

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-523444

(P2014-523444A)

(43) 公表日 平成26年9月11日(2014.9.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 9/127 (2006.01)</b>	A 6 1 K 9/127	4 C 0 7 6
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 N	4 C 0 8 5
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 6
<b>A 6 1 K 31/198 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/198	4 C 2 0 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 37 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2014-521722 (P2014-521722)	(71) 出願人	503128320 エステーシー、 ユーエヌエム S T C. U N M アメリカ合衆国 ニューメキシコ 8 7 1 0 6, アルバカーキ, ユニバーシティ ブルバード サウスイースト 8 0 1 、 スイート 1 0 1
(86) (22) 出願日	平成24年7月18日 (2012. 7. 18)	(74) 代理人	100158920 弁理士 上野 英樹
(85) 翻訳文提出日	平成26年3月20日 (2014. 3. 20)	(72) 発明者	ゼイネルデン, リーマ アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 5 4 5 シュルーズベリー レイク スト リート 4 3 1
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/047133		
(87) 国際公開番号	W02013/012891		
(87) 国際公開日	平成25年1月24日 (2013. 1. 24)		
(31) 優先権主張番号	61/509, 251		
(32) 優先日	平成23年7月19日 (2011. 7. 19)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 癌の炎症性環境に基づいて治療用積載物を放出する、腹腔内投与されるナノ担体

## (57) 【要約】

一実施形態において、本発明は、腹腔内の癌部位において治療用積載物を特異的に放出するナノ担体組成物の新規設計を提供する。このナノ担体は腹腔内投与され、複数の多孔性ナノ粒子を含む。多孔性ナノ粒子は、( a ) 1つ以上の薬理活性剤を単独で積載するか、又は造影剤と組み合わせて積載してセラノスティクス(治療診断)的価値を提供し、( b ) 癌の環境中で生成した活性酸素種との接触によって破裂する脂質二重層によって被包され、そしてそれを担持する。別の実施形態では、本発明は、本明細書に記載のナノ担体を含む治療方法及び医薬組成物を提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

複数の多孔性ナノ粒子を含むナノ担体組成物であって、前記多孔性ナノ粒子が、(a) 1つ以上の薬理活性剤を積載し、(b) 活性酸素種との接触によって破裂する脂質二重層によって被包され、そしてそれを担持する、ナノ担体組成物。

## 【請求項 2】

腹腔内投与に適用される、請求項 1 に記載のナノ担体組成物。

## 【請求項 3】

治療対象の癌又は腫瘍への直接投与に適用される、請求項 1 に記載のナノ担体組成物。

## 【請求項 4】

前記多孔性ナノ粒子は、シリカ、生分解性ポリマー、ゾルゲル、金属、及び金属酸化物からなる群から選択される1つ以上の組成物からなる、請求項 1 に記載のナノ担体組成物。

## 【請求項 5】

前記脂質二重層は、オゾン又は活性酸素種と接触した際に最大限の破裂を起こす、請求項 1 又は 2 に記載のナノ担体組成物。

## 【請求項 6】

(a) 前記 1つ以上の薬理活性剤は、少なくとも1つの抗癌剤を含み、

(b) 前記抗癌剤の約 10% ~ 約 20% 未満が、活性酸素種の非存在下で前記多孔性ナノ粒子から放出され、

(c) 活性酸素種との接触の結果としての前記脂質二重層の破裂によって、前記多孔性ナノ粒子は、5% (w/v) トリトン X - 100 を用いて前記脂質二重層を溶解させた場合に放出される抗癌剤量の約 60% ~ 約 80% におおよそ等しい抗癌剤量を放出する、

請求項 1 に記載のナノ担体組成物。

## 【請求項 7】

前記多孔性ナノ粒子は、約 1 ~ 約 5 マイクロメートルの間の直径を有する多孔性シリカナノ粒子である、請求項 1 に記載のナノ担体組成物。

## 【請求項 8】

前記脂質二重層は、リン脂質及びコレステロールからなる群から選択される1つ以上の脂質からなる、請求項 1 に記載のナノ担体組成物。

## 【請求項 9】

前記脂質二重層は、1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DMPC)、1, 2 - ジオレオイル - 3 - トリメチルアンモニウムプロパン (DOTAP)、1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (POPC)、卵 PC、及び脂質混合物からなる群から選択される1つ以上の脂質からなり、前記脂質混合物は、約 40 ~ 60 重量% の1つ以上の不飽和ホスファチジルコリン、炭素長 14 を有し不飽和結合を有さない DMPC [14 : 0]、1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DPPC) [16 : 0]、1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DSPC) [18 : 0]、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DOPC) [18 : 1 (9 - Cis)]、POPC [16 : 0 - 18 : 1]、及び DOTAP [18 : 1] を包含する、請求項 1 に記載のナノ担体組成物。

## 【請求項 10】

(a) 前記脂質二重層は、(1) 卵 PC と (2) 1つ以上のリン脂質との混合物からなり、前記リン脂質は、1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DMPC)、1, 2 - ジオレオイル - 3 - トリメチルアンモニウムプロパン (DOTAP)、1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (POPC)、及び脂質混合物からなる群から選択され、前記脂質混合物は、1つ以上の不飽和リン脂質、好ましくは不飽和ホスファチジルコリン、炭素長 14 を有し不飽和結合を有さない DMPC [14 : 0]、1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (D

10

20

30

40

50

PPC) [16:0]、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC) [18:0]、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DOPC) [18:1(9-Cis)]、POPC [16:0-18:1]、及びDOTAP [18:1]を包含し、

(b) 上記混合物中の前記卵PCのモル濃度は、前記脂質二重層の約40%~約60%の間であり、

(c) 前記1つ以上のリン脂質のモル濃度は、前記脂質二重層の約40%~約60%の間である、

請求項1に記載のナノ担体組成物。

【請求項11】

前記多孔性ナノ粒子は、約500nm未満の有効平均粒子サイズを有する、請求項1に記載のナノ担体組成物。

【請求項12】

前記多孔性ナノ粒子は、結晶相、アモルファス相、準結晶相、準アモルファス相、又はそれらの混在で存在する、請求項1に記載のナノ担体組成物。

【請求項13】

前記多孔性ナノ粒子は、メソ多孔性シリカナノ粒子又はコアシェルナノ粒子である、請求項1に記載のナノ担体組成物。

【請求項14】

前記多孔性ナノ粒子は、脂肪族ポリエステル、ポリ乳酸(PLA)、ポリグリコール酸(PGA)、乳酸とグリコール酸とのコポリマー(PLGA)、ポリカプロラクトン(PCL)、ポリ酸無水物、ポリオルトエステル、ポリウレタン、ポリ酪酸、ポリ吉草酸、ポリラクチド-co-カプロラクトン、アルギン酸塩及びその他の多糖、コラーゲン及びその化学誘導体、アルブミン、ゼイン、プロラミン、親水性蛋白質、コポリマー、並びにそれらの混合物からなる群から選択される1つ以上の組成物を含む生分解性ポリマーナノ粒子である、請求項1に記載のナノ担体組成物。

【請求項15】

前記多孔性ナノ粒子は、水存在下で有機溶媒と金属アルコキシドとを加えることによって形成されるゾルゲル混合物であり、前記金属アルコキシドの金属は、Ti、Zr、Sn、B、Al、Y、Au、Ag及びそれらの混合物からなる群から選択される、請求項1に記載のナノ担体組成物。

【請求項16】

前記多孔性ナノ粒子は、水存在下において有機溶媒とSiアルコキシドとを加えることによって形成されるゾルゲル混合物からなる、請求項1に記載のナノ担体組成物。

【請求項17】

前記多孔性ナノ粒子はそれぞれ、本質的にシリカを含まないコア表面を有するコアと、前記コア表面に結合するシェルとを含み、前記コアは、酸化物、炭化物、硫化物、窒化物、リン化物、ホウ酸化物、ハロゲン化物、セレン化物、テルル化物、酸化タンタル、酸化鉄、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される遷移金属化合物を含む、請求項1に記載のナノ担体組成物。

【請求項18】

前記脂質二重層は、リン脂質、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルジエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴ脂質、及びエトキシ化ステロール、並びにそれらの混合物からなる群から選択される1つ以上の組成物からなる、請求項1に記載のナノ担体組成物。

【請求項19】

(a) 前記リン脂質はレシチンであり、

(b) 前記ホスファチジルイノシトールは、大豆、アブラナ、綿実、卵、及びそれらの混合物から得られたものであり、

(c) 前記スフィンゴ脂質は、セラミド、セレブロシド、スフィンゴシン、及びスフィ

10

20

30

40

50

ンゴミエリン、並びにそれらの混合物からなる群から選択され、

(d) 前記エトキシ化ステロールは、フィトステロール、ポリエチレングリコール - 5 - 大豆ステロール、及びポリエチレングリコール - 5 葉種ステロールからなる群から選択される、

請求項 18 に記載のナノ担体組成物。

【請求項 20】

前記フィトステロールは、シトステロール、カンペステロール及びスティグマステロールの組成物のうちの少なくとも 2 つからなる混合物を含む、請求項 17 に記載のナノ担体組成物。

【請求項 21】

前記脂質二重層は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルエタノールアミン、リゾホスファチジルイノシトール、及びリゾホスファチジルイノシトールからなる群から選択される 1 つ以上のホスファチジル基からなる、請求項 1 に記載のナノ担体組成物。

【請求項 22】

前記脂質二重層は、モノアシル又はジアシルホスホグリセリドから選択されるリン脂質からなる、請求項 1 に記載のナノ担体組成物。

【請求項 23】

前記脂質二重層は、ホスファチジルイノシトール - 3 - リン酸 (PI - 3 - P)、ホスファチジルイノシトール - 4 - リン酸 (PI - 4 - P)、ホスファチジルイノシトール - 5 - リン酸 (PI - 5 - P)、ホスファチジルイノシトール - 3, 4 - ニリン酸 (PI - 3, 4 - P2)、ホスファチジルイノシトール - 3, 5 - ニリン酸 (PI - 3, 5 - P2)、ホスファチジルイノシトール - 4, 5 - ニリン酸 (PI - 4, 5 - P2)、ホスファチジルイノシトール - 3, 4, 5 - 三リン酸 (PI - 3, 4, 5 - P3)、リゾホスファチジルイノシトール - 3 - リン酸 (LPI - 3 - P)、リゾホスファチジルイノシトール - 4 - リン酸 (LPI - 4 - P)、リゾホスファチジルイノシトール - 5 - リン酸 (LPI - 5 - P)、リゾホスファチジルイノシトール - 3, 4 - ニリン酸 (LPI - 3, 4 - P2)、リゾホスファチジルイノシトール - 3, 5 - ニリン酸 (LPI - 3, 5 - P2)、リゾホスファチジルイノシトール - 4, 5 - ニリン酸 (LPI - 4, 5 - P2)、リゾホスファチジルイノシトール - 3, 4, 5 - 三リン酸 (LPI - 3, 4, 5 - P3)、ホスファチジルイノシトール (PI)、及びリゾホスファチジルイノシトール (LPI) からなる群から選択される 1 つ以上のホスホイノシチドからなる、請求項 1 に記載のナノ担体組成物。

【請求項 24】

前記脂質二重層は、ポリエチレングリコール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 (PEG - DSPE)、ポリエチレングリコール誘導体化セラミド (PEG - CER)、水添大豆ホスファチジルコリン (HSPC)、卵ホスファチジルコリン (EPC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルグリセロール (PG)、ホスファチジルイノシトール (PI)、モノシアロガングリオシド、スフィンゴミエリン (SPM)、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)、ジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC)、及びジミリストイルホスファチジルグリセロール (DMPG) からなる群から選択される 1 つ以上のリン脂質からなる、請求項 1 に記載のナノ担体組成物。

【請求項 25】

前記 1 つ以上の薬理活性剤は、ポリエチレングリコール (PEG)、代謝拮抗剤、トポイソメラーゼ I 及び II の阻害剤、アルキル化剤、微小管阻害剤、低分子阻害剤、バイオ治療薬及びモノクローナル抗体、アドリアマイシン、アルデスロイキン、アレムツズマブ、アリトレチノイン、アロプリノール、アルトレタミン、アミフォスチン、アナストロゾール、三酸化ヒ素、アスパラギナーゼ、BCG 生菌、ベキサロテンカプセル、ベキサロテ

10

20

30

40

50

ンゲル、ブレオマイシン、静注用ブスルファン、経口用ブスルファン、カルステロン、カペシタピン、カルボプラチン、カルムスチン、ポリフェプロサン 20 インプラントを用いたカルムスチン、セレコキシブ、クロラムブシル、シスプラチン、クラドリピン、シクロホスファミド、シタラピン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、アクチノマイシン D、ダルベポエチン、ダウノルピシン、ダウノマイシン、デニロイキンジフチトックス、デクスラゾキサソ、ドセタキセル、ドキシソルピシン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エリオット B 液、エピルピシン、エポエチン、エストラムスチン、リン酸エトボシド、エトボシド (VP-16)、エキセメスタン、フィルグラスチム、フロクスウリジン (動注用)、フルダラビン、フルオロウラシル (5-FU)、フルベストラント、ゲムシタピン、ゲムツズマブオゾガマイシン、ゴセレリン酢酸塩、ヒドロキシ尿素、イブリツモマブチウキセタン、イダルピシン、イホスファミド、イマチニブメシル酸塩、インターフェロン - 2 a、インターフェロン - 2 b、イリノテカン、レトロゾール、ロイコボリン、レバミゾール、ロムスチン (CCNU)、メクロレタミン (ナイトロジェンマスタード)、酢酸メゲストロール、メルファラン (L-PAM)、メルカプトプリン (6-MP)、メスナ、メトトレキセート、メトキサレン、マイトマイシン C、ミトタン、ミトキサントロン、ナンドロロンフェンプロピオナート、ノフェツモマブ (Nofetumomab)、LOddC、オプレルベキン、オキサリプラチン、パクリタキセル、パミドロネート、ペガデマーゼ、ペガスパルガーゼ、ペグフィルグラスチム、ペントスタチン、ピボプロマン、プリカマイシン、ミトラマイシン、ポルフィマーナトリウム、プロカルバジン、キナクリン、ラスブリカーゼ、リツキシマブ、サルグラモスチム、ストレプトゾシン、テルブビジン (LDT)、タルク、タモキシフェン、テモゾロミド、テニボシド (VM-26)、テストラクトン、チオグアニン (6-TG)、チオテパ、トポテカン、トレミフェン、トシツモマブ、トラスツズマブ、トレチノイン (ATRA)、ウラシルマスタード、バルルピシン、バルトルシタピン (モノバル LDC)、ピンブラスチン、ピノレルピン、ゾレドロネート、及びそれらの混合物で機能化された、ドキシソルピシンを積載したリポソームからなる群から選択される抗癌剤を含む、請求項 1 に記載のナノ担体組成物。

10

20

【請求項 26】

前記多孔性ナノ粒子は、シリカ、生分解性ポリマー、ゾルゲル、金属、及び金属酸化物からなる群から選択される 1 つ以上の組成物を含む、請求項 25 に記載のナノ担体組成物。

30

【請求項 27】

前記 1 つ以上の薬理活性剤は、ドキシソルピシン、メルファラン、ベバシズマブ、ダクチノマイシン、シクロホスファミド、アミフォスチン、エトボシド、ゲムシタピン、アルトレタミン、トポテカン、シクロホスファミド、タキサン系化学療法剤及び白金系化学療法剤からなる群から選択される、請求項 1 に記載のナノ担体組成物。

【請求項 28】

前記ナノ担体の前記脂質二重層は、オゾン ( $O_3$ )、過酸化水素、次亜塩素酸イオン、ヒドロキシルラジカル、スーパーオキシドアニオン ( $O_2^-$ )、及びペルオキシ亜硝酸からなる群から選択される活性酸素種 (ROS) との接触によって破裂される、請求項 1 に記載のナノ担体組成物。

40

【請求項 29】

腹腔内投与に適用される、請求項 1 から 28 のいずれかに記載のナノ担体組成物。

【請求項 30】

治療される対象の癌又は腫瘍への直接注入に適用される、請求項 1 から 28 のいずれかに記載のナノ担体組成物。

【請求項 31】

請求項 1 から 30 のいずれかに記載のナノ担体組成物の薬学的な有効量を治療対象に投与することを含む、癌に罹患した治療対象の治療方法。

【請求項 32】

(a) 前記治療対象が腹膜癌に罹患しており、前記ナノ担体組成物は、前記治療対象の

50

子宮に腹腔内投与され、

(b) 前記ナノ担体は、シリカナノ粒子、生分解性ポリマー、ゾルゲル、金属を主成分とするナノ粒子及び酸化物を主成分とするナノ粒子からなる群から選択される1つ以上の組成物を含むナノ粒子を含み、

(c) 前記投与に続いて、前記ナノ担体の前記脂質二重層は、オゾン( $O_3$ )、過酸化水素、次亜塩素酸イオン、ヒドロキシルラジカル、スーパーオキシドアニオン( $O_2^-$ )、及びペルオキシ亜硝酸からなる群から選択される活性酸素種(ROS)との接触によって破裂し、

(d) 前記ナノ担体の前記1つ以上の薬理活性剤は、ドキシソルピシン、メルファラン、ペバシズマブ、ダクチノマイシン、シクロホスファミド、アミフォスチン、エトポシド、ゲムシタピン、アルトレタミン、トポテカン、シクロホスファミド、タキサン系化学療法剤及び白金系化学療法剤からなる群から選択される抗癌剤を含む、

10

請求項31に記載の方法。

【請求項33】

前記治療対象は、前記ナノ担体組成物と一緒に1つ以上の更なる抗癌剤若しくは抗癌治療を併用して投与又は施される、請求項31又は32に記載の方法。

【請求項34】

前記更なる抗癌剤若しくは前記抗癌治療及び前記ナノ担体組成物は、同時に前記治療対象に投与又は施される、請求項33に記載の方法。

【請求項35】

20

前記ナノ担体組成物は、癌又は腫瘍へ直接投与される、請求項31、33、34のいずれかに記載の方法。

【請求項36】

腹膜癌に罹患した治療対象の治療方法であって、前記方法はナノ担体組成物の薬学的な有効量を前記治療対象に腹腔内投与することを含み、前記ナノ担体組成物は複数の多孔性シリカナノ粒子を含み、前記多孔性シリカナノ粒子は、

(a) ドキシソルピシン、メルファラン、ペバシズマブ、ダクチノマイシン、シクロホスファミド、アミフォスチン、エトポシド、ゲムシタピン、アルトレタミン、トポテカン、シクロホスファミド、タキサン系化学療法剤又は白金系化学療法剤からなる群から選択される1つ以上の薬理活性剤を積載し、

30

(b) リン脂質、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴ脂質、及びエトキシ化ステロール、並びにそれらの混合物からなる群から選択される1つ以上の組成物からなる脂質二重層によって被包され、そしてそれを担持して前記ナノ担体を形成し、

前記投与に続いて、前記ナノ担体の前記脂質二重層は、オゾン( $O_3$ )、過酸化水素、次亜塩素酸イオン、ヒドロキシルラジカル、スーパーオキシドアニオン( $O_2^-$ )、及びペルオキシ亜硝酸からなる群から選択される活性酸素種(ROS)との接触によってインピボで破裂する、方法。

【請求項37】

(a) (1) 1つ以上の薬理活性剤を積載し、かつ(2) 活性酸素種との接触によってインピボで破裂する脂質二重層によって被包され、そしてそれを担持する、複数の多孔性ナノ粒子を含む腹腔内投与されるナノ担体組成物と、

40

(b) 少なくとも1つの薬学的に許容される希釈剤又は薬学的に許容される賦形剤と、を含む医薬組成物。

【請求項38】

(b) 前記ナノ担体組成物は、シリカ、生分解性ポリマー、ゾルゲル、金属、及び金属酸化物からなる群から選択される1つ以上の組成物を含むナノ粒子を含み、

(c) 前記多孔性ナノ粒子の前記脂質二重層は、オゾン( $O_3$ )、過酸化水素、次亜塩素酸イオン、ヒドロキシルラジカル、スーパーオキシドアニオン( $O_2^-$ )、及びペルオキシ亜硝酸からなる群から選択される活性酸素種(ROS)との接触によってインピボで破

50

裂し、

(d) 前記多孔性ナノ粒子の前記1つ以上の薬理活性剤が、ドキソルビシン、メルファラン、ペバシズマブ、ダクチノマイシン、シクロホスファミド、アミフォスチン、エトボシド、ゲムシタピン、アルトレタミン、トポテカン、シクロホスファミド、タキサン系化学療法剤及び白金系化学療法剤からなる群から選択される抗癌剤を含む、

請求項37に記載の医薬組成物。

【請求項39】

治療対象における癌の治療のための医薬の製造における請求項1～30、37、38のいずれかに記載のナノ担体組成物の使用。

【請求項40】

前記医薬は腹腔内投与に適用される、請求項39に記載の使用。

【請求項41】

前記医薬は、治療対象の癌又は腫瘍への直接投与に適用される、請求項39に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願)

本出願は、2011年7月19日出願の米国仮出願第61/509,251号、発明の名称「腹膜癌の治療のための新規ナノテクノロジープラットフォーム (Novel Nanotechnology Platform for Treatment of Peritoneal Cancers)」に基づく優先権を主張し、その全内容を参照によりここに援用する。

【0002】

一実施形態において、本発明は、腹腔内の癌部位において治療用積載物を特異的に放出するナノ担体の新規設計を提供する。このナノ担体は腹腔内投与され、複数の多孔性ナノ粒子を含む。多孔性ナノ粒子は、(a) 1つ以上の薬理活性剤を単独で積載するか、又は造影剤と組み合わせて積載してセラノスティクス(治療診断)的価値を提供し、(b) 癌の環境中で生成した活性酸素種との接触によって破裂する脂質二重層によって被包され、そしてそれを担持する。

【0003】

別の実施形態では、本発明は、本明細書に記載のナノ担体を用いる治療方法及び医薬組成物を提供する。

【背景技術】

【0004】

卵巣癌(OVCA)は婦人科悪性腫瘍による主な死亡原因であり、米国において2010年に約21,880件の推定される新たな患者、及び2010年に推定13,850件の死亡をもたらしている(参考文献30)。大多数のOVCAは、卵巣表面上皮(OSE)から生じる(参考文献31)。臨床的には多くの場合に卵巣及び網に影響し、びまん性で多病巣性の腹腔内転移や悪性腹水症を伴う(参考文献1)。OVCAの転移(図1)には、原発性OVCAから単細胞(SC)又はスフェロイド若しくは細胞凝集塊(MCA)として細胞が脱落し、その後、腹膜の内側表面を覆う中皮細胞と相互作用し、近傍の骨盤内臓器に播種することが含まれる(参考文献9、32、33)。大多数のOVCA患者(約75%)は、播種性の腹腔内疾患(ステージIV)が余りに遅く診断され、この遅い診断のせいで低い生存率を有する(参考文献34)。治療のために、患者は通常は腫瘍縮小手術の後に、カルボプラチンとパクリタキセルとの標準的な第一選択の化学療法剤併用レジメンの投与を受ける(参考文献2、5、35)。それでもやはり、患者の大多数は結局は治療耐性を招き、OVCAの再発を起こす(参考文献35、36)。

【0005】

排卵及びOVCAの両方における炎症の役割が、証拠によって指摘されている(参考文献13、37)。OVCAの腹膜微小環境中の炎症は、OVCA微小環境中への免疫細胞

10

20

30

40

50

浸潤によってO V C Aの進行に寄与するようである(参考文献13、14)。O V C Aにおいては、活性化したマクロファージ及びT細胞、並びにより少数ではあるがナチュラルキラー細胞、B細胞、及びマスト細胞を含む腹水中に白血球が存在することが報告されている(参考文献14)。それらの活性化した免疫細胞は活性酸素種を生成し、O V C Aの進行を促進するサイトカイン、血管新生因子、及び成長因子を分泌する(参考文献38)。

#### 【0006】

抗体(その由来や抗原特異性に関係なく)及びT細胞受容体は、一重項分子酸素の存在下において水酸化によるオゾン(オゾンの化学的特徴を有する分子)の生成を触媒し(図2)、細菌に対する毒性を引き起こす(参考文献16、18、39、40)。インビボでは、この反応は、一重項分子酸素の発生源である活性化した免疫細胞によって起こる(参考文献16、17)。試験管内においては、光増感剤を添加して試験管内容物を近紫外線照射に暴露すること、即ち光化学源を用いることによって一重項分子酸素が生成する(参考文献16、18)。しかし、インビボでは、活性化した好中球によって一重項分子酸素が生成することが知られている(参考文献25、26)。例えばオゾンは、インビボにおいてアルブミンと抗アルブミン抗体とを用いたラットの皮内注射によって生ずる逆受動アルサス反応で作られ、その炎症部においてオゾンが検出される(参考文献16)。さらにウェントワース(Wentworth)らは、オゾンは、インビトロにおいて活性化した白血球の存在下でコレステロールのオゾン分解生成物としてのアテロナルの生成を伴ってアテローム斑で作られるのに加え、インビボにおいてはアテローム斑において作られることを報告している(参考文献17)。一方、コレステロールのオゾン分解の特有の生成物として検出されたアテロナルは、オゾンに加え、一重項酸素によっても生成し得るので、その研究には議論がある(参考文献41、42)。しかし、ウェントワースらは自身の最初の研究における実例を再確認しており、得られた生成物の比が、検出されたアテロナルの生成において一重項酸素よりもオゾンの関与を示唆するというを明らかにしている(参考文献43、44)。

#### 【0007】

オゾン及びオゾン化物は、リン脂質二重層並びに細胞の破裂及び溶解を引き起こすことが知られている(参考文献19-21)。さらに活性酸素種及びオゾンは、球面又は平面のプラットフォームに担持された脂質二重層中の有機分子及びリン脂質の光分解を引き起こす(参考文献22-24)。これらの二重層がリボソームの一部であるか、又は多孔性球体に担持されている場合には、それらの破裂は例えば化学療法剤などのそれらの内容物の漏出をもたらす。

#### 【0008】

要約すると、他臓器への転移及び播種が腹膜腔を経て起こるため、卵巣癌(O V C A)は腹膜疾患である(参考文献1)。従って化学療法剤の腹腔内(IP)投与は、腹膜に限局されて、限局性及び播種性のO V C Aを治療する。近年、単独又は経静脈化学療法と併用された場合のO V C AのIP化学療法の有効性が実証された(参考文献2-5)。これは恐らく、例えば癌の幹細胞やスフェロイドなどの化学療法剤耐性に関与する数種類の腹膜O V C A細胞への薬剤の直接的な送達による(参考文献6-12)。

#### 【0009】

活性酸素種を生成したり腫瘍の進行を促す因子を分泌したりする免疫細胞の浸潤ゆえに、O V C Aの腹膜微小環境は炎症性である(参考文献13、14)。最近の報告では、炎症性疾患ではインビボにおいてオゾンが生成することを示している(参考文献15-17)。このオゾン生成は、抗体の酸化触媒活性の直接的結果である(参考文献16、18)。抗体は、その由来や抗原特異性に関係なく、水酸化経路によるオゾン及び過酸化物の生成を触媒する(参考文献16、18)。抗体がこの反応を媒介するために唯一必要とするものは、一重項分子酸素の発生源であり、インビトロにおいては光増感剤の存在下において近紫外線照射によって提供される(参考文献16、18)。インビボにおいてこの反応が起こるために唯一必要なものは、水酸化経路を媒介してオゾンを生成するのに加えて一

10

20

30

40

50



重項分子酸素の発生源でもある活性化した免疫細胞の存在である（参考文献 16、17）。

【0010】

オゾン及びその他の活性酸素種（ROS）は、リン脂質二重層の過酸化及びフリーラジカルの生成を引き起こし、リン脂質からなる脂質二重層の分解をもたらすことが知られている（参考文献 19 - 24）。これらの二重層がリポソームの一部であるか、又は多孔性のナノ球体に担持される場合には、ROSによるその破裂は例えば化学療法剤などのその内容物の漏出をもたらす。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0011】

従って、（1）OVCAなどの炎症性疾患において活性化した免疫細胞によって媒介されるROS生成を利用し（参考文献 16、17、25、26）、（2）ROSが脂質二重層を、遊離しているか又は球体若しくは平面のプラットフォームに担持されているかに関わらず破裂することを可能にし（参考文献 19 - 24）、（3）化学療法剤を捕捉する能力を有する多孔性ナノ粒子上に担持された堅牢な脂質二重層膜組立体を用いる（参考文献 27 - 29）ことができる、OVCAのIP治療のためのナノ担体の必要性が存在する。

【課題を解決するための手段】

【0012】

一実施形態において、本発明は、その治療用積載物を腹腔内の癌部位に特異的に放出するナノ担体の新規設計を提供する。このナノ担体は、組成物として癌や腫瘍などの作用部位に直接投与され、好ましくは腹腔内投与され、そして複数の多孔性ナノ粒子を含む。多孔性ナノ粒子は、（a）1つ以上の薬理活性剤を単独で積載するか、又は造影剤と組み合わせて積載してセラノスティクスの価値を提供し、（b）癌の環境中で生成した活性酸素種との接触によって破裂する脂質二重層によって被包され、そしてそれを担持する。

20

【0013】

好ましくは、（1）ナノ粒子は、シリカ、生分解性ポリマー、ゾルゲル、金属、及び金属酸化物からなる群から選択される1つ以上の組成物からなり、（2）脂質二重層は、少なくとも1つの活性酸素種と接触した際に最大限の破裂を起こす。

【0014】

30

別の好ましい一実施形態においては、

- （a）ナノ担体は少なくとも1つの抗癌剤を含み、
- （b）抗癌剤の約10%～約20%未満、又は約11%～約19%未満、又は約12%～約18%未満、又は約13%～約17%未満、又は約14%～約16%未満、又は約15%未満が、活性酸素種の非存在下で多孔性ナノ粒子から放出され、
- （c）活性酸素種との接触の結果としての脂質二重層の破裂によって、多孔性ナノ粒子は、5%（w/v）トリトンX-100を用いて脂質二重層を溶解させた場合に放出される抗癌剤量の約60%～約80%、又は約65%～約75%、又は約66%～約74%、又は約67%～約73%、又は約68%～約72%、又は約69%～約71%、又は約70%におおよそ等しい抗癌剤量を放出する。

40

【0015】

別の好ましい実施形態においては、

- （a）ナノ粒子は、シリカ、生分解性ポリマー、ゾルゲル、金属、及び金属酸化物からなる群から選択される組成物からなり、
- （b）ナノ担体は、癌を治療するのに用いられる少なくとも1つの薬理活性剤、例えばドキシソルピシン、メルファラン、ペバシズマブ、ダクチノマイシン、シクロホスファミド、アミフォスチン、エトポシド、ゲムシタピン、アルトレタミン、トポテカン、シクロホスファミド、特にパクリタキセル/タキソールやドセタキソールなどのタキサン系化学療法剤又はカルボプラチンやシスプラチンなどの白金系化学療法剤、及びタキソールからなる群から選択される少なくとも1つの抗癌剤を含み、

50

(c) 脂質二重層は、オゾン ( $O_3$ )、過酸化水素、次亜塩素酸イオン、ヒドロキシルラジカル、スーパーオキシドアニオン ( $O_2^-$ )、及びペルオキシ亜硝酸からなる群から選択される活性酸素種 (ROS) との接触によってインビボで破裂し、

(d) ナノ担体は、治療対象の癌/腫瘍へ直接投与されるか、あるいは好ましくは腹膜癌に罹患した治療対象の腹膜に腹腔内投与される。

【0016】

別の実施形態においては、本発明は癌に罹患した治療対象を治療する方法を提供する。この方法は、本明細書に記載のナノ担体の薬学的な有効量を、治療対象に対して癌/腫瘍の部位などの作用部位に直接投与するか、あるいは好ましくは腹腔内 (IP) に投与することを含む。好ましい一実施形態においては、ナノ担体は、腹膜癌に罹患した治療対象を治療するために投与される。

10

【0017】

さらに別の実施形態においては、本発明は、本明細書に記載のナノ担体を含み、腹腔内注入用に製剤される医薬組成物を提供する。

【0018】

本発明の上記及び他の実施形態は、発明を実施するための形態においてさらに説明される。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】上皮性卵巣癌の発癌に關与するステップを示す。灰色の細胞は、癌幹細胞 (CSC) である。OSE は卵巣表面上皮、SCs は単細胞、MCAs は細胞凝集塊又はスフェロイドである。

20

【図2】一重項酸素及び水を基質とし、オゾン、過酸化水素及び三重項酸素を生成物とし、三酸化二水素の中間生成物がある、抗体及びT細胞受容体によって触媒される水酸化反応の反応式である (参考文献40)。

【図3】ROS感受性ナノ担体をOVCA治療に用いることの意義を示す。ROS感受性ナノ担体は、その内容物を専ら炎症性の腹膜OVCA微小環境に放出し、体循環には放出しない。これは、数種類のOVCA薬剤耐性細胞 (SC、MCA、CSC) を標的にするIP治療を増強し、一方で全身毒性を低減する。

【図4】無細胞系において  $10\mu$  の6-ピオプテリン存在下で紫外線Aの照射を用いて、アミノ酸によって触媒されるオゾン生成を示す。試験管はさらに  $30\mu$  インジゴカルミンも含み、これはオゾンによってイサチンスルホン酸に変換され、イサチンスルホン酸は  $610nm$  の吸光度の減少によって検出される。  $1mM$  の各アミノ酸及び  $5mg/mL$  のウシ血清アルブミン (BSA) (リン酸緩衝液中) を試験した。エラーバーは、3回の反復の標準偏差を示す。

30

【図5】トリプトファン (Trp) によってオゾンを生成するのに紫外線 (UV) A 及び6-ピオプテリン (6BP) の両方が必要であることを示す。  $1mM$  のTrpを試験した。エラーバーは、3回の反復の標準偏差を示す。

【図6】Trp濃度を増大させることによる、オゾン生成の用量反応曲線である。試験濃度は0、10、20、40、80、160、500、1000  $\mu$  のトリプトファンである。高濃度の500  $\mu$  及び  $1mM$  のTrpは、160  $\mu$  と同様の結果を生じたため示していない。エラーバーは、3回の反復の標準偏差を示す。

40

【図7】トリトンX-100によって起こる脂質二重層の破裂を示す。50の公称細孔サイズを有する  $3\mu m$  のシリカ球体を  $5mM$  のフルオレセインと一緒に培養し、次に卵ホスファチジルコリンからなる脂質二重層で被覆した。一部の球体は未処理のままにし、一部は最終濃度5% (w/v) のトリトンX-100 (TX100) で処理した。球体を沈殿させた後の上清の蛍光を検査して、フルオレセインの放出を調査した。

【図8】目的1のための方法を示し、それは試験管内でTrpによって光化学的に生成されるオゾンによる最大限の分解を選択するために、脂質二重層 (SLB) の脂質組成を最適化することを含む。オゾンによるSLBの分解によって、捕捉されたフルオレセイン (

50

緑色の星印)が放出される。シリカの蛍光でのこの減少は、フローサイトメトリーによって検出される。

【図9】酢酸ミリスチン酸ホルボール(PMA)を用いたマクロファージ活性化時の、蛍光色素を用いたROSの検出を示す。

【図10】PMAで活性化した状態でのマクロファージによる種々の脂質二重層の破裂を示す。

【図11】マクロファージが無いときは、培地の存在下で無視できる程度の蛍光増大(培地中にフェノールレッドが存在することの直接的結果)であることを示す。次の条件を適用した。(1)リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中のナノ担体対培地中のナノ担体、(2)室温(RT)での培養対37℃での培養、(3)PMAの存在下及び非存在下。

【図12】種々の卵巣癌細胞における、卵巣癌特異的受容体である葉酸受容体(FR)の発現を示す。上段: RT-PCR(1=OVCA433、2=SKOV-3、3=OVCA420、4=OVCA429、5=OVCA432、6=DOV13、7=OVEA6)である。下段: マウス抗FR(Sig-3619)及び抗マウス-FITCを用いた、SKOV3、OVCA433、及びOVEA6でのFRのフローサイトメトリーである。SKOV-3ではFR蛋白質発現が高いことが、フローサイトメトリーによって確認された。

【図13】FRのノックダウン、及びFR(-)細胞では見られない、FR(+)細胞による葉酸機能化ナノ担体の特異的取り込みの確認を示す。(A)は、FR蛋白質レベルを示すフローサイトメトリーである。(B)は、親細胞株SKOV-3(FR(+))及びFRのノックダウンを発現している細胞(FR(-))の、内部対照として18Sを用いたFRのRT-PCRである。(C、D)は、FR(+)細胞(左側)及びFR(-)細胞(右側)の共焦点顕微鏡法写真であり、FR(-)細胞では見られない、FR(+)細胞による葉酸で機能化されたナノ担体の特異的取り込みを示す。スケールバー=20µm。

【発明を実施するための形態】

【0020】

次の用語は、本明細書において本発明を説明するために用いられる。用語が本明細書において具体的な定義を与えられない場合、その用語は当業者が理解するものと同じ意味を有するものとする。本発明の化合物の1つ以上を用いて治療される病態又は状態について与えられる定義は、当分野で一般的に知られたものとする。

【0021】

本明細書及び添付の特許請求の範囲において用いられる場合、単数(「a」、「an」及び「the」)は、はっきりと明確に1つの指示対象に限定されない限り、複数の指示対象を包含するものとする。従って、例えば単数の「化合物」についての言及は、2つ以上の化合物も包含する。本明細書で用いる場合、用語「含む」及びその文法的な変形は非限定的であることを意図し、リストにおける事項の列挙は、代替可能な他の類似の事項又はリストの事項に追加可能な他の事項を除外しない。

【0022】

分子酸素(二酸素O<sub>2</sub>)は、あらゆる好気性生物の生存に必須である。好気性のエネルギー代謝は酸化的リン酸化に依存し、そのプロセスによって、ミトコンドリアによる電子伝達(多成分NADHデヒドロゲナーゼ酵素複合体による)の酸化還元エネルギーが変換されて、ATPの高エネルギーリン酸結合になる。シトクロムcオキシダーゼは、このミトコンドリア酵素複合体の最終酵素要素であって、O<sub>2</sub>からH<sub>2</sub>Oへの4電子還元を触媒し、O<sub>2</sub>は、シトクロムcオキシダーゼについての最終電子受容体として働く。部分的に還元されたO<sub>2</sub>の高反応性代謝物は、これらの(及びその他の)電子伝達反応中に生成し得る。これらのO<sub>2</sub>代謝物には、それぞれO<sub>2</sub>の1電子還元及び2電子還元によって生成されるスーパーオキシドアニオン(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)及び過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)が含まれる。遷移金属イオンの存在下においては、さらにもっと反応性のヒドロキシルラジカル(OH<sup>·</sup>)が生成され得る。O<sub>2</sub>のこれらの部分的還元代謝物は、分子O<sub>2</sub>と比較してその高反応性ゆえに、

10

20

30

40

50

しばしば「活性酸素種」(ROS)と呼ばれる。

【0023】

「活性酸素種」(ROS)には、限定ではないが、アフナスエフ(Afanas'ev)著「癌における活性酸素種のシグナル伝達：老化との比較(Reactive Oxygen Species Signaling in Cancer: Comparison with Aging)」、エージング・アンド・ディーズ(Aging and Disease)、2011年6月、第2巻(3)、219-230頁に記載の活性酸素種が含まれる。例示の活性酸素種(ROS)には、限定ではないが、オゾン(O<sub>3</sub>)、過酸化水素、次亜塩素酸イオン、ヒドロキシルラジカル、スーパーオキシドアニオン(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)、及びペルオキシ亜硝酸が含まれる。

【0024】

用語「ナノ粒子」は、マルチ粒子(multiparticulate)であって、それに含まれる粒子の「有効平均粒子サイズ」が直径で約2,000nm(2ミクロン)未満であるものを指す。ナノ粒子を含む組成物は、本明細書では「ナノ粒子組成物」という。

【0025】

用語「ナノ粒子」及び「多孔性ナノ粒子」は、本明細書においては交換可能に用いられ、そのような粒子は、結晶相、アモルファス相、準結晶相、準アモルファス相、又はそれらの混在で存在し得る。

【0026】

ナノ粒子は、様々な形状及び断面形状を有することができ、それらは部分的に、その粒子を生成するために用いるプロセスに依存する。一実施形態においては、ナノ粒子は、球体、棒状、筒状、薄片状、繊維状、平板状、ワイヤー状、立方体、又は髟結晶の形態を有することができる。1つのナノ粒子が、前記形態の2つ以上を有する複数の粒子を含んでもよい。一実施形態においては、粒子の断面形状は、円形、楕円形、三角形、長方形、又は多角形の1つ以上であり得る。一実施形態においては、ナノ粒子は、本質的に非球体の粒子からなってもよい。例えば、そのような粒子は3主軸全てが異なる長さを有する楕円形状を有してもよく、又は偏球若しくは扁長の回転楕円であってもよい。非球体のナノ粒子は、形状が薄板状であってもよい。ここで「薄板状」は、1つの軸に沿った最大寸法が他の2軸のそれぞれに沿った最大寸法よりかなり小さい粒子を指す。非球体のナノ粒子は、角錐若しくは円錐の錐台又は細長い棒の形状を有してもよい。一実施形態においては、ナノ粒子は形状が不規則であってもよい。一実施形態においては、複数のナノ粒子が本質的に球体のナノ粒子からなってもよい。

【0027】

マルチ粒子(例えば多孔性ナノ粒子)を説明するために本明細書において用いられる用語「有効平均粒子サイズ」は、その中の複数粒子のうち少なくとも50%が規定のサイズであることを意味する。従って「直径約2,000nm未満の有効平均粒子サイズ」は、その中の複数粒子のうち少なくとも50%が直径約2,000nm未満であることを意味する。一部の実施形態においては、ナノ粒子は、光散乱法、顕微鏡法、又はその他の適当な方法で測定して、約2,000nm(即ち2ミクロン)未満、約1,900nm未満、約1,800nm未満、約1,700nm未満、約1,600nm未満、約1,500nm未満、約1,400nm未満、約1,300nm未満、約1,200nm未満、約1,100nm未満、約1,000nm未満、約900nm未満、約800nm未満、約700nm未満、約600nm未満、約500nm未満、約400nm未満、約300nm未満、約250nm未満、約200nm未満、約150nm未満、約100nm未満、約75nm未満、若しくは約50nm未満の有効平均粒子サイズを有する。「D<sub>50</sub>」は、1つのマルチ粒子中にある複数粒子のうち50%がそれより小さい粒子サイズを指す。同様に「D<sub>90</sub>」は、1つのマルチ粒子中にある複数粒子のうち90%がそれより小さい粒子サイズを指す。

【0028】

一部の実施形態においては、多孔性ナノ粒子は、シリカ、生分解性ポリマー、ゾルゲル、金属、及び金属酸化物からなる群から選択される1つ以上の組成物からなる。

10

20

30

40

50

## 【0029】

本発明のナノ担体に用いられる多孔性ナノ粒子としては、メソ多孔性シリカナノ粒子及びコアシェルナノ粒子が含まれる。

## 【0030】

多孔性ナノ粒子はまた、脂肪族ポリエステル、ポリ乳酸（PLA）、ポリグリコール酸（PGA）、乳酸とグリコール酸とのコポリマー（PLGA）、ポリカプロラクトン（PCL）、ポリ酸無水物、ポリオルトエステル、ポリウレタン、ポリ酪酸、ポリ吉草酸、ポリラクチド-co-カプロラクトン、アルギン酸塩及びその他の多糖、コラーゲン及びその化学誘導体、アルブミン、親水性蛋白質、ゼイン（トウモロコシの貯蔵蛋白質）、プロラミン、疎水性蛋白質、コポリマー、並びにそれらの混合物からなる群から選択される1つ以上の組成物を含む生分解性ポリマーナノ粒子であってもよい。

10

## 【0031】

あるいは多孔性ナノ粒子は、水存在下で有機溶媒と金属アルコキシドとを加えることによって生成するゾルゲル混合物からなってもよい。純粹に例示である実施形態においては、金属アルコキシドの金属酸化物はTi、Zr、Sn、B、Alであり、Yを用いてもよい。さらに別の実施形態においては、金又は銀からなるナノ粒子を用いることもできる。

## 【0032】

別の例示の実施形態においては、多孔性ナノ粒子は、水存在下において有機溶媒とSiアルコキシドとを加えることによって生成するゾルゲル混合物からなる。

## 【0033】

さらに別の実施形態においては、多孔性ナノ粒子はそれぞれ、本質的にシリカを含まないコア表面を有するコアと、コア表面に結合したシェルとを含む。コアは、酸化物、炭化物、硫化物、窒化物、リン化物、ホウ酸化物、ハロゲン化物、セレン化物、テルル化物、酸化タンタル、酸化鉄、又はそれらの組み合わせからなる群から選択される遷移金属化合物を含む。

20

## 【0034】

本発明で用いられるシリカナノ粒子は、例えばメソ多孔性シリカナノ粒子及びコアシェルナノ粒子とすることができる。このナノ粒子に吸収分子（例えば吸収色素）を組み入れてもよい。適当な条件下において、ナノ粒子は、化学発光から生じる電磁放射線を放射する。

30

## 【0035】

メソ多孔性シリカナノ粒子は、例えばサイズを約5nm～約500nm（その間の全ての整数及び範囲が含まれる）にすることができる。このサイズは、粒子の最大軸として測定する。種々の実施形態においては、粒子は、サイズ約10nm～約500nm及び約10nm～約100nmである。メソ多孔性シリカナノ粒子は多孔性構造を有し、そのナノ粒子の表面に開口した少なくとも1つの細孔、好ましくは多数の細孔を有する。細孔は、直径約1～約20nm（その間の全ての整数及び範囲を含む）にすることができる。一実施形態においては、細孔は直径約1～約10nmである。一実施形態においては、細孔の約90%が直径約1～約20nmである。別の実施形態においては、細孔の約95%が直径約1～約20nmである。

40

## 【0036】

メソ多孔性ナノ粒子は、当該分野で公知の方法によって合成できる。一実施形態においては、このナノ粒子はゾルゲル法を用いて合成され、1つ又は複数のシリカ前駆体、及び吸収分子にコンジュゲート（即ち共有的に結合）された1つ又は複数のシリカ前駆体を、ミセル形状の鑄型存在下において加水分解する。鑄型は、例えば臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム（CTAB）などの界面活性剤を用いて生成される。ミセルを生成できるいずれの界面活性剤も用いることができると考えられる。

## 【0037】

上記のコアシェルナノ粒子は、コア及びシェルからなる。コアは、シリカ及び吸収分子からなる。吸収分子は、吸収分子とシリカネットワークとの間の1つ又は複数の共有結合

50

によってシリカネットワークに組み入れられる。シェルはシリカからなる。

【0038】

一実施形態においては、コアは公知のゾルゲル化学反応を用いて、例えば1つ又は複数のシリカ前駆体の加水分解によって、独立して合成される。シリカ前駆体は、シリカ前駆体と、吸収分子にコンジュゲートされた（例えば共有結合によって連結された）1つ又は複数のシリカ前駆体（本明細書では「コンジュゲートされたシリカ前駆体」という。）との混合物として存在する。加水分解をアルカリ（塩基性）条件下で行って、シリカコア及び/又はシリカシェルを生成することができる。例えば加水分解は、シリカ前駆体とコンジュゲートされたシリカ前駆体とを含む混合物への水酸化アンモニウムの添加によって行うことができる。

10

【0039】

シリカ前駆体は、加水分解条件下でシリカを生成できる化合物である。シリカ前駆体の例としては、限定ではないが、例えばテトラエトキシシラン（TEOS）やテトラメトキシシラン（TMOS）などのオルガノシランなどである。

【0040】

コンジュゲートされたシリカ前駆体を生成するために用いられるシリカ前駆体は、1つ又は複数の吸収分子と反応して1つ又は複数の共有結合を形成可能な、1つ又は複数の官能基を有する。シリカ前駆体の例としては、限定ではないが、イソシアナートプロピルトリエトキシシラン（ICPTSS）、アミノプロピルトリメトキシシラン（APTSS）、メルカプトプロピルトリメトキシシラン（MPTSS）などである。

20

【0041】

一実施形態においては、コアを生成するために用いられるオルガノシラン（コンジュゲートされたシリカ前駆体）は、一般式  $R_{4-n}SiX_n$  を有する。ここでXは、例えばエトキシ、メトキシ、又は2-メトキシエトキシなどの加水分解可能基である。Rは1~12炭素原子の一価有機基であり、限定ではないが、例えばメルカプト、エポキシ、アクリリル、メタクリリル、又はアミノなどの有機官能基を任意で含むことができる。nは0~4の整数である。例えばTEOSやTMOSなどのシリカ前駆体を用いてコアを形成するために、コンジュゲート可能なシリカ前駆体を吸収分子にコンジュゲートし、続いて共縮合する。シリカシェルを形成するために用いられるシランは、n=4である。共反応性官能基又はヒドロキシ官能性表面（ガラス表面など）のカップリング及び修飾のために、官能性のモノ、ビス、及びトリスアルコキシシランを用いることも知られている。カーク・オトマー（Kirk-Othmer）著、化学技術事典（Encyclopedia of Chemical Technology）、第20巻第3版、ジョン・ワイリー社（J. Wiley）、ニューヨーク、及びE. プルードマン（Pluedemann）著、シランカップリング剤（Silane Coupling Agents）、プレナム出版社（Plenum Press）、ニューヨーク、1982年を参照。オルガノシランはゲルを生じ得るので、アルコール又はその他の公知の安定化剤を用いることが望ましい場合もある。改変したストーパー法を用いてコアシェルナノ粒子を合成するプロセスが、米国特許出願第10/306,614号及び第10/536,569号明細書に記載されており、それらのプロセスの開示は参照により本明細書に援用される。

30

【0042】

本発明のナノ担体の一部の実施形態においては、脂質二重層は、ホスファチジルコリン及びその他のリン脂質（例えばDOTAP）などのリン脂質並びにコレステロールからなる群から選択される1つ以上の脂質からなる。

40

【0043】

一部の更なる実施形態においては、脂質二重層は1つ以上のホスファチジルコリン（PC）などのリン脂質からなり、リン脂質は、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DMPC）、1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン（DOTAP）、1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（POPC）、卵PC（好ましくは少なくとも卵PC）、及び脂質混合物からなる群から選択される。脂質混合物は、約25%~約55%以上、約35%~約50%、約

50

36%～約49%、約37%～約48%、約40%（多くの場合約50%未満）の卵PC、約50%～約70%、約51%～約69%、約52%～約68%、約53%～約67%、約54%～約66%、約55%～約65%、約56%～約64%、約57%～約63%、約58%～約62%、約59%～約61%、若しくは約60%の1つ以上の不飽和リン脂質、炭素長14を有し不飽和結合を有さないDMP C [14:0]、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DPPC) [16:0]、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC) [18:0]、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DOPC) [18:1(9-Cis)]、POPC [16:0-18:1]、及びDOTAP [18:1]、又はそれらの混合物を包含する。

10

## 【0044】

さらに別の実施形態においては、

(a) 脂質二重層は、(1) 卵PCと(2) 1つ以上のリン脂質との混合物からなり、リン脂質は、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DMP C)、1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン(DOTAP)、1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(POPC)、及び脂質混合物からなる群から選択され、脂質混合物は、約25%～約55%以上、約35%～約50%、約36%～約49%、約37%～約48%、約40%～約49%（多くの場合約50%未満）の卵PC、約50%～約70%、約51%～約69%、約52%～約68%、約53%～約67%、約54%～約66%、約55%～約65%、約56%～約64%、約57%～約63%、約58%～約62%、約59%～約61%、又は約60%の1つ以上の不飽和リン脂質、好ましくは不飽和ホスファチジルコリン、炭素長14を有し不飽和結合を有さないDMP C [14:0]、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DPPC) [16:0]、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC) [18:0]、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DOPC) [18:1(9-Cis)]、POPC [16:0-18:1]、及びDOTAP [18:1]を包含し、

20

(b) 上記混合物中の卵PCのモル濃度は、約10%～約75%、約15%～約70%、約25%～約68%、約30%～約67%、約34%～約66%、約40%～約65%、約45%～約64%、約47%～約63%、約48%～約62%、約49%～約61%、約50%～約60%、約51%～約59%、約52%～約58%、約53%～約57%、約54%～約62%、約55%～約65%、約56%～約64%、約57%～約63%、約58%～約62%、若しくは約29%～約31%、又は約30%であり、脂質二重層の残りの部分は、含む。

30

## 【0045】

さらに別の好ましい態様においては、脂質二重層は卵PCを約40%～約60%のモル濃度で含み、少なくとも1つの更なる上記のリン脂質を約40%～約60%のモル濃度で含む。一部の好ましい実施形態においては、脂質二重層は、脂質二重層のうちの約40%～約60%のモル濃度の卵PCと、脂質二重層のうちの約40%～約60%のモル濃度（合計）の混合物とを含み、混合物は、不飽和リン脂質、炭素長14を有し不飽和結合を有さないDMP C [14:0]、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DPPC) [16:0]、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC) [18:0]、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DOPC) [18:1(9-Cis)]、POPC [16:0-18:1]、及びDOTAP [18:1]の1つ以上からなる。

40

## 【0046】

一部の実施形態においては、脂質二重層は、リン脂質、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルジエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴ脂質、及びエトキシ化ステロール、又はそれらの混合物からなる群から選択される1つ以上の組成物からなる。そのような実施形態の例示の実施例では、リン脂質はレ

50

シチンとすることができ、ホスファチジルイノシトールは大豆、アブラナ、綿実、卵、及びそれらの混合物から得ることができ、スフィンゴ脂質はセラミド、セラブロシド、スフィンゴシン、及びスフィンゴミエリン、並びにそれらの混合物とすることができ、エトキシ化ステロールはフィトステロール、ポリエチレングリコール - 5 - 大豆ステロール、及びポリエチレングリコール - 5 菜種ステロールとすることができる。一部の実施形態においては、フィトステロールは、シトステロール、カンペステロール及びスティグマステロールの組成物のうちの少なくとも2つからなる混合物を含む。

【0047】

さらに別の例示の実施形態においては、脂質二重層は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルエタノールアミン、リゾホスファチジルイノシトール、及びリゾホスファチジルイノシトールからなる群から選択される1つ以上のホスファチジル基からなる。

10

【0048】

さらに別の例示の実施形態においては、脂質二重層は、モノアシル又はジアシルホスホグリセリドから選択されるリン脂質からなる。

【0049】

さらに別の例示の実施形態においては、脂質二重層は、ホスファチジルイノシトール - 3 - リン酸 (PI - 3 - P)、ホスファチジルイノシトール - 4 - リン酸 (PI - 4 - P)、ホスファチジルイノシトール - 5 - リン酸 (PI - 5 - P)、ホスファチジルイノシトール - 3, 4 - ニリン酸 (PI - 3, 4 - P2)、ホスファチジルイノシトール - 3, 5 - ニリン酸 (PI - 3, 5 - P2)、ホスファチジルイノシトール - 4, 5 - ニリン酸 (PI - 4, 5 - P2)、ホスファチジルイノシトール - 3, 4, 5 - 三リン酸 (PI - 3, 4, 5 - P3)、リゾホスファチジルイノシトール - 3 - リン酸 (LPI - 3 - P)、リゾホスファチジルイノシトール - 4 - リン酸 (LPI - 4 - P)、リゾホスファチジルイノシトール - 5 - リン酸 (LPI - 5 - P)、リゾホスファチジルイノシトール - 3, 4 - ニリン酸 (LPI - 3, 4 - P2)、リゾホスファチジルイノシトール - 3, 5 - ニリン酸 (LPI - 3, 5 - P2)、リゾホスファチジルイノシトール - 4, 5 - ニリン酸 (LPI - 4, 5 - P2)、リゾホスファチジルイノシトール - 3, 4, 5 - 三リン酸 (LPI - 3, 4, 5 - P3)、ホスファチジルイノシトール (PI)、及びリゾホスファチジルイノシトール (LPI) からなる群から選択される1つ以上のホスホイノシチドからなる。

20

30

【0050】

さらに別の例示の実施形態においては、脂質二重層は、ポリエチレングリコール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 (PEG - DSPE)、ポリエチレングリコール誘導体化セラミド (PEG - CER)、水添大豆ホスファチジルコリン (HSPC)、卵ホスファチジルコリン (EPC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルグリセロール (PG)、ホスファチジルイノシトール (PI)、モノシアロガングリオシド、スフィンゴミエリン (SPM)、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)、ジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC)、及びジミリストイルホスファチジルグリセロール (DMPG) からなる群から選択される1つ以上のリン脂質からなる。

40

【0051】

本発明のナノ担体の1つの例示の実施形態においては、  
 (a) 1つ以上の薬理活性剤は少なくとも1つの抗癌剤を含み、  
 (b) 抗癌剤の約10% ~ 約20%未満が、活性酸素種の非存在下で多孔性ナノ粒子から放出され、  
 (c) 活性酸素種との接触の結果としての脂質二重層の破裂によって、多孔性ナノ粒子は、5% (w/v) トリトン X - 100 を用いて脂質二重層を溶解させた場合に放出される抗癌剤量の約60% ~ 約80%、又は約61% ~ 約79%、又は約62% ~ 約78%、又

50



は約 63% ~ 約 77%、又は約 64% ~ 約 77%、又は約 65% ~ 約 76%、又は約 66% ~ 約 75%、又は約 66% ~ 約 74%、又は約 68% ~ 約 73%、又は約 69% ~ 約 72%、又は約 70% ~ 約 71%、又は約 70% におおよそ等しい抗癌剤量を放出する。

#### 【0052】

本発明のナノ担体は、多種多様な薬理活性成分を含むことができる。好ましくは、そのような活性成分は、代謝拮抗剤、トポイソメラーゼ I 及び II の阻害剤、アルキル化剤、微小管阻害剤、低分子阻害剤、バイオ治療薬及びモノクローナル抗体、アドリアマイシン、アルデスロイキン、アレムツズマブ、アリトレチノイン、アロプリノール、アルトレタミン、アミフォスチン、アナストロゾール、三酸化ヒ素、アスパラギナーゼ、BCG 生菌、ベキサロテンカプセル、ベキサロテングル、プレオマイシン、静注用ブスルファン、経口用ブスルファン、カルステロン、カペシタピン、カルボプラチン、カルムスチン、ポリフェプロサン 20 インプラントを用いたカルムスチン、セレコキシブ、クロラムブシル、シスプラチン、クラドリピン、シクロホスファミド、シタラピン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、アクチノマイシン D、ダルベポエチン、ダウノルビシン、ダウノマイシン、デニロイキンジフチトックス、デクスラゾキサソ、ドセタキセル、ドキシソルビシン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エリオット B 液、エピルビシン、エポエチン、エストラムスチン、リン酸エトポシド、エトポシド (VP-16)、エキセメスタン、フィルグラスチム、フロクスウリジン (動注用)、フルダラビン、フルオロウラシル (5-FU)、フルベストラント、ゲムシタピン、ゲムツズマブオゾガマイシン、ゴセレリン酢酸塩、ヒドロキシ尿素、イブリツモマブチウキセタン、イダルビシン、イホスファミド、イマチニブメシル酸塩、インターフェロン - 2a、インターフェロン - 2b、イリノテカン、レトロゾール、ロイコボリン、レバミゾール、ロムスチン (CCNU)、メクロレタミン (ナイトロジェンマスタード)、酢酸メゲストロール、メルファラン (L-PAM)、メルカプトプリン (6-MP)、メスナ、メトトレキセート、メトキサレン、マイトマイシン C、ミトタン、ミトキサントロン、ナンドロロンフェンプロピオナート、ノフェツモマブ (Nofetumomab)、LOddC、オブレルベキン、オキサリプラチン、バクリタキセル、パミドロネート、ペガデマラーゼ、ペガスパルガーゼ、ペグフィルグラスチム、ペントスタチン、ピボプロマン、プリカマイシン、ミトラマイシン、ポルフィマーナトリウム、プロカルバジン、キナクリン、ラスプリカーゼ、リツキシマブ、サルグラモスチム、ストレプトゾシン、テルブジジン (LDT)、タルク、タモキシフェン、テモゾロミド、テニボシド (VM-26)、テストラクトン、チオグアニン (6-TG)、チオテバ、トポテカン、トレミフェン、トシツモマブ、トラスツズマブ、トレチノイン (ATRA)、ウラシルマスタード、バルルビシン、バルトルシタピン (モノバル LDC)、ピンブラスチン、ピノレルピン、ゾレドロネート、及びそれらの混合物からなる群から選択される抗癌剤である。

#### 【0053】

より好ましくは、本発明のナノ担体は、卵巣癌又は腹膜癌の治療において有用な抗癌剤を含む。そのような抗癌剤の限定でない例としては、ドキシソルビシン、メルファラン、ペバシズマブ、ダクチノマイシン、シクロホスファミド、アミフォスチン、エトポシド、ゲムシタピン、アルトレタミン、トポテカン、シクロホスファミド、バクリタキセル、カルボプラチン、シスプラチン、及びタキソールなどである。

#### 【0054】

本発明の一部の実施形態は、腹膜癌に罹患した治療対象の腹膜に、本明細書に記載の複数のナノ担体を腹腔内投与する (例えば、複数のナノ担体並びに薬学的に許容される希釈剤及び/又は賦形剤を含む製剤の注入によって)、癌に罹患した治療対象を治療する方法を提供する。

#### 【0055】

この治療方法の一部の実施形態は、  
(a) ナノ担体は、シリカ、生分解性ポリマー、ゾルゲル、金属、及び金属酸化物からなる群から選択される 1 つ以上の組成物を含むナノ粒子を含み、

10

20

30

40

50

(b) 投与に続いて、ナノ担体の脂質二重層は、オゾン ( $O_3$ )、過酸化水素、次亜塩素酸イオン、ヒドロキシルラジカル、スーパーオキシドアニオン ( $O_2^-$ )、及びペルオキシ亜硝酸からなる群から選択される活性酸素種 (ROS) との接触によって破裂し、

(c) ナノ担体の1つ以上の抗癌剤は、ドキソルビシン、メルファラン、ペバシズマブ、ダクチノマイシン、シクロホスファミド、アミフォスチン、エトポシド、ゲムシタピン、アルトレタミン、トポテカン、シクロホスファミド、パクリタキセル/タキソールやドセタキソールなどのタキサン系化学療法剤、又はカルボプラチンやシスプラチンなどの白金系化学療法剤を含む。

#### 【0056】

例示の製剤及び上記段落に記載された方法では、ナノ担体は複数の多孔性シリカナノ粒子を含むことができ、多孔性シリカナノ粒子は、

(a) 1つ以上の薬理活性剤を積載し、薬理活性剤は、好ましくはドキソルビシン、メルファラン、ペバシズマブ、ダクチノマイシン、シクロホスファミド、アミフォスチン、エトポシド、ゲムシタピン、アルトレタミン、トポテカン、シクロホスファミド、タキサン系化学療法剤 (例えばパクリタキセル/タキソール若しくはドセタキソール)、又は白金系化学療法剤 (例えばカルボプラチン、シスプラチン若しくはオキサリプラチン) からなる群から選択され、

(b) リン脂質、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴ脂質、及びエトキシ化ステロール、又はそれらの混合物からなる群から選択される1つ以上の組成物からなる脂質二重層によって被包され、そしてそれを担持し、

投与に続いて、ナノ担体の脂質二重層は、オゾン ( $O_3$ )、過酸化水素、次亜塩素酸イオン、ヒドロキシルラジカル、スーパーオキシドアニオン ( $O_2^-$ )、及びペルオキシ亜硝酸からなる群から選択される活性酸素種 (ROS) との接触によってインピボで破裂する。

#### 【0057】

他の本発明の治療方法の実施形態は、治療対象は、ナノ担体組成物と一緒に1つ以上の更なる抗癌剤若しくは抗癌治療 (例えば放射線療法) を併用して投与又は施される。更なる抗癌剤若しくは抗癌治療及びナノ担体組成物は、違う時又は同時に治療対象に投与又は施されることができる。一部の実施形態は、腹膜癌に罹患した治療対象の腹膜に、複数のナノ担体並びに薬学的に許容される希釈剤及び/又は賦形剤を含む製剤を腹腔内投与することを伴う。

#### 【0058】

更に別の実施形態では、本発明は、

(a) (1) 1つ以上の薬理活性剤を積載し、かつ(2) 活性酸素種との接触によってインピボで破裂する脂質二重層によって被包され、そしてそれを担持する、複数の多孔性ナノ粒子を含む腹腔内投与されるナノ担体組成物と、

(b) 少なくとも1つの薬学的に許容される希釈剤又は薬学的に許容される賦形剤と、を含む医薬組成物を提供する。

#### 【0059】

本発明の医薬組成物の1つの実施形態では、

(a) ナノ担体組成物は、シリカ、生分解性ポリマー、ゾルゲル、金属、及び金属酸化物からなる群から選択される1つ以上の組成物を含むナノ粒子を含み、

(b) ナノ粒子の脂質二重層は、オゾン ( $O_3$ )、過酸化水素、次亜塩素酸イオン、ヒドロキシルラジカル、スーパーオキシドアニオン ( $O_2^-$ )、及びペルオキシ亜硝酸からなる群から選択される活性酸素種 (ROS) との接触によってインピボで破裂し、

(c) 1つ以上の薬理活性剤が、例えばドキソルビシン、メルファラン、ペバシズマブ、ダクチノマイシン、シクロホスファミド、アミフォスチン、エトポシド、ゲムシタピン、アルトレタミン、トポテカン、シクロホスファミド、タキサン系化学療法剤 (例えばパクリタキセル/タキソール若しくはドセタキソールなど)、又は白金系化学療法剤 (例えば

10

20

30

40

50

カルボプラチン、シスプラチン若しくはオキサリプラチンなど)からなる群から選択される抗癌剤を含む。

【0060】

用語「患者」又は「対象」は、本明細書を通して、動物、好ましくはヒトを表すために用いられ、それらに対して本発明の組成物を用いた予防的治療を含む治療が提供される。ヒト患者などの特定の動物に特異的な感染、状態又は病態の治療については、用語「患者」はその特定の動物を指す。

【0061】

用語「有効量」は、本明細書を通して、その使用の文脈に応じて、本発明の所期の効果を生ずる量で用いられる製剤又はその他の成分の濃度若しくは量を表すために用いられる。製剤又は成分を用いて、治療される疾患若しくは状態に好ましい変化をもたらすことができる。その変化は、治療される疾患若しくは状態に応じて、寛解、好ましい生理的結果、治療される病態若しくは状態の回復又は減衰、状態若しくは病態が起こることの予防又はその可能性の低減のいずれかである。複数の製剤を組み合わせる場合には、それぞれの製剤を有効量で用い、その場合の有効量には相乗的な量も包含される。本発明で用いられる製剤量は、製剤の種類、患者の年齢及び体重、並びに製剤の生物学的利用能及び薬物動態に影響し得る多数のその他の因子に応じて変わり得る。患者に投与する製剤量は、通常は1日当たり約0.001mg/kg～約50mg/kg以上、約0.5mg/kg～約25mg/kg、約0.1～約15mg/kg、約1mg～約10mg/kg、及び本明細書に別に記載の範囲である。治療過程になされる投与計画又は投与量の変動は、当業者には容易に理解されよう。

10

20

【0062】

用語「予防的」は、患者又は治療対象における状態若しくは病態の発生可能性を低減する、本明細書に記載の製剤の使用を表すために用いられる。用語「可能性を低減」は、所与の患者集団において、全患者での病態の発生、再発又は転移を予防するのではなく、その全患者の集団に属する1人以上の患者で疾患の発生、再発又は転移の可能性を低減するために本発明を用いることができるという事実を指す。

【0063】

用語「薬学的に許容される」は、本明細書に記載のナノ担体若しくはその成分、又はそのようなナノ担体を含む製剤、あるいは本明細書に記載の製剤の添加剤、希釈剤又は賦形剤が、投与される治療対象にとって許容できないほど毒性でないことを意味する。

30

【0064】

用語「タキサン」又は「タキサン系化学療法剤」には、限定ではないが、パクリタキセル(タキソール(登録商標))、ドセタキセル(タキソテール(登録商標))、IDN5390やGRN1005などのタキサン誘導体、欧州特許出願公開第2330100号明細書に記載のタキサン誘導体、及び「バイオサイエンス・バイオテクノロジー・アンド・バイオケミストリー(Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry)」第76巻(2)、349-352頁(2012年)に記載又は参照があるタキサン誘導体が含まれる。好ましいタキサンは、パクリタキセル及びドセタキセルを包含する。

40

【0065】

用語「白金系化学療法剤」は、白金を含む化学療法剤を表すために用いられる。好ましい白金系化学療法剤は、シスプラチン、オキサリプラチン、及びカルボプラチンを包含する。

【0066】

用語「癌」は、本明細書を通して、癌性又は悪性の新生物、即ち細胞増殖によって成長し、多くの場合正常組織よりも急速に増殖し、その新たな成長を引き起こした刺激が止んだ後も成長し続ける異常組織の形成及び成長をもたらす病理プロセスを指すのに用いられる。悪性新生物は、構造的構成及び正常組織との機能的協調の部分的又は完全な欠如を示し、多くは周辺組織に侵潤し、複数部位に転移し、切除が試みられた後も再発して十分に治療されない限り患者の死をもたらす可能性が高い。本明細書で用いられる場合、用語「

50

新形成」はあらゆる癌性の病態を表すのに用い、悪性の血液性腫瘍、腹水型腫瘍、及び固形腫瘍に関連する病理プロセスを包含又は網羅する。

【0067】

本発明の種々の実施形態を用いて治療される癌の例には、限定ではないが、癌腫（例えば扁平上皮癌腫、基底細胞癌腫、腺癌、肝細胞癌腫、及び腎細胞癌腫、特に膀胱、腸、乳房、子宮頸管、結腸、食道、頭部、腎臓、肝臓、肺、頸部、卵巣、膵臓、前立腺、及び胃の癌腫）、良性及び悪性のリンパ腫（特にバーキットリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫）、良性及び悪性の黒色腫、骨髄増殖性疾患、肉腫（特にユーイング肉腫、血管肉腫、カポジ肉腫、脂肪肉腫、筋肉腫、末梢神経上皮腫、及び滑膜肉腫）、中枢神経系の腫瘍（例えば神経膠腫、星細胞腫、乏突起膠腫、上衣腫、膠芽腫、神経芽腫、神経節細胞腫、神経節膠腫、髓芽腫、松果体細胞腫瘍、髄膜腫、髄膜肉腫、神経線維腫、及びシュワン細胞腫）、生殖系及び非生殖系の腫瘍（例えば腸癌、乳癌、前立腺癌、子宮頸癌、子宮癌、肺癌、卵巣癌、睾丸癌、甲状腺癌、星細胞腫、食道癌、膵臓癌、胃癌、肝臓癌、結腸癌、及び黒色腫）、混合型の新形成（特に癌肉腫及びホジキン病）、並びに混合起源の腫瘍（例えばウィルムス腫瘍及び奇形癌腫）が含まれる（ピアーズ（Beers）及びベルコウ（Berkow）編「メルクマニュアル 診断と治療（The Merck Manual of Diagnosis and Therapy）」第17（17.sup.th）版（ニュージャージー州ホワイトハウスステーション、メルク研究所、1999年）、973-74、976、986、988、991頁）。腹膜癌の場合には、好ましい投与経路は腹腔内（IP投与）である。非腹膜癌である癌の場合には、本発明の組成物の好ましい投与経路は、直接的に癌/腫瘍に入れることである。

10

20

【0068】

用語「腹膜癌」は、腹膜と呼ばれる腹部を覆う薄層組織で発生するやや稀な癌を指し、子宮、膀胱、及び直腸にも及ぶ。腹膜癌は腸癌や胃癌と混同される場合もあるが、腹膜癌は腹膜から発生するので、腹膜に転移するこれらの癌とは異なる。従って、通常は原発性腹膜癌と呼ばれる。原発性腹膜癌（PPC又はPPCa）は、腹膜又は腹腔を覆う細胞の癌である。腹膜癌は、卵巣癌のような活動及び外観を有する。これは主に、腹膜と同様に卵巣表面が上皮細胞からなっているためである。原発性腹膜癌又は癌腫は、漿液性表面乳頭状癌腫、原発性腹膜癌腫、卵巣外漿液性癌腫、原発性漿液性乳頭状癌腫、砂腫状癌腫としても知られる。

【0069】

本発明の製剤は、更なる抗癌剤と併用投与されてもよい。それらの薬剤としては、例えば代謝拮抗剤、トポイソメラーゼI及びIIの阻害剤、アルキル化剤、微小管阻害剤（例えばタキソール）、低分子阻害剤、バイオ治療薬、及びモノクローナル抗体が含まれる。本発明で用いられる具体的な抗癌併用療法には、特に例えばアドリアマイシン、アルデスロイキン、アレムツズマブ、アリトレチノイン、アロプリノール、アルトレタミン、アミフォスチン、アナストロゾール、三酸化ヒ素、アスパラギナーゼ、BCG生菌、ベキサロテンカプセル、ベキサロテングル、プレオマイシン、静注用ブスルファン、経口用ブスルファン、カルステロン、カベシタピン、カルボプラチン、カルムスチン、ポリフェプロサン20インプラントを用いたカルムスチン、セレコキシブ、クロラムブシル、シスプラチン、クラドリピン、シクロホスファミド、シタラピン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、アクチノマイシンD、ダルベポエチン、ダウノルピシン、ダウノマイシン、デニロイキンジフチトックス、デクスラゾキサソ、ドセタキセル、ドキシソルピシン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エリオットB液、エピルピシン、エポエチン、エストラムスチン、リン酸エトポシド、エトポシド（VP-16）、エキセメスタン、フィルグラスチム、フロクスウリジン（動注用）、フルダラビン、フルオロウラシル（5-FU）、フルベストラント、ゲムシタピン、ゲムツズマブオゾガマイシン、ゴセレリン酢酸塩、ヒドロキシ尿素、イブリツモマブチウキセタン、イダルピシン、イホスファミド、イマチニブメシル酸塩、インターフェロン-2a、インターフェロン-2b、イリノテカン、レトロゾール、ロイコボリン、レバミゾール、ロムスチン（CCNU）、メクロレタミン（ナイトロジェンマスタード）、酢酸メゲストロール、メルファラン（L-PAM）、メルカプトブ

30

40

50

リン(6-MP)、メスナ、メトトレキセート、メトキサレン、マイトマイシンC、ミトタン、ミトキサントロン、ナンドロロンフェンプロピオナート、ノフェツモマブ(Nofetumomab)、L O d d C、オプレルベキン、オキサリプラチン、バクリタキセル、パミドロネート、ペガデマゼ、ペガスパルガーゼ、ペグフィルグラスチム、ペントスタチン、ピポプロマン、プリカマイシン、ミトラマイシン、ポルフィマーナトリウム、プロカルバジン、キナクリン、ラスブリカーゼ、リツキシマブ、サルグラモスチム、ストレプトゾシン、テルブビジン(LDT)、タルク、タモキシフェン、テモゾロミド、テニボシド(VM-26)、テストラクトン、チオグアニン(6-TG)、チオテパ、トポテカン、トレミフェン、トシツモマブ、トラスツズマブ、トレチノイン(ATRA)、ウラシルマスタード、バルルピシン、バルトルシタピン(モノバルLDC)、ピンブラスチン、ピノレルピン、ゾレドロネート、及びそれらの混合物などである。

10

【0070】

本発明の製剤は、薬学的に許容される希釈剤、担体、可溶化剤、乳化剤、保存剤、及び/又はアジュバントを含んでもよい。許容される製剤原料は、使用する用量及び濃度において服用者に好ましくは非毒性である。医薬製剤は、例えば組成物のpH、モル浸透圧濃度、粘度、透明性、色、等張性、臭気、無菌性、安定性、分解若しくは放出の速度、吸着性若しくは透過性などを改変、維持又は保護する物質を含んでもよい。好適な製剤原料には、限定ではないが、アミノ酸(例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリジン)、抗菌薬、抗酸化剤(例えばアスコルビン酸、亜硫酸ナトリウム又は亜硫酸水素ナトリウム)、緩衝剤(例えばホウ酸塩、重炭酸塩、トリスHCl、クエン酸塩、リン酸塩、又はその他の有機酸)、増量剤(例えばマンニトール又はグリシン)、キレート剤(例えばエチレンジアミン四酢酸(EDTA))、錯化剤(例えばカフェイン、ポリビニルピロリドン、 $\beta$ -シクロデキストリン又はヒドロキシプロピル- $\beta$ -シクロデキストリン)、充填剤、単糖、二糖、及びその他の炭水化物(例えばグルコース、マンノース又はデキストリン)、蛋白質(例えば血清アルブミン、ゼラチン又は免疫グロブリン)、着色剤、香味剤、希釈剤、乳化剤、親水性ポリマー(例えばポリビニルピロリドン)、低分子量ポリペプチド、塩形成性の対イオン(例えばナトリウム)、保存剤(例えば塩化ベンザルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサル、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸又は過酸化水素)、溶媒(例えばグリセリン、プロピレングリコール又はポリエチレングリコール)、糖アルコール(例えばマンニトール又はソルビトール)、懸濁化剤、界面活性剤若しくは湿潤剤(例えばプルロニック、ポリエチレングリコール(PEG)、ソルビタンエステル、ポリソルベート20やポリソルベート80などのポリソルベート、トリトン、トリメチルアミン、レシチン、コレステロール、又はチロキサポール)、安定性増進剤(例えばショ糖又はソルビトール)、等張性増強剤(例えばアルカリ金属ハロゲン化物、好ましくは塩化ナトリウム、塩化カリウム、マンニトール、又はソルビトール)、送達ビヒクル、希釈剤、賦形剤、並びに/又は医薬アジュバントが含まれる。例えば「レミントンの薬学(REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES)」第18版(18.sup.th)、A.R.ジェンナー口(Gennaro)編、1990年、マック出版社(Mack Publishing)参照。

20

30

【0071】

医薬製剤中の主なビヒクル若しくは担体には、限定ではないが、注射用水、生理食塩溶液、又は人工脳脊髄液が含まれ、非経口投与用の組成物に一般的なその他の物質を補足してもよい。中性緩衝生理食塩水及び血清アルブミン混合生理食塩水は、更なる典型的なビヒクルである。医薬製剤は、約pH7.0~8.5のトリス緩衝液若しくは約pH4.0~5.5の酢酸緩衝液を含むことができ、ソルビトール又は適当な代替物をさらに含んでもよい。本発明の製剤を、所望の純度を有する選択された組成物と任意の製剤用薬品(「レミントンの薬学」同上)とを混合して、凍結乾燥の固形又は水性溶液の形態で保存用に調製してもよい。さらに製剤は、例えばショ糖などの適当な賦形剤を用いて、凍結乾燥物として形成されてもよい。製剤成分は、投与部位に許容できる濃度で存在する。有利には、緩衝剤を用いて組成物を生理的pH又はやや低いpH、通常は約5~約8のpH範囲内

40

50

に維持する。

【0072】

本発明で用いられる製剤は、発熱物質を含まない非経口的に許容される水性溶液の形態であってもよい。調製は、デポ注射によって送達されることが出来る生産物の制御型又は持続型の放出を提供し得る所望のナノ担体を製剤することを伴う。ヒアルロン酸を用いた製剤は、血液循環における持続的な存続期間を助長する効果を有する。

【0073】

インピボ投与に用いられる医薬組成物は、通常は無菌である。一部の実施形態においては、これは無菌ろ過膜を通る過によってなされることが出来る。一部の実施形態においては、組成物を凍結乾燥する場合には、この方法を用いた無菌化は凍結乾燥及び復元の前又は後に行うことが出来る。一部の実施形態においては、非経口投与用の組成物は、凍結乾燥形態又は溶液で保存することが出来る。一部の実施形態においては、非経口組成物は、通常は無菌アクセスポートを有する容器、例えば静注液のバッグ、又は皮下注射針で突き通すことが可能な栓を有するバイアルに入れられる。

【0074】

本発明の製剤を形成したら直ぐに、溶液、懸濁液、ゲル、乳液、固体、脱水粉末、又は凍結乾燥粉末として無菌バイアル中で保存することが出来る。そのような製剤は、すぐに使用できる形態又は投与前に戻す形態（例えば凍結乾燥状）で保存することが出来る。

【0075】

本発明の上記及びその他の態様を、次の限定でない実施例によってさらに説明する。

【実施例1】

【0076】

<オゾンの生成及びSLBの破裂>

1. 概要

OVC Aは腹膜疾患であるので、そうすると論理的には疾患部位に直接、腹腔内（IP）に治療薬剤を入れることは、経静脈（IV）経路よりも高い有効性を有するはずである。さらに前臨床試験は、IP経路がIV経路よりも高濃度の化学療法剤の投与を可能にすることを明らかにしている（参考文献45）。実際に、化学療法を施すIP経路は、単独又はIV経路との併用でより高い総生存率をもたらした（参考文献2-5）。しかし、IP投与に伴う最も重要な問題は、全身毒性の高い割合である（参考文献2、35、46）。本発明者は、IP治療に伴う現在の全身毒性の問題を克服するために、その治療内容物を腹膜にのみ放出し、血液循環中には放出しないナノ担体を設計することを企図する。本発明のナノ担体は、多孔性シリカナノ球体に担持されたROS感受性脂質二重層からなる（図3）。ROS感受性であることの意義は、その治療内容物が、脂質二重層の分解を引き起こす活性化した免疫細胞が多数存在するOVC Aの炎症性の腹膜微小環境中に、専ら放出されることが出来ることである。同時に、脂質二重層がシリカ球体に担持されることによって、腹腔腔を通り抜けて血液循環に入り低いROS濃度にさらされた際に、安定化されると考えられる。低い抑えられた血中のROSレベルは、血液循環でのROSの影響を抑制する（例えばその細菌毒性を妨げる）抗酸化物質に起因する（参考文献47、48）。

【0077】

ナノ担体の大多数は腹膜に局在し（図3）、そのため標的部位以外の炎症性部位における顕著な薬剤放出が予防される。薬剤のIP投与の意義は、OVC A転移は主として腹膜に局限されるので、単細胞（SC）、細胞凝集塊（MCA）、及び癌幹細胞（CSC）を介した限局性及び播種性の疾患を治療することである（図1）。これらの細胞の存続は、治療抵抗性及び治療中における再発の公知の一因であるので、これらの細胞を直接的に腹膜内で標的にすることは重要である（参考文献6-12）。そのため、この治療形態はOVC Aの化学療法剤耐性を抑えると考えられ、特に本発明者のナノテクノロジープラットフォームは、全身毒性を低減するという意義を有する。

【0078】

10

20

30

40

50

したがって、本発明のナノ担体の投与によれば、(1)OVC Aなどの炎症性疾患において活性化した免疫細胞によって媒介されて一重項酸素からROSが生成し、(2)ROSが脂質二重層を損傷してその分解を引き起こし、更に(3)化学療法剤を捕捉する能力を有する多孔性ナノ粒子上に担持された堅牢な脂質二重層膜組立体を容易に形成することができる(参考文献27-29)。

#### 【0079】

##### 2. 方法

###### < 目的を支持する予備調査 >

本発明者は、光化学源を用いることによって、即ち光増感剤を添加してその試験管内容物を紫外線Aの照射に暴露することによって、無細胞系においてオゾン(オゾンの化学的特徴を有する分子)を首尾よく生成した。本発明の発見をこの節で要約する。4種類のアミノ酸(トリプトファン、メチオニン、システイン、及びヒスチジン)は、光化学源の利用による好中球の殺細菌活性の増大と共にオゾンを生成する水酸化に必要な抗体と、同じ触媒活性を有することが報告されている(その他のアミノ酸では報告されていない)(参考文献49)。予備調査のために、オゾンを生成するための最も単純な仕組みとしてアミノ酸を用いた。用いた光増感剤は、6-ピオプテリン(シグマアルドリッチ社(Sigma-Aldrich)、ミズーリ州セントルイス)(参考文献49)であり、紫外線Aの照射(315~400nm)は、ソーラーシミュレータとしての非オゾン発生型1000Wキセノンアークランプによって、適当なフィルターによって紫外線Bの照射を遮断して提供された(オリエル・インストゥルメンツ社(Oriel Instruments)、コネチカット州ストラトフォード)。紫外線Aの照射の出力は、紫外線測定器(ソーラーライト社(Solar Light)3D型、ペンシルバニア州グレンサイド)によって確認すると共に6mW/cm<sup>2</sup>であることが測定された。サンプルを4分間暴露した。オゾンは、上述のように610nmの吸光度を測定することによって、既に述べたようなそのインジゴカルミン(610nmに最大吸光を有する青色色素)からイサチンスルホン酸(無色)への変換を通して検出された(参考文献16、49)。図4は、本発明者がトリプトファンによって触媒された反応で光化学的にオゾンを生成したこと、及びメチオニンによって低度にオゾンを生成したことを示す。これは以前の報告と一致する(参考文献49)。一方で、ウシ血清アルブミン(BSA)は僅かにしかオゾンを生成せず、以前に報告されたようにリン酸緩衝液は負の対照として利用することができた(参考文献49)。

10

20

30

#### 【0080】

トリプトファン(Trp)は最も高い割合のオゾンを生成したため、次の実験においても継続して用い、リン酸緩衝液及びBSAの両方を負の対照として用いた。図5は、トリプトファンのみでは水酸化ができず、光増感剤としての6-ピオプテリン(6BP)の存在及び紫外線Aに対する暴露の両方が、この反応には必要であることを明示している。それらの存在は、この反応のために、水に加えて基質として必要な一重項酸素を生成することが報告されている(参考文献16、49)。さらに、トリプトファンは用量依存的に一重項酸素をオゾンに変換した(図6)。

これらの実験はすべて、本発明者が、無細胞系及び球体を含まない系においてアミノ酸のトリプトファンによってオゾン(オゾンの化学的特徴を有する分子)の生成に成功したことを示している。使用予定のプラットフォームには、多孔性シリカ上に担持された脂質二重層(SLB)を用いる。Trpによって光化学的にオゾンを生成する上記方法を用いて、オゾンによるSLBの破裂を試験する。SLBの破裂を検出するために、3ミクロンの多孔性シリカ(マッハライ・ナーゲル社(Macherey-Nagel)、ドイツ)中にフルオレセインを被包した後に前述のようにしてSLBを形成した球体(参考文献27)に対して、トリトンX-100(TX100)を添加することによって概念実証の試験をした(図7)。TX100によるSLBの破裂は、被包されたフルオレセインの放出をもたらした(未処理球体に対し、TX100により蛍光が14倍増大)。これが実施されて、蛍光色素を用いることによってSLBの破裂及び多孔性球体の内容物の放出を検出可能であることが明らかになった。

40

50

## 【0081】

要約すると、本発明者の予備データは、本発明者がアミノ酸によって光化学的にオゾン生成することに成功し、SLBの分解及びその被包された内容物の放出を検出する方法を得たことを示す。

## 【実施例2】

## 【0082】

## &lt;多孔性シリカ球体&gt;

図7に記載する系を、トリプトファンによって光化学的に（即ち紫外線Aに対する暴露及び6BPの存在によって）生成したオゾンに対して暴露する。公表された方法に従って、サイズ範囲200~500nmの多孔性ナノシリカ球体を合成する（参考文献50）。フローサイトメトリーによって、ナノ担体のフルオレセイン内容物の放出を検出する（図8）。SLBの脂質構成を最適化するために、コレステロールに加えて種々のホスファチジルコリン（PC）を評価する（アバンティ・ポラー・リピッズ社（Avanti Polar Lipids、アラバマ州アラバスター）から全て入手可能）。試験するPCには、その含量の約54%を不飽和PCとして有する脂質混合物の例として卵PCが含まれる。

10

評価する他のPCは様々な鎖長及び様々な飽和度を有し、シリカ上での安定性を維持しながらオゾン生成に応じた分解を最適化する。用いた一部のPCは、SLBの一部である場合にオゾン生成によって分解されると報告されており、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DMPC）、1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン（DOTAP）、及び1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（POPC）が含まれる（参考文献23、24）。卵PCは低い転移温度（ $T_m$ ）を有するので、室温でその流体相を維持し、ナノ球体上にSLBを生成するために室温で用いることが容易である。

20

卵PCと様々な長さ及び飽和度の上記の他のPCとを混合し、それらの $T_m$ に基づいて調製時の温度を調節する。これらのPCには、DMPC [14:0]（即ち炭素長=14、不飽和結合無し）、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DPPC） [16:0]、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DSPC） [18:0]、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DOPC） [18:1（9-Cis）]、POPC [16:0-18:1]、及びDOTAP [18:1]が含まれる。10、20、及び40モル%のPC含量で、これらの脂質のそれぞれと卵PCとの混合物を試験する。トリプトファンによって光化学的に生成したオゾンに対するこれらのSLBの反応を試験する前に、フローサイトメトリーによって検出される経時的なフルオレセインの漏出を調べることによって、ナノシリカ上のSLBの安定性を確認する。不安定なPCは全て、更なる実験から除外する。

30

フルオレセインを被包する多孔性シリカナノ球体上に担持された安定なPC混合物を用いて、オゾン分解実験を行う。オゾンを経時的にトリプトファンによって光化学的に生成し、フルオレセインの放出はフローサイトメトリーによって検出する。全サンプルを正の対照である5%（w/v）TX100によるSLB破裂と比較する。負の対照には、（1）同じサンプルだが紫外線暴露無し、及び（2）同じサンプルだが6BPの存在無しが含まれる。その他の負の対照は、緩衝液のみを有するか、又はトリプトファンの代わりにBSAを有する。オゾン非存在下においては安定性を提供するがオゾン存在下においては最大限の分解を起こす最良のPC混合物を選択する。最大限の分解は、TX100による分解（これを100%の分解と見なす）と比較した場合に、蛍光性内容物の約70%を放出する分解として定義する。この論理は、経験上TX100は脂質二重層の最大の分解をもたらすのに対し、生体分子は通常は不完全な分解をもたらすからである。例えばメリチン（膜活性ペプチド）は、70~80%の分解を引き起こす（TX100と比べて）（参考文献27、51）。

40

## 【0083】

最良の混合物を選択した後、脂質含量のうちの5、10、及び20モル%でコレステロールを前記PC混合物に含ませる効果を試験し、これがオゾン存在下での分解を増強する

50



か、あるいは逆の効果（即ち安定化）であるかを評価する。全実験に関して、データはトリプレートで収集し、比較をノンパラメトリックのウェルチの二標本 t 検定を用いて行い、0.05未満の p 値を統計的有意と見なす。

【0084】

自己消光を起こすことなくフローサイトメトリーで検出可能な、球体中に捕捉されるフルオレセインの最適量を決定する（参考文献50）。必要に応じて、生成オゾン量を調節する組込み型の酸化還元調節装置と出力測定用の酸化還元電位電極とを有するコロナ放電オゾン化装置を用いて、オゾンを生成する。

【実施例3】

【0085】

< ROS 存在下における DOX の細胞毒性 >

OVC A 治療の観察された改善の1つは、OVC A の増強された標的化を導くナノ担体の使用と、白金系療法及びタキサン系療法（OVC A が耐性になる恐れがある）以外の化学療法剤の使用とからもたらされる。例えば、キャエリクス（Caelyx、登録商標、シェリング・プラウ社（Schering-Plough））やドキシル（Doxil、登録商標、セントコア・オーソ・バイオテック社（Centocor Ortho Biotech））などのポリエチレングリコール（PEG）で機能化された、ドキシソルピシンを積載したリポソームをOVC A に対して用いることである（参考文献5、52-54）。ドキシソルピシン（DOX）は、OVC A 治療に通常用いられる化学療法剤には含まれないが、これらのナノ担体はDOXをOVC A に用いることの有効性を明らかにした。蛍光顕微鏡法を用いて細胞内における容易な検出を可能とするDOXの蛍光性という利点に加え、それを理由として、本発明の方法を用いてDOXを試験する。目的2では、ROS存在下において、本提案で開発するビヒクルによって放出されるDOXの細胞毒性を試験する。そのために、本発明者は、培養OVC A 細胞を用いてこのDOX積載ナノ担体を試験する。酢酸ミリスチン酸ホルボール（PMA）の添加によって活性化されるマクロファージと一緒にOVC A 細胞を共培養することによって、オゾンが生成すると予想される（参考文献15-17、43、49）。この方法は、インビボのOVC A 炎症性環境を模擬するので評価が行われる。

【0086】

ポイデンチャンパー試験を変更したものを用いて（参考文献55）、OVC A 細胞（OVC A 433、OVC A 429、及びSKOV-3ipを含む試験細胞）を24ウェルプレート用のインサートメンブレン上で単層として培養する。マクロファージ（腹膜マクロファージ細胞株H36.12j）は、そのインサートを配置したウェル中で細胞懸濁液として共培養する。ナノ担体をインサートに添加して、上述のとおりPMAを添加してマクロファージを活性化する（参考文献15-17、43、49）。24時間の培養後に、インサートメンブレン上の細胞を固定し、膜上の細胞の核をDAPI染色し、続いてスライドに乗せて蛍光顕微鏡法により検査する。核の可視化に加えて、DOXを取り込んだがまだ生存している細胞において、その蛍光（励起480nm、放射550nm）によってDOXの細胞内取り込みを検出することができる。核数は生細胞を表すので、細胞への毒性は核数の減少をもたらす。

全ての上記実験に関して、少なくとも70%の細胞毒性を生ずるのに用いられる薬剤の最適濃度を決定した後に、正の対照としてDOXを細胞に対して直接的に添加する。本発明者は、最終濃度1μのDOXを用いて72時間の培養後に96%の細胞死を示すデータを有する（下記の定量的マイルストーン参照）。負の対照としては、（1）マクロファージ活性化を行わないことによるROS非存在、及び（2）ROSは生成するが、DOXを有しないナノ担体の添加、が含まれる。データはトリプレートで収集し、比較はノンパラメトリックのウェルチの二標本 t 検定を用いて行い、0.05未満の p 値を統計的有意と見なす。全ての上記実験は、インビボでの炎症及びROS生成を刺激する系の存在下において、開発したナノ担体がインビトロでその細胞毒性の治療内容物をOVC A 細胞に対して放出できることの概念実証をするために必要不可欠である。

【0087】

10

20

30

40

50

この目的において、ROSを生成する活性化したマクロファージの存在下での本提案において開発するナノ担体から細胞へのインビトロの化学療法剤放出について、概念実証をする。この概念実証のために、ナノ球体ではなくマイクロ球体をインビトロで用いる。本発明者は、脂質二重層を分解可能なROSがOVCA細胞に対して細胞毒性であるDOXの放出を引き起こし、その細胞の死をもたらすと予測する。この目的の唯一の潜在的問題は、インビボのOVCA微小環境は、炎症性環境及びROS生成の一因となる抗体（自己抗体を含む）（参考文献57-59）及び多種のペプチドが多数存在するので、活性化したマクロファージがROSの生成に十分でないかもしれないということである。その場合は、マクロファージの活性化に加えてアミノ酸のトリプトファンを添加して培養においてROSを生成させ、DOX放出に関する効果を試験する。

10

## 【実施例4】

## 【0088】

## &lt; 定量的マイルストーン &gt;

ROS非存在下においては安定性を提供し、一方でROS存在下においては最大限の分解を起こす最良のPC混合物を選択する。ROS非存在下における最大減の安定性は、フルオレセインの15%未満の漏出として定義する。最大限の分解は、5% (w/v) TX100による分解（これを100%の分解と見なす）と比較した場合に、蛍光性内容物の約70%を放出する分解として定義する。この論理は、経験上TX100は脂質二重層の最大の分解をもたらすのに対し、生体分子は通常は不完全な分解をもたらすからである。例えばメリチン（膜活性ペプチド）は、70~80%の範囲で分解する（TX100と比べて）（参考文献27、51）。

20

## 【0089】

実施例3の実験で、本発明のプラットフォームが24時間の培養後に少なくとも70%の細胞毒性をもたらすことを立証する。本発明者の経験上、1 $\mu$ のDOX単独での処理は、24時間の培養後に約45%の細胞毒性をもたらし、72時間の培養後に約96%の細胞毒性をもたらす（データ不表示）。しかし、ナノ担体については、72時間でROSの存在に関わらずナノ担体の内在化とDOXの放出とが起こり得る。そのために、本発明者は24時間の培養を選択し（この時間以前の効果はROSのみに起因すると考えられるため）、約70%の毒性を予測する。インビトロで成功したならば、このことは今後のR33出願に向けて原理実証をもたらすものであり、そこではこのプラットフォームをOVCAの腹膜癌マウスモデルでインビボで試験することが可能である。

30

## 【0090】

## 結果

< 活性化したマクロファージによって生成したオゾン及び活性酸素種による、インビトロにおける脂質二重層の破裂の試験 >

## (細胞)

H36.12j及びRAW264.7のマクロファージの細胞株をアメリカンタイプセルカルチャー（American Type Cell Culture (ATCC)、バージニア州マナサス）から入手した。H36.12j細胞は、10% (v/v)の加熱非働化済みの鉄添加仔牛血清を加えたダルベッコ（Delbecco）改変イーグル培地（ATTC、バージニア州マナサス）で増殖させた。増殖は37において5%の二酸化炭素で行った。RAW264.7細胞は、10% (v/v)のウシ胎児血清を加えたダルベッコ（Delbecco）改変イーグル培地（ATTC、バージニア州マナサス）で増殖させた。増殖は37において10%の二酸化炭素で行った。

40

## 【0091】

## (活性化したマクロファージによるROS生成の確認)

細胞（ $0.2 \times 10^6$ 個、500 $\mu$ L培地中）をピペットで24ウェルプレートの各ウェルに注入した。最終濃度1 $\mu$ のホルボール-12-ミリストート-13-アセタート（PMA）（シグマ社（Sigma）、ミズーリ州セントルイス）を用いて細胞を30分間刺激した後、5 $\mu$ のCellROX（インビトロジェン社（Invitrogen））と一緒に30

50

分間培養してROSを検出した。その際には蛍光をフローサイトメトリーによって測定した。結果から、PMAを用いた活性化状態のマクロファージによってROSが生成されたことが明らかになった(図9)。

#### 【0092】

(活性化したマクロファージによる脂質破裂の検討)

細胞(1×10<sup>5</sup>個、500μL培地中)をピペットで24ウェルプレートの各ウェルに添加した。PBS中のトリプトファンを各ウェルに最終濃度1mMで添加した。次に、脂質で被覆されかつフルオレセインを被包したマイクロ球体をウェルに添加した。最後に、最終濃度50ng/mlのホルボール-12-ミリストート-13-アセタート(PMA)(シグマ社(Sigma)、ミズーリ州セントルイス)又は対照DMSO(シグマ社(Sigma)、ミズーリ州セントルイス)をウェルに添加した。細胞を1時間培養して上清を回収し、フローサイトメーターを用いてマイクロ球体の蛍光を検査した。試験した脂質は、卵PC中の40モル%DOPC、卵PC中の40モル%DOTAP、卵PC中の40モル%DMPC、卵PC中の40モル%DSPC、及び卵PC中の40モル%DPPCであった。対照には、細胞無しの球体、及び培地で代わりにPBSを用いた球体が含まれた。図10は、活性酸素種を生成させるためのPMAによるマクロファージ活性化状態で、蛍光の減少によって検出される担持された脂質二重層の顕著な破裂が、卵PC中の40モル%DOTAP及び卵PC中の40モル%DMPCの2種類の脂質組成で起こったことを示す。

#### 【0093】

(卵PCからなる脂質二重層に及ぼす培地、温度、及びPMSの影響の評価)

PMAを添加して細胞を37℃で培養することが、マクロファージ非存在下において卵PCの脂質二重層に影響を及ぼすかどうかを評価した。そのために、図10で行った実験を、いずれのマクロファージも添加しないで繰り返した。ナノ担体を用いたこれらの実験を行って、(1)リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中のナノ担体対培地中のナノ担体、(2)室温(RT)培養対37℃培養、並びに(3)PMA存在下及び非存在下、の条件を評価した。図11はこれらの実験の結果を示す。培地存在下において蛍光の無視できる程度の増大が見られるが、これは培地中にフェノールレッドが存在することの直接的結果である。増大は無視できる程度であり、細胞を用いる本発明者の実験においては培地の存在は全てのサンプル中に存在する不変なものであるため、この僅かな増大は無視し得る。PMAの存在はナノ担体に対して影響を及ぼさなかった。温度を上げると蛍光の顕著な減少が起こったが、これは卵PCで予期されるものであり、その他の脂質についても評価する必要がある。

#### 【0094】

(卵巣癌細胞での葉酸受容体(FR)のノックダウン)

本発明者の目的は、高レベルのFRを発現する卵巣癌細胞株を実験用を選択し、一方で負の対照としてFRを発現しない細胞株を用いることであった。RT-PCRによって検討した卵巣癌細胞株には、OVCA432、OVCA420、SKOV-3、DOV13、OVCA433、OVCA429、及びOVEA6が含まれた。図12には、FRの過剰発現対象であるSKOV-3及びOVCA432を示す。OVCA432及びSKOV-3では高レベルのFRが以前に報告されているが、本明細書で評価するその他の細胞株は以前には検討されていなかった。将来的な実験のFR陽性細胞株としてはSKOV-3細胞を用いるつもりである。

#### 【0095】

本発明者は、RNAi(オリジーン社(Origene)、メリーランド州ロックビル)を用いてSKOV-3細胞におけるFRの発現をノックダウンし、葉酸-PEG機能化ナノ担体の取り込みが無くなることを見い出した。このことは、FRを介したこれらのナノ担体の取り込みの特異性を示している(図13)。

#### 【0096】

(参考文献)

1. Scully, R., R. Young, and P. Clement, Tumors of the ovary, maldeveloped gona 50

- ds, allopian tube, and broad ligament. Atlas of Tumor Pathology, ed. J. Rosia and L. Sobin. Vol. Fascicle 23. 1998, Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology.
- 2 . Metzger-Filho, O., C. Moulin, and V. D'Hondt, First-line systemic treatment of ovarian cancer: a critical review of available evidence and expectations for future directions. *Curr Opin Oncol*, 2010. 22(5): p. 513-520.
- 3 . Zeimet, A.G.  $\bar{\delta}$ , Pros and cons of intraperitoneal chemotherapy in the treatment of epithelial ovarian cancer. *Anticancer Res*, 2009. 29(7): p. 2803-8.
- 4 . Markman, M. and J.L. Walker, Intraperitoneal chemotherapy of ovarian cancer: a review, with a focus on practical aspects of treatment. *J Clin Oncol*, 2006. 24(6): p. 988-994. 10
- 5 . Liu, J. and U.A. Matulonis, New advances in ovarian cancer. *Oncology (Williston Park)*, 2010. 24(8): p. 721-728.
- 6 . Filippovich, I.V.  $\bar{\delta}$ , Radiation-induced apoptosis in human ovarian carcinoma cells growing as a monolayer and as multicell spheroids. *Int J Cancer*, 1997. 72(5): p. 851-9.
- 7 . Makhija, S.  $\bar{\delta}$ , Taxol-induced bcl-2 phosphorylation in ovarian cancer cell monolayer and spheroids. *Int J Oncol*, 1999. 14(3): p. 515-21.
- 8 . Bardies, M.  $\bar{\delta}$ , Use of multi-cell spheroids of ovarian carcinoma as an intraperitoneal radio-immunotherapy model: uptake, retention kinetics and dosimetric evaluation. *Int J Cancer*, 1992. 50(6): p. 984-991. 20
- 9 . Shield, K.  $\bar{\delta}$ , Multicellular spheroids in ovarian cancer metastases: Biology and pathology. *Gynecol Oncol*, 2009. 113(1): p. 143-8.
- 10 . Bapat, S.A., Human ovarian cancer stem cells. *Reproduction*, 2010. 140(1): p. 33-41.
- 11 . Fong, M.Y. and S.S. Kakar, The role of cancer stem cells and the side population in epithelial ovarian cancer. *Histol Histopathol*, 2010. 25(1): p. 113-20.
- 12 . Ponnusamy, M.P. and S.K. Batra, Ovarian cancer: emerging concept on cancer stem cells. *J Ovarian Res*, 2008. 1(1): p. 4.
- 13 . Freedman, R.S.  $\bar{\delta}$ , Peritoneal inflammation -A microenvironment for Epithelial Ovarian Cancer (EOC). *J Transl Med*, 2004. 2(1): p. 23. 30
- 14 . Negus, R.P.  $\bar{\delta}$ , Quantitative assessment of the leukocyte infiltrate in ovarian cancer and its relationship to the expression of C-C chemokines. *Am J Pathol*, 1997. 150(5): p. 1723-34.
- 15 . Babior, B.M.  $\bar{\delta}$ , Investigating antibody-catalyzed ozone generation by human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(6): p. 3031-4.
- 16 . Wentworth, P., Jr.  $\bar{\delta}$ , Evidence for antibody-catalyzed ozone formation in bacterial killing and inflammation. *Science*, 2002. 298(5601): p. 2195-9.
- 17 . Wentworth, P., Jr.  $\bar{\delta}$ , Evidence for ozone formation in human atherosclerotic arteries. *Science*, 2003. 302(5647): p. 1053-6. 40
- 18 . Wentworth, P., Jr.  $\bar{\delta}$ , Antibody catalysis of the oxidation of water. *Science*, 2001. 293(5536): p. 1806-11.
- 19 . Freeman, B.A., M. Sharman, and J.B. Mudd, Reaction of ozone with phospholipid vesicles and human erythrocyte ghosts. *Arch Biochem Biophys*, 1979. 197(1): p. 264-72.
- 20 . Teige, B., T.T. McManus, and J.B. Mudd, Reaction of ozone with phosphatidylcholine liposomes and the lytic effect of products on red blood cells. *Chem Phys Lipids*, 1974. 12(3): p. 153-71.
- 21 . Giamalva, D.H., D.F. Church, and W.A. Pryor, Effect of bilayer structure on the rates of reaction of ozone with polyunsaturated fatty acids in phosphatidyl 50

choline liposomes. *Chem Res Toxicol*, 1988. 1(3): p. 144-5.

2 2 . Parikh, A.N., Membrane-substrate interface: phospholipid bilayers at chemically and topographically structured surfaces. *Biointerphases*, 2008. 3(2): p. FA 22.

2 3 . Sanii, B. and A.N. Parikh, Patterning fluid and elastomeric surfaces using short-wavelength UV radiation and photogenerated reactive oxygen species. *Annu Rev Phys Chem*, 2008. 59: p. 411-32.

2 4 . Yu, C, A.N. Parikh, and J.T. Groves, Direct patterning of membrane-derivatized colloids using in-situ UV-ozone photolithography. *Adv Mater*, 2005. 17(12): p. 1477-1480.

2 5 . Steinbeck, M.J., A.U. Khan, and M.J. Kamovsky, Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap. *J Biol Chem*, 1992. 267(19): p. 13425-33.

2 6 . Steinbeck, M. J., A.U. Khan, and M.J. Kamovsky, Extracellular production of singlet oxygen by stimulated macrophages quantified using 9,10-diphenylanthracene and perylene in a polystyrene film. *J Biol Chem*, 1993. 268(21): p. 15649-54.

2 7 . Piyasena, M.E. S, Biosensors based on release of compounds upon disruption of lipid bilayers supported on porous microspheres *Biointerphases*, 2008. 3(2): p. 38-49.

2 8 . Chemburu, S. S, Biomimetic silica microspheres in biosensing. *Molecules*, 2010. 15(3): p. 1932-1957.

2 9 . Troutier, A.L. and C. Ladaviere, An overview of lipid membrane supported by colloidal particles. *Adv Colloid Interface Sci*, 2007. 133(1): p. 1-21.

3 0 . Jemal, A. S, Cancer Statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*, 2010.

3 1 . Auersperg, N. S, Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocr Rev*, 2001. 22(2): p. 255-88.

3 2 . Hudson, L.G., R. Zeineldin, and M.S. Stack, Phenotypic plasticity of neoplastic ovarian epithelium: unique cadherin profiles in tumor progression. *Clin Exp Metastasis*, 2008. 25(6): p. 643-55.

3 3 . Lengyel, E., Ovarian Cancer Development and Metastasis. *Am J Pathol*, 2010.

3 4 . Heintz, A.P. S, Carcinoma of the ovary. FIGO 6th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *Int J Gynaecol Obstet*, 2006. 95 Suppl 1: p. S161-S192.

3 5 . Williams, T.I. S, Epithelial ovarian cancer: disease etiology, treatment, detection, and investigational gene, metabolite, and protein biomarkers. *J. Proteome Res*, 2007. 6(8): p. 2936-2962.

3 6 . Gubbels, J.A. S, The detection, treatment, and biology of epithelial ovarian cancer. *J Ovarian Res*, 2010. 3: p. 8.

3 7 . Shan, W. and J. Liu, Inflammation: a hidden path to breaking the spell of ovarian cancer. *Cell Cycle*, 2009. 8(19): p. 3107-11.

3 8 . Guruvayoorappan, C, Tumor versus tumor-associated macrophages: how hot is the link? *Integr Cancer Ther*, 2008. 7(2): p. 90-5.

3 9 . Datta, D. S, Mechanism for antibody catalysis of the oxidation of water by singlet dioxygen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(5): p. 2636-41.

4 0 . Lerner, R.A. and A. Eschenmoser, Ozone in biology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(6): p. 3013-5.

4 1 . Brinkhorst, J., S.J. Nara, and D.A. Pratt, Hock cleavage of cholesterol Sa lpha-hydroper oxide: an ozone free pathway to the cholesterol ozonolysis products identified in arterial plaque and brain tissue. *J Am Chem Soc*, 2008. 130(37): p. 12224-5.

10

20

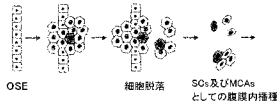
30

40

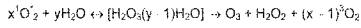
50

- 4 2 . Uemi, M.  $\delta$ , Generation of cholesterol carboxyaldehyde by the reaction of singlet molecular oxygen [O<sub>2</sub> (1 $\Delta$ (g))] as well as ozone with cholesterol. *Chem Res Toxicol*, 2009. 22(5): p. 875-84.
- 4 3 . Wentworth, A.D.  $\delta$ , The ratio of cholesterol 5,6-secosterols formed from ozone and singlet oxygen offers insight into the oxidation of cholesterol in vivo. *Chem Commun (Camb)*, 2009(21): p. 3098-100.
- 4 4 . Drahl, C, Probing For In-Body Ozone: Molecule hunters need better traps to prove that a wily oxygen species is made in the flesh. *Chem & Eng News*, 2009. 87(25): p. 40-42.
- 4 5 . Dedrick, R.L.  $\delta$ , Pharmacokinetic rationale for peritoneal drug administration in the treatment of ovarian cancer. *Cancer Treat Rep*, 1978. 62(1): p. 1-11. 10
- 4 6 . Howell, S.B., Pharmacologic principles of intraperitoneal chemotherapy for the treatment of ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 2008. 18 Suppl 1: p. 20-5.
- 4 7 . Travagli, V.  $\delta$ , A physicochemical investigation on the effects of ozone on blood. *Int J Biol Macromol*, 2007. 41(5): p. 504-11.
- 4 8 . Burgassi, S.  $\delta$ , How much ozone bactericidal activity is compromised by plasma components? *J Appl Microbiol*, 2009. 106(5): p. 1715-21.
- 4 9 . Yamashita, K.  $\delta$ , Ozone production by amino acids contributes to killing of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(44): p. 16912-7. 20
- 5 0 . Buranda, T.  $\delta$ , Biomimetic molecular assemblies on glass and mesoporous silica microbeads for biotechnology. *Langmuir*, 2003. 19(5): p. 1654-1663.
- 5 1 . Zeineldin, R.  $\delta$ , Detection of membrane biointeractions based on fluorescence superquenching. *Langmuir*, 2008. 24(8): p. 4125-31.
- 5 2 . Green, A.E. and P.G. Rose, Pegylated liposomal doxorubicin in ovarian cancer. *Int J Nanomedicine*, 2006. 1(3): p. 229-39.
- 5 3 . Hawkins, M.J., P. Soon-Shiong, and N. Desai, Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008. 60(8): p. 876-85.
- 5 4 . Cannistra, S.A., Evaluating new regimens in recurrent ovarian cancer: how much evidence is good enough? *J Clin Oncol*, 2010. 28(19): p. 3101-3103. 30
- 5 5 . Zeineldin, R. and L.G. Hudson, Epithelial cell migration in response to epidermal growth factor. *Methods Mol Biol*, 2006. 327: p. 147-158.
- 5 6 . Edwards, B.S.  $\delta$ , High-throughput cytotoxicity screening by propidium iodide staining. *Curr Protoc Cytom*, 2007. Chapter 9: p. Unit9 24.
- 5 7 . Barua, A.  $\delta$ , Anti-tumor and anti-ovarian autoantibodies in women with ovarian cancer. *Am J Reprod Immunol*, 2007. 57(4): p. 243-9.
- 5 8 . Luborsky, J.L.  $\delta$ , Anti-tumor antibodies in ovarian cancer. *Am J Reprod Immunol*, 2005. 54(2): p. 55-62.
- 5 9 . Piura, B. and E. Piura, Autoantibodies to tumor-associated antigens in epithelial ovarian carcinoma. *J Oncol*, 2009. 2009: p. 581939. 40

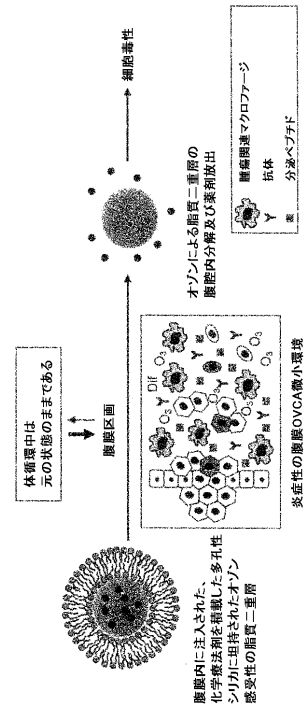
【 図 1 】



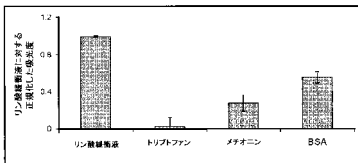
【 図 2 】



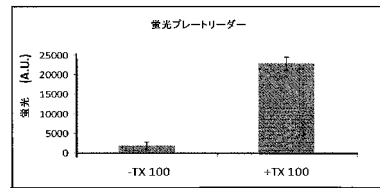
【 図 3 】



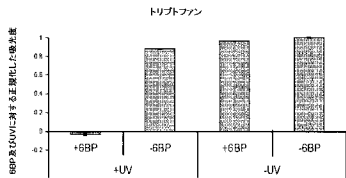
【 図 4 】



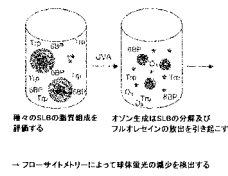
【 図 7 】



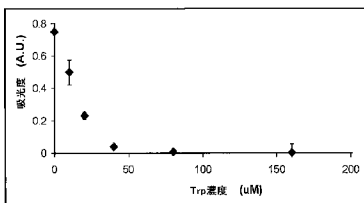
【 図 5 】



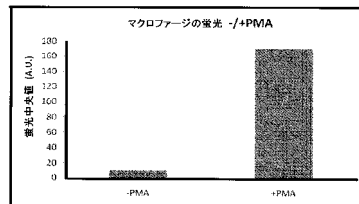
【 図 8 】



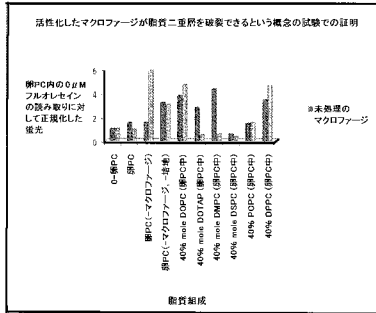
【 図 6 】



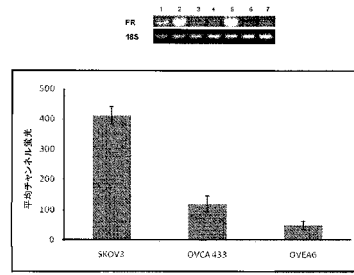
【 図 9 】



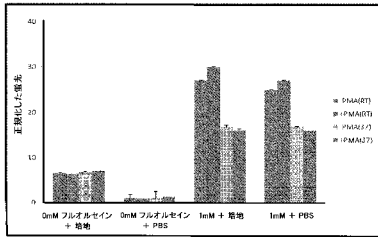
【図 10】



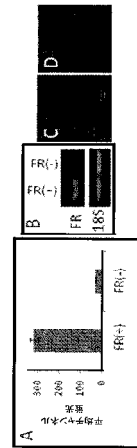
【図 12】



【図 11】



【図 13】





## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2012/047133

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

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

1.  Claims Nos.: 31-36  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 31-36 are directed to a treatment method of the human body by therapy under Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT.
2.  Claims Nos.: 32, 34, 40, 41  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
Claims 32, 34, 40 and 41 are unclear under PCT Article 6, because they refer to any one of multiple dependent claims which are not drafted in accordance with the third sentence of PCT Rule 6.4(a).
3.  Claims Nos.: 31, 33, 35, 39  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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



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

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
**PCT/US2012/047133**

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>	
<i>A61K 9/16(2006.01)i, A61K 9/14(2006.01)i, A61K 9/22(2006.01)i, A61K 47/48(2006.01)i, A61K 47/30(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i</i>	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>	
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 9/16; A61K 9/22; A61K 9/14; A61K 9/20; A61M 37/00; A61K 9/127; A61K 31/407	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eCOMPASS(KIPO internal) & Keywords: nanocarrier, porous, cancer, lipid bilayer, reactive oxygen species, ROS, polymer, intraperitoneal, nanoparticulate	
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages
X	US 2008-0279764 A1 (A. MANGANARO et al.) 13 November 2008 See abstract, paragraphs [0020], [0023]-[0025], [0031], and claims 1, 8, 14, 17, 29, 33-36, 40, 47, 59.
Y	
Y	WO 2010-078569 A2 (STC. UNM.) 08 July 2010 See abstract, paragraphs [0027], [0031], examples 1-11 and claims 1, 3, 8, 15.
A	
A	US 05820879 A (J. M. FERNANDEZ et al.) 13 October 1998 See abstract, lines 38 - 41 in column 2, and claims 1, 15.
A	US 2011-0105995 A1 (T. F. ZHU et al.) 05 May 2011 See paragraphs [0033], [0108], [0184] and claims 1, 3.
A	US 05277913 A (D. H. THOMPSON et al.) 11 January 1994 See abstract and claims 1, 14.
A	US 2002-0039594 A1 (E. C. UNGER) 04 April 2002 See paragraphs [0033], [0280] and claims 1, 9.
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.	
* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 14 NOVEMBER 2012 (14.11.2012)	Date of mailing of the international search report <b>16 NOVEMBER 2012 (16.11.2012)</b>
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer LEE, SUN HWA  Telephone No. 82-42-481-5606

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/US2012/047133**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2008-0279764 A1	13.11.2008	WO 2008-112565 A2	18.09.2008
		WO 2008-112565 A3	11.12.2008
		WO 2008-112565 A9	19.02.2009
WO 2010-078569 A2	08.07.2010	US 2011-268791 A1	03.11.2011
		WO 2010-078569 A3	18.11.2010
US 05820879 A	13.10.1998	EP 0591378 A1	31.03.1999
		EP 0591378 B1	31.03.1999
		EP 0684812 A1	06.12.1995
		EP 0684812 B1	21.01.1998
		JP 08-509956 A	22.10.1996
		KR 10-1994-0701261 A	28.05.1994
		US 05486509 A	23.01.1996
		US 05654006 A	05.08.1997
		US 05753261 A	19.05.1998
		US 05811124 A	22.09.1998
		US 2002-0035097 A1	21.03.2002
		US 6291443 B1	18.09.2001
		WO 93-00079 A1	07.01.1993
		WO 94-17786 A1	18.08.1994
		US 2011-0105995 A1	05.05.2011
WO 2009-091531 A3	23.07.2009		
US 05277913 A	11.01.1994	WO 93-04673 A1	18.03.1993
US 2002-0039594 A1	04.04.2002	AR 017752 A1	24.10.2001
		AU 2001-24585 A1	16.07.2001
		AU 2002-330886 A8	17.02.2003
		AU 2003-238936 A1	22.12.2003
		AU 2003-238936 A8	22.12.2003
		AU 7378798 A	08.12.1998
		CA 2395132 A1	12.07.2001
		EP 0981333 A1	01.03.2000
		EP 0983060 A1	08.03.2000
		EP 0983060 A4	24.04.2002
		EP 1246608 A1	09.10.2002
		EP 1551371 A2	13.07.2005
		JP 2001-524983 A	04.12.2001
		JP 2003-520210 A	02.07.2003
		JP 2010-280678 A	16.12.2010
		US 2001-0018072 A1	30.08.2001
		US 2002-0041898 A1	11.04.2002
		US 2002-0159952 A1	31.10.2002
		US 2003-0059465 A1	27.03.2003
		US 2004-0009229 A1	15.01.2004
US 2004-0091541 A1	13.05.2004		
US 6391687 B1	21.05.2002		

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/US2012/047133**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 6416740 B1	09.07.2002
		WO 01-49268 A1	12.07.2001
		WO 03-009881 A2	06.02.2003
		WO 03-103596 A2	18.12.2003
		WO 98-51282 A1	19.11.1998
		WO 98-51284 A1	19.11.1998

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K	31/675 (2006.01)	A 6 1 K	31/675
A 6 1 K	31/661 (2006.01)	A 6 1 K	31/661
A 6 1 K	31/7048 (2006.01)	A 6 1 K	31/7048
A 6 1 K	31/7068 (2006.01)	A 6 1 K	31/7068
A 6 1 K	31/4745 (2006.01)	A 6 1 K	31/4745
A 6 1 K	33/24 (2006.01)	A 6 1 K	33/24
A 6 1 K	31/337 (2006.01)	A 6 1 K	31/337
A 6 1 K	47/04 (2006.01)	A 6 1 K	47/04
A 6 1 K	47/02 (2006.01)	A 6 1 K	47/02
A 6 1 K	47/24 (2006.01)	A 6 1 K	47/24
A 6 1 K	47/28 (2006.01)	A 6 1 K	47/28
A 6 1 K	47/34 (2006.01)	A 6 1 K	47/34
A 6 1 K	47/36 (2006.01)	A 6 1 K	47/36
A 6 1 K	47/42 (2006.01)	A 6 1 K	47/42
A 6 1 K	9/16 (2006.01)	A 6 1 K	9/16
A 6 1 K	47/18 (2006.01)	A 6 1 K	47/18

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

Fターム(参考) 4C076 AA19 AA95 BB11 CC27 DD09H DD21A DD29A DD63H DD70H EE22A  
 EE23H EE24A EE30A EE36A EE41A EE43A EE48A FF02 FF21  
 4C084 AA17 MA66 NA10 NA13 ZB261 ZC202 ZC412  
 4C085 AA14 CC23 EE01 EE05 GG06  
 4C086 AA01 BA02 CB22 DA34 EA11 EA17 HA12 HA24 HA26 HA28  
 MA03 MA05 MA66 NA10 NA13  
 4C206 AA01 FA53 MA03 MA05 MA86 NA10 NA13