

(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2014-512409

(P2014-512409A)

(43) 公表日 平成26年5月22日 (2014.5.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 9/16 (2006.01)	A 6 1 K 9/16	4 C 0 7 6
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 9/127 (2006.01)	A 6 1 K 9/127	4 C 0 8 5
A 6 1 K 47/24 (2006.01)	A 6 1 K 47/24	4 C 0 8 6
A 6 1 K 47/28 (2006.01)	A 6 1 K 47/28	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 77 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2014-508125 (P2014-508125)	(71) 出願人	503128320
(86) (22) 出願日	平成24年4月27日 (2012.4.27)		エスティーシー、 ユーエヌエム
(85) 翻訳文提出日	平成26年1月6日 (2014.1.6)		S T C. U N M
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/035529		アメリカ合衆国 ニューメキシコ 8 7 1
(87) 国際公開番号	W02012/149376		0 6, アルバカーキ, ユニバーシティ
(87) 国際公開日	平成24年11月1日 (2012.11.1)		ブルバード サウスイースト 8 0 1
(31) 優先権主張番号	61/479, 847		, スイート 1 0 1
(32) 優先日	平成23年4月28日 (2011.4.28)	(71) 出願人	513271380
(33) 優先権主張国	米国 (US)		サンディア コーポレーション
			アメリカ合衆国 ニューメキシコ州 8 7
			1 2 3, アルバカーキ, パーバンク
			サウスイースト 1 5 1 5
		(74) 代理人	100158920
			弁理士 上野 英樹
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 標的送達用の多孔性ナノ粒子に担持された脂質二重層（プロトセル）及びその使用方法

(57) 【要約】

本発明は、肝細胞癌細胞及びその他の癌細胞の特異的標的のためのプロトセルに関する。プロトセルは、担持された脂質二重層を有するナノ多孔性シリカコアと、癌細胞死を促進する又はレポーターとしての少なくとも1つの薬剤（従来の小分子、高分子カーゴ（例えば、s i R N A 又はタンパク質毒素（リシン毒素 A 鎖又はジフテリア毒素 A 鎖など））、及び/又はヒストンでパッケージングされてナノ多孔性シリカコア中に配置されたプラスミド D N A（D N A をプロトセル中により効率的にパッケージングするためには好ましくは超らせんである。任意で、プロトセルを癌細胞の核内に局在させることを助ける核局在配列及び癌細胞の治療（アポトーシス/細胞死）に関与するペプチドを発現する能力を助ける核局在配列で任意で修飾される。）と、標的細胞へのプロトセルの結合が特異的かつ増強されるように治療される組織中の癌細胞を標的にするターゲティングペプチドと、プロトセル及び被包された D N A のエンドソーム脱出を促進する融合ペプチドとを含む。本発明のプロトセルは、肝細胞組織に選択的に結合する新規の結合ペプチド（c - M E T ペプチド）を用いて癌（特に肝細胞（肝臓）癌を含む）を治療するために、又は癌の診断（癌治療及び創薬を含む）において作用するために用いられることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞を標的にする多孔性プロトセルであって、前記プロトセルは、担持された脂質二重層を有するナノ多孔性のシリカコア又は金属酸化物コアと、少なくとも 1 つの更なる成分とを含み、前記少なくとも 1 つの更なる成分が、

細胞を標的にする化学種と、

プロトセル及び被包された DNA のエンドソーム脱出を促進する融合ペプチドと、

二本鎖直鎖 DNA、プラスミド DNA、薬物、造影剤、短鎖干渉 RNA、短鎖ヘアピン RNA、マイクロ RNA、又はそれらの混合物からなる群から選択される少なくとも 1 つのカーゴ成分を含むその他のカーゴと、
からなる群から選択され、前記カーゴ成分の 1 つが任意で更に核局在配列でコンジュゲートされる、プロトセル。

10

【請求項 2】

前記シリカコアが球形であり、直径が約 10 nm ~ 約 250 nm の範囲である、請求項 1 に記載のプロトセル。

【請求項 3】

前記シリカコアが約 150 nm の平均直径を有する、請求項 2 に記載のプロトセル。

【請求項 4】

前記シリカコアが、単分散又は多分散のサイズ分布である、請求項 2 又は 3 に記載のプロトセル。

20

【請求項 5】

前記シリカコアが単分散である、請求項 2 又は 3 に記載のプロトセル。

【請求項 6】

前記シリカコアが多分散である、請求項 2 又は 3 に記載のプロトセル。

【請求項 7】

前記脂質二重層は、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DOPC)、1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DPPC)、1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DSPC)、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホル - L - セリン] (DOPS)、1, 2 - ジオレオイル - 3 - トリメチルアンモニウム - プロパン (18 : 1 の DOTAP)、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - (1' - rac - グリセロール) (DOPG)、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (DOPE)、1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (DPPE)、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ (ポリエチレングリコール) - 2000] (18 : 1 PEG - 2000 PE)、1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ (ポリエチレングリコール) - 2000] (16 : 0 の PEG - 2000 PE)、1 - オレオイル - 2 - [12 - [(7 - ニトロ - 2 - 1, 3 - ベンゾオキサジアゾール - 4 - イル) アミノ] ラウロイル] - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (18 : 1 ~ 12 : 0 の NBD - PC)、1 - パルミトイル - 2 - {12 - [(7 - ニトロ - 2 - 1, 3 - ベンゾオキサジアゾール - 4 - イル) アミノ] ラウロイル} - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (16 : 0 - 12 : 0 の NBD - PC)、コレステロール、及びそれらの混合物からなる群から選択される脂質で構成される、請求項 1 から 6 のいずれかに記載のプロトセル。

30

40

【請求項 8】

前記脂質二重層が、DOPC を DOPE と組み合わせて含む、請求項 1 から 7 のいずれかに記載のプロトセル。

【請求項 9】

前記脂質二重層が、DOTAP、DOPG、DOPC、又はそれらの混合物を含む、請求項 1 から 7 のいずれかに記載のプロトセル。

【請求項 10】

50

前記脂質二重層が D O P G 及び D O P C を含む、請求項 1 から 7 のいずれかに記載のプロトセル。

【請求項 1 1】

前記脂質二重層が更にコレステロールを含む、請求項 8 から 1 0 のいずれかに記載のプロトセル。

【請求項 1 2】

前記脂質二重層が、D O P C を約 5 w t % の D O P E 、約 3 0 w t % のコレステロール、及び約 1 0 w t % の P E G - 2 0 0 0 P E (1 8 : 1) と組み合わせて含む、請求項 1 から 7 のいずれかに記載のプロトセル。

【請求項 1 3】

脂質二重層が、約 5 w t % の D O P E 、約 5 w t % の P E G 、約 3 0 w t % のコレステロール、約 6 0 w t % の D O P C 及び / 又は D P P C を含む、請求項 1 から 7 のいずれかに記載のプロトセル。

【請求項 1 4】

前記 P E G が前記 D O P E にコンジュゲートされる、請求項 1 3 に記載のプロトセル。

【請求項 1 5】

前記細胞を標的にする化学種がターゲティングペプチドである、請求項 1 から 1 4 のいずれかに記載のプロトセル。

【請求項 1 6】

前記ターゲティングペプチドが S P 9 4 ペプチドである、請求項 1 5 に記載のプロトセル。

【請求項 1 7】

前記ターゲティングペプチドが配列番号 6 、配列番号 7 、又は配列番号 8 である、請求項 1 6 に記載のプロトセル。

【請求項 1 8】

前記ターゲティングペプチドが、配列番号 1 、配列番号 2 、配列番号 3 、配列番号 4 、又は配列番号 5 による M E T 結合ペプチドである、請求項 1 5 に記載のプロトセル。

【請求項 1 9】

前記融合タンパク質が、H 5 W Y G ペプチド (配列番号 1 3) 又はポリアルギニンの 8 m e r (配列番号 1 4) である、請求項 1 から 1 8 のいずれかに記載のプロトセル。

【請求項 2 0】

前記融合ペプチドが配列番号 1 3 である、請求項 1 9 に記載のプロトセル。

【請求項 2 1】

プラスミド D N A を含み、該プラスミド D N A が核局在配列を発現するために任意で修飾される、請求項 1 から 2 0 に記載のプロトセル。

【請求項 2 2】

前記プラスミド D N A が、超らせんプラスミド D N A 又はパッケージングされたプラスミド D N A である、請求項 2 1 に記載のプロトセル。

【請求項 2 3】

前記 D N A が、超らせん化かつパッケージングされたプラスミド D N A である、請求項 2 2 に記載のプロトセル。

【請求項 2 4】

前記プラスミド D N A が核局在配列を発現するために修飾される、請求項 2 0 から 2 3 のいずれかに記載のプロトセル。

【請求項 2 5】

前記 D N A が、ヒストンでパッケージングされた超らせんプラスミド D N A であって、ヒトのヒストンタンパク質の混合物を含む、請求項 2 1 から 2 4 のいずれかに記載のプロトセル。

【請求項 2 6】

ヒストンの前記混合物が、H 1 、H 2 A 、H 2 B 、H 3 、及び H 4 からなる、請求項 2

10

20

30

40

50

5 に記載のプロトセル。

【請求項 27】

ヒストンの前記混合物が、H1、H2A、H2B、H3、及びH4であって1:2:2:2:2の重量比である、請求項25に記載のプロトセル。

【請求項 28】

前記プラスミドDNAが、ポリペプチド毒素、短鎖ヘアピンRNA(s h RNA)、又は短鎖干渉RNA(s i RNA)を発現可能である、請求項1から27のいずれかに記載のプロトセル。

【請求項 29】

前記ポリペプチド毒素が、リシン毒素A鎖又はジフテリア毒素A鎖からなる群から選択される、請求項28に記載のプロトセル。

【請求項 30】

前記短鎖ヘアピンRNA又は前記短鎖干渉RNAが、細胞のアポトーシスを誘導する、請求項1又は28に記載のプロトセル。

【請求項 31】

前記DNAがレポータータンパク質を発現可能である、請求項1から30のいずれかに記載のプロトセル。

【請求項 32】

前記レポータータンパク質が、緑色蛍光タンパク質又は赤色蛍光タンパク質である、請求項31に記載のプロトセル。

【請求項 33】

前記核局在配列が、配列番号9、配列番号10、配列番号11、又は配列番号12のペプチドである、請求項1から32のいずれかに記載のプロトセル。

【請求項 34】

前記核局在配列が配列番号9のペプチドである、請求項1から33のいずれかに記載のプロトセル。

【請求項 35】

前記薬物として抗癌剤を更に含む、請求項1から34のいずれかに記載のプロトセル。

【請求項 36】

前記抗癌剤が、エベロリムス、トラベクテジン、アブラキサン、TLK286、AV-299、DN-101、パゾパニブ、GSK690693、RTA744、ON0910.Na、AZD6244(ARRY-142886)、AMN-107、TKI-258、GSK461364、AZD1152、エンザスタウリン、バンデタニブ、ARQ-197、MK-0457、MLN8054、PHA-739358、R-763、AT-9263、FLT-3インヒビター、VEGFRインヒビター、EGFR-TKインヒビター、オーロラキナーゼインヒビター、PIK-1修飾剤、Bcl-2インヒビター、HDACインヒビター、c-METインヒビター、PARPインヒビター、Cdkインヒビター、EGFR-TKインヒビター、IGFR-TKインヒビター、抗HGF抗体、PI3キナーゼインヒビター、AKTインヒビター、JAK/STATインヒビター、チェックポイント-1又は2のインヒビター、接着斑キナーゼインヒビター、Mapキナーゼキナーゼ(mek)インヒビター、VEGFトラップ抗体、ペメトレキセド、エルロチニブ、ダサタニブ(dasatinib)、ニロチニブ、デカタニブ(decatanib)、パニツムマブ、アムルピシン、オレゴボマブ、Lep-etu、ノラトレキシド、azd2171、バタブリン、オフアツムマブ、ザノリムマブ、エドテカリン、テトランドリン、ルビテカン、テスミリフェン、オブリメルセン、チシリムマブ、イビリムマブ、ゴシポール、Bio111、131-I-TM-601、ALT-110、BIO140、CC8490、シレンギチド、ギマテカン、IL13-PE38QQR、INO1001、IPdR₁KRX-0402、ルカントン、LY317615、ノイラジアブ(neuradiab)、ピテスペン、RTA744、Sdx102、タランパネル、アトラセンタン、Xr311、ロミデプシン、ADS-100380、スニチニブ、5-フルオロウラシル、ポリノスタット、エトボ

10

20

30

40

50

シド、ゲムシタピン、ドキシソルピシン、リボソームドキシソルピシン、5'-デオキシ-5-フルオロウリジン、ピンクリスチン、テモゾロミド、ZK-304709、セリシクリブ；PD0325901、AZD-6244、カペシタピン、L-グルタミン酸、N-[4-[2-(2-アミノ-4,7-ジヒドロ-4-オキソ-1H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-5-イル)エチル]ベンゾイル]-ニナトリウム塩(七水和物)、カンプトテシン、PEG標識イリノテカン、タモキシフェン、トレミフェンクエン酸塩、アナストラゾール、エキセメスタン、レトロゾール、DES(ジエチルスチルベストロール)、エストラジオール、エストロゲン、結合型エストロゲン、ベバシズマブ、IMC-1C11、CHIR-258,);3-[5-(メチルスルホニルピペラジンメチル)-インドリル-キノロン、パタラニブ、AG-013736、AVE-0005、[D-Ser(But)6,Azgly10]酢酸塩(ピロ-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(But)-Leu-Arg-Pro-Azgly-NH₂酢酸[C₅₉H₈₄N₁₈O₁₄-(C₂H₄O₂)_x,x=1~2.4]、ゴセレリン酢酸塩、リユープロリド酢酸塩、トリプトレリンパモ酸塩、酢酸メドロキシプロゲステロン、カブロン酸ヒドロキシプロゲステロン、酢酸メゲストロール、ラロキシフェン、ピカルタミド、フルタミド、ニルタミド、酢酸メゲストロール、CP-724714;TAK-165、HKI-272、エルロチニブ、ラパタニブ、カネルチニブ、ABX-EGF抗体、アービタックス、EKB-569、PKI-166、GW-572016、ロナファルニブ、BMS-214662、チピファルニブ;アミホスチン、NVP-LAQ824、ヒドロキサミン酸サブエロイルアニリド、バルプロ酸、トリコスタチンA、FK-228、SU11248、ソラフェニブ、KRN951、アミノグルテチミド、アムサクリン、アナグレリド、L-アスパラギナーゼ、カルメット・ゲラン桿菌(BCG)ワクチン、プレオマイシン、ブセレリン、ブスルファン、カルボプラチン、カルムスチン、クロラムブシル、シスプラチン、クラドリピン、クロドロネート、シプロテロン、シタラビン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、ジエチルスチルベストロール、エビルピシン、フルダラビン、フルドコロチゾン、フルオキシメステロン、フルタミド、ゲムシタピン、グリベック(glee vac)、ヒドロキシ尿素、イダルピシン、イホスファミド、イマチニブ、ロイプロリド、レバミゾール、ロムスチン、メクロレタミン、メルファラン、6-メルカプトプリン、メスナ、メトトレキサート、ミトマイシン、ミトタン、ミトキサントロン、ニルタミド、オクトレオチド、オキサリプラチン、パミドロネート、ペントスタチン、プリカマイシン、ボルフィマー、プロカルバジン、ラルチトレキセド、リツキシマブ、ストレプトゾシン、テニポシド、テストステロン、サリドマイド、チオグアニン、チオテパ、トレチノイン、ビンデシン、13-cis-レチノイン酸、フェニルアラニンマスタード、ウラシルマスタード、エストラムスチン、アルトレタミン、フロクスウリジン、5-デオキシウリジン、シトシンアラビノシド、6-メルカプトプリン、デオキシコホルマイシン、カルシトリオール、バルルピシン、ミトラマイシン、ビンブラスチン、ビノレルビン、トボテカン、ラゾキシシン、マリマスタット、COL-3、ネオバスタット、BMS-275291、スクアラミン、エンドスタチン、SU5416、SU6668、EMD121974、インターロイキン-12、IM862、アンギオスタチン、ビタキシシン、ドロロキシフェン、イドキシフェン、スピロノラクトン、フィナステリド、シメチジン、トラスツズマブ、デニロイキンジフチトクス、ゲフィチニブ、ボルテゾミブ、パクリタキセル、クレモホール非含有パクリタキセル、ドセタキセル、エピチロン(epithilone)B、BMS-247550、BMS-310705、ドロロキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェン、ピペンドキシフェン、ERA-923、アルゾキシフェン、フルベストラント、アコルピフェン、ラソフォキシフェン、イドキシフェン、TSE-424、HMR-3339、ZK186619、トボテカン、PTK787/ZK222584、VX-745、PD184352、ラパマイシン、40-O-(2-ヒドロキシエチル)-ラパマイシン、テムシロリムス、AP-23573、RAD001、ABT-578、BC-210、LY294002、LY292223、LY292696、LY293684、LY293646、ワートマニン、ZM336372、L-779,450、PEG-フィルグラスチム、ダ

10

20

30

40

50

ルベポエチン、エリスロポエチン、顆粒球コロニー刺激因子、ゾレンドロネート (zolendronate)、プレドニゾン、セツキシマブ、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子、ヒストレリン、PEG化インターフェロン - 2a、インターフェロン - 2a、PEG化インターフェロン - 2b、インターフェロン - 2b、アザシチジン、PEG-L-アスパラギナーゼ、レナリドマイド、ゲムツズマブ、ヒドロコルチゾン、インターロイキン - 11、デクスラゾキサ、アレムツズマブ、全トランスレチノイン酸、ケトコナゾール、インターロイキン - 2、メガストロール、免疫グロブリン、ナイトロジェンマスタード、メチルプレドニゾン、イブリットモマブチウキセタン、エンドロゲン、デシタビン、ヘキサメチルメラミン、ベキサロテン、トシツモマブ、三酸化ヒ素、コルチゾン、エチドロロン酸、ミトタン、シクロスポリン、ダウノルビシンリボソーム、エルウィニア - アスパラギナーゼ、ストロンチウム 89、カソピタント、ネツピタント、NK - 1 受容体アンタゴニスト、パロノセトロン、アプレピタント、ジフェンヒドラミン、ヒドロキシジン、メトクロプラミド、ロラゼパム、アルブラゾラム、ハロペリドール、ドロペリドール、ドロナピノール、デキサメタゾン、メチルプレドニゾン、プロクロルペラジン、グラニセトロン、オンダンセトロン、ドラセロトン、トロピセトロン、ペグフィルグラスチム、エリスロポエチン、エポエチン、ダルベポエチン、又はそれらの混合物である、請求項 35 に記載のプロトセル。

10

【請求項 37】

前記薬物が抗ウイルス剤を含む、請求項 1 から 36 のいずれかに記載のプロトセル。

20

【請求項 38】

前記抗ウイルス剤が、抗 HIV 剤、抗 HBV 剤、又は抗 HCV 剤である、請求項 37 に記載のプロトセル。

【請求項 39】

担持された脂質二重層を有するナノ多孔性シリカコアと、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、又は配列番号 5 の MET 結合ペプチドとを含む、プロトセル。

【請求項 40】

前記 MET 結合ペプチドが配列番号 1 のペプチドである、請求項 31 に記載のプロトセル。

【請求項 41】

前記 MET 結合ペプチドが前記脂質二重層にコンジュゲートされる、請求項 39 又は 40 に記載のプロトセル。

30

【請求項 42】

前記プロトセルが、プロトセル及び被包された DNA のエンドソーム脱出を促進する融合ペプチド、プラスミド DNA、二本鎖直鎖 DNA、薬物、造影剤、短鎖干渉 RNA、短鎖ヘアピン RNA、及びマイクロ RNA からなる群から選択される少なくとも 1 つの成分を更に含み、前記プラスミド DNA、前記薬物、前記造影剤、及び / 又は前記 RNA が、更に核局在配列とコンジュゲートされる、請求項 39 から 41 のいずれかに記載のプロトセル。

【請求項 43】

前記薬物が少なくとも 1 つの抗癌剤を含む、請求項 42 に記載のプロトセル。

40

【請求項 44】

前記抗癌剤が、エベロリムス、トラベクテジン、アブラキサン、TLK286、AV - 299、DN - 101、パゾパニブ、GSK690693、RTA744、ON0910、Na、AZD6244 (ARRY - 142886)、AMN - 107、TKI - 258、GSK461364、AZD1152、エンザスタウリン、バンデタニブ、ARQ - 197、MK - 0457、MLN8054、PHA - 739358、R - 763、AT - 9263、FLT - 3 インヒビター、VEGFR インヒビター、EGFR - TK インヒビター、オーロラキナーゼインヒビター、PIK - 1 修飾剤、Bcl - 2 インヒビター、HDAC インヒビター、c - MET インヒビター、PARP インヒビター、Cdk インヒビター、EGFR - TK インヒビター、IGFR - TK インヒビター、抗 HGF 抗体、PI3

50

キナーゼインヒビター、AKTインヒビター、JAK/STATインヒビター、チェック
 ポイント-1又は2のインヒビター、接着斑キナーゼインヒビター、Mapキナーゼ
 ーゼ(mek)インヒビター、VEGFトラップ抗体、ペメトレキセド、エルロチニブ、
 ダサタニブ(dasatinib)、ニロチニブ、デカタニブ(decatanib)、パニツムマブ、アム
 ルピシン、オレゴボマブ、Lep-etu、ノラトレキシド、azd2171、バタブリ
 ン、オフアツムマブ、ザノリムマブ、エドテカリン、テトランドリン、ルビテカン、テス
 ミリフェン、オブリメルセン、チシリムマブ、イビリムマブ、ゴシポール、Bio111
 、131-I-TM-601、ALT-110、BIO140、CC8490、シレンギ
 チド、ギマテカン、IL13-PE38QQR、INO1001、IPdR₁KRX-0
 402、ルカントン、LY317615、ノイラジアブ(neuradiab)、ピテスペン、R
 ta744、Sdx102、タランパネル、アトラセンタン、Xr311、ロミデプシン
 、ADS-100380、スニチニブ、5-フルオロウラシル、ポリノスタット、エトボ
 シド、ゲムシタピン、ドキシソルピシン、リボソームドキシソルピシン、5'-デオキシ-5
 -フルオロウリジン、ピンクリスチン、テモゾロミド、ZK-304709、セリシクリ
 ブ; PD0325901、AZD-6244、カペシタピン、L-グルタミン酸、N-[
 4-[2-(2-アミノ-4,7-ジヒドロ-4-オキソ-1H-ピロロ[2,3-d]
 ピリミジン-5-イル)エチル]ベンゾイル]-ニナトリウム塩(七水和物)、カンプト
 テシン、PEG標識イリノテカン、タモキシフェン、トレミフェンクエン酸塩、アナスト
 ラゾール、エキセメスタン、レトロゾール、DES(ジエチルスチルベストロール)、エ
 ストラジオール、エストロゲン、結合型エストロゲン、ベバシズマブ、IMC-1C11
 、CHIR-258,); 3-[5-(メチルスルホニルピペラジンメチル)-インドリ
 ル-キノロン、パタラニブ、AG-013736、AVE-0005、[D-Ser(B
 ut)6, Azgly10]酢酸塩(ピロ-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-
 D-Ser(But)-Leu-Arg-Pro-Azgly-NH₂酢酸[C₅₉H₈₄N₁
 8O₁₄-(C₂H₄O₂)_x, x=1~2.4]、ゴセレリン酢酸塩、リユープロリド酢酸塩
 、トリプトレリンパモ酸塩、酢酸メドロキシプロゲステロン、カブロン酸ヒドロキシプロ
 ゲステロン、酢酸メゲストロール、ラロキシフェン、ピカルタミド、フルタミド、ニルタ
 ミド、酢酸メゲストロール、CP-724714; TAK-165、HKI-272、エ
 ルロチニブ、ラパタニブ、カネルチニブ、ABX-EGF抗体、アービタックス、EKB
 -569、PKI-166、GW-572016、ロナファルニブ、BMS-21466
 2、チピファルニブ; アミホスチン、NVP-LAQ824、ヒドロキシサミン酸サブエロ
 イルアニリド、バルプロ酸、トリコスタチンA、FK-228、SU11248、ソラフ
 ェニブ、KRN951、アミノグルテチミド、アムサクリン、アナグレリド、L-アスパ
 ラギナーゼ、カルメット・ゲラン桿菌(BCG)ワクチン、プレオマイシン、プセレリン
 、ブスルファン、カルボプラチン、カルムスチン、クロラムブシル、シスプラチン、クラ
 ドリピン、クロドロネート、シプロテロン、シタラビン、ダカルバジン、ダクチノマイシ
 ン、ダウノルピシン、ジエチルスチルベストロール、エピルピシン、フルダラビン、フル
 ドロコルチゾン、フルオキシメステロン、フルタミド、ゲムシタピン、グリベック(glee
 vac)、ヒドロキシ尿素、イダルピシン、イホスファミド、イマチニブ、ロイプロリド、
 レバミゾール、ロムスチン、メクロレタミン、メルファラン、6-メルカプトブリン、メ
 スナ、メトトレキサート、ミトマイシン、ミトタン、ミトキサントロン、ニルタミド、オ
 クトレオチド、オキサリプラチン、パミドロネート、ペントスタチン、プリカマイシン、
 ポルフィマー、プロカルバジン、ラルチトレキシド、リツキシマブ、ストレプトゾシン、
 テニボシド、テストステロン、サリドマイド、チオグアニン、チオテパ、トレチノイン、
 ビンデシン、13-cis-レチノイン酸、フェニルアラニンマスタード、ウラシルマス
 タード、エストラムスチン、アルトレタミン、フロクスウリジン、5-デオキシウリジン
 、シトシンアラビノシド、6-メルカプトブリン、デオキシコホルマイシン、カルシトリ
 オール、バルルピシン、ミトラマイシン、ピンブラスチン、ビノレルビン、トボテカン、
 ラゾキシ、マリマスタット、COL-3、ネオバスタット、BMS-275291、ス
 クアラミン、エンドスタチン、SU5416、SU6668、EMD121974、イン

10

20

30

40

50

ターロイキン - 12、IM862、アンギオスタチン、ピタキシン、ドロロキシフェン、イドキシフェン、スピロノラクトン、フィナステリド、シメチジン、トラスツズマブ、デニロイキンジフチトクス、ゲフィチニブ、ボルテゾミブ、バクリタキセル、クレモホル非含有バクリタキセル、ドセタキセル、エピチロン (epithilone) B、BMS - 247550、BMS - 310705、ドロロキシフェン、4 - ヒドロキシタモキシフェン、ピペンドキシフェン、ERA - 923、アルゾキシフェン、フルベストラント、アコルピフェン、ラソフォキシフェン、イドキシフェン、TSE - 424、HMR - 3339、ZK186619、トポテカン、PTK787 / ZK222584、VX - 745、PD184352、ラパマイシン、40 - O - (2 - ヒドロキシエチル) - ラパマイシン、テムシロリムス、AP - 23573、RAD001、ABT - 578、BC - 210、LY294002、LY292223、LY292696、LY293684、LY293646、ワートマニン、ZM336372、L - 779、450、PEG - フィルグラスチム、ダルベポエチン、エリスロポエチン、顆粒球コロニー刺激因子、ゾレンドロネート (zolendronate)、プレドニゾン、セツキシマブ、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子、ヒストレリン、PEG化インターフェロン - 2a、インターフェロン - 2a、PEG化インターフェロン - 2b、インターフェロン - 2b、アザシチジン、PEG - L - アスパラギナーゼ、レナリドマイド、ゲムツズマブ、ヒドロコルチゾン、インターロイキン - 11、デクスラゾキサ、アレムツズマブ、全トランスレチノイン酸、ケトコナゾール、インターロイキン - 2、メガストロール、免疫グロブリン、ナイトロジェンマスタード、メチルプレドニゾン、イブリットマブチウキセタン、エンドロゲン、デシタピン、ヘキサメチルメラミン、ベキサロテン、トシツモマブ、三酸化ヒ素、コルチゾン、エチドロロン酸、ミトタン、シクロスポリン、ダウノルビシンリボソーム、エルウィニア - アスパラギナーゼ、ストロンチウム89、カソピタント、ネツピタント、NK - 1受容体アンタゴニスト、パロノセトロン、アプレピタント、ジフェンヒドラミン、ヒドロキシジン、メトクロプラミド、ロラゼパム、アルブラゾラム、ハロペリドール、ドロペリドール、ドロナビノール、デキサメタゾン、メチルプレドニゾン、プロクロルペラジン、グラニセトロン、オndanセトロン、ドラセロトン、トロピセトロン、ペグフィルグラスチム、エリスロポエチン、エポエチン、ダルベポエチン、及びそれらの混合物からなる群から選択される、請求項43に記載のプロトセル。

10

20

30

【請求項45】

前記薬物が少なくとも1つの抗ウイルス剤を含む、請求項39から45のいずれかに記載のプロトセル。

【請求項46】

前記抗ウイルス剤が、抗HIV剤、抗HBV剤、抗HCV剤、又はそれらの混合物である、請求項45に記載のプロトセル。

【請求項47】

前記DNAが、少なくとも1つのレポーター分子を発現可能である、請求項39から46のいずれかに記載のプロトセル。

【請求項48】

プラスミドDNAを含み、前記プラスミドDNAが核局在配列を発現するために任意で修飾される、請求項39から47のいずれかに記載のプロトセル。

40

【請求項49】

前記DNAが、超らせんプラスミドDNA又はパッケージングされたプラスミドDNAである、請求項48に記載のプロトセル。

【請求項50】

前記DNAが、超らせん化かつパッケージングされたプラスミドDNAである、請求項49に記載のプロトセル。

【請求項51】

前記プラスミドDNAが核局在配列を発現するために修飾される、請求項48から51のいずれかに記載のプロトセル。

50

【請求項 5 2】

前記 DNA が、ヒストンでパッケージングされた超らせんプラスミド DNA であって、ヒトのヒストンタンパク質の混合物を含む、請求項 4 7 から 5 1 のいずれかに記載のプロトセル。

【請求項 5 3】

ヒストンの前記混合物が、H 1、H 2 A、H 2 B、H 3、及び H 4 からなる、請求項 5 2 に記載のプロトセル。

【請求項 5 4】

ヒストンの前記混合物が、H 1、H 2 A、H 2 B、H 3、及び H 4 であって、1 : 2 : 2 : 2 : 2 の重量比である、請求項 5 3 に記載のプロトセル。

10

【請求項 5 5】

前記プラスミド DNA が、ポリペプチド毒素、短鎖ヘアピン RNA (s h RNA)、又は短鎖干渉 RNA (s i RNA) を発現可能である、請求項 4 8 から 5 4 のいずれかに記載のプロトセル。

【請求項 5 6】

前記ポリペプチド毒素が、リシン毒素 A 鎖又はジフテリア毒素 A 鎖からなる群から選択される、請求項 5 5 に記載のプロトセル。

【請求項 5 7】

前記短鎖ヘアピン RNA 又は前記短鎖干渉 RNA が、細胞のアポトーシスを誘導する、請求項 5 5 に記載のプロトセル。

20

【請求項 5 8】

前記プラスミド DNA がレポータータンパク質を発現可能である、請求項 4 8 から 5 7 のいずれかに記載のプロトセル。

【請求項 5 9】

前記レポータータンパク質が、緑色蛍光タンパク質又は赤色蛍光タンパク質である、請求項 5 8 に記載のプロトセル。

【請求項 6 0】

前記核局在配列が、配列番号 9、配列番号 1 0、配列番号 1 1、又は配列番号 1 2 のペプチドである、請求項 3 9 から 5 9 のいずれかに記載のプロトセル。

【請求項 6 1】

前記核局在配列が配列番号 9 のペプチドである、請求項 6 0 に記載のプロトセル。

30

【請求項 6 2】

治療効果を達成するための有効な量の請求項 1 から 6 1 のいずれかに記載の一群のプロトセルを、医薬的に許容される担体、添加剤、又は賦形剤と組み合わせて含む、医薬組成物。

【請求項 6 3】

プロトセル内にカーゴとして配置されない薬物を更に含む、請求項 6 2 に記載の組成物。

【請求項 6 4】

前記薬物が、抗癌剤又は抗ウイルス剤である、請求項 6 3 に記載の組成物。

40

【請求項 6 5】

前記抗ウイルス剤が、抗 HIV 剤、抗 HBV 剤、抗 HCV 剤、又はそれらの混合物である、請求項 6 4 に記載の組成物。

【請求項 6 6】

非経口剤形である請求項 6 2 から 6 5 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 6 7】

前記剤形が、皮内、筋肉内、骨内、腹腔内、静脈内、皮下、又は髄腔内投与の剤形である、請求項 6 6 に記載の組成物。

【請求項 6 8】

局所剤形又は経皮剤形である、請求項 6 2 から 6 5 のいずれかに記載の組成物。

50

【請求項 69】

配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、又は配列番号 5 の M E T 結合ペプチド。

【請求項 70】

請求項 69 に記載の配列番号 1 の M E T 結合ペプチド。

【請求項 71】

請求項 69 又は 70 に記載の M E T 結合ペプチドを含む医薬組成物。

【請求項 72】

抗癌剤、及び抗 H B V 剤、抗 H C V 剤、又はそれらの混合物と組み合わせて、肝細胞癌の細胞に対してプロトセルが選択的に結合するようにターゲティングペプチドを含む一群のプロトセルを含む、医薬組成物。

10

【請求項 73】

前記ターゲティングペプチドが、S 9 4 ペプチド、M E T 結合ペプチド、又はそれらの混合物からなる群から選択される、請求項 72 に記載の組成物。

【請求項 74】

前記抗癌剤が、ネクサパール（ソラフェニブ）、スニチニブ、ベバシズマブ、タルセバ（エルロチニブ）、タイカーブ（ラパチニブ）、又はそれらの混合物である、請求項 72 に記載の組成物。

【請求項 75】

前記抗 H B V 剤が、ヘブセラ（アデホビルジピボキシル）、ラミブジン、エンテカビル、テルビブジン、テノホビル、エムトリシタビン、クレブジン、バルトリシタビン（valt oricitabine）、アムドキシビル、プラデホビル、ラシビル、B A M 2 0 5、ニタゾキサニド、U T 2 3 1 - B、B a y 4 1 - 4 1 0 9、H 8 9 9、ザダキシニン（チモシン - 1）、又はそれらの混合物である、請求項 72 から 74 のいずれかに記載の組成物。

20

【請求項 76】

前記抗 H C V 剤が、ボセプレビル、ダクラタスビル、アスナプレビル、I N X - 1 8 9、F V - 1 0 0、N M 2 8 3、V X - 9 5 0（テラプレビル）、S C H 5 0 3 0 4、T M C 4 3 5、V X - 5 0 0、B X - 8 1 3、S C H 5 0 3 0 3 4、R 1 6 2 6、I T M N - 1 9 1（R 7 2 2 7）、R 7 1 2 8、P F - 8 6 8 5 5 4、T T 0 3 3、C G H - 7 5 9、G I 5 0 0 5、M K - 7 0 0 9、S I R N A - 0 3 4、M K - 0 6 0 8、A - 8 3 7 0 9 3、G S 9 1 9 0、G S 9 2 5 6、G S 9 4 5 1、G S 5 8 8 5、G S 6 6 2 0、G S 9 6 2 0、G S 9 6 6 9、A C H - 1 0 9 5、A C H - 2 9 2 8、G S K 6 2 5 4 3 3、T G 4 0 4 0（M V A - H C V）、A - 8 3 1、F 3 5 1、N S 5 A、N S 4 B、A N A 5 9 8、A - 6 8 9、G N I - 1 0 4、I D X 1 0 2、A D X 1 8 4、A L S - 2 2 0 0、A L S - 2 1 5 8、B I 2 0 1 3 3 5、B I 2 0 7 1 2 7、B I T - 2 2 5、B I T - 8 0 2 0、G L 5 9 7 2 8、G L 6 0 6 6 7、P S I - 9 3 8、P S I - 7 9 7 7、P S I - 7 8 5 1、S C Y - 6 3 5、リバビリン、P E G 化インターフェロン、P H X 1 7 6 6、S P - 3 0、又はそれらの混合物である、請求項 72 から 75 のいずれかに記載の組成物。

30

【請求項 77】

患者の癌細胞に抗癌剤を送達するように改変された請求項 1 から 61 のいずれかに記載のプロトセルの一群を含む組成物の有効量を、必要とする患者に投与することを含む、癌を治療する方法。

40

【請求項 78】

請求項 72 から 76 のいずれかに記載の組成物の有効量を患者に投与することを含む、肝細胞癌を治療する方法。

【請求項 79】

請求項 1 から 61 のいずれかに記載のプロトセルの一群の有効量を必要とする患者に投与することを含み、前記 D N A プラスミドが超らせんであって抗癌ポリペプチド及び／又は抗癌 R N A を発現するように改変され、任意で前記プロトセル内のカーゴとして処方さ

50

れる更なる抗癌剤の有効量と組み合わせられる、癌を治療する方法。

【請求項 80】

前記抗癌ポリペプチドが、リシン毒素 A 鎖又はジフテリア毒素 A 鎖である、請求項 79 に記載の方法。

【請求項 81】

前記 RNA が、癌細胞のアポトーシスを誘導する shRNA 又は siRNA である、請求項 79 又は 80 に記載の方法。

【請求項 82】

前記 siRNA が、s565、s7824、又は s10234 からなる群から選択される、請求項 79 から 81 のいずれかに記載の方法。

【請求項 83】

前記 shRNA が、細胞死を誘導するサイクリン B1 特異的 shRNA である、請求項 81 に記載の方法。

【請求項 84】

前記抗癌剤が、エベロリムス、トラベクテジン、アブラキサン、TLK286、AV-299、DN-101、パゾパニブ、GSK690693、RTA744、ON0910-Na、AZD6244 (ARRY-142886)、AMN-107、TKI-258、GSK461364、AZD1152、エンザスタウリン、バンデタニブ、ARQ-197、MK-0457、MLN8054、PHA-739358、R-763、AT-9263、FLT-3 インヒビター、VEGFR インヒビター、EGFR-TK インヒビター、オーロラキナーゼインヒビター、PIK-1 修飾剤、Bcl-2 インヒビター、HDAC インヒビター、c-MET インヒビター、PARP インヒビター、Cdk インヒビター、EGFR-TK インヒビター、IGFR-TK インヒビター、抗 HGF 抗体、PI3 キナーゼインヒビター、AKT インヒビター、JAK/STAT インヒビター、チェックポイント-1 又は 2 のインヒビター、接着斑キナーゼインヒビター、Map キナーゼ (mek) インヒビター、VEGF トラップ抗体、ベメトレキセド、エルロチニブ、ダサタニブ (dasatinib)、ニロチニブ、デカタニブ (decatanib)、パニツムマブ、アムルピシン、オレゴボマブ、Lep-etu、ノラトレキシド、azd2171、パタブリン、オフアツムマブ、ザノリムマブ、エドテカリン、テトランドリン、ルビテカン、テスミリフェン、オブリメルセン、チシリムマブ、イピリムマブ、ゴシポール、Bio111、131-I-TM-601、ALT-110、BIO140、CC8490、シレンギチド、ギマテカン、IL13-PE38QQR、INO1001、IPdR₁KRX-0402、ルカントン、LY317615、ノイラジアブ (neuradiab)、ピテスペン、Rta744、Sdx102、タランパネル、アトラセンタン、Xr311、ロミデプシン、ADS-100380、スニチニブ、5-フルオロウラシル、ポリノスタット、エトボシド、ゲムシタピン、ドキシソルピシン、リボソームドキシソルピシン、5'-デオキシ-5-フルオロウリジン、ピンクリスチン、テモゾロミド、ZK-304709、セリシクリブ；PD0325901、AZD-6244、カベシタピン、L-グルタミン酸、N-[4-[2-(2-アミノ-4,7-ジヒドロ-4-オキソ-1H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-5-イル)エチル]ベンゾイル]-ニナトリウム塩(七水和物)、カンプトテシン、PEG 標識イリノテカン、タモキシフェン、トレミフェンクエン酸塩、アナストラゾール、エキセメスタン、レトロゾール、DES (ジエチルスチルベストロール)、エストラジオール、エストロゲン、結合型エストロゲン、ペバシズマブ、IMC-1C11、CHIR-258,); 3-[5-(メチルスルホニルピペラジンメチル)-インドリル-キノロン、バタラニブ、AG-013736、AVE-0005、[D-Ser (But)6, Azgly10] 酢酸塩 (ピロ-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser (But)-Leu-Arg-Pro-Azgly-NH₂ 酢酸 [C₅₉H₈₄N₁₈O₁₄-(C₂H₄O₂)_x, x=1~2.4]、ゴセレリン酢酸塩、リユープロリド酢酸塩、トリプトレリンパモ酸塩、酢酸メドロキシプロゲステロン、カブロン酸ヒドロキシプロゲステロン、酢酸メゲストロール、ラロキシフェン、ピカルタミド、フルタミド、ニルタ

10

20

30

40

50

ミド、酢酸メゲストロール、C P - 7 2 4 7 1 4 ; T A K - 1 6 5、H K I - 2 7 2、エルロチニブ、ラパタニブ、カネルチニブ、A B X - E G F 抗体、アービタックス、E K B - 5 6 9、P K I - 1 6 6、G W - 5 7 2 0 1 6、ロナファルニブ、B M S - 2 1 4 6 6 2、チピファルニブ；アミホスチン、N V P - L A Q 8 2 4、ヒドロキシサミン酸サブエロイルアニリド、バルプロ酸、トリコスタチン A、F K - 2 2 8、S U 1 1 2 4 8、ソラフェニブ、K R N 9 5 1、アミノグルテチミド、アムサクリン、アナグレリド、L - アスパラギナーゼ、カルメット・ゲラン桿菌 (B C G) ワクチン、ブレオマイシン、プセレリン、ブスルファン、カルボプラチン、カルムスチン、クロラムブシル、シスプラチン、クラドリピン、クロドロネート、シプロテロン、シタラビン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ジエチルスチルベストロール、エビルピシン、フルダラビン、フルドロコルチゾン、フルオキシメステロン、フルタミド、ゲムシタピン、グリベック (glee vac)、ヒドロキシ尿素、イダルピシン、イホスファミド、イマチニブ、ロイプロリド、レバミゾール、ロムスチン、メクロレタミン、メルファラン、6 - メルカプトプリン、メスナ、メトトレキサート、ミトマイシン、ミトタン、ミトキサントロン、ニルタミド、オクトレオチド、オキサリプラチン、パミドロネート、ペントスタチン、プリカマイシン、ポルフィマー、プロカルバジン、ラルチトレキセド、リツキシマブ、ストレプトゾシン、テニボシド、テストステロン、サリドマイド、チオグアニン、チオテバ、トレチノイン、ビンデシン、1 3 - c i s - レチノイン酸、フェニルアラニンマスタード、ウラシルマスタード、エストラムスチン、アルトレタミン、フロクスウリジン、5 - デオキシウリジン、シトシンアラビノシド、6 - メルカプトプリン、デオキシコホルマイシン、カルシトリオール、バルルピシン、ミトラマイシン、ピンブラスチン、ピノレルピン、トボテカン、ラゾキシシン、マリマスタット、C O L - 3、ネオバスタット、B M S - 2 7 5 2 9 1、スクアラミン、エンドスタチン、S U 5 4 1 6、S U 6 6 6 8、E M D 1 2 1 9 7 4、インターロイキン - 1 2、I M 8 6 2、アンギオスタチン、ビタキシシン、ドロロキシフェン、イドキシフェン、スピロノラクトン、フィナスチリド、シメチジン、トラスツズマブ、デニロイキンジフチトクス、ゲフィチニブ、ボルテゾミブ、バクリタキセル、クレモホル非含有バクリタキセル、ドセタキセル、エピチロン (epithilone) B、B M S - 2 4 7 5 5 0、B M S - 3 1 0 7 0 5、ドロロキシフェン、4 - ヒドロキシタモキシフェン、ピペンドキシフェン、E R A - 9 2 3、アルゾキシフェン、フルベストラント、アコルピフェン、ラソフォキシフェン、イドキシフェン、T S E - 4 2 4、H M R - 3 3 3 9、Z K 1 8 6 6 1 9、トボテカン、P T K 7 8 7 / Z K 2 2 2 5 8 4、V X - 7 4 5、P D 1 8 4 3 5 2、ラパマイシン、4 0 - O - (2 - ヒドロキシエチル) - ラパマイシン、テムシロリムス、A P - 2 3 5 7 3、R A D 0 0 1、A B T - 5 7 8、B C - 2 1 0、L Y 2 9 4 0 0 2、L Y 2 9 2 2 2 3、L Y 2 9 2 6 9 6、L Y 2 9 3 6 8 4、L Y 2 9 3 6 4 6、ワートマニン、Z M 3 3 6 3 7 2、L - 7 7 9、4 5 0、P E G - フィルグラスチム、ダルベポエチン、エリスロポエチン、顆粒球コロニー刺激因子、ゾレンドロネート (zolendronate)、プレドニゾン、セツキシマブ、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子、ヒストレリン、P E G 化インターフェロン - 2 a、インターフェロン - 2 a、P E G 化インターフェロン - 2 b、インターフェロン - 2 b、アザシチジン、P E G - L - アスパラギナーゼ、レナリドマイド、ゲムツズマブ、ヒドロコルチゾン、インターロイキン - 1 1、デクスラゾキサシン、アレムツズマブ、全トランスレチノイン酸、ケトコナゾール、インターロイキン - 2、メガストロール、免疫グロブリン、ナイトロジェンマスタード、メチルプレドニゾロン、イブリツモマブチウキセタン、エンドロゲン、デシタピン、ヘキサメチルメラミン、ベキサロテン、トシツモマブ、三酸化ヒ素、コルチゾン、エチドロロン酸、ミトタン、シクロスポリン、ダウノルビシンリボソーム、エルウィニア - アスパラギナーゼ、ストロンチウム 8 9、カソピタント、ネツピタント、N K - 1 受容体アンタゴニスト、パロノセトロン、アプレピタント、ジフェンヒドラミン、ヒドロキシジン、メトクロプラミド、ロラゼパム、アルブラゾラム、ハロペリドール、ドロペリドール、ドロナピノール、デキサメタゾン、メチルプレドニゾロン、プロクロルペラジン、グラニセトロン、オンダンセトロン、ドラセロトン、トロピセトロン、ペグフィルグラスチム、エリス

ロポエチン、エポエチン、ダルベポエチン、及びそれらの混合物からなる群から選択される、請求項 79 から 84 のいずれかに記載の方法。

【請求項 85】

前記プロトセル又は前記プロトセルの外側の前記組成物が抗ウイルス剤を更に含む、請求項 79 から 84 のいずれかに記載の方法。

【請求項 86】

前記抗ウイルス剤が抗 HBV 剤又は抗 HCV 剤である、請求項 85 に記載の方法。

【請求項 87】

請求項 62 から 76 のいずれかに記載の組成物の有効量を必要とする患者に投与することを含む、患者の癌を治療する方法。

10

【請求項 88】

前記癌が、扁平上皮細胞癌、腺癌、肝細胞癌、腎細胞癌、膀胱、骨、腸、乳房、子宮頸管、結腸（大腸）、食道、頭部、腎臓、肝臓（肝細胞）、肺、鼻咽頭、頸部、卵巣、膵臓、前立腺、及び胃の癌腫、白血病、パーキットリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、B 細胞リンパ腫、悪性のメラノーマ、骨髄増殖性疾患、ユーイング肉腫、血管肉腫、カボジ肉腫、脂肪肉腫、筋肉腫、末梢性神経上皮腫、滑膜肉腫、グリオーマ、星状細胞腫、乏突起膠腫、上衣腫、膠芽腫、神経芽細胞腫、神経節神経腫、神経節膠腫、髓芽細胞腫、松果体細胞腫瘍、髄膜腫、髄膜肉腫、神経線維腫、シュヴァン鞘腫、腸癌、乳癌、前立腺癌、子宮頸部癌、子宮癌、非小細胞癌、小細胞肺癌、混合の小細胞癌及び非小細胞肺癌、胸膜中皮腫、精巣癌、甲状腺癌、及び星状細胞腫である、請求項 87 に記載の方法。

20

【請求項 89】

癌のリスクがある患者の癌を診断する方法であって、前記方法は、請求項 1 から 61 のいずれかに記載のプロトセルの一群を含む医薬組成物を前記患者に投与することを含み、前記プロトセルは、癌細胞に対して選択的に結合して前記プロトセルを前記細胞に送達するように改変されたターゲティングペプチドを含み、前記プロトセルは、レポーター分子を発現するように改変されたプラスミド DNA を含み、任意で更なるレポーター分子を含み、前記癌細胞が存在する場合には、前記患者の癌細胞への前記プロトセルの結合によって前記レポーター分子が前記癌細胞内に放出され、前記レポーター分子がシグナルを引き起こし、前記シグナルを標準と比較して前記患者が癌を有するか否かを判定でき、癌を有する場合には、その程度及び/又は癌性腫瘍のサイズを判定することができる、方法。

30

【請求項 90】

患者の癌治療を観察する方法であって、請求項 1 から 61 のいずれかに記載のプロトセルの一群を前記患者に投与することを含み、前記プロトセルは、癌細胞に対して選択的に結合して前記プロトセルを前記細胞に送達するように改変されたターゲティングペプチドを含み、前記プロトセルは、レポーター分子を発現するように改変されたプラスミド DNA を含み、任意で更なるレポーター分子を含み、前記患者の癌細胞への前記プロトセルの結合によって前記レポーター分子が前記癌細胞内に放出され、前記レポーター分子がシグナルを引き起こし、前記シグナルを治療開始時及び治療中の様々な間隔で標準と比較して患者が前記治療に反応しているか否かを判定でき、反応している場合には前記治療に対する前記反応の程度を判定できる、方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

（関連出願及び政府支援）

本発明は、2011年4月28日出願の米国仮出願第61/479847号である発明の名称「ペプチドにより標的を定められたシリカナノ粒子に担持された脂質二重層（プロトセル）を用いた肝細胞癌の選択的トランスフェクション（The Selective Transfection of Hepatocellular Carcinoma Using Peptide-Targeted Silica Nanoparticle-Supported Lipid Bilayers (Protocells)）」の優先権の利益を主張し、この出願の全内容が参照により援用される。

50

【 0 0 0 2 】

本発明は、国立衛生研究所の助成金第 P H S 2 P N 2 E Y 0 1 6 5 7 0 B 号、国立癌研究所の 1 U 0 1 C A 1 5 1 7 9 2 - 0 1 によって与えられた助成金、空軍科学研究所の助成金第 F A 9 5 5 0 - 0 7 - 1 - 0 0 5 4 / 9 5 5 0 - 1 0 - 1 - 0 0 5 4 号、N I E H S の 1 U 1 9 E S 0 1 9 5 2 8 - 0 1、国立科学財団の N S F : E F - 0 8 2 0 1 1 7、及び国立科学財団の D G E - 0 5 0 4 2 7 6 による政府支援を受けて行われた。政府は、本発明について一定の権利を有する。

【 0 0 0 3 】

本発明の実施形態は、特に肝細胞癌細胞及び他の癌細胞を含めた患者体内の細胞の特異的標的のためのプロトセルに関し、このプロトセルは、1) ナノ多孔性のシリカコア又は金属酸化物コア、2) 担持された脂質二重層、3) 少なくとも1つの薬剤、標的細胞に対するプロトセルの結合を特異的にかつ増強するようにして治療対象の組織中の癌細胞を標的にするターゲティングペプチド、並びにプロトセル及び被包されたカーゴ (DNAを含む) のエンドソーム脱出を促進する融合ペプチドを含む。少なくとも1つの薬剤は、癌細胞死を促進する薬剤 (従来の小分子、高分子カーゴ (例えば siRNA、shRNA、他のマイクロRNA、又はタンパク質毒素 (リシン毒素A鎖若しくはジフテリア毒素A鎖など))、及び/又はDNA (二本鎖又は直鎖のDNA、プラスミドDNAなど) などであり、DNAは超らせん及び/又は例えばヒストンでパッケージングされてナノ多孔性シリカコア中に配置されてもよく (より効率的にDNAをプロトセル中にパッケージングするためには、好ましくは超らせん)、癌細胞の核内にプロトセルを局在させることを助ける核局在配列及び癌細胞の治療法 (アポトーシス/細胞死) に関与するペプチドを発現する能力を助ける核局在配列で任意に修飾される。) 又はレポーターとしての薬剤である。本発明のプロトセルは、選択的に肝細胞組織に結合する新規の結合ペプチド (c-METペプチド) を用いて癌 (特に肝細胞 (肝臓) 癌を含む) を治療するために、又は癌の診断 (癌治療及び創薬を含む) において機能するために用いられることができる。

【 背景技術 】

【 0 0 0 4 】

ナノ担体中に被包された薬物の標的送達は、従来の「遊離した」薬物が示す多数の問題である貧弱な溶解性、限られた安定性、速やかな除去、及び特に選択性の欠如 (これは正常細胞に非特異的な毒性をもたらす、疾患細胞を根絶するのに必要な用量の段階的増大を妨げる) などを改善することが可能である。受動的標的のスキームは、腫瘍血管系の亢進した透過性と腫瘍リンパ管の低下した排出効率とに依存して腫瘍部位へのナノ担体の蓄積を導くものであり (いわゆる血管透過性・滞留性亢進効果又はEPR効果)、これらの問題の多くを克服するが、ナノ担体の内在化を引き起こすのに必要な細胞特異的相互作用の欠如が治療有効性を低下させ、薬物の排除や多剤耐性の誘発をもたらす得る。

【 0 0 0 5 】

ナノメディシンにおける課題の1つは、例えば薬物などのカーゴを高濃度で効率的に被包し、細胞膜を通過し、所定の期間に渡って標的部位に制御可能に薬物を放出できるナノ構造体及び材料を設計することである。最近になって、ナノメディシンにおける新世代の薬物又は治療法の送達媒体として無機ナノ粒子が現れた。更に最近になって、クマリン、アゾベンゼン、ロタキサン、ポリマー、又はナノ粒子を用いるゲーティング (gating) 法が、カーゴを粒子中に封入し、光刺激又は電気化学刺激に従って引き起こされる放出を可能にするために開発された。

【 0 0 0 6 】

リポソームは、その低い免疫原性及び低い毒性により薬物送達に広く用いられて来たが、未だいくつかの点について改善される必要がある。第1に、カーゴの装填はリポソームが調製される状況下でのみ成される。従って、カーゴの濃度や種類が制限される可能性がある。第2に、リポソームの安定性は比較的低い。リポソームの脂質二重層は多くの場合に経時劣化して融合しがちであり、それによってサイズやサイズ分布が変化する。第3に、リポソーム中のカーゴの放出はリポソームのバーストの瞬間に起こるため、それが放出

を制御することを困難にしている。

【 0 0 0 7 】

ナノ多孔性シリカ粒子へのリボソームの融合によって形成される多孔性ナノ粒子に担持された脂質二重層（プロトセル）は、癌の治療法や診断法の標的送達に伴う多くの課題に対応する新規種類のナノ担体である。リボソームと同様に、プロトセルは生体適合性、生分解性、及び非免疫原性であるが、そのナノ多孔性シリカコアは、同様のサイズのリボソーム送達剤と比較すると大幅に増強されたカーゴ収容能力及び長期の二重層安定性を提供する。コアの多孔性及び表面の化学的性質を更に調節して、例えば薬物、核酸、及びタンパク質毒素などの多様な治療薬の被包を促進することができる。カーゴ放出の速度は、コアの細孔サイズ、化学組成及びシリカ縮合の全体的な程度によって制御可能であるので、プロトセルはバースト放出又は制御型放出のプロファイルが必要な用途に有用である。最後に、プロトセルの担持された脂質二重層（S L B）は、選択的送達を促進するためにリガンドで様々に修飾されることができ、更に循環時間を延長するためにP E Gで様々に修飾されることができ。

10

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 8 】

化学療法薬の活性を改善し、癌治療法を増強する必要性は続いている。プロトセルの使用を、癌を標的とし、癌と結合し、癌への侵入を増強し、そして化学療法薬をその作用部位の近傍に届ける他の方法と組み合わせることは、癌治療法の重要な一面である。本発明は、癌治療薬の投与を増強することによって、又は診断における癌の診断及び癌治療観察のための手法を促進するために、癌治療法の技術を向上させること並びに治療結果に影響し得る薬剤の送達を改善することに取り組む。

20

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 9 】

本発明の目的は、プロトセル技術、プロトセル自体、そのようなプロトセルを含む医薬組成物について改善を提供すること、及び本発明のプロトセル及び医薬組成物を治療法及び診断法（治療の観察を含む）に用いる方法を提供することに関する。

【 0 0 1 0 】

本発明の実施形態の更なる目的は、本発明のその他の実施形態である新規のM E T 結合ペプチド、医薬組成物及び方法におけるそれらの使用に関する。

30

【 0 0 1 1 】

本発明のこれらの及び / 又はその他の目的は、本明細書で与えられる説明の検討により容易に得られる。

【 0 0 1 2 】

本発明の実施形態は、細胞（特定の態様においては肝細胞の癌細胞及び他の癌細胞）の特異的標的のためのプロトセルに関する。

【 0 0 1 3 】

一部の態様においては、本発明は、担持された脂質二重層を有するナノ多孔性のシリカコア又は金属酸化物コアと、次のものからなる群から選択される少なくとも1つの更なる成分とを含む、細胞を標的にする多孔性プロトセルに関する。

40

- ・細胞を標的にする化学種
- ・プロトセル及び被包されたD N Aのエンドソーム脱出を促進する融合ペプチド、並びにその他のカーゴ

その他のカーゴは、

- ・二本鎖直鎖D N A又はプラスミドD N A
- ・薬物
- ・造影剤
- ・短鎖干渉R N A、短鎖ヘアピンR N A、マイクロR N A、又はそれらの混合物

から選択される少なくとも1つのカーゴ成分を含み、このカーゴ成分の1つは、任意で更

50

に核局在配列でコンジュゲートされる。

【0014】

一部の実施形態においては、本発明の実施形態のプロトセルは、担持された脂質二重層を有するナノ多孔性シリカコアと、少なくとも1つの治療薬からなるカーゴとを含む。少なくとも1つの治療薬は、選択的に癌細胞死を促進する治療薬であり、例えば従来の小分子、高分子カーゴ（例えば siRNA（特に S565、S7824、及び / 又は s10234 など）、shRNA、又はタンパク質毒素（リシン毒素 A 鎖又はジフテリア毒素 A 鎖など））、及び / 又はパッケージングされて（一部の実施形態においてはヒストンでパッケージングされて）ナノ多孔性シリカコア中に配置されるプラスミド DNA（DNA をカーゴ成分としてプロトセル中により効率的にパッケージングするために、好ましくは本明細書に別に記載のように超らせん）であり、DNA は癌細胞の核内にプラスミドを局在させること / 提示することを助ける核局在配列及び治療（例えば癌細胞のアポトーシス / 細胞死）に関与するペプチドを発現する能力を助ける核局在配列で任意に修飾される。または、少なくとも1つの治療薬は、診断用途のレポーターとしての薬剤である（特に本明細書に別に記載の蛍光緑色タンパク質、蛍光赤色タンパク質）。本発明のプロトセルは、標的細胞に対するプロトセルの結合を特異的かつ増強するようにして治療される細胞（例えば、治療対象の組織中の癌細胞）を標的にするターゲティングペプチド、並びにプロトセル及び被包された DNA のエンドソーム脱出を促進する融合ペプチドを含む。本発明のプロトセルは、治療法又は診断法に用いられることができ、より具体的には癌及びその他の疾患（ウィルス感染を含み、特に肝細胞（肝臓）癌を含む）を治療するために用いられることができる。本発明の他の態様においては、プロトセルは、癌組織（特に肝細胞、卵巣、及び子宮頸部の癌組織を含む）に選択的に結合する新規の結合ペプチド（本明細書に別に記載の MET 結合ペプチド）を癌の治療及び / 又は診断（癌治療の観察及び創薬を含む）のために用いる。

10

20

【0015】

一態様においては、本発明の実施形態のプロトセルは多孔性ナノ粒子プロトセルを含み、多孔性ナノ粒子プロトセルは、担持された脂質二重層を有するナノ多孔性シリカコアを多くの場合を含む。本発明のこの態様においては、プロトセルはターゲティングペプチドを含み、ターゲティングペプチドは多くの場合の本明細書に別に記載の MET 受容体結合ペプチドであり、多くの場合プロトセルの表面の融合ペプチドと組み合わせられる。プロトセルは、種々の治療用及び / 又は診断用のカーゴ（例えば、小分子（治療用及び / 又は診断用、特に抗癌剤及び / 又は抗ウィルス剤（HBV 及び / 又は HCV の治療用）を含む）、ポリペプチドやヌクレオチドのような高分子（RNA（shRNA 及び siRNA）を含む）、又はプラスミド DNA（超らせん及びヒストンでパッケージングであって核局在配列を含んでもよい））を装填されて、治療用及び / 又は診断用にされることができる（蛍光ペプチド（特に蛍光緑色タンパク質 / FGP、蛍光赤色タンパク質 / FRP を含む）のようなレポーター分子を含む）。

30

【0016】

本発明の実施形態のその他の側面は、医薬組成物に関する。本発明の医薬組成物は一群のプロトセルを含むが、これらは同一であっても異なってもよく、医薬的に許容される担体、添加剤、又は賦形剤と組み合わせる。プロトセルは、治療される疾患や投与経路（本明細書に別に記載）に応じて、単独で処方されても又は別の生物活性剤（例えば更なる抗癌剤又は抗ウィルス剤）と組み合わせる。これらの組成物は、特定の目的（例えば治療（癌治療など）又は診断法（癌治療の観察など））のために改変されたプロトセルを含む。医薬組成物は、特定の目的及び投与経路に有効な一群のプロトセルを、医薬的に許容される担体、添加剤又は賦形剤と組み合わせる。

40

【0017】

本発明の一実施形態は、本明細書に記載の新規のプロトセルを利用する方法にも関する。そのため別の実施形態においては、本発明は、本明細書に別に記載の医薬組成物の有効量を、必要とする患者若しくは対象に投与することを含む、疾患及び / 又は状態を治療す

50

る方法に関する。本発明の医薬組成物は、特に癌、及び癌に続発する又は癌の原因となる病態若しくは状態（特にHBV及び／又はHCVの感染）を含む多数の病態の治療に特に有用である。

【0018】

更なる別の態様においては、本発明は、癌を診断する方法に関する。この方法は、診断剤又はレポーター造影剤を癌細胞に選択的に送達して患者の癌を特定するために改変された一群のプロトセルを含む医薬組成物を投与することを含む。この方法では、本発明のプロトセルは、ターゲティングペプチドの的であるポリペプチド（より一般的には表面受容体又は細胞膜成分）を発現する癌細胞に結合する少なくとも1つのターゲティングペプチドの含有によって、癌細胞を標的にするために改変されることができる。または、本発明のプロトセルは、癌細胞を標的としたプロトセルのレポーター成分（造影剤を含む）を含有することで、レポーターのシグナルを標準と比較することによって患者又は対象の癌性組織の存在及びサイズを確認するために用いられてもよい。標準は、例えば健康な患者又は診断の対象となる疾患を有することが分かっている患者の集団から得られる。診断されたら、本発明の医薬組成物を用いた適当な治療法又はその他の治療法が施されることができる。

10

【0019】

本発明の更に他の態様では、本発明の組成物は、特定の病態及び／又は状態の治療（本発明の組成物を用いた治療を含む）の進行を観察するために使用されることができる。本発明のこの態様では、病態の治療の進行が観察されるように、癌細胞に特異的に結合しかつレポーター成分を含む一群のプロトセルを含む組成物を治療中の患者又は対象に投与することができる。

20

【0020】

本発明のその他の態様は、5つの新規のMET結合ペプチド（本明細書に別に記載）に関する。それらは、本発明の一部の実施形態のプロトセルでのターゲティングペプチドとして用いられることができる。あるいは、種々の癌細胞（癌性組織の種々の細胞のうち特に肝細胞、子宮頸部、及び卵巣の細胞を含む）のMETタンパク質に結合する利点のために医薬組成物中において用いられることができる。本発明の一実施形態は、MET受容体（別名では肝細胞増殖因子受容体であり、c-MET遺伝子によって発現される）に対する新規の結合ペプチドとしての活性を示す5つの異なる7merペプチドに関する。これらの5つの7merペプチドは次の通りである。

30

ASVHFPP (Ala - Ser - Val - His - Phe - Pro - Pro) 配列番号1

TATFWFQ (Thr - Ala - Thr - Phe - Trp - Phe - Gln) 配列番号2

TSPVALL (Thr - Ser - Pro - Val - Ala - Leu - Leu) 配列番号3

IPLKVHP (Ile - Pro - Leu - Lys - Val - His - Pro) 配列番号4

WPRLTNM (Trp - Pro - Arg - Leu - Thr - Asn - Met) 配列番号5

40

【0021】

これらのペプチドのそれぞれは、単独で用いられても、あるいは上記群のうちの他のMET結合ペプチドと組み合わせて用いられても、又は本発明の一実施形態のプロトセルを癌細胞（特に、肝細胞癌細胞、卵巣癌細胞、乳癌細胞、及び子宮頸部癌細胞を含む）に結合させる助けとなり得る一連のその他のターゲティングペプチド（例えば本明細書に記載のSP94ペプチド）と組み合わせて用いられてもよい。これらの結合ペプチドはまた、癌を治療する又は肝細胞増殖因子結合受容体を阻害するMET結合ペプチドとして、単独で医薬化合物に用いられることもできる。これらのペプチドは、意図した結果を提供するために、単独で処方されても又はその他の生物活性剤と組み合わせて処方されてもよい。

50

医薬組成物は、上記5つのMET結合ペプチドのうちの少なくとも1つの有効量を医薬的に許容される担体、添加剤、又は賦形剤と組み合わせて含み、任意で更なる生物活性剤、例えば抗癌剤、抗ウィルス剤、又はその他の生物活性剤などと組み合わせて含むことができる。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】エアロゾルによって支援されるEISAプロセスによって調製される本発明で用いられる一実施形態のナノ粒子が、粒子のサイズ及び分布を制御するために変えられ得ることを示す図である。

【図2】一実施形態において、多くの種類のカーゴに合わせて設計されることができる細孔のサイズ及び骨格と、エアロゾル化した補助成分が容易に取り込まれることを示す。

【図2A】図2のa、b、c、及びeが、CTAB、B58、P123、及びPS+B56による鋳型であることを示す。A、B、C、D、及びEは、CTAP+NaCl、3wt%のP123、3wt%のP123+ポリ(プロピレングリコールアクリレート)、ミクロエマルジョン、及びCTAB(NH₄)₂SO₄による鋳型である。

【図3】一実施形態における、同時自己集合又は自己集合後の誘導体化によって細孔表面の化学的性質(即ち電荷及び疎水性)並びに細孔サイズが、有機シランと珪酸との共縮合によって主に制御されることを示す。Linら、Chem. Mater. 15, 4247-56 2003; Liu, J. 10
ら、J. Phys. Chem., 104, 8323-2339, 2000; Fan, H.ら、Nature, 405, 56-60, 2000; Lu, Y.ら、J. Am. Chem. Soc., 122, 5258-5261, 2000参照。

【図4】ヒストンタンパク質によるCB1プラスミドのパッケージングを示す。(A)は、CB1プラスミド(pCB1)を超らせん化し、超らせんpCB1をヒストンH1、H2A、H2B、H3、及びH4でパッケージングし、得られたpCB1-ヒストン複合体を、核膜孔を通る移行を促進する核局在配列(NLS)で修飾するために用いられるプロセスを示す概念図である。(B)及び(D)は、CB1プラスミド(B)及びヒストンでパッケージングされたpCB1(D)の原子間力顕微鏡法(AFM)画像である。スケールバー=100nm。(C)及び(E)は、それぞれ(B)及び(D)での赤線に対応する高さプロファイルを示す。

【図5】ヒストンでパッケージングされたpCB1が装填された、MC40によって標的を定められたメソ多孔性のシリカナノ粒子に担持された脂質二重層(プロトセル)の合成を示す。(A)は、DNAを装填し、ペプチドで標的を定められたプロトセルを生成するために用いられるプロセスを示す概念図である。プロトセルのコアを形成するメソ多孔性のシリカナノ粒子をpCB1-ヒストン複体の溶液中に単に浸漬することによって、ヒストンでパッケージングされたpCB1をシリカナノ粒子に装填する。次にPEG化リポソームをDNAが装填されたコアと融合し、HCCに結合するターゲティングペプチド(MC40)と、内在化したプロトセルのエンドソーム脱出を促進するエンドソーム分解性ペプチド(H5WYG)とで更に修飾された、担持された脂質二重層(SLB)を形成する。スルフヒドリル-アミン架橋剤(スパーサーアーム=9.5nm)を用いて、C末端システイン残基で修飾したペプチドをSLB中のDOPE成分にコンジュゲートした。

(B)は、プロトセルのコアとして用いられるメソ多孔性のシリカナノ粒子の透過型電子顕微鏡法(TEM)画像である。スケールバー=200nm。挿入画像=走査型電子顕微鏡法(SEM)画像であって、15~25nmの細孔が表面から利用可能であることを示す。挿入画像のスケールバー=50nm。(C)は、動的光散乱法(DLS)によって測定されたメソ多孔性のシリカナノ粒子のサイズ分布を示す。(D、左軸)バレット-ジョイナー-ハレンダ(BJH)モデルを用いて図S-4Aに示す窒素吸着等温線の吸着枝から計算された、メソ多孔性のシリカナノ粒子の累積細孔容積である。(D、右軸)DLSにより測定された、pCB1-ヒストン複体のサイズ分布である。

【図6】一実施形態における、メソ多孔性のシリカナノ粒子がヒストンでパッケージングされたpCB1について高い収容能力を有し、得られたプロトセルが、エンドソーム環境を模倣する状況下でのみ被包されたDNAを放出することを示す。(A)は、未修飾のメ

10

20

30

40

50

ソ多孔性のシリカナノ粒子 ($\zeta = -38.5 \text{ mV}$) 又はアミン含有シランの APTES で修飾されたメソ多孔性のシリカナノ粒子 ($\zeta = +11.5 \text{ mV}$) 中に被包可能な、pCB1 又はヒストンでパッケージングされた pCB1 (「複合体」) の濃度を示す。(B) は、MC40 で標的を定められ、pCB1 が装填されたプロトセル (1×10^9 個) と共に 1×10^6 細胞/mL を 37 °C で 24 時間培養した場合に、ZsGreen (pCB1 によりコードされる緑色蛍光タンパク質) に対して陽性となる Hep3B の割合を示す。x 軸は、プロトセルのコアが APTES で修飾されたか否か及び pCB1 がヒストンで予めパッケージングされたか否かを示す。(A) 及び (B) では、DOTAP と DOPE との混合物 (1:1 w/w) でパッケージングされた pCB1 を対照として含む。(C) 及び (D) は、疑似体液 (C) 又は pH 5 緩衝液 (D) に暴露した際の、未修飾のメソ多孔性のシリカナノ粒子及び対応するプロトセルからの、ヒストンでパッケージングされた pCB1 の時間に依存した放出を示す。プロトセルの SLB は、5 wt % の DOPE、30 wt % のコレステロール、及び 10 wt % の PEG-2000 を含む DOPC からなり、(B) については、0.015 wt % の MC40 及び 0.500 wt % の H5WYG で修飾された。全てのエラーバーは、 $n = 3$ の場合の 95 % 信頼区間を表す (1.96)。

【図 7】MC40 で標的を定められたプロトセルが、ヒストンでパッケージングされた pCB1 を HCC まで送達するプロセスを示す概念図である。[1] 種々の HCC 株により過剰発現される Met へのターゲティングペプチドの動員によって、MC40 で標的を定められたプロトセルは、Hep3B 細胞に高親和性で結合する。流動性の DOPC の SLB はペプチドの流動性を促進し、それにより低い MC40 密度で修飾されたプロトセルが Hep3B に対して高い特異親和性を保持することを可能にする (図 8 A 参照)。[2] MC40 で標的を定められたプロトセルは、受容体依存性エンドサイトーシスを介して Hep3B によって内在化される (図 8 B 及び図 15 A 参照)。[3] エンドソーム条件は SLB を不安定化し (Nature Materials の参考文献を挿入)、エンドソーム分解性ペプチド H5WYG のプロトン化を引き起こす。これらは何れも、ヒストンでパッケージングされた pCB1 が Hep3B 細胞の細胞質ゾル中に拡散することを可能にする (図 16 B 参照)。[4] pCB1 - ヒストン複合体は、核局在配列 (NLS) で修飾された場合に、約 24 時間以内に Hep3B 細胞の核内に濃縮される (図 16 C 参照)。これによって、分裂中及び非分裂中の癌細胞の両方での効率的なトランスフェクションが可能になる (図 17 参照)。

【図 8】MC40 で標的を定められたプロトセルが HCC に高親和性で結合し、Hep3B によって内在化されるが正常肝細胞によっては内在化されないことを示す。(A) は、MC40 で標的を定められたプロトセルを Hep3B 又は肝細胞に暴露した場合の見かけの解離定数 (K_d) を示す。 K_d 値は、特異親和性に対して逆の関係にあり、飽和結合曲線から求められた (図 S - 11 参照)。エラーバーは、 $n = 5$ の場合の 95 % 信頼区間を表す (1.96)。(B) 及び (C) は、MC40 で標的を定められたプロトセル (1000 倍の過剰量) に 37 °C で 1 時間暴露された Hep3B (B) 及び肝細胞 (C) の共焦点蛍光顕微鏡法画像である。Met は AlexaFluor (登録商標) 488 標識モノクローナル抗体で染色され (緑色)、プロトセルコアは AlexaFluor (登録商標) 594 で標識され (赤色)、細胞核はヘキスト 33342 で染色された (青色)。スケールバー = $20 \mu\text{m}$ 。プロトセルの SLB は、5 wt % の DOPE、30 wt % コレステロール、及び 10 wt % の PEG-2000 (18:1) を含む DOPC からなり、0.015 wt % (A ~ C) 又は 0.500 wt % (A) の MC40 ターゲティングペプチドで修飾された。

【図 9】MC40 で標的を定められ、pCB1 が装填されたプロトセルは、ピコモル濃度で HCC のアポトーシスを誘導するが、正常肝細胞の生存性に関してはごく小さい影響しか有さないことを示す。MC40 で標的を定められ、pCB1 が装填されたプロトセルに 37 °C で Hep3B を連続して暴露した際の、サイクリン B1 の mRNA 及びサイクリン B1 タンパク質の発現における用量 (A) 及び時間 (B) に依存した減少を示す。(A) では、細胞を種々の pCB1 濃度に 48 時間暴露し、(B) では、5 pM の pCB1 に種

10

20

30

40

50

々の時間に渡って暴露した。肝細胞でのサイクリン B 1 タンパク質の発現及び H e p 3 B での Z s G r e e n の発現が、対照として含まれる。リアルタイム P C R 及び免疫蛍光法を用いて、サイクリン B 1 の m R N A 及びタンパク質それぞれの濃度を測定した。(C) は、M C 4 0 で標的を定められ、p C B 1 が装填されたプロトセル ([p C B 1] = 5 p M) に 3 7 で種々の時間に渡って連続して暴露した後の、G₂ / M 期に停止した H e p 3 B の割合を示す。G₂ / M 期の肝細胞の割合及び S 期の H e p 3 B の割合を比較のために含む。細胞は、細胞周期分析の前にヘキスト 3 3 3 4 2 で染色された。(D) は、M C 4 0 で標的を定められ、p C B 1 が装填されたプロトセル ([p C B 1] = 5 p M) に 3 7 で種々の時間に渡って連続して暴露した際に、アポトーシス性になる H e p 3 B の割合を示す。アポトーシスのマーカーに陽性である肝細胞の割合を対照として含む。A l e x a F l u o r (登録商標) 6 4 7 標識 アネキシン V に陽性である細胞は、アポトーシスの初期にあると見なし、アネキシン V 及びヨウ化プロビジウム の両方に陽性である細胞は、アポトーシスの後期にあると見なした。アポトーシス性細胞の総数は、一方及び両方に陽性である細胞の数を加算して求められた。全ての実験において、プロトセルの S L B は、5 w t % の D O P E 、 3 0 w t % コレステロール、及び 1 0 w t % の P E G - 2 0 0 0 (1 8 : 1) を含む D O P C からなり、0 . 0 1 5 w t % の M C 4 0 及び 0 . 5 0 0 w t % の H 5 W Y G で修飾された。全てのエラーバーは、n = 3 の場合の 9 5 % 信頼区間を表す (1 . 9 6) 。

10

【図 1 0】M C 4 0 で標的を定められ、p C B 1 が装填されたプロトセルが、対応するリポプレックスよりも 2 5 0 0 倍有効に H C C の選択的なアポトーシスを誘導することを示す。(A) は、D O P C プロトセル、1 0 w t % の P E G - 2 0 0 0 (1 8 : 1) で修飾された D O P C プロトセル、p C B 1 と D O T A P 及び D O P E の混合物 (1 : 1 w / w) とからなるリポプレックス、並びに 1 0 w t % の P E G - 2 0 0 0 で修飾された D O T A P / D O P E リポプレックスの電位の値を示す。全ての電位測定は、0 . 5 × P B S (p H 7 . 4) 中で行われた。(B 、左軸) M C 4 0 で標的を定められたプロトセル又はリポプレックスによって送達された 5 p M の p C B 1 に 3 7 で 4 8 時間連続して暴露した際に、アポトーシス性になる H e p 3 B 及び肝細胞の割合である。(B 、右軸) 1 × 1 0 ⁶ 個の H e p 3 B 細胞の 9 0 % において 3 7 で 4 8 時間以内にアポトーシスを誘導するのに必要な、M C 4 0 で標的を定められ、p C B 1 が装填されたプロトセル又はリポプレックスの数である。(B) については、細胞は、A l e x a F l u o r (登録商標) 6 4 7 標識 アネキシン V 及びヨウ化プロビジウムで染色された。一方及び両方に陽性である細胞をアポトーシス性に見なした。プロトセルの S L B は、5 w t % の D O P E 、 3 0 w t % コレステロール、及び 1 0 w t % の P E G - 2 0 0 0 (表示される場合) を含む D O P C からなり、0 . 0 1 5 w t % の M C 4 0 及び 0 . 5 0 0 w t % の H 5 W Y G で修飾された。D O T A P / D O P E リポプレックスは、1 0 w t % の P E G - 2 0 0 0 (表示される場合) 、 0 . 0 1 5 w t % の M C 4 0 、及び 0 . 5 0 0 w t % の H 5 W Y G で修飾された。p C B 1 は、全ての実験において N L S で修飾された。全てのエラーバーは、n = 3 の場合の 9 5 % 信頼区間を表す (1 . 9 6) 。

20

30

【図 1 1】M C 4 0 で標的を定められたプロトセルが、肝細胞の生存性には影響を与えることなく、高濃度のタキソール、B c l - 2 特異 s i R N A 、及び p C B 1 を H C C に選択的に送達することを示す。(A) は、1 0 ¹² 個のプロトセル、リボソーム、又はリポプレックスの中に被包可能な、タキソール、B c l - 2 の発現を抑制する s i R N A 、及び C B 1 プラスミドの濃度を示す。赤色のバーは、タキソール及び p C B 1 の両方がプロトセルに装填された場合に、タキソール及び p C B 1 の濃度がどのように変わるかを示す。青色のバーは、タキソール、s i R N A 、及び p C B 1 のすべてがプロトセルに装填された場合又は s i R N A 及び p C B 1 がリポプレックスに装填された場合に、タキソール、s i R N A 、及び p C B 1 の濃度がどのように変わるかを示す。(B) は、M C 4 0 で標的を定められたプロトセルによって H e p 3 B まで送達された場合の、オレゴングリーン (登録商標) 4 8 8 標識 タキソール (緑色) 、A l e x a F l u o r (登録商標) 5 9 4 標識 s i R N A (赤色) 、及び C y 5 標識 p D N A (白色) の細胞内分布を示す共焦点蛍

40

50

光顕微鏡法画像である。細胞をMC40で標的を定められたプロトセルの1000倍の過剰量と共に37で24時間培養した後に固定して、ヘキスト33342で染色した(青色)。スケールバー=10 μ m。(C)は、10nMのタキソール及び/又は5pMのpCB1に37で48時間暴露した際に、G₂/M期に停止したHep3B、SNU-398、及び肝細胞細胞の割合を示す。割合は、G₂/Mでの対数増殖細胞の割合に対して正規化された。(D)は、10nMのタキソール、250pMのBcl-2特異siRNA、及び/又は5pMのpCB1に37で48時間暴露した際に、AlexaFluor(登録商標)647標識アネキシンV及びヨウ化プロビジウム(PI)について陽性になるHep3B、SNU-398、及び肝細胞の細胞の割合を示す。(C)及び(D)において、「pCB1」は、DOTAPとDOPEとの混合物(1:1w/w)を用いてパッケージングされて細胞まで非特異的に送達されたpCB1を指す。全ての実験において、プロトセルのSLBは、5wt%のDOPE、30wt%のコレステロール、及び10wt%のPEG-2000(18:1)を含むDOPCからなり、0.015wt%のMC40及び0.500wt%のH5WYGで修飾された。リボソームは、5wt%のDMPE、30wt%のコレステロール、及び10wt%のPEG-2000(16:0)を含むDSPCからなり、0.015wt%のMC40及び0.500wt%のH5WYGで修飾された。リボプレックスは、DOTAP:DOPE(1:1w/w)混合物からなり、10wt%のPEG-2000、0.015wt%のMC40、及び0.500wt%のH5WYGで修飾された。pCB1は、全ての実験においてNLSで修飾された。全てのエラーバーは、n=3の場合の95%信頼区間を表す(1.96)。

【図12】CB1プラスミドのベクターマップを示す。CB1プラスミド(pCB1)は、RNAi-Ready pSIREN-RetroQ-ZsGreenベクター(クオンテック・ラボラトリーズ社、カリフォルニア州マウンテンビュー)及びpNEB193ベクター(ニュー・イングランド・バイオラボ社、マサチューセッツ州イプスウィッチ)から構築された。pCB1は、サイクリンB1特異的短鎖ヘアピンRNA(shRNA)及びスナギンチャク種の緑色蛍光タンパク質(ZsGreen)をコードする。構成的shRNA発現は、RNAPolIII依存性ヒトU6プロモーター(P_{U6})によって駆動され、構成的ZsGreen発現は、サイトメガロウイルスの最初期プロモーター(P_{CMV})によって駆動される。oriエレメント及びAmp^Rエレメントは、大腸菌内におけるプラスミドの増殖を可能にする。サイクリンB1特異的shRNAのセンス鎖及びアンチセンス鎖をコードするDNA配列に下線を付す。dsDNAオリゴヌクレオチドをpSIRENベクターに導入するために用いた制限酵素部位(BamHIは赤色、EcoRIは青色)が横にある。

【図13】ヒストンでパッケージングされたpCB1の特徴を示す。(A)は、漸増濃度のヒストン(モル比1:2:2:2:2のH1、H2A、H2B、H3、及びH4)に暴露されたpCB1に関する電気泳動移動度シフトアッセイを示す。pCB1:ヒストンのモル比をレーン3~6に示す。レーン1はDNAラダーを含み、レーン2はpCB1を含み添加ヒストンを含まない。(B)は、ヒストンでパッケージングされたpCB1(pCB1:ヒストンのモル比1:50)のTEM画像である。スケールバー=50nm。

【図14】未装填のメソ多孔性のシリカナノ粒子及びpCB1が装填されたメソ多孔性のシリカナノ粒子の窒素吸着分析を示す。(A)は、ヒストンでパッケージングされたpCB1の装填前後での、メソ多孔性のシリカナノ粒子の窒素吸着等温線である。(B)は、ヒストンでパッケージングされたpCB1の装填前後での、メソ多孔性のシリカナノ粒子のブルナウアー-エメット-テラー(BET)表面積である。エラーバーは、n=3の場合の95%信頼区間を表す(1.96)。

【図15】DOPCプロトセルの小角中性子散乱(SANS)データを示す。フィッティングデータは、一定厚さの共形シェルを有する多分散な多孔性シリカ球のモデルを用いて得られたものであり、シリカ粒子の表面に細孔開口部を覆う36の二重層が存在することを示す。厚さ0、20、60の二重層についてシミュレーションされたSANSデータを比較のために含む。測定された二重層の厚さ36は、平坦な担持された脂質二重層

10

20

30

40

50

について行われた他の中性子研究 (3 3 ~ 3 8) と一致しており、これらの対照条件下では、脂質二重層の水素に富む炭化水素コアからの散乱を主に示す。

【図 1 6】プロトセルが、被包された DNA をヌクレアーゼ分解から守ることを示す。DNase I 処理した pCB1 (レーン 3)、ヒストンでパッケージングされた pCB1 (レーン 5)、DOTAP と DOPE との 1 : 1 (w / w) 混合物でパッケージングされた pCB1 (レーン 7)、カチオン性コアを有するプロトセルに装填された pCB1 (レーン 9)、及びアニオン性コアを有するプロトセルに装填されたヒストンでパッケージングされた pCB1 (レーン 1 1) のアガロースゲル電気泳動を示す。裸の pCB1 (レーン 2)、ヒストンから放出された pCB1 (レーン 4)、DOTAP / DOPE リポブレンクスから放出された pCB1 (レーン 6)、カチオン性コアを有するプロトセルから放出された pCB1 (レーン 8)、及びアニオン性コアを有するプロトセルから放出されたヒストンでパッケージングされた pCB1 (レーン 1 0) を比較のために含む。レーン 1 は DNA ラダーを含む。試料を DNase I (5 0 n g の DNA 当たり 1 ユニット) と共に室温で 3 0 分培養し、pCB1 放出は 1 % SDS を用いて促進された。

【図 1 7】メソ多孔性のシリカナノ粒子 (「未修飾のコア」)、2 0 % (v / v) の APTES 中に室温で 1 2 時間浸漬したメソ多孔性のシリカナノ粒子 (「APTES 修飾コア」)、CB1 プラスミド (「pCB1」)、ヒストンでパッケージングされた pCB1 (「pCB1 - ヒストン複合体」)、及び DOTAP と DOPE との 1 : 1 (w / w) 混合物でパッケージングされた pCB1 (「DOTAP / DOPE リポブレンクス」) の電位 () の値を示す。電位測定は、0 . 5 x PBS (pH 7 . 4) 中で行われた。エラーバーは、n = 3 の場合の 9 5 % 信頼区間を表す (1 . 9 6) 。

【図 1 8】図 6 及び 2 4 において ZsGreen 発現陽性の細胞の割合を求めるのに用いられた、代表的な前方散乱 - 側方散乱 (FSC - SSC) プロット図及び FL - 1 ヒストグラムである。(A) ~ (D) は、ZsGreen 陰性細胞についての FSC - SSC プロット図 (A 及び C) 及び対応する FL - 1 ヒストグラム (それぞれ B 及び D) であり、(A) は細胞残屑を除外するためにゲーティングし、(C) はしていない。FL - 1 チャネルの平均蛍光強度 (MFI) の値を、(B) 及び (D) に示す。(E) ~ (H) は、ZsGreen 陽性細胞についての FSC - SSC プロット図 (E 及び G) 及び対応する FL - 1 ヒストグラム (それぞれ F 及び H) であり、(E) は細胞残屑を除外するためにゲーティングし、(G) はしていない。(F) 及び (H) のゲートは、MFI 2 8 2、即ち ZsGreen 陰性細胞の MFI の 1 0 0 倍 (D 図参照) の細胞の割合に対応する。

【図 1 9】MC40 ターゲティングペプチドの識別を示す。図中に示す概念図は、MC40 ターゲティングペプチドを選択するのに用いられたプロセスを表す。1 x 1 0 ¹¹ p f u / m L のペプチドを、ヒト IgG の Fc ドメインに融合された 1 0 0 n M の組み換えヒト Met (rhMet) と共に室温で 1 時間培養した。プロテイン A 又はプロテイン G でコーティングした磁性粒子を用いて Met - ファージ複合体を親和性捕捉し、続いて TBS (5 0 m M の Tris - HCl、1 5 0 m M の NaCl、pH 7 . 4) で 1 0 回洗浄して未結合のファージを除去した。結合したファージクロンは低 pH 緩衝液 (0 . 2 M グリシン、1 m g / m L の BSA、pH 2 . 2) で溶出し、溶出物を宿主細菌 (大腸菌 E R 2 7 3 8) の感染によって増幅した。

【図 2 0】MC40 ターゲティングペプチドの特徴を示す。(A) は、5 回目の選択ラウンド後のペプチド配列アラインメントである。主配列 ASVHFPP は、以前に確認されていた Met 特異的な 1 2 m e r の Y L F S V H W P P L K A (配列番号 1 8、Zhao ら、ClinCancerRes 2007; 13(20 6049-6055)) の下線部分に相似である。標的に無関係の H A I Y P R H ペプチド (約 1 0 %) (配列番号 1 9、Brammer ら、Anal.Biochem. 377 (2008) 88-89) を提示するファージクロンは、配列アラインメントから除かれた。(B) 及び (C) は、親和性選択したファージクロンが rhMet に結合した度合を、酵素結合免疫吸着剤法 (ELISA) によって測定した。(B) に示す ELISA のスキームは、材料及び方法の項で説明する。ELISA の結果を (C) に示す。(D) は、Met に結合しないペプチドを除去した後の配列アラインメントである。図 S - 9 に示す共通配列は

、このアラインメントから決定された。(E)及び(F)は、(1)Metに対するAlexaFluor(登録商標)488標識モノクローナル抗体と、無関係なファージクローン(TPDWLP)(配列番号20)と、M13ファージに対するAlexaFluor(登録商標)546標識モノクローナル抗体とに暴露された(青色のドット)、又は(2)Metに対するAlexaFluor(登録商標)488標識モノクローナル抗体と、MC40クローンと、M13ファージに対するAlexaFluor(登録商標)546標識モノクローナル抗体とに暴露された(橙色のドット)、Hep3B(E)及び肝細胞(F)についてのフローサイトメトリーの散布図である。未処理細胞(赤色のドット)を用いて、FL-1(AlexaFluor(登録商標)488蛍光)及びFL-2(AlexaFluor(登録商標)546蛍光)のチャンネルについての電圧パラメータを設定した。

【図21】Hep3Bに暴露されたMC40で標的を定められたプロトセルについての例示の結合曲線である。図5Aの解離定数を求めるために、 1×10^6 個のHep3B又は肝細胞をサイトカラシンDで前処理してエンドサイトーシスを抑制し、AlexaFluor(登録商標)647で標識されMC40で標的を定められた種々の濃度のプロトセルと共に37℃で1時間培養した。フローサイトメトリーを用いて得られた細胞群の平均蛍光強度を測定し、プロトセル濃度に対してプロットして全体の結合曲線を得た。非特異的結合は、飽和濃度の非分類の肝細胞増殖因子の存在下において、AlexaFluor(登録商標)647で標識されMC40で標的を定められたプロトセルと共に細胞を培養することによって求められた。特異的結合曲線は、非特異的結合曲線を全体の結合曲線から引くことによって得られた。 K_d 値は、特異的結合曲線から計算された。この図に示す実験において、プロトセルのSLBは5wt%のDOPE、30wt%のコレステロール、及び10wt%のPEG-2000(18:1)を含むDOPCからなり、0.015wt%(約6ペプチド/粒子)のMC40ターゲティングペプチドで修飾された。対応する K_d 値は 1050 ± 142 pMである。全てのエラーバーは、 $n = 5$ の場合の95%信頼区間を表す(1.96)。

【図22】MC40で標的を定められたプロトセルが受容体依存性エンドサイトーシスによって内在化され、H5WYGペプチドの非存在下でリソソームへ誘導されることを示す。(A)は、Hep3B又は肝細胞の細胞のそれぞれによって1時間以内に37℃で内在化された、MC40で標的を定められたプロトセルの平均数である。 1×10^6 個の細胞を飽和濃度($100 \mu\text{g}/\text{mL}$)のヒト肝細胞増殖因子(HGF)の非存在下(-)又は存在下(+)において種々の濃度のプロトセルと共に培養し、フローサイトメトリーを用いて各細胞に結合した粒子の平均数を求めた。プロトセルをNBD及びpHrodo(商標)で標識して、表面に結合した粒子を酸性細胞内区画に内在化されたものから区別した(それぞれについて)。エラーバーは、 $n = 3$ の場合の95%信頼区間を表す(1.96)。(B)は、プロトセルと、(1)Rab5、(2)Rab7、(3)リソソーム関連膜タンパク質1(LAMP-1)又は(4)Rab11aとの間のピアソンの相関係数(r 値)を示す。Hep3B細胞を1000倍の過剰量のAlexaFluor(登録商標)594標識プロトセルと共に37℃で1時間培養した後、固定して透過処理し、Rab5、Rab7、LAMP-1、又はRab11aに対してAlexaFluor(登録商標)488標識抗体と共に培養した。SlideBookソフトウェアを用いて r 値を求めた。 r 値は、 $n = 3 \times 50$ 細胞の平均値 \pm 標準偏差として表される。 r 値計算の際に細胞境界の外のピクセルを無視できるように、微分干渉(DIC)画像を用いてHep3B細胞の境界線を定めた。プロトセルのSLBは、5wt%のDOPE、30wt%コレステロール、及び10wt%のPEG-2000(18:1)を含むDOPCからなり、0.015wt%のMC40及び0.500wt%のH5WYGで修飾された。

【図23】ヒストンでパッケージングされたpCB1がNLSで修飾され、MC40で標的を定められたプロトセルによって送達された場合に、HCC細胞の核内で時間に依存して濃縮されることを示す。(A)~(C)は、MC40で標的を定められ、pCB1が装填された1000倍の過剰量のプロトセルに37℃で15分(A)、12時間(B)、又

は24時間(C)暴露されたHep3B細胞の共焦点蛍光顕微鏡法画像である。(B)については、プロトセルのエンドソーム脱出及びpCB1の細胞質ゾル内分散は、約2時間後までには明白であった。しかし、ZsGreen発現は12~16時間まで検出可能でなかった。24時間の時点で、Cy5標識pCB1は細胞内全体に分布したままであった。一方、(C)において細胞質ゾルの染色が見えないのは、核内に局在したピクセルの飽和を回避するためにCy5チャンネルのゲインを下げたせいである。シリカコアはAlexaFluor(登録商標)594で標識され(赤色)、pCB1はCy5で標識され(白色)、細胞核はヘキスト33342で対比染色された(青色)。スケールバー=20 μ m。(D)は、Cy5で標識したpCB1及びヘキスト33342で標識したHep3Bの核についての、時間に対するピアソンの相関係数(r値)である。SlideBookソフトウェアを用いてr値を求めた。r値は、 $n = 3 \times 50$ 個の細胞の平均値 \pm 標準偏差として表される。r値計算の際に細胞境界の外のピクセルを無視できるように、微分干渉(DIC)画像を用いてHep3B細胞の境界線を定めた。プロトセルのSLBは、5wt%のDOPE、30wt%コレステロール、及び10wt%のPEG-2000(18:1)を含むDOPCからなり、0.015wt%のMC40及び0.500wt%のH5WYGで修飾された。

【図24】ヒストンでパッケージングされたpCB1がNLSで修飾され、MC40で標的を定められたプロトセルによって送達された場合に、分裂中及び非分裂中のHCC細胞の両方をほぼ100%の効率で選択的にトランスフェクションすることを示す。(A)、(C)及び(E)は、MC40で標的を定められ、pCB1が装填された1000倍の過剰量のプロトセルに37 $^{\circ}$ Cで24時間暴露されたHep3B細胞の共焦点蛍光顕微鏡法画像である。Hep3B細胞は、(A)では分裂中であり、(C)及び(E)では約95%コンフルエントであった。全ての画像においてpCB1はヒストンで予めパッケージングされており、(E)において、pCB1-ヒストン複合体はNLSで更に修飾された。シリカコアはAlexaFluor(登録商標)594で標識され(赤色)、pCB1はCy5で標識され(白色)、細胞核はヘキスト33342で対比染色された(青色)。スケールバー=20 μ m。(B)、(D)及び(F)は、MC40で標的を定められ、pCB1が装填されたプロトセル(「PC」)1 \times 10⁹個に37 $^{\circ}$ Cで24時間連続して暴露された際に、ZsGreen発現陽性になる1 \times 10⁶個のHep3B及び肝細胞の割合である。細胞は(B)では分裂中であり、(D)及び(F)では約95%コンフルエントであった。x軸は、CB1プラスミド(「pCB1」)及びpCB1-ヒストン複合体(「複合体」)がNLSで修飾されていたか否かを示す。pCB1単独に加えて、DOTAPとDOPEとの1:1(w/w)混合物でパッケージングされたpCB1も対照として用いられた。細胞を20mg/mLの小麦胚芽アグルチニン(WGA)に暴露し、核膜孔複合体を経るNLS修飾したpCB1の移行を遮断した。エラーバーは、 $n = 3$ の場合の95%信頼区間を表す(1.96)。 (G)~(I)は、それぞれ(A)、(C)及び(E)で用いた細胞の細胞周期のヒストグラムである。G₀/G₁期の細胞の割合を各ヒストグラムについて示す。全ての実験において、プロトセルのSLBは5wt%のDOPE、30wt%コレステロール、及び10wt%のPEG-2000(18:1)を含むDOPCからなり、0.015wt%のMC40及び0.500wt%のH5WYGで修飾された。

【図25】MC40で標的を定められ、pCB1が装填されたプロトセルに37 $^{\circ}$ Cで1時間又は72時間暴露されたHep3B(A)及び肝細胞(B)の共焦点蛍光顕微鏡法画像を示す。pCB1濃度は、全ての実験において5pMに維持された。(B)の矢印は、有糸分裂細胞を示す。サイクリンB1はAlexaFluor(登録商標)594標識モノクローナル抗体で標識され(赤色)、細胞核はヘキスト33342で染色された(青色)。プロトセルのSLBは、5wt%のDOPE、30wt%のコレステロール、及び10wt%のPEG-2000(18:1)を含むDOPCからなり、0.015wt%のMC40及び0.500wt%のH5WYGで修飾された。全てのスケールバー=20 μ m。

【図26】MC40で標的を定められ、pCB1が装填されたプロトセルに37℃で1時間又は72時間暴露されたHep3B(A)及び肝細胞(B)の共焦点蛍光顕微鏡法画像を示す。pCB1濃度は、全ての実験において5pMに維持された。細胞をAlexaFluor(登録商標)647標識アネキシンV(白色)及びヨウ化プロピジウム(赤色)で染色し、それぞれ初期及び後期のアポトーシスを試験した。細胞核はヘキスト33342で対比染色された(青色)。プロトセルのSLBは、5wt%のDOPE、30wt%のコレステロール、及び10wt%のPEG-2000(18:1)を含むDOPCからなり、0.015wt%のMC40及び0.500wt%のH5WYGで修飾された。全てのスケールバー=20µm。

【図27】双性イオン性脂質からなるSLBを有するプロトセルが、ごく低い非特異的細胞毒性しか誘導しないことを示す。1×10⁹個のAPTES修飾メソ多孔性のシリカナノ粒子、APTES修飾コアを有するDOPCプロトセル、スクランブルshRNA配列をコードするプラスミド(「スクランブルpCB1」)が装填されたDOPCプロトセル、又はスクランブルpCB1が装填されたDOTAP/DOPE(1:1w/w)リポプレックスに37℃で48時間連続して暴露した際に、アポトーシス性になる1×10⁶個のHep3Bの割合を示す。プロトセル及びリポプレックスは、10wt%のPEG-2000、0.015wt%のMC40、及び0.500wt%のH5WYGで修飾された。正荷電及び負荷電のポリスチレンナノ粒子(それぞれ「アミン-PS」及び「カルボキシル-PS」)を正の対照として用い、一方で10mMの抗酸化剤N-アセチルシステイン(NAC)又は1pmolの遊離したpCB1に暴露されたHep3Bを負の対照として用いた。全てのエラーバーは、n=3の場合の95%信頼区間を表す(1.96)。

【発明を実施するための形態】

【0023】

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。用語が本明細書で特に定義されない場合には、その用語は当業者による使用と一致した方法で用いられるものと理解される。

【0024】

ある数値の範囲が与えられた場合には、その範囲の上限値と下限値との間にある各値は、文中に別に明記しない限り下限値の単位の10分の1まで、及びその記載された範囲におけるいずれかの他の記載された値又は介在値は、本発明に包含されるものと理解される。これらのより狭い範囲の上限値及び下限値は、そのより狭い範囲に独立して含まれてもよく、同様に本発明に包含され、記載された範囲でのいずれかの具体的に除外された限界値に従う。記載された範囲が限界値の一方又は両方を含む場合には、それらの限界値の一方又は両方を除外した範囲も本発明に含まれる。ある置換基が1つ以上のマーカッシュ群で可能であるものである場合には、安定な結合を形成する置換基のみが用いられるものと理解される。

【0025】

別に定義されない限り、本明細書で用いる全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する分野の当業者によって通常理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと類似又は同等のいずれかの方法及び材料も本発明の実施又は試験に用いることができるが、ここでは好ましい方法及び材料を説明する。

【0026】

本明細書及び特許請求の範囲で用いられる場合、単数形の「ある」(a、an)、及び「その(前記)」(the)には、文脈において明白に別に指示がない限り、複数への言及が包含されることに留意しなければならない。

【0027】

更に、次の用語は以下に示す定義を有する。

【0028】

用語「患者」又は「対象」は、本明細書全体にわたって、文脈により動物、通常は哺乳動物(特に家畜及び好ましくはヒトを含む)を記すために用いられ、本発明の化合物又は

10

20

30

40

50

組成物を用いた治療（予防的治療（予防）を含む）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。殆どの場合、本発明の患者又は対象は、一方又は両方の性別のヒト患者である。

【0029】

用語「有効（な）」は、別に示されない限り、その結果が感染及び／又は病態の予防及び／又は治療法に関するか、あるいは本明細書に別に記載の予防及び／又は治療法に関するかを問わず、その使用の文脈において用いられる場合に所期の結果を生じる又はもたらす量の化合物又は成分を記すために用いられる。用語「有効（な）」は、本出願において別に記載される又は使用される全てのその他の有効量又は有効濃度の用語（用語「治療的に有効」を含む）を包含する。

10

【0030】

用語「化合物」は、本明細書で開示されるいずれかの特定の化合物又は生物活性剤を記すために用いられ、いずれか及び全ての立体異性体（ジアステレオマーを含む）、個々の光学異性体（エナンチオマー）又はラセミ混合物、医薬的に許容される塩、並びにプロドラッグの形態を含む。用語「化合物」は、本明細書においては安定な化合物を指す。文脈におけるその使用の範囲内で、用語「化合物」は本明細書に別に記載の単一の化合物又は化合物の混合物を指し得る。

【0031】

用語「生物活性剤」は、本発明の実施形態における使用のために処方可能ないずれかの生理的に活性な化合物又は薬物を指す。生物活性剤の例としては、癌又は癌に続発する病態若しくは状態を治療するために用いられる本発明の化合物を含み、抗ウイルス剤、特に抗HIV剤、抗HBV剤、及び／又は抗HCV剤（特に肝細胞癌を治療する場合）並びに本明細書に別に記載するその他の化合物又は薬剤が含まれてもよい。

20

【0032】

用語「治療する」（*treat*）、「治療すること」（*treating*）、及び「治療」（*treatment*）は、疾患のリスクがある又は疾患に罹患した患者に利益を提供するいずれかの行為を指すために同義的に用いられ、少なくとも1つの症状の緩和、抑制、鎮静又は除去による状態の改善、疾患の進行の遅延、疾患の発症の予防、遅延又はその可能性の抑制などが含まれる。ウイルス感染の場合には、これらの用語はウイルス感染にも適用され、好ましくは一部の特に好ましい実施形態においては感染の病原体であるウイルスの根絶又は除去（診断法の限界によって規定される）を含む。

30

【0033】

「治療」は、本明細書で用いる場合、主に癌の予防的及び治療的な治療の両方を包含するが、その他の病態、例えばウイルス感染、特にHBV及び／又はHCVも包含する。本発明の化合物は、例えば疾患発生の前に哺乳動物に予防的に投与して、その疾患の可能性を低減することができる。予防的な投与は、哺乳動物での疾患のその後の発生の可能性を低減若しくは減少させ、又はその後に発生する疾患（特に癌の転移を含む）の重症度を減少させる（抑制する）のに有効である。あるいは、本発明の化合物は、例えば既に疾患に罹患している哺乳動物に治療的に投与できる。治療的な投与の一実施形態においては、本発明の化合物の投与は疾患を除去し、及び癌の緩解をもたらす又はその転移の可能性を實質的に除去するのに有効である。本発明の化合物の投与は、癌の場合のように疾患の重症度を減少させるのに又は罹患した哺乳動物の寿命を延ばすのに、あるいはB型肝炎ウイルス（HBV）及び／又はC型肝炎ウイルス感染（HCV）の感染の場合のように疾患の病原体を抑制する若しくは場合によっては除去するのに有効である。

40

【0034】

用語「医薬的に許容される」は、本明細書で用いる場合、本明細書に記載の治療を達成するために化合物又は組成物が対象（ヒト患者を含む）への投与に適し、疾患の重症度及び治療の必要性に照らして不当に有害な副作用を有さないことを意味する。

【0035】

用語「抑制（阻害）」は、本明細書で用いる場合、起こり得る結果の部分的又は完全な

50

除去を指す。「抑制（阻害）剤（インヒビター）」は、抑制（阻害）する能力を有する化合物／組成物である。

【0036】

用語「予防」は、文脈で用いられる場合、本発明の1つ以上の化合物若しくは組成物の単独又は別の薬剤との組み合わせでの投与又は同時投与の結果として、「可能性を低減すること」又は疾患、状態若しくは病態が起ることを予防することを意味する。「予防」が100%有効であることは、ほとんどないことに注意されたい。従って用語「予防」及び「可能性を低減すること」は、患者又は対象の一定の集団において、本発明の化合物の投与が特定の状態若しくは病態（特に癌の増殖若しくは転移のような病態の悪化）又は疾患進行のその他の一般に認められた指標が起る可能性を低減する、あるいはそれらが起ることを抑制するという事実を示すために用いられる。

10

【0037】

用語「プロトセル」は、シリカ、ポリスチレン、アルミナ、チタニア、ジルコニア、又は一般的に金属酸化物、有機金属塩、有機珪酸塩、又はそれらの混合物を含む材料からなる多孔性ナノ粒子を記すために用いられる。多孔性球形シリカナノ粒子は好ましいプロトセルのために用いられ、担持された脂質又はポリマーの二重層又は多分子層によって囲まれる。本発明の種々の実施形態においては、本発明のナノ構造体、ナノ構造体を構築及び使用する方法、並びにプロトセルを提供する方法を提供する。最も基本的な形態であるプロトセルの多くは、当分野で公知である。5nm未満～200nm若しくは500nm以上のサイズ（直径）に渡る種々のサイズ範囲の多孔性シリカ粒子は当分野において容易に入手可能であり、又は当分野で公知の方法を用いて容易に調製できる（実施例の項参照）。あるいはその代わりに、Meliorum Technologies (New York, Rochester)、SkySpring Nanomaterials, Inc. (米国, Texas, Houston) 又はDiscovery Scientific, Inc. (British Columbia, Vancouver) から購入できる。多様なシリカナノ粒子は、Carollらの手順 (Langmuir, 25, 13540-13544 (2009)) を用いて容易に調製できる。プロトセルは、当分野で公知の方法を用いて容易に得られる。本出願の実施例の項では、本発明に有用なプロトセルを得るための特定の方法を提供する。本発明のプロトセルは容易に調製でき、シリカナノ粒子の表面に融合した脂質を含むプロトセルを含む。例えば、Liuら, Chem. Comm., 5100-5102 (2009)、Liuら, J. Amer. Chem. Soc., 131, 7567-7569 (2009)、Luら, Nature, 398, 223-226 (1999) 参照。本発明での使用のための好ましいプロトセルは、Ashleyら, Nature Materials, 2011, May; 10 (5): 389-97、Luら, Nature, 398, 223-226 (1999)、Carollら, Langmuir, 25, 13540-13544 (2009)、及び以下の実験の項に別途示す手順に従って調製される。

20

30

【0038】

本発明の一実施形態においては、ナノ構造体は脂質のシェル（好ましくは二重層だが、場合により単分子層又は多分子層）で囲まれた多孔性粒子コアからなるコア-シェル構造を含む (Liuら, JACS, 2009, 前出参照)。多孔性粒子コアは、例えば上記の無機材料及び／又は有機材料からなる多孔性ナノ粒子を含み、脂質二重層によって囲まれていることができる。本発明において、これらの脂質二重層に囲まれたナノ構造体は、担持された脂質二重層の膜構造を有するので、「プロトセル」又は「機能上のプロトセル」と呼ばれる。本発明の複数の実施形態においては、プロトセルの多孔性粒子コアには種々の所望の化学種（「カージ」）が充填されることができる。化学種は、小分子（例えば、本明細書に別に記載の抗癌剤）、高分子（特に、RNA（例えば短鎖干渉RNA (siRNA) 又は短鎖ヘアピンRNA (shRNA) を含む）若しくはポリペプチド（リシン毒素A鎖のようなポリペプチド毒素又はジフテリア毒素A鎖DTxのようなその他の毒性ポリペプチドを含む）、レポーターポリペプチド（例えば、特に蛍光緑色タンパク質）、半導体量子ドット、金属系ナノ粒子、金属酸化物ナノ粒子、又はそれらの組み合わせを含む。本発明のいくつかの好ましい態様においては、プロトセルには超らせんプラスミドDNAが装填され、それはタンパク質（例えば増殖因子受容体、又は細胞（特に癌細胞）の増殖の原因となり若しくはそれを助け、癌細胞の増殖停止及びアポトーシスを誘導するその他の受容体。

40

50

特に上皮増殖因子 / E G F R、血管内皮増殖因子受容体 / V E G F R - 2、又は血小板由来増殖因子受容体 / P D G F R - を含む) の発現を抑制するために使用されることができる治療用若しくは / 又は診断用のペプチド、並びに短鎖ヘアピン RNA / s h RNA 若しくは短鎖干渉 RNA / s i RNA を送達するために用いられることができる。

【 0 0 3 9 】

一部の実施形態において、カーゴ成分としては、例えば特定の目的 (例えば本明細書に開示の治療用途又は診断用途) 用の化学的な小分子 (特に抗癌剤及び抗ウイルス剤 (抗 H I V 剤、抗 H B V 剤、及び / 又は抗 H C V 剤を含む)、核酸 (D N A 及び R N A (例えば s i R N A 及び s h R N A、並びに細胞への送達後に 1 つ以上のポリペプチド又は R N A 分子を発現するプラスミド) が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【 0 0 4 0 】

一部の実施形態においては、プロトセルの脂質二重層は生体適合性を提供することができ、かつ標的を定めるための化学種 (例えばターゲティングペプチド (抗体を含む)、アプタマー、及び P E G (ポリエチレングリコール)) を有するように修飾されることができ、例えばプロトセルの更なる安定性及び / 又は生物活性細胞への標的送達が可能である。

【 0 0 4 1 】

本発明のプロトセル粒子のサイズ分布は、用途に応じて単分散又は多分散にすることができる。シリカコアはある程度まで単分散 (即ち、特に溶液法を用いて調製される場合、直径が約 5 % よりもばらつかないようなサイズの群、例えば 2 0 0 n m の直径のプロトセルの場合には $\pm 1 0$ n m である) にでき、又はある程度まで多分散 (即ち、多分散群は平均 (又は中央) 直径から大きくばらついてよい。例えばエアロゾルによって調製される場合には、最大 $\pm 2 0 0$ n m 以上である) にできる (添付の図 1 参照)。多分散群を大きさで分けて単分散群にすることができる。これらはいずれもプロトセルの生成に好適である。本発明において好ましいプロトセルは、好ましくは直径約 5 0 0 n m 以下であり、患者又は対象への送達をもたらして所期の治療効果を生ずるためには好ましくは直径約 2 0 0 n m 以下である。

20

【 0 0 4 2 】

本発明のプロトセルは、通常は直径約 8 ~ 1 0 n m 超から約 5 μ m のサイズの範囲であり、好ましくは直径約 2 0 n m ~ 3 μ m、約 1 0 n m ~ 約 5 0 0 n m、より好ましくは約 2 0 ~ 2 0 0 n m (約 1 5 0 n m を含み、これを平均直径又は直径の中央値のとすることができる) である。上記のように、プロトセルの群はプロトセルの群の平均直径又は直径の中央値に基づいて単分散又は多分散と見なされる。直径約 8 n m よりも小さい粒子は腎臓を通して排出され、約 2 0 0 n m よりも大きい粒子は肝臓及び脾臓によって捕捉されるので、サイズは本発明の治療及び診断の態様にとって非常に重要である。従って本発明の一実施形態は、患者又は対象における薬物送達及び診断のためのより小さいサイズのプロトセルに焦点を合わせる。

30

【 0 0 4 3 】

本発明のプロトセルは、メソ細孔、好ましくはナノ構造体材料に見られる細孔を含むことを特徴とする。それらの細孔 (少なくとも 1 つだが、多くの場合には多数) は、ナノ粒子の表面と交わっていてもよく (ナノ粒子の表面に現れた細孔の一方又は両方の末端が存在することによって)、又はナノ構造体の内部にあって、少なくとも 1 つ以上のメソ細孔がナノ粒子の表面のメソ細孔と相互に連結していてもよい。より小さいサイズの相互に連結した細孔は、多くの場合に表面のメソ細孔の内側に見られる。メソ細孔の細孔サイズ的全範囲は、直径 0 . 0 3 ~ 5 0 n m にすることができる。メソ細孔の好ましい細孔サイズは約 2 ~ 3 0 n m の範囲であり、単一サイズ、二峰性又は傾斜的であってもよく、規則的又は不規則 (本質的にランダムな配置若しくは蠕虫状) であってもよい (添付の図 2 参照)。

40

【 0 0 4 4 】

メソ細孔 (I U P A C 定義では直径 2 ~ 5 0 n m) は、鋳型剤 (界面活性剤、ブロック

50

コポリマー、分子、高分子、エマルション、ラテックスビーズ、又はナノ粒子など）によって「鑄造」される。更に、プロセスによっては約 0.03 nm まで小さいマイクロ細孔（IUPAC 定義では直径 2 nm 未満）をもたらすことができる（例えばエアロゾルプロセスの鑄型成分が用いられない場合）。メソ細孔をマクロ細孔、即ち直径 50 nm に拡大することもできる。

【0045】

ナノ粒子材料の細孔表面の化学的性質は非常に多様であり得る。全ての有機シランは、カチオン性、アニオン性、親水性、疎水性、反応性の基をもたらす。細孔表面の化学的性質、特に電荷及び疎水性は、装填容量に影響する（添付の図3参照）。引力静電相互作用又は疎水性相互作用は装填容量を調節/増強し、放出速度を調節する。より大きい表面積は、それらの引力相互作用を介して薬物/カーゴのより多い装填をもたらし得る（以下参照）。

10

【0046】

ナノ粒子の表面積は、 N_2 -BET 法による測定によると、約 $100 \text{ m}^2/\text{g}$ ~ > 約 $1200 \text{ m}^2/\text{g}$ の範囲である。通常は、細孔サイズが大きくなると表面積は小さくなる（図2Aの表参照）。鑄型剤を除かない場合、又は細孔が 0.5 nm 未満であり、従って動力学効果のせいで 77 K における N_2 収着法によって測定可能でない場合、表面積は理論上は本質的に 0 まで減少し得る。しかしながら、この場合には CO_2 又は水の収着によって測定可能であるが、恐らく非多孔性と思なされる。これは鑄型を用いずに調製したシリカコア中に生体分子が直接被包される場合に該当すると考えられ、その場合には粒子（内部のカーゴ）は、細胞への送達後のシリカマトリクスの分解によって放出される。

20

【0047】

通常、本発明のプロトセルは、最大約 50 wt % の容量（（カーゴ重量 / 装填済みのプロトセル重量） $\times 100$ として定義される）までカーゴが装填される。カーゴの最適な装填は、多くの場合に約 0.01 ~ 10 % であるが、プロトセル中にカーゴとして組み込まれる薬物又は薬物の組み合わせに依存する。これは通常は 10^{10} 個の粒子当たりの μ として表され、本発明者は 10^{10} 個の粒子当たり $2000 \sim 100 \mu$ の範囲の値を得ている。本発明の好ましいプロトセルは、pH 約 5.5（エンドソームの pH）でカーゴの放出を示すが、生理的 pH 7 又はより高い pH（7.4）では安定である。

【0048】

30

装填用の内部スペースの表面積は、その最適値が約 1.1 ~ 0.5 立方センチメートル / グラム（cc / g）の範囲の細孔容積である。ただし、本発明の一実施形態のプロトセルでは、表面積はナノ粒子外部の幾何学的表面積ではなく、主に内部であることに注意されたい。

【0049】

本発明の一実施形態の多孔性粒子に担持された脂質二重層は、非多孔性支持体に担持された脂質二重層又はリボソームの脂質二重層よりも低い融解転移温度を有する（即ちより流動性である）。二重層の流動性は、側方拡散及び標的細胞表面受容体によるペプチドの動員を可能にするので、これは場合によっては、低ペプチド密度のターゲティングリガンドの高親和性結合を達成するために重要である。一実施形態においてはペプチドにクラスターをもたらす、それは補足的な標的への結合を促進する。

40

【0050】

本発明においては、脂質二重層は組成が非常に多様であり得る。通常、リボソームに用いることができるいずれの脂質又はポリマーも、プロトセルに用いることができる。好ましい脂質は本明細書に別に記載する。本発明のプロトセルで使用するための特に好ましい脂質二重層は、脂質の混合物（本明細書に別に記載する）を、重量によって、5 wt % の D O P E、5 wt % の P E G、30 wt % のコレステロール、60 wt % の D O P C 又は D P P C の重量比で含む。

【0051】

電位により測定されるメソ多孔性のシリカ NP コアの電荷は、アミンシランの 2 - (

50

アミノエチル)プロピルトリメトキシシラン(AEPTMS)又はその他の有機シランによる修飾によって-50mVから+50mVまで単調に変化させられる。更にこの電荷修飾は、プロトセルのカーゴ中の薬物の装填を変化させる。通常、担持された脂質二重層の融合後に電位は約-10mVと+5mVとの間まで低下するが、これは血中循環時間を最大化し非特異的相互作用を回避するのに重要である。

【0052】

どのように界面活性剤鑄型が除去されるか(例えば、高温(500)における焼成、酸性エタノールによる抽出)及びシリカの骨格に含まれるAEPTMSの量に依存して、シリカの分解速度は非常に変わり得る。更にこれによって内部のカーゴの放出速度が調節される。これが起こる理由は、細孔の内部表面積に強く引きつけられた分子が粒子コアからゆっくりと拡散するため、粒子コアの分解によって放出速度が部分的に調節されるためである。

10

【0053】

本発明の一実施形態のプロトセルの更なる特徴としては、pH7において安定である、即ちそのカーゴを漏出させないが、pH5.5(エンドソームのpH)においては脂質又はポリマーの被覆が不安定化してカーゴ放出を開始する。このpH誘発の放出は、エンドサイトーシスによってプロトセルが細胞中に内在化され、そこでpH誘発の複数の事象がエンドソームへの放出をもたらす、その結果として細胞の細胞質ゾルへの放出をもたらす時点まで、プロトセルの安定性を維持するために重要である。定量的な実験の証拠からは、標的化プロトセルは、高い親和性のIgGに必要なT細胞のヘルプを支持しないので、弱い免疫応答しか引き起こさず、好ましい結果が示されている。

20

【0054】

本発明のプロトセルは、従来技術のプロトセルから区別される少なくとも1つ又は複数の特徴(実施形態に応じて)を示す。

1) 従来技術とは異なり、本発明の一実施形態においては平均サイズ(直径)が約200nm未満のナノ粒子を特定する。このサイズは、受容体依存性エンドサイトーシスによる効率的な細胞内取り込みを可能にするように設計されている。

2) 本発明の一実施形態においては、生体内分布の制御を可能にするために、単分散及び/又は多分散のサイズを特定する。

3) 本発明の一実施形態は、受容体依存性エンドサイトーシスを誘導する標的化されたナノ粒子に関する。

30

4) 本発明の一実施形態は、融合ペプチド又はエンドソーム分解性ペプチドの含有によって細胞質内へのカーゴの分散を誘導する。

5) 本発明の一実施形態は、pHで誘発されるカーゴ放出をする粒子を提供する。

6) 本発明の一実施形態では、カーゴの制御された時間依存的放出(シリカナノ粒子マトリックスの熱誘起架橋の程度による)を示す。

7) 本発明の一実施形態は、時間依存的でpH誘発の放出を示すことができる。

8) 本発明の一実施形態は、複合的な複数のカーゴの細胞送達を包含し、提供することができる。

9) 本発明の一実施形態は、標的癌細胞の致死を示す。

40

10) 本発明の一実施形態は、標的癌細胞の診断を示す。

11) 本発明の一実施形態は、標的細胞への選択的移入を示す。

12) 本発明の一実施形態は、標的でない細胞の選択的除外(選択性)を示す。

13) 本発明の一実施形態は、担持された脂質二重層の増強された流動性を示す。

14) 本発明の一実施形態は、標的細胞に対してサブナノモルの制御された結合親和性を示す。

15) 本発明の一実施形態は、従来技術に見られる濃度よりも低いターゲティングリガンド密度でサブナノモルの結合親和性を示す。

16) 本発明の一実施形態は、従来技術では利用できない細部の微細な程度によって、従来技術から更に区別することができる。

50

【 0 0 5 5 】

用語「脂質」は、本発明で用いられるナノ粒子の表面に脂質二重層を形成するために用いられる成分を表すのに使用される。種々の実施形態では、脂質二重層を担持するナノ粒子から構築されるナノ構造体を提供する。本発明の複数の実施形態においては、ナノ構造体は、好ましくは例えば脂質二重層のシェルに囲まれた多孔性粒子コアを含むコア-シェル構造を含む。ナノ構造体、好ましくは上記の多孔性シリカナノ構造体は、脂質二重層の膜構造を担持する。本発明の複数の実施形態においては、プロトセルの脂質二重層は生体適合性を提供でき、更に例えばプロトセルの更なる安定性及び/又は生物活性の細胞(特に癌細胞)中への標的送達が可能ないように、標的を定めるための化学種(例えば、ターゲティングペプチド、融合ペプチド、抗体、アプタマー、及びPEG(ポリエチレングリコール)を含む)を有するように修飾されることができる。PEGが脂質二重層に含まれる場合、分子量は非常に様々であり得る。ただし約10~約100ユニットのエチレングリコール、約15~約50ユニット、約15~約20ユニット、約15~約25ユニット、約16~約18ユニットなどの範囲のPEGを用いることができ、アミン基を介してリン脂質に通常コンジュゲートされるPEG成分は、脂質二重層に含まれる脂質のうち、重量で約1%~約20%、好ましくは約5wt%~約15wt%、約10%を構成する。

10

【 0 0 5 6 】

リポソーム送達システムに用いられる多くの脂質を用いてナノ粒子上に脂質二重層を形成し、本発明のプロトセルを提供することができる。本発明の一実施形態のプロトセルを生成するために、ナノ粒子を囲む脂質二重層に、リポソームを形成するのに用いられる実質的にいかなる脂質を用いてもよい。本発明での使用のための好ましい脂質としては、例えば、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DOPC)、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DPPC)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-[ホスホル-L-セリン](DOPS)、1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン(18:1のDOTAP)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-(1'-rac-グリセロール)(DOPG)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DPPE)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000](18:1PEG-2000PE)、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000](16:0のPEG-2000PE)、1-オレオイル-2-[12-[(7-ニトロ-2-1,3-ベンゾオキサジアゾール-4-イル)アミノ]ラウロイル]-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(18:1~12:0のNBD-PC)、1-パルミトイル-2-{12-[(7-ニトロ-2-1,3-ベンゾオキサジアゾール-4-イル)アミノ]ラウロイル}-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(16:0-12:0のNBD-PC)、コレステロール、及びそれらの混合物/組み合わせが挙げられる。コレステロールは専門的には脂質ではないが、コレステロールは本発明の一実施形態のプロトセルの脂質二重層の重要な成分であり得るという事実から、本発明の一実施形態のために脂質として提供される。多くの場合、二重層の構造的完全性を増強するために、コレステロールをプロトセルの脂質二重層に含ませる。これらの脂質は全て、Avanti Polar Lipids, Inc.(米国、Alabama、Alabaster)から市販で容易に入手できる。DOPE及びDPPEは、ペプチド、ポリペプチド(抗体を含む)、RNA、及びDNAをアミン基を介して脂質にコンジュゲートする(適当な架橋剤を介して)のに特に有用である。

20

30

40

【 0 0 5 7 】

用語「レポーター」は、本発明の一実施形態のプロトセルのリン脂質二重層又はカーゴに含まれて測定可能なシグナルを提供する造影剤又は造影成分を記すために用いられる。この成分は蛍光シグナルを提供してもよく、又は特に放射線検出を可能にする放射性同位体であってもよい。プロトセルに用いる例示の蛍光標識(好ましくは脂質二重層又はシリ

50

カコアへのコンジュゲート又は吸着によるが、これらの標識はカーゴ成分（プロトセルによって細胞まで送達されるDNA、RNA、ポリペプチド、及び小分子など）に含まれてもよい）としては、ヘキスト33342（350/461）、4', 6 - ジアミジノ - 2 - フェニルインドール（DAPI、356/451）、AlexaFluor（登録商標）405カルボン酸スクシンイミジルエステル（401/421）、CellTracker（商標）バイオレットBMQC（415/516）、CellTracker（商標）グリーンCMFDA（492/517）、カルセイン（495/515）、AlexaFluor（登録商標）488 - アネキシンVコンジュゲート（495/519）、AlexaFluor（登録商標）488ヤギ抗マウスIgG（H+L）（495/519）、Click-iT（登録商標）AHA - AlexaFluor（登録商標）488タンパク質合成HCSアッセイ（495/519）、LIVE/DEAD（登録商標）フィクサブルグリーン死細胞染色キット（495/519）、SYTOX（登録商標）グリーン核酸染色（504/523）、Mitochondria（商標）レッドミトコンドリア過酸化物指示薬（510/580）、AlexaFluor（登録商標）532カルボン酸スクシンイミジルエステル（532/554）、pHrodo（商標）スクシンイミジルエステル（558/576）、CellTracker（商標）レッドCMTPX（577/602）、テキサスレッド（登録商標）1, 2 - ジヘキサデカノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン（テキサスレッド（登録商標）DHPE、583/608）、AlexaFluor（登録商標）647ヒドラジド（649/666）、AlexaFluor（登録商標）647カルボン酸スクシンイミジルエステル（650/668）、Ulysis（商標）AlexaFluor（登録商標）647核酸標識キット（650/670）、及びAlexaFluor（登録商標）647 - アネキシンVコンジュゲート（650/665）が挙げられる。蛍光シグナルを増強する又は蛍光の退色を遅らせる成分が含まれてもよく、SlowFade（登録商標）ゴールド・アンチフェード試薬（DAPI含有及び非含有）やイメージiT（登録商標）FXシグナル増強剤などである。これらの全ては当分野において周知である。更なるレポーターとしては、プラスミド（例えば、ヒストンでパッケージングされた超らせんDNAプラスミド）によって発現されるポリペプチドレポーターが含まれ、蛍光緑色タンパク質及び蛍光赤色タンパク質のようなポリペプチドレポーターが含まれる。本発明のレポーターは、患者における癌（癌組織）の存在若しくは進行及び/又は患者若しくは対象における治療の進行の診断を含めて、主に診断用途に用いられる。

【0058】

用語「ヒストンでパッケージングされた超らせんプラスミドDNA」は、「超らせん化」された好ましいプラスミドDNA（即ち、プロトセル中への効率的なパッケージングのためにより高密度になるように、プラスミド自体を折り畳ませて「超らせん化」させる過飽和塩溶液又はその他のイオン性溶液を用いてそれ自体が折り畳まれたもの）を用いる本発明のプロトセルの好ましい成分を記すために用いられる。プラスミドは、いずれかの数のポリペプチドを発現する、又はRNA（本明細書に別に記載の短鎖ヘアピンRNA/shRNA又は短鎖干渉RNA/siRNAを含む）をコードする、実質的にいかなるプラスミドであってよい。超らせん化されたら（高濃度塩溶液又はその他のアニオン性溶液を用いて）、超らせんプラスミドDNAを次にヒストンタンパク質と複合体化して、ヒストンでパッケージングされた「複合体化した」超らせんプラスミドDNAを生じさせる。

【0059】

「パッケージングされた」DNAは、本明細書においてはプロトセル中に装填されたDNA（細孔中に吸着されたもの又はナノ多孔性シリカコア自体の中に直接閉じ込められたもののいずれか）を指す。DNAを空間的に最小化するために多くの場合はパッケージングされる。これは、周囲の媒体の電荷を調整してDNAと例えば脂質、タンパク質又はその他のナノ粒子（通常は限定ではないがカチオン性）との小型の複合体を作ること、複数の異なる方法で達成できる。パッケージングされたDNAは、多くの場合にリボプレックス（即ち、DNAをカチオン性脂質混合物と複合体化すること）によって得られる。更

にDNAは、カチオン性タンパク質（ヒストン以外のタンパク質も含む）や金ナノ粒子（例えばナノフレア・ナノ粒子のコアが金である工学的なDNAと金属との複合体）を用いてもパッケージングされる。

【0060】

いずれかの数のヒストンタンパク質に加えて、DNAをより小さい体積にパッケージングするその他の手段（例えば通常はカチオン性のナノ粒子、脂質、又はタンパク質）も超らせんプラスミドDNA「ヒストンでパッケージングされた超らせんプラスミドDNA」をパッケージングするために用いられることができる。しかし、ヒト患者を治療することに関する治療的な態様においては、ヒトのヒストンタンパク質の使用が、好ましくは用いられる。本発明の一部の態様では、ヒトのヒストンタンパク質H1、H2A、H2B、H3、及びH4の好ましい比1:2:2:2:2での組み合わせであるが、他のヒストンタンパク質も、当分野で公知のようにその他の類似の比で用いられることができ、又は本発明の教示に従って容易に実施されることができる。DNAは、プラスミドDNAに代えて二本鎖直鎖DNAでもよく、任意で超らせん化、及び/又はヒストン若しくはその他のパッケージング成分でパッケージングされてもよい。

10

【0061】

本発明のこの態様に用いられることができるその他のヒストンタンパク質は、例えばH1F、H1F0、H1FNT、H1FOO、H1FX、H1H1のHIST1H1A、HIST1H1B、HIST1H1C、HIST1H1D、HIST1H1E、HIST1H1T；H2AF、H2AFB1、H2AFB2、H2AFB3、H2AFJ、H2AFV、H2AFX、H2AFY、H2AFY2、H2AFZ、H2A1、HIST1H2A、HIST1H2AB、HIST1H2AC、HIST1H2AD、HIST1H2AE、HIST1H2AG、HIST1H2AI、HIST1H2AJ、HIST1H2AK、HIST1H2AL、HIST1H2AM、H2A2、HIST2H2AA3、HIST2H2AC、H2BF、H2BFM、HSBFS、HSBFWT、H2B1、HIST1H2BA、HIST1HSBB、HIST1HSBC、HIST1HSBD、HIST1H2BE、HIST1H2BF、HIST1H2BG、HIST1H2BH、HIST1H2BI、HIST1H2BJ、HIST1H2BK、HIST1H2BL、HIST1H2BM、HIST1H2BN、HIST1H2BO、H2B2、HIST2H2BE、H3A1、HIST1H3A、HIST1H3B、HIST1H3C、HIST1H3D、HIST1H3E、HIST1H3F、HIST1H3G、HIST1H3H、HIST1H3I、HIST1H3J、H3A2、HIST2H3C、H3A3、HIST3H3、H41、HIST1H4A、HIST1H4B、HIST1H4C、HIST1H4D、HIST1H4E、HIST1H4F、HIST1H4G、HIST1H4H、HIST1H4I、HIST1H4J、HIST1H4K、HIST1H4L、H44、及びHIST4H4を含む。

20

30

【0062】

用語「核局在配列」は、ヒストンでパッケージングされた超らせんプラスミドDNAを構成するヒストンタンパク質中に組み込まれた又は架橋されたペプチド配列を指す。一部の実施形態においては、本発明のプロトセルは、ヒストンでパッケージングされたプラスミドが、発現及び最終的には細胞死を促進するために、細胞の核を通過してその内容物をそこに下ろす能力を増強する核局在配列で修飾（架橋）されたプラスミド（多くの場合、ヒストンでパッケージングされた超らせんプラスミドDNA）を更に含んでもよい（ただし、ヒストンタンパク質が核局在配列と架橋されても、あるいはプラスミド自体が改変されて核局在配列を発現してもよい。これらのペプチド配列は、ヒストンでパッケージングされたプラスミドDNA及び会合したヒストンを標的細胞核内に運ぶことを助ける。そこにおいて、治療用及び/又は診断用の分子（ポリペプチド及び/又はヌクレオチド）を標的細胞核内に送達するために、プラスミドは望みのペプチド及び/又はヌクレオチドを発現する。当分野で公知であるいずれかの数の架橋剤を用いて、ヒストンでパッケージングされたプラスミドを細胞核内に導入するのに用いられるヒストンタンパク質に、核局在配

40

50

列を共有結合することができる（多くの場合、ポリペプチドから突出して露出したアミノ酸側鎖中のリジン基で又は求核性若しくは求電子性の基を有するその他の基の位置で）。あるいは、核局在配列を発現するヌクレオチド配列は、ヒストンタンパク質を発現するヌクレオチド配列の近傍のプラスミドに配置されることができ、それによって核局在配列にコンジュゲートされたヒストンタンパク質の発現が起こって、標的細胞の核内へのプラスミドの運搬を促進する。

【0063】

タンパク質は、核膜を通して核内に入ることができる。核膜は、複数の同心膜である外膜及び内膜からなる。これらは核への入り口である。この外被は、孔又は巨大な核複合体からなる。NLSを持つように翻訳されたタンパク質は、インポーチン（別名カリオフィリン）に強く結合して一体となり、この複合体は核膜孔を通して移動する。いずれかの数の核局在配列を用いて、ヒストンでパッケージングされたプラスミドDNAを細胞の核内に導入することができる。好ましい核局在配列には、 $H_2N - G N Q S S N F G P M K G G N F G G R S S G P Y G G G G Q Y F A K P R N Q G G Y G G C - C O O H$ （配列番号9）、 $R R M K W K K$ （配列番号10）、 $P K K K R K V$ （配列番号11）、及び $K R [P A A T K K A G Q A] K K K K$ （配列番号12）（ヌクレオプラスミンのNLSであり、約10アミノ酸のスペーサーによって隔てられた塩基性アミノ酸の2つのクラスターからなる原型的な両方向性シグナル）が含まれる。多数のその他の核局在配列が当分野では周知である。例えば、LaCasseら、Nuclear localization signals overlap DNA- or RNA-binding domains in nucleic acid-binding proteins, Nucl. Acids Res., 23, 1647-1656 1995; Weis, K. Importins and exportins: how to get in and out of the nucleus (Trends Biochem Sci 1998 Jul; 23 (7): 235に訂正記事あり)。TIBS, 23, 185-9 (1998); Murat Cokol, Raj Nair & Burkhard Rost, "Finding nuclear localization signals", ウェブサイトubic.bioc.columbia.edu/papers/2000 nls/paper.html#tab2参照。

【0064】

用語「癌」は、無秩序な増殖、分化の欠如、局部組織浸潤、及び/又は転移をもたらす、正常な制御の喪失という独特の特質を有する腫瘍細胞（新生物）の増殖を記すために用いられる。本明細書で用いる場合、「新生物」は限定することなく、同種の組織における正常な増殖と比べての、対象又は宿主の組織中の細胞の形態上の異常、及び対象の組織中の細胞の病的増殖を含む。更に、新生物は、良性腫瘍、及び浸潤性又は非浸潤性の悪性腫瘍（例えば結腸腫瘍）を含む。悪性新生物は、より高度の異形成、又は細胞の分化及び配向の喪失を示し、更に浸潤及び転移の性質を有する点において、良性新生物と区別される。用語「癌」は文脈によって、多剤耐性癌を含めた薬物耐性癌も含む。本発明の標的細胞が生じる新生物又は異常増殖の例は、限定ではないがとりわけ、癌腫（例えば扁平上皮細胞癌、腺癌、肝細胞癌、及び腎細胞癌）、特に膀胱、骨、腸、乳房、子宮頸管、結腸（大腸）、食道、頭部、腎臓、肝臓（肝細胞）、肺、鼻咽頭、頸部、卵巣、膵臓、前立腺、及び胃の癌腫；白血病、例えば急性骨髄性白血病、急性リンパ球性白血病、急性前骨髄球性白血病（APL）、急性T細胞リンパ芽球性白血病、成人T細胞白血病、好塩基球性白血病、好酸球性白血病、顆粒球性白血病、有毛細胞白血病、白血球減少性白血病、リンパ性白血病、リンパ芽球性白血病、リンパ球性白血病、巨核球性白血病、小骨髄芽球性白血病、単球性白血病、好中球性白血病、及び肝細胞性白血病；良性及び悪性のリンパ腫、特にパーキットリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、及びB細胞リンパ腫；良性及び悪性のメラノーマ；骨髄増殖性疾患；肉腫、特にユーイング肉腫、血管肉腫、カボジ肉腫、脂肪肉腫、筋肉腫、末梢性神経上皮腫、及び滑膜肉腫；中枢神経系の腫瘍（例えば、グリオーマ、星状細胞腫、乏突起膠腫、上衣腫、膠芽腫、神経芽細胞腫、神経節神経腫、神経節膠腫、髄芽細胞腫、松果体細胞腫瘍、髄膜腫、髄膜肉腫、神経線維腫、及びシュヴァン鞘腫）；生殖系列腫瘍（例えば、腸癌、乳癌、前立腺癌、子宮頸部癌、子宮癌）、肺癌（例えば、小細胞肺癌、混合の小細胞癌及び非小細胞癌、胸膜中皮腫（転移胸膜中皮腫小細胞肺癌を含む）、及び非小細胞肺癌）、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、星状細胞腫、食道癌、膵臓癌、胃癌、肝臓癌、結腸癌、及びメラノーマ；混合型の新生物、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や奇形癌腫を含む。留意すべきことに、いくつかの腫瘍（特に肝細胞及び子宮頸部癌を含む）は、特に癌細胞上のMET受容体の上昇したレベルを示すことが証明されており、プロトセルと複合体化したMET結合ペプチドを含む本発明の実施形態の組成物及び治療法についての主な標的である。

【0065】

用語「共投与する」及び「共投与」は、本発明のプロトセル組成物の少なくとも1つを、少なくとも1つのその他の薬剤（多くの場合、本明細書に具体的に開示される少なくとも1つの更なる抗癌剤（本明細書に別に記載））と組み合わせて、有効量と考えられる量又は濃度で、同時又はほぼ同時に投与することを記すために同義的に用いられる。共投与される組成物／薬剤は同時に投与されることが好ましいが、組成物／薬剤の両方（又はそれ以上）の有効濃度が少なくとも短時間に渡って同時に患者体内に見られるようにして、薬剤が複数の時点で投与されてもよい。あるいは、本発明の一部の態様においては、それぞれの共投与された組成物／薬剤が、癌（特に肝細胞癌又は細胞性癌を含む）の抑制及び治療、並びにその他の病態、状態又は合併症の軽減又は抑制する最終的な成果を伴って、その抑制効果を別々の時点において患者体内で示すようにすることが可能であり得る。当然ながら、複数の病態、感染又はその他の状態が存在する場合には、必要に応じて本発明の化合物をその他の薬剤と組み合わせて、そのような他の感染、疾患又は状態を治療してもよい。

【0066】

用語「抗癌剤」は、任意でいずれかの種類の癌、とりわけ特に肝細胞又は子宮頸部癌を治療するために、本発明のプロトセルを含む1つ以上の組成物と組み合わせて処方されることができる化合物を記すために用いられる。本発明の化合物と共に処方可能な抗癌化合物は、例えば本発明に用いられ得る例示の抗癌剤を含み、エベロリムス、トラベクテジン、アブラキサン、TLK286、AV-299、DN-101、パゾパニブ、GSK690693、RTA744、ON0910、Na、AZD6244（ARRY-142886）、AMN-107、TKI-258、GSK461364、AZD1152、エンザスタウリン、バンデタニブ、ARQ-197、MK-0457、MLN8054、PHA-739358、R-763、AT-9263、FLT-3インヒビター、VEGFRインヒビター、EGFR-TKインヒビター、オーロラキナーゼインヒビター、PIK-1修飾剤、Bcl-2インヒビター、HDACインヒビター、c-METインヒビター、PARPインヒビター、Cdkインヒビター、EGFR-TKインヒビター、IGFR-TKインヒビター、抗HGF抗体、PI3キナーゼインヒビター、AKTインヒビター、JAK/STATインヒビター、チェックポイント-1又は2のインヒビター、接着斑キナーゼインヒビター、Mapキナーゼキナーゼ（mek）インヒビター、VEGFトラップ抗体、ペメトレキセド、エルロチニブ、ダサタニブ（dasatinib）、ニロチニブ、デカタニブ（decatanib）、パニツムマブ、アムルピシン、オレゴボマブ、Lep-etu、ノラトレキシド、azd2171、パタプリン、オフアツムマブ、ザノリムマブ、エドテカリン、テトランドリン、ルピテカン、テスミリフェン、オブリメルセン、チシリムマブ、イピリムマブ、ゴシポール、Bio111、131-I-TM-601、ALT-110、BIO140、CC8490、シレンギチド、ギマテカン、IL13-PE38QQR、INO1001、IPdR₁KRX-0402、ルカントン、LY317615、ノイラジアブ（neuradiab）、ピテスペン、Rta744、Sdx102、タランパネル、アトラセンタン、Xr311、ロミデブシン、ADS-100380、スニチニブ、5-フルオロウラシル、ボリノスタット、エトボシド、ゲムシタピン、ドキシソルピシン、リボソームドキシソルピシン、5'-デオキシ-5-フルオロウリジン、ピンクリスチン、テモゾロミド、ZK-304709、セリシクリブ；PD0325901、AZD-6244、カペシタピン、L-グルタミン酸、N-[4-[2-(2-アミノ-4,7-ジヒドロ-4-オキソ-1H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-5-イル)エチル]ベンゾイル]-二ナトリウム塩（七水和物）、カンプトテシン、PEG標識イリノテカン、タモキシフェン、トレミフェンクエン酸塩、アナストラゾール、エキセメスタン、レトロゾール、D

10

20

30

40

50

ES (ジエチルスチルベストロール)、エストラジオール、エストロゲン、結合型エストロゲン、ベパシズマブ、IMC-1C11、CHIR-258,); 3-[5-(メチルスルホニルピペラジンメチル)-インドリル-キノロン、バタラニブ、AG-013736、AVE-0005、[D-Ser(But)6, Azgly10]酢酸塩(ピロ-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(But)-Leu-Arg-Pro-Azgly-NH₂酢酸[C₅₉H₈₄N₁₈O₁₄-(C₂H₄O₂)_x, x=1~2.4]、ゴセレリン酢酸塩、リユープロリド酢酸塩、トリプトレリンバモ酸塩、酢酸メドロキシプロゲステロン、カプロン酸ヒドロキシプロゲステロン、酢酸メゲストロール、ラロキシフェン、ピカルタミド、フルタミド、ニルタミド、酢酸メゲストロール、CP-724714; TAK-165、HKI-272、エルロチニブ、ラパタニブ、カネルチニブ、ABX-EGF抗体、アービタックス、EKB-569、PKI-166、GW-572016、ロナファルニブ、BMS-214662、チピファルニブ; アミホスチン、NVP-LAQ824、ヒドロキサミン酸サブエロイルアニリド、バルプロ酸、トリコスタチンA、FK-228、SU11248、ソラフェニブ、KRN951、アミノグルテチミド、アムサクリン、アナグレリド、L-アスパラギナーゼ、カルメット・ゲラン桿菌(BCG)ワクチン、プレオマイシン、プセレリン、プスルファン、カルボプラチン、カルムスチン、クロラムブシル、シスプラチン、クラドリピン、クロドロネート、シプロテロン、シタラピン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ジエチルスチルベストロール、エピルピシン、フルダラビン、フルドロコルチゾン、フルオキシメステロン、フルタミド、ゲムシタビン、グリベック(gleevac)、ヒドロキシ尿素、イダルピシン、イホスファミド、イマチニブ、ロイプロリド、レバミゾール、ロムスチン、メクロレタミン、メルファラン、6-メルカプトプリン、メスナ、メトトレキサート、ミトマイシン、ミトタン、ミトキサントロン、ニルタミド、オクトレオチド、オキサリプラチン、パミドロネート、ペントスタチン、プリカマイシン、ボルフィマー、プロカルバジン、ラルチトレキセド、リツキシマブ、ストレプトゾシン、テニボシド、テストステロン、サリドマイド、チオグアニン、チオテバ、トレチノイン、ビンデシン、13-cis-レチノイン酸、フェニルアラニンマスタード、ウラシルマスタード、エストラムスチン、アルトレタミン、フロクスウリジン、5-デオキシウリジン、シトシンアラビノシド、6-メルカプトプリン、デオキシコホルマイシン、カルシトリオール、バルルピシン、ミトラマイシン、ピンブラスチン、ピノレルピン、トボテカン、ラゾキシニ、マリマスタット、COL-3、ネオバスタット、BMS-275291、スクアラミン、エンドスタチン、SU5416、SU6668、EMD121974、インターロイキン-12、IM862、アンギオスタチン、ピタキシニ、ドロロキシフェン、イドキシフェン、スピロノラクトン、フィナステリド、シメチジン、トラスツズマブ、デニロイキンジフチトクス、ゲフィチニブ、ボルテゾミブ、パクリタキセル、クレモホル非含有パクリタキセル、ドセタキセル、エピチロン(epithilone)B、BMS-247550、BMS-310705、ドロロキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェン、ピペンドキシフェン、ERA-923、アルゾキシフェン、フルベストラント、アコルピフェン、ラソフォキシフェン、イドキシフェン、TSE-424、HMR-3339、ZK186619、トボテカン、PTK787/ZK222584、VX-745、PD184352、ラパマイシン、40-O-(2-ヒドロキシエチル)-ラパマイシン、テムシロリムス、AP-23573、RAD001、ABT-578、BC-210、LY294002、LY292223、LY292696、LY293684、LY293646、ワートマニン、ZM336372、L-779, 450、PEG-フィルグラスチム、ダルベポエチン、エリスロポエチン、顆粒球コロニー刺激因子、ゾレンドロネート(zolendronate)、プレドニゾン、セツキシマブ、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子、ヒストレリン、PEG化インターフェロン-2a、インターフェロン-2a、PEG化インターフェロン-2b、インターフェロン-2b、アザシチジン、PEG-L-アスパラギナーゼ、レナリドマイド、ゲムツズマブ、ヒドロコルチゾン、インターロイキン-11、デクスラゾキサニ、アレムツズマブ、全トランスレチノイン酸、ケトコナゾール、インターロイキン-2、メガストロール、免

疫グロブリン、ナイトロジェンマスタード、メチルプレドニゾロン、イブリツモマブチウキセタン、エンドロゲン、デシタピン、ヘキサメチルメラミン、ベキサロテン、トシツモマブ、三酸化ヒ素、コルチゾン、エチドロロン酸、ミトタン、シクロスポリン、ダウノルビシンリポソーム、エルウィニア・アスパラギナーゼ、ストロンチウム 89、カソピタント、ネツピタント、NK-1 受容体アンタゴニスト、パロノセトロン、アプレピタント、ジフェンヒドラミン、ヒドロキシジン、メトクロプラミド、ロラゼパム、アルブラゾラム、ハロペリドール、ドロペリドール、ドロナビノール、デキサメタゾン、メチルプレドニゾロン、プロクロルペラジン、グラニセトロン、オndanセトロン、ドラセロトン、トロピセトロン、ペグフィルグラスチム、エリスロポエチン、エポエチン、ダルベポエチン、及びそれらの混合物を含む。

10

【0067】

用語「抗肝細胞癌剤」は、本明細書において肝細胞癌又はその癌の転移の抑制、治療、その可能性の低減に用いることができる抗癌剤を記すために用いられる。本発明で用いられ得る抗癌剤には、例えばネクサバル（ソラフェニブ）、スニチニブ、ペバシズマブ、タルセバ（エルロチニブ）、タイカーブ（ラパチニブ）、及びそれらの混合物が含まれる。更にその他の抗癌剤が、そのような薬剤が癌、特に肝細胞癌の転移を抑制することが見いだされる場合には本発明で用いられてもよい。

【0068】

用語「抗ウィルス剤」は、ウィルス（薬物耐性ウィルス株のような変異株も含む）の増殖及び／又は形成を抑制する生物活性剤／薬物を記すために用いられる。好ましい抗ウィルス剤は、抗 HIV 剤、抗 HBV 剤、及び抗 HCV 剤を含む。本発明の一部の態様においては、特に肝細胞癌の治療が治療の目的である場合には、B 型肝炎ウィルス（HBV）及び／又は C 型肝炎ウィルス（HCV）が多くの場合に肝細胞癌に関する原発性又は続発性の感染又は病態であることを考えると、治療をもたらすために抗 C 型肝炎剤又は抗 B 型肝炎剤の含有が、その他の従来の抗癌剤と組み合わせることができる。プロトセル中のカーゴ成分として又は一群のプロトセルを含む医薬組成物中の更なる生物活性剤として本発明に用いられる抗 HBV 剤には、ヘプセラ（アデホビルジビボキシル）、ラミブジン、エンテカビル、テルビブジン、テノホビル、エムトリシタビン、クレブジン、バルトリシタビン（valtoricitabine）、アムドキシビル、プラデホビル、ラシビル、BAM205、ニタゾキサニド、UT231-B、Bay 41-4109、H899、ザダキシン（チモシン-1）、及びそれらの混合物のような薬剤が含まれる。本発明での使用のための抗 HCV 剤には、ボセプレビル、ダクラタスビル、アスナプレビル、INX-189、FV-100、NM283、VX-950（テラプレビル）、SCH50304、TMC435、VX-500、BX-813、SCH503034、R1626、ITMN-191（R7227）、R7128、PF-868554、TT033、CGH-759、GI5005、MK-7009、SIRNA-034、MK-0608、A-837093、GS9190、GS9256、GS9451、GS5885、GS6620、GS9620、GS9669、ACH-1095、ACH-2928、GSK625433、TG4040（MVA-HCV）、A-831、F351、NS5A、NS4B、ANA598、A-689、GNI-104、IDX102、ADX184、ALS-2200、ALS-2158、BI201335、BI207127、BIT-225、BIT-8020、GL59728、GL60667、PSI-938、PSI-7977、PSI-7851、SCY-635、リバビリン、PEG 化インターフェロン、PHX1766、SP-30、及びそれらの混合物のような薬剤が含まれる。

20

30

40

【0069】

用語「抗 HIV 剤」は、HIV ウィルス（I 及び／又は II）若しくはその変異体の増殖及び／又は形成を抑制する化合物を指す。本発明のプロトセルのカーゴとして含まれることができる本発明での使用のための例示の抗 HIV 剤としては、例えば特にヌクレオシド逆転写酵素インヒビター（NRTI）、その他の非ヌクレオシド逆転写酵素インヒビター（即ち本発明の典型でないもの）、プロテアーゼインヒビター、膜融合阻害剤が含まれ

50

る。それらの例示の化合物としては、例えば 3 T C (ラミブジン)、A Z T (ジドブジン)、(-) - F T C、d d I (ジダノシン)、d d C (ザルシタピン)、アバカビル (A B C)、テノホビル (P M P A)、D - D 4 F C (リバーセット (Reverset))、D 4 T (スタブジン)、ラシビル、L - F d d C、L - F D 4 C、N V P (ネビラピン)、D L V (デラビルジン)、E F V (エファビレンツ)、S Q V M (メシル酸サキナビル)、R T V (リトナビル)、I D V (インジナビル)、S Q V (サキナビル)、N F V (ネルフィナビル)、A P V (アンブレナビル)、L P V (ロビナビル)、膜融合阻害剤 (特に T 2 0 など)、フゼオン (fuseon)、及びそれらの混合物が含まれる。

【 0 0 7 0 】

用語「ターゲティング活性化学種」は、プロトセルが標的細胞の表面に選択的に結合してその内容物を細胞内に下ろすことができるように、標的細胞の表面の成分に結合する、本発明のプロトセルの表面と複合体化又は好ましくは共有結合される化合物又は部分を記すために用いられる。本発明での使用のためのターゲティング活性化学種は、標的細胞に結合する化学種のうち、特に好ましくは本明細書に別に記載のターゲティングペプチド、ポリペプチド (抗体又は抗体断片を含む)、アプタマー、又は炭水化物である。

【 0 0 7 1 】

用語「ターゲティングペプチド」は、好ましいターゲティング活性化学種であって、特定の配列のペプチドであり、癌細胞における受容体又はその他のポリペプチドに結合して、ターゲティングペプチドが結合するペプチド (受容体又はその他の機能性ポリペプチド) を発現する特定の細胞へ、本発明のプロトセルが標的を定めることを可能にするものを記すために用いられる。本発明において、例示のターゲティングペプチドは、例えば遊離した S P 9 4 ペプチド ($H_2N - S F S I I L T P I L P L - COOH$ 、配列番号 6)、架橋剤とのコンジュゲート用に C 末端システインで修飾された S P 9 4 ペプチド ($H_2N - S F S I I L T P I L P L G G C - COOH$ 、配列番号 7)、改変された S P 9 4 ペプチド ($H_2N - S F S I I L T P I L P L E E E G G C - COOH$ 、配列番号 8)、又は本明細書に別に記載の M E T 結合ペプチドを含む。その他のターゲティングペプチドも当分野で公知である。ターゲティングペプチドは、脂質二重層と複合体化されても、あるいは好ましくは本明細書に別に記載の架橋剤の使用によって脂質二重層と共有結合されてもよい。

【 0 0 7 2 】

用語「M E T 結合ペプチド」又は「M E T 受容体結合ペプチド」は、増強された結合効率で癌細胞表面上の M E T 受容体に結合することが示された 5 つの 7 m e r ペプチドについて用いられる。本発明に従って、異なる特異性レベルで M E T 受容体 (別名は肝細胞増殖因子受容体であり、c - M E T 遺伝子により発現される) に結合し、M E T 受容体シグナル経路を活性化する様々な程度の能力を有する、異なるアミノ酸配列を有する複数の短鎖ペプチドが確認された。7 m e r ペプチドは、ファージディスプレイによるバイオパニングを用いて確認された。M E T 受容体に対し、及びその結果として例えば高レベルの M E T 受容体を発現する癌細胞 (例えば肝細胞、卵巣、及び子宮頸部) などの細胞に対し、増強された結合を示す配列の例を下記に示す。バイオパニングのプロセス中に最も頻繁に現れた配列のうちの幾つかの結合性データは、本出願の実施例の項でも示される。これらのペプチドは、細胞特異的治療法のターゲティングリガンドとして特に有用である。しかし、受容体経路を活性化する能力を有するペプチドは、それ自体又はその他の治療法との組み合わせで、更なる治療有用性を有し得る。ペプチドの多くは、肝細胞癌腫 (本来の所期の標的) に結合するだけでなく、広範な種類のその他の癌腫 (卵巣及び子宮頸部の癌を含む) にも結合することが見い出された。これらのペプチドは、種々の癌、並びに M E T 及び関連受容体の発現と関連するその他の生理的問題を標的にするための又は治療するための広範囲の適用性を有すると考えられる。

【 0 0 7 3 】

次の 5 つの 7 m e r ペプチド配列は、M E T 受容体に対して実質的な結合を示し、本発明のプロトセルに使用するターゲティングペプチドとして特に有用である。

ASVHFPP (Ala - Ser - Val - His - Phe - Pro - Pro) 配列番号 1
 TATFWFQ (Thr - Ala - Thr - Phe - Trp - Phe - Gln) 配列番号 2
 TSPVALL (Thr - Ser - Pro - Val - Ala - Leu - Leu) 配列番号 3
 IPLKVHP (Ile - Pro - Leu - Lys - Val - His - Pro) 配列番号 4
 WPRLTNM (Trp - Pro - Arg - Leu - Thr - Asn - Met) 配列番号 5

10

【0074】

これらのペプチドのそれぞれは、単独で用いられても、又は上記群のその他のMETペプチド若しくは本発明のプロトセルを癌細胞（例えば特に肝細胞癌細胞、卵巣癌細胞、及び子宮頸部癌細胞）に結合させる助けとなり得るその他のターゲティングペプチドと組み合わせ用いられてもよい。これらの結合ペプチドは、癌を治療するために又は肝細胞増殖因子の結合を抑制するために、MET結合ペプチドとして医薬化合物中に単独で用いられることもできる。

【0075】

用語「融合ペプチド」及び「エンドソーム分解性ペプチド」は、本発明のプロトセルの脂質二重層表面のペプチド（任意で好ましくは架橋された）を記すために同義的に用いられる。融合ペプチドは、エンドソーム本体からの脱出を促進し又は助け、標的細胞へのプロトセルの導入を促進して所期の結果（本明細書に別に記載の治療用及び/又は診断用の）をもたらすために、プロトセル上に含まれる。本発明のプロトセルで用いられる代表的で好ましい融合ペプチドは、当分野で公知のもののうち特にH5WYGペプチド、 H_2N -GLFHAIAHF IHGGWHGL IHGWYGGC-COOH（配列番号13）又は8merのポリアルギニン（ H_2N -RRRRRRRRR-COOH、配列番号14）を含む。

20

【0076】

用語「架橋剤」は、本発明の種々の成分を互いに共有結合するのに使用されることができる、2つの異なる官能基を含む種々の長さの二官能性化合物を記すために用いられる。本発明の架橋剤は2つの求電子性基を含んでもよい（ペプチド（オリゴヌクレオチド）上の求核性基と反応するためには、1個の求電子性基と1個の求核性基又は2個の求核性基）。架橋剤は、連結される成分及び必要な相対的屈曲性に依存しての長さが多様であってよい。架橋剤を用いてターゲティングペプチド及び/又は融合ペプチドをリン脂質二重層上に固定したり、超らせんのプラスミドDNAのパッケージングのために核局在配列をヒストンタンパク質に連結したり、場合によってはプロトセルの脂質二重層中の脂質を架橋したりする。本発明に用いられ得る多数の架橋剤があり、多くは市販されているか又は文献で入手できる。本発明での使用のための好ましい架橋剤には、例えば特に1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミド塩酸塩（EDC）、スクシンイミジル4-[N-マレイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボキシレート（SMCC）、N-[-マレイミドプロピオン酸]ヒドラジド（BMPPH）、NHS-(PEG)_n-マレイミド、スクシンイミジル-[(N-マレイミドプロピオンアミド)-テトラコサエチレングリコール]エステル（SM(PEG)₂₄）、及びスクシンイミジル6-[3'-(2-ピリジルジチオ)-プロピオンアミド]ヘキサノエート（LC-SPDP）が含まれる。

30

40

【0077】

詳細に上述したように、本発明の多孔性ナノ粒子コアは少なくとも1つの寸法を有する多孔性ナノ粒子を含んでよい。例えば、幅又は直径約3000nm以下、約1000nm以下、約500nm以下、約200nm以下である。好ましくはナノ粒子コアは、約500nm以下、より好ましくは約8~10nmから約200nmの好ましい直径を有する球

50

形である。複数の実施形態においては、多孔性粒子コアは、円状、長方形、正方形、又はいずれかのその他の形状などの種々の断面形状を有することができる。一部の実施形態においては、多孔性粒子コアは約 2 nm ~ 約 30 nm の範囲の平均細孔サイズの細孔を有することができる。ただし、平均細孔サイズや他の特性（例えば多孔性粒子コアの多孔性）は、本発明の教示の種々の実施形態に従って限定されない。

【0078】

通常、本発明のプロトセルは生体適合性である。薬物及びその他のカーゴ成分は、多くの場合には粒子コアの細孔の吸着及び/又は毛細管充填によって、最終的なプロトセル（全成分を含む）の最大約 50 wt % まで装填される。本発明の一部の実施形態においては、装填されたカーゴは粒子コア（メソ細孔）の多孔性表面から放出されることができ、その放出プロファイルは、本明細書において概略的に説明されるように、例えば細孔サイズ、多孔性粒子コア表面の化学的性質、システムの pH 値、及び/又は多孔性粒子コアと周囲の脂質二重層との相互作用によって決定若しくは調整されることができる。

10

【0079】

本発明においては、プロトセルを調製するのに使用される多孔性ナノ粒子コアは、本明細書に別に記載されるように、親水性又は次第により疎水性になるように調整されることができ、より親水性の表面を提供するために更に処理されることができる。例えば、メソ多孔性のシリカ粒子を水酸化アンモニウム及び過酸化水素で更に処理して、より高い親水性を提供することができる。本発明の好ましい態様においては、脂質二重層を多孔性粒子コア上に融合してプロトセルを形成する。本発明のプロトセルは様々な脂質を様々な重量比で含むことができ、好ましくは 1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DOPC)、1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DPPC)、1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DSPC)、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホル - L - セリン] (DOPS)、1, 2 - ジオレオイル - 3 - トリメチルアンモニウム - プロパン (18 : 1 の DOTAP)、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - (1' - rac - グリセロール) (DOPG)、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (DOPE)、1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (DPPE)、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ (ポリエチレングリコール) - 2000] (18 : 1 の PEG - 2000 PE)、1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ (ポリエチレングリコール) - 2000] (16 : 0 の PEG - 2000 PE)、1 - オレオイル - 2 - [12 - [(7 - ニトロ - 2 - 1, 3 - ベンゾオキサジアゾール - 4 - イル) アミノ] ラウロイル] - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (18 : 1 ~ 12 : 0 の NBD - PC)、1 - パルミトイル - 2 - {12 - [(7 - ニトロ - 2 - 1, 3 - ベンゾオキサジアゾール - 4 - イル) アミノ] ラウロイル} - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (16 : 0 ~ 12 : 0 の NBD - PC)、コレステロール、及びそれらの混合物/組み合わせなどである。

20

30

【0080】

本発明のプロトセルを調製するために用いられる脂質二重層は、例えば約 100 nm の細孔サイズを有するフィルターを通した水和した脂質フィルムの押し出しによって、当分野で公知の標準的なプロトコル又は本明細書に別に記載のプロトコルを用いて調製されることができる。フィルターを通された脂質二重層フィルムを、次に例えばピペットで混合することによって、多孔性粒子コアと融合することができる。一部の実施形態においては、プロトセルのコロイド安定性を改善するために、過剰量の脂質二重層又は脂質二重層のフィルムを用いてプロトセルを生成することができる。

40

【0081】

一部の診断用の実施形態においては、種々の色素又は蛍光（レポーター）分子がプロトセルのカーゴ（プラスミド DNA として発現されるもの）に含まれることができ、あるいは診断目的の多孔性粒子コア及び/又は脂質二重層に取り付けられることができる。例え

50

ば、多孔性粒子コアはシリカコア又は脂質二重層であってF I T C（緑色蛍光）で共有結合的に標識されることができ、一方で脂質二重層又は粒子コアはF I T C テキサスレッド（赤色蛍光）で共有結合的に標識されることができる。多孔性粒子コア、脂質二重層、及び生成したプロトセルは、例えば診断用途で使用される共焦点蛍光法によって観察できる。更に、プラスミドが例えば診断用途で用いられ得る蛍光緑色タンパク質又は蛍光赤色タンパク質などの1つ以上の蛍光タンパク質を発現できるようにして、本明細書に記載のようにプラスミドDNAを本発明のプロトセル中のカーゴとして用いることができる。

【0082】

種々の実施形態においては、適宜、脂質二重層融合物又はリボソーム融合物（即ち多孔性粒子コア上）が粒子コアの細孔（メソ細孔）の種々のカーゴ成分と共に装填及び封入される相助作用の方法でプロトセルを用い、それにより脂質二重層の細胞膜を横断する又は多孔性ナノ粒子の分解による、カーゴ送達に有用な装填済みプロトセルを作る。一部の実施形態においては、単一の脂質（例えばリン脂質）二重層を融合することに加えて、反対の電荷を有する複数の二重層を多孔性粒子コア上に続けて融合してカーゴの装填及び／又は封入並びに最終的なプロトセルの放出特性に影響を与えることができる。

10

【0083】

融合及び相助作用の装填機構が、カーゴの送達のために含まれることができる。例えば、多孔性粒子へのリボソームの融合によって、カーゴを相助作用的に装填、被包、又は封入できる。カーゴは、例えば小分子薬物（例えば特に抗癌薬物及び／又は抗ウイルス薬物（抗HBV薬物若しくは抗HCV薬物など）を含む）、ペプチド、タンパク質、抗体、DNA（特にプラスミドDNAであり、好適なヒストンでパッケージングされた超らせんプラスミドDNAを含む）、RNA（例えばshRNAやsiRNA（プロトセル中にカーゴとして含まれるプラスミドDNAによって発現されてもよい）、蛍光色素（プロトセル中に含まれたプラスミドDNAによって発現可能な蛍光色素ペプチドを含む）などである。

20

【0084】

本発明の実施形態においては、カーゴを多孔性粒子コアの細孔（メソ細孔）中に装填して装填済みプロトセルを形成することができる。種々の実施形態においては、リボソームを用いた薬物送達、例えばPEG化を用いる標的送達用の開発されるいずれかの従来技術を移転して本発明のプロトセルに適用することができる。

30

【0085】

上記のように、静電的性質及び細孔サイズはカーゴの装填に影響を与え得る。例えば多孔性シリカナノ粒子は負電荷を有することができ、細孔サイズは約2nmから約10nm以上まで調整され得る。負荷電ナノ粒子は正荷電分子を吸着する生来の傾向を有することができ、正荷電ナノ粒子は負荷電分子を吸着する生来の傾向を有することができる。種々の実施形態においては、表面湿潤性のようなその他の特性（例えば疎水性）もまた、異なる疎水性を有するカーゴの装填に影響し得る。

【0086】

種々の実施形態において、カーゴの装填は、脂質組成物を調整することによって相助作用する脂質で補助される装填となり得る。例えば、カーゴ成分が負荷電分子である場合、負荷電シリカ中へのカーゴの装填は脂質で補助された装填によって達成できる。一部の実施形態においては、例えば、融合及び相助作用の装填メカニズムを示すように脂質二重層をシリカ表面に融合する場合、陰性の化学種をカーゴとして負荷電シリカ粒子の細孔中に装填することができる。この方法においては、負荷電のメソ多孔性粒子上への負荷電でない（即ち正荷電又は中性）脂質二重層又はリボソームの融合が、粒子コアに負荷電のカーゴ成分を装填するのに役立つ。装填されるプロトセル中に負荷電のカーゴ成分を濃縮して、溶液中の荷電カーゴ成分と比べて濃度を約100倍超にすることができる。その他の実施形態においては、メソ多孔性粒子及び脂質二重層の電荷を変えることによって、正荷電カーゴ成分をプロトセル中に容易に装填できる。

40

【0087】

50

製造されたら、装填済みプロトセルは、投与後の望ましい部位へのカーゴ送達のために細胞内に取り込まれることができる。例えば、カーゴが装填されたプロトセルが患者又は対象に投与されて、ターゲティングペプチドを含んだプロトセルが標的細胞に結合して標的細胞、例えば対象若しくは患者の癌細胞によって内在化又は取り込まれることができる。標的細胞内でのカーゴが装填されたプロトセルの内在化によって、カーゴ成分は次に標的細胞内に送達され得る。一部の実施形態ではカーゴは小分子であり、治療のために標的細胞内に直接送達されることができ、他の実施形態においては、負荷電のDNA又はRNA (shRNA又はsiRNAを含む) (好ましくはヒストンでパッケージングされて好ましくは核局在配列で修飾された超らせんプラスミドDNAとして処方されたDNAプラスミドを特に含む) が直接送達されることができ、標的細胞によって内在化される。そのため、DNA又はRNAは先ずプロトセルに装填され、次に装填済みプロトセルの内在化によって標的細胞内に至る。

10

【0088】

上記のように、プロトセルに装填されて標的細胞まで送達されるカーゴとしては、小分子又は薬物 (特に、抗癌剤又は抗HBV剤及び/若しくは抗HCV剤)、生物活性高分子 (生物活性ポリペプチド (例えばリシン毒素A鎖又はジフテリア毒素A鎖) 又はRNA分子 (例えば本明細書に別に記載のshRNA及び/又はsiRNA))、あるいは治療用又は診断用のペプチド又は治療用RNA分子 (例えばshRNA又はsiRNA) を発現可能なヒストンでパッケージングされた超らせんプラスミドDNAが挙げられる。ヒストンでパッケージングされた超らせんプラスミドDNAは、任意で好ましくは、送達されたプラスミドDNAを標的細胞核内に局在させて濃縮できる核局在配列で修飾される。このように装填済みプロトセルは、治療用又は診断用にそのカーゴを標的細胞中に送達することができる。

20

【0089】

本発明の種々の実施形態において、プロトセル及び/又は装填済みプロトセルは、プロトセル又はカーゴ成分を標的細胞 (例えば癌細胞) まで選択的に送達するための標的送達方法を提供できる。例えば、脂質二重層の表面を、標的細胞に対応したターゲティング活性化学種によって修飾できる。ターゲティング活性化学種は、本明細書に別に記載のターゲティングペプチド、ポリペプチド (抗体若しくは抗体断片を含む)、アプタマー、炭水化物、又は標的細胞に結合するその他の成分であり得る。本発明の望ましい態様においては、ターゲティング活性化学種は、本明細書に別に記載のターゲティングペプチドである。一部の実施形態においては、望ましいペプチドのターゲティング化学種は本明細書に別に記載のMET結合ペプチドを含む。

30

【0090】

例えばターゲティング活性化学種 (好ましくはターゲティングペプチド) を装填済みプロトセルの表面に提供することによって、プロトセルは本明細書での教示通りに標的細胞に選択的に結合する。一実施形態においては、癌細胞 (癌の肝臓細胞を含む) を標的にする本明細書に別に記載される例示のターゲティングペプチドSP94若しくは類似体又はMET結合ペプチドを脂質二重層にコンジュゲートすることによって、多数のカーゴ装填済みプロトセルが、癌 (例えば肝臓) 細胞の例示のSP94又はMET結合ペプチドによる特異的標的により、この特定の癌細胞によって認識されて内在化されることができ、殆どの場合、プロトセルがターゲティングペプチドと結合されるなら、プロトセルは癌細胞に選択的に結合し、癌性でない細胞に明らかなほどの結合は起こらないと考えられる。

40

【0091】

標的細胞に結合して取り込まれると、装填済みプロトセルは多孔性粒子からカーゴ成分を放出して、放出されたカーゴ成分を標的細胞中に移送することができる。例えば、多孔性粒子コア上のリボソームの融合二重層によってプロトセル中に封入された場合、カーゴ成分は脂質二重層の細孔から放出され、脂質二重層のプロトセル膜を通して移送され、標的細胞内に送達されることができ、本発明の複数の実施形態においては、プロトセル中のカーゴ成分の放出プロファイルは、従来技術で知られているようなりボソームのみを用

50

いる場合と比べてより制御可能であり得る。カーゴの放出は、例えば多孔性コアと脂質二重層との間の相互作用、及び／又はシステムのpH値などのその他のパラメータによって決まり得る。例えば、カーゴの放出は脂質二重層を通してなされ、多孔性シリカの分解によってなされる。一方で、プロトセルからのカーゴの放出はpH依存的であり得る。

【0092】

一部の実施形態においては、カーゴのpH値は多くの場合に7未満、好ましくは約4.5～約6.0であるが、約pH14以下であってもよい。より低いpHでは、高いpHと比較してカーゴ成分の放出を大きく促進する傾向がある。より低いpHが有利な傾向にあるのは、殆どの細胞内のエンドソーム区画が低pH（約5.5）であるためだが、細胞でのカーゴの送達速度はカーゴのpHによって左右され得る。カーゴとカーゴがプロトセルから放出されるpHとに依存して、カーゴの放出は比較的短期（2～3時間から1日程度）であるか、又は数日から約20～30日以上の間であり得る。従って、本発明はプロトセルそのものからの即放性及び／又は徐放性の適用を提供し得る。

10

【0093】

一部の実施形態においては、界面活性剤の含有を提供して速やかに脂質二重層をバーストさせて、プロトセルの脂質二重層及び標的細胞を通してカーゴ成分を輸送することができる。一部の実施形態においては、プロトセルのリン脂質二重層を界面活性剤（特にドデシル硫酸ナトリウム（SDS）など）の添加／放出によってバーストさせて、プロトセルから標的細胞中へのカーゴの速やかな放出を促進することができる。一部の実施形態においては、脂質二重層のバーストが、続いてプロトセルの粒子コアの細孔からのカーゴ成分の即時的で完全な放出を誘導できる。この方法では、本発明のプロトセルプラットフォームは、当分野のその他の送達システムに比べて多用途の送達システムを提供することができる。例えば、ナノ粒子のみを用いる送達システムと比較した場合、本明細書に開示のプロトセルプラットフォームは単純なシステムを提供して、リボソーム又は脂質二重層の低い毒性及び免疫原性と共にそのPEG化又はコンジュゲートされる能力を利用して、循環時間を延長して標的化を達成することができる。別の例においては、リボソームのみを用いる送達システムと比較して、本発明のプロトセルプラットフォームはより安定なシステムを提供でき、更にメソ多孔性コアを利用して装填及び／又は放出のプロファイルを制御することができる。

20

【0094】

更に、脂質二重層及びその多孔性粒子コアとの融合を微調整して装填、放出及び標的化のプロファイルを制御することができ、更に融合ペプチド及び関連ペプチドを含むことで、より大きい治療効果及び／又は診断効果のためにプロトセルの送達を促進することができる。更に、プロトセルの脂質二重層は、リガンド提示及び多価の標的化のために流動性の界面を提供し、これによって流動性脂質の界面上におけるリガンド再編成の能力により、比較的低い表面リガンド密度を用いた特異的標的が可能になる。更に、本明細書に開示のプロトセルは標的細胞中に容易に移入するが、多孔性粒子の支持がない空のリボソームは細胞によって内在化されることができない。

30

【0095】

本発明の医薬組成物は、所期の結果（例えば、治療結果及び／又は診断分析（治療法の観察を含む））を達成するために処方される本明細書に別に記載の有効な一群のプロトセルを含み、医薬的に許容される担体、添加剤、又は賦形剤と組み合わせて製剤される。組成物の群の中のプロトセルは、求められる望ましい結果に依存して同一であっても又は異なってもよい。本発明の医薬組成物は、例えば抗癌剤又は抗ウイルス剤（例えば抗HIV剤、抗HBV剤、又は抗HCV剤）などの更なる生物活性剤又は薬物を含んでもよい。

40

【0096】

通常、上記化合物の投与用量及び投与経路は対象の大きさ及び状態によって決まり、標準的な薬務プラクティスに従って決まる。用いられる用量レベルは非常にさまざまであり、当業者によって容易に決定されることができる。通常、ミリグラム～グラム量の量がいられる。組成物は対象に対して種々の経路、例えば特に経口的、経皮的、神経周囲、又

50

は非経口的、即ち静脈内注射、皮下注射、腹腔内注射、髄腔内注射、又は筋肉内注射によって投与されることができ、口腔、直腸、及び経皮の投与が含まれる。本発明の方法の治療が意図される対象には、ヒト、ペット、実験動物などが含まれる。本発明は即放性及び／又は徐放性／制御型放出の組成物を意図し、即放性及び徐放性の処方の方を含む組成物も含まれる。これは、プロトセルの異なる個体群を医薬組成物に用いる場合又は更なる生物活性剤を本明細書に別に記載のようにプロトセルの１つ以上の個体群と組み合わせて用いる場合に、特に当てはまる。

【 0 0 9 7 】

本発明の化合物を含有する製剤は、液体、固体、半固体、又は凍結乾燥粉末の形態、例えば溶液、懸濁液、エマルション、徐放性製剤、錠剤、カプセル剤、粉末剤、座薬、クリ

10

【 0 0 9 8 】

本発明の医薬組成物は、通常は従来の医薬用の担体又は賦形剤を含み、更にその他の医薬品、担体、アジュバント、添加剤などを含んでもよい。好ましくは、組成物は、約 0 . 1 w t % ~ 約 8 5 w t %、約 0 . 5 w t % ~ 約 7 5 w t % が本発明の１つ又は複数の化合物であり、残りは主として適した医薬品賦形剤からなる。

【 0 0 9 9 】

非経口投与（例えば静脈内、筋肉内又は髄腔内）のための注射用組成物は、通常は化合物を好適な静脈用溶剤（例えば無菌生理食塩水）中に含む。組成物は、水性エマルションでの懸濁液として製剤されてもよい。

20

【 0 1 0 0 】

液体製剤は、プロトセルの一群（約 0 . 5 w t % ~ 約 2 0 w t % 又はそれ以上）及び任意の医薬用アジュバントを担体（例えば水性生理食塩水、水性デキストロース、グリセロール、又はエタノールなど）中に溶解又は分散して溶液又は懸濁液を作ることによって調製できる。経口液体製剤での使用については、組成物は溶液、懸濁液、エマルション、又はシロップとして調製されることができ、液体形態又は水若しくは通常生理食塩水での水和に適した乾燥形態で供給されることができ。

【 0 1 0 1 】

経口投与のためには、そのような賦形剤としては製薬等級のマニトール、ラクトース、澱粉、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルカム、セルロース、グルコース、ゼラチン、スクロース、炭酸マグネシウムなどが挙げられる。必要に応じて、組成物は少量の無毒の補助物質、例えば湿潤剤、乳化剤、又は緩衝剤を含んでもよい。

30

【 0 1 0 2 】

組成物を経口投与用の固形製剤の形態で用いる場合、製剤は錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤などであってよい。錠剤の場合、組成物は通常は添加剤、例えば賦形剤（糖類又はセルロースの調合剤など）、結合剤（澱粉ペースト又はメチルセルロースなど）、充填剤、崩壊剤、及び医療用製剤の製造に通常用いられるその他の添加剤を用いて製剤される。

【 0 1 0 3 】

このような剤形を調製する方法は、当業者に公知又は明らかである。例えばレミントンの薬学、第 1 7 版、Mack Pub. Co.、1985年参照）。投与される組成物は、選択した化合物を、生体系（本発明による患者又は対象を含む）の治療での使用のための薬学的有効量で含む。

40

【 0 1 0 4 】

特定の病態又は感染（特に、癌及び／又は H B V、H C V、若しくは H I V の感染を含む）について必要とする患者又は対象を治療する方法は、治療用プロトセルと、任意で少なくとも１つの更なる生物活性（例えば抗ウイルス）剤とを含む本発明の医薬組成物の有効量を投与することを含む。

【 0 1 0 5 】

本発明の診断法は、有効量の一群の診断用プロトセル（例えば、ターゲティング化学種

50

(例えば癌細胞に選択的に結合するターゲティングペプチド)と、癌細胞が存在する場合に癌細胞に対するプロトセルの結合を知らせるレポーター成分とを含むプロトセル)を必要とする患者(癌が疑われる患者)に投与することを含む。レポーター成分(部分)が明示する癌細胞に対するプロトセルの結合によって、患者における癌の存在の診断が可能になる。

【0106】

本発明の診断法の代替方法は、患者の癌又はその他の病態の治療を観察するために用いられる。この方法は、有効な一群の診断用プロトセル(例えば、ターゲティング化学種(癌細胞又はその他の標的細胞に対して選択的に結合するターゲティングペプチドなど)と、癌細胞が存在する場合に癌細胞に対するプロトセルの結合を知らせるレポーター成分とを含むプロトセル)を治療前に患者若しくは対象に投与し、この患者での標的細胞に対する診断用プロトセルの結合の程度を治療中及び/又は治療後に測定することを含む。この場合、患者における治療開始前と治療中及び/又は治療後の結合の違いが、患者における治療の有効性(例えば患者が治療を完了したか否か、又は病態が抑制されたか若しくは排除されたか否か(癌の緩解を含む))を明白にする。

【0107】

以下の実施例は限定でなく、本発明及びその有利な特性の例示であって、開示又は特許請求の範囲に何ら限定を及ぼすものではない。本出願での実施例及び他の箇所において、全ての割合及び百分率は特に断りがない限り重量に基づく。

【実施例】

【0108】

以下の実施例に示すように、多孔性ナノ粒子に担持された脂質二重層(プロトセル)は、ナノ多孔性シリカ粒子へのリポソームの融合によって形成されるものであり、癌の治療法及び診断法の標的送達に関連する種々の課題に対応する新たな種類のナノ担体である。リポソームと同様にプロトセルは生体適合性、生分解性、及び非免疫原性であるが、そのナノ多孔性シリカコアは同様のサイズのリポソーム送達剤と比較して、大幅に増強されたカーゴ収容能力及び長期の二重層安定性を提供する。コアの多孔性及び表面の化学的性質を更に調節して、例えば薬物、核酸、及びタンパク質毒素などの多様な治療薬の被包を促進することができる。カーゴ放出の速度は細孔サイズ及びシリカ縮合の全体的な程度によって制御可能であるので、プロトセルはバースト放出又は制御型放出のプロファイルが必要な用途に有用である。最後に、プロトセルの担持された脂質二重層(SLB)は、選択的送達を促進するためにリガンドで修飾されることができ、更に循環時間を延長するためにPEGで修飾されることができ、更に循環時間を延長するためにPEGで修飾されることができ。実施例において、本発明者は、短鎖ヘアピンRNA(shRNA)をコードするプラスミドの特異性の高い送達を達成するための、ペプチドで標的を定められたプロトセルの使用を報告する。これにより、トランスフェクションした細胞の増殖停止やアポトーシスがサイクリンB1を抑制することによって誘導される。下記の実施例の項で示すように、本発明者は2種類の界面活性剤による手法を用いて、ヒストンでパッケージングされたプラスミドを格納するのに十分大きい細孔を有する合成シリカナノ粒子を調製した。非イオン性界面活性剤(ブルロニック(登録商標)F-127)を膨張剤(1,3,5-トリメチルベンゼン)と併用した際には、大型の細孔の鑄型として働いた。一方で、フッ化炭素系界面活性剤(FC-4)はシリカコアの成長を促進した。得られた粒子は100nm~300nmの範囲の直径を有し、17.3nmの細孔入口を有する20nmの細孔の規則的な網状組織を含んでいた。超らせんプラスミドDNAをヒストンでパッケージングし、得られた複合体(直径約15nm)を核局在配列(NLS)で修飾した後、シリカコアに装填した。ナノ多孔性コアへのリポソームの融合によって、疑似体液に37℃で暴露した場合にも被包されたDNAの長期保持(>1ヶ月)が促進された。ファージディスプレイ法を用いて、本発明者は、種々の種類の肝細胞癌腫(HCC)によって過剰発現されることが公知である肝細胞増殖因子受容体c-Metに対してナノモル濃度の親和性を有するターゲティングペプチドを確認した。DNA-ヒストン-NLS複合体が装填され、“240コピーのターゲティングペプチドのそれぞれとプロ

10

20

30

40

50

トセル及び被包されたDNAのエンドソーム脱出を促進する融合ペプチドとで修飾されたプロトセルは、分裂中及び非分裂中のHCCの両方をトランスフェクション可能であった。更に、標的化されたプロトセルはHCCのGJM停止及びアポトーシス(LC, γ = 25 nM)を有効に誘導したが、癌性でない細胞(肝細胞、内皮細胞、及び免疫細胞(PBMC、B細胞、及びT細胞)を含む)の生存性には影響しなかった。

【0109】

<方法>

プロトセルのコアを形成するナノ多孔性シリカ粒子を、前述のように^{1,2}(Ashleyら、Nature Materials, 2011, May; 10(5):389-97も参照)水溶性シリカ前駆体と両親媒性界面活性剤との均質混合物から、エアロゾルを使用した蒸発誘起自己組織化(EISA)又は油中水型エマルション滴中での溶媒抽出による自己組織化を用いて調製した¹。溶媒の蒸発又は抽出によってエアロゾル又はエマルション滴が界面活性剤中において濃縮されて周期的な規則構造の形成が誘導され、その周りにシリカが集合して縮合する。界面活性剤を熱焼成によって除去し、良好に定められた均一な細孔サイズ及び形態を有する多孔性ナノ粒子を得る。エアロゾルを使用したEISAによって生成された粒子(「単峰分布」の粒子)は、平均直径約120 nm(サイズ排除に基づく分離後)、 $1200 \text{ m}^2/\text{g}$ を超えるブルナウアー-エメット-テラー(BET)表面積、細孔容積の割合約50%、及び単峰分布の細孔直径2.5 nmを有する。エマルション滴内に生成した粒子(「多峰分布」の粒子)は、平均直径約150 nm(サイズ排除に基づく分離後)、BET表面積 $> 600 \text{ m}^2/\text{g}$ 、細孔容積の割合約65%、及び表面から利用可能であり6~12 nmの細孔によって相互に連結した大きな(20~30 nm)細孔からなる多峰分布の細孔形態を有する。エアロゾル又はエマルションの処理(それぞれ)に伴う液-気界面張力又は液-液界面張力によって、ごく小さい表面粗さを有する球形にする。更にどちらの種類の粒子も、窒素吸着等温線の解析によって明らかにされるように、十分に利用可能な3次元の細孔の網状組織を有する。

【0110】

ナノ多孔性シリカコアの大きい細孔容積、表面積、及び近接性によって高いカーゴ収容能力が得られ、多様な種類の治療剤及び診断剤の速やかな装填が可能になる。単峰分布のナノ多孔性コアは、低分子量の化学療法薬について高い収容能力を有する。一方で多峰分布コアは、siRNA、タンパク質毒素、及びその他の高分子量カーゴ(例えばプラスミドDNA)の被包に必要とされる大きくて表面から利用可能な細孔を有する。カーゴ放出速度は、シリカコアが縮合する度合によって正確に制御できる。ナノ多孔性シリカコアの生成に用いるゾル中に種々の量のAETMS(アミン含有シラン)を含ませることによって、実現可能な縮合の程度が低減され、中性pH、高イオン強度(即ち細胞質ゾル)の条件下でコアのより速やかな分解が促進される。AETMSを含まない粒子は疑似体液中において2週間掛けて溶解するが、30 mol%のAETMSを含む粒子は24時間以内に溶解する。従って、プロトセルは連続放出又はバースト放出のプロファイルが必要な用途に適合されることができる。

【0111】

ナノ多孔性シリカ粒子の生成に用いる前駆体ゾル中にAETMSを含ませることによって、細胞質ゾル条件下での粒子分解が加速され、単純な拡散で達成されるよりも速やかな被包されたカーゴの放出が促進される。しかし、AETMS修飾粒子は、弱塩基性の化学療法剤(例えばドキソルビシン)については低下した収容能力も有する。従って収容能力及び細胞内放出の両方を最大化するために、本発明者は電位、カーゴ(例えば、化学療法の薬物(ドキソルビシン/DOX))の収容能力、シリカの分解速度、及びカーゴ放出速度をAETMS濃度の関数として明らかにした。上述したように、未修飾の単峰分布粒子(γ = -104.5 \pm 5.6)はカーゴの高い収容能力を有するが(DOXの場合には 10^{10} 粒子当たり約1.8 mM)、被包されたカーゴ(薬物)の20%を24時間(即ちHCCの典型的な倍加時間)以内に放出するのみである。反対に、30 wt%のAETMSで修飾された単峰分布粒子(γ = 88.9 \pm 5.5)は、その被包されたカー

ゴ（薬物）の全てを6時間以内に放出するが、低下した薬物（DOX）収容能力を有する（ 10^{10} 粒子当たり約0.15 mM）。15 wt %のA E P T M S（ $= -21.3 \pm 5.1$ ）を含む単峰分布粒子は薬物（DOX）の高い収容能力を保持し（ 10^{10} 粒子当たり約1.1 mM）、疑似体液に暴露されると被包されたカーゴ（薬物）の殆ど全てを24時間以内に放出する。従って、これらの粒子が、カーゴの送達を含む全ての実験用に選択される。特に留意すべきこととして、単峰分布シリカ粒子の電位はA E P T M S濃度の関数として増大するが、A E P T M S修飾粒子の細孔容積の割合（30 wt %のA E P T M Sを含有する粒子では約45%）は、未修飾の粒子のもの（約50%）と実質的に異なる。従って、発明者は、A E P T M Sで修飾された単峰分布粒子の減少したカーゴ収容能力は、減少した細孔容積よりも静電反発力に起因すると考える。カーゴ収容能力及びカーゴ放出の動力学に及ぼす細孔サイズの影響を示すために、多峰分布粒子が対照として含められる。

【0112】

<一般試薬>

無水エタノール、塩酸（37%）、オルトケイ酸テトラエチル（TEOS、98%）、3-アミノプロピルトリエトキシシラン（APTES、98%）、3-[2-(2-アミノエチルアミノ)エチルアミノ]プロピルトリメトキシシラン（A E P T M S、工業等級）、2-シアノエチルトリエトキシシラン（CETES、97.0%）、臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム（CTAB、99%）、Br i j（登録商標）-56、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS、98.5%）、T r i t o n（登録商標）X-100、ヘキサデカン（99%）、ドキシソルビシン塩酸塩（98%）、5-フルオロウラシル（99%）、cis-ジアンミン白金（II）二塩化物（シスプラチン、99.9%）、コリネバクテリウムジフテリア由来のジフテリア毒素、トリボクラジウムインフラタム由来のシクロスポリンA（CsA、95%）、N-アセチル-L-システイン（NAC、99%）、ヒト上皮増殖因子、L- -ホスファチジルエタノールアミン、チミジン（99%）、ヒポキサンチン（99%）、ウシフィブロネクチン、ウシI型コラーゲン、ゼラチン、大豆トリブシンインヒビター（98%）、2-メルカプトエタノール（99.0%）、DL-ジチオスレイトール（99.5%）、ジメチルスルホキシド（99.9%）、pH5のクエン酸緩衝液、エチレンジアミン4酢酸（EDTA、99.995%）、4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-1-エタンスルホン酸（HEPES、99.5%）、リン酸水素二アンモニウム（99.99%）、及びセファロース（登録商標）CL-4Bは、シグマ・アルドリッチ社（ミズーリ州セントルイス）から購入した。A B I L（登録商標）EM90（セチルPEG/PPG-10/1ジメチコン）は、エボニック・インダストリーズ社（ドイツ、エッセン）から購入した。超高純度のEM等級ホルムアルデヒド（16%、メタノール非含有）は、ポリサイエンシズ社（ペンシルバニア州ウォリントン）から購入した。H e l l m a n e x（登録商標）I Iは、ヘルマ社（ドイツ、ミュールハイム）から購入した。

【0113】

<脂質>

1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DOPC）、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DPPC）、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DSPC）、1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン（18:1のDOTAP）、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-（1'-rac-グリセロール）（DOPG）、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DOPE）、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DPPE）、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ（ポリエチレングリコール）-2000]（18:1のPEG-2000PE）、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ（ポリエチレングリコール）-2000]（16:0のPEG-2000PE）、1-オレオイル-2-[1

10

20

30

40

50

2 - [(7 - ニトロ - 2 - 1 , 3 - ベンゾオキサジアゾール - 4 - イル) アミノ] ラウロイル] - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (1 8 : 1 ~ 1 2 : 0 の N B D - P C) 、 1 - パルミトイル - 2 - { 1 2 - [(7 - ニトロ - 2 - 1 , 3 - ベンゾオキサジアゾール - 4 - イル) アミノ] ラウロイル } - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (1 6 : 0 ~ 1 2 : 0 の N B D - P C) 、 及びコレステロールは、アバンティ・ボーラー・リビッツ社 (アラバマ州アラバスター) から購入した。

【 0 1 1 4 】

< 細胞株及び増殖培地 >

ヒト H e p 3 B (H B - 8 0 6 4) 、ヒト肝細胞 (C R L - 1 1 2 3 3) 、ヒト末梢血単核細胞 (C R L - 9 8 5 5) 、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (C R L - 2 8 7 3) 、 T リンパ球 (C R L - 8 2 9 3) 、 B リンパ球 (C C L - 1 5 6) 、イーグル最小必須培地 (E M E M) 、ダルベッコ改変イーグル培地 (D M E M) 、イスコフ改変ダルベッコ培地 (I M D M) 、 R P M I 1 6 4 0 培地、ウシ胎児血清 (F B S) 、及び 1 × トリプシン - E D T A 溶液 (0 . 2 5 % トリプシン、 0 . 5 3 m M の E D T A) は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (A T C C ; バージニア州マナサス) から購入した。 B E G M - B u l l e t キットは、ロンザグループ社から購入した (クロネティクス ; メリーランド州ウォークーズビル) 。フェノールレッド未添加の D M E M は、シグマ・アルドリッチ社 (ミズーリ州セントルイス) から購入した。

【 0 1 1 5 】

< 蛍光染色試薬及び顕微鏡試薬 >

ヘキスト 3 3 3 4 2 (3 5 0 / 4 6 1) 、 4 ' , 6 - ジアミジノ - 2 - フェニルインドール (D A P I 、 3 5 6 / 4 5 1) 、 A l e x a F l u o r (登録商標) 4 0 5 カルボン酸スクシンイミジルエステル (4 0 1 / 4 2 1) 、 C e l l T r a c k e r (商標) バイオレット B M Q C (4 1 5 / 5 1 6) 、 C e l l T r a c k e r (商標) グリーン C M F D A (4 9 2 / 5 1 7) 、カルセイン (4 9 5 / 5 1 5) 、 A l e x a F l u o r (登録商標) 4 8 8 - アネキシン V コンジュゲート (4 9 5 / 5 1 9) 、 A l e x a F l u o r (登録商標) 4 8 8 ヤギ抗マウス I g G (H + L) (4 9 5 / 5 1 9) 、 C l i c k - i T (登録商標) A H A - A l e x a F l u o r (登録商標) 4 8 8 タンパク質合成 H C S アッセイ (4 9 5 / 5 1 9) 、 L I V E / D E A D (登録商標) フィクサブルグリーン死細胞染色キット (4 9 5 / 5 1 9) 、 S Y T O X (登録商標) グリーン核酸染色 (5 0 4 / 5 2 3) 、 M i t o S O X (商標) レッドミトコンドリア過氧化物指示薬 (5 1 0 / 5 8 0) 、 A l e x a F l u o r (登録商標) 5 3 2 カルボン酸スクシンイミジルエステル (5 3 2 / 5 5 4) 、ヨウ化プロビジウム (5 3 5 / 6 1 7) 、 p H r o d o (商標) スクシンイミジルエステル (5 5 8 / 5 7 6) 、 C e l l T r a c k e r (商標) レッド C M T P X (5 7 7 / 6 0 2) 、テキサスレッド (登録商標) 1 , 2 - ジヘキサデカノイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (テキサスレッド (登録商標) D H P E 、 5 8 3 / 6 0 8) 、 A l e x a F l u o r (登録商標) 6 4 7 ヒドラジド (6 4 9 / 6 6 6) 、 A l e x a F l u o r (登録商標) 6 4 7 カルボン酸 - スクシンイミジルエステル (6 5 0 / 6 6 8) 、 U l y s i s (商標) A l e x a F l u o r (登録商標) 6 4 7 核酸標識キット (6 5 0 / 6 7 0) 、 A l e x a F l u o r (登録商標) 6 4 7 - アネキシン V コンジュゲート (6 5 0 / 6 6 5) 、 S l o w F a d e (登録商標) ゴールド・アンチフェード試薬 (D A P I 含有及び非含有) 、イメージ i T (登録商標) F X シグナル増強剤、 1 × ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (D - P B S) 、ウシアルブミン画分 V 溶液 (B S A 、 7 . 5 %) 、及びトランスフェリンは、インビトロジェンライフサイエンス社 (カリフォルニア州カールスバッド) から購入した。赤色蛍光タンパク質 (R F P 、 5 5 7 / 5 8 5) 、 C a s p G L O W (商標) フルオレセイン活性カスパーゼ - 3 染色キット (4 8 5 / 5 3 5) 、及び C a s p G L O W (商標) レッド活性カスパーゼ - 8 染色キット (5 4 0 / 5 7 0) は、バイオビジョン社 (カリフォルニア州マウンテンビュー) から購入した。水溶性 C d S e / Z n S 量子ドット C Z W D 6 4 0 (6 4 0 / 6 6 0) は、 N N - L a b s 社 (アーカンサス州ファイエットビル) から購入した。

【0116】

< 架橋剤 >

1 - エチル - 3 - [3 - ジメチルアミノプロピル] カルボジイミド塩酸塩 (EDC)、スクシンイミジル 4 - [N - マレイミドメチル] シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート (SMCC)、N - [- マレイミドプロピオン酸] ヒドラジド (BMPH)、スクシンイミジル - [(N - マレイミドプロピオンアミド) - テトラコサエチレングリコール] エステル (SM (PEG)₂₄)、スクシンイミジル 6 - [3' - (2 - ビリジルジチオ) - プロピオンアミド] ヘキサノエート (LC - SPDP)、及びスルフヒドリル付加キットは、ピアース・プロテインリサーチプロダクツ社 (サーマフィッシャーサイエンティフィック LSR 社、イリノイ州ロックフォード) から購入した。

10

【0117】

< その他のシリカナノ粒子 >

5 nm 未満の珪素ナノ粒子は、メロリウムテクノロジーズ社 (ニューヨーク州ロチェスター) から購入した。10 ~ 20 nm の酸化珪素ナノ粒子は、スカイスプリングナノマテリアルズ社 (テキサス州ヒューストン) から購入した。30 nm、40 nm、50 nm、60 nm、70 nm、80 nm、90 nm、100 nm、150 nm、200 nm、及び 10 µm のシリカ粒子は、ディスカバリーサイエンティフィック社 (ブリティッシュ・コロンビア州バンクーバー) から購入した。

【0118】

< 合成 siRNA 及び合成ペプチド >

サイレンサーセレクト siRNA (EGFR、VEGFR - 2、及び PDGFR - a に ついての siRNA の ID は、それぞれ s565、s7824、及び s10234) は、アンピオン社 (テキサス州オースティン) から購入した。5' アミノ修飾剤 C12 を備えた二本鎖 DNA オリゴヌクレオチド (5' - AAACATGTGGATTACCCATGTC - 3') は、インテグレートッド DNA テクノロジーズ社 (IDT、アイオワ州コーラルビル) から購入した。「遊離した」SP94 ペプチド (H₂N - SFSIIILTPILPL - COOH、配列番号 6)、コンジュゲート用に C 末端 Cys で修飾された SP94 ペプチド (H₂N - SFSIIILTPILPLGGC - COOH、配列番号 7)、及び図 2 d の動員実験に用いた SP94 ペプチド (H₂N - SFSIIILTPILPLEEGGC - COOH、配列番号 8) は、ニューイングランドペプチド社 (マサチューセッツ州ガードナー) が合成した。H5WYG ペプチド (H₂N - GLFHAI AHFIHGGWHGLIHGWYGGGC - COOH) 及び核局在配列 (H₂N - NQSSNF GPMKGGNF GGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGYGGGC - COOH) は、バイオペプチド社 (カリフォルニア州サンディエゴ) が合成した。ペプチドの下線部分は、元々の配列である。追加のアミノ酸残基は、コンジュゲート又は標識の目的で付加された。全ての抗体 (CHALV - 1、抗 Rab11a、抗 LAMP - 1、抗 EGFR、抗 VEGFR - 2、抗 PDGFR -) は、アブカム社 (マサチューセッツ州ケンブリッジ) から購入した。

20

30

【0119】

< 細胞培養条件 >

Hep3B、肝細胞、PBMC、Tリンパ球、及びBリンパ球はATCCから入手し、製品説明書に従って培養した。簡潔に言えば、Hep3Bは10% FBSを含むEMEM中に維持された。肝細胞は、BSA、フィブロネクチン、及びウシI型コラーゲンでコーティングされたフラスコ中で培養した。用いた培地は、5 ng/mL 上皮増殖因子、70 ng/mL ホスファチジルエタノールアミン、及び10% FBSを備えたBEGM (ゲンタマイシン、アンホテリシン、及びエピネフリンは、BEGM - Bulletキットから除かれた) であった。HUVECは、20% FBSを含むDMEM中で培養された。ゼラチンでコーティングしたフラスコを用いて接着を促進した。PBMC、Tリンパ球、及びBリンパ球は、浮遊培養用フラスコ (グライナーバイオワン社、ノースカロライナ州モンロー) 中で維持された。PBMCは、0.02 mM チミジン、0.1 mM ヒボキサンチン

40

50

、0.05 mMの2-メルカプトエタノール、及び10% FBSが追加されたIMDM中で培養された。Tリンパ球及びBリンパ球はそれぞれ、20% FBSを含むIMDM中及び20% FBSを含むRPMI 1640中で培養された。全ての細胞は、湿気のある環境(5% CO₂を補充した空気)において37℃で維持された。接着細胞は0.05%トリプシンを用いて継代比率1:3で継代され、一方で非接着細胞は 2×10^5 細胞/mLの密度で播種され、 $1 \sim 5 \times 10^6$ 細胞/mLで維持された。

【0120】

[ナノ多孔性シリカ粒子の合成及び特徴]

<単峰分布シリカナノ粒子の合成>

単峰分布の多孔性を有するナノ多孔性シリカ粒子の調製に用いるエアロゾルを使用した蒸発誘起自己組織化法は、Luら²によって記載されている。簡潔に言えば、シリカ前駆体(TEOS)、構造指向性の界面活性剤(CTAB、最初は臨界ミセル濃度よりかなり低い濃度、又はCMC)、及びHClを含有する、水-エタノール溶液に溶解された均質ゾルを、改良型市販アトマイザー(モデル9302A、TSI社、ミネソタ州セントポール)を用いてエアロゾル化した。窒素をキャリアガスとして用い、全ての加熱ゾーンを400℃に維持して溶媒を蒸発させ、有効界面活性剤濃度を増大させた。ピンホールにおける圧力降下は20 psiであった。粒子を80℃に維持したデュラポアメンブレンフィルター(ミリポア社、マサチューセッツ州ビレリカ)上に集めた。代表的な反応混合物は、55.9 mLの脱イオン水、43 mLの200プルーフエタノール、1.10 mLの1.0規定HCl、4.0 gのCTAB、及び10.32 gのTEOSを含んだ。細胞内(中性pH、比較的高塩濃度)条件下でより速やかに溶解するナノ多孔性シリカ粒子を調製するために、様々な量のTEOS及びアミン含有シランAEP-TMSを前駆体ゾル中に含ませ、系のpHを濃塩酸を用いて2.0に調節した。例えば、15 wt%のAEP-TMSを有する粒子を調製するために、9.36 gのTEOS及び1.33 gのAEP-TMSを用いた。

【0121】

<多峰分布シリカナノ粒子の合成>

多峰分布の多孔性を有するナノ多孔性シリカ粒子を合成するのに用いたエマルションの処理はCarrollら¹によって記載されている。簡潔に言えば、1.82 gのCTAB(水相に可溶)を20 gの脱イオン水に加え、溶解するまで40℃で攪拌し、25℃まで冷ました。このCTAB溶液に0.57 gの1.0 N塩酸、5.2 gのTEOS、及び0.22 gのNaClを加え、得られたゾルを1時間攪拌した。3 wt%のAbil-EM90(油相中に可溶な非イオン性乳化剤)を含むヘキサデカンからなる油相を調製した。前駆体ゾルを1000 mLの丸底フラスコ中で油相と結合し(ゾル:油の体積比1:3)、2分間激しく攪拌して油中水型エマルションの形成を促進し、ロータリーエバポレーター(R-205、ビュッヒラボラトリーエクイップメント社、スイス)に取り付け、80℃の水浴中に30分間置いた。この混合物を次に120 mbarの減圧下で沸騰(35 rpm、3時間)させて溶媒を除去した。粒子を3000 rpmで20分間遠心し(Centra-MP4Rモデル、インターナショナル・エクイップメント・カンパニー社、テネシー州チャタヌーガ)、上清を傾瀉した。最後に粒子を500℃で5時間焼成して界面活性剤やその他の過剰な有機物質を除去した。Carrollらが記載のように、溶媒除去によって水相にCTAB(>CMC)が濃縮され、得られたミセルはシリカ粒子の縮合(水相中での)の際に6~12 nmの細孔の鑄型となる。更に、水-油界面への2つの界面活性剤(CTAB及びAbil-EM90)の吸着によって相助作用で界面張力が減少し、表面から利用可能な大きな細孔の鑄型となる20~30 nmのマイクロエマルション滴の自発的形成がもたらされる。

【0122】

<シリカナノ粒子の特徴>

ナノ多孔性シリカ粒子の動的光散乱法は、ゼータサイザーナノ(マルバーン社、英国ウスターシャー州)を用いて行った。サンプルは、48 µLのシリカ粒子(25 mg/mL

を 2.4 mL の 1 × D - P B S 中で希釈することによって調製した。溶液を解析のために 1 mL ポリスチレンキュベット（ザルスタット社、ドイツ、ニュームブレヒト）に移した。窒素収着は、A S A P - 2 0 2 0 比表面積・細孔分布測定装置（マイクロメトリックス・インスツルメント社、ジョージア州ノークロス）を用いて行った。電位測定は、ゼータサイザーナノ（マルバーン社、英国ウスターシャー州）を用いて行った。代表的な実験においては、シリカ粒子、リボソーム、又はプロトセルを疑似体液（pH 7.4）又はクエン酸緩衝液（pH 5.0）中に 1 : 50 で希釈した。これらは何れも 150 mM の N a C l を含むように調節され、解析のために 1 mL 折り畳みキャピラリーセル（マルバーン社、英国ウスターシャー州）に移された。D L S 及び窒素収着のデータについては添付の図 1、シリカナノ粒子、リボソーム、及びプロトセルの電位の値については、添付の図 1 2 を参照。

【 0 1 2 3 】

[プロトセルの合成、装填、及び表面機能化]

< ナノ多孔性シリカ粒子へのリボソームの融合 >

プロトセルを合成するのに用いる手順はLiuらによって記載されており^{25 ~ 27}、簡単にのみ言及される。脂質はアバンティ・ポーラー・リピッツ社に注文し、クロロホルム中に予め溶解して - 20 °C に保存した。プロトセル合成の直前に、2.5 mg の脂質を窒素流のもとで乾燥し、真空オープン（モデル 1 4 5 0 M、V W R インターナショナル社、ペンシルバニア州ウエストチェスター）中に一晚置いて残留溶媒を除去した。脂質を 0.5 × D - P B S 中において濃度 2.5 mg / mL で再水和し、Mini - エクストルーダーセット（アバンティ・ポーラー・リピッツ社、アラバマ州アラバスター市）を用いて 100 nm フィルターを少なくとも 10 回通した。D P P C 及び D S P C をそれぞれの転移温度（41 °C 及び 55 °C）まで予熱した 0.5 × D - P B S 中に溶解し、押し出しプロセス中は 60 °C に維持した。得られたリボソーム（直径約 120 nm）を 4 °C で最大 1 週間保存した。ナノ多孔性シリカコアを 0.5 × D - P B S 中に溶解し（25 mg / mL）、過剰量のリボソーム（脂質：シリカの体積比 1 : 2 ~ 1 : 4）に室温で 30 ~ 90 分暴露した。プロトセルを過剰な脂質の存在下において 4 °C で最大 3 ヶ月間保存した。過剰な脂質を除去するために、プロトセルを 10,000 rpm で 5 分間遠心し、2 回洗浄し、0.5 × D - P B S 中に再懸濁した。

【 0 1 2 4 】

< 担持された脂質二重層の組成物の最適化 >

対照細胞に対する非特異的結合及び毒性を最少化するために、S L B の組成を最適化した。用いた種々の脂質の構造については添付の図 4 参照。表面への結合、内在化、及び送達の実験の全てにおいて用いたプロトセルは、5 wt % D O P E（又は D P P E）、30 wt % コレステロール、及び 5 wt % の 18 : 1（又は 16 : 0）の P E G - 2 0 0 0 P E を含む D O P C（又は D P P C）からなる S L B を有した。必要に応じて、蛍光脂質（18 : 1 ~ 12 : 0 の N B D - P C、16 : 0 ~ 12 : 0 の N B D - P C、又はテキサスレッド（登録商標）D H P E）を S L B 中に 1 ~ 5 wt % 含ませた。脂質は、再水和及び押し出しの前にまとめて凍結乾燥した。例えば 75 µL の D O P C（25 mg / mL）、5 µL の D O P E（25 mg / mL）、10 µL のコレステロール（75 mg / mL）、5 µL の 18 : 1 の P E G - 2 0 0 0 P E（25 mg / mL）、及び 5 µL の 18 : 1 ~ 12 : 0 の N B D - P C（5 mg / mL）を組み合わせ乾燥し、5 wt % の D O P E、30 wt % のコレステロール、5 wt % の P E G - 2 0 0 0、及び 1 wt % の N B D - P C を含む D O P C からなるリボソームを生成した。

【 0 1 2 5 】

< 様々な種類のターゲティングリガンドでの担持された脂質二重層の修飾 >

H C C に対するプロトセルの特異親和性を、様々な種類のターゲティングリガンドを様々な密度で S L B にコンジュゲートすることによって最適化した。S P 9 4 及び H 5 W Y G ペプチド（C 末端システイン残基を持つように合成した）を、スルフヒドリル部分及びアミン部分に反応性であって長さを変えて特異親和性を最適化できる P E G スペーサーア

ームを有するヘテロ二官能性架橋剤のNH₂- (PEG)_n-マレイミドを介して、PEの頭部基中に存在する1級アミンにコンジュゲートした。殆どの実験においてSM (PEG)₂₄を用いた (スパーサーアーム = 9.52 nm)。トランスフェリン、抗EGFR、及びCHALV-1中に存在するアミン部分を、スルフヒドリル付加キットを用いて遊離したスルフヒドリルに変換した (製品説明書に従った)。機能化されたトランスフェリン及び抗体を、SM (PEG)₂₄を用いてSLB中のPEにコンジュゲートした。リガンド密度を反応化学量論及び培養時間の両方によって調節した。例えば、プロトセルを10倍モル過剰のSP94と共に室温で2時間培養し、ペプチド密度0.015 wt% (約6ペプチド/プロトセル)を得た。一方、プロトセルを5000倍モル過剰のSP94と共に4で一晚培養し、ペプチド密度5.00 wt% (約2048ペプチド/プロトセル)を得た。平均リガンド密度は、トリシン-SDS-PAGE (SP94及びH5WYGペプチド)又はレムリ-SDS-PAGE (トランスフェリン、抗EGFR、及びCHALV-1)によって測定された²⁸。簡潔に言えば、LC-SPDP (スパーサーアーム = 1.57 nm)は、1級アミン部分及びスルフヒドリル部分と反応し、還元によって切断可能なヘテロ二官能性架橋剤であり、これを用いてプロトセルを種々のリガンド密度で修飾した。プロトセルを10 mMジチオスレイトール (DTT)に30分間暴露し、10,000 rpmで5分間遠心した。得られた上清は遊離したリガンドを含み、その濃度をImageJ画像処理・解析ソフトウェア (アメリカ国立衛生研究所、メリーランド州ベセスダ)を用いて各サンプルのバンド濃度と標準曲線とを比較することによって、SDS-PAGEで測定した。20%ゲル (6%ビスアクリルアミド及び6 M尿素を含む)を用いてSP94及びH5WYGのペプチド密度を解析した。10%ゲルを用いて抗体 (抗EGFR及びCHALV-1)密度を解析し、15%ゲルを用いてトランスフェリン密度を解析した。

10

20

30

40

50

【0126】

< 蛍光標識されたナノ多孔性コアの調製 >

100 µLの粒子 (25 mg/mL)を0.5 x D-PBS中の900 µLの20% APTESに添加して、ナノ多孔性コアを蛍光標識した。粒子をAPTES中において室温で一晩培養し、遠心 (10,000 rpm、5分)して未反応のAPTESを除去し、1 mLの0.5 x D-PBS中に再懸濁した。アミン反応性フルオロフォア (例えばAlexa Fluor (登録商標) 647カルボン酸スクシンイミジルエステル、1 mg/mL、DMSO中)を添加した (粒子の1 mL当たり色素5 µL)。粒子を室温に2時間保った後、遠心して未反応の色素を除去した。蛍光標識された粒子を4で0.5 x D-PBS中に保存した。

【0127】

< 単峰分布コア及びリポソームへの化学療法剤の装填 >

リポソームの融合前に、15 wt%のAETMS (25 mg/mL)を含むように修飾した単峰分布ナノ多孔性コアを、ドキソルビシン (5 mM)中、又はドキソルビシン、シスプラチン及び5-フルオロウラシル (各薬物5 mM)の混合物中に室温で1時間浸漬した。過剰な薬物を粒子の遠心 (10,000 rpm、5分間)によって除去した。以前に記載されたリン酸アンモニウム勾配に基づく方法を用いて²⁹、120 nmリポソームにDOXが装填された。簡潔に言えば、脂質膜を300 mMの () O₄で再水和し、リポソーム溶液を100 nm薄膜に少なくとも10回通した。リポソームを透析 (フロート-A-Lyzer-G2透析ユニット、3.5~5 kDa MWCO、スペクトラムラボラトリーズ社、カリフォルニア州ランチョドミンゲス)によって等張緩衝溶液 (140 mMのNaCl、10 mMのHEPES、pH 7.4)で平衡化し、ドキソルビシンHCl (薬物:脂質のモル比1:3)と共に4で一晚培養した。過剰のDOXをサイズ排除クロマトグラフィー (0.7 cm x 10 cm セファロース (登録商標) CL-4Bカラム)によって除去した。以前に記載されたように^{30, 31}、リポソームに5-FU又はシスプラチンが装填された。

【0128】

< 多峰分布コアへの多成分混合物、s i R N A、及びジフテリア毒素 A 鎖の装填 >

20 w t % の A E P T M S (25 m g / m L) を含むように修飾した多峰分布ナノ多孔性コアを、カルセイン (5 m M)、A l e x a F l u o r (登録商標) 647 標識 d s D N A オリゴヌクレオチド (100 μ)、R F P (100 μ)、及び C d S e / Z n S 量子ドット (10 μ) の溶液中に 4 時間浸漬した。ハイバースペクトル画像のための最善の蛍光強度を得るために、各カーゴの濃度を变化させた。850 μ L の 1 x D - P B S 中にカルセイン及び N L S をそれぞれ 1 m g 溶解することによって、カルセインを N L S (C 末端システイン残基を含むように合成した) で修飾した。100 μ L の E D C (10 m g / m L、脱イオン水中) 及び 50 μ L の B M P H (10 m g / m L、D M S O 中) を添加し、混合物を室温で 2 時間培養した。過剰のカルセインを透析 (S l i d e - A - L y z e r ミニ透析ユニット、2 k D a M W C O、サーモフィッシャーサイエンティフィック L S R 社、イリノイ州ロックフォード) によって除去した。d s D N A オリゴヌクレオチドを U l y s i s (商標) A l e x a F l u o r (登録商標) 647 核酸標識キットを用いて標識し (製品説明書に従った)、更に 50 μ L の d s D N A (2 m M、脱イオン水中) を 50 μ L の N L S (1 m M、D M S O 中) 及び 10 μ L の S M C C (10 m g / m L、D M S O 中) と結合することによって N L S で修飾した。混合物を室温で 2 時間培養し、過剰な N L S を透析 (スライド - A - L y z e r ミニ透析ユニット、7 k D a - M W C O、サーモフィッシャーサイエンティフィック L S R 社、イリノイ州ロックフォード) によって除去した。添付の図 13 ~ 16 に記載の送達実験のために、20 w t % の A E P T M S (25 m g / m L) で修飾した多峰分布のナノ多孔性コアを、s i R N A (100 μ) 又はジフテリア毒素 A 鎖 (100 μ) 中に 4 で 2 時間浸漬した。被包されていないカーゴを遠心 (10,000 r p m、5 分間) によって除去し、カーゴ装填済みのコアにリポソームを直ちに融合した。

10

20

30

40

50

【 0129 】

< ヒストンタンパク質による C B 1 プラスミドのパッケージング >

C B 1 プラスミド (p C B 1) の超らせん化に用いたプロセスを図 4 に示す。概念図には、高度に飽和した塩溶液を用いて C B 1 プラスミド (p C B 1) (C B 1 プラスミドベクターは以下及び添付の図 12 に示される) を超らせん化し、超らせん p C B 1 をヒストン H 1、H 2 A、H 2 B、H 3、及び H 4 でパッケージングし、得られた p C B 1 - ヒストン複合体をヒストンタンパク質へのコンジュゲートによって核膜孔を通る移行を促進する核局在配列 (N L S) で修飾するために用いられるプロセスを示す。図 4 (B) 及び (D) は、C B 1 プラスミド (B) 及びヒストンでパッケージングされた p C B 1 (D) の原子間力顕微鏡法 (A F M) 画像である。スケールバー = 100 n m。 (C) 及び (E) は、それぞれ (B) 及び (D) での赤線に対応する高さプロファイルである。

【 0130 】

< ヒストンでパッケージングされた p C B 1 が装填された、M C 40 によって標的を定められたメソ多孔性のシリカナノ粒子に担持された脂質二重層 (プロトセル) の合成 >

図 5 に示すように、5 (A) は D N A を装填し、ペプチドで標的を定められたプロトセルを生成するために用いられるプロセスを示す概念図である。この方法に従って、プロトセルのコアを形成するメソ多孔性のシリカナノ粒子を p C B 1 - ヒストン複体の溶液に単純に浸漬することによって、ヒストンでパッケージングされた p C B 1 をシリカナノ粒子に装填する。次に P E G 化リポソームを D N A が装填されたコアと融合し、H C C に結合するターゲティングペプチド (M C 40) と、内在化したプロトセルのエンドソーム脱出を促進するエンドソーム分解性ペプチド (H 5 W Y G) とで更に修飾された、担持された脂質二重層 (S L B) を形成する。スルフヒドリル - アミン架橋剤 (スペーサーアーム = 9.5 n m) を用いて、C 末端システイン残基で修飾したペプチドを S L B 中の D O P E 成分にコンジュゲートした。図 5 (B) は、プロトセルのコアとして用いられるメソ多孔性のシリカナノ粒子の透過型電子顕微鏡法 (T E M) 画像である。スケールバー = 200 n m。挿入画像 = 走査型電子顕微鏡法 (S E M) 画像であって、15 ~ 25 n m の細孔が表面から利用可能であることを示す。挿入画像のスケールバー = 50 n m。5 (C)

は、動的光散乱法 (DLS) によって測定されたメソ多孔性のシリカナノ粒子についてのサイズ分布を示す。(5D、左軸) パレット - ジョイナー - ハレング (BJH) モデルを用いて図 S - 4 A に示す窒素吸着等温線の吸着枝から計算された、メソ多孔性のシリカナノ粒子の累積細孔容積の線図である。(5D、右軸) DLS により測定された、pCB1 - ヒストン複合体のサイズ分布である。

【0131】

<メソ多孔性のシリカナノ粒子はヒストンでパッケージングされた pCB1 について高い収容能力を有し、得られたプロトセルはエンドソーム環境を模倣する条件下でのみ被包された DNA を放出する>

図 6 (A) は、未修飾のメソ多孔性のシリカナノ粒子 ($\zeta = -38.5 \text{ mV}$) 又はアミン含有シランの APTEs で修飾されたメソ多孔性のシリカナノ粒子 ($\zeta = +11.5 \text{ mV}$) の中に被包可能な pCB1 又はヒストンでパッケージングされた pCB1 (「複合体」) の濃度を示す。図 6 (B) は、MC40 で標的を定められ、pCB1 が装填されたプロトセル (1×10^9 個) と共に 1×10^6 細胞/mL を 37 °C で 24 時間培養した場合に、ZsGreen (pCB1 によりコードされる緑色蛍光タンパク質) に対して陽性となる Hep3B の割合を示す。x 軸は、プロトセルのコアが APTEs で修飾されたか否か及び pCB1 がヒストンで予めパッケージングされたか否かを示す。(A) 及び (B) では、DOTAP と DOPE との混合物 (1 : 1 w/w) でパッケージングされた pCB1 を対照として含む。図 6 (C) 及び (D) は、疑似体液 (C) 又は pH 5 緩衝液 (D) に暴露した際の、未修飾のメソ多孔性のシリカナノ粒子及び対応するプロトセルからの、ヒストンでパッケージングされた pCB1 の時間に依存した放出を示す。プロトセルの SLB は、5 wt % の DOPE、30 wt % のコレステロール、及び 10 wt % の PEG - 2000 を含む DOPC からなり、(B) については、0.015 wt % の MC40 及び 0.500 wt % の H5WYG で修飾された。全てのエラーバーは、 $n = 3$ の場合の 95 % 信頼区間を表す (1.96)。

【0132】

<MC40 で標的を定められたプロトセルがヒストンでパッケージングされた pCB1 を HCC まで送達するプロセス>

添付の図 7 に示される概念図に表されるように、[1] 種々の HCC 株により過剰発現される Met へのターゲティングペプチドの動員によって、MC40 で標的を定められたプロトセルは、Hep3B 細胞に高親和性で結合する。流動性の DOPC の SLB はペプチドの流動性を促進し、それにより低い MC40 密度で修飾されたプロトセルが Hep3B に対して高い特異親和性を保持することを可能にする (図 8 A 参照)。[2] MC40 で標的を定められたプロトセルは、受容体依存性エンドサイトーシスを介して Hep3B によって内在化される (図 8 B 及び図 15 A 参照)。[3] エンドソーム条件は SLB を不安定化し (Nature Materials の参考文献を挿入)、エンドソーム分解性ペプチド H5WYG のプロトン化を引き起こす。これらは何れも、ヒストンでパッケージングされた pCB1 が Hep3B 細胞の細胞質ゾル中に拡散することを可能にする (図 16 B 参照)。[4] pCB1 - ヒストン複合体は、核局在配列 (NLS) で修飾された場合に、約 24 時間以内に Hep3B 細胞の核内に濃縮される (図 16 C 参照)。これによって、分裂中及び非分裂中の癌細胞の両方での効率的なトランスフェクションが可能になる (図 17 参照)。

【0133】

<MC40 で標的を定められたプロトセルは HCC に高親和性で結合し、Hep3B によって内在化されるが正常肝細胞によっては内在化されない>

図 8 (A) は、MC40 で標的を定められたプロトセルを Hep3B 又は肝細胞に暴露した場合の見かけの解離定数 (K_d) を示す。 K_d 値は、特異親和性に対して逆の関係にあり、飽和結合曲線から求められた (図 S - 11 参照)。エラーバーは、 $n = 5$ の場合の 95 % 信頼区間を表す (1.96)。図 8 (B) 及び (C) は、MC40 で標的を定められたプロトセル (1000 倍の過剰量) に 37 °C で 1 時間暴露された Hep3B (B) 及

び肝細胞（C）の共焦点蛍光顕微鏡法画像である。MetはAlexaFluor（登録商標）488標識モノクローナル抗体で染色され（緑色）、プロトセルコアはAlexaFluor（登録商標）594で標識され（赤色）、細胞核はヘキスト33342で染色された（青色）。スケールバー＝20 μ m。プロトセルのSLBは、5wt%のDOPE、30wt%コレステロール、及び10wt%のPEG-2000（18：1）を含むDOPCからなり、0.015wt%（A～C）又は0.500wt%（A）のMC40ターゲットペプチドで修飾された。

【0134】

<MC40で標的を定められ、pCB1が装填されたプロトセルは、ピコモル濃度でHCCのアポトーシスを誘導するが、正常肝細胞の生存性に関してはごく小さい影響しか有さない>

図9（A）及び（B）は、MC40で標的を定められ、pCB1が装填されたプロトセルに37でHep3Bを連続して暴露した際の、サイクリンB1のmRNA及びサイクリンB1タンパク質の発現における用量（A）及び時間（B）に依存した減少を示す。（A）では、細胞を種々のpCB1濃度に48時間暴露し、（B）では、5pMのpCB1に種々の時間に渡って暴露した。肝細胞でのサイクリンB1タンパク質の発現及びHep3BでのZsGreenの発現が、対照として含まれる。リアルタイムPCR及び免疫蛍光法を用いて、サイクリンB1のmRNA及びタンパク質それぞれの濃度を測定した。図9（C）は、MC40で標的を定められ、pCB1が装填されたプロトセル（[pCB1]＝5pM）に37で種々の時間に渡って連続して暴露した後の、G₂/M期に停止したHep3Bの割合を示す。G₂/M期の肝細胞の割合及びS期のHep3Bの割合を比較のために含む。細胞は、細胞周期分析の前にヘキスト33342で染色された。図9（D）は、MC40で標的を定められ、pCB1が装填されたプロトセル（[pCB1]＝5pM）に37で種々の時間に渡って連続して暴露した際に、アポトーシス性になるHep3Bの割合を示す。アポトーシスのマーカーに陽性である肝細胞の割合を対照として含む。AlexaFluor（登録商標）647標識アネキシンVに陽性である細胞は、アポトーシスの初期にあると見なし、アネキシンV及びヨウ化プロビジウムの両方に陽性である細胞は、アポトーシスの後期にあると見なした。アポトーシス性細胞の総数は、一方及び両方に陽性である細胞の数を加算して求められた。全ての実験において、プロトセルのSLBは、5wt%のDOPE、30wt%コレステロール、及び10wt%のPEG-2000（18：1）を含むDOPCからなり、0.015wt%のMC40及び0.500wt%のH5WYGで修飾された。全てのエラーバーは、n＝3の場合の95%信頼区間を表す（1.96）。

【0135】

<MC40で標的を定められ、pCB1が装填されたプロトセルが、対応するリポブレンクスよりも2500倍有効にHCCの選択的なアポトーシスを誘導する>

図10（A）は、DOPCプロトセル、10wt%のPEG-2000（18：1）で修飾されたDOPCプロトセル、pCB1とDOTAP及びDOPEの混合物（1：1w/w）とからなるリポブレンクス、並びに10wt%のPEG-2000で修飾されたDOTAP/DOPEリポブレンクスの電位の値を示す。全ての電位測定は、0.5xPBS（pH7.4）中で行われた。図10（B、左軸）は、MC40で標的を定められたプロトセル又はリポブレンクスによって送達された5pMのpCB1に37で48時間連続して暴露した際に、アポトーシス性になるHep3B及び肝細胞の割合を示す。図10（B、右軸）は、1x10⁶個のHep3B細胞の90%において37で48時間以内にアポトーシスを誘導するのに必要な、MC40で標的を定められ、pCB1が装填されたプロトセル又はリポブレンクスの数を示す。（B）については、細胞は、AlexaFluor（登録商標）647標識アネキシンV及びヨウ化プロビジウムで染色された。一方及び両方に陽性である細胞をアポトーシス性に見なした。プロトセルのSLBは、5wt%のDOPE、30wt%コレステロール、及び10wt%のPEG-2000（表示される場合）を含むDOPCからなり、0.015wt%のMC40及び0.500

10

20

30

40

50

w t % の H 5 W Y G で修飾された。D O T A P / D O P E リポプレックスは、1 0 w t % の P E G - 2 0 0 0 (表示される場合)、0 . 0 1 5 w t % の M C 4 0、及び 0 . 5 0 0 w t % の H 5 W Y G で修飾された。p C B 1 は、全ての実験において N L S で修飾された。全てのエラーバーは、n = 3 の場合の 9 5 % 信頼区間を表す (1 . 9 6)。

【 0 1 3 6 】

< M C 4 0 で標的を定められたプロトセルが、肝細胞の生存性には影響を与えることなく、高濃度のタキソール、B c l - 2 特異 s i R N A、及び p C B 1 を H C C に選択的に送達する >

図 1 1 (A) は、 10^{12} 個のプロトセル、リボソーム、又はリポプレックスの中に被包可能な、タキソール、B c l - 2 の発現を抑制する s i R N A、及び C B 1 プラスミドの濃度を示す。図 1 1 A の赤色のバーは、タキソール及び p C B 1 の両方がプロトセルに装填された場合に、タキソール及び p C B 1 の濃度がどのように変わるかを示す。青色のバーは、タキソール、s i R N A、及び p C B 1 のすべてがプロトセルに装填された場合又は s i R N A 及び p C B 1 がリポプレックスに装填された場合に、タキソール、s i R N A、及び p C B 1 の濃度がどのように変わるかを示す。図 1 1 (B) は、M C 4 0 で標的を定められたプロトセルによって H e p 3 B まで送達された場合の、オレゴングリーン (登録商標) 4 8 8 標識タキソール (緑色)、A l e x a F l u o r (登録商標) 5 9 4 標識 s i R N A (赤色)、及び C y 5 標識 p D N A (白色) の細胞内分布を示す共焦点蛍光顕微鏡法画像を提供する。細胞を M C 4 0 で標的を定められたプロトセルの 1 0 0 0 倍の過剰量と共に 3 7 ° で 2 4 時間培養した後に固定して、ヘキスト 3 3 3 4 2 で染色した (青色)。スケールバー = 1 0 μ m。図 1 1 (C) は、1 0 n M のタキソール及び / 又は 5 p M の p C B 1 に 3 7 ° で 4 8 時間暴露した際に、G₂ / M 期に停止した H e p 3 B、S N U - 3 9 8、及び肝細胞細胞の割合を示す。割合は、G₂ / M での対数増殖細胞の割合に対して正規化された。図 1 1 (D) は、1 0 n M のタキソール、2 5 0 p M の B c l - 2 特異 s i R N A、及び / 又は 5 p M の p C B 1 に 3 7 ° で 4 8 時間暴露した際に、A l e x a F l u o r (登録商標) 6 4 7 標識アネキシン V 及びヨウ化プロビジウム (P I) について陽性になる H e p 3 B、S N U - 3 9 8、及び肝細胞の細胞の割合を示す。

(C) 及び (D) において、「p C B 1」は、D O T A P と D O P E との混合物 (1 : 1 w / w) を用いてパッケージングされて細胞まで非特異的に送達された p C B 1 を指す。全ての実験において、プロトセルの S L B は、5 w t % の D O P E、3 0 w t % のコレステロール、及び 1 0 w t % の P E G - 2 0 0 0 (1 8 : 1) を含む D O P C からなり、0 . 0 1 5 w t % の M C 4 0 及び 0 . 5 0 0 w t % の H 5 W Y G で修飾された。リボソームは、5 w t % の D M P E、3 0 w t % のコレステロール、及び 1 0 w t % の P E G - 2 0 0 0 (1 6 : 0) を含む D S P C からなり、0 . 0 1 5 w t % の M C 4 0 及び 0 . 5 0 0 w t % の H 5 W Y G で修飾された。リポプレックスは、D O T A P : D O P E (1 : 1 w / w) 混合物からなり、1 0 w t % の P E G - 2 0 0 0、0 . 0 1 5 w t % の M C 4 0、及び 0 . 5 0 0 w t % の H 5 W Y G で修飾された。(C) 及び (D) において、「p C B 1」は、D O T A P と D O P E との混合物 (1 : 1 w / w) を用いてパッケージングされて細胞まで非特異的に送達された p C B 1 を指す。全ての実験において、プロトセルの S L B は、5 w t % の D O P E、3 0 w t % のコレステロール、及び 1 0 w t % の P E G - 2 0 0 0 (1 8 : 1) を含む D O P C からなり、0 . 0 1 5 w t % の M C 4 0 及び 0 . 5 0 0 w t % の H 5 W Y G で修飾された。リボソームは、5 w t % の D M P E、3 0 w t % のコレステロール、及び 1 0 w t % の P E G - 2 0 0 0 (1 6 : 0) を含む D S P C からなり、0 . 0 1 5 w t % の M C 4 0 及び 0 . 5 0 0 w t % の H 5 W Y G で修飾された。リポプレックスは、D O T A P : D O P E (1 : 1 w / w) 混合物からなり、1 0 w t % の P E G - 2 0 0 0、0 . 0 1 5 w t % の M C 4 0、及び 0 . 5 0 0 w t % の H 5 W Y G で修飾された。p C B 1 は、全ての実験において N L S で修飾された。全てのエラーバーは、n = 3 の場合の 9 5 % 信頼区間を表す (1 . 9 6)。

【 0 1 3 7 】

< C B 1 プラスミドのベクターマップ >

C B 1 プラスミド (p C B 1) は、RNA i - R e a d y p S I R E N - R e t r o Q - Z s G r e e n ベクター (クロンテック・ラボラトリーズ社、カリフォルニア州マウンテンビュー) 及び p N E B 1 9 3 ベクター (ニュー・イングランド・バイオラボ社、マサチューセッツ州イプスウィッチ) から構築された。p C B 1 は、サイクリン B 1 特異的短鎖ヘアピン RNA (s h R N A) (Yuan ら、Oncogene (2006) 25, 1753-1762) 及びスナギンチャク種の緑色蛍光タンパク質 (Z s G r e e n) をコードする。構成的 s h R N A 発現は、RNA P o l I I I 依存性ヒト U 6 プロモーター (P_{U6}) によって駆動され、構成的 Z s G r e e n 発現は、サイトメガロウイルスの最初期プロモーター (P_{CMV IE}) によって駆動される。ori エlement 及び Amp^R エlement は、大腸菌内におけるプラスミドの増殖を可能にする。サイクリン B 1 特異的 s h R N A のセンス鎖及びアンチセンス鎖をコードする DNA 配列に下線を付す。ds DNA オリゴヌクレオチドを p S I R E N ベクターに導入するために用いた制限酵素部位 (B a m H I は赤色、E c o R I は青色) が横にある。

10

【 0 1 3 8 】

< ヒストンでパッケージングされた p C B 1 の特徴 >

図 1 3 (A) は、漸増濃度のヒストン (モル比 1 : 2 : 2 : 2 : 2 の H 1、H 2 A、H 2 B、H 3、及び H 4) に暴露された p C B 1 に関する電気泳動移動度シフトアッセイを示す。p C B 1 : ヒストンのモル比をレーン 3 ~ 6 に示す。レーン 1 は DNA ラダーを含み、レーン 2 は p C B 1 を含み添加ヒストンを含まない。図 1 3 (B) は、ヒストンでパッケージングされた p C B 1 (p C B 1 : ヒストンのモル比 1 : 5 0) の TEM 画像である。スケールバー = 5 0 n m。

20

【 0 1 3 9 】

< 未装填のメソ多孔性のシリカナノ粒子及び p C B 1 が装填されたメソ多孔性のシリカナノ粒子の窒素吸着分析 >

図 1 4 (A) は、ヒストンでパッケージングされた p C B 1 の装填前後での、メソ多孔性のシリカナノ粒子の窒素吸着等温線である。図 1 4 (B) は、ヒストンでパッケージングされた p C B 1 の装填前後での、メソ多孔性のシリカナノ粒子のブルナウアー - エメット - テラー (B E T) 表面積を示す。エラーバーは、n = 3 の場合の 9 5 % 信頼区間を表す (1 . 9 6)。

30

【 0 1 4 0 】

< D O P C プロトセルの小角中性子散乱 (S A N S) データ >

図 1 5 は、D O P C プロトセルの S A N S データを示す。フィッティングデータデータは、一定厚さの共形シェルを有する多分散な多孔性シリカ球のモデルを用いて得られたものであり、シリカ粒子の表面に細孔開口部を覆う 3 6 の二重層が存在することを示す。厚さ 0、2 0、6 0 の二重層についてシミュレーションされた S A N S データを比較のために含む。測定された二重層の厚さ 3 6 は、平坦な担持された脂質二重層について行われた他の中性子研究 (3 3 ~ 3 8) (Ferrari, M. Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges. Nature Reviews Cancer 5, 161-171 (2005) 参照) と一致しており、これらの対照条件下では、脂質二重層の水素に富む炭化水素コアからの散乱を主に示す。実験データは、2 9 9 . 2 の細孔の存在も示しており、2 を 0 . 0 3 1 5⁻¹ (即ち、細孔からの散乱により生じる実験データでのピークの q 値) で割ることによって求められた。S A N S データは、1 0 0 % D₂O / P B S 緩衝液中の 5 % (v / v) のプロトセル懸濁液を用いて、L A N S C E (ロスアラモス国立研究所) で L Q D ビームラインで得られた。データは、N C N R の S A N S データ解析パッケージ (N I S T) を用いて適合された。

40

【 0 1 4 1 】

< プロトセルは被包された DNA をヌクレアーゼ分解から守る >

図 1 6 に、D N a s e I 処理した p C B 1 (レーン 3)、ヒストンでパッケージングされた p C B 1 (レーン 5)、D O T A P と D O P E との 1 : 1 (w / w) 混合物でバッケ

50

ージングされた p C B 1 (レーン 7)、カチオン性コアを有するプロトセルに装填された p C B 1 (レーン 9)、及びアニオン性コアを有するプロトセルに装填されたヒストンでパッケージングされた p C B 1 (レーン 11) のアガロースゲル電気泳動の結果を示す。裸の p C B 1 (レーン 2)、ヒストンから放出された p C B 1 (レーン 4)、D O T A P / D O P E リポブラックスから放出された p C B 1 (レーン 6)、カチオン性コアを有するプロトセルから放出された p C B 1 (レーン 8)、及びアニオン性コアを有するプロトセルから放出されたヒストンでパッケージングされた p C B 1 (レーン 10) を比較のために含む。レーン 1 は D N A ラダーを含む。試料を D N a s e 1 (50 ng の D N A 当たり 1 ユニット) と共に室温で 30 分培養し、p C B 1 放出は 1 % S D S を用いて促進された。

10

【 0 1 4 2 】

図 17 は、メソ多孔性のシリカナノ粒子 (「未修飾のコア」)、20 % (v / v) の A P T E S 中に室温で 12 時間浸漬したメソ多孔性のシリカナノ粒子 (「A P T E S 修飾コア」)、C B 1 プラスミド (「p C B 1」)、ヒストンでパッケージングされた p C B 1 (「p C B 1 - ヒストン複合体」)、及び D O T A P と D O P E との 1 : 1 (w / w) 混合物でパッケージングされた p C B 1 (「D O T A P / D O P E リポブラックス」) の電位 () の値を示す。電位測定は、0.5 x P B S (p H 7.4) 中で行われた。エラーバーは、n = 3 の場合の 95 % 信頼区間を表す (1.96)。

【 0 1 4 3 】

< 図 6 及び S - 16 (A) ~ (D) において Z s G r e e n 発現陽性の細胞の割合を求めるのに用いられた、代表的な前方散乱 - 側方散乱 (F S C - S S C) プロット図及び F L - 1 ヒストグラム >

20

図 18 は、Z s G r e e n 陰性細胞についての F S C - S S C プロット図 (A 及び C) 及び対応する F L - 1 ヒストグラム (それぞれ B 及び D) であり、(A) は細胞残屑を除外するためにゲーティングし、(C) はしていない。F L - 1 チャンネルの平均蛍光強度 (M F I) の値を、(B) 及び (D) に示す。(E) ~ (H) は、Z s G r e e n 陽性細胞についての F S C - S S C プロット図 (E 及び G) 及び対応する F L - 1 ヒストグラム (それぞれ F 及び H) であり、(E) は細胞残屑を除外するためにゲーティングし、(G) はしていない。(F) 及び (H) のゲートは、M F I 282、即ち Z s G r e e n 陰性細胞の M F I の 100 倍 (D 図参照) の細胞の割合に対応する。

30

【 0 1 4 4 】

< M C 40 ターゲティングペプチドの確認 >

図 19 は、M C 40 ターゲティングペプチドを P h . D . (商標) - 7 ファージディスプレイライブラリ (ニュー・イングランド・バイオラボ社、マサチューセッツ州イプスウィッチ) から選択するのに用いたプロセスを示す概念図である。1 x 10¹¹ p f u / m L のペプチドを、ヒト I g G の F c ドメインに融合された 100 n M の組み換えヒト M e t (r h M e t) と共に室温で 1 時間培養した。プロテイン A 又はプロテイン G でコーティングした磁性粒子を用いて M e t - ファージ複合体を親和性捕捉し、続いて T B S (50 m M の T r i s - H C l、150 m M の N a C l、p H 7.4) で 10 回洗浄して未結合のファージを除去した。結合したファージクローンは低 p H 緩衝液 (0.2 M グリシン、1 m g / m L の B S A、p H 2.2) で溶出し、溶出物を宿主細菌 (大腸菌 E R 2738) の感染によって増幅した。概念図に従って、次第に厳くなる条件を用いて 5 ラウンドの親和性選択を行った。M e t 濃度を 100 n M から 50 n M に、そして 10 n M に減らし、培養時間を 1 時間から 30 分に、そして 15 分に縮め、洗浄緩衝液に添加した T w e e n - 20 の濃度を 0 % (v / v) から 0.1 % に、そして 0.5 % に増やした。プロテイン A 及びプロテイン G に特異的なペプチドは、プロテイン A でコーティングした磁性粒子とプロテイン G でコーティングした磁性粒子との間で選択ラウンドを交互に行うことによって回避された。5 回の選択ラウンドの後に D N A を 40 個の別個のクローンから回収し、P h . D . (商標) - 7 キットに添付の 96 g I I I プライマーを用いて配列を決定した。M E T 受容体に対して最大の結合活性を有する配列は次の通り表される。

40

50

A S V H F P P (A l a - S e r - V a l - H i s - P h e - P r o - P r o) 配列番号 1
 T A T F W F Q (T h r - A l a - T h r - P h e - T r p - P h e - G l n) 配列番号 2
 T S P V A L L (T h r - S e r - P r o - V a l - A l a - L e u - L e u) 配列番号 3
 I P L K V H P (I l e - P r o - L e u - L y s - V a l - H i s - P r o) 配列番号 4
 W P R L T N M (T r p - P r o - A r g - L e u - T h r - A s n - M e t) 配列番号 5

10

【 0 1 4 5 】

< M C 4 0 ターゲティングペプチドの特徴 >

図 2 0 (A) は、5 回の選択ラウンド後のペプチド配列アラインメントを示す。主配列 A S V H F P P は以前に確認されていた M e t 特異的な 1 2 m e r の Y L F S V H W P P L K A (配列番号 1 8) の下線部分に相似である。標的に無関係の H A I Y P R H ペプチド (約 1 0 %) (配列番号 1 9) を提示するファージクローンは、配列アラインメントから除かれた。図 2 0 (B) 及び (C) は、親和性選択したファージクローンが r h M e t に結合した度合を示し、酵素結合免疫吸着剤法 (E L I S A) によって測定した。(B) に示す E L I S A のスキームは、材料及び方法の項で説明する。E L I S A の結果を (C) に示す。図 2 0 (D) は、M e t に結合しないペプチドを除去した後の配列アラインメントを示す。図 2 0 に示す共通配列はこのアラインメントから決定された。図 2 0 (E) 及び (F) は、(1) M e t に対する A l e x a F l u o r (登録商標) 4 8 8 標識モノクローナル抗体と、無関係なファージクローン (T P D W L F P) (配列番号 2 0) と、M 1 3 ファージに対する A l e x a F l u o r (登録商標) 5 4 6 標識モノクローナル抗体とに暴露された (青色のドット) 、又は (2) M e t に対する A l e x a F l u o r (登録商標) 4 8 8 標識モノクローナル抗体と、M C 4 0 クローンと、M 1 3 ファージに対する A l e x a F l u o r (登録商標) 5 4 6 標識モノクローナル抗体とに暴露された (橙色のドット) 、H e p 3 B (E) 及び肝細胞 (F) についてのフローサイトメトリーの散布図である。未処理細胞 (赤色のドット) を用いて、F L - 1 (A l e x a F l u o r (登録商標) 4 8 8 蛍光) 及び F L - 2 (A l e x a F l u o r (登録商標) 5 4 6 蛍光) のチャンネルについての電圧パラメータを設定した。

20

30

【 0 1 4 6 】

< H e p 3 B に暴露された M C 4 0 で標的を定められたプロトセルについての例示の結合曲線 >

図 8 A の解離定数を求めるために、 1×10^6 個の H e p 3 B 又は肝細胞をサイトカラシン D で前処理してエンドサイトーシスを抑制し、A l e x a F l u o r (登録商標) 6 4 7 で標識され M C 4 0 で標的を定められた種々の濃度のプロトセルと共に 3 7 °C で 1 時間培養した。フローサイトメトリーを用いて得られた細胞群の平均蛍光強度を測定し、プロトセル濃度に対してプロットして全体の結合曲線を得た。非特異的結合は、飽和濃度の非分類の肝細胞増殖因子の存在下において、A l e x a F l u o r (登録商標) 6 4 7 で標識され M C 4 0 で標的を定められたプロトセルと共に細胞を培養することによって求められた。特異的結合曲線は、非特異的結合曲線を全体の結合曲線から引くことによって得られた。 K_D 値は、特異的結合曲線から計算された。図 2 1 に示す実験において、プロトセルの S L B は 5 w t % の D O P E 、 3 0 w t % のコレステロール、及び 1 0 w t % の P E G - 2 0 0 0 (1 8 : 1) を含む D O P C からなり、0 . 0 1 5 w t % (約 6 ペプチド / 粒子) の M C 4 0 ターゲティングペプチドで修飾された。対応する K_D 値は $1.050 \pm 1.42 \text{ pM}$ である。全てのエラーバーは、 $n = 5$ の場合の 9 5 % 信頼区間を表す (1 . 9 6) 。

40

【 0 1 4 7 】

< M C 4 0 で標的を定められたプロトセルが受容体依存性エンドサイトーシスによって内

50

在化され、H 5 W Y G ペプチドの非存在下でリソソームへ誘導される >

図 2 2 (A) は、H e p 3 B 又は肝細胞の細胞のそれぞれによって 1 時間以内に 3 7 で内在化された、M C 4 0 で標的を定められたプロトセルの平均数を示す。1 × 1 0 ⁶ 個の細胞を飽和濃度 (1 0 0 μ g / m L) のヒト肝細胞増殖因子 (H G F) の非存在下 (-) 又は存在下 (+) において種々の濃度のプロトセルと共に培養し、Ashleyら、Nature Materials, 2011, May;10(5):389-97によって記載されるように、フローサイトメトリーを用いて各細胞に結合した粒子の平均数を求めた。プロトセルをN B D 及びp H r o d o (商標) で標識して、表面に結合した粒子を酸性細胞内区画に内在化されたものから区別した (それぞれについて) 。エラーバーは、n = 3 の場合の 9 5 % 信頼区間を表す (1 . 9 6) 。 (B) は、プロトセルと、 (1) R a b 5 、 (2) R a b 7 、 (3) リソソーム関連膜タンパク質 1 (L A M P - 1) 又は (4) R a b 1 1 a との間のピアソンの相関係数 (r 値) を示す。H e p 3 B 細胞を 1 0 0 0 倍の過剰量の A l e x a F l u o r (登録商標) 5 9 4 標識プロトセルと共に 3 7 で 1 時間培養した後、固定して透過処理し、R a b 5 、 R a b 7 、 L A M P - 1 、 又は R a b 1 1 a に対して A l e x a F l u o r (登録商標) 4 8 8 標識抗体と共に培養した。S l i d e B o o k ソフトウェアを用いて r 値を求めた。r 値は、n = 3 × 5 0 細胞の平均値 ± 標準偏差として表される。r 値計算の際に細胞境界の外のピクセルを無視できるように、微分干渉 (D I C) 画像を用いて H e p 3 B 細胞の境界線を定めた。プロトセルの S L B は、5 w t % の D O P E 、 3 0 w t % コレステロール、及び 1 0 w t % の P E G - 2 0 0 0 (1 8 : 1) を含む D O P C からなり、0 . 0 1 5 w t % の M C 4 0 及び 0 . 5 0 0 w t % の H 5 W Y G で修飾された。

【 0 1 4 8 】

< ヒストンでパッケージングされた p C B 1 が N L S で修飾され、M C 4 0 で標的を定められたプロトセルによって送達された場合に、H C C 細胞の核内で時間に依存して濃縮される >

図 2 3 (A) ~ (C) は、M C 4 0 で標的を定められ、p C B 1 が装填された 1 0 0 0 倍の過剰量のプロトセルに 3 7 で 1 5 分 (A) 、 1 2 時間 (B) 、 又は 2 4 時間 (C) 暴露された H e p 3 B 細胞の共焦点蛍光顕微鏡法画像である。 (B) については、プロトセルのエンドソーム脱出及び p C B 1 の細胞質ゾル内分散は、約 2 時間後までには明白であった。しかし、Z s G r e e n 発現は 1 2 ~ 1 6 時間まで検出可能でなかった。2 4 時間の時点で、C y 5 標識 p C B 1 は細胞内全体に分布したままであった。一方、 (C) において細胞質ゾルの染色が見えないのは、核内に局在したピクセルの飽和を回避するために C y 5 チャンネルのゲインを下げたせいである。シリカコアは A l e x a F l u o r (登録商標) 5 9 4 で標識され (赤色) 、 p C B 1 は C y 5 で標識され (白色) 、細胞核はヘキスト 3 3 3 4 2 で対比染色された (青色) 。スケールバー = 2 0 μ m 。図 2 3 (D) は、C y 5 で標識した p C B 1 及びヘキスト 3 3 3 4 2 で標識した H e p 3 B の核についての、時間に対するピアソンの相関係数 (r 値) を示す。S l i d e B o o k ソフトウェアを用いて r 値を求めた。r 値は、n = 3 × 5 0 個の細胞の平均値 ± 標準偏差として表される。r 値計算の際に細胞境界の外のピクセルを無視できるように、微分干渉 (D I C) 画像を用いて H e p 3 B 細胞の境界線を定めた。プロトセルの S L B は、5 w t % の D O P E 、 3 0 w t % コレステロール、及び 1 0 w t % の P E G - 2 0 0 0 (1 8 : 1) を含む D O P C からなり、0 . 0 1 5 w t % の M C 4 0 及び 0 . 5 0 0 w t % の H 5 W Y G で修飾された。

【 0 1 4 9 】

< ヒストンでパッケージングされた p C B 1 は、N L S で修飾され、M C 4 0 で標的を定められたプロトセルによって送達された場合に、分裂中及び非分裂中の H C C 細胞の両方をほぼ 1 0 0 % の効率で選択的にトランスフェクションする >

図 2 4 (A) 、 (C) 及び (E) は、M C 4 0 で標的を定められ、p C B 1 が装填された 1 0 0 0 倍の過剰量のプロトセルに 3 7 で 2 4 時間暴露された H e p 3 B 細胞の共焦点蛍光顕微鏡法画像である。H e p 3 B 細胞は、 (A) では分裂中であり、 (C) 及び (E) では約 9 5 % コンフルエントであった。全ての画像において p C B 1 はヒストンで予

めパッケージングされており、(E)において、pCB1-ヒストン複合体はNLSで更に修飾された。シリカコアはAlexaFluor(登録商標)594で標識され(赤色)、pCB1はCy5で標識され(白色)、細胞核はヘキスト33342で対比染色された(青色)。スケールバー=20 μ m。図24(B)、(D)及び(F)は、MC40で標的を定められ、pCB1が装填されたプロトセル(「PC」)1 \times 10⁹個に37で24時間連続して暴露された際に、ZsGreen発現陽性になる1 \times 10⁶個のHep3B及び肝細胞の割合を示す。細胞は(B)では分裂中であり、(D)及び(F)では約95%コンフルエントであった。x軸は、CB1プラスミド(「pCB1」)及びpCB1-ヒストン複合体(「複合体」)がNLSで修飾されていたか否かを示す。pCB1単独に加えて、DOTAPとDOPEとの1:1(w/w)混合物でパッケージングされたpCB1も対照として用いられた。細胞を20mg/mLの小麦胚芽アグルチニン(WGA)に暴露し、核膜孔複合体を経るNLS修飾したpCB1の移行を遮断した。エラーバーは、n=3の場合の95%信頼区間を表す(1.96)。図24(G)~(I)は、それぞれ図(A)、(C)、及び(E)で用いた細胞の細胞周期のヒストグラムである。G₀/G₁期の細胞の割合を各ヒストグラムについて示す。全ての実験において、プロトセルのSLBは5wt%のDOPE、30wt%コレステロール、及び10wt%のPEG-2000(18:1)を含むDOPCからなり、0.015wt%のMC40及び0.500wt%のH5WYGで修飾された。

【0150】

図25は、MC40で標的を定められ、pCB1が装填されたプロトセルに37で1時間又は72時間暴露されたHep3B(A)及び肝細胞(B)の共焦点蛍光顕微鏡法画像を示す。pCB1濃度は、全ての実験において5pMに維持された。(B)の矢印は、有糸分裂細胞を示す。サイクリンB1はAlexaFluor(登録商標)594標識モノクローナル抗体で標識され(赤色)、細胞核はヘキスト33342で染色された(青色)。プロトセルのSLBは、5wt%のDOPE、30wt%のコレステロール、及び10wt%のPEG-2000(18:1)を含むDOPCからなり、0.015wt%のMC40及び0.500wt%のH5WYGで修飾された。全てのスケールバー=20 μ m。

【0151】

図26は、MC40で標的を定められ、pCB1が装填されたプロトセルに37で1時間又は72時間暴露されたHep3B(A)及び肝細胞(B)の共焦点蛍光顕微鏡法画像を示す。pCB1濃度は、全ての実験において5pMに維持された。細胞をAlexaFluor(登録商標)647標識アネキシンV(白色)及びヨウ化プロビジウム(赤色)で染色し、それぞれ初期及び後期のアポトーシスを試験した。細胞核はヘキスト33342で対比染色された(青色)。プロトセルのSLBは、5wt%のDOPE、30wt%のコレステロール、及び10wt%のPEG-2000(18:1)を含むDOPCからなり、0.015wt%のMC40及び0.500wt%のH5WYGで修飾された。全てのスケールバー=20 μ m。

【0152】

<双性イオン性脂質からなるSLBを有するプロトセルは、ごく低い非特異的細胞毒性しか誘導しない>

添付の図27は、1 \times 10⁹個のAPTES修飾メソ多孔性のシリカナノ粒子、APTES修飾コアを有するDOPCプロトセル、スクランブルshRNA配列をコードするプラスミド(「スクランブルpCB1」)が装填されたDOPCプロトセル、又はスクランブルpCB1が装填されたDOTAP/DOPE(1:1w/w)リポプレックスに37

で48時間連続して暴露した際に、アポトーシス性になる1 \times 10⁶個のHep3Bの割合を示す。プロトセル及びリポプレックスは、10wt%のPEG-2000、0.015wt%のMC40、及び0.500wt%のH5WYGで修飾された。正荷電及び負荷電のポリスチレンナノ粒子(それぞれ「アミン-PS」及び「カルボキシル-PS」)を正の対照として用い、一方で10mMの抗酸化剤N-アセチルシステイン(NAC)又

10

20

30

40

50

は 1 p m o l の遊離した p C B 1 に暴露された H e p 3 B を負の対照として用いた。全てのエラーバーは、n = 3 の場合の 9 5 % 信頼区間を表す (1 . 9 6) 。

【 0 1 5 3 】

本明細書に開示する全参考文献は、適宜引用により援用される。

【 0 1 5 4 】

参考文献

- 1 Carroll, N. J., Pylypenko, S., Atanassov, P. B. & Petsev, D. N. Microparticles with Bimodal Nanoporosity Derived by Microemulsion Templating. *Langmuir*, doi: 10.1021/la900988j (2009).
- 2 Lu, Y. F. $\bar{\Delta}$ Aerosol-assisted self-assembly of mesostructured spherical nanoparticles. *Nature* 398, 223-226 (1999). 10
- 3 Iler, R. K. *The Chemistry of Silica: Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties, and Biochemistry*. (John Wiley and Sons, 1979).
- 4 Doshi, D. A. $\bar{\Delta}$ Neutron Reflectivity Study of Lipid Membranes Assembled on Ordered Nanocomposite and Nanoporous Silica Thin Films. *Langmuir* 21, 2865-2870, doi: 10.1021/la0471240 (2005).
- 5 Bernhard, M. I. $\bar{\Delta}$ Guinea Pig Line 10 Hepatocarcinoma Model: Characterization of Monoclonal Antibody and in Vivo Effect of Unconjugated Antibody and Antibody Conjugated to Diphtheria Toxin A Chain. *Cancer Research* 43, 4420-4428 (1983).
- 6 Lo, A., Lin, C. T. & Wu, H. C. Hepatocellular carcinoma cell-specific peptide ligand for targeted drug delivery. *Molecular Cancer Therapeutics* 7, 579-589, doi: 10.1158/1535-7163.mct-07-2359 (2008). 20
- 7 Sciote, R. $\bar{\Delta}$ Transferrin receptor expression in human hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study of 34 cases. *Histopathology* 12, 53-63 (1988).
- 8 Kannangai, R., Sahin, F. & Torbenson, M. S. EGFR is phosphorylated at Ty845 in hepatocellular carcinoma. *Mod Pathol* 19, 1456-1461 (2006).
- 9 Behr, J. P. The Proton Sponge: a Trick to Enter Cells the Viruses Did Not Exploit. *CHIMIA International Journal for Chemistry* 51, 34-36 (1997).
- 10 Jiang, W., KimBetty, Y. S., Rutka, J. T. & ChanWarren, C. W. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nat Nano* 3, 145-150 (2008). 30
- 11 Zimmermann, R. $\bar{\Delta}$ Charging and structure of zwitterionic supported bilayer lipid membranes studied by streaming current measurements, fluorescence microscopy, and attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy. *Bio interfaces* 4, 1-6 (2009).
- 12 Ashihara, E., Kawata, E. & Maekawa, T. Future Prospect of RNA Interference for Cancer Therapies. *Current Drug Targets* 11, 345-360 (2010).
- 13 Pawitan, J. A. The possible use of RNA interference in diagnosis and treatment of various diseases. *International Journal of Clinical Practice* 63, 1378-1385 (2009).
- 14 Elbashir, S. M. $\bar{\Delta}$ Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498 (2001). 40
- 15 Davis, M. E. $\bar{\Delta}$ Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature advance online publication* (2010).
- 16 Oh, Y.-K. & Park, T. G. siRNA delivery systems for cancer treatment. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61, 850-862 (2009).
- 17 Sou, K., Endo, T., Takeoka, S. & Tsuchida, E. Poly(ethylene glycol)-Modification of the Phospholipid Vesicles by Using the Spontaneous Incorporation of Poly(ethylene glycol)-Lipid into the Vesicles. *Bioconjugate Chemistry* 11, 372-379, doi: 10.1021/bc990135y (2000).
- 18 Klein, E. $\bar{\Delta}$ "HFP" Fluorinated Cationic Lipids for Enhanced Lipoplex Stabil 50

ity and Gene Delivery. *Bioconjugate Chemistry* 21, 360-371, doi: 10.1021/bc900469z (2010).

19 Minguez, B., Tovar, V., Chiang, D., Villanueva, A. & Llovet, J. M. Pathogenesis of hepatocellular carcinoma and molecular therapies. *Current Opinion in Gastroenterology* 25, 186-194 110.1097/MOG.1090b1013e32832962a32832961 (2009).

20 Li, S.-D., Chen, Y.-C., Hackett, M. J. & Huang, L. Tumor-targeted Delivery of siRNA by Self-assembled Nanoparticles. *Mol Ther* 16, 163-169, doi:http://www.nature.com/mt/journal/v16/n1/suppinfb/6300323s1.html (2007).

21 Landen, C. N. & Therapeutic EphA2 Gene Targeting In vivo Using Neutral Liposomal Small Interfering RNA Delivery. *Cancer Research* 65, 6910-6918 (2005).

22 Honjo, T., Nishizuka, Y., Hayaishi, O. & Kato, I. Diphtheria Toxin-dependent Adenosine Diphosphate Ribosylation of Aminoacyl Transferase II and Inhibition of Protein Synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 243, 3553-3555 (1968).

23 Uchida, T., Kim, J. H., Yamaizumi, M., Miyake, Y. & Okada, Y. Reconstitution of lipid vesicles associated with HVJ (Sendai virus) spikes. Purification and some properties of vesicles containing non-toxic fragment A of diphtheria toxin. *Journal of Cell Biology* 80, 10-20 (1979).

24 Mizuguchi, H. & Application of fusogenic liposomes containing fragment A of diphtheria toxin to cancer therapy. *British Journal of Cancer* 73, 472-476 (1997).

25 Liu, J. W., Jiang, X. M., Ashley, C. & Brinker, C. J. Electrostatically Mediated Liposome Fusion and Lipid Exchange with a Nanoparticle-Supported Bilayer for Control of Surface Charge, Drug Containment, and Delivery. *Journal of the American Chemical Society* 131, 7567-+, doi: 10.1021/ja902039y (2009).

26 Liu, J. W., Stace-Naughton, A. & Brinker, C. J. Silica nanoparticle supported lipid bilayers for gene delivery. *Chemical Communications*, 5100-5102, doi: 10.1039/b911472f (2009).

27 Liu, J. W., Stace-Naughton, A., Jiang, X. M. & Brinker, C. J. Porous Nanoparticle Supported Lipid Bilayers (Protocells) as Delivery Vehicles. *Journal of the American Chemical Society* 131, 1354-+, doi: 10.1021/ja808018y (2009).

28 Schagger, H. Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Protocols* 1, 16-22 (2006).

29 Fritze, A., Hens, F., Kimpfler, A., Schubert, R. & Peschka-Suss, R. Remote loading of doxorubicin into liposomes driven by a transmembrane phosphate gradient. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1758, 1633- 1640 (2006).

30 Elorza, B., Elorza, M. A., Frutos, G. & Chantres, J. R. Characterization of 5-fluorouracil loaded liposomes prepared by reverse-phase evaporation or freezing-thawing extrusion methods: study of drug release. *Biochimica et Biophysica Acta* 1153, 135-142 (1993).

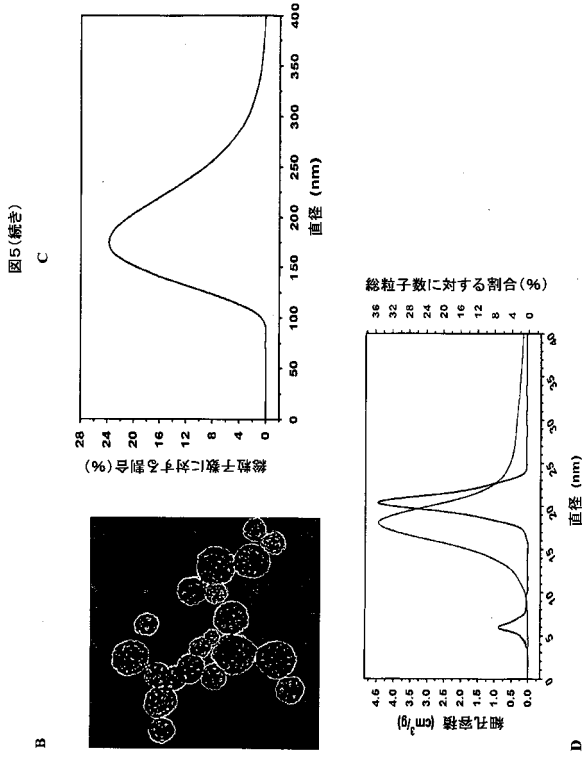
31 Peleg-Shulman, T., Gibson, D., Cohen, R., Abra, R. & Barenholz, Y. Characterization of sterically stabilized cisplatin liposomes by nuclear magnetic resonance. *Biochimica et Biophysica Acta* 1510, 278-291 (2001).

32 Bogush, T., Smirnova, G., Shubina, L., Syrkin, A. & Robert, J. Direct evaluation of intracellular accumulation of free and polymer-bound anthracyclines. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 35, 501-505, doi: 10.1007/BF00686835 (1995).

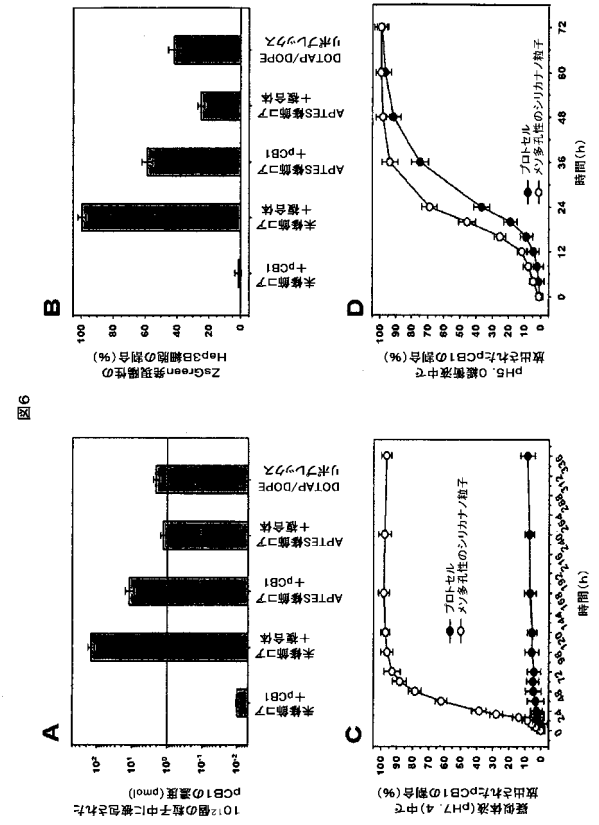
33 Tong, A. W. & Chemosensitization of human hepatocellular carcinoma cells with cyclosporin A in post-liver transplant patient plasma. *Clin. Cancer Res.* 2, 531-539 (1996).

34 Minko, T., Kopeckova, P. & Kopecek, J. Chronic exposure to HPMA copolymer-bound adriamycin does not induce multidrug resistance in a human ovarian carcinoma cell line. *Journal of Controlled Release* 59, 133-148 (1999).

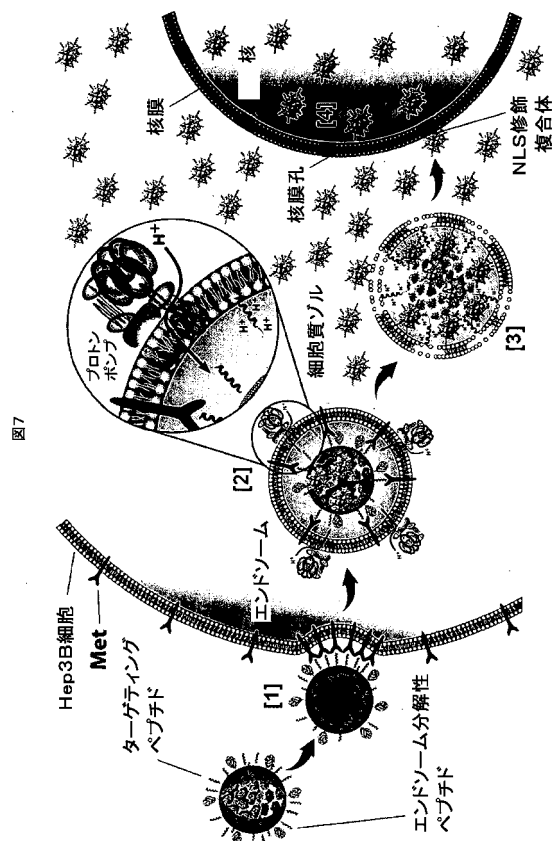
【図5(3)】



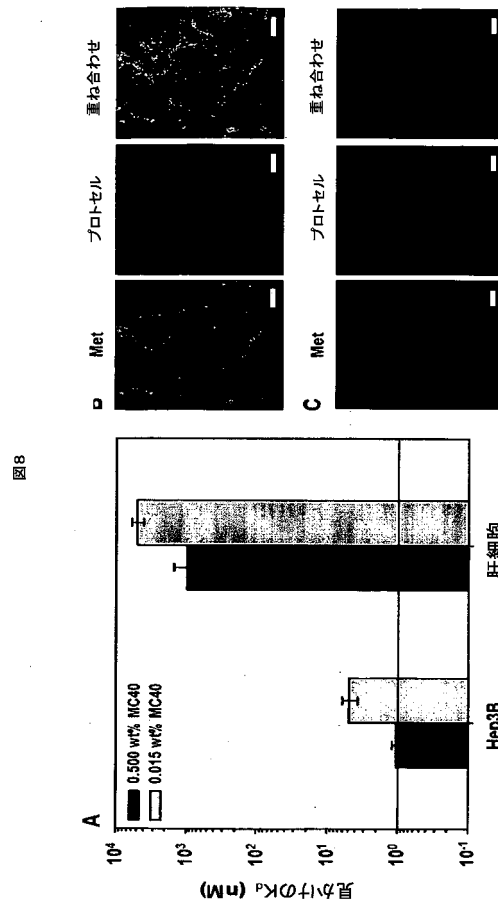
【図6】



【図7】



【図8】



【図 9】

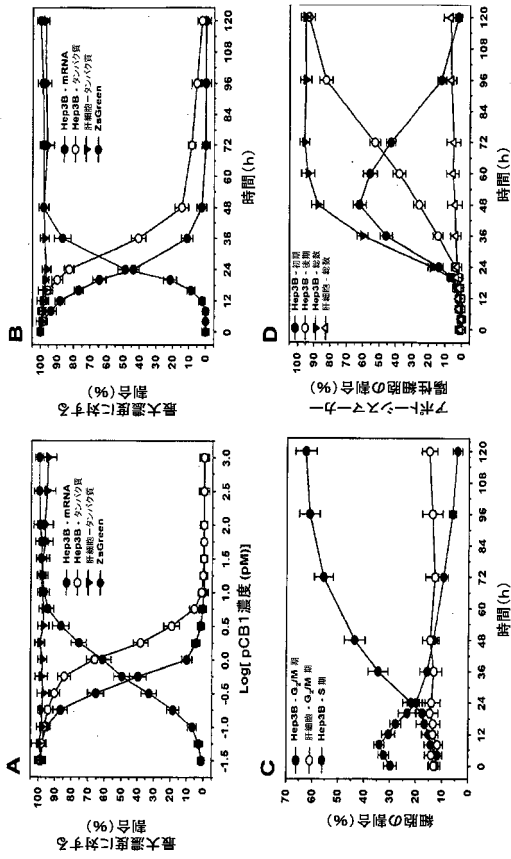


図9

【図 11 (1)】

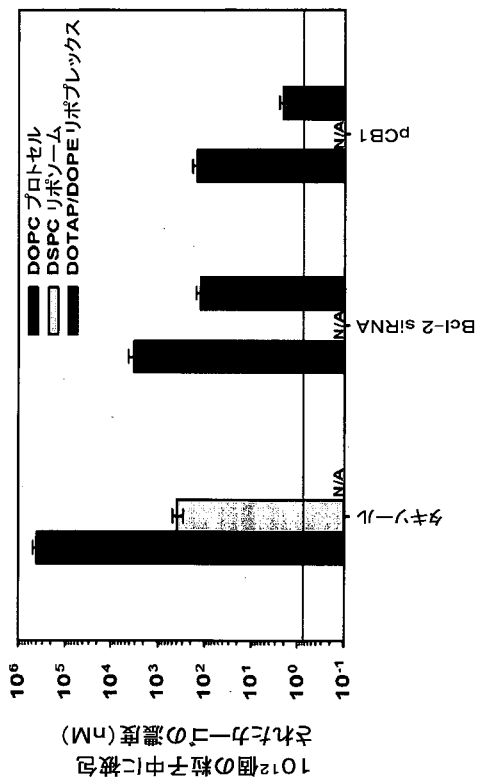


図11

【図 10】

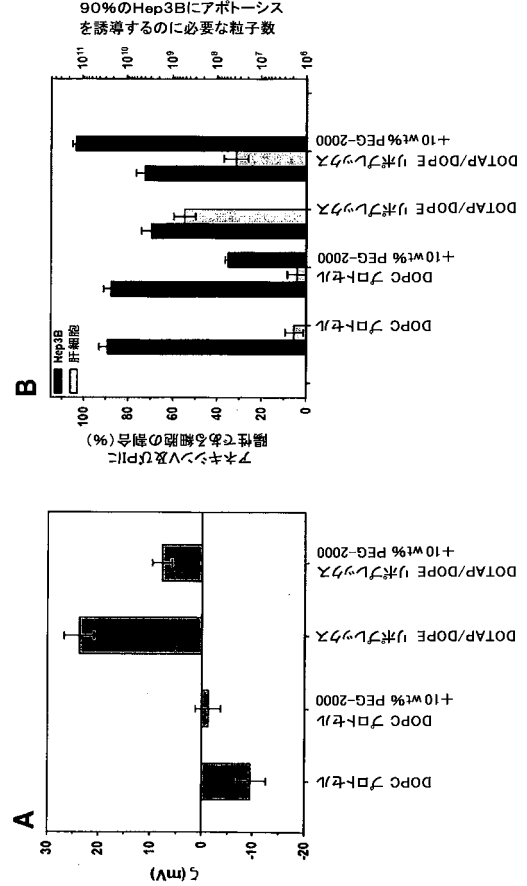


図10

【図 11 (2)】

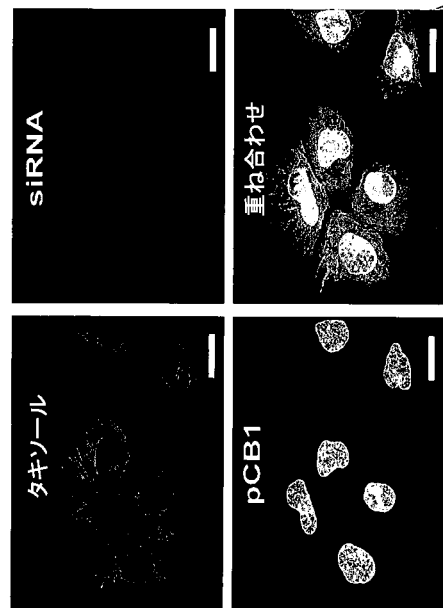
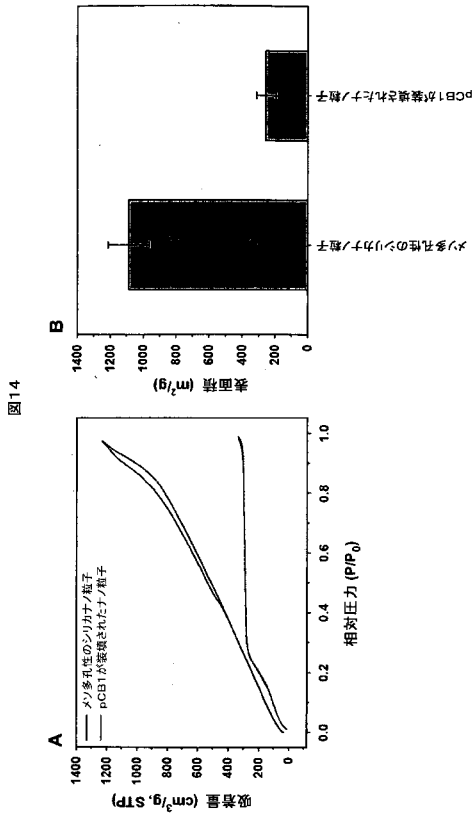
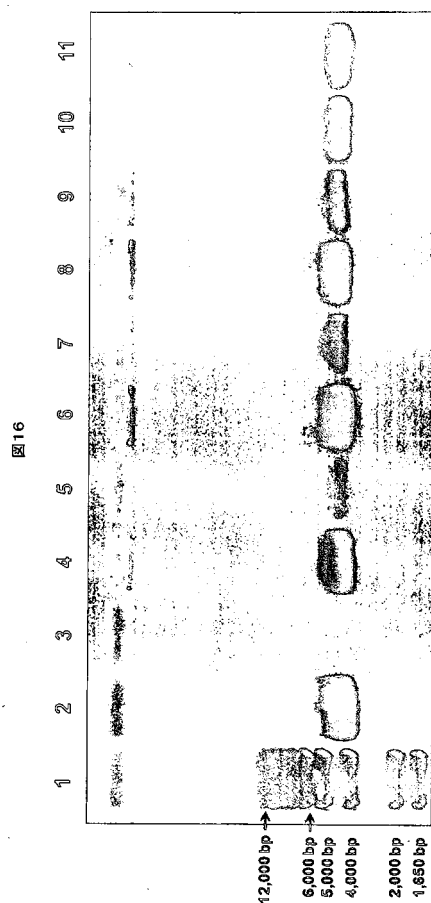


図11 (続き)

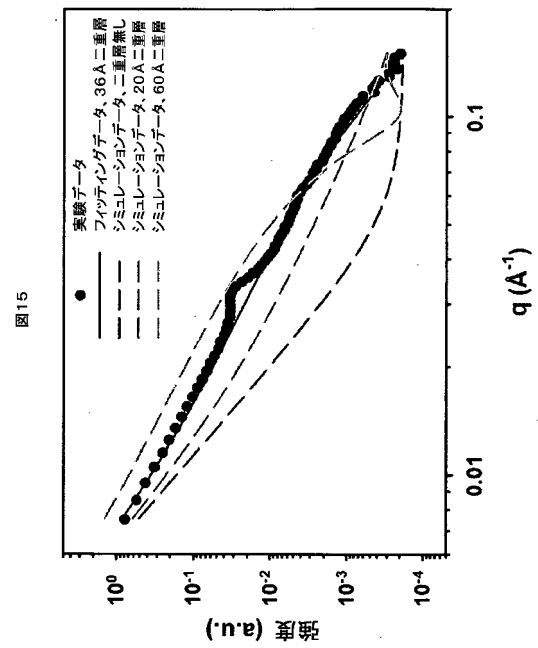
【図 14】



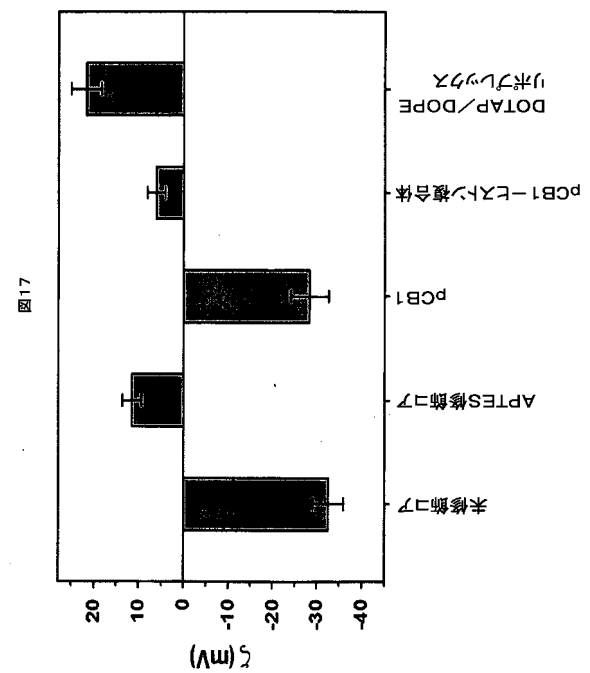
【図 16】



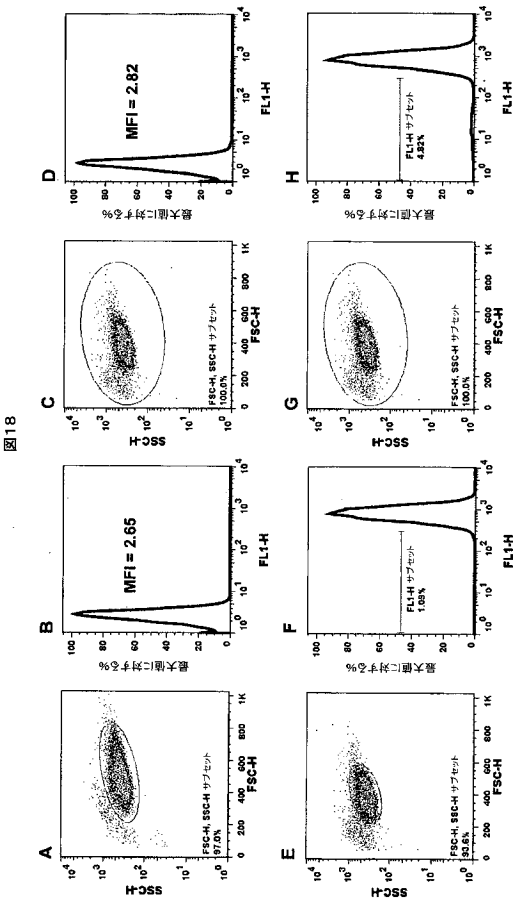
【図 15】



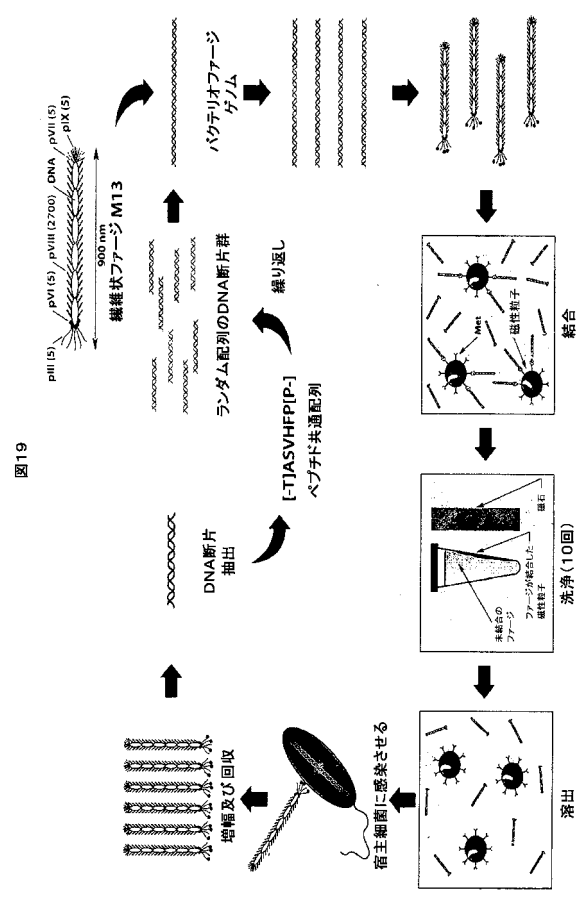
【図 17】



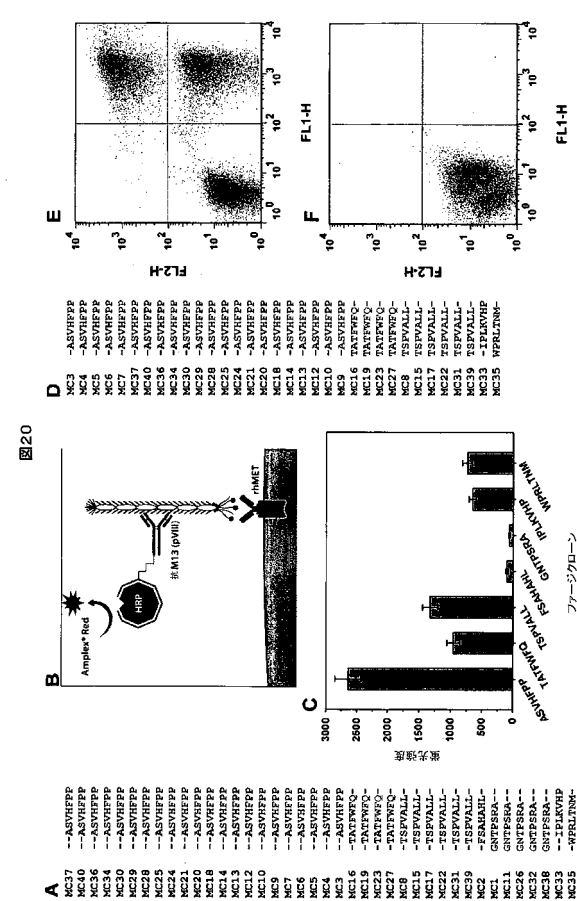
【 図 1 8 】



【 図 1 9 】



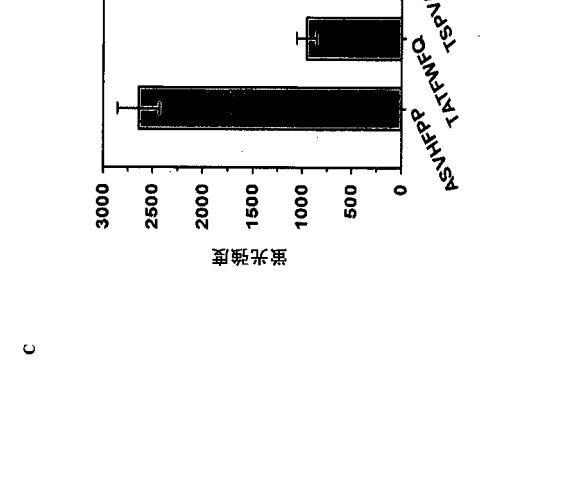
【 図 2 0 (1) 】



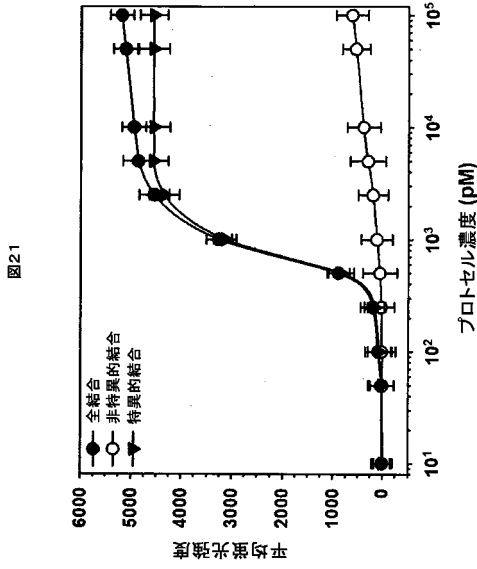
【 図 2 0 (2) 】



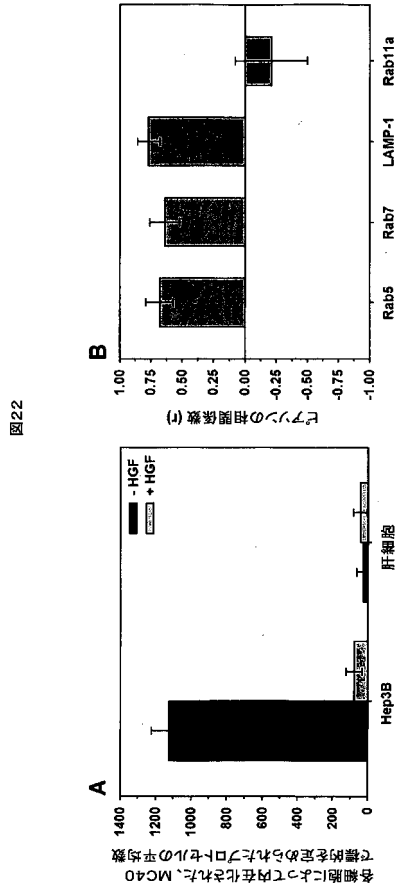
図20(続き)



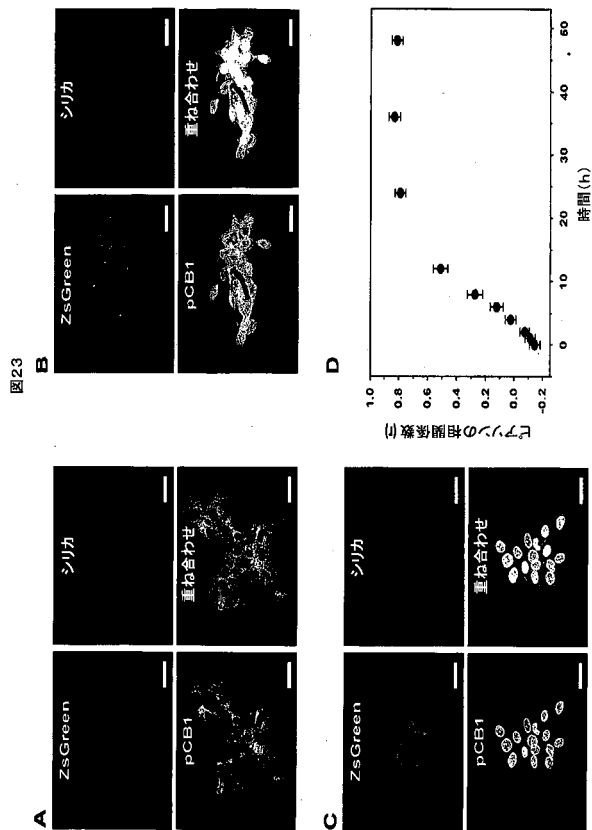
【図 2 1】



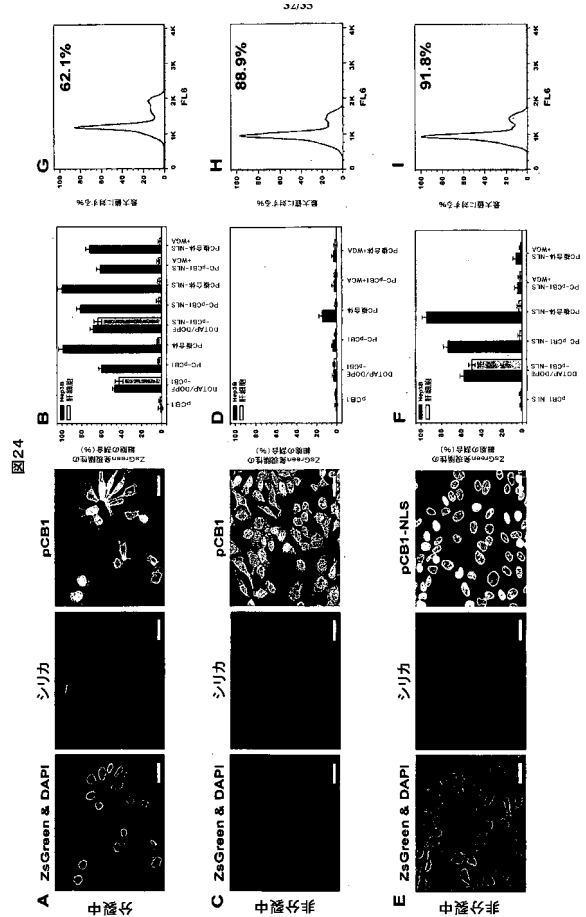
【図 2 2】



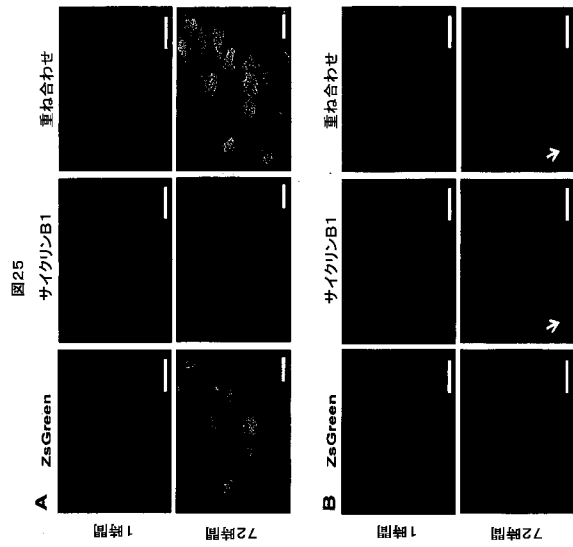
【図 2 3】



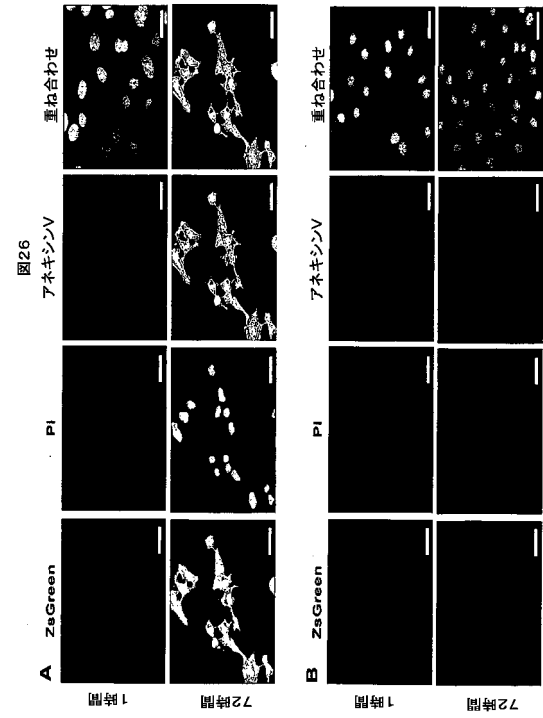
【図 2 4】



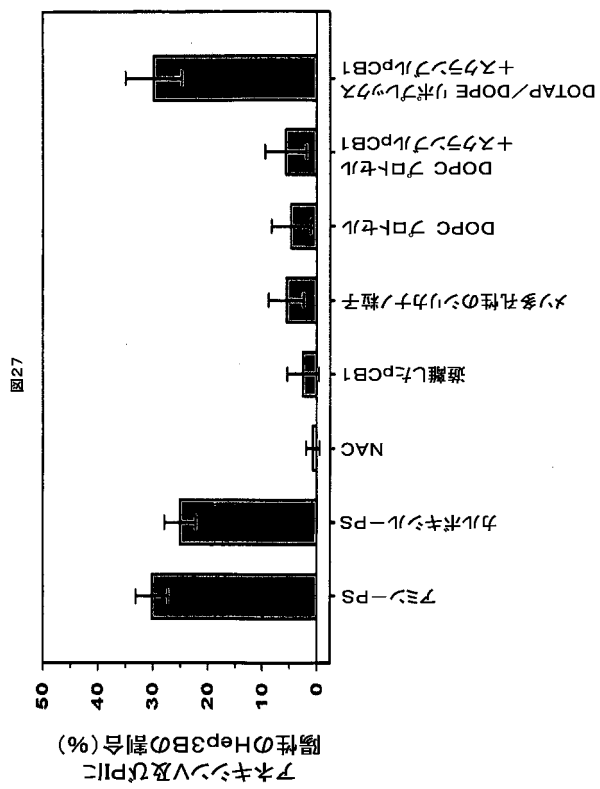
【図 25】





【図 26】



【図 27】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2012/035529
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>A61K 9/16(2006.01)i, A61K 47/48(2006.01)i, A61K 47/30(2006.01)i, A61K 38/17(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 9/16; A61K 9/22; B32B 9/00; A61K 9/20; B05D 1/18		
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: porous protocell, nanoporous, mesoporous, silica, metal oxide, lipid bilayer, cell targeting, fusogenic peptide, double stranded linear DNA, plasmid DNA, drug, imaging agent, siRNA, shRNA, miRNA, nuclear localization sequence (NLS)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	C. E. ASHLEY et al., "The targeted delivery of multicomponent cargos to cancer cells by nanoporous particle-supported lipid bilayers", Nature Materials, Vol. 10, pp. 389-397, 17 April 2011 (published online) See abstract, lines 2-5, 11-13 in left-handed column in p. 390, line 21 in right-handed column in p. 392 - line 7 in left-handed column in p. 393, and Figures 1, 3.	1-6, 72-75
A		39-41, 69-71
X	J. LIU et al., "Porous nanoparticle supported lipid bilayers (Protocells) as delivery vehicles", Journal of American Chemical Society, Vol. 131, pp. 1354-1355, 01 December 2009 (published on web) See Figure 1.	1-6
A		39-41, 69-75
X	WO 2010-078569 A2 (STC. UNM) 08 July 2010 See paragraph [0019] and claims 1, 3, 5, 7.	1-6
A		39-41, 69-75
A	J. M. ROSENHOLM et al., "Towards multifunctional, targeted drug delivery systems using mesoporous silica nanoparticles - opportunities & challenges", Nanoscale, Vol. 2, pp. 1870-1883, 23 August 2010 See lines 3-11 in right-handed column in p. 1873 and Figure 2.	1-6, 39-41, 69-75
<input checked="" 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: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 OCTOBER 2012 (23.10.2012)		Date of mailing of the international search report 23 OCTOBER 2012 (23.10.2012)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsu-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

International application No.

PCT/US2012/035529

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	M. POROTTO et al., "Synthetic protocells interact with viral nanomachinery and inactivate pathogenic human virus", Plos One, Vol. 6, Issue 3, pp. 1-9, 01 March 2011 See lines 12-16, 29-32 in left-handed column in p. 2.	1-6,39-41,69-75
A	US 2008-0160313 A1 (G. LOPEZ et al.) 03 July 2008 See claims 1, 3, 5.	1-6,39-41,69-75

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2012/035529

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.: 77-90
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 77-90 are directed to a treatment method (claims 77-88) of the human body by therapy or a diagnostic method (claims 89 and 90) under Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT.
2. ☒ Claims Nos.: See below
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 14, 16-18, 20, 22, 23, 26, 27, 29, 32, 36, 38, 43, 44, 46, 49, 50, 53-57, 59, 61, 63-65, 67, 80, 83, 86 and 88 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.: See Box. VII in WOISA
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

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2012/035529

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010-078569 A2	08.07.2010	US 2011-268791 A1 WO 2010-078569 A3	03.11.2011 18.11.2010
US 2008-0160313 A1	03.07.2008	None	

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 47/34 (2006.01)	A 6 1 K 47/34
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088
A 6 1 K 31/436 (2006.01)	A 6 1 K 31/436
A 6 1 K 31/506 (2006.01)	A 6 1 K 31/506
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 31/18
A 6 1 P 31/20 (2006.01)	A 6 1 P 31/20
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 P 31/14
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 K 31/44 (2006.01)	A 6 1 K 31/44
A 6 1 K 31/404 (2006.01)	A 6 1 K 31/404
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395
A 6 1 K 31/517 (2006.01)	A 6 1 K 31/517
A 6 1 K 31/513 (2006.01)	A 6 1 K 31/513
A 6 1 K 31/522 (2006.01)	A 6 1 K 31/522
A 6 1 K 31/675 (2006.01)	A 6 1 K 31/675
A 6 1 K 31/7072 (2006.01)	A 6 1 K 31/7072
A 6 1 K 47/04 (2006.01)	A 6 1 K 47/04

T

(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,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,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,ID,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

(72)発明者 ブリンカー, ジェフリー, シー.

アメリカ合衆国 ニュー メキシコ 8 7 1 2 2, アルバカーキ, イーグル ネスト ドライブ エヌイー 1 4

(72)発明者 カーンズ, エリック, シー.

アメリカ合衆国 ニュー メキシコ 8 7 1 2 3, アルバカーキ, チャコ クリフ トレイル エスイー 1 3 3 0 9

(72)発明者 アシュレイ, カーリー, エリン

アメリカ合衆国 ニュー メキシコ 8 7 1 2 3, アルバカーキ, バウアー ロード エヌイー 1 4 3 1 6

F ターム(参考) 4C076 AA19 AA31 BB13 BB15 BB16 BB21 BB31 CC27 CC35 DD29A

DD29M DD63F DD70F EE23 FF16 FF31 FF43

4C084 AA02 AA20 AA22 BA01 BA44 BA47 CA53 MA02 MA24 MA56

MA63 MA66 NA05 NA14 ZB262 ZB332

4C085 AA14 CC23 EE03 GG02 GG03 GG04 GG05 GG06

4C086 AA01 AA02 BC13 BC17 BC42 BC46 BC50 CB07 CB22 DA38

EA16 EA17 GA02 GA05 GA07 GA08 GA12 GA16 MA02 MA04

MA24 MA56 MA63 MA66 NA05 NA14 ZB26 ZB33