, 7(2): 994 - 1005; Meng et al. (2011) ACS Nano, 5(5): 4131 - 4144; Meng et al. (2013) ACS Nano, 7(11): 10048 - 10065; Meng et al. (2015) ACS Nano, 9(4): 3540 - 3557)。薬物パッケージングのために使用することができる広い内部表面積、調節可能な空孔サイズ、担体安定性、及び制御薬物放出能によって、MSNは、がん治療のために多用途の多機能ナノ担体プラットフォームを構成することが実証されている(Meng et al. (2013) ACS Nano, 7(2): 994 - 1005; Meng et al. (2011) ACS Nano, 5(5): 4131 - 4144; Meng et al. (2013) ACS Nano, 7(11): 10048 - 10065; Meng et al. (2015) ACS Nano, 9(4): 3540 - 3557; Meng et al. (2010) J. Am. Chem. Soc. 132(36): 12690 - 12697; Li et al. (2012) Chem. Soc. Rev. 41(7): 2590 - 2605; Tang et al. (2012) Adv. Mat. 24(12): 1504 - 1534; Tarn et al. (2013) Acc. Chem. Res. 46(3): 792 - 801)。しかしながら、脂質 - 二重層コーティングされたシリカ粒子に効果的に負荷する方法は限られており、典型的には、約10重量%から40重量%までの範囲の負荷が得られる。

【0222】

様々な実施形態で、脂質 - 二重層コーティングされたナノ粒子薬物担体の著しく高い負荷を達成する新たな負荷方法を本明細書において提供する。一般に、新たな負荷方法は、カーゴ(例えば、目的の1つまたは複数の薬物)を、脂質二重層の内側にあるナノ粒子の空孔内に保持するカーゴ捕捉試薬を利用する。より具体的には、特定の実施形態では、この

10

20

30

40

50

方法は、

目的のカーゴ（例えば、薬物）を収容することができる多数の空孔を含む多孔性シリカ体を含むナノ担体を得ること；

捕捉剤（カーゴ捕捉剤）を多数の空孔内に配置すること（この際、捕捉剤は、カーゴを空孔内に捕捉するその能力で選択される）；

ナノ担体の表面空孔を脂質二重層でコーティングすること；及び

脂質二重層によって、カーゴをコーティングされた空孔に導入すること（この際、カーゴは、捕捉剤と反応し、空孔内に保持される）

を含み得る。

#### 【0223】

特定の実施形態では、捕捉剤は、プロトン化剤を含み、方法は、脂質二重層を通過して二重層コーティングされた多孔性ナノ粒子に至り得る1つまたは複数の薬物を得ることを含む。多孔性ナノ粒子中のプロトン化剤は、薬物を、脂質二重層を越えて逆拡散することができない親水性誘導体に変換する。

#### 【0224】

実施例1に示す例示的な、ただし非限定的な実施形態では、MSN P核をゾル-ゲル化学によって合成し、プロトン化剤、TEA g S O Sを含有する溶液に浸漬した。これらの粒子を、二重層安定性に最適な組成の脂質バイオフィルムの存在下で音波処理手順を使用して、LBでコーティングした。これに、TEA g S O Sによって与えられるプロトン勾配によって、遠隔イリノテカン負荷を続けた。イリノテカンは、LBを越えて、MSN P内部パッケージング空間に拡散し得る弱塩基性の両親媒性分子であり、その空間で、先に捕捉されたトリエチルアンモニウムスクロースオクタスルファート（TEA g S O S）によるプロトン放出が、薬物を、LBを越えて逆拡散することができない親水性誘導体に変換する。この方法を使用すると、高い負荷容量（例えば、40重量%超、または45重量%超、または50重量%超、または60重量%超、または70重量%超、%、または80重量%超など）が達成される。

#### 【0225】

本明細書に記載の方法を使用して生成した脂質二重層ナノ粒子薬物担体（LB-MSN Pまたは「シリカソーム」）は、多数の利点をもたらす。LB-MSN Pを合成するための既存のバイオフィルムコーティング法をTEA g S O Sなどのプロトン化剤と組み合わせると、リポソームを上回る多数の利点を示す微粒子担体において、イリノテカンなどの薬物の能動的及び高用量の負荷が得られる。そのような利点には、これらだけに限定されないが、合成の容易さ、薬物負荷の及び放出プロファイルの改善、安定性の改善及び生体内分布の改善が含まれる。特定の実施形態、例示的な、ただし非限定的な実施形態では、この遠隔負荷方法は、MSN P内でLBの後ろでの受動的薬物封入と比較して、イリノテカンの負荷容量の4倍以上の増加をもたらす。本明細書に記載の方法を使用すると、非封入イリノテカンは、LBを介して拡散することによって、MSN P空孔に入り込み、その後、プロトン化が、イリノテカンに親水性にして脱出することができなくする。

#### 【0226】

さらに、ナノ担体の負荷容量の増加は、がん部位への薬物送達の増加をもたらし、より少ない遊離薬物が、イリノテカンが毒性を引き起こす骨髄及び胃腸管（GIT）などの部位で利用可能となる。一例では、LB-MSN Pは、MM-398の社内リポソーム同等物（負荷容量42.5重量%）に対して、負荷容量の改善（イリノテカン負荷83.5重量%）を示す。負荷時間、捕捉剤濃度、及び負荷のために提供されるイリノテカンの量の最適化の後に、LB-MSN P製剤の実施形態は、リポソーム製剤と比較して、酸性pH（4.5）で、3～5倍高い放出容量を実証している。用量調節によって、同じ有効性を得るためにより少ない薬物用量の投与が可能になり、全身薬物毒性のさらなる低下につながる。一例では、最大耐量（MTD）の計算において、LB-MSN Pの実施形態は、遊離薬物と比較して、耐量の5倍の改善を示した。MTDの増加は、リポソーム製剤と同様であった。骨髄組織診の分析は、イリノテカン毒性がLB-MSN Pによって大きく減少し

10

20

30

40

50



たことを示した。

【0227】

加えて、本明細書に記載の合成／負荷方法は、Zhang et al. (2104) Biomaterials, 35(11):3560-3665)によって使用される従来のリポソームまたはポリマー-脂質技術の作成よりも容易に行うことができる。これは、非封入薬物の量を減らすことによる費用削減を含めて、GMP製造へとスケールアップするために有利である。

【0228】

方法及びそれによって生成されるナノ粒子薬物担体（シリカソーム）をここではイリノテカンに関して記載したが、以下に説明するとおり、方法は、いくつかの他のカーゴ（例えば、1つまたは複数の薬物を含むカーゴ）に適用することができることは理解されるであろう。さらに、本明細書において提供する教示を考慮すると、（標的への）薬物送達の改善、及び／または毒性の低下、及び／または生体内分布の改善、及び／または放出プロファイルの改善が、多数の他の薬物で、本明細書に記載の方法及び組成物を使用して達成されるであろうと考えられる。

【0229】

したがって、特定の実施形態では、カーゴ捕捉剤の援助によって、カーゴの安定していて、かつ保護されている負荷を高い負荷レベルで可能にするLB-MSNベースのナノ担体送達系を記載する。一部の実施形態では、カーゴは薬物であり得る。有効性の増強、高い薬物負荷容量及び全身毒性の低下によって、改良されたLB-MSN封入及び捕捉による薬物送達は、薬物封入、例えば、化学療法薬のより頻繁な使用を可能にする。ナノ担体設計の観点から、このシステムの様々な実施形態、例えば、LB-MSN内のポリ陰イオン性カーゴ捕捉剤を、いくつかの異なる種類のがん及び他の疾患プロセスを処置するための広範な追加の弱塩基性分子及び薬物を送達するための有効な設計原理として使用する。

【0230】

一例では、有効性の増強、高い薬物負荷容量及びイリノテカンの全身毒性の低下によって、イリノテカンに関して、改良されたLB-MSN封入及び捕捉手順による送達は、ヒトPDAC患者におけるイリノテカン及びFOLFIRINOXのより頻繁な使用を可能にする。これはまた、生存の増加を見込んで、より多くのPDAC患者をゲムシタピンよりも効力のある治療レジメンで処置することを可能にする。最後に、PDAC処置のために、IV注射用の効率的で生体適合性、かつ翻訳的に競合する(translationally competitive)イリノテカン製剤(MM398リポソームに対して)を提供する。特に、本明細書に記載の方法及び得られるナノ粒子薬物担体を考慮すると、イリノテカン及びFOLFIRINOX治療は、これらだけに限定されないが、結腸、直腸、肺、及び卵巣癌を含む他のがんを処置するためにも利用可能であり得る。

【0231】

本明細書において開示するシリカソーム送達系は、多機能プラットフォームである。メソ多孔性シリカ薬物担体は、広範なカーゴをがん細胞に、さらには動物における様々なヒトがんモデルに送達することができることが実証されている。これらには、マウスにおける異種移植片及び同所PDAC腫瘍へのゲムシタピン及びパクリタキシル(paclitaxel)同時送達が含まれる。さらに、MSNは、生分解性され、広範な動物検査において安全であることが実証されている(Meng et al. (2013) ACS Nano, 7(2):994-1005; Meng et al. (2011) ACS Nano, 5(5):4131-4144; Meng et al. (2013) ACS Nano, 7(11):10048-10065; Meng et al. (2015) ACS Nano, 9(4):3540-3557; Tang et al. (2012) Adv. Mat. 24(12):1504-1534; Tarn et al. (2013) Acc. Chem. Res. 46(3):792-801; Zhang et al. (2012) J. Am. Chem. Soc. 134(38):15790-15804; Lu et

10

20

30

40

50

a l . ( 2 0 1 0 ) S m a l l , 6 ( 1 6 ) : 1 7 9 4 - 1 8 0 5 ) 。

【 0 2 3 2 】

本明細書に記載の改善された負荷、得られた薬物動態プロファイルなどを考慮すると、本明細書に記載の負荷方法、脂質二重層組成物及び得られたナノ粒子薬物担体の安定性は、以前のナノ粒子薬物担体を上回る著しい改善及び利点をもたらすと考えられる。

【 0 2 3 3 】

脂質 - 二重層コーティングされた多孔性ナノ粒子の負荷方法。

様々な実施形態で、脂質二重層コーティングされた多孔性ナノ粒子（例えば、メソ多孔性シリカ粒子）を負荷する改善方法を、そのような方法によって作成された薬物送達ナノ粒子と共に提供する。特定の実施形態では、本明細書に記載の方法は、例えば、40重量%、または45重量%超、または50重量%超、または60重量%超、または70重量%超、%、または80重量%超など）の非常に高レベルの薬物負荷を達成する。

【 0 2 3 4 】

上述のとおり、特定の実施形態では、方法は：

目的のカーゴ（例えば、薬物））を収容することができる多数の空孔を含む多孔性シリカ体を含むナノ担体を得ること；

捕捉剤（カーゴ捕捉剤）を多数の空孔内に配置すること（この際、捕捉剤は、カーゴを空孔内に捕捉するその能力で選択される）；

ナノ担体の表面空孔を脂質二重層でコーティングすること；

カーゴを、脂質二重層によってコーティングされた空孔に導入すること（この際、カーゴは捕捉剤と反応し、空孔内に保持される）を含み得る。

【 0 2 3 5 】

以前にMSNPプラットフォームで使用されたことはなかったが、ポリ陰イオン性化合物、TEAGSOSは、MM-398において、イリノテカンを捕捉するために使用された（Drummond et al . ( 2 0 0 6 ) C a n c e r R e s . , 6 6 ( 6 ) : 3 2 7 1 - 3 2 7 7 ）。しかしながら、本明細書に記載の研究以前には、TEAGSOSを、他の負荷または浸漬方法よりも著しく高いレベルで多孔性ナノ粒子の遠隔負荷を効果的に行うために使用することができるかどうかは知られていなかった。

【 0 2 3 6 】

実施例に記載するとおり、TEAGSOSは、加水分解すると8個のH<sup>+</sup>イオン及び八価SOS<sup>8-</sup>を放出するプロトン生成剤である（図1A、パネルA2）。イオン交換クロマトグラフィーを使用して、TEAGSOSを生成し、これを、下記の方法セクションにおいて記載するとおり、MSNPに浸漬させた（同図）。浸漬した粒子を、3:2:0.15のモル比のDSPC/コレステロール/DSP-PEG2000からなる脂質バイオフィルムでコーティングされた丸底フラスコに導入した。懸濁液の音波処理によって、捕捉剤を含有するLBコーティングされた粒子が得られた（図1A、パネルA1）。これらの粒子をただちに、イリノテカン溶液中でインキュベートして、薬物が、SOS<sup>8-</sup>と会合してゲル様沈澱物として、空孔内に移入、プロトン化、及び捕捉されることを可能にした（図1A、パネルA1及びA2、図1B）。これは、本発明者らが、80重量%以上のイリノテカン負荷容量を達成することを可能にし（図1B）、これは、以前に実証されたとおり（Meng et al . ( 2 0 1 5 ) A C S N a n o , 9 ( 4 ) : 3 5 4 0 - 3 5 5 7 ）、850m<sup>2</sup>/gの総表面積及び約0.7cm<sup>3</sup>/gの空孔体積では、多孔性担体の理論最大負荷容量（約100重量%）に近い。

【 0 2 3 7 】

方法を、薬物イリノテカン及び捕捉剤としてのTEAGSOSの使用に関して示しているが、原理の証明を実証しているので、同じ方法を、多数の他の薬物（特に、弱塩基性薬物）をシリカソームに導入するために使用することができ、多数の他の捕捉剤を同様に、例えば、本明細書に記載のとおり利用することができることは認められるであろう。

【 0 2 3 8 】

薬物負荷容量は、治療有効性及び薬物毒性の限界にも決定的な重要な製造問題であるので

10

20

30

40

50

、MSNPによる薬物封入の有効性を最適化するために、かなりの研究が当てられ、負荷容量の増加及び相乗的な薬物の組合せを同時送達する可能性をもたらしている。従来の浸漬方法によって、イリノテカンなどの薬物をMSNPに導入することが可能であるが、この負荷方法は、比較的効率であり、約10重量%の負荷レベルを達成することが判明しており（例えば、He et al. (2010) *Biomaterials*, 31(12): 3335 - 3346を参照されたい）、薬物を空孔中に保持することは困難である（例えば、Meng et al. (2010) *J. Am. Chem. Soc.* 132(36): 12690 - 12697を参照されたい）。物理的吸着、静電付着、超分子アセンブリまたは捕捉方法の使用（例えば、ストッパー、ナノバルブまたは遮断実体）に依存した従来の薬物負荷アプローチとは異なり、多孔性ナノ粒子上に配置された無傷の脂質二重層コーティングの使用は、薬物捕捉のための急速かつ瞬間的な空孔密閉を提供する。これは、合成を簡略化し、安定した高い薬物負荷容量を提供する。本明細書に記載の方法は、多孔性粒子にカーゴを高レベルで負荷するために有効であり、脂質二重層でのこの急速かつ瞬間的な空孔密閉と適合する。

#### 【0239】

バイオフィルム技術は、担持LBによってゲムシタピン（GEM）（例えば、水溶性ヌクレオシド）を急速に封入するために使用することができるLBコーティングされたMSNPプラットフォームのために開発されている（Meng et al. (2015) *ACS Nano*, 9(4): 3540 - 3557）。これは、LB-MSNPが40重量%までのGEMの負荷容量を達成することを可能にするだけでなく、脂質二重層（LB）に組み込むことができる疎水性パクリタキセル（PTX）の同時送達も可能にした（Meng et al. (2015) *ACS Nano*, 9(4): 3540 - 3557）。これは、マウスにおける同所ヒトPDACモデルでのPDAC処置のための相乗的及びレシオメトリック設計された担体を提供している（同書）。

#### 【0240】

この担持LBコーティング方法はまた、MSNP表面へのリポソーム付着、破断、追加のリポソーム組成物の追加によって二次的に密閉される不完全な被覆によるMSNP表面の部分的被覆を含むいくつかのステップを伴う、MSNPのための比較可能なリポソームコーティング技術よりもはるかに優れていることが実証されている（Liu et al. (2009) *J. Am. Chem. Soc.* 131: 7567 - 7569）。

#### 【0241】

しかしながら、脂質二重層（LB）の存在は、以前の薬物送達ナノ粒子に改善をもたらしたが、本明細書に記載の遠隔負荷方法の利用前には、二重層はなお、さらに高い薬物負荷レベルの達成に対する障害をもたらした。

#### 【0242】

上述のとおり、様々な実施形態で、LB-MSNPプラットフォームによる薬物負荷は、第1ステップとして、プロトン化剤を封入するためにLBを使用すること、続く、薬物の弱塩基性（ $pK_a = 8.1$ ）に依存しているイリノテカン負荷によって、さらに改善されている。本明細書の例において示すとおり、MSNP担体と、トリエチルアンモニウムスクロースオクタスルファート（TEA8OS）の封入の後に、非担持LBがイリノテカン負荷のために使用されたりポソーム同等物（Drummond et al. (2006) *Cancer Res.*, 66(6): 3271 - 3277; Von Hoff et al. (2013) *Br. J. Cancer*, 109(4): 920 - 925）との比較を行った。MSNP担体は、確固たる同所PDACモデルにおいて、リポソーム製剤よりも高いイリノテカンの負荷容量及び腫瘍死滅を達成しただけではなく、リポソームと比較して、担体安定性の上昇及び漏出の減少によって、薬物毒性も防いだ。したがって、LB-MSNPプラットフォームは、PDAC（または他のがん）処置のための第一選択イリノテカン担体に望ましい特性を示す。

#### 【0243】

最近、ポリマー-脂質担持コーティング方法が、Zhang et al.によって、Ba

10

20

30

40

50

lb / c ノードマウスにおいて薬剤耐性乳癌腫瘍を処置するための MSNP のイリノテカン薬物負荷のために記載された (Zhang et al. (2014) Biomaterials, 35 (11) : 3650 - 3665)。しかしながら、この参照文献に記載の方法は、本明細書に記載の方法及び組成物と比較すると、異なり、同じ薬物負荷容量を達成することはない。第一に、Zhang et al. は、古典的な LB または捕捉剤を使用しておらず、本明細書で提供する担体 (約 83.5 w / w %) の 1 / 5 の負荷容量 (約 15 w / w %) しか有さない担体が生じる。

#### 【0244】

第二の大きな相違は、薬物負荷手順にある。著者らは、「CPT - 11 @ MSN」を遠心分離し、PBS (pH 7.4) 中で洗浄し、次いで、真空下で室温で乾燥させる、と述べている。対照的に、本明細書に記載の方法は、保護されていない MSNP を乾燥させることを必要としない。全身薬物送達に重要な要件である水性媒体への再懸濁で、分散液を得ることが困難であるので、MSNP の乾燥には、問題があり得る。加えて、本方法は、薬物損失を最小化し、かつ高い負荷容量 (例えば、約 83.5 % (w / w)) を促進する空孔密閉の前に、薬物 (例えば、イリノテカン) 負荷された MSNP の洗浄を必要としない。

#### 【0245】

第三の大きな相違は、LB 製剤の組成である。1 つまたは複数の実施形態では、市販の脂質及びコレステロール (例えば、DSPC / コレステロール / DSPE - PEG) の混合物を使用するが、Zhang et al. は、社内合成した pH 不安定な Pluronic P123 グラフト化 DOPE を使用する。Pluronic の使用は明らかに、薬物流出の防止剤として作用するその能力に基づくが (例えば、Batrakova et al. (2004) Pharm. Res. 21 (12) : 2226 - 2233 を参照されたい)、薬剤耐性乳癌を処置するためには問題である。コーティングされた二重層中にコレステロールが存在しないことで、プラットフォームの流動性及び安定性が低下する。対照的に、シリカソーム中のコレステロールの存在は、本明細書において開示する LB - MSNP の優れた安定性に寄与する (実施例を参照されたい)。さらに、提供する担体へのイリノテカン封入は、pH 7.4 を有する生物学的緩衝液中で、37 °C で、24 時間にわたって < 5 % の漏出を示す。これは、Zhang et al. (2014) Biomaterials, 35 : 3650 - 3665) によって記載された早期漏出 (pH 7.4 及び 37 °C で、24 時間にわたって約 16 % の漏出) よりも 2.5 倍低い。

#### 【0246】

Zhang et al. によって記載された薬物送達プラットフォームとの別の相違は、本発明の様々な実施形態が、バイオフィルム再水和及び空孔密閉、続く、遠心分離精製またはサイズ排除クロマトグラフィーのために、プローブ音波処理 (probe sonication) を使用することである。他方で、Zhang et al. は、リボソームに関して、膜押出法を利用する。CTAC も、MSNP 合成のためのテンプレート剤 (templating agent) として使用されるが、Zhang et al. は CTAB を利用する。最後に、本発明は、PDAC 及び他のがんのための治療の開発に取り組んでおり、主に、薬物耐性を克服するように設計されているのではないが、乳癌研究で使用するために Zhang et al. によって記載された薬物送達粒子は、そのように設計されている。すべて考慮すると、特定の理論には結び付けられないが、本明細書に記載の脂質二重層コーティングされたナノ粒子薬物担体 (例えば、イリノテカン - 送達 LB - MSNP) は、薬物負荷容量、コロイド安定性、生成の容易さ、ならびに血液及び体液中での安定な薬物保持に基づき、Zhang et al. の担体よりも優れた独特の設計を提供すると考えられる。

#### 【0247】

ナノ粒子。

様々な実施形態で、本明細書に記載のナノ粒子薬物担体は、脂質二重層でコーティングされた多孔性シリカナノ粒子 (例えば、表面を有し、分子をその中に収容するために適した多数の空孔を画定するシリカ体) を含む。例えば、特定の実施形態では、シリカナノ粒子

10

20

30

40

50

は、メソ多孔性シリカナノ粒子であってよい。ナノ粒子がシリカナノ粒子と称されるという事実は、シリカ以外の材料もシリカナノ粒子内に組み込まれることを妨げるものではない。一部の実施形態では、シリカナノ粒子は、表面に通じていて空孔へのアクセスをもたらす多数の空孔開口部を有する、実質的に球形であってよい。しかしながら、様々な実施形態では、シリカナノ粒子は、実質的に球形の形状以外の形状を有してもよい。したがって、例えば、特定の実施形態では、シリカナノ粒子は、実質的に卵形、ロッド形、実質的に正多角形、不正多角形であってよい。

【0248】

一般に、シリカナノ粒子は、空孔開口部間の外面、さらには、空孔内の側壁を画定するシリカ体を含む。空孔は、シリカ体を通して別の空孔開口部に延びていてもよいし、または空孔は、部分的にのみシリカ体を通じて延びていて、シリカ体によって画定される底表面を有してもよい。

10

【0249】

一部の実施形態では、シリカ体は、メソ多孔性である。他の実施形態では、シリカ体は、ミクロ多孔性である。本明細書で使用される場合、「メソ多孔性」は、約2 nmから約50 nmの間の直径を有する空孔を有することを意味し、「ミクロ多孔性」は、約2 nm未満の直径を有する空孔を有することを意味する。一般に、空孔は、任意のサイズであってよいが、典型的な実施形態では、1つまたは複数の治療用化合物をその中に含むために十分に大きい。このような実施形態では、空孔は、小分子、例えば、抗がん化合物などの治療用化合物が空孔の内表面に付着または結合し、治療目的で使用された場合には、シリカ体から放出されることを可能にする。一部の実施形態では、空孔は、実質的に円柱形である。

20

【0250】

特定の実施形態では、ナノ粒子は、直径約1 nmから約10 nmの間、または約2 nmから約8 nmの間の空孔直径を有する空孔を含む。特定の実施形態では、ナノ粒子は、約1 nmから約6 nmの間、または約2 nmから約5 nmの間の空孔直径を有する空孔を含む。他の実施形態は、2.5 nm未満の空孔直径を有する粒子を含む。他の実施形態では、空孔直径は、1.5から2.5 nmの間である。例えば、シリカナノ粒子の調製中に異なる界面活性剤または膨潤剤を使用することによって、他の空孔サイズを有するシリカナノ粒子を調製してもよい。

30

【0251】

様々な実施形態では、ナノ粒子は、約1000 nmの大きな（例えば、平均または中央直径（または他の特性寸法）の粒子を含んでよい。しかしながら、様々な実施形態では、一般に、300 nm超の粒子は、生細胞または血管開窓に進入する際にあまり有効ではないことがあるので、ナノ粒子は典型的には、500 nm未満または約300 nm未満である。特定の実施形態では、ナノ粒子は、サイズにおいて、約40 nm、または約50 nm、または約60 nmから、約100 nm、または約90 nm、または約80 nm、または約70 nmまでの範囲である。特定の実施形態では、ナノ粒子は、サイズにおいて、約60 nm～約70 nmの範囲である。一部の実施形態は、約50 nmから約1000 nmの間の平均最大寸法を有するナノ粒子を含む。他の実施形態は、約50 nmから約500 nmの間の平均最大寸法を有するナノ粒子を含む。他の実施形態は、約50 nmから約200 nmの間の平均最大寸法を有するナノ粒子を含む。一部の実施形態では、平均最大寸法は、約20 nm超、約30 nm超、40 nm超、または約50 nm超である。他の実施形態は、約500 nm未満、約300 nm未満、約200 nm未満、約100 nm未満または約75 nm未満の平均最大寸法を有するナノ粒子を含む。本明細書で使用される場合、ナノ粒子のサイズは、透過型電子顕微鏡法（TEM）または同様の可視化技術によって測定されるような、一次粒子の平均または中央サイズに関する。

40

【0252】

例示的なメソ多孔性シリカナノ粒子には、これらだけに限定されないが、MCM-41、MCM-48、及びSBA-15が含まれる（例えば、Katiyar et al. (2

50

006) J. Chromatog. 1122 (1-2): 13-20 を参照されたい)。

【0253】

多孔性シリカナノ粒子を作成する方法は、当業者に周知である。特定の実施形態では、メソ多孔性シリカナノ粒子を、オルトケイ酸テトラエチル (TEOS) をロッド状ミセルから作成されたテンプレートと反応させることによって合成する。結果は、規則的配置の空孔が多くあるナノサイズの球体またはロッドの集まりである。次いで、テンプレートを、適正な pH に調節された溶媒で洗浄することによって除去することができる (例えば、Trewyn et al. (2007) Chem. Eng. J. 137 (1): 23-29 を参照されたい。特定の実施形態では、メソ多孔性粒子は簡単なゾル-ゲル法を使用して合成することもできる (例えば、Nandiyanto, et al. (2009) Microporous and Mesoporous Mat. 120 (3): 447-453 などを参照されたい)。特定の実施形態では、オルトケイ酸テトラエチルを、追加のポリマーモノマー (テンプレートとして) と共に使用することができる。特定の実施形態では、3-メルカプトプロピル) トリメトキシシラン (MPTMS) を TEOS の代わりに使用する。

10

【0254】

特定の実施形態では、メソ多孔性シリカナノ粒子は、Meng et al. (2015) ACS Nano, 9 (4): 3540-3557 に記載のゾル/ゲル手順の改良によって合成された核である。MSNP 約 500 mg のバッチを合成するためには、CTAC 50 mL を H<sub>2</sub>O 150 mL と、フラスコ (例えば、500 mL 円錐フラスコ) 内で混合し、続いて、攪拌する (例えば、350 rpm、85 °C で 15 分間にわたって)。これに続いて、10% トリエタノールアミン 8 mL を 30 分間にわたって同じ温度で添加する。次いで、シリカ前駆体、TEOS 7.5 mL を、ぜん動ポンプを使用して 1 mL / 分の速度で滴下添加する。溶液を 350 rpm で 85 °C で 20 分間にわたって攪拌すると、約 65 nm の一次サイズを有する粒子の形成につながる。界面活性剤を、粒子をメタノール/HCl (500:19 v/v) の混合物で室温で 24 時間にわたって洗浄することによって除去することができる。粒子を、10000 rpm で 60 分間にわたって遠心分離し、メタノール中で 3 回洗浄することができる。

20

【0255】

本明細書に記載の負荷方法は、多孔性シリカナノ粒子 (例えば、メソ多孔性シリカ) の負荷に関して実証されているが、同様の負荷方法を他の多孔性ナノ粒子で使用するすることができることは認められるであろう。薬物送達ナノ粒子で使用する事ができる多数の他のメソ多孔性物質が、当業者に知られている。例えば、特定の実施形態では、メソ多孔性炭素ナノ粒子を利用することができるであろう。メソ多孔性炭素ナノ粒子は、当業者に周知である (例えば、Huang et al. (2016) Carbon, 101: 135-142; Zhu et al. (2014) Asian J. Pharm. Sci., 9 (2): 82-91; などを参照されたい)。

30

【0256】

同様に、特定の実施形態では、メソ多孔性ポリマー粒子を利用することができる。蒸発誘導自己集合戦略による、トリブロックコポリマーと可溶性低分子量フェノール樹脂前駆体 (レゾール) との有機-有機集合体からの高度規則メソ多孔性ポリマー及び炭素フレームワークの合成が、Meng et al. (2006) Chem. Mat. 6 (18): 4447-4464 及びそこに引用されている参考文献によって報告されている。

40

【0257】

本明細書に記載のナノ粒子は、実例であり、非限定的である。本明細書において提供する教示を使用して、多数の他の脂質二重層薬物送達ナノ粒子を、当業者は利用することができるであろう。

【0258】

脂質二重層。

本明細書に記載の薬物担体ナノ粒子は、脂質二重層でコーティングされた多孔性ナノ粒子

50

(例えば、メソ多孔性シリカナノ粒子(MSNP))を含む。特定の実施形態では、急速かつ均一な粒子コーティングを得るために、コロイド及び循環安定性を得るために、及び望ましいカーゴ放出プロファイルも許容しながら有効なカーゴ保持を得るために、二重層組成物を最適化する。

#### 【0259】

特定の実施形態では、脂質二重層は、リン脂質、コレステロール、及び特定の実施形態では、ペグ化脂質(例えば、DSPE-PEG2000)、または標的化部分または他の部分とのコンジュゲーションを促進するための機能化(functionalized)ペグ化脂質(例えば、DSPE-PEG2000-マレイミド)の組合せを含む。

#### 【0260】

表面LBコーティングを付着させるために、コーティングされる脂質フィルム手順が開発され、その際、薬物-またはTEOS浸漬されたMSNP懸濁液を、例えば、丸底フラスコ上にコーティングされた広い脂質フィルム表面に添加する。種々の脂質二重層組成物を使用して、一連の実験を行って、急速かつ均一な粒子ラッピング、コーティング及び有効なカーゴ保持ならびに/または音波処理での放出をもたらす組成及び最適な脂質/粒子比を見い出すことができる。この脂質組成及びラッピングは、低エネルギーボルトテックス条件下での粒子表面へのリボソーム融合によっては、達成することができないと考えられる。

#### 【0261】

実施例1に記載のとおり、特定の実施形態では、MSNP 500 mgをTEAGSOS 20 mL (80 mM溶液)に浸漬し、これを、丸底フラスコの底にコーティングされたDSPC/Chol/DSPE-PEG2000の混合物(モル比3:2:0.15) 550 mgからなる脂質バイオフィルムの上に添加する(実施例1、及びLiu et al. (2016) ACS Nano. 10(2): 2702-2715を参照されたい)。比を表すためにmol%を使用するならば、「3:2:0.15」の比は、「58.3 mol%:38.8 mol%:3.9 mol%」に等しい。これは、約1.1:1の脂質:粒子比をもたらす。LBでの粒子ラッピング及びコーティングを達成するための音波処理の後に、遊離TEAGSOSを、Sephacrose CL-4Bカラムでのサイズ排除クロマトグラフィーによって除去する。TEAGSOS負荷されたシリカソームを、薬物負荷のために、イリノテカン溶液10 mg/mL中で、65 °Cの水浴内でインキュベートする。30分後に、氷水浴内でクエンチすることによって、負荷を停止し、続いて、薬物負荷されたシリカソームを遠心分離によって3回洗浄し、PBS中に再懸濁した。

#### 【0262】

上記及び実施例1に記載の脂質二重層配合は、実例であり、非限定的である。シリカソームに負荷される薬物(複数可)及び所望の放出プロファイルに応じて、様々な実施形態では、種々の脂質二重層配合を使用することができ、最適な配合を決定することができる。

#### 【0263】

したがって、特定の実施形態では、脂質二重層は、1) C14~C20炭素鎖を有する1つまたは複数の飽和脂肪酸、例えば、ジミリスチルホスファチジルコリン(DMPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)、及びジアクチル(diacyl)ホスファチジルコリン(DAPC);ならびに/または2) C14~C20炭素鎖を有する1つまたは複数の不飽和脂肪酸、例えば、1,2-ジミリストレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1,2-ジパルミトレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DOPC)、1,2-ジエイコセノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン;ならびに/または3) C12~C20炭素鎖を有する脂肪酸の混合物を含む天然脂質、例えば、卵PC、及び大豆PC、スフィンゴミエリンなどを含んでよい。これらの脂質は、実例であるが、非限定的であり、多数の他の脂質が公知であり、シリカソームの形成のために脂質二重層に組み込むことができる。

#### 【0264】

特定の実施形態では、シリカソームは、脂質（例えば、リン脂質）、コレステロール、及びPEG機能化脂質（例えば、mPEGリン脂質）を含有する。特定の実施形態では、mPEGリン脂質は、C14～C18リン脂質炭素鎖、及び350～5000のPEG分子量を含む（例えば、MPEG5000、MPEG3000、MPEG2000、MPEG1000、MPEG750、MPEG550、MPEG350など）を含む。特定の実施形態では、mPEGリン脂質は、DSPE-PEG5000、DSPE-PEG3000、DSPE-PEG2000、DSPE-PEG1000、DSPE-PEG750、DSPE-PEG550、またはDSPE-PEG350を含む。MPEGは、市販されている（例えば、/avantilipids.com/product-category/products/polymers-polymerizable-lipids/mpeg-phospholipids/を参照されたい）。

10

#### 【0265】

特定の実施形態では、リン脂質：CHOL：PEGの比は、およそリン脂質（50～90mol%）：CHOL（10～50mol%）：PEG（1～10mol%）である。

#### 【0266】

上記、及び実施例で提供しているこのプロトコルは例示である。特定の実施形態では、それらの特定のカーゴ（複数可）に最適化された他のシリカソームを特定するために、捕捉剤を変更することができ、脂質組成物及びモル比を変更することができ、1つまたは複数の薬物を変更することができる。

#### 【0267】

20

例えば、ゲムシタピン含有シリカソームのための有効な脂質配合物は、DPPC/コレステロール/DSPE-PEGを77.5：20：2.5のモル比で含む一方で、イリノテカン含有シリカソームのための有効な脂質配合物は、DSPC/Chol/DSPE-PEG2000（モル比3：2：0.15、これは58.3mol%：38.8mol%：3.9mol%に等しい）を含むことに注意されたい。

#### 【0268】

特定の実施形態では、これらの方法は、薬物負荷容量（薬物重量/担体の合計重量）を改善するために変動させることができる。特定の実施形態では、薬物負荷容量は、少なくとも約30%、または少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、または少なくとも80w/w%である。特定の実施形態では、薬物負荷は、40w/w%超、または45w/w%超、または50w/w%超、または60w/w%超、または70w/w%超、または80w/w%超である。

30

#### 【0269】

本明細書に記載のプロトコルは、本明細書において提供する合成の容易さ及び改善された負荷容量及び放出プロファイルの記載によって例示されるとおり、MSN表面との融合によって、リボソームコーティング方法によって作成されたナノ担体よりも優れたナノ粒子薬物担体（ナノ担体）を提供する。典型的な実施形態では、LBコーティング手順を使用して、プロトン化剤、例えば、TEAGSOSを急速に封入するが、これは後に、LBを越えて拡散して入ってくる薬物をプロトン化することによってイリノテカン負荷及び捕捉をもたらす。これは、粒子空孔への高い薬物負荷をもたらす。漏出させることなく捕捉剤（例えば、TEAGSOS）を保持するための急速かつ有効な空孔密閉は、担体の有効性及び安定性に寄与する。

40

#### 【0270】

カーゴ捕捉試薬。

カーゴ捕捉試薬は、所望のカーゴと相互作用するように選択することができる。一部の実施形態では、この相互作用は、イオンまたはプロトン化反応であってよいが、他の様式の相互作用が企図される。カーゴ捕捉剤は、1つまたは複数のイオン性部位を有してよく、すなわち、モノイオン性またはポリイオン性であってよい。イオン性部分は、陽イオン性、陰イオン性であってよく、または場合によっては、カーゴ捕捉剤は、陽イオン性及び陰イオン性部分の両方を含んでよい。イオン性部位は、対応する非荷電形態と平衡していて

50



よい；例えば、陰イオン性カルボキシラート（ $-\text{COO}^-$ ）は、その対応するカルボン酸（ $-\text{COOH}$ ）と平衡してよい；または別の実施例では、アミン（ $-\text{NH}_2$ ）は、その対応するプロトン化アンモニウム形態（ $-\text{NH}_3^+$ ）と平衡してよい。これらの平衡は、局所環境のpHによって影響される。

#### 【0271】

同様に特定の実施形態では、カーゴは、1つまたは複数のイオン性部位を含んでよい。カーゴ捕捉剤及びカーゴは、ナノ粒子（例えば、メソ多孔性シリカナノ粒子）の内側で相互作用するように選択され得る。この相互作用は、カーゴの放出が望まれるまで、カーゴをナノ粒子内に保持するために役立ち得る。一部の実施形態では、カーゴは、非イオン性形態とイオン性形態との間のpH依存的平衡で存在し得る。非イオン性形態は、脂質二重層を越えて拡散し、MSNPの空孔に進入し得る。そこで、カーゴ捕捉剤（例えば、ポリイオン性カーゴ捕捉剤）が、カーゴのイオン性形態と相互作用し、それによって、カーゴをナノ担体内に、例えば、MSNPの空孔内に保持することができる（カーゴ及びカーゴ捕捉剤のイオン性形態が反対の電荷を有することを条件とする）。相互作用は、イオン性相互作用であってよく、沈澱物の形成を含んでよい。ナノ担体内でのカーゴの捕捉は、同様の系、例えば、カーゴ捕捉剤を省いたナノ担体、または捕捉剤を含まないリポソームと比較して、高レベルのカーゴ負荷をもたらす得る。カーゴの放出は、カーゴとカーゴ捕捉剤との間の相互作用を破壊するpHの適切な変化によって、例えば、カーゴを、脂質二重層を越えて容易に拡散することができるその非イオン性状態に戻すことによって達成することができる。一実施形態では、カーゴはイリノテカンであり、カーゴ捕捉剤はTEA8SOSである。

#### 【0272】

カーゴ捕捉剤を、TEA8SOSに限定する必要はない。特定の実施形態では、カーゴ捕捉は、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ などの小分子を含む。他の捕捉剤には、これらだけに限定されないが、アンモニウム塩（例えば、硫酸アンモニウム、アンモニウムスクロースオクタスルファート、アンモニウム - シクロデキストリンスルファート、アンモニウム - シクロデキストリンスルファート、アンモニウム - シクロデキストリンスルファート、アンモニウムホスファート、アンモニウム - シクロデキストリンホスファート、アンモニウム - シクロデキストリンホスファート、アンモニウム - シクロデキストリンホスファート、クエン酸アンモニウム、酢酸アンモニウムなど）、トリメチルアンモニウム塩（例えば、トリメチルアンモニウムスルファート、トリメチルアンモニウムスクロースオクタスルファート、トリメチルアンモニウム - シクロデキストリンスルファート、トリメチルアンモニウム - シクロデキストリンスルファート、トリメチルアンモニウム - シクロデキストリンスルファート、トリメチルアンモニウムホスファート、トリメチルアンモニウム - シクロデキストリンホスファート、トリメチルアンモニウム - シクロデキストリンホスファート、トリメチルアンモニウムシトラート、トリメチルアンモニウムアセタートなど）、トリエチルアンモニウム塩（例えば、トリエチルアンモニウムスルファート、トリエチルアンモニウムスクロースオクタスルファート、トリエチルアンモニウム - シクロデキストリンスルファート、トリエチルアンモニウム - シクロデキストリンスルファート、トリエチルアンモニウムホスファート、トリエチルアンモニウム - シクロデキストリンホスファート、トリエチルアンモニウム - シクロデキストリンホスファート、トリエチルアンモニウムシトラート、トリエチルアンモニウムアセタートなど）が含まれる。

#### 【0273】

TEA8SOSに加えて、膜貫通pH勾配を、酸性緩衝剤（例えば、クエン酸塩）（Chou et al. (2003) J. Biosci. Bioengineer., 95(4): 405 - 408; Nichols et al. (1976) Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 455 (

10

20

30

40

50

1) : 269 - 271)、プロトン生成解離塩(例えば $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )(Hara et al. (1993) *Biochimica et Biophysica Acta* (BBA) - Biomembranes, 1151(2) : 201 - 215; Maurer - Spurej et al. (1999) *Biochimica et Biophysica Acta* (BBA) - Biomembranes, 1416(1) : 1 - 10; Fritze et al. (2006) *Biochimica et Biophysica Acta* (BBA) - Biomembranes, 1758(10) : 1633 - 1640)、または金属塩からのイオノフォア媒介イオン勾配(例えば、A23187及び $\text{MnSO}_4$ )(Messerer et al. (2004) *Clinical Cancer Res.* 10(19) : 6638 - 6649; Ramsay et al. (2008) *Eur. J. Pharmaceut. Biopharmaceut.* 68(3) : 607 - 617; Fenske et al. (1998) *Biochimica et Biophysica Acta* (BBA) - Biomembranes, 1414(1) : 188 - 204)によって生成することもできることも、指摘に値する。さらに、LB - MSNPへの両親媒性弱酸負荷を改善するために酢酸カルシウム勾配を使用するなど、薬物負荷のために逆pH勾配を生成することが可能であり、これは、リボソームで利用されている戦略である(Avnir et al. (2008) *Arthritis & Rheumatism*, 58(1) : 119 - 129)。

10

#### 【0274】

カーゴ/薬物。

20

1つまたは複数の実施形態では、カーゴは、プロトン化され得る少なくとも1個の第一級アミン基、または少なくとも1個の第二級アミン基、または少なくとも1個の第三級アミン基、または少なくとも1個の第四級アミン基、またはその任意の組合せを含む有機化合物を含む。本発明者らはまた、プロトン勾配によってLB - MSNPに負荷することができる弱塩基性薬物の包括的なリストを特定している。これらのカーゴ分子の一般的な特徴には、次の化学的特性が含まれる：

(i) 第一級、第二級、第三級または第四級アミン(複数可)を含む有機分子化合物；

(ii) プロトン化及びLBの後ろでの捕捉を可能にする $\text{pK}_a < 11$ (Zucker et al. (2009) *J. Control. Release*, 139(1) : 73 - 80; Cern et al. (2012) *J. Control. Release*, 160(2) : 147 - 157; Xu et al. (2014) *Pharmaceut. Res.* 31(10) : 2583 - 2592)；

30

(iii) LBを越えての拡散を可能にする5 ~ 25 mg / mLの水溶性指数及び両親媒性；

(iv) - 3.0 ~ 3.0のオクタノール/水分配係数またはlog P値(Zucker et al. (2009) *J. Control. Release*, 139(1) : 73 - 80; Cern et al. (2012) *J. Control. Release*, 160(2) : 147 - 157)；

(v) MSNP空孔への進入を可能にするMSNP空孔サイズ(2 ~ 8 nm)よりも小さい幾何学的寸法を有する適切な分子量(Li et al. (2012) *Chem. Soc. Rev.* 41(7) : 2590 - 2605; Tang et al. (2012) *Adv. Mat.* 24(12) : 1504 - 1534; Tarn et al. (2013) *Acc. Chem. Res.* 46(3) : 792 - 801)。

40

#### 【0275】

すべてを包括するものではないが、様々な実施形態では、有望な化学療法薬のリストには、イリノテカン誘導体及び代謝産物、例えば、他のアルカロイドと共にSN38(例えば、トポテカン、10 - ヒドロキシカンプトテシン、ペロテカン、ルビテカン、ピノレルビン、LAQ824、ピンブラスチン、ピンクリスチン、ホモハリングトニン、トラベクテジン)、アンスラサイクリン(例えば、ドキソルピシン、エピルピシン、ピラルピシン、ダウノルピシン、ルビドマイシン、バルルピシン、アムルピシン)、アルカリ性アントラ

50

センジオン（例えば、ミトキサントロン）、アルカリ性アルキル化薬（例えば、シクロフォスファミド、メクロレタミン、テモゾロミド）、プリンまたはピリミジン誘導体（例えば、5 - フルオロウラシル、5' - デオキシ - 5 - フルオロウリジン、ゲムシタピン、カベシタピン）、及びプロテインキナーゼ阻害薬（例えば、パゾパニブ、エンザスタウリン、バンデタニブエルロチニブ、ダサチニブ、ニロチニブ、スニチニブ）が含まれ得る。

【0276】

上記薬剤の1つまたは組み合わせをパッケージング及び送達する能力は、結腸、乳房、肺、肝臓、腫瘍、黒色腫などの追加のがん種の処置問題を含む、多機能LB-MSNプラットフォームの幅広い有用性を増強する。

【0277】

上のリストの薬物組合せを単一の担体に同時パッケージングすることも可能である。例えば、本発明者らのGEM/PTX同時送達プラットフォームで本発明者らが達成した成功に基づき（例えば、Meng et al. (2015) ACS Nano, 9(4): 3540 - 3557を参照されたい）、本明細書に記載のシリカソームを使用して、相乗的及びレシオメトリック送達のために、FOLFIRINOXレジメンの薬物の組合せ（例えば、オキサリプラチンとイリノテカン）を検討することが可能である。さらに、本発明者らのLB-MSNによる薬物負荷は、感染症用途のための抗生物質、例えば、シプロフロキサシン、レボフロキサシンまたはHIV抗レトロウイルス薬（例えば、テノホビルジソプロキシルフマル酸塩）の封入などの非がん用途のために使用することができる。

【0278】

上述の制がん薬に加えて、薬物分子が上記のとおり塩基性である限り、捕捉試薬によって促進されるLB-MSNプラットフォームは、効率的な薬物負荷及び送達に有用である。非塩基性薬物分子では、捕捉試薬は限られた援助しか提供しないであろうが、MSN空孔修復のために用意された1ステップバイオフィルム技術が、さらに広いスペクトルの薬物分子、例えば、抗がん薬、抗ウイルス薬、抗真菌薬、及び抗生物質にさらに有効である。

【0279】

例えば、MSNを密閉するためのLBバイオフィルムの使用では、特定の実施形態では、効率的な薬物封入は、これらだけに限定されないが、エベロリムス、トラベクテジン、パクリタキセル、TLK286、AV-299、DN-101、パゾパニブ、GSK690693、RTA744、ON0910.Na、AZD6244 (ARRY-142886)、AMN-107、TKI-258、GSK461364、AZD1152、エンザスタウリン、バンデタニブ、ARQ-197、MK-0457、MLN8054、PHA-739358、R-763、AT-9263、FLT-3阻害薬、VEGFR阻害薬、EGFR TK阻害薬、オーロラキナーゼ阻害薬、PIK-1モジュレーター、Bcl-2阻害薬、HDAC阻害薬、c-MET阻害薬、PARP阻害薬、Cdk阻害薬、EGFR TK阻害薬、IGFR-TK阻害薬、抗HGF抗体、PI3キナーゼ阻害薬、AKT阻害薬、JAK/STAT阻害薬、チェックポイント-1または2阻害薬、接着斑キナーゼ阻害薬、Mapキナーゼキナーゼ (mek) 阻害薬、VEGFトラップ抗体、ペメトレキセド、エルロチニブ、ダサタニブ、ニロチニブ、デカタニブ、パニツムマブ、アムルビシン、オレゴボマブ、Lep-etu、ノラトレキセド、azd2171、パタブリン、オファツムマブ、ザノリムマブ、エドテカリン、テトランドリン、ルビテカン、テスミリフェン、オブリメルセン、チシリムマブ、イピリムマブ、ゴシポール、Bio111、131-I-TM-601、ALT-110、BIO140、CC8490、シレンジタイド、ギマテカン、IL13-PE38QQR、INO1001、IPdR1 KRX-0402、ルカントン、LY317615、ノイラジアブ、ピテスパン、Rta744、Sdx102、タランパネル (talampanel)、アトラセンタン (atracentan)、Xr311、ロミデプシン、ADS-100380、スニチニブ、5 - フルオロウラシル、ボリノスタット、エトポシド、ゲムシタピン、ドキソルビシン、5' - デオキシ - 5 - フルオロウリジン、ピンクリスチン、テモゾロミド、ZK-304709、セリ

10

20

30

40

50

シクリブ (seliciclib) ; PD0325901、AZD-6244、カペシタ  
 ビン、L-グルタミン酸、N-[4-[2-(2-アミノ-4,7-ジヒドロ-4-オキ  
 ソ-1H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-5-イル)エチル]ベンゾイル]ニナトリ  
 ウム塩七水和物、カンプトテシン、PEG標識イリノテカン、タモキシフェン、クエン酸  
 トレミフェン、アナストラゾール、エキセメスタン、レトロゾール、DES(ジエチルス  
 チルベストロール)、エストラジオール、エストロゲン、結合型エストロゲン、ベバシズ  
 マブ、IMC-1C11、CHIR-258) ; 3-[5-(メチルスルホニルピペラジ  
 ンメチル)-インドリル]-キノロン、パタラニブ、AG-013736、AVE-00  
 05、[D-Ser(Bu<sup>t</sup>)6,Azgly<sup>10</sup>](pyro-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(Bu<sup>t</sup>)-Leu-Arg-Pro-Azgly  
 -NH<sub>2</sub>アセタートの酢酸塩[C<sub>59</sub>H<sub>84</sub>N<sub>18</sub>O<sub>14</sub>-(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>)<sub>x</sub>、式中、  
 x=1~2.4]、酢酸ゴセレリン、酢酸ロイプロリド、パモ酸トリプトレリン、酢酸メ  
 ドロキシプロゲステロン、カブロン酸ヒドロキシプロゲステロン、酢酸メゲストロール、  
 ラロキシフェン、ピカルタミド、フルタミド、ニルタミド、酢酸メゲストロール、CP-  
 724714 ; TAK-165、HKI-272、エルロチニブ、ラパタニブ(lapata  
 nib)、カネルチニブ(canertinib)、ABX-EGF抗体、アービタ  
 ックス、EKB-569、PKI-166、GW-572016、イオナファルニブ(I  
 onafarnib)、BMS-214662、チピファルニブ ; アミホスチン、NVP  
 -LAQ824、スベロイルアナリドヒドロキサム酸(suberoylanalide  
 hydroxamic acid)、バルプロ酸、トリコスタチンA、FK-228、S  
 U11248、ソラフェニブ、KRN951、アミノグルテチミド、アムサクリン、アナ  
 グレリド、L-アスパラギナーゼ、Bacillus Calmette-Guerin  
 (BCG)ワクチン、ブレオマイシン、ブセレリン、ブスルファン、カルボプラチン、カル  
 ムスチン、クロラムブシル、シスプラチン、クラドリピン、クロドロネート、シプロテ  
 ロン、シタラビン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ジエチルスチル  
 ベストロール、エピルピシン、フルダラビン、フルドロコルチゾン、フルオキシメステロ  
 ン、フルタミド、ゲムシタビン、グリーバック(gleevac)、ヒドロキシ尿素、イ  
 ダルビシン、イホスファミド、イマチニブ、ロイプロリド、レバミゾール、ロムスチン、  
 メクロレタミン、メルファラン、6-メルカプトプリン、メスナ、メトトレキサート、マ  
 イトマイシン、ミトタン、ミトキサントロン、ニルタミド、オクトレオチド、オキサリプ  
 ラチン、パミドロネート、ペントスタチン、プリカマイシン、ボルフィマー、プロカルバ  
 ジン、ラルチトレキセド、リツキシマブ、ストレプトゾシン、テニボシド、テストステロ  
 ン、サリドマイド、チオグアニン、チオテパ、トレチノイン、ビンデシン、13-cis  
 -レチノイン酸、フェニルアラニンマスタード、ウラシルマスタード、エストラムスチン  
 、アルトレタミン、フロクスウリジン、5-デオオキシウリジン、シトシンアラビノシド  
 、6-メカプトプリン(6-mecaptopurine)、デオキシコホルマイシン、  
 カルシトリオール、バルルビシン、ミトラマイシン、ピンブラスチン、ビノレルビン、ト  
 ポテカン、ラゾキシシン(razoxin)、マリマスタット、COL-3、ネオバスタッ  
 ト、BMS-275291、スクアラミン、エンドスタチン、SU5416、SU666  
 8、EMD121974、インターロイキン-12、IM862、アンジオスタチン、ビ  
 タキシシン(vitaxin)、ドロロキシフェン、イドキシフェン(idoxyfene)  
 )、スピロノラクトン、フィナステリド、シミチジン(cimitidine)、トラス  
 ツズマブ、デニロイキンジフチトクス(denileukin diftitox)、ゲ  
 フィチニブ、ボルテジミブ(bortezimib)、パクリタキセル、クレモフォル  
 -非含有パクリタキセル、ドセタキセル、エピチオロンB(epithilone B)  
 、BMS-247550、BMS-310705、ドロロキシフェン、4-ヒドロキシタ  
 モキシフェン、ピペンドキシフェン(pipendoxifene)、ERA-923、  
 アルゾキシフェン(arzoxifene)、フルベストラント、アコルピフェン(ac  
 olbifene)、ラソフォキシフェン、イドキシフェン、TSE-424、HMR-  
 3339、ZK186619、トポテカン、PTK787/ZK222584、VX-7

10

20

30

40

50

45、PD184352、ラパマイシン、40-O-(2-ヒドロキシエチル)-ラパマイシン、テムシロリムス、AP-23573、RAD001、ABT-578、BC-210、LY294002、LY292223、LY292696、LY293684、LY293646、ウォルトマニン、ZM336372、L-779、450、PEG-フィルグラスチム、ダルベポエチン、エリスロポイエチン、顆粒球コロニー刺激因子、ゾレンドロナート(zolendronate)、プレドニゾン、セツキシマブ、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、ヒストレリン、ペグ化インターフェロンアルファ-2a、インターフェロンアルファ-2a、ペグ化インターフェロンアルファ-2b、インターフェロンアルファ-2b、アザシチジン、PEG-L-アスパラギナーゼ、レナリドマイド、ゲムツズマブ、ヒドロコルチゾン、インターロイキン-11、デクスラゾキサネ(dexrazoxane)、アレムツズマブ、オールトランスレチノイン酸、ケトコナゾール、インターロイキン-2、メゲストロール、免疫グロブリン、ナイトロジェンマスタード、メチルプレドニゾン、イブリツモマブ-チウキセタン(ibritumomab tiuxetan)、アンドロゲン、デシタピン、ヘキサメチルメラミン、ベキサロテン、トシツモマブ、三酸化ヒ素、コルチゾン、エジトロナート(editronate)、ミトタン、シクロスポリン、リボソームダウノルピシン、Edwina-アスパラギナーゼ、ストロンチウム89、カソピタント(casopitant)、ネツピタント(netupitant)、NK-1受容体アンタゴニスト、パロノセトロン、アプレピタント、ジフェンヒドラミン、ヒドロキシジン、メトクロプラミド、ロラゼパム、アルプラゾラム、ハロペリドール、ドロペリドール、ドロナビノール、デキサメタゾン、メチルプレドニゾン、プロクロルペラジン、グラニセトロン、オンダンセトロン、ドラセトロン、トロピセトロン、ペグフィルグラスチム、エリスロポイエチン、エポエチンアルファ、及びダルベポエチンアルファ、ボセプレビル、ダクラタスビル、アスナパビル(asunapavir)、INX-189、FV-100、NM283、VX-950(テラプレビル)、SCH50304、TMC435、VX-500、BX-813、SCH503034、R1626、ITMN-191(R7227)、R7128、PF-868554、TT033、CGH-759、GI5005、MK-7009、SIRNA-034、MK-0608、A-837093、GS9190、GS9256、GS9451、GS5885、GS6620、GS9620、GS9669、ACH-1095、ACH-2928、GSK625433、TG4040(MVA-HCV)、A-831、F351、NS5A、NS4B、ANA598、A-689、GNI-104、IDX102、ADX184、ALS-2200、ALS-2158、BI201335、BI207127、BIT-225、BIT-8020、GL59728、GL60667、PSI-938、PSI-7977、PSI-7851、SCY-635、リバビリン、ペグ化インターフェロン、PHX1766、SP-30、またはその混合物を含む。

#### 【0280】

特定の実施形態では、カーゴは、抗真菌薬を含む。例示的な抗真菌薬には、これらだけに限定されないが、アンホテリシンB(例えば、Pseudallescheria sp.を除く多くの真菌感染などのための)、アニデュラファンギン(例えば、カンジダ血症を含むカンジダ症などのための)、カスポファンギン(例えば、アスペルギルス症、カンジダ血症を含むカンジダ症などのための)、フルコナゾール(例えば、粘膜及び全身システムカンジダ症、クリプトコックス髄膜炎、コクシジオイデス髄膜炎などのための)、フルシトシン(例えば、カンジダ症(全身)、クリプトコックス症などのための)、イサブコナゾール(例えば、アスペルギルス症、ムコール菌症などのための)、イトラコナゾール(例えば、白癬、ヒストプラズマ症、プラストミセス症、コクシジオイデス症、スポロトリクス症などのための)、ミカファンギン(例えば、カンジダ血症を含むカンジダ症のための)、ボサコナゾール(例えば、侵襲性アスペルギルス症及びカンジダ症、口腔カンジダ症、イトラコナゾールに対して難治性の口腔カンジダ症などを予防するため)、ポリコナゾール(例えば、侵襲性アスペルギルス症、フサリウム症、スケドスポリウム症などのために)などが含まれる。

10

20

30

40

50

## 【0281】

二重治療用シリカソーム。

特定の実施形態では、本明細書に記載のナノ粒子薬物担体（シリカソーム）が2種以上の治療薬を含むことができることは認められるであろう。したがって、例えば、特定の実施形態では、シリカソーム中の空孔に、2つ、または3つ、または4つ、またはそれ以上の異なる治療薬を負荷することができる。これは、特定の実施形態では、これらの治療薬のレシオメトリック送達を可能にし得る。非限定的実例では、多数の多剤治療レジメンが、がんの処置では公知である。これらには、これらだけに限定されないが、COMP（メトトレキサート、プレドニゾン）、LSA<sub>2</sub>-L<sub>2</sub>（シクロフォスファミド、ピンクリスチン、プレドニゾン、ダウノマイシン、メトトレキサート、シタラピン、チオグアニン、アスパラギナーゼ、及びカルムスチン）、FOLFIRINOX（イリノテカン、オキサリプラチン、5-フルオロウラシル、ロイコボリン）などが含まれる。特定の実施形態では、本明細書に記載の方法を使用してシリカソームに負荷される薬物に関する本明細書に記載の要求を満たす2種以上の薬剤をシリカソームに与えることができる。多剤レジメンが、本明細書に記載の負荷方法と適合し得ない薬剤を含む場合には、一部の薬剤（例えば、イリノテカン）を、忍容性の改善を得るためにシリカソームに与えることができ、処置レジメンの他の成分は、従来のモダリティによって投与することができる。

10

## 【0282】

特定の実施形態では、疎水性（例えば、親油性）薬物、及び他の薬剤）を、シリカソームの脂質二重層成分に与えることができる。そのような疎水性薬物には、これらだけに限定されないが、パクリタキセル、エリプチシン、カンプトテカン、L-アスパラギナーゼ、ドキソルビシン、SN-38などが含まれる。特定の実施形態では、シリカソームの脂質二重層成分は、1つまたは複数のリン脂質プロドラッグ（例えば、脂質にコンジュゲートした薬物）を含有してよい。例示的な脂質プロドラッグには、これらだけに限定されないが、アシクロビルジホスファートジミリストイルグリセロール（例えば、Hostetler, et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 (24): 11835-11839を参照されたい）、ドキソルビシン結合型リン脂質プロドラッグ（例えば、Wang et al. (2015) J. Mater. Chem. B, 3: 3297-3305を参照されたい）、ヌクレオシド類似体のリン脂質誘導体（例えば、1-D-アラビノフラノシルシトシン（ara-C）の5'-ジホスファート-L-1, 2-ジパルミチン誘導体、9-D-アラビノフラノシルアデニン（ara-A）、ツベルシジンなど（例えば、Matsushita et al. (1981) Cancer Res., 41: 2707-2713）を参照されたい）、リン脂質結合型クロラムブシル（例えば、Pederson et al. (2010) J. Med. Chem., 53: 3782-3792を参照されたい）などが含まれる。

20

30

## 【0283】

上述の多剤シリカソームは、例示的及び非限定的である。本明細書において提供する教示を使用すると、本明細書に記載のシリカソーム中に（またはその上に）組み込むために多数の治療薬の組合せを、当業者は利用することができるであろう。

## 【0284】

標的化リガンド及び免疫複合体。

特定の実施形態では、LBコーティングされたナノ粒子（シリカソーム）を、例えば、内皮細胞、がん細胞への特異的送達を促進するための1つまたは複数の標的化リガンドに、例えば、エンドソーム脱出を促進するための融合性リガンド、血液脳関門などを越えての輸送を増進するためのリガンドにコンジュゲートさせることができる。

40

## 【0285】

例示的な、ただし非限定的な一実施形態では、シリカソームを、ヒスチジンリッチH5WYG（H<sub>2</sub>N-GLFHAI AHFIHG GWHGLIHGWYG-COOH（配列番号1））などの融合性ペプチドにコンジュゲートさせる（例えば、Midoux et al., (1998) Bioconj. Chem., 9: 260-267を参照されたい）。

50

## 【0286】

特定の実施形態では、シリカソームを、抗体、さらには標的化ペプチドを含む標的化リガンドにコンジュゲートさせる。標的化抗体には、これらだけに限定されないが、インタクトな免疫グロブリン、免疫グロブリン断片（例えば、 $F(ab)'_2$ 、Fabなど）、一本鎖抗体、二重特異性抗体、アフィボディ、ユニボディ、ナノボディなどが含まれる。特定の実施形態では、がんマーカーに特異的に結合する抗体を使用する（例えば、腫瘍関連抗原）。広範囲の様々ながんマーカーが、当業者に知られている。マーカーは、がん細胞に特有である必要はないが、マーカーの発現ががん細胞で上昇する場合（正常で健康な細胞と比較して）、またはマーカーが周囲組織において匹敵するレベルで存在しない場合（特に、キメラ部分が局所送達される場合）にも、有効であり得る。

10

## 【0287】

例示的ながんマーカーには、例えば、ND4モノクローナル抗体によって認識される腫瘍マーカーが含まれる。このマーカーは、不十分に分化された結腸直腸癌、さらには、胃腸神経内分泌腫瘍で見出される（例えば、Tobiet al. (1998) Cancer Detection and Prevention, 22(2): 147-152を参照されたい）。がん免疫療法のための他の重要な標的は、膜結合補体調節糖タンパク質CD46、CD55及びCD59であり、これらは、インビボ及びインビトロで、多くの腫瘍細胞上に発現されることが見出されている。ヒトムチン（例えば、MUC1）は、gp100、チロシナーゼ、及びMAGEと同様に、公知の腫瘍マーカーであり、これらは、黒色腫において見出される。野生型ウィルムス腫瘍遺伝子WT1は、多くの急性骨髄球性、急性リンパ球性、及び慢性骨髄球性白血病だけではなく、肺癌を含む様々な種類の充実性腫瘍でも高レベルで発現される。

20

## 【0288】

急性リンパ球性白血病は、TAAs HLA-Dr、CD1、CD2、CD5、CD7、CD19、及びCD20によって特徴づけられている。急性骨髄性白血病は、TAAs HLA-Dr、CD7、CD13、CD14、CD15、CD33、及びCD34によって特徴づけられている。乳癌は、マーカーEGFR、HER2、MUC1、Tag-72によって特徴づけられている。様々な癌が、マーカーMUC1、TAG-72、及びCEAによって特徴づけられている。慢性リンパ球性白血病は、マーカーCD3、CD19、CD20、CD21、CD25、及びHLA-DRによって特徴づけられている。ヘアリーセル白血病は、マーカーCD19、CD20、CD21、CD25によって特徴づけられている。ホジキン病は、Leu-M1マーカーによって特徴づけられている。様々な黒色腫が、HMB45マーカーによって特徴づけられている。非ホジキンリンパ腫は、CD20、CD19、及びIaマーカーによって特徴づけられている。また、様々な前立腺癌が、PSMA及びSE10マーカーによって特徴づけられている。

30

## 【0289】

加えて、多くの種類の腫瘍細胞は、細胞種及び/またはその環境には不適切であるか、または生体の発生中にだけ存在することが正常である（例えば、胎児性抗原）、稀な抗原を表示する。そのような抗原の例には、正常には、神経細胞の外表面膜上で有意水準で発現されるだけであり、免疫系へのその曝露は、血液脳関門によって限定されるグリコスフィンゴリピド脂質GD2、ジシアロガングリオシドが含まれる。GD2は、神経芽細胞腫、髄芽細胞腫、神経膠星状細胞腫、黒色腫、小細胞肺癌、骨肉腫及び他の軟部組織肉腫を含む広範な腫瘍細胞の表面上で発現される。したがって、GD2は、免疫療法のための便利な腫瘍特異的標的である。

40

## 【0290】

他の種類の腫瘍細胞は、健康な細胞の表面では稀であるか、存在せず、腫瘍細胞の未制御の増殖及び分化を引き起こす細胞シグナル伝達経路の活性化を担う細胞表面受容体を表示する。例には、乳癌腫瘍細胞の表面で異常に高いレベルで産生される(Erbb2)HER2/neu、構成的活性型細胞表面受容体が含まれる。

## 【0291】

50

他の有用な標的には、これらだけに限定されないが、C D 2 0、C D 5 2、C D 3 3、上皮成長因子受容体などが含まれる。

【 0 2 9 2 】

適切な腫瘍マーカーの例示的な、ただし限定的ではないリストを表 1 に提示する。これらの及び他のがんマーカーに対する抗体は、当業者に公知であり、商業的に得ることができるか、または例えば、ファージ - ディスプレイ技術を使用して容易に生成することができる。そのような抗体は、例えば、実施例 3 で、i R G D ペプチドをコンジュゲートさせるのと同じ手法で、本明細書に記載のシリカソームに容易にコンジュゲートさせることができる。

【 0 2 9 3 】

10

20

30

40

50



【表 1 A】

表 1。例示的ながんマーカー及び関連文献（これらはすべて、引用した腫瘍マーカーを特定する目的で、参照によって本明細書に組み込まれる）。

マーカー	参考文献
5 アルファレダクターゼ	Delos et al. (1998) Int J Cancer, 75: 6 840-846
α-フェトプロテイン	Esteban et al. (1996) Tumour Biol., 17 (5): 299-305
AM-1	Harada et al. (1996) Tohoku J Exp Med., 180 (3): 273-288
APC	Dihlmann et al. (1997) Oncol Res., 9 (3) 119-127
APRIL	Sordat et al. ('998) J Exp Med., 188 (6): 1185-1190
BAGE	Boel et al. (1995) Immunity, 2: 167-175.
β-カテニン	Hugh et al. (1999) Int J Cancer, 82 (4): 504-11
Bcl2	Koty et al. (1999) Lung Cancer, 23 (2): 115-127
bcr-abl (b3a2)	Verfaillie et al. ('996) Blood, 87 (11): 4770-4779
CA-125	Bast et al. ('998) Int J Biol Markers, 13 (4): 179-187
CASP-8 / FLICE	Mandruzzato et al. (1997) J Exp Med., 186 (5): 785-793.
カテプシン	Thomssen et al. (1995) Clin Cancer Res., 1 (7): 741-746
CD19	Scheuermann et al. (1995) Leuk Lymphoma, 18 (5-6): 385-397
CD20	Knox et al. (1996) Clin Cancer Res., 2 (3): 457-470
CD21、CD23	Shubinsky et al. (1997) Leuk Lymphoma, 25 (5-6): 521-530
CD22、CD38	French et al. (1995) Br J Cancer, 71 (5): 986-994
CD33	Nakase et al. (1996) Am J Clin Pathol., 105 (6): 761-768

10

20

30

40

50

【表 1 B】

CD35	Yamakawa et al. Cancer, 73 (11): 2808-2817
CD44	Naot et al. (1997) Adv Cancer Res., 71: 241-319
CD45	Buzzi et al. (1992) Cancer Res., 52 (14): 4027-4035
CD46	Yamakawa et al. (1994) Cancer, 73 (11): 2808-2817
CD5	Stein et al. (1991) Clin Exp Immunol., 85 (3): 418-423
CD52	Ginaldi et al. (1998) Leuk Res., 22 (2): 185-191
CD55	Spendlove et al. (1999) Cancer Res., 59: 2282-2286.
CD59(791 Tgp72)	Jarvis et al. (1997) Int J Cancer, 71 (6): 1049-1055
CDC27	Wang et al. (1999) Science, 284 (5418): 1351-1354
CDK4	Wolfel et al. (1995) Science, 269 (5228): 1281-1284
CEA	Kass et al. (1999) Cancer Res., 59 (3): 676-683
c-myc	Watson et al. (1991) Cancer Res., 51 (15): 3996-4000
Cox-2	Tsujii et al. (1998) Cell, 93: 705-716
DCC	Gotley et al. (1996) Oncogene, 13 (4): 787-795
DcR3	Pitti et al. (1998) Nature, 396: 699-703
E6/E7	Steller et al. (1996) Cancer Res., 56 (21): 5087-5091
EGFR	Yang et al. (1999) Cancer Res., 59 (6): 1236-1243.
EMBP	Shiina et al. (1996) Prostate, 29 (3): 169-176.
Ena78	Arenberg et al. (1998) J. Clin. Invest., 102: 465-472.
FGF8b 及び FGF8a	Dorkin et al. (1999) Oncogene, 18 (17): 2755-2761
FLK-1/KDR	Annie and Fong (1999) Cancer Res., 59: 99-106

10

20

30

40

50

【表 1 C】

葉酸受容体	Dixon et al. (1992) J Biol Chem., 267 (33): 24140-72414
G250	Divgi et al. (1998) Clin Cancer Res., 4 (11): 2729-2739
GAGEファミリー	De Backer et al. (1999) Cancer Res., 59 (13): 3157-3165
ガストリン17	Watson et al. (1995) Int J Cancer, 61 (2): 233-240
ガストリン放出ホルモン(ボンベシン)	Wang et al. (1996) Int J Cancer, 68 (4): 528-534
GD2/GD3/GM2	Wiesner and Sweeley (1995) Int J Cancer, 60 (3): 294-299
GnRH	Bahk et al. (1998) Urol Res., 26 (4): 259-264
GnTV	Hengstler et al. (1998) Recent Results Cancer Res., 154: 47-85
gp100/Pmel17	Wagner et al. (1997) Cancer Immunol Immunother., 44 (4): 239-247
gp-100-in4	Kirkin et al. (1998) APMIS, 106 (7): 665-679
gp15	Maeurer et al. (1996) Melanoma Res., 6 (1): 11-24
gp75/TRP-1	Lewis et al. (1995) Semin Cancer Biol., 6 (6): 321-327
hCG	Hoermann et al. (1992) Cancer Res., 52 (6): 1520-1524
ヘパラナーゼ	Vlodavsky et al. (1999) Nat Med., 5 (7): 793-802
Her2/neu	Lewis et al. (1995) Semin Cancer Biol., 6 (6): 321-327
Her3	
HMTV	Kahl et al. (1991) Br J Cancer, 63 (4): 534-540
Hsp70	Jaattela et al. (1998) EMBO J., 17 (21): 6124-6134
hTERT (テロメラゼ)	Vonderheide et al. (1999) Immunity, 10: 673-679. 1999.
IGFR1	Ellis et al. (1998) Breast

10

20

30

40

50

【表 1 D】

	Cancer Res. Treat., 52:175-184
IL-13R	Murata et al. (1997) Biochem Biophys Res Commun., 238 (1):90-94
iNOS	Klotz et al. (1998) Cancer, 82 (10):1897-1903
Ki67	Gerdes et al. (1983) Int J Cancer, 31:13-20
KIAA0205	Gueguen et al. (1998) J Immunol., 160 (12):6188-6194
K-ras、H-ras、N-ras	Abrams et al. (1996) Semin Oncol., 23 (1):118-134
KSA (CO17-1A)	Zhang et al. (1998) Clin Cancer Res., 4 (2):295-302
LDLR-FUT	Caruso et al. (1998) Oncol Rep., 5 (4):927-930
MAGEファミリー (MAGE1、MAGE3など)	Marchand et al. (1999) Int J Cancer, 80 (2):219-230
マンマグロビン	Watson et al. (1999) Cancer Res., 59:13 3028-3031
MAP17	Kocher et al. (1996) Am J Pathol., 149 (2):493-500
Melan-A / MART-1	Lewis and Houghton (1995) Semin Cancer Biol., 6 (6):321-327
メソテリン	Chang et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 93 (1):136-140
MICA/B	Groh et al. (1998) Science, 279:1737-1740
MT-MMP、例えばMMP2、MMP3、MMP7、MMP9	Sato and Seiki (1996) J Biochem (Tokyo), 119 (2):209-215
Mox1	Candia et al. (1992) Development, 116 (4):1123-1136
ムチン、例えばM	Lewis and Houghton (1995)

10

20

30

40

50

【表 1 E】

UC-1、MUC-2、MUC-3、及びMUC-4	Semin Cancer Biol., 6 (6): 321-327
MUM-1	Kirkin et al. (1998) APMIS, 106 (7): 665-679
NY-ESO-1	Jager et al. (1998) J. Exp. Med., 187: 265-270
オステオネクチン	Graham et al. (1997) Eur J Cancer, 33 (10): 1654-1660
p15	Yoshida et al. (1995) Cancer Res., 55 (13): 2756-2760
P170/MDR1	Trock et al. (1997) J Natl Cancer Inst., 89 (13): 917-931
p53	Roth et al. (1996) Proc. Natl Acad. Sci., USA, 93 (10): 4781-4786.
p97/メラノトランスフェリン	Furukawa et al. (1989) J Exp Med., 169 (2): 585-590
PAI-1	Grondahl-Hansen et al. (1993) Cancer Res., 53 (11): 2513-2521
PDGF	Vassbotn et al. (1993) Mol Cell Biol., 13 (7): 4066-4076
プラスミノゲン (uPA)	Naitoh et al. (1995) Jpn J Cancer Res., 86 (1): 48-56
PRAME	Kirkin et al. (1998) APMIS, 106 (7): 665-679
プロバシン	Matuo et al. (1985) Biochem Biophys Res Commun., 130 (1): 293-300
プロフェニポイエチン	-----
PSA	Sanda et al. (1999) Urology, 53 (2): 260-266.
PSM	Kawakami et al. (1997) Cancer Res., 57 (12): 2321-2324
RAGE-1	Gaugler et al. (1996) Immunogenetics, 44 (5): 323-330

10

20

30

40

50

【表 1 F】

Rb	Dosaka-Akita et al. (1997) Cancer, 79 (7): 1329-1337
RCAS1	Sonoda et al. (1996) Cancer, 77 (8): 1501-1509.
SART-1	Kikuchi et al. (1999) Int J Cancer, 81 (3): 459-466
SSX遺伝子ファミリー	Gure et al. (1997) Int J Cancer, 72 (6): 965-971
STAT3	Bromberg et al. (1999) Cell, 98 (3): 295-303
STn (ムチン関連)	Sandmaier et al. (1999) J Immunother., 22 (1): 54-66
TAG-72	Kuroki et al. (1990) Cancer Res., 50 (16): 4872-4879
TGF- $\alpha$	Imanishi et al. (1989) Br J Cancer, 59 (5): 761-765
TGF- $\beta$	Picon et al. (1998) Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 7 (6): 497-504
チモシン $\beta$ 15	Bao et al. (1996) Nature Medicine, 2 (12), 1322-1328
IFN- $\alpha$	Moradi et al. (1993) Cancer, 72 (8): 2433-2440
TPA	Maulard et al. (1994) Cancer, 73 (2): 394-398
TPI	Nishida et al. (1984) Cancer Res, 44 (8): 3324-9
TRP-2	Parkhurst et al. (1998) Cancer Res., 58 (21) 4895-4901
チロシナーゼ	Kirkin et al. (1998) APMIS, 106 (7): 665-679
VEGF	Hyodo et al. (1998) Eur J Cancer, 34 (13): 2041-2045
ZAG	Sanchez et al. (1999) Science, 283 (5409): 1914-1919
p16INK4	Quelle et al. (1995) Oncogene Aug. 17, 1995; 11 (4): 635-645
グルタチオンS-トランスフェラーゼ	Hengstler (1998) et al. Recent Results Cancer Res., 154: 47-85

## 【0294】

上述のマーカーのいずれも、本明細書に記載のシリカソームコンストラクトを構成する標的化部分のための標的として使用し得る。特定の実施形態では、標的マーカーには、これらだけに限定されないが、上皮成長因子ファミリーのメンバー（例えば、HER2、HER3、EGF、HER4）、CD1、CD2、CD3、CD5、CD7、CD13、CD14、CD15、CD19、CD20、CD21、CD23、CD25、CD33、CD34、CD38、5E10、CEA、HLA-DR、HM1.24、HMB45、1a、Leu-M1、MUC1、PMSA、TAG-72、ホスファチジルセリン抗原などが含まれる。

## 【0295】

上述のマーカーは、例示であって、限定ではないことが意図されている。他の腫瘍関連抗原も、当業者に公知であろう。

## 【0296】

腫瘍マーカーが細胞表面受容体である場合、その受容体に対するリガンドが、標的化部分として機能し得る。同様に、そのようなリガンドの模倣物質も、標的化部分として使用することができる。したがって、特定の実施形態では、ペプチドリガンドを、様々な抗体に加えて、またはその代わりに使用することができる。適切な標的化ペプチドの例示的な、ただし非限定的なリストを表2に示す。特定の実施形態では、これらのペプチドのいずれか1つまたは複数を、本明細書に記載のシリカソームにコンジュゲートさせることができる。

10

【表2】

表2。様々ながん細胞によって発現または過剰発現される膜受容体を標的とする例示的な、ただし非限定的なペプチド。

標的の膜受容体	標的化ペプチド	配列番号
インテグリン受容体 A <sub>v</sub> β <sub>3</sub>	c (R G D f K)	2
	c (R G D f C)	3
	c (R G D y C)	4
	R G D	
G F R	G E 1 1 (Y H W Y G Y T P Q N V I)	5
G F R	G S G - K C C Y S L	6
S S T R 2	オストレオチド (O s t r e o t i d e)	
G R P	Q W A V G H M L	7
C C K	D Y M G W M D F	8
N T	R R P Y I L	9
	R R P Y I L Q L Y E N	10
	K P R R P Y I L	
L H R H	ゴンダオレリン (G o n d a o r e l i n)	
G P R C ファミリー メンバー	アンタゴニスト G	
c ( ) はシクロペプチドを示す。小文字は「D」アミノ酸を示す。		

20

30

## 【0297】

特定の実施形態では、シリカソームを、循環における安定性を促進する、及び/またはシリカソームを細網内皮系 (R E C) から隠す、及び/またはバリア (例えば、間質障壁、血液脳関門など) を越えての、及び/または組織への輸送を促進する部分にコンジュゲートさせることができる。特定の実施形態では、シリカソームを、血液脳関門を越えての輸送を促進するためにトランスフェリンまたは A p o E にコンジュゲートさせる。特定の実施形態では、シリカソームを、葉酸にコンジュゲートさせる。

40

## 【0298】

シリカソームを標的化剤 (または他の薬剤) にカップリングする方法は、当業者に周知である。例には、これらだけに限定されないが、例えば、二官能性カップリング剤、例えば、グルタルアルデヒド、ジイミドエステル、芳香族及び脂肪族ジイソシアナート、ジカ

50

ルボン酸のビス - p - ニトロフェニルエステル、芳香族ジスルホニルクロリド及び二官能性アリールハライド、例えば、1, 5 - ジフルオロ - 2, 4 - ジニトロベンゼン; p, p' - ジフルオロ m, m' - ジニトロジフェニルスルホン、スルフヒドリル反応性マレイミドなどを使用する従来の化学反応によって、ビオチン及びアビジンまたはストレプトアビジンを使用すること（例えば、米国特許第 4, 885, 172 A 号を参照されたい）が含まれる。そのようなカップリングに適用され得る適切な反応は、Williams et al. *Methods in Immunology and Immunochimistry* Vol. 1, Academic Press, New York 1967 に記載されている。実施例 3 に記載の、例示的な、ただし非限定的な 1 つのアプローチでは、DSPE - PEG 2000 を DSPE - PEG 2000 - マレイミドで置換し（実施例 3 の方法セクションを参照されたい）、システイン - 修飾ペプチドへのチオール - マレイミドカップリングを可能にすることによって、ペプチド（この実施例では iRGD）をシリカソームにカップリングさせる。特定の実施形態では、標的化（及び他の）部分を、脂質二重層を含む脂質にコンジュゲートさせることができることも認められるであろう。

10

#### 【0299】

前のコンジュゲート及びカップリング方法は、例示的及び非限定的である。本明細書において提供する教示を使用すると、多数の他の部分を、様々な方法のいずれかによって、本明細書に記載のシリカソームにコンジュゲートさせることができる。

#### 【0300】

医薬製剤、投与及び治療

20

医薬製剤。

一部の実施形態では、本明細書に記載のナノ粒子薬物担体を、単独で、または投与経路及び標準的な薬務に従って選択された生理学的に許容される担体（生理食塩水またはリン酸塩緩衝液など）との混合物で投与する。例えば、注射剤として使用する場合、シリカソームは、薬学的に許容される担体を用いて無菌懸濁剤、分散剤、または乳剤として製剤化することができる。特定の実施形態では、生理食塩水を、薬学的に許容される担体として使用することができる。他の適切な担体には、安定性の増強のための糖タンパク質、例えば、アルブミン、リポタンパク質、グロブリンなどを含む、例えば、水、緩衝水、0.4% 食塩水、0.3% グリシンなどが含まれる。食塩水または他の塩含有担体を含む組成物では、担体を好ましくは、シリカソームの形成後に添加する。したがって、シリカソームを形成し、適切な薬物（複数可）を負荷した後に、シリカソームを、生理食塩水などの薬学的に許容される担体中で希釈することができる。これらの組成物を、従来の周知の滅菌技術によって滅菌することができる。得られた水性溶液、懸濁液、分散液、エマルジョンなどを、使用のためにパッケージングするか、または無菌条件下で濾過することができる。特定の実施形態では、シリカソームを凍結乾燥し、凍結乾燥された製剤を、投与前に無菌水溶液と合わせる。組成物はまた、生理学的条件に近づけるために必要な場合には、薬学的に許容される補助物質、例えば、pH 調節剤及び緩衝剤、張性調節剤など、例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウムなどを含有してよい。

30

#### 【0301】

加えて、特定の実施形態では、医薬製剤は、貯蔵時にフリーラジカル及び脂質過酸化損傷に対して脂質を保護する脂質保護剤を含んでよい。親油性フリーラジカル失活剤、例えば、アルファ - トコフェロール及び水溶性鉄特異的キレート剤、例えば、フェリオキサミン (ferrioxamine) が適している。

40

#### 【0302】

医薬製剤中のシリカソームの濃度は、例えば、重量で約 0.05% 未満、通常は、少なくとも約 2~5% から、多くは 10~50% まで、または 40% まで、または 30% まで広く変動してよく、選択された特定の投与様式に従って、主に流体体積、粘度などによって選択される。例えば、処置と関連した流体負荷を低下させるために、濃度を上昇させてもよい。これは特に、アテローム硬化症関連鬱血性心不全または重篤な高血圧を有する患者

50



で望ましいことがある。別法では、投与部位での炎症を軽減するために、刺激性脂質から構成されるシリカソームを、低濃度まで希釈してもよい。投与されるシリカソームの量は、使用される特定の薬物、処置される病態及び臨床家の判断に左右されるが、一般に、体重1キログラム当たり約0.01から約50mg、好ましくは体重1kg当たり約0.1から約5mgの間である。

#### 【0303】

一部の実施形態では、例えば、シリカソーム中にポリエチレングリコール（PEG）修飾リン脂質を含むことが望ましい。別法では、または加えて、特定の実施形態では、PEG-セラミド、またはガングリオシドGM1修飾脂質をシリカソームに組み込むことができる。そのような成分の添加は、シリカソームの凝集を妨げるために役立ち、循環寿命の増加及び標的組織への負荷シリカソームの送達の増加をもたらす。特定の実施形態では、シリカソーム中でのPEG修飾リン脂質、PEG-セラミド、またはGM1修飾脂質の濃度は、約1～15%である。

10

#### 【0304】

一部の実施形態では、全シリカソーム装入量は、血液からのシリカソームクリアランスにおける重要な決定因子である。装入されたシリカソームは典型的には、細網内皮系によってより急速に取り込まれ（例えば、RESによるリポソームクリアランスを論述しているJuliano（1975）、Biochem. Biophys. Res. Commun. 63:651-658を参照されたい）、したがって、血流でより短い半減期を有すると考えられる。長時間の循環半減期を有するシリカソームが典型的には、治療的使用には望ましい。例えば、特定の実施形態では、8時間、または12時間、または24時間、またはそれ以上維持されるシリカソームが望ましい。

20

#### 【0305】

それらの使用の別の例では、例えば、局所癌を処置するために、薬物負荷されたシリカソームを、これらだけに限定されないが、ゲル剤、油剤、乳剤などを含む幅広い範囲の局所剤形に組み込むことができる。例えば、一部の実施形態では、薬物負荷シリカソームを含む懸濁液を、局所クリーム剤、ペースト剤、軟膏剤、ゲル剤、ローション剤などとして製剤化し、投与する。

#### 【0306】

一部の実施形態では、本明細書に記載のシリカソームを含む医薬製剤は追加的に、緩衝剤を組み込む。緩衝剤は、任意の薬学的に許容される緩衝剤であってよい。緩衝系には、これらだけに限定されないが、クエン酸塩緩衝剤、酢酸塩緩衝剤、ホウ酸塩緩衝剤、及びリン酸塩緩衝剤が含まれる。緩衝剤の例には、これらだけに限定されないが、クエン酸、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、酢酸、リン酸ナトリウム及びリン酸、アスコルビン酸ナトリウム、酒石酸、マレイン酸、グリシン、乳酸ナトリウム、乳酸、アスコルビン酸、イミダゾール、炭酸水素ナトリウム及び炭酸、コハク酸ナトリウム及びコハク酸、ヒスチジン、及び安息香酸ナトリウム、安息香酸などが含まれる。

30

#### 【0307】

一部の実施形態では、本明細書に記載のシリカソームを含む医薬製剤は追加的に、キレート化剤を組み込む。キレート化剤は、任意の薬学的に許容されるキレート化剤であってよい。キレート化剤には、これらだけに限定されないが、エチレンジアミンテトラ酢酸（EDTA）、エデト酸、ベルセン酸、及びセキエストレンとも同意語）、及びEDTA誘導体、例えば、エデト酸二カリウム、エデト酸二ナトリウム、エデト酸カルシウム二ナトリウム、エデト酸ナトリウム、エデト酸三ナトリウム、及びエデト酸カリウムが含まれる。他のキレート化剤には、クエン酸（例えば、クエン酸一水和物）及びその誘導体が含まれる。クエン酸の誘導体には、無水クエン酸、クエン酸三ナトリウム・二水和物などが含まれる。さらに他のキレート化剤には、これらだけに限定されないが、ナイアシンアミド及びその誘導体ならびにデオキシコール酸ナトリウム及びその誘導体が含まれる。

40

#### 【0308】

一部の実施形態では、本明細書に記載のシリカソームを含む医薬製剤は追加的に、抗酸化

50

剤を含む生物活性剤を組み込む。抗酸化剤は、任意の薬学的に許容される抗酸化剤であってよい。抗酸化剤は、当業者には周知であり、それらには、これらだけに限定されないが、アスコルビン酸、アスコルビン酸誘導体（例えば、パルミチン酸アスコルビル、ステアリン酸アスコルビル、アスコルビン酸ナトリウム、アスコルビン酸カルシウムなど）、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブイル化（*buylated*）ヒドロキシトルエン、アルキルガラート、メタ硫酸水素ナトリウム、硫酸水素ナトリウム、亜ジチオン酸ナトリウム、ナトリウムチオグリコール酸、ナトリウムホルムアルデヒドスルホキシレート、トコフェロール及びその誘導体、（*d*-アルファトコフェロール、*d*-アルファトコフェロールアセタート、*d*1-アルファトコフェロールアセタート、*d*-アルファトコフェロールスクシナート、ベータトコフェロール、デルタトコフェロール、ガンマトコフェロール、及び *d*-アルファトコフェロールポリオキシエチレングリコール 1000 スクシナート）モノチオグリセロール、亜硫酸ナトリウム及び *N*-アセチルシステインなどの物質が含まれる。特定の実施形態では、そのような物質を、存在する場合には典型的には、0.01 ~ 2.0 % の範囲で添加する。

#### 【0309】

一部の実施形態では、本明細書に記載のシリカソームを含む医薬製剤を、凍結保護物質と共に製剤化する。凍結保護剤は、任意の薬学的に許容される凍結保護剤であってよい。一般的な凍結保護剤には、これらだけに限定されないが、ヒスチジン、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリジン、ラクトース、スクロース、マンニトール、ポリオールなどが含まれる。

#### 【0310】

一部の実施形態では、本明細書に記載のシリカソームを含む医薬製剤を、等張化剤と共に製剤化する。等張化剤は、任意の薬学的に許容される等張化剤であってよい。この用語は、当技術分野では、等浸透圧剤（*iso-osmotic agent*）と互換的に使用され、浸透圧を例えば、一部の実施形態では、血漿などのヒト細胞外液と等浸透性である 0.9 % 塩化ナトリウム溶液の浸透圧まで上昇させるために、医薬製剤に添加される化合物として公知である。例示的な等張化剤には、これらだけに限定されないが、塩化ナトリウム、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、デキストロース及びグリセロールが含まれる。

#### 【0311】

特定の実施形態では、シリカソームの医薬製剤は任意選択で、防腐剤を含んでよい。一般的な防腐剤には、これらだけに限定されないが、クロロブタノール、パラベン、チメロソール、ベンジルアルコール、及びフェノールからなる群から選択されるものが含まれる。適切な防腐剤には、これらだけに限定されないが：クロロブタノール（例えば、0.3 ~ 0.9 w/v %）、パラベン（例えば、0.01 ~ 5.0 %）、チメロサル（例えば、0.004 ~ 0.2 %）、ベンジルアルコール（例えば、0.5 ~ 5 %）、フェノール（例えば、0.1 ~ 1.0 %）などが含まれる。

#### 【0312】

一部の実施形態では、シリカソームを含む医薬製剤を、例えば、経口適用において快い食感をもたらすために、湿潤剤と共に製剤化する。当技術分野で公知の湿潤剤には、これらだけに限定されないが、コレステロール、脂肪酸、グリセリン、ラウリン酸、ステアリン酸マグネシウム、ペンタエリトリトール、及びプロピレングリコールが含まれる。

#### 【0313】

一部の実施形態では、例えば、すべての添加剤、特に、ベンジルアルコールなどの疎水性成分の完全な溶解を保証するために、乳化剤が、製剤中に含まれる。多くの乳化剤が当技術分野で公知であり、例えば、ポリソルベート 60 である。

#### 【0314】

経口投与に関連する一部の実施形態では、薬学的に許容される香味剤及び/または甘味剤を添加することが望ましいことがある。サッカリン、グリセリン、単純なシロップ、及びソルビトールなどの化合物が、甘味剤として有用である。

## 【0315】

## 投与及び治療

カーゴ（例えば、薬物）負荷されたシリカソームを、様々な技術のいずれかによって対象（例えば、患者）に投与することができる。

## 【0316】

特定の実施形態では、医薬製剤を、非経口で、例えば、関節内、静脈内、腹腔内、皮下、または筋肉内で投与する。一部の実施形態では、医薬組成物を、静脈内、動脈内、または腹腔内で大量注射によって投与する（例えば、リポソームの投与を記載している米国特許第3,993,754号；同第4,145,410号；同第4,235,871号；同第4,224,179号；同第4,522,803号；及び同第4,588,578号を参照されたい）。この投与に適した特定の医薬製剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17th ed. (1985)において見出される。典型的には、製剤は、許容される担体、好ましくは水性担体中に懸濁されたシリカソームの溶液を含む。上述のとおり、適切な水溶液には、これらだけに限定されないが、生理学的に適合性の緩衝液、例えば、ハanks液、リンゲル液、または生理（例えば、0.9%等張性）食塩水緩衝液、及び/またはある種の乳剤製剤中が含まれる。溶液（複数可）は、配合剤（formulatory agent）、例えば、懸濁化剤、安定剤及び/または分散剤を含有してよい。特定の実施形態では、活性薬剤（複数可）を、使用前に適切なビヒクル、例えば、無菌の発熱物質不含の水で構成するための粉末形態で提供することができる。経粘膜投与のために、かつ/または血液/脳関門通過のために、透過させる障壁に適した浸透剤を製剤において使用することができる。これらの組成物を従来の周知の滅菌技術によって滅菌してよい、または無菌濾過してよい。得られた水溶液を、そのまま使用するためにパッケージングするか、または凍結乾燥させてよく、その際、凍結乾燥された製剤は、投与前に無菌水溶液と合わせる。組成物は、例えば、上記のとおり、生理学的条件に近づくために必要な場合には、薬学的に許容される補助物質、例えば、pH調節剤及び緩衝剤、張性調節剤、湿潤剤など、例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、モノラウリン酸ソルビタン、トリエタノールアミンオレアートなどを含有してよい。

## 【0317】

他の方法では、組織に製剤を直接施与することによって、本明細書に記載のシリカソーム（silicasomes）を含有する医薬製剤を標的組織と接触させることができる。施与を、局所によって、「オープン（open）」または「クローズド（closed）」手順によって行ってよい。「局所」とは、皮膚、中咽頭、外耳道などの環境に曝露されている組織に医薬製剤を直接施与することを意味している。オープン手順は、患者の皮膚を切開すること、及び下にある組織を直接可視化し、そこに医薬製剤を施与することを含む手順である。これは一般に、外科手術、例えば、肺にアクセスするための開胸術、腹部内臓にアクセスするための腹式開腹術、または標的組織に対する他の直接的な外科的アプローチによって達成される。クローズド手順は、内部標的組織を直接可視化せずに、しかし、それに、皮膚の小さな創傷を通して器具を挿入することによってアクセスする侵襲性手順である。例えば、製剤を、針洗浄（needle lavage）によって腹膜に投与してもよい。同様に、医薬製剤を、腰椎穿刺中に、脊髄麻酔又は脊髄のメトラズアミド（metrizamide）イメージングのため一般に行われるような患者の適当な位置決めが続いて、注入によって髄膜又は脊髄に投与してもよい。別法では、製剤を、内視鏡検査装置によって投与してもよい。特定の実施形態では、医薬製剤を、カニューレを介して導入する。

## 【0318】

特定の実施形態では、本明細書に記載のシリカソームを含む医薬製剤を、吸入によって（例えば、エアロゾルとして）投与する。吸入は、肺及び/または脳への投与では、特に有効な送達経路であり得る。吸入による投与では、シリカソームを、適切な噴射剤、例えば

、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の適切なガスを使用して加圧パックまたは噴霧器からエアロゾル噴霧剤の形態で好都合に送達する。加圧エアロゾルの場合には、投薬単位は、計測量を送達するためのバルブを用意することによって決定することができる。吸入器または注入器で使用するための、例えば、ゼラチン製のカプセル及びカートリッジを、化合物及びラクトースまたはデンプンなどの適切な散剤基剤の粉末混合物を含有して製剤化してもよい。

#### 【0319】

特定の実施形態では、本明細書に記載のシリカソームを、経口投与のために製剤化する。経口投与では、適切な製剤を、シリカソーム（複数可）を、当技術分野で周知の経口送達に適した薬学的に許容される担体と組み合わせることによって容易に製剤化することができる。そのような担体は、本明細書に記載の活性薬剤（複数可）を、処置される患者が経口摂取するための錠剤、丸剤、糖剤、カプレット剤、ロゼンジ剤、ジェルキャップ剤、カプセル剤、液剤、ゲル剤、シロップ剤、スラリー剤、懸濁液剤などとして製剤化することを可能にする。例えば、散剤、カプセル剤及び錠剤などの経口固体製剤では、適切な添加剤には、増量剤、例えば、糖（例えば、ラクトース、スクロース、マンニトール及びソルビトール）、セルロース調製物（例えば、トウモロコシデンプン、コムギデンプン、コメデンプン、バレイショデンプン、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム）、合成ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン（PVP））、造粒剤；及び結合剤が含まれ得る。所望の場合には、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸もしくはその塩、例えば、アルギン酸ナトリウムなどの崩壊剤を添加してもよい。所望の場合には、固体剤形を、標準的な技術を使用して糖コーティングまたは腸溶コーティングしてもよい。腸溶コーティングされた粒子の調製は、例えば、米国特許第4,786,505号及び第4,853,230号において開示されている。

#### 【0320】

様々な実施形態では、シリカソーム（複数可）を、例えば、従来の坐剤基剤、例えば、カカオバターまたは他のグリセリドを含有する坐剤または停留浣腸剤などの直腸または腔用組成物で製剤化することができる。直腸または腔送達のために活性薬剤を製剤化する方法は、当業者に周知であり（例えば、Allen (2007) Suppositories, Pharmaceutical Pressを参照されたい）、典型的には、活性薬剤を適切な塩基（例えば、親水性（PEG）、親油性物質、例えば、カカオバターまたはWitepsol W45）、両新媒性物質、例えば、Suppocire AP及びポリグリコール化グリセリドなど）と組み合わせることを含む。基剤は、所望の溶融/送達プロフィールで選択され、配合される。

#### 【0321】

シリカソームの送達経路は、身体へのそれらの分布にも影響を及ぼし得る。シリカソームの受動的送達は、投与の様々な経路の使用、例えば、非経口を含むが、他の有効な投与形態、例えば、関節内注射、吸入ミスト、経口活性製剤、経皮イオン泳動、または坐剤も想起される。各経路は、シリカソームの局在において相違をもたらす。

#### 【0322】

医薬品の投与計画は医師には周知であるので、哺乳類、特にヒトにおける疾患または状態を処置するために有効であるか、または治療的であるリポソーム医薬品製剤の量は、当業者には明らかであろう。本明細書における製剤の最適な量及び個々の投薬間隔は、処置される状態の性質及び規模、投与形態、経路及び部位、ならびに処置される特定の患者によって決定され、そのような最適は、従来技術によって決定することができる。当業者であれば、処置決定試験の従来の経過を使用して、最適な処置経過、例えば、規定の日数にわたって1日当たり与えられる投与回数を確認することができることも、当業者には分かるであろう。

#### 【0323】

特定の実施形態では、シリカソーム及び/またはその医薬形成物は、（1）反復投与、（

10

20

30

40

50

２）その生理活性形態での薬物の持続的送達、または（３）該当する遊離薬物と比較して、適切な有効性と共に毒性の低下を必要とする状態を含む、様々ながん、または様々な感染などを処置する際に動物（ヒトを含む）で治療用に使用することができる。様々な実施形態では、シリカソーム及び／またはその医薬形成物を、治療上有効な用量で投与する。本明細書に記載のシリカソーム及びその製剤に関する場合の「治療上有効」という用語は、シリカソームの上及び／または中に存在する生物学的活性物質が、その生物学的活性物質（治療薬）が意図されている特定の医学的効果を達成するために十分なように提供／放出されることを意味する。達成され得る望ましい医学的効果の例は、限定ではないが、化学療法、抗生物質療法、及び代謝の調節である。したがって、例えば、がん化学療法での治療上有効な用量は、がん細胞の成長及び／もしくは増殖を減速させる、ならびに／または充実性腫瘍の成長を減速、停止させる、または充実性腫瘍を縮小もしくは除去する、ならびに／または転移細胞の増殖を減速、停止させるために有効な用量（及び／または投与計画）であり得る。感染を処置するために治療上有効な用量は、病原体の成長及び／もしくは増殖を阻害する、ならびに／または病原体を死滅させる、ならびに／または病原体によって生じる１つもしくは複数の症状を軽減するために十分な用量（及び／または投与計画）であり得る。

10

#### 【 0 3 2 4 】

正確な投与量は、特定の治療薬及び望ましい医学的効果などの因子、さらには、年齢、性別、全身状態などの患者因子に依存して変動する。当業者は容易に、これらの因子を考慮し、過度の実験に頼ることなく、それらを、有効な治療濃度を確立するために使用することができる。

20

#### 【 0 3 2 5 】

疾患の治療的、軽減的、減速的（*retardive*）、または予防的処置でのヒト（または非ヒト哺乳類）への投与では、処方医が、所与のヒト（または非ヒト）対象のための薬物の適切な投与量を最終的に決定し、これは、個体の年齢、体重、及び応答、さらには患者の疾患の性質及び重症度によって変動すると予測され得る。特定の実施形態では、シリカソーム（複数可）によって提供される薬物の投与量は、遊離薬物で使用される投与量とほぼ等しくてよい。しかしながら、上述のとおり、本明細書に記載のシリカソームは、投与される薬物（複数可）の毒性を著しく低下させることができ、それによって、治療ウィンドウを著しく拡大させることができる。したがって、場合によっては、遊離薬物で処方される投与量を超える投与量が利用される。

30

#### 【 0 3 2 6 】

特定の実施形態では、特定の時点で投与される封入薬物の用量は、約 1 ~ 約 1, 0 0 0 m g / m<sup>2</sup> / 日、または ~ 約 8 0 0 m g / m<sup>2</sup> / 日、または ~ 約 6 0 0 m g / m<sup>2</sup> / 日、または ~ 約 4 0 0 m g / m<sup>2</sup> / 日の範囲にある。例えば、特定の実施形態では、約 1 ~ 約 3 5 0 m g / m<sup>2</sup> / 日、1 ~ 約 3 0 0 m g / m<sup>2</sup> / 日、1 ~ 約 2 5 0 m g / m<sup>2</sup> / 日、1 ~ 約 2 0 0 m g / m<sup>2</sup> / 日、1 ~ 約 1 5 0 m g / m<sup>2</sup> / 日、1 ~ 約 1 0 0 m g / m<sup>2</sup> / 日、約 5 ~ 約 8 0 m g / m<sup>2</sup> / 日、約 5 ~ 約 7 0 m g / m<sup>2</sup> / 日、約 5 ~ 約 6 0 m g / m<sup>2</sup> / 日、約 5 ~ 約 5 0 m g / m<sup>2</sup> / 日、約 5 ~ 約 4 0 m g / m<sup>2</sup> / 日、約 5 ~ 約 2 0 m g / m<sup>2</sup> / 日、約 1 0 ~ 約 8 0 m g / m<sup>2</sup> / 日、約 1 0 ~ 約 7 0 m g / m<sup>2</sup> / 日、約 1 0 ~ 約 6 0 m g / m<sup>2</sup> / 日、約 1 0 ~ 約 5 0 m g / m<sup>2</sup> / 日、約 1 0 ~ 約 4 0 m g / m<sup>2</sup> / 日、約 1 0 ~ 約 2 0 m g / m<sup>2</sup> / 日、約 2 0 ~ 約 4 0 m g / m<sup>2</sup> / 日、約 2 0 ~ 約 5 0 m g / m<sup>2</sup> / 日、約 2 0 ~ 約 9 0 m g / m<sup>2</sup> / 日、約 3 0 ~ 約 8 0 m g / m<sup>2</sup> / 日、約 4 0 ~ 約 9 0 m g / m<sup>2</sup> / 日、約 4 0 ~ 約 1 0 0 m g / m<sup>2</sup> / 日、約 8 0 ~ 約 1 5 0 m g / m<sup>2</sup> / 日、約 8 0 ~ 約 1 4 0 m g / m<sup>2</sup> / 日、約 8 0 ~ 約 1 3 5 m g / m<sup>2</sup> / 日、約 8 0 ~ 約 1 3 0 m g / m<sup>2</sup> / 日、約 8 0 ~ 約 1 2 0 m g / m<sup>2</sup> / 日、約 8 5 ~ 約 1 4 0 m g / m<sup>2</sup> / 日、約 8 5 ~ 約 1 3 5 m g / m<sup>2</sup> / 日、約 8 5 ~ 約 1 3 0 m g / m<sup>2</sup> / 日、または約 8 5 ~ 約 1 2 0 m g / m<sup>2</sup> / 日の範囲を提供する投与量（投与計画）を利用する。特定の実施形態では、特定の時点で投与される用量はまた、約 1 3 0 m g / m<sup>2</sup> / 日、約 1 2 0 m g / m<sup>2</sup> / 日、約 1 0 0 m g / m<sup>2</sup> / 日、約 9 0 m g / m<sup>2</sup> / m

40

50

2 / 日、約 85 mg / m<sup>2</sup> / 日、約 80 mg / m<sup>2</sup> / 日、約 70 mg / m<sup>2</sup> / 日、約 60 mg / m<sup>2</sup> / 日、約 50 mg / m<sup>2</sup> / 日、約 40 mg / m<sup>2</sup> / 日、約 30 mg / m<sup>2</sup> / 日、約 20 mg / m<sup>2</sup> / 日、約 15 mg / m<sup>2</sup> / 日、または約 10 mg / m<sup>2</sup> / 日であってもよい。

#### 【0327】

当業者には分かるとおり、投与量を、インビボ動物モデルを使用して推定してもよい。これに関して、本明細書に記載のイリノテカン負荷されたシリカソームでは、KPC 由来同所動物モデルにおける Ir - シリカソームの有効な治療量は約 40 mg / kg であり、これは、70 Kg のヒト対象では 120 mg / m<sup>2</sup> に等しいことに注意されたい (Liu, et al. (2016) ACS Nano, 10: 2702 - 2715)。フィボナッチ分析は、この用量が、40 及び 80 mg / m<sup>2</sup> の開始及び中間用量によって達成され得ることを示している。

10

#### 【0328】

投与される用量は、他の因子のなかでも、組成物の生物学的利用能、有害な副作用に対する個体の忍容性、投与様式及び上記で論述した様々な因子に応じて、本明細書に記載の用量範囲よりも高くても、または低くてもよい。治療効果を維持するために十分である、組成物の血漿中レベルを得るために、処方医の判断によって、投与量及び間隔を個々に調節してよい。当業者であれば、本明細書において提示した教示を考慮して、過度の実験を伴うことなく、有効な局所投与量を最適化することができる。

#### 【0329】

本明細書に記載のとおり組成物の複数の用量 (例えば、連続またはボース) を、数時間、数日、数週、または数か月の経過で、それを必要とする個体に投与してもよい。例えば、これらだけに限定されないが、1、2、3、4、5、または 6 回を毎日、1 日おき、10 日おき、毎週、毎月、週 2 回、週 3 回、月 2 回、月 3 回、月 4 回、月 5 回、1 カ月おき、3 カ月おき、4 カ月おきなど。

20

#### 【0330】

処置方法。

様々な実施形態で、本明細書に記載のナノ粒子薬物担体 (複数可) 及び / またはナノ粒子薬物担体を含む医薬製剤 (複数可) を使用する処置方法を提供する。特定の実施形態では、方法 (複数可) は、がんを処置する方法を含む。特定の実施形態では、方法は、それを必要とする対象に、本明細書に記載のとおりナノ粒子薬物担体、及び / またはナノ粒子薬物担体を含む医薬製剤の有効量を投与することを含むことができ、前記ナノ粒子薬物担体及び / または前記医薬製剤中の薬物は、抗がん薬を含む。特定の実施形態では、ナノ粒子薬物担体及び / または医薬製剤は、化学療法薬レジメンにおける一次治療である。特定の実施形態では、ナノ粒子薬物担体及び / または医薬製剤は、多剤化学療法薬レジメンにおける一成分である。特定の実施形態では、多剤化学療法薬レジメンは、イリノテカン (IRIN)、オキサリプラチン (OX)、5 - フルオロウラシル (5 - FU)、及びロイコボリン (LV) からなる群から選択される少なくとも 2 つの薬物を含む。特定の実施形態では、多剤化学療法薬レジメンは、イリノテカン (IRIN)、オキサリプラチン (OX)、5 - フルオロウラシル (5 - FU)、及びロイコボリン (LV) からなる群から選択される少なくとも 3 つの薬物を含む。特定の実施形態では、多剤化学療法薬レジメンは、少なくともイリノテカン (IRIN)、オキサリプラチン (OX)、5 - フルオロウラシル (5 - FU)、及びロイコボリン (LV) を含む。

30

40

#### 【0331】

様々な実施形態では、本明細書に記載のナノ粒子薬物担体 (複数可) 及び / またはナノ粒子薬物担体を含む医薬製剤 (複数可) は、様々ながんのいずれかを処置するために有効である。特定の実施形態では、がんは、膵臓管状腺癌 (PDAC) である。特定の実施形態では、がんは、急性リンパ芽球性白血病 (ALL)、急性骨髄性白血病 (AML)、副腎皮質癌、AIDS 関連がん (例えば、カポジ肉腫、リンパ腫)、肛門癌、虫垂癌、神経膠星状細胞腫、非定型奇形様 / 横紋筋肉腫様腫瘍、胆管癌、肝外癌、膀胱癌、骨癌 (例えば

50

、ユーイング肉腫、骨肉腫、悪性線維性組織球腫）、脳幹膠腫、脳腫瘍（例えば、神経膠星状細胞腫、神経膠芽細胞腫、脳及び脊髄腫瘍、脳幹膠腫、中枢神経系非定型奇形様／横紋筋肉腫様腫瘍、中枢神経系胎児性腫瘍、中枢神経系生殖細胞腫瘍、頭蓋咽頭腫、脳室上衣細胞腫、乳癌、気管支腫瘍、パーキットリンパ腫、類癌腫（例えば、小児期、胃腸）、心臓腫瘍、子宮頸癌、脊索腫、慢性リンパ球性白血病（CLL）、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性骨髄増殖性障害、結腸癌、結腸直腸癌、頭蓋咽頭腫、皮膚t細胞リンパ腫、腺管癌、例えば（胆管、肝臓外）、腺管上皮内癌（DCIS）、胎児性腫瘍、子宮内膜癌、脳室上衣細胞腫、食道癌、感覚神経芽細胞腫、頭蓋外胚細胞腫瘍、性腺外胚細胞腫瘍、肝臓外胆管癌、眼癌（例えば、眼内黒色腫、網膜芽細胞腫）、骨の線維性組織球腫、悪性、及び骨肉腫、胆嚢癌、胃癌、胃腸類癌腫、消化管間質腫瘍（GIST）、生殖細胞腫瘍（例えば、卵巣癌、睾丸癌、頭蓋外癌、生殖腺外癌、中枢神経系）、妊娠性絨毛腫瘍、脳幹癌、ヘアリーセル白血病、頭頸部癌、心臓癌、肝細胞（肝）癌、組織球増殖症、ランゲルハンス細胞癌、ホジキンリンパ腫、下咽頭癌、眼内黒色腫、島細胞腫瘍、脾臓神経内分泌腫瘍、カボジ肉腫、腎臓癌（例えば、腎臓細胞、ウィルムス腫瘍、及び他の腎臓腫瘍）、ランゲルハンス細胞組織球増殖症、喉頭癌、急性リンパ芽球性（ALL）、急性骨髄性（AML）、慢性リンパ球性（CLL）、慢性骨髄性（CML）、ヘアリーセル白血病、口唇及び口腔癌、肝臓癌（原発性）、上皮内小葉癌（LCIS）、肺癌（例えば、小児期、非小細胞、小細胞）、リンパ腫（例えば、AIDS関連、パーキット（例えば、非ホジキンリンパ腫）、皮膚T細胞（例えば、菌状息肉症、セザリー症候群）、ホジキン、非ホジキン、原発性中枢神経系（CNS））、マクログロブリン血症、ワルデンストローム、男性乳癌、骨の悪性線維性組織球腫及び骨肉腫、黒色腫（例えば、小児期、眼内（目））、メルケル細胞癌、中皮腫、転移性扁平上皮頸部癌、正中線管癌腫、口腔癌、多発性内分泌腺腫症、多発性骨髄腫／形質細胞新生物、菌状息肉症、骨髄異形成症候群、慢性骨髄性白血病（CML）、多発性骨髄腫、鼻腔及び副鼻腔癌、鼻咽頭癌、神経芽細胞腫、口腔癌、口唇及び口咽頭癌、骨肉腫、卵巣癌、脾臓癌、脾臓神経内分泌腫瘍（島細胞腫瘍）、乳頭腫症、傍神経節腫、副鼻腔及び鼻腔癌、副甲状腺癌、陰茎癌、咽頭癌、褐色細胞腫、下垂体腫瘍、形質細胞新生物、胸膜肺芽細胞腫、原発性中枢神経系（CNS）リンパ腫、前立腺癌、直腸癌、腎臓細胞（腎臓）癌、腎盂及び尿管、移行細胞癌、横紋筋肉腫、唾液腺癌、肉腫（例えば、ユーイング、カボジ、骨肉腫、横紋筋肉腫、軟部組織、子宮）、セザリー症候群、皮膚癌（例えば、黒色腫、メルケル細胞癌、基底細胞癌、非黒色腫）、小腸癌、扁平上皮細胞癌、潜在性原発を伴う扁平上皮頸部癌、胃癌、睾丸癌、咽頭癌、胸腺腫及び胸腺癌、甲状腺癌、栄養膜腫瘍、尿管及び腎盂癌、尿道癌、子宮癌、子宮内膜癌、子宮肉腫、陰癌、外陰癌、ワルデンストロームマクログロブリン血症、ならびにウィルムス腫瘍からなる群から選択されるがんである。

### 【0332】

特定の実施形態では、ナノ粒子薬物担体は、iRGDペプチドにコンジュゲートされてなく、ナノ粒子薬物担体をiRGDペプチドと併せて投与する（例えば、ナノ粒子薬物担体及びiRGDペプチドを、別々の製剤として同時投与する）。

### 【0333】

特定の実施形態では、方法（複数可）は、感染を処置する方法を含む。特定の実施形態では、方法は、それを必要とする対象に、本明細書に記載のとりのナノ粒子薬物担体、及び／またはナノ粒子薬物担体を含む医薬製剤の有効量を投与することを含むことができ、その際、前記ナノ粒子薬物担体及び／または前記医薬製剤中の薬物は、抗微生物または抗ウイルス薬を含む。特定の実施形態では、感染は、院内感染を含む。特定の実施形態では、感染は、ウイルス性、細菌性、または真菌性病原体に起因する。特定の実施形態では、感染は、血流感染（BSI）、肺炎（例えば、人工呼吸器関連肺炎（VAP））、胃腸感染、尿路感染（UTI）、手術部位感染（SSI）、または皮膚感染を含む。特定の実施形態では、感染は、*Staphylococcus aureus*（例えば、血液感染）、*Escherichia coli*（例えば、UTI）、*Enterococci*（例えば、血液、UTI、創傷）、*Pseudomonas aeruginosa*（例えば

10

20

30

40

50

、腎臓または呼吸器感染)、*Mycobacterium tuberculosis* (例えば、肺)などの病原体に起因する。特定の実施形態では、感染は、ウイルス感染(例えば、HIV、B型肝炎、C型肝炎など)である。

【0334】

特定の実施形態では、感染は、薬剤耐性病原体に起因する。例示的な薬剤耐性病原体には、これらだけに限定されないが、メチシリン耐性*Staphylococcus aureus* (MRSA)、バンコマイシン耐性*Enterococcus* (VRE)及び多剤耐性*Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB)、及び*Klebsiella pneumoniae*カルバペネマーゼ産生細菌(KPC)が含まれる。

10

【0335】

これらの処置方法の様々な実施形態では、ナノ粒子薬物担体及び/または医薬製剤を、静脈内投与、動脈内投与、脳内投与、髄腔内投与、経口投与、エアロゾル投与、吸入による投与(鼻腔内及び気管内送達を含む)、カニューレによる頭蓋内投与、ならびに皮下または筋肉内デポー沈着からなる群から選択される経路によって投与する。特定の実施形態では、ナノ粒子薬物担体及び/または医薬製剤を、注射として、IVドリップバッグから、または薬物送達カニューレを介して投与する。様々な実施形態では、対象は、ヒトであり、他の実施形態では、対象は、非ヒト哺乳類である。

【0336】

キット。

20

特定の実施形態では、キットは、病態(例えば、がん、微生物感染、ウイルス感染など)を処置するための、本明細書に記載の脂質二重層コーティングされたナノ粒子薬物担体を含有している。キットは典型的には、本明細書に記載の薬物負荷されたシリカソーム及び/または本明細書に記載の薬物負荷されたシリカソームを含む免疫複合体を含む。特定の実施形態では、シリカソームは、イリノテカンを含む。特定の実施形態では、シリカソームはiRGDペプチドに結合されているが、他の実施形態では、キットは、薬物(例えば、イリノテカン)負荷されたシリカソームまたはシリカソーム免疫複合体と同時投与するために製剤化された別のiRGDペプチドを含む。

【0337】

加えて、特定の実施形態では、キットは、薬物負荷されたシリカソームまたはシリカソーム免疫複合体の使用手段(例えば、膵臓癌、胃癌、子宮頸癌、卵巣癌などのための治療薬としての)を開示する説明材料を含んでよい。

30

【0338】

加えて、キットは任意選択で、本明細書に記載のナノ粒子薬物担体を例えば、単独で、または組合せで、様々ながんを処置するために使用するための用法(例えば、プロトコル)を示すラベル及び/または説明材料を含む。説明材料はまた、推奨投与量、禁忌(counterindication)の説明(複数可)などを含んでよい。

【0339】

様々なキットにおける説明材料は典型的には、記載または印刷された材料を含むが、これらは、それらに限定されない。そのような説明を保存し、それらを末端使用者に伝達することができる任意の媒体が、本発明では企図されている。そのような媒体には、これらだけに限定されないが、電子記憶媒体(例えば、磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップ)、光学媒体(例えば、CD-ROM)などが含まれる。そのような媒体は、そのような説明材料を提供するインターネットサイトへのアドレスを含んでもよい。

40

【実施例】

【0340】

次の実施例を、例示のために提供するが、これは、特許請求の範囲に記載の発明を限定するものではない。

【0341】

実施例1

50



脂質コーティングされたメソ多孔性シリカナノ粒子によるイリノテカン送達、膵臓癌で、リポソームを超える有効性及び安全性の改善を示す

リポソーム担体はイリノテカンなどの高度に毒性な薬物の安全性を改善することに失敗し得るという問題によって、本発明者らは、メソ多孔性シリカナノ粒子 (MSNP) に施与された担持脂質二重層 (LB) を使用して、これが、より安定な担体 (リポソームよりも) をもたらすかどうかを判断することに関心を持った。薬物パッケージングのために使用することができる大きな内部表面積、調節可能な空孔サイズ、担体安定性、及び薬物放出能の制御によって、MSNPは、がん治療のための多用途で多機能のナノ担体プラットフォームを構成することが実証されている (Lu et al. (2007) Small, 3

: 1341 - 1346; Slowing et al. (2008) Adv. Drug Deliv. Rev. 60: 1278 - 1288; Meng et al. (2010) J. Am. Chem. Soc. 132 (36): 12690 - 12697; Lee et al. (2010) Angew. Chem. 122: 8390 - 8395; Meng et al. (2011) ACS Nano, 5 (5): 4131 - 4144; He and Shi (2011) J. Mater. Chem 21: 5845 - 5855; Gao et al. (2011) ACS Nano, 5: 9788 - 9798; Li et al. (2012) Chem. Soc. Rev. 41: 2590 - 2605; Tang et al. (2012) Adv. Mat. 24 (12): 1504 - 1534; Meng et al. (2013) ACS Nano, 7 (2): 994 - 1005; Tarn et al. (2013) Acc. Chem. Res. 46 (3): 792 - 801; Meng et al. (2013) ACS Nano, 7 (11): 10048 - 10065; Argyo et al. (2014) Chem. Mater. 26: 435 - 451; Meng et al. (2015) ACS Nano, 9 (4): 3540 - 3557)。さらに、MSNPは、生分解性であり、広範な動物試験において安全であることが判明している (Meng et al. (2011) ACS Nano, 5 (5): 4131 - 4144; Tang et al. (2012) Adv. Mat. 24 (12): 1504 - 1534; Meng et al. (2013) ACS Nano, 7 (2): 994 - 1005; Tarn et al. (2013) Acc. Chem. Res. 46 (3): 792 - 801; Meng et al. (2013) ACS Nano, 7 (11): 10048 - 10065; Meng et al. (2015) ACS Nano, 9 (4): 3540 - 3557; Lu et al. (2010) Small, 6 (16): 1794 - 18050

。浸漬によって、イリノテカンまたはカンプトテシンをMSNPに導入することが可能であるが、この方法は比較的、非効率的であり (負荷容量 < 10 重量%) (Lu et al. (2007) Small, 3: 1341 - 1346; He et al. (2010) Biomaterials 31: 3335 - 3346)、不十分な薬物保持をもたらす (Meng et al. (2010) J. Am. Chem. Soc. 132 (36): 12690 - 12697)。しかしながら、本発明者らは、担持されたLBによって、急速GEM封入のために使用することができるバイオフィルム技術を開発した (Meng et al. (2015) ACS Nano, 9 (4): 3540 - 3557)。粒子表面とのリポソーム相互作用及び融合 (Liu, et al. (2009) J. Am. Chem. Soc., 131 (22): 7567 - 7569; Liu, et al. (2009) J. Am. Chem. Soc., 131 (4): 1354 - 1355) またはEtOH分散された脂質溶液を利用する溶媒交換 (Cauda et al. (2010) Nano Lett. 10: 2484 - 2492) を含むいくつかのLBコーティング手順が公開されているが、バイオフィルム技術の使用は、より再現可能で完全なコーティング、急速封入、及び担体安定性の改善をもたらす (Meng et al. (2015) ACS Nano, 9 (4): 3540 - 3557)。これは、LB-MSNPが最高でGEM 40 重量%の負荷容量を達成することを可能にするだけでなく、LBに組み込むことができるパクリタキセル (PTX) の同時送達も可能にしている (同書)。これは、本発明者らが、マウスにおける同所ヒトPDACモデルでのPDAC処置のために、相乗的かつレシオメ

10

20

30

40

50

トリックに設計された担体を開発することを可能にした（同書）。最近、Zhang et al. が、イリノテカンを送達するためのポリマー-脂質担持MSNを報告したが、薬物負荷は比較的低い（すなわち、約16重量%）（Zhang et al. (2014) Biomaterials, 35:3650-3665）。

#### 【0342】

この実施例では、本発明者らは、特に、プロトン化剤を封入するためにLBを使用する、LB-MSNプラットフォームのための新規の設計特徴を導入する；これは、薬物の弱塩基性特性（ $pK_a = 8.1$ ）を利用して、高イリノテカン薬物負荷の遠隔負荷を可能にする。さらに、担持LBの能力の上昇はまた、本発明者らが、リポソーム同等物（非担持LB小胞が捕捉剤、トリエチルアンモニウムスクロースオクタスルファート（TEASOS）によってイリノテカンを遠隔負荷するために使用された）との比較分析を行うことを可能にした（Drummond et al. (2006) Cancer Res., 66(6):3271-3277; Von Hoff et al. (2013) Br. J. Cancer, 109(4):920-925）。MSN担体は、確固たる同所PDACモデルにおいてリポソーム製剤よりも高い負荷容量及び腫瘍死滅を達成しただけでなく、担体安定性の改善及び漏出の減少によって、イリノテカン毒性も防いだ。これは、LBコーティングされた担体によって、高毒性化学療法薬の毒性を減少させるための革新的なアプローチをもたらし、これは、GEM処置の失敗を留保するのではなく（リポソーム担体を使用するための現行のFDA改善指示）、PDACのための第一選択処置オプションとしてイリノテカンを使用することを可能にする。

#### 【0343】

##### 結果

コーティングされたLB及びプロトン勾配を使用することによる、MSNへの高イリノテカン負荷。

本発明者らの最初の試みは、急速かつ均一な空孔密閉をもたらすLB被覆によってイリノテカンを送入するMSN担体を生産することであった（Meng et al. (2015) ACS Nano, 9(4):3540-3557）。これは、イリノテカン22重量%（MSN重量に対して）の受動的捕捉を可能にした。負荷容量をさらに改善するために、本発明者らはまた、LBを越えて拡散することができる両親媒性イリノテカン、空孔内に保持される親水性誘導体に変換するプロトン化剤の捕捉について決定した（図1A、パネルA1）。本発明者などは、この捕捉手順を、リポソームにおいて、弱塩基性薬物、例えば、GEM及びイリノテカンの有効で重要な封入のために使用した（Chou et al. (2003) J. Biosci. Bioeng., 95(4):405-408; Meng et al. (2013) ACS Nano, 7(11):10048-10065; Haran et al. (1993) Biochim. Biophys. Acta, Biomembr., 1151:201-215）。以前にMSNプラットフォームで使用されたことはないが、ポリ陰イオン性化合物、TEASOSを、イリノテカン捕捉のためにMM-398で使用した（Drummond et al. (2006) Cancer Res., 66(6):3271-3277）。TEASOSは、加水分解すると8個の $H^+$ イオン及び八価 $SO_8^{8-}$ を放出するプロトン生成剤である（図1A、パネルA2）。イオン交換クロマトグラフィーを使用して、TEASOSを生成し、これを、下記の方法セクションにおいて記載するとおり、MSNに浸漬させた（同図）。浸漬した粒子を、3:2:0.15のモル比のDSPC/コレステロール/DSPC-PEG2000からなる脂質バイオフィルムでコーティングされた丸底フラスコに導入した。最適な脂質：粒子比は、1.1:1.0であると決定された。懸濁液の音波処理は、LBコーティングされた粒子をもたらす、これは、捕捉剤を含有する（図1A、パネルA1）。これらの粒子をただちに、イリノテカン溶液中でインキュベートして、薬物が、 $SO_8^{8-}$ と会合してゲル様沈澱物として、空孔内に移入、プロトン化、及び捕捉されることを可能にした（図1A、パネルA1及びA2、図1B）。これは、本発明者らが、最高80重量%のイリノテカン負荷容量を達成することを可能にし（図1B）、これは、

以前に実証されたとおり (Meng et al. (2015) ACS Nano, 9 (4) : 3540 - 3557)、 $850 \text{ m}^2 / \text{g}$  の総面積及び約  $0.7 \text{ cm}^3 / \text{g}$  の空孔体積では、多孔性担体の理論最大負荷容量 (約 100 重量%) に近い。その後の試験は、イリノテカン 50 重量% を含有する粒子で行った。

#### 【0344】

TEAGSOS を使用して、イリノテカン負荷された LB-MSN (Ir-LB-MSN) の有効性及び安全性をリポソーム担体と比較するために、リポソームを、MM-398 の手順と類似の手順によって構築した (図 1A、パネル A3) (Drummond et al. (2006) Cancer Res., 66 (6) : 3271 - 3277)。これは、約 40 重量% イリノテカン負荷容量を有するリポソーム (「Ir-リポソーム」と名付けられる) をもたらした; これは捕捉剤を用いないリポソーム (約 5 重量%) を生成するよりもかなり高い (図 1B)。低温電子顕微鏡法 (cryoEM) は、リポソーム及び LB-MSN でそれぞれ約 75 及び約 80 nm の粒径を明らかにした (図 1C)。高倍率 cryoEM イメージによって、無傷の約 7 nm 厚の二重層による Ir-LB-MSN の均一なコーティングが存在することが確認された。低倍率 cryoEM イメージは、LB が粒子の > 99% で無傷であったことを示した (図 11)。これによって、1 ステップ封入プロトコルの再現性が確認され、これは、MSN 二重層コーティングの他の方法を上回る著しい前進を有する (Meng et al. (2015) ACS Nano, 9 (4) : 3540 - 3557)。

#### 【0345】

本発明者らの主な仮定は、LB-MSN が、リポソームと比較して担体安定性を改善できるということであるので、両方の担体を血清中でインキュベートし、凍結乾燥して、それらの薬物保持能及びイリノテカン漏出を決定した。両方の担体を、連続的かつ穏やかに振盪しながら、24 時間にわたって 37 °C で 100% 血清中でインキュベートした。血清タンパク質の吸着は、cryoEM 可視化を妨げるので、代わりに高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析を使用して、担体懸濁液中での薬物放出を決定した; これは、リポソームからの約 22% と比較して、LB-MSN による < 6% 早期イリノテカン放出を示した (図 1D)。しかしながら、90 日間にわたる 4 °C での血清非含有懸濁液中での粒子貯蔵は、両方の担体が高いコロイド安定性を有することを、少量の (< 5%) 早期薬物放出または流体力学的粒径の変化 (< 5%) と共に示した。逆に、抗凍結 (cryoprotective) 5% デキストロス溶液 40 °C での粒子凍結乾燥は、水中に再懸濁すると、担体安定性において著しい相違を示した (図 1E)。したがって、Ir-LB-MSN は、流体力学的サイズを変化させず、2.7% の薬物放出のみをもたらした一方で、リポソームは、目に見えるほど凝集し、そのイリノテカン含分の 20.8% を放出した。これによって、LB コーティングされた担体は、形態学的には同様に見えるが、LB-MSN は、リポソームよりも著しく安定していることが確認される。

#### 【0346】

LB-MSN による生体内分布、薬物動態 (PK)、及びイリノテカン送達の改善を、Kras 由来同所 PDA C モデルにおいてリポソームと比較した。生体内分布及び PK 研究を、トランスジェニック Kras<sup>LSL-G12D/+</sup>; Trp53<sup>LSL-R172H/+</sup>; Pdx-1-Cre (KPC) 動物における自発的 PDA C 腫瘍に由来するルシフェラーゼ発現細胞系を同所移植された免疫応答性 B6/129 マウスで行った (Hingorani et al. (2005) Cancer Cell, 7 : 469 - 483)。KPC 由来同所モデルは、Kras 変異、比較的豊富な間質の発現、局所組織侵襲、及び転移の発生においてヒト PDA C を模倣する (Tseng et al. (2010) Clin. Cancer Res., 16 : 3684 - 3695; Provenzano et al. (2013) Br. J. Cancer, 108 : 1 - 8; Torres et al. (2013) PLoS One, 8 : e80580)。原発性腫瘍が、同所移植部位で 2 ~ 3 週間以内に発生し、転移が約 5 週間で出現し、これは、文献と一致した (図 12) (同書)。腫瘍部位へのイリノテカン担体の生体内分布を追跡す

るために、同所移植から3週間後に、動物に、近赤外(NIR)標識(DyLight 680)リポソームまたはLB-MSN PをIV注射した(図2A)。IVイメージングを指示時点で、指示時点での標識LB-MSN Pまたはリポソーム100mg/kgのIV注射の前(第2欄)及び後(第3~6欄、図2A)に得た。これを、D-ルシフェリンの腹腔内(IP)注射を受けた動物における発生腫瘍でのルシフェラーゼ発現を検出するための生物発光IVイメージング(図2A、第1の欄)と対にした。確固たる蛍光強度が、LB-MSN P注射の2時間以内に腫瘍部位で観察され、その後、シグナルは少なくとも48時間にわたって持続した。対照的に、リポソーム(同様の標識効率を有する)を注射されたマウスでは、NIRシグナル強度は、より暗く、より急速に消失した。これは、注射後24時間後のと殺の後に動物から収集された腫瘍及び主要臓器のエキスビボイメージングによっても確認された(図2B)。エキスビボイメージングも、48時間後に実施し、これによって、リポソーム処置動物と比較して、LB-MSN Pにおけるオペレーター規定の該当領域(region of interest; ROI)における、強いNIRシグナル強度が確認された(図13)。腫瘍部位での豊富な粒子取り込みに加えて、肝臓及び脾臓も、粒子分布の主要な部位であった。肺、心臓及び腎臓では、シグナル伝達はほとんど得られなかった。腫瘍組織及び主要臓器におけるケイ素(Si)存在度を定量化する誘導結合プラズマ発光分光測定(ICP-OES)は、投与された元素Si用量全体の約3%が発生腫瘍部位に分布し得たことを実証した(図14)。これは、PDAC部位への粒子分布パーセンテージが0.2~2.4%になるリポソーム、ポリマーミセル、ゼラチン、またはMoS<sub>2</sub>/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>ナノ粒子と比較して、非常に良好な生体内分布を表している(Yoshida et al. (2012) PLoS One, 7: e39545; Yu et al. (2015) Theranostics, 5: 931-945; Cabral et al. (2011) Nat. Nanotechnol. 6: 815-823; Guo et al. (2013) Biomaterials 34: 8323-8332; Xu et al. (2013) Mol. Pharmaceutics, 10: 2031-2044)。本発明者らは、共焦点顕微鏡法によってNIR標識粒子の腫瘍内分布の可視化するための腫瘍切片も得た;これは、リポソームと比較して、LB-MSN Pでは、24時間後に腫瘍部位でのより高い粒子存在度を実証した(図2B)。腫瘍部位でのイリノテカン含有率を評価するために、薬物60mg/kgの当量を単回用量として、遊離薬物、Ir-LB-MSN P(薬物60mg/kg; 粒子用量120mg/kg)またはIr-リポソーム(薬物60mg/kg; 粒子用量150mg/kg)の形態で注射した。動物を、血液収集及び腫瘍採取のために0.5、4、24、及び48時間後にと殺した。これらの組織を、イリノテカン組織含有率を定量化するためのHPLC分析のために使用したが、これは、24時間目に、遊離薬物においてよりも、Ir-LB-MSN P及びIr-リポソームでは、5倍及び2倍高かった(図2C)。イリノテカンの循環半減期は、血漿薬物濃度のHPLC定量化によって、それぞれLB-MSN P、リポソーム、及び遊離薬物で、11、8.7、及び1.0時間と計算された(図2D)。マウスから得ることができる血液の体積のロジスティックな制約によって、本発明者らは、担体の血液滞留時間を決定することができなかった。本発明者らは、皮下PANC-1異種移植片モデルにおいて生体内分布及びPK研究も行い、遊離薬物を上回る、それぞれIr-LB-MSN P及びIr-リポソームで腫瘍薬物含有率の30倍及び4倍の上昇を観察した(図15)。本発明者らはまた、個々の臓器の薬物含有率を比較した(図16)。これは、注射後24時間目に、Ir-LB-MSN Pと比較して、Ir-リポソームでは、それぞれ肝臓、脾臓、及び腸管組織において、0.8倍、0.2倍、及び0.2倍高い薬物含有率を実証した。腎臓では、有意な差異は見られなかった。

#### 【0347】

Ir-LB-MSN Pは、同所PDACモデルにおいて、遊離薬物またはIr-リポソームよりも効率的な死滅をもたらす  
有効性評価のための用量探索スケジュールを開発するために、本発明者らは、米国国立がん研究所からのプロトコルを使用して、健康なマウスにおける最大耐量(MTD)を決定

10

20

30

40

50

した (Drummond et al. (2006) Cancer Res., 66 (6) : 3271 - 3277)。この評価は、それぞれ遊離イリノテカン、Ir - リポソーム、及び Ir - LB - MSNP で、60、295、及び 295 mg / kg の MTD を実証した (図 3 A)。40 mg / kg の薬物用量 (遊離薬物または封入薬物当量での MTD の 66 . 7 または 13 . 3 % に等しい) をその後の実験のために選択した。これらの用量は、それぞれ Ir - LB - MSNP または Ir - リポソームでは 80 または 100 mg / kg のナノ粒子用量に等しい。IV 注射を、 $2 \times 10^6$  KPC 細胞の同所腫瘍移植後 14 日目に開始した；この時、平均原発性腫瘍サイズは、約 5 mm であり、マクロ転移はなかった。IV 注射を 4 日ごとに、最高 8 回の繰り返し反復で繰り返した (図 3 B)。対照群は、IV 食塩水のみを与えられた動物を含んだ。同所腫瘍成長を IVIS 生物発光イメージングによって、設定された時点で監視した (図 3 B)。ROI におけるイメージング強度を決定するための IVIS ソフトウェアによる腫瘍成長の量的表現は、食塩水、遊離薬物、または Ir - リポソームと比較して、Ir - LB - MSNP 処置による著しく遅い腫瘍成長を実証した (図 3 B)。抗腫瘍有効性も、40 ~ 47 日目にと殺された動物から収集された腫瘍外植片におけるアポトーシスの率によって測定した。活性化 (切断された) カスパーゼ - 3 を検出するための免疫組織化学 (IHC) 染色プロトコルを利用して、本発明者らは、それぞれ遊離イリノテカンまたは Ir - リポソームでの約 6 及び約 11 % と比較して、Ir - LB - MSNP 処置されたマウスでは約 25 % のアポトーシス細胞死を観察した (図 3 C)。

#### 【0348】

代表的な IHC イメージが図 17 に示されている。本発明者らは、公式な生存試験を行うつもりはなかったが、調査の異なるステージでの生存動物の数を比較するために、47 日後のカプラン - マイヤーデータ表示を使用することが可能であった (図 18)。これは、リポソーム製剤よりも良好な Ir - LB - MSNP の生存率を含めて、遊離薬物を超える、両方の担体での生存の改善を実証した (図 18)。

#### 【0349】

動物の検死を、局所腫瘍の広がり及び転移の出現を評価するために行った (図 3 D)。胃、小腸、肝臓、脾臓、腎臓、横隔膜、及び腹壁の直接的な腫瘍侵襲に加えて、多数の巨視的転移病巣を食塩水処置された動物で見ることができ、それらの動物は出血性腹水も発症していた。遊離イリノテカンは、転移に影響を及ぼすことはできなかったが、Ir - リポソームは、転移部位で生物発光強度の中等度の低下を示した (図 3 D)。目立って対照的に、Ir - LB - MSNP 処置は、強力な阻害効果を発揮し、IVIS イメージング中に、原発性腫瘍領域外に暗い生物発光の証拠を有した (図 3 D)。これは、HPLC 分析でイリノテカンのより高い、しかし著しくはない含有率を示した腎臓の領域で特に顕著であった (図 16)。図 3 E のヒートマップは、腫瘍転移に対する処置の影響の定量的表示を示している。

#### 【0350】

リポソームではなく LB - MSNP は、マウス同所モデルにおいてイリノテカン送達の安全性を改善する。

イリノテカンが、FOLFIRINOX 毒性に主に寄与するので、封入送達によって薬物毒性を減少させる可能性が、主な試験の目的である。MTD 評価は、両方の担体が急性致命的用量を遊離薬物の約 5 倍に増加させることができることを示した (図 3 A)。封入薬物送達 (図 3 B) によるイリノテカン毒性に対応するために、肝臓、胸骨骨髓、及び腸管組織を有効性試験においてと殺された動物から収集した。これらは、PDAC 患者におけるイリノテカン毒性での主な標的臓器である (Conroy et al. (2011) N. Engl. J. Med. 364 (19) : 1817 - 1825 ; Ueno et al. (2007) Cancer Chemother. Pharmacol. 59 (4) : 447 - 454 ; Loupakis et al. (2013) Br. J. Cancer, 108 (12) : 2549 - 2556)。肝臓の組織学的検査は、遊離薬物で処置された動物における重篤で広範な肝細胞壊死を実証した (図 4 A)。これは、肝細胞における核濃

10

20

30

40

50

縮及び断片化核の存在に反映される (Ziegler et al. (2004) *New s Physiol. Sci.* 19:124-128)。肝臓損傷の重症度がIr-リポソームによって多少低下したが、広範な肝壊死が観察された(図4A)。対照的に、Ir-LB-MSN P処置された動物は、壊死を含まず、僅かな脂肪症、可逆的薬物誘導ストレス応答のみを示した(図4A)(King and Perry (2001) *Oncolog ist*, 6:162-176; Maor and Malnick (2013) *Int. J. Hepatol. Art*:815105)。組織学的データは、IHC分析によっても確認され、その際、肝臓組織が、クッパ細胞(KC)を(FITC標識抗F4/80抗体で)染色するために使用され、アポトーシス細胞は、RITC標識抗体で(切断カスパーゼ-3を認識)、細胞核は33342(青色色素)で検出された(図4B)。蛍光顕微鏡下での染色切片の検査は、遊離薬物で処置された動物の肝臓全体での広範なアポトーシスを実証した。Ir-リポソームでの処置を受けた動物は、より少ないアポトーシスを実証し、これは往々にして、KCまたは隣接肝組織を含んだ。対照的に、Ir-LB-MSN Pで処置された動物の肝臓において、アポトーシスは見られなかった。

#### 【0351】

GI管のH&E染色は、処置群のいずれにおいても、毒性の顕微鏡証拠を明らかにしなかったが、切断されたカスパーゼ-3でのIHC染色は、遊離薬物によるアポトーシス細胞の存在及び腸絨毛の鈍化を実証した(図4C)。Ir-リポソームでの処置は絨毛を鈍化からは保護したが、IHC染色は、先端腸細胞におけるアポトーシスの存在を明らかにした。これは、いずれのアポトーシスまたは絨毛の損傷ももたらさなかったIr-LB-MSN Pでの処置とは明らかに対照的である(図4C)。

#### 【0352】

骨髄毒性を、動物に、上記のとおり40mg/kgのイリノテカン用量当量の3回の注射を与える別の実験で試験した。と殺の後に、胸骨骨髄を、H&E染色によって骨髄毒性を評価するために収集した(図4D)(Iusuf et al. (2014) *Mol. Cancer Ther.* 13:492-503)。遊離薬物またはIr-リポソームで処置した動物は広範な骨髄損傷を示し、骨髄腔の<30%が造血(ematopoietic)細胞によって充満していることによって証拠付けられたが(Travlos (2006) *Toxicol. Pathol.* 34:566-598)、Ir-LB-MSN P処置された動物では、骨髄細胞性の変化はなかった(図4D)。さらに、遊離薬物またはIr-リポソームによる骨髄への損傷は、末梢血好中球減少症を随伴したが、Ir-LB-MSN P処置は、好中球数の無視できる低下を示した(図19)。すべて考慮すると、これらのデータは、Ir-LB-MSN Pでの処置では全身及び標的臓器毒性の著しい低下を実証したが、リポソーム担体はなお、重大な臓器毒性を示す。

#### 【0353】

##### 考察

本発明者らは、高用量イリノテカン負荷及び送達のために、担持LB及びプロトン生成捕捉剤を使用して、特注設計されたメソ多孔性シリカナノ粒子プラットフォームを開発し、それを、免疫適格性マウスにおけるKPC由来膵臓癌モデルで試験した。同じ負荷手順及び捕捉剤(TEAGSOS)を使用して、社内合成したMM-398リポソーム同等物と比較して、担体の安定性及び負荷容量の改善は、生体内分布、循環半減期、及びイリノテカンの薬物腫瘍含有率を改善した。Ir-LB-MSN Pは、原発性腫瘍部位での腫瘍死滅の誘導においてより有効であるだけでなく、転移を処置するためにも、より活性であった。同様に重要なことに、LB-MSN P担体は、著しい全身毒性を誘導しなかったが、これは、骨髄、GI管、及び肝臓に対して有害な影響を有したリポソームとは際立って対照的である。本発明者らは、処置有効性の維持を伴った毒性低下を、リポソームの担体能力と比較した場合のLB-MSN Pの担体能力の上昇に帰している。したがって、LB-MSN P担体は、PDACの処置にイリノテカンを導入するための革新的なアプローチを示しており、これは、現在は、最新のFDA改善リポソーム担体のための事例であるようなGEM処置に失敗した患者のための留保ではなく、第一選択の検討として、この薬物の

使用を促進する可能性を含んでいる。

#### 【0354】

本発明者らは、リポソーム同等物との形態学的類似点を有する、イリノテカンのための強固なMSNP担体を開発している。しかしながら、無傷の担持LBによって得られる優れた薬物封入に加えて、LB-MSNPは、結合及び/または静電相互作用の結果として、多孔性シリカ側壁に対する密な薬物パッケージングも可能にする(Tarn et al. (2013) Acc. Chem. Res. 46(3): 792-801; Meng et al. (2010) ACS Nano, 4: 4539-4550; Ashley et al. (2011) Nat. Mater., 10: 389-397)。これは、本発明者らが、イリノテカン負荷容量の改善を達成することを可能にしたが、このことは、リポソームと比較して、同所腫瘍部位での優れた死滅効率をもたらす。負荷容量の改善は、担持LBの安定性によってもさらに支援され、これは、血液循環及び腫瘍部位への生体内分布の間に、リポソーム二重層と比較して、カーゴ保護を改善する。本発明者らは、担持LBの変動の低下が、おそらく粒子表面との強固な静電及びファンデルワールス相互作用の結果として、非担持脂質二重層(リポソーム)との血清タンパク質相互作用による脂質喪失を減少させると提唱する。担持LBはまた、担体を補体媒介溶解及び血流中で生じるせん断力から守り得る(Liu et al. (2000) In: Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 172(1-3): 57-67; Heurtault et al. (2003) Biomaterials, 24(23): 4283-4300; Ashley et al. (2011) Nat. Mater., 10: 389-397; Liang et al. (2004) J. Colloid Interface Sci. 278: 53-62; Anderson et al. (2009) Langmuir, 25: 6997-7005; Michel et al. (2012) Int. J. Mol. Sci. 13: 11610-11642; Wang et al. (2014) Small 10: 3927-3931)。例えば、ドキソルピシン負荷されたDOPCリポソームは、模擬血清含有生物流体環境中で、37℃で24時間以内に約40%の薬物漏出を示す(Ashley et al. (2011) Nat. Mater., 10: 389-397)。これは、ナノ担体として有効であるが、Ir-リポソームは、全血清中で、または粒子凍結乾燥及び再懸濁後に、Ir-LB-MSNPよりも著しく安定性が低いという本発明者らの発見に従うものである(図1D及び1E)。Ir-リポソームからの高度に毒性のトポイソメラーゼ阻害薬の早期放出は、動物試験において、骨髄、肝臓、及び小腸において高率の毒性も随伴し、これは、Ir-LB-MSNPの保護効果とは全く異なる。したがって、リポソームとの形態学的類似性に関わらず、LB-MSNP担体は、有効性及び薬物毒性の両方の観点から、リポソームイリノテカン送達を超える明らかな利点を提供する。

#### 【0355】

Ir-LB-MSNPによる骨髄及び腸管毒性の低下は、最近、FDA承認のMM-398リポソーム製剤、Onivydeが、PDAC患者の処置中の重篤な好中球減少症及び下痢の可能性についての黒枠警告と共に販売されているという観点から留意すべきである(例えば、[www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm468654.htm](http://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm468654.htm); [www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2015/207793LB.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2015/207793LB.pdf)を参照されたい)。その警告は、致命的好中球敗血症が患者の0.8%で観察され、重篤かつ生命を脅かす好中球減少性発熱が3%で起こったことを述べている([www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2015/207793LB.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2015/207793LB.pdf))。生命を脅かす好中球減少症は、5-フルオロウラシル及びロイコボリンと組み合わせてOnivydeを与えられた患者の20%で観察された(同書)。同じ薬物の組合せはまた、処置された対象の13%で重篤な下痢を引き起こした(同書)。本発明者らは、比較のためにOnivydeを使用しなかったが、イリノテカン負荷のためにTEASOSを使用する社内リポソーム

10

20

30

40

50

製剤は、遊離薬物と同様に、重大な骨髄及び腸管毒性を随伴した。同様の効果は、Ir-LB-MSNプラットフォームでの処置中には見られなかった。

#### 【0356】

NIR標識粒子及びFITC標識抗F4/80抗体を使用して共焦点顕微鏡法によって実証されたとおり、MSN及びリポソーム担体の両方が肝臓においてKCによって捕捉されたことは興味深い(図示せず)。直接的なインビボ実証を提供することは困難であるが、本発明者らは、LBの分解及びイリノテカン放出が、KCにおける酸性エンドソーム/リソソームのコンパートメントで始まると提唱する(Hwang et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030-4034; Derksen et al. (1988) Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg. 971: 127-136; Kolter and Sandhoff (2010) FEBS Lett. 584: 1700-1712)。リポソームのより急速な崩壊は、なぜ、豊富なIr-LB-MSNの存在と比較して、まばらなNIR標識粒子のみがIr-リポソームを注射された動物で観察されたかを説明し得た(図2B)。次いで、担体崩壊の割合は、バースタンダー肝細胞への薬物放出の割合を決定し得た。これは、リポソーム担体からのイリノテカンの破裂放出が、CYP 3A及びウリジンジホスファート-グルクロノシルトランスフェラーゼ(UGT1A1)によって行われる薬物の肝代謝を圧倒し得た可能性を高めている(Mathijssen et al. (2001) Clin. Cancer Res. 7: 2182-2194)。代謝の低下は、非代謝薬物のより高い保持をもたらし得、これは、図4Aに示されているとおり、肝細胞損傷及び壊死につながる。これは、Ir-LB-MSNと比較して、Ir-リポソームで処置された動物の肝臓組織における、コンジュゲートされていないイリノテカンの著しく高い含有率、すなわち、IV注射後24時間目での26対15%ID/gを説明し得る(図16)。これらの所見は、Ir-LB-MSN処置動物においてアポトーシスが存在しないことと比較して、Ir-リポソームでの処置中のKC及び隣接肝細胞における高い細胞死亡率を実証しているKC及び活性化カスパーゼ-3のIHC染色とも適合する(図4B)。図4Eの図は、肝細胞アポトーシス及び壊死の規模の決定における担体安定性の役割及びKCからのイリノテカン放出の割合に関する本発明者らの仮説を概説している(Zhao et al. (2015) In vivo. Sci. Bull., 60: 3-20)。瀕死状態の動物から得ることができた血液の量が限られたため、肝酵素を測定することは不可能であった。

#### 【0357】

GEMは往々にして、PDACのための第一選択治療として役立ち、6-8カ月の生存結果を有する(Burris et al. (1997) J. Clin. Oncol., 15: 2403-2413; Teague et al. (2014) Ther. Adv. Med. Oncol. 7: 68-84)。FOLFIRINOXは、生存を約11カ月に改善することができるが、重篤な薬物毒性の頻繁な発生(主にイリノテカン及びオキサリプラチンによる)が、第一選択治療としてのその使用を排除する。したがって、FOLFIRINOXは多くの場合に、良好なパフォーマンスステータスを有する患者のために留保される。残念なことに、この位置づけは、第一選択治療として認められておらず、重篤な下痢及び好中球減少症の黒枠警告を含むOnivydeの導入で変わっていない。PDAC患者の約80%が、進行した疾患段階にあるので、第一選択処置としてFOLFIRINOXレジメンで薬物を使用することは有利であろう。本発明者らは、比較分析のためにOnivydeを使用しなかったが、Ir-LB-MSNプラットフォームは、本発明者らの同等の社内Ir-リポソーム製剤よりも、少ない全身毒性で有効かつ生体適合性であった。したがって、本発明者らは、Ir-LB-MSNプラットフォームが、PDACにおける第一選択治療のために開発され得るであろうと提唱する。本発明者らは最近、PDACモデルにおけるGEM及びPTXのための二重送達MSN担体の実行可能性を実証している(Meng et al. (2015) ACS Nano, 9(4): 3540-3557)。各処置アプローチは、実施の前に、設計の複雑さ、経費、及び良好な製造



実行に対する影響を慎重に考慮すべきである (Sugahara et al. (2010) Science, 328:1031-1035)。

【0358】

脂質コーティングされたMSNPは、カーゴ送達のためにインビトロ及び/またはインビボで有効であることが示されているが (Meng et al. (2015) ACS Nano, 9(4):3540-3557; Zhang et al. (2014) Biomaterials, 35:3650-3665; Ashley et al. (2011) Nat. Mater., 10:389-397; Ashley et al. (2012) ACS Nano, 6:2174-2188; Dengler et al. (2013) J. Controlled Release, 168:209-224)、これは、どの  
10 ようにプロトン化剤をこの担体プラットフォームの負荷効率を上昇させるために使用することができるかの最初の実証である。本発明者らはまた、プロトン勾配によってLB-MSNPに負荷することができる弱塩基性薬物の包括的なリストを特定している。これらのカーゴ分子の一般的な特徴には、次の化学的特性が含まれる:

(i) 第一級、第二級、第三級または第四級アミン (複数可) を含む有機分子化合物;

(ii) プロトン化及びLBの後ろでの捕捉を可能にする  $pK_a < 11$  (Zucker et al. (2009) J. Control. Release, 139(1):73-80; Cern et al. (2012) J. Control. Release, 160(2):147-157; Xu et al. (2014) Pharmaceut. Res.  
20 31(10):2583-2592);

(iii) LBを越えての拡散を可能にする5~25mg/mLの水溶性及び両親媒性;

(iv) -3.0~3.0のオクタノール/水分配係数またはlogP値; 71, 72

(v) MSNP空孔への進入を可能にするMSNP空孔サイズ(2~8nm)よりも小さい幾何学的サイズを有する適切な分子量 (Li et al. (2012) Chem. Soc. Rev. 41(7):2590-2605; Tang et al. (2012) Adv. Mat. 24(12):1504-1534; Tarn et al. (2013) Acc. Chem. Res. 46(3):792-801)。

【0359】

すべてを包括するものではないが、有望な化学療法薬のリストには、トポイソメラーゼI阻害薬、トポテカン; 抗腫瘍アンスラサイクリン抗生物質、ドキソルビシン及びミトキサントロン; 有糸分裂阻害薬、ビンブラスチン及びビンORELビン; チロシンキナーゼ阻害薬、イマチニブ、オシメルチニブ、及びスニチニブなどが含まれる。結腸、乳房、肺、肝臓、  
30 膠腫、黒色腫などの追加のがん種の処置の問題を含めて、上記薬剤の1つ、またはその組み合わせをパッケージング及び送達する能力は、本発明者らの多機能LB-MSNPプラットフォームの幅広い有用性を増強する。上記リストの薬物組合せを単一の担体に同時パッケージングすることも可能である。例えば、本発明者らが本発明者らのGEM/PTX同時送達プラットフォームで達成することができた成功に基づき (Meng et al. (2015) ACS Nano, 9(4):3540-3557)、相乗的及びレシ  
40 オメトリック送達のために、FOLFIRINOXレジメン中の薬物 (例えば、オキサリプラチンとイリノテカン) を組み合わせることを考慮することができる。さらに、本発明者らのLB-MSNPによる薬物負荷は、非がん用途、例えば、感染症のための抗生物質、例えば、シプロフロキサシン、レボフロキサシン、またはHIV抗レトロウイルス薬 (例えば、フマル酸テノフォビルジソプロキシル) をカプセル化するために使用することができる。TEAgSOSに加えて、膜貫通pH勾配は、酸性緩衝剤 (例えば、クエン酸塩) (Chou et al. (2003) J. Biosci. Bioengineer.,  
95(4):405-408; Nichols et al. (1976) Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 455(1):269-271)、プロトン生成解離塩 (例えば  $(NH_4)_2SO_4$ ) (Haran et al. (1993) Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1151(2):201-215  
50

; Maurer - Spurej et al. (1999) Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1416 (1) : 1 - 10; Fritze et al. (2006) Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1758 (10) : 1633 - 1640)、または金属塩からのイオノフォア媒介イオン勾配 (例えば、A23187及びMnSO<sub>4</sub>) (Messerer et al. (2004) Clinical Cancer Res. 10 (19) : 6638 - 6649; Ramsay et al. (2008) Eur. J. Pharmaceut. Biopharmaceut. 68 (3) : 607 - 617; Fenske et al. (1998) Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1414 (1) : 188 - 204) によって生成することもできることも、指摘に値する。さらに、LB - MSNPへの両親媒性弱酸負荷を改善するために酢酸カルシウム勾配を使用するなど、薬物負荷のために逆pH勾配を生成することが可能であり、これは、リポソームで利用されている戦略である (Avnir et al. (2008) Arthritis & Rheumatism, 58 (1) : 119 - 129)。

#### 【0360】

##### 結論

まとめると、本発明者らは、リポソームとのその形態学的類似性にも関わらず、同等のリポソーム製剤または遊離薬物よりも優れた生体親和性及び治療効力をもたらす、イリノテカンのためのMSNP送達プラットフォームを開発した。この新たな担体を使用すると、イリノテカン送達及びFOLFIRINOXレジメン中の薬物組合せを、PDACのための第一選択処置の地位へと進めることができるであろう。

#### 【0361】

##### 方法

##### 物質。

オルトケイ酸テトラエチル (TEOS)、トリエタノールアミン、セチルトリメチルアンモニウムクロリド溶液 (CTAC、水中25重量%)、トリエチルアミン (TEA)、Dowex 50WX8樹脂、セファロースCL-4B、及びSephadex G-25は、Sigma-Aldrich、USAから購入した。1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DSPC)、1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ (ポリエチレングリコール) - 2000] (アンモニウム塩) (DSPE-PEG2000)、及びコレステロール (Chol) は、Avanti Polar Lipids、USAから購入した。スクロースオクタスルファート (SOS) ナトリウム塩は、Toronto Research Chemicals, Inc.、Canadaから購入した。塩酸イリノテカン三水和物は、LC Laboratories、USAから購入した。ペニシリン、ストレプトマイシン、及びダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) は、Invitrogenから得た。ウシ胎児血清 (FBS) は、Gemini Bio Productから購入した。活性化 (切断された) カスパーゼ - 3を検出するウサギmAb抗体 (カタログ番号9664) は、Cell Signalingから購入した。Matrigel Matrix Basement Membraneは、BD Bioscienceから購入した。遠心濾過フィルターユニット (カットオフ: 10K及び30K) は、EMD Milliporeから購入した。すべての薬品を、さらに精製せずに直接使用した。

#### 【0362】

捕捉試薬を使用してのイリノテカン負荷されたLB - MSNPの調製。

##### MSNPの合成。

MSNP核を、本発明者らの以前のゾル/ゲル手順をやや変更することによって合成した (Meng et al. (2015) ACS Nano, 9 (4) : 3540 - 3557)。MSNP約500mgのバッチを合成するために、CTAC50mLをH<sub>2</sub>O150mLと、500mL円錐フラスコ内で混合し、続いて、350rpmで15分間にわたっ

て85 で撹拌した。これに、10%トリエタノールアミン8mLの添加を30分間にわたって、同じ温度で続けた。次いで、シリカ前駆体、TEOS7.5mLを、ぜん動ポンプを使用して1mL/分の速度で滴下添加した。溶液を350rpm、85 で20分間にわたって撹拌すると、約65nmの一次サイズを有する粒子が形成した。界面活性剤を、粒子をメタノール/HClの混合物(500:19v/v)で室温で24時間にわたって洗浄することによって除去した。粒子を10000rpmで60分間にわたって遠心分離し、メタノールで3回洗浄した。

#### 【0363】

捕捉剤TEASOSの合成。

TEASOSを、市販のSOSナトリウム塩からイオン交換クロマトグラフィーによって合成した(Drummond et al. (2006) Cancer Res., 66(6):3271-3277)。簡単に述べると、その塩500mgを脱イオン(DI)水1mLに溶かし、500mg/mLの水溶液を得た。溶液を、DI水で準備された8cm×1.5cm陽イオン性イオン交換樹脂(Dowex 50WX8)カラムに通した。SOS塩をカラムに添加し、スクロースオクタスルホン(SOS)酸に変換するために水で溶離した。酸性SOS溶離液を、5.8の最終pHに達するように、無溶媒トリエチルアミンでただちに滴定した。これは、TEASOSの形成をもたらした。塩濃度を約80mMに調節し、使用前に、冷蔵庫内で4 で貯蔵した。

#### 【0364】

TEASOS負荷及びMSNPへのLBによる捕捉。

本発明者らは、LBコーティングの使用によってTEASOSをMSNPに捕捉するための新規の方法を使用した(Meng et al. (2015) ACS Nano, 9(4):3540-3557)。合成を、空のMSNP100mgを、15/15秒オンオフ作業サイクル及び32.5Wの出力でのプローブ音波処理によって5分間にわたって水性80mM TEASOS4mL中に浸漬することによって開始した。粒子懸濁液をただちに、10mg/mLでクロロホルムに懸濁された110mgのDSPC/Chol/DSPC-PEG2000(モル比3:2:0.15)の混合物を6cm丸底フラスコの底部に添加することによって得られるコーティングされた脂質バイオフィルムに添加した。これは、1.0:1.1の粒子:脂質比に等しい。室温で回転蒸発器で溶媒を蒸発させた後に、本発明者らは、約30cm<sup>2</sup>の表面積を有するバイオフィルムを得た。バイオフィルムに粒子懸濁液を添加した後に、プローブ音波処理を、15/15秒オンオフ作業サイクルで、32.5Wの出力で30分間にわたって使用した。捕捉されなかったTEASOSを、Sephacrose CL-4Bカラム(1.5×15cm)でのサイズ排除クロマトグラフィーによって、HEPES緩衝デキストロース溶液(5mM HEPES、5%デキストロース、pH6.5)を溶離のために使用して除去した。

#### 【0365】

イリノテカン負荷のための、TEASOS負荷されたLB-MSNPの使用。

イリノテカン、HEPES緩衝デキストロース(5mM HEPES、5%デキストロース、pH6.5)に10mg/mLで溶解させ、これを、TEASOS負荷された粒子と混合して、1:1(w/w)のイリノテカン/MSNP比を達成した。混合物を65 で水浴中で30分間にわたってインキュベートし、次いで、10分間にわたって氷水中でクエンチした。薬物負荷された粒子を洗浄し、15000rpmで10分間にわたって遠心分離することによって3回精製した。洗浄した粒子を、示されているとおり水、食塩水、またはPBSに再懸濁させた。

#### 【0366】

イリノテカン送達のための比較用リポソーム製剤の調製。

捕捉剤の非存在下でのLB-MSNPによるイリノテカン封入。

空のMSNP(40mg)を、音波処理と共に10mg/mLイリノテカン溶液(水中)4mLに添加し、続いて、4時間にわたって室温で撹拌した。次いで、上記と同様の組成の脂質バイオフィルムの音波処理を使用して、薬物をLBによって封入した。プローブ音

10

20

30

40

50

波処理の後に、粒子を遠心分離及び洗浄によって精製し、上記のとおり再懸濁した。

#### 【0367】

TEA8SOSを使用してのイリノテカンのリボソーム封入。

MM-398製剤の社内類似体を開発するために(Drummond et al. (2006) Cancer Res., 66(6):3271-3277; Ko et al. (2013) Br. J. Cancer, 109:920-925)、DSPC/Chol/DSPC-PEG2000を(3:2:0.015のモル比で)含有する脂質混合物212mgをエタノール0.4mLに65℃で溶解した。4ミリリットルのTEA8SOS溶液(80mM)を同じ温度で脂質エタノール溶液と混合し、続いて、水浴内で2分間にわたって音波処理した。脂質懸濁液を65℃で、0.1µm空孔サイズを有するポリカーボネート膜を通して15回押し出した。捕捉されなかったTEA8SOSを、サイズ排除クロマトグラフィーカラム(Sephacryl S-4B)によって、HEPES-緩衝デキストロース溶液(5mM HEPES、5%デキストロース、pH6.5)で溶離して除去した。HEPES緩衝デキストロース(5mM HEPES、5%デキストロース、pH6.5)中で10mg/mLで調製されたイリノテカン溶液をTEA8SOS負荷リボソーム懸濁液(イリノテカン/脂質=1:2.1w/w)と混合し、水浴内で65℃で30分間にわたってインキュベートした。サンプルをただちに、氷水中で10分間にわたってクエンチした。遊離薬物を、Sephadex G-25カラムを使用して、HEPES緩衝食塩水(5mM HEPES、145mM NaCl、pH6.5)で溶離して除去した。

#### 【0368】

捕捉剤の非存在下でのイリノテカンリボソーム担体の合成

本発明者らはまた、捕捉剤の代わりに受動的封入アプローチを使用して、イリノテカン送達用リボソームを合成した。簡単に述べると、脂質の混合物(脂質53mg、3:2:0.015のモル比のDSPC/Chol/DSPC-PEG2000)をエタノール0.1mLに、65℃で溶解した。1ミリリットルのイリノテカン溶液(水中10mg/mL)を、脂質エタノール溶液と65℃で混合し、続いて、2分間にわたって音波処理した。脂質懸濁液を65℃で、0.1µm空孔サイズを有するポリカーボネート膜を通して15回押し出した。薬物負荷されたりボソームを、上記と同じ方法を使用して精製した。

#### 【0369】

物理化学的特徴づけ。

この実施例で使用したすべての粒子を、形態、サイズ、サイズ分布、形状、及び表面電荷について広範に特徴づけた。LBコーティングの均一性及びその無傷性をTEM(JEOL 1200-EX)及びcryoEM(TF20 FEI Tecnai-G2)によって特徴づけた。粒径及び電位をZETAPALS機器(Brookhaven Instruments Corporation)によって測定した。これらの測定を、10%FBSを加えた水、PBS、及び細胞培養培地中に100µg/mLの粒子濃度で懸濁させたナノ粒子で行った。

#### 【0370】

各担体の薬物負荷容量を、以前に記載されたとおりに減算法によって決定した(Meng et al. (2015) ACS Nano, 9(4):3540-3557)。簡単に述べると、精製中に検出された非封入イリノテカンの量( $m_1$ )を、マイクロプレートリーダー(M5e, Molecular Device, USA)でのOD(360nm)によって、またはHPLC(Raytest, Germany)の使用によって決定した。薬物負荷容量は、 $DL C = [ \text{イリノテカン全量} (m_0) - \text{非封入イリノテカン} (m_1) ] / [ \text{粒子全量} (m \text{ M S N P または } m \text{ l i p i d} ) ] \times 100\%$ と定義された。薬物保持安定性を100%FBS中、37℃で24時間にわたって試験した。簡単に述べると、薬物負荷されたNP(イリノテカン:10mg/mL)40µLを、連続的に振盪しながら37℃で、血清1mLに添加した。遠心濾過器分離デバイス(10KのMWカットオフ)を使用して、混合物を設定された時間間隔で遠心分離した。放出されたイリノテカンマイ

クロプレートリーダーで、またはHPLCによって定量化した。NPを含まない血清濾液を対照として使用した。両方の担体の安定性も、凍結乾燥手順によって試験した。簡単に述べると、Ir-MSNPsを5%デキストロース中に懸濁させた。サンプルを-60で終夜凍結乾燥させ、-80フリーザー内で貯蔵した。貯蔵したサンプルを、穏やかなボルトックス処理によって水中に再懸濁させ、その後、懸濁溶液を、以前に記載したとおりにサイズ、電位、及び薬物放出について特徴づけた。

#### 【0371】

細胞培養。

トランスジェニックKrasLSL-G12D/+、Trp53LSL-R172H/+、Pdx1-Creマウスにおける自然発生腫瘍に由来する不死化細胞系を、Dr. UC San DiegoのAndrew Lowy博士の厚意によって得た。PANC-1細胞はAmerican Type Culture Collection (ATCC) から購入した。両方の細胞種を10%FBS、100U/mLペニシリン、100µg/mLストレプトマイシン、及び2mM L-グルタミンを含有するDMEM中で培養した。IVISシステムでのバイオルミネセンス腫瘍イメージングを可能にするために、UCLAベクターコア施設(UCLA vector core facility)において、以前に記載されたとおりに、両方の細胞に、ルシフェラーゼベースのレンチウイルスベクターを永続的にトランスフェクトした(Meng et al. (2015) ACS Nano, 9(4): 3540-3557)。単細胞クローンを選択するための限定希釈プロトコルの後に、KPC-luc及びPANC-1-luc細胞集団を、PDACモデルを開発するために使用した。

#### 【0372】

最大耐量の推定。

米国国立がん研究所のToxicology and Pharmacology Branch(<http://ntp.niehs.nih.gov/branches/tpb/default.htm>)からのプロトコルを使用して、遊離及び封入イリノテカン製剤のMTDを決定した(Drummond et al. (2006) Cancer Res., 66(6): 3271-3277)。2匹の健康な雄のBALB/cマウスに、遊離または封入イリノテカンの50mg/kg(C1用量)当量をIV注射した。これに、1.8の用量増加係数を続けて、最後の投与後から24時間以内に動物死が生じるCn用量を得た。用量探索の第2ラウンドはCn-1用量で開始し、1.15増加係数(n=2)を利用して、死亡または罹患の非存在と定義されるMTDを発見した。MTDを、6匹のマウスに注射し、それらを罹患、死亡、または>15%体重減少の無いことを決定するために15日間にわたって追跡することによって確認した。

#### 【0373】

免疫適格性マウスにおけるKPC由来同所腫瘍モデルの確立。

雌のB6/129マウス(約8週)をJackson Laboratoryから購入し、無病原体条件下で飼育した。すべての動物実験を、UCLA動物実験委員会によって承認されたプロトコルで行った。同所異種移植片を成長させるために、マウスに、イソフルランで麻酔をかけ、続いて、ケタミン50mg/kg及びキシラジン10mg/kgをIP注射した。手術部位を、切開部位の周囲1cmの範囲で剃毛し、ベタダイン及び70%エタノールで洗うことによって滅菌した。マウスを外科手術のために加温パッドの上に置き、左側腹部の切開部位を、無菌ガーゼで覆った。0.5~0.7cmの外科的切開を行って、膵臓注射部位を露出させ、続いて、27ゲージ針によって、2×10<sup>6</sup>KPC-luc細胞を含有するDMEM/マトリゲル50µL(1:1v/v)を膵臓尾部に注射した。腹膜層を吸収性縫合糸(PDS II、Ethicon)で、かつ皮膚を非吸収性縫合糸(PROLENE、Ethicon)で閉じた。マウスを、麻酔から完全に回復するまで加温パッド上で保持し、次いで、清潔なケージに移した。有効性試験を腫瘍担持マウスで、移植から約2週間後に行ったが、その時点で、原発性腫瘍は、約0.5cmまで成長しており、肉眼による腫瘍転移の証拠はなかった。生体内分布実験では、腫瘍担持マウ

スを腫瘍移植から3週間後に使用し、その時点で、原発性腫瘍は、約0.8cmのサイズまで成長していた。

#### 【0374】

IV注射されたNIR標識ナノ粒子の全身及び腫瘍内生体内分布。

IVIS (Xenogen) インビボイメージングシステムを使用して、KPC由来同所モデルにおけるNIR標識MSNPs及びリポソームの生体内分布を試験した ( $n = 3$  マウス)。NIR標識を、0.1 w/w % DyLight 680 - DMPE を、薬物を含まないリポソーム及びMSNPs担体の両方のLBに組み込むことによって行った (Meng et al. (2015) ACS Nano, 9 (4): 3540 - 3557)。腫瘍部位の生物発光イメージングのために、マウスに、D-ルシフェリン 75 mg/kg をIP注射した。粒子注射の前に、腫瘍担持マウスでの基準蛍光イメージを捕獲した。NIR標識粒子 100 mg/kg をIV注射された動物で、NIRイメージを48時間にわたって得た。動物をと殺した後に、エクスビボイメージを、切除した腫瘍及び主要臓器から得て、粒子の生体内分布を定量的に評価した。腫瘍組織の小さな切片を、OCT試薬を用いて凍結包埋し、腫瘍切片を調製するために使用した。NIR標識粒子の腫瘍内分布を、NIRレーザーを使用して共焦点顕微鏡法 (SP2 - 1P - FCS, Leica) によって試験した。同じ切片の核染色を、Hoechst 33342 色素 (青色) を使用することによって行った。LB - MSNPで処理した動物では、腫瘍組織及び主要臓器も、ICP - OESによってSi含有率を評価するために使用した。粒子生体内分布は、注射された用量全体の% (% ID) として表され、これは、個々の臓器に分散することが示され得た。腫瘍または他の正常な組織におけるイリノテカン含有率を測定するために、動物に、遊離または封入イリノテカン 60 mg/kg (粒子用量、MSNPsでは120 mg/kg 及びリポソームでは150 mg/kg) を注射し、続いて、24時間後にと殺した。HPLC分析を、採取した腫瘍組織、肝臓、脾臓、腎臓、小腸、及び血液で行って、イリノテカン含有率を決定した。

#### 【0375】

HPLC分析。

採取された腫瘍及び臓器サンプルを秤量し、氷上で均質化した。血漿または組織ホモジネート 0.1 mL を酸性溶液 0.4 mL (0.1 mol/L のリン酸/メタノール、1:4 v/v) で抽出した後に、抽出物を10秒間にわたって2回ボルテックス処理し、13000 rpm で10分間にわたって遠心分離した。Knauler Smartline ニューマチックポンプ、C18カラム、K-2600 分光光度計、及びGina データ収集ソフトウェアを含む系でHPLC分析するために、イリノテカン含有上清を0.22 µm フィルターで濾過した。1.00 mL/分の流速で送達される移動相は、3% 酢酸トリエチルアンモニウム水性緩衝液 (pH 5.5) 及びアセトニトリル (73:27 v/v) を含んだ (Noble et al. (2006) Cancer Res., 66 (5): 2801 - 2806)。20 マイクロリットルのイリノテカン含有サンプルを注射して、254 nm での薬物吸収を測定したが、典型的には4.4分に溶離された。イリノテカン標準曲線を0.05 ~ 100 µg/mL の濃度範囲で作成した。イリノテカン含有率は、組織1グラム当たりの注射用量の% (% ID/g) として表される。

#### 【0376】

KPC由来同所モデルを使用しての有効性の評価。

腫瘍担持 B6/129 マウスを、1群当たり8匹の動物を含む4つの群に無作為に割り付けた。マウスに、遊離または封入イリノテカン をIV注射して、4日ごとに40 mg/kg の用量 (すなわち、MSNPs 100 または80 mg/kg のリポソーム用量) を与えた。最高8回の注射を、28日間の観察期間にわたって投与した。食塩水注射を、陰性対照として役立てた。腫瘍量をIVISイメージングによって8日ごとに監視し、オペレーター定義されたROIで生物発光イメージング強度として定量的に表示した。群間の差異の統計的解析を、t検定 (Excelソフトウェア、Microsoft) を使用して行った。すべての生存マウスを47日目にと殺したが、その時点で、食塩水及び無薬物群の動

物はすべて死亡していた。腫瘍組織及び主要臓器（G I 管、肝臓、脾臓、心臓、肺、及び腎臓）を、エキスビボ生物発光イメージ強度の定量化のために採取した。

#### 【0377】

種々のイリノテカン製剤の毒性可能性の比較。

有効性試験の実験中に収集された主要組織（肝臓、腎臓、脾臓、胃、及び小腸）を10%ホルマリン中で固定し、続いて、パラフィン包埋した。組織切片を組織学的分析のためにH&Eによって染色し、活性化（切断）カスパーゼ-3の発現のIHC分析のためにも使用した。スライドを盲検様式で、経験豊富な病理学者が読み取った。骨髄毒性を評価するための第2のアプローチは、健康なマウスにおける40mg/kgでの遊離薬物及び担体製剤の、2日空けて3回のIV投与を使用した。動物を7日目にと殺し、胸骨を10%ホルマリン中での固定、カルシウム除去、パラフィン包埋、及びH&E染色のために使用した。本発明者らはまた、UCLA Division of Laboratory Animal Medicine (DLAM) の診断用臨床検査サービスによる示差的白血球計数のために血液を収集した。遊離薬物及び担体による示差的肝臓毒性の機構を理解するために、イリノテカン60mg/kgの用量当量の単回注射を受けたマウスを24時間後にと殺した。それぞれKC及び切断カスパーゼ-3を同定するためにFITC標識抗F4/80抗体またはRITCコンジュゲートした二次抗体を使用する、KC及び活性化カスパーゼ-3の発現の免疫蛍光染色のために、肝臓組織を凍結包埋した。Hoechst 33342色素を使用して、同じ切片で細胞核を位置限定した。染色したスライドを共焦点顕微鏡（Observer D1、Zeiss）下で検査した。

#### 【0378】

統計的解析。

群間の差異の比較分析を、両側スチューデントt検定（Excelソフトウェア、Microsoft）を使用して行った。統計的に有意な差違は $p < 0.05$ と決定された。値は、図の説明文で述べられているとおり、複数回の決定の平均 $\pm$ SDまたはSEMとして表された。

#### 【0379】

実施例2

膵臓管状腺癌（PDAC）は、5年生存率が5%未満である致命的な疾患である。現在、PDACのための第一選択の化学療法は、ゲムシタピン（GEM）（単一薬剤療法）またはロイコボリン、5-FU、オキサリプラチン、及びイリノテカンを含むFOLFIRINOXとしても公知である4剤レジメンの使用による処置を含む。FOLFIRINOXは、GEMと比較して、PDAC奏功率を上昇させているが（すなわち、31.6%対9.4%）、このレジメンは、毒性がかなり高く、したがって、良好な機能状態を有する、進行段階のPDAC患者のうちの少数に限定される（Conroy et al. (2011) N. Engl. J. Med. 364: 1817-1825）。イリノテカンが主に、骨髄（例えば、好中球減少症の発病率約60%）、さらにはG.I.T.（例えば、患者の約50%における嘔吐、下痢、悪心、食欲不振）での有害作用によって、FOLFIRINOX毒性に寄与している（Ueno et al. (2007) Cancer Chemother. Pharmacol. 59(4): 447-454）。イリノテカンの毒性の低下を含む、毒性の低いFOLFIRINOXレジメンを開発する必要性が満たされていない。

#### 【0380】

リポソーム（Messerer et al. (2004) Clin. Cancer Res., 10(19): 6638-6649; Drummond et al. (2006) Cancer Res., 66(6): 3271-3277）またはポリマーベースのナノ担体（Onishi et al. (2003) Biol. Pharmaceut. Bull. 26(1): 116-119）によるイリノテカンの送達によって示されるとおり、イリノテカンを送達するためのナノ粒子担体の使用は、この薬物の毒性の低下に、有望な解決をもたらす。前臨床レベルでは、これらのナノ担体を使用する利点には、様々なマウ

SPDACモデルの毒性低下、抗腫瘍有効性の上昇、及び生存率の増強が含まれる。現在までに、イオノフォア、A23187 (Irinophore C) またはプロトン化捕捉剤、トリエチルアンモニウムスクロースオクタスルファート (TEAGSOS) によって薬物負荷を促進するリポソーム製剤を含めて、僅かなイリノテカン担体のみが治験で試験されている。MM-398の治療効力は、多価陰イオン性捕捉剤、TEAGSOSの使用による、リポソームへのイリノテカンの封入及び捕捉に依存している。TEAGSOSは、脂質二重層を越えて拡散するイリノテカンのプロトン化をもたらし、これを、脂質二重層から出ることができない親水成分へと変換する。したがって、薬物は、リポソーム二重層による受動的封入を10倍上回る濃度で捕捉される (Drummond et al., (2006) Cancer Res., 66(6): 3271-3277)。MM-398は現在、Merrimack Pharmaceuticalsによって第3相治験中である (www.merrimackpharma.com) (Hoff et al. によるポスター・プレゼンテーション、Society for Medical Oncology, 2014)。このポスターは、//merrimackpharma.com/sites/default/files/documents/ESMOGI2014MM398.pdf) で見ることができる。AACR2012ミーティングにおいて、Merrimack社は、「MM-398は、同所転移モデルを含む膵臓癌の多数のマウスモデルにおいて、腫瘍退縮を誘導した」との声明を含むアブストラクトを公開した。皮下モデルには、BxPC3、AsPC-1、Panc-1及びMiaPaCaが含まれた。膵臓における同所移植は、BxPC3で実施された。詳細なデータは示されなかった。MM-398のIV投与は、マウスにおいて、転移性腫瘍病巣形成の阻害を含めて、様々なPDAC腫瘍モデルで完全な腫瘍退縮を誘導することが示されている (Drummond et al., (2006) Cancer Res., 66(6): 3271-3277)。MM-398、5-FU及びロイコボリンの組合せでの、第3相PDAC治験における417人の患者の処置は、5-FU及びロイコボリンを与えられたヒト対照における1.9カ月と比較して、全生存期間の増加(6.1カ月)を示した (Hoff et al., ESMO Poster, www.merrimackpharma.com)。

#### 【0381】

この実施例では、本発明者らは、リポソーム同等物と比較して優れた容量を有するナノ担体によって、イリノテカンの能動的負荷、捕捉、及び封入を達成することができる新規のメソ多孔性シリカナノ粒子 (MSNP) プラットフォームを記載する。これらの粒子の合成は、担持脂質二重層LBによる、粒子の多孔性内部へのTEAGSOSの急速な封入によって達成された。その後、イリノテカン溶液中で、これらの粒子をインキュベーションすることで、イリノテカンの能動的捕捉が可能となったが、イリノテカンは、二重層を越えて拡散し、次いで、TEAGSOSによってプロトン化される。イリノテカン負荷されたLB-MSNPと、社内合成したMM-398のリポソーム同等物との比較分析を行った。この分析は、MSNP担体による優れた負荷容量、負荷効率、及び放出プロファイルを実証した。本発明者らはまた、社内MM-398リポソームと比較して、同様のインビトロ有効性及びインビボ毒性の低下を示した。本発明者らは現在、皮下及び同所ヒトPDAC腫瘍モデルにおいてこれらの担体を比較するための動物有効性試験を行っている。

#### 【0382】

本発明者らは、イリノテカンのLB-MSNP媒介ナノ封入及び標的化送達、骨髄及びGITにおけるイリノテカンの毒性の低下を含む毒性の低下によって、FOLFIRINOXの臨床使用を改善すると考えている。この発見は、負荷容量及びがん部位での十分な薬物放出によってリポソーム担体よりも優れ得る、IV注射可能で、効率的で、生体適合性で、かつ商業的に競争力のあるイリノテカン製剤を可能にする。特定の実施形態では、本発明を、がん処置、さらには他の疾患の処置に使用することができる他の弱塩基性分子 ( $pK_a > 7.0$ ) を送達するための有効な設計原理として使用することもできるであろう。

#### 【0383】

10

20

30

40

50



次の記載では、イリノテカン負荷のための担体設計のいくつかの実施形態、さらにはLB-MSNP担体と、MM-398と同様の社内合成されたリポソーム製剤との比較分析を説明する。

#### 【0384】

追加の能動的負荷を達成するための捕捉剤も含む、LB-MSNPによるイリノテカン封入。

LB-MSNPによるイリノテカンの有効な負荷を得るために、本発明者らは、本発明者らが最近発見したバイオフィーム手順を、捕捉剤、TEAGSOSを初めに封入することによって、薬物負荷のために適合させ、そして、この捕捉剤、TEAGSOSが、担持LBを越えて拡散する薬物をプロトン化して空孔に進入させることによって、イリノテカン移入及び保持を担う。これは、密閉されたMSNP空孔へのイリノテカンの安定な捕捉をもたらし、平衡が達成されるまで、LBを越えてのさらなる拡散のために勾配を生成する。これは実際に、多孔性内部の広い表面積及び捕捉剤媒介薬物保持の援助によって、薬物が高濃度で蓄積することを可能にする。特定の実施形態では、合成手順は、4つの部分、すなわち、MSNP核の合成、TEAGSOS負荷されたLB-MSNPの合成、TEAGSOSの作用による、粒子へのイリノテカンの能動的負荷、及び最後に、担体の精製からなる。

#### 【0385】

薬品：

オルトケイ酸テトラエチル(TEOS、99.0%、Lot#BCBK9540V)、トリエタノールアミン(99.0%、Lot#BCBH9036V)、セチルトリメチルアンモニウムクロリド溶液(CTAC、水中25重量%、Lot#STBC7888V)、トリエチルアミン(TEA、99.0%、Lot#SHBD9006V)は、Sigma-Aldrich、USAから購入した。ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC、>99.0%、Lot#180PC-147)、メトキシポリ(エチレン)グリコール(PEG2000)誘導体化ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(DSPE-PEG2000、>99.0%、Lot#180PEG2PE-122)、及びコレステロール(Chol、>98.0%、Lot#CH-94)は、Avanti Polar Lipids、USAから購入した。スクロースオクタスルファートナトリウム塩(Lot#1-TMH-175-4)は、Toronto Research Chemicals, Inc、Canadaから購入した。塩酸イリノテカン三水和物(IRIN、99.0%、Lot#RCN-104)は、LC Laboratories、USAから購入した。すべての薬品を、さらに精製せずにそのまま使用した。

#### 【0386】

MSNPのゾル-ゲル合成及びテンプレートの除去

MSNP核を、本発明者らのゾル/ゲル手順をわずかに変更することによって合成した。反応を500mL円錐フラスコ内で実施した。CTAC(25%)50mLを、350rpmで攪拌しながら15分間にわたって85℃で、H<sub>2</sub>O150mLと混合した。これに、85℃で30分間にわたる10%トリエタノールアミン8mLの添加を続けた。シリカ前駆体、TEOS(7.5mL)を、ぜん動ポンプによって制御された1mL/分の速度で、混合物に滴下添加した。約60nmの一次サイズを有する粒子の合成を達成するために、溶液を350rpmで、85℃で20分間にわたって攪拌した。界面活性剤を除去するために、粒子を、室温で24時間にわたってメントール及びHCl(500:19、v/v)によって洗浄した。粒子を10,000rpmで60分間にわたって遠心分離し、メントールで3回洗浄した。高品質のMSNP核を得るために、粒子の凝集及び汚染を監視するためのDLS測定、粒子形態を可視化するためのTEM、ならびに界面活性剤が完全に除去されたかどうかをチェックするための赤外分光法及び細胞傷害性アッセイを含む、頻繁な品質チェックを行った。

#### 【0387】

捕捉剤としてTEAGSOSを使用してのイリノテカン負荷されたLB-MSNPの調製

LB-MSNＰによるイリノテカン負荷のための最適な手順を確立するために、本発明者らは、バイオフィルム手順（以前に開示されている）を使用して、プロトン化剤を粒子内に捕捉し、その後、その粒子をイリノテカン溶液中でインキュベートする新規のアプローチを開発した。これは、親油性イリノテカンが、LB膜を通して拡散し、その後、空孔内でプロトン化することを可能にして、濃度勾配に対する薬物の捕捉をもたらす（図5を参照されたい）。負荷容量及び薬物放出挙動を考慮して、本発明者らは、負荷時間、捕捉剤濃度、LB-MSNＰ濃度、イリノテカン濃度、及びイリノテカン/LB-MSNＰ比を全体的に変更することによって、イリノテカン負荷手順を最適化した。これは、本発明者らが、85%のイリノテカン負荷容量（イリノテカン/MSNＰ、w/w）を達成することを可能にしたが、これは、捕捉試薬の非存在下での薬物負荷容量を約4倍上回った。これは、並行して合成されたMM-398のリボソームバージョンの負荷容量の2倍になった。さらなる考察では、本発明者らは、イリノテカン負荷されたLB-MSNＰを「Ir-LB-MSNＰ(+SOS)」と呼んでいる。

10

#### 【0388】

TEAgSOS負荷されたLB-MSNＰの合成

市販のスクロースオクタスルファートナトリウム塩からの捕捉剤トリエチルアンモニウムスクロースオクタスルファート(TEAgSOS)の調製。

本発明者らは、TEAgSOSを、その前駆体であるスクロースオクタスルファートのナトリウム塩から合成するためにイオン交換反応を使用した。簡単に述べると、前駆体塩500mgを脱イオン水1mLに溶解させて、500mg/mLの水溶液を得た。この溶液を陽イオン性Dowex 50WX8樹脂イオン交換カラム（直径15mm及び長さ8cm、Sigmaから購入、Lot # MKBH8810V）に通過させた。脱イオン水でカラムを溶離した後に、スクロースナトリウムは、このプロセスでプロトン化オクタスルファートに変換される。収集したスクロースオクタスルホン酸をただちに、トリメチルアミン(TEA)で5.5~6.0の最終pHに滴定すると、TEAgSOSの形成が生じた。TEAgSOS濃度を、TEAの量の滴定に基づいて約80mMに調節した。多価陰イオン性TEAgSOSを、使用前には4℃冷蔵庫で貯蔵した。

20

#### 【0389】

TEAgSOS負荷されたLB-MSNＰの調製。

本発明者らは、LBコーティングのために本発明者らが以前に開示したバイオフィルム技術（その全体で参照によって組み込まれるPCT/US2014/020857（UCLA開示2013-534-2））を、TEAgSOSを封入するために適合させ、その後、イリノテカン負荷に進めた。簡単に述べると、空のMSNＰ100mgを、15/15秒オンオフ作業サイクルで、32.5Wの出力で30分間にわたってプローブ音波処理を使用してTEAgSOS水溶液4mL（40mM）中に浸漬した。懸濁液をただちに、丸底フラスコ（直径6cm）の底部で約30cm<sup>2</sup>の表面積を占める、コーティングされた脂質バイオフィルムの上に添加した。脂質成分の最適な混合を達成するための実験（漏出のない安定なコーティングを目的とした）に従って、本発明者らは、3:2:0.15のモル比でDSPC/Chol/DSPC-PEG228mgを含有する混合物に決定した。この混合物を、クロロホルムに10mg/mLで溶解させた。室温で、真空系に接続された回転蒸発器を使用して、約1時間かけて溶媒を蒸発させることによって、バイオフィルム形成が達成された。粒子懸濁液4mLをバイオフィルムに添加した後に、プローブ音波処理を、15/15秒オンオフ作業サイクルで、32.5Wの出力で30分間にわたって使用した。音波処理された懸濁液は、コーティングされた粒子、リボソーム、及び遊離TEAgSOSを含有するので、TEAgSOS-LB-MSNＰを、セファロースCL-4Bカラム（直径15mm及び長さ15cm、Sigmaから購入、Lot # MKBP0885V）をHEPES緩衝液（5mM HEPES、5%デキストロース、pH6.5）で溶離するクロマトグラフィー手順を使用して精製した。

30

40

#### 【0390】

能動的イリノテカン負荷のための、TEAgSOS負荷されたLB-MSNＰの使用。

50

イリノテカンを10 mg/mLの濃度で、HEPES緩衝溶液(5 mM HEPES、5 %デキストロース、pH 6.5)に溶解させた。この薬物溶液を、TEAGSOS負荷されたLB-MSNP懸濁液と1:1(w/w)のイリノテカン/粒子比で混合し、60の水浴内で0.5時間にわたってインキュベートした。反応を、容器を氷水内に10分間にわたって入れることによって停止させた。

#### 【0391】

##### 粒子精製

Ir-LB-MSNP(+SOS)を、15,000 rpmで10分間にわたる粒子の遠心分離、続く、食塩水または5 %デキストロースへの再懸濁によって、遊離リポソーム及び遊離イリノテカンから精製した。洗浄手順を3回繰り返した。

10

#### 【0392】

Ir-LB-MSNP(+SOS)粒子を使用し、比較試験のための対照製剤の調製Ir-LB-MSNP(+SOS)粒子の独特の特性を反映する比較分析を行うために、本発明者らは、浸漬されたイリノテカンLBによって密閉する、捕捉剤を含まないLB-MSNPを合成した。本発明者らはまた、捕捉剤を用いて調製されたMM-398のリポソーム同等物、さらにはイリノテカンを封入する、捕捉剤を含まない対照リポソームを調製した。

#### 【0393】

捕捉剤を含有しないイリノテカンLB-MSNPの合成:

空のMSNP(40 mg)を、5分間にわたって音波処理と共に、イリノテカン溶液4 mL(水中、10 mg/mL)に入れ、次いで、さらに4時間にわたって室温で撹拌した。イリノテカン浸漬されたMSNP懸濁液を、無水脂質膜(DSPC/コレステロール/PE-PEG2000)を3:2:0.15のモル比で含有する脂質混合物91 mg)に添加し、続いて、15/15秒オンオフ作業サイクルを32.5 Wの出力で使用して30分間にわたってプローブ音波処理した。10分間にわたって15,000 rpmでの遠心分離を使用し、続いて、上記のとおり粒子を洗浄し、かつ再懸濁して、粒子を遊離リポソーム及び遊離薬物から精製した。本発明者らは、捕捉剤を含まない粒子を「Ir-LB-MSNP(-SOS)」と称した。

20

#### 【0394】

商業的に開発されたりポソーム製剤、MM-398のリポソーム同等物の社内合成

30

合成を、Drummond et al.(Cancer Res. 2006, 66, 3271-3277)によってMM-398のために公開された手順に従って実施した。簡単に述べると、脂質の混合物(脂質212 mg、3:2:0.015のモル比のDSPC/Chol/DSP-PEG)をエタノール0.4 mLに60~65 °Cで溶解させた。TEAGSOS溶液4 mL(80 mM)を、同じ温度で脂質エタノール溶液と混合し、続いて、水浴内で2分間にわたって音波処理した。脂質懸濁液を60~65 °Cで、0.1 µmの空孔サイズを有するポリカーボネート膜を通して15回押し出した。非捕捉TEAGSOSを、HEPES緩衝液(5 mM HEPES、5 %デキストロース、pH 6.5)で溶離するSephacrose CL-4Bカラムでのクロマトグラフィーによって除去した。イリノテカン溶液(HEPES緩衝液、5 mM HEPES、及び5 %デキストロース、pH 6.5を含有する10 mg/mL水溶液)を、TEAGSOSを予め負荷されたりポソーム懸濁液(イリノテカン:脂質=1:2.1 w/w)と混合し、次いで、水浴内で、65 °Cで0.5時間にわたってインキュベートした。反応を、混合物を氷水内に10分間にわたって入れることによって停止した。次いで、イリノテカン負荷されたりポソームを、HEPES緩衝生理食塩水(5 mmol/L HEPES、145 mmol/L NaCl、pH 6.5)によって溶離するSephadex G-25カラム(直径15 mm及び長さ15 cm、Sigma、Lot #019K1077)で遊離イリノテカン除去することによって精製した。本発明者らは、社内合成されたりポソーム製剤を「Ir-Lipo(+SOS)」と称する。

40

#### 【0395】

50

捕捉剤を使用しない、イリノテカン封入されたリポソームの合成。

本発明者らはまた、受動的封入アプローチを使用するリポソームを合成した。簡単に述べると、脂質の混合物（脂質 53 mg、3 : 2 : 0 . 015 のモル比の DSPC / Chol / DSPC - PEG）を、60 ~ 65 でエタノール 0 . 1 mL に溶解させた。イリノテカン溶液 1 mL（水中、10 mg / mL）を 60 ~ 65 で脂質エタノール溶液と混合し、2 分間にわたる水浴音波処理を続けた。脂質懸濁液を、60 ~ 65 で、0 . 1  $\mu$ m の空孔サイズを有するポリカーボネート膜を通して 15 回押し出した。薬物負荷されたリポソームを、HEPES 緩衝生理食塩水（5 mmol / L HEPES、145 mmol / L NaCl、pH 6 . 5）で溶離する Sephadex G - 25 カラムを使用して遊離イリノテカンを除去することによって精製した。本発明者らは、このリポソーム製剤を「Ir - Lipo ( - SOS)」と称する。

10

【0396】

Ir - LB - MSNP ( + SOS ) と対照イリノテカン製剤との比較分析。

Ir - LB - MSNP ( + SOS ) 及び対照製剤の物理化学的特徴づけ。

表 3 は、対照製剤と比較して、Ir - LB - MSNP ( + SOS ) の流体力学的サイズ、サイズ分布及び表面電荷を示している。Ir - LB - MSNP ( + SOS ) は、約 0 . 1 の多分散指数 ( PDI ) で、110 ~ 130 nm の流体力学的サイズを有する。この粒子は、純水中で負のゼータ電位値、すなわち、- 24 . 7 mV を示した。ゼータ電位は、PBS 中では - 2 . 95 mV、及び完全 DMEM 培養培地中では - 3 . 27 mV に変化した。これらの物理化学的パラメーターは、種々の溶液中で、Ir - Lipo ( - SOS )、Ir - Lipo ( + SOS )、及び Ir - LB - MSNP ( - SOS ) などの対照製剤と同様であった。

20

30

40

50

【表 3】

表 3。種々のインキュベーション培地における I r 負荷された粒子のサイズ及びゼータ電位。

N P	D L S 流体力学的サイズ (n m) (P D I)			ゼータ電位		
	水	P B S	D M E M + 1 0 % F B S	水	P B S	D M E M + 1 0 % F B S
I r - L i p o (- S O S)	1 0 1 . 7 ( 0 . 1 1 3 )	9 5 . 5 ( 0 . 0 1 4 )	7 6 . 5 ( 0 . 2 7 5 )	- 1 1 . 7	- 4 . 9 5	- 4 . 6 3
I r - L i p o (+ S O S)	1 0 2 . 0 ( 0 . 1 1 2 )	1 0 4 . 7 ( 0 . 0 6 7 )	9 8 . 6 ( 0 . 1 7 2 )	- 1 3 . 4	- 2 . 2 6	- 4 . 3 8
I F - L B L - M S N P (- S O S)	1 2 9 . 4 ( 0 . 1 4 0 )	1 1 6 . 1 ( 0 . 0 8 7 )	1 1 0 . 2 ( 0 . 1 7 )	- 2 2 . 4	- 5 . 8 7	- 3 . 5 7
I r - L B L - M S N P (+ S O S)	1 2 8 . 0 ( 0 . 1 0 7	1 2 5 . 7 ( 0 . 1 1 2 )	1 2 1 . 1 ( 0 . 2 0 0	- 2 4 . 7	- 2 . 9 5	- 3 . 2 7
種々のイリノテカン負荷された粒子の流体力学的サイズ、サイズ分布及び表面電荷。粒子を、水、P B S 及び 1 0 % F B S を補充された D M E M 培地中に約 0 . 1 m g / m L の M S N P または脂質濃度で分散させた。サイズ及びゼータ電位を、Z E T A P A L S 粒径分析計及びゼータ電位分析器 ( B r o o k h a v e n i n s t r u m e n t s C o r p . ) によって測定した。結果は 3 回の測定の平均値を表している						

【 0 3 9 7 】

表 4 は、捕捉剤の使用を伴う、及び伴わない L B - M S N P の負荷容量及び負荷効率を示している。負荷容量 = ( 全イリノテカン - 上清中のイリノテカン ) / ( M S N P またはリポソームの質量 ) × 1 0 0 % 。負荷効率は、[ ( 全イリノテカン - 上清中のイリノテカン ) / 全イリノテカン ] × 1 0 0 % と定義される。リポソームでは、負荷容量は、8 0 m M 捕捉試薬の非存在または存在下で、4 . 1 2 w / w % 及び 4 5 . 2 w / w % であった。リポソームプラットフォームにおけるイリノテカンの負荷効率は、捕捉剤の作用の結果として、8 . 7 1 % から 9 5 . 5 % へ増加した。これは、合成された M M - 3 9 8 リポソームについて公開されたデータ ( C a n c e r R e s . 2 0 0 6 , 6 6 , 3 2 7 1 ) と一致する。最も安定な粒子製剤を得るための実験の後に、本発明者らは、L B - M S N P を合成するために 4 0 m M の捕捉剤を使用した。イリノテカンと共にインキュベートした後に、本発明者らは、捕捉試薬を含まない L B - M S N P での 2 2 . 5 w / w % の負荷容量と

比較して、負荷容量 83.5 w/w % で Ir-LB-MSN P (+SOS) を達成した。Ir-LB-MSN P は、少ない捕捉剤 (40 mM) を使用したが、実際にこれは、80 mM 捕捉剤を含有する社内 MM-398 リポソームと比較した場合に、2 倍の負荷容量をもたらした。

#### 【表 4】

表 4。TEO<sub>2</sub>SOS 捕捉剤の非存在及び存在下での LB-MSN P 対リポソームの負荷容量及び効率。

NP	供給物中の IRIN (g/mol リン脂質)	負荷容量 IRIN / MSN P w/w	負荷容量 IRIN / 脂質 w/w	封入効率
Ir-Lipo (-SOS)	500	N/A	4.12 %	8.71 %
Ir-Lipo (+SOS)	500	N/A	45.2 %	95.5 %
IF-LB L-MSN P (-SOS)	500	22.5 %	N/A	22.5 %
Ir-LB L-MSN P (+SOS)	500	83.5 %	N/A	83.5 %

#### 【0398】

本発明者らはまた、Ir-LB-MSN P (+SOS) の形態を可視化するために cryoEM 分析を行った。これによって、脂質二重層による MSNP 表面の均一なコーティングが確認された (図 6 A、上のパネル)。高倍率 cryoEM イメージは、約 80 nm の一次粒子サイズを、二重層約 7.1 nm 厚による完全な表面コーティングと共に実証した。ズームインイメージによって、無傷の脂質被覆の存在が確認されたが、空孔中の高密度物質の存在も実証され；この物質は、イリノテカン-TEA<sub>8</sub>SOS 複合体を表す。本発明者らは、粒子表面に密に付着していないが、しかしながら、LB 層は無傷なままであるやや大きなリポソームによって封入された粒子をたまに観察した。Ir-Lipo (+SOS) のイメージは、単層二重層約 6.5 nm 厚を有する約 75 nm のリポソーム構造を示した (図 6 A、下のパネル)。高倍率 cryoEM は、リポソーム内部の高密度 IRIN-TEA<sub>8</sub>SOS 沈澱物 (赤色の矢印) を見るために十分な解像度を示す。

#### 【0399】

各製剤の安定性を評価するために、本発明者らは、血流中でのイリノテカン安定性を推定することを意図して、PBS (pH = 7.4) 中で 37 °C での薬物安定性を比較した (図 6 B)。これは、Ir-LB-MSN P (+SOS) が PBS 中で非常に安定であり、24 時間かけて < 5 % の放出をもたらすことを実証した。PBS 中で匹敵する安定性が、社内 MM-398 リポソームにおいて見出された。

#### 【0400】

グルコース取り込み、解糖作用、乳酸産生 (ワールブルク効果)、異常な血液灌流、及び密な間質の存在によって、PDAC の pH 値は酸性である (Wojtkowiak, et

al. (2012) Cancer Res. 72(16):3938-3947;; Estrella et al. (2013) Cancer Res. 73(5):1524-1535)。したがって、本発明者らはまた、酸性pH条件での薬物放出プロファイルを観察した。腫瘍pHは古典的に、約6.5に低下するが、低くは約5.5でもあり得る(Jahde et al. (1992) Cancer Res. 52:6209-6215)。粒子がPDAC細胞によって取り込まれた場合には、pHは、リソソームコンパートメントでさらに<5に低下し得る(Mindell et al. (2012) Annu Rev Physiol. 74:69-86)。したがって、本発明者らは、ファゴリソソーム模擬流体(PSF、pH=4.5)中で薬物放出実験を行った。PSF中では、急速なイリノテカン放出(すなわち、4時間で20%)をLB-MSN Pにおいて見ることができた。しかしながら、社内MM-398製剤では、本発明者らは、PSFにおいて著しく遅い薬物放出プロファイル、すなわち、24時間でわずか約4%の薬物放出を見出した。

#### 【0401】

培養PDAC細胞におけるIr-LB-MSN P(+SOS)の細胞取り込み及び死滅効率Texasレッド標識されたLB-MSN Pまたはリポソームを利用した共焦点顕微鏡法は、PANC-1細胞の核周囲分布での豊富な細胞取り込みを実証した(図7)。本発明者らはまた、MTS細胞傷害性アッセイを使用して、増分イリノテカン濃度での処置の間の、PANC-1及びBxPC3細胞に対するIr-LB-MSN P(+SOS)の効果を決定した。本発明者らは、これらの粒子の効果を、遊離薬物及びIr-Lipo(+SOS)対照と比較した。遊離薬物は24時間での死滅では、より有効であるが、Ir-LB-MSN P(+SOS)及びリポソームの両方は、両方の細胞種において、72時間目に匹敵する死滅を示した(図8)。空のナノ粒子は48時間にわたって、500 µg/mLまでの濃度で、毒性を誘導しない。

#### 【0402】

マウスにおけるIr-LB-MSN P(+SOS)対Ir-Lipo(+SOS)のインビボ毒物学的効果の比較分析。

最大耐量(MTD)。

本発明者らは、様々なイリノテカン製剤のMTDを決定することによって、インビボ毒性試験を開始した。これを、Toxicology and Pharmacology Branch([dtp.nci.nih.gov/branches/tpb/default.htm](http://dtp.nci.nih.gov/branches/tpb/default.htm))からのNCIプロトコルを使用して達成した。2匹の健康な雄のBALB/cマウスに、遊離または封入薬物50 mg/kg(C<sub>1</sub>用量)をIV注射した。次いで、本発明者らは、1.8の用量増加係数を使用して、両方の動物(n=2)が24時間以内に死亡するC<sub>n</sub>用量を決定した。遊離または封入イリノテカンでの処置後。第2ラウンドの用量探索をC<sub>n-1</sub>用量で開始し、1.15増加係数を使用して(n=2)、死亡または重篤な罹患が存在しないMTDを見出した。MTDをさらに、5匹のマウスに注射し、それらを15日間にわたって追跡して、罹患、死亡または>20%の体重減少が存在しないことを確かめることによって確認した。本発明者らの結果によって、Ir-LB-MSN P(+SOS)、Ir-Lipo(+SOS)、及び遊離イリノテカンのMTD用量値がそれぞれ、295 mg/kg、350 mg/kg、及び60 mg/kgであることが実証された。遊離薬物と比較して、ナノ製剤は約5倍高いMTD用量を示し、LB-MSN P及びリポソーム製剤の両方の使用で、毒性低下の能力を明らかに示唆している。

#### 【0403】

組織学的分析。

別の実験で、健康なマウスに、IV 60 mg/kgの薬物用量で、Ir-LB-MSN P(+SOS)、Ir-Lipo(+SOS)、及び遊離イリノテカンの単回IV投与を与えた。処置から24時間後に、マウスを、臓器採取のためにと殺した。胸骨、胃腸(GI、胃及び小腸)管、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、及び肺の適切なサイズ切片を10%ホルマリン中で固定し、次いで、パラフィンに包埋した。4 µm厚の組織切片をガラススライド

に載せた。切片をヘマトキシリン - エオシン (H & E) で染色し、光学顕微鏡法によって検査した。スライドを経験豊富な病理学者が読み取った。結果は、遊離 I R I N よりも、I r - L B - M S N P ( + S O S ) 及び I r - L i p o ( + S O S ) で骨髄毒性のかなりの低下を示した (図 9)。本発明者らは、赤血球、巨核球または白血球前駆体に対して示差的毒性が存在するかどうかを評価するために免疫組織化学を使用して、胸骨骨髄でより詳細な試験を行っている。遊離イリノテカン及びリポソーム製剤は、腎毒性をもたらし、これは、糸球体腫脹として症状発現した。I r - L B - M S N P ( + S O S ) 粒子によって処置されたマウスでは、著しい腎臓異常は見い出されなかった (図 10)。

【 0 4 0 4 】

結論。

このプロジェクトの目的は、有効な P D A C 死滅及び毒性低下のために I V 注射用イリノテカンナノ送達プラットフォームを開発することである。高い薬物負荷容量、ナノ担体生体適合性、及び効率的な薬物封入の使用によって、L B - M S N P プラットフォームは、P D A C 細胞及び急性動物毒性試験において有望な結果を示している。

【 0 4 0 5 】

実施例 3

i R G D 媒介トランスサイトーシスは、マウス及びヒト膵臓癌におけるシリカソームナノ担体のイリノテカン送達及び有効性を増強する

膵臓管状腺癌 ( P D A C ) はほぼ一様に致命的であるが、多少の全生存期間の改善が、イリノテカンまたはパクリタキセルを送達するナノ担体の導入で達成されている。本発明者らは、脂質二重層でコーティングされたメソ多孔性シリカナノ粒子 ( M S N P ) からなるイリノテカンシリカソーム担体を使用して、これらの結果を動物同所モデルにおいてさらに改善している。シリカソーム担体はまた、イリノテカンのためのリポソーム担体と比較して、大きな毒性低下をもたらす。ナノ担体は主に、腫瘍へのアクセスについて、異常な漏出性血管系 ( 透過性及び保持効果の増強としても公知 ) に依存していると一般に推測されるが、ニューロピリン - 1 ( N R P - 1 ) 受容体によって調節されるトランスサイトーシス輸送経路が最近、報告されている。この独特の輸送経路は、腫瘍関連インテグリンに結合する循環 i R G D ペプチドによって開始され得て、その際、そのペプチドは、N R P - 1 へのその後の結合のために処理される。i R G D の同時投与は、確固たる K r a s 同所 P D A C モデルにおいて、イリノテカン - シリカソームの取り込みを 3 ~ 4 倍増強し、生存上の利益及び転移の著しい減少をもたらした。金 - ナノ粒子核が埋め込まれているシリカソームを、インビボでのトランスサイトーシス経路の超微細構造検査のために使用したところ、i R G D 同時投与が、血管管腔から、がん細胞の核周囲部位へと電子密度の高い担体を輸送する小胞輸送経路を誘導することが実証された。シリカソーム取り込みの i R G D 媒介増強は、患者由来異種移植片でも観察され、これは、腫瘍血管での N R P - 1 発現のレベルと一致した。これらの結果によって、P D A C 治療への有望な個人化アプローチのための i R G D の有用性が実証されている。

【 0 4 0 6 】

この実施例では、本発明者らは、確固たる膵臓管状腺癌 ( P D A C ) 動物モデルにおける、リポソームよりも優れたイリノテカン送達用の脂質二重層コーティングされたメソ多孔性シリカナノ担体 ( シリカソーム ) の開発を記載する。本発明者らは、同所腫瘍部位でのシリカソーム取り込みが、ニューロピリン - 1 受容体のライゲーシオンによって新規のトランスサイトーシス経路を引き起こす i R G D ペプチドの同時投与によって 3 ~ 4 倍増強され得ることを実証する。i R G D は、同じ血管受容体を発現する患者由来異種移植片へのシリカソーム取り込みも増強した。本発明者らは、小胞ベースのトランスサイトーシス経路の超微細構造証拠を提供するが、これは、腫瘍部位でのナノ担体の取り込みを説明するために一般に使用される透過性の増強及び保持効果を補足し得た。トランスサイトーシス経路は、P D A C 患者においてイリノテカン - シリカソーム担体の利益を増強する可能性を提供する。

【 0 4 0 7 】



## 序論

本発明者らは、薬物封入のために担持脂質二重層（LB）を使用して、高用量PDAC化学療法を得るために適合されている多機能メソ多孔性シリカナノ粒子（MSN）プラットフォームを開発した（例えば、実施例1を参照されたい）。この担体は、担持されていないLBを含有する形態学的に同様のリポソーム担体と識別するために、「シリカソーム」とも呼ばれている。イリノテカン用の社内リポソーム担体を含むリポソームと比較して、本明細書に記載のシリカソームは、この薬物について著しく高い負荷容量、循環安定性の改善（担持されたLBの結果として）、及び薬物漏出の減少を示すことが判明している。これらの特徴は、ストリンジェントな同所Kras PDACモデルにおいて、リポソームに対して、シリカソームの薬物動態の改善及び処置有効性を可能にする（例えば、実施例1を参照されたい）。加えて、シリカソームは、リポソーム同等物と比較して、胃腸管、肝臓、及び骨髄において重大な毒性低下ももたらす（同書）。イリノテカンでの成功の他に、シリカソームプラットフォームを、パクリタキセル及びゲムシタピンの相乗的送達のために適合させており、同所PDACモデルにおいて、遊離ゲムシタピンとAbraxane（登録商標）との組合せよりも著しく（>10倍）優れていることを可能にしている。注目すべきことに、シリカソーム担体での上の結果は、標的化リガンドの使用に頼ることを必要とせず、「受動的」送達によって達成され得た。

10

## 【0408】

この背景によって、本発明者らは、イリノテカン負荷されたシリカソーム（Ir-シリカソーム）によるPDAC処置の有効性がトランスサイトーシスによって改善され得るかどうかが、及びこれが、担体へのiRGDコンジュゲーションまたはその同時投与によって最良に達成され得るかどうかに関心を持った。この実施例で、本発明者らは、Kras同所モデルにおいて担体取り込み及び処置有効性を増強するために遊離iRGDペプチドの同時投与を使用する実行可能性を実証する。さらに、本発明者らは、血管管腔からがん細胞の核周囲部位へのAu標識シリカソームの輸送を可能にする群化小胞システムの超微細構造の証拠を示す。本発明者らは、患者由来PDAC異種移植片において、腫瘍血管系でのNRP-1発現の比存在度が、iRGD同時投与の使用による、シリカソームに対する応答規模を決定することも実証する。

20

## 【0409】

## 結果

薬物負荷のためのシリカソームの合成及び特徴づけ、ならびにPDAC腫瘍における可視化  
本発明者らは、プロトン化剤に依存した遠隔負荷技術を使用し、LBコーティングされたMSN（シリカソームとしても公知）による高いイリノテカン負荷を実証している（例えば、図21Aの上のパネル、及びLiu et al. (2016) ACS Nano. 10(2): 2702-2715を参照されたい）。イリノテカンは、LBを越えてMSN内部パッケージングスペースへと拡散することができる弱塩基性及び両親媒性の分子であり、そのMSN内部パッケージングスペースで、先に捕捉されたトリエチルアンモニウムスクロースオクタスルファート（TEASOS）によるプロトン放出が、薬物を、LBを越えて逆拡散することができない親水性誘導体に変換する（図21A、上のパネル）。遠隔負荷手順を、50重量%（w/w、イリノテカン/MSN）の薬物負荷容量を達成するIr-シリカソームバッチを合成するために使用した（同書）。シリカソーム表面上へのiRGDペプチドのコンジュゲーションがPDAC腫瘍部位への担体生体内分布に影響を及ぼし得るかどうかを決定するために、本発明者らはまた、LBのDSPA-PEG2000成分をペプチド中のシステイン残基へのコンジュゲーションのために使用する粒子バッチを合成した。これは、DSPA-PEG2000の代わりにDSPA-PEG2000-マレイミドを用いて、ステイン-修飾ペプチド、Cys-c（CRGDKGPD）（配列番号11）へのチオール-マレイミドカップリングを可能にすることによって達成された（方法セクションを参照されたい）（図21A、ボックス2）。コンジュゲーション反応の成功を確認するために、本発明者らは、Ruoslahti et al.によって開発されたペプチドのフルオレセイン標識バージョン（FAM-iRGD

30

40

50

）も使用して、充分な洗浄後にコンジュゲートしたシリカソームの蛍光分光法を行った（図27、パネルA）（Sugahara et al. (2009) Cancer Cell, 16(6):510-520）。これによって、蛍光ペプチドとLBとの安定な会合が確認された。コロイド不安定性及び担体取り込みにおける妨害を防ぐために、iRGDコンジュゲーションの密度は、約3mol%（全LB成分に対して）に限定された。無傷のシリカソーム-iRGD担体の取り込みを、フローサイトメトリー及びKPC細胞における共焦点顕微鏡法によって確認した（図27、パネルB及びC）。

#### 【0410】

PDAC腫瘍におけるトランスサイトーシスプロセスのTEM可視化を行うために、本発明者らはまた、約10nmの電子密度の高いAuナノ粒子を含む核-シェルMSNPのバッチを合成した（図1A、ボックス3）。CryoEMによって実証されたとおり、裸の粒子と同様に、核/シェル粒子を、LBで効果的にコーティングすることができた（図21A、ボックス3）。このコミュニケーションで使用されたすべての担体での詳細な合成及び特徴づけ手順は、補足情報の方法セクションにおいて論述する。シリカソームの主な物理化学的特徴を下の表5にまとめる。

#### 【0411】

#### 【表5】

表5。例示的なシリカソームの生理化学的特性。

特性	値
MSNP表面積（BET）	約850m <sup>2</sup> /g
MSNP空孔体積（BET）	約0.75cm <sup>3</sup> /g
MSNP空孔サイズ（BET、TEM）	約3nm
MSNP核サイズ（TEM）	約65nm
LB厚（cryo-EM）	約7nm
シリカソームサイズ（cryo-EM）	約80nm
流体力学的サイズ（DLS）	約130nm
ゼータ電位	約-10mV
薬物負荷容量 （イリノテカン）	約50% （w/w、薬物/MSNP）

#### 【0412】

同所PDACモデルにおける、シリカソーム生体内分布に対するコンジュゲートされたiRGDペプチド対コンジュゲートされていないiRGDペプチドの効果の比較  
トランスジェニックKras<sup>LSL-G12D</sup>/+; Trp53<sup>LSL-R172H</sup>/+; Pdx-1-Cre動物からの自発的PDAC腫瘍に由来するルシフェラーゼ発現KPC細胞を、免疫適格性B6/129マウスの脾臓尾部に同所移植した（例えば、図21Bの左のパネル、及びLiu et al. (2016) ACS Nano, 10(2):2702-2715; Tseng et al. (2010) Clin. Cancer Res. 16(14):3684-3695を参照されたい）。このストリンジェントなPDAC腫瘍モデルは、発がん遺伝子発現、成長特徴、転移、組織学的特徴及び形成異常間質の発生についてヒトPDACを模倣する。図21Bは、動物検死及びIVISイメージング（図21B）で見られたとおりの腫瘍成長特徴及び転移の詳細をまとめている（Tseng et al. (2010) Clin. Cancer Res. 16(14):368

4 - 3 6 9 5 ; T o r r e s e t a l . ( 2 0 1 3 ) P l o S O n e 8 : e 8 0 5 8 0 ) 。 同所腫瘍部位へのシリカソーム生体内分布を、コンジュゲートされていないか(すなわち、「IRGD非含有」状態)、またはペプチド-コンジュゲートされている(「シリカソーム-iRGD」)近赤外(NIR)標識(DyLight 680)粒子50 mg/kgの単回静脈内(IV)注射によって評価した(図22A)。動物の第3の群には、遊離ペプチド8  $\mu\text{mol/kg}$  及びコンジュゲートされていない粒子の同時投与が与えられた(「シリカソーム+iRGD」)。当初注射から24時間後及び動物と殺の後に行われた移植臓器のIVISイメージングは、シリカソーム-iRGDまたはシリカソームのみの群でのシグナル伝達強度と比較して、「シリカソーム+iRGD」群では、腫瘍部位でのNIRシグナル伝達強度の顕著な上昇を実証した(図22A)。イメージング強度を、IVIS Lumina Living Imageソフトウェアによって定量化した。それらのインビボ効果の欠如とは対照的に、ペプチド-コンジュゲートしたシリカソームは、KPC細胞において担体取り込みを増強することが分かり得た(図27、パネルB及びC)。本発明者らは、これを、膜貫通取り込みを開始するには十分なNRP-1受容体密度と解釈する一方で、Ruoslahti et al.によってインビトロ/インビボ比較について以前に報告されたとおり、腫瘍血管部位での受容体存在度は、通過することができるコンジュゲートされた粒子の数で限定され得る(Sugahara et al. (2009) Cancer Cell, 16(6): 510-520; Teesalu et al. (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106(38): 16157-16162; Hussain et al. (2014) Sci Rep 4: 5232)。NIR強度(図22B、左のパネル)が実際のMSNP取り込みを反映していることを示すために、誘導結合プラズマ発光分光測定(ICP-OES)を、腫瘍のケイ素(Si)含有率の定量化のために使用した(図22B、右のパネル)。これによって、シリカソーム-iRGDまたはシリカソームのみの群と比較して、「シリカソーム+iRGD」群におけるSi含有率の著しい(約3倍)上昇が実証された。本発明者らはまた、対照的非CendRペプチド、シクロ(RGDfK)とのシリカソーム同時投与(Sugahara et al. (2010) Science, 328(5981): 1031-1035)がシリカソーム取り込みを増強することができないことを示すために、別の実験を行うことによって、PDAC生体内分布のためのC末端(CendR)モチーフの重要性を実証した(図28)。この結果はまた、ICP-OESによって確認された(図28)。

#### 【0413】

腫瘍組織切片を、NIR標識シリカソームの腫瘍内生体内分布の比存在度及び腫瘍血管からの移動距離を評価するために使用し、これらを、抗CD31 Alexa Fluor(登録商標)488染色によって明瞭にした(図29)。この分析は、iRGD同時投与が、同所腫瘍部位でのシリカソーム取り込みを増強するための最も有効な戦略であったことを示した。対照的に、iRGD-コンジュゲートした担体は、本発明者らのKPC同所モデルにおいて粒子の数、さらには移動距離に対して著しい効果を発揮することはできなかった(図29)。上記の所見によって、その後の有効性試験を行うためには、遊離iRGDを使用することとなった。

#### 【0414】

すべてのナノ担体がまた、細網内皮系(RES)に取り込まれるので、肝臓及び脾臓への観察可能なシリカソーム取り込みについて注釈することは重要である(肺、心臓、及び腎臓への効果はほとんど認められない)。興味深いことに、IVISイメージングは、RES臓器へのコンジュゲートした担体の生体内分布の増加の可能性を示した(図22A)。これは、ICP-OESの実行中の肝臓及び脾臓におけるSi含有率の上昇によって確認された(図30)。本発明者らは、この観察を正確に説明することができないが、ペプチドコンジュゲーションは直接的または間接的に、粒子オプソニン化、及びNRP-1とは無関係な、スカベンジャー受容体による取り込みの増加をもたらすことが可能である(Li and Huang (2008) Mol. Pharm. 5(4): 496-504)。

## 【0415】

iRGD同時投与は、シリカソームによるイリノテカン送達の有効性を増強する  
 Ir - シリカソームでのPDAC処置におけるiRGD同時投与の治療効果の可能性を実証するために、有効性実験を同じ同所腫瘍モデルにおいて行った。動物に、Ir - シリカソームのIV注射を40mg/kgの薬物用量(80mg/kgの担体用量に同等)で、iRGD8μmol/kgの同時投与を伴って、または伴わずに投与した。処置を、 $2 \times 10^6$  KPC - Luc細胞の同所実施から13日後に開始したが(図23A)、その時点で、原発性腫瘍のサイズは、マクロ転移の非存在下で約3~5mmであった(上記、及びLiuet al. (2016) ACS Nano, 10(2): 2702 - 2715を参照されたい)。注射を、3日ごとに合計4回の投与で繰り返した(図23A)。対照群は、IV PBS、Ir - シリカソームのみ(同じ用量)、または遊離iRGDのみ(同じ用量)を与えられた動物からなった。 Kaplan - Maierプロットを使用して動物生存率を表し(同書)、動物検死を使用して局所腫瘍拡散及び転移の存在を評価した。多数の転移病巣を、食塩水または遊離iRGDペプチドで処置された動物の脾臓、小腸、胃、肝臓、及び腎臓で見ることができた(図23B)。Ir - シリカソームは、腫瘍量及び転移の数を有意に減少させたが、iRGD同時投与は、原発性腫瘍の縮小、さらには肝臓、胃及び小腸への拡散の阻害をさらに増強した(図23B)。図23Cのヒートマップは、転移疾患に対する、同時投与されたペプチドの影響の定量的表示を示している。ロジランク検定(SPSS 19.0ソフトウェア、IBM SPSS Statistics、USA)も、PBS群と比較して、iRGDペプチドの同時投与中の57.1%と比較した場合、Ir - シリカソームのみでの処置は生存を28.6%改善したことを実証した(図23D)；この相違は、統計的に有意である( $p = 0.027$ )。本発明者らはまた、24時間目に高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって決定されたとおり、iRGD(8μmol/kg) IVの単回投与をIr - シリカソーム(薬物40mg/kg)と一緒に与えられた動物では、イリノテカンの腫瘍含有率の著しい(約2倍)増加が存在することを確認した(図23E)。

## 【0416】

iRGD媒介シリカソーム取り込みは、腫瘍血管系でのNRP - 1発現を必要とする  
 薬物取り込みを媒介する際のiRGDの作用機序は、がん血管上に優先的に発現されるv<sub>3</sub>またはv<sub>5</sub>インテグリンへのホーミングに依存している(Ruoslahti and Pierschbacher (1987) Science, 238(4826): 491 - 497; Hanahan and Weinberg (2000) Cell, 100(1): 57 - 70)。インテグリンへの循環ペプチドの結合には、ペプチドのC末端の切断及び放出が続き、これが、NRP - 1との相互作用を媒介する(これは、C末端則としても公知)。NRP - 1結合は、薬物及びナノ粒子の輸送を援助し得る小胞の系の起動をもたらす(Sugahara et al. (2009) Cancer Cell, 16(6): 510 - 520; Pang et al. (2014) Nat. Commun., 5: 4904)。KPC腫瘍部位でのNRP - 1の発現を決定するために、IHC染色を、Alexa Fluor(登録商標)488標識抗NRP - 1によって行ったが、内皮細胞及び核は、それぞれAlexa Fluor(登録商標)594標識抗CD31及びDAPIでの染色によって位置限定した。蛍光顕微鏡法及びImage J分析を、CD31とのNRP - 1の重複%を決定するために行った；これは、94.2%の同時局在を実証した(図24B)。同所腫瘍部位でのシリカソーム取り込みにおけるNRP - 1の役割を確かめるために、腫瘍担持マウスに、NRP - 1のb1b2ドメインに対するアンタゴニスト抗体を予め注射した(Sugahara et al. (2009) Cancer Cell, 16(6): 510 - 520; Sugahara et al. (2010) Science, 328(5981): 1031 - 1035)。iRGD及びNIR標識シリカソームのその後の投与は、遮断抗体で処置されなかった動物と比較して、担体取り込みの決定的な減少を実証した(図24C)。同じ干渉が、対照IgGでは見られなかった(図24C)。これらのデータによって、iRGD媒介シリカソーム取り込みにおけ

る N R P - 1 の役割が確認される。

#### 【 0 4 1 7 】

K P C がん部位でのトランスサイトosis小胞による、シリカソームの輸送の超微細構造の実証

N R P - 1 への i R G D の C 末端の結合が、がんへの栄養素送達のために重要な新規の小胞輸送機構に係るバルクトランスサイトosis経路を開始し得ることが実証されている ( S u g a h a r a e t a l . ( 2 0 0 9 ) C a n c e r C e l l , 1 6 ( 6 ) : 5 1 0 - 5 2 0 ; S u g a h a r a e t a l . ( 2 0 1 0 ) S c i e n c e , 3 2 8 ( 5 9 8 1 ) : 1 0 3 1 - 1 0 3 5 ; P a n g e t a l . ( 2 0 1 4 ) N a t . C o m m u n . 5 : 4 9 0 4 ) 。本発明者らの知る限り、このトランスサイトosis経路が、腫瘍の部位への治療用ナノ担体の輸送中に直接的に可視化されたことはない。視覚的な増強の実証をもたらし得る電子顕微鏡法 ( E M ) を使用して、K P C モデルにおいて i R G D 媒介輸送経路の超微細構造分析を試みた。初めに、本発明者らは、i R G D 同時投与を伴う、または伴わないシリカソームの I V 注射後にいろいろな間隔で採取された腫瘍部位で撮影された T E M イメージを比較した ( 図 2 5 A ) 。2 4 時間目に、i R G D 同時投与が、内皮細胞を越えて、血管の管腔から半管腔側まで広がる直径 1 1 0 ~ 3 7 0 n m のブドウ状小胞の形成を誘導することが明らかに分かり得た ( 図 2 5 A 、領域「 3 」及び「 4 」) 。これらの特徴は、D v o r a k e t a l ( F e n g e t a l . ( 1 9 9 6 ) J . E x p . M e d . 1 8 3 ( 5 ) : 1 9 8 1 - 1 9 8 6 ) によって記載された小胞 - 空胞オルガネラ ( v e s i c u l o - v a c u o l a r o r g a n e l l e ) または V V O と類似する。少なくとも 1 0 の該当領域において小胞の数をカウントし、細胞における内部表面積  $\mu m^2$  当たりの小胞数を表すことによって決定される小胞密度の半定量分析は、i R G D が、ペプチド同時投与を与えられていない動物と比較して、小胞密度を約 3 倍増加させ得ることを実証した ( 図 2 5 A 、左のパネル) 。

#### 【 0 4 1 8 】

可視化システムによってシリカソーム輸送を可視化することを試みる場合に、低電子密度の M S N P は、不均一で複雑な P D A C 微細環境において担体の存在を解像することが困難である。この難題に対処するために、シリカソームを、T E M によって容易に可視化することができる約 1 0 n m の A u - ナノ粒子を含むように合成した ( 図 2 1 A ) ( L i u e t a l . 9 2 0 1 3 ) A C S N a n o . 7 ( 7 ) : 6 2 4 4 - 6 2 5 7 ) 。同所 K P C 腫瘍を発現しているマウスに、i R G D 8  $\mu m o l / k g$  の非存在または存在下で A u - シリカソーム 5 0 m g / k g を I V 注射した。腫瘍組織を、注射の 2 4 時間後に採取し、T E M 分析を行うために固定した。1 イメージで、i R G D 同時投与を受けた動物の ( i ) 血管腔における電子密度の高いシリカソーム、( i i ) 内皮細胞における小胞輸送、及び ( i i i ) 腫瘍マトリックス中での粒子沈積を示す代表的な電子顕微鏡写真が、図 2 5 B において示されている。イメージのより高い倍率の領域 1 ~ 3 によって、A u 含有粒子の存在が確認される。i R G D 同時投与の間に、アポトーシスを受けている腫瘍細胞中の核周囲分布におけるシリカソームの出現を実証することも可能であった ( 図 2 5 C ) 。この部位は、最も近い腫瘍血管から数百  $\mu m$  離れている ( 図 2 5 C ) 。i R G D 処置を受けていない動物の腫瘍マトリックスで、より低い粒子密度を観察することが可能であったが、本発明者らは、小胞輸送システムによって運ばれているいずれのシリカソームも位置づけることもできなかったし、静止イメージで進入のための代替機構を特定することもできなかった ( 図 3 1 ) 。

#### 【 0 4 1 9 】

N R P - 1 発現のために表現型が決定された患者由来 P D A C 腫瘍における、シリカソーム取り込みに対する i R G D 同時投与の示差的影響

N R P - 1 経路が、K P C 腫瘍モデルにおいて i R G D に機能的に関連し得ることは明らかであるが、本発明者らは、そのペプチドが N O D S C I D I L 2 ノックアウト ( N S G ) マウスにおいて成長させた患者由来異種移植片においてシリカソーム取り込みに影響を及ぼし得るかどうかを確認することに興味を持った ( R u c k e r t e t a l . (

2012). J. Surg. Res. 172(1): 29-39)。本発明者らの1人(TD)が、NSGマウスにおいて23のヒトPDAC腫瘍からなるリポジトリを確立している；これらの腫瘍サンプルは、ホイップル外科手術中に患者から得た。転移性腫瘍組織を、PDACの特徴である間質存在度ならびに発癌遺伝子及びシグナル伝達経路成分の発現を含めて、対応するヒトPDAC腫瘍の特色を示すがんの特徴について表現型で特徴づけた(同書)。本発明者らは、同等の間質存在度を有するが、IHC染色によって決定されるとおり、NRP-1発現の密度及び分布において異なる腫瘍の対を選択するために、この表現型情報を使用した。NRP-1発現の密度、さらにはCD31及び細胞核(DAPI)とのその同時局在(図26A)を比較するために、image Jソフトウェアを使用して、染色を、NSGマウスから採取した腫瘍組織で第3または第4腫瘍継代で行った。本発明者らは、同様のカラーゲン密度(三重染色)を示すが、NRP-1発現において異なるXWR#8及びXWR#187と呼ばれる2つの患者腫瘍サンプルを特定することができた(図26A)。したがって、XWR#8は低いNRP-1存在度によって特徴づけられたが、XWR#187は、高いNRP-1発現レベルを有した(図26A)。XWR#187はまた、XWR#8(約35%)と比較して、より多いNRP-1陽性腫瘍血管(約80%)を示した。皮下異種移植片(n=3)をNSGマウスの側腹部で確立し、その後、動物に、NIR標識シリカソーム(50mg/kg)をiRGDペプチド(8µmol/kg)の同時投与を伴って、または伴わずにIV注射した。24時間後に動物をと殺した後に、移植組織のIVISイメージングは、iRGDを与えられたXWR#187の腫瘍部位では、NIR強度の50%上昇を示したが；同様の増強は、XWR#8においては見られなかった(図26B)。これらのデータは、ICP-OESを使用して腫瘍組織の元素Si含有率を評価することによって確認された(図26B)。すべて考慮すると、本発明者らのデータは、NRP-1発現の密度及び分布が、インビボで、ヒト腫瘍へのシリカソーム生体内分布の程度を決定することを示している。

#### 【0420】

##### 考察

この実施例で、本発明者らは、イリノテカン-シリカソーム担体の有効性が、腫瘍取り込みを増強するために担体に結合させる必要のないコンジュゲートされていないiRGDペプチドの同時投与によって有意に改善され得ることを実証している。遊離iRGDペプチドの同時投与は、同所KPC腫瘍部位でのシリカソーム取り込みを3~4倍増加させ、原発性腫瘍の死滅の増強、さらには転移阻害をもたらした。総じて、これは、動物の生存において、Irr-シリカソームのみを上回る有意な改善をもたらした。iRGD効果は、初めは腫瘍関連インテグリンとの相互作用、続いて、ペプチド切断及びNRP-1と結合するC末端の放出によって媒介される。NRP-1の生理学的役割は、栄養上の目的でトランスサイトーシスを制御することであるが、受容体-遮断抗体の注射後の粒子輸送の減少によって実証されるとおり、小胞系も、ナノ粒子の輸送のために使用され得る。さらに、EMイメージングは、iRGDが内皮細胞において、Au標識シリカソームを血管腔から腫瘍マトリックスへと運ぶことができる群化小胞の出現を誘導し得るという超微細構造の証拠を示した。本発明者らはまた、NRP-1が、NSGマウスに移植されたヒト膵臓腫瘍においてトランスサイトーシス経路を調節するという証拠を得た。腫瘍血管系の上で示差的NRP-1発現を有する腫瘍対の選択によって、iRGD処置中の担体取り込み及びイリノテカン送達における差異が実証された。すべて考慮すると、これらのデータは、iRGD同時投与によってイリノテカンシリカソーム担体の有効性を増強するために、PDAC化学療法に対する個人化アプローチを使用することが可能であることを示している。

#### 【0421】

PDACにおいてイリノテカン送達を増強するためのトランスサイトーシス経路の有用性は、いくつかの理由で重要である。第1の理由は、腫瘍部位での薬物耐性に、加えて、腫瘍成長及び転移の増強に寄与する異形成間質の表示である(Feig et al. (2012) Clin. Cancer Res. 18(16): 4266-4276; Dimou et al. (2012) Ther. Adv. Med. Oncol. 175883401

10

20

30

40

50

2446008)。異常な血管透過性が、ナノ粒子管外遊出の理由であり、EPR効果と称される概念であることは多くの場合に理解されるが、本発明者らは、脾臓癌間質が血管透過性を積極的に妨害することを知っている(Meng et al. (2013) ACS Nano. 7(11):10048-10065; Kano et al. (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104(9):3460-3465; Cabral et al. (2011) Nat. Nanotechnol. 6(12):815-823; Liu et al. (2012) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 109(41):16618-16623)。これは、血管内皮細胞にしっかり付着する周細胞の存在を含む(同書)。したがって、EPR効果は、PDACにおいてナノ担体取り込みに寄与し得るが、この輸送、さらには血管漏出を調節する栄養輸送経路及び血管成長因子の寄与の可能性を含めて、他の血管機構が腫瘍部位でのナノ粒子取り込みに寄与し得る可能性を考慮することが重要である(Jain and Stylianopoulos (2010) Nat. Rev. Clin. Oncol. 7(11):653-664; Ruoslahti et al. (2010) J. Cell. Biol. 188(6):759-768; Maeda et al. (2000) J. Control. Release 65(1):271-284; Li and Huang (2008) Mol. Pharm. 5(4):496-504; Feng et al. (1996) J. Exp. Med. 183(5):1981-1986; Kobayashi et al. (2014) Theranostics, 4(1):81-89)。Ruoslahti et al. は、腫瘍栄養で役割を果たし、腫瘍透過性iRGDペプチドにも治療上関係し得るエンドサイトーシス経路を記載した(Pang et al. (2014) Nat. Commun. 5:4904)。加えて、VEGF、VEGF-A、VEGF-A165、TGF- $\beta$ 及びセマフォリン3Aなどの血管成長因子は、腫瘍血管系で $\alpha_v\beta_3$ 及び $\alpha_v\beta_5$ インテグリンへの結合を可能にするRGDモチーフを表示する(Sugahara et al. (2009) Cancer Cell, 16(6):510-520; Sugahara et al. (2010) Science, 328(5981):1031-1035; Pang et al. (2014) Nat. Commun. 5:4904)。したがって、タンパク質分解切断及びCendRモチーフの放出は、成長因子受容体と関連したシグナル伝達経路及び血管透過性の役割に加えて(Kolodkin et al. (1997) Cell, 90(4):753-762; Ellis (2006) Mol. Cancer Ther. 5(5):1099-1107; Glinka and Prud'homme (2008) J. Leukoc. Biol. 84(1):302-310)、NRP-1媒介トランスサイトーシスを起動させることができる(Pang et al. (2014) Nat. Commun. 5:4904)。その結果、NRP-1経路は、EPR効果を含む血管漏出と共存し得るが、異なる時間反応速度を示すことが可能である。CendRモチーフに対する応答は数分以内に開始し得るが、EPR効果は典型的には、ピークまで6~8時間を要する(Sugahara et al. (2009) Cancer Cell, 16(6):510-520; Maeda et al. (2003) Int. Immunopharmacol. 3(3):319-328)。

#### 【0422】

iRGD同時投与中のシリカソームトランスサイトーシスについての本発明者らのデータは、PDAC処置中の間質-血管障壁を克服する以前の試みを補うものである(Feig et al. (2012) Clin. Cancer Res. 18(16):4266-4276; Dimou et al. (2012) Ther. Adv. Med. Oncol. 1758834012446008; Meng et al. (2013) ACS Nano. 7(11):10048-10065; Meng et al. (2015) ACS Nano. 9(4):3540-3557)。数種の血管新生薬(angiotropic drug)が、ナノ担体の腫瘍アクセスを改善するために導入されている(Dimou et al. (2012) Ther. Adv. Med. Oncol. 1758834012446008; Kobayashi et al. (2014) Theranostic

10

20

30

40

50

s, 4 ( 1 ) : 8 1 - 8 9 )。これらのうち、VEGFは、ナノ粒子取り込みを増強するために、PDAC部位での灌流及び血管漏出の一時的な増加をもたらす得る ( Olive et al. ( 2 0 0 9 ) Science, 3 2 4 ( 5 9 3 3 ) : 1 4 5 7 - 1 4 6 1 ; Jacobetz et al. ( 2 0 1 3 ) Gut, 6 2 ( 1 ) : 1 1 2 - 1 2 0 )。腫瘍部位での血管透過性を促進する他の薬剤には、ブラジキニン、酸化窒素、アンジオテンシン - 変換酵素阻害薬、腫瘍壊死因子、ヘムオキシゲナーゼ - 1、コラゲナーゼ及びヒアルロニダーゼが含まれる ( Kobayashi et al. ( 2 0 1 4 ) Theranostics, 4 ( 1 ) : 8 1 - 8 9 ; Eikenes et al. ( 2 0 0 4 ) Cancer Res. 6 4 ( 1 4 ) : 4 7 6 8 - 4 7 7 3 ; Seynhaeve et al. ( 2 0 0 7 ) Cancer Res. 6 7 ( 1 9 ) : 9 4 5 5 - 9 4 6 2 ; Fang et al. ( 2 0 1 1 ) Adv. Drug Deliv. Rev. 6 3 ( 3 ) : 1 3 6 - 1 5 1 ; Fang et al. ( 2 0 1 2 ) Cancer Sci. 1 0 3 ( 3 ) : 5 3 5 - 5 4 1 ; Maeda ( 2 0 1 3 ) Cancer Sci. 1 0 4 ( 7 ) : 7 7 9 - 7 8 9 ; Eikenes et al. ( 2 0 0 5 ) Br. J. Cancer. 9 3 ( 1 ) : 8 1 - 8 8 )。本発明者らはまた、トランスフォーミング増殖因子ベータ ( TGF - ) 経路の小分子阻害薬、LY364947を送達するナノ担体の使用は、インビボで内皮細胞への周細胞付着を急速に ( < 2 時間 ) 逆転させ得ることを実証している ( Meng et al. ( 2 0 1 3 ) ACS Nano. 7 ( 1 1 ) : 1 0 0 4 8 - 1 0 0 6 5 )。付随する血管透過性の複数倍の上昇が、腫瘍部位でのゲムシタピン送達リボソームの出現の劇的な上昇をもたらすと実証された ( 1 9 )。TGF - 経路の標的化によって血管透過性を増強するための他のアプローチも報告されている ( Cabral et al. ( 2 0 1 1 ) Nat. Nanotechnol. 6 ( 1 2 ) : 8 1 5 - 8 2 3 ; Liu et al. ( 2 0 1 2 ) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1 0 9 ( 4 1 ) : 1 6 6 1 8 - 1 6 6 2 3 )。最後に、本発明者らの担体が、マウスにおける同所PDAC腫瘍の処置中にアブラキサン及び遊離ゲムシタピンの投与よりも優れ得る限りにおいて ( Fres et al. ( 2 0 1 2 ) Cancer Discov. 2 ( 3 ) : 2 6 0 - 2 6 9 )、シリカソーム担体は、パクリタキセルとゲムシタピンとの同時送達によって間質の減少を達成することができることは述べるに値する ( Meng et al. ( 2 0 1 5 ) ACS Nano. 9 ( 4 ) : 3 5 4 0 - 3 5 5 7 )。

#### 【 0 4 2 3 】

iRGDの同時送達がPDAC腫瘍部位でのシリカソームの取り込みを増強するという実証に基づき ( 図 2 2 )、同時投与アプローチによって、ペプチドがナノ担体にコンジュゲートしている別の送達機構の主な限界が克服されるということを強調することが重要である。この差違の説明は、NRP - 1 受容体の利用可能な数に基づく、担体系の輸送容量にある ( Sugahara et al. ( 2 0 1 0 ) Science, 3 2 8 ( 5 9 8 1 ) : 1 0 3 1 - 1 0 3 5 ; Ruoslahti ( 2 0 1 2 ) Adv. Mater. 2 4 ( 2 8 ) : 3 7 4 7 - 3 7 5 6 ; ; Ruoslahti ( 2 0 1 6 ) Adv. Drug Deliv. Rev. pii : S 0 1 6 9 - 4 0 9 X ( 1 6 ) 3 0 0 9 4 - 1 . doi : 1 0 . 1 0 1 6 / j . addr . 2 0 1 6 . 0 3 . 0 0 8 )。したがって、コンジュゲートされたシリカソームの輸送は、血管系上の相対的に少なく有限数の標的受容体によって限定されるが、コンジュゲートされていないペプチドを別に注射することは、腫瘍部位での同伴 ( bystander ) シリカソームの大量移送 ( より多数で ) を起動させる。さらに、フィブロネクチンマトリックスへの培養腫瘍細胞の付着及び遊走に干渉することによって実証されているとおり、遊離iRGDは、インテグリン機能の調節によって抗転移活性も有する ( Sugahara et al. ( 2 0 1 5 ) Mol. Cancer Ther. 1 4 ( 1 ) : 1 2 0 - 1 2 8 )。これは、部分的に、本発明者らの試験における腫瘍転移に対するペプチド干渉を説明し得た ( 図 2 3 B 及び 2 3 C )。担体合成の経費及び複雑さを増加させるコンジュゲーション機構への依存と比較して、遊離ペプチドの使用はまた、臨床使用のために現実的かつ利用可能である。

#### 【 0 4 2 4 】



## 物質及び方法

物質及び実験手順のより詳細な説明を、以下の「補足的物質及び方法」に示す。

## 【0425】

## シリカソームの調製

イリノテカン負荷されたシリカソームの合成：

65 nm MSNP核を、上記に示したとおりのゾル - ゲル手順を使用して合成した (Liu et al. (2016) ACS Nano. 10 (2) : 2702 - 2715 も参照されたい)。以前に報告されたとおり、脂質バイオフィルムを使用して、シリカソームを生成した (Meng et al. (2015) ACS Nano. 9 (4) : 3540 - 3557 ; 実施例 1 及び Liu et al. (2016) ACS Nano. 10 (2) : 2702 - 2715 を参照されたい)。簡単に述べると、MSNP 500 mg を TE Ag SOS 20 mL (80 mM 溶液) に浸漬し、これを、丸底フラスコの底にコーティングされた DSPC / Chol / DSPE - PEG 2000 の混合物 550 mg (モル比 3 : 2 : 0.15) からなる脂質バイオフィルムの上部に添加する (実施例 1、及び Liu et al. (2016) ACS Nano. 10 (2) : 2702 - 2715 を参照されたい)。LB での粒子コーティングを達成するための音波処理の後に、遊離 TE Ag SOS を、Sephacrose CL - 4B カラムでのサイズ排除クロマトグラフィーによって除去した。TE Ag SOS 負荷されたシリカソームを、薬物負荷のために、イリノテカン溶液 10 mg / mL 中で 65 の水浴内でインキュベートした。30 分後に、氷水浴内でクエンチすることによって、負荷を停止し、続いて、薬物負荷されたシリカソームを遠心分離によって 3 回洗浄し、PBS 中に再懸濁した。

## 【0426】

iRGD コンジュゲートしたシリカソームの合成：

iRGD - コンジュゲートしたシリカソームを、LB に含まれる PEG 鎖にペプチドを連結させることによって合成した。これは、上記のとおり脂質のモル比を維持しながら、市販の DSPE - PEG 2000 - マレイミドを DSPE - PEG 2000 の代わりに使用することによって達成された。チオール - マレイミド反応を使用し、室温で 4 時間にわたって実施して、過剰 (0.15 mL、5 mg / mL) のシステイン - 修飾 iRGD ペプチドを DSPE - PEG 2000 - マレイミドにコンジュゲートした (Sugahara et al. (2009) Cancer Cell, 16 (6) : 510 - 520)。粒子を洗浄して、反応しなかった iRGD を除去した。コンジュゲーション反応の成功を、フルオレセイン (FAM) 標識 iRGD ペプチドにコンジュゲートした粒子のバッチを調製し、続いて、十分に洗浄することによっても確認した (同書) (図 27、パネル A)。

## 【0427】

金の核マーカーを含むシリカソームの合成

10 nm Au ナノ粒子を、クエン酸塩含有溶液中で合成した (下記の「補足物質及び物質」を参照されたい)。金ナノ粒子核上に MSNP シェルを成長させるために、クエン酸塩封止された粒子 36 mL を、CTAC 溶液 12 mL (H<sub>2</sub>O 中 2.5 重量%) に急速注入した。粒子を洗浄し、350 rpm で攪拌しながら 5 分間にわたって 85 で CTAC 溶液 (H<sub>2</sub>O 中 6.25 重量%) に再懸濁した。この混合物に、10% (w/v) トリエタノールアミン 0.256 mL を 10 分間にわたって添加し、続いて、シリカ前駆体、TEOS 0.32 mL を滴下添加した。溶液を 350 rpm で 20 分間にわたって攪拌して、約 65 nm の平均サイズを有する Au 核 / MSNP シェル粒子を作成した。粒子を、メタノール中 1% NaCl (w/v) 及び純メタノールで連続洗浄することによって精製した。次いで、Au 標識 MSNP を、前記したとおりに LB でコーティングした。

## 【0428】

iRGD 同時投与を伴って、または伴わずに IV 注射されたシリカソームの生体内分布試験 IVIS (Xenogen) イメージングを使用して、KPC 由来同所モデルにおいて (n = 3 マウス / 群) において NIR 標識シリカソームの生体内分布を試験した (実施例 1、及び Liu et al. (2016) ACS Nano. 10 (2) : 2702 - 27

15を参照されたい)。動物に、 $iRGD 8 \mu mol / kg$ の同時投与を伴って、または伴わずに、 $50 mg / kg$ のコンジュゲートされた、及びコンジュゲートされていないシリカソームをIV注射した。動物を24時間後にと殺し、続いて、切除した腫瘍及び主要臓器をエキスピボでイメージングした。腫瘍生体内分布を、ICP-OESプロトコルを使用してSi含有率を評価することによっても確認した(同書)。

#### 【0429】

KPC由来同所腫瘍モデルにおける、 $iRGD$ 同時投与によるIr-シリカソーム有効性の評価

腫瘍担持B6/129マウスを、それぞれ6匹の動物を含む4つの群に無作為に割り付けた。第1の群には、イリノテカン用量 $40 mg / kg$ ( $MSN P 80 mg / kg$ )を含有するシリカソームを3日ごとに合計4回の投与でIV注射した。第2群には、同じ用量のIr-シリカソームを $iRGD 8 \mu mol / kg$ の同時投与と共に与えた。第3及び第4の群は、PBSまたは $iRGD$ のみで処置した。マウスを、自発的な動物死の時点または瀕死状態に近づくまで毎日監視した(実施例1及びLiu et al. (2016) ACS Nano. 10(2): 2702-2715; Olive et al. (2009) Science, 324(5933): 1457-1461を参照されたい)。原発性腫瘍及び転移部位の生物発光イメージングを、と殺の10分前に動物にD-ルシフェリン $75 mg / kg$ を腹腔内注射することによって行った。腫瘍組織及び主要臓器(GI管、肝臓、脾臓、心臓、肺及び腎臓)を、生物発光イメージ強度の定量評価のために採取した。

#### 【0430】

TEM検査によるトランスサイトosis経路の超微細構造分析

KPC同所腫瘍マウスを、 $iRGD 8 \mu mol / kg$ の同時投与を伴って、または伴わずに、Au封入されたシリカソーム $50 mg / kg$ のIV注射によって処置した。腫瘍生検材料を24時間後に収集し、PBS中で洗浄し、ただちに4℃で2.5%グルタルアルデヒドで固定した。さらなるサンプル調製及び切り出しは、UCLAの電子顕微鏡検査サービスセンター(Electron Microscopy Services Center)によって行われた。1%OsO<sub>4</sub>中で固定した後に、サンプルを酸化プロピレン中で脱水し、樹脂中に包埋した。60~80nm厚の組織切片を銅製のグリッド上に置き、JEOL 1200-EX電子顕微鏡下で検査した。

#### 【0431】

患者由来PDAC腫瘍におけるシリカソーム生体内分布

施設内のヒト対象の許可により、ホイップル外科手術を受けた患者から23のPDACサンプルのリポジトリを収集し、Timothy Donahue博士の研究室でNSGマウスにおいて異種移植片を確立するために使用した。表現型決定データ及びNRP-1発現についてのIHC染色の実施を利用して、2つの患者サンプル(XWR#8及び#187)を、6週齢の雌のNSGマウスの側腹部で新鮮な皮下異種移植片を成長させるために収集した(Ruckert et al. (2012). J. Surg. Res. 172(1): 29-39)。腫瘍サイズが約0.8cmの直径まで成長したときに、上記の手順と同様に、 $iRGD$ 同時投与を伴って、または伴わずにシリカソームを与えられた各群の3匹の動物を、腫瘍部位への生体内分布を評価するために使用した。動物を、エキスピボイメージングの実行のために24時間後にと殺して、NIR標識シリカソームの取り込みを決定した。イメージングデータを、ICP-OESによって腫瘍部位でのSi含有率を評価することによっても確認した。

#### 【0432】

統計的解析

群間の差異の比較分析を、両側スチューデントt検定(Excelソフトウェア、Microsoft)を使用して行った。統計的に有意な差は $p < 0.05$ と決定された。値は、図の説明文で述べられているとおり、多数回の決定の平均 $\pm SD$ として表された。生存データを、SPSSソフトウェアを使用してログランク検定(マンテル-コックス)によって処理した。

10

20

30

40

50

## 【0433】

## 補足的物質及び方法

## 物質

テトラエチルオルトシケート (tetraethyl orthosilicate; TEOS)、トリエタノールアミン、セチルトリメチルアンモニウムクロリド溶液 (CTAC、水中25重量%)、(3-アミノプロピル)トリエトキシシラン (APTES)、トリエチルアミン (TEA)、塩化金 (III) 水和物、クエン酸三ナトリウム脱水物、Dowex 50WX8樹脂、及びセファロースCL-4Bは、Sigma-Aldrich, USAから購入した。1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DSPC)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000] (アンモニウム塩) (DSPE-PEG2000)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[マレイミド(ポリエチレングリコール)-2000] (アンモニウム塩) (DSPE-PEG2000-マレイミド) 及びコレステロール (Chol) は、Avanti Polar Lipids, USAから購入した。スクロースオクタスルファート (SOS) ナトリウム塩は、Toronto Research Chemicals, Canadaから購入した。塩酸イリノテカン三水和物は、LC Laboratories, USAから購入した。ペニシリン、ストレプトマイシン、及びダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) は、Invitrogenから購入した。ウシ胎児血清 (FBS) は、Gemini Bio Products, USAから購入した。iRGD (CRGDKGPDG、配列番号11) は、Biomatik, USAから購入した。システイン残基で修飾された反応性iRGD及び遮断抗NPR-1抗体 (NRP-1の組換えb1b2ドメインに対する) は、Ruoslahti博士の厚意によって提供された。シクロ(-RGDfK) (配列番号12) は、Apex Bio Technology, USAから購入した。抗CD31抗体 (カタログ#553708) は、BD Pharmingen (商標) , USAから購入した。抗NPR-1抗体 (ab81321) は、Abcam, USAから購入した。対照の正常ヤギIgG (sc-2028) は、Santa Cruz Biotechnology, USAから購入した。Alexa Fluor (登録商標) 488コンジュゲートしたヤギ抗ウサギIgG (H+L) 二次抗体 (A11008)、Alexa Fluor (登録商標) 594コンジュゲートしたヤギ抗ラットIgG (H+L) 二次抗体 (A11007) 及びDyLight 680 NHSエステルは、Thermo Fisher Scientific Inc, USAから購入した。Matrigel (商標) Matrix Basement Membraneは、BD Bioscience, USAから購入した。すべての薬品をさらに精製せずに、そのまま使用した。

## 【0434】

DyLight 680を使用してのMSNPのNIR標識

NIR蛍光色素。DyLight 680 NHSエステルをMSNP標識のために使用した。初めに、NHSエステルのコンジュゲーションのために、MSNP表面をNH<sub>2</sub>基で官能化した。簡単に述べると、MSNP10mgをエタノール1mL中に懸濁させ、APTES1μLと混合した。反応を、80℃で終夜攪拌しながら不活性N<sub>2</sub>雰囲気下で行った。続いて、混合物を遠心分離し、エタノールで3回洗浄した。NH<sub>2</sub>コンジュゲートしたMSNPをDMF1mLに懸濁させ、DyLight 680 NHSエステル0.01mgと混合し、室温で2時間にわたって攪拌した。標識されたMSNPを、エタノール及び脱イオン水で洗浄した。NIR標識MSNPを使用して、シリカソームを作成した。

## 【0435】

約10nm金ナノ粒子の合成

約10nmの金ナノ粒子を、HAuCl<sub>4</sub>5mL (10mM) 及びMilli-Q水45mLを、凝縮器を備えた100mL丸底フラスコに添加することによって作成した。激しく攪拌しながら沸騰温度に達した後に、クエン酸ナトリウム5.8mL (38.8mM) を、沸騰溶液に添加した。これは、淡黄色からバーガンディ色への色変化を伴った。沸騰

10

20

30

40

50

溶液を160 で10分間にわたって攪拌し、次いで、加熱せずにさらに15分間にわたって攪拌した。金粒子を、本原稿の方法セクションにおいて記載したとおり、シリカソームを合成するための核として使用した。

#### 【0436】

##### 細胞系

不死化細胞系は、トランスジェニックKrasLSL-G12D/+;Trp53LSL-R172H/+;Pdx-1-Creマウスでの自発腫瘍に由来した。同所移植後の成長腫瘍の生物発光腫瘍イメージングを可能にするために、UCLAベクターコア施設(UCLA vector core facility)で、細胞にルシフェラーゼベースのレンチウイルスベクターを永続的にトランスフェクトした。限界希釈プロトコルの使用後に、代表的な細胞クローンを得た。

10

#### 【0437】

KPC由来細胞系を使用しての、免疫適格マウスにおける同所腫瘍の調製

すべての動物実験を、UCLA動物実験委員会によって承認されたプロトコルで行った。雌のB6/129マウス(約8週)をJackson Laboratoryから購入した。同所異種移植片を成長させるために、マウスに、イソフルランで麻酔をかけ、続いて、ケタミン50mg/kg及びキシラジン10mg/kgをIP注射した。手術部位を、切開部位の周囲1cmの範囲で剃毛し、ベタダイン及び70%エタノールで洗うことによって滅菌した。マウスを外科手術のために加温パッドの上に置き、左側腹部の切開部位を、無菌ガーゼで覆った。約0.7cmの外科的切開を行って、注射部位を露出させ、続いて、27ゲージ針によって、 $2 \times 10^6$  KPC-Luc細胞を含有するDMEM/マトリゲル50µL(1:1v/v)を臍臓尾部に注射した。腹膜層を吸収性縫合糸(PDS II、Ethicon)で、かつ皮膚を非吸収性縫合糸(Prolene、Ethicon)で閉じた。マウスを、麻酔から完全に回復するまで加温パッド上で保持し、次いで、清潔なケージに移した。人工涙軟膏剤を使用して、外科手術中にマウスの目を保護した。

20

#### 【0438】

iRGD効果に干渉するための抗NRP-1遮断抗体の使用

KPC由来同所腫瘍担持マウスにNIR標識シリカソーム50mg/kg及び遊離iRGD8µmol/kgのIV注射を与える15分前に、遮断抗NRP-1抗体または対照IgG50µgを注射した。シリカソームのみを与えられた動物を対照として使用した。動物を、注射後24時間目にと殺し、エキスピボNIRイメージングを、NIR標識シリカソームの生体内分布を試験するために使用した。エキスピボイメージングデータを、IVISソフトウェアを使用するNIR強度分析によって定量化し、ICP-OESを使用するSi含有率分析を続けた。

30

#### 【0439】

##### HPLC分析

組織中のイリノテカンのHPLC分析のために、採取した腫瘍及び臓器サンプルを秤量し、氷上で均質化した。組織ホモジネート0.1mLを酸性溶液0.4mL(0.1mol/Lのリン酸/メタノール、1:4v/v)で抽出した後に、抽出物を10秒間にわたって2回ボルテックス処理し、13,000rpmで10分間にわたって遠心分離した。Knauer Smartlineニューマチックポンプ、C18カラム、K-2600分光光度計、及びGinaデータ収集ソフトウェアを含む系でHPLC分析するために、イリノテカン含有上清を0.22µmフィルターで濾過した。1.0mL/分の流速で送達される移動相は、3%酢酸トリエチルアンモニウム水性緩衝液(pH5.5)及びアセトニトリル(73:27v/v)を含んだ。20マイクロリットルのイリノテカン含有サンプルを注射して、254nmでの薬物吸収を測定したが、典型的には約4.4分に溶離された。イリノテカン標準曲線を0.05~100µg/mLの濃度範囲で作成した。

40

#### 【0440】

##### 免疫蛍光染色

二重免疫蛍光染色を使用して、KPC腫瘍組織におけるNRP-1陽性血管を決定した

50

。腫瘍組織を、OCT試薬を使用して低温包埋し、腫瘍切片を調製するために使用した。切片を初めに、抗NRP1モノクローナル抗体(1:250)で4で終夜処理した。一次抗体を除去し、PBS中で3回洗浄した後に、Alexa Fluor(登録商標)488二次抗体(1:500)を添加し、1時間にわたって室温でインキュベートした。同じ切片を抗CD31抗体でも染色し、Alexa Fluor(登録商標)594-コンジュゲートした二次抗体処置を続けて、CD31発現を同定した。DAPIを使用して、細胞核を位置限定した。染色した切片を蛍光顕微鏡(Observer D1、Zeiss)下で検査した。NRP-1+/CD31+血管の同時局在比を、Imaging Jソフトウェアによって決定した。

【0441】

10

#### 実施例 4

##### プロトセルとシリカソームとの比較分析

脂質二重層コーティングされたナノ粒子の調製に向けた1つのアプローチは、エアロゾル補助された自己集合法によって合成されたMSNPの使用を含む。MSNPを、静電荷電リポソームの使用によってコーティングしたが、これは順に、負の電荷をもつMSNP表面と付着し、それを壊し、次いで、それと融合する(例えば、Liu et al. (2009) J. Am. chem. Soc. 131: 7567-7569を参照されたい)。Sandia及びUniversity of New MexicoのBrinker博士のグループによって開発されたこの生成物は、「プロトセル」と呼ばれ、標題:「がん細胞に多成分カーゴを標的送達するためのプロトセル及びその使用(Protocells and their use for targeted delivery of multicomponent cargos to cancer cells)」で米国特許(米国特許第8,992,984B1号)を与えられた。その特許は特に、「プロトセルは、カーゴ成分及び多孔性粒子をリポソームまたは脂質と混合し、続いて、多孔性粒子上で脂質二重層を融合させ、カーゴ成分を多孔性粒子の1つまたは複数の空孔中に相乗的に負荷してプロトセル化合物を形成することによって形成することができる」ことを教示している。米国特許第8,992,984号の図1Cに示されているプロトセルの例は、「正の電荷をもつ多孔性粒子は、DOPS脂質二重層などの負の電荷をもつ脂質二重層と融合することができ、その際、その正の電荷をもつ多孔性粒子は、負の電荷をもつカーゴ成分(例えば、カルセインまたはDNAまたはsiRNA)を吸収することができる[正の電荷をもつ多孔性粒子]」を示している。

20

30

【0442】

本明細書に記載の方法及びシリカソームを開発する際に、本発明者らは、このアプローチを、いくつかの理由によって予測不可能で、かつ可能化されないとみなしたので、プロトセルで使用される手順及び成分を積極的に回避した。本発明者らは米国特許第8,992,984号に記載のリポソーム融合方法を使用して均一なMSNPコーティングを達成することができただけでなく、数多くの試みで、有意な薬物負荷も達成することができなかった。このことが、本発明者らを、本明細書に記載のバイオフィルム技術、音波処理手順、及び負荷方法を開発して、プロトセルとは異なる脂質組成物からなるLBでの均一な粒子コーティングのための再現可能な手順を得るように促した。

40

【0443】

図32は、「プロトセル」を生成するための本発明者らの試みの間に作成されたデータを示しており、これは、Ashley et al. (2011) Nat. Mat., 10: 389-397によって記載されたプロトセルと同等である。簡単に述べると、25mg/mL MSNP 100 µLをリポソーム 100 µLに2.5mg/mLで添加し、Ashley et al. 刊行物(同書)に記載の連続ステップを続けた。最終生成物が上のパネルに示されている。この生成物を、流体力学的サイズ、サイズ分布及びコロイド安定性の評価に掛けた。左側の差し込み写真は、「コーティングされた」生成物の相分離を示しており、中央のDLSパネルは、コーティングされていない粒子の小さなピーク及び凝集した粒子塊の大きなピークを示している。右側のTEMイメージによって、プロトセル

50

の粒子凝集及びシリカソームでのコロイド安定性が確認される。プロトセルにコロイド安定性が掛けていることによって、この生成物は、I V 投与によって使用するには失格である。まとめると、プロトセルとは異なり、シリカソームは優れたコロイド安定性、低いPDI、及び狭いサイズ分布を示す。

【0444】

表6は、シリカソームとプロトセル技術との間の様々な差異を示している。

【表6A】

表6。シリカソームとプロトセル技術とのいくつかの特徴の比較。

組成物、方法、または結果	シリカソーム	プロトセル
MSNP合成方法	ゾルゲル方法、実施例1～3に示されている特徴を有する均一な粒径分布が得られる	エアロゾル補助された自己集合、上記で示した不均一なサイズ分布及び特徴を有する粒子が得られる
LB組成	例示的な、ただし非限定的なシリカソームのバイオフィルムの脂質組成は以下のものである： DPPC/Chol/DSPE-PEG (PTX/GEM同時送達シリカソーム) DSPC/Chol/DSPE-PEG (イリノテカンシリカソーム)	コーティングされた粒子の実際の脂質組成は分からないが、次の組成を有するリポソームから作成される： DOPC/Chol/DOTAP DOPC/Chol/DOPS DOPC/Chol/DSPE-PEG DPPC/Chol/DSPE-PEG DOPC/Chol/DOPPE-PEG DSPC/Chol/DSPE-PEG
MSNP：脂質比(wt/wt)	1：1.1	10：1 (前出Ashley et al. では1：2に変更)
コーティング技術及び効率	シングルステップアプローチで、高エネルギー入力で音波処理を使用、そして、粒子の約100%の瞬間封入、粒子集団におけるCryo-EM証明あり	マルチステップアプローチで、低エネルギー入力で粒子/リポソーム混合物のボルテックス処理を使用、そして、集団内の多くの粒子のコーティングについて証拠がない
粒径、サイズ分布	例示的な、ただし非限定的な実施形態で、MSNP核サイズは60～70nmの範囲である。 これらは、PDI<0.1で高度に均一である。 LBコーティング後に、シ	MSNP核はゾルゲル手順で作成されてなく、したがって、核粒子は均一ではなく大きな、及び小さな粒子の混合物である。プロトセルでは、MSNP核サイズは、50～300nmの範

10

20

30

40

50

【表 6 B】

	<p>リカソームは、<math>&lt; 0.1</math> の PDI で <math>110 \sim 130</math> nm の流体力学的サイズを示す。</p> <p>CryoEM は、約 <math>80</math> nm の一次シリカソームサイズを示している。</p> <p>本発明者らの LB コーティング手順は、均一でより小さな、またはより大きな MSNP 核サイズ、例えば <math>50 \sim 300</math> nm を有する MSNP をコーティングする際にも有効である。</p>	<p>囲である。したがって、サンプルの PDI は不均一すぎて計算することができない。</p>
空孔分布及びサイズ	ミミズ状の分布、サイズ約 $3$ nm	ミミズ状； $1.95 \sim 2.25$ nm
コロイド安定性	高いコロイド安定性。継続中の安定性試験は、生成の瞬間から、PBS 中で $4^{\circ}\text{C}$ での貯蔵を通じて 6 カ月以上にわたって良好で変わらない安定性を示している。	さらなる安定性試験を不可能にする瞬間凝集
合成再現性	初めてこの技術を実行する学部生でも、高度に再現可能	本発明者らの手では、さらには Brinker の人々と並んで作業しても再現不可能
薬物負荷方法	プロトン勾配による遠隔負荷	封入の前に、大部分は浸漬及び空孔への静電付着を使用
医薬品活性成分 (API) の特徴	<p>親水性薬物、疎水性薬物、親水性及び疎水性の組合せ、弱塩基性の特徴を有する薬物の遠隔負荷は、次のパラダイムに従って記載される：</p> <p>これらのカーゴ分子の一般的な特徴には、次の化学的特性が含まれる：(i) 第一級、第二級、第三級または第四級アミン（複数可）を含む有機分子化合物；(ii) プロトン化及び LB の</p>	<p>米国特許第 <math>8,992,984</math> 号は、これらの API の構造についての明確な定義なしに、多数のペイロードを列挙している。最小限、これには、約 <math>360</math> のペイロード構造、例えば、化学剤、キナーゼ阻害薬、抗体及びタンパク質が含まれる。様々な DNA 及び siRNA の封入も請求されている。いくつかの場合には静電相互作用も役割を果た</p>

10

20

30

40

50

【表 6 C】

	後ろでの捕捉を可能にする $pK_a < 11$ ; (i i i) L Bを越えての拡散を可能に する $5 \sim 25 \text{ mg/mL}$ の 水溶範囲及び両親媒性; (i v) $-3.0 \sim 3.0$ のオ クタノール／水分配係数ま たは $\log P$ 値; (v) MS NP 空孔への進入を可能に する MSNP 空孔サイズ ( $2 \sim 8 \text{ nm}$ ) よりも小さ い幾何学的寸法を有する適 切な分子量。	し得るが、これらの API の多くは、受動的封入プロ セスによって封入される。
--	--	---

10

## 【0445】

本明細書に記載の実施例及び実施形態は、例示を目的としたものに過ぎないこと、及びそれらを考慮して様々な変更または変化が当業者に示唆され、それらは、本出願の意図及び趣旨、ならびに添付の特許請求の範囲に含まれ得ることは理解される。本明細書において引用されるすべての刊行物、特許、及び特許出願は、あらゆる目的のためにそれらの全体で参照によって本明細書に組み込まれる。

20

30

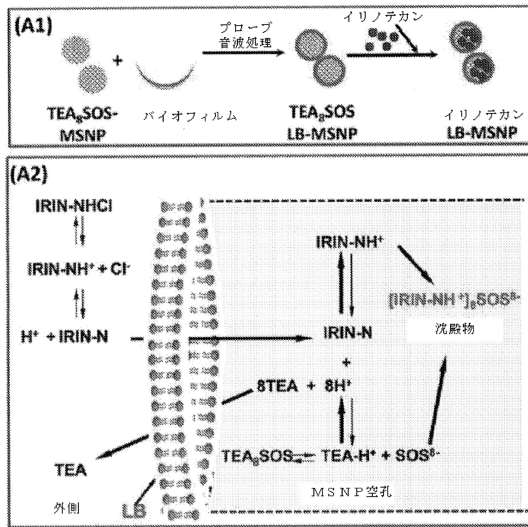
40

50

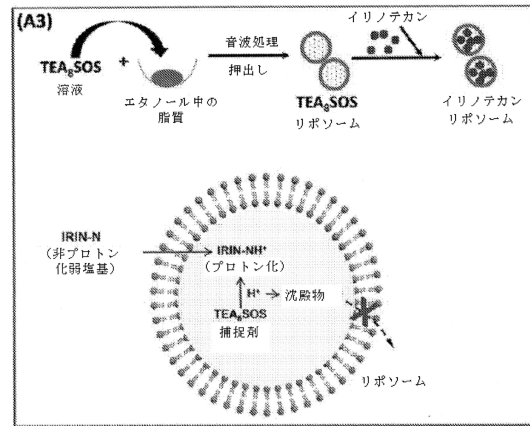


【図面】

【図 1 A - 1】



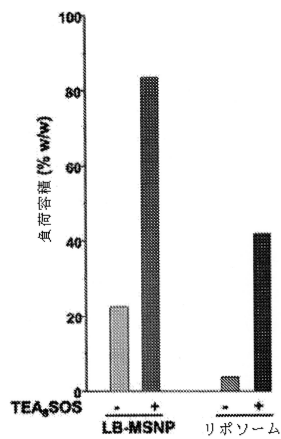
【図 1 A - 2】



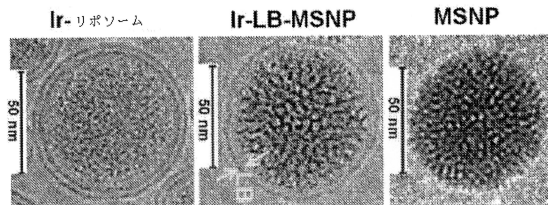
10

20

【図 1 B】



【図 1 C】

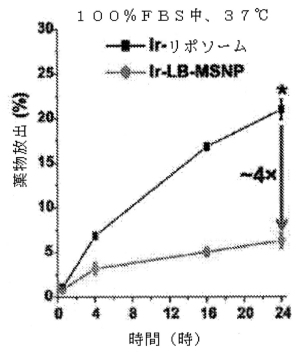


30

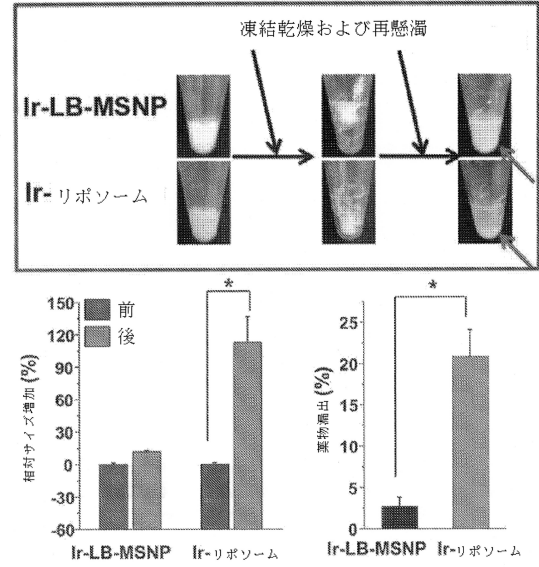
40

50

【図 1 D】

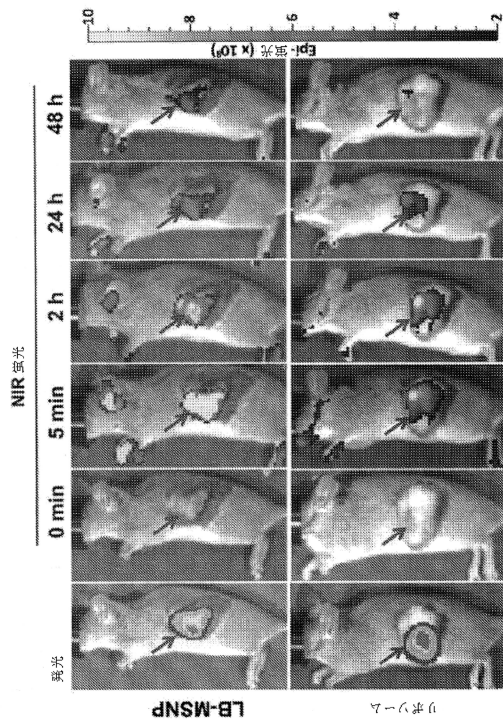


【図 1 E】

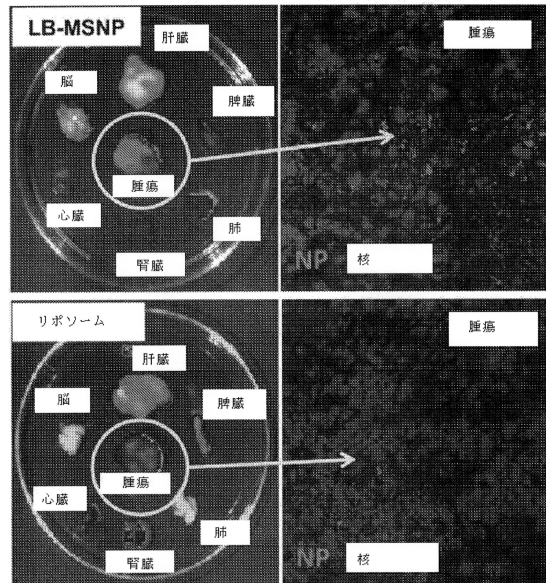


10

【図 2 A】



【図 2 B】



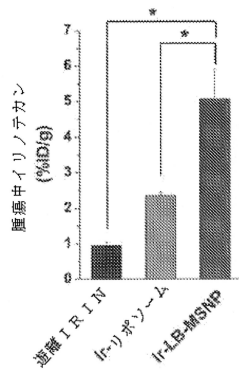
20

30

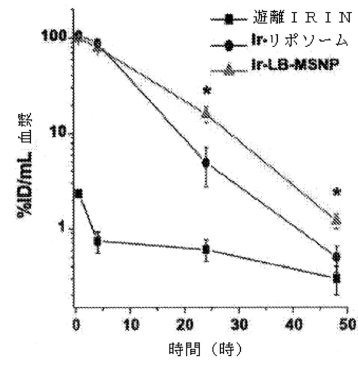
40

50

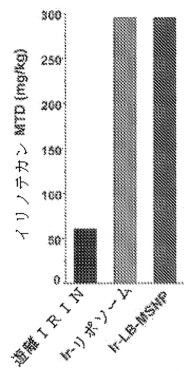
【図 2 C】



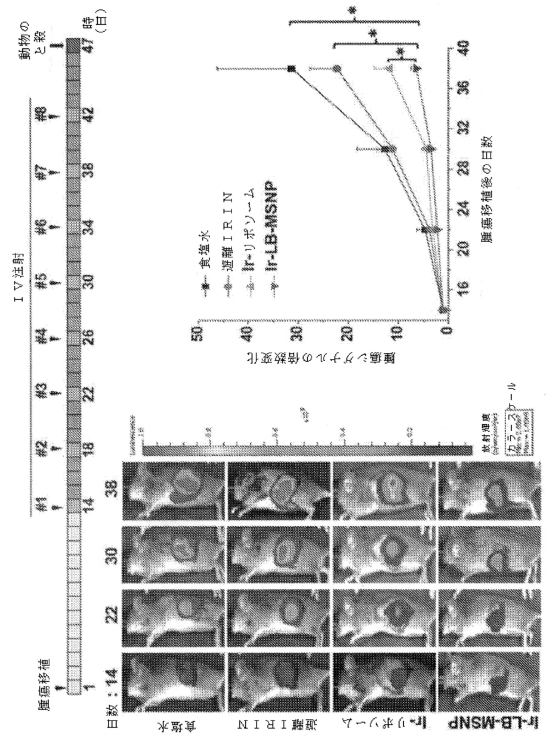
【図 2 D】



【図 3 A】



【図 3 B】



10

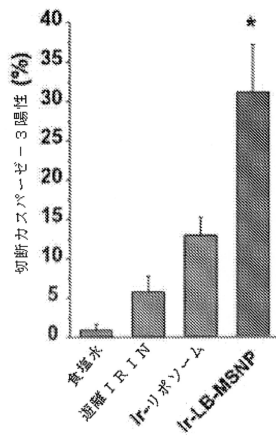
20

30

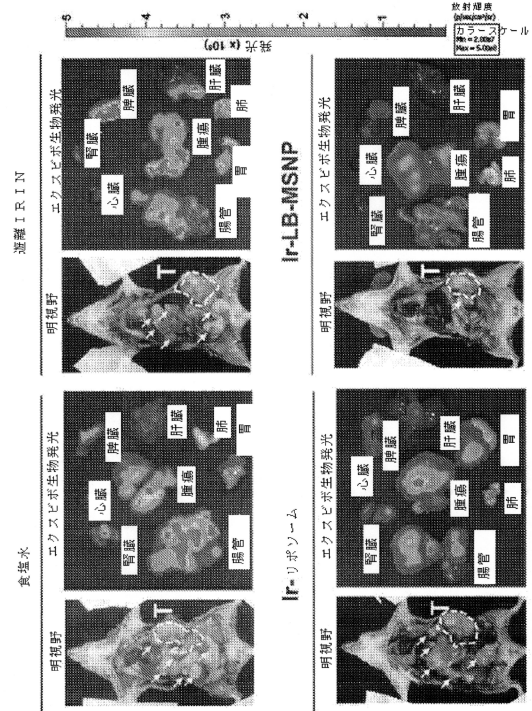
40

50

【図 3 C】



【図 3 D】

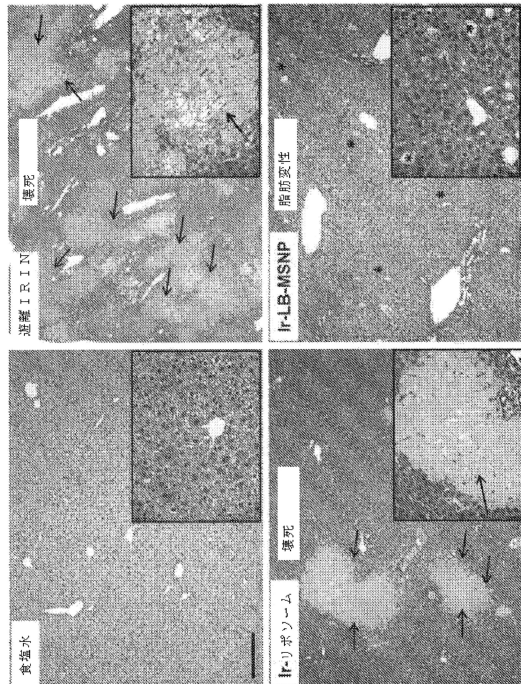


【図 3 E】

	食塩水	遊離 I R I N	Ir-リボソーム	Ir-LB-MSNP
肝臓	87.5	87.5	75	62.5
脾臓	100	100	75	75
腎臓	62.5	50	62.5	25
腸管	100	100	100	87.5
胃	100	100	87.5	75
腹壁	100	100	100	100
横隔膜	100	100	75	50
血性腹水	100	100	75	62.5

転移頻度 (Transfer Frequency) scale: 0 to 100%

【図 4 A】



10

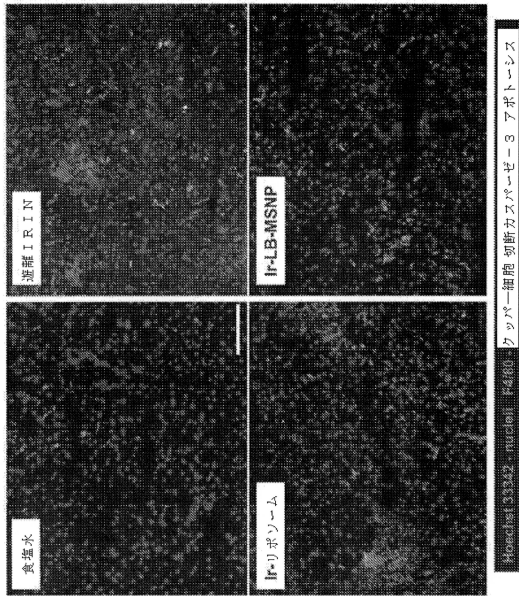
20

30

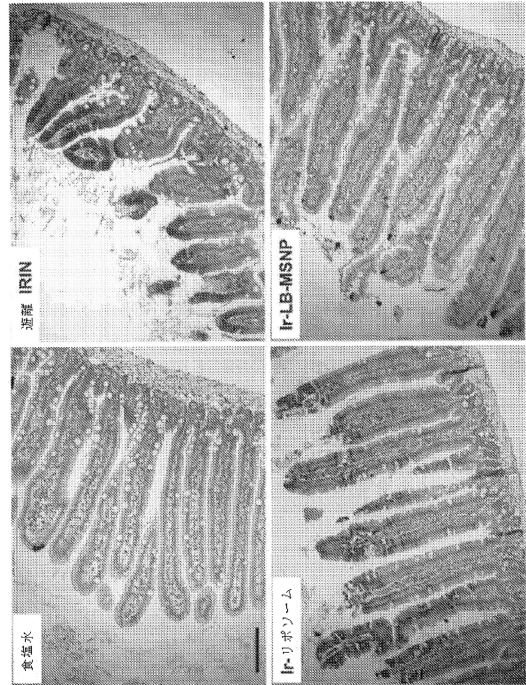
40

50

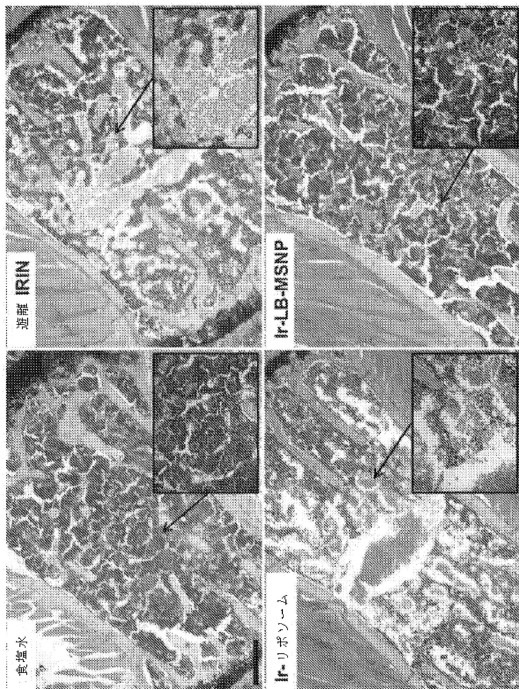
【図 4 B】



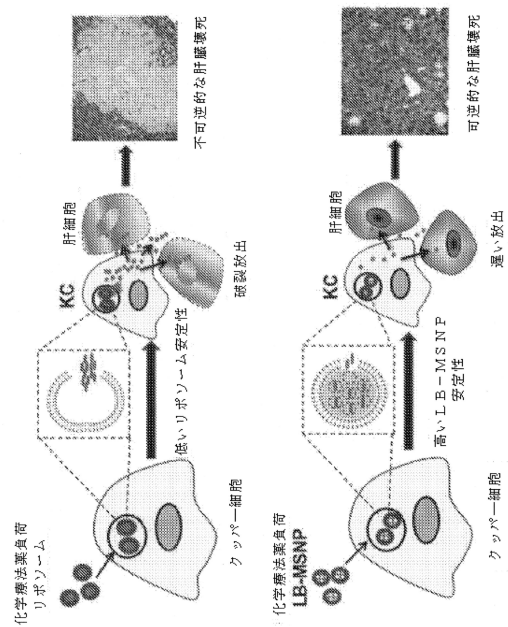
【図 4 C】



【図 4 D】



【図 4 E】



10

20

30

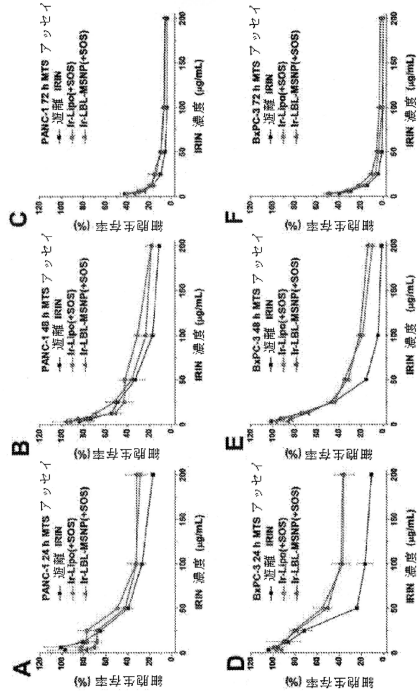
40

50

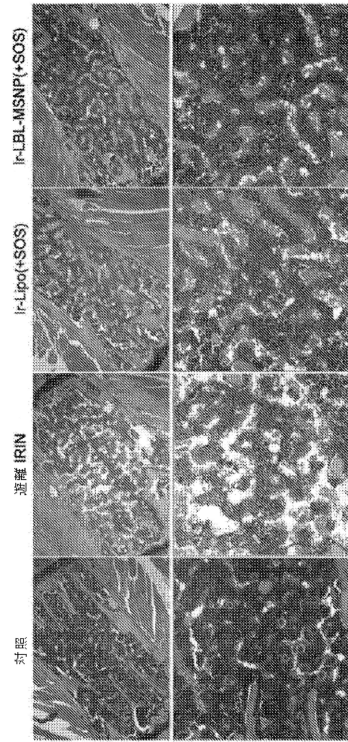




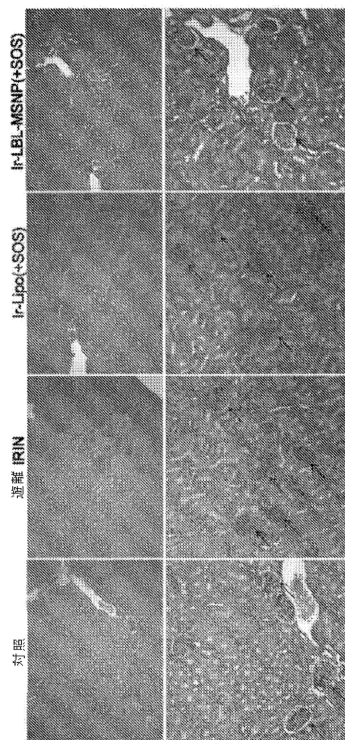
【図 8】



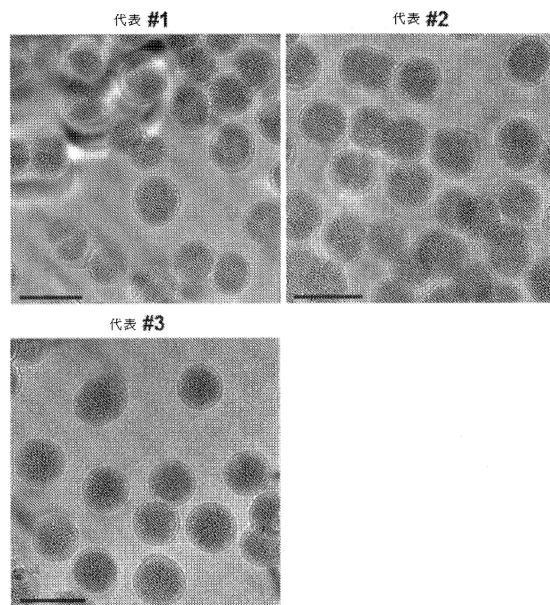
【図 9】



【図 10】



【図 11】



10

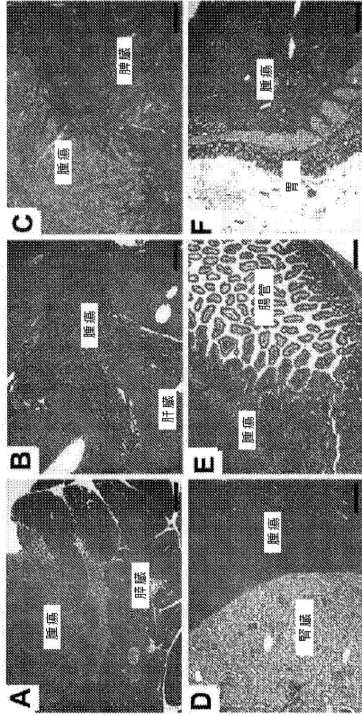
20

30

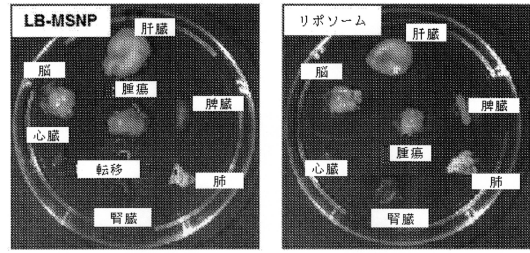
40

50

【図 1 2】



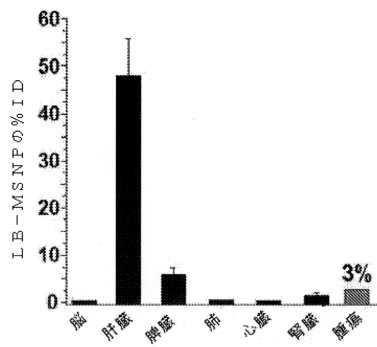
【図 1 3】



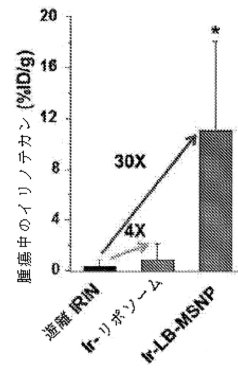
10

20

【図 1 4】



【図 1 5 A】



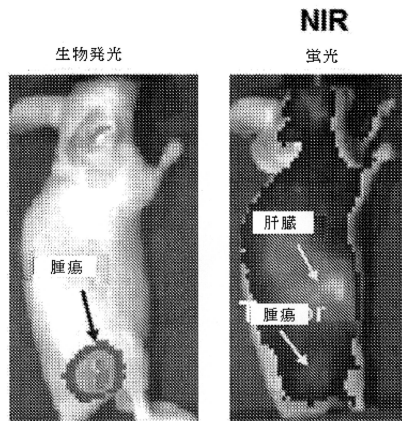
30

40

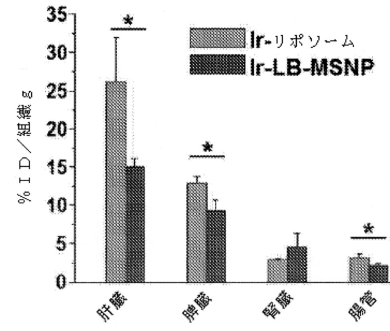
50



【図 15 B】

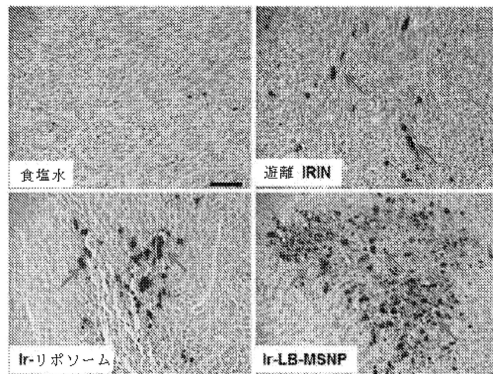


【図 16】

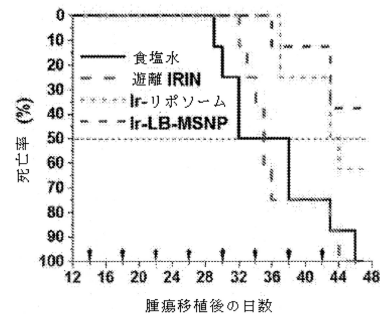


10

【図 17】



【図 18】



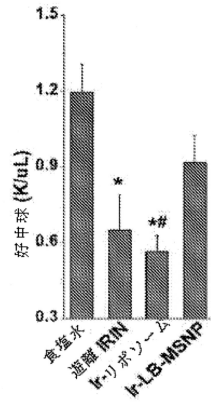
20

30

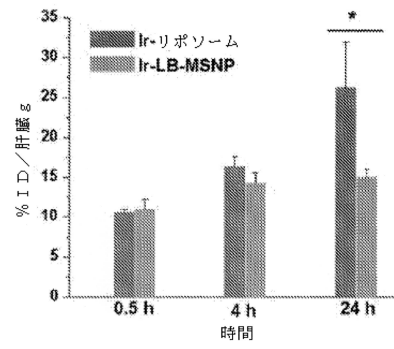
40

50

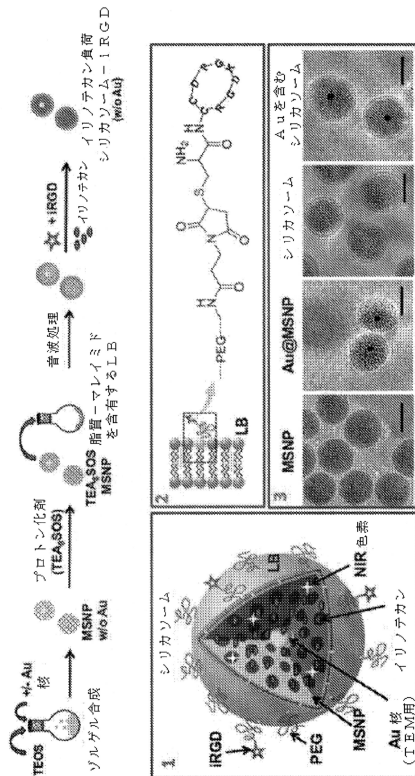
【図 19】



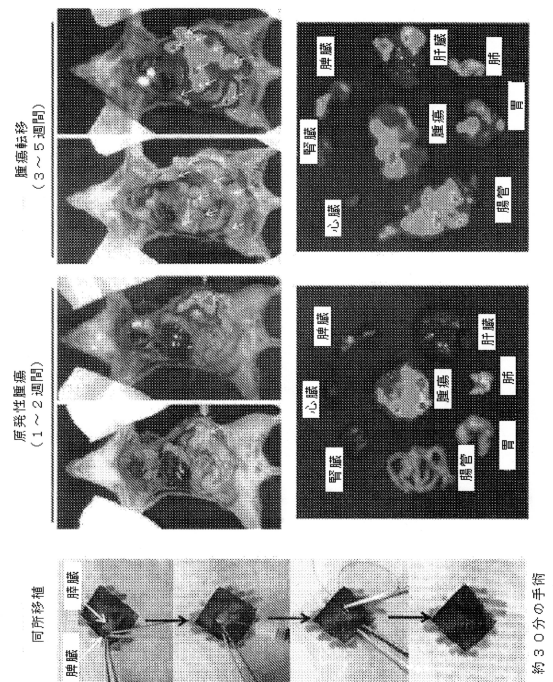
【図 20】



【図 21 A】



【図 21 B】



10

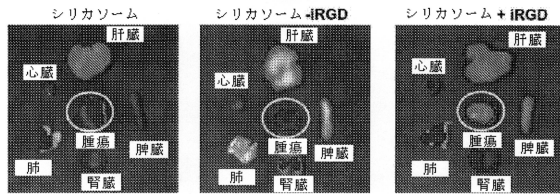
20

30

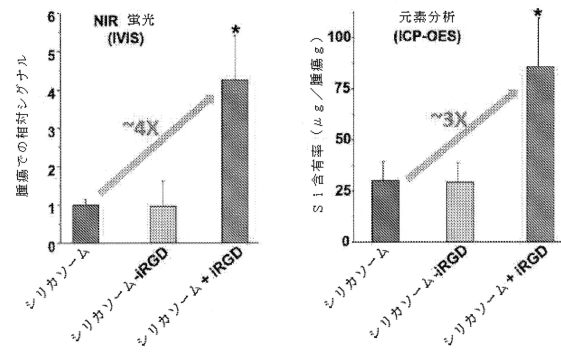
40

50

【図 2 2 A】

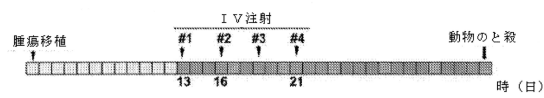


【図 2 2 B】

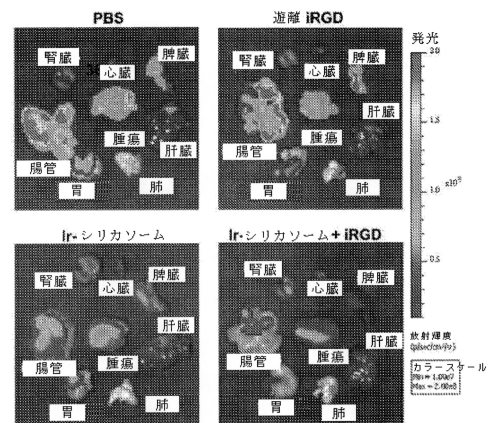


10

【図 2 3 A】



【図 2 3 B】



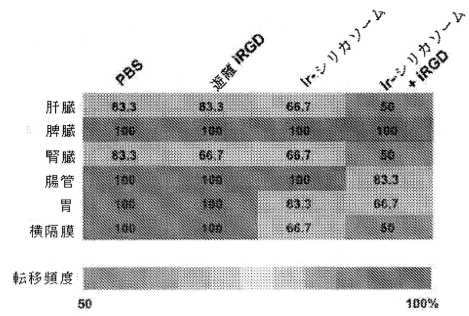
20

30

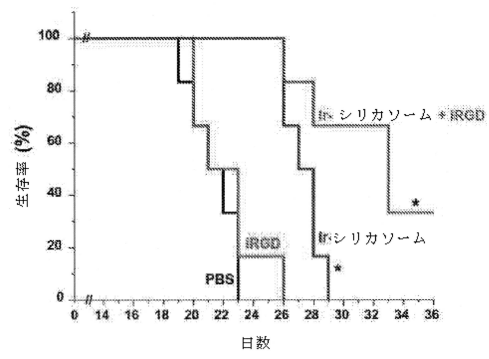
40

50

【図 2 3 C】

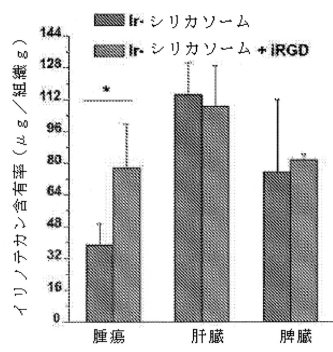


【図 2 3 D】

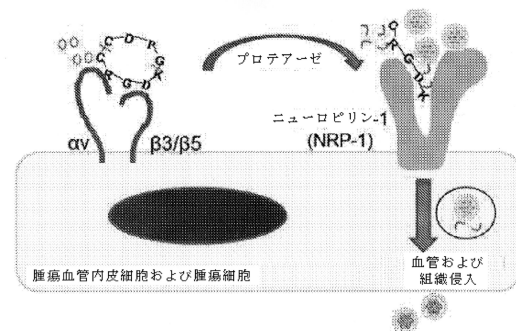


10

【図 2 3 E】



【図 2 4 A】



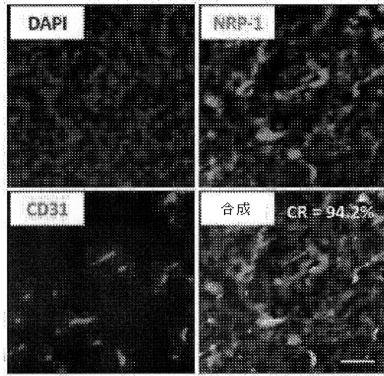
20

30

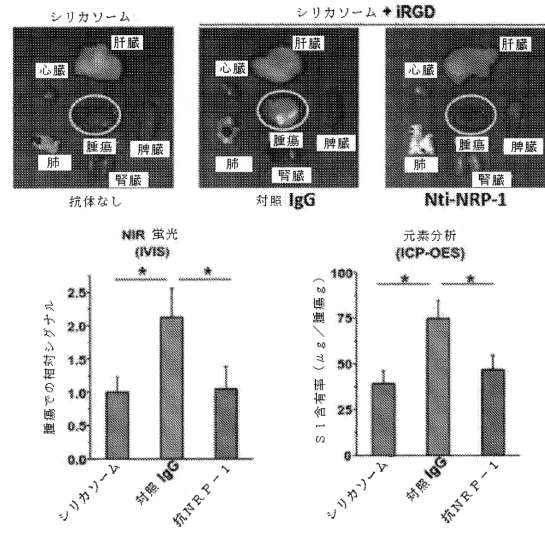
40

50

【図 2 4 B】

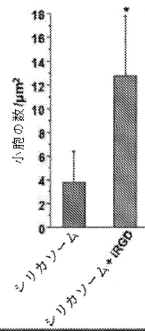


【図 2 4 C】

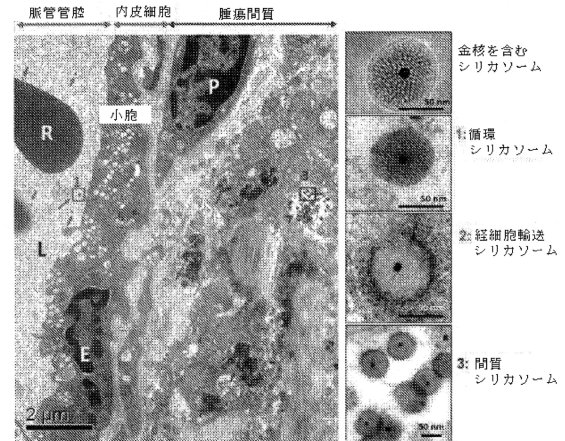


10

【図 2 5 A】

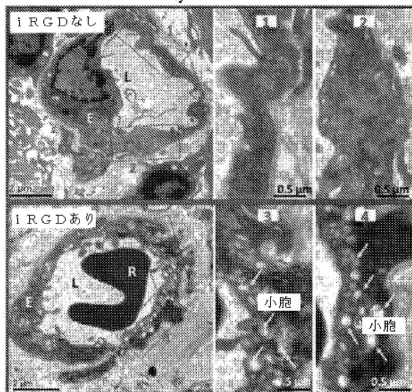


【図 2 5 B】



20

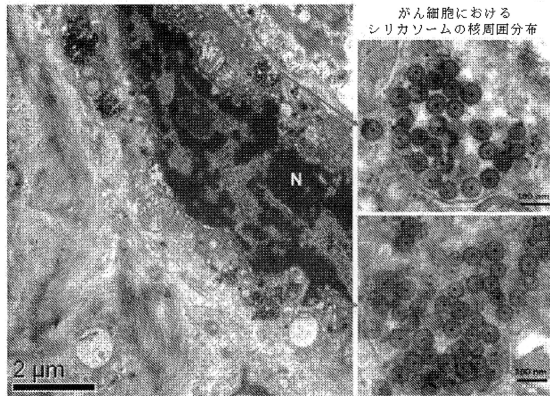
30



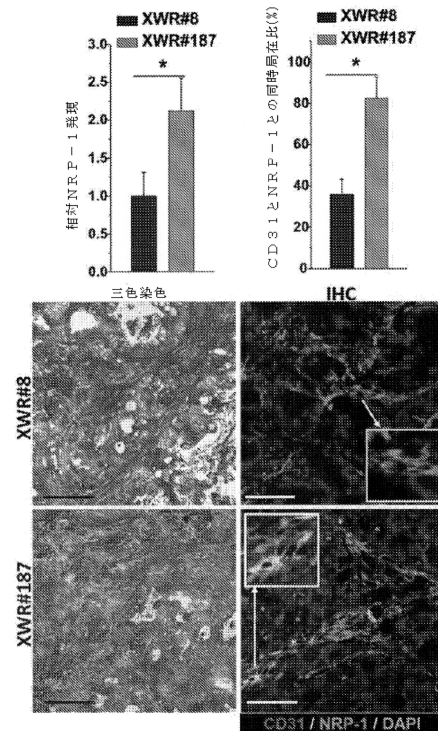
40

50

【図 25C】



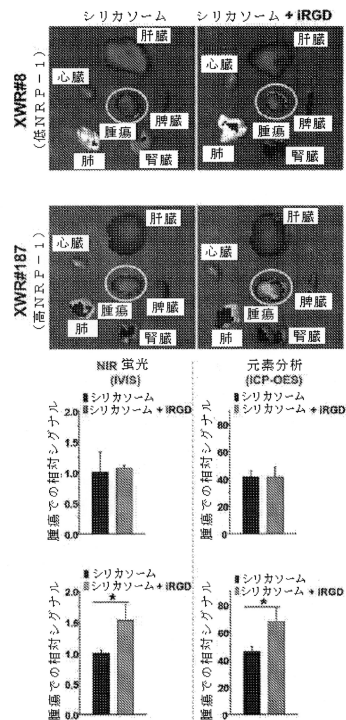
【図 26A】



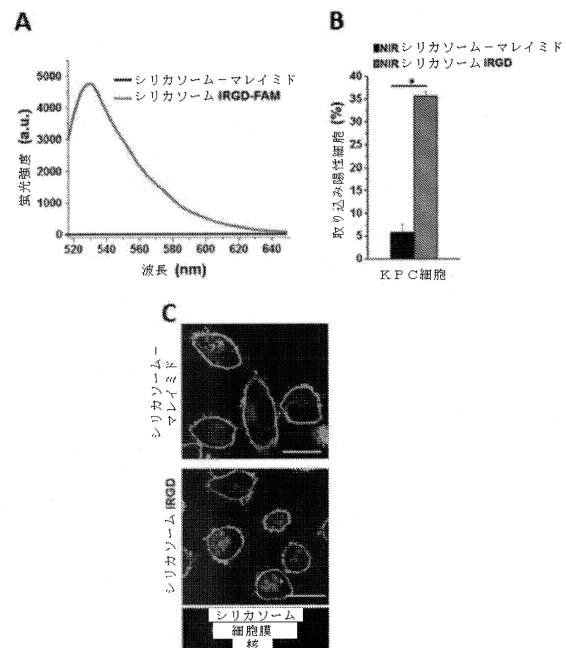
10

20

【図 26B】



【図 27】

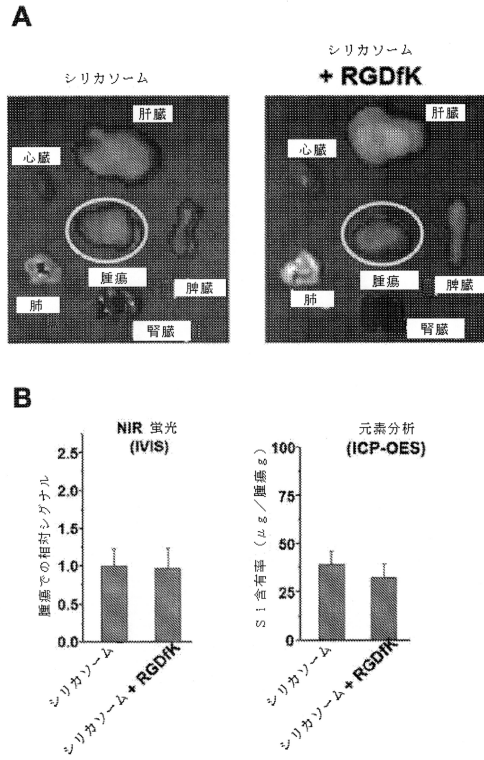


30

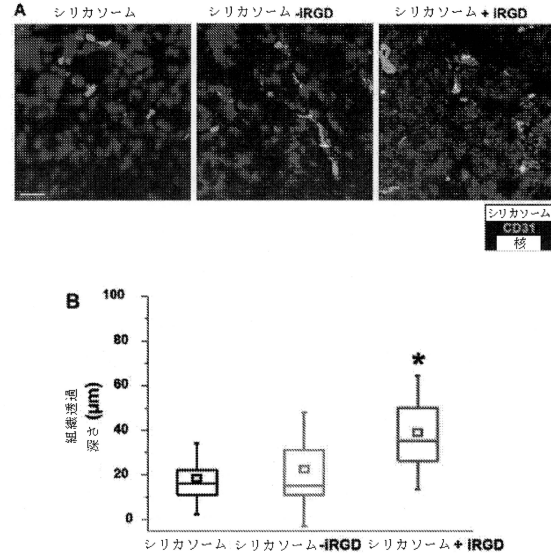
40

50

【図 28】



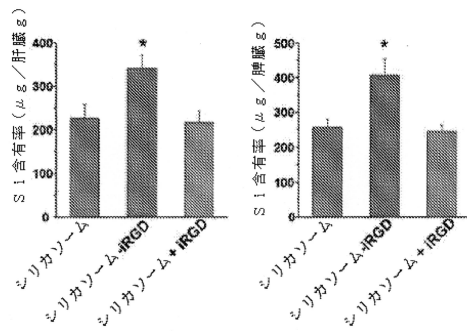
【図 29】



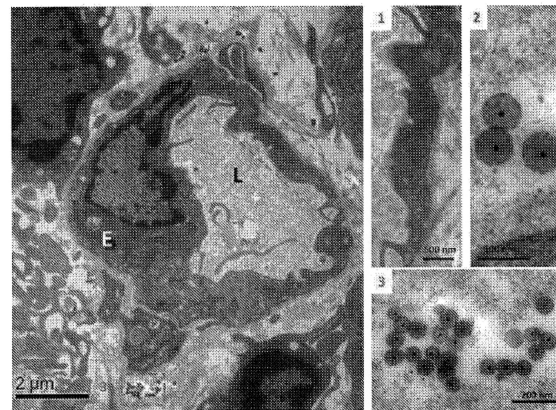
10

20

【図 30】



【図 31】

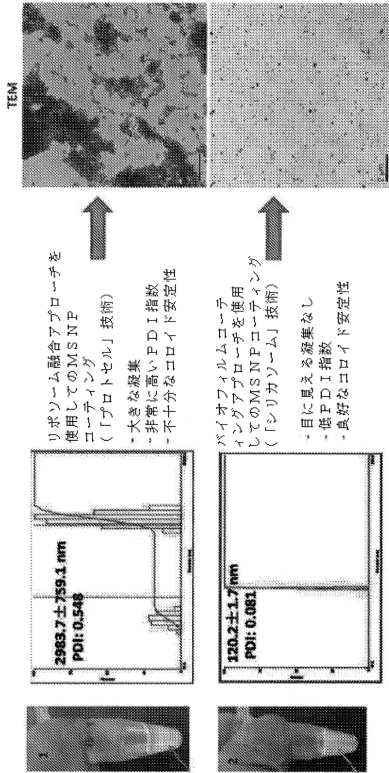


30

40

50

【図 3 2】



10

20

30

40

50



## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	31/513 (2006.01)	A 6 1 K	31/513
A 6 1 K	31/519 (2006.01)	A 6 1 K	31/519
A 6 1 K	47/04 (2006.01)	A 6 1 K	47/04
A 6 1 K	47/24 (2006.01)	A 6 1 K	47/24
A 6 1 K	47/26 (2006.01)	A 6 1 K	47/26
A 6 1 K	47/28 (2006.01)	A 6 1 K	47/28
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00

弁理士 阿部 達彦

## (72)発明者

アンドレ・イー・ネル

アメリカ合衆国・カリフォルニア・9 1 4 2 3・シャーマン・オークス・ミュリエッタ・アヴェニ  
ュー・4 2 1 2

## (72)発明者

ファン・メン

アメリカ合衆国・カリフォルニア・9 0 0 6 6・ロサンゼルス・ソウテル・ブルヴァード・3 3  
4 0・# 2 0 4

## (72)発明者

シャンシェン・リュウ

アメリカ合衆国・カリフォルニア・9 0 0 3 4・ロサンゼルス・オーバーランド・アヴェニュー・  
3 2 3 0・# 2 1 2

審査官

梅田 隆志

## (56)参考文献

米国特許第0 8 9 9 2 9 8 4 ( U S , B 1 )

DRUMMOND, D.C. et al. , Cancer Research , 2006年 , Vol.66, No.6 , pp.3271-3277.

## (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K 3 1 / 4 7 4 5

A 6 1 K 9 / 1 0

A 6 1 K 9 / 1 2

A 6 1 K 9 / 7 2

A 6 1 K 3 1 / 2 8 2

A 6 1 K 3 1 / 5 1 3

A 6 1 K 3 1 / 5 1 9

A 6 1 K 4 7 / 0 4

A 6 1 K 4 7 / 2 4

A 6 1 K 4 7 / 2 6

A 6 1 K 4 7 / 2 8

A 6 1 P 3 5 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T  
N )