

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7688394号
(P7688394)

(45)発行日 令和7年6月4日(2025.6.4)

(24)登録日 令和7年5月27日(2025.5.27)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	17/04 (2006.01)	C 0 7 K	17/04
A 6 1 K	9/14 (2006.01)	A 6 1 K	9/14
A 6 1 K	38/18 (2006.01)	A 6 1 K	38/18
A 6 1 K	38/19 (2006.01)	A 6 1 K	38/19
A 6 1 K	38/20 (2006.01)	A 6 1 K	38/20
請求項の数 11 (全63頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2021-506399(P2021-506399)	(73)特許権者	517022072
(86)(22)出願日	令和1年6月3日(2019.6.3)		レモネックス インコーポレイテッド
(65)公表番号	特表2021-532163(P2021-532163 A)		LEMONEX INC.
(43)公表日	令和3年11月25日(2021.11.25)		大韓民国 0 6 6 8 3 ソウル, ソチョーグ, バンベロー, 1 0 3 (バンベードン, ディーエム タワー)
(86)国際出願番号	PCT/KR2019/006682		(DM Tower, Bangbae-dong) 103, Bangbae-ro, Seocho-gu, Seoul 06683 Republic of Korea
(87)国際公開番号	WO2020/032366	(74)代理人	100137095
(87)国際公開日	令和2年2月13日(2020.2.13)		弁理士 江部 武史
審査請求日	令和3年2月5日(2021.2.5)	(72)発明者	ウォン, チョル ヘ
審判番号	不服2023-10552(P2023-10552/J 1)		大韓民国, 0 8 7 4 1 ソウル, グワ
審判請求日	令和5年6月26日(2023.6.26)		最終頁に続く
(31)優先権主張番号	62/714,874		
(32)優先日	平成30年8月6日(2018.8.6)		
(33)優先権主張国・地域又は機関			
最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 免疫反応物質送達体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗体 (antibody) またはサイトカイン (cytokine) を担持した多孔性シリカ粒子を含み、

前記多孔性シリカ粒子は、1 ～ 1 0 0 n mの平均気孔直径を有し、

前記多孔性シリカ粒子は、生分解性であり、下記数式 1 の吸光度の比が 1 / 2 となる t が 2 4 以上であり、

前記多孔性シリカ粒子は、外部表面または気孔内部に親水性または疎水性の官能基を有するものである、免疫反応物質送達体。

[数式 1]

$$A_t / A_0$$

(式中、A₀は、前記多孔性シリカ粒子 1 m g / m l と疑似体液とを含む懸濁液 5 m l を直径 5 0 k D a の気孔を有する円筒状の透過膜に入れて測定した前記多孔性シリカ粒子の吸光度であり、

前記透過膜の外には、前記透過膜と接し、前記懸濁液と同じ前記疑似体液 1 5 m l が位置し、前記透過膜の内外部は 3 7 ° C で 6 0 r p m で水平攪拌され、

前記懸濁液の p H は 7 . 4 であり、

A_tは、前記 A₀ の測定時から t 時間経過後に測定した前記多孔性シリカ粒子の吸光度である。)

【請求項2】

前記抗体は、インターロイキン（interleukins）またはインターフェロン（interferons）タンパク質に特異的に結合する抗体である、請求項 1 に記載の送達体。

【請求項 3】

前記抗体は、IgG であるか；PD-1、CTLA-4、TIM-3、BTLA、VISTA、LAG-3、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、CD28、CD27、CD137、HVEM、GITR、VEGFR、VEGF、EGFR、EGF、IL-1、IL-6、IL-23、TGF-beta、CTGF、TSLP、TNF-alpha、Notch 及び OX40 からなる群より選択される少なくとも一つのタンパク質に特異的に結合する抗体である、請求項 1 に記載の送達体。

【請求項 4】

前記抗体は、PD-1、PD-L1 及び CTLA-4 からなる群より選択される少なくとも一つのタンパク質に特異的に結合する抗体である、請求項 1 に記載の送達体。

【請求項 5】

前記サイトカインは、インターロイキン（interleukins）またはインターフェロン（interferons）である、請求項 1 に記載の送達体。

【請求項 6】

前記サイトカインは、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-21、IL-23、IL-24、IL-27、G-CSF、GM-CSF、HGF、EGF、VEGF、LTF、TGF-beta 及び IL-2 からなる群より選択される少なくとも一つである、請求項 1 に記載の送達体。

【請求項 7】

前記サイトカインは、IL-2、IL-12、IL-15、IL-21、IL-24 及び IL-13 からなる群より選択される少なくとも一つである、請求項 1 に記載の送達体。

【請求項 8】

前記多孔性シリカ粒子は、前記外部表面または前記気孔内部が中性の pH で電荷を帯びるものである、請求項 1 に記載の送達体。

【請求項 9】

抗体（antibody）を担持した多孔性シリカ粒子と、サイトカイン（cytokine）を担持した多孔性シリカ粒子とを含む、請求項 1 に記載の送達体。

【請求項 10】

請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の送達体を含む免疫療法（immunotherapy）用の組成物。

【請求項 11】

請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の送達体を含む癌または免疫疾患の予防または治療用の薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫反応物質を安定的に、標的部位に送達し、優れた免疫治療効果を有する免疫反応物質送達体に関する。

【背景技術】

【0002】

薬物送達システムとは、医薬品の副作用を最小限に抑え、効能及び効果を極大化し、必要な量の薬物、例えば、タンパク質、核酸又はその他の低分子などを効率よく送達する医薬技術を意味する。新薬開発に必要なコストと時間を軽減する効果を有する前記技術は、最近になってナノテクノロジーと結合し、医薬系において新たな付加価値を創出する先端技術の一分野として位置づけられている。米国と日本などの技術先進国では、去る 80 年代後半から、製薬会社などの企業を中心に新薬開発とともに薬物送達システムの開発に全力を注いでいる。

【0003】

10

20

30

40

50

これまでは、ウイルス遺伝子、組換えタンパク質、リポソーム (liposome)、陽イオン性高分子、並びに様々な形態のナノ粒子とナノ物質が、動物細胞内への薬物送達に使用されてきた。しかし、多くの陽イオン性リポソームと陽イオン性高分子は、細胞に強い毒性を示すため、臨床に適用するには不相当であることが判明した。また、核酸の安定な細胞膜透過のために、核酸の主鎖を化学的に変形する方法も試みられた。しかし、この方法は、高コストで長時間かかり、労働集約的な工程を必要とするため、臨床への適用には適していない。意味のある試みとして、量子ドット、磁性粒子又は金ナノ粒子を含む様々な形態のナノ粒子を用いる薬物送達システム (drug delivery system、DDS) が開発されている。しかし、これらの粒子は、細胞に毒性を示し、核酸などの生体高分子の導入に容易でない構造を有し、また細胞内への導入効率も低いという欠点があった。

10

【0004】

細胞内における生理活性物質の機能の研究または細胞内送達のためには、効率の良い送達システムが必要である。しかしながら、広範な生理活性物質を送達できる汎用的な送達システム、多量の薬物を収容及び送達できるシステム、薬物を徐放的に放出するシステムの開発は、まだ不十分な状況である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、抗体とサイトカインを含む様々な免疫反応物質を安定的に、標的部位に送達し、優れた免疫治療効果を有する免疫反応物質送達体を提供することにその目的がある。

20

【課題を解決するための手段】

【0006】

1. 抗体 (antibody) またはサイトカイン (cytokine) を担持した多孔性シリカ粒子を含み、

前記多孔性シリカ粒子は、直径 5 nm 未満の気孔を有するシリカ粒子を 120℃～180℃で24時間～96時間膨張剤と反応させ、前記直径 5 nm 未満の気孔を膨張させるステップと、前記気孔が膨張されたシリカ粒子を 400℃以上の温度で3時間以上か焼するステップとを含んで製造され、

前記多孔性シリカ粒子の平均直径は 150 nm～1,000 nm であり、その BET 表面積は 200 m²/g～700 m²/g であり、その g 当たりの体積は 0.7 ml～2.2 ml であり、

30

前記多孔性シリカ粒子は、下記数式 1 の吸光度の比が 1/2 となる t が 24 以上である、免疫反応物質送達体。

[数式 1]

$$A_t / A_0$$

(式中、A₀は、前記多孔性シリカ粒子 1 mg/ml の懸濁液 5 ml を直径 50 kDa の気孔を有する円筒状の透過膜に入れて測定した前記多孔性シリカ粒子の吸光度であり、

前記透過膜の外部には、前記透過膜と接し、前記懸濁液と同じ溶媒 15 ml が位置し、前記透過膜の内外部は 37℃で 60 rpm で水平攪拌され、

前記懸濁液の pH は 7.4 であり、

40

A_tは、前記 A₀ の測定時から t 時間経過後に測定した前記多孔性シリカ粒子の吸光度である。)

【0007】

2. 前記項目 1 において、前記抗体は、インターロイキン (interleukins) またはインターフェロン (interferons) タンパク質に特異的に結合する抗体である、送達体。

【0008】

3. 前記項目 1 において、前記抗体は、IgG；又は PD-1、CTLA-4、TIM-3、BTLA、VISTA、LAG-3、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、CD28、CD27、CD137、HVEM、GITR、VEGFR、VEGF、EGFR、EGF、IL-1、IL-6、IL-23、TGF-beta、CTGF、

50

T S L P、T N F - a l p h a、N o t c h及びO X 4 0からなる群より選択される少なくとも一つのタンパク質に特異的に結合する抗体である、送達体。

【0009】

4. 前記項目1において、前記抗体は、P D - 1、P D - L 1及びC T L A - 4からなる群より選択される少なくとも一つのタンパク質に特異的に結合する抗体である、送達体。

【0010】

5. 前記項目1において、前記サイトカインは、インターロイキン (interleukins) またはインターフェロン (interferons) である、送達体。

【0011】

6. 前記項目1において、前記サイトカインは、I L - 7、I L - 1 0、I L - 1 2、I L - 1 3、I L - 1 5、I L - 2 1、I L - 2 3、I L - 2 4、I L - 2 7、G - C S F、G M - C S F、H G F、E G F、V E G F、L T F、T G F - β 及びI L - 2からなる群より選択される少なくとも一つである、送達体。

【0012】

7. 前記項目1において、前記サイトカインは、I L - 2、I L - 1 2、I L - 1 5、I L - 2 1、I L - 2 4及びI L - 1 3からなる群より選択される少なくとも一つである、送達体。

【0013】

8. 前記項目1において、前記多孔性シリカ粒子は、外部表面または気孔内部が中性のp Hで電荷を帯びるものである、送達体。

【0014】

9. 前記項目1において、前記多孔性シリカ粒子は、外部表面または気孔内部に親水性または疎水性の官能基を有するものである、送達体。

【0015】

10. 前記項目1において、抗体 (antibody) を担持した多孔性シリカ粒子と、サイトカイン (cytokine) を担持した多孔性シリカ粒子とを含む送達体。

【0016】

11. 前記項目1～10のいずれかに記載の送達体を含む免疫療法 (immunotherapy) 用の組成物。

【0017】

12. 前記項目1～10のいずれかに記載の送達体を含む癌または免疫疾患の予防または治療用の薬学的組成物。

【発明の効果】

【0018】

本発明の免疫反応物質送達体は、抗体とサイトカインを含む様々な免疫反応物質を安定的に、標的部位に送達し、優れた免疫治療効果を有する。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】図1は、本発明の一実施形態に係る多孔性シリカ粒子の顕微鏡写真である。

【図2】図2は、本発明の一実施形態に係る多孔性シリカ粒子の顕微鏡写真である。

【図3】図3は、本発明の一実施形態に係る多孔性シリカ粒子の製造工程における小気孔粒子の顕微鏡写真である。

【図4】図4は、本発明の一実施形態に係る小気孔粒子の顕微鏡写真である。

【図5】図5は、本発明の一実施形態に係る多孔性シリカ粒子の気孔直径別の顕微鏡写真である。D D V (Degradable Delivery Vehicle) は、実施例の粒子であり、括弧内の数字は粒子の直径を、下付き文字の数字は気孔の直径を意味する。例えば、D D V (2 0 0) _{1 0} は、粒子直径が200 nm、気孔直径が10 nmである実施例の粒子を意味する。

【図6】図6は、本発明の一実施形態に係る多孔性シリカ粒子の生分解性を確認できる顕

10

20

30

40

50

微鏡写真である。

【図 7】図 7 は、一つの例示による円筒状の透過膜を備えたチューブである。

【図 8】図 8 は、本発明の一実施形態に係る多孔性シリカ粒子の時間経過による吸光度の減少の結果である。

【図 9】図 9 は、本発明の一実施形態に係る多孔性シリカ粒子の時間経過による粒径別の吸光度の減少の結果である。

【図 10】図 10 は、本発明の一実施形態に係る多孔性シリカ粒子の時間経過による気孔直径別の吸光度の減少の結果である。

【図 11】図 11 は、本発明の一実施形態に係る多孔性シリカ粒子の時間経過による環境の pH 別の吸光度の減少の結果である。

【図 12】図 12 は、本発明の一実施形態に係る多孔性シリカ粒子の時間経過による吸光度の減少の結果である。

【図 13 - 15】図 13 ~ 15 は、それぞれ IgG、PD-1、PD-L1 抗体を多孔性シリカ粒子に担持した後の放出された累積量を示すものである。

【図 16】図 16 は、IL-2 サイトカインの担持に用いられた多孔性シリカ粒子の TEM 画像を示すものである。

【図 17 - 21】図 17 ~ 21 は、IL-10、IL-15、HGF、EGF、IL-2 を多孔性シリカ粒子に担持した後の放出された累積量を示すものである。

【図 22 - 43】図 22 ~ 43 は、本発明の多孔性シリカ粒子の毒性有無を確認した結果である。

【図 44 - 45】図 44、45 は、多孔性シリカ粒子に担持された免疫反応物質の生物学的活性の保存有無を確認した結果である。

【図 46】図 46 は、本発明の送達体による過敏反応の有無を確認した結果である。

【図 47 - 55】図 47 ~ 55 は、本発明の送達体の担持された抗体またはサイトカインの安定的な送達性および標的性を確認したものである。

【図 56 - 82】図 56 ~ 82 は、本発明の送達体の癌免疫治療の効果を確認した結果である。

【図 83 - 92】図 83 ~ 92 は、本発明の送達体の副作用（VLS 又はCLS）の減少効果を確認した結果である。

【発明を実施するための形態】

【0020】

以下、本発明を具体的に説明する。

【0021】

本発明は、抗体 (antibody) またはサイトカイン (cytokine) を担持した多孔性シリカ粒子；を含む免疫反応物質送達体を提供するものである。

【0022】

前記サイトカインは、具体的には、インターロイキン (interleukins) またはインターフェロン (interferons) であってもよい。

【0023】

前記サイトカインは、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-21、IL-23、IL-24、IL-27、G-CSF、GM-CSF、HGF、EGF、VEGF、LTF、TGF- β 、IL-2、A2M、ABI3BP、acidic fibroblast growth factor、ACVR1B、ADAM17、ADAMTS6、ADMLX、aFGF、AGPAT1、AGPAT2、AIF1、AIMP1、AKR1C1、AKT1S1、allograft-inflammatory factor-1、amac-1、AMH、ANGPTL2、ANGPTL3、ANKFN1、ANKRD1、ankyrin repeat and SOCS box-containing protein 3 isoform a variant、ankyrin repeat domain-containing SOCS box protein ASB11、ankyrin repeat domain-containing SOCS box protein Asb-13、ankyrin repeat domain-containing SOCS box protein Asb-14、ankyrin repeat domain-containing SOCS box protein Asb-15、ankyrin repeat-containing protein ASB-2、ankyrin repeat-containing SOCS box protein 7、ANOS1、Apo-2 ligand、APOC1、ARHGAP10、ASB1、ASB-1 protein

10

20

30

40

50

、 ASB10、 ASB-10、 ASB11、 ASB12、 ASB13、 ASB14、 ASB15、 ASB16、 ASB17、
 ASB18、 ASB2、 ASB-2、 ASB3、 ASB-3 protein、 ASB4、 ASB-4 protein、 ASB5、 AS
 B6、 ASB7、 ASB8、 ASB9、 ASTN2、 ATP10A、 ATP1A1、 ATP8A1、 AXL、 B219/OB
 receptor isoform HuB219.1 precursor、 B219/OB receptor isoform HuB219.2
 precursor、 B219/OB receptor isoform HuB219.3 precursor、 BATF、 BCL2A1、
 BCL3、 BCO2、 BIG-2、 BMP6、 BOC、 BTNL2、 byk、 C10orf99、 C11orf40、 C17、
 C17orf99、 C19orf66、 C1GALT1C1、 C1QTNF4、 C22orf39、 C2orf83、 C3orf39
 、 C6 beta-chemokine、 C6orf120、 C8orf44-SGK3、 CALL、 CAMKMT、 CARD14、
 cardiotrophin-like cytokine CLC、 CASP1、 cathepsin X、 CBLB、 CBLN4、 CCDC1
 34、 CCDC86、 CCL1、 CCL11、 CCL13、 CCL14、 CCL15、 CCL16、 CCL17、 CCL18
 、 CCL19、 CCL2、 CCL20、 CCL21、 CCL22、 CCL23、 CCL24、 CCL25、 CCL26、 CC
 L27、 CCL28、 CCL3、 CCL3L1、 CCL3L3、 CCL4、 CCL4L、 CCL4L1、 CCL4L2、 CCL
 5、 CCL7、 CCL8、 CCR4、 CCR8、 CD200R1、 CD274、 CD28、 CD300LB、 CD34、 C
 D36、 CD3D、 CD40LG、 CD53、 CD70、 CD74、 CD74-ROS1_C6、 R32、 CD80、 CD
 83、 CD84、 CD86、 CDO、 CDON、 CEBPD、 CER1、 CFC1、 chemokine (C-C motif)
 ligand 13、 chemokine (C-C motif) ligand 3、 CHL1、 CHUK、 CIAPIN1、 ciliary n
 eurotrophic factor receptor、 CIP29、 CIS2、 CIS3、 CIS4、 CISH、 CISH6、 CITED
 2、 CKId、 CKIe、 CKLF、 CKLF1、 CKLFSF1、 CLC、 CLCF1、 CLEC11A、 CLEC1B、 C
 LEC2D、 CLF-1、 CLNK、 c-mer、 c-mpl-K、 c-mpl-P、 CMYA5、 CNAIP、 CNTF、 CNT
 FR、 CNTN1、 CNTN2、 CNTN3、 CNTN4、 CNTN5、 CNTN6、 CNTNAP4、 CNTRL、 C
 ol VII、 COL12A1、 COL14A1、 COL20A1、 COL28A1、 COL7A1、 collagen VII、 co
 lony stimulating factor 2 receptor alpha subunit splice variant、 colony stimu
 lating factor 3 receptor isoform c precursor variant、 CPEB 4 variant、 CPEB4
 、 CR6、 CREME9、 CRF2/12、 CRIP2、 CRL1、 CRL2、 CRL3、 CRLF1、 CRLF2、 CRL
 F3、 CRNDE、 CRP、 CRTAM、 CS box-containing WD protein、 CSA2、 CSBP1、 CS
 BP2、 CSF1、 CSF1R、 CSF2、 CSF2RA、 CSF2RB、 CSF3、 CSF3R、 CSN1S1、 CTF1、
 CTLA4、 CTLA8、 CTSG、 CUA001、 CX3CL1、 CXCL10、 CXCL11、 CXCL12、 CXCL
 13、 CXCL14、 CXCL16、 CXCL3、 CXCL5、 CXCL6、 CXCL8、 CXCL9、 CXCR2、 CX
 CR3、 CXCR5、 CXXC5、 cyclon、 CYP4F3、 CYTIP、 CYTL1、 cytokine CX2 precus
 or、 cytokine receptor CRL2 precursor、 cytokine receptor-like factor 2 varian
 t、 cytokine SDF-1-beta、 cytokine type 1 receptor CRLP-1 precursor、 cytokine
 -inducible inhibitor of signalling type 1b、 cytokine-inducible SH2-containing
 protein、 cytokine-like nuclear factor n-pac、 cytokine-like nuclear factor n-pa
 c-like protein、 cytokine-like protein 2-21、 cytokine-like protein EF-7、 CYTO
 R4、 cytotoxic lymphocyte maturation factor 40 kDa subunit、 DAGLA、 DCC、 D
 CSTAMP、 DDT、 DEFB103B、 delta 4-delta 7/11 truncated prolactin receptor、
 delta 4-SF1b truncated prolactin receptor、 dendritic cell associated lectin 2
 、 density enhanced phosphatase-1、 DHX58、 DIP2C、 DNAH3、 DNAH9、 Down s
 yndrome cell adhesion molecule isoform CHD2-42 precursor variant、 DRT、 D
 SCAM、 DSCAM2、 DSCAML1、 DTK、 DTL、 DUB3、 DVL2、 EBI3、 ECK、 EDIL3、 eE
 F1A2 binding protein、 EFNA5、 EGFLAM、 EGR4、 ELAC1、 ELAVL1、 ELAVL3、 E
 LP2、 endothelial-monocyte activating polypeptide II、 EOMES、 eotaxin precu
 sor、 EPGN、 EPHA1、 EPHA10、 EPHA2、 EPHA3、 EPHA4、 EPHA5、 EPHA6、 EPH
 A7、 EPHA8、 EPHB1、 EPHB2、 EPHB2 variant protein、 EPHB3、 EPHB4、 EPHB6
 、 EphB6 variant protein、 ephrin receptor EphA5 isoform a variant、 ephrin re
 ceptor EphA7 variant、 ephrin receptor EphB4 precursor variant、 EPO、 EPOR
 、 ERK、 ESOP1、 FABP5、 factor for adipocyte differentiation 104 variant、 fad
 104、 FAM19A4、 FAM213A、 FAM3A、 FAM3B、 FAM3C、 FAM3D、 FANK1、 FBRS
 、 FCAR、 FCER1A、 FCER1G、 FCGR2C、 FCN3、 FES、 FGF19、 FGF9、 FGF-9、 fibro
 nectin、 Fibronectin 1 variant、 FIL1-theta、 FILIP1L、 FLJ00133、 FLJ00148、 F

10

20

30

40

50

LJ00154, FLJ00236, FLJ00376, FLT3, FLT3LG, FN1, FNDC1, FNDC3A, FNDC3B, FNDC4, FNDC5, FNDC7, FNDC8, FOSB, FOSL1, FOXP3, FRMD1, FSD1, FSD1L, FSD2, FSTL3, FUCA2, G0S3, G18, G-26, GAB2, GAB3, gamma.1, GBP4, G-CSFR-1, G-CSFR-2, GDF15, GDF2, GHR, GJA1, GLEPP1, GLYR1, GM-CSF receptor beta chain, gp130, gp130-like monocyte receptor, gp250 precursor, GPI, GPR15, GPR75-ASB3, GPSM1, GRAIL, granulocyte colony-stimulating factor receptor, granulocyte macrophage-colony stimulating factor, granulocyte-macrophage colony stimulating factor 2, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor precursor, GRAP2, GRO-beta, GRO-gamma, growth-inhibiting protein 45, GZMK, HAVCR2, HAX1, HBD, HCF-2, HCFC1, HCFC2, HCV NS5A-binding protein NS5ABP37, HDAC11, hDDM36, HEK, HEK11, HEK5, HEK7, HEK8, hematopoietic stem/progenitor cell induced protein 1, hematopoietic stem/progenitor cell induced protein 2, hematopoietic stem/progenitor cell induced protein 3, HES4, HGF, HGS, HIBDL, hIL-2Rg, HILPDA, HIN-1 putative cytokine, HMGB1, hmrp-2a, hmrp-2b, hNB-2, hNB-2s, hNB-3, host cell factor C2 variant, HOXB5, hp40, HSD13, hSHIP, HSP90B1, HSSOCS-2, HTK, HTPZP2, hTroy, Humig, HXB, hypothetical protein, ICO SLG, IFI16, IFI30, IFNA1, IFNA10, IFNA17, IFNA2, IFNA4, IFNA8, IFNAR1, IFNAR2, IFNB1, IFNG, IFNGR1, IFNGR2, IFNK, IFNL1, IFNL2, IFNL3, IFNLR1, IFNW1, IGANRP, IGDCC3, IGDCC4, IGF1R, IGFN1, IGSF22, IGSF9, IGSF9B, IK, IKBKB, IKK alpha, Interleukins, IL10, IL10RB, IL11, IL11RA, IL12 receptor beta2, IL12 receptor component, IL12A, IL12B, IL12RB1, IL12RB2, IL13, IL-13Ra, IL13RA1, IL13RA2, IL15, IL15RA, IL16, IL-17, IL-17 receptor, IL17A, IL17B, IL17BR, IL17C, IL17D, IL-17D, IL17D precursor, IL17E, IL17F, IL17RA, IL17RB, IL17RC, IL-17RC, IL-17RD, IL-17RE, IL18, IL-18 receptor beta splice variant, IL18BP, IL18R1, IL18RAP, IL19, IL1A, IL1B, IL1BCE, IL1F10, IL1F7, IL1L1, IL1R1, IL1R2, IL1RAP, IL1RAPL1, IL1RAPL2, IL1RL1, IL1RL2, IL1RN, IL2, IL15, IL20, IL20RA, IL20RB, IL21, IL-21, IL21R, IL22, IL22BP, IL22R, IL22RA1, IL22RA2, IL23A, IL23R, IL-23R, IL-24 splice variant delE3, IL-24 splice variant delE5, IL25, IL26, IL27, IL27RA, IL28A, IL28B, IL28C, IL28RA, IL29, IL30, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL3, IL31, IL31RA, IL32, IL33, IL34, IL36A, IL36B, IL36G, IL36RN, IL37, IL3RA, IL4, IL4I1, IL4R, IL5, IL5RA, IL6, IL6R, IL6ST, IL7, IL7R, IL9, IL9R, il-xr, ING3, INPP5D, INSR, INSRR, insulin receptor variant, insulin responsive sequence DNA binding protein-1, integrin beta 4 isoform 3 precursor variant, interferon alpha 2b, interferon gamma, interferon-lambda1, interferon-lambda2, interferon-lambda3, interleukin 10 receptor, beta, interleukin 11 receptor, alpha, interleukin 12, P40, interleukin 13, interleukin 13 receptor, alpha 1 precursor variant, interleukin 17A, interleukin 17B, interleukin 17C, interleukin 18 precursor, interleukin 23 p19 subunit, interleukin 23 receptor isoform 1, interleukin 32 variant, interleukin 34 isoform 1 precursor, interleukin 34 isoform 2 precursor, interleukin 4 receptor alpha chain isoform a precursor variant, interleukin 6 receptor isoform 1 precursor variant, interleukin-1 homolog 1, interleukin-1 homolog 2, interleukin-1 homolog 4, interleukin-11 receptor alpha chain, interleukin-13 receptor, interleukin-17 beta, interleukin-1-related protein long isoform, interleukin-1-related protein long isoform a, interleukin-1-related protein short isoform, interleukin-2, interleukin-32 small, interleukin-32 theta, interleukin-33, intermediate prolactin receptor isoform, IRAK1, IRAK3, IREB2 variant, IRF9, IRS2, ISG15, ITGA1, ITGAL, ITGB2, ITGB4, ITPK1, JAB, JAK2, J

10

20

30

40

50

AK3, JAKMIP1, JOSD2, KAL, KAL1, KALIG-1, KALRN, KAT6B, KCNA3, KCN J12, KIAA0273, KIAA0282, KIAA0283, KIAA0318, KIAA0343, KIAA0671, KIAA0756, KIAA0970, KIAA1030, KIAA1132, KIAA1146, KIAA1297, KIAA1 355, KIAA1397, KIAA1459, KIAA1496, KIAA1497, KIAA1510, KIAA1514, KIAA1568, KIAA1628, KIAA1666, KIAA1866, KLF8, KLRF1, L1CAM, LAR, LBP, LD78 alpha beta, LEPR, leptin receptor, LGI3, LICR2, LIF, LIFR, LIL RA2, LIMK2, LOC57019, LOC728835, long myosin light chain kinase, LRG1 , LRRC20, LRRC70, LRRFIP2, LRRN1, LRRN4, LTA, LTB, LTBP1, LTBP2, ly mphokine, lymphotoxin beta isoform variant, lysophosphatidic acid acyltran sferase-alpha, lysophosphatidic acid acyltransferase-beta, macrophage colon y-stimulating factor 1, MAF, magic roundabout, MAPK14, MCP3, MCP-3, M CP4, MCP-4, MDK, MEP1B, MERTK, MEX3C, MGDF, MIC-1, microtubule-as sociated protein GLFND, MIP-1 delta, MIP1a, MIP2a, mitochondria associat ed granulocyte macrophage CSF signaling molecule Magmas, ML1, MLCK, M MP9, MNAT1, MON1B, MOV10, MPIF-1, MPL, MRPL17, MSLN, MTHFD2L, MTUS1, MUSK, MYBPC1, MYBPC2, MYBPC3, MYBPH, MYBPHL, MYDGF, my eloproliferative leukemia virus oncogene, MYLK, MYOM1, MYOM2, MYOM3 , NAA35, NAMPT, NC28, NCAM, N-CAM, NCAM1, NCAM2, NCAM21, Nck, Ash and phospholipase C gamma-binding protein NAP4, NCR1, NCR3, NCR3L G1, NCSTN, NDFIP1, NDUFA2, NDUFB6, NEO1, neogenin, neogenin homolog 1 variant, neshbp, NET PTK, Neural cell adhesion molecule 1, 120 kDa isof orm precursor variant, neural cell adhesion molecule CD56, Neural cell adhe sion molecule variant, neurotrophin-1/B-cell stimulating factor-3, NFAM1, NFASC, NFAT1, NFATC1, NFATC4, NHLH1, NILR, NIPSNAP1, NIPSNAP2, N KSF1, NKSF2, NLRC5, NLRP11, NLRP12, NLRP13, NLRP2, NLRP4, NLRP6, NLRP7, NLRR-1, NOX5, N-PAC, NR2C2, NR4A1, NRCAM, OBSCN, OC-116KD a, OCLN, OPTC, OR2H1, OSM, OSMR, OSMRB, osteoprotegerin ligand, OTU B1, OTUD6B, OTUD7B, P2RY8/CRLF2 fusion, p48, PANX2, PARC, PDCD1LG 2, PGLYRP1, PHF11, PHYHIP, PHYHIPL, PI9, PIAS1, PIBF1, PIK3R3, PLA2 G2D, PLAC8, pLD78 peptide, PLK3, PLTP, PLXNC1, POMGNT2, PP14212, PPBP, PPIA, PPM1F, PPM1H, PPP2R5A, PPP3CC, PPP5C, PPY, PREX1, prk , PRLR, PRO0915, prolactin receptor, prolactin receptor delta 7/11, prolac tin receptor isoform delta S1 precursor, proliferation associated cytokine-in ducible protein CIP29, protein tyrosine phosphatase delta, protein tyrosine phosphatase sigma, protein tyrosine phosphatase, receptor type, D isoform 4 precursor variant, protein tyrosine phosphatase, receptor type, F isoform 2 precursor variant, protein tyrosine phosphatase, receptor type, G precursor variant, protein tyrosine phosphatase, receptor type, K precursor variant, protein tyrosine phosphatase, receptor type, sigma isoform 3 precu rsor variant, protein-tyrosine phosphatase, PRR16, PRSS27, PRTG, PSMA4 , PTCHD1, PTGDR, PTGES, PTN, PTPRB, PTPRC, PTPRD, PTPRE, PTPRF, P TPRG, PTPRH, PTPRJ, PTPRK, PTPRM, PTPRO, PTPRQ, PTPRS, PTPRT, PTP RU, PTPRZ, PTPRZ1, PTPsigma, PTX4, PUS7L, putative cytokine receptor C RL4 precursor, PYPAF6, PYRIN-containing Apaf1-like protein 2, PYRIN-conta ining Apaf1-like protein 3, PYRIN-containing APAF1-like protein 4, PYRIN-c ontaining APAF1-like protein 5, PYRIN-containing APAF1-like protein 7, PYY , RAB40A, RAB40AL, RAB40B, RAB40B, member RAS oncogene family varia nt, RAB40C, RAB6B, RANTES precursor, Rar protein, Rar-2 protein, RBM15 , RBM5 variant, RCAN3, receptor protein tyrosine phosphatase hPTP-J prec ursor, Receptor protein tyrosine phosphatase hPTP-J precursor variant, rece

10

20

30

40

50

ptor tyrosine kinase, receptor-type protein tyrosine phosphatase O isoform a precursor variant, RGS2, RIMBP2, RIMBP3, RIMBP3B, RIMBP3C, RIPK4, RMC1, RNASE10, RNASE7, RNASE9, RNASET2, RNF113A, RNF128, RNF41, ROBO1, ROBO2, ROBO2 isoform a, ROBO2 isoform b, ROBO3, ROBO4, RORC, ROS1, RPL27, RPL36, RPS21, R-PTP-kappa, RPTP-rho, rse, RSL24D1, S100A12, S100A8, S100A9, S1PR4, SAC3D1, SAP/SH2D1A, SAP-1, SARNP, SASH1, SCAMP5, SCGB3A1, SCGB3A2, SCM-1, SCYA13, SCYA16, SCYA26, SCYE1, SDC4, SDC4-ROS1_S2, R32, SDC4-ROS1_S4, R32, SDK1, SDK2, secreted osteoclastogenic factor of activated T cells, SELE, SEMA7A, SENP3, SERPINB9, serum/glucocorticoid regulated kinase-like isoform 1 variant, SETD1B, SGK3, SGK-like protein SGK1, SH2 domain containing SOCS box protein SOCS4, SH2B1, SH2B3, shen-dan, SIGIRR, SIGLEC14, Similar to RIKEN cDNA 3930401K13 gene, SKIP1, SKIP3, sky, SLAMF9, SLC2A5, SLC2A9, SLC34A2/ROS fusion, SLC34A2-ROS1, SLC39A13, SLC39A3, SLC4A3, SLC9A8, SLC9B2, SLURP1, small cytokine B subfamily member 11 SCYB11 precursor, SMIM27, SMPD2, SNED1, SNX10, SOCS box containing protein RAR2A, SOCS box protein ASB-5, SOCS1, SOCS-1, SOCS2, SOCS3, SOCS4, SOCS5, SOCS6, SOCS7, SORL1, SPATA2, SPOCK3, SPP1, SPPL2B, SPRY domain-containing SOCS box protein SSB-1, SPRY domain-containing SOCS box protein SSB-1 variant, SPRY domain-containing SOCS box protein SSB-2, SPRY domain-containing SOCS box protein SSB-3, SPRY domain-containing SOCS box protein SSB-4, SPSB1, SPSB2, SPSB3, SPSB4, STAM, STAM2, STAMBP, STAT induced STAT inhibitor-1, STAT induced STAT inhibitor-2, STAT induced STAT inhibitor-3, STAT1, STAT5A, STAT5B, STAT-induced STAT inhibitor-2, stem cell factor, STIMATE, STK35, STK40, striated muscle preferentially expressed protein, suppressor of cytokine signaling 3, surface glycoprotein, Ig superfamily member variant, SUSP2, SWIP1, SYNJ2BP, synleucin, TACC2, TAIF, TARM1, TBX21, TBX5, TCEB1, TCIRG1, TEC, TEK, TEK tyrosine kinase variant, tenascin XB isoform 1 variant, tenascin-C isoform 14/AD1/16, testicular tissue protein Li 126, testicular tissue protein Li 64, testis tissue sperm-binding protein Li 57p, TEX12, TFPI, THEMIS2, THNSL2, THPO, thymic stromal lymphopoietin protein receptor TSLPR, thymic stromal lymphopoietin protein TSLP, TIE, tie receptor tyrosine kinase, TIE1, Tie-2, TIGIT, TIMP1, tip3, TIRAP, Titin, TLR1, TLR3, TLR6, TM7SF3, TMEM102, TMEM110-MUSTN1, TMSB4X, TMX2, TNC, TNC variant protein, TNF, TNFAIP3, TNFAIP8L2, TNFRSF11B, TNFRSF12A, TNFRSF13C, TNFRSF21, TNFRSF25, TNFRSF4, TNFRSF8, TNFRSF10, TNFRSF11, TNFRSF12, TNFRSF13, TNFRSF13B, TNFRSF15, TNFRSF18, TNFRSF4, TNFRSF8, TNFRSF9, TNL, TNN, TNR, TNXB, TOPORS, Trad, TRAF6, TRIM21, TRIM3, TRIM42, TRIM46, TRIM67, TRIM8, TRIM9, TRPM4, TSLP, TTN, TULP4, tumor necrosis factor receptor, TUSP, TUT4, TUT7, TWIST2, TYK2, type VII collagen, type XII collagen, type-I T cell cytokine receptor, TYRO3, tyrosyl-tRNA synthetase, tyrosyl-tRNA synthetase variant, U2AF1L4, UBA6, UBAP1, ubiquitin ligase E3 alpha-I, ubiquitin ligase E3 alpha-I, UBR2, UFO, undulin 1, undulin 2, UNQ1942, UNQ2421, UNQ288, UNQ296, UNQ3121, UNQ421, UNQ5793, UNQ604, UNQ6309, UNQ6368, UNQ6389, UNQ6504, UNQ693, UQCRH, USH2A, USMG5, USP15, USP17L10, USP17L11, USP17L12, USP17L13, USP17L15, USP17L17, USP17L18, USP17L19, USP17L2, USP17L20, USP17L21, USP17L22, USP17L24, USP17L25, USP17L26, USP17L27, USP17L28, USP17L29, USP17L3, USP17L30, USP17L4, USP17L5, USP17L7, USP17L8, USP18, USP36, UTY, V alpha 1, V alpha 1

10

20

30

40

50

3、VCAM1、VESPR、VNN2、VSIG2、VWA1、WARS、WD SOCS-box protein 1 isoform 1 variant、WDR26、WSB1、WSB-1、WSB-1 isoform、WSB-1 protein、WSB2、WSB-2、WSX1、WWOX、XA、XB、XBP1、XCL1、XCL2、XKR4、YARS、ZBED3、ZBP1、ZC3H12D、ZC3H15、ZCYTO10、zcytor5、ZCYTOR7、ZFP36、ZNF366、ZNF580及びZNF827からなる群より選択される少なくとも一つであってもよいが、これらに限定されるものではない。

【0024】

前記抗体は、具体的には、インターロイキン (interleukins) またはインターフェロン (interferons) タンパク質に特異的に結合する抗体であってもよい。

【0025】

前記抗体は、IgG；又はPD-1、CTLA-4、TIM-3、BTLA、VISTA、LAG-3、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、CD28、CD27、CD137、HVEM、GITR、VEGFR、VEGF、EGFR、EGF、IL-1、IL-6、IL-23、TGF-beta、CTGF、TSLP、TNF-alpha、Notch及びOX40からなる群より選択される少なくとも一つのタンパク質に特異的に結合する抗体であってもよいが、生物学的観点から通常の抗体として認識されるものであれば、これらに限定されない。

【0026】

前記多孔性シリカ粒子は、シリカ (SiO₂) 素材の粒子であり、ナノサイズの粒径を有する。

【0027】

本発明の多孔性シリカナノ粒子は、多孔性粒子であり、ナノサイズの気孔を有し、その表面 (外部表面) 及び／又は気孔内部に抗体 (antibody) 又はサイトカイン (cytokine) を担持することができる。

【0028】

本発明の多孔性シリカ粒子は、生分解性粒子であり、抗体 (antibody) 又はサイトカイン (cytokine) を担持して体内に投与されたとき、体内で生分解されて抗体 (antibody) 又はサイトカイン (cytokine) を放出することができる。つまり、本発明の多孔性シリカ粒子は、体内で徐々に分解され、担持された抗体 (antibody) 又はサイトカイン (cytokine) が徐放的に放出されるようにすることができる。例えば、下記数式1の吸光度の比が1/2となるtは24以上である。

【0029】

[数式1]

$$A_t / A_0$$

(式中、A₀は、前記多孔性シリカ粒子1mg/mlの懸濁液5mlを直径50kDaの気孔を有する円筒状の透過膜に入れて測定した多孔性シリカ粒子の吸光度であり、

前記透過膜の外部には、前記透過膜と接し、前記懸濁液と同じ溶媒15mlが位置し、前記透過膜の内外部は、37℃で60rpmで水平攪拌され、

前記懸濁液のpHは、7.4であり、

A_tは、前記A₀の測定時からt時間経過後に測定した多孔性シリカ粒子の吸光度である。)

【0030】

前記数式1は、多孔性シリカ粒子が体内と同様の環境でどの程度の速度で分解されるかを意味するものである。

【0031】

前記数式1における吸光度A₀、A_tは、例えば図34に示されているように、円筒状の透過膜に多孔性シリカ粒子および懸濁液を入れ、透過膜の外部にも同じ懸濁液を入れて測定したものであり得る。

【0032】

本発明の多孔性シリカ粒子は、生分解性であり、懸濁液中で徐々に分解され得る。直径

10

20

30

40

50

50 kDaは約5 nmに相当するものであり、生分解された多孔性シリカ粒子は、直径50 kDaの透過膜を通過することができる。円筒状の透過膜は、60 rpmの水平攪拌下にあるので、懸濁液を均一に混合することができ、分解された多孔性シリカ粒子は、透過膜の外部に放出され得る。

【0033】

前記数式1での吸光度は、例えば、透過膜の外部の懸濁液が新しい懸濁液に入れ替わる環境下で測定したものであり得る。懸濁液は、持続的に入れ替わるものであってもよく、一定期間ごとに入れ替わるものであってもよい。前記一定期間は、定期的または不定期的な期間であってもよい。例えば、1時間～1週間の範囲内で、1時間おき、2時間おき、3時間おき、6時間おき、12時間おき、24時間おき、2日おき、3日おき、4日おき、7日おき等に入れ替えることができるが、これらに限定されるものではない。

10

【0034】

前記「吸光度の比が1/2となる」ということは、t時間後の吸光度が初期吸光度の半分になるということであり、これは多孔性シリカ粒子の約半分が分解されたことを意味する。

【0035】

前記懸濁液は緩衝溶液であってもよく、具体例としては、PBS（リン酸緩衝食塩水）およびSBF（疑似体液）からなる群より選択される1種以上であってもよく、より具体的にはPBSであってもよい。

【0036】

本発明の前記数式1の吸光度の比が1/2となるtは24以上であり、例えばtは24～120であってもよく、例えば、前記範囲内で24～96、24～72、30～70、40～70、50～65などであってもよいが、これらに限定されるものではない。

20

【0037】

本発明の多孔性シリカ粒子は、前記数式1の吸光度の比が1/5となるtが、例えば70～140であってもよく、例えば、前記範囲内で80～140、80～120、80～110、70～140、70～120、70～110などであってもよいが、これらに限定されるものではない。

【0038】

本発明の多孔性シリカ粒子は、前記数式1の吸光度の比が1/20となるtが、例えば130～220であってもよく、例えば、前記範囲内で130～200、140～200、140～180、150～180などであってもよいが、これらに限定されるものではない。

30

【0039】

本発明の多孔性シリカ粒子は、測定される吸光度が0.01以下となるtが、例えば、250以上、300以上、350以上、400以上、500以上、1,000以上などであってもよく、その上限は2,000であってもよいが、これらに限定されるものではない。

【0040】

本発明の多孔性シリカ粒子における前記数式1の吸光度の比とtは、高い量の相関関係を有するものであり、例えば、ピアソン相関係数が0.8以上であってもよく、例えば0.9以上、0.95以上であってもよい。

40

【0041】

前記数式1のtは、多孔性シリカ粒子が体内と同様の環境でどの程度の速度で分解されるかを意味するものである。これは、例えば多孔性シリカ粒子の表面積、粒径、気孔直径、表面及び／又は気孔内部の置換基、表面の緻密さの程度などを調節することによって調節できる。

【0042】

例えば、粒子の表面積を増加させてtを減少させるか、表面積を減少させてtを増加させることができる。表面積は、粒子の直径、気孔の直径を調節することによって調節でき

50

る。また、表面及び／又は気孔内部に置換基を位置させ、多孔性シリカ粒子が環境（溶媒など）に直接露出することを減らして τ を増加させることができる。また、多孔性シリカ粒子に抗体（antibody）又はサイトカイン（cytokine）を担持させ、抗体（antibody）又はサイトカイン（cytokine）と多孔性シリカ粒子間の親和度を増加させ、多孔性シリカ粒子が環境に直接露出することを減らして τ を増加させることができる。また、粒子の製造時に表面をより緻密に製造して τ を増加させることもできる。前記に数式1の τ を調節できる様々な例を示したが、それらに限定されるものではない。

【0043】

本発明の多孔性シリカ粒子は、例えば球状粒子であってもよいが、これに限定されるものではない。

【0044】

本発明の多孔性シリカ粒子は、平均粒径が例えば150nm～1,000nmであってもよく、例えば、前記範囲内で150nm～800nm、150nm～500nm、150nm～400nm、150nm～300nm、150nm～200nmであってもよいが、これらに限定されるものではない。

【0045】

本発明の多孔性シリカ粒子は、平均気孔直径が例えば1nm～100nmであってもよく、例えば、前記範囲内で5nm～100nm、7nm～100nm、7nm～50nm、10nm～50nm、10nm～30nm、7nm～30nmであってもよいが、これらに限定されるものではない。前記のような大きな直径を持って多量の抗体（antibody）又はサイトカイン（cytokine）を担持することができ、サイズの大きい抗体（antibody）又はサイトカイン（cytokine）の担持も可能である。

【0046】

本発明の多孔性シリカ粒子は、BET表面積が、例えば200m²/g～700m²/gであってもよい。例えば、前記範囲内で200m²/g～700m²/g、200m²/g～650m²/g、250m²/g～650m²/g、300m²/g～700m²/g、300m²/g～650m²/g、300m²/g～600m²/g、300m²/g～550m²/g、300m²/g～500m²/g、300m²/g～450m²/gなどであってもよいが、これらに限定されるものではない。

【0047】

本発明の多孔性シリカナノ粒子は、g当たりの体積が例えば0.7ml～2.2mlであってもよい。例えば、前記範囲内で0.7ml～2.0ml、0.8ml～2.2ml、0.8ml～2.0ml、0.9ml～2.0ml、1.0ml～2.0mlなどであってもよいが、これらに限定されるものではない。g当たりの体積が小さすぎると、分解速度が速くなりすぎることがあり、大きすぎると、製造が困難であるか、完全な形状を有しないことがある。

【0048】

本発明の多孔性シリカ粒子は、外部表面及び／又は気孔内部に親水性置換基及び／又は疎水性置換基が存在し得る。例えば、表面及び気孔内部の両方に親水性置換基のみが存在するか、疎水性置換基のみが存在してもよく、表面または気孔内部の一方のみに親水性置換基が存在するか、疎水性置換基が存在してもよい。また、表面に親水性置換基が、気孔内部に疎水性置換基が存在してもよく、その逆の場合も可能である。

【0049】

本発明の多孔性シリカ粒子に担持された抗体（antibody）又はサイトカイン（cytokine）の放出は、主に、ナノ粒子の分解によって行われるものである。このため、前記置換基の調節により抗体（antibody）又はサイトカイン（cytokine）の放出環境に対する多孔性シリカ粒子の相互作用を調節し、ナノ粒子自体の分解速度を調節して、抗体（antibody）又はサイトカイン（cytokine）の放出速度を調節することができる。また、抗体（antibody）又はサイトカイン（cytokine）は、ナノ粒子から拡散して放出させることもできるが、前記置換基の調節により抗体（antibody）又はサイトカイン（cytokine）のナノ

10

20

30

40

50

粒子への結合力を調節し、抗体 (antibody) 又はサイトカイン (cytokine) の放出を調節することができる。

【0050】

また、難溶性 (疎水性) の抗体 (antibody) 、サイトカイン (cytokine) または物質との結合力を強化するために、気孔内部に疎水性置換基が存在し、使用、製剤化のし易さなどの側面で粒子の表面に親水性置換基が存在するようにするなどの処理も可能である。

【0051】

親水性置換基としては、例えば、ヒドロキシ基、カルボキシ基、アミノ基、カルボニル基、スルフヒドリル基、ホスフェート基、チオール基、アンモニウム基、エステル基、イミド基、チオイミド基、ケト基、エーテル基、インデン基、スルホニル基、ポリエチレングリコール基などが挙げられる。疎水性置換基としては、例えば、置換または非置換の $C_1 \sim C_{30}$ のアルキル基、置換または非置換の $C_3 \sim C_{30}$ のシクロアルキル基、置換または非置換の $C_6 \sim C_{30}$ のアリール基、置換または非置換の $C_2 \sim C_{30}$ のヘテロアリール基、ハロゲン基、 $C_1 \sim C_{30}$ のエステル基、及びハロゲン含有基などが挙げられる。

【0052】

また、本発明の多孔性シリカ粒子は、外部表面及び／又は気孔内部が陽電荷及び／又は陰電荷に帯電されたものであってもよい。例えば、表面及び気孔内部の両方が陽電荷に帯電されるか、陰電荷に帯電されてもよく、表面または気孔内部の一方のみが陽電荷に帯電されるか、陰電荷に帯電されてもよい。また、表面が陽電荷、気孔内部が陰電荷に帯電されてもよく、その逆の場合も可能である。

【0053】

前記帯電は、例えば、陽イオン性置換基または陰イオン性置換基が存在することによって行われたものであり得る。

【0054】

前記陽イオン性置換基は、例えば、塩基性基としてアミノ基、その他の窒素含有基などであってもよく、前記陰イオン性置換基は、例えば、酸性基としてカルボキシ基 ($-COOH$)、スルホン酸基 ($-SO_3H$)、チオール基 ($-SH$) などであってもよいが、これらに限定されるものではない。

【0055】

同様に、前記帯電によって前記置換基の調節により抗体 (antibody) 又はサイトカイン (cytokine) の放出環境に対する多孔性シリカ粒子の相互作用を調節し、ナノ粒子自体の分解速度を調節して、抗体 (antibody) 又はサイトカイン (cytokine) の放出速度を調節することができる。また、抗体 (antibody) 又はサイトカイン (cytokine) は、ナノ粒子から拡散されて放出させることもできるが、前記置換基の調節により抗体 (antibody) 又はサイトカイン (cytokine) のナノ粒子への結合力を調節し、抗体 (antibody) 又はサイトカイン (cytokine) の放出を調節することができる。

【0056】

また、本発明の多孔性シリカ粒子は、その表面及び／又は気孔内部に前記の他に抗体 (antibody) 又はサイトカイン (cytokine) の担持、抗体 (antibody) 又はサイトカイン (cytokine) の標的細胞への移動、その他の目的のための物質の担持、又はその他の追加置換基の結合などのための置換基が存在してもよく、それに結合された抗体、リガンド、細胞透過性のペプチドまたはアプタマーなどをさらに含んでもよい。

【0057】

前述した表面及び／又は気孔内部の置換基、電荷、結合物質などは、例えば、表面改質によって付加することができる。

【0058】

表面改質は、例えば、導入しようとする置換基を有する化合物を粒子と反応させて行うことができ、前記化合物は、例えば、 $C_1 \sim C_{10}$ のアルコキシ基を有するアルコキシシランであってもよいが、これに限定されるものではない。前記アルコキシシランは、前記アルコキシ基を1つ以上有するものであり、例えば1〜3つを有することができ、アルコ

10

20

30

40

50

キシ基の結合していない部位に導入しようとする置換基があるか、又はそれで置換された置換基があってもよい。

【0059】

本発明の多孔性シリカ粒子は、例えば、小気孔の粒子の製造および気孔拡張工程を経て製造したものであってもよく、必要に応じて、か焼 (calcination) 工程、表面改質工程などをさらに経て製造したものであってもよい。か焼及び表面改質工程をすべて経た場合は、か焼後に表面改質されたものであってもよい。

【0060】

前記小気孔の粒子は、例えば、平均気孔直径が1 nm～5 nmの粒子であってもよい。

【0061】

前記小気孔の粒子は、溶媒に界面活性剤とシリカ前駆物質を入れて攪拌及び均質化して得ることができる。

【0062】

前記溶媒は、水及び／又は有機溶媒であってもよい。有機溶媒としては、例えば、1, 4-ジオキサンなどのエーテル類 (特に環状エーテル類) ; クロロホルム、塩化メチレン、四塩化炭素、1, 2-ジクロロエタン、ジクロロエチレン、トリクロロエチレン、ペルクロロエチレン、ジクロロプロパン、塩化アミル、1, 2-ジブromoエタンなどのハロゲン化炭化水素類; アセトン、メチルイソブチルケトン、 γ -ブチロラクトン、1, 3-ジメチル-イミダゾリジノン、メチルエチルケトン、シクロヘキサノン、シクロペンタノン、4-ヒドロキシ-4-メチル-2-ペンタノンなどのケトン類; ベンゼン、トルエン、キシレン、テトラメチルベンゼンなどの炭素系芳香族類; N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジブチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどのアルキルアミド類; メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノールなどのアルコール類; エチレングリコールモノエチルエーテル、エチレングリコールモノメチルエーテル、エチレングリコールモノブチルエーテル、ジエチレングリコールモノエチルエーテル、ジエチレングリコールモノメチルエーテル、ジエチレングリコールモノブチルエーテル、プロピレングリコールモノメチルエーテル、プロピレングリコールモノエチルエーテル、ジプロピレングリコールジエチルエーテル、トリエチレングリコールモノエチルエーテルなどのグリコールエーテル類 (セロソルブ) ; その他ジメチルアセトアミド (DMAc)、N, N-ジエチルアセトアミド、ジメチルホルムアミド (DMF)、ジエチルホルムアミド (DEF)、N, N-ジメチルアセトアミド (DMAc)、N-メチルピロリドン (NMP)、N-エチルピロリドン (NEP)、1, 3-ジメチル-2-イミダゾリジノン、N, N-ジメチルメトキシアセトアミド、ジメチルスルホキシド、ピリジン、ジメチルスルホン、ヘキサメチルホスホアミド、テトラメチル尿素、N-メチルカプロラクタム、テトラヒドロフラン、m-ジオキサン、p-ジオキサン、1, 2-ジメトキシエタンなどを使用でき、具体的にはアルコール、より具体的にはメタノールを使用できるが、これらに限定されるものではない。

【0063】

前記溶媒において、水と有機溶媒の混合溶媒の使用時の割合は、例えば、水と有機溶媒を1:0.7～1.5の体積比、例えば1:0.8～1.3の体積比で使用できるが、これらに限定されるものではない。

【0064】

前記界面活性剤は、例えば、CTAB (臭化セチルトリメチルアンモニウム)、TMABr (臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム)、TMPrCl (塩化ヘキサデシルトリメチルピリジニウム)、TMACl (塩化テトラメチルアンモニウム) などであってもよく、具体的にはCTABを使用することができる。

【0065】

前記界面活性剤は、例えば、溶媒1リットルあたりに1 g～10 g、例えば、前記範囲内で1 g～8 g、2 g～8 g、3 g～8 gなどの量で添加できるが、これらに限定されるものではない。

10

20

30

40

50

【0066】

前記シリカ前駆物質は、溶媒に界面活性剤を添加して攪拌した後に添加することができる。シリカ前駆物質は、例えば、TMO S（テトラメチルオルソシリケート）であってもよいが、これに限定されるものではない。

【0067】

前記攪拌は、例えば10分～30分間行うことができるが、これに限定されるものではない。

【0068】

前記シリカ前駆物質は、例えば溶媒1リットル当たり0.5ml～5ml、例えば、前記範囲内で0.5ml～4ml、0.5ml～3ml、0.5ml～2ml、1ml～2mlなどの量で添加できるが、これらに限定されるものではない。

10

【0069】

必要に応じて、触媒として水酸化ナトリウムをさらに使用することができるが、これは溶媒に界面活性剤を添加した後、シリカ前駆物質の添加前に攪拌しながら添加することができる。

【0070】

前記水酸化ナトリウムは、例えば、1M水酸化ナトリウム水溶液を基準で溶媒1リットル当たり0.5ml～8ml、例えば、前記範囲内で0.5ml～5ml、0.5ml～4ml、1ml～4ml、1ml～3ml、2ml～3mlなどであってもよいが、これらに限定されるものではない。

20

【0071】

前記シリカ前駆物質の添加後に溶液を攪拌して反応させることができる。攪拌は、例えば2時間～15時間行うことができ、例えば、前記範囲内で3時間～15時間、4時間～15時間、4時間～13時間、5時間～12時間、6時間～12時間、6時間～10時間などであってもよいが、これらに限定されるものではない。攪拌時間（反応時間）が短すぎると、結晶核生成（nucleation）が不足することがある。

【0072】

前記攪拌の後には、溶液を熟成（aging）させることができる。熟成は、例えば、8時間～24時間行うことができ、例えば、前記範囲内で8時間～20時間、8時間～18時間、8時間～16時間、8時間～14時間、10時間～16時間、10時間～14時間などであってもよいが、これらに限定されるものではない。

30

【0073】

その後、反応産物を洗浄及び乾燥して多孔性シリカ粒子を得ることができる。必要に応じて、洗浄の前に未反応物質の分離を先行することができる。

【0074】

前記未反応物質の分離は、例えば、遠心分離で上澄み液を分離して行うことができる。遠心分離は、例えば6,000～10,000rpmで行うことができる。その時間は、例えば3分～60分、例えば、前記範囲内で3分～30分、3分～30分、5分～30分などであってもよいが、これらに限定されるものではない。

【0075】

前記洗浄は、水及び／又は有機溶媒で行うことができ、具体的には、溶媒ごとに溶解できる物質が異なるので、水と有機溶媒を1回または数回交互に使用してもよく、水または有機溶媒単独で1回または数回洗浄してもよい。前記数回は、例えば2回以上10回以下、例えば、3回以上10回以下、4回以上8回以下、4回以上6回以下などであってもよい。

40

【0076】

前記有機溶媒としては、例えば、1,4-ジオキサンなどのエーテル類（特に環状エーテル類）；クロロホルム、塩化メチレン、四塩化炭素、1,2-ジクロロエタン、ジクロロエチレン、トリクロロエチレン、ペルクロロエチレン、ジクロロプロパン、塩化アミル、1,2-ジブromoエタンなどのハロゲン化炭化水素類；アセトン、メチルイソブチルケ

50

トン、γ-ブチロラクトン、1,3-ジメチル-イミダゾリジノン、メチルエチルケトン、シクロヘキサノン、シクロペンタノン、4-ヒドロキシ-4-メチル-2-ペンタノンなどのケトン類；ベンゼン、トルエン、キシレン、テトラメチルベンゼンなどの炭素系芳香族類；N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジブチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどのアルキルアミド類；メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノールなどのアルコール類；エチレングリコールモノエチルエーテル、エチレングリコールモノメチルエーテル、エチレングリコールモノブチルエーテル、ジエチレングリコールモノエチルエーテル、ジエチレングリコールモノメチルエーテル、ジエチレングリコールモノブチルエーテル、プロピレングリコールモノメチルエーテル、プロピレングリコールモノエチルエーテル、ジブプロピレングリコールジエチルエーテル、トリエチレングリコールモノエチルエーテルなどのグリコールエーテル類（セロソルブ）；その他ジメチルアセトアミド（DMAc）、N,N-ジエチルアセトアミド、ジメチルホルムアミド（DMF）、ジエチルホルムアミド（DEF）、N,N-ジメチルアセトアミド（DMAc）、N-メチルピロリドン（NMP）、N-エチルピロリドン（NEP）、1,3-ジメチル-2-イミダゾリジノン、N,N-ジメチルメトキシアセトアミド、ジメチルスルホキシド、ピリジン、ジメチルスルホン、ヘキサメチルホスホアミド、テトラメチル尿素、N-メチルカプロラクタム、テトラヒドロフラン、m-ジオキサン、p-ジオキサン、1,2-ジメトキシエタンなどを使用でき、具体的にはアルコール、より具体的にはエタノールを使用できるが、これらに限定されるものではない。

【0077】

前記洗浄は遠心分離下で行うことができ、例えば6,000~10,000rpmで行うことができる。その時間は、例えば3分~60分、例えば、前記範囲内で3分~30分、3分~30分、5分~30分などであってもよいが、これらに限定されるものではない。

【0078】

前記洗浄は、遠心分離をせずに、フィルタで粒子をろ過して行うこともできる。フィルタは、多孔性シリカ粒子の直径以下の気孔を有するものであってもよい。反応液を、そのようなフィルタでろ過すると、粒子だけがフィルタの上に残り、そのフィルタの上に水及び／又は有機溶媒を注ぎ、洗浄することができる。

【0079】

前記洗浄時には、水と有機溶媒を1回または数回交互に使用してもよく、水または有機溶媒単独で1回または数回洗浄してもよい。前記数回は、例えば、2回以上10回以下、例えば、3回以上10回以下、4回以上8回以下、4回以上6回以下などであってもよい。

【0080】

前記乾燥は、例えば20℃~100℃で行うことができるが、これらに限定されず、真空状態で行うこともできる。

【0081】

その後、前記で得られた多孔性シリカ粒子の気孔を拡張する。気孔の拡張は、気孔膨張剤を用いて行うことができる。

【0082】

前記気孔膨張剤としては、例えば、トリメチルベンゼン、トリエチルベンゼン、トリプロピルベンゼン、トリブチルベンゼン、トリペンチルベンゼン、トリヘキシルベンゼン、トルエン、ベンゼンなどを使用でき、具体的にはトリメチルベンゼンを使用できるが、これらに限定されるものではない。

【0083】

また、前記気孔膨張剤としては、例えばN,N-ジメチルヘキサデシルアミン（N,N-dimethylhexadecylamine、DMHA）を使用できるが、これに限定されるものではない。

【0084】

前記気孔の拡張は、例えば、溶媒中の多孔性シリカ粒子を気孔膨張剤と混合し、加熱して反応させて行うことができる。

【0085】

10

20

30

40

50

前記溶媒は、例えば、水及び／又は有機溶媒であってもよい。有機溶媒としては、例えば 1, 4-ジオキサンなどのエーテル類（特に環状エーテル類）；クロロホルム、塩化メチレン、四塩化炭素、1, 2-ジクロロエタン、ジクロロエチレン、トリクロロエチレン、ペルクロロエチレン、ジクロロプロパン、塩化アミル、1, 2-ジブromoエタンなどのハロゲン化炭化水素類；アセトン、メチルイソブチルケトン、シクロヘキサノンなどのケトン類；ベンゼン、トルエン、キシレンなどの炭素系芳香族類；N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジブチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどのアルキルアミド類；メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノールなどのアルコール類；などを使用でき、具体的にはアルコール、より具体的にはエタノールを使用できるが、これらに限定されるものではない。

10

【0086】

前記多孔性シリカ粒子は、例えば、溶媒 1 リットルあたりに 10 g～200 g、例えば、前記範囲内で 10 g～150 g、10 g～100 g、30 g～100 g、40 g～100 g、50 g～100 g、50 g～80 g、60 g～80 g などの割合で添加できるが、これらに限定されるものではない。

【0087】

前記多孔性シリカ粒子は、溶媒中に均一に分散されているものであってもよく、例えば、溶媒に多孔性シリカ粒子を添加して超音波分散したものであってもよい。混合溶媒を使用する場合には、第 1 の溶媒に多孔性シリカ粒子を分散した後、第 2 の溶媒を添加したものであってもよい。

20

【0088】

前記気孔膨張剤は、例えば、溶媒 100 体積部に対して 10～200 体積部、前記範囲内で 10～150 体積部、10～100 体積部、10～80 体積部、30～80 体積部、30～70 体積部などの割合で添加できるが、これらに限定されるものではない。

【0089】

前記反応は、例えば 120℃～190℃で行うことができる。例えば、前記範囲内で 120℃～190℃、120℃～180℃、120℃～170℃、130℃～170℃、130℃～160℃、130℃～150℃、130℃～140℃などで行うことができるが、これらに限定されるものではない。

【0090】

前記反応は、例えば 6 時間～96 時間行うことができる。例えば、前記範囲内で 30 時間～96 時間、30 時間～96 時間、30 時間～80 時間、30 時間～72 時間、24 時間～80 時間、24 時間～72 時間、36 時間～96 時間、36 時間～80 時間、36 時間～72 時間、36 時間～66 時間、36 時間～60 時間、48 時間～96 時間、48 時間～88 時間、48 時間～80 時間、48 時間～72 時間、6 時間～96 時間、7 時間～96 時間、8 時間～80 時間、9 時間～72 時間、9 時間～80 時間、6 時間～72 時間、9 時間～96 時間、10 時間～80 時間、10 時間～72 時間、12 時間～66 時間、13 時間～60 時間、14 時間～96 時間、15 時間～88 時間、16 時間～80 時間、17 時間～72 時間などであってもよいが、これらに限定されるものではない。

30

【0091】

前記例示した範囲内で時間および温度を調節して、反応が過剰せずに十分に行われるようにすることができる。例えば、反応温度が低くなると反応時間を増やしたり、反応温度が高くなると反応時間を短くしたりすることができる。反応が十分でないと、気孔の拡張が十分でないことがあり、反応が進行しすぎると、気孔の過剰拡張により粒子が崩壊することがある。

40

【0092】

前記反応は、例えば、段階的に昇温して行うことができる。具体的には、常温から前記温度まで 0.5℃/分～15℃/分の速度で段階的に昇温して行うことができ、例えば、前記範囲内で 1℃/分～15℃/分、3℃/分～15℃/分、3℃/分～12℃/分、3℃/分～10℃/分などであってもよいが、これらに限定されるものではない。

50

【0093】

前記反応は、攪拌下で行うことができる。例えば100rpm以上の速度で攪拌することができ、具体的には100rpm～1,000rpmの速度で行うことができるが、これらに限定されるものではない。

【0094】

前記反応後は、反応液を徐々に冷却することができ、例えば、段階的に減温して冷却することができる。具体的には、前記温度から常温まで0.5℃/分～20℃/分の速度で段階的に減温して行うことができ、例えば、前記範囲内で1℃/分～20℃/分、3℃/分～20℃/分、3℃/分～12℃/分、3℃/分～10℃/分などであってもよいが、これらに限定されるものではない。

10

【0095】

前記冷却後に反応産物を洗浄および乾燥し、気孔が拡張された多孔性シリカ粒子を得ることができる。必要に応じて、洗浄の前に未反応物質の分離を先行することができる。

【0096】

前記未反応物質の分離は、例えば、遠心分離で上澄み液を分離して行うことができる。遠心分離は、例えば6,000～10,000rpmで行うことができる。その時間は、例えば3分～60分、例えば、前記範囲内で3分～30分、3分～30分、5分～30分などであってもよいが、これらに限定されるものではない。

【0097】

前記洗浄は、水及び／又は有機溶媒で行うことができる。具体的には、溶媒ごとに溶解できる物質が異なるので、水と有機溶媒を1回または数回交互に使用してもよく、水または有機溶媒単独で1回または数回洗浄してもよい。前記数回は、例えば2回以上、10回以下、例えば、3回、4回、5回、6回、7回、8回などであってもよい。

20

【0098】

前記有機溶媒としては、例えば、1,4-ジオキサンなどのエーテル類（特に環状エーテル類）；クロロホルム、塩化メチレン、四塩化炭素、1,2-ジクロロエタン、ジクロロエチレン、トリクロロエチレン、ペルクロロエチレン、ジクロロプロパン、塩化アミル、1,2-ジブromoエタンなどのハロゲン化炭化水素類；アセトン、メチルイソブチルケトン、シクロヘキサノンなどのケトン類；ベンゼン、トルエン、キシレンなどの炭素系芳香族類；N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジブチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどのアルキルアミド類；メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノールなどのアルコール類；などを使用することができ、具体的にはアルコール、より具体的にはエタノールを使用できるが、これらに限定されるものではない。

30

【0099】

前記洗浄は遠心分離下で行うことができ、例えば6,000～10,000rpmで行うことができる。その時間は、例えば3分～60分、例えば、前記範囲内で3分～30分、3分～30分、5分～30分などであってもよいが、これらに限定されるものではない。

【0100】

前記洗浄は遠心分離をせずに、フィルタで粒子をろ過して行うこともできる。フィルタは、多孔性シリカ粒子の直径以下の気孔を有するものであってもよい。反応液を、そのようなフィルタでろ過すると、粒子だけがフィルタの上に残り、そのフィルタの上に水及び／又は有機溶媒を注ぎ、洗浄することができる。

40

【0101】

前記洗浄時には、水と有機溶媒を1回または数回交互に使用してもよく、水または有機溶媒単独で1回または数回洗浄してもよい。前記数回は、例えば2回以上10回以下、例えば、3回以上10回以下、4回以上8回以下、4回以上6回以下などであってもよい。

【0102】

前記乾燥は、例えば20℃～100℃で行うことができるが、これに限定されるものではなく、真空状態で行うこともできる。

50

【0103】

その後、得られた粒子は、か焼することができる。か焼は、粒子を加熱してその表面および内部のシラノール基を除去して粒子の反応性を下げ、より緻密な構造にし、気孔を満たす有機物を除去する工程であり、例えば400℃以上の温度に加熱して行うことができる。その上限は特に限定されず、例えば、1,000℃、900℃、800℃、700℃等であってもよい。加熱は、例えば3時間以上行うことができる。その上限は特に限定されず、例えば、24時間、12時間、10時間、8時間、6時間などであってもよい。具体的には、400℃～700℃で3時間～8時間、より具体的には500℃～600℃で4時間～5時間行うことができるが、これらに限定されるものではない。

【0104】

気孔を満たす有機物を除去することにより、残存有機物によって示される細胞毒性、泡の発生などの問題を防止することができる。

【0105】

その後、得られた多孔性シリカ粒子は、表面改質することができる。表面改質は、表面及び／又は気孔内部に行うことができる。粒子表面と気孔内部は、同じように表面改質してもよく、異なるように表面改質してもよい。

【0106】

前記表面改質により粒子が帯電されるようにするか、または親水性及び／又は疎水性の性質を持つようにすることができる。

【0107】

より具体的には、抗体 (antibody) 又はサイトカイン (cytokine) の効果的な担持のために、アミノ基、アミノアルキル基、アルキルアミノ基、窒素原子を含むヘテロ環芳香族化合物基、シアン基及びグアニジン基からなる群より選択される少なくとも一つの置換基を有するようにして、前記多孔性シリカ粒子の表面改質を行うことができる。

【0108】

表面改質は、例えば、導入しようとする親水性、疎水性、陽イオン性、陰イオン性などの置換基を有する化合物を粒子と反応させて行うことができる。前記化合物は、例えばC1～C10のアルコキシ基を有するアルコキシシランであってもよいが、これに限定されるものではない。

【0109】

前記アルコキシシランは、前記アルコキシ基を1個以上有するものであり、例えば1～3個有することができ、アルコキシ基が結合していない部位に導入しようとする置換基があるか、又はそれで置換された置換基があってもよい。

【0110】

前記アルコキシシランを多孔性シリカ粒子と反応させると、シリコン原子と酸素原子との共有結合が形成され、アルコキシシランが多孔性シリカ粒子の表面及び／又は気孔内部と結合することができる。前記アルコキシシランは、導入しようとする置換基を有しているので、当該置換基を多孔性シリカ粒子の表面及び／又は気孔内部に導入することができる。

【0111】

前記反応は、溶媒に分散した多孔性シリカ粒子をアルコキシシランと反応させて行うことができる。

【0112】

前記溶媒は、水及び／又は有機溶媒であってもよい。有機溶媒としては、例えば、1,4-ジオキサンなどのエーテル類 (特に環状エーテル類) ; クロロホルム、塩化メチレン、四塩化炭素、1,2-ジクロロエタン、ジクロロエチレン、トリクロロエチレン、ペルクロロエチレン、ジクロロプロパン、塩化アミル、1,2-ジブromoエタンなどのハロゲン化炭化水素類; アセトン、メチルイソブチルケトン、γ-ブチロラクトン、1,3-ジメチル-イミダゾリジノン、メチルエチルケトン、シクロヘキサノン、シクロペンタノン、4-ヒドロキシ-4-メチル-2-ペンタノンなどのケトン類; ベンゼン、トルエン、

10

20

30

40

50

キシレン、テトラメチルベンゼンなどの炭素系芳香族類；N，N－ジメチルホルムアミド、N，N－ジブチルホルムアミド、N，N－ジメチルアセトアミド、N－メチルピロリドンなどのアルキルアミド類；メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノールなどのアルコール類；エチレングリコールモノエチルエーテル、エチレングリコールモノメチルエーテル、エチレングリコールモノブチルエーテル、ジエチレングリコールモノエチルエーテル、ジエチレングリコールモノメチルエーテル、ジエチレングリコールモノブチルエーテル、プロピレングリコールモノメチルエーテル、プロピレングリコールモノエチルエーテル、ジプロピレングリコールジエチルエーテル、トリエチレングリコールモノエチルエーテルなどのグリコールエーテル類（セロソルブ）；その他ジメチルアセトアミド（DMAc）、N，N－ジエチルアセトアミド、ジメチルホルムアミド（DMF）、ジエチルホルムアミド（DEF）、N，N－ジメチルアセトアミド（DMAc）、N－メチルピロリドン（NMP）、N－エチルピロリドン（NEP）、1，3－ジメチル－2－イミダゾリジノン、N，N－ジメチルメトキシアセトアミド、ジメチルスルホキシド、ピリジン、ジメチルスルホン、ヘキサメチルホスホアミド、テトラメチル尿素、N－メチルカプロラクタム、テトラヒドロフラン、m－ジオキサン、p－ジオキサン、1，2－ジメトキシエタンなどを使用でき、具体的にはトルエンを使用できるが、これらに制限されるものではない。

【0113】

前記陽電荷での帯電は、例えばアミノ基、アミノアルキル基などの窒素含有基などの塩基性基を有するアルコキシシランと反応させて行うことができる。具体的には、N－[3－（トリメトキシシリル）プロピル]エチレンジアミン（N－[3－（Trimethoxysilyl）propyl]ethylenediamine）、N1－（3－トリメトキシシリルプロピル）ジエチレントリアミン（N1－（3－Trimethoxysilylpropyl）diethylenetriamine）、（3－アミノプロピル）トリメトキシシラン（（3－Aminopropyl）trimethoxysilane）、N－[3－（トリメトキシシリル）プロピル]アニリン（N－[3－（Trimethoxysilyl）propyl]aniline）、トリメトキシ[3－（メチルアミノ）プロピル]シラン（Trimethoxy[3－（methylamino）propyl]silane）、3－（2－アミノエチルアミノ）プロピルジメトキシメチルシラン（3－（2－Aminoethylamino）propyldimethoxymethylsilane）などを使用できるが、これらに限定されるものではない。

【0114】

前記陰電荷での帯電は、例えばカルボキシ基、スルホン酸基、チオール基などの酸性基を有するアルコキシシランと反応させて行うことができる。具体的には、（3－メルカプトプロピル）トリメトキシシラン（（3－Mercaptopropyl）trimethoxysilane）などを使用できるが、これに限定されるものではない。

【0115】

前記親水性の性質は、親水性基、例えば、ヒドロキシ基、カルボキシ基、アミノ基、カルボニル基、スルフヒドリル基、ホスフェート基、チオール基、アンモニウム基、エステル基、イミド基、チオイミド基、ケト基、エーテル基、インデン基、スルホニル基、ポリエチレングリコール基などを有するアルコキシシランと反応させて持たせることができる。具体的には、N－[3－（トリメトキシシリル）プロピル]エチレンジアミン（N－[3－（Trimethoxysilyl）propyl]ethylenediamine）、N1－（3－トリメトキシシリルプロピル）ジエチレントリアミン（N1－（3－Trimethoxysilylpropyl）diethylenetriamine）、（3－アミノプロピル）トリメトキシシラン（（3－Aminopropyl）trimethoxysilane）、（3－メルカプトプロピル）トリメトキシシラン（（3－Mercaptopropyl）trimethoxysilane）、トリメトキシ[3－（メチルアミノ）プロピル]シラン（Trimethoxy[3－（methylamino）propyl]silane）、3－（2－アミノエチルアミノ）プロピルジメトキシメチルシラン（3－（2－Aminoethylamino）propyldimethoxymethylsilane）などを使用できるが、これらに限定されるものではない。

【0116】

前記疎水性の性質は、疎水性置換基、例えば、置換または非置換のC1～C30のアル

10

20

30

40

50

キル基、置換または非置換のC₃～C₃₀のシクロアルキル基、置換または非置換のC₆～C₃₀のアリール基、置換または非置換のC₂～C₃₀のヘテロアリール基、ハロゲン基、C₁～C₃₀のエステル基、ハロゲン含有基などを有するアルコキシシランと反応させて持たせることができる。具体的には、トリメトキシ（オクタデシル）シラン（Trimethoxy (octadecyl) silane）、トリメトキシ-n-オクチルシラン（Trimethoxy-n-octylsilane）、トリメトキシ（プロピル）シラン（Trimethoxy (propyl) silane）、イソブチル（トリメトキシ）シラン（Isobutyl (trimethoxy) silane）、トリメトキシ（7-オクテン-1-イル）シラン（Trimethoxy (7-octen-1-yl) silane）、トリメトキシ（3, 3, 3-トリフルオロプロピル）シラン（Trimethoxy (3, 3, 3-trifluoropropyl) silane）、トリメトキシ（2-フェニルエチル）シラン（Trimethoxy (2-phenylethyl) silane）、ビニルトリメトキシシラン（Vinyltrimethoxysilane）、シアノメチル（Cyanomethyl）、[3-（トリメトキシシリル）プロピル]トリチオカーボネート（[3-（trimethoxysilyl）propyl] trithiocarbonate）、（3-ブロモプロピル）トリメトキシシラン（（3-Bromopropyl）trimethoxysilane）などを使用できるが、これらに限定されるものではない。

【0117】

そのほか、前記表面改質により難溶性（疎水性）の抗体（antibody）、サイトカイン（cytokine）または物質との結合力を強化するために、気孔内部に疎水性置換基が存在し、使用、製剤化のし易さなどの側面で粒子の表面に親水性置換基が存在するようにするなどの処理も可能であり、表面に他の抗体（antibody）、サイトカイン（cytokine）または物質を結合するための置換基が存在してもよい。

【0118】

また、前記表面改質は、複合的に行うこともできる。例えば、外部表面または気孔内部に2回以上の表面改質を行うこともできる。具体例として、アミノ基が導入されたシリカ粒子にカルボキシル基を含む化合物をアミド結合で結合して陽電荷に帯電した粒子を、他の表面特性を持つように変化させることができるが、これに限定されるものではない。

【0119】

前記多孔性シリカ粒子のアルコキシシランとの反応は、例えば、加熱下で行うことができる。加熱は、例えば80℃～180℃、例えば、前記範囲内で80℃～160℃、80℃～150℃、100℃～160℃、100℃～150℃、110℃～150℃などで行うことができるが、これらに限定されるものではない。

【0120】

前記多孔性シリカ粒子のアルコキシシランとの反応は、例えば4時間～20時間、例えば、前記範囲内で4時間～18時間、4時間～16時間、6時間～18時間、6時間～16時間、8時間～18時間、8時間～16時間、8時間～14時間、10時間～14時間などで行うことができるが、これらに限定されるものではない。

【0121】

前記反応温度、時間、そして表面改質に使用される化合物の量などは、表面改質しようとする程度によって選択できる。本発明の抗体（antibody）、サイトカイン（cytokine）または物質の親水性、疎水性、電荷の程度によって反応条件を変えて多孔性シリカ粒子の親水性、疎水性、電荷の程度を調節することにより、抗体（antibody）、サイトカイン（cytokine）または物質の放出速度を調節することができる。例えば、抗体（antibody）、サイトカイン（cytokine）または物質が中性のpHで強い陰電荷を帯びる場合には、多孔性シリカ粒子が強い陽電荷を帯びるようにするために、反応温度を高くしたり、反応時間を長くしたり、化合物の処理量を増やすことができるが、これらに限定されるものではない。

【0122】

また、本発明の多孔性シリカ粒子は、例えば、小気孔の粒子の製造、気孔の拡張、表面改質、気孔内部の改質工程を経て製造されたものであってもよい。

【0123】

前記小気孔の粒子の製造および気孔拡張工程は前述通りの工程によって行うことができ、小気孔の粒子の製造後、そして気孔拡張工程の後に洗浄及び乾燥工程を行うことができる。

【0124】

必要に応じて、洗浄の前に未反応物質の分離を先行することができる。未反応物質の分離は、例えば遠心分離で上澄み液を分離して行うことができる。

【0125】

前記遠心分離は、例えば6,000～10,000rpmで行うことができる。その時間は、例えば3分～60分、具体的には、前記範囲内で3分～30分、3分～30分、5分～30分などであってもよいが、これらに限定されるものではない。

10

【0126】

前記小気孔の粒子の製造後の洗浄は、先に例示した範囲内の方法／条件で行うことができるが、これらに限定されるものではない。

【0127】

前記気孔拡張後の洗浄は、先の例示よりは緩和された条件で行うことができる。例えば、洗浄を3回以内行うことができるが、これに限定されるものではない。

【0128】

前記表面改質と気孔内部改質のそれぞれは、前述通りの工程によって行うことができる。表面改質と気孔内部改質の順に工程を行うことができ、前記両工程の間に粒子の洗浄工程をさらに行うことができる。

20

【0129】

前記小気孔の粒子の製造および気孔拡張の後に洗浄をより緩和された条件で行う場合、気孔内部には粒子製造、気孔拡張に使用された界面活性剤などの反応液が満たされているため、表面改質時に気孔内部が改質されずに、表面だけが改質され得る。その後、粒子を洗浄すると、気孔内部の反応液が除去され得る。

【0130】

前記表面改質工程と気孔内部改質工程との間の粒子の洗浄は、水及び／又は有機溶媒で行うことができる。具体的には、溶媒ごとに溶解できる物質が異なるので、水と有機溶媒を1回または数回交互に使用してもよく、水または有機溶媒単独で1回または数回洗浄してもよい。前記数回は、例えば2回以上10回以下、具体的には、3回以上10回以下、4回以上8回以下、4回以上6回以下などであってもよい。

30

【0131】

前記洗浄は遠心分離下で行うことができ、例えば6,000～10,000rpmで行うことができる。その時間は、例えば3分～60分、具体的には、前記範囲内で3分～30分、3分～30分、5分～30分などであってもよいが、これらに限定されるものではない。

【0132】

前記洗浄は遠心分離をせずに、フィルタで粒子をろ過して行うこともできる。フィルタは、多孔性シリカ粒子の直径以下の気孔を有するものであってもよい。反応液をそのようなフィルタでろ過すると、粒子だけがフィルタの上に残り、そのフィルタの上に水及び／又は有機溶媒を注ぎ、洗浄することができる。

40

【0133】

前記洗浄時には、水と有機溶媒を1回または数回交互に使用してもよく、水または有機溶媒単独で1回または数回洗浄してもよい。前記数回は、例えば2回以上10回以下、具体的には、3回以上10回以下、4回以上8回以下、4回以上6回以下などであってもよい。

【0134】

前記乾燥は、例えば20℃～100℃で行うことができるが、これに限定されるものではなく、真空状態で行うこともできる。

【0135】

50

抗体 (antibody) 又はサイトカイン (cytokine) は、多孔性シリカ粒子の表面及び／又は気孔内部に担持することができる。担持は、例えば、溶媒中の多孔性シリカ粒子と抗体 (antibody) 又はサイトカイン (cytokine) とを混合して行うことができる。

【0136】

前記溶媒は、水及び／又は有機溶媒であってもよい。有機溶媒としては、例えば、1, 4-ジオキサンなどのエーテル類 (特に環状エーテル類) ; クロロホルム、塩化メチレン、四塩化炭素、1, 2-ジクロロエタン、ジクロロエチレン、トリクロロエチレン、ペルクロロエチレン、ジクロロプロパン、塩化アミル、1, 2-ジブromoエタンなどのハロゲン化炭化水素類; アセトン、メチルイソブチルケトン、シクロヘキサノンなどのケトン類; ベンゼン、トルエン、キシレンなどの炭素系芳香族類; N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジブチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどのアルキルアミド類; メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノールなどのアルコール類; などを使用することができる。

【0137】

また、前記溶媒として、PBS (リン酸緩衝食塩水)、SBF (疑似体液)、Borate-buffered saline、Tris-buffered salineなどを使用することもできる。

【0138】

前記多孔性シリカ粒子と本発明のオリゴヌクレオチドの割合は、特に限定されず、例えば、重量比が1:0.05~0.8、例えば、前記範囲内で1:0.05~0.7、1:0.05~0.6、1:0.1~0.8、1:0.1~0.6、1:0.2~0.8、1:0.2~0.6等であってもよい。

【0139】

前記多孔性シリカ粒子に担持された抗体 (antibody) 又はサイトカイン (cytokine) は、延長された時間をかけて段階的に放出され得る。このような遅い放出は、連続または非連続性、線形または非線形であってもよく、多孔性シリカ粒子の特徴及び／又はそれと抗体 (antibody) 又はサイトカイン (cytokine) との相互作用に起因して異なり得る。

【0140】

前記多孔性シリカ粒子に担持された抗体 (antibody) 又はサイトカイン (cytokine) は、多孔性シリカ粒子が生分解されながら放出されるが、本発明に係る多孔性シリカ粒子は徐々に分解され、担持された抗体 (antibody) 又はサイトカイン (cytokine) が徐放的に放出されるようにすることができる。これは例えば、多孔性シリカ粒子の表面積、粒径、気孔直径、表面及び／又は気孔内部の置換基、表面の緻密さの程度などを調節することで調節できるが、これらに限定されるものではない。

【0141】

また、前記多孔性シリカ粒子に担持された抗体 (antibody) 又はサイトカイン (cytokine) は、多孔性シリカ粒子から離脱して拡散しながらも放出できる。これは多孔性シリカ粒子と抗体 (antibody) 又はサイトカイン (cytokine)、抗体 (antibody) 又はサイトカイン (cytokine) の放出環境との関係に影響を受けるものであるところ、これを調整して、抗体 (antibody) 又はサイトカイン (cytokine) の放出を調節することができる。例えば、表面改質によって多孔性シリカ粒子の抗体 (antibody) 又はサイトカイン (cytokine) との結合力を強化または弱化させることによって調節することができる。

【0142】

より具体的な例として、担持される抗体 (antibody)、サイトカイン (cytokine) または物質が難溶性 (疎水性) である場合には、粒子の表面及び／又は気孔内部が疎水性置換基を有することにより、多孔性シリカ粒子と抗体 (antibody)、サイトカイン (cytokine) または物質との結合力が増加し得る。これにより、抗体 (antibody)、サイトカイン (cytokine) または物質を徐放的に放出することができる。これは例えば、多孔性シリカ粒子が疎水性置換基を有するアルコキシシランで表面改質されたものであってもよい。

【0143】

本明細書で「難溶性」とは、(水に対して) 不溶性 (insoluble)、実質的に不溶性 (p

10

20

30

40

50

ractically insoluble)、またはごくわずかの可溶性 (only slightly soluble) を含む意味である。これは「Pharmaceutical Science」18th Edition (U.S.P、Remington、Mack Publishing Company発行) に定義されている用語である。

【0144】

前記難溶性の物質は、例えば1気圧、25℃での水溶解度が10g/L未満、具体的には5g/L未満、より具体的には1g/L未満であってもよいが、これらに限定されるものではない。

【0145】

担持される抗体 (antibody)、サイトカイン (cytokine) または物質が水溶性 (親水性) である場合には、粒子の表面及び／又は気孔内部が親水性置換基を有することにより、多孔性シリカ粒子と抗体 (antibody)、サイトカイン (cytokine) または物質との結合力が増加し得る。これにより、抗体 (antibody)、サイトカイン (cytokine) または物質を徐放的に放出することができる。これは例えば、多孔性シリカ粒子が親水性置換基を有するアルコキシシランで表面改質されたものであってもよい。

10

【0146】

水溶性物質は、例えば1気圧、25℃での水溶解度が10g/L以上であってもよいが、これに限定されるものではない。

【0147】

担持される抗体 (antibody)、サイトカイン (cytokine) または物質が電荷を帯びる場合には、粒子の表面及び／又は気孔内部がその逆の電荷に帯電することにより、多孔性シリカ粒子と抗体 (antibody)、サイトカイン (cytokine) または物質との結合力が増加し得る。これにより、抗体 (antibody)、サイトカイン (cytokine) または物質を徐放的に放出することができる。これは例えば、多孔性シリカ粒子が酸性基または塩基性基を有するアルコキシシランで表面改質されたものであってもよい。

20

【0148】

具体的には、抗体 (antibody)、サイトカイン (cytokine) または物質が中性のpHで陽電荷を帯びるものであれば、粒子の表面及び／又は気孔内部が中性のpHで陰電荷に帯電するものであってもよい。これにより、多孔性シリカ粒子と抗体 (antibody)、サイトカイン (cytokine) または物質との結合力が増加して、抗体 (antibody)、サイトカイン (cytokine) または物質を徐放的に放出することができる。これは例えば、多孔性シリカ粒子がカルボキシ基 ($-COOH$)、スルホン酸基 ($-SO_3H$) などの酸性基を有するアルコキシシランで表面改質されたものであってもよい。

30

【0149】

また、抗体 (antibody)、サイトカイン (cytokine) または物質が中性のpHで陰電荷を帯びるものであれば、粒子の表面及び／又は気孔内部が陽電荷に帯電するものであってもよい。これにより、多孔性シリカ粒子と抗体 (antibody)、サイトカイン (cytokine) または物質との結合力が増加して、抗体 (antibody)、サイトカイン (cytokine) または物質を徐放的に放出することができる。これは例えば、多孔性シリカ粒子がアミノ基、その他窒素含有基などの塩基性基を有するアルコキシシランで表面改質されたものであってもよい。

40

【0150】

抗体 (antibody)、サイトカイン (cytokine) または物質は、必要な治療の種類、放出環境、使用される多孔性シリカ粒子に依存して、例えば7日～1年またはそれ以上の期間にわたって放出され得る。

【0151】

また、本発明の多孔性シリカ粒子は、生分解性で100%分解され得るので、これに担持された抗体 (antibody)、サイトカイン (cytokine) または物質は、100%放出され得る。

【0152】

50

本発明は、前述した送達体を含む免疫療法用組成物を提供するものである。

【0153】

免疫療法（immunotherapy）とは、免疫学的方法で患者の治療を企画することを意味する。免疫療法には、特定の抗原に対する免疫応答のみに関与する特異的免疫療法と、特定の抗原に限らず、免疫系全体に影響を与える非特異的免疫療法がある。前記特異的療法の代表例としては、抗体を投与する方法が、前記非特異的療法の代表例としては、サイトカインを投与する方法がある。

【0154】

本発明の免疫療法用組成物は、前述した抗体またはサイトカインを含む免疫反応物質を担持した多孔性シリカ粒子を含んでいるため、担持した免疫反応物質を体内に安定的かつ徐放的に送達し、免疫反応物質本来の副作用を低減する効果において優位性を持つ。このため、免疫療法に用いて、様々な癌または免疫疾患などの予防または治療に優れた効果を示すことができる。

【0155】

前記癌は、膀胱癌、乳癌、結腸癌、腎臓癌、肝癌、肺癌、卵巣癌、前立腺癌、膵臓癌、胃癌、頸部癌、甲状腺癌、および扁平細胞癌を含む皮膚癌を含む癌種；白血病、急性リンパ性白血病、急性リンパ球性白血病、B-細胞リンパ腫、T-細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、毛髪状細胞リンパ腫およびバーキットリンパ腫を含むリンパ系の造血器腫瘍；急性及び慢性の骨髄性白血病および前骨髄球白血病を含む骨髄型の造血腫瘍；線維肉腫および横紋筋肉腫を含む間葉由来の腫瘍；黒色腫、精上皮腫、奇形癌種、神経芽細胞腫および神経膠腫を含む他の腫瘍；星状細胞腫、神経芽細胞腫、神経膠腫および神経鞘腫を含む中枢及び末梢神経系の腫瘍；線維肉腫、横紋筋肉腫および骨肉腫を含む中間葉由来の腫瘍；及び、黒色腫、色素性乾皮症、角化棘細胞腫、精上皮腫、甲状腺濾胞状癌および奇形癌種を含む他の腫瘍からなる群より選択されるいずれか一つであってもよい。

【0156】

前記免疫疾患は、哺乳類免疫系の構成成分が哺乳類の病理状態を引き起こすか、媒介するか、又はその他の貢献する疾患を意味するものであり、免疫反応の刺激または中断がその病気の進行に補償的な効果を有する疾患をすべて含むことができ、自己免疫疾患、感染性疾患、炎症性疾患または細胞、組織又は器官の移植拒絶（transplantation rejection）疾患などをすべて含むことができる。具体的には、ベーチェット病、多発性筋炎／皮膚筋炎、自己免疫血球減少症、自己免疫心筋炎、アトピー性皮膚炎、喘息、一次性肝硬変、皮膚筋炎、グッドパスチャー症候群、自己免疫髄膜炎、肥満、シェーグレン症候群、強直性脊髄炎、全身性エリテマトーデス、アジソン病、円形脱毛症、自己免疫性肝炎、自己免疫性耳下腺炎、クローン病、インスリン依存型糖尿病、栄養障害型表皮水疱症、副睾丸炎、糸球体腎炎、グレーブス病、ギラン・バレー症候群、橋本病、溶血性貧血、多発性硬化症、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、乾癬、リウマチ熱、関節リウマチ、サルコイドーシス、皮膚硬化症、脊椎関節症、甲状腺炎、血管炎、白斑症、粘液水腫、悪性貧血、潰瘍性大腸炎などを含むことができる。

【0157】

前記免疫疾患の一種類としての自己免疫疾患は、その種類を限定しないが、クローン病、紅斑病、アトピー、関節リウマチ、橋本甲状腺炎、悪性貧血、アジソン病、1型糖尿病、ループス、慢性疲労症候群、線維筋痛症、甲状腺機能低下症・亢進症、強皮症、ベーチェット病、炎症性腸疾患、多発性硬化症、重症筋無力症、メニエール症候群（Meniere's syndrome）、ギラン・バレー症候群（Guilian-Barre syndrome）、シェーグレン症候群（Sjogren's syndrome）、白斑症、子宮内膜症、乾癬、全身性强皮症、喘息または潰瘍性大腸炎であってもよい。

【0158】

前記免疫疾患の一種類としての感染性疾患は、バクテリア、寄生虫、真菌類、ウイルス、ウイロイド及びプリオンによってもたらされる感染性疾患であってもよい。

【0159】

前記ウイルスは、腸内ウイルス、ロタウイルス、アデノウイルス及び肝炎ウイルスであってもよく、前記ウイルスのほかにも、レトロウイルス科（例えば、HIV-I（また、HTLV-III、LAVまたはHTLV-III/LAV、またはHIV-IIIとも言う。）のようなヒト免疫不全ウイルス；及びHIV-LPのような他の分離物）；ピコルナウイルス科（Picornaviridae）（例えば、ポリオウイルス（polio virus）、A型肝炎ウイルス、エンテロウイルス、ヒトコクサッキーウイルス（human Cocksackie virus）、ライノウイルス（rhinovirus）、エコーウイルス（echovirus））；カリシウイルス科（Calciviridae）（例えば、胃腸炎の原因となる種）；トガウイルス科（Togaviridae）（例えば、ウマ脳炎ウイルス（equine encephalitis virus）、風疹ウイルス（rubella virus））；フラビウイルス科（Flaviviridae）（例えば、デングウイルス（dengue virus）、脳炎ウイルス（encephalitis virus）、黄熱ウイルス（yellow fever virus））；コロナウイルス科（Coronaviridae）（例えば、コロナウイルス（coronavirus））；ラブドウイルス科（Rhabdoviridae）（例えば、水疱性口内炎ウイルス（vesicular stomatitis virus）、狂犬病ウイルス（rabies virus））；フィロウイルス科（例えば、エボラウイルス（ebola virus））；パラミクソウイルス科（Paramyxoviridae）（例えば、パラインフルエンザウイルス（parainfluenza virus）、ムンプスウイルス（mumps virus）、麻疹ウイルス（measles virus）、RSウイルス（respiratory syncytial virus））；オルトミクソウイルス科（Orthomyxoviridae）（例えば、インフルエンザウイルス（influenza virus））；ブニヤウイルス科（Bunyaviridae）（例えば、ハンタウイルス（Hantaan virus）、ブニヤウイルス（bunya virus）、フレボウイルス（phlebovirus）及びナイロウイルス（Nairo virus））；アレナウイルス科（出血熱ウイルス（hemorrhagic fever virus））；レオウイルス科（Reoviridae）（例えば、レオウイルス（reovirus）、オルビウイルス（orbivirus）及びロタウイルス（rotavirus））；ボルナウイルス科（Bornaviridae）；ヘパドナウイルス科（Hepadnaviridae）（B型肝炎ウイルス（Hepatitis B virus））；パルボウイルス科（Parvoviridae）（パルボウイルス（Parvoviridae））；パポーバウイルス科（Papovaviridae）（乳頭腫ウイルス（papilloma virus）、ポリオマウイルス（polyoma virus））；アデノウイルス科（Adenoviridae）（殆どのアデノウイルス（Adenovirus））；ヘルペスウイルス科（Herpesviridae）（単純ヘルペスウイルス（herpes simplex virus、HSV）1・2、水痘・带状疱疹ウイルス（varicella zoster virus）、サイトメガロウイルス（cytomegalovirus、CMV）、ヘルペスウイルス（herpes virus））；ポックスウイルス科（Poxviridae）（痘瘡・天然痘ウイルス（variola virus）、ワクシニアウイルス（vaccinia virus）、ポックスウイルス（pox virus））；及びイリドウイルス科（Iridoviridae）（例えば、アフリカ豚コレラウイルス（African swine fever virus））；及び未分類のウイルス（例えば、デルタ肝炎（delta hepatitis）（B型肝炎の欠乏したサテライト（satellite）であると考えられる。）、C型肝炎（hepatitis C）；ノーウォーク（Norwalk）及び関連ウイルス、およびアストロウイルス（astro virus）の製剤）を含むが、これらに限定されるものではない。

【0160】

本発明は、また、前述した送達体を含む癌または免疫疾患の予防または治療用の薬学的組成物を提供するものである。

【0161】

本発明の組成物は、癌または免疫疾患の予防または治療効果を有するものであり、これは担持された抗体またはサイトカインを体内に安定的に送達し、ターゲットに徐放的に放出して、癌（または腫瘍）の成長を阻害し、転移を阻害することにより達成される効果であり得る。

【0162】

本発明の組成物は、薬学的に許容可能な担体をさらに含むことができ、担体と共に製剤化することができる。本発明で用語「薬学的に許容可能な担体」とは、生物体を刺激せず

10

20

30

40

50

投与化合物の生物学的活性及び特性を阻害しない担体または希釈剤を意味する。液状溶液に製剤化される組成物において薬学的に許容可能な担体は、滅菌および生体に適したものとして、食塩水、滅菌水、リンガー液、緩衝食塩水、アルブミン注射液、デキストロース溶液、マルトデキストリン溶液、グリセロール、エタノール及びこれらの成分のうち1成分以上を混合して使用することができ、必要に応じて、抗酸化剤、緩衝液及び静菌剤などの他の通常の添加剤を添加することができる。また、希釈剤、分散剤、界面活性剤、結合剤及び潤滑剤を付加的に添加し、水溶液、懸濁液、乳濁液などの注射用剤形、丸薬、カプセル、顆粒または錠剤に製剤化することができる。

【0163】

本発明の組成物は、本発明の送達体を有効成分として含むいずれの剤型にも適用可能であり、経口用または非経口用の剤形に製造することができる。本発明の薬学的剤形は、口腔 (oral)、直腸 (rectal)、鼻腔 (nasal)、局所 (topical; 頬及び舌下を含む)、皮下、膣 (vaginal) または非経口 (parenteral; 筋肉内、皮下及び静脈内を含む) 投与に適したもの、あるいは吸入 (inhalation) または注入 (insufflation) による投与に適した形態を含む。

【0164】

本発明の組成物は、薬学的に有効な量を投与する。有効容量は、患者の疾患の種類、重症度、薬物の活性、薬物に対する敏感度、投与時間、投与経路、排出割合、治療期間、同時使用される薬物を含む要素、及びその他の医学分野でよく知られている要素によって決定できる。本発明の薬学的組成物は、個々の治療剤として投与してもよく、他の治療剤と併用して投与してもよい。また、従来の治療剤と順次または同時に投与することができ、単一または多重投与することができる。前記の要素をすべて考慮して副作用なしに最小限の量で最大の効果が得られる量を投与することが重要であり、これは当業者によって容易に決定され得る。

【0165】

本発明の組成物の投与量は、患者の体重、年齢、性別、健康状態、食物、投与時間、投与方法、排泄率および疾患の重症度などによってその範囲が非常に多様である。適正な投与量は、例えば、患者の体内に蓄積された薬物の量及び／又は使用される本発明の送達体の具体的な効能程度によって異なり得る。一般的に、イン・ビボ動物モデル及びイン・ビトロで効果的なものと測定されたEC₅₀に基づいて計算することができ、例えば、体重1kgあたりに0.01µg～1gであってもよい。日、週、月、または年の単位期間に、単位期間あたりに一回または数回に分けて投与してもよく、若しくはインフュージョンポンプを用いて長期間連続して投与してもよい。反復投与の回数は、薬物の体内滞在時間、体内薬物濃度などを考慮して決定する。疾患の治療経過によっては、治療された後でも再発防止のために組成物を投与することができる。

【0166】

本発明の組成物は、癌の治療に関連して同一または類似の機能を示す有効成分を1種以上、または有効成分の溶解性及び／又は吸収性を維持／増加させる化合物をさらに含むことができる。また必要に応じて、化学治療剤、抗炎症剤、抗ウイルス剤、及び／又は免疫調節剤などをさらに含むことができる。

【0167】

また、本発明の組成物は、哺乳動物に投与された後、活性成分の迅速、持続または遅延放出を提供できるように、当該分野で公知の方法を用いて剤形化することができる。剤形は、粉末、顆粒、錠剤、エマルジョン、シロップ、エアロゾル、軟質または硬質のゼラチンカプセル、滅菌注射液、滅菌粉末の形態であってもよい。

【0168】

前記予防または治療の対象としての癌及び免疫疾患に関する具体的な説明は、前述の通りである。

【0169】

以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明することとする。

【0170】

以下、本発明の多孔性シリカ粒子は「DegradBALLまたはDDV」に、IL-2が担持されたDegradBALLは「BALLkine-2」に、それぞれ略称することがある。

【0171】

以下、腫瘍周囲注射 (peri-tumoral injection) は「p. t」に、腹腔注射 (intra-peritoneal injection) は「i. p」に、皮下注射 (subcutaneous injection) は「s. c」に、静脈注射 (intravenous injection) は「i. v」に、それぞれ略称することがある。

【0172】

実施例1. 多孔性シリカ粒子 (DDVまたはDegradBALL)

1. 多孔性シリカ粒子の製造

(1) 多孔性シリカ粒子の製造

1) 小気孔粒子の製造

2 L 丸底フラスコに蒸留水 (DW) の960 ml と MeOH の810 ml を入れた。前記フラスコにCTABを7.88 g 入れた後、攪拌しながら1 M NaOH の4.52 ml を素早く入れた。10 分間攪拌して均一な混合液を得た後、TMOS の2.6 ml を入れた。6 時間攪拌して均一に混合した後、24 時間熟成し、反応液を得た。

その後、前記反応液を25℃で10分間8,000 rpmで遠心分離して上澄み液を除去し、25℃で10分間8,000 rpmで遠心分離し、エタノール及び蒸留水で交互に5回洗浄した。

その後、70℃のオーブンで乾燥し、1.5 g の粉末状の小気孔多孔性シリカ粒子 (気孔平均直径2 nm、粒径200 nm) を得た。

【0173】

2) 気孔の拡張

1.5 g の小気孔多孔性シリカ粒子の粉末をエタノール10 ml に添加して超音波分散し、水10 ml、TMB (trimethyl benzene) 10 ml を添加して超音波分散し、分散液を得た。

その後、前記分散液をオートクレーブに入れて160℃、48時間反応させた。

反応は25℃で開始し、10℃/分の速度で昇温して行った。その後、オートクレーブ内で1~10℃/分の速度で徐々に冷却した。

冷却した反応液を25℃で10分間8,000 rpmで遠心分離して上澄み液を除去し、25℃で10分間8,000 rpmで遠心分離し、エタノールおよび蒸留水で交互に5回洗浄した。

その後、70℃のオーブンで乾燥し、粉末状の多孔性シリカ粒子 (気孔直径10~15 nm、粒径200 nm) を得た。

【0174】

3) か焼

前記2) で製造された多孔性シリカ粒子をガラスバイアル (vial) に入れて550℃で5時間加熱し、反応終了後、常温まで徐々に冷却して粒子を製造した。

【0175】

(2) 多孔性シリカ粒子の製造

気孔拡張時の反応条件を140℃、72時間に変更した以外は、前記1-1-(1)の方法と同様にして多孔性シリカ粒子を製造した。

【0176】

(3) 多孔性シリカ粒子の製造 (10 L スケール)

5倍大きな容器を使用し、各物質をいずれも5倍の容量で使用した以外は、実施例1-1-(1)の方法と同様にして多孔性シリカ粒子を製造した。

【0177】

(4) 多孔性シリカ粒子の製造 (粒径300 nm)

小気孔粒子の製造時に蒸留水 920 ml、メタノール 850 ml を使用した以外は、1-1-(1)の方法と同様にして多孔性シリカ粒子を製造した。

【0178】

(5) 多孔性シリカ粒子の製造 (粒径 500 nm)

小気孔粒子の製造時に蒸留水 800 ml、メタノール 1,010 ml、CTAB 10.6 g を使用した以外は、1-1-(1)の方法と同様にして多孔性シリカ粒子を製造した。

【0179】

(6) 多孔性シリカ粒子の製造 (粒径 1,000 nm)

小気孔粒子の製造時に蒸留水 620 ml、メタノール 1,380 ml、CTAB 7.8 g を使用した以外は、1-1-(1)の方法と同様にして多孔性シリカ粒子を製造した。

【0180】

(7) 多孔性シリカ粒子の製造 (気孔直径 4 nm)

気孔拡張時に TMB を 2.5 ml 使用した以外は、1-1-(1)の方法と同様にして多孔性シリカ粒子を製造した。

【0181】

(8) 多孔性シリカ粒子の製造 (気孔直径 7 nm)

気孔拡張時に TMB を 4.5 ml 使用した以外は、1-1-(1)の方法と同様にして多孔性シリカ粒子を製造した。

【0182】

(9) 多孔性シリカ粒子の製造 (気孔直径 17 nm)

気孔拡張時に TMB を 11 ml 使用した以外は、1-1-(1)の方法と同様にして多孔性シリカ粒子を製造した。

【0183】

(10) 多孔性シリカ粒子の製造 (気孔直径 23 nm)

気孔拡張時に TMB を 12.5 ml 使用した以外は、1-1-(1)の方法と同様にして多孔性シリカ粒子を製造した。

【0184】

(11) 多孔性シリカ粒子の製造 (二重改質)

1) 小気孔粒子の製造

実施例 1-1-(1)-1)の方法と同様にして小気孔粒子を製造した。

【0185】

2) 気孔の拡張

実施例 1-1-(1)-2)の方法と同様にして小気孔粒子を TMB と反応させ、冷却し、遠心分離して上澄み液を除去した。その後、実施例 1-1-(1)-2)と同じ条件で遠心分離し、エタノール及び蒸留水で交互に 3 回洗浄した。その後、実施例 1-1-(1)-2)と同じ条件で乾燥し、粉末状の多孔性シリカ粒子 (気孔直径 10~15 nm、粒径 200 nm) を得た。

【0186】

3) 表面改質

気孔が拡張された多孔性シリカ粒子 0.8 g~1 g を 50 ml のトルエンに分散した後、(3-アミノプロピル)トリエトキシシラン ((3-aminopropyl) triethoxysilane) を 5 ml 入れて 120 °C で還流したまま 12 時間加熱した。この過程では、前述の洗浄過程および乾燥過程を経た後、1 ml のトリエチレングリコール (PEG3, 2-[2-(2-methoxyethoxy) ethoxy] acetic acid) と、100 mg の EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide) と、200 mg の N-ヒドロキシコハク酸イミド (N-Hydroxysuccinimide, NHS) を 30 ml の PBS に分散して常温で攪拌したまま 12 時間反応する。その後、生成物は、前記の洗浄及び乾燥過程を経る。

気孔内部に、前のステップの反応液が残っているため、気孔内部は改質されない。

【0187】

4) 気孔内部の洗浄

表面改質された粒子粉末 800 mg を 2 M H C l / エタノール 40 m l に溶かし、12 時間強く攪拌下で還流した。

その後、冷却された反応液を 10 分間 8,000 r p m で遠心分離して上澄み液を除去し、25℃で 10 分間 8,000 r p m で遠心分離し、エタノールおよび蒸留水で交互に 5 回洗浄した。

その後、70℃のオーブン中で乾燥して粉末状の多孔性シリカ粒子を得た。

【0188】

5) 気孔内部の改質

i) 後述する実施例 1-2-(2)-1) の方法と同様にして気孔内部にプロピル基を導入した。

ii) 後述する実施例 1-2-(2)-2) の方法と同様にして気孔内部にオクチル基を導入した。

【0189】

2. 多孔性シリカ粒子の表面改質

(1) 陽電荷での帯電

1) 粒径 300 nm の粒子

実施例 1-1-(4) の多孔性シリカ粒子を (3-アミノプロピル) トリエトキシシラン ((3-Aminopropyl) triethoxysilane, A P T E S) と反応させて、陽電荷に帯電させた。

具体的には、100 mL 丸底フラスコにおいて、100 mg の多孔性シリカ粒子を 10 mL のトルエンに洗浄器 (bath sonicator) で分散させた。その後、1 mL の A P T E S を添加し、400 r p m で攪拌し、130℃で攪拌して 12 時間反応させた。

反応後、常温まで徐々に冷却し、10 分間 8,000 r p m で遠心分離して上澄み液を除去し、25℃で 10 分間 8,000 r p m で遠心分離し、エタノールおよび蒸留水で交互に 5 回洗浄した。

その後、70℃のオーブン中で乾燥し、表面および気孔内部にアミノ基を有する粉末状の多孔性シリカ粒子を得た。

【0190】

2) 粒径 200 nm の粒子

i) 実施例 1-1-(1) の多孔性シリカ粒子を (3-アミノプロピル) トリエトキシシラン ((3-Aminopropyl) triethoxysilane, A P T E S) と反応させて陽電荷に帯電させ、A P T E S を 0.4 mL 添加し、反応時間を 3 時間とした以外は、前記実施例 1-2-(1)-1) の方法と同様にして改質した。

ii) 実施例 1-1-(9) の多孔性シリカ粒子を (3-アミノプロピル) トリエトキシシラン ((3-Aminopropyl) triethoxysilane, A P T E S) と反応させて陽電荷に帯電させ、それ以外は、前記実施例 1-2-(1)-1) の方法と同様にして改質した。

iii) 実施例 1-1-(10) の多孔性シリカ粒子を (3-アミノプロピル) トリエトキシシラン ((3-Aminopropyl) triethoxysilane, A P T E S) と反応させて陽電荷に帯電させ、それ以外は、前記実施例 1-2-(1)-1) の方法と同様にして改質した。

【0191】

(2) 疎水性基の導入

1) プロピル基

前記実施例 1-1-(1) の多孔性シリカ粒子をトリメトキシ (プロピル) シラン (Trimethoxy (propyl) silane) と反応させて、表面および気孔内部にプロピル基を導入し、A P T E S の代わりにトリメトキシ (プロピル) シラン (Trimethoxy (propyl) silane) を 0.35 mL 添加し、12 時間反応させた以外は、前記実施例 1-2-(1) の方法と同様にして改質した。

【0192】

2) オクチル基

10

20

30

40

50

前記実施例 1-1-(1) の多孔性シリカ粒子をトリメトキシ-n-オクチルシラン (Trimethoxy-n-octylsilane) と反応させて、表面および気孔内部にプロピル基を導入し、A P T E S の代わりにトリメトキシ-n-オクチルシラン (Trimethoxy-n-octylsilane) を 0.5 mL 添加し、12 時間反応させた以外は、前記実施例 1-2-(1) の方法と同様にして改質した。

【0193】

(3) 陰電荷での帯電

1) カルボキシル基

前記実施例 1-1-(1) の多孔性シリカ粒子を無水コハク酸 (succinic anhydride) と反応させて陰電荷に帯電させ、トルエンの代わりに D M S O (ジメチルスルホキシド) を使用し、A P T E S の代わりに 80 mg の無水コハク酸 (succinic anhydride) を添加して 24 時間常温で攪拌し反応させ、洗浄時に蒸留水の代わりに D M S O を使用した以外は、前記実施例 1-2-(1)-(1) の方法と同様にして改質した。

【0194】

2) チオール基

A P T E S の代わりに M P T E S の 1.1 mL を使用した以外は、前記実施例 1-2-(1)-(1) の方法と同様にして改質した。

【0195】

3) スルホン酸基

前記実施例 1-2-(3)-(2) の多孔性シリカナノ粒子 100 mg を、1 M 硫酸水溶液 1 mL と 30% 過酸化水素水 20 mL に分散して常温で攪拌し、酸化反応を誘導してチオール基をスルホン酸基に酸化した。その後、前記実施例 1-2-(1)-(1) の方法と同様にして洗浄および乾燥した。

【0196】

3. 粒子の形成及び気孔拡張の確認

実施例 1-1-(1) ~ (3) の粒子の小気孔粒子、製造された多孔性シリカ粒子を顕微鏡で観察し、小気孔粒子が均一に生成されているか、気孔が十分に拡張されて多孔性シリカ粒子が均一に形成されているかを確認した (図 1 ~ 4)。

図 1 は、実施例 1-1-(1) の多孔性シリカ粒子の写真、図 2 は、実施例 1-1-(2) の多孔性シリカ粒子の写真であり、気孔が十分に拡張された球状の多孔性シリカ粒子が均一に生成されたことを確認することができる。

図 3 は、実施例 1-1-(1) の小気孔粒子の写真、図 4 は、実施例 1-1-(1) と 1-1-(3) の小気孔粒子の比較写真であり、球状の小気孔粒子が均一に生成されたことを確認することができる。

【0197】

4. B E T 表面積および気孔体積の計算

実施例 1-1-(1) の小気孔粒子、実施例 1-1-(1)、(7)、(8)、(10) の多孔性シリカ粒子の表面積と気孔体積を計算した。表面積は、ブルナウアー-エメット-テラー (Brunauer-Emmett-Teller) (B E T) 方法により計算し、気孔サイズの分布は、バーレット-ジョイナー-ハレンダ (Barrett-Joyner-Halenda) (B J H) 方法により計算した。

前記各粒子の顕微鏡写真を図 5 に、計算の結果を下記表 1 に示す。

【0198】

10

20

30

40

50

【表 1】

区分	気孔直径 (nm)	BET 表面積 (m ² /g)	気孔体積 (mL/g)
実施例 1-1-(1)の 小気孔粒子	2.1	1337	0.69
実施例 1-1-(7)	4.3	630	0.72
実施例 1-1-(8)	6.9	521	0.79
実施例 1-1-(1)	10.4	486	0.82
実施例 1-1-(10)	23	395	0.97

10

【0199】

5. 生分解性の確認

実施例 1-1-(1) の多孔性シリカ粒子の生分解性を確認するために、37℃、SBF (pH 7.4) における生分解の程度を 0 時間、120 時間、360 時間に顕微鏡で観察した。それを図 6 に示す。

これを参照すると、多孔性シリカ粒子が生分解され、360 時間経過後はほぼすべてが分解されたことを確認することができる。

【0200】

20

6. 吸光度比の測定

時間別に下記数式 1 による吸光度比を測定した。

【0201】

[数式 1]

$$A_t / A_0$$

(式中、 A_0 は、前記多孔性シリカ粒子 1 mg / ml の懸濁液 5 ml を直径 50 kDa の気孔を有する円筒状の透過膜に入れて測定した多孔性シリカ粒子の吸光度であり、

前記透過膜の外部には、前記透過膜と接し、前記懸濁液と同じ溶媒 15 ml が位置し、前記透過膜の内外部は、37℃で 60 rpm で水平攪拌され、

A_t は、前記 A_0 の測定時から t 時間経過後に測定した多孔性シリカ粒子の吸光度である。)

30

【0202】

具体的には、多孔性シリカ粒子粉末 5 mg を SBF (pH 7.4) 5 ml に溶かした。その後、5 ml の多孔性シリカ粒子溶液を、図 7 に示す直径 50 kDa の気孔を有する透過膜に入れた。外部膜に 15 ml の SBF を添加し、外部膜の SBF は 12 時間ごとに入れ替えた。多孔性シリカ粒子の分解は、37℃で 60 rpm で水平攪拌して行った。

その後、紫外・可視分光法 (UV-vis spectroscopy) によって吸光度を測定し、 $\lambda = 640 \text{ nm}$ で分析した。

【0203】

(1) 吸光度比の測定

40

実施例 1-1-(1) の多孔性シリカ粒子の吸光度比を前記方法に従って測定した。その結果を図 8 に示す。

これを参照すると、吸光度比が $1/2$ となる t は約 58 時間であり、非常にゆっくりと分解されることが確認できた。

【0204】

(2) 粒径別

実施例 1-1-(1)、(5)、(6) の多孔性シリカ粒子の吸光度を前記数式 1 により測定した。その結果を図 9 に示す (懸濁液と溶媒としては、SBF を使用した。)

これを参照すると、粒径の増加によって t が減少することが分かる。

【0205】

50

(3) 気孔の平均直径別

実施例 1-1-(1)、(9) の多孔性シリカ粒子、そしてコントロールとして実施例 1-1-(1) の小気孔多孔性シリカ粒子の吸光度を前記数式 1 により測定した。その結果を図 10 に示す（懸濁液と溶媒としては、SBF を使用した。）。

これを参照すると、実施例の多孔性シリカ粒子は、コントロールに比べて t が非常に大きいことが確認できる。

【0206】

(4) pH 別

実施例 1-1-(4) の多孔性シリカ粒子の pH 別吸光度を測定した。吸光度は、SBF で、そして pH 2、5 及び 7.4 の Tris で測定した。その結果を図 11 に示す。

これを参照すると、pH 別に t の差はあるが、いずれも吸光度の比が $1/2$ となる t は 24 以上であった。

【0207】

(5) 帯電

実施例 1-2-(1)-1) の多孔性シリカ粒子の吸光度を測定し、その結果を図 12 に示す（懸濁液と溶媒としては、トリス (Tris, pH 7.4) を使用した。）。

これを参照すると、陽電荷に帯電した粒子も吸光度の比が $1/2$ となる t は 24 以上であった。

【0208】

7. 抗体またはサイトカインの担持

(1) 抗体の担持

1 x PBS の 200 μ l に実施例 1-2-(1)-2) - ii) の多孔性シリカ粒子粉末 100 μ g 及びアンチツイスト (anti-twist) IgG (Santacruz, sc-81417) 10 μ g を混合した。その後、室温で 1 時間インキュベートして IgG を担持した。前記と同じ条件下で他の抗体も担持した。

【0209】

(2) サイトカインの担持

PBS または蒸留水の 100 μ l に実施例 1-2-(1)-2) - ii) の多孔性シリカ粒子粉末 25 μ g 及び IL-2 の 10 μ g を混合した。その後、1 時間インキュベートして IL-2 を担持した。前記と同じ条件下で他のサイトカインも担持した。

【0210】

8. 抗体またはサイトカインの放出

(1) 抗体の放出

フルオレセイン (Fluorescein) 蛍光が標識された IgG をロードした多孔性シリカ粒子 100 μ g を SBF (pH 7.4) または PBS (pH 7.4) の 200 μ l に再浮遊させた。

【0211】

IgG、PD-1、PD-L1 の放出は、37°C で 60 rpm で水平攪拌して行われ、6 時間、12 時間、24 時間、48 時間、96 時間、144 時間、240 時間の時点で 200 μ l の放出溶媒を蛍光測定のために回収し、等量の SBF または PBS を添加した。フルオレセイン (Fluorescein) 蛍光が標識された IgG の蛍光強度は、517 nm の波長 ($\lambda_{ex} = 492$ nm) で測定し、BSA の放出程度を測定した。

【0212】

図 13 ~ 15 を参照すると、IgG は SBF と PBS の両方において徐放的に放出され、IgG、PD-1、PD-L1 のいずれも 250 時間以上に渡ってほぼ 100% まで放出されることを確認することができる。

【0213】

(2) サイトカインの放出

FITC が結合されたサイトカインを担持した多孔性シリカ粒子を 37°C で SBF (pH 7.4) に再浮遊させた後、所定の期間 (1、2、3、4、5、6、7 日) 観察した。

溶液は、10分間8,000rpmで遠心分離した。サイトカインの放出量はF I T Cの蛍光強度スペクトルから確認した。

【0214】

図17～21を参照すると、I L - 1 0、I L - 1 5、H G F、E G F、I L - 2は、いずれも徐放的に放出され、7時間以上に渡ってほぼ100%まで放出されることを確認することができる。

【0215】

実施例2. 多孔性シリカ粒子の毒性有無の確認

1. 実験方法

本発明の多孔性シリカ粒子の単回投与毒性を確認するために、すべてのマウス（群あたり4匹）にそれぞれ31.25、62.5、125、250mg/kgの多孔性シリカ粒子（D e g r a d a B A L L）を投与した。投与後5日目にマウスを犠牲にして主要な臓器（肝臓、脾臓、肺、心臓及び腎臓）を分離した。

【0216】

本発明の多孔性シリカ粒子の反復投与毒性を確認するために、すべてのマウス（群あたり8匹）に0.5、5、50mg/kgの多孔性シリカ粒子（D e g r a d a B A L L）を3日または4日間隔で最大9回皮下投与した。最後の投与から48時間後にすべてのマウスを犠牲にして主要な臓器（肝臓、脾臓、肺、心臓及び腎臓）を分離した。

【0217】

2. 実験結果

図22～43を参照すると、すべての群で明らかな病理学的または臨床的な毒性の兆候は観察されないことを確認することができる。より具体的には、本発明の多孔性シリカ粒子は、器官（肝臓、脾臓、腎臓、胸腺、心臓、肺及びリンパ節）の有意な体重減少を誘発しなかった（データは、平均±標準偏差で示す。正常群との有意差の値（*p<0.05））。また、全血分析および血清生化学分析で得られた様々なパラメータにおいて、赤血球（R B C）、白血球（W B C）及び血液細胞容積（すなわち、平均微粒子容積（M C V））、平均血小板容積（M P V）、平均微粒子ヘモグロビン濃度（M C H C）、ヘモグロビン、ヘマトクリット、および赤血球分布幅（R D W）レベルは正常範囲を示した。また、A L T（Alanine transaminase）、A S T（aspartate transaminase）、A L P（alkaline phosphatase）及びG G T（gamma-glutamyltransferase）数値においても、肝損傷の兆候を示さなかった。腎機能（血液尿素窒素（B U N）、クレアチニン）の指標および全タンパク質とビリルビンもまた、すべての群で正常範囲であった。すべての群の心臓、肝臓、肺、腎臓および脾臓のH & E染色（x200）の組織学的観察においても出血は観察されず、群間の差はなかった（バーは100μmを示す。）。

【0218】

実施例3. 担持された免疫反応物質の生物学的活性保存の確認

1. 実験方法

多孔性シリカ粒子に担持された抗体またはサイトカインの生物学的活性が、担持されていない場合と同様に保存されるかを確認するために、I L - 2を担持した多孔性シリカ粒子（B A L L k i n e - 2）を処理したマウスのT細胞の細胞増殖（cell proliferation）の程度をC C Kアッセイ（assay）で確認した。I L - 2を担持した多孔性シリカ粒子（B A L L k i n e - 2）を処理したI L - H E K細胞でのS T A T 5活性程度をH E K - B l u e TM I L - 2アッセイ（InvivoGen、CA、USA）を用いて、メーカーのプロトコルに従って分析した。

【0219】

2. 実験結果

図44、45を参照すると、I L - 2が担持されていない場合と比較して、I L - 2が多孔性シリカ粒子に担持されている場合には、マウスのT細胞の増殖とS T A T 5の活性程度が処理濃度に無関係に有意な差を示さなかった。これは、抗体やサイトカインを本発明の多孔性シリカ粒子に担持して処理しても生物学的活性がよく保存されることを示す結

果である。

【0220】

実施例4．本発明の送達体による過敏反応の有無の確認

1．実験方法

D e g r a d a B A L L、I L-2及びI L-2を担持したD e g r a d a B A L L (B A L L k i n e-2)の潜在的な免疫原性、特に遅延型過敏反応 (type 4 hypersensitivity)を評価するために、試験管内M U S S T (骨髓性U 9 3 7 肌敏感試験)の分析を行った。Stimulation indexが3以下であることは、反応のないことを意味する (N C : 陰性対照群 (negative control)、P C : 陽性対照群 (positive control)、刺激指数 = 試験サンプルの陽性細胞の平均% / N Cの陽性細胞の平均%、N C群との有意差 (### p < 0.05))。N CとP C群では3回、他の群では2回繰り返し試験した。

10

【0221】

2．実験結果

図46を参照すると、すべての群のすべての刺激指数 (理論血漿濃度の10倍から1/25倍まで)は、3.0よりも低く陽性反応のないことが示された。これは本発明の送達体による過敏反応、特に遅延型過敏反応がないことを証明する結果である。

【0222】

実施例5．本発明の送達体の安定的な送達性及び標的性の確認

1．抗体の送達

図47、48は、アンチ-P D-L 1抗体とD D VにそれぞれF I T C、C y 5を標識し、アンチ-P D-L 1抗体を担持したD D Vを腫瘍内投与 (intratumoral injection)した後、各時間ごとにアンチ-P D-L 1抗体とD D Vの蛍光強度を測定した結果を示すものであり、D D Vとアンチ-P D-L 1抗体が長期間投与部位に残っていることを確認できる。これらは、本発明の送達体が担持されたアンチ-P D-L 1抗体を安定的に送達することができ、腫瘍内および投与部位に長期間滞在させて長期間薬効が保持することを証明するものである。

20

【0223】

2．サイトカインの送達

図49は、I L-2とD D VにそれぞれC y 7、C y 5を標識し、I L-2を担持したD D V (B A L L k i n e-2)を皮下投与 (SC injection)した後、各時間ごとにI L-2とD D Vの蛍光強度を測定した結果を示すものであり、D D VとB A L L k i n e-2が長期間投与部位に残っていることを確認できる。これは、本発明の送達体が担持されたI L-2を安定的に送達できることを証明するものである。

30

【0224】

図50、51は、I L-2にF I T C蛍光をつけ、D D VにT A M R A蛍光をつけて皮下投与し、24時間後に尾静脈にC y 5蛍光で標識 (labeling)されているレクチン (lectin)を注射して血管を染色した後、腫瘍を摘出して蛍光画像を確認した結果を示すものであり、D D VとB A L L k i n e-2が腫瘍組織に特異的に分布していることを確認できる。これは、本発明の送達体が担持されたI L-2を腫瘍特異的に標的して送達できることを証明するものである。

40

【0225】

図52は、腫瘍細胞 (D A P I)、v e h i c l e (T A M R A)、I L-2 (F I T C)および血管染色 (dylight 649 接合レクチン)を示す腫瘍組織の組織学的断面画像を示すものである。図53は、B A L L k i n e-2 (p. t)及びI L-2 (i. p又はp. t)の腫瘍内薬物動態 (グラフは、測定時間あたり3匹のマウスの平均±標準偏差を示す。)を示すものであり、皮下注射後、腫瘍内でのI L-2の量をE L I S Aで測定した結果を示すものである。これらを参照すると、本発明の多孔性シリカ粒子がI L-2を腫瘍及び投与部位に長期間滞在させ、I L-2を安定的に送達できることを確認できる。

【0226】

3．免疫反応物質の免疫器官への送達能の確認

50

図54、55は、マウスに1xPBSバッファ(100μL)及びCy5接合DegradableBALL(2.5mg/kg)を皮下注入し、投与後1、3、5日にマウスを犠牲にして、臓器(皮膚、胸腺、脾臓及びリンパ節)を分離した後、FOBIイメージングシステムにより臓器の蛍光画像を撮影した結果を示すものであり、1、3、5日に免疫器官に分布されることを蛍光画像から確認できる。これは、本発明の多孔性シリカ粒子が担持された様々な免疫反応物質を免疫器官に安定的に送達できることを証明するものである。

【0227】

実施例6. 本発明の送達体の癌免疫治療の効果の確認

1. 黒色腫(melanoma)モデル

図56に示すように、正常マウスと黒色腫腫瘍マウスにDegradableBALLをそれぞれ皮下または腫瘍周囲に注射した。図57は、すべてのマウスにTAMRAが付いたDegradableBALLをそれぞれ2.5、10、50mg/kgの容量で皮下注入し、1、3、5、7日後にマウスを犠牲にして皮膚組織を摘出し、蛍光画像を確保した結果である。注入後7日目になっても蛍光が残存することから、本発明の多孔性シリカ粒子の生体内安定性が非常に高く、担持された免疫反応物質を安定的に長期間徐放的に送達できることを暗示する。

【0228】

本発明の送達体の黒色腫の治療効果の優位性を証明するために、図58及び下記表2のプロトコルに従って黒色腫マウスモデルを用いて実験を行った。各群別に腫瘍の成長速度を測定し、マウスの個体ごとの腫瘍成長速度を測定した結果を図59に示す。aPD-1抗体とIL-2の併用投与は、aPD-1抗体単独投与群と比べてその成長速度が低かったが、IL-2を多孔性シリカ粒子に担持して併用投与した場合(BALLkine-2)には、その成長速度が顕著に低いことを確認できる。また、各群ごとの生存率もまた、IL-2を多孔性シリカ粒子に担持して併用投与した場合(BALLkine-2)が、そうでない場合と比べて顕著に高いことを図60から確認できる。

【0229】

10

20

30

40

50

【表 2】

投与群 (Group)	投与プロトコル	合計容量
Buffer(i.p)	3日間隔で7回の腹腔注射 (0,3,6,9,12,15,18日)	
DegradaBALL(s.c)	6日間隔で4回の腫瘍周囲注射 (0,6,12,18日)	
aPD-1 抗体 (i.p)	3日間隔で7回の腹腔注射 (0,3,6,9,12,15,18日)	70 mg/kg
aPD-1 抗体 (i.p) + IL-2(i.p)	aPD-1 抗体: 3日間隔で7回の腹腔注射 (0,3,6,9,12,15,18日) IL-2: 毎5日間2サイクルの腹腔注射 (0,1,2,3,4,10,11,12,13,14日)	aPD-1 抗体: 70 mg/kg IL-2: 10 mg/kg
aPD-1 抗体 (i.p) + IL-2(s.c)	aPD-1 抗体: 3日間隔で7回の腹腔注射 (0,3,6,9,12,15,18日) IL-2: 6日間隔で4回の腫瘍周囲注射 (0,6,12,18日)	aPD-1 抗体: 70 mg/kg IL-2: 4 mg/kg
aPD-1 抗体 (i.p) + BALLkine-2(s.c)(1 又は 0.25 mg/kg)	aPD-1 抗体: 3日間隔で7回の腹腔注射 (0,3,6,9,12,15,18日) BALLkine- 2: 6日間隔で4回の腫瘍周囲注射 (0,6,12,18日)	aPD-1 抗体: 70 mg/kg BALLkin e-2: 4 mg/kg 又は 1 mg/kg

【0230】

また、本発明の送達体の転移性黒色腫 (metastatic melanoma) 治療効果の優位性を証明するために、図61のプロトコルに従って転移性黒色腫の肺転移動物モデルで実験を行った。前記図58～60の結果と同様に、aPD-1抗体とIL-2の併用投与は、aPD-1抗体単独投与群と比べてその成長速度が低かったが、IL-2を多孔性シリカ粒子に担持して併用投与した場合 (BALLkine-2) には、その成長速度が顕著に低いことを確認した。具体的には、図61でIL-2を多孔性シリカ粒子に担持してaPD-1抗体と併用投与した場合 (BALLkine-2) には、そうでない場合と比べて、黒色の癌組織部位が顕著に少ない面積に広がっていて肺転移が低く、肺腫瘍結節の形成と肺の体積増大を大幅に抑制することを確認することができる。図62で肺転移が進行された各肺の重量もまた、IL-2を多孔性シリカ粒子に担持してaPD-1抗体と併用投与した場合 (BALLkine-2) には、そうでない場合と比べて顕著に低いことを確認できる (データは3匹のマウスの平均±標準偏差で示す。)。図63の生存率もまた、IL-2を多孔性シリカ粒子に担持してaPD-1抗体と併用投与した場合 (BALLkine-2) には、そうでない場合と比べて顕著に高いことを確認できる (群あたり10匹のマウス)。本発明の送達体の黒色腫治療における免疫反応機序を調べるために、図64のプロトコルに従って腫瘍浸潤リンパ球 (TILs) の分析を行った。TIL分析は目標日 (BALLkine-2の投与から1, 3, 5, 7日) にマウスから分離し、免疫細胞集団 ((b) CD8⁺T細胞、(c) CD4⁺T細胞、(d) 有効NK細胞、(e) Treg細胞、(f) CD8⁺/Treg細胞) を流細胞分析法で分析し、(点は個々の腫瘍組織を、線は8匹のマウスの腫瘍組織の平均を示す。)、3、5日時点のCD8⁺T細胞の免疫組織を染色して分析した。BALLkine-2投与群の代表画像 (図70) を参照すると、CD8⁺T細胞の数が大幅に増加して広範な腫瘍細胞の間に分布していること

を確認できる。また、BALLine-2をB16F10黒色腫瘍マウスの右脇腹に注入（腫瘍周囲注射；peritumoral injection）してから1，3，5日目に脾臓と排出リンパ節（腸骨と鼠径部リンパ節）を分離し、リンパ球（CD8⁺T細胞とNK細胞）を分離して免疫細胞集団を評価した（データは3匹のマウスの平均±標準偏差で示す）。このことから、対照群に比べて免疫細胞の数がBALLine-2投与群で顕著に増加することを確認できる。

【0231】

2. 腎臓癌（renal cell carcinoma）モデル

本発明の送達体の腎臓癌治療の優位性を確認するために、図75のプロトコルに従って腎細胞癌（RCC）異種移植マウスモデルにおいて、多孔性シリカ粒子に担持していないIL-2に対する、多孔性シリカ粒子に担持したIL-2（BALLine-2）の腫瘍成長抑制程度を確認しようとした。図76から確認できるように、BALLine-2は、IL-2に比べて有意な腫瘍成長抑制性を示し、腎臓癌治療の優位性を立証した（データは平均±SEMで示し、群あたり7匹のマウスとした。*** $p < 0.001$ ：他の群と有意に相違する。）。

【0232】

また、RCCの転移性（metastatic）及び正位（orthotopic）マウスモデルにおいて、多孔性シリカ粒子に担持していないIL-2に対する、多孔性シリカ粒子に担持したIL-2（BALLine-2）の腫瘍成長抑制程度を確認するために図77のプロトコルに従って実験を行った。投与後10日目にマウスを犠牲にし、腎臓を摘出してその重量を測定した（腎臓重量／体重（%）を計算。データは平均±SDで示し、群あたり3匹のマウスとした。# $p < 0.05$ 、### $p < 0.001$ ：対照群（バッファ投与群）に比べて有意に相違する。* $p < 0.05$ ：IL-2投与群に比べて有意に相違する。）。その結果、IL-2投与群と比較して、BALLine-2投与群の腎臓重量が有意に低いことを図78から確認できる。図79の摘出した腎臓の実測画像からも、BALLine-2の腎臓サイズが他の群と比較して顕著に小さいことを確認できる。図80の腎臓組織のH&E染色写真からも他の群と比較してBALLine-2処理群の組織染色程度が顕著に高いことを確認できる。また、肺浮腫を評価するために、ウェット肺を収穫して重量を測定した後、60℃のオーブンで3日間乾燥した後に重量を測定した結果（図81。データは平均±SDで示し、群あたり3匹のマウスとした。## $p < 0.01$ ：対照群（バッファ投与群）に比べて有意に相違する。** $p < 0.01$ ：IL-2投与群に比べて有意に相違する。）、BALLine-2の処理群において、ウェット肺とドライ肺の重量比がIL-2の投与群と比べて有意に低いことを確認した。

【0233】

また、マウスの血液中の白血球、好中球及びリンパ球を分析した結果（図82。データは平均±SDで示し、群あたり3匹のマウスとした。# $p < 0.05$ ：対照群（バッファ投与群）に比べて有意に相違する。* $p < 0.05$ ：IL-2投与群に比べて有意に相違する。）、その数において、BALLine-2処理群が他の群に比べて有意に高いレベルを示した。このことから、免疫反応の促進効果における顕著な優位性を確認した。

【0234】

3. その他の癌モデル

黒色腫と腎臓癌を含む他の癌種に対する本発明の組成物の効果を下記表3に示す。

【0235】

10

20

30

40

50

【表 3】

癌種	細胞株	測定変数	対照群 (vehicle)	実験群 1	実験群 2	実験群 3
黒色腫	B16F10	相対的腫瘍サイズ(12日)	14.1	IL-2/aPD-1抗体	IL-2+DegradaBALL/aPD-1抗体	
				9.1	4.3	
		相対的腫瘍サイズ(10日)	12.5	IL-15	IL-15+DegradaBALL	
				8.2	3.9	
腎臓癌	Renca	体重量に対する腎臓重量(w/w%; 10日)	1.05	IL-2	IL-2+DegradaBALL	
				0.86	0.78	
肝癌	BNL-h1	肝転移の数	85	IL-12	IL-12+DegradaBALL	
				9	2	
大腸癌	CT26(s.c)	腫瘍サイズ(mm ³ ; 19日)	452	aPD-L1抗体	aPD-L1抗体+DegradaBALL	
				220	187	
	CT26(i.v)	生体発光、光子量/s	38	IL-2	IL-2+DegradaBALL	
				11	1.4	
肺癌	LLC	生体発光、光子量/s	3.9	IL-12	IL-12+DegradaBALL	
				1.1	0.4	
				PTX/CDP	IL-2/PTX/CDDP	IL-12+DegradaBALL/PTX/CDDP
				3.8	0.2	0.01

10

20

30

40

50

乳癌	4T1	腫瘍サイズ(mm ³ ; 20日)	411	IL-12	IL-12+Degrada BALL	
				32.4	8.3	
	EMT-6	腫瘍サイズ(mm ³ ; 28日)	953	IL-21	IL-21+Degrada BALL	
				521	120	
				aCTLA-4抗体	aCTLA-4抗体+Degrada BALL	IL-21/aCTLA-4抗体+Degrada BALL
				320	89	21
胃癌	SGC-7901	腫瘍サイズ(mm ³ ; 28日)	1285	IL-24	IL-24+Degrada BALL	
				423	121	
膵臓癌	HS766T	腫瘍サイズ(mm ² ; 28日)	81	IL-13	IL-13+Degrada BALL	
				14	3.2	
頭頸部癌	KCCT873	腫瘍サイズ(mm ² ; 30日)	138	IL-13	IL-13+Degrada BALL	
				29	11	
				IL-13/CpG	IL-13+Degrada BALL/CpG	IL-13+Degrada BALL/CpG+Degrada BALL
				19	4.2	1.7

【0236】

実施例7. 本発明の送達体の副作用減少効果の確認

サイトカインの投与には様々な副作用が存在するが、中でもIL-2の投与による副作用として血管漏出症候群(capillary leak syndrome (CLS) 又はvascular leak syndrome (VLS))がよく知られている。そこで、本発明の送達体が担持する物質の副作用を減少させる効果が存在するかを確認するために、IL-2サイトカインを担持した多孔性シリカ粒子であるBALLkine-2を用いて実験を行った。

【0237】

図83の投与スケジュールとCLS分析プロトコルに従って実験を行った。具体的には、3日間IL-2(15 µg)とBALLkine-2(15 µg)をC57BL/6マウスに投与した後、4日目に分析した。緩衝液(i.vまたはs.c)、Degrada BALL(i.vまたはs.c)、IL-2(i.vまたはs.c)、又はBALLkine-2(i.vまたはs.c)を投与したマウスの肺組織のH&E染色の代表画像(図84)を参照すると、BALLkine-2投与群において、IL-2(i.vまたはs.c)投与群に比べて血管内部と周辺の炎症細胞数を減少させることを確認できる(バーは200 µmを示す。)。また、肺浮腫を評価するために、ウェット肺を分離して重量を測定し、肺を60℃のオーブンで3日間乾燥して重量を測定した(図85)。その結果、BALLkine-2投与群では、IL-2(i.vまたはs.c)ウェット肺と比べて

ドライ肺の重量比（ウェット肺の重量／ドライ肺の重量）が有意に低いことを確認した。また、前記VLSモデルで尾静脈からエバンスブルー色素を、犠牲にする2時間前にマウスに注入した。犠牲にして肝臓（図86）と肺（図87）を分離し、VLSの深化程度をエバンスブルーの血管外流出により測定して分析した。その結果、BALBkine-2投与群では、IL-2（i.vまたはs.c）投与群に比べてその流出程度が顕著に低いことを確認した。また、3日目にマウスの血液学的分析のために、血液を採取して白血球、好中球及びリンパ球を分析した。その結果、いずれもBALBkine-2投与群がIL-2（i.vまたはs.c）投与群に比べてその数が有意に高いことを確認した（図88）。データは緩衝液及びDegradBALB処理群あたり3～4匹、BALBkine-2群あたり4～7匹のマウスの平均±標準偏差で示す；緩衝液（i.vまたはs.c）群と有意差（# $p < 0.05$ ；## $p < 0.01$ ；### $p < 0.001$ ）、IL-2（i.vまたはs.c）群と有意差（* $p < 0.05$ ；** $p < 0.01$ ；*** $p < 0.001$ ）。

【0238】

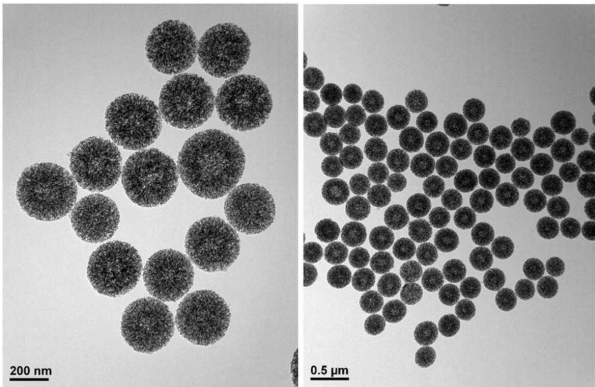
実際の癌の免疫治療においても血管漏出症候群を低減できるかを確認するために、図89のプロトコルに従って腫瘍マウスモデルで血管漏出症候群（VLS）の分析を行った。肺浮腫を評価するために、ウェット肺を分離して重量を測定し、肺を60℃のオーブンで3日間乾燥して重量を測定した（図90）。その結果、BALBkine-2投与群では、IL-2（i.vまたはs.c）投与群に比べてその重量比が有意に低く、正常群と類似した数値を示した。また、VLSモデルで尾静脈からエバンスブルー色素を、犠牲にする2時間前にマウスに注射した。その後、肝臓（図91）と肺（図92）を分離し、エバンスブルーの血管外流出により測定したVLSを分析した。その結果、BALBkine-2投与群では、IL-2（i.vまたはs.c）投与群に比べてその流出程度が顕著に低いことを確認した。

【0239】

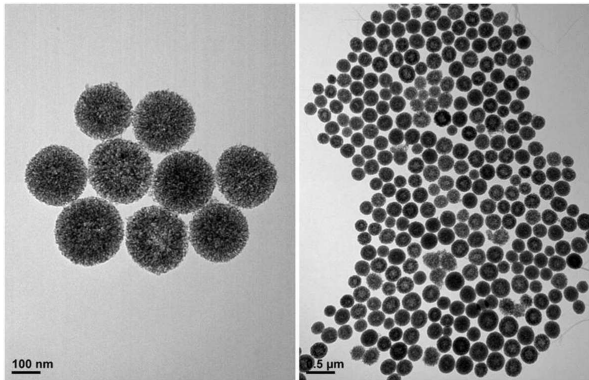
前述した結果は、本発明の多孔性シリカ粒子に抗体またはサイトカインのような免疫反応物質を担持して生体内送達する場合、各抗体またはサイトカインが有する本来の副作用を大幅に軽減することにより、本来の薬理的な治療効果を増大できることを証明する意味な結果であると判断される。

【図面】

【図 1】

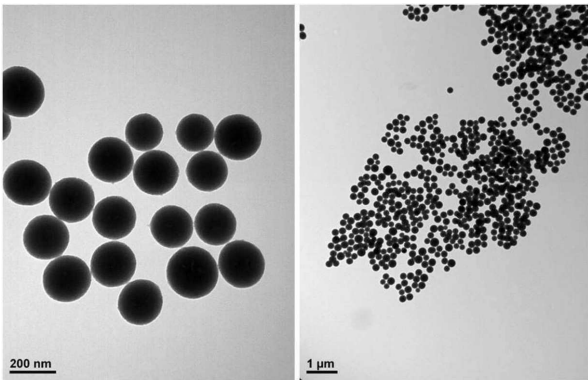


【図 2】

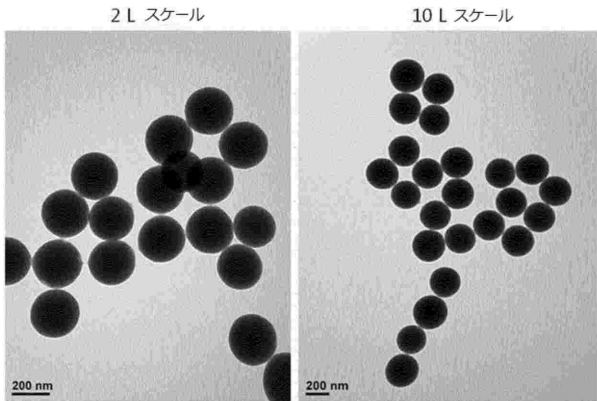


10

【図 3】

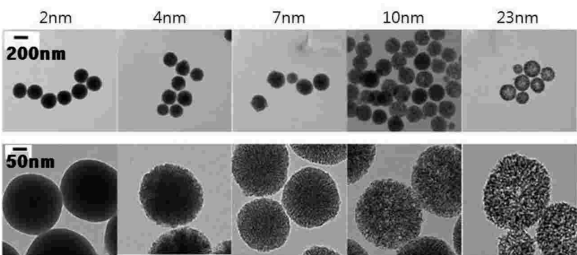


【図 4】

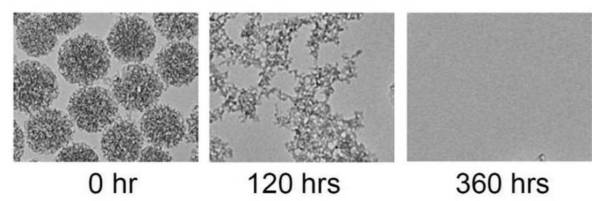


20

【図 5】



【図 6】

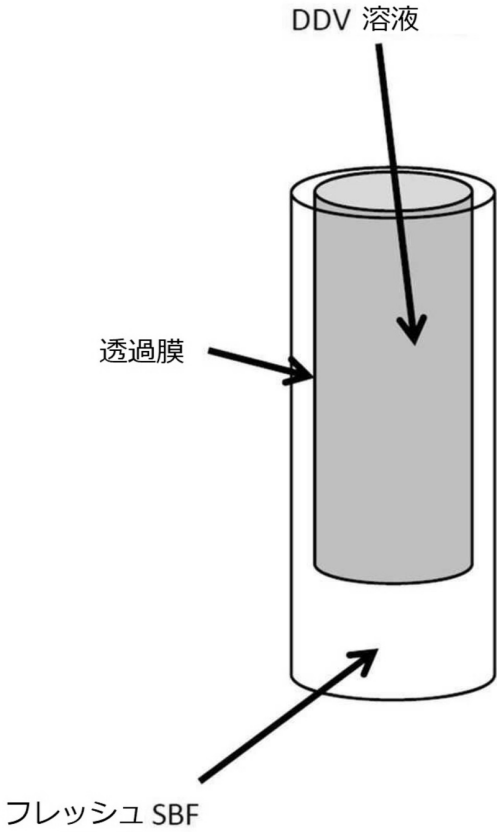


30

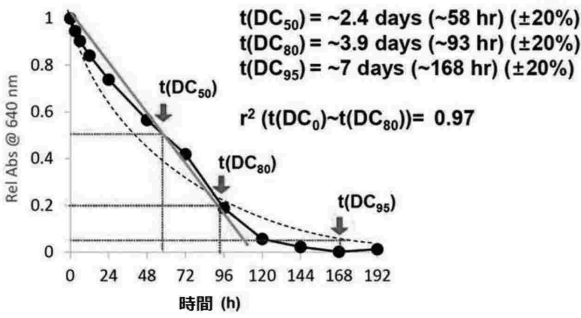
40

50

【図 7】



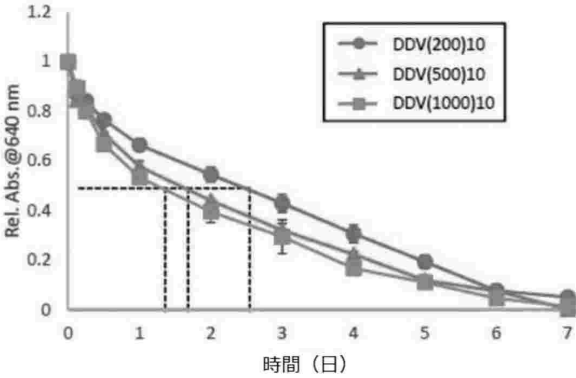
【図 8】



10

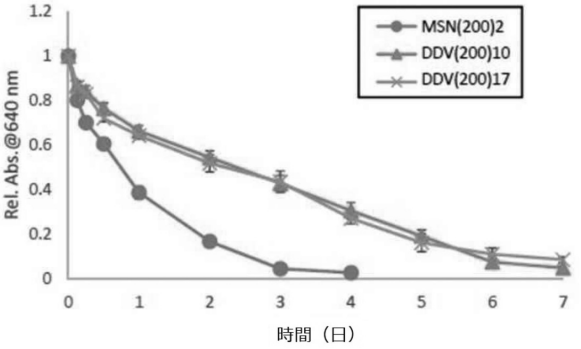
20

【図 9】



サンプル	$t_{50\%}$
DDV(200) ₁₀	57.4 h
DDV(500) ₁₀	37.5 h
DDV(1000) ₁₀	30.0 h

【図 10】



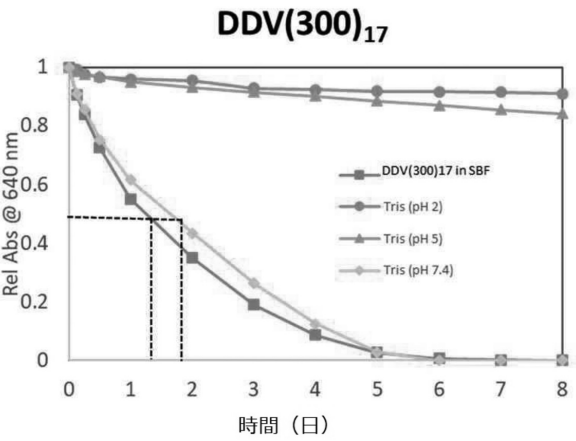
サンプル	$t_{50\%}$
MSN(200) ₂	17.9 h
DDV(200) ₁₀	57.4 h
DDV(200) ₁₇	53.6 h

30

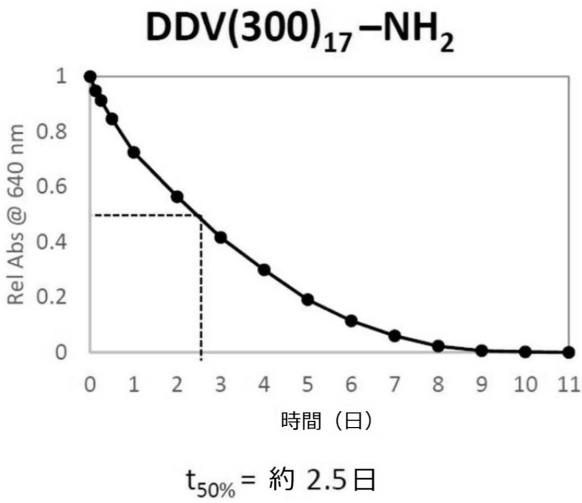
40

50

【図 1 1】

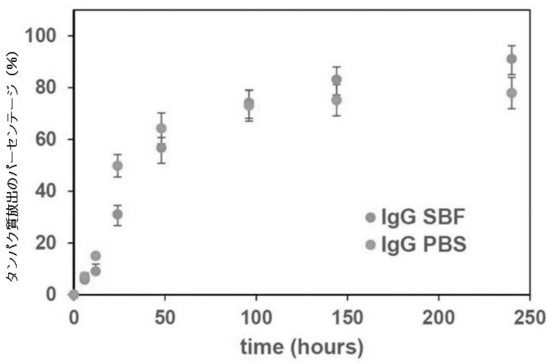


【図 1 2】

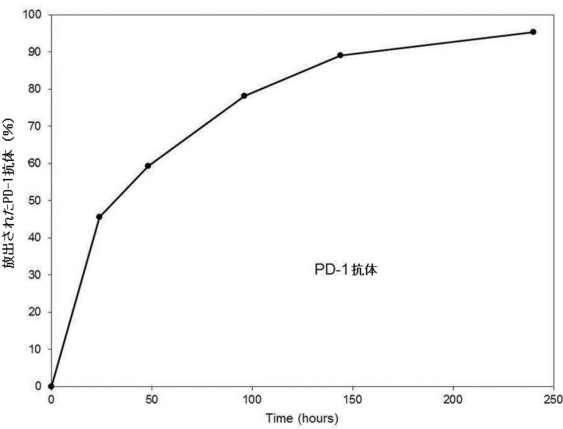


10

【図 1 3】



【図 1 4】



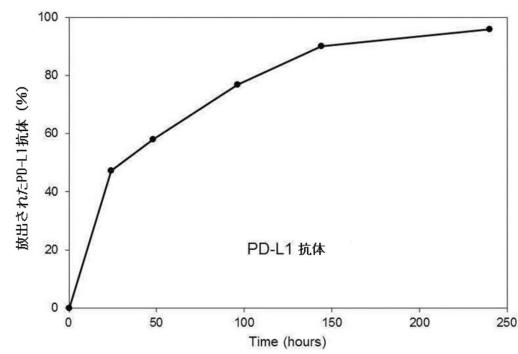
20

30

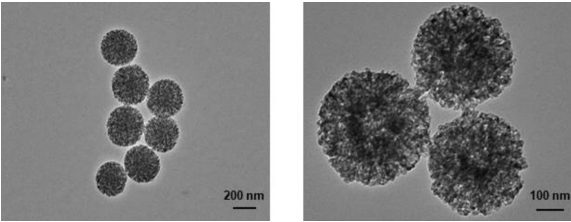
40

50

【図 1 5】

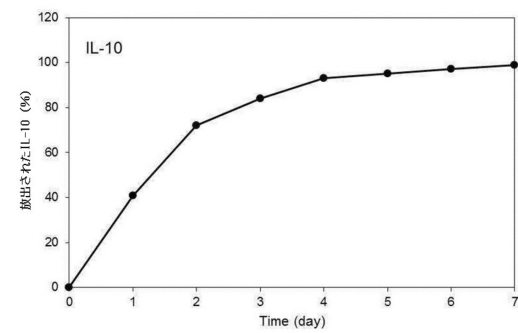


【図 1 6】

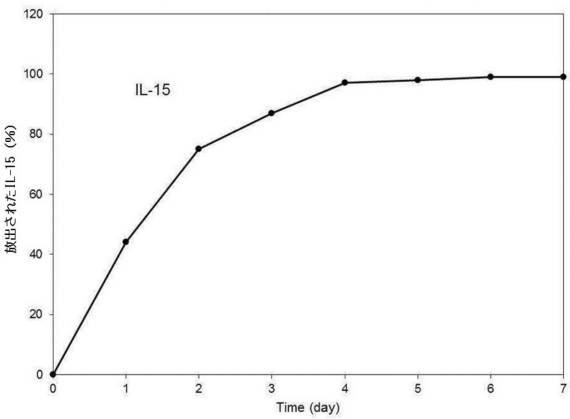


10

【図 1 7】



【図 1 8】



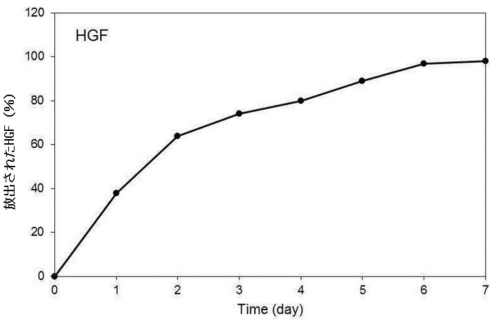
20

30

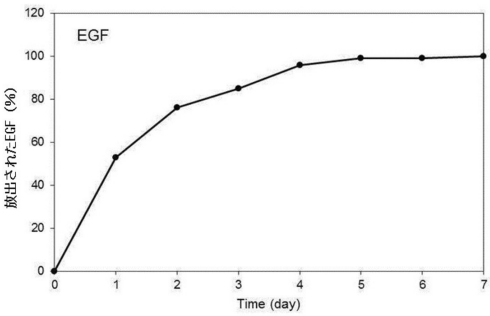
40

50

【図 19】

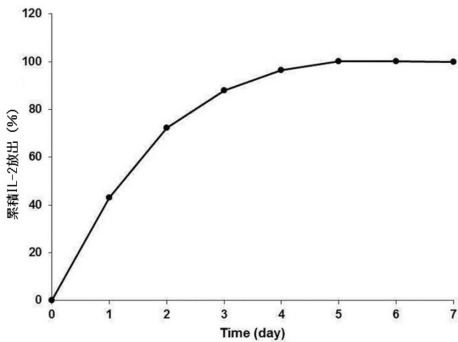


【図 20】

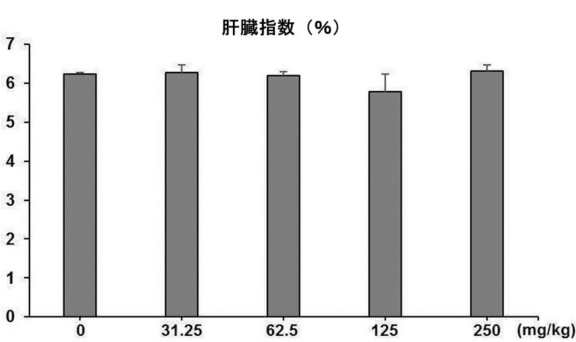


10

【図 21】



【図 22】



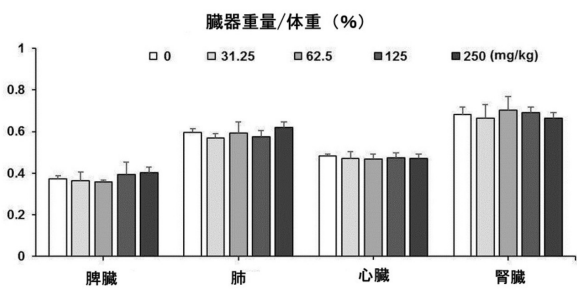
20

30

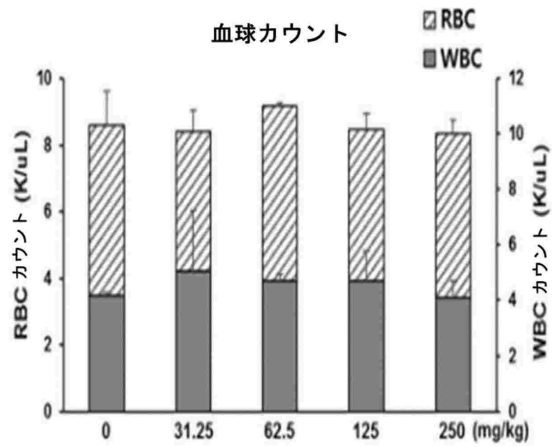
40

50

【図 2 3】

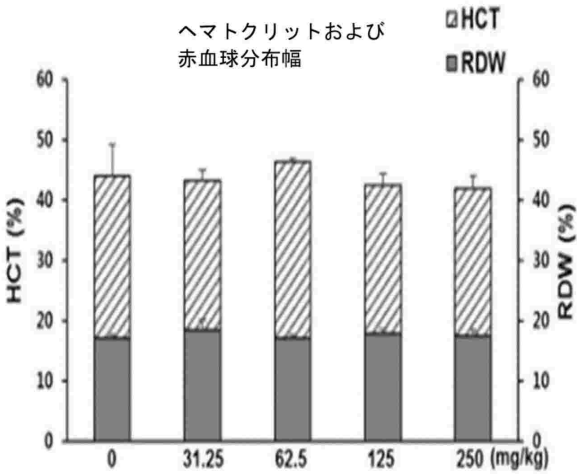


【図 2 4】

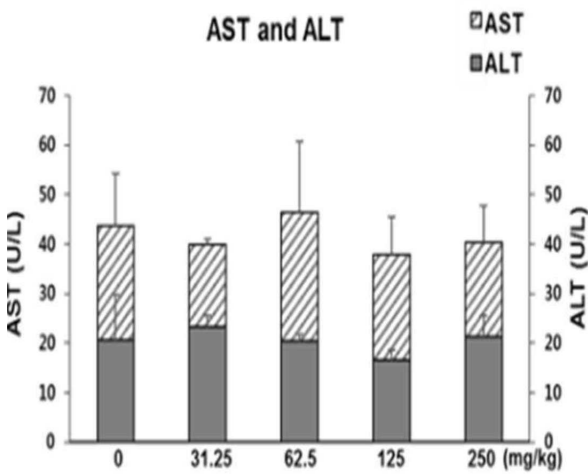


10

【図 2 5】



【図 2 6】



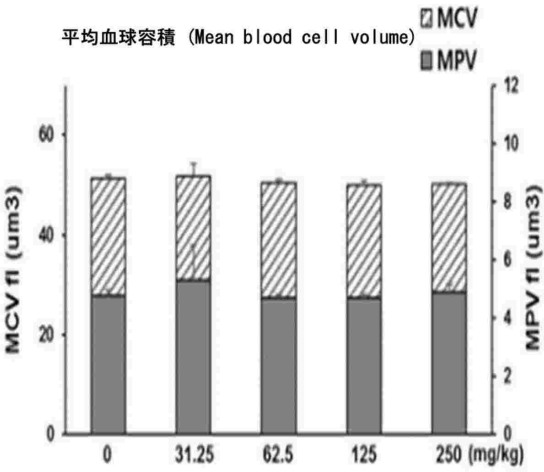
20

30

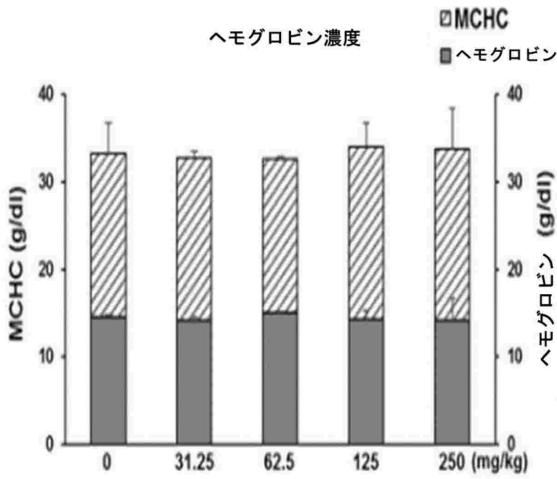
40

50

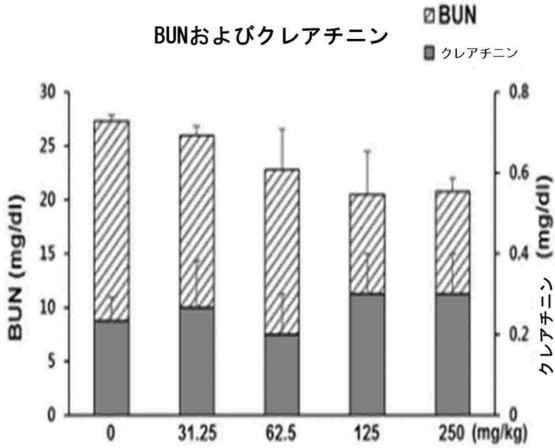
【図 2 7】



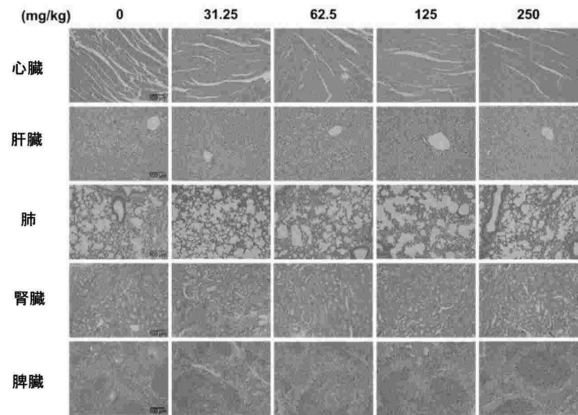
【図 2 8】



【図 2 9】



【図 3 0】



10

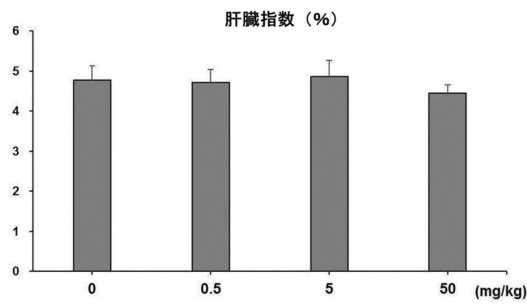
20

30

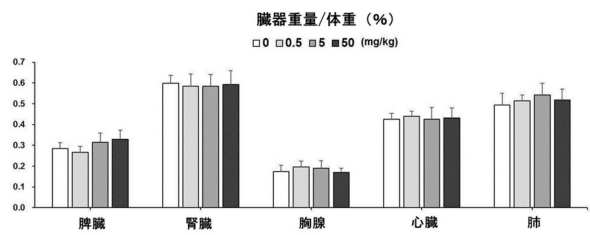
40

50

【図 3 1】

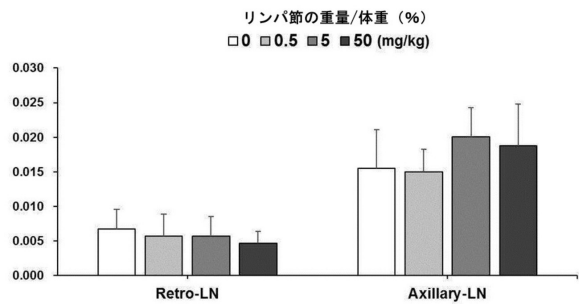


【図 3 2】

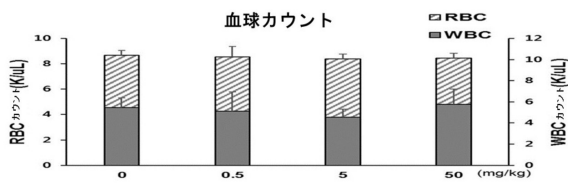


10

【図 3 3】

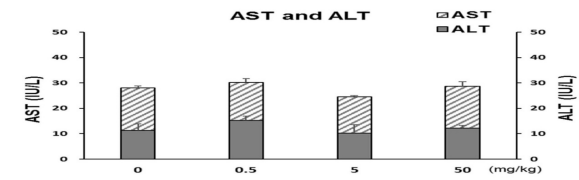


【図 3 4】

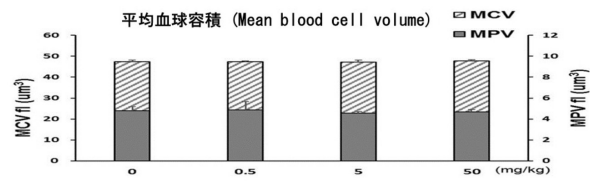


20

【図 3 5】



【図 3 6】

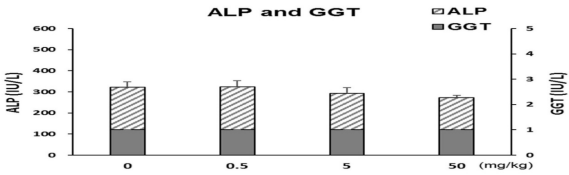


30

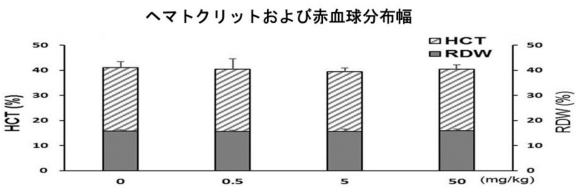
40

50

【図 3 7】

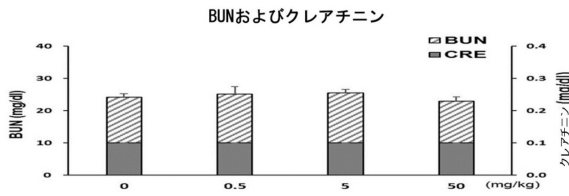


【図 3 8】

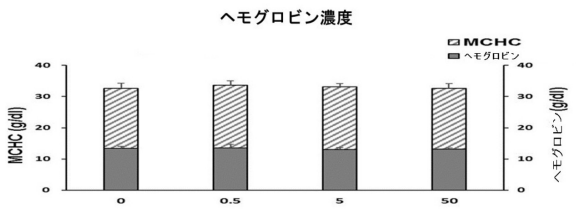


10

【図 3 9】

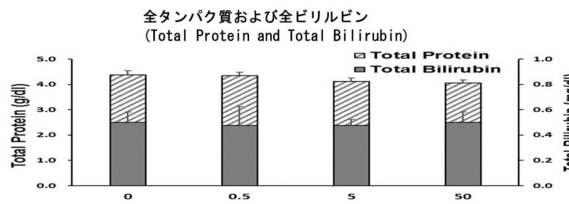


【図 4 0】

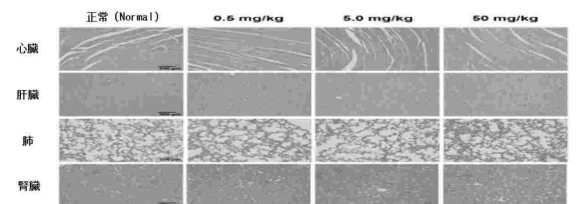


20

【図 4 1】



【図 4 2】

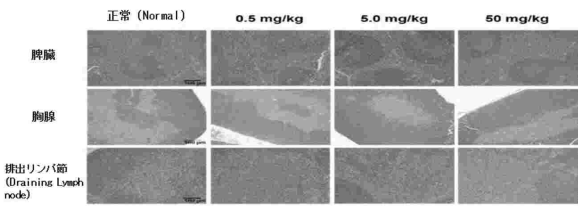


30

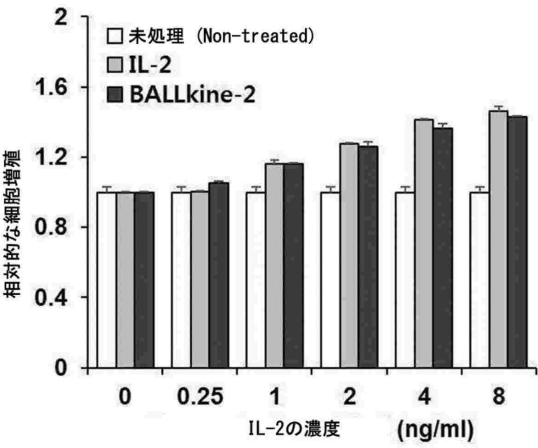
40

50

【図 4 3】

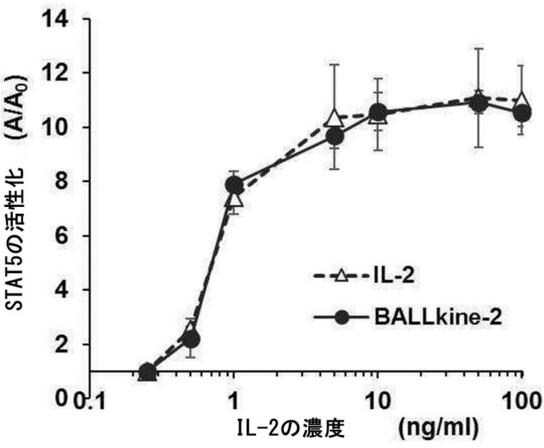


【図 4 4】

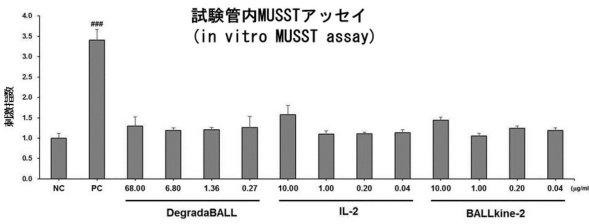


10

【図 4 5】



【図 4 6】



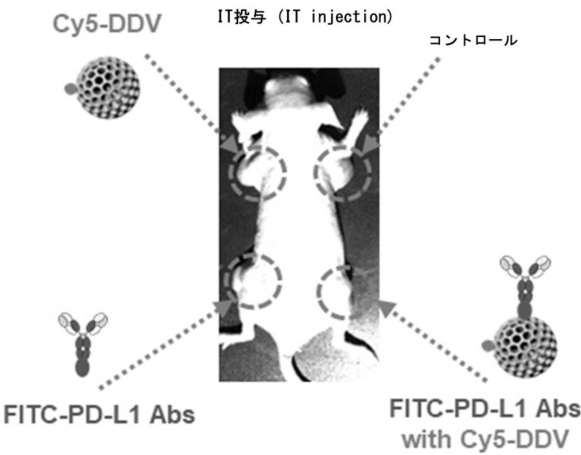
20

30

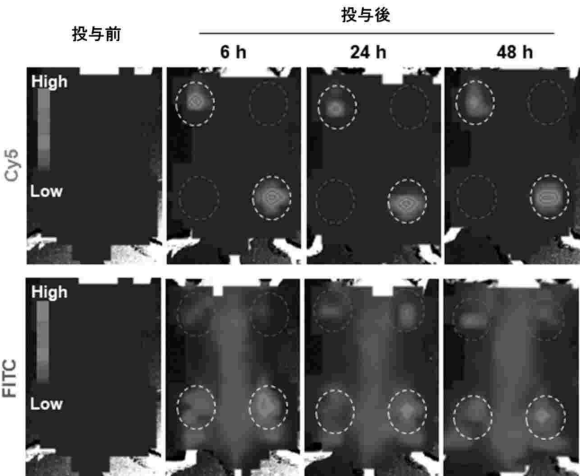
40

50

【図 4 7】

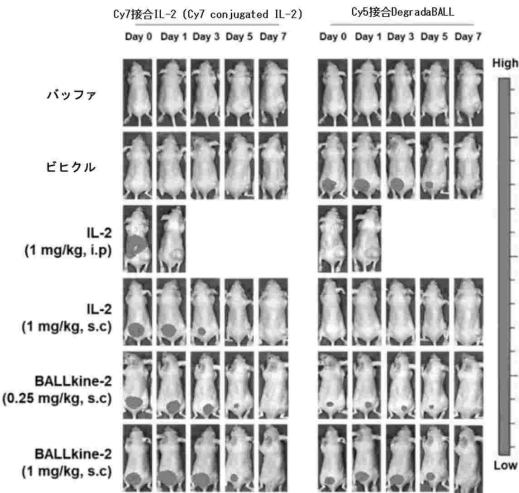


【図 4 8】

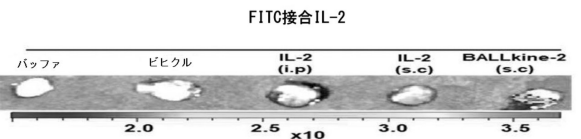


10

【図 4 9】



【図 5 0】



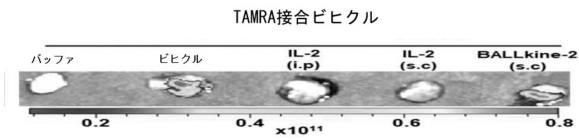
20

30

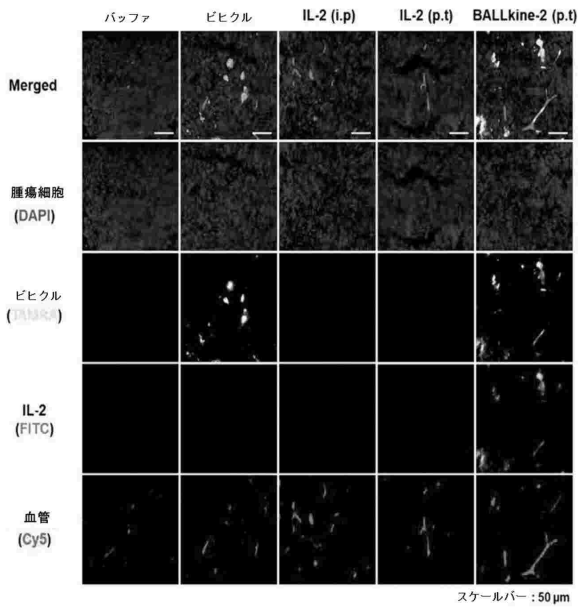
40

50

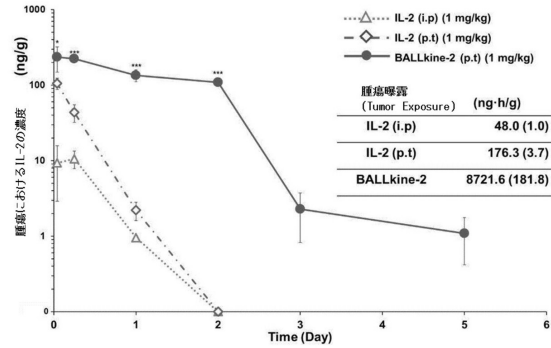
【図 5 1】



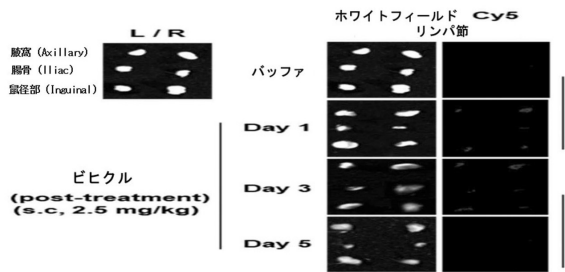
【図 5 2】



【図 5 3】



【図 5 4】



10

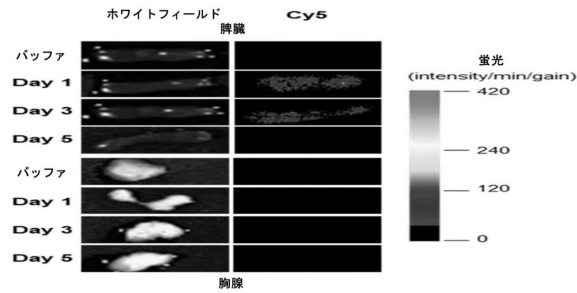
20

30

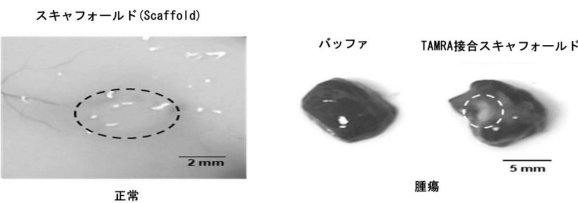
40

50

【図 5 5】

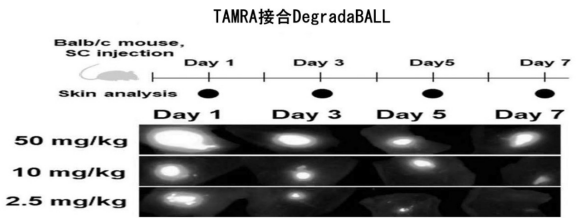


【図 5 6】

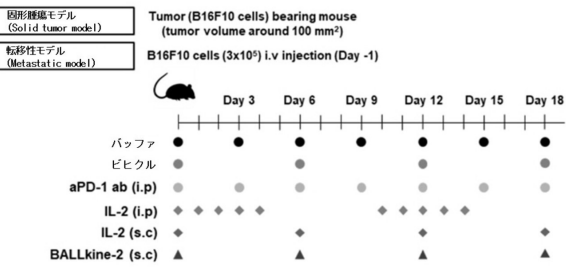


10

【図 5 7】

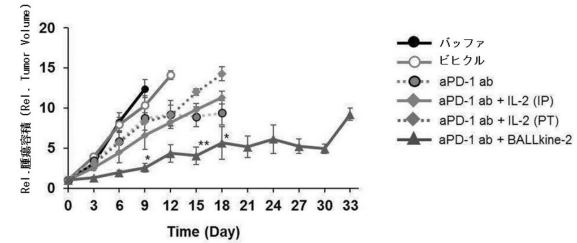


【図 5 8】

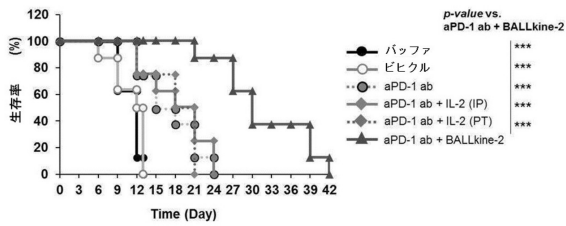


20

【図 5 9】



【図 6 0】

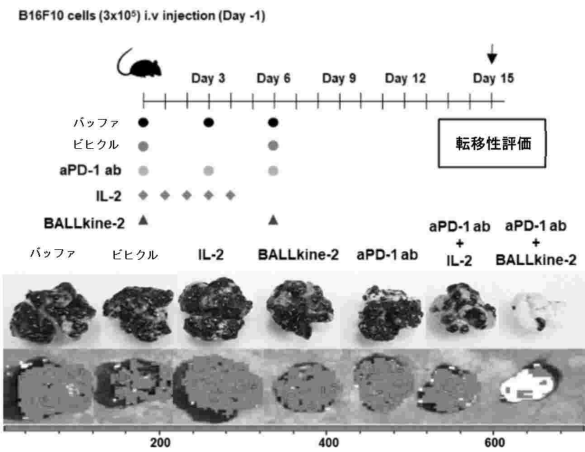


30

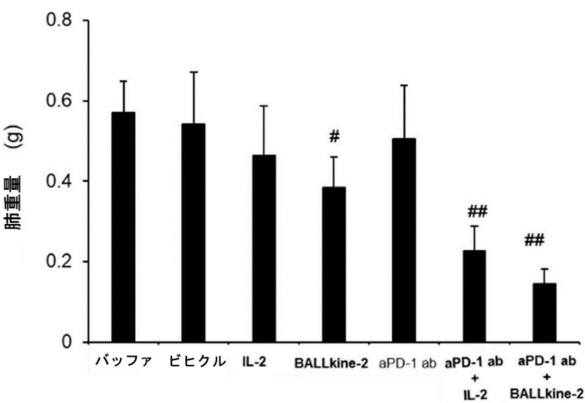
40

50

【図 6 1】

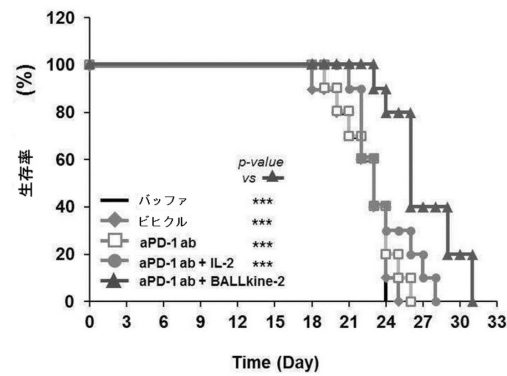


【図 6 2】

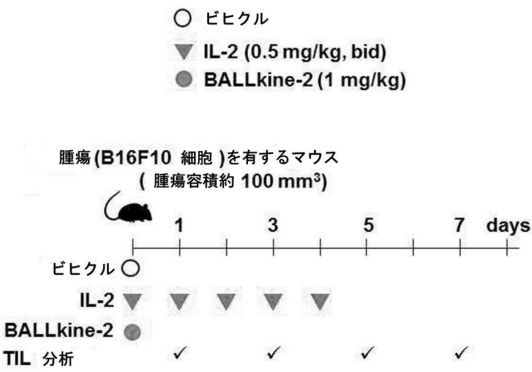


10

【図 6 3】



【図 6 4】



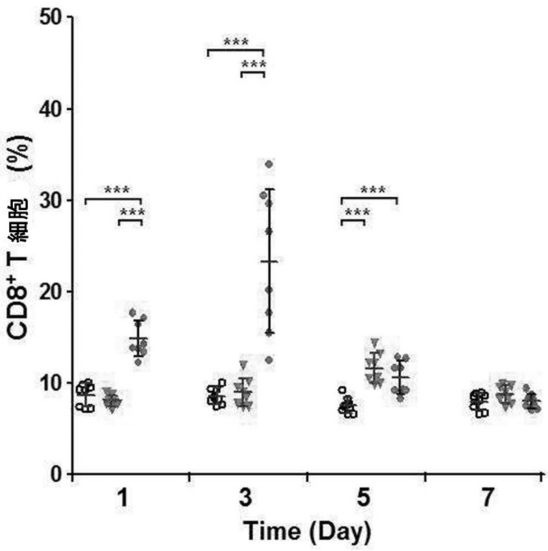
20

30

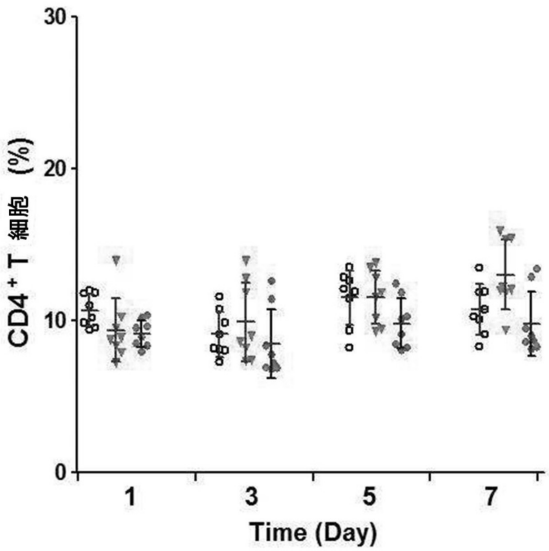
40

50

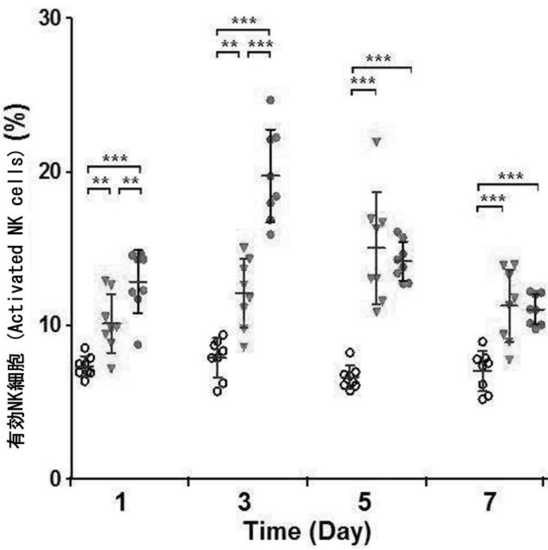
【図 6 5】



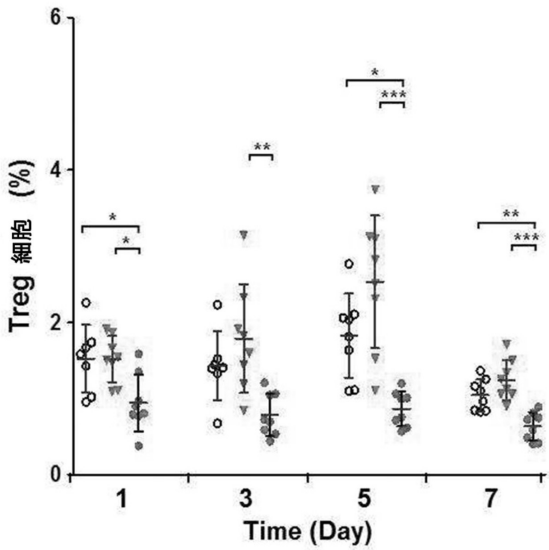
【図 6 6】



【図 6 7】



【図 6 8】



10

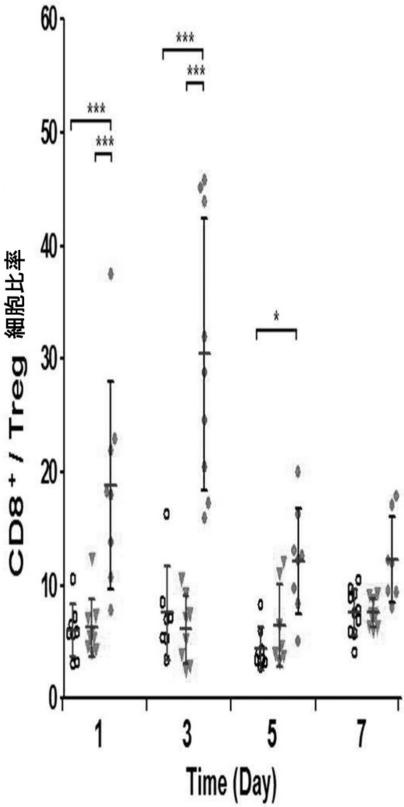
20

30

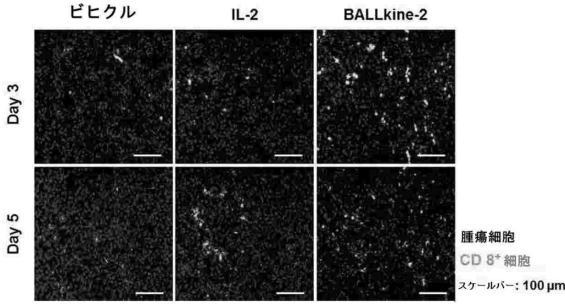
40

50

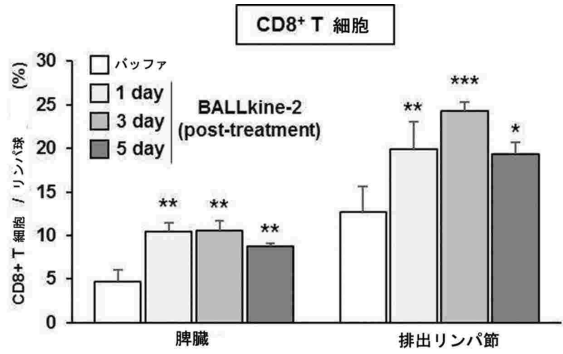
【図 6 9】



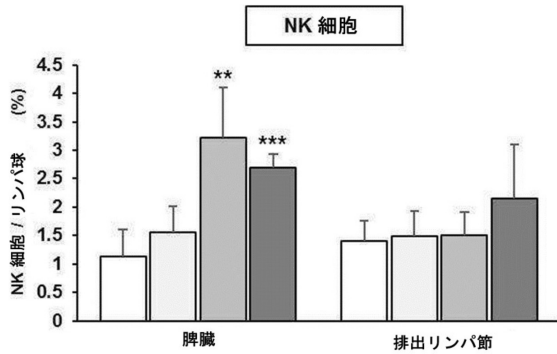
【図 7 0】



【図 7 1】



【図 7 2】



10

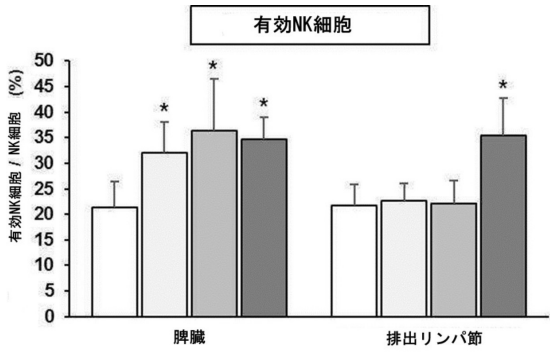
20

30

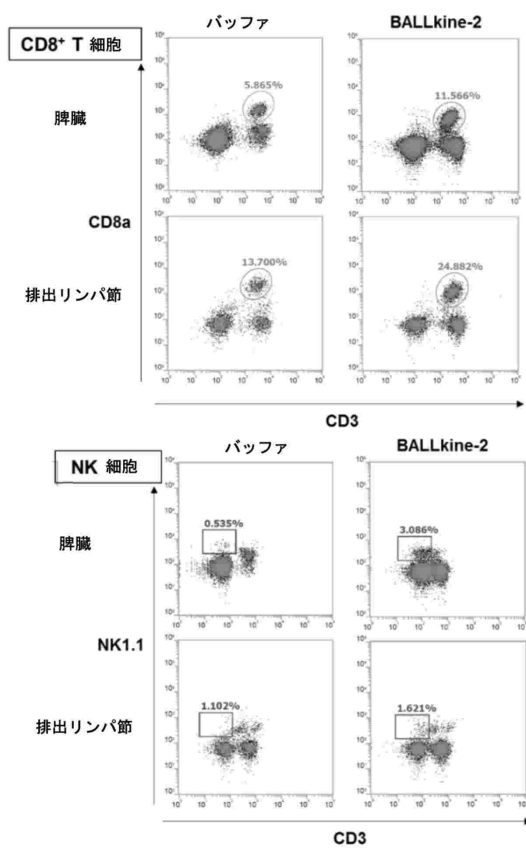
40

50

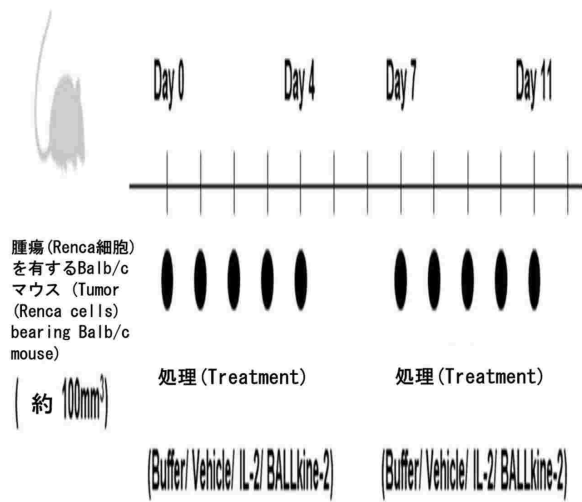
【図 7 3】



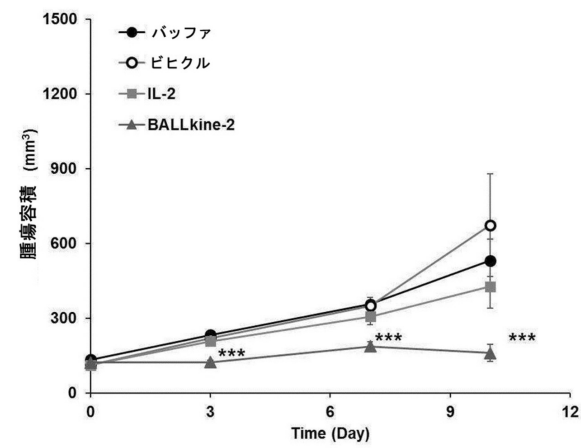
【図 7 4】



【図 7 5】



【図 7 6】



10

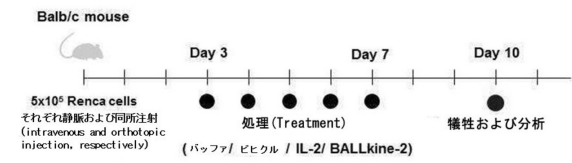
20

30

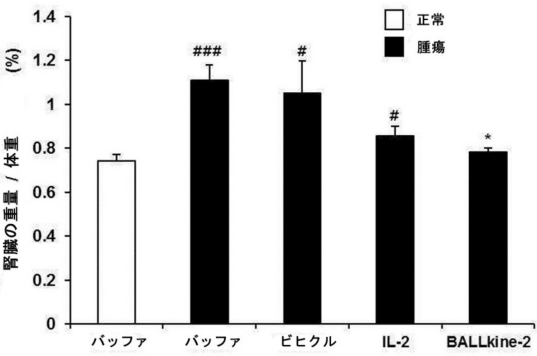
40

50

【図 7 7】

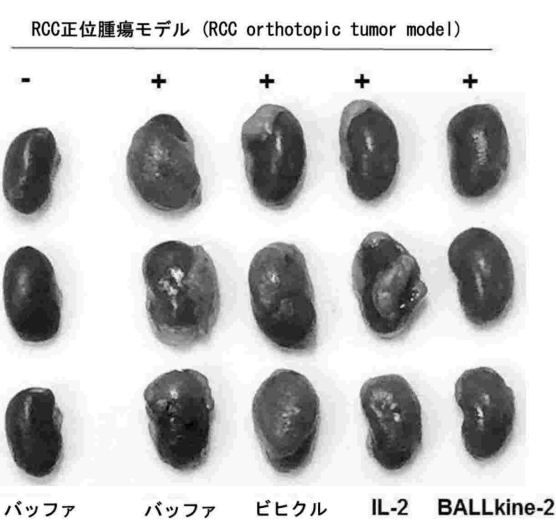


【図 7 8】

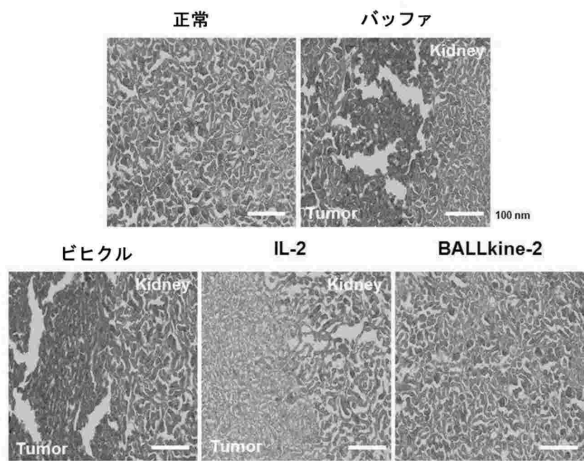


10

【図 7 9】



【図 8 0】



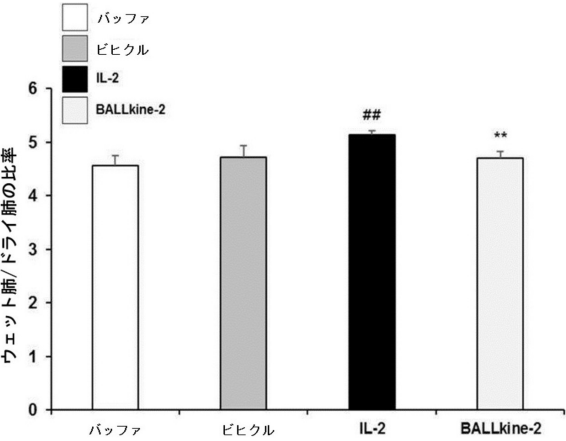
20

30

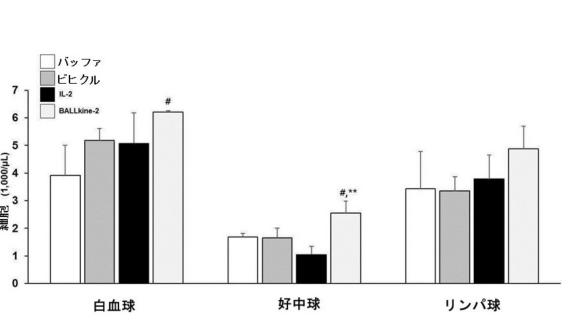
40

50

【図 8 1】

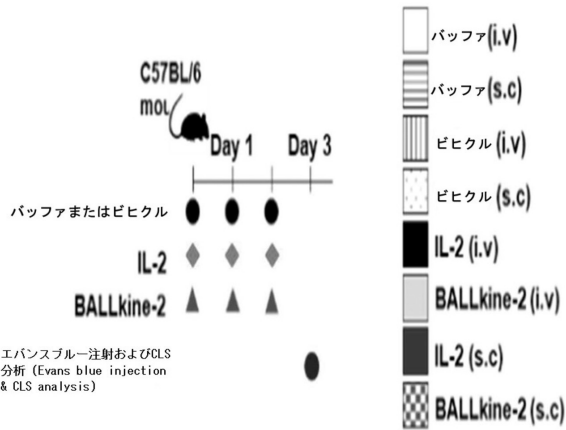


【図 8 2】

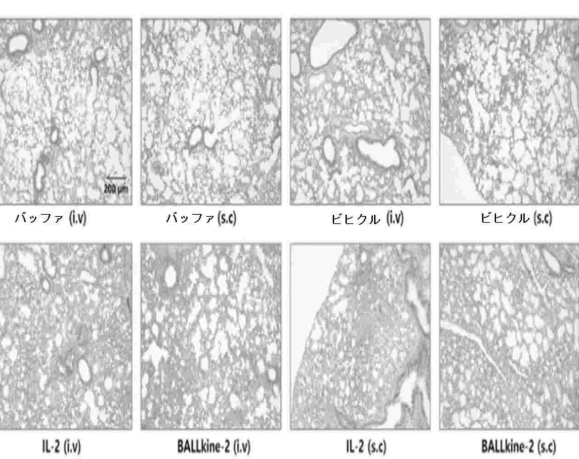


10

【図 8 3】



【図 8 4】



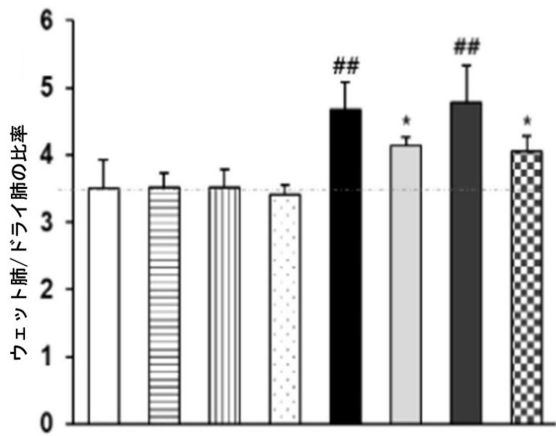
20

30

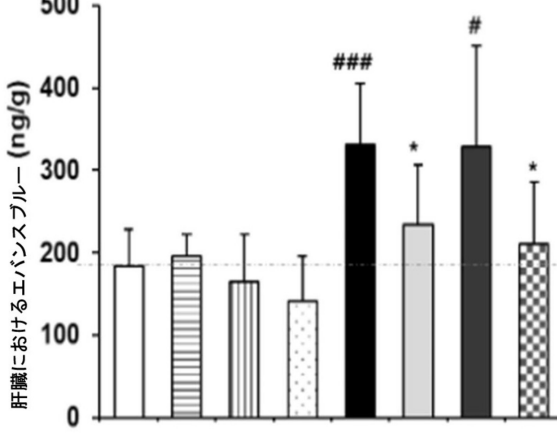
40

50

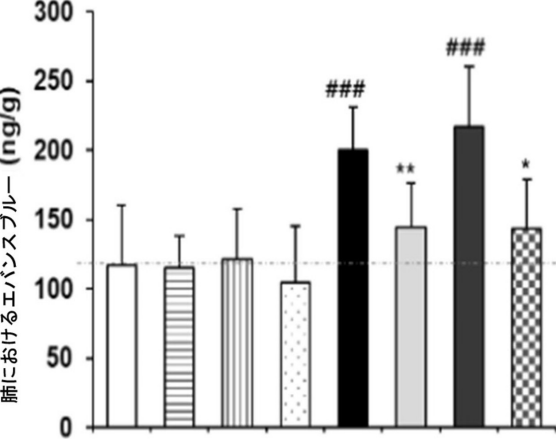
【図 8 5】



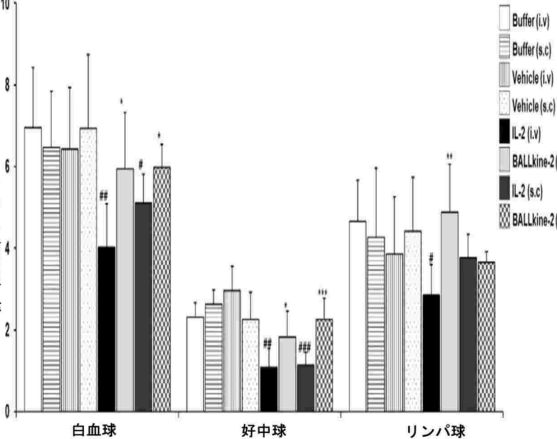
【図 8 6】



【図 8 7】



【図 8 8】



10

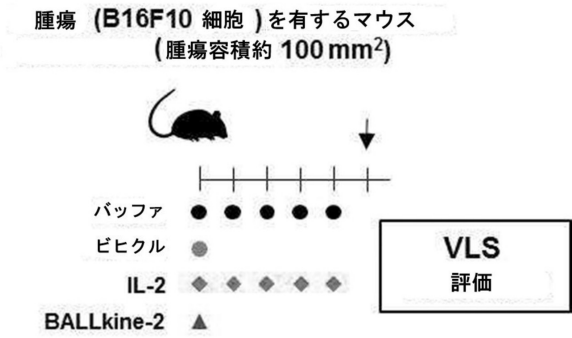
20

30

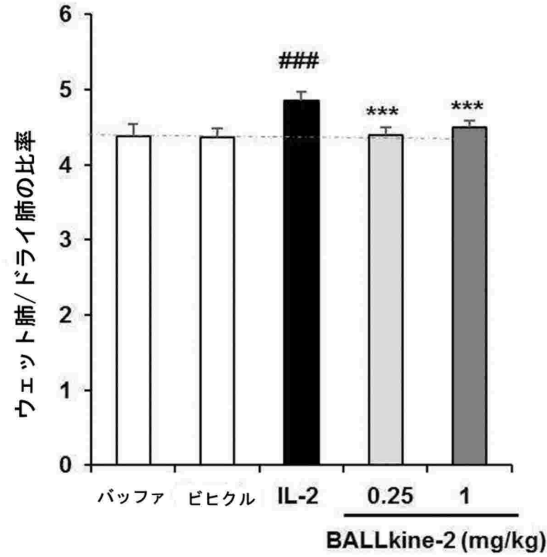
40

50

【図 8 9】

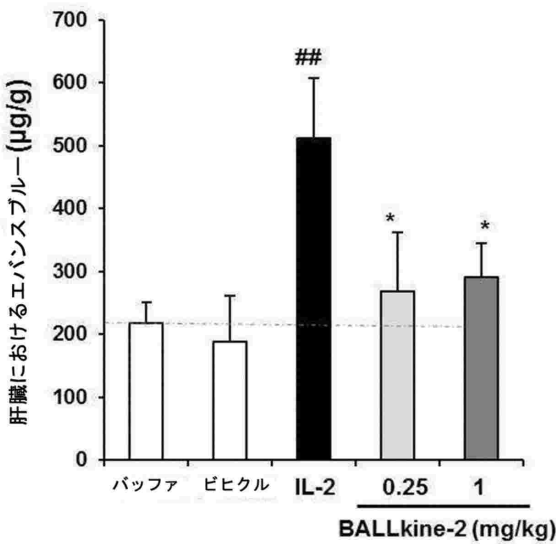


【図 9 0】

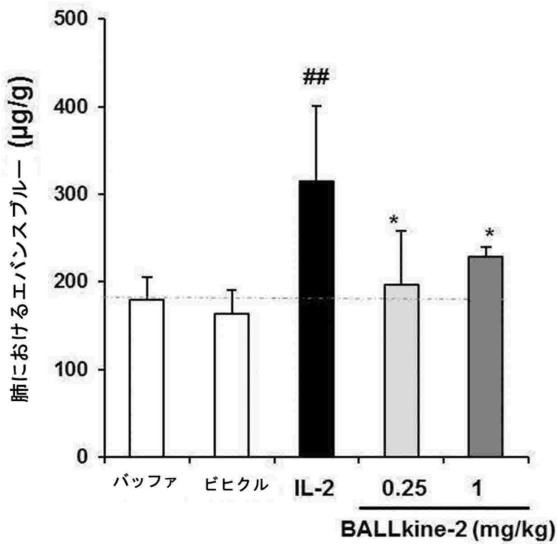


10

【図 9 1】



【図 9 2】



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	38/21	(2006.01)	A 6 1 K	38/21	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 K	47/04	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	F
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	37/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	U
			A 6 1 K	47/04	
			A 6 1 P	35/00	
			A 6 1 P	37/00	

米国(US)

(31)優先権主張番号 10-2019-0065620

(32)優先日 令和1年6月3日(2019.6.3)

(33)優先権主張国・地域又は機関

韓国(KR)

ナクーグ, ソルバトーロ 7ーギル, 16, 301-803 (ボンチョンードン, ナクソ
ンダエ ヒュンダイ ホームタウン)

合議体

審判長 上條 肇

審判官 小暮 道明

審判官 柴原 直司

(56)参考文献

特表2017-529384号公報(JP, A)

国際公開第2014/058014(WO, A1)

国際公開第2016/039218(WO, A1)

国際公開第2013/129093(WO, A1)

NANO LETTERS (2017) vol.17, no.5, p.2747-2756

Acta Pharmaceutica Sinica B (Mar. 2018) vol.8, no.2, p.165-177

資源・素材学会誌 (1991) vol.107, no.9, p.585-591

Journal of the Ceramic Society of Japan (1993) vol.101, no.6, p.707-712

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C07K

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)