

(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2016-529284

(P2016-529284A)

(43) 公表日 平成28年9月23日(2016.9.23)

| (51) Int.Cl. | F 1 | テーマコード (参考) |
|------------------------------|---------------|-------------|
| A61K 9/127 (2006.01) | A 61 K 9/127 | 4 C 076 |
| A61K 45/00 (2006.01) | A 61 K 45/00 | 4 C 084 |
| A61K 31/502 (2006.01) | A 61 K 31/502 | 4 C 086 |
| A61P 35/00 (2006.01) | A 61 P 35/00 | 4 C 206 |
| A61P 43/00 (2006.01) | A 61 P 43/00 | 1 2 1 |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 38 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願2016-537829 (P2016-537829) | (71) 出願人 | 592233750 ノースイースタン ユニバーシティ アメリカ合衆国 021115 マサチューセッツ州 ボストン、 ハンティングトン アベニュー 360 |
| (86) (22) 出願日 | 平成26年8月27日 (2014.8.27) | (74) 代理人 | 100062225 弁理士 秋元 輝雄 |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成28年4月21日 (2016.4.21) | (74) 代理人 | 100186060 弁理士 吉澤 大輔 |
| (86) 國際出願番号 | PCT/US2014/053006 | (72) 発明者 | タングテューリ, シャファリカ アメリカ合衆国 02148 マサチューセッツ州 モールデン、アパートメント 307、ワシントン ストリート 19 |
| (87) 國際公開番号 | W02015/031536 | | |
| (87) 國際公開日 | 平成27年3月5日 (2015.3.5) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 61/870, 258 | | |
| (32) 優先日 | 平成25年8月27日 (2013.8.27) | | |
| (33) 優先権主張国 | 米国(US) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ナノ粒子薬物デリバリシステムおよび、癌および神経外傷の治療方法

(57) 【要約】

【課題】本発明は、ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ(PARP)酵素の阻害剤の医薬製剤を提供する。

【解決手段】本発明に係る前記医薬製剤は、癌の治療および予防、ならびに神経外傷および神経変性疾患の治療に用いることができる。PARP阻害剤は、癌細胞または他の細胞および細胞内の阻害剤の放出へ阻害剤を効率的にデリバリし、それはナノ粒子の形体で実行される。癌の治療においては、腫瘍細胞の殺傷をもたらすのに対し、神経外傷および神経変性疾患の治療においては、細胞機能を保存する。

【選択図】図1A

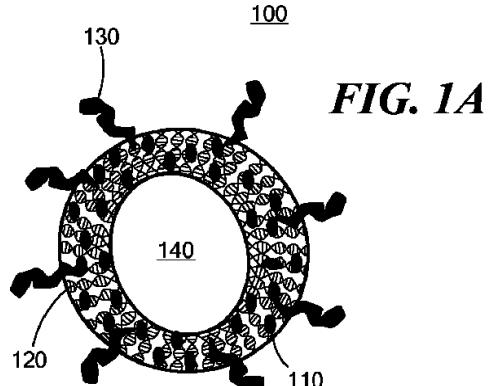


FIG. 1A

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ(PARP)酵素の阻害剤のナノ粒子製剤であって、前記製剤は、水性媒体中の脂質ベシクルの懸濁物からなり、脂質ベシクルは、正の表面電荷を有し、平均粒径が50nm～200nmであり、PARP阻害剤を含有し、PEGを結合させた脂質モイエティからなる。

【請求項 2】

前記脂質ベシクルが、約80nm～120nmの直径を有する請求項1のナノ粒子製剤。

【請求項 3】

前記脂質ベシクルが、約100nmの直径を有する請求項2のナノ粒子製剤。

【請求項 4】

PARP阻害剤が、オラパリブ、ヴェリパリブ、ルカパリブ、イニパリブ、BNM-673、3-アミノベンズアミド、ME0328、PJ34HCl、AG-14361、INO-1001、UPF-1069、AZD-2461およびA-966492からなる群から選ばれる、請求項1のナノ粒子製剤。

【請求項 5】

PARP阻害剤が、オラパリブである、請求項4のナノ粒子製剤。

【請求項 6】

前記脂質ベシクル内のオラパリブの効果的濃度が約400μM(ミクロモーラー)～約20mM(ミリモーラー)の範囲にある、請求項5のナノ粒子製剤。

【請求項 7】

PARP阻害剤がBNM-673である、請求項4のナノ粒子製剤。

【請求項 8】

前記脂質ベシクル内のBNM-673の効果的濃度が約50nM(ナノモーラー)～約1μM(ミクロモーラー)の範囲にある、請求項7のナノ粒子製剤。

【請求項 9】

前記脂質ベシクル内に追加の医薬品を含む、請求項1のナノ粒子製剤。

【請求項 10】

前記追加の医薬品が、シスプラチン、テモゾロミド、ゲムシタビン、ドキソルビシン、PI3K阻害剤、MEK阻害剤、ATM阻害剤、またはその他の抗癌剤である、請求項9のナノ粒子製剤。

【請求項 11】

前記脂質ベシクルが、pH7.4において正荷電する脂質からなる、請求項1のナノ粒子製剤。

【請求項 12】

前記正荷電脂質が、N-[1-(2,3-ジオレオイロキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムメチル硫酸塩(DOTAP)である、請求項11のナノ粒子製剤。

【請求項 13】

前記脂質ベシクルの表面電位が、pH7.4において約+15mV～+40mVである、請求項1のナノ粒子製剤。

【請求項 14】

PEG化した脂質が1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[アミノ(ポリエチレングリコール)](DSPE-PEG)である、請求項1のナノ粒子製剤。

【請求項 15】

PEG化した脂質が、DSPE-PEG2000である、請求項14のナノ粒子製剤。

【請求項 16】

前記脂質ベシクルが、ジバルミトイルホスファチジルクロリン(DPPC)およびコレステロールからなる、請求項1のナノ粒子製剤。

10

20

30

40

50

【請求項 17】

DPPC：コレステロールのモル比が約1：7～1：4である、請求項16のナノ粒子製剤。

【請求項 18】

前記脂質ベシクルが、DPPC、DOTAP、コレステロール、およびDSP-E-P EG2000を含む、請求項1のナノ粒子製剤。

【請求項 19】

前記脂質ベシクル二層膜が本質的にDPPC、DOTAP、コレステロール、およびDSP-E-P EG2000を含む、請求項18のナノ粒子製剤。

【請求項 20】

DPPC、DOTAP、コレステロール、およびDSP-E-P EG2000のモル比が、約1～8モルのDPPC：0.05～1モルのDOTAP：約0.5～2モルのコレステロール：0.1～5モルのDSP-E-P EG2000である、請求項18のナノ粒子製剤。

【請求項 21】

DPPC、DOTAP、コレステロール、およびDSP-E-P EG2000のモル比が、約5.4モルのDPPC：0.25モルのDOTAP：約0.78モルのコレステロール：0.14モルのDSP-E-P EG2000であり、PARP阻害剤がオラパリブである、請求項20のナノ粒子製剤。

【請求項 22】

DPPC、DOTAP、コレステロール、およびDSP-E-P EG2000のモル比が、約1.4モルのDPPC：0.09モルのDOTAP：約0.78モルのコレステロール：0.11モルのDSP-E-P EG2000であり、PARP阻害剤がBMN-673である、請求項20のナノ粒子製剤。

【請求項 23】

前記リポソ-ムが、pH7未満でPARP阻害剤を放出する、請求項1のナノ粒子製剤。

【請求項 24】

腫瘍を有する被験体への製剤の静脈内注射後の腫瘍細胞へのPARP阻害剤の選択的送達が可能である、請求項1に記載のナノ粒子製剤。

【請求項 25】

腫瘍を有する対象に投与した場合、腫瘍塊を減少させる、および/または腫瘍細胞を死滅させることが可能である、請求項24に記載のナノ粒子製剤。

【請求項 26】

静脈注射に適する、請求項1のナノ粒子製剤。

【請求項 27】

前記脂質ベシクルがさらに腫瘍細胞に結合する標的モイエティを含む、請求項1のナノ粒子製剤。

【請求項 28】

標的部分が、タンパク質および抗体からなる群から選ばれる、請求項27のナノ粒子製剤。

【請求項 29】

PARP阻害剤の徐放性製剤で、当該製剤は生体分解性のポリマーからなるマトリックスに埋め込まれたPARP阻害剤を含む。

【請求項 30】

請求項29に記載の徐放性製剤であって、さらに当該製剤は、正の表面電荷を有する前記マトリックス中に埋め込まれた複数の脂質ベシクルを含み、前記脂質ベシクルは約50nm～約200nmの範囲の平均粒径を有し、前記PARP阻害剤を含み、およびPEG化した脂質部分を含む。

【請求項 31】

10

20

30

40

50

前記脂質ベシクルが、約 80 nm ~ 約 120 nm の範囲の直径を有する、請求項 30 の徐放性製剤。

【請求項 32】

前記PARP阻害剤が、オラパリブ、ヴェリパリブ、ルカパリブ、イニパリブ、BMN-673、3-アモニベンズアミド、ME0328、PJ34 HC1、AG-14361、INO-1001、UPF-1069、AZD-2461、およびA-966492からなる群から選ばれる、請求項29の徐放性製剤。

【請求項 33】

前記PARP阻害剤がオラパリブであり、脂質ベシクル中のオラパリブの効果的濃度が、約 400 μM (ミクロモーラー) ~ 約 20 mM (ミリモーラー) である、請求項 32 の徐放性製剤。10

【請求項 34】

前記PARP阻害剤がBMN-673であり、脂質ベシクル中のBMN-673の効果的濃度が、約 50 nM (ナノモーラー) ~ 約 1 μM (ミクロモーラー) である、請求項 32 の徐放性製剤。

【請求項 35】

さらに追加の医薬品を含む、請求項 29 の徐放性製剤。

【請求項 36】

前記追加の医薬品が、シスプラチン、テモゾロミド、ゲムシタビン、ドキソルビシン、PI3K阻害剤、MEK阻害剤、ATM阻害剤、またはその他の抗癌剤である、請求項 35 の徐放性製剤。20

【請求項 37】

前記脂質ベシクルがpH 7.4において正荷電する脂質からなる、請求項 30 の徐放性製剤。

【請求項 38】

前記正荷電した脂質が、DOTAP である、請求項 37 の徐放性製剤。

【請求項 39】

前記脂質ベシクルの表面電位が、pH 7.4において約 +15 mV ~ +40 mV である、請求項 30 の徐放性製剤。

【請求項 40】

PEG化した脂質が、DSP-E-P EG 2000 である、請求項 30 の徐放性製剤。30

【請求項 41】

前記脂質ベシクルが、DPPC およびコレステロールからなり、DPPC : コレステロールのモル比が約 1 : 7 ~ 1 : 4 である、請求項 29 の徐放性製剤。

【請求項 42】

前記脂質がDPPC、DOTAP、コレステロール、およびDSP-E-P EG 2000 からなり、DPPC、DOTAP、コレステロール、およびDSP-E-P EG 2000 のモル比が、約 1 ~ 8 モルのDPPC : 0.05 ~ 1 モルのDOTAP : 約 0.5 ~ 2 モルのコレステロール : 0.1 ~ 5 モルのDSP-E-P EG 2000 である、請求項 30 の徐放性製剤。40

【請求項 43】

DPPC、DOTAP、コレステロール、およびDSP-E-P EG 2000 のモル比が、約 5.4 モルのDPPC : 0.25 モルのDOTAP : 約 0.78 モルのコレステロール : 0.14 モルのDSP-E-P EG 2000 であり、PARP阻害剤がオラパリブである、請求項 42 の徐放性製剤。

【請求項 44】

DPPC、DOTAP、コレステロール、およびDSP-E-P EG 2000 のモル比が、約 1.4 モルのDPPC : 0.09 モルのDOTAP : 約 0.78 モルのコレステロール : 0.11 モルのDSP-E-P EG 2000 であり、PARP阻害剤がBMN-673 である、請求項 42 の徐放性製剤。50

【請求項 4 5】

脂質ベシクルが生体分解性のポリマーからなるマトリックスの分解の際に、マトリックスから徐々に放出され、放出された脂質ベシクルは pH 7 未満において P A R P 阻害剤を放出する、請求項 3 0 の徐放性製剤。

【請求項 4 6】

腫瘍細胞を有する被験体のインプラントに統いて、P A R P 阻害剤の腫瘍細胞への選択的デリバリが数週間から数ヶ月の期間に渡って行われる能がある、請求項 2 9 の徐放性製剤。

【請求項 4 7】

前記生体分解性ポリマーが、ポリ - L - 乳酸 (P L L A) 、ポリ (乳酸 - コ - グリコール酸) (P L G A) 、キトサン、およびポリカプロラクタム (P C L) からなる群から選ばれる、請求項 2 9 の徐放性製剤。

【請求項 4 8】

癌の治療法であって、当該方法は、必要な被験者に請求項 1 ~ 4 7 の何れかの P A R P 阻害剤製剤を投与することからなる。

【請求項 4 9】

請求項 1 ~ 2 6 の何れかの製剤を静脈注射によって投与する、請求項 4 8 の方法。

【請求項 5 0】

請求項 2 7 または 2 8 の製剤が、筋肉内、皮下、または頭蓋内注射によって投与され、P A R P 阻害剤の放出を行う、請求項 4 8 の方法。

【請求項 5 1】

被験者が、前立腺癌、乳癌、肺癌、ユーイング肉腫、膵臓癌、頸部癌、子宮頸癌、または卵巣癌に罹患している、請求項 4 8 の方法。

【請求項 5 2】

被験者が、B R C A - 1 、 B R C A - 2 、 P T E N 、または T P 5 3 における変異原性と関連する、または T M P R S S 2 : E R G 遺伝子融合または E W S : F L I 遺伝子融合に関連する癌を罹患している、請求項 4 8 の方法。

【請求項 5 3】

去勢抵抗性前立腺癌； B R C A - 1 または B R C A - 2 と関連する E R G 遺伝子融合、乳癌または卵巣癌； P T E N 突然変異または T M P R S S 2 に関連する前立腺癌、および E W S に関連するユーイング肉腫； F L I 遺伝子融合からなる群から選択される、請求項 5 2 の方法。

【請求項 5 4】

被験者へ 1 またはそれ以上の放射線治療のラウンドを投与することからなる、請求項 4 8 の方法。

【請求項 5 5】

前記 P A R P 阻害剤製剤が、放射線治療と合わせて投与される、請求項 5 4 の方法。

【請求項 5 6】

非 P A R P 阻害剤化学療法剤を被験者へ投与することからなる、請求項 4 8 の方法。

【請求項 5 7】

前記 P A R P 阻害剤が、非 P A R P 阻害剤化学療法剤と合わせて投与される、請求項 5 6 の方法。

【請求項 5 8】

1 またはそれ以上の腫瘍またはその部分を除去するための外科治療に統いて、前記 P A R P 阻害剤が投与される、請求項 4 8 の方法。

【請求項 5 9】

請求項 2 7 ~ 4 5 の何れかの P A R P 阻害剤製剤が、腫瘍の再発防止の援助のためになるように投与される、請求項 4 8 の方法。

【請求項 6 0】

請求項 1 ~ 2 6 の何れかの P A R P 阻害剤製剤が、被験者へ 1 回以上投与される、請求

10

20

30

40

50

項 4 8 の方法。

【請求項 6 1】

神経外傷または神経変性疾患もしくは状態を治療する方法であって、前記方法は、それを必要とする被験者へ P A R P 阻害剤を投与することを含む方法。

【請求項 6 2】

前記 P A R P 阻害剤が、オラパリブ、ヴェリパリブ、ルカパリブ、イニパリブ、B M N - 6 7 3 、 3 - アモニベンズアミド、M E 0 3 2 8 、 P J 3 4 H C 1 、 A G - 1 4 3 6 1 、 I N O - 1 0 0 1 、 U P F - 1 0 6 9 、 A Z D - 2 4 6 1 、 および A - 9 6 6 4 9 2 からなる群から選ばれる、請求項 6 1 の方法。

【請求項 6 3】

P A R P 阻害剤が、オラパリブ、または B M N - 6 7 3 である、請求項 6 2 の方法。

【請求項 6 4】

請求項 1 ~ 4 8 の何れかである前記 P A R P 阻害剤製剤が投与される、請求項 6 1 の方法。

【請求項 6 5】

請求項 1 ~ 2 8 の何れかの製剤を静脈注射によって投与される、請求項 6 4 の方法。

【請求項 6 6】

請求項 2 9 ~ 4 7 の何れかの製剤が、筋肉内、皮下、または頭蓋内注射によって投与され、P A R P 阻害剤の放出を行う、請求項 6 4 の方法。

【請求項 6 7】

被験体が、外傷性脳損傷、外傷性神経損傷、術後神経損傷、脊髄損傷、脳卒中、脳虚血からなる群から選択される神経外傷に関連する状態を有する、請求項 6 1 の方法。

【請求項 6 8】

被験体が、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、てんかん、統合失調症、認知症は、脳硬化症、障害髄鞘形成、糖尿病と関連する神経変性、脳の老人性変性からなる群から選択される神経変性疾患または症状を有する、請求項 6 1 の方法。

【請求項 6 9】

P A R P 阻害剤が、被験者への神経外科治療を行なう前または後に投与される、請求項 6 1 の方法。

【請求項 7 0】

追加の医薬品が被験者に投与される請求項 6 1 の方法。

【請求項 7 1】

ナノ粒子 P A R P 阻害剤製剤を調製する方法であって、以下の工程を含む：

(a) 両性イオン性リン脂質、カチオン性脂質、コレステロール、P E G 化した脂質、及び有機溶媒に溶解した P A R P 阻害剤を含有する混合物を提供する工程；

(b) 前記混合物から溶媒を除去することによって、乾燥脂質フィルムを調製する工程；

(c) P A R P 阻害剤を含有する水和した脂質構造物の懸濁液を形成する水溶液で脂質膜を水和する工程；

(d) 前記サスペンションを超音波処理する工程； および

(e) ナノ粒子 P A R P 阻害剤製剤を得るために、ナノ多孔質膜に、超音波処理した懸濁液を通す工程。

【請求項 7 2】

前記 (e) 工程において調製されたナノ粒子製剤が、P A R P 阻害剤を含む脂質ベシクルの形体である、請求項 7 1 の方法。

【請求項 7 3】

前記脂質ベシクルが正の表面荷電を有し、約 5 0 n m ~ 約 2 0 0 n m の平均直径を有する、請求項 7 1 の方法。

【請求項 7 4】

10

20

30

40

50

前記ナノ多孔性膜が約200nmの直径の孔を含む、請求項71の方法。

【請求項75】

前記サスペンジョンが前記(e)工程の膜を約10回通過させる、請求項71の方法。

【請求項76】

前記PARP阻害剤は、オラパリブ、ヴェリパリブ、ルカパリブ、イニパリブ、BMN-673、3-アモニベンズアミド、ME0328、PJ34HCL、AG-14361、INO-1001、UPF-1069、AZD-2461、およびA-966492からなる群から選ばれる、請求項71の方法。

【請求項77】

前記PARP阻害剤が、オラパリブまたはBMN-673である、請求項76の方法。

10

【請求項78】

前記PARP阻害剤が、オラパリブであって、脂質ベシクル中のオラパリブ濃度が約400μM～約20mMである、請求項77の方法。

【請求項79】

前記PARP阻害剤が、BMN-673であって、脂質ベシクル中のBMN-673濃度が約50nM～約1μMである、請求項77の方法。

【請求項80】

対イオンリン脂質がホスファチジルクロリンである、請求項71の方法。

【請求項81】

陽イオン性脂質がDOTAPである、請求項71の方法。

20

【請求項82】

PEG化した脂質がDSP-E-P EG2000である、請求項71の方法。

【請求項83】

DPPC、DOTAP、コレステロール、およびDSP-E-P EG2000のモル比が、約1～8モルのDPPC：0.05～1モルのDOTAP：約0.5～2モルのコレステロール：0.1～5モルのDSP-E-P EG2000である、請求項71の方法。

【請求項84】

DPPC、DOTAP、コレステロール、およびDSP-E-P EG2000のモル比が、約5.4モルのDPPC：0.25モルのDOTAP：約0.78モルのコレステロール：0.14モルのDSP-E-P EG2000であり、PARP阻害剤がオラパリブである、請求項71の方法。

30

【請求項85】

DPPC、DOTAP、コレステロール、およびDSP-E-P EG2000のモル比が、約1.4モルのDPPC：0.09モルのDOTAP：約0.78モルのコレステロール：0.11モルのDSP-E-P EG2000であり、PARP阻害剤がBMN-673である、請求項71の方法。

【請求項86】

(e)工程で用いられる水溶液が、追加の医薬品を含む、請求項71の方法。

【請求項87】

前記追加の医薬品が、シスプラチン、テモゾロミド、ゲムシタビン、ドキソルビシン、またはその他の抗癌剤である、請求項71の方法。

40

【請求項88】

(a)～(e)工程が無菌状態で行われる、請求項71の方法。

【請求項89】

(c)工程が、45～50で、連続混合下で行われる、請求項71の方法。

【請求項90】

(d)工程が、37以下で行われる、請求項71の方法。

【請求項91】

(d)工程が粒子サイズの断続的な決定で行なわれ、超音波処理が平均粒径が約100～200nmになるまで継続される、請求項71の方法。

50

【請求項 9 2】

最終粒径が約 80 ~ 100 nm である、請求項 7 1 の方法。

【請求項 9 3】

(c) 工程の水和用に用いられる水溶液が、リン酸塩緩衝生理食塩水を用いる、請求項 7 1 の方法。

【請求項 9 4】

請求項 1 ~ 4 7 の何れかの PARP 阻害剤、包装材、および請求項 4 8 ~ 7 0 の何れかの方法を実施するための指示書を備えるキット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】**

10

【0 0 0 1】**[関連出願への相互参照]**

本出願は、2013年8月27日出願の米国仮出願番号61/870,258、名称：阻害剤および生物製剤デリバリ用のナノプラットホーム、に係る優先権を主張し、当該出願の全内容をここに参照によって組み入れる。

【背景技術】**【0 0 0 2】**

転写経路における欠陥のDNA損傷修復経路および遺伝子変異は、癌の広いスペクトル中のポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ(PARP)阻害治療のための主要な標的として確立されて来た(1-4)。PARP-1、核酵素は、その癌治療における‘アキレス腱’となる、細胞内のDNA修復経路において重要な役割を果たしている。PARP阻害剤療法は特に有効で、前立腺がん、乳がんのためBRCAおよび卵巣癌のためのPTENなどの遺伝的変異は、DNA修復経路の欠陥につながる、腫瘍における合成致死機構を介して起こる(4,15)。オラパリブ(Olaparib)は、このようにPARPにより介入される、単一鎖DNAを修復するメカニズムを減衰させる、競争的にPARPのNAD⁺結合部位に結合する経口活性PARP阻害剤である(5-7)。それらは効果的に、いくつかの癌(8,9)、特に前立腺癌(10-13)における腫瘍破壊を増強するDNA損傷に起因して、PARP活性を阻害することにより放射線治療に対して様々な癌を増感するので、オラパリブおよびその他のPARP阻害剤は、十分に確立された放射線増感剤である。

20

【0 0 0 3】

去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)の症状は、局所的または転移癌(mCRPC)のいずれかのように、前立腺癌患者群における死亡者の主要な原因である(20-22)。いくつかの研究は、乳癌および卵巣癌におけるBRCA突然変異に似ている前立腺癌におけるPARP-1阻害とPTEN欠損症(23)に関連する合成致死性を仮定とし、および由来とした(7,24)。PARP-1阻害はまた、特に前立腺癌のCRPCモデルにおいて治療的意味を有し、それは、アンドロゲン枯渇療法(25)に対して非感受性の癌をもたらす、リガンド独立性の異常なアンドロゲン受容体(AR)活性と食い違うように見える。さらに、PARP-1はまた、それが酵素的にAR活性および癌の進行に連結されている、AR感受性癌に関与している(25)。特定の遺伝子融合(TMPRS2:ERG融合)(26)、PTENおよびTP53変異を含む染色体再配列は、頻繁に耐性去勢になりがちな前立腺癌でしばしば検出される(27-29)。

30

【0 0 0 4】

オラパリブは現在、前立腺癌、膵臓癌(14)、乳がん(4,15)および卵巣癌(4)を含む種々の癌のためのいくつかの臨床試験では、経口投与を介してテストされている。オラパリブでの臨床試験において続く、現在の治療計画は、1日2回の400mgの経口投与を含む(3,4)。有望ではあるが、いくつかの臨床試験に由来する薬物動態プロファイルは、以下の制限に直面していることを示唆している：1) 患者は毎日16カプセルを飲み込む面倒なルーチンに従うことが必要である。2) 腫瘍部位で、無用量依存的蓄積は観察されていなかった(15)。3) オラパリブは約6~7時間の循環から急速に脱離され、非治療の

40

50

代謝産物への第1の通過代謝のために、生物学的利用性が乏しい。これらの制限は、オラパリブおよびその他のPARP阻害剤のための代替のデリバリ方法に対する強制的なニーズがあることを示している。

【発明の概要】

【0005】

本発明は、がんの治療と予防並びに神経外傷の治療、および神経変性疾患に使用するためのPARP阻害剤の様々な製剤を提供する。製剤の多くは、癌細胞または他の細胞および細胞内の阻害剤の放出の阻害剤の効率的なデリバリを提供する、ナノ粒子へのPARP阻害剤のパッケージを利用する。本発明のPARP阻害剤の製剤は、効果的に腫瘍細胞を死滅させ、腫瘍を縮小することができる。驚くべきことに、当該製剤はまた、治療および神経外傷および神経変性疾患からの回復を促進するのに有効である。

10

【0006】

本発明の一態様は、ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ(PARP)酵素の阻害剤のナノ粒子製剤である。処方物は、水性媒体中で脂質小胞(lipid vesicles)(liposomes、リボソーム)の懸濁液を含む。脂質小胞は、正に荷電した脂質を含む結果として、正の表面電荷を有する。脂質小胞は、約50nm～約200nmの平均直径を有し、好ましくは約80nm～約120nm、または約80nm～約100nm、または約100nmである。脂質小胞は、PARP阻害剤を含み、また、PEG化脂質部分を含む。

20

【0007】

本発明の別の態様は、PARP阻害剤の徐放性製剤である。製剤は、マトリックス中に埋め込まれたPARP阻害剤を含み、マトリックスは、生分解性ポリマーを含むか、または生分解性ポリマーにより形成されている。いくつかの実施形態において、徐放性製剤は、マトリックス中に埋め込まれた脂質小胞を複数含む。脂質小胞は、正の表面電荷を有する約50nm～約200nmの範囲の平均直径を有する、PARP阻害剤を含み、PEG化脂質部分を含む。

30

【0008】

本発明のさらに別の態様は、癌を治療する方法である。この方法は、それを必要とする被験体に上述したようなPARP阻害剤製剤を投与するステップを含む。本発明のさらに別の態様は、神経外傷または神経変性疾患または状態を治療する方法である。この方法は、それを必要とする被験体にPARP阻害剤を投与する工程を含む。当該方法のいくつかの実施態様において、上述のように、PARP阻害剤は、製剤として投与される。

30

【0009】

本発明の別の態様は、ナノ粒子のPARP阻害剤製剤を調製する方法である。当該方法は、(a)両性イオン性リン脂質、カチオン性脂質、コレステロール、PEG化脂質、及び有機溶媒に溶解したPARP阻害剤を含有する混合物を提供し；(b)前記混合物から溶媒を除去することによって、乾燥脂質フィルムを調製する工程；(c)PARP阻害剤を含有する水和した脂質構造物の懸濁液を形成する水溶液で脂質膜を水和する工程；および(d)超音波処理懸濁し；(e)当該懸濁液を超音波処理したナノ多孔質膜に通して、ナノ粒子のPARP阻害剤製剤を得る。

【0010】

本発明はさらに、上記のようなPARP阻害剤製剤、包装材料、および上記の治療の方法のいずれかを実行するため指示書を含むキットを含む。

40

【図面の簡単な説明】

【0011】

図1A-1Cは、本発明のPARP阻害剤のナノ粒子製剤のナノ粒子の3つの異なる実施態様の概略図である。

【図1A】図1Aの実施態様は、標的化部分を欠くように描かれ、ナノ粒子の脂質二重相中にPARP阻害剤が含まれている。

【図1B】図1Bの実施態様では、脂質二重層の相における標的化部分とPARP阻害剤を含むことが示されている。

【図1C】図1Cの実施態様では、標的化部分、脂質二重層の相におけるPARP阻害剤、およ

50

びナノ粒子のルーメン（内腔）における水相中のまた別の医薬品を有することが示されている。

【図2A】図2Aは、単一の解放機構を有する移植可能なPARP阻害剤送達（デリバリ）装置の概略図である。当該デバイスは、生分解性マトリックス中に埋め込まれたPARP阻害剤が含まれている。

【図2B】図2Bは、二重のリリース機構を備えた移植可能なPARP阻害剤送達装置の概略図である。デバイスは、生分解性のマトリックスに埋め込まれた、図1A～1Cのいずれかに示すような、ナノ粒子が含まれている。

【図3A】図3Aは、本発明のナノ粒子処方物の非経口投与対経口投与による腫瘍のPARP阻害剤の送達の概略図である。

【図3B】図3Bは、ナノ粒子のPARP阻害剤対遊離PARP阻害剤の細胞取り込みを比較した概略図である。

【図4A】図4Aは、4において、24時間、5ヶ月および7ヶ月貯蔵の後オラパリブのナノ粒子製剤の強度指向サイズ分布を示すグラフである。

【図4B】図4Bは、1%酢酸ウラニルで染色した、オラパリブを含有するナノ粒子の透過型電子顕微鏡写真である。スケールバーは、500nmを表す。

【図4C】図4Cは、異なるpHを有する溶媒でオラパリブを含有するナノ粒子のインキュベーション後の粒度分布の変化を示すグラフである。

【図4D】図4Dは、pH 7.4および37における血清中オラパリブに関してオラパリブを含む血清に関連するナノ粒子の放出プロファイルを示すグラフである。示した値は、指定された時点で収集放出緩衝液の曲線下の累積面積（AUC）である。

【図4E】図4Eは、pH 6及びpH7.4における血清中オラパリブを参照しながら、37におけるオラパリブを含む血清に関連するナノ粒子の放出プロファイルを示すグラフである。示した値は、指定された時点で収集放出緩衝液の曲線下の累積面積である。

【図5A】図5Aは、PC3細胞の抽出物中のPARP-1、PAR、およびアクチンのウェスタンプロットを示す。細胞は、イオン化X線を0,2、または4Gy（グレイ）の強度で照射し、空のナノ粒子、オラパリブ（2個の試料）、またはナノ*オラパリブ（オラパリブを含むナノ粒子、2個の試料）を4時間インキュベートし、そして抽出液を調製する前に1時間インキュベートした。

【図5B】図5Bは、正規化標準としてPARP-1の信号を用いて、図5Aのウェスタンプロットから定量化した、PAR信号のグラフである。アスタリスク（*）は、不対2テールを用いて導出されたp<0.05を示す。

【図5C】図5Cは、ウェスタンプロットyH2AX及びPC3細胞の抽出物中のアクチン正規化標準としてアクチンを用いて定量化yH2AX信号のグラフを示す。細胞を図5A中の非照射試料と同様に処理した。アスタリスク（*）は、不対の2テールt - テストを用いて導出された、p < 0.05を示す。

【図6A】図6Aは、DAPI及び開裂PARPに対する抗体で共染色したLNCaP細胞の蛍光顕微鏡写真を示す。DNAのDAPI染色は核を識別するために使用される。細胞は、イオン化X線の2Gyを4時間照射し、オラパリブまたはナノ・オラパリブと共にインキュベートし、顕微鏡検査のために処理される前に1時間インキュベートした。バーは20 μmを表す。

【図6B】図6Bは、細胞核当たりの開裂されたPARPの定量化を示すグラフである。別個の対照試料が照射されなかったことを除いて図6Aに記載したように、LNCaP細胞を処理した。記号**は、p < 0.01で、ナノ・オラパリブ 2 Gyの試料からの信号とオラパリブ 2 Gy試料から信号の間の統計的に有意な差を示している。統計的に有意な差は**として表される。

【図6C】図6Cは、DAPI及びPARPの開裂に対する抗体で共染色したPC3細胞の蛍光顕微鏡写真を示す。図6Aに記載のように細胞を調製した。バーは20 μmを表す。

【図6D】図6Dは、細胞核あたりの開裂されたPARPの定量化を示すグラフである。別個の対照試料が照射されなかったことを除いて図6Cに記載したように、PC3細胞を処理した。シンボル***はP < 0.001で、オラパリブ 2 Gyの試料とNanoOlaparib 2 Gyの試料の両方からの信号、およびコントロール2 Gy試料からの信号間の統計的に有意な差を示している。記

号**はナノ・オラパリブ 0 Gyの試料からの信号と対照0 Gyの試料からの信号の間に統計的に有意な差を示す。シンボル#はナノ・オラパリブ 0 Gyの試料からの信号とナノ・オラパリブ 2Gyの試料からの信号間の統計的な有意な差を示す。

【図 6 E】図6Eは、FK01細胞をDAPIで共染色し、開裂されたPARPに対する抗体の蛍光顕微鏡写真を示す。細胞は、図 6Aに記載したように調製した。バーは20 μ mを表す。

【図 6 F】図6Fは、核あたり開裂されたPARPの定量化を示すグラフである。別個の対照試料が照射されなかったことを除いて図6Eに記載したよう、FK01細胞を処理した。シンボル***は、p <0.001で、ナノ・オラパリブ 2 Gyの試料からの信号と対照2 Gyの試料からの信号の間の統計的な有意差を示す。

【図 7 A】図7Aは、照射前のオラパリブとナノ・オラパリブで処理した細胞の培養皿の写真を示す。9個の倍増サイクルで培養したLNCaP(左パネル)、PC3(中央パネル)、およびFK01(右パネル)細胞がイオン化X線を0,2または4 Gyで4時間照射され、オラパリブまたはナノ・オラパリブと共にインキュベートし、クリスタルバイオレット色素で染色した。

【図 7 B】図7Bは、図7Aの実験から、細胞生存率のグラフを示す。クリスタルバイオレット色素が試料から抽出され、590nmで分光測定により定量化した。

【図 7 C】図7Cは、LNCaP細胞、PC3、およびFK01細胞に薬物、照射治療の組み合わせの効果を示す棒グラフである。組合せ指数はChou-Talalayのアイソボログラムの式に基づいて、2.0版のCalcuSynを用いて測定された。グラフの上部にあるラベルは、薬物および照射治療の相乗効果のレベルを示す。

【図 7 D】図7Dは、生体外での前立腺癌モデルにおけるPARPの役割を示す概略図である。p53およびPTEN遺伝子型およびLNCaP、PC3およびFK01細胞の相対的な放射抵抗が示されている。

【図 8 A】図8Aは、Ptenpc/- - Trp53pc- / - マウスにおける前立腺腫瘍(矢印)を示している。

【図 8 B】図8Bは、ナノ・オラパリブ(Nano)若しくはオラパリブ(Std)で処理したマウスからの前立腺腫瘍のロープにおけるオラパリブ代謝を示すグラフである。前側、腹側、背側ロープのメタボローム(代謝)解析は、それぞれ、黒、ダークグレー、およびライトグレーで表示されている。カウントは、腫瘍重量に対して正規化された。

【図 8 C】図8Cは、図8Bにおいて分析された腫瘍の三つのロープのうち、オラパリブ蓄積の増加を示すグラフである。

【図 8 D】図 8Dは、オラパリブまたはナノ・オラパリブのいずれかで2週間処理したマウスからの脾臓、肝臓、および腎臓組織の病理組織学的画像を示す。図8Eはオラパリブまたはナノ・オラパリブで処理したマウスにおける腫瘍のロープの体積の変化を示すグラフである。腹側と背側ロープの容量はそれぞれ黒と灰色で示されている。体積変化は、体積変化の \log_2 の単位で示されている。

【図 8 E】図8Eはオラパリブまたはナノ・オラパリブで処理したマウスにおける腫瘍のロープの体積の変化を示すグラフである。腹側と背側ロープの容量はそれぞれ黒と灰色で示されている。体積変化は、体積変化の \log_2 の単位で示されている。

【図 9 A】図9Aは、図6Aに記載された実験からオラパリブまたはナノ・オラパリブで処理したLNCaP細胞における核の大きさを示すグラフである。個々の細胞のDAPI染色からの信号が定量された。

【図 9 B】図9Bは、図6Cに記載された実験から、オラパリブまたはナノ・オラパリブで処理されたPC3細胞における核の大きさを示すグラフである。個々の細胞のDAPI染色からの信号を定量した。

【図 9 C】図 9Cは、図6Eに記載の実験から、オラパリブまたはナノ・オラパリブで処理されたFK01細胞中の核の大きさを示すグラフである。個々の細胞のDAPI染色からの信号が定量化された。

【発明を実施するための形態】

【0012】

10

20

30

40

50

本発明者らは、予想外に、ヒトまたは動物の体内で彼らのターゲットに阻害剤および他の物質の非常に有効な治療濃度のデリバリを促進するPARP阻害剤および他の薬物または生物製剤の新規製剤の様々な製剤の開発を行った。これらの製剤は、癌、ならびに神経外傷の治療、および神経変性疾患の治療および予防に使用することができる。PARP阻害剤は、それらの強い疎水性を制御し、デリバリすることが特に困難である。このようなPARPなどの細胞内標的への効率的なデリバリを提供する脂質含有ナノ粒子中への本発明のパッケージのPARP阻害剤および他の化合物の製剤である。ナノ粒子は、血液脳関門を通過する能力を有し、したがって、脳に影響する神経疾患及び症状の治療のために使用することができる。細胞に取り込まれた後、ナノ粒子は、細胞内の阻害剤または他の物質を放出する。本発明のPARP阻害剤の製剤は、効果的に腫瘍細胞を死滅させ、腫瘍を縮小化することができる。本発明のPARP阻害剤の製剤はまた、神経外傷および神経変性疾患の治療および回復を促進するのに非常に有効である。

10

【0013】

本発明のナノ粒子製剤は、PARP阻害剤又は他の阻害剤又は生物学的薬剤を含む脂質ベースのナノ粒子の水性懸濁液である。PARP阻害剤、および高度に疎水性である他の薬剤の場合には、阻害剤は、完全に統合されるか、少なくとも部分的にナノ粒子の脂質部分である。任意の特定の構成に本発明を限定するものではないが、脂質は、リポソームまたは脂質小胞のような球状構造を形成する二分子膜の形体であると考えられる。本発明の重要な特徴は、有意な治療効果が送達時に達成されるように、PARP阻害剤又は他の薬剤の十分に大量のパッケージングである。脂質小胞は、好ましくは小さく、単層で、約50nm～200nmの平均サイズ（直径）、好ましくは80nm～120nm、80nm～100nm、または約100nmを有する。血流中の生存を促進するように、脂質小胞は、それらの外表面に露出したポリエチレンギリコール（PEG）基を有する。脂質小胞はまた、積極的に血液または細胞外培地の生理的pH（例えば、pH 7.4）で荷電している脂質の1種類以上を含めることによって、好ましくは+15 mV～+40 mVの範囲内で、正味の正の表面電荷を担い、N-[1-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル]-N、N、N-トリメチルアンモニウムメチル（DOTAP）が例示される。カチオン性脂質のその他の例として、国際公開公報WO2009129387、同WO9405624、および米国特許US6056938を参照されたい。正の表面電荷は、細胞内への小胞の取り込みを促進する。一般的に、適切な脂質小胞は、一つ以上の両性イオン性リン脂質（例えば、ホスファチジルコリン（PC）および/またはホスファチジルエタノールアミン（PE））、一つ以上の正に荷電した脂質およびコレステロールから形成することができる。PEG基は、リン脂質の1種類以上の極性頭部基に共有結合によって導入することができる（例えば、PEG化PE）。適切なPEG化リン脂質の例は、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[アミノ（ポリエチレンギリコール）]（DSPE-PEG）である。異なる分子量を有するPEG部分は、例えばPEG2000を使用することができる。

20

【0014】

様々な異なる脂質組成物は、ナノ粒子製剤に適した脂質小胞を作製するために使用することができる。小胞は、ジバルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）およびコレステロールを、DPPCおよびコレステロールのモル比でそれぞれ約1～7モルのDPPC、および約1～4モルのコレステローを含むことができる。小胞は、また、DPPC、DOTAP、コレステロール、及びDSPE-PEG2000を含むか、それらから本質的になる。DPPC、DOTAP、コレステロールおよびDSPE-PEG2000のモル比は、例えば、約1～8モルのDPPC、対約0.05～1モルのDOTAP、対約0.5～2モルのコレステロール、対約0.1～5モルのDSPE-PEG2000である。小胞はオラパリブでロードされるときに、適切な小胞は、DPPC、DOTAP、コレステロールおよびDSPE-PEG2000のモル比を、例えば、約5.4モルDPPC、対約0.25モルのDOTAP、対約0.78モルのコレステロール、約0.14モルのDSPE-PEG2000で含むことができる。阻害剤が、BMN-673の場合、DPPC、DOTAP、コレステロール、およびDSPE-PEG2000のモル比は、例えば、約1.4モルのDPPC、対約0.09モルのDOTAP、対約0.78モルのコレステロール、対約0.11モルのDSPE-PEG2000とすることができます。

30

【0015】

40

50

ナノ粒子は、当技術分野で公知の様々な方法のいずれかによって製造することができる（用語「ナノ粒子」、「リポソーム」、および「脂質小胞」は、本明細書において互換的に使用され得る）。好ましい方法は、先ず、所望の脂質を組み合わせることによって、乾燥脂質フィルムを形成し、溶媒溶液中のPARP阻害剤又は他の疎水性薬剤の有機溶媒（例えば、クロロホルムまたはクロロホルム/メタノール混合物）中に添加し、溶媒を蒸発器によって組み合わされた脂質および阻害剤混合物を徹底的に乾燥する。乾燥した脂質・阻害剤フィルムは、次いで適切な水性媒体、好ましくは小胞（例えば、リン酸緩衝生理食塩水）の内部の水性媒体として選択された、好ましい1つ水性媒体の存在下で水和される。水性媒体は、1つ以上の追加の水溶性の薬理学的または生物学的薬剤を含むことができる。水和脂質阻害剤材料は、超音波処理により、粗小胞に形成され、粗小胞は、その後、ナノ多孔質膜を繰り返し通して均質化し、小粒子化される。そのような膜は、多種多様な物質が商業的に入手可能で種々の材料（例えば、アルミナ又はシリカなどの無機材料、およびポリカーボネートなどの有機材料）、孔径（100nmが好ましい）を有する。小胞の形成及び分粒した後、それらのサイズおよび組成は、光散乱法または電子顕微鏡法により測定することができ、必要に応じて外部溶液は、サイズ排除クロマトグラフィーなどの従来の方法により交換することができる。

10

【0016】

本発明のナノ粒子は、PARP阻害剤又は他の薬剤の十分に大量のパッケージングを可能にし、その結果、顕著な治療効果がデリバリ時に達成される。これは、PARP阻害剤又は他の疎水性の活性剤を有するナノ粒子の脂質相を負荷させることによって、少なくとも部分的に達成される。当該製剤は溶液中に完全に遊離して存在しないが、完全にまたは少なくとも部分的に脂質中に結合されるので、ナノ粒子中の薬剤の有効濃度を決定するのに有用であり得る。有効濃度は、薬剤の全量が遊離していれば、ナノ粒子の既知の体積で割ったナノ粒子当たり製剤の既知量に基づいて、得られる濃度である。有効濃度は、ナノ粒子を用いた薬剤の送達および治療効果を最適化するために使用することができる。例えば、本発明者らは、オラパリブは、約400 μM ~ 約20mMの範囲の有効濃度で治療上活性であることを決定したが、それに対してBMN-673は、約50 nM ~ 約1 μMの有効濃度で活性である。

20

【0017】

特定の実施態様において、ナノ粒子は標的部分を含み、それは、腫瘍細胞または中枢神経系の細胞の如き選択された標的細胞に結合したナノ粒子の外表面に露出した分子である。標的化部分は、既知の細胞表面タンパク質を標的とする、抗体、抗体断片、オリゴヌクレオチド、ペプチド、ホルモン、リガンド、サイトカイン、ペプチド模倣薬、タンパク質、炭水化物、化学的に修飾されたタンパク質、化学的に修飾された核酸、又は化学的に修飾された炭水化物であり得る（例えば、US2011 / 0123451参照）。標的化部分は、細胞表面受容体に結合することが知られている分子に由来してもよい。例えば、標的化部分は低密度リポタンパク質、トランスフェリン、EGF、インスリン、PDGF、線維素溶解酵素、抗HER2、アネキシン、インターロイキン、インターフェロン、エリスロポエチン、またはコロニー刺激因子から誘導することができる。標的化部分は、例えばトランスフェリン受容体、インスリン受容体、IGF-1またはIGF-2受容体の如き血液脳関門に対するリポソームを標的とする抗体または抗体フラグメントあってもよい（例えば、米国公開特許US2002/0025313参照）。

30

【0018】

標的化部分は、リンカーによって、ナノ粒子中のリン脂質またはPEG部分に取り付けることができる。リポソーム中のリン脂質に結合するペプチド、タンパク質、および他の分子のためのリンカーが当該技術分野において既知である（例えば、国際公開公報WO199100289、US20090220587、および国際公開公報WO2008095004参照）。リンカーは、例えば、N-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPD)、N-スクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート(SMPB)、N-スクシンイミジル-3-マレイミドベンゾエート(SMB)、N-スクシンイミジル-3-マレイミジブチレート(GMBS)、N-スクシンイミジル6-マレイミドカプロエート(EMCS)、N-スクシンイミジル-3-マレイミドプロ

40

50

ピネート、N-スクシンイミジルトランス-4- (N-マレイミジルメチル) シクロヘキサン-1-カルボキシレート (SMCC) またはN-スクシンイミジルマレイミジルアセテート (AMAS) 等のマレイミド含有化合物であり得る。

【0019】

本発明のナノ粒子のいくつかの代表的な実施態様が図1A-1Cに示されている。図1Aは、ナノ粒子の脂質二重層の相120内の、PARP阻害剤の如き活性剤110を含む、ナノ粒子100を示している。PEG部分130は、二層膜の外表面に取り付けられている。ナノ粒子のコア(脂質小胞の内腔)は、緩衝溶液140である。この実施態は、標的部分を欠いている。図1Bにおいて、ある実施態様は、図1Aの実施態様と同様であることが示されているが、ターゲット部分150を含む。図1Cの実施態様に示すように、付加的な、水溶性の活性剤160は、内腔における水相に添加される。10

【0020】

本発明の処方物は、単一成分の放出機構または二成分の放出機構のいずれかを利用することができる。図2Aは、単一の放出機構を有する移植可能なデリバリデバイスを示す。移植片200は、移植後に離れてインプラントから拡散する薬物210の活性形体で被覆されている。あるいは、薬物210は、それが分解し、薬物を放出する生分解性マトリックス中に埋め込むことができる。図2Bは、二重の放出機構を備えた移植可能なデリバリデバイスを示す。薬剤220は、ナノ粒子230に包裝されており、順番に、インプラント240の本体を構成する生体適合性マトリックス中に埋め込まれている。マトリックスは、例えば、PLGA、キトサン、または他の生分解性ポリマーから作られているか、またはそれらを含むことができる。最初の放出工程では、マトリックスはゆっくりと劣化され、ナノ粒子が放散する。第二の放出工程では、ナノ粒子は分解され(例えば、細胞取り込み後に)、薬物の活性形体が放出される。20

【0021】

本発明のナノ粒子状担体は、腫瘍に対するオラパリブの如きPARP阻害剤の送達の障壁を克服するか、然もなくは体内で遭遇することが可能である。可能なメカニズムは、図3Bに示されている。カプセル形態で経口送達されたオラパリブの結末は左側に示されている。遊離のオラパリブは、非特異的血管壁を横切り、初回通過代謝後に低い生物学的利用能をもたらす。ナノ粒子製剤(ナノ・オラパリブ)のような非経口注射でデリバリされたオラパリブの結末は、右側に示されている。ナノ・オラパリブの粒子は、漏れやすい腫瘍血管系と粒子の大きさ、および約100%の生物学的利用能が得られた粒子からの腫瘍放出のないオラパリブの酸性微小環境によって生じるEPR効果の故に腫瘍に蓄積する。30図3Bは、追加された全体の薬物が細胞内への取り込みのために利用可能である生体内設定での細胞によって遊離したオラパリブとナノ・オラパリブの細胞取り込みを比較した概略図である。

ナノ・オラパリブの正味の細胞内濃度は、より高い取り込みおよびPGP媒介薬剤排出の回避の故に、オラパリブの細胞内濃度よりも高くなると考えられている。

【0022】

本発明のナノ粒子製剤は、表1のPARP阻害剤化合物を含む、任意の疎水性活性剤を詰め込むことができる。

【0023】

10

20

30

40

【表1】

| PARP 阻害剤 | 化合物名 |
|------------------------------------|--|
| オラパリブ (AZD2281, Ku-0059436) | 4-(3-(1-(シクロプロパンカルボニル)ヒドロジン-4-カルボニル)-4-フロロベンジル)フタラジン-1(2H)-オノ |
| ヴェリパリブ(ABT-888) | (R)-2-(2-メチルヒドロジン-2-イル)-1H-ヘンゾ[4,5,3-cd]イントル-1(6H)-オソリン酸 |
| ルカパリブ (AG-014699) (PF-01367338) | 6-フロロ-5-(4-((メチルアミノ)メチル)フェニル)-3,4-ジヒドロ-2H-アゼビノ[5,4,3-cd]イントル-1(6H)-オソリン酸 |
| イニパリブ(851-201) | 4-ヨード-3-ニトロベンズアミド |
| BMN 673 | 3H-ヒドロ[4,3,2-テ]フタラジン-3-オノ, 5-フロロ-8-(4-フロロフェニル)-2,7,8,9-テトラヒドロ-9-(1-メチル-1H-1,2,4-トリアゾ-5-イル)-(8S,9R)-3-アミノベンズアミド |
| ME0328 | 3,4-ジヒドロ-4-オキソ-3,4-ジヒドロ-4-オキソ-N-[(1S)-1-フェニルエチル]-2-キソリンプロパンアミド |
| PJ34 HCl | アセトアミド, N-(5,6-ジヒドロ-6-オキソ-2-フェナルスリジニル)-2-{ジメチルアミノ}-, ハイドロクロライド(1:1) |
| AG-14361 | イミダゾ[4,5,1-jk][1,4]ヘンゾジアゼビノ-7(4H)-オノ, 2-[4-[(ジメチルアミノ)メチル]フェニル]-5,6-ジヒドロ- |
| INO-1001 | 3-アミノベンズアミド |
| UPF 1069 | 1(2H)-イソキノリン, 5-(2-オキソ-2-フェニルエトキシ)- |
| AZD2461 | 1(2H)-フタラジノン, 4-[[4-フロロ-3-[(4-メトキシ-1ヒドロジニル)カルボニル]フェニル]メチル]- |
| A-966492 | 2-(2-フロロ-4-((S)-ヒドロジン-2-イル)フェニル)-3H-ヘンゾ[4,5,3-cd]イミダゾール-4-カルボキシアミド |

【0024】

ナノ粒子製剤処方は、さらにシスプラチン、テモゾロミド、ゲムシタビン、ドキソルビシンの如き抗がん剤、PI3K阻害剤、MEK阻害剤、ATM阻害剤、またはその他の抗がん剤等の第2活性剤を含み得る。第2活性剤は、脂質二層相または粒子の内腔内の水性区画に入れ込まれ得る。

【0025】

一般的に知られているように、製剤は、静脈内投与を含む非経口投与のいずれかのタイプ用に調製することができる。これらはまた、鼻腔内投与用の適切な方法で調製することができる。リポソーム粒子の鼻腔内送達のために調製する製剤の方法は、当該分野で公知である（例えば、欧州特許EP0440289参照）。製剤は公知の方法（例えば、米国特許US8609088参照）に従って、中枢神経系への鼻腔内送達に適した方法で製造することができる。徐放製剤は、好ましくは頭蓋内、筋肉内、または腫瘍内へ注射される。

【0026】

本発明は、ナノ粒子のPARP阻害剤製剤を調製する方法を含む。この方法は、両性イオン

10

20

30

40

50

性リン脂質、カチオン性脂質、コレステロール、PEG化脂質、及び有機溶媒に溶解したPARP阻害剤を含有する混合物を提供することを含む。溶媒は、クロロホルム、メタノール、ヘキサン、または他の有機溶媒、またはそれらの混合物を含んでいてもよい。カチオン性脂質の例については、WO2009129387、WO9405624、米国特許US6056938を参照されたい。乾燥脂質フィルムが混合物から有機溶媒を除去することにより調製される。当該方法の一実施態様では、有機溶媒を蒸発により除去する。

【0027】

PARP阻害剤を含有する水和した脂質構造物の懸濁液が水溶液で脂質膜を水和することにより形成される。一実施態様では、水溶液は、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)である。一実施態様では、水和した脂質構造は、連続的に、懸濁液を混合することにより形成される。一実施態様では、水和工程は、45～50℃で行われる。一実施態様では、水和工程は、室温で行われる。

10

【0028】

水和脂質構造は、所望の大きさの小さい均質なナノ粒子の集団を得るために再構成される。一実施態様において、ナノ粒子は、超音波処理によって処理される。超音波処理は、好ましくは0～25℃、または0-37℃の温度で行われる。一実施態様において、ナノ粒子は、再構成されており、ナノ多孔質膜を通して繰り返し押し出しによってサイズが選択される。いくつかの実施態様では、押出は0～25℃、または0-37℃、または約37℃の温度で行われる。いくつかの実施態様では、押出は、約10回ナノ粒子懸濁液を多孔質膜を通過させることを含む。一実施態様では、膜の孔径は200nmである。一実施態様において、ナノ粒子は、超音波処理に続いて押し出しによってサイズ選択される。いくつかの実施態様では、ナノ粒子の所望の大きさは80～100nm、80～120nm、または100～120nmである。

20

【0029】

本発明はまた、本明細書に記載のPARP阻害剤製剤を投与することによって、被験体における癌を治療する方法を含む。癌は、例えば、前立腺癌、乳癌、肺癌、ユーディング肉腫、肺臓癌、頭頸部癌、子宮頸癌、卵巣癌、結腸直腸癌、骨肉腫、脳腫瘍、肝臓癌、リンパ腫、黒色腫、白血病、神経芽細胞腫、上咽頭癌、肛門癌、虫垂癌、癌腫、肉腫、皮膚癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脳幹神経膠腫、脳腫瘍、子宮癌、膣癌、陰茎癌、子宮体癌、眼癌、口腔癌、胆嚢癌、胃癌、精巣癌、腎臓癌、腸の癌、咽頭癌、または甲状腺癌であり得る。

30

【0030】

癌は遺伝的変異に関連付けられている場合がある。例えば、癌は、BRCA1、BRCA2、ATM、NBS、MRE11、BLM、WRN、RECQL4 (RECQL4)、FANCA、FANCB、FANCD1、FANCD2、FANCE、FANCF、FANCG、FANCI、FANCJ、FANCL、FANCM、FANCN、XPC、XPE (DDB2)、XPA、XPB、XPD、XPF、XPG、XPV (POLH)、hMSH2、hMSH6、hMLH1、hPMS2またはMUTYHのようなDNA修復に含まれる、遺伝子の変異に関連付けされ得る。癌は、PTEN、TP53、TMPRSS2、ERG、EWS、またはFLIにおける変異に関連付けされ得る。癌は、遺伝子融合に関連し、例えば、TMPRSS2：ERGまたはEWS：FLIに関連付けされ得る。

【0031】

本発明はさらに、本明細書中に記載のPARP阻害剤製剤を投与することによって、神経外傷、または神経変性疾患を治療する方法を含む。例えば、神経変性疾患は、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、運動ニューロン疾患、毛細血管拡張性運動失調症、常染色体優性小脳性運動失調、バッテン病、大脳皮質基底核変性症、クロイツフェルト・ヤコブ病、致死性家族性不眠症、遺伝性運動および近位優位と感覚神経障害、歩行運動失調、ライム病、マシャド・ジョセフ病、精神遅滞、多系統萎縮症、神経有棘赤血球症、ニーマン・ピック病、橋小脳低形成、タンパク質凝集、ピルビン酸脱水素酵素欠損症、レフサム病、サンドホフ病、シャイ・ドレーガー症候群、脊髄小脳変性症、脊髄の亜急性連合変性症、亜急性硬化性全脳炎、脊髄癆の背側、ティ・サックス病、中毒性脳症、毒性白質脳症、グラグラハリネズミ症候群、てんかん、統合失調症、認知症、脳の硬化症、障害性神経纖維、糖尿病、または脳の老人性変性に関連する神経変性の髓鞘形成であり得る。神経外傷は、外傷性脳損傷、外傷性神経損傷、術後神経

40

50

損傷、脊髄損傷、脳卒中または脳虚血であり得る。

【0032】

PARP阻害剤製剤は、静脈内、筋肉内、皮下、または頭蓋内注射によって投与することができる。本発明のナノ粒子のPARP阻害剤の製剤は、pH6.8、6.7、6.6、6.5、6.4、6.3、6.2、6.1、または6.0の如きpH7未満において、PARP阻害剤を放出する。製剤は、腫瘍を有する被験者に製剤の、例えば静脈内注射によるが如き、投与に続く、腫瘍細胞へのPARP阻害剤の選択的デリバリーが可能である。ナノ粒子PARP阻害剤製剤は、腫瘍塊を減少させ、および/または腫瘍を有する被験体に投与した場合、腫瘍細胞を死滅させることができる。被験体は、患者のようなヒト、または動物の被験体とすることができます。

【0033】

癌、神経外傷、または神経変性疾患を治療する方法はまた、治療の他の態様を含むことができる。例えば、本方法は、放射線療法、非PARP阻害化学療法、または手術に関連して本明細書に記載されるPARP阻害剤の製剤を投与することを含み得る。この方法は、放射線療法および/または非PARP阻害剤療法の1回以上を含むことができる。本明細書に記載のPARP阻害剤製剤は、または治療の他の態様の前、後または同時に投与することができる。

【0034】

当該治療方法は、ここに記載されたPARP阻害剤製剤を、1回または2回以上投与することを含み得る。

【0035】

本発明のナノ粒子状のPARP阻害剤の製剤は、オラパリブのような遊離のPARP阻害剤の投与と比較して、以下の利点を提供する：1) 高い生体適合性および生物学的利用能の増加、2) 血漿中の滞留時間を延長、3) 強化された浸透性および保持(EPR)に起因する、受動的な腫瘍への標的設定(ターゲッティング)、4) 腫瘍微小環境におけるpH応答性の放出プロファイル；および5) PARP阻害剤の大きく、速い核局在化。これらの利点は、効果的に腫瘍を破壊するために薬物の非常に高い臨床的に関連する用量を送達する必要性の観点から特に重要である。

【0036】

本発明は、また、包装材料と、本明細書に記載される治療方法のいずれかを実行するための説明書と共に、本明細書に記載のPARP阻害剤の製剤のいずれかを含むキットを含む。

【実施例】

【0037】

実施例1：材料及び方法

ナノ・オラパリブの合成：

1,2-ジパルミトイール-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DPPC)、コレステロール、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000](DSPE-mPEG-2000)、1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン(塩化物塩)(DOTAP)はアバンティ・ポーラー・リピッド(アラバスター、アラバマ州)から購入した。簡単に言えば、すべての脂質およびポリマー(アバンティ・ポーラー・リピッド)は、オラパリブとは、クロロホルムに溶解し、溶媒を脂質-ポリマー-オラパリブ溶融物を形成するために蒸発させた。フィルムは、一晩真空中で乾燥させ、プレ油中水エマルジョン化のために50℃で水性溶媒で水和した。プレエマルジョンは10分間室温で超音波処理し、オラパリブの高度に凝縮した脂質ナノ粒子を産出した。

【0038】

HPLC分析：カプセル化されたオラパリブの濃度はHPLCを用いて測定した。移動相はメタノールで最適化された：水(64:36)を逆相C18カラム(SUPELCOTM)上で実行し、オラパリブは207 nmで検出された。以下の検討に使用される全ての用量は、上記のように移動相に連続的に希釈したオラパリブ溶液の作業範囲を用いて得られた標準曲線から導かれた。バッチ全体の積載効率は約80~90パーセントであった。

【0039】

ナノ・オラパリブの物理化学的特性：粒子サイズがゼータプラス粒子サイジングソフト

10

20

30

40

50

ウェアバージョン5.23（ブルックハイブン・インスツルメンツ・コーポ社）を用いて測定した。粒子サイズに関する安定性が、4で24時間、5ヶ月および7ヶ月の保存の後で、測定された。粒径のpH依存性の変化は、0分および10分、各バッファにナノ・オラパリブをインキュベートしたのちに、pH7.4およびpH6で測定した。

【0040】

透過型電子顕微鏡：我々は、次に透過型電子顕微鏡（TEM）JEOLモデルJEM-1000顕微鏡を用いてナノオラパリブを調べた。ナノオラパリブを配合し、サンプルをPBSで50倍に希釈した。一酸化ケイ素のホルムバールコーティングされた200メッシュグリッドは、撮像のために使用された。簡単に説明すると、グリッドは1分間、濾過水の滴で洗浄し、ろ紙で乾燥プロットした。試料の10 μL等分量を、1分間、グリッド上にピペットで滴下し、1%酢酸ウラニル染色に続いてプロット乾燥し、グリッドを室温で乾燥させた。濾過された水の滴が、再度ピペット計量し、室温で乾燥させた。TEM顕微鏡写真は、80kVの加速電圧でAMTカメラシステムを用いて捕捉した。顕微鏡の倍率バーは500nmである。

10

【0041】

放出試験は：放出試験はナノ・オラパリブのために修正された、透析に基づいて行われた。簡単に言うと、PBSまたはFBSのいずれかを55%に希釈した0.4 mLのナノ・オラパリブの量は、セルロースエステル膜とフロー-A-ライザー（R）G2（スペクトラム^{（R）}ラボラトリーズ、インク、カタログ番号G235025）に装填した。透析バッグは、CaおよびMgを含まないPBSの80mLに懸濁し、37±0.5に維持し、絶えずビーカー内の適切なサイズのテフロン（登録商標）被覆磁気攪拌棒を使用して、200 r.p.mで回転させた。7日間に渡って所定の時間間隔で、リリースメディア（ビーカー内）からの1mLの等分量をサンプリングし、新鮮なPBSを1mL、37に保って置換した。1mLの等分量のオラパリブ濃度は、HPLCを用いて定量され、そして全ての実験は二度行った。

20

【0042】

ナノ・オラパリブの体外の特徴付け：体外での研究のために、発明者らはPTEN欠損ヒト前立腺癌細胞株PC3（ATCC）、LNCaP細胞（ATCC）およびマウス細胞株FK01を使用した。すべての細胞株はATCCによって示唆された適切な培地中に維持された。簡単に言えば、完全な培地は、ハイクローン（FBS）からF12-K（PC3）、RPMI（LNCaP細胞）およびDMEMへ10%ウシ胎児血清を添加することにより製剤され、それらは、ウシ下垂体抽出物、（Life Technologies社：カタログ番号13028014）などの成長因子で補充され、最終濃度25 μg/ml、インスリン、（シグマアルドリッヂ カタログ番号：16634-50mg）最終濃度5 μg/ml、EGF（ライフテクノロジー社カタログ番号：PHG0311）、最終濃度6ng/ml（FK01で補充された。FK01細胞は、コラーゲンコートプレート（VWRカタログ#：47743-656）上で増殖させた。CellTiter-Glo（登録商標）発光細胞生存試薬は、Promega、CAカタログ番号G7570）からオーダーされた。クローニ原性アッセイキットは、カタログ番号CODE：CA-001、BioPioneer、CAから購入された。

30

【0043】

体外試験のための照射：放射線は小動物放射線研究プラットフォーム（SARRP）DFCI、固定されたフィールド照射が可能のX線管とフラットパネル撮像器を搭載した構台、回転療法とコーンビームCT（CBCT）撮像を使用してデリバリされた。SARRPは、220 keVのX線の複数の円弧状小フィールド照射を送達することができる、より均一な線量プロファイルを有する、近接照射療法源によって生成される線量分布のサイズに匹敵する放射分布を形成することができる。ここで、放射線量は、24時間オラパリブ/ナノ・オラパリブで前処理した細胞に照射する2 Gy（5.6Gy/分、22秒間）と4 Gy（5.5Gy/分、44秒間）に最適化された。

40

【0044】

核局在化および初期DNA損傷決定：様々な処理条件の細胞株におけるPARP、PARylation、PARP開裂およびH2AXを含む初期のDNA損傷及びPARP阻害経路の損傷を評価するためには、免疫蛍光法（共焦点）およびウェスタンブロッティングアッセイの両方のための放射線のあり、なしで、前立腺癌細胞株を20 μMのオラパリブ/ナノオラパリブに露出し、10

50

0,000細胞で播種した。PARP-1はDNA鎖開裂によって強力に活性化される116 kDaの核タンパク質である。アポトーシスの間、例えば、カスパーゼ-3及び-7のようなタンパク質は、85キロダルトン及び25 kDaのフラグメントを生成するために、PARPを開裂する。アポトーシスの核局在および程度は、核PARP開裂アッセイおよびウェスタンプロットを用いて測定したすべての細胞株の様々な治療のためにPARP、PAR、および H2AXの相対的な細胞濃度を決定するために使用された。簡単に述べると、薬剤を添加する前に、24時間、105細胞/ウェル(井戸)の滅菌カバースリップ上の6ウェルプレートに播種した。細胞は、それらが照射した後、または4時間のいずれかのため、薬物とともにインキュベートされた。このように処理された細胞は、さらなる分析のためにそれらを固定する前に、37 °で1時間インキュベートされた。

10

【0045】

全細胞溶解物についてのウェスタンプロット：ウェスタンプロッティングのために、細胞溶解物を、プロテアーゼ (Roche社) を補充したNP40バッファ (ボストンバイオプロダクト社) とHALTホスファターゼ阻害剤カクテル (サーモサイエンティフィック社) を用いて調製し、続いてSDS-ゲル分離 (インヴィトロゲン社) およびウェスタンプロッティングに付される。以下の抗体をウェスタンプロッティングに使用した：抗 H2AX (#9718、セルシグナリング社)、抗PAR (トレヴィゲン社)、抗PARP (9542; セルシグナリング社)、および抗 アクチン (AC-74、シグマ社)。得られたウェスタンプロットをイメージJソフトウェアを用いて定量した。イメージJ分析のために、PAR濃度は、最初のローディングアクチンコントロールに対して正規化し、その後処置群で利用可能のPARP-1に対して正規化された。

20

【0046】

共焦点顕微鏡を使用する核PARP開裂解析：細胞を1%ホルマリンで固定し、37 °で15分間保持した。細胞の定着剤がなくなるまでカバースリップは、3回PBS洗浄(各3分)された。細胞は、30分間、0.5%トウイーン80を含むPBSを用いて再水和し、緩衝剤で洗浄し、抗PARP開裂部位 (214/215) の特定の抗体、FITCコンジュゲート (ライフテクノロジー社、NY、カタログ番号44-699) で1時間インキュベートした。この抗体は、開裂されたPARPの85kDaの断片を特異的に認識し、アポトーシス細胞を検出するためのマーカーとして使用することができる。カバーガラスを2回洗浄し、使用するスライドガラス上にマウントし、エッジはマニキュア液を用いて封止した。画像はオリンパスFV1000、多光子共焦点顕微鏡 (オリンパス・アメリカ社、セントラルバレー、カリフォルニア州) を用いて撮影した。開裂PARP (FITC) およびDAPIの撮像用に用いられた励起フィルタは、それぞれEx-488、405であった。発光フィルターは、FITCおよびDAPIに対してそれぞれ530、458 nmに設定した。すべての画像は60倍の対物レンズで撮影した。さらなる分析は、画像Jで行われた。擬似カラーがRGB形式の画像に割り当てられ、そこにおいては、DAPI(緑)、開裂されたPARP(赤)とマージされた画像は、次のセクションで報告された。統計的有意性は、双方向ANOVAおよびグラフパッドプリズムにおけるダネットの多重比較検定を用いて分析された。

30

【0047】

放射線増感した後の遅延生存率分析：いくつかの研究に基づいて、発明者らはオラパリブとナノ・オラパリブとの無線-増感の長期的な効果を決定するために、一般的なクローリン原性分析プロトコルを変更した (42、43)。パーセント細胞生存率は、2 Gyおよび4 Gyの線量で修飾クローリン原性分析を用いて測定された。照射は、前立腺癌細胞株、LNCaP P C3及びFK01において、上記のようにして行なわれた。簡単に説明すると、細胞は、105細胞/ウェル(井戸)で、一晩インキュベートし、関連するすべてのコントロールを含む20 μMのオラパリブ相当のオラパリブ/ナノ・オラパリブで処理し、4時間後に照射し、1時間インキュベーターでそれらを放置した。次いで、細胞をトリプシン処理し、複製における様々な処理の細胞懸濁液を回収した。自動細胞計数器及び各処置群から10,000 ~ 20,000細胞を用いて決定した細胞密度を計算し、新たな6ウェルプレートに播種した。細胞は、各細胞株について約9倍加サイクル(特殊)の間インキュベートされ、コロニーを固定し

40

50

、クリスタルバイオレット染色を用いて染色した。過剰な染色は、脱イオン水を用いて洗浄除去し、画像はデジタルカメラを用いて撮影した。染色は、すべての細胞株についてオラパリブとナノ・オラパリブ処理の効果を定量化するために、酢酸に溶解した。

【0048】

CalcuSynを使用する相乗効果の決定：上記・オラパリブ処理に応答して影響をされた細胞の割合 (Fa) が決定された。単独で照射との併用療法によって影響を受けた細胞のフラクションを遅延細胞生存率分析によって決定し、これらの値は、相乗効果の分析を実行するために利用された。Chou-Talalay (チョウ - タラレイ) のアイソボログラム式に基づいて、CalcuSyn (バイオソフト) によって配合された、非一定の比率の組み合わせの設計は、組み合わせ指数を計算するために使用された (44)。全ての細胞は照射の用量の増加に伴って20 μ Mのオラパリブまたはナノオラパリブに曝露された。CI値は、アイソボログラムから生成された。全てのアッセイは二連で行った。バーは、照射との組み合わせでのLN CaP、PC3およびFK01上のオラパリブとナノ・オラパリブのコンビネーションインデックス (CI) を表す。全ての処置群に対して生成されたCI値は、重複した実験に由来する棒グラフで報告されている。Chou-Talalayの方法によって示されるように、相乗効果の程度が想定される。コンビネーションインデックス > 1の場合は、増加する相加を表し、CI値 < 1の場合は、増加する相乗効果を表し、0.1~0.3または0.3~0.7の間のCI値は、明らかな相乗効果を表し、0.85から1.10の範囲の値は、わずかな相乗作用または相加効果を示す。

10

【0049】

ナノオラパリブの体内特徴付けのためPtenpc - / - ; Trp53pc - / - GEMM前立腺癌：すべての動物は、実験動物のケアのための制度規則および倫理ガイドラインに従って、BIDMC / ハーバード大学医学部の動物施設で飼われた。全ての動物実験は、BIDMC IACUCプロトコル066-2011によって承認された。Ptenpc - / - ; Trp53pc - / - GEMMsは前述のようにが開発された (19、45)。簡単に言えば、雌のPtenのloxP / loxP ; Trp53のloxP / loxP配列は、PtenおよびTrp53の前立腺特異的欠失のための雄のPB-Cre4トランスジェニックマウスと交配した。Pb-Cre4の存在下、PtenおよびTrp53の再結合が3個の前立腺ロープ、すなわち前部前立腺、腹側前立腺および前立腺背側に限定され、マイナーな組換えが精嚢に発生した。それはPtenおよびTrp53の不活性化の組み合わせに、HG-PINは100%のマウスから、3つのロープで発見したこと、およびPtenpc - / - ; Trp53pc - / - の年齢10週までのマウス (N = 12) の50%に、浸潤性前立腺癌が観察された。11週までに、侵襲性の腺癌はPtenpc - / - ; Trp53pc - / - 突然変異体に限定されていた (19)。ナノ・オラパリブに対するオラパリブの前臨床評価のために、Ptenpc ; Trp53pc - / - マウスは、前立腺腫瘍の存在下、生後4ヶ月でMRIによって評価され、続いて登録された。体内での治療研究のために、DMSO (50 mg / ml) でオラパリブ (LC Laboratories社) をベヒクル溶液 (10%2-ヒドロキシプロピル - シグマデキストリン (シグマ社) / PBS) で希釈し、10 μ L / g体重の最終注射量にした。オラパリブは、腹腔内注射により毎日50mg / kgの用量で注射投与した。ナノ・オラパリブは、50mg / kg / 投与を達成するために、ストック (200c.c) から直接腹腔内注射した。

20

30

【0050】

メタボロミックな分析：以前に記載のようにオラパリブのLCMS/ MSについて、薬物動態学代謝物質は、マウス腫瘍サンプルから抽出し、分析した (2、46)。サンプルはオラパリブのための435.2/281.3のQ1 / Q3遷移を用いて測定された。標準曲線のために、オラパリブが40%メタノール中1mMから1nMの10-1希釈で調製された。オラパリブの濃度は、腫瘍の重量に対して正規化された。

40

【0051】

MRI画像形成および分析：腫瘍の増殖および治療効果をモニターリングするために、以前記載されているように (18)、マウスの前立腺画像はMRIスキャナ (モデルM2の1T ASPECTマグネットテクノロジーズ社、ネタニア、イスラエル) に取り込まれ、画像化された。以前記載のように (47)、腫瘍体積の定量化を行った。

50

【0052】

組織病理学：マウスはその後、2週間の治療後に屠殺され、そしてオラパリブとナノ・オラパリブグループについての腫瘍、脾臓、肝臓と腎臓を回収した。組織を4%パラホルムアルデヒド中で固定し、標準的な手順に従って、パラフィンに包埋した。5 μmの厚さの腫瘍組織切片は、マイクロームHM550クライオスタットを使用して（サーモサイエンティフィック、ピツツバーグ、PA）、清浄なスライド上に載せられ、H&E染色が行われ、切片の埋め込みおよびH&E染色がBIDMCにおける組織学コアによって行われた。

【0053】

実施例2：高濃縮腫瘍pH応答性ナノ・オラパリブの製剤

すべての最適化ステップは、臨床的に関連する濃度において、体外または体内試験で調整され、すぐに使用する注射製剤を得るために、オラパリブ送達のための非常に凝縮されたpH応答性ナノ製剤を処方することに対して目標にされた。

ナノ粒子の粒径分布は、以下のようにいくつかのバッチに渡って見られるように100~120ナノメートルであり、透過型電子顕微鏡(TEM)(図4B)で分析したが、動的光散乱(DLS)測定(図4A)と協調している。具体的に漏れやすい腫瘍血管系(31,32)によって、このサイズ範囲の周辺のナノ粒子は、ナノ・オラパリブの受動的取り込みのために最も適していることはよく知られている。DLS測定によって確認されたように、ナノ粒子製剤は、少なくとも5ヶ月間安定であるが、4で、7ヶ月貯蔵後の粒子サイズの顕著な増加があった(図4A)。

【0054】

実施例3：ナノ・オラパリブはpH7.4におけるに比して、腫瘍pHにおいて大きな薬剤解放を示す。

ナノ粒子の成分はナノ・オラパリブが、高血清培地(血中濃度をシミュレートした)の存在下で、pH7.4の(血液)で無傷のままであるが、酸性pH6に応答してバースト放出を示すように、最適化された。それは、腫瘍微小環境とエンドソーム小器官で流行している。実際、ナノ・オラパリブは、pH7.4およびpH6において(図4E)、血清中のオラパリブおよびナノ・オラパリブの体外放出試験に見られるように、pHが放出動態学を引き起こすことを実証した。オラパリブの血液pHにおける放出と比較して、血清の存在下、腫瘍のpHにおいてはオラパリブの放出は7.5倍高い。オラパリブのなしの場合に比べて、ナノ・オラパリブの放出プロファイルは、ナノ・オラパリブのために、血液中のより長い滞留時間を意味する(図4D)。消失速度の動力学は、これらの体外研究において考慮されていない。pH6において、ナノ・オラパリブの大きさの急激な増加は、脂質ナノ粒子の外側の層の膨潤を可能にし、酸性pHトリガでの爆発的放出を可能にすると考えられている(図4C)。

【0055】

実施例4：ナノ・オラパリブの体外特性のための前立腺癌細胞株

ナノ・オラパリブとオラパリブの有効性は、LNCaP細胞、PC3とFK01で分析され、同時にPARおよびH2AXのようにPARP応答のバイオマーカーの差動レベルが決定された。結果は、実施例5,6で説明されている。

【0056】

実施例5：ナノ・オラパリブはPAR化を阻害する。

PARP-1の細胞機能を酵素的に負に荷電したポリマーによって媒介され、ポリADPリボシル(PAR)とは、PARP阻害の有効性を評価するためのバイオマーカーとして使用することができる。付随照射有りまたは無しでナノ・オラパリブの機能性を確立するために、全細胞溶解物をウェスタンプロット分析を使用して、PC3のPARレベル(PAR化)を決定するために分析した。PC3(図5A)のPAR化プロットは、細胞の照射後に1時間で、ナノ・オラパリブで前処理された、潜在的により高い細胞への取込みは、オラパリブ処理した細胞と比較して、PAR化の大きな抑制があったことを示している。予想されたように、0 Gyから4 Gyの放射線量の増加は、PAR化を増加したが、核内のPAR化阻害のために利用可能なナノ・オラパリブの濃度は、PC3でのオラパリブがない場合(図5B)のそれよりも大きかった。

10

20

30

40

50

【0057】

実施例6：ナノ・オラパリブはYH2Axの発現を増加する。

広範な細胞性DNA修復機構は、PARを含む多くのサイトゾルタンパク質、および、ヒストン／ヒストンバリアント（H2AX）の動員によって調節されている（33）。ここでは、H2AXの初期発現はLNCaPs（図5C）で研究された。ナノ・オラパリブが修復プロセス（図3B）を抑止するようにオラパリブに比べてより有利な時空間的利用可能性を持っている、という仮説を強化し、LNCaPsが体外で、ナノ・オラパリブで処理された場合、H2AX発現が最も高かった。

【0058】

実施例7：核開裂PARP分析はナノ・オラパリブの早急かつ大きな核局在化を実証する。

PARP開裂は、アポトーシスの古典的な特徴の一つであると考えられている。開裂されたPARPのような照射後のアポトーシスのバイオマーカーは、PARP-1が、核（5）におけるクロマチンの再編成の際に主要な役割を果たしている、抑止DNA損傷応答の如き、基本的な事象に頻繁に依存している。したがって、次のステップは、ナノ・オラパリブは、特に核に薬物を送達し、DNA損傷修復経路及び／又はアポトーシス活性に対する阻害作用を引き起こすかどうかを決定することであった。開裂されたPARPの程度は、共焦点分析を使用して、1時間の放射線後照射を決定し、核の面積と放射線照射有り無しでのオラパリブとナノ・オラパリブ処理した細胞中の開裂されたPARPの発現を検討した。最大PARP開裂は、ナノ・オラパリブで処理した細胞内、2 Gyでの照射で観察された。一般に、PARP開裂の程度は、照射細胞 < オラパリブ処理細胞 + 2 Gy の ナノ・オラパリブで処理した細胞 + 2 Gy で試験したすべての細胞株における明確な傾向に従う。

【0059】

まず、3倍の増加がオラパリブ／ナノ・オラパリブ処理後のLNCaP（緑）の核の領域で観察された（図9）。LNCaP細胞において、開裂PARP（赤）は、両方の薬剤で単剤療法の際に20倍に増加したが、照射された試料に、ナノ・オラパリブ処理した細胞でさらに3倍の増加が見られた（図6B）。またオラパリブ処理したLNCaPsにおいて、開裂されたPARPは、主に核周辺領域で発見されたことが観察されたが、同じ時間枠で、ナノ・オラパリブ処理した細胞は、放射線増感剤として使用した場合、核の内部で開裂されたPARPの活性を示し、オラパリブの空間・時間送達の重要性を強調した。PC3細胞では、オラパリブ処理対照に比べて、2 Gyでのナノ・オラパリブ処理した細胞中の核の開裂されたPARPで約10倍の増加と、4Gyにおいて約6倍の増加があった（図6C、6D）。ナノ・オラパリブで前処理した照射FKO1核はまた、それぞれのオラパリブ処理対照に比べて2 Gyで、核開裂されたPARPレベルの～8倍の増加を示しました、4Gyで20倍の増加を示した（図6E、6F）。核の大きさに顕著な変化は、PC3とFKO1で見られなかった（図9）。空のナノ粒子コントロールは、試験した細胞株では、極最小限の開裂されたPARPを誘導した（図示せず）。

【0060】

照射により誘導される細胞死経路におけるナノ・オラパリブの早期介入は、上記の分析から非常に明白で、すべての細胞株において、ナノ・オラパリブが有意に良好な放射線増感剤であることを示唆し、それは、オラパリブなしの場合に比べて、ナノ粒子を介して送達した場合、オラパリブのより大きな、より高速の核局在化に起因する（図3B）。

【0061】

実施例8：ナノ・オラパリブはオラパリブよりも良い放射線増感剤である。

オラパリブとナノ・オラパリブの長期／遅延放射線増感効果を研究するために、従来のクローン原性アッセイは、LNCaP、PC3及びFKO1の長期パーセント細胞生存率（図7A）を測定するように変更された。一般に、放射線感受性が、LNCaPs（単独で、2 Gyの照射に起因して80%の細胞死）に対して、続いてPC3（2 Gyで30%の細胞死）、FKO1s（2 Gyで17%の細胞死）までと最も高いことが観察され、FKO1が全ての細胞株の中で最も放射線抵抗性であることにされた。2Gyにおけるパーセント細胞生存率は、ナノ・オラパリブとインキュベートした細胞は、同じ用量でオラパリブの放射線増感を比較したら、大きい細胞死（PC3s 90%とFKO1s、76%）を示したことを示す（PC3s 80%、FKO1-68%）。同様に、4 Gy

10

20

30

40

50

の放射線と組み合わせナノ・オラパリブ治療とパーセント細胞生存率曲線は、同じ用量 (LNCaPs-95%、PC3s-89%、FK01-82%) でオラパリブとの放射線増感に比べて大きい細胞死滅 (LNCaPs-97%、PC3s-93% と FK01s-83%) を示した。ナノ・オラパリブの単独療法は、また、オラパリブ単独 (LNCaP-46%、PC3-78%、FK01-53%) を用いた治療と比較して、有意に高い細胞死 (LNCaP-60%、PC3-91%、FK01-64%) を誘発した (図7B)。キーの遺伝形質および特性は、前立腺癌細胞株、LNCAP、PC3とFK01の我々の選択のための理論的根拠、および本研究における観測の要約を概説した (図7D)。

【0062】

実施例9：ナノ・オラパリブは放射線で相乗的活動を示した。

CalcuSynソフトウェアを用いて計算された組合せインデックス (図7C) は、全ての細胞株および治療において、ナノ・オラパリブは、オラパリブのない場合に比べ（ますます相乗的な）低いICI値を有することが判明した。併用療法は、オラパリブで処理した場合、添加剤の効果がPC3の中で見ている間に、LNCaPsにおいて、続いてFK01において、高度に相乗的であるように思われる。FK01は、その放射線抵抗性の性質と放射線感受性との相乗効果を考慮し、ナノ・オラパリブ処理の最大の利点がある。全ての細胞株において、2 Gyの場合と比較してより4Gyの場合に高い照射線用量において、より大きな相乗作用が観察され、それは、PC3細胞において相乗効果を向上させる余地があることを示している。

【0063】

実施例10：ナノオラパリブ（腹腔内）は、前立腺癌のPtenpc-/-;Trp53pc-/- GEMMsにおけるオラパリブの場合に比べて20倍高い累積を示す（背の前立腺葉）。

本発明者らは、そのPtenpc-/-;Trp53pc-/-とGEMMマウスが、FK01細胞株が、それに由来し、ナノオラパリブの腫瘍蓄積および治療効果を調査するためにCRPCの適切なモデルとして役立つと推論した (図8A)。方法の項で述べたように、オラパリブとナノ・オラパリブの前立腺腫瘍の蓄積、およびそれに続く2週間の治療レジメン (摂生) を測定した。正規化されたオラパリブ数は、すべての前立腺葉中の遊離薬剤投与 (図8B) と比較して、ナノ送達を介して、より大きなオラパリブの蓄積を示す。ナノ・オラパリブの蓄積の増加倍率は、背側前立腺葉の20倍と測定され、腹腔内に投与したとき、すべての葉の平均蓄積は、オラパリブのない場合に比べて、約10倍高い (図8C)。

【0064】

実施例11：ナノ・オラパリブは前立腺癌のPtenpc-/-;Trp53pc-/- GEMMsにおいて腫瘍容積を減少させる。

前のセクションで説明したように、両方の腫瘍サプレッサー、PTENおよびp53の遺伝子切除は、去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) に進行する癌と相關している (27-29)。オラパリブとナノ・オラパリブの治療の治療的応答は、上記のセクションで述べたように、MRI分析を用いて、体内のGEMMsで、背外側および腹側前立腺ロープの容積の変化倍率の点でここに報告されている (図8D)。一般的には、固形腫瘍は、腫瘍の最も積極的な亜集団であり、こうして固形腫瘍体積の変化倍率がここに報告されている。腹側と背側の前立腺葉の量の倍数変化は、日日1の未処理腫瘍と比較して、14日間の治療後に分析された。遊離のオラパリブは、腫瘍を保有するロープにおいて、1.5~2.5倍の増加を示しているが、ナノ・オラパリブは、腫瘍を安定化するだけでなく、ナノ・オラパリブの最高蓄積 (オラパリブのない場合より約20倍高い) があった背外側ロープ中で、約1.5倍の腫瘍体積を減少させた (図8B)。

【0065】

実施例12：ナノオラパリブは1次RES器官において最小の毒性を示す。

RES器官におけるナノ・オラパリブの毒性プロファイルを調べた (図8C)。肝臓、腎臓および脾臓のH&E染色は、ナノ・オラパリブに腹腔内用の安全なベヒクルを提供する、オラパリブ処理マウス (マウスID206) およびナノ・オラパリブ処理マウス (マウスのID207) との間の顕著な差を示していない。空のナノ粒子 (ベヒクル) の毒性を調べる予備的研究は、3匹のマウスを行った。これらの研究においては、全くの体重減少または形態学的变化も、見られなかった (データは報告されていない)。

10

20

30

40

50

【0066】

「から本質的になる」は、本明細書で使用されるように、実質クレームの基本的及び新規な特徴に影響を及ぼさない、材料又はステップを排除するものではない。本明細書において、特に組成物またはデバイスの要素の説明における構成要素の説明において、用語「含む (comprising)」の任意の列挙は、「本質的になる」または「からなる」と置き換えることができる。

【0067】

本発明は特定の好ましい実施形態に関連して説明をして来たが、当業者は、前述の明細書を読んだ後、本明細書に記載の組成物および方法に種々の変更、均等物の置換、およびその他の変更を行うことができるようになる。

10

【0068】

[参考文献]

1. Audeh MW, Carmichael J, Penson RT, Friedlander M, Powell B, Bell-McGuinn KM, et al. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet.* 2010;376:245-51.
2. Juvekar A, Burga LN, Hu H, Lunsford EP, Ibrahim YH, Balmana J, et al. Combining a PI3K inhibitor with a PARP inhibitor provides an effective therapy for BRCA1-related breast cancer. *Cancer discovery.* 2012;2:1048-63.
3. Tutt A, Robson M, Garber JE, Domchek SM, Audeh MW, Weitzel JN, et al. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet.* 2010;376:235-44.
4. Gelmon KA, Tischkowitz M, Mackay H, Swenerton K, Robidoux A, Tonkin K, et al. Olaparib in patients with recurrent high-grade serous or poorly differentiated ovarian carcinoma or triple-negative breast cancer: a phase 2, multicentre, open-label, non-randomised study. *The lancet oncology.* 2011;12:852-61.
5. Kim MY, Zhang T, Kraus WL. Poly(ADP-ribosylation) by PARP-1: 'PAR-laying' NAD⁺ into a nuclear signal. *Genes & development.* 2005;19:1951-67.
6. Luo X, Kraus WL. On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1. *Genes & development.* 2012;26:417-32.
7. Ashworth A. A synthetic lethal therapeutic approach: poly(ADP) ribose polymerase inhibitors for the treatment of cancers deficient in DNA double-strand break repair. *Journal of clinical oncology:official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2008;26:3785-90.
8. Hirai T, Shirai H, Fujimori H, Okayasu R, Sasai K, Masutani M. Radiosensitization effect of poly(ADP-ribose) polymerase inhibition in cells exposed to low and high linear energy transfer radiation. *Cancer science.* 2012;103:1045-50.
9. Senra JM, Telfer BA, Cherry KE, McCrudden CM, Hirst DG, O'Connor MJ, et al. Inhibition of PARP-1 by olaparib (AZD2281) increases the radiosensitivity of a lung tumor xenograft. *Molecular cancer therapeutics.* 2011;10:1949-58.

20

30

40

50

10. Miura K, Sakata K-i, Someya M, Matsumoto Y, Matsumoto H, Takahashi A, et al. The combination of olaparib and camptothecin for effective radiosensitization. *Radiation Oncology*. 2012;7:62.
11. Han S, Brenner JC, Sabolch A, Jackson W, Speers C, Wilder-Romans K, et al. Targeted radiosensitization of ETS fusion-positive prostate cancer through PARP1 inhibition. *Neoplasia (New York, NY)*. 2013;15:1207-17.
12. Barreto-Andrade JC, Efimova EV, Mauceri HJ, Beckett MA, Sutton HG, Darga TE, et al. Response of Human Prostate Cancer Cells and Tumors to Combining PARP Inhibition with Ionizing Radiation. *Molecular cancer therapeutics*. 2011;10:1185-93.
13. Dong Y, Bey EA, Li LS, Kabbani W, Yan J, Xie XJ, et al. Prostate cancer radiosensitization through poly(ADP-Ribose) polymerase-1 hyperactivation. *Cancer research*. 2010;70:8088-96.
14. Olaparib shows promise in multiple tumor types. *Cancer discovery*. 2013;3:OF 5.
15. Bundred N, Gardovskis J, Jaskiewicz J, Eglitis J, Paramonov V, McCormack P, et al. Evaluation of the pharmacodynamics and pharmacokinetics of the PARP inhibitor olaparib: a phase I multicentre trial in patients scheduled for elective breast cancer surgery. *Investigational new drugs*. 2013;31:949-58.
16. Garcia KP, Zarschler K, Barbaro L, Barreto JA, O'Malley W, Spiccia L, et al. Zwitterionic-Coated "Stealth" Nanoparticles for Biomedical Applications: Recent Advances in Countering Biomolecular Corona Formation and Uptake by the Mononuclear Phagocyte System. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*. 2014.
17. Staropoli N, Ciliberto D, Botta C, Fiorillo L, Grimaldi A, Lama S, et al. Pegylated liposomal doxorubicin in the management of ovarian cancer: A systematic review and metaanalysis of randomized trials. *Cancer biology & therapy*. 2014;15.
18. Lunardi A, Ala U, Epping MT, Salmena L, Clohessy JG, Webster KA, et al. A co-clinical approach identifies mechanisms and potential therapies for androgen deprivation resistance in prostate cancer. *Nature genetics*. 2013;45:747-55.
19. Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin HK, Dotan ZA, Niki M, et al. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature*. 2005;436:725-30.
20. Kirby M, Hirst C, Crawford ED. Characterising the castration-resistant prostate cancer population: a systematic review. *International journal of clinical practice*. 2011;65:1180-92.
21. Mazzucchelli R, Scarpelli M, Lopez-Beltran A, Cheng L, Di Primio R, Montironi R. Treatment effects in prostate cancer following traditional and emerging therapies. *International journal of immunopathology and pharmacology*. 2013;26:291-50.

8.

22. Won AC, Gurney H, Marx G, De Souza P, Patel MI. Primary treatment of the prostate improves local palliation in men who ultimately develop castrate-resistant prostate cancer. *BJU international*. 2013;112:E250-5.

23. Oplustilova L, Wolanin K, Mistrik M, Korinkova G, Simkova D, Bouchal J, et al. Evaluation of candidate biomarkers to predict cancer cell sensitivity or resistance to PARP-1 inhibitor treatment. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2012;11:383 7-50.

10

24. Fraser M, Zhao H, Luoto KR, Lundin C, Coackley C, Chan N, et al. PTEN deletion in prostate cancer cells does not associate with loss of RAD51 function: implications for radiotherapy and chemotherapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18:1015-27.

25. Schieler MJ, Goodwin JF, Han S, Brenner JC, Augello MA, Dean JL, et al. Dual roles of PARP-1 promote cancer growth and progression. *Cancer discovery*. 2012; 2:1134-49.

20

26. Chatterjee P, Choudhary GS, Sharma A, Singh K, Heston WD, Ciezki J, et al. PARP inhibition sensitizes to low dose-rate radiation TMPRSS2-ERG fusion gene-expressing and PTEN-deficient prostate cancer cells. *PLoS one*. 2013;8:e60408.

27. Martin TJ, Peer CJ, Figg WD. Uncovering the genetic landscape driving castration-resistant prostate cancer. *Cancer biology & therapy*. 2013;14:399-400.

28. Phin S, Moore MW, Cotter PD. Genomic Rearrangements of in Prostate Cancer. *Frontiers in oncology*. 2013;3:240.

30

29. Grasso CS, Wu YM, Robinson DR, Cao X, Dhanasekaran SM, Khan AP, et al. The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature*. 2012;487:239-43.

30. Ittmann M, Huang J, Radaelli E, Martin P, Signoretti S, Sullivan R, et al. Animal models of human prostate cancer: the consensus report of the New York meeting of the Mouse Models of Human Cancers Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer research*. 2013;73:2718-36.

31. Jain RK. Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001;46:149-68.

40

32. Campbell RB, Fukumura D, Brown EB, Mazzola LM, Izumi Y, Jain RK, et al. Cationic charge determines the distribution of liposomes between the vascular and extravascular compartments of tumors. *Cancer research*. 2002;62:6831-6.

33. Rogakou E, Nieves-Neira W, Boon C, Pommier Y, Bonner W. Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J Biol Chem*. 2000;275:9390 - 5.

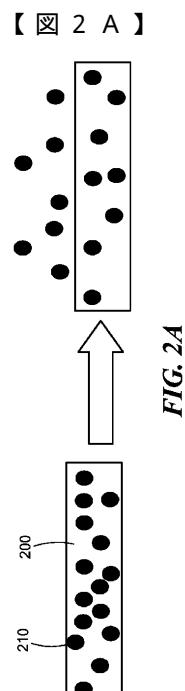
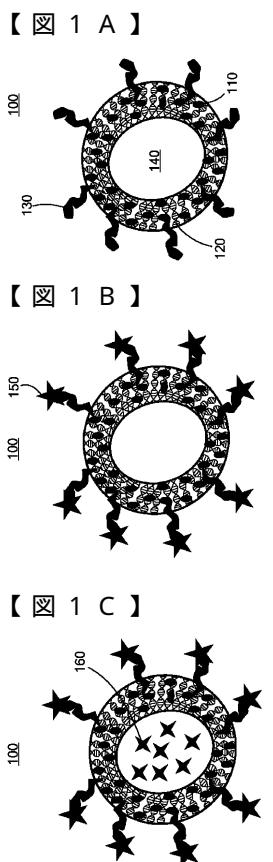
50

34. Polkinghorn WR, Parker JS, Lee MX, Kass EM, Spratt DE, Iaquinta PJ, et al. Androgen receptor signaling regulates DNA repair in prostate cancers. *Cancer discovery*. 2013;3:1245-53.
35. Vitale I, Galluzzi L, Castedo M, Kroemer G. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2011; 12:385-92.
36. Riganti C, Voena C, Kopecka J, Corsetto PA, Montorfano G, Enrico E, et al. Liposome-encapsulated doxorubicin reverses drug resistance by inhibiting P-glycoprotein in human cancer cells. *Molecular pharmaceutics*. 2011;8:683-700. 10
37. Fedoruk MN, Gimenez-Bonafe P, Guns ES, Mayer LD, Nelson CC. P-glycoprotein increases the efflux of the androgen dihydrotestosterone and reduces androgen responsive gene activity in prostate tumor cells. *The Prostate*. 2004;59:77-90.
38. Zietman AL, Bae K, Slater JD, Shipley WU, Efstathiou JA, Coen JJ, et al. Randomized trial comparing conventional-dose with high-dose conformal radiation therapy in early-stage adenocarcinoma of the prostate: long-term results from proton radiation oncology group/american college of radiology 95-09. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28:1106-11. 20
39. Kuban DA, Tucker SL, Dong L, Starkschall G, Huang EH, Cheung MR, et al. Long-term results of the M. D. Anderson randomized dose-escalation trial for prostate cancer. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2008;70:67-74.
40. Shappell SB, Thomas GV, Roberts RL, Herbert R, Ittmann MM, Rubin MA, et al. Prostate Pathology of Genetically Engineered Mice: Definitions and Classification. The Consensus Report from the Bar Harbor Meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer research*. 2004;64:2270-305. 30
41. Lee HJ, Yoon C, Schmidt B, Park do J, Zhang AY, Erkizan HV, et al. Combining PARP-1 inhibition and radiation in ewing sarcoma results in lethal DNA damage. *Molecular cancer therapeutics*. 2013;12:2591-600.
42. Abazeed ME, Adams DJ, Hurov KE, Tamayo P, Creighton CJ, Sonkin D, et al. Integrative Radiogenomic Profiling of Squamous Cell Lung Cancer. *Cancer research*. 2013;73:6289-98. 40
43. Buch K, Peters T, Nawroth T, Sanger M, Schmidberger H, Langguth P. Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT Assay - A comparative study. *Radiation Oncology*. 2012;7:1.
44. Chou T-C. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. *Cancer research*. 2010;70:440-6.
45. Trotman LC, Niki M, Dotan ZA, Koutcher JA, Di Cristofano A, Xiao A, et al. 50

Pten Dose Dictates Cancer Progression in the Prostate. PLoS Biol. 2003;1:e59.

46. Yuan M, Breitkopf SB, Yang X, Asara JM. A positive/negative ion-switching, targeted mass spectrometry-based metabolomics platform for bodily fluids, cells, and fresh and fixed tissue. *Nature protocols*. 2012;7:872-81.

47. Nastiuk KL, Liu H, Hamamura M, Muftuler LT, Nalcioglu O, Krolewski JJ. In vivo MRI volumetric measurement of prostate regression and growth in mice. *BMC urology*. 2007;7:12.



【図 4 B】

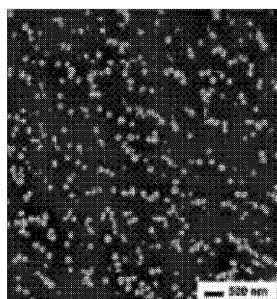
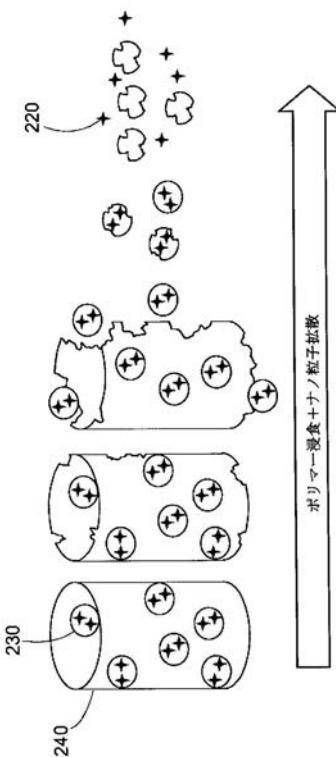


FIG. 4B

【図 2 B】



【図 8 A】

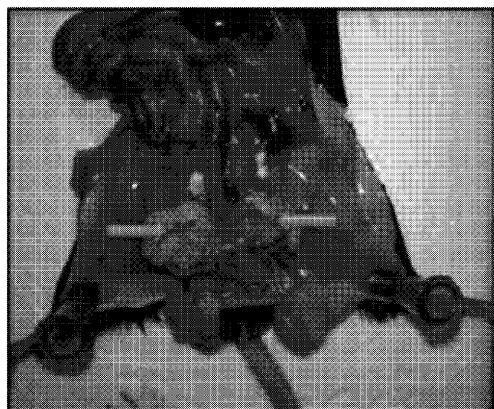
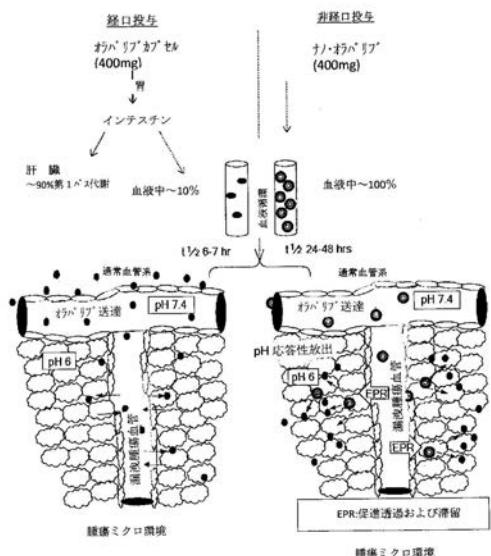
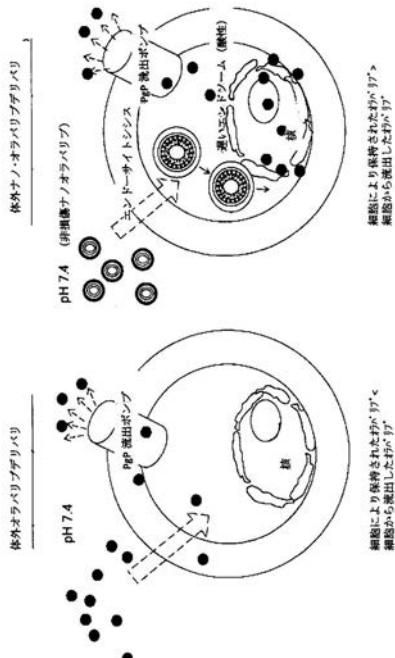


FIG. 8A

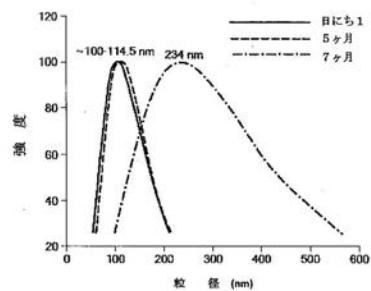
【図 3 A】



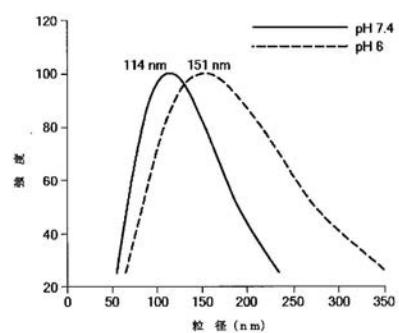
【図 3 B】



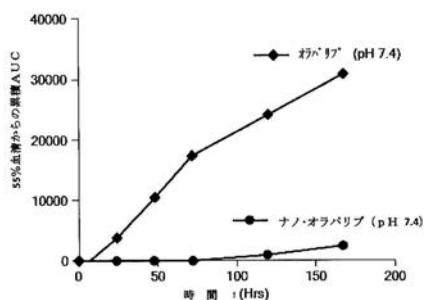
【図4 A】



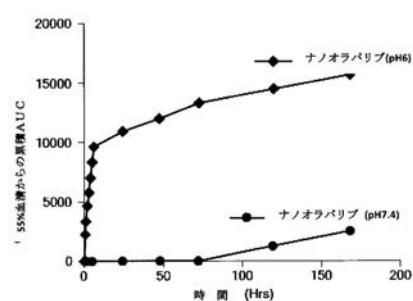
【図4 C】



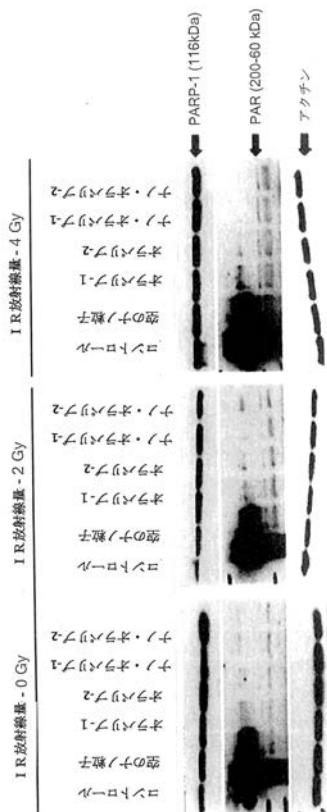
【図4 D】



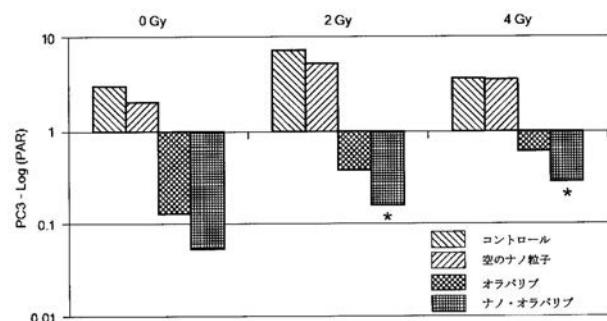
【図4 E】



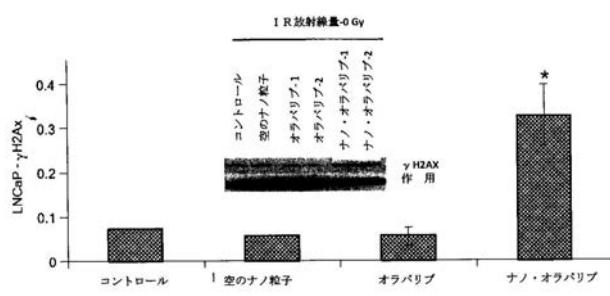
【図5 A】



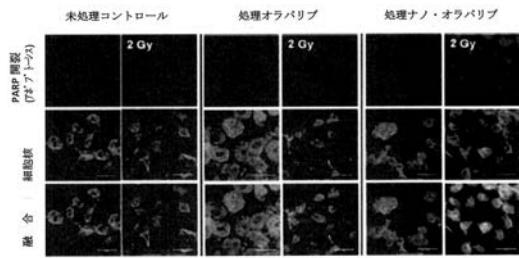
【図5 B】



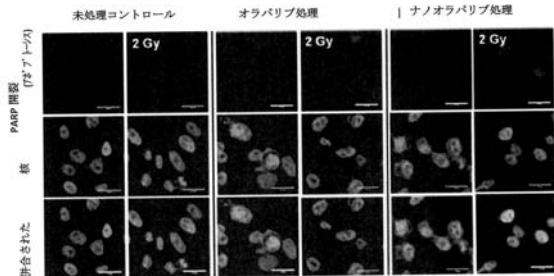
【図5 C】



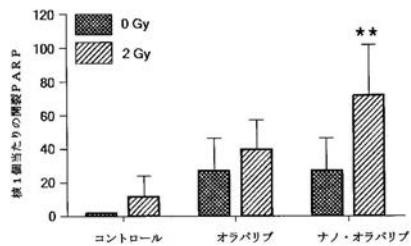
【図 6 A】



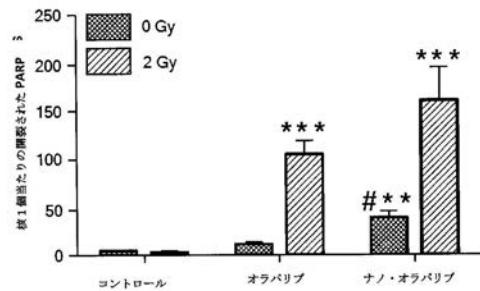
【図 6 C】



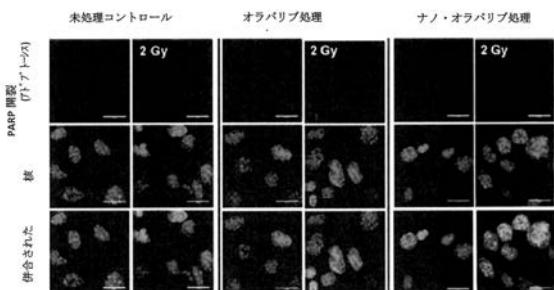
【図 6 B】



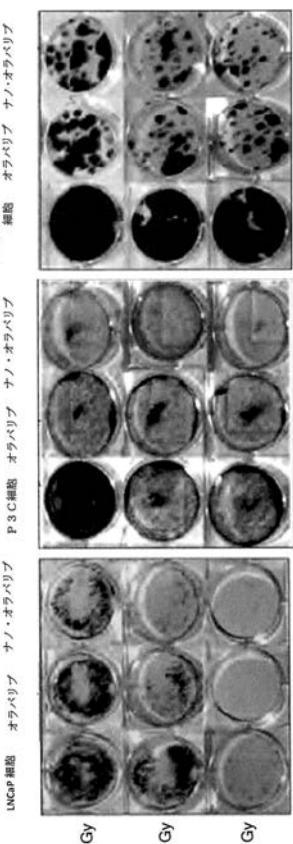
【図 6 D】



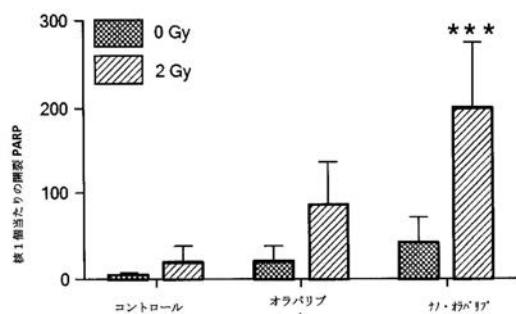
【図 6 E】



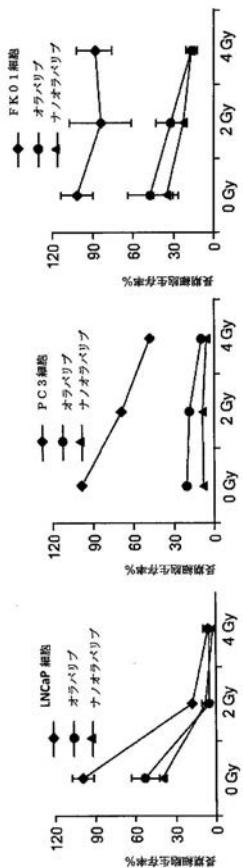
【図 7 A】



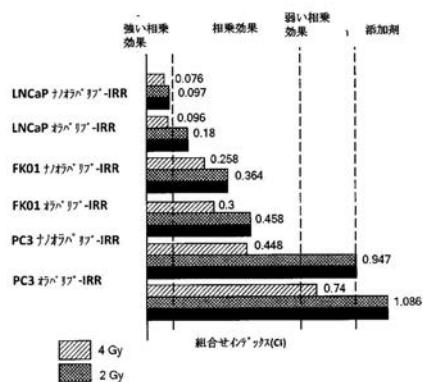
【図 6 F】



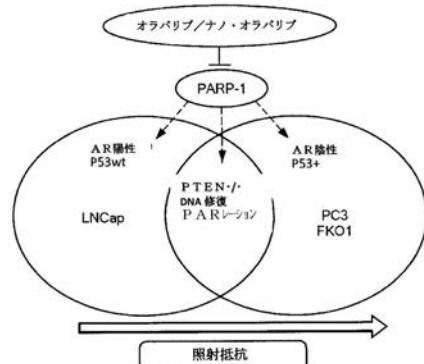
【図 7 B】



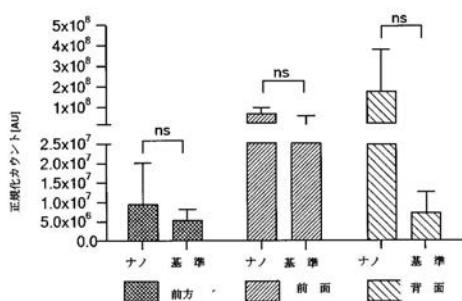
【図 7 C】



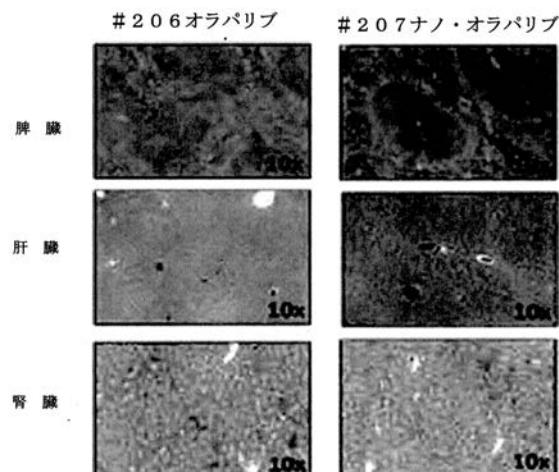
【図 7 D】



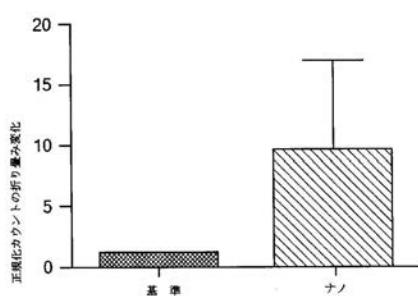
【図 8 B】



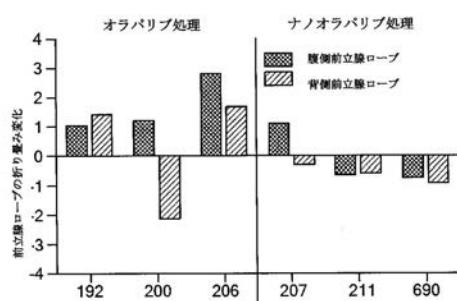
【図 8 D】



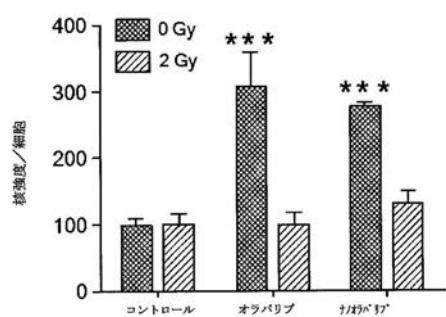
【図 8 C】



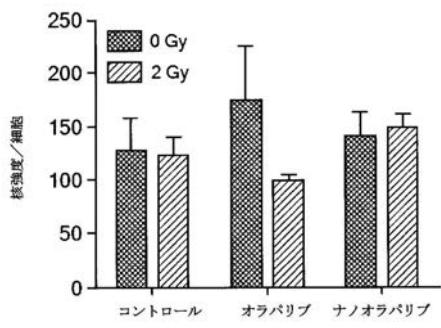
【図 8 E】



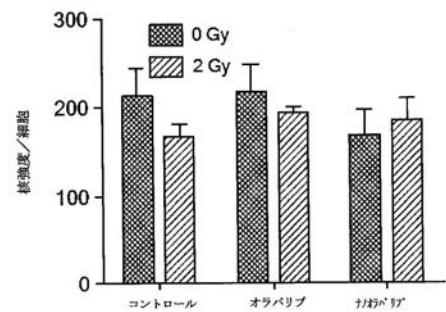
【図9A】



【図9C】



【図9B】



【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/US2014/063006 |
|--|---|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 9/127 (2014.01) CPC - A61K 9/1271 (2014.12) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - A61K 9/48, 9/127, 31/7088, 38/02, 39/00, 47/18, 47/22; C07C 217/16, 217/28; C07D 207/8, 317/26 (2014.01) USPC - 424/184.1; 514/1.1, 44A, 44R, 185, 788; 548/568; 549/451, 530; 554/103, 111; 564/391, 504 | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - A61K 9/1271, 9/1272; C07C 205/43, 217/28; C07D 207/4 (2014.12) (keyword delimited) | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Orbit, Google Patents, Google Scholar Search terms: olaparib sustained release nanoparticle ("poly-L-lactic acid" OR PLLA OR "poly(lactic-co-glycolic acid" OR PLGA OR chitosan OR polycaprolactone OR PCL) DOTAP DSPE PEG2000 neurodegen" | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | US 2010/0104629 A1 (DANDE et al) 29 April 2010 (29.04.2010) entire document | 1-6, 11-21, 24-33, 37-43, 46, 54-58 |
| Y | | 23, 45, 47, 51-53, 61, 62, 67-70 |
| Y | BLANCO et al. "Chapter 9: Targeted Nanoparticles for Cancer Therapy," Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems, 31 October 2012 (31.10.2012), Pgs. 242-278. Retrieved from the Internet: <www.intechopen.com/books/recent-advances-in-novel-drug-carrier-systems/targeted-nanoparticles-for-cancer-therapy> on 15 January 2015 (15.01.2015). entire document | 23, 45, 51-53 |
| Y | US 2010/0129456 A1 (ISHIHARA et al) 27 May 2010 (27.05.2010) entire document | 47 |
| Y | WO 2006/076681 A2 (SIRTRIS PHARMACEUTICALS, INC) 20 July 2006 (20.07.2006) entire document | 61, 62, 67-70 |
| A | TUTT et al. "Oral Poly(ADP-ribose) Polymerase Inhibitor Olaparib in Patients with BRCA1 or BRCA2 Mutations and Advanced Breast Cancer: A Proof-of-Concept Trial," Lancet, 6 July 2010 (06.07.2010), Vol. 376, Pgs. 235-244. entire document | 1-6, 11-21, 23-33, 37-43, 45-48, 51-58, 61, 62, 67-70 |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> | | |
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | |
| Date of the actual completion of the international search 15 January 2015 | Date of mailing of the international search report 06 FEB 2015 | |
| Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201 | Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774 | |

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/US2014/053006 |
|--|-------------------------------------|---|
| 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. | <input type="checkbox"/> | Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: |
| 2. | <input type="checkbox"/> | Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: |
| 3. | <input checked="" type="checkbox"/> | Claims Nos.: 49, 50, 59, 60, 64-66, 94 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: | | |
| See Extra Sheet(s). | | |
| 1. | <input type="checkbox"/> | As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims. |
| 2. | <input type="checkbox"/> | As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees. |
| 3. | <input type="checkbox"/> | 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. | <input checked="" type="checkbox"/> | 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.: 1-6, 11-21, 23-33, 37-41, 45-48, 51-58, 61, 62, and 67-70 restricted to a formulation comprising a suspension of lipid vesicles in an aqueous medium, wherein the lipid vesicles have a positive surface charge, have an average diameter in the range from about 50 nm to about 200 nm, comprise a PARP inhibitor, and comprise a PEGylated lipid moiety, wherein the inhibitor of PARP is selected to be olaparib. |
| Remark on Protest | | <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. |
| | | <input type="checkbox"/> 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. |
| | | <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|-------------------------------|
| International application No. |
| PCT/US2014/053006 |

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees need to be paid.

Group I+: claims 1-48, 51-58, 61-63, and 67-70 are drawn to a nanoparticulate formulation of an inhibitor of a poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) enzyme and a method of treating neurotrauma or a neurodegenerative disease or condition comprising the same.

Group II: claims 71-93 are drawn to a method of preparing a nanoparticulate PARP inhibitor formulation.

The first invention of Group I+ is restricted to a nanoparticulate formulation of an inhibitor of a poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) enzyme, and a method of treating neurotrauma or a neurodegenerative disease or condition comprising the same, the formulation comprising a suspension of lipid vesicles in an aqueous medium, wherein the lipid vesicles have a positive surface charge, have an average diameter in the range from about 50 nm to about 200 nm, comprise a PARP inhibitor, and comprise a PEGylated lipid moiety, wherein the inhibitor of PARP is selected to be olaparib. It is believed that claims 1-6, 11-21, 23-33, 37-43, 45-48, 51-58, 61, 62, and 67-70 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they read on the above embodiment.

Applicant is invited to elect additional nanoparticulate formulations to be searched in a specific combination by paying additional fee for each set of election. An exemplary election would be a nanoparticulate formulation of an inhibitor of a poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) enzyme, and a method of treating neurotrauma or a neurodegenerative disease or condition comprising the same, the formulation comprising a suspension of lipid vesicles in an aqueous medium, wherein the lipid vesicles have a positive surface charge, have an average diameter in the range from about 50 nm to about 200 nm, comprise a PARP inhibitor, and comprise a PEGylated lipid moiety, wherein the inhibitor of PARP is selected to be BMN-673. Additional nanoparticulate formulations will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined.

The inventions listed in Groups I+ and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1, because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical features of Groups I+, a nanoparticulate formulation of an inhibitor of a poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) enzyme and a method of treating neurotrauma or a neurodegenerative disease or condition comprising the same, are not found in Group II; the special technical features of Group II, a method of preparing a nanoparticulate PARP inhibitor formulation, are not found in Groups I+.

Groups I+ and II share the technical features of a nanoparticulate PARP inhibitor formulation comprising a cationic lipid, a PEGylated lipid, and a PARP inhibitor. However, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art. Specifically, WO 2006/076681 A2 to Milburn et al. discloses a nanoparticulate PARP inhibitor formulation comprising a cationic lipid, a PEGylated lipid, and a PARP inhibitor (liposome-drug formulations, Pg. 188, Ln. 34; sustained release formulation, e.g., by embedding or encapsulating the sirtuin activator into nanoparticles for delivery, Pg. 128, Lns. 11-12; a combination drug regimen may include one or more sirtuin activators and one or more anti-neurodegeneration agents ...one or more sirtuin-activating compounds can be combined with an effective amount of ...a PARP inhibitor, Pg. 143, Lns. 31-34 and Pg. 144, Lns. 1-4; surface modification to a liposome is the attachment of PEG chains, Pg. 189, Ln. 9; positively charged, Pg. 204, Ln. 21).

The Groups I+ formulas do not share a significant structural element, requiring the selection of alternatives for the PARP inhibitor "the PARP inhibitor is selected from the group consisting of olaparib, veliparib, rucaparib, niraparib, BMN-673, 3-aminobenzamide, ME0328, PJ34 HCl, AG-14361, INO-1001, UPF-1069, AZD-2461, and A-966492".

The Groups I+ share the technical features of a nanoparticulate formulation of an inhibitor of a poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) enzyme, the formulation comprising a suspension of lipid vesicles in an aqueous medium, wherein the lipid vesicles have a positive surface charge, have an average diameter in the range from about 50 nm to about 200 nm, comprise a PARP inhibitor, and comprise a PEGylated lipid moiety; a sustained release formulation of a PARP inhibitor, the formulation comprising a PARP inhibitor embedded in a matrix comprising a biodegradable polymer; and a method of treating neurotrauma or a neurodegenerative disease or condition, the method comprising administering a PARP inhibitor to a subject in need thereof. However, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2014/053006

Specifically, WO 2006/076681 A2 to Milburn et al. discloses a nanoparticulate formulation of an inhibitor of a poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) enzyme (liposome-drug formulations, Pg. 188, Ln. 34; a PARP inhibitor, Pg. 143, Ln. 4; the pharmaceutically acceptable carriers, for example nanoparticles or liposomes, Pg. 186, Lns. 10-11), the formulation comprising a suspension of lipid vesicles in an aqueous medium (nanoparticles can be administrated as ..suspensions, Pg. 187, Lns. 10-11; compositions may take such forms as suspensions ...in oily or aqueous vehicles, Pg. 183, Lns. 10-11), wherein the lipid vesicles have a positive surface charge (positively charged, Pg. 204, Ln. 21), have an average diameter in the range from about 50 nm to about 200 nm (nanoparticles are preferred having a diameter from about 50 nm to about 500 nm, in particular from about 100 nm to about 200 nm, Pg. 187, Lns. 18-19), comprise a PARP inhibitor (a PARP inhibitor, Pg. 143, Ln. 4), and comprise a PEGylated lipid moiety (surface modification to a liposome is the attachment of PEG chains, Pg. 189, Ln. 9); a sustained release formulation of a PARP inhibitor (sustained release kinetics is embedding or encapsulating the active compound into nanoparticles, Pg. 187, Lns. 9-10), the formulation comprising a PARP inhibitor (a PARP inhibitor, Pg. 143, Ln. 4) embedded in a matrix comprising a biodegradable polymer ("nanoparticles" as it is used hereinafter refers to particles formed by a polymeric matrix in which the active compound is dispersed, Pg. , Lns. 14-15; biocompatible polymers those polymers are especially preferred which are also biodegradable, Pg. 187, Lns. 30-31); and a method of treating neurotrauma or a neurodegenerative disease or condition (provided herein are methods for treating or preventing neurodegenerative disorders in a subject, Pg. 2, Lns. 3-4), the method comprising administering a PARP inhibitor to a subject in need thereof (the method may also comprise administering, e.g., conjointly administering, to a subject a therapeutically effective amount of another anti-neurodegeneration agent, Pg. 2, Lns. 15-16; one or more anti-neurodegeneration agents. For example ...a PARP inhibitor, Pg. 143, Ln. 32 and Pg. 144, Ln. 4).

The inventions listed in Groups I+ and II therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical features.

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 P 25/28 | (2006.01) | A 6 1 P 25/28 |
| A 6 1 P 25/16 | (2006.01) | A 6 1 P 25/16 |
| A 6 1 P 25/14 | (2006.01) | A 6 1 P 25/14 |
| A 6 1 P 25/08 | (2006.01) | A 6 1 P 25/08 |
| A 6 1 P 25/18 | (2006.01) | A 6 1 P 25/18 |
| A 6 1 P 9/10 | (2006.01) | A 6 1 P 9/10 |
| A 6 1 P 21/00 | (2006.01) | A 6 1 P 21/00 |
| A 6 1 P 25/00 | (2006.01) | A 6 1 P 25/00 |
| A 6 1 K 47/18 | (2006.01) | A 6 1 K 47/18 |
| A 6 1 K 47/28 | (2006.01) | A 6 1 K 47/28 |
| A 6 1 K 47/24 | (2006.01) | A 6 1 K 47/24 |
| A 6 1 K 47/42 | (2006.01) | A 6 1 K 47/42 |
| A 6 1 K 31/4184 | (2006.01) | A 6 1 K 31/4184 |
| A 6 1 K 31/55 | (2006.01) | A 6 1 K 31/55 |
| A 6 1 K 31/166 | (2006.01) | A 6 1 K 31/166 |
| A 6 1 K 31/517 | (2006.01) | A 6 1 K 31/517 |
| A 6 1 K 31/473 | (2006.01) | A 6 1 K 31/473 |
| A 6 1 K 31/5513 | (2006.01) | A 6 1 K 31/5513 |
| A 6 1 K 31/472 | (2006.01) | A 6 1 K 31/472 |
| A 6 1 K 31/4188 | (2006.01) | A 6 1 K 31/4188 |
| A 6 1 K 33/24 | (2006.01) | A 6 1 K 33/24 |
| A 6 1 K 31/7068 | (2006.01) | A 6 1 K 31/7068 |
| A 6 1 K 31/704 | (2006.01) | A 6 1 K 31/704 |
| | | A 6 1 P 43/00 1 1 1 |

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG

(72)発明者 スリデウハ,スリニヴァス

アメリカ合衆国 0 2 4 5 9 マサチューセッツ州 ニュートン、エスティー ファーム ロード
4 1

F ターム(参考) 4C076 AA19 AA22 AA94 BB13 BB15 BB16 CC01 CC27 DD49 DD63
DD70 EE23 EE41 FF32 GG41
4C084 AA17 MA24 NA12 NA13 ZA01 ZB26 ZC20 ZC41
4C086 AA10 BC27 BC30 BC39 BC41 BC46 BC50 CB05 CB11 EA10
EA17 GA07 GA12 HA12 MA03 MA05 MA24 MA66 NA12 ZA01
ZA02 ZA15 ZA16 ZB26 ZC20 ZC41
4C206 AA10 GA07 MA03 MA05 MA44 MA86 NA12 ZA01 ZA02 ZA15
ZA16 ZB26 ZC20 ZC41