(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7561146号
(P7561146)

(45)発行日　令和6年10月3日(2024.10.3)

(24)登録日　令和6年9月25日(2024.9.25)

(51)国際特許分類		FI	
A61K	*47/34 (2017.01)*	A61K	47/34
A61K	*45/00 (2006.01)*	A61K	45/00
A61K	*31/704 (2006.01)*	A61K	31/704
A61K	*31/4745(2006.01)*	A61K	31/4745
A61K	*31/337 (2006.01)*	A61K	31/337

請求項の数　58　（全141頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2021-572295(P2021-572295)
(86)(22)出願日　令和2年6月4日(2020.6.4)
(65)公表番号　特表2022-534796(P2022-534796A)
(43)公表日　令和4年8月3日(2022.8.3)
(86)国際出願番号　PCT/US2020/036040
(87)国際公開番号　WO2020/247576
(87)国際公開日　令和2年12月10日(2020.12.10)
審査請求日　令和5年4月26日(2023.4.26)
(31)優先権主張番号　62/858,478
(32)優先日　令和1年6月7日(2019.6.7)
(33)優先権主張国・地域又は機関　米国(US)

(73)特許権者　507244910
プレジデント・アンド・フェロウズ・オブ・ハーバード・カレッジ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケンブリッジ クィンシー ストリート １７
(74)代理人　100102978
弁理士　清水 初志
(74)代理人　100160923
弁理士　山口 裕孝
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部 俊
(74)代理人　100142929
弁理士　井上 隆一
(74)代理人　100148699
弁理士　佐藤 利光

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　接着している粒子を有する赤血球に関連する組成物および方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

a．赤血球、ならびに

b．該赤血球の細胞表面上に位置する、以下を含む粒子

i）50超:50のL:G比を含むPLGA、および

ii）少なくとも1種の治療剤

を含む、改変細胞組成物。

【請求項２】

a．赤血球、および

b．各粒子がPLGAと少なくとも1種の治療剤とを含み、各粒子が該赤血球の細胞表面上に位置している、該赤血球の細胞表面上に位置する18個より多くの粒子

を含む、改変細胞組成物。

【請求項３】

ii）前記PLGAが、少なくとも50:50またはLがそれより多いL:G比を含むか；

iii）前記PLGAが、50:50のL:G比およびエステル末端を含むか；または

iv）前記PLGAが、50:50のL:G比および酸末端を含む、

請求項2記載の組成物。

【請求項４】

前記PLGAが、85:15のL:G比を含む、請求項1～2のいずれか一項記載の組成物。

【請求項５】

前記PLGAが、65:35のL:G比を含む、請求項1～3のいずれか一項記載の組成物。
【請求項６】
前記PLGAが、エステル末端および/または酸末端を含む、請求項1～5のいずれか一項記載の組成物。
【請求項７】
前記PLGAが、エステル末端を含む、請求項1～6のいずれか一項記載の組成物。
【請求項８】
前記PLGAが、酸末端を含む、請求項1～6のいずれか一項記載の組成物。
【請求項９】
前記PLGAが、85:15のL:G比およびエステル末端を含む、請求項4記載の組成物。
【請求項１０】
前記PLGAが、65:35のL:G比および酸末端を含む、請求項5記載の組成物。
【請求項１１】
前記PLGAが、85:15のL:G比およびエステル末端を含み、これにより前記治療剤が腎臓および/または肺を標的とする、請求項4および9のいずれか一項記載の組成物。
【請求項１２】
前記PLGAが、65:35のL:G比および酸末端を含み、これにより前記治療剤が、肺、心臓、および/または腎臓を標的とする、請求項5および10のいずれか一項記載の組成物。
【請求項１３】
前記PLGAが、50超:50のL:G比を含み、これにより前記治療剤が肺および/または腎臓を標的とする、請求項1～3のいずれか一項記載の組成物。
【請求項１４】
前記PLGAが、85未満:15のL:G比およびエステル末端を含み、これにより前記治療剤が脾臓を標的とする、請求項1～3のいずれか一項記載の組成物。
【請求項１５】
前記少なくとも1種の治療剤が、
化学療法剤、抗原、ステロイド、免疫抑制剤、免疫賦活剤、ウイルス、小分子、ペプチド、核酸、およびケモカイン
から選択される、請求項1～14のいずれか一項記載の組成物。
【請求項１６】
前記少なくとも1種の化学療法剤が、
ドキソルビシン、カンプトテシン、パクリタキセル、ドセタキセル、5-フルオロウラシル、ゲムシタビン、メトトレキサート、またはそれらの組み合わせ
からなる群より選択される、請求項15記載の組成物。
【請求項１７】
前記治療剤が、3×10^{8}個の赤血球あたり少なくとも100μgの濃度で存在する、請求項1～16のいずれか一項記載の組成物。
【請求項１８】
前記治療剤が、3×10^{8}個の赤血球あたり少なくとも150μgの濃度で存在する、請求項1～17のいずれか一項記載の組成物。
【請求項１９】
前記治療剤が、3×10^{8}個の赤血球あたり少なくとも200μgの濃度で存在する、請求項1～18のいずれか一項記載の組成物。
【請求項２０】
前記治療剤が、3×10^{8}個の赤血球あたり少なくとも250μgの濃度で存在する、請求項1～19のいずれか一項記載の組成物。
【請求項２１】
前記粒子の直径が100 nm～10μmである、請求項1～20のいずれか一項記載の組成物。
【請求項２２】
前記粒子の直径が100 nm～1μmである、請求項1～20のいずれか一項記載の組成物。

【請求項２３】
前記粒子が、1種または複数種の細胞接着分子をさらに含む、請求項1～22のいずれか一項記載の組成物。
【請求項２４】
前記1種または複数種の細胞接着分子が、前記粒子の表面の一領域に局在している、請求項23記載の組成物。
【請求項２５】
前記細胞接着分子が、
赤血球細胞上の分子に特異的に結合する抗体試薬、赤血球細胞上の分子に特異的に結合するペプチド、細胞接着性ポリマー、細胞接着性高分子電解質、および赤血球細胞上の受容体に対するリガンド
からなる群より選択される、請求項23～24のいずれか一項記載の組成物。
【請求項２６】
前記細胞接着性高分子電解質が、ヒアルロン酸、ヒアルロン酸-アルデヒド、および/またはポリ（アリルアミン）塩酸塩を含む、請求項25記載の組成物。
【請求項２７】
前記ヒアルロン酸が、アルデヒド基を含むように修飾されている、請求項26記載の組成物。
【請求項２８】
前記細胞接着性ポリマーが、ポリフェノールまたは金属-ポリフェノール錯体である、請求項25記載の組成物。
【請求項２９】
赤血球の表面上に位置する20個より多くの粒子を含む、請求項1～28のいずれか一項記載の組成物。
【請求項３０】
対象の細胞に治療剤を送達する方法における使用のための請求項1～29のいずれか一項記載の組成物であって、該方法が、請求項1～29のいずれか一項記載の組成物を該対象に投与する工程を含む、組成物。
【請求項３１】
前記細胞が、がん細胞であり、前記治療剤が、化学療法剤、ケモカイン、または免疫賦活剤である、請求項30記載の組成物。
【請求項３２】
前記化学療法剤、ケモカイン、または免疫賦活剤が、IFN類、IFN-γ、TNFα、TGF-β、IL-1β、IL-6、IL-4、IL-10、IL-13、IL-2、IL-12、IL-15、IL-27、CpG ODN、イミキモド、レシキモド（R848）、モノホスホリルリピドA（MPLA）、またはポリ（I:C）である、請求項31記載の組成物。
【請求項３３】
それを必要とする対象において、がんおよび/または腫瘍を処置する方法における使用のための請求項1～29のいずれか一項記載の組成物であって、該方法が、請求項1～29のいずれか一項記載の組成物を該対象に投与する工程を含む、組成物。
【請求項３４】
前記治療剤が、化学療法剤またはケモカインである、請求項33記載の組成物。
【請求項３５】
前記対象の肺内にがん細胞が存在し、かつ/または前記対象が肺がんを有する、請求項33～34のいずれか一項記載の組成物。
【請求項３６】
前記PLGAが、65:35のL:G比および酸末端を含む、請求項35記載の組成物。
【請求項３７】
前記対象の腎臓内にがん細胞が存在し、かつ/または前記対象が腎臓がんを有する、請求項33～36のいずれか一項記載の組成物。

【請求項３８】
前記PLGAが、85:15のL:G比およびエステル末端を含む、請求項37記載の組成物。
【請求項３９】
前記PLGAが、65:35のL:G比および酸末端を含む、請求項37記載の組成物。
【請求項４０】
前記PLGAが、50超:50のL:G比を含む、請求項30～39のいずれか一項記載の組成物。
【請求項４１】
前記方法が、放射線療法または少なくとも1つの化学療法を前記対象に施す工程をさらに含む、請求項30～40のいずれか一項記載の組成物。
【請求項４２】
それを必要とする対象において免疫応答を賦活化する方法における使用のための請求項1～29のいずれか一項記載の組成物であって、該方法が、請求項1～29のいずれか一項記載の組成物を該対象に投与する工程を含み、前記治療剤が、抗原、免疫賦活剤、またはケモカインである、組成物。
【請求項４３】
前記免疫応答が局所化される、請求項42記載の組成物。
【請求項４４】
前記治療剤が抗原であり、前記PGLAが、a）50:50のL:G比およびエステル末端、b）50:50のL:G比および酸末端、またはc）85未満:15のL:G比およびエステル末端を含む、請求項42～43のいずれか一項記載の組成物。
【請求項４５】
それを必要とする対象において免疫応答を低減または抑制する方法における使用のための請求項1～29のいずれか一項記載の組成物であって、該方法が、請求項1～29のいずれか一項記載の組成物を該対象に投与する工程を含み、前記治療剤が免疫調節剤またはステロイドである、組成物。
【請求項４６】
前記免疫調節剤がIL-4である、請求項45記載の組成物。
【請求項４７】
前記免疫応答が局所化される、請求項45または46記載の組成物。
【請求項４８】
前記対象が、肺における免疫応答を必要としている、請求項45～47のいずれか一項記載の組成物。
【請求項４９】
前記対象が、急性肺損傷の処置を必要としている、請求項45～48のいずれか一項記載の組成物。
【請求項５０】
前記治療剤が、ステロイドまたはIL-4である、請求項45～49のいずれか一項記載の組成物。
【請求項５１】
前記PLGAが、50超:50のL:G比を含む、請求項45～50のいずれか一項記載の組成物。
【請求項５２】
前記PLGAが、65:35のL:G比および酸末端を含む、請求項45～50のいずれか一項記載の組成物。
【請求項５３】
治療上有効な量の前記組成物が投与される、請求項30～52のいずれか一項記載の組成物。
【請求項５４】
投与される前記治療剤の用量が、遊離形態で投与される場合に対象に投与される量の50％以下である、請求項30～52のいずれか一項記載の組成物。
【請求項５５】

投与される前記治療剤の用量が、遊離形態で投与される場合に対象に投与される量の40％以下である、請求項30～52のいずれか一項記載の組成物。

【請求項５６】

投与される前記治療剤の用量が、遊離形態で投与される場合に対象に投与される量の30％以下である、請求項30～52のいずれか一項記載の組成物。

【請求項５７】

投与される前記治療剤の用量が、遊離形態で投与される場合に対象に投与される量の20％以下である、請求項30～52のいずれか一項記載の組成物。

【請求項５８】

投与される前記治療剤の用量が、遊離形態で投与される場合に対象に投与される量の10％以下である、請求項30～52のいずれか一項記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連出願の相互参照

本出願は、2019年6月7日に出願された米国特許仮出願第62/858,478号の35 U.S.C.§ 119（e）に基づく恩典を主張するものであり、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【０００２】

技術分野

本明細書に記載されている技術は、細胞表面に接着している粒子を有する赤血球に関連する方法および組成物に関する。

【背景技術】

【０００３】

背景

医薬品での処置のほとんどに伴う目下の問題点は治療剤の標的指向性送達の達成の困難さである。静脈内投与では、最小限の侵襲性で身体の大部分に送達できる投与がもたらされ得るが、罹病状態の組織または器官に受容される用量は総用量のほんの一部である。さらに、既存の投与技術では、処置を必要としない器官および組織にも治療剤の分布がもたらされ、多くの場合、有害な副作用が引き起こされる。本明細書において、効率的でありかつさらに標的指向性の薬物送達を可能にする、赤血球の表面上で自己集合している生分解性薬物ナノ粒子からなる、非常に有効な赤血球活用化学療法（Erythrocyte Leveraged Chemotherapy）（ELeCt）および赤血球固定型全身免疫療法（Erythrocyte Anchored Systemic Immunotherapy）（EASY）プラットフォームを記載する。例えば、一態様において、ELeCtプラットフォームにより、遊離ナノ粒子と比べて薬物ナノ粒子の循環時間が有意に長くなり、10倍多い薬物量が標的器官に送達された。

【発明の概要】

【０００４】

概要

本明細書において、赤血球細胞が体内の特定の組織および/または器官に治療剤を送達することを可能にするアプローチを記載する。このアプローチは、薬剤単独または遊離ポリマー粒子中に薬剤を封入することでの投薬よりも効率的であり、したがって付随する副作用のリスクが低いことを実証する。

【０００５】

本態様のいずれかの一局面において、a. 赤血球と、b. 赤血球の細胞表面上に位置する、PLGAおよび少なくとも1種の治療剤を含む粒子とを含む、改変細胞組成物が本明細書に記載されている。

【０００６】

本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは、少なくとも50:50のL:G比またはより多くのLを含む。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは約50:50のL:G比を含む。本

局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは約85:15のL:G比を含む。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは約65:35のL:G比を含む。

【０００７】

本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは、エステル末端および/または酸末端を含む。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAはエステル末端を含む。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは酸末端を含む。

【０００８】

本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは、約50:50のL:G比およびエステル末端を含む。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは、約50:50のL:G比および酸末端を含む。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは、約85:15のL:G比およびエステル末端を含む。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは、約65:35のL:G比および酸末端を含む。

【０００９】

本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは約50:50のL:G比およびエステル末端を含み、これにより治療剤は脾臓および/または心臓を標的とする。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは約50:50のL:G比および酸末端を含み、これにより治療剤は脾臓および/または肺を標的とする。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは約85:15のL:G比およびエステル末端を含み、これにより治療剤は腎臓および/または肺を標的とする。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは約65:35のL:G比および酸末端を含み、これにより治療剤は、肺、心臓、および/または腎臓を標的とする。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは50:50より大きいL:G比を含み、これにより治療剤は肺および/または腎臓を標的とする。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは85:15より小さいL:G比およびエステル末端を含み、これにより治療剤は脾臓を標的とする。

【００１０】

本局面のいずれかの一部の態様では、少なくとも1種の治療剤は、化学療法剤、抗原、ステロイド、免疫抑制剤、免疫賦活剤、ウイルス、小分子、ペプチド、核酸、およびケモカインから選択される。本局面のいずれかの一部の態様では、少なくとも1種の化学療法剤は、ドキソルビシン、カンプトテシン、パクリタキセル、ドセタキセル、5-フルオロウラシル、ゲムシタビン、メトトレキサート、またはそれらの組み合わせからなる群より選択される。

【００１１】

本局面のいずれかの一部の態様では、治療剤は3×10^{8}個の赤血球あたり少なくとも100μgの濃度で存在する。本局面のいずれかの一部の態様では、治療剤は3×10^{8}個の赤血球あたり少なくとも150μgの濃度で存在する。本局面のいずれかの一部の態様では、治療剤は3×10^{8}個の赤血球あたり少なくとも200μgの濃度で存在する。本局面のいずれかの一部の態様では、治療剤は3×10^{8}個の赤血球あたり少なくとも250μgの濃度で存在する。

【００１２】

本局面のいずれかの一部の態様では、ポリマー粒子の直径は約100 nm～約10μmである。本局面のいずれかの一部の態様では、ポリマー粒子の直径は約100 nm～約1μmである。

【００１３】

本局面のいずれかの一部の態様では、ポリマー粒子は1種または複数種の細胞接着分子をさらに含む。本局面のいずれかの一部の態様では、1種または複数種の細胞接着分子は粒子表面の一領域に局在している。本局面のいずれかの一部の態様では、細胞接着分子は、赤血球細胞上の分子に特異的に結合する抗体試薬、赤血球細胞上の分子に特異的に結合するペプチド、細胞接着性ポリマー、細胞接着性高分子電解質、および赤血球細胞上の受容体に対するリガンドからなる群より選択される。本局面のいずれかの一部の態様では、細胞接着性高分子電解質は、ヒアルロン酸、ヒアルロン酸-アルデヒド、および/またはポリ（アリルアミン）塩酸塩を含む。本局面のいずれかの一部の態様では、ヒアルロン酸は

、アルデヒド基を含むように修飾されている。本局面のいずれかの一部の態様では、細胞接着性ポリマーは、ポリフェノールまたは金属-ポリフェノール錯体である。

【００１４】

本態様のいずれかの一局面において、本明細書に記載の組成物を対象に投与する工程を含む、対象の細胞に治療剤を送達する方法が本明細書に記載されている。本局面のいずれかの一部の態様では、細胞は、がん細胞であり、治療剤は、化学療法剤、ケモカイン、または免疫賦活剤（例えば、IFN類、IFN-γ、TNFα、TGF-β、IL-1β、IL-6、IL-4、IL-10、IL-13、IL-2、IL-12、IL-15、およびIL-27、ならびに他の免疫賦活性アンタゴニスト、例えば、CpG ODN、イミキモド、レシキモド（R848）、モノホスホリルリピドA（MPLA）、およびポリ（I:C））である。

【００１５】

本態様のいずれかの一局面において、それを必要とする対象において、がんおよび/または腫瘍を処置する方法であって、本明細書に記載の組成物を対象に投与する工程を含む、方法が本明細書に記載されている。本局面のいずれかの一部の態様では、治療剤は化学療法剤またはケモカインである。

【００１６】

本局面のいずれかの一部の態様では、対象の肺内にがん細胞が存在し、かつ/または対象は肺がんを有する。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは、約65:35のL:G比および酸末端を含む。

【００１７】

本局面のいずれかの一部の態様では、対象の腎臓内にがん細胞が存在し、かつ/または対象は腎臓がんを有する。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは、約85:15のL:G比およびエステル末端を含む。

【００１８】

本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは、約65:35のL:G比および酸末端を含む。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは、50超:50のL:G比を含む。

【００１９】

本局面のいずれかの一部の態様では、方法は、放射線療法または少なくとも1つの化学療法を対象に施す工程をさらに含む。

【００２０】

本態様のいずれかの一局面において、それを必要とする対象において免疫応答を賦活化する方法であって、本明細書に記載の組成物を対象に投与する工程を含み、治療剤が免疫賦活剤またはケモカインである、方法が本明細書に記載されている。本局面のいずれかの一部の態様では、免疫応答が局所化される。

【００２１】

本態様のいずれかの一局面において、それを必要とする対象において免疫応答を低減または抑制する方法であって、本明細書に記載の組成物を対象に投与する工程を含み、治療剤が免疫調節剤（例えば、IL-4）またはステロイドである、方法が本明細書に記載されている。本局面のいずれかの一部の態様では、免疫応答が局所化される。本局面のいずれかの一部の態様では、対象は肺における免疫応答を必要としている。本局面のいずれかの一部の態様では、対象は急性肺損傷の処置を必要としている。本局面のいずれかの一部の態様では、治療剤はステロイドまたはIL-4である。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは、50超:50のL:G比を含む。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは、約65:35のL:G比および酸末端を含む。

【００２２】

本局面のいずれかの一部の態様では、治療上有効な量の組成物が投与される。本局面のいずれかの一部の態様では、投与される治療剤の用量は、遊離形態で投与される場合に対象に投与される量の50％以下である。本局面のいずれかの一部の態様では、投与される治療剤の用量は、遊離形態で投与される場合に対象に投与される量の40％以下である。本局面のいずれかの一部の態様では、投与される治療剤の用量は、遊離形態で投与される場合

に対象に投与される量の30％以下である。本局面のいずれかの一部の態様では、投与される治療剤の用量は、遊離形態で投与される場合に対象に投与される量の20％以下である。本局面のいずれかの一部の態様では、投与される治療剤の用量は、遊離形態で投与される場合に対象に投与される量の10％以下である。

【図面の簡単な説明】

【００２３】

【図１】図1A～1Bは、PLGAの特性が担体赤血球へのPLGAの結合に影響することを示す。図1Aは、種々のPLGAナノ粒子の赤血球への結合効率のグラフを示す。図1Bは、種々のPLGAナノ粒子が便乗（hitchhike）している赤血球の走査型電子顕微鏡（SEM）画像を示す。

【図２】図2A～2Bにより、PLGAの特性が担体赤血球上でのPLGAの結合および脱離に影響することが実証される。図2Aは、低剪断応力（回転剪断応力、約1 Pa）下で担体赤血球から脱離したナノ粒子の割合（％）を示す。図2Bは、高剪断応力（6 Pa）下で赤血球から脱離したナノ粒子の正味の割合（％）を示す。

【図３－１】図3は、赤血球に便乗しているPLGAの特性が特定の器官へのその送達に影響することを示す。肺、腎臓、脾臓、肝臓、心臓および脳における、ナノ粒子、および赤血球に便乗しているナノ粒子の生体内分布を示す。

【図３－２】図3-1の続きを示す。

【図４－１】図4A～4Kは、赤血球活用化学療法（EleCt）プラットフォームの概略図および薬物（ドキソルビシン）搭載生分解性PLGAナノ粒子の特性評価を示す。（図4A）肺転移の処置のための赤血球プラットフォーム（EleCt）上で自己集合する生分解性薬物ナノ粒子の組成および機構の概略図。

【図４－２】（図4B～4D）未修飾（plain）のナノ粒子および薬物搭載ナノ粒子の平均サイズ（図4B）、ゼータ電位（図4C）および薬物搭載量（図4D）。（図4E）ナノ粒子の形態構造の特長を示すSEM画像。スケールバー：200 nm。（図4F）未修飾（plain）ナノ粒子および薬物搭載ナノ粒子のサイズ分布。（図4G）完全培地中での生分解性ナノ粒子からの薬物放出動態（n＝4）。

【図４－３】（図4H）薬物搭載ナノ粒子のB16F10-Luc黒色腫細胞との相互作用を示すフローサイトメトリープロット。

【図４－４】（図4I）薬物搭載ナノ粒子のB16F10-Luc黒色腫細胞との相互作用を示す共焦点レーザー走査型顕微鏡画像。（図4I）において、細胞核はDAPIを用いて染色した。（図4J～4K）種々の製剤での24時間の処置後のB16F10-Luc細胞の用量応答曲線（図4J）およびIC_{50}値（図4K）（n＝6）。

【図５－１】図5A～5Kにより、ドキソルビシン搭載生分解性PLGAナノ粒子はマウス赤血球およびヒト赤血球に効率的に自己集合することが実証される。（図5A）種々のナノ粒子：赤血球比（左から右に、0:1、50:1、200:1、400:1および800:1）でのマウス赤血球へのDOX搭載PLGAナノ粒子の自己集合のフローサイトメトリー解析。（図5B）少なくとも1個のナノ粒子を担持しているマウス赤血球の割合（％）。種々のナノ粒子:マウス赤血球比でのマウス赤血球上における（図5C）ナノ粒子結合効率、および（図5D）薬物用量。

【図５－２】表面で薬物搭載ナノ粒子が自己集合しているマウス赤血球の（図5E）共焦点レーザー走査型顕微鏡（CLSM）画像、および（図5F）SEM画像。（図5F）のスケールバー：2μm。表面で薬物搭載ナノ粒子が自己集合しているヒト赤血球の（図5G）CLSM画像、および（図5H）SEM画像。（図5H）のスケールバー：2μm。

【図５－３】（図5I）種々のナノ粒子：赤血球比（左から右に、0:1、200:1、800:1および1600:1）でのヒト赤血球への薬物搭載ナノ粒子の自己集合のフローサイトメトリーアッセイ。種々のナノ粒子：赤血球比でのヒト赤血球上における（図5J）ナノ粒子結合効率、および（図5K）薬物用量。

【図６－１】図6A～6Eにより、ELeCtプラットフォームによって、転移を有する肺へのナノ粒子薬物の向上した標的指向性送達が可能となることが実証される。（図6A）静脈内投与されたドキソルビシン製剤の薬物動態。赤血球への便乗によって遊離薬物またはナノ粒

子単独の使用と比べてドキソルビシンの血中循環時間の長期化が得られた（n＝3）。有意差あり（ANOVAの後、テューキーのHSD解析）:＊p＜0.05、＊＊p＜0.01。（図6B）薬物を搭載している便乗ナノ粒子は、肺に相当する剪断応力下でマウス赤血球およびヒト赤血球から特異的に脱離することができた。試料は20分間剪断した（n＝3）。低剪断は回転剪断（約1 Pa）を示すが、高剪断は6 Paであった。有意差あり（スチューデントのt検定）:＊＊＊p＜0.001。（図6C）種々のドキソルビシン製剤の静脈内投与の20分後および6時間後の、B16F10-Lucの肺転移を有するマウスの肺内における薬物集積（n＝3）。（図6D）遊離薬物群およびナノ粒子単独群に対する赤血球便乗群の肺内薬物濃度の比較（n＝3）。

【図６－２】（図6E）ドキソルビシン製剤の静脈内投与の20分後の罹病状態の肺内における薬物分布。点線は転移結節の境界線を示す。

【図７－１】図7A～7Hにより、ELeCtプラットフォームによって早期B16F10-Luc転移モデルにおいて肺転移の進行が抑止され、生存度が改善されることが実証される。（図7A）処置スケジュールの概略チャート。（図7B）種々の時点での肺転移の生物発光画像。

【図７－２】（図7C）インビボ生物発光シグナル強度で示す肺転移の進行曲線。

【図７－３】（図7D）種々の時点での肺転移量の定量（n＝7）。（図7E）生物発光シグナル強度で示す16日目の種々の処置群での肺転移量を比較する散乱-プロット（n＝7）。有意差あり（マンホイットニー検定）:＊p＜0.05、＊＊p＜0.01、＊＊＊p＜0.001。（図7F）23日目の肺転移量の散乱-プロット比較（n＝7）。有意差あり（マンホイットニー検定）:＊p＜0.05、＊＊p＜0.01、＊＊＊p＜0.001、n.s.:有意差なし。（図7G）処置期間中のマウスの体重変化（n＝7）。

【図７－４】（図7H）カプラン・マイヤー曲線によって示す種々の処置でのマウスの生存度（n＝7）。有意差あり（ログランク検定）:＊p＜0.05、＊＊p＜0.01、＊＊＊p＜0.001、n.s.:有意差なし。

【図８－１】図8A～8Gにより、ELeCtプラットフォームによって末期のB16F10-Luc転移モデルにおいて肺転移の進行が抑止され、生存が長くなることが実証される。（図8A）処置スケジュールの概略図。（図8B）種々の時点での肺転移の進行の生物発光画像。

【図８－２】（図8C）種々のドキソルビシン製剤で処置されたマウスの肺転移の増殖曲線。（図8D）生物発光シグナル強度で示す肺転移量の定量分析（n＝7）。有意差あり（マンホイットニー検定）:＊p＜0.05、＊＊p＜0.01、n.s.:有意差なし。

【図８－３】（図8E）種々の処置群のマウスの16日目の摘出肺の転移結節数の定量（n＝7）。有意差あり（マンホイットニー検定）:＊＊＊p＜0.001、n.s.:有意差なし。（図8F）処置期間中のマウスの体重変化（n＝7）。（図8G）種々の処置群のマウスのカプラン・マイヤー生存曲線。有意差あり（ログランク検定）:＊＊p＜0.01、＊＊＊p＜0.001、n.s.:有意差なし。

【図９】図9は、他の化学療法剤搭載生分解性ナノ粒子が赤血球に効率的に結合できることを示す。試験する化学療法剤は、カンプトテシン、パクリタキセル、ドセタキセル、5-フルオロウラシル、ゲムシタビン、メトトレキサート、および5-フルオロウラシル＋メトトレキサートの組み合わせを含む。スケールバー：1μm。

【図１０】図10A～10Cはマウスの肺の代表的なＨ＆E染色画像を示す。（図10A）対照（生理食塩水）、（図10B）DOX搭載ナノ粒子および（図10C）赤血球上で自己集合している薬物ナノ粒子（RBC-NP）で処置したマウスを、末期の肺転移モデルでの腫瘍移植の16日後に致死させた。肺をＨ＆E染色によって処理した。

【図１１】図11は、種々の薬物製剤で処置したマウスの器官の代表的なＨ＆E染色画像を示す。末期の肺転移モデルでの腫瘍移植の16日後にマウスを致死させ、器官をＨ＆E染色によって処理した。

【図１２】図12は、種々の化学療法剤搭載生分解性PLGAナノ粒子のサイズ分布を示す。

【図１３】図13は、免疫回復のための赤血球固定型全身免疫療法（EASY）の概略図を示す。（a）ImmunoBait（ケモカイン搭載ポリマーナノ粒子）が赤血球の表面上で集合している。（b）ImmunoBaitが機械生理学的剪断応力に応答して赤血球から特異的に外れ

、肺転移部位の近傍に沈着する。（c）ImmunoBaitが、ケモカインを放出し、ケモカイン勾配を回復させることによって局所微小環境を調節する。（d）エフェクター細胞、例えば、Th1 CD4、エフェクターCD8 T、およびナチュラルキラー（NK）細胞が肺転移部位に浸潤してその進行を制御する。

【図１４－１】図14A～14Rにより、PLGAナノ粒子の材料特性の調節によって肺への最適な標的指向性送達がもたらされたことが実証される。図14Aは、赤血球に対する種々のPLGAナノ粒子の結合効率を示す（n＝5）。有意差あり（一元配置ANOVAの後、テューキーのHSD検定）:他の全ての群と比べて＊＊p＜0.01、＆＆＆p＜0.001。（図14B）種々のPLGAナノ粒子に便乗された後の担体赤血球の凝集。200 nmのポリスチレン（PS）ナノ粒子を陽性対照として使用した。（図14C）高い回転剪断応力（6 Pa）が起こったときに赤血球から脱離したナノ粒子の正味の割合（%）（n＝3）。Alexa Fluor 647-オボアルブミンを封入することによってナノ粒子を蛍光標識した。（図14D）静脈内投与してから20分後の肺内に沈着した種々のPLGAナノ粒子の量（ID%/g器官）（遊離ナノ粒子はn＝3、便乗ナノ粒子はn＝6）。有意差あり（一元配置ANOVAの後、テューキーのHSD検定）:＊＊p＜0.01、＊＊＊p＜0.001、＊＊＊＊p＜0.0001、n.s:有意差なし。

【図１４－２】（図14E）赤血球上に便乗している種々のPLGAナノ粒子の投与の20分後の摘出マウス肺のIVIS蛍光画像。（図14F）抗ICAM-1抗体あり、またはなしのPLGA-dナノ粒子での20分間または6時間の処置後の肺微小血管内皮細胞の共焦点レーザー走査型顕微鏡法（CLSM）画像。ナノ粒子をAlexa Fluor 647で標識し、一方で細胞核はDAPIによって染色した。スケールバー：30μm。（図14G）PLGA-dナノ粒子製剤の静脈内投与後の種々の時点での摘出器官のIVIS蛍光画像。（図14H）肺内に沈着したPLGA-dナノ粒子の量（ID%/g器官）の動態（n＝3）。系列は、順に、NP、aICAM-1なしのEH-NP、およびaICAM-1ありのEH-NPである。有意差あり（一元配置ANOVAの後、テューキーのHSD検定）:＊p＜0.05、＊＊p＜0.01、＊＊＊p＜0.001。（図14D、14E、14Gおよび14H）において、Alexa Fluor 750-オボアルブミンを封入することによってナノ粒子を蛍光標識した。（図14A、14C、14D、14H）のデータは平均±s.e.m.として示している。

【図１４－３】（図14I）ImmunoBaitの走査型電子顕微鏡（SEM）画像。スケールバー,1μm。（図14J）ImmunoBaitの透過型電子顕微鏡（TEM）画像。スケールバー,500 nm。（図14K）ImmunoBaitのサイズ分布。（図14L）PBS、FBSおよび完全培地中でのImmunoBaitからのケモカイン放出動態（n＝3）。（図14M）ImmunoBaitが表面にアンカリングしている赤血球のCLSM画像。ケモカインにコンジュゲートされたAlexa Fluor 647でImmunoBaitを標識した。

【図１４－４】（図14N）Alexa Fluor 647標識ImmunoBaitを担持している赤血球のフローサイトメトリー解析。ケモカインにコンジュゲートされたAlexa Fluor 647でImmunoBaitを標識した。囲み外の点:未修飾の赤血球、囲み内の点:ImmunoBait担持赤血球。（図14O）赤血球上にアンカリングしているImmunoBaitのSEM画像。スケールバー,1μm。（図14P）ナノ粒子に便乗された後の担体赤血球上のホスファチジルセリン発現（n＝3）。（図14Q）ナノ粒子に便乗された担体赤血球の凝集。200 nmのカルボン酸ポリスチレンナノ粒子を陽性対照として（図14P）および（図14Q）において使用した。（図14R）ナノ粒子に便乗された後の担体赤血球の浸透圧脆弱性。73 mMのNaClでの担体赤血球の溶血割合（%）を示した（n＝3）。（図14L、14Pおよび14R）のデータは平均±s.e.m.として示している。

【図１５－１】図15A～15Jにより、ImmunoBaitが、担体赤血球に対して明白な副作用を引き起こすことなく赤血球上で集合したことが実証される。（図15A）ImmunoBaitの走査型電子顕微鏡（SEM）画像。スケールバー,1μm。（図15B）ImmunoBaitの透過型電子顕微鏡（TEM）画像。スケールバー,500 nm。（図15C）ImmunoBaitのサイズ分布。（図15D）ImmunoBaitからのケモカイン放出動態（n＝3）。

【図１５－２】（図15E）表面でImmunoBaitが集合している赤血球のCLSM画像。ケモカインにコンジュゲートされたAlexa Fluor 647でImmunoBaitを標識した。（図15F）Alexa Fluor 647標識ImmunoBaitを担持している赤血球のフローサイトメトリー解析。

ケモカインにコンジュゲートされたAlexa Fluor 647でImmunoBaitを標識した。囲みの左側の点:未修飾の赤血球、囲み内の点:ImmunoBait担持赤血球。（図15G）赤血球上で集合しているImmunoBaitのSEM画像。スケールバー,1μm。

【図１５－３】（図15H）ナノ粒子に便乗された後の担体赤血球上のホスファチジルセリン発現（n＝3）。未修飾のナノ粒子およびImmunoBaitで引き起こされた担体赤血球上のホスファチジルセリン発現はともに無視できる。系列は、順に、未修飾のNPおよびImmunoBaitである。（図15I）ナノ粒子に便乗された担体赤血球の凝集。200 nmのカルボン酸ポリスチレンナノ粒子を陽性対照として（図15H）および（図15I）において使用した。（図15J）ナノ粒子に便乗された後の担体赤血球の浸透圧脆弱性。73 mMのNaClでの担体赤血球の溶血割合（%）を示した（n＝3）。（図15D、15Hおよび15J）のデータは平均±s.e.m.として示している。

【図１６－１】図16A～16Mにより、EASYによってImmunoBaitが転移を有する肺に精密に送達され、免疫回復が得られたことが実証される。（図16A）剪断前、剪断後、または固定後剪断時の、ImmunoBaitが便乗している赤血球のSEM画像。試料を6 Paの回転剪断応力で20分間剪断した。（図16B）6 Paで5、10、または20分間剪断されたときの担体赤血球から脱離したImmunoBaitナノ粒子の割合（%）（n＝3）。（図16B）のデータは平均±s.e.m.として示している。

【図１６－２】（図16C）早期の肺転移モデルでの静脈内投与の20分後または6時間後のImmunoBait製剤の生体内分布。20分のとき、全ての群でn＝3。6時間のとき、NPおよびaICAM-1ありのNPでn＝2、EH-NPおよびaICAM-1ありのEH-NPでn＝3。有意差あり（一元配置ANOVAの後、テューキーのHSD検定）:＊p＜0.05、＊＊p＜0.01、＊＊＊p＜0.001および＊＊＊＊P＜0.0001。（図16C）のデータは平均±s.e.m.として示している。

【図１６－３】（図16D）早期の肺転移モデルでの静脈内投与の20分後のImmunoBaitナノ粒子の分布の、血中に対する肺内の比率（n＝3）。有意差あり（一元配置ANOVAの後、テューキーのHSD検定）:＊p＜0.05。（図16D）のデータは平均±s.e.m.として示している。（図16E）ImmunoBait製剤の静脈内投与の20分後の、早期の肺転移を有するマウスの肺のIVIS蛍光画像。（図16F）ImmunoBait製剤の静脈内投与の20分後の、末期の肺転移を有するマウスの肺のIVIS蛍光画像。

【図１６－４】（図16G）ImmunoBait製剤の静脈内投与の20分後の肺転移巣区域のCLSM画像。白い点線は転移結節の境界線を示す。核をDAPIによって染色した。（図16B～16G）において、ナノ粒子はすべて、アルブミン担体タンパク質にコンジュゲートさせたAlexa Fluor 647をナノ粒子内に封入することによって標識した。（図16H）乳がん肺転移を有するマウスでのCXCL10ケモカイン勾配の経時的変化をモニタリングするためのスケジュール。（図16I）原発腫瘍切除から種々の日数が経過した後の、血中CXCL10ケモカインに対する肺内CXCL10ケモカインの比率（n＝5）。有意差あり（一元配置ANOVAの後、テューキーのHSD検定）:＊p＜0.05。（図16I）のデータは平均±s.e.m.として示している。（図16J）ケモカイン勾配アッセイのスケジュール。

【図１６－５】（図16K）CXCL10製剤の静脈内投与の20分後または6時間後のCXCL10ケモカインの血中濃度（n＝4～5）。（図16L）CXCL10製剤の静脈内投与の20分後または6時間後のCXCL10ケモカインの血中濃度（n＝4～5）。（図16M）投与後の血中CXCL10ケモカイン濃度に対する肺内CXCL10ケモカイン濃度の比率（n＝4～5）。有意差あり（一元配置ANOVAの後、テューキーのHSD検定）:＊p＜0.05、＊＊p＜0.01。（図16K～16M）のデータは平均±s.e.m.として示している。図16K～16Mの系列は、順に、対照、遊離ケモカイン（5x）、NP、およびRBC-NPである。

【図１６－６】（図16O）（図16G）に示した共焦点画像から計算されたImmunoBait NP含有面積割合（%）（n＝5）。計算はImageJにおいて実施した。有意差あり（一元配置ANOVAの後、テューキーのHSD検定）:＊＊＊p＜0.001、＊＊＊＊p＜0.0001。

【図１６－７】（図16P）CXCL10製剤の静脈内投与の20分後、6時間後、24時間後、48時間後、および72時間後のCXCL10ケモカインの血中濃度（n＝4～6）。（図16Q）CXCL10製剤の静脈内投与後のCXCL10ケモカインの肺内濃度（n＝4～6）。（図16R）投

与後の血中CXCL10ケモカイン濃度に対する肺内CXCL10ケモカイン濃度の比率（n＝4～6）。（図16P～16R）において、横線は、処置前の対照マウスでの対応するレベルの平均±s.e.m.を示す。処置前の対照と比べて有意差あり（一元配置ANOVAの後、テューキーのHSD検定またはスチューデントのt検定）:＊p＜0.05、＊＊p＜0.01、＊＊＊p＜0.001。遊離のケモカイン（5×）群と比べて有意差あり（一元配置ANOVAの後、テューキーのHSD検定またはスチューデントのt検定）:＃＃p＜0.01。ImmunoBait群と比べて有意差あり（一元配置ANOVAの後、テューキーのHSD検定またはスチューデントのt検定）:＆p＜0.05、＆＆p＜0.01、＆＆＆＆p＜0.0001。（図16O～16R）のデータは平均±s.e.m.として示している。

【図１７－１】図17A～17Hにより、EASYにより、乳がん肺転移モデルにおいて肺転移進行の有意な抑止および生存度の改善がもたらされたことが実証される。（図17A）有効性試験のスケジュール。（図17B）種々の処置を受けているマウスの種々の時点での代表的な生物発光画像。

【図１７－２】（図17C）37日目のマウスの摘出肺上の結節数（n＝8）。有意差あり（マンホイットニー検定）:＊＊p＜0.01、＊＊＊p＜0.001。（図17C）のデータは平均±s.e.m.として示している。（図17D）種々の処置の阻害率。（図17E）37日目の摘出肺の代表的な画像。

【図１７－３】（図17F）種々の処置による処置後37日目のマウスの肺重量（n＝8）。有意差あり（一元配置ANOVAの後、テューキーのHSD検定）:＊p＜0.05。（図17G）処置期間中のマウスの体重変化（n＝8）。（図17F、17G）のデータは平均±s.e.m.として示している。（図17H）カプラン・マイヤー曲線によって示す種々の処置でのマウスの生存度（n＝6）。有意差あり（ログランク検定）:＊p＜0.05。

【図１７－４】（図17I）異なる処置を受けているマウスの37日目の摘出肺上の結節数（n＝6～7）。有意差あり（マンホイットニー検定）:＊＊p＜0.01、＊＊＊p＜0.001。データは平均±s.e.m.として示している。（図17J）カプラン・マイヤー曲線によって示す種々の処置でのマウスの生存度（n＝15～16）。有意差あり（マンテル・コックス検定）:＊＊＊p＜0.001。

【図１８－１】図18A～18Oにより、EASYにより、肺転移巣内へのエフェクター免疫細胞の浸潤の向上がもたらされたことが実証される。（図18A）種々の処置でのマウスの肺転移巣の免疫細胞のプロファイリングのスケジュール。（図18B）CD4＋IFN-γ＋細胞の代表的なフローサイトメトリー解析画像。

【図１８－２】（図18D）CD8＋IFN-γ＋細胞の代表的なフローサイトメトリー解析画像。

【図１８－３】（図18C）肺内のIFN-γ＋Th1 CD4細胞の絶対割合（%）（n＝7～8）。（図18E）肺内のIFN-γ＋CD8細胞の絶対割合（%）（n＝7～8）。（図18Cおよび18E）のデータは平均±s.e.m.として示している。（図18Cおよび18E）において有意差あり（一元配置ANOVAの後、テューキーのHSD検定）:＊p＜0.05、＊＊p＜0.01、＊＊＊＊p＜0.0001。

【図１８－４】（図18F）グランザイムB＋CD8細胞の代表的なフローサイトメトリー解析画像。（図18H）CD45＋NKp46＋細胞の代表的なフローサイトメトリー解析画像。

【図１８－５】（図18G）肺内のグランザイムB＋エフェクターCD8細胞の絶対割合（%）（n＝7～8）。（図18I）肺内のNKp46＋NK細胞の絶対割合（%）（n＝7～8）。（図18K）肺内の活性化された（CD86＋）樹状細胞の絶対割合（%）（n＝7～8）。（図18Iおよび18K）のデータは平均±s.e.m.として示している。（図18G、18I、および18K）において有意差あり（一元配置ANOVAの後、テューキーのHSD検定）:＊p＜0.05、＊＊p＜0.01、＊＊＊＊p＜0.0001。

【図１８－６】（図18J）CD11c＋CD86＋細胞の代表的なフローサイトメトリー解析画像。（図18L～18O）種々の処置後のマウスの肺転移巣における（図18L）IFN-γ、（図18M）TNF-α、（図18N）IL-10、および（図18O）CXCL10の濃度。（図18L～O）のデータは平均±s.e.m.として示している。（図18L～O）において有意差あり（一元配置A

NOVAの後、テューキーのHSD検定）:＊p＜0.05、＊＊p＜0.01、＊＊＊＊p＜0.0001。
【図１８－７】図18-6の説明を参照。
【図１９】図19は、種々のPLGAナノ粒子を担持しているマウス赤血球の走査型電子顕微鏡（SEM）画像を示す。
【図２０－１】図20A～20Cにより、担体赤血球に対する種々のPLGAナノ粒子の効果が実証される。（図20A）便乗プロセスで溶解した担体赤血球の割合（%）（n＝3）。（図20C）種々のPLGAナノ粒子に便乗された後の、ホスファチジルセリンを表面上に発現している担体赤血球の割合（%）（n＝3）。データは平均±s.e.m.として示している。図20Aおよび20Cの系列は、順に、PLGA-a、PLGA-b、PLGA-cおよびPLGA-dである。
【図２０－２】（図20B）表面に種々のPLGAナノ粒子が便乗している担体赤血球の浸透圧脆弱性（浸透圧ショックの際の溶血）（n＝3）。拡大パネルは、72.5 mMのNaCl濃度での担体赤血球の溶血割合（%）を示す。データは平均±s.e.m.として示している。
【図２１】図21は、インビトロ剪断条件下で担体赤血球から脱離したナノ粒子の割合（%）を示す。表面に種々のPLGAナノ粒子が便乗している赤血球を、レオメーターを用いて高回転応力（6 Pa）で20分間剪断した（n＝2～3）。低剪断は、リボルバーを12 rpm/分で使用する回転中に担体赤血球に起こる回転応力を示す。データは平均±s.e.m.として示している。系列は、順に、低剪断および高剪断である。
【図２２Ａ】図22A～22Bは、PLGAナノ粒子の生体内分布を示す。（図22A）遊離形態または赤血球上に便乗している状態のいずれかの種々のPLGAナノ粒子の静脈内投与の20分後の生体内分布（NPはn＝3、EH-NPはn＝6）。系列は、順に、NPおよびEH-NPである。データは平均±s.e.m.として示している。
【図２２Ｂ】（図22B）静脈内投与後の種々の時点での抗ICAM-1抗体あり、またはなしの便乗PLGA-dナノ粒子の生体内分布（n＝3）。系列は、順に、NP、aICAM-1なしのEH-NP、およびaICAM-1ありのEH-NPである。有意差あり（一元配置ANOVAの後、テューキーのHSD検定）:＊p＜0.05、＊＊p＜0.01、＊＊＊p＜0.001。データは平均±s.e.m.として示している。
【図２３】図23A～23Cは、マウス赤血球の表面へのImmunoBaitの集合を示す。（図23A）種々の量のImmunoBaitナノ粒子とともにインキュベートした後の赤血球のフローサイトメトリーヒストグラムプロット。ヒストグラムにおいて、使用したImmunoBait：赤血球比は左から右に、それぞれ0:1、50:1、400:1および1000:1である。（図23B）種々のImmunoBait：赤血球比でインキュベートした後のImmunoBaitナノ粒子担持赤血球の割合（%）（n＝3）。データは平均±s.e.m.として示している。（図23C）400:1のImmunoBait：赤血球比でインキュベートした場合のImmunoBaitナノ粒子担持赤血球のCLSM画像。ImmunoBaitは、封入されているケモカインにコンジュゲートさせたAlexa Fluor 647によって標識した。
【図２４】図24により、他の免疫調節剤を担持しているImmunoBaitの赤血球上への集合が実証される。GM-CSF、IL-2、IL-12、およびIL-15をImmunoBait内に封入した。抗PD-1抗体をImmunoBaitの表面にコンジュゲートさせた。スケールバー：1μm。
【図２５】図25A～25Bにより、ImmunoBaitのヒト赤血球への集合が実証される。（図25A）表面にImmunoBaitナノ粒子が集合しているヒト赤血球のSEM画像。スケールバー：1μm。（図25B）異なるImmunoBait：ヒト赤血球インキュベーション比での、ヒト赤血球の表面上に集合しているImmunoBaitナノ粒子の数（n＝3）。データは平均±s.e.m.として示している。
【図２６】図26は、浸透圧ストレスに対する担体赤血球の感受性に対するImmunoBaitの便乗の影響を示す。担体赤血球の代表的な浸透圧脆弱性曲線を示した（n＝3）。担体赤血球は、試験した全てのナノ粒子濃度で、未処理の赤血球と比べて同様の脆弱性曲線を示した。データは平均±s.e.m.として示している。
【図２７】図27A～27Bは、原発腫瘍切除後の種々の時点における、乳がん肺転移を有するマウスの血中および肺内のCXCL10ケモカイン濃度を示す。
【図２８】図28は、早期の肺転移モデルにおける種々の処置での37日目のマウスの肺の

背面の代表的な画像を示す。
【図２９】図29は、早期の肺転移モデルにおける種々の処置後のマウス器官のＨ＆Ｅを示す。
【図３０】図30A～30Cは、末期の乳がん肺転移モデルでの肺転移の抑止におけるEASYの有効性を示す。（図30A）末期の肺転移モデルでの有効性試験のスケジュール。（図30B）種々の処置後50日目のマウスの摘出肺上の結節数（n＝3）。有意差あり（スチューデントのt検定）:＊p＜0.05。データは平均±s.e.m.として示している。（図30C）50日目の摘出肺の画像。
【図３１】図31A～31D　種々の処置でのマウスの肺転移巣内の免疫細胞。肺内の（図31A）CD4、（図31B）CD8、および（図31C）樹状細胞の絶対割合（%）を示した。（図31D）CD45＋CD11c＋樹状細胞におけるCD86＋細胞の割合（%）。データは平均±s.e.m.として示している。有意差あり（一元配置ANOVAの後、テューキーのHSD検定）:＊p＜0.05、＊＊p＜0.01、＊＊＊p＜0.001。
【図３２】図32は、種々の処置によって処置されているマウスの肺転移巣におけるサイトカインの濃度を示すヒートマップを示す。単位:pg/mL。
【図３３－１】図33A～33Pにより、EASIによってインサイチュー免疫処置および遠隔腫瘍の全身性抑制がもたらされたことが実証される。（図33A）局所免疫応答および全身性免疫応答の評価のスケジュール。（図33B）単離した肺リンパ球とともに50:1または100:1のエフェクター細胞:腫瘍細胞比で共培養した4T1-Luc細胞の生存率（n＝6）。データは、「対照-生理食塩水」群に対して正規化したものとして示した。有意差あり（スチューデントのt検定）:＊p＜0.05、＊＊＊p＜0.001。（図33C）肺転移巣内のCD11c＋CD86＋細胞の代表的なフローサイトメトリー解析画像。（図33D）対照群と比べたときの、肺内の活性化された（CD86＋）樹状細胞の絶対割合（%）の変化倍数（n＝14～15）。（図33E）血中のCD8 T細胞の代表的なフローサイトメトリー解析画像。（図33F）血中のCD8 T細胞の絶対割合（%）。（図33G）血中のIFN-γ＋CD8細胞の代表的なフローサイトメトリー解析画像。（図33H）血中のIFN-γ＋CD8細胞の絶対割合（%）。（図33I）血中のグランザイムB＋CD8細胞の代表的なフローサイトメトリー解析画像。（図33J）血中のグランザイムB＋CD8細胞の絶対割合（%）。（図33B、33D、33F、33H、および33J）において、有意差あり（スチューデントのt検定）:＊p＜0.05、＊＊p＜0.01、＊＊＊＊p＜0.0001。（図33B、33D、33F、33H、および33J）のデータは平均±s.e.m.として示している。
【図３３－２】（図33K）腫瘍再負荷試験のスケジュール。（図33L）腫瘍再負荷試験における再移植された腫瘍の個々の増殖曲線。（図33M）再移植された腫瘍の全体増殖曲線。（図33N）再移植された腫瘍の移植後最初の10日間の全体増殖曲線。（図33O）腫瘍再負荷の16日後の摘出腫瘍の重量。（図33P）腫瘍再負荷の16日後の摘出腫瘍の写真。「EXP」は「期限切れ（Expired）」を示す。（図33K～33P）において、「健常」群はn＝8、「対照-生理食塩水」および「EASI」群はn＝5。（図33M～33O）において、有意差あり（スチューデントのt検定）:＊p＜0.05、＊＊p＜0.01、＊＊＊＊p＜0.0001。（図33M～33O）のデータは平均±s.e.m.として示している。
【図３４】図34A～34Eは、赤血球へのナノ粒子のアンカリングの機構を示す。種々の条件下での赤血球へのナノ粒子のアンカリングの相対結合効率および代表的なSEM画像。（図34A）赤血球を2.5%グルタルアルデヒドによって固定した場合。（図34B）赤血球の表面をPEG化した場合。（図34C）便乗（hitchhiking）を血清中で実施した場合。（図34D）PLGA NPをPEG化した場合。（図34E）PLGA NPが異なる表面末端（異なる水素結合形成能）を有した場合。
【図３５】図35は、インビトロ剪断条件下で担体赤血球から脱離したナノ粒子の割合（%）を示す。表面に種々のPLGAナノ粒子が便乗している赤血球を、レオメーターを用いて高回転応力（6 Pa）で20分間剪断した（n＝6～7）。低剪断は、リボルバーを12 rpm/分で使用する回転中に担体赤血球に起こる回転応力を示す。データは平均±s.e.m.として示している。有意差あり（二元配置ANOVA）:＊P＜0.05、＊＊p＜0.01、＊＊＊p＜0.00

01。他の全ての群と比べて有意差あり（二元配置ANOVA）:＆＆P＜0.01。

【図３６】図36A～36Fは、i.v.投与後の血中の赤血球便乗系の特性評価を示す。（図36A）担体赤血球およびナノ粒子の追跡のための二重標識ストラテジーの概略図。担体赤血球をCellTrace（商標）Far Redで標識し、PLGA-dナノ粒子をFITCで標識した。この二重標識系をi.v.投与した後、種々の時点で血液を収集した。担体赤血球およびその表面のナノ粒子をフローサイトメトリーによって解析した。（図36B）種々の時点での血液の代表的なフロープロット（n＝3）。（図36C）種々の時点での投与された赤血球の代表的なフロープロット（n＝3）。（図36D）0分に対して正規化した、種々の時点での血中に残存している担体赤血球の割合（%）（n＝3）。（図36E）0分に対して正規化した、種々の時点での便乗ナノ粒子担持担体赤血球の割合（%）（n＝3）。（図36F）赤血球便乗系をi.v.投与してから5分間後のマウスの器官のIVIS画像。（図36F）において、ナノ粒子は、AF647を封入することによって標識したが、担体赤血球は標識しなかった。

【図３７】図37は、剪断応力下での担体赤血球からのナノ粒子の脱離に対する、EH-NP複合体へのaICAM-1抗体の結合の効果を示す。aICAM-1結合あり、またはなしのPLGA-dナノ粒子が表面に便乗している赤血球を、レオメーターを用いて高回転応力（6 Pa）で20分間剪断した（n＝4～7）。低剪断は、リボルバーを12 rpm/分で使用する回転中に担体赤血球に起こる回転応力を示す。データは平均±s.e.m.として示している。n.s.:有意差なし（二元配置ANOVA）。

【図３８】図38A～38Bは、ImmunoBait内への封入後のCXCL10の安定性を示す。（図38A）天然のCXCL10およびImmunoBaitから放出されたCXCL10のMALDI-TOFスペクトル。（図38B）天然のCXCL10およびImmunoBaitから放出されたCXCL10の円二色性スペクトル。

【図３９】図39A～39Bは、剪断下で担体赤血球からImmunoBaitが放出されたことを実証している。（図39A）剪断前、剪断後、または固定後剪断時の、ImmunoBaitが便乗している赤血球のSEM画像。試料を6 Paの回転剪断応力で20分間剪断した。（図39B）低剪断応力（12 rpmでの回転剪断）または高剪断応力（6 Pa）で3、10、もしくは20分間剪断されたときの担体赤血球から脱離したImmunoBaitナノ粒子の割合（%）（n＝3）。低剪断と比べて有意差あり（スチューデントのt検定）:＊＊＊p＜0.001、＊＊＊＊p＜0.0001。（図39B）のデータは平均±s.e.m.として示している。

【図４０】図40A～40Bは、肺転移の進行とともに、EHによって送達されたImmunoBaitの肺内集積を示す。原発腫瘍切除後7、14および21日目、種々の組のマウスにaICAM-1を有するEASIをIV投与した（n＝3～4）。注射の20分後にマウスを安楽死させ、IVISを用いた蛍光測定のために器官を収集した。ImmunoBait NPを、AF647-オボアルブミンを封入することによって標識した。図40A）肺の代表的なIVIS画像。図40B）肺内に集積したImmunoBait NPのID%。データにより、肺転移の進行とともに、EHによって肺に送達されるNPの量は同様のままであることが示された。全ての群間で有意差なし（一元配置ANOVAの後、テューキーのHSD検定）:n.s.データは平均±s.e.m.として示している。

【図４１】図41A～41Bにより、赤血球への便乗によって肺転移巣に送達されたImmunoBaitナノ粒子は食細胞内に閉じ込められなかったことが実証される。EASIをIV注射する48時間前に、5 mg/mLのクロドロネートを含む200μLのClodrosome（登録商標）をIV投与することによって、食細胞（主に組織マクロファージ）を枯渇させた。ImmunoBait NPを、AF647-オボアルブミンを封入することによって標識した。EASI投与の20分後にマウスを安楽死させ、肺、肝臓、脾臓、および腎臓を含む主要器官を収集し、IVISを用いてイメージングを行なった。ROIの蛍光強度（放射効率）を定量して解析した。図41A）生理食塩水を注射したマウス、EASIを注射したマウス、または食細胞枯渇後にEASIを注射したマウスの器官の代表的なIVIS画像。図41B）食細胞枯渇あり、またはなしでのマウスの主要器官の器官1グラムあたりの全放射効率。食細胞の枯渇によって、肝臓および腎臓内へのNPの集積の低減がもたらされ、これらの2つの器官内に集積するNPの多くが食細胞に捕捉されることが示された。対照的に、肺内へのNPの集積は、食細胞を枯渇させた場合に減少せず、肺内で脱離したImmunoBait NPの多くは食細胞に捕捉されないことが示

された。データは平均±s.e.m.として示している。有意差あり（スチューデントのt検定）:＊p＜0.01、＊＊p＜0.01、＊＊＊p＜0.001。

【図４２】図42A～42Cにより、赤血球への便乗によるRANTES（ケモカイン）の送達が実証される。PLGAナノ粒子内にRANTESを封入することによって、ImmunoBait-RANTESを調製した。抗ICAM-1抗体でImmunoBait-RANTESをコートした。製剤をIV投与してから6時間後に、血清中および肺ホモジネート中のRANTES濃度をELISAによって定量した。（図42A）血中のRANTESケモカイン濃度（n＝5）。（図42B）肺内のRANTESケモカイン濃度（n＝5）。（図42C）投与後の血中RANTESケモカイン濃度に対する肺内RANTESケモカイン濃度の比率（n＝5）。データは平均±s.e.m.として示している。有意差あり（スチューデントのt検定）:＊＊p＜0.01。有意差なし（スチューデントのt検定）:n.s.

【図４３】図43A～43Bは、種々の処置でのマウスの肺転移巣内の免疫細胞を示す。肺内の（図43A）CD4および（図43B）CD8樹状細胞の絶対割合（%）を示した。データは平均±s.e.m.として示している。有意差あり（一元配置ANOVAの後、テューキーのHSD検定）:＊p＜0.05。

【図４４】図44A～44Bは、種々の処置でのマウスの異なる器官内の免疫細胞を示す。（図44A）脾臓内および（図44B）肝臓内のCD4細胞、Th1 CD4細胞、CD8細胞、エフェクターCD8細胞、NK細胞、樹状細胞および活性化された樹状細胞の絶対割合（%）を示した。データは平均±s.e.m.として示している。有意差あり

【図４５】図45A～45Bは、肺転移の進行の抑止における種々の製剤の有効性および安全性の評価を示す。（図45A）早期の肺転移モデルにおける種々の処置での37日目のマウスの肺の代表的な画像。（図45B）処置期間中のマウスの体重変化。（図45B）のデータは平均±s.e.m.として示している。

【図４６】図46A～46Bは、種々の処置でのマウスの肺転移巣内の樹状細胞を示す。（図46A）肺内の樹状細胞の絶対割合（%）。（図46B）CD45＋CD11c＋樹状細胞中のCD86＋細胞の割合（%）。データは平均±s.e.m.として示している。有意差あり（スチューデントのt検定）:＊＊p＜0.01、＊＊＊＊p＜0.0001。

【図４７】図47A～47Fは、赤血球への便乗による脾臓でのナノ粒子の引き渡しを改変するための模式図を示す。（図47A）試験に使用した、タンパク質でキャップされたポリマーナノ粒子（種々のサイズ、材料または種々のタンパク質でコート）。（図47B）タンパク質搭載のため、およびホスファチジルコリンの一時的な上方調節を誘導するために、赤血球上に搭載されるナノ粒子の数を調整した。（図47C）便乗ナノ粒子の静脈内注射により、脾臓内での高放出がもたらされる。（図47D）ホスファチジルコリンの上方調節およびCD47のマスキングにより、脾臓内での抗原提示細胞（APC）との相互作用が改善される。（図47E）赤血球の相互作用の改善により、APCによるナノ粒子取込みが促進されるとともに、赤血球は循環系に戻る。（図47F）脾臓でのナノ粒子の引き渡しにより、体液性免疫応答と細胞性免疫応答の両方が改善される。

【図４８】図48A～48Gは、タンパク質でキャップされたナノ粒子の特性評価を示す:（図48A）EDCケミストリーを用いたカルボキシル含有ポリスチレン（PS-COOH）ナノ粒子へのタンパク質結合のスキーム。（図48B）PS-COOHへの抗原結合（n＝12）。（図48C）未修飾のナノ粒子およびタンパク質でキャップされたナノ粒子の粒径（単位：nm）（n＝6）。有意差あり（スチューデントのt検定）:＊＊＊＊:p＜0.0001。（図48D）未修飾のナノ粒子およびタンパク質でキャップされたナノ粒子のゼータ電位（単位：mV）（n＝6）。有意差あり（スチューデントのt検定）:＊＊＊＊:p＜0.0001。（図48E）未修飾のナノ粒子およびタンパク質でキャップされたナノ粒子の粒径分布。（図48F）未修飾のナノ粒子およびタンパク質でキャップされたナノ粒子の走査型電子顕微鏡写真（SEM）。スケールバー：200 nm。（図48G）CD80発現%（基底発現に対して正規化）の観点で評価した樹状細胞の成熟（全ての群でn＝3）。有意差あり（一元配置ANOVAの後、テューキーのHSD検定）:＊:p＜0.05、ns：有意差なし。（図48B～48D、48G）のデータは平均±s.e.m.として表示している。

【図４９－１】図49A～49Kは、脾臓への標的指向性を達成するためのナノ粒子の赤血球

への便乗のパラメータの改変を示す。（図49A）赤血球に対する種々のナノ粒子供給比での赤血球1個あたりの搭載ナノ粒子（全ての群でn＝3）。（図49B）赤血球に対する種々のナノ粒子供給比でのナノ粒子担持赤血球の割合（％）（フローサイトメトリーによって測定）（全ての群でn＝3）。（図49C）肺に相当する剪断応力（6 Pa）でのインビトロ剪断試験後の赤血球から放出されたナノ粒子の割合（％）。有意差あり（一元配置ANOVAの後、テューキーのHSD検定）：＊:p＜0.05。（図49D）赤血球に対する種々のナノ粒子供給比での、ホスファチジルセリン発現割合（％）の変化によって評価した、ナノ粒子によって引き起こされた赤血球のダメージ（全ての群でn＝3）。点線は、陽性対照（ポリスチレンビーズ）の平均値を示す。有意差あり（一元配置ANOVAの後、テューキーのHSD検定）：＊:p＜0.05、＊＊:p＜0.01。（図49E）ナノ粒子によって赤血球に誘導される凝集塊は最小限であることを示す光学的凝集アッセイ。マトリックス形状の凝集塊が誘導されたポリスチレンビーズとは対照的に、試験したナノ粒子：赤血球比ではすべて、未処理の対照と同様であった。（図49F）種々のナノ粒子：赤血球比でインキュベートした赤血球を注射してから20分後にマウスから採取した肺および脾臓のIVIS画像。スケールは、低（栗色）から高（明黄色）までの放射効率を示す。（図49G）IVISイメージングによるこれらの器官の放射効率を用いることによりコンピュータ計算された、脾臓内に対する肺内の集積比（全ての群でn＝3）。点線は肺内集積と脾臓内集積が等しいことを示す。有意差あり（一元配置ANOVAの後、テューキーのHSD検定）：＊:p＜0.05。（図49A～49Dおよび49G）のデータは平均±s.e.m.として表示している。

【図４９－２】（図49H）フローサイトメトリーを用いた並行追跡によって評価した、循環系内に残存している粒子および赤血球の割合（n＝5）。（図49I）組織1グラムあたりの注入量％として表示した、注射の20分間後に採取した種々の器官における遊離ナノ粒子および便乗ナノ粒子の生体内分布（全ての群でn＝3）。有意差あり（スチューデントのt検定）：＊:p＜0.05。第1の系列はNPであり、第2の系列はRBC-NPである。（図49J）注射後24時間にわたってモニタリングした遊離ナノ粒子および便乗ナノ粒子の脾臓内集積動態。（全ての群でn＝3）。有意差あり（スチューデントのt検定）：＊:p＜0.05。（図49K）注射20分後の、単核食細胞系の最も重要な2つの器官における便乗ナノ粒子の生体内分布に対する食細胞枯渇の効果。（全ての群でn＝3）。第1の系列は＋食細胞であり、第2の系列は－食細胞である。有意差あり（スチューデントのt検定）：＊:p＜0.05、ns：有意差なし。（図49H～49J）のデータは平均±s.e.m.として表示している。

【図５０－１】図50A～50Iは、脾臓でのナノ粒子の引き渡しの免疫学的帰結を示す。（図50A）便乗ナノ粒子の全身の抗体応答（体液性応答）を評価するスケジュール。（図50B）最初の免疫負荷の1日前（-1日目）および2回目の免疫負荷の14日後（27日目）に評価した抗OVA IgG力価（全ての群でn＝5）。有意差あり（一元配置ANOVAの後、テューキーのHSD検定）：＊:p＜0.05。（図50B）のデータは平均±s.e.m.として表示している。（図50C）便乗ナノ粒子の全身の細胞性免疫応答を評価するスケジュール。

【図５０－２】（図50D）脾臓内のCD3＋CD8＋細胞の代表的なフローサイトメトリー解析画像。（図50E）脾臓内のCD3＋CD8＋細胞の割合（％）の定量分析。（EDIT群はn＝4、他の群は全てn＝5）。有意差あり（一元配置ANOVAの後、テューキーのHSD検定）：＊:p＜0.05。（図50F）脾臓内のCCR7＋CD62L＋細胞の代表的なフローサイトメトリー解析画像。（図50G）脾臓内のCCR7＋CD62L＋細胞の割合（％）の定量分析。（EDIT群はn＝4、他の群は全てn＝5）。有意差あり（一元配置ANOVAの後、テューキーのHSD検定）：＊＊:p＜0.01、＊＊＊:p＜0.001。（図50H）脾臓内のCD25＋FOXP3＋細胞の代表的なフローサイトメトリー解析画像。（図50I）脾臓内のCD25＋FOXP3＋細胞の割合（％）の定量分析。（EDIT群はn＝4、他の群は全てn＝5）。有意差あり（一元配置ANOVAの後、テューキーのHSD検定）：＊:p＜0.05、＊＊:p＜0.01、＊＊＊＊:p＜0.0001。（図50E、50G、50I）のデータは平均±s.e.m.として表示している。

【図５１－１】図51A～51Iは、ワクチン接種のための便乗ナノ粒子の免疫調節の治療的延長を示す。（図51A）予防ワクチン接種試験のスケジュール。（図51B）種々のエフェクター：標的比での、未処置対照に対して正規化した生存率のパーセントとして評価した

、種々の処置群による免疫処置後のインビトロ細胞死滅データ（全ての群でn＝3匹のマウス）。生理食塩水-OVA対EDITおよびNP対EDITで有意差あり（一元配置ANOVAの後、テューキーのHSD検定）：＊:p＜0.05、&:p＜0.05。（図51C）インビトロ細胞死滅アッセイにおける変化倍数、各処置群内でのエフェクター：標的比の関数としての変化倍数の比較。（全ての群でn＝3匹のマウス）。有意差あり（一元配置ANOVAの後、テューキーのHSD）：＊:p＜0.05。x軸において、第1の群は生理食塩水-OVAであり、第2の群はNPであり、第3の群はEDITであり、第4の群はCpGである。（図51B～51C）のデータは平均±s.e.m.として表示している。

【図５１－２】（図51D）種々の処置群ごとの、予防ワクチン接種後に移植を受けたマウスの腫瘍増殖曲線。この図の統計解析は17日目に行なった。（図51E）13日目の種々の群の腫瘍体積の評価。図51D～51Eについて、EDIT群およびCpG群はn＝8、生理食塩水群およびNP群はn＝7。有意差あり（一元配置ANOVAの後、テューキーのHSD）：＊:p＜0.05、＊＊:p＜0.01、＊＊＊:p＜0.001。図51F～51I（図51F）生理食塩水、（図51G）NP、（図51H）EDIT、（図51I）CpG処置群の個々のマウスでの腫瘍増殖動態。（図51D～51E）のデータは平均±s.e.m.として表示している。

【図５２】図52A～52Bは、200 nmのカルボキシル含有ポリスチレンナノ粒子の表面における種々の量のタンパク質の結合を示す。（図52A）PS-COOHに対するタンパク質の結合効率。（図52B）粒子1mgあたりの結合しているμgとして表示した、PS-COOHに結合したタンパク質の量。データは平均±s.e.m.として表示している。

【図５３】図53A～53Bは、樹状細胞によるOVA-NPの内在化を示す。（図53A）遊離形態またはPS-COOHに結合している状態のいずれかのAlexa Fluor 647標識オボアルブミンの内在化後の樹状細胞のフローサイトメトリー画像。（図53B）遊離形態またはPS-COOHに結合している状態のいずれかのAlexa Fluor 647標識オボアルブミンの内在化後の樹状細胞の共焦点光走査型顕微鏡写真（CLSM）。スケールバー：10μm。

【図５４】図54A～54Dは、EDITプラットフォームのための粒子の組み合わせを示す。（図54A）EDCケミストリーを用いた、種々の粒子に対する種々のタンパク質の結合の定量。500 nmのカルボキシル含有ポリスチレンおよび200 nmのポリ乳酸・グリコール酸に対するオボアルブミンの結合、ならびに200 nmのカルボキシル含有ポリスチレンに対するKLHの結合。（PS-KLH-200はn＝6、他の群は全てn＝5）。（図54B）種々の粒子の走査型電子顕微鏡写真。スケールバー：200 nm。（図54C）種々の粒子に結合しているAlexa Fluor 647標識オボアルブミンまたはKLHの内在化後の樹状細胞の共焦点光走査型顕微鏡写真（CLSM）。スケールバー：10μm。（図54D）CD80発現％の観点から評価した樹状細胞の成熟（基底発現に対して正規化）（全ての群でn＝3）。有意差あり（スチューデントのt検定）:＊＊＊:p＜0.001。（図54A～54D）のデータは平均±s.e.m.として表示している。

【図５５】図55A～55Cは、赤血球-ナノ粒子結合の機構の理解を示す。（図55A）適正な便乗を得るためにはナノ粒子の物理的包み込みが必要であることを示す、赤血球を固定した場合の便乗効率の変化。（図55B）便乗プロセスでの血清の添加はこのプロセスに影響を及ぼし、最小限の量であっても血清はタンパク質-タンパク質相互作用が起こることに影響を及ぼすことを示し、この相互作用は便乗を支配する重要な相互作用であることを示す。（図55C）赤血球上の便乗ナノ粒子の共焦点レーザー走査型顕微鏡画像。スケールバー：10μm。（図55A、55B）においてデータは平均±s.e.m.として表示している。

【図５６】図56A～56Cは、赤血球上に便乗しているナノ粒子の走査型電子顕微鏡写真を示す。（図56A）一群の対照赤血球。スケールバー：10μm。（図56B）一群の便乗された赤血球。スケールバー：10μm。（図56C）便乗ナノ粒子を示す単一の赤血球。スケールバー：2μm

【図５７】図57A～57Bは、赤血球膜上の表面マーカー発現の変化を示す。（図57A）赤血球膜上のCD47の発現割合（％）。未処理細胞での発現を点線によって示した。（全ての群でn＝3）。有意差あり（一元配置ANOVAの後、テューキーのHSD検定）：＊:p＜0.05。（図57B）基底発現に対して正規化したホスファチジルセリン発現の変化動態。各群

は、注射前の便乗された赤血球、注射直後に追跡した赤血球、および注射20分後（剪断によりナノ粒子が離脱することが予測される時点）に追跡した赤血球を示す（n＝3）。有意差あり（一元配置ANOVAの後、テューキーのHSD検定）：＊:p＜0.05。データは平均±s.e.m.として表示している。

【図５８】図58A～58Bは、静脈内注射の6時間後および24時間後の便乗ナノ粒子および遊離ナノ粒子の生体内分布を示す。（図58A）6時間目の生体内分布。（全ての群でn＝3）。有意差あり（スチューデントのt検定）：＊:p＜0.05、＊＊＊:p＜0.001。（図58B）24時間目の生体内分布。データは平均±s.e.m.として表示している。どちらも、第1の系列はNPであり、第2の系列はRBC-NPである。

【図５９】図59A～59Dは、種々のナノ粒子の組み合わせを脾臓に送達するEDITの能力を示す。（図59A）便乗ナノ粒子を有する赤血球（PS-OVA-500、PLGA-OVA-200、PS-KLH-200）の走査型電子顕微鏡写真。スケールバーはすべて2μm。（図59B）300:1のナノ粒子：赤血球の供給比における、種々のタンパク質でキャップされた粒子でのホスファチジルセリン発現の割合（%）の変化によって評価した、ナノ粒子によって引き起こされた赤血球のダメージ（全ての群でn＝3）。点線は、未処理の赤血球におけるホスファチジルセリン発現および陽性対照（ポリスチレンビーズ）によって引き起こされたダメージを示す。（図59C）300:1のナノ粒子：赤血球の供給比における、種々のタンパク質でキャップされた粒子での、ナノ粒子によって誘導された赤血球に対するダメージを示す、光学的凝集アッセイ。マトリックス形状の凝集塊が誘導されたポリスチレンとは対照的に、試験した粒子はすべて、未処理の対照と同様であった。（図59D）IVISイメージングによって評価した、注射から20分後の便乗ナノ粒子の生体内分布。便乗粒子はすべて、高い脾臓送達効率を示した。（全ての群でn＝3）。（図59B、59D）のデータは平均±s.e.m.として表示している。

【図６０】図60A～60Bは、肺内における送達の向上の免疫学的帰結を示す。（図60A）肺内に存在するCD8＋細胞の定量分析。（EDITはn＝3、他の群は全てn＝5）。（図60B）肺内の抗原感作CCR7＋CD62L＋細胞の定量分析（EDITはn＝4、他の群は全てn＝5）。（図60A、60B）のデータは平均±s.e.m.として表示している。

【図６１】図61は、予防の試験でのワクチン接種処置後の体重変化を示す。データは平均±s.e.m.として表示している。

【発明を実施するための形態】

【００２４】

詳細な説明

本明細書に記載の方法および組成物は、特定のポリマー粒子と組み合わせた状態の赤血球、例えばポリマー粒子が表面上に位置する赤血球に関する。このようなポリマー粒子は少なくとも治療剤とPLGAを含む。本明細書に記載のポリマー粒子を赤血球に接着させて対象に投与すると、ポリマー粒子は食作用を受けにくくなり、組織または器官内に優先的に集積することができ、効率が高まった薬物送達をもたらすことができる。

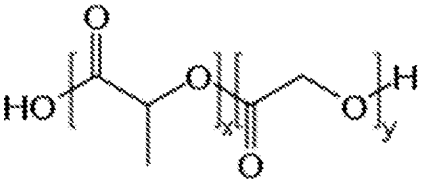
【００２５】

本態様のいずれかの一局面において、a. 赤血球と、b. 赤血球の細胞表面上に位置する、PLGAおよび少なくとも1種の治療剤を含む粒子とを含む、改変された組成物（例えば、細胞組成物）が本明細書に記載されている。粒子は、本明細書において互換的に「接着している粒子」、「ポリマー粒子」、または「バックパック」と称され得る。

【００２６】

赤血球または赤血球細胞は、ヒトでは細胞核がなく、卵形の両凹形状を有する造血細胞である。赤血球は、高レベルのヘモグロビンを有し、脊椎動物の全身に酸素を送達する手段である。本局面のいずれかの一部の態様では、赤血球はヒト赤血球である。本局面のいずれかの一部の態様では、赤血球は対象にとって自己である、例えば、インビトロまたはインビボのいずれかで粒子が接着している、対象自体の赤血球のうちの1つである。本局面のいずれかの一部の態様では、赤血球は遺伝子改変されておらず、かつ/または赤血球の細胞質に外来性物質が導入されていない。

【００２７】
本明細書に記載のポリマー粒子は、ポリ（乳酸・グリコール酸）（PLGA）を含む。本局面のいずれかの一部の態様では、粒子は、1種または複数種の治療剤およびPLGAを含む。本局面のいずれかの一部の態様では、粒子は、1種または複数種の治療剤およびPLGAから本質的になる。本局面のいずれかの一部の態様では、粒子は、1種または複数種の治療剤およびPLGAからなる。



PLGAの構造

【００２８】
本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは、ランダムコポリマーであり得る。
【００２９】
本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは、約10,000～約90,000の分子量を有するPLGAを含み得る、それからなり得る、または本質的にそれからなり得る。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは、約20,000～約60,000の分子量を有するPLGAを含み得る、それからなり得る、または本質的にそれからなり得る。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは、約35,000～約56,000の分子量を有するPLGAを含み得る、それからなり得る、または本質的にそれからなり得る。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは、約38,000～約54,000の分子量を有するPLGAを含み得る、それからなり得る、または本質的にそれからなり得る。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは、約45,000～約80,000の分子量を有するPLGAを含み得る、それからなり得る、または本質的にそれからなり得る。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは、約50,000～約75,000の分子量を有するPLGAを含み得る、それからなり得る、または本質的にそれからなり得る。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは、約20,000～約40,000の分子量を有するPLGAを含み得る、それからなり得る、または本質的にそれからなり得る。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは、約24,000～約38,000の分子量を有するPLGAを含み得る、それからなり得る、または本質的にそれからなり得る。
【００３０】
本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは、10,000～90,000の分子量を有するPLGAを含み得る、それからなり得る、または本質的にそれからなり得る。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは、20,000～60,000の分子量を有するPLGAを含み得る、それからなり得る、または本質的にそれからなり得る。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは、35,000～56,000の分子量を有するPLGAを含み得る、それからなり得る、または本質的にそれからなり得る。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは、38,000～54,000の分子量を有するPLGAを含み得る、それからなり得る、または本質的にそれからなり得る。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは、45,000～80,000の分子量を有するPLGAを含み得る、それからなり得る、または本質的にそれからなり得る。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは、50,000～75,000の分子量を有するPLGAを含み得る、それからなり得る、または本質的にそれからなり得る。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは、20,000～40,000の分子量を有するPLGAを含み得る、それからなり得る、または本質的にそれからなり得る。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは、24,000～38,000の分子量を有するPLGAを含み得る、それからなり得る、または本質的にそれからなり得る。
【００３１】
本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは、少なくとも約50:50またはLがそれより

多いL:G比、例えば、少なくとも約50:50、約55:45、約60:40、約65:35、約70:30、約75:25、約80:20、約85:15、約90:10、もしくは約95:5、またはそれより大きいL:Gを含む。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは、少なくとも50:50またはLがそれより多いL:G比、例えば、少なくとも50:50、55:45、60:40、65:35、70:30、75:25、80:20、85:15、90:10、もしくは95:5、またはそれより大きいL:Gを含む。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは、少なくとも約50:50～約95:5のL:G比、例えば、約50:50～約85:15、約50:50～約65:35のL:G比を含む。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは、少なくとも50:50～95:5のL:G比、例えば、50:50～85:15、50:50～65:35のL:G比を含む。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは、約50:50、約65:35、または約85:15のL:G比を含む。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは、45:55～55:45、60:40～70:30、または80:20～90:10のL:G比を含む。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは、50:50、65:35、または85:15のL:G比を含む。

【００３２】

PLGAは、エステル末端または酸末端で終結し得る。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGAは、エステル末端および/または酸末端を含む。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGA末端は、エステル末端を少なくとも90％、例えばエステル末端を少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、少なくとも99％、またはそれより多く含む。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGA末端は、酸末端を少なくとも90％、例えば、酸末端を少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、少なくとも99％、またはそれより多く含む。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGA末端はエステル末端からなる。本局面のいずれかの一部の態様では、PLGA末端は酸末端からなる。

【００３３】

特定のL:G比および末端の具体物（identities）を含む特定の具体的なPLGA組成が本明細書において企図されており、当該組成により、そのポリマー粒子が特定の器官を標的とすることが実証されている。かかる組成物の例を表3に示す。

【００３４】

（表３）

粒子組成番号	PLGAのL:G比	PLGAの末端組成	標的器官
1	約 50:50	エステル末端を少なくとも90%含む	脾臓、心臓
2	45:55 ～ 55:45	エステル末端を少なくとも90%含む	脾臓、心臓
3	50:50	エステル末端を少なくとも90%含む	脾臓、心臓
4	約 50:50	エステル末端からなる	脾臓、心臓
5	45:55 ～ 55:45	エステル末端からなる	脾臓、心臓
6	50:50	エステル末端からなる	脾臓、心臓
7	約 50:50	酸末端を少なくとも90%含む	脾臓、肺
8	45:55 ～ 55:45	酸末端を少なくとも90%含む	脾臓、肺
9	50:50	酸末端を少なくとも90%含む	脾臓、肺
10	約 50:50	酸末端からなる	脾臓、肺
11	45:55 ～ 55:45	酸末端からなる	脾臓、肺
12	50:50	酸末端からなる	脾臓、肺
13	約 85:15	エステル末端を少なくとも90%含む	腎臓、肺
14	80:20 ～ 90:10	エステル末端を少なくとも90%含む	腎臓、肺
15	85:15	エステル末端を少なくとも90%含む	腎臓、肺
16	約 85:15	エステル末端からなる	腎臓、肺
17	80:20 ～ 90:10	エステル末端からなる	腎臓、肺
18	85:15	エステル末端からなる	腎臓、肺
19	約 65:35	酸末端を少なくとも90%含む	肺、心臓、腎臓
20	60:40 ～ 70:30	酸末端を少なくとも90%含む	肺、心臓、腎臓
21	65:35	酸末端を少なくとも90%含む	肺、心臓、腎臓
22	約 65:35	酸末端からなる	肺、心臓、腎臓
23	60:40 ～ 70:30	酸末端からなる	肺、心臓、腎臓
24	65:35	酸末端からなる	肺、心臓、腎臓
25	約85未満:15	エステル末端を少なくとも90%含む	脾臓
26	85未満:15	エステル末端を少なくとも90%含む	脾臓
27	約85未満:15	エステル末端からなる	脾臓
28	85未満:15	エステル末端からなる	脾臓
29	約 50:50 ～ 約 85:15	エステル末端を少なくとも90%含む	脾臓
30	50:50 ～ 85:15	エステル末端を少なくとも90%含む	脾臓
31	約 50:50 ～ 約 85:15	エステル末端からなる	脾臓
32	50:50 ～ 85:15	エステル末端からなる	脾臓

【００３５】

択一的または付加的に、細胞組成物を形成させるためのインキュベーション時の粒子：赤血球比は、治療剤の送達標的に影響を及ぼし得る。例えば、局面のいずれかの一部の態様では、赤血球1個あたり約150～約600個の粒子の比での粒子と赤血球のインキュベーションによって形成される細胞組成物は、治療剤を脾臓へ標的指向化する。本局面のいずれかの一部の態様では、赤血球1個あたり150～600個の粒子の比での粒子と赤血球のインキュベーションによって形成される細胞組成物は、治療剤を脾臓へ標的指向化する。本局面のいずれかの一部の態様では、赤血球1個あたり約200～約400個の粒子の比での粒子と赤血球のインキュベーションによって形成される細胞組成物は、治療剤を脾臓へ標的指向化する。本局面のいずれかの一部の態様では、赤血球1個あたり200～400個の粒子の比での粒子と赤血球のインキュベーションによって形成される細胞組成物は、治療剤を脾臓へ標的指向化する。本局面のいずれかの一部の態様では、赤血球1個あたり約300個の粒子の比での粒子と赤血球のインキュベーションによって形成される細胞組成物は、治療剤を脾臓へ標的指向化する。本局面のいずれかの一部の態様では、赤血球1個あたり300個の粒子の比での粒子と赤血球のインキュベーションによって形成される細胞組成物は、治療剤を脾臓へ標的指向化する。本局面のいずれかの一部の態様では、粒子はナノ粒子

である。

【００３６】

本局面のいずれかの一部の態様では、赤血球1個あたり18個より多くの粒子を含む細胞組成物は、治療剤を脾臓へ標的指向化する。本局面のいずれかの一部の態様では、赤血球1個あたり20個より多くの粒子を含む細胞組成物は、治療剤を脾臓へ標的指向化する。本局面のいずれかの一部の態様では、赤血球1個あたり22個より多くの粒子を含む細胞組成物は、治療剤を脾臓へ標的指向化する。本局面のいずれかの一部の態様では、赤血球1個あたり約24個の粒子を含む細胞組成物は、治療剤を脾臓へ標的指向化する。本局面のいずれかの一部の態様では、赤血球1個あたり24個の粒子を含む細胞組成物は、治療剤を脾臓へ標的指向化する。本局面のいずれかの一部の態様では、粒子はナノ粒子である。

【００３７】

本局面のいずれかの一部の態様では、赤血球1個あたり約200個より少ないまたは約500個より多い粒子の比での粒子と赤血球のインキュベーションによって形成される細胞組成物は、治療剤を肺へ標的指向化する。本局面のいずれかの一部の態様では、赤血球1個あたり200個より少ないまたは500個より多い粒子の比での粒子と赤血球のインキュベーションによって形成される細胞組成物は、治療剤を肺へ標的指向化する。本局面のいずれかの一部の態様では、赤血球1個あたり約150個より少ないまたは約600個より多い粒子の比での粒子と赤血球のインキュベーションによって形成される細胞組成物は、治療剤を肺へ標的指向化する。本局面のいずれかの一部の態様では、赤血球1個あたり150個より少ないまたは600個より多い粒子の比での粒子と赤血球のインキュベーションによって形成される細胞組成物は、治療剤を肺へ標的指向化する。本局面のいずれかの一部の態様では、粒子はナノ粒子である。

【００３８】

本局面のいずれかの一部の態様では、赤血球1個あたり22個未満の粒子を含む細胞組成物は、治療剤を肺へ標的指向化する。本局面のいずれかの一部の態様では、赤血球1個あたり20個未満の粒子を含む細胞組成物は、治療剤を肺へ標的指向化する。本局面のいずれかの一部の態様では、赤血球1個あたり18個以下の粒子を含む細胞組成物は、治療剤を肺へ標的指向化する。本局面のいずれかの一部の態様では、赤血球1個あたり約18個の粒子を含む細胞組成物は、治療剤を肺へ標的指向化する。本局面のいずれかの一部の態様では、赤血球1個あたり18個の粒子を含む細胞組成物は、治療剤を肺へ標的指向化する。本局面のいずれかの一部の態様では、粒子はナノ粒子である。

【００３９】

本局面のいずれかの一部の態様では、ポリマー粒子の直径は約10 nm～約100μmのサイズである。本局面のいずれかの一部の態様では、ポリマー粒子の直径は10 nm～100μmのサイズである。本局面のいずれかの一部の態様では、ポリマー粒子の直径は約100 nm～約10μmのサイズである。本局面のいずれかの一部の態様では、ポリマー粒子の直径は100 nm～10μmのサイズである。本局面のいずれかの一部の態様では、ポリマー粒子の直径は約100 nm～約1μmのサイズである。本局面のいずれかの一部の態様では、ポリマー粒子の直径は100 nm～1μmのサイズである。

【００４０】

本局面のいずれかの一部の態様では、ポリマー粒子は実質的に円盤状の形状である。本局面のいずれかの一部の態様では、ポリマー粒子は円盤状の形状である。本明細書で用いる場合、「円盤状」とは、粒子が、実質的に平坦、凹形、または凸形の面を有するディスク様形状を有することを示す。本局面のいずれかの一部の態様では、ポリマー粒子は、杆体、柱体、立方体、直方体、六面体、または錐体の形状を有する。

【００４１】

本明細書で用いる場合、用語「治療剤」は、疾患および/または疾患に関連する症状の処置、管理、または軽快に使用され得る任意の薬剤を示す。薬剤は、化学薬品；有機または無機の小分子；シグナル伝達分子；核酸配列；核酸アナログ；タンパク質；ペプチド；酵素；アプタマー；ペプチド模倣物、ペプチド誘導体、ペプチドアナログ、抗体；イントラ

ボディ；生体高分子、生体材料、例えば細菌、植物、真菌、または動物の細胞または組織から作成した抽出物；天然に存在するか、または合成の組成物またはその機能性の断片を含む群から選択され得る。本局面のいずれかの一部の態様では、薬剤は、任意の化学薬品、実体または部分、例えば非限定的に、合成および天然に存在する非タンパク質性の実体である。薬剤は、所望の活性および/または性質を有することが公知であってもよく、多様な化合物のライブラリーから選択されてもよい。好ましくは、治療剤は、疾患または疾患に関連する1つもしくは複数の症状の処置、管理、または軽快に有用であることが公知であるか、あるいはそれらに使用されてきたか、または現在使用されている薬剤である。さまざまな病態に対する治療用化合物が当技術分野において公知であり、例えば、drugs.comのワールド・ワイド・ウェブにおいて入手可能なデータベースまたはcatalog.data.gov/dataset/drugsfda-databaseのワールド・ワイド・ウェブにおいて入手可能なFDA承認化合物のカタログを参照のこと；これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。治療剤の非限定的な例としては、ペプチド、核酸、抗原（例えば、抗原を発現している細胞に対する免疫応答を賦活化するため）、抗体試薬、小分子、ウイルス、化学療法剤、ステロイド、ケモカイン、免疫抑制剤、免疫賦活剤、またはそれらの組み合わせが挙げられる。

【００４２】

核酸分子は、本明細書に記載のように、ベクター、発現ベクター、阻害性核酸、アプタマー、鋳型分子もしくはカセット（例えば、遺伝子編集のための）、または標的指向性分子（例えば、CRISPR-Cas技術のための）、あるいは細胞に送達されることが望まれる任意の他の核酸分子であり得る。核酸分子は、RNA、DNA、またはその合成型もしくは修飾型であり得る。

【００４３】

本明細書で用いる場合、用語「化学療法剤」は、異常な細胞増殖を特徴とする疾患の処置において治療的有用性を有する任意の化学的または生物学的薬剤を示す。かかる疾患としては、腫瘍、新生物およびがん、ならびに過形成性増殖を特徴とする疾患が挙げられる。このような薬剤は、がん細胞が増殖を継続するために依存する細胞活動を抑止する機能を果たし得る。あらゆる態様の一部の局面では、化学療法剤は細胞周期阻害剤または細胞分裂阻害剤である。本発明の方法において有用な化学療法剤のカテゴリーとしては、アルキル化剤/アルカロイド剤、代謝拮抗薬、ホルモンまたはホルモンアナログ、および種々雑多な抗新生物薬が挙げられる。このような薬剤のほとんどは、がん細胞に対して直接または間接的に毒性である。一態様において、化学療法剤は放射性分子である。化学療法剤の非限定的な例は、本明細書の他の箇所に示されている。本局面のいずれかの一部の態様では、少なくとも1種の化学療法剤は、ドキソルビシン、カンプトテシン、パクリタキセル、ドセタキセル、5-フルオロウラシル、ゲムシタビン、メトトレキサート、またはそれらの組み合わせであり得る。

【００４４】

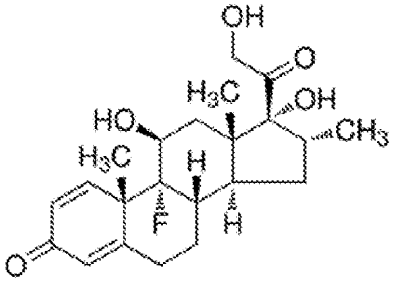
用語「免疫調節剤（immunomodulatory agent）」およびその語尾変化形、例えば非限定的に「免疫調節剤（immunomodulatory agents）」は、本明細書で用いる場合、宿主の免疫系を調節する薬剤を示す。一部の特定の態様では、免疫調節剤は免疫抑制剤である。一部の特定の他の態様では、免疫調節剤は免疫賦活剤である。本明細書で用いる場合、「免疫系の抑制」は、免疫系の種々の免疫機能の任意のパラメータによって測定される動物の免疫機能の低下または阻害を示す。免疫機能のパラメータの非限定的な例としては、抗体応答、B細胞の応答、T細胞の応答、T細胞の増殖、免疫調節性サイトカインの産生および/または抗原に対する応答（例えば、同種異系もしくは異種の細胞に対する応答）の大きさが挙げられ得る。逆に、「免疫系の賦活化」は、免疫系の種々の免疫機能の任意のパラメータによって測定される動物の免疫機能の増強または活性化を示す。例示的で非限定的な免疫賦活薬としては、免疫賦活性サイトカイン、例えば、IFN類、IFN-γ、TNFα、TGF-β、IL-1β、IL-6、IL-4、IL-10、IL-13、IL-2、IL-12、IL-15、およびIL-27、ならびに他の免疫賦活性アンタゴニスト、例えばCpG ODN、イミキモド、レシキモド

（R848）、モノホスホリルリピドA（MPLA）およびポリ（I:C）が挙げられる。

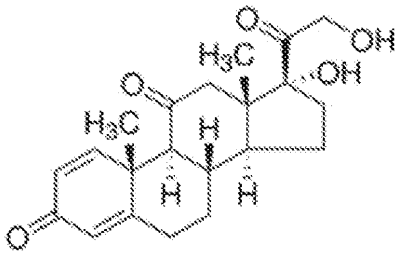
【００４５】

本明細書で用いる場合、用語「ステロイド」は、3つのシクロヘキサン環とシクロペンタン環とを含む化学物質を示す。これらの環は、四環系のシクロペンタフェナントレン、すなわちゴナンが形成されるように配列されている。本局面のいずれかの一部の態様では、ステロイドはコルチコステロイドである。本明細書で用いる場合、用語「コルチコステロイド」は、副腎皮質によって産生されるか、または合成によって作製されたステロイドホルモンの一類型を示す。コルチコステロイドは、広範な生理学的系、例えばストレス応答、免疫応答および炎症の調節、糖質の代謝、タンパク質異化作用、血中電解質のレベルおよび挙動に関与している。コルチコステロイドは一般的に、化学構造に基づいて4つの類型にグループ分けされる。グループAのコルチコステロイド（短～中時間作用型グルココルチコイド）としては、ヒドロコルチゾン、酢酸ヒドロコルチゾン、酢酸コルチゾン、ピバル酸チキソコルトール、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロンおよびプレドニゾンが挙げられる。グループBのコルチコステロイドとしては、トリアムシノロンアセトニド、トリアムシノロンアルコール、モメタゾン、アムシノニド、ブデソニド、デソニド、フルオシノニド、フルオシノロンアセトニドおよびハルシノニドが挙げられる。グループCのコルチコステロイドとしては、ベタメタゾン、ベタメタゾンリン酸エルテルナトリウム、デキサメタゾン、デキサメタゾンリン酸エステルナトリウムおよびフルオコルトロンが挙げられる。グループDのコルチコステロイドとしては、ヒドロコルチゾン-17-ブチレート、ヒドロコルチゾン-17-バレレート、二プロピオン酸アクロメタゾン、吉草酸ベタメタゾン、ジプロピオン酸ベタメタゾン、プレドニカルベート、クロベタゾン-17-ブチレート、クロベタゾール-17-プロピオネート、カプロン酸フルオコルトロン、ピバル酸フルオコルトロンおよび酢酸フルプレドニデンが挙げられる。コルチコステロイドの非限定的な例としては、アルドステロン、ベクロメタゾン、ジプロピオン酸ベクロメタゾン、ベタメタゾン、ベタメタゾン-21-ホスフェート二ナトリウム、吉草酸ベタメタゾン、ブデソニド、クロベタゾール、プロピオン酸クロベタゾール、酪酸クロベタゾン、ピバル酸クロコルトロン、コルチゾール、コルチステロン（cortisteron）、コルチゾン、デフラザコート、デキサメタゾン、酢酸デキサメタゾン、デキサメタゾンリン酸エステルナトリウム、二酢酸ジフロラゾン、ジヒドロキシコルチゾン、フルシノニド（flucinonide）、酢酸フルドロコルチゾン、フルメタゾン、フルニソリド、フルオシノロン（flucionolone）アセトニド、フロ酸フルチカゾン、プロピオン酸フルチカゾン、ハルシノニド、ハルプメタゾン（halpmetasone）、ヒドロコルチゾン、酢酸ヒドロコルチゾン（hydroconrtisone）、コハク酸ヒドロコルチゾン、16α-ヒドロキシプレドニゾロン、酢酸イソフルプレドン、メドリゾン、メチルプレドニゾロン、プレドナシノロン、プレドリカルベート（predricarbate）、プレドニゾロン、酢酸プレドニゾロン、プレドニゾロンコハク酸エステルナトリウム、プレドニゾン、トリアムシノロン、トリアムシノロンおよび二酢酸トリアムシノロンが挙げられる。本明細書で用いる場合、用語「コルチコステロイド」には、非限定的に、以下の一般名および商品名のコルチコステロイド:コルチゾン（CORTONE（商標）ACETATE（商標）、ADRESON（商標）、ALTESONA（商標）、CORTELAN（商標）、CORTISTAB（商標）、CORTISYL（商標）、CORTOGEN（商標）、CORTONE（商標）、SCHEROSON（商標））;デキサメタゾン-経口（DECADRON-ORAL（商標）、DEXAMETH（商標）、DEXONE（商標）、HEXADROL-ORAL（商標）、DEXAMETHASONE（商標）INTENSOL（商標）、DEXONE 0.5（商標）、DEXONE 0.75（商標）、DEXONE 1.5（商標）、DEXONE 4（商標））;ヒドロコルチゾン-経口（CORTEF（商標）、HYDROCORTONE（商標））;ヒドロコルチゾンシピオネート（CORTEF ORAL SUSPENSION（商標））;メチルプレドニゾロン-経口（MEDROL-ORAL（商標））;プレドニゾロン-経口（PRELONE（商標）、DELTA-CORTEF（商標）、PEDIAPRED（商標）、ADNISOLONE（商標）、CORTALONE（商標）、DELTACORTRIL（商標）、DELTASOLONE（商標）、DELTASTAB（商標）、DI-ADRESON F（商標）、ENCORTOLONE（商標）、HYDROCORTANCYL（商標）、MEDISOLONE（商標）、METICORTELONE（商標）、OPRED

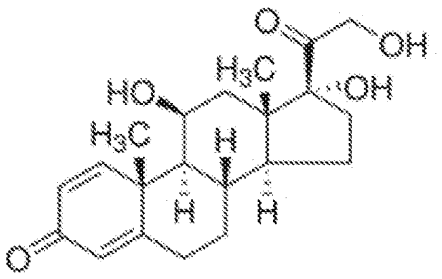
SONE（商標）、PANAAFCORTELONE（商標）、PRECORTISYL（商標）、PRENISOLONA（商標）、SCHERISOLONA（商標）、SCHERISOLONE（商標））;プレドニゾン（DELTASONE（商標）、LIQUID PRED（商標）、METICORTEN（商標）、ORASONE 1（商標）、ORASONE 5（商標）、ORASONE 10（商標）、ORASONE 20（商標）、ORASONE 50（商標）、PREDNICEN-M（商標）、PREDNISONE INTENSOL（商標）、STERAPRED（商標）、STERAPRED DS（商標）、ADASONE（商標）、CARTANCYL（商標）、COLISONE（商標）、CORDROL（商標）、CORTAN（商標）、DACORTIN（商標）、DECORTIN（商標）、DECORTISYL（商標）、DELCORTIN（商標）、DELLACORT（商標）、DELTADOME（商標）、DELTACORTENE（商標）、DELTISONA（商標）、DIADRESON（商標）、ECONOSONE（商標）、ENCORTON（商標）、FERNISONE（商標）、NISONA（商標）、NOVOPREDNISONE（商標）、PANAFCORT（商標）、PANASOL（商標）、PARACORT（商標）、PARMENISON（商標）、PEHACORT（商標）、PREDELTIN（商標）、PREDNICORT（商標）、PREDNICOT（商標）、PREDNIDIB（商標）、PREDNIMENT（商標）、RECTODELT（商標）、ULTRACORTEN（商標）、WINPRED（商標））;トリアムシノロン経口（KENACORT（商標）、ARISTOCORT（商標）、ATOLONE（商標）、SHOLOG A（商標）、TRAMACORT-D（商標）、TRI-MED（商標）、TRIAMCOT（商標）、TRISTOPLEX（商標）、TRYLONE D（商標）、U-TRI-LONE（商標））が包含され得る。本局面のいずれかの一部の態様では、コルチコステロイドが、デキサメタゾン（例えば、式Iの構造を有する化合物）;プレドニゾン（例えば、式IIの構造を有する化合物）;プレドニゾロン（例えば、式IIIの構造を有する化合物）;トリアムシノロン（例えば、式IVの構造を有する化合物）;プロピオン酸クロベタゾール（例えば、式Vの構造を有する化合物）;吉草酸ベタメタゾン（例えば、式VIの構造を有する化合物）;ジプロピオン酸ベタメタゾン（例えば、式VIIの構造を有する化合物）;またはフランカルボン酸モメタゾン（例えば、式VIIの構造を有する化合物）であり得る。ステロイドおよびコルチコステロイドの合成方法は当技術分野において周知であり、また、かかる化合物、例えばデキサメタゾン（カタログ番号D4902、Sigma-Aldrich;St. Louis,MO）およびプレドニゾン（カタログ番号P6254、Sigma-Aldrich;St. Louis,MO）が市販されている。



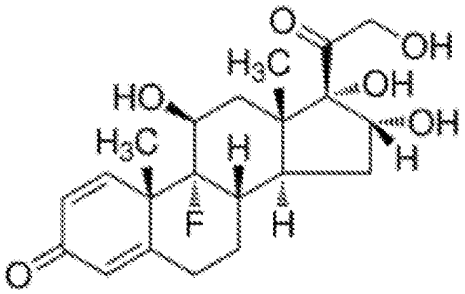
式I



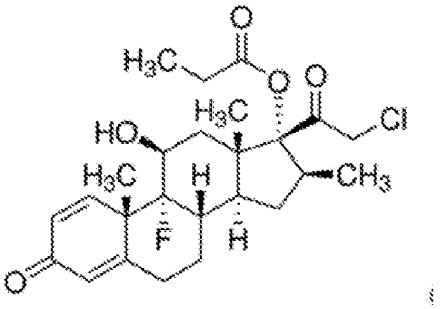
式II



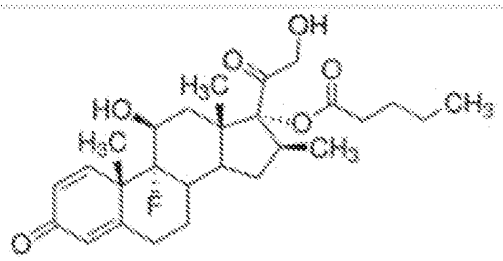
式 III



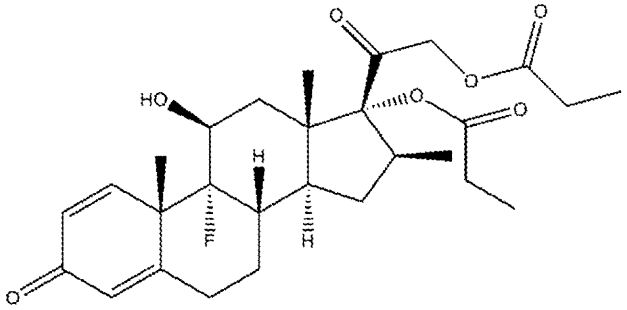
式 IV



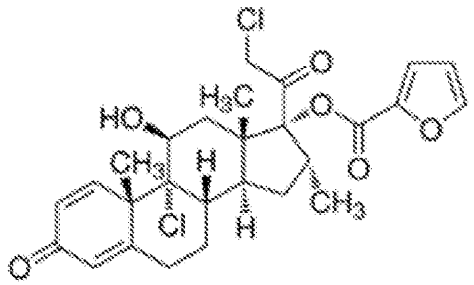
式IV



式 V



式VI



式VII

【００４６】

用語「ケモカイン」は、白血球に対して作用し、免疫系の機能を実施するように白血球の遊走を誘導する、および/または活性化状態にする任意のタンパク質の総称である。ケモカインは当技術分野において周知である。例示的なケモカインとしては、例えば非限定的に、TECK、ELC、BLC-1、CTACK、RANTES、フラクタルカイン、エキソタキシン（exotaxin）、エオタキシン-2、単球走化性タンパク質-1（MCP-1）、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MDC、ロイコタクチン（leukotactin）、SDF-1. ベータ.,リンホタクチン、TARC、ITAC、ENA-70、ENA-78、IP-10、NAP-2、インターロイキン-8（IL-8）、HCC-1、MIP-1α、MIP-1β、MIP-1δ、I-309、GRO-α、GRO-β、GRO-γ、MPIF-1、I-LINK、GCP-2、CXCL9、CXCL10、CXCL11、XCL-1、およびCCL-5が挙げられる。本局面のいずれかの一部の態様では、治療剤は、3×10^8個の赤血球あたり少なくとも約100μg、例えば、3×10^8個の赤血球あたり少なくとも約150μg、3×10^8個の赤血球あたり少なくとも約200μg、または3×10^8個の赤血球あたり少なくとも約250μgの濃度で存在し得る。本局面のいずれかの一部の態様では、治療剤は、3×10^8個の赤血球あたり少なくとも100μg、例えば3×10^8個の赤血球あたり少なくとも150μg、3×10^8個の赤血球あたり少なくとも200μg、または3×10^8個の赤血球あたり少なくとも250μgの濃度で存在し得る。

【００４７】

本局面のいずれかの一部の態様では、（1種または複数種の）治療剤はPLGAとの混合状態で存在する。本局面のいずれかの一部の態様では、（1種または複数種の）治療剤は粒子の一部のみに存在する、例えば、粒子の表面が治療剤でコーティングされており、かつ/または粒子の内部空間の一部分に治療剤が存在する。

【００４８】

本局面のいずれかの一部の態様では、粒子は2種以上の異なる治療剤を含み得る。本局面のいずれかの一部の態様では、細胞組成物は、各々が異なる治療剤を含む2個以上の粒子を含む。本局面のいずれかの一部の態様では、細胞組成物は、各々が異なる治療剤を含む2つ以上の赤血球-粒子の組み合わせの混合物を含む。

【００４９】

本局面のいずれかの一部の態様では、ポリマー粒子は、1種または複数種の細胞接着分子をさらに含む。細胞接着分子は、細胞（例えば赤血球）の表面に接着する任意の分子であり得る。好適な細胞接着分子の非限定的な例としては、赤血球細胞上の分子に特異的に結合する抗体試薬、赤血球細胞上の分子に特異的に結合するペプチド、細胞接着性ポリマー、細胞接着性高分子電解質、および赤血球細胞上の受容体に対するリガンドが挙げられる。

【００５０】

細胞接着を向上させ得る特徴としては、例えば、高い表面自由エネルギー、親水性タンパク質の含有量、低い表面水和、および低い表面電荷密度が挙げられる。例示的で非限定的な細胞接着分子には、ポリ（メタクリル酸グリシジル）（PGMA）、ポリカプロラクトン（PCL）、ポリジメチルシロキサン（PDMS）、ポリ（ヘキサメチルジシロキサン）（PHMDSO）、超疎水性パーフルオロ置換PEDOT（PEDOT-F）、超疎水性ポリスチレン（PS）、プラズマ処理ポリ（メタクリル酸メチル）（PMMA）、プラズマ処理ポリ-3-ヒドロキシブチレート（P3HB）、ホスファチジルエタノールアミン（PE）、およびカルボキシメチルキチン（CMCH）が含まれ得る。また、細胞接着分子には、例えば、RGDペプチド、コラーゲン、フィブロネクチン、ゼラチン、およびコラーゲンも含まれ得る。細胞接着分子のさらなる論考は、例えば、Lih et al. Progress in Polymer Science 44:28-61（2015）およびChen et al. Materials Today（2017）において知得され得、これらは参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【００５１】

本局面のいずれかの一部の態様では、細胞接着性高分子電解質は、ヒアルロン酸、ポリ（アリルアミン）塩酸塩、および/またはアルデヒド基を含むように修飾されたヒアルロン酸を含む。

【００５２】

本局面のいずれかの一部の態様では、細胞接着性ポリマーは、ポリフェノールまたは金属-ポリフェノール錯体であり得る。

【００５３】

所与の細胞表面上の受容体に対するリガンドおよび/または赤血球細胞を標的とするリガンドは当技術分野において公知であり、天然または合成のリガンドが挙げられ得る。赤血球細胞に対する例示的なリガンドとしては、非限定的な一例として、グルコースなどのグルコース輸送体のリガンド、レクチンなどのBAND3のリガンド、EBA-175などのグリコホリンAのリガンド、EBL-1などのグリコホリンBのリガンド、EBA-140などのグリコホリンCのリガンド、Rh4などの補体受容体1のリガンド、Rh5などのバシジンのリガンド、およびC9などのCD59のリガンドが挙げられ得る。

【００５４】

本局面のいずれかの一部の態様では、細胞接着分子は、1つまたは複数の細胞型、例えば赤血球細胞に特異的であり得る。しかしながら、粒子を、単離された細胞集団にインビトロで接着させてもよく、したがって、かかる特異性は全ての態様に必要とされる訳ではない。本局面のいずれかの一部の態様では、細胞接着分子は赤血球細胞に特異的ではない。

【００５５】

本局面のいずれかの一部の態様では、（1種または複数種の）細胞接着分子はPLGAとの混合状態で存在する。本局面のいずれかの一部の態様では、（1種または複数種の）細胞接着分子は粒子のほんの一部に存在する、例えば、粒子の表面が細胞接着分子でコーティングされている。本局面のいずれかの一部の態様では、粒子は2つ以上の異なる細胞接着分子を含み得る。本局面のいずれかの一部の態様では、細胞組成物は、各々が異なる細胞接着分子を含む2個以上の粒子を含む。本局面のいずれかの一部の態様では、細胞組成物は、各々が異なる細胞接着分子を含む2つ以上の赤血球-粒子の組み合わせの混合物を含む。

【００５６】

本明細書で用いる場合、用語「ポリマー」は、オリゴマー、コオリゴマー、ポリマーお

よびコポリマー、例えばランダムブロック、マルチブロック、スター、グラフト、勾配コポリマー、ならびにそれらの組み合わせを示す。ゲル浸透クロマトグラフィーによる測定時のポリマーの平均分子量は、500～約500,000、例えば20,000～約500,000の範囲であり得る。

【００５７】

本局面のいずれかの一部の態様では、粒子は1種または複数種のさらなるポリマーを含み得る。非限定的に、当技術分野において公知の任意のポリマー材料が本発明において使用され得る。したがって、局面のいずれかの一部の態様では、ポリマーは、多糖、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、フマル酸/セバシン酸のコポリマー、ポロキサマー、ポリラクチド、ポリグリコリド、ポリカプロラクトン、ポリ乳酸とポリグリコール酸のコポリマー、ポリ無水物、ポリイプシロンカプロラクトン、ポリアミド、ポリウレタン、ポリエステルアミド、ポリオルトエステル、ポリジオキサノン、ポリアセタール、ポリケタール、ポリカーボネート、ポリオルトカーボネート、ポリジヒドロピラン、ポリホスファゼン、ポリヒドロキシブチレート、ポリヒドロキシバレレート、ポリアルキレンオキサレート、ポリアルキレンスクシネート、ポリ（リンゴ酸）、ポリ（アミノ酸）、ポリビニルピロリドン、ポリエチレングリコール、ポリヒドロキシセルロース、ポリメタクリル酸メチル、キチン、キトサン、ポリ乳酸とポリグリコール酸のコポリマー、ポリ（グリセロールセバシン酸）（PGS）、ゼラチン、コラーゲン、シルク、アルギネート、セルロース、ポリ核酸、酢酸セルロース（例えば、二酢酸セルロース）、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリブチレン、ポリエチレンテレフタレート（PET）、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、ポリアミド、ナイロン、ポリカーボネート、ポリスルフィド、ポリスルホン、ハイドロゲル（例えば、アクリル系）、ポリアクリロニトリル、ポリ酢酸ビニル、酢酸酪酸セルロース、ニトロセルロース、ウレタン/カーボネートのコポリマー、スチレン/マレイン酸のコポリマー、ポリ（エチレンイミン）、ヒアルロン、ヘパリン、アガロース、プルラン、およびコポリマー、ターポリマー、ならびにその任意の組み合わせを含むコポリマーからなる群より選択される。例示的なポリマーとしては、非限定的な一例として、ポリラクチド（PLA）:ポリグリコリド（PGA）、ポリ-（ε-カプロラクトン）（PCL）、ポリビニルアルコール（PVA）、ポリ（乳酸-コ-カプロラクトン）（PLCL）、ヒアルロン酸（HA）、ゼラチン、コラーゲン、ポリ（グリセロールセバシン酸）（PGS）、ポリホスファゼン、ポリオルトエステル、ポリ無水物、ポリ（α-ヒドロキシエステル）、ポリ（エーテルエステル）、グリコリドのラクチドとε-カプロラクトンまたはトリメチレンカーボネートを含むコポリマー、ポリ（ポリオールセバシン酸）エラストマー、エラストマー、ポリ（ポリオールクエン酸）、ポリエステル、ポリ（グリコール酸）、ポリ（乳酸）、ポリ（カプロラクトン）、ポリ（乳酸・グリコール酸）、ポリ（ブチレンサクシネート）、ポリ（トリメチレンカーボネート）、ポリ（p-ジオキサノン）、ポリ（ブチレンテレフタレート）、ポリ（エステルアミド）、Hybrane（商標）S1200、DegraPol（商標）、ポリウレタン、ポリ無水物、ポリ［（カボキシ（caboxy）フェノキシ）プロパン-セバシン酸］、ポリホスホエステル、ポリ［ビス（ヒドロキシエチル）テレフタレート-オルトリン酸エチル/塩化テレフタロイル］、ポリ（オルトエステル）、ポリ（シアノアクリル酸アルキル）、ポリ（シアノアクリル酸ブチル）、ポリエーテル、ポリ（エチレングリコール）、ポリ（アミノ酸）、チロシン由来ポリカーボネート、微生物ポリエステル、ポリ（β-ヒドロキシアルカノエート）、ポリ（ヒドロキシブチレート）、ポリ（ヒドロキシブチレート-コ-ヒドロキシバレレート）、コラーゲン、アルブミン、グルテン、キトサン、ヒアルロネート、セルロース、アルギネート、およびデンプンが挙げられ得る。好適なポリマー構造は、例えば、Bat et al. Regen. Med. 9:385-398（2014）およびMarin et al. Int. J. Nanomedicine 8:3071-3091（2013）により詳細に論考されており、これらは参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【００５８】

本局面のいずれかの一部の態様では、ポリマーは生体適合性ポリマーである。本明細書で用いる場合、用語「生体適合性の」とは、体液または身体組織との接触状態の際に細胞

毒性または免疫原性を本質的に示さないことを意味する。用語「生体適合性ポリマー」は、対象が内服したときに無毒性、化学的に不活性、かつ実質的に非免疫原性であり、血中に実質的に不溶性であるポリマーを示す。生体適合性ポリマーは非生分解性または好ましくは生分解性のいずれかであり得る。好ましくは、生体適合性ポリマーはまた、インサイチューで用いられる場合、非炎症性である。

【００５９】

生分解性ポリマーは当技術分野において開示されている。好適な生分解性ポリマーの例としては、非限定的に、線形鎖状ポリマー、例えばポリペプチド、ポリヌクレオチド、多糖、ポリラクチド、ポリグリコリド、ポリカプロラクトン、ポリ乳酸とポリグリコール酸のコポリマー、ポリ無水物、ポリイプシロンカプロラクトン、ポリアミド、ポリウレタン、ポリエステルアミド、ポリオルトエステル、ポリジオキサノン、ポリアセタール、ポリケタール、ポリカーボネート、ポリオルトカーボネート、ポリジヒドロピラン、ポリホスファゼン、ポリヒドロキシブチレート、ポリヒドロキシバレレート、ポリアルキレンオキサレート、ポリアルキレンスクシネート、ポリ（リンゴ酸）、ポリ（アミノ酸）、ポリビニルピロリドン、ポリエチレングリコール、ポリヒドロキシセルロース、ポリメタクリル酸メチル、キチン、キトサン、ポリ乳酸とポリグリコール酸のコポリマー、ポリ（グリセロールセバシン酸）（PGS）、フマル酸、セバシン酸、および前述のものの1種または複数種を含むコポリマー、ターポリマーが挙げられる。他の生分解性ポリマーとしては、例えばゼラチン、コラーゲン、シルク、キトサン、アルギネート、セルロース、ポリ核酸などが挙げられる。

【００６０】

好適な非生分解性の生体適合性ポリマーとしては、一例として、酢酸セルロース（例えば、二酢酸セルロース）、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリブチレン、ポリエチレンテレフタレート（PET）、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、ポリアミド、ナイロン、ポリカーボネート、ポリスルフィド、ポリスルホン、ハイドロゲル（例えば、アクリル系）、ポリアクリロニトリル、ポリ酢酸ビニル、酢酸酪酸セルロース、ニトロセルロース、ウレタン/カーボネートのコポリマー、スチレン/マレイン酸のコポリマー、ポリ（エチレンイミン）、ポロキサマー（例えば、プルロニック、例えばポロキサマー407および188）、ヒアルロン酸、ヘパリン、アガロース、プルラン、ならびに前述のものの1種または複数種を含むコポリマー、例えばエチレン/ビニルアルコールコポリマー（EVOH）が挙げられる。本局面のいずれかの一部の態様では、生体適合性ポリマーは、ポリ乳酸とポリグリコール酸のコポリマー、ポリ（グリセロールセバシン酸）（PGS）、ポリ（エチレンイミン）、プルロニック（ポロキサマー407、188）、ヒアルロン酸、ヘパリン、アガロースまたはプルランである。

【００６１】

本局面のいずれかの一部の態様では、ポリマーは、ホモポリマー、コポリマー、またはブロックポリマーである。本局面のいずれかの一部の態様では、ポリマーは、アミド基またはエステル基からなる群より選択される側鎖を含む。本局面のいずれかの一部の態様では、ポリマーは生分解性、生体適合性かつ無毒性である。

【００６２】

ポリマーは、第2のポリマーを用いて誘導体化されてもよく、第1のポリマーと第2のポリマーは同じであっても異なっていてもよい。例えば、ポリマーは、ポリエチレングリコール（PEG）を用いて誘導体化され得る。

【００６３】

本局面のいずれかの一部の態様では、ポリマーまたはポリマーの一部分はリンカーによって連結され得る。本局面のいずれかの一部の態様では、ポリマー粒子の成分、例えば治療剤および/または細胞接着分子がリンカーを介して連結され得る。本明細書で用いる場合、用語「リンカー」は、化合物の2つのパートを連結する部分を示す。リンカーは典型的には、直接結合または原子、例えば酸素もしくはイオウ、単位、例えばNR_1、C（O）、C（O）O、C（O）NR_1、SO、SO_2、SO_2NHまたは原子鎖、例えば置換もしくは非置換の

アルキル、置換もしくは非置換のアルケニル、置換もしくは非置換のアルキニル、アリールアルキル、アリールアルケニル、アリールアルキニル、ヘテロアリールアルキル、ヘテロアリールアルケニル、ヘテロアリールアルキニル、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロシクリルアルケニル、ヘテロシクリルアルキニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルキルアリールアルキル、アルキルアリールアルケニル、アルキルアリールアルキニル、アルケニルアリールアルキル、アルケニルアリールアルケニル、アルケニルアリールアルキニル、アルキニルアリールアルキル、アルキニルアリールアルケニル、アルキニルアリールアルキニル、アルキルヘテロアリールアルキル、アルキルヘテロアリールアルケニル、アルキルヘテロアリールアルキニル、アルケニルヘテロアリールアルキル、アルケニルヘテロアリールアルケニル、アルケニルヘテロアリールアルキニル、アルキニルヘテロアリールアルキル、アルキニルヘテロアリールアルケニル、アルキニルヘテロアリールアルキニル、アルキルヘテロシクリルアルキル、アルキルヘテロシクリルアルケニル、アルキルヘテロシクリルアルキニル、アルケニルヘテロシクリルアルキル、アルケニルヘテロシクリルアルケニル、アルケニルヘテロシクリルアルキニル、アルキニルヘテロシクリルアルキル、アルキニルヘテロシクリルアルケニル、アルキニルヘテロシクリルアルキニル、アルキルアリール、アルケニルアリール、アルキニルアリール、アルキルヘテロアリール、アルケニルヘテロアリール、アルキニルヘレロアリールを含み、このとき、1つまたは複数のメチレンは、O、S、S（O）、SO_2、N（R_1）$_2$、C（O）、切断性連結基、置換または非置換のアリール、置換または非置換のヘテロアリール、置換または非置換の複素環式部が介在していてもよいし、それらで終結していてもよく、ここで、R_1は、水素、アシル、脂肪族、または置換脂肪族である。

【００６４】

リンカーは分岐型リンカーであってもよい。分岐型リンカーの分岐点は少なくとも二価であり得るが、三価、四価、五価または六価の原子であってもよく、かかる多価を提示する基であってもよい。一部の特定の態様では、分岐点は、-N、-N（Q）-C、-O-C、-S-C、-SS-C、-C（O）N（Q）-C、-OC（O）N（Q）-C、-N（Q）C（O）-C、または-N（Q）C（O）O-Cであり得、ここで、Qは、各存在の場合で独立してHまたは置換されていてもよいアルキルである。本局面のいずれかの一部の態様では、分岐点は、アクリレート、シアノアクリレート、またはメチルアクリレートであり得る。

【００６５】

種々の態様において、リンカーは切断性リンカーである。切断性リンカーは、リンカーが、これが一体に保持している2つのパートを解放するために切断可能であることを意味する。切断性リンカーは、切断剤、例えば非限定的に、酵素、pH、酸化還元電位または分解性分子の存在に感受性であり得る。かかる薬剤の例:特定の基質に対して選択される酸化還元剤あるいは基質特異性を有しない酸化還元剤、例えば、細胞内に存在し、還元によって酸化還元切断性連結基を分解することができる酸化酵素もしくは還元酵素または還元剤、例えばメルカプタンなど;エステラーゼ;アミダーゼ;エンドソームまたは酸性環境を作出し得る薬剤、例えば5以下のpHをもたらすもの;一般酸として作用することによって酸切断性連結基を加水分解もしくは分解することができる酵素、ペプチダーゼ（これは基質特異的であり得る）およびプロテアーゼ、ならびにホスファターゼ。

【００６６】

本局面のいずれかの一部の態様では、リンカーはポリエチレングリコールである。本局面のいずれかの一部の態様では、リンカーは、配列DEVD（SEQ ID NO:1）を含むペプチドである。さらなる一態様では、リンカーは、配列KDEVDAP（SEQ ID NO:2）を含むペプチドである。なおさらなる一態様では、リンカーは、配列GKDEVDAP（SEQ ID NO:3）を含むペプチドである。本局面のいずれかの一部の態様では、切断性リンカーは酵素によって切断可能である。

【００６７】

本局面のいずれかの一部の態様では、切断性リンカーは、小分子からなる群より選択される。一部の好ましい態様では、切断性リンカーは、ペプチドまたはポリペプチドからな

る群より選択される。

【００６８】

粒子を作製し、これを赤血球に接着させる例示的な方法を本明細書の実施例に示す。

【００６９】

本態様のいずれかの一局面において、対象に本明細書に記載の細胞組成物を投与する工程を含む、対象の細胞に治療剤を送達する方法が本明細書に記載されている。本局面のいずれかの一部の態様では、細胞は、がん細胞であり、治療剤は、化学療法剤、ケモカイン、または免疫賦活剤（例えば、IFN）である。

【００７０】

本態様のいずれかの一局面において、それを必要とする対象において、がんおよび/または腫瘍を処置する方法であって、本明細書に記載の細胞組成物を対象に投与する工程を含み、治療剤が、化学療法剤、ケモカイン、または免疫賦活剤（例えば、IFN）である、方法が本明細書に記載されている。

【００７１】

本局面のいずれかの一部の態様では、対象の肺内にがん細胞が存在し、かつ/または対象が肺がんを有する。本局面のいずれかの一部の態様では、対象の肺内にがん細胞が存在し、かつ/または対象が肺がんを有し、PLGAは、肺を標的とする、表3から選択される組成物であり、例えば、当該PLGAは約65:35のL:G比および酸末端を含む。

【００７２】

本局面のいずれかの一部の態様では、対象の腎臓内にがん細胞が存在し、かつ/または対象が腎臓がんを有する。本局面のいずれかの一部の態様では、対象の腎臓内にがん細胞が存在し、かつ/または対象が腎臓がんを有し、PLGAは、腎臓を標的とする、表3から選択される組成物であり、例えば、当該PLGAは約85:15のL:G比およびエステル末端を含むか、または当該PLGAは約65:35のL:G比および酸末端を含む。

【００７３】

本明細書で用いる場合、用語「がん」は一般的に、異常な細胞が制御されずに分裂し、近隣組織に浸潤し得る類型の疾患または病態に関する。また、がん細胞は、血液およびリンパ系を介して他の身体部分にも拡散し得る。がんにはいくつかの主要な型が存在する。癌は、皮膚または内臓の内層であるか、もしくは内臓を覆う組織に発生するがんである。肉腫は、骨、軟骨、脂肪、筋肉、血管または他の結合組織もしくは支持組織に発生するがんである。白血病は、血液形成組織、例えば骨髄に発生するがんであり、大量数の異常な血液細胞が生成して血中に入ることを引き起こす。リンパ腫および多発性骨髄腫は免疫系の細胞に発生するがんである。中枢神経系のがんは脳および脊髄の組織に発生するがんである。

【００７４】

本局面のいずれかの一部の態様では、がんが原発性がんである。本局面のいずれかの一部の態様では、がんが悪性のがんである。本明細書で用いる場合、用語「悪性の」は、がんが、制御不能な増殖（すなわち、正常範囲を超えた分裂）、浸潤（すなわち、隣接組織への侵入および破壊）ならびに転移（すなわち、リンパまたは血液による体内の他の場所への拡散）のうちの1つまたは複数を示す腫瘍細胞群であることを示す。本明細書で用いる場合、用語「転移する」とは、身体のある部分から別の部分へのがんの拡散を示す。拡散し細胞によって形成された腫瘍を「転移性腫瘍」または「転移」と称する。転移性腫瘍には元の（原発性）腫瘍内のものと同様の細胞が含まれている。本明細書で用いる場合、用語「良性の」または「非悪性の」とは、腫瘍が大きく増殖する場合もあり得るが身体の他の部分に拡散しないことを示す。良性腫瘍は自己限定的であり、典型的には浸潤または転移しない。

【００７５】

「がん細胞」または「腫瘍細胞」は、がん性の増殖物または組織の個々の細胞を示す。腫瘍は一般的に、異常な細胞増殖によって形成された腫脹部または病変部を示し、これは、良性、前悪性または悪性であり得る。ほとんどのがん細胞は腫瘍を形成するが、一部の

もの、例えば白血病は必ずしも腫瘍を形成しない。腫瘍を形成するがん細胞では、がん（細胞）および腫瘍（細胞）という用語は互換的に用いられる。

【００７６】

本明細書で用いる場合、用語「新生物」は、任意の新たな異常な増殖組織、例えば異常な組織塊を示し、その増殖は、正常組織の増殖を上回り、正常組織の増殖と協調的でない。したがって、新生物は、良性新生物、前悪性新生物または悪性新生物であり得る。

【００７７】

がんまたは腫瘍を有する対象は、対象の体内に客観的に測定可能ながん細胞が存在している対象である。この定義には、悪性の活発に増殖性のがん、ならびに潜在的に休眠状態の腫瘍または微小転移が含まれる。元の場所から移動して他の重要器官に播種されたがんは、最終的に、冒された器官の機能の低下による対象の死をもたらし得る。

【００７８】

がんの例としては、非限定的に、癌、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、白血病、基底細胞癌、胆道がん、膀胱がん、骨のがん、脳およびCNSのがん、乳がん、腹膜のがん、子宮頸がん、絨毛癌、結腸および直腸のがん、結合組織のがん、消化器系のがん、子宮内膜がん、食道がん、目のがん、頭頸部のがん、胃がん（例えば、胃腸のがん）、膠芽細胞腫（GBM）、肝癌、ヘパトーマ、上皮内新生物.、腎臓がんまたは腎がん、喉頭がん、白血病、肝臓がん、肺がん（例えば、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、肺の腺癌、および肺の扁平上皮癌）、リンパ腫、例えばホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫、黒色腫、骨髄腫、神経芽細胞腫、口腔がん（例えば、口唇、下、口内および咽頭）、卵巣がん、膵がん、前立腺がん、網膜芽腫、横紋筋肉腫、直腸がん、呼吸器系のがん、唾液腺癌、肉腫、皮膚がん、扁平上皮細胞がん、胃がん、精巣がん、甲状腺がん、子宮または子宮内膜のがん、泌尿器系のがん、外陰がん、ならびに他の癌および肉腫、ならびにB細胞リンパ腫（例えば、低悪性度/濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）、小リンパ球性（SL）NHL、中悪性度/濾胞性NHL、中悪性度びまん性NHL、高悪性度免疫芽球性NHL、高悪性度リンパ芽球性NHL、高悪性度小型非切れ込み核細胞性NHL、巨大腫瘤病変NHL、マントル細胞リンパ腫、AIDS関連リンパ腫、およびワルデンストレームマクログロブリン血症）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、ヘアリー細胞白血病、慢性骨髄芽球性白血病、および移植後リンパ増殖性障害（PTLD）、ならびに母斑症に付随する異常な血管増殖、浮腫（例えば、脳腫瘍に付随するもの）、およびメイグス症候群が挙げられる。

【００７９】

「がん細胞」は、インビボ、エクスビボまたは組織培養状態のいずれかの、がん性、前がん性または形質転換された細胞であって、必ずしも新たな遺伝物質の取込みを伴うものでない自然発生的または誘導された表現型の変化を有する細胞である。形質転換は、形質転換性のウイルスによる感染と新たなゲノム核酸の組込み、または外来性核酸の取込みにより生じ得るが、自然発生的に、または発癌物質への曝露後、それにより内在遺伝子が変異することによっても生じ得る。形質転換/がんは、例えば、形態構造の変化、細胞の不死化、増殖制御の異常、病巣の形成、足場非依存性、悪性、接触阻止および増殖の密度制限の喪失、増殖因子または血清への非依存性、腫瘍特異的マーカー、侵襲性または転移、ならびに適当な動物宿主、例えばヌードマウスでの腫瘍増殖と関連している。

【００８０】

本局面のいずれかの一部の態様では、それを必要とする対象において免疫応答を賦活化する方法であって、本明細書に記載の細胞組成物を対象に投与する工程を含み、治療剤が、抗原、免疫賦活剤、またはケモカインである、方法が本明細書に記載されている。本局面のいずれかの一部の態様では、免疫応答が局所化される。

【００８１】

本明細書の実施例に記載のように、本明細書に記載の細胞組成物のうちの1つを用いた抗原の送達によりワクチン接種効果がもたらされ得る。すなわち、治療剤は抗原であり、抗原に対するワクチン接種をもたらすための細胞組成物によって免疫応答を刺激する。

【００８２】

本明細書にさらに記載のように、本明細書に記載の細胞組成物は、さらなるアジュバントの使用を伴わずにワクチン接種効果をもたらし得る。免疫処置、免疫応答およびワクチン接種との関連において本明細書で用いる場合、用語「アジュバント」は、特異的抗原と併用した使用した場合に抗原単独よりロバストな免疫応答を生じさせる任意の物質を示す。ワクチン製剤に組み込んだ場合、アジュバントは一般的に、（1種または複数種の）ワクチン抗原に対する特異的免疫応答を加速する、長期化する、またはその質を向上させるように作用する。したがって、局面のいずれかの一部の態様では、抗原を含む本明細書に記載の細胞組成物が、さらなるアジュバントなしで投与される。本局面のいずれかの一部の態様では、抗原を含む本明細書に記載の細胞組成物に、さらなるアジュバントが含まれていない。本局面のいずれかの一部の態様では、抗原を含む本明細書に記載の細胞組成物を含む組成物に、さらなるアジュバントが含まれていない。本局面のいずれかの一部の態様では、さらなるアジュバントが、ミョウバン、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、水酸化リン酸カルシウム、パラフィン油、スクアレン、デタージェント、植物性サポニン、サイトカイン、完全フロイントアジュバント、不完全フロイントアジュバントまたは鎮痛薬のうちのいずれかであり得る。本局面のいずれかの一部の態様では、抗原を含む本明細書に記載の細胞組成物を含む組成物に、外来性または異所性のミョウバン、水酸化アルミニウム、リン酸アリウミニウム、水酸化リン酸カルシウム、パラフィン油、スクアレン、デタージェント、植物性サポニン、サイトカイン、完全フロイントアジュバント、不完全フロイントアジュバントまたは鎮痛薬が含まれていない。本局面のいずれかの一部の態様では、抗原を含む本明細書に記載の細胞組成物に、外来性または異所性のミョウバン、水酸化アルミニウム、リン酸アリウミニウム、水酸化リン酸カルシウム、パラフィン油、スクアレン、デタージェント、植物性サポニン、サイトカイン、完全フロイントアジュバント、不完全フロイントアジュバントまたは鎮痛薬が含まれていない。

【００８３】

本明細書に記載のように、「抗原」は、B細胞受容体（BCR）、T細胞受容体（TCR）および/または抗体によって特異的に結合され、それにより免疫応答を活性化する分子である。抗原は、病原体由来のもの、または起源が病原体であるものであり得る。抗原は、ポリペプチド、タンパク質、核酸もしくは他の分子またはその一部分であり得る。用語「抗原決定基」は、抗原結合分子によって、より具体的には前記分子の抗原結合部位によって認識される抗原上のエピトープを示す。

【００８４】

本局面のいずれかの一部の態様では、細胞組成物は、サブユニットワクチン、例えば組換えサブユニットワクチンであり得る。サブユニットワクチンは、疾患原因微生物全体ではなく、疾患原因微生物から得られた、または疾患原因微生物に由来する抗原のサブセットのみを含む。サブユニットワクチンは複数種類の異なる抗原を含むものであってもよい。抗原は、組換え技術によって作製されたサブユニットワクチンは組換えサブユニットワクチンと称される。

【００８５】

本明細書に記載の方法および組成物における使用に好適な例示的で非限定的なワクチンとしては、コロナウイルスワクチン、SARS-CoV-2ワクチン、肺炎球菌ワクチン、B型肝炎（HBV）ワクチン、無菌体百日咳（aP）ワクチン、ジフテリア破傷風無菌体百日咳（DTaP）ワクチン、A型肝炎（HAV）ワクチン、髄膜炎菌（MV）ワクチン、および/または肺炎球菌結合型ワクチン（PCV）13が挙げられ得る。本局面のいずれかの一部の態様では、抗原が、コロナウイルス、SARS-CoV-2、肺炎球菌、B型肝炎（HBV）ウイルス、破傷風菌（Clostribium tetani）、百日咳菌（Bordetella pertussis）、ジフテリア菌（Corynebacterium diphtheria）、A型肝炎（HAV）ウイルス、および/または髄膜炎菌の（ウイルスもしくは菌から得られる、起源がウイルスもしくは菌である、あるいはウイルスもしくは菌に見出される）抗原であり得る。

【００８６】

本局面のいずれかの一部の態様では、複数種類の抗原が投与される。本局面のいずれか

の一部の態様では、複数種類のワクチンが投与される。

【００８７】

本明細書に記載の組成物および方法は、ワクチン接種、免疫処置、および/または免疫応答の賦活化を必要とする対象に投与され得る。本局面のいずれかの一部の態様では、本明細書に記載の方法は、有効な量の本明細書に記載の組成物を、例えば、免疫応答を賦活化するため、または抗原が由来する関連する病原体に対する防御をもたらすために、対象に投与する工程を含む。関連する病原体に対する防御をもたらすことは、後に抗原（例えば、生きた病原体上または生きた病原体内の）に曝露されると対象が抗原の刺激を受けていない場合より有効な免疫応答が誘発されるように免疫系を賦活化することである。防御としては、より速い病原体のクリアランス、症状の重症度および/または期間の低減、および/または疾患もしくは症状の発現の欠如が挙げられ得る。同等の未処理対照と比較したとき、かかる低減は、任意の標準的な手法により測定された場合、少なくとも5%、10%、20%、40%、50%、60%、80%、90%、95%、99%、またはそれを上回る低減である。本明細書に記載の組成物を対象に投与するためのさまざまな手段が当業者に公知である。かかる方法としては、非限定的に、経口、非経口、静脈内、筋肉内、皮下、経皮、気道（エーロゾル）、経肺、皮膚経由、注射または経表面での投与が挙げられ得る。投与は局所であっても全身性であってもよい。本局面のいずれかの一部の態様では、投与が筋肉内または皮下であり得る。

【００８８】

本局面のいずれかの一部の態様では、治療剤が抗原である場合、細胞組成物は脾臓を標的指向性を有する。例えば組成物のPGLAが、a）約50:50のL:G比およびエステル末端、b）約50:50のL:G比および酸末端、またはc）85未満:15のL:G比およびエステル末端を含む場合、細胞組成物は脾臓への標的指向性を有し得る。

【００８９】

択一的または付加的に、細胞組成物を形成するためのインキュベーション時の粒子：赤血球比は、治療剤の送達標的に影響を及ぼし得る。例えば、局面のいずれかの一部の態様では、赤血球1個あたり約150～約600個の粒子の比での粒子と赤血球のインキュベーションによって形成される細胞組成物は、治療剤を脾臓へ標的指向化する。本局面のいずれかの一部の態様では、赤血球1個あたり150～600個の粒子の比での粒子と赤血球のインキュベーションによって形成される細胞組成物は、治療剤を脾臓へ標的指向化する。本局面のいずれかの一部の態様では、赤血球1個あたり約200～約400個の粒子の比での粒子と赤血球のインキュベーションによって形成される細胞組成物は、治療剤を脾臓へ標的指向化する。本局面のいずれかの一部の態様では、赤血球1個あたり200～400個の粒子の比での粒子と赤血球のインキュベーションによって形成される細胞組成物は、治療剤を脾臓へ標的指向化する。本局面のいずれかの一部の態様では、赤血球1個あたり約300個の粒子の比での粒子と赤血球のインキュベーションによって形成される細胞組成物は、治療剤を脾臓へ標的指向化する。本局面のいずれかの一部の態様では、赤血球1個あたり300個の粒子の比での粒子と赤血球のインキュベーションによって形成される細胞組成物は、治療剤を脾臓へ標的指向化する。本局面のいずれかの一部の態様では、粒子がナノ粒子である。

【００９０】

本局面のいずれかの一部の態様では、赤血球1個あたり18個より多くの粒子を含む細胞組成物は、治療剤を脾臓へ標的指向化する。本局面のいずれかの一部の態様では、赤血球1個あたり20個より多くの粒子を含む細胞組成物は、治療剤を脾臓へ標的指向化する。本局面のいずれかの一部の態様では、赤血球1個あたり22個より多くの粒子を含む細胞組成物は、治療剤を脾臓へ標的指向化する。本局面のいずれかの一部の態様では、赤血球1個あたり約24個の粒子を含む細胞組成物は、治療剤を脾臓へ標的指向化する。本局面のいずれかの一部の態様では、赤血球1個あたり24個の粒子を含む細胞組成物は、治療剤を脾臓へ標的指向化する。本局面のいずれかの一部の態様では、粒子がナノ粒子である。

【００９１】

本局面のいずれかの一部の態様では、それを必要とする対象において免疫応答を低減または抑制する方法であって、本明細書に記載の細胞組成物を対象に投与する工程を含み、治療剤が免疫抑制剤またはステロイドである、方法が本明細書に記載されている。本局面のいずれかの一部の態様では、免疫応答が局所化される。

【００９２】

本局面のいずれかの一部の態様では、賦活化、低減、または抑制すべき免疫応答は、対象の肺におけるものであるか、または対象の肺におけるもののはずである。本局面のいずれかの一部の態様では、賦活化、低減、または抑制すべき免疫応答は、対象の肺におけるものであるか、または対象の肺におけるもののはずであり、PLGAは、肺を標的とする、表3から選択される組成物であり、例えば、当該PLGAは約65:35のL:G比および酸末端を含む。

【００９３】

本明細書で用いる場合、「免疫応答」は、免疫系の細胞、例えばB細胞、T細胞（CD4もしくはCD8）、制御性T細胞、抗原提示細胞、樹状細胞、単球、マクロファージ、NKT細胞、NK細胞、好塩基球、好酸球または好中球による刺激に対する（例えば、疾患、抗原、または例えば自己免疫の場合では健常細胞に対する）応答を示す。本明細書に記載の局面の一部の態様では、免疫応答がT細胞応答、例えばCD4＋応答またはCD8＋応答である。これらの細胞によるかかる応答としては、例えば、細胞傷害性、増殖、サイトカインもしくはケモカインの産生、輸送または食作用が挙げられ得、応答を行なう免疫細胞の性質に依存性であり得る。免疫応答の賦活化は、免疫応答の誘導または増強を示す。免疫応答の抑制は免疫応答の消失または低減を示す。

【００９４】

抗原に対する免疫応答は、関心対象の抗原内またはワクチン組成物内に存在する分子に対する対象における体液性および/または細胞媒介性免疫応答の発現であり得る。本発明の解釈上、「体液性免疫応答」は抗体媒介性免疫応答であり、抗原を、ある程度の親和性で認識して結合する抗体の誘導および生成を伴うが、「細胞媒介性免疫応答」はT細胞および/または他の白血球によって媒介されるものである。「細胞媒介性免疫応答」は、主要組織適合複合体（MHC）のクラスIもしくはクラスII分子、CD1または他の非古典的MHC様分子と結合状態の抗原性エピトープの提示によって誘起される。これにより抗原特異的CD4＋Tヘルパー細胞またはCD8＋細胞傷害性リンパ球細胞（「CTL」）が活性化される。CTLは、古典的または非古典的MHCにコードされたタンパク質との結合状態で提示され、細胞表面上に発現されるペプチド抗原に対する特異性を有する。CTLは、細胞内微生物の細胞内破壊またはかかる微生物に感染した細胞の溶解の誘導および促進を補助する。細胞性免疫の別の局面はヘルパーT細胞による抗原特異的応答を伴う。ヘルパーT細胞は、古典的または非古典的MHC分子との結合状態のペプチドまたは他の抗原を表面上にディスプレイしている細胞に対する非特異的エフェクター細胞の機能の賦活化およびエフェクター細胞の活性の注力を補助するように作用する。また、「細胞媒介性免疫応答」では、活性化されたT細胞および/または他の白血球、例えばCD4＋T細胞およびCD8＋T細胞に由来するものによって産生されるサイトカイン、ケモカインおよび他のかかる分子の産生が示される。具体的な抗原または組成物が細胞媒介性免疫学的応答を賦活化する能力は、いくつかのアッセイによって、例えばリンパ増殖（リンパ球活性化）アッセイ、細胞傷害性CTL細胞アッセイによって、抗原に特異的なTリンパ球について感作対象においてアッセイすることによって、または抗原での再刺激に応答したT細胞によるサイトカイン産生の測定によって測定され得る。かかるアッセイは当技術分野において周知である。例えば、Erickson et al.（1993）J. Immunol. 151:4189-4199、およびDoe et al.（1994）Eur. J. Immunol. 24:2369-2376を参照のこと。

【００９５】

改変細胞組成物は、処置される対象にとって自己または異種である細胞（例えば、赤血球）を含み得る。本局面のいずれかの一部の態様では、処置方法が、ドナーおよび/または対象から細胞を採取し、細胞をポリマー粒子とエクスビボで接触させる第1の工程を含み

得る。細胞は、単離されたもの、例えば、接触/接着工程を行なう前にドナー/対象から採取された血液試料から単離されたものであってもよく、接触/接着を複数種類の細胞型を含む試料中、例えば血液試料中で行なってもよい。

【００９６】

本明細書に記載の組成物および方法は、本明細書に記載の病態のうちの1つを有するか、またはそれを有すると診断された対象に投与/実施され得る。本局面のいずれかの一部の態様では、本明細書に記載の方法が、有効な量の本明細書に記載の組成物、例えば改変細胞組成物を対象に、本明細書に記載の病態の症状を緩和するために投与する工程を含む。本局面のいずれかの一部の態様では、治療上有効な用量の組成物が投与される。本明細書で用いる場合、「症状を緩和すること」は、その疾患と関連している任意の病態または症状が軽快することである。同等の未処理対照と比較したとき、かかる低減は、任意の標準的な手法により測定された場合、少なくとも5％、10％、20％、40％、50％、60％、80％、90％、95％、99％、またはそれを上回る低減である。本明細書に記載の組成物を対象に投与するためのさまざまな手段が当業者に公知である。かかる方法としては、非限定的に、非経口、静脈内、筋肉内、皮下、経皮、気道（エーロゾル）、経肺、皮膚経由、注射または腫瘍内での投与が挙げられ得る。投与は局所であっても全身性であってもよい。

【００９７】

用語「有効な量」は、本明細書で用いる場合、疾患または障害の少なくとも1つまたはそれより多くの症状を緩和するのに必要とされる組成物の量を示し、所望の効果がもたらされるのに充分な薬理学的組成物の量に関する。用語「治療上有効な量」は、したがって、典型的な対象に投与したときに具体的な治療効果がもたらされるのに充分な組成物の量を示す。また、本明細書で用いる場合の有効な量は、種々の状況において、疾患症状の発現を遅延させるのに充分な量、疾患症状の過程を改変する（例えば非限定的に、疾患症状の進行を減速させる）のに充分な量、または疾患症状を逆転させるのに充分な量が包含されることもあり得よう。したがって、厳密な「有効な量」を明記することは一般的に実用的でない。しかしながら、任意の所与の場合で、適切な「有効な量」は、当業者が常套的な実験法のみを用いて決定することができよう。

【００９８】

有効な量、毒性および治療有効性は、標準的な製薬手順により細胞培養物または実験動物において、例えば、LD50（集団の50％に対して致死性の用量）およびED50（集団の50％において治療上有効な用量）を調べるために測定され得る。投薬量は、使用される投薬形態および使用される投与経路に応じて異なり得る。毒性効果と治療効果との用量比は治療指数であり、LD50/ED50比として表示され得る。大きな治療指数を示す組成物および方法が好ましい。治療上有効な用量は最初、細胞培養物でのアッセイにより推定され得る。また、用量は動物モデルにおいて、細胞培養物または適切な動物モデルでの測定時、IC50（すなわち、症状の半抑制（half-maximal inhibition）が達成される活性成分濃度）を含む循環血漿濃度範囲が得られるように設定され得る。血漿中レベルは、例えば高速液体クロマトグラフィーによって測定され得る。任意の具体的な投薬量の効果は適当なバイオアッセイにより、例えばとりわけ腫瘍サイズおよび/または免疫応答マーカーについてモニタリングされ得る。投薬量は医師によって決定され、必要に応じて、観察される処置効果に合うように調整され得る。

【００９９】

本局面のいずれかの一部の態様では、投与される治療剤の用量が、遊離（例えば、粒子中にはなく、かつ/または赤血球に接着していない）形態で投与される場合に対象に投与される量の50％以下である。本局面のいずれかの一部の態様では、投与される治療剤の用量が、遊離（例えば、粒子中にはなく、かつ/または赤血球に接着していない）形態で投与される場合に対象に投与される量の40％以下である。本局面のいずれかの一部の態様では、投与される治療剤の用量が、遊離（例えば、粒子中にはなく、かつ/または赤血球に接着していない）形態で投与される場合に対象に投与される量の30％以下である。本局面のいずれかの一部の態様では、投与される治療剤の用量が、遊離（例えば、粒子中にはなく、か

つ/または赤血球に接着していない）形態で投与される場合に対象に投与される量の20％以下である。本局面のいずれかの一部の態様では、投与される治療剤の用量が、遊離（例えば、粒子中にはなく、かつ/または赤血球に接着していない）形態で投与される場合に対象に投与される量の10％以下である。

【０１００】

本局面のいずれかの一部の態様では、本明細書に記載の組成物が薬学的組成物であり得る。本局面のいずれかの一部の態様では、本明細書に記載の技術は、本明細書に記載の改変細胞組成物と任意に薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物に関する。本局面のいずれかの一部の態様では、薬学的組成物の活性成分が本明細書に記載の改変細胞組成物を含む。本局面のいずれかの一部の態様では、薬学的組成物の活性成分が本質的に本明細書に記載の改変細胞組成物からなる。本局面のいずれかの一部の態様では、薬学的組成物の活性成分が本明細書に記載の改変細胞組成物からなる。薬学的に許容される担体および希釈剤としては、生理食塩水、水性バッファー溶液、溶媒および/または分散媒が挙げられる。かかる担体および希釈剤の使用は当技術分野において周知である。薬学的に許容される担体としての機能を果たし得る物質の非限定的な一例としては:（1）糖類、例えばラクトース、グルコースおよびスクロース;（2）デンプン、例えばコーンスターチおよびイモデンプン;（3）セルロースおよびその誘導体、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、エチルセルロース、微晶質セルロースおよび酢酸セルロース;（4）粉末化トラガカント;（5）麦芽;（6）ゼラチン;（7）滑沢剤、例えばステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウムおよびタルク;（8）賦形剤、例えばココアバターおよび坐剤用ワックス;（9）油、例えばピーナッツ油、綿実油、ベニバナ油、ゴマ油、オリーブ油、コーン油およびダイズ油;（10）グリコール、例えばプロピレングリコール;（11）ポリオール、例えばグリセリン、ソルビトール、マンニトールおよびポリエチレングリコール（PEG）;（12）エステル、例えばオレイン酸エチルおよびラウリン酸エチル;（13）寒天;（14）緩衝剤、例えば水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウム;（15）アルギン酸;（16）パイロジェンフリー水;（17）等張性生理食塩水;（18）リンゲル液;（19）エチルアルコール;（20）pH緩衝液;（21）ポリエステル、ポリカーボネートおよび/またはポリ無水物;（22）充填剤、例えばポリペプチドおよびアミノ酸（23）血清成分、例えば血清アルブミン、HDLおよびLDL;（22）C_2～C_{12}アルコール、例えばエタノール;ならびに（23）薬学的製剤に使用される他の無毒性の適合性の物質が挙げられる。また、湿潤剤、着色剤、離型剤、コーティング剤、甘味剤、香味剤、芳香剤、保存料および酸化防止剤を製剤中に存在させてもよい。例えば「賦形剤」、「担体」、「薬学的に許容される担体」などの用語は本明細書において互換的に用いている。本局面のいずれかの一部の態様では、本明細書に記載のように、担体は活性薬剤の分解を抑止する。

【０１０１】

本局面のいずれかの一部の態様では、本明細書に記載の改変細胞組成物を含む薬学的組成物が非経口用量形態であり得る。非経口投薬形態の投与は典型的には汚染物質に対する患者の自然防御を回避するため、非経口投薬形態は好ましくは滅菌されているか、または患者への投与前に滅菌が可能である。非経口投薬形態の例としては、非限定的に、注射の準備ができた液剤、注射用の薬学的に許容されるビヒクル中に溶解または懸濁させる準備ができた乾燥または凍結乾燥製剤品、注射の準備ができた懸濁剤、およびエマルジョン剤が挙げられる。また、制御放出の非経口投薬形態、例えば非限定的にDUROS（登録商標）-型投薬形態および過量放出が患者への投与ために調製される場合もあり得る。

【０１０２】

本開示のような改変細胞組成物の非経口投薬形態を得るために使用され得る好適なビヒクルは当業者に周知である。例としては、非限定的に:滅菌水;注射用水USP;生理食塩液;グルコース溶液;水性ビヒクル、例えば非限定的に、塩化ナトリウム注射液、リンゲル注射液、デキストロース注射液、デキストロースと塩化ナトリウムの注射液、および乳酸加リンゲル注射液;水混和性ビヒクル、例えば非限定的に、エチルアルコール、ポリエチレングリコールおよびプロピレングリコール;ならびに非水性ビヒクル、例えば非限定的に、コーン

油、綿実油、ピーナッツ油、ゴマ油、オレイン酸エチル、ミリスチン酸イソプロピルおよび安息香酸ベンジルが挙げられる。

【０１０３】

本局面のいずれかの一部の態様では、本明細書に記載の改変細胞組成物が単独療法薬として投与され、例えば、その病態のための別の処置薬は対象に投与されない。

【０１０４】

本局面のいずれかの一部の態様では、本明細書に記載の方法は、第2の薬剤および/または処置薬を対象に、例えば併用療法の一部として投与することをさらに含み得る。第2の薬剤および/または処置薬の非限定的な例としては、放射線療法、手術、ゲムシタビン、シスプラチン、パクリタキセル、カルボプラチン、ボルテゾミブ、AMG479、FK506、ボリノスタット、アクリフラビン、リツキシマブ、テモゾロミド、ラパマイシン、ABT-737、PI-103;アルキル化剤、例えばチオテパおよびCYTOXAN（登録商標）シクロホスファミド;アルキルスルホネート、例えばブスルファン、インプロスルファンおよびピポスルファン;アジリジン、例えばベンゾドパ、カルボクオン、メツレドパおよびウレドパ;エチレンイミンおよびメチラメラミン（methylamelamine）、例えばアルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレン（trietylene）ホスホルアミド、トリエチイレン（triethiylene）チオホスホルアミドおよびトリメチローロメラミン（trimethylolmelamine）;アセトゲニン（特に、ブラタシンおよびブラタシノン）;カンプトテシン（例えば、合成アナログのトポテカン）;ブリオスタチン;カリスタチン（callystatin）;CC-1065（例えば、そのアドゼレシン、カルゼレシンおよびビゼレシン合成アナログ）;クリプトフィシン（特に、クリプトフィシン1およびクリプトフィシン8）;ドラスタチン;デュオカルマイシン（例えば、合成アナログのKW-2189およびCB1-TM1）;エレウテロビン（eleutherobin）;パンクラチスタチン;サルコディクチン（sarcodictyin）;スポンジスタチン;ナイトロジェンマスタード、例えばクロラムブシル、クロルナファジン、コロホスファミド（cholophosphamide）、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、塩酸メクロレタミンオキシド、メルファラン、ノベンビチン（novembichin）、フェネステリン（phenesterine）、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタード;ニトロソウレア、例えばカルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチンおよびラニムヌスチン（ranimnustine）;抗生物質、例えばエンジイン系抗生物質（例えば、カリケアミシン、特にカリケアミシンガンマ1IおよびカリケアミシンオメガI1（例えば、Agnew. Chem. Intl. Ed. Engl.,33:183-186（1994）参照）;ジネミシン、例えばジネミシンA;ビスホスホネート、例えばクロドロネート;エスペラミシン;ならびにネオカルジノスタチン発色団および関連色素タンパク質エンジイン系抗生物質発色団）、アクラシノマイシン（aclacinomysins）、アクチノマイシン、アウトラマイシン（authramycin）、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン（carabicin）、カミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシニ（chromomycinis）、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン（detorubicin）、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ADRIAMYCIN（登録商標）ドキソルビシン（例えば、モルホリノ-ドキソルビシン、シアノモルホリノ-ドキソルビシン、2-ピロロリノ-ドキソルビシンおよびデオキシドキソルビシン）、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン（marcellomycin）、マイトマイシン、例えばマイトマイシンC、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン（potfiromycin）、ピューロマイシン、ケラマイシン（quelamycin）、ロドルビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン;代謝拮抗薬、例えばメトトレキサートおよび5-フルオロウラシル（5-FU）;葉酸アナログ、例えばデノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトレキサート;プリンアナログ、例えばフルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン（thiamiprine）、チオグアニン;ピリミジンアナログ、例えばアンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン;アンドロゲン、例えばカルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノー

ル、メピチオスタン、テストラクトン;抗副腎剤、例えばアミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン;葉酸補充剤、例えばフロリン酸（frolinic acid）;アセグラトン;アルドホスファミドグリコシド;アミノレブリン酸;エニルウラシル;アムサクリン;ベストラブシル（bestrabucil）;ビサントレン;エダトラキサート（edatraxate）;デフォファミン（defofamine）;デメコルシン;ジアジクオン（diaziquone）;エルホルミチン（elformithine）;酢酸エリプチニウム（elliptinium）;エポチロン;エトグルシド;硝酸ガリウム;ヒドロキシ尿素;レンチナン;ロニダイニン（lonidainine）;メイタンシノイド、例えばメイタンシンおよびアンサミトシン;ミトグアゾン;ミトザントロン;モピダンモル（mopidanmol）;ニトラエリン（nitraerine）;ペントスタチン（pentostatin）;フェナメット（phenamet）;ピラルビシン;ロソキサントロン（losoxantrone）;ポドフィリン（podophyllinic）酸;2-エチルヒドラジド;プロカルバジン;PSK（登録商標）多糖複合体（JHS Natural Products,Eugene,Oreg.）;ラゾキサン;リゾキシン;シゾフラン（sizofuran）;スピロゲルマニウム;テヌアゾン酸;トリアジクオン;2,2’,2’’-トリクロロトリエチルアミン;トリコテセン（特に、T-2トキシン、ベラクリン（verracurin）A、ロリジンAおよびアングイジン（anguidine））;ウレタン;ビンデシン;ダカルバジン;マンノムスチン;ミトブロニトール;ミトラクトール;ピポブロマン;ガシトシン（gacytosine）;アラビノシド（「Ara-C」）;シクロホスファミド;チオテパ;タキソイド、例えばTAXOL（登録商標）パクリタキセル（Bristol-Myers Squibb Oncology,Princeton,N.J.）、ABRAXANE（登録商標）クレモホールフリー、パクリタキセルのアルブミン懸濁型（-engineered）ナノ粒子製剤（American Pharmaceutical Partners,Schaumberg,Ill.）、およびTAXOTERE（登録商標）ドキセタキセル（doxetaxel）（Rhone-Poulenc Rorer,Antony,France）;クロランブシル（chloranbucil）;GEMZAR（登録商標）ゲムシタビン;6-チオグアニン;メルカプトプリン;メトトレキサート;白金系アナログ、例えばシスプラチン、オキサリプラチンおよびカルボプラチン;ビンブラスチン;白金;エトポシド（VP-16）;イホスファミド;ミトザントロン;ビンクリスチン;NAVELBINE. RTM. ビンクリスチン;ノバントロン;テニポシド;エダトレキサート;ダウノマイシン;アミノプテリン;ゼローダ;イバンドロネート;イリノテカン（カンプトサール,CPT-11）（例えば、イリノテカンと5-FUおよびロイコボリンとでの処置レジメン）;トポイソメラーゼ阻害剤RFS 2000;ジフルオロメチルオルニチン（DMFO）;レチノイド、例えばレチノイン酸;カペシタビン;コンブレタスタチン;ロイコボリン（LV）;オキサリプラチン、例えばオキサリプラチン処置レジメン（FOLFOX）;ラパチニブ（Tykerb.RTM.）;細胞増殖を低減させるPKC-アルファの阻害剤、細胞増殖を低減させるRafの阻害剤、細胞増殖を低減させるH-Rasの阻害剤、細胞増殖を低減させるEGFRの阻害剤（例えば、エルロチニブ（Tarceva（登録商標）））および細胞増殖を低減させるVEGF-Aの阻害剤ならびに上記の任意のものの薬学的に許容される塩、酸または誘導体が挙げられ得る。

【０１０５】

また、処置方法は、放射線または放射線療法の使用をさらに含み得る。さらに、処置方法は、外科処置の使用をさらに含み得る。

【０１０６】

一部の特定の態様では、本明細書に記載の細胞組成物を含む組成物が有効な用量で患者に1回投与され得る。一部の特定の態様では、有効な用量の組成物が患者に反復して投与され得る。本局面のいずれかの一部の態様では、初期処置レジメン後、処置が、より低頻度ベースで施行され得る。例えば、隔週で3ヶ月間の処置後、処置は、1回/月で6ヶ月間または1年間またはそれより長く反復され得る。本明細書に記載の方法による処置により、病態のマーカーレベルまたは症状は、例えば、少なくとも10％、少なくとも15％、少なくとも20％、少なくとも25％、少なくとも30％、少なくとも40％、少なくとも50％、少なくとも60％、少なくとも70％、少なくとも80％、もしくは少なくとも90％、またはそれより大きく低減され得る。

【０１０７】

本明細書に記載の組成物の投薬量は医師によって決定され、必要に応じて、観察される処置効果に合うように調整され得る。処置の持続期間および頻度に関して、当業者の医師

が、処置によって治療有益性がもたらされているときを判断するため、および投薬量を増やすか減らすか、投与頻度を上げるか下げるか、処置を中止するかどうか、処置を再開するかどうか、または処置レジメンに他の変更を加えるかどうかを判断するために対象をモニタリングすることは典型的である。投薬スケジュールは、いくつかの臨床的要素、例えば組成物に対する対象の感受性に応じて週1回から毎日までで異なり得る。所望の用量または活性化量は一度に投与してもよく、部分用量、例えば2～4回の部分用量に分割し、ある期間にわたって、例えば1日のうちで適切な時間間隔で、または他の適切なスケジュールで投与してもよい。本局面のいずれかの一部の態様では、投与は、長期、例えば1日1回または複数回の用量および/または処置が数週または数ヶ月の期間にわたるものであり得る。投薬および/または処置のスケジュールの例は、毎日、1日2回、1日3回または1日4回以上で1週間、2週間、3週間、4週間、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月もしくは6ヶ月またはそれ以上の期間にわたる投与である。本明細書に記載の改変細胞組成物を含む組成物は、5分間、10分間、15分間、20分間、または25分間などの期間にわたって投与され得る。

【０１０８】

本明細書に記載の方法による本明細書に記載の組成物の投与のための投薬量範囲は、例えば、細胞の有有効性、および本明細書に記載の病態の症状、マーカーまたは指標の所望される低減の程度、例えば、誘導されることが所望される腫瘍増殖の所望される低減率（％）に依存する。投薬量は、有害な副作用、例えば過度な炎症または免疫抑制が引き起こされるほど大きくないのがよい。一般的に、投薬量は、患者の年齢、体調および性別により異なり、当業者によって決定され得る。また、投薬量は、合併症があった場合には個々の医師によって調整され得る。

【０１０９】

細胞組成物の有効性、例えば、本明細書に記載の病態の処置における、または本明細書に記載の応答を誘導するための有効性は、当業者の医師によって判断され得る。しかしながら、処置は、本明細書に記載の病態の徴候または症状のうちの1つまたは複数が有益な様式で改変された場合、他の臨床的に許容される症状が改善されたか、またはさらには軽快した場合、あるいは所望の応答が、本明細書に記載の方法による処置後、例えば少なくとも10％誘導された場合、本明細書で用いる用語の「有効な処置」とみなされる。有効性は、例えば、本明細書に記載の方法により処置される病態のマーカー、指標、症状および/または発生率あるいは任意の他の測定可能な適切なパラメータを測定することによりアセスメントされ得る。また、有効性は、入院または医療介入の必要性によってアセスメントされる個体に悪化がない（すなわち、疾患の進行が停止している）ことによっても測定され得る。このような指標を測定する方法は当業者に公知である、および/または本明細書に記載されている。処置としては、個体または動物（非限定的な一例としてはヒトまたは動物が挙げられる）における疾患の任意の処置が挙げられ:（1）疾患を抑止すること、例えば、症状（例えば、痛みもしくは炎症）の悪化を予防すること、または（2）疾患の重症度を軽減すること、例えば、症状の消退を引き起こすことが挙げられる。疾患の処置のための有効な量は、それを必要とする対象に投与したとき、疾患に対して、本明細書において定義した用語の有効な処置がもたらされるのに充分な量を意味する。薬剤の有効性は、病態の物理学的指標または所望の応答をアセスメントすることにより判断され得る。かかるパラメータのうちのいずれか1つ、またはパラメータの任意の組み合わせを測定することによって投与および/または処置の有効性をモニタリングすることは充分に当業者の能力の範囲内である。有効性は、本明細書に記載の病態、例えば、がんの処置の動物モデルにおいてアセスメントされ得る。実験動物モデルを使用する場合、処置の有効性は、マーカー、例えば、腫瘍増殖、腫瘍サイズ、炎症、創傷のサイズなどにおいて統計学的に有意な変化が観察された場合、証明される。

【０１１０】

便宜上、本明細書、実施例および添付の特許請求の範囲で用いている一部の用語および語句の意味を以下に示す。特に記載のない限り、または文脈に黙示的でない限り、以下の

用語および語句は以下に示す意味を包含している。本定義は具体的な態様の説明を補助するために示しており、本発明の範囲は特許請求の範囲によってのみ限定されるため、請求項に記載の発明を限定することを意図するものではない。特に定義していない限り、本明細書で用いる科学技術用語はすべて、本発明が属する技術分野の当業者に一般的に理解されているものと同じ意味を有する。用語の当技術分野における語法と本明細書に示したその定義との間に明らかな矛盾がある場合は、本明細書において示した定義によって支配されるものとする。

【０１１１】

便宜上、本明細書、実施例および添付の特許請求の範囲において本文書で用いている一部の特定の用語をここに集める。

【０１１２】

用語「減少する」、「低減された」、「低減」、または「抑止する」はすべて、本明細書において、統計学的に有意な量の減少を意味するために用いている。本局面のいずれかの一部の態様では、「低減される」、「低減」もしくは「減少する」、または「抑止する」は典型的には、参照レベル（例えば、所与の処置または薬剤なし）と比べたときの少なくとも10％の減少を意味し、例えば、少なくとも約10％、少なくとも約20％、少なくとも約25％、少なくとも約30％、少なくとも約35％、少なくとも約40％、少なくとも約45％、少なくとも約50％、少なくとも約55％、少なくとも約60％、少なくとも約65％、少なくとも約70％、少なくとも約75％、少なくとも約80％、少なくとも約85％、少なくとも約90％、少なくとも約95％、少なくとも約98％、少なくとも約99％、またはそれより大きな減少が挙げられ得る。本明細書で用いる場合、「低減」または「抑止」は参照レベルと比べたときの完全な抑止または低減を包含しない。「完全な抑止」は参照レベルと比べたときの100％抑止である。減少は好ましくは、所与の障害がない個体での正常の範囲内と認められるレベルまでの下げであり得る。

【０１１３】

用語「増強された」、「増強する」、「向上させる」、または「活性化する」はすべて、本明細書において、統計学的に有意な量の増強を意味するために用いている。本局面のいずれかの一部の態様では、用語「増強された」、「増強する」、「向上させる」、または「活性化する」は、参照レベルと比べたときの少なくとも10％の増強、例えば、参照レベルと比べたときの、少なくとも約20％、もしくは少なくとも約30％、もしくは少なくとも約40％、もしくは少なくとも約50％、もしくは少なくとも約60％、もしくは少なくとも約70％、もしくは少なくとも約80％、もしくは少なくとも約90％の増強、または100％を含む100％までの増強、または10～100％のいずれかの増強、あるいは参照レベルと比べたときの、少なくとも約2倍、もしくは少なくとも約3倍、もしくは少なくとも約4倍、もしくは少なくとも約5倍、もしくは少なくとも約10倍の増強、または2倍～10倍もしくはそれより大きな任意の増強を意味し得る。マーカーまたは症状との関連において、「増強」はかかるレベルの統計学的に有意な増強である。

【０１１４】

本明細書で用いる場合、「対象」はヒトまたは動物を意味する。通常、動物は脊椎動物、例えば霊長類、齧歯類、飼育動物または狩猟動物である。霊長類としては、チンパンジー、カニクイザル、クモザル、およびマカク属のサル、例えばアカゲザルが挙げられる。齧歯類としては、マウス、ラット、ウッドチャック、フェレット、ウサギおよびハムスターが挙げられる。飼育動物および狩猟動物としては、ウシ、ウマ、ブタ、シカ、バイソン、バッファロー、ネコ科の種、例えば飼いネコ、イヌ科の種、例えばイヌ、キツネ、オオカミ、鳥類の種、例えばニワトリ、エミュー、ダチョウならびに魚類、例えばマス、ナマズおよびサケが挙げられる。本局面のいずれかの一部の態様では、対象が哺乳動物、例えば霊長類、例えばヒトである。用語「個体」、「患者」および「対象」は本明細書において互換的に用いている。

【０１１５】

好ましくは、対象は哺乳動物である。哺乳動物は、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ラッ

ト、イヌ、ネコ、ウマまたはウシであり得るが、これらの例に限定されない。ヒト以外の哺乳動物も、疾患の動物モデルとなる対象として好都合に使用され得る。対象は男性/雄であっても女性/雌であってもよい。

【０１１６】

対象は、処置を必要とする病態またはかかる病態に関連する1つもしくは複数の合併症に苦しんでいるか、あるいは病態または合併症を有すると以前に診断されているか、あるいは認定されている対象であって、任意に、病態または病態に関連する1つもしくは複数の合併症に対する処置を既に受けたことがある対象であり得る。あるいはまた、対象は、病態または病態に関連する1つもしくは複数の合併症を有すると以前に診断されていない対象であってもよい。例えば、対象は、病態または病態に関連する1つもしくは複数の合併症の1つまたは複数のリスクファクターを示す対象あるいはリスクファクターを示さない対象であり得る。

【０１１７】

ある具体的な病態に対する処置を「必要とする対象」は、病態を有するか、病態を有すると診断されたか、または病態を発症するリスクがある対象であり得る。

【０１１８】

用語「化合物」および「薬剤」は、通常存在しないか、あるいは細胞、組織または対象に投与および/または提供されるレベルで存在しない任意の実体を示す。薬剤は:化学薬品;有機または無機の小分子;シグナル伝達分子;核酸配列;核酸アナログ;タンパク質;ペプチド;酵素;アプタマー;ペプチド模倣物、ペプチド誘導体、ペプチドアナログ、抗体;イントラボディ;生体高分子、生体材料、例えば細菌、植物、真菌または動物の細胞または組織から作成した抽出物;天然に存在するか、または合成の組成物またはその機能性の断片を含む群から選択され得る。本局面のいずれかの一部の態様では、薬剤は任意の化学薬品、実体または部分、例えば非限定的に、合成および天然に存在する非タンパク質性の実体である。一部の特定の態様では、薬剤が、化学的部分を有する小分子である。例えば、化学的部分としては、非置換もしくは置換型のアルキル、芳香族またはヘテロシクリル部分、例えばマクロライド、レプトマイシンおよび関連する天然産物またはそのアナログが挙げられる。薬剤は、所望の活性および/または性質を有することが公知であってもよく、多様な化合物のライブラリーから選択されてもよい。

【０１１９】

本明細書で用いる場合、用語「小分子」は、非限定的にペプチド、ペプチド模倣物、アミノ酸、アミノ酸アナログ、ポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドアナログ、アプタマー、ヌクレオチド、ヌクレオチドアナログ、約10,000グラム/モル未満の分子量を有する有機または無機の化合物（すなわち、例えばヘテロ有機（heteroorganic）化合物および有機金属化合物）、約5,000グラム/モル未満の分子量を有する有機または無機の化合物、約1,000グラム/モル未満の分子量を有する有機または無機の化合物、約500グラム/モル未満の分子量を有する有機または無機の化合物、および塩、エステル、ならびにかかる化合物の他の薬学的に許容される形態が挙げられ得る化学的薬剤を示す。

【０１２０】

本明細書で用いる場合、用語「タンパク質」および「ポリペプチド」は本明細書において、隣接残基のアルファ-アミノ基およびカルボキシル基とのペプチド結合によって互いに連結された一連のアミノ酸残基を表示するために互換的に用いている。用語「タンパク質」および「ポリペプチド」は、サイズまたは機能に関係なく、修飾アミノ酸（例えば、リン酸化、糖化、グリコシル化など）およびアミノ酸アナログを含むアミノ酸のポリマーを示す。「タンパク質」および「ポリペプチド」は多くの場合、比較的大きなポリペプチドに関して使用され、一方、用語「ペプチド」は多くの場合、小さいポリペプチドに関して使用されるが、当技術分野におけるこれらの用語の語法は重複する。用語「タンパク質」および「ポリペプチド」は本明細書において、遺伝子産物およびその断片に言及している場合は互換的に用いている。したがって、例示的なポリペプチドまたはタンパク質としては、遺伝子産物、天然に存在するタンパク質、ホモログ、オーソログ、パラログ、断片お

よび他の等価物、バリアント、断片、ならびに前述のもののアナログが挙げられる。

【０１２１】

本明細書に記載の種々の態様において、バリアント（天然に存在するか、もしくは別の様式の）、対立遺伝子、ホモログ、記載した具体的なポリペプチドのいずれかの保存的修飾バリアントおよび/または保存的置換バリアントが包含されることがさらに想定される。アミノ酸配列に関して、当業者には、コード配列内の単一のアミノ酸または少数パーセンテージのアミノ酸が変更される、核酸、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の配列に対する個々の置換体、欠失体または付加体が「保存的修飾バリアント」であり、ここで、変更は、化学的に類似したアミノ酸とのアミノ酸置換をもたらすものであり、ポリペプチドの所望の活性は保持されることは認識されよう。かかる保存的修飾バリアントは、本開示と整合する多型バリアント、種間ホモログおよび対立遺伝子に追加され、除外されない。

【０１２２】

所与のアミノ酸を、同様の生理化学的特徴を有する残基で置き換えてもよく、例えば、ある脂肪族残基が別の脂肪族残基で（例えば、Ile、Val、LeuもしくはAlaが互いに）置換され得るか、またはある極性残基が別の極性残基で（例えば、LysとArg間、GluとAsp間、もしくはGlnとAsn間で）置換され得る。他のかかる保存的置換、例えば、同様の疎水性特徴を有する全領域の置換は周知である。保存的アミノ酸置換を含むポリペプチドは、本明細書に記載のアッセイのいずれか1つにおいて、所望の活性、例えばM1分極化活性および天然または参照のポリペプチドの特異性が保持されていることを確認するために試験され得る。

【０１２３】

アミノ酸は、その側鎖の特性の類似性に従ってグループ分けされ得る（Biochemistry,second ed.,pp. 73-75,Worth Publishers,New York（1975）のA.L. Lehningerにおける）:（1）無極性:Ala（A）、Val（V）、Leu（L）、Ile（I）、Pro（P）、Phe（F）、Trp（W）、Met（M）;（2）無電荷極性:Gly（G）、Ser（S）、Thr（T）、Cys（C）、Tyr（Y）、Asn（N）、Gln（Q）;（3）酸性:Asp（D）、Glu（E）;（4）塩基性:Lys（K）、Arg（R）、His（H）。あるいはまた、天然に存在する残基は、共通する側鎖の特性:（1）疎水性:ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile;（2）中性親水性:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;（3）酸性:Asp、Glu;（4）塩基性:His、Lys、Arg;（5）鎖の配向に影響を及ぼす残基:Gly、Pro;（6）芳香族:Trp、Tyr、Pheに基づいてグループに分けられ得る。非保存的置換は、これらの類型のうちの1つの構成員の別の類型のものでの交換を伴う。具体的な保存的置換としては、例えば;AlaがGlyもしくはSerに;ArgがLysに;AsnがGlnもしくはHisに;AspがGluに;CysがSerに;GlnがAsnに;GluがAspに;GlyがAlaもしくはProに;HisがAsnもしくはGlnに;IleがLeuもしくはValに;LeuがIleもしくはValに;LysがArg、GlnもしくはGluに;MetがLeu、TyrもしくはIleに;PheがMet、LeuもしくはTyrに;SerがThrに;ThrがSerに;TrpがTyrに;TyrがTrpに;および/またはPheがVal、IleのLeuに、が挙げられる。

【０１２４】

本局面のいずれかの一部の態様では、本明細書に記載のポリペプチド（またはかかるポリペプチドをコードしている核酸）が、本明細書に記載のアミノ酸配列のうちの1つの機能性の断片であり得る。本明細書で用いる場合、「機能性の断片」は、本明細書において後述するアッセイにより、野生型である参照ポリペプチドの活性の少なくとも50％を保持しているペプチドの断片またはセグメントである。機能性の断片は、本明細書に開示の配列の保存的置換を含み得る。

【０１２５】

本局面のいずれかの一部の態様では、本明細書に記載のポリペプチドが本明細書に記載の配列のバリアントであり得る。本局面のいずれかの一部の態様では、バリアントが保存的修飾バリアントである。保存的置換バリアントは、例えば、天然のヌクレオチド配列の変異によって得られ得る。「バリアント」は、本明細書で言及している場合、天然または

参照のポリペプチドと実質的に相同であるが、1つまたは複数の欠失、挿入または置換のため天然または参照のポリペプチドのものと異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドである。バリアントポリペプチドコードDNA配列は、天然または参照のDNA配列と比較した場合、ヌクレオチドの1つまたは複数の付加、欠失または置換を含むが、活性を保持しているバリアントタンパク質またはその断片をコードしている配列を包含している。多種多様なPCRベースの部位特異的変異誘発アプローチが当技術分野において公知であり、当業者によって適用され得る。

【０１２６】

バリアントのアミノ酸配列またはDNA配列は、天然または参照の配列と少なくとも90％、少なくとも91％、少なくとも92％、少なくとも93％、少なくとも94％、少なくとも95％、少なくとも96％、少なくとも97％、少なくとも98％、少なくとも99％、またはそれ以上、同一であり得る。天然の配列と変異型配列間の相同性の度合い（同一性パーセント）は、例えば、2つの配列を、この目的のために一般的に使用されるワールド・ワイド・ウェブで自由に入手可能なコンピュータプログラム（例えば、デフォルト設定を伴ったBLASTpまたはBLASTn）を用いて比較することによって求めることができる。

【０１２７】

天然のアミノ酸配列の改変は、当業者に公知のいくつかの手法のいずれかによって行なわれ得る。変異は、例えば、天然の配列の断片とのライゲーションを可能にする制限部位によってフランキングされた変異型配列を含むオリゴヌクレオチドを合成することにより、特定の座位に導入され得る。ライゲーション後、得られた再構成配列は、所望のアミノ酸の挿入、置換または欠失を有するアナログをコードしている。あるいはまた、オリゴヌクレオチド指向性部位特異的変異誘発手順を使用し、必要とされる置換、欠失または挿入に応じて改変された特定のコドンを有する改変型ヌクレオチド配列が得られ得る。かかる改変を行なうための手法は非常によく確立されており、例えば、Walder et al.（Gene 42:133,1986）、Bauer et al.（Gene 37:73,1985）、Craik（BioTechniques,January 1985,12-19）、Smith et al.（Genetic Engineering:Principles and Methods,Plenum. Press,1981）、ならびに米国特許第4,518,584号および同第4,737,462号に開示されたものが挙げられ、これらは参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。また、ポリペプチドの適正なコンホメーションの維持に関与しない任意のシステイン残基も一般的にはセリンで、分子の酸化安定性を改善するため、および異常な架橋を抑制するために置換され得る。逆に、安定性を改善するため、またはオリゴマー化を助長するためには（1つまたは複数の）システイン結合がポリペプチドに付加され得る。

【０１２８】

本局面のいずれかの一部の態様では、本明細書に記載のポリペプチド、核酸または細胞が改変され得る。本明細書で用いる場合、「改変された」とは、人間の手によって操作されているという局面を示す。例えば、ポリペプチドは、ポリペプチドの少なくとも1つの局面、例えばその配列が、自然状態で存在するときの局面とは異なるように人間の手によって操作されている場合、「改変された」とみなされる。普通のことであり、当業者に理解されているように、改変細胞の子孫は典型的には、先の実体に対して実際の操作が行なわれなかったとしてもなお「改変された」と称される。

【０１２９】

本明細書で用いる場合、用語「抗体」は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、抗原に免疫特異的に結合する抗原結合部位を含む分子を示す。またこの用語は、2つの免疫グロブリン重鎖と2つの免疫グロブリン軽鎖で構成された抗体ならびにさまざまな形態、例えば完全長の抗体およびその抗原結合部分;例えば、免疫グロブリン分子、モノクローナル抗体、キメラ抗体、CDRグラフト化抗体、ヒト化抗体、Fab、Fab’、F（ab’）2、Fv、ジスルフィド結合型Fv、scFv、シングルドメイン抗体（dAb）、ダイアボディ、多重特異性抗体、デュアル特異性抗体、抗イディオタイプ抗体、二重特異性抗体、その機能的に活性なエピトープ結合部分および/または二機能性ハイブリッド抗体なども示す。各重鎖は、前記重鎖の可変領域（本明細書においてHCVRま

たはVHと略記する）および前記重鎖の定常領域で構成されている。重鎖定常領域は3つのドメインCH1、CH2およびCH3からなる。各軽鎖は、前記軽鎖の可変領域（本明細書においてLCVRまたはVLと略記する）および前記軽鎖の定常領域で構成されている。軽鎖定常領域はCLドメインからなる。VH領域およびVL領域は、相補性決定領域（CDR）と称される超可変領域にさらに分けられ得、フレームワーク領域（FR）と称される保存された領域が散在し得る。各VH領域およびVL領域は、したがって、3つのCDRと4つのFRからなり、これらはN末端からC末端に向かって以下の順:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4に並んでいる。この構造は当業者に周知である。

【０１３０】

本明細書で用いる場合、用語「抗体試薬」は、少なくとも1つの免疫グロブリン可変ドメインまたは免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むポリペプチドであって、所与の抗原に特異的に結合するポリペプチドを示す。抗体試薬は、抗体または抗体の抗原結合ドメインを含むポリペプチドを含み得る。本局面のいずれかの一部の態様では、抗体試薬が、モノクローナル抗体またはモノクローナル抗体の抗原結合ドメインを含むポリペプチドを含み得る。例えば、抗体は、重（H）鎖可変領域（本明細書においてVHと略記する）と軽（L）鎖可変領域（本明細書においてVLと略記する）を含み得る。別の例では、抗体が、2つの重（H）鎖可変領域と2つの軽（L）鎖可変領域を含む。用語「抗体試薬」は、抗体の抗原結合断片（例えば、一本鎖抗体、FabおよびsFab断片、F（ab’）2、Fd断片、Fv断片、scFv、およびドメイン抗体（dAb）断片ならびに完全抗体を包含している。

【０１３１】

抗体および/または抗体試薬としては、免疫グロブリン分子、モノクローナル抗体、キメラ抗体、CDRグラフト化抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体、Fab、Fab’、F（ab’）2、Fv、ジスルフィド結合型Fv、scFv、シングルドメイン抗体、ダイアボディ、多重特異性抗体、デュアル特異性抗体、抗イディオタイプ抗体、二重特異性抗体、およびその機能的に活性なエピトープ結合部分が挙げられ得る。

【０１３２】

本明細書で用いる場合、用語「ナノボディ」またはシングルドメイン抗体（sdAb）は、ラクダ科動物およびヒトコブラクダから得られる抗体の短いシングル可変ドメイン（VHH）を含む抗体を示す。ラクダおよびヒトコブラクダ（dromedary）（カメルス・バクルリアヌス（Camelus baclrianus）およびカレルス・ドロマデリウス（Calelus dromaderius））の科の構成員、例えば新世界構成員、例えばリャマ種（アルパカ（Lama paccos）、リャマ（Lama glama）およびビクーニャ（Lama vicugna））から得られる抗体タンパク質は、サイズ、構造の複雑度およびヒト対象に対する抗原性に関して特性評価されている。この科の哺乳動物由来の一部の特定のIgG抗体は、自然状態で見られるように軽鎖がなく、したがって、2つの重鎖と2つの軽鎖を有する他の動物の抗体の典型的な4つの鎖の4本鎖構造とは構造的に相違する。PCT/EP93/02214（1994年3月3日に公開されたWO94/04678を参照のこと、これは参照によりその全体が本明細書に組み入れられる）。

【０１３３】

ラクダ科動物抗体のVHHと識別される短いシングル可変ドメインである領域は、遺伝子改変して標的に対して高い親和性を有する小型タンパク質を得、「ラクダ科動物ナノボディ」として公知の低分子量の抗体由来タンパク質にすることによって得られ得る。1998年6月2日に発行された米国特許第5,759,808号を参照のこと、また、Stijlemans,B. et al.,2004 J Biol Chem 279:1256-1261、Dumoulin,M. et al.,2003 Nature 424:783-788、Pleschberger,M. et al. 2003 Bioconjugate Chem 14:440-448、Cortez-Retamozo,V. et al. 2002 Int J Cancer 89:456-62、およびLauwereys,M. et al. 1998 EMBO J. 17:3512-3520も参照のこと、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。改変されたラクダ科動物抗体および抗体断片のライブラリーは、例えばAblynx,Ghent,Belgiumから市販されている。非ヒト起源の他の抗体と同様、ラクダ科動物抗体のアミノ酸配列を、ヒト配列にさらによく似た配列を得るために組換えによ

り改変してもよい、すなわち、ナノボディを「ヒト化され」してもよい。かくして、ラクダ科動物抗体のヒトに対する天然の低い抗原性がさらに低減され得る。

【０１３４】

ラクダ科動物ナノボディは、ヒトIgG分子のおよそ10分の1の分子量を有し、このタンパク質が有する物理的直径はわずか数ナノメートルである。サイズが小さいことによる帰結の1つはより大型の抗体タンパク質には機能的に見えない抗原性部位に結合できるというラクダ科動物ナノボディの能力である、すなわち、ラクダ科動物ナノボディは、通常は隠れている抗原を古典的な免疫学的手法を用いて検出する試薬として、場合によっては治療剤として有用である。したがって、サイズが小さいことのまた別の帰結は、ラクダ科動物ナノボディが、標的タンパク質の溝または狭い裂溝内の特異的部位に結合する結果、標的タンパク質を阻害できること、したがって、古典的な抗体の機能よりも古典的な低分子量薬物の機能の方によく似ているという能力において有用であり得ることである。この低い分子量およびコンパクトなサイズにより、さらに、ラクダ科動物ナノボディは、極めて熱安定性となり、極端なpHおよびタンパク質分解性消化に対して安定性となり、抗原性は不充分となる。2004年8月19日に公開された米国特許出願公開第20040161738号を参照のこと、これは参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。このような特長とヒトに対する低い抗原性を併せ持つことは大きな治療能力を示す。

【０１３５】

本明細書で用いる場合、「阻害性核酸」は、標的の発現を阻害し得る核酸分子、例えば二本鎖RNA（dsRNA）、阻害性RNA（iRNA）などを示す。

【０１３６】

本明細書で用いる場合、用語「処置する」、「処置」、「処置すること」または「軽快」は、疾患または障害、例えばがんと関連している病態を逆転させること、緩和すること、軽快させること、抑止すること、減速させること、またはその進行もしくは重症度を停止させることを目的とする治療的処置を示す。用語「処置すること」は、病態、病態と関連している疾患または障害の少なくとも1つの有害な効果または症状を低減させること、または緩和することを含む。処置は一般的に、1つまたは複数の症状または臨床マーカーが低減された場合、「有効」である。あるいはまた、処置は、疾患の進行が低減されたか、または停止した場合、「有効」である。すなわち、「処置」は、単なる症状またはマーカーの改善だけでなく、症状の進行または悪化の停止または処置なしの場合に予測され得るものと比べて少なくとも減速していることも含む。有益な臨床結果または所望の臨床結果としては、非限定的に、1つもしくは複数の症状の緩和、疾患の程度の減弱、疾患の状態の安定化（すなわち、悪化しない）、疾患進行の遅延もしくは減速、疾患状態の軽快もしくは待機、寛解（部分的であれ完全であれ）、および/または検出可能であれ検出不能であれ死亡率の低下が挙げられる。また、疾患の「処置」という用語は、疾患の症状または副作用の軽減をもたらすこと（例えば、待機的処置）も含む。

【０１３７】

本明細書で用いる場合、用語「薬学的組成物」は、薬学的に許容される担体、例えば、製薬業界で一般的に使用されている担体と組み合わせた状態の活性薬剤を示す。語句「薬学的に許容される」とは、本明細書で用いる場合、化合物、材料、組成物および/または投薬形態が、正しい医学的判断の範囲内で、妥当な便益/リスク比に相応し、過度な毒性、刺激、アレルギー応答または他の問題もしくは合併症を伴うことなく人間および動物の組織との接触における使用に適していることを示す。本局面のいずれかの一部の態様では、薬学的に許容される担体が水以外の担体であり得る。本局面のいずれかの一部の態様では、薬学的に許容される担体が、クリーム、エマルジョン、ゲル、リポソーム、ナノ粒子および/または軟膏であり得る。本局面のいずれかの一部の態様では、薬学的に許容される担体が、人工担体または改変された担体、例えば、自然状態では活性成分の存在が見出されないであろう担体であり得る。

【０１３８】

本明細書で用いる場合、用語「投与すること」は、本明細書において開示しているよう

な化合物を、薬剤の所望の部位への少なくとも部分的な送達がもたらされる方法または経路によって対象内に入れることを示す。本明細書に開示の化合物を含む薬学的組成物は、対象に有効な処置をもたらす任意の適切な経路によって投与され得る。

【０１３９】

用語「統計学的に有意な」または「有意に」とは統計学的有意性を示し、一般的には標準偏差の2倍（2SD）以上の差を意味する。

【０１４０】

本実施例以外またはそうでないことを示している箇所以外、本明細書で用いている成分または反応条件の量を示す数値はすべて、全ての場合において用語「約」で修飾されていると理解されたい。用語「約」は、パーセンテージに関して用いている場合、±1％を意味し得る。

【０１４１】

本明細書で用いる場合、用語「含む」は、提示した規定の要素に加えて他の要素も存在してもよいことを意味する。「含む」の使用は限定ではなく包含を示す。

【０１４２】

用語「からなる」は、本明細書に記載の組成物、方法、およびそのそれぞれの成分において、態様の説明に記載されていない要素はいずれも排除されることを示す。

【０１４３】

本明細書で用いる場合、用語「から本質的になる」は、その要素が所与の態様に必要とされることを示す。この用語は、本発明の態様の基本的かつ新規な特徴または機能的特徴（1つまたは複数）に実質的に影響しないさらなる要素の存在を許容する。

【０１４４】

本明細書で用いる場合、用語「特異的な結合」は、2つの分子、化合物、細胞、および/または粒子の間の化学的相互作用であって、第1の実体が、非標的である第3の実体に結合するよりも高い特異性および親和性で第2の標的実体に結合する、化学的相互作用を示す。本局面のいずれかの一部の態様では、特異的な結合は、第1の実体の第2の標的実体に対する親和性が、第3の非標的実体に対する親和性よりも少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも500倍、少なくとも1000倍、またはそれより大きいことを示し得る。所与の標的に特異的な試薬は、使用しているアッセイの条件下で標的に対して特異的な結合を示すものである。

【０１４５】

一部の事例では、例えばアルデヒド修飾を有するヒアルロン酸を用いる場合、特異的な結合は、細胞/粒子間の相互作用を強化するために共有結合させることによって行なわれ得る。

【０１４６】

単数形“a”、“an”および“the”は、本文中にそうでないことを明記していない限り、複数の指示対象物を包含している。同様に、語「または」は、本文中にそうでないことを明記していない限り、「および」を包含していることを意図する。本明細書に記載のものと同様または同等の方法および材料が、本開示の実施または試験において使用され得るが、好適な方法および/または材料を以下に説明する。略語“e.g.（例えば）”は、ラテン語のexempli gratia（例えば）に由来し、本明細書において非限定的な例を示すために用いている。したがって、略語“e.g.”は、用語“for example（例えば）”と同義である。

【０１４７】

本明細書に開示の本発明の択一的な要素または態様の群分けは、限定と解釈されるべきでない。群内の各構成員が、その群の他の構成員もしくは本明細書にみられる他の要素に対する言及である場合もあり得、個々に、またはその群の他の構成員もしくは本明細書にみられる他の要素との任意の組み合わせで請求項に記載される場合もあり得る。群の1つ以上の構成員が、便宜および/または特許性の理由で、群に含められる場合、または群から削除される場合があり得る。任意のかかる包含または削除が行なわれる場合、その明細書は、明細書において、修正されたとおりの、したがって、添付の特許請求の範囲に使用さ

れた全てのマーカッシュ群の書面による明細を満足する群を含むものとされる。

【０１４８】

本明細書において特に定義していない限り、本出願との関連において用いる科学技術用語は、本開示が属する技術分野の当業者に一般的に理解されているものと同じ意味を有するものとする。本発明は、本明細書に記載の具体的な方法論、プロトコルおよび試薬などに限定されず、そのため、さまざまであり得ることは理解されよう。本明細書で用いる専門用語は、具体的な態様を説明する目的のためにすぎず、特許請求の範囲によってのみ規定される本発明の範囲を限定することを意図するものではない。免疫学および分子生物学の一般用語の定義は、Merck Sharp & Dohme Corp.によって2011年に出版されたThe Merck Manual of Diagnosis and Therapy,19th Edition（ISBN 978-0-911910-19-3）、Robert S. Porter et al.（編）,Blackwell Science Ltd.によって1999～2012年に出版されたThe Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine（ISBN 9783527600908）、およびRobert A. Meyers（編）,Molecular Biology and Biotechnology:VCH Publishers,Inc.によって1995年に出版されたComprehensive Desk Reference（ISBN 1-56081-569-8）、Elsevierによって2006年に出版されたImmunology by Werner Luttmann、Janeway’s Immunobiology,Kenneth Murphy,Allan Mowat,Casey Weaver（編）,Taylor & Francis Limited,2014（ISBN 0815345305,9780815345305）、Jones & Bartlett Publishersによって2014年に出版されたLewin’s Genes XI（ISBN-1449659055）、Michael Richard Green and Joseph Sambrook,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,4th ed.,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,USA（2012）（ISBN 1936113414）、Davis et al.,Basic Methods in Molecular Biology,Elsevier Science Publishing,Inc.,New York,USA（2012）（ISBN 044460149X）、Laboratory Methods in Enzymology:DNA,Jon Lorsch（編）Elsevier,2013（ISBN 0124199542）、Current Protocols in Molecular Biology（CPMB）,Frederick M. Ausubel（編）,John Wiley and Sons,2014（ISBN 047150338X、9780471503385）、Current Protocols in Protein Science（CPPS）,John E. Coligan（編）,John Wiley and Sons,Inc.,2005、ならびにCurrent Protocols in Immunology（CPI）（John E. Coligan,ADA M Kruisbeek,David H Margulies,Ethan M Shevach,Warren Strobe,（編）John Wiley and Sons,Inc.,2003（ISBN 0471142735、9780471142737）において知得され得、これらの内容はすべて、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【０１４９】

当業者は、有用な化学療法剤を容易に認定することができよう（例えば、Physicians’Cancer Chemotherapy Drug Manual 2014,Edward Chu,Vincent T. DeVita Jr.,Jones & Bartlett Learning、Principles of Cancer Therapy,Chapter 85 in Harrison’s Principles of Internal Medicine,18th edition、Therapeutic Targeting of Cancer Cells:Era of Molecularly Targeted Agents and Cancer Pharmacology,Chs. 28-29 in Abeloff’s Clinical Oncology,2013 Elsevier、およびFischer D S（編）:The Cancer Chemotherapy Handbook,4th ed. St. Louis,Mosby-Year Book,2003参照）。

【０１５０】

本局面のいずれかの一部の態様において、本明細書に記載の開示内容は、人間または動物、また、かかる方法によってもたらされる動物にとってなんら実質的な医学的有益性がないことに苦しむことになる可能性が高い、人間のクローン化のための方法、人間の生殖細胞系の遺伝的同一性を修飾するための方法、工業目的もしくは商業目的のためのヒト胚の使用または動物の遺伝的同一性を修飾するための方法に関するものではない。

【０１５１】

他の用語は、本明細書において、本発明の種々の局面の説明において定義している。

【０１５２】

本出願書類の至る箇所において挙げた特許および他の刊行物、例えば、参考文献、発行

済特許、公開特許出願および同時係属中の特許出願、はすべて、参照により、例えば、かかる刊行物に記載された、本明細書に記載の技術に関連して使用されるかもしれない方法論を説明および開示する目的のために本明細書に明示的に組み入れられる。このような刊行物は、その開示が本出願の出願日より前であることを示すものにすぎない。これに関して、いずれのものも、先願発明という理由で、または任意の他の理由で、本発明者らが、かかる開示より時間的に先行していると主張できないという是認と解釈されるべきでない。日付に関する記載またはこれらの文献の内容に関する表示はすべて、本出願人らが入手可能な情報に基づいたものであり、これらの文献の日付または内容の正確さに関する是認をなんら構成するものではない。

【０１５３】

本開示の態様の説明は、網羅的であること、または本開示を、開示した厳密な形態に限定することを意図するものではない。本開示の具体的な態様および実施例を、実例を示す目的で本明細書に記載しているが、種々の等価な修正が本開示の範囲内で可能であり、これは当業者には認識されよう。例えば、諸方法工程または諸機能を所与の順序で提示しているが、択一的な態様では諸機能が異なる順序で発揮される場合もあり得る、または諸機能が実質的に並行して発揮される場合もあり得る。本明細書に示した本開示の教示は、適宜、他の手順または方法にも適用され得る。本明細書に記載の種々の態様を組み合わせると、さらなる態様を得ることができる。上記の参考文献および本出願の組成物、機能および思想を使用するために必要であれば本開示の諸局面を修正すると、本開示のまたさらなる態様を得ることができる。さらに、生物学的機能等価性の考慮のため、タンパク質の構造において、生物学的または化学的作用に影響することなく、種類または量にいくらかの変更が行なわれる場合があり得る。このような、および他の変更は、本開示に対して本詳細説明に鑑みて行なわれ得る。かかる修正はすべて、添付の特許請求の範囲の範囲内に含まれることを意図する。

【０１５４】

前述の任意の態様の具体的な要素を、組み合わせてもよく、他の態様の要素と置き換えてもよい。さらに、本開示の一部の特定の態様と関連している利点を、このような態様との関連において記載したが、他の態様が、かかる利点を示す場合もあり得、必ずしも全ての態様が、本開示の範囲内に含まれるためのかかる利点を示す必要はない。

【０１５５】

本明細書に記載の技術を、以下の実施例によってさらに例示する。以下の実施例は、なんらさらなる限定であると解釈されるべきでない。

【０１５６】

本明細書に記載の技術の一部の態様は、番号付けされた以下のいずれかの項に従って規定され得る:

1．a．赤血球、および

b．該赤血球の細胞表面上に位置する、PLGAと少なくとも1種の治療剤とを含む粒子を含む、改変細胞組成物。

2．前記PLGAが、少なくとも50:50またはLがそれより多いL:G比を含む、第1項記載の組成物。

3．前記PLGAが、約50:50のL:G比を含む、第2項記載の組成物。

4．前記PLGAが、約85:15のL:G比を含む、第2項記載の組成物。

5．前記PLGAが、約65:35のL:G比を含む、第2項記載の組成物。

6．前記PLGAが、エステル末端および/または酸末端を含む、第1項～第5項のいずれか一項記載の組成物。

7．前記PLGAが、エステル末端を含む、第1項～第6項のいずれか一項記載の組成物。

8．前記PLGAが、酸末端を含む、第1項～第6項のいずれか一項記載の組成物。

9．前記PLGAが、約50:50のL:G比およびエステル末端を含む、第2項記載の組成物。

10．前記PLGAが、約50:50のL:G比および酸末端を含む、第2項記載の組成物。

11．前記PLGAが、約85:15のL:G比およびエステル末端を含む、第2項記載の組成物。

12．前記PLGAが、約65:35のL:G比および酸末端を含む、第2項記載の組成物。
13．前記PLGAが、約50:50のL:G比およびエステル末端を含み、これにより前記治療剤が脾臓および/または心臓を標的とする、第1項～第8項のいずれか一項記載の組成物。
14．前記PLGAが、約50:50のL:G比および酸末端を含み、これにより前記治療剤が脾臓および/または肺を標的とする、第1項～第8項のいずれか一項記載の組成物。
15．前記PLGAが、約85:15のL:G比およびエステル末端を含み、これにより前記治療剤が腎臓および/または肺を標的とする、第1項～第8項のいずれか一項記載の組成物。
16．前記PLGAが、約65:35のL:G比および酸末端を含み、これにより前記治療剤が、肺、心臓、および/または腎臓を標的とする、第1項～第8項のいずれか一項記載の組成物。
17．前記PLGAが、50超:50のL:G比を含み、これにより前記治療剤が肺および/または腎臓を標的とする、第1項～第8項のいずれか一項記載の組成物。
18．前記PLGAが、85未満:15のL:G比およびエステル末端を含み、これにより前記治療剤が脾臓を標的とする、第1項～第8項のいずれか一項記載の組成物。
19．前記少なくとも1種の治療剤が、
　化学療法剤、抗原、ステロイド、免疫抑制剤、免疫賦活剤、ウイルス、小分子、ペプチド、核酸、およびケモカイン
から選択される、第1項～第18項のいずれか一項記載の組成物。
20．前記少なくとも1種の化学療法剤が、
　ドキソルビシン、カンプトテシン、パクリタキセル、ドセタキセル、5-フルオロウラシル、ゲムシタビン、メトトレキサート、またはそれらの組み合わせ
からなる群より選択される、第19項記載の組成物。
21．前記治療剤が、3×10^{8}個の赤血球あたり少なくとも100μgの濃度で存在する、第1項～第20項のいずれか一項記載の組成物。
22．前記治療剤が、3×10^{8}個の赤血球あたり少なくとも150μgの濃度で存在する、第1項～第21項のいずれか一項記載の組成物。
23．前記治療剤が、3×10^{8}個の赤血球あたり少なくとも200μgの濃度で存在する、第1項～第22項のいずれか一項記載の組成物。
24．前記治療剤が、3×10^{8}個の赤血球あたり少なくとも250μgの濃度で存在する、第1項～第23項のいずれか一項記載の組成物。
25．前記ポリマー粒子の直径が約100 nm～約10μmである、第1項～第24項のいずれか一項記載の組成物。
26．前記ポリマー粒子の直径が約100 nm～約1μmである、第1項～第24項のいずれか一項記載の組成物。
27．前記ポリマー粒子が、1種または複数種の細胞接着分子をさらに含む、第1項～第26項のいずれか一項記載の組成物。
28．前記1種または複数種の細胞接着分子が、前記粒子の表面の一領域に局在している、第27項記載の組成物。
29．前記細胞接着分子が、
　赤血球細胞上の分子に特異的に結合する抗体試薬、赤血球細胞上の分子に特異的に結合するペプチド、細胞接着性ポリマー、細胞接着性高分子電解質、および赤血球細胞上の受容体に対するリガンド
からなる群より選択される、第27項～第28項のいずれか一項記載の組成物。
30．前記細胞接着性高分子電解質が、ヒアルロン酸、ヒアルロン酸-アルデヒド、および/またはポリ（アリルアミン）塩酸塩を含む、第29項記載の組成物。
31．前記ヒアルロン酸が、アルデヒド基を含むように修飾されている、第30項記載の組成物。
32．前記細胞接着性ポリマーが、ポリフェノールまたは金属-ポリフェノール錯体である、第29項記載の組成物。
33．対象の細胞に治療剤を送達する方法であって、第1項～第32項のいずれか一項記載の組成物を該対象に投与する工程を含む、方法。

34．前記細胞が、がん細胞であり、前記治療剤が、化学療法剤、ケモカイン、または免疫賦活剤（例えば、IFN類、IFN-γ、TNFα、TGF-β、IL-1β、IL-6、IL-4、IL-10、IL-13、IL-2、IL-12、IL-15、およびIL-27、ならびに他の免疫賦活性アンタゴニスト、例えば、CpG ODN、イミキモド、レシキモド（R848）、モノホスホリルリピドA（MPLA）、およびポリ（I:C））である、第33項記載の方法。
35．それを必要とする対象において、がんおよび/または腫瘍を処置する方法であって、第1項～第32項のいずれか一項記載の組成物を該対象に投与する工程を含む、方法。
36．前記治療剤が、化学療法剤またはケモカインである、第35項記載の方法。
37．前記対象の肺内にがん細胞が存在し、かつ/または前記対象が肺がんを有する、第33項～第36項のいずれか一項記載の方法。
38．前記PLGAが、約65:35のL:G比および酸末端を含む、第37項記載の方法。
39．前記対象の腎臓内にがん細胞が存在し、かつ/または前記対象が腎臓がんを有する、第33項～第36項のいずれか一項記載の方法。
40．前記PLGAが、約85:15のL:G比およびエステル末端を含む、第39項記載の方法。
41．前記PLGAが、約65:35のL:G比および酸末端を含む、第39項記載の方法。
42．前記PLGAが、50超:50のL:G比を含む、第33項～第41項のいずれか一項記載の方法。
43．放射線療法または少なくとも1つの化学療法を前記対象に施す工程をさらに含む、第33項～第42項のいずれか一項記載の方法。
44．それを必要とする対象において免疫応答を賦活化する方法であって、第1項～第32項のいずれか一項記載の組成物を該対象に投与する工程を含み、前記治療剤が、抗原、免疫賦活剤、またはケモカインである、方法。
45．前記免疫応答が局所化される、第44項記載の方法。
46．それを必要とする対象において免疫応答を低減または抑制する方法であって、第1項～第32項のいずれか一項記載の組成物を該対象に投与する工程を含み、前記治療剤が免疫調節剤（例えば、IL-4）またはステロイドである、方法。
47．前記免疫応答が局所化される、第46項記載の方法。
48．前記対象が、肺における免疫応答を必要としている、第44項～第47項のいずれか一項記載の方法。
49．前記対象が、急性肺損傷の処置を必要としている、第46項～第48項のいずれか一項記載の方法。
50．前記治療剤が、ステロイドまたはIL-4である、第46項～第49項のいずれか一項記載の方法。
51．前記PLGAが、50超:50のL:G比を含む、第46項～第50項のいずれか一項記載の方法。
52．前記PLGAが、約65:35のL:G比および酸末端を含む、第46項～第51項のいずれか一項記載の方法。
53．治療上有効な量の前記組成物が投与される、第33項～第52項のいずれか一項記載の方法。
54．投与される前記治療剤の用量が、遊離形態で投与される場合に対象に投与される量の50％以下である、第33項～第53項のいずれか一項記載の方法。
55．投与される前記治療剤の用量が、遊離形態で投与される場合に対象に投与される量の40％以下である、第33項～第53項のいずれか一項記載の方法。
56．投与される前記治療剤の用量が、遊離形態で投与される場合に対象に投与される量の30％以下である、第33項～第53項のいずれか一項記載の方法。
57．投与される前記治療剤の用量が、遊離形態で投与される場合に対象に投与される量の20％以下である、第33項～第53項のいずれか一項記載の方法。
58．投与される前記治療剤の用量が、遊離形態で投与される場合に対象に投与される量の10％以下である、第33項～第53項のいずれか一項記載の方法。
【０１５７】

本明細書に記載の技術の一部の態様は、番号付けされた以下のいずれかの項に従って規定され得る:

1. a. 赤血球、および

b. 該赤血球の細胞表面上に位置する、PLGAと少なくとも1種の治療剤とを含む粒子を含む、改変細胞組成物。

2. 前記PLGAが、少なくとも50:50またはLがそれより多いL:G比を含む、第1項記載の組成物。

3. 前記PLGAが、約50:50のL:G比を含む、第2項記載の組成物。

4. 前記PLGAが、約85:15のL:G比を含む、第2項記載の組成物。

5. 前記PLGAが、約65:35のL:G比を含む、第2項記載の組成物。

6. 前記PLGAが、エステル末端および/または酸末端を含む、第1項～第5項のいずれか一項記載の組成物。

7. 前記PLGAが、エステル末端を含む、第1項～第6項のいずれか一項記載の組成物。

8. 前記PLGAが、酸末端を含む、第1項～第6項のいずれか一項記載の組成物。

9. 前記PLGAが、約50:50のL:G比およびエステル末端を含む、第2項記載の組成物。

10. 前記PLGAが、約50:50のL:G比および酸末端を含む、第2項記載の組成物。

11. 前記PLGAが、約85:15のL:G比およびエステル末端を含む、第2項記載の組成物。

12. 前記PLGAが、約65:35のL:G比および酸末端を含む、第2項記載の組成物。

13. 前記PLGAが、約50:50のL:G比およびエステル末端を含み、これにより前記治療剤が脾臓および/または心臓を標的とする、第1項～第8項のいずれか一項記載の組成物。

14. 前記PLGAが、約50:50のL:G比および酸末端を含み、これにより前記治療剤が脾臓および/または肺を標的とする、第1項～第8項のいずれか一項記載の組成物。

15. 前記PLGAが、約85:15のL:G比およびエステル末端を含み、これにより前記治療剤が腎臓および/または肺を標的とする、第1項～第8項のいずれか一項記載の組成物。

16. 前記PLGAが、約65:35のL:G比および酸末端を含み、これにより前記治療剤が、肺、心臓、および/または腎臓を標的とする、第1項～第8項のいずれか一項記載の組成物。

17. 前記PLGAが、50超:50のL:G比を含み、これにより前記治療剤が肺および/または腎臓を標的とする、第1項～第8項のいずれか一項記載の組成物。

18. 前記PLGAが、85未満:15のL:G比およびエステル末端を含み、これにより前記治療剤が脾臓を標的とする、第1項～第8項のいずれか一項記載の組成物。

19. 前記少なくとも1種の治療剤が、

化学療法剤、抗原、ステロイド、免疫抑制剤、免疫賦活剤、ウイルス、小分子、ペプチド、核酸、およびケモカイン

から選択される、第1項～第18項のいずれか一項記載の組成物。

20. 前記少なくとも1種の化学療法剤が、

ドキソルビシン、カンプトテシン、パクリタキセル、ドセタキセル、5-フルオロウラシル、ゲムシタビン、メトトレキサート、またはそれらの組み合わせ

からなる群より選択される、第19項記載の組成物。

21. 前記治療剤が、3×10^{8}個の赤血球あたり少なくとも100μgの濃度で存在する、第1項～第20項のいずれか一項記載の組成物。

22. 前記治療剤が、3×10^{8}個の赤血球あたり少なくとも150μgの濃度で存在する、第1項～第21項のいずれか一項記載の組成物。

23. 前記治療剤が、3×10^{8}個の赤血球あたり少なくとも200μgの濃度で存在する、第1項～第22項のいずれか一項記載の組成物。

24. 前記治療剤が、3×10^{8}個の赤血球あたり少なくとも250μgの濃度で存在する、第1項～第23項のいずれか一項記載の組成物。

25. 前記ポリマー粒子の直径が約100 nm～約10μmである、第1項～第24項のいずれか一項記載の組成物。

26. 前記ポリマー粒子の直径が約100 nm～約1μmである、第1項～第24項のいずれか一項記載の組成物。

27．前記ポリマー粒子が、1種または複数種の細胞接着分子をさらに含む、第1項～第26項のいずれか一項記載の組成物。
28．前記1種または複数種の細胞接着分子が、前記粒子の表面の一領域に局在している、第27項記載の組成物。
29．前記細胞接着分子が、
　赤血球細胞上の分子に特異的に結合する抗体試薬、赤血球細胞上の分子に特異的に結合するペプチド、細胞接着性ポリマー、細胞接着性高分子電解質、および赤血球細胞上の受容体に対するリガンド
からなる群より選択される、第27項～第28項のいずれか一項記載の組成物。
30．前記細胞接着性高分子電解質が、ヒアルロン酸、ヒアルロン酸-アルデヒド、および/またはポリ（アリルアミン）塩酸塩を含む、第29項記載の組成物。
31．前記ヒアルロン酸が、アルデヒド基を含むように修飾されている、第30項記載の組成物。
32．前記細胞接着性ポリマーが、ポリフェノールまたは金属-ポリフェノール錯体である、第29項記載の組成物。
33．対象の細胞に治療剤を送達する方法であって、第1項～第32項のいずれか一項記載の組成物を該対象に投与する工程を含む、方法。
34．前記細胞が、がん細胞であり、前記治療剤が、化学療法剤、ケモカイン、または免疫賦活剤（例えば、IFN類、IFN-γ、TNFα、TGF-β、IL-1β、IL-6、IL-4、IL-10、IL-13、IL-2、IL-12、IL-15、およびIL-27、ならびに他の免疫賦活性アンタゴニスト、例えば、CpG ODN、イミキモド、レシキモド（R848）、モノホスホリルリピドA（MPLA）、およびポリ（I:C））である、第33項記載の方法。
35．それを必要とする対象において、がんおよび/または腫瘍を処置する方法であって、第1項～第32項のいずれか一項記載の組成物を該対象に投与する工程を含む、方法。
36．前記治療剤が、化学療法剤またはケモカインである、第35項記載の方法。
37．前記対象の肺内にがん細胞が存在し、かつ/または前記対象が肺がんを有する、第33項～第36項のいずれか一項記載の方法。
38．前記PLGAが、約65:35のL:G比および酸末端を含む、第37項記載の方法。
39．前記対象の腎臓内にがん細胞が存在し、かつ/または前記対象が腎臓がんを有する、第33項～第36項のいずれか一項記載の方法。
40．前記PLGAが、約85:15のL:G比およびエステル末端を含む、第39項記載の方法。
41．前記PLGAが、約65:35のL:G比および酸末端を含む、第39項記載の方法。
42．前記PLGAが、50超:50のL:G比を含む、第33項～第41項のいずれか一項記載の方法。
43．放射線療法または少なくとも1つの化学療法を前記対象に施す工程をさらに含む、第33項～第42項のいずれか一項記載の方法。
44．それを必要とする対象において免疫応答を賦活化する方法であって、第1項～第32項のいずれか一項記載の組成物を該対象に投与する工程を含み、前記治療剤が、抗原、免疫賦活剤、またはケモカインである、方法。
45．前記免疫応答が局所化される、第44項記載の方法。
46．前記治療剤が抗原であり、前記PGLAが、a）約50:50のL:G比およびエステル末端、b）約50:50のL:G比および酸末端、またはc）85未満:15のL:G比およびエステル末端を含む、第44項～第45項のいずれか一項記載の方法。
47．それを必要とする対象において免疫応答を低減または抑制する方法であって、第1項～第32項のいずれか一項記載の組成物を該対象に投与する工程を含み、前記治療剤が免疫調節剤（例えば、IL-4）またはステロイドである、方法。
48．前記免疫応答が局所化される、第47項記載の方法。
49．前記対象が、肺における免疫応答を必要としている、第44項～第48項のいずれか一項記載の方法。
50．前記対象が、急性肺損傷の処置を必要としている、第44項～第49項のいずれか一項

記載の方法。
51．前記治療剤が、ステロイドまたはIL-4である、第47項～第50項のいずれか一項記載の方法。
52．前記PLGAが、50超:50のL:G比を含む、第47項～第51項のいずれか一項記載の方法。
53．前記PLGAが、約65:35のL:G比および酸末端を含む、第47項～第51項のいずれか一項記載の方法。
54．治療上有効な量の前記組成物が投与される、第33項～第53項のいずれか一項記載の方法。
55．投与される前記治療剤の用量が、遊離形態で投与される場合に対象に投与される量の50％以下である、第33項～第54項のいずれか一項記載の方法。
56．投与される前記治療剤の用量が、遊離形態で投与される場合に対象に投与される量の40％以下である、第33項～第54項のいずれか一項記載の方法。
57．投与される前記治療剤の用量が、遊離形態で投与される場合に対象に投与される量の30％以下である、第33項～第54項のいずれか一項記載の方法。
58．投与される前記治療剤の用量が、遊離形態で投与される場合に対象に投与される量の20％以下である、第33項～第54項のいずれか一項記載の方法。
59．投与される前記治療剤の用量が、遊離形態で投与される場合に対象に投与される量の10％以下である、第33項～第54項のいずれか一項記載の方法。
60．対象の細胞に治療剤を送達する方法における使用のための第1項～第32項のいずれか一項記載の組成物であって、該方法が、第1項～第32項のいずれか一項記載の組成物を該対象に投与する工程を含む、組成物。
61．前記細胞が、がん細胞であり、前記治療剤が、化学療法剤、ケモカイン、または免疫賦活剤（例えば、IFN類、IFN-γ、TNFα、TGF-β、IL-1β、IL-6、IL-4、IL-10、IL-13、IL-2、IL-12、IL-15、およびIL-27、ならびに他の免疫賦活性アンタゴニスト、例えばCpG ODN、イミキモド、レシキモド（R848）、モノホスホリルリピドA（MPLA）およびポリ（I:C））である、第60項記載の組成物。
62．それを必要とする対象において、がんおよび/または腫瘍を処置する方法における使用のための第1項～第32項のいずれか一項記載の組成物であって、該方法が、第1項～第32項のいずれか一項記載の組成物を該対象に投与する工程を含む、組成物。
63．前記治療剤が、化学療法剤またはケモカインである、第62項記載の組成物。
64．前記対象の肺内にがん細胞が存在し、かつ/または前記対象が肺がんを有する、第62項～第63項のいずれか一項記載の組成物。
65．前記PLGAが、約65:35のL:G比および酸末端を含む、第64項記載の組成物。
66．前記対象の腎臓内にがん細胞が存在し、かつ/または前記対象が腎臓がんを有する、第62項～第65項のいずれか一項記載の組成物。
67．前記PLGAが、約85:15のL:G比およびエステル末端を含む、第66項記載の組成物。
68．前記PLGAが、約65:35のL:G比および酸末端を含む、第66項記載の組成物。
69．前記PLGAが、50超:50のL:G比を含む、第60項～第68項のいずれか一項記載の組成物。
70．放射線療法または少なくとも1つの化学療法を前記対象に施す工程をさらに含む、第60項～第69項のいずれか一項記載の組成物。
71．それを必要とする対象において免疫応答を賦活化する方法における使用のための第1項～第32項のいずれか一項記載の組成物であって、該方法が、第1項～第32項のいずれか一項記載の組成物を該対象に投与する工程を含み、前記治療剤が、抗原、免疫賦活剤、またはケモカインである、組成物。
72．前記免疫応答が局所化される、第71項記載の組成物。
73．前記治療剤が抗原であり、前記PGLAが、a）約50:50のL:G比およびエステル末端、b）約50:50のL:G比および酸末端、またはc）85未満:15のL:G比およびエステル末端を含む、第71項～第72項のいずれか一項記載の組成物。

74．それを必要とする対象において免疫応答を低減または抑制する方法における使用のための第1項～第32項のいずれか一項記載の組成物であって、該方法が、第1項～第32項のいずれか一項記載の組成物を該対象に投与する工程を含み、前記治療剤が免疫調節剤（例えば、IL-4）またはステロイドである、組成物。
75．前記免疫応答が局所化される、第74項記載の組成物。
76．前記対象が、肺における免疫応答を必要としている、第74項～第75項のいずれか一項記載の組成物。
77．前記対象が、急性肺損傷の処置を必要としている、第74項～第76項のいずれか一項記載の組成物。
78．前記治療剤が、ステロイドまたはIL-4である、第74項～第77項のいずれか一項記載の組成物。
79．前記PLGAが、50超:50のL:G比を含む、第74項～第78項のいずれか一項記載の組成物。
80．前記PLGAが、約65:35のL:G比および酸末端を含む、第74項～第78項のいずれか一項記載の組成物。
81．治療上有効な量の前記組成物が投与される、第60項～第80項のいずれか一項記載の組成物。
82．投与される前記治療剤の用量が、遊離形態で投与される場合に対象に投与される量の50％以下である、第60項～第80項のいずれか一項記載の組成物。
83．投与される前記治療剤の用量が、遊離形態で投与される場合に対象に投与される量の40％以下である、第60項～第80項のいずれか一項記載の組成物。
84．投与される前記治療剤の用量が、遊離形態で投与される場合に対象に投与される量の30％以下である、第60項～第80項のいずれか一項記載の組成物。
85．投与される前記治療剤の用量が、遊離形態で投与される場合に対象に投与される量の20％以下である、第60項～第80項のいずれか一項記載の組成物。
86．投与される前記治療剤の用量が、遊離形態で投与される場合に対象に投与される量の10％以下である、第60項～第80項のいずれか一項記載の組成物。
【実施例】
【０１５８】
実施例1
　4つのPLGA組成物を、本明細書に記載の赤血球-ナノ粒子アプローチを用いて試験した。この4つのPLGA候補は、その疎水性と水素結合形成能力を決定する2つのパラメータであるL:G比と末端基が異なる。L:G比が大きいPLGAほど、より疎水性である。エステル末端を有するPLGAの方が疎水性である。全般的に、この2つのパラメータによって、赤血球に対するナノ粒子の結合強度の調整によりPLGAナノ粒子に便乗された赤血球の送達場所、ならびに担体赤血球からのナノ粒子の剪断依存性脱離が制御される。表1は、この4つのPLGA組成物を、モル比として示したL:G比とともに示す。
【０１５９】
（表１）

	PLGA-a	PLGA-b	PLGA-c	PLGA-d
L:G 比	50:50	50:50	85:15	65:35
末端基	エステル末端	酸末端	エステル末端	酸末端

【０１６０】
　結合効率データにより、より多くのPLGAナノ粒子を赤血球に結合させるためには疎水

性相互作用と水素結合形成の両方が必要であることが示された（図1A）。SEMデータにより、酸末端のPLGAナノ粒子は、赤血球上においてエステル末端のPLGAナノ粒子より深く進入することが示された（図1B）。L:G比および末端基の違いは担体赤血球からのPLGAナノ粒子の脱離と相関し、両方のパラメータを改変することにより、PLGAナノ粒子の結合強度と剪断依存性脱離が調整され得る（図2A～2B）。

【０１６１】

生体内分布データはインビトロ剪断試験データと相関する（図2A～2B）。赤血球への便乗により、PLGAの特性に応じてPLGAナノ粒子が特定の器官に送達される（図3）。高剪断器官（肺および腎臓）へのPLGAナノ粒子の送達は、高剪断応力下における赤血球からの正味のナノ粒子脱離と相関する。例えば、PLGA-cおよびPLGA-dは、高剪断応力下において最も高い脱離効率を示し、肺および腎臓の方により多く送達された。低剪断器官（脾臓）へのPLGAナノ粒子の送達は、低剪断応力下における早期のナノ粒子放出に関連する。例えば、PLGA-aは、低剪断応力下において最も高い早期の脱離を示し、脾臓の方により多く送達された。

【０１６２】

実施例2: 赤血球活用化学療法（ELeCt）:肺転移に対処するための赤血球表面で集合している生分解性ナノ粒子

がん処置の柱であるにもかかわらず、化学療法は、効果的でない標的指向化および不充分な腫瘍集積のため、肺転移の処置に対して示されている有効性は限定的である。本明細書において、生分解性薬物ナノ粒子を赤血球の表面上で自己集合させて、肺転移の処置のための化学療法を可能にすることからなる非常に有効な赤血球活用化学療法（ELeCt）プラットフォームを記載する。このELeCtプラットフォームにより、遊離のナノ粒子と比べて薬物ナノ粒子の循環時間が有意に長くなり、10倍高い薬物含有量が肺に送達された。早期黒色腫肺転移モデルおよび末期黒色腫肺転移モデルの両方で、ELeCtプラットフォームにより、生存度の有意な改善をもたらす腫瘍増殖の実質的な抑止が可能であった。さらに、ELeCtプラットフォームは、数多くの承認済の化学療法薬を送達するために使用され得る。総合的に、この研究結果は、ELeCtプラットフォームによって有効な肺転移の処置のための化学療法を可能にするための多用途ストラテジーがもたらされることを示す。

【０１６３】

序論

がんは、この数十年間にわたって主な死因の1つとなっている［1］。特定の組織内または血液中における腫瘍細胞の早期検出によってがん患者の生存度は改善されているが、現在使用されている標準治療介入、例えば、手術、放射線療法、または化学療法が有する有効性は限定的であり、がんは早期に検出されない［1～4］。しかしながら、早期検出は多くの場合、実現可能でなく、ほとんどの患者は、診断時点までに腫瘍が第2の場所に転移している［2,4］。

【０１６４】

米国立がん研究所（NCI）によれば、さまざまな原発性がんの最も一般的な転移部位は、高い血管密度のため肺である。肺転移は、処置しなかった場合は致命性が高く、現在、その具体的な処置法がない［5,6］。全身性の化学療法は、肺転移に対する標準的な処置選択肢の1つである［7,8］。しかしながら、その有効性は、肺への効果的でない標的指向化および不充分な集積のため望ましいものとはほど遠くなっている。ナノテクノロジーが、進行期の転移性がんの処置の向上に中枢的役割を果たすようになってきており［9～11］、したがって肺転移の場合にも同様に応用され得る。しかしながら、従来のナノ粒子送達では、多くの場合、血管内に注射されたナノ粒子を妨害する生物学的バリアの存在のため、所望の作用部位に集積させることができない［12～17］。組織特異的リガンドを用いた能動的標的指向化（active targeting）が、多くの場合で組織集積を改善するためのストラテジーとして探索されているが、ささやかな治療有効性の改善がもたらされているにすぎず、高い生産コストのため形式変換の可能性は低い［18～26］。

【０１６５】

有効な肺転移の処置のための化学療法を可能にするための効率的な薬物送達を達成するため、標的部位の独自の生理学を本明細書において考慮し、二面的ストラテジー（赤血球活用化学療法（ELeCt））-赤血球の表面上で自己集合する生分解性薬物ナノ粒子を開発した（図4A）。赤血球は、狭い肺毛細血管内で赤血球に起こる高い剪断応力に応答して、肺内皮および腫瘍結節内で応答的に粒子を外すことができる、一次薬物送達系としての機能を果たす［27,28］。生分解性ナノ粒子自体は、大量の化学療法薬を封入し、特徴的な制御放出機構を有することができる［29,30］。このナノ粒子は、カーゴの持続的送達を可能にする二次薬物送達系としての機能を果たす。この試験では、この肺生理学支援型ナノ粒子ストラテジーの卓越した集積および治療有効性が、モデル化学療法薬のドキソルビシンを用いて実証された。この思想は、肺転移に対処し、生存度を改善するために早期および末期の黒色腫肺転移モデルにおいて成功裡に使用された。多量のFDA承認済の化学療法薬および薬物の組み合わせを生分解性ナノ粒子内に組み込み、続いて赤血球上で自己集合する能力が実証された。また、粒子は、ヒト赤血球に容易に自己集合し、剪断力依存的に外れる。総合すると、赤血球活用化学療法（ELeCt）により、肺転移に対処するための多用途で効果がある形式変換可能なプラットフォームがもたらされる。

【０１６６】

結果

薬物搭載生分解性ナノ粒子は標的がん細胞と効率的に相互作用し得る。ドキソルビシンをモデル薬物として使用し、薬物搭載生分解性ポリマー（ポリ（乳酸・グリコール酸）（PLGA））ナノ粒子を、ナノ沈殿法を用いて調製した。この薬物搭載PLGAナノ粒子は、未修飾のナノ粒子よりわずかに大きい136.0±2.7 nmの直径を有した（図4B）。興味深いことに、ドキソルビシンの封入によって薬物搭載ナノ粒子の表面がわずかに正（10.45±0.84 mV）となった（図4C）。これは、ナノ粒子表面上のドキソルビシンの存在によるものであり得る。この薬物搭載PLGAナノ粒子は高い薬物搭載能（196.7±5.8 mg/g）を示した（図4D）。ナノ粒子の形態構造を、走査型電子顕微鏡法（SEM）を用いて特性評価した。図4Eに示すSEM画像により、未修飾のPLGAナノ粒子および薬物搭載PLGAナノ粒子はどちらも球状であり、比較的単分散型であることが明らかである。動的光散乱（DLS）データ（図4F）により、調製されたナノ粒子の一様なサイズ分布が確認された。薬物がPLGAナノ粒子から放出され得るかどうかを試験するため、その放出プロフィールを完全培地中でアッセイした。バーストの後、徐放プロフィールが観察され、ほとんどの薬物が最初の6時間以内に放出された（図4G）。薬物ナノ粒子と標的がん細胞との効率的な相互作用は成功裡の薬物送達および有効性のために極めて重要である。この試験では、B16F10-Luc黒色腫細胞を、薬物搭載生分解性PLGAナノ粒子と標的がん細胞間の相互作用を評価するためのモデルとして使用した。図4Hに示されるように、薬物搭載PLGAナノ粒子は、B16F10-Luc細胞によって速やかに効率的に内在化されるようであった。20分間のインキュベーションの間に、大部分の細胞が自身に薬物搭載ナノ粒子を有した。図4Iに示す共焦点レーザー走査型顕微鏡法（CLSM）画像により、ナノ粒子とB16F10-Luc細胞間の効率的な相互作用が確認された。注目すべきことに、細胞核内におけるドキソルビシン蛍光の増強により、搭載された薬物の有効な細胞内送達および充分な放出が示された。薬物搭載PLGAナノ粒子のインビトロ抗腫瘍有効性を同じ細胞株の2D培養物において、さらに評価した。用量応答曲線（図4J）およびIC_{50}値（図4K）、によって示されるように、薬物搭載PLGAナノ粒子が示した細胞死滅効果は、遊離薬物と比べてわずかに弱かった。しかしながら、その差は有意でない。

【０１６７】

薬物搭載生分解性ナノ粒子は赤血球上に効率的に自己集合した

薬物搭載PLGAナノ粒子がマウス赤血球上に効率的に自己集合し得るかどうかを最初に評価した。これを行なうため、マウス赤血球をナノ粒子とともに、一連のナノ粒子：赤血球比（50:1～800:1）でインキュベートし、ナノ粒子の結合を、フローサイトメトリーを用いて検出した。図5Aおよび5Bに示されるように、薬物搭載PLGAナノ粒子は実際に、マウス赤血球上に効率的に自己集合した。具体的には、ナノ粒子とともに200:1の比でイン

キュベートした場合、81.6%の赤血球がナノ粒子を担持していることがわかり、この数は、インキュベーション比をさらに上げると＞96%まで増大した。また、赤血球に対するナノ粒子の結合効率も定量した。驚くべきことに、インキュベートしたナノ粒子の大部分（39.3～54.5%）が、赤血球に対するナノ粒子の供給比に応じてマウス赤血球上で自己集合した（図5C）。ナノ粒子のこの高い結合効率および高い薬物搭載能のため、マウス赤血球は高い（3×10^8個の赤血球あたり294.1μgという高い）薬物用量を担持することができた（図5D）。また、マウス赤血球上の薬物用量は、赤血球に対するナノ粒子の供給比を操作することにより容易に調整され得る。次に、マウス赤血球上への薬物搭載PLGAナノ粒子の自己集合を、CLSMおよびSEMを用いて可視化した。図5Eおよび5Fに示されるように、CLSMおよびSEMの両方のデータにより、マウス赤血球上へのナノ粒子の効率的な自己集合が確認された。その一方で、マウス赤血球は、薬物搭載PLGAナノ粒子に便乗された後もその両凹形状を維持しており（図5Eおよび5F）、ナノ粒子の自己集合によって引き起こされた担体赤血球に対するダメージは最小限であることが示された。赤血球便乗プラットフォームの応用可能性を試験するため、ヒト赤血球上への薬物搭載PLGAナノ粒子の自己集合を評価した。図5Gおよび5Hに示すCLSMおよびSEMの両方の画像により、薬物ナノ粒子はヒト赤血球上でも同様に効率的に自己集合することが示された。

【０１６８】

また、種々のナノ粒子：赤血球供給比（200:1～1600:1）でのヒト赤血球への薬物搭載PLGAナノ粒子の自己集合も評価した）。マウス対応物と同様、薬物搭載PLGAナノ粒子はヒト赤血球上に、種々のナノ粒子：赤血球供給比において高効率（38.7～45.7%）で自己集合された（図5Iおよび5J）。さらに、ヒト赤血球上の薬物用量は、インキュベーション比を変えることによって調整可能であり、1600:1のナノ粒子：赤血球比でインキュベートした場合、非常に高い薬物用量（1.5×10^8個の赤血球あたり209.1μg）がヒト赤血球に便乗し得る（図5K）。

【０１６９】

赤血球活用化学療法（ELeCt）により、転移を有する肺へのナノ粒子薬物の向上した標的指向性送達が可能になる。種々の薬物製剤の血中循環時間を調べるために、まず薬物動態試験を実施した。図6Aに示されるように、薬物ナノ粒子が赤血球に自己集合されることにより、試験した全ての時点で高血中薬物濃度が得られ、便乗製剤の長い循環時間が示された。マウス肺毛細血管は5μmの平均直径を有し、マウス赤血球の直径より3～4倍小さい1μmという小さいサイズまで狭くなる［27］。静脈内投与すると、赤血球上で自己集合した薬物搭載ナノ粒子は、高剪断応力のため担体赤血球から脱離し、狭い肺毛細血管内に沈着することが予測される。この仮説を試験するため、まず、薬物搭載ナノ粒子を担持している赤血球を低い（約1 Pa）または高い（6 Pa）剪断応力において20分間剪断するインビトロ剪断試験を行なった。図6Bに示されるように、マウス赤血球からの薬物ナノ粒子の脱離は明らかに剪断依存的であり、罹病状態の肺への薬物ナノ粒子の特異的送達の根拠となる。具体的には、レオメーターの使用で肺に相当する剪断応力（6 Pa）で、便乗薬物ナノ粒子の76%が剪断離脱した。さらに、薬物ナノ粒子のこの剪断依存性脱離はヒト赤血球でも観察され、このELeCtプラットフォームの応用可能性が支持された。薬物ナノ粒子がインビボで、転移を有する肺内で剪断離脱して沈着し得るかどうかを試験するため、生体内分布試験を、B16F10-Luc黒色腫肺転移を有するマウスにおいて実施し、薬物、この場合ではドキソルビシンの量を定量した。驚いたことに、図6Cおよび6Dに示されるように、赤血球上での自己集合により、投与後20分で、薬物搭載ナノ粒子では、その遊離のナノ粒子対応物と比べて16.6倍高い薬物含有量が罹病状態の肺に送達された。より長い時点（6時間）であっても、赤血球への便乗により、その非便乗対応物と比べて8.7倍高い薬物含有量が肺内に沈着した。また、赤血球への便乗により、投与後20分で、遊離薬物の注射と比べて6.9倍高い薬物含有量が黒色腫の転移を有する肺に送達された。

【０１７０】

次に、転移を有する肺内で担体赤血球から剪断離脱した薬物ナノ粒子の分布を調べた。図6Eに示されるように、生体内分布データと整合して、自己集合ナノ粒子を有する赤血球

で処置されている肺区域内には、ナノ粒子単独で処置されている肺区域と比べて顕著に多い薬物ナノ粒子がみられた。明らかに、沈着したナノ粒子の全部ではないが大部分が転移腫瘍結節内に深く進入し、赤血球上での生分解性薬物ナノ粒子の自己集合により、ペイロード化学療法剤をその所望の作用部位に精密に送達することが可能になることが示された。

【０１７１】

赤血球活用化学療法（ELeCt）プラットフォームにより肺転移の進行が抑止され、生存度が改善される。赤血球上における生分解性薬物ナノ粒子の自己集合のプラットフォームの有効性を評価するため、B16F10-Luc黒色腫肺転移モデルを確立し、抗転移有効性を早期および末期の両方の同モデルにおいて試験するために使用した。開発したプラットフォームの有効性を早期の肺転移の制御において試験した。図7Aに示されるように、肺転移モデルは、B16F10-Luc細胞を尾静脈から静脈内注射することによって確立した。4回の用量の処置を1日おきに行ない、最初の用量は、腫瘍細胞の注射の1日後に投与した。肺転移量を、肺における生物発光強度によって測定した。生物発光画像（図7B）および個々のマウスの肺転移量の増殖曲線（図7C）によって示されるように、ELeCtにより、遊離薬物またはナノ粒子単独の使用と比べて有意に良好な肺転移の進行の抑止が達成された。驚くべきことに、2匹のマウスは、赤血球上で自己集合している薬物ナノ粒子で処置された後、腫瘍移植後31日目まで完全に肺転移なしのままであった。全肺転移量を、肺における生物発光強度に基づいて計算した。図7Dに示されるように、腫瘍移植、最初の23日間で、肺転移は、赤血球上で自己集合している薬物ナノ粒子で処置されている全てのマウスで、ほぼ完全に抑止された。具体的には、図7Eに示されるように、16日目、それぞれ遊離薬物または薬物ナノ粒子単独で処置されているマウスでは、肺転移量の94.2％および45.6％が抑止された。明確な対比として、ELeCtでは99.5％の転移抑止率が得られた。同様の研究結果が23日目でも観察された。図7Fに示されるように、薬物ナノ粒子単独の使用と比べて、赤血球上で自己集合している薬物ナノ粒子を用いた処置により、42.3％高い肺転移量の抑止率がもたらされた。カプラン・マイヤー生存解析（図7H）により、ナノ粒子単独の使用より生存度が有意に改善されるというELeCtアプローチの有益性がさらに確認された。遊離薬物またはナノ粒子単独の使用では生存度はわずかに改善されたにすぎず、生存期間の中央値は29日間から32日間に延びた。明確な比較として、赤血球上で自己集合している薬物ナノ粒子での処置により、動物の生存期間の中央値は29日間から61日間に延びた。さらに、7匹のマウスのうち1匹は少なくとも70日間、生存し続けた。全処置期間中、マウスの体重変化をモニタリングした。いずれの処置でも、遊離薬物での処置の際の急激な体重減少と比べて有意な体重減少は検出されず（図7G）、遊離薬物の投与のみで、現在使用されている薬物用量で明白な毒性が引き起こされることが示された。

【０１７２】

次に、開発した治療薬の抗転移活性を末期の肺転移において調べた。図8Aに示されるように、腫瘍細胞の静脈内注射後、マウスに4回の用量の治療薬の投与を1日おきに受けさせ、最初の用量は移植の1週間後（7日目に）投与した。個々のマウスの生物発光画像（図8B）および肺転移の増殖曲線（図8C）によれば、薬物ナノ粒子単独の使用では、肺転移の進行の有意な抑止はもたらされなかった。しかしながら、赤血球上で自己集合している薬物ナノ粒子（ELeCt）では肺転移の進行を遅らせることができたが、早期転移モデルの場合ほど著しくはなかった。具体的には、赤血球上で自己集合している薬物ナノ粒子での処置を受けた7匹のマウスのうち2匹は、腫瘍移植後16日目まで完全に肺転移なしのままであった。図8Dに示す全肺転移量データにより、ナノ粒子単独の使用より良好な便乗薬物ナノ粒子の有効性が確認された。特に、腫瘍移植後16日目、便乗薬物ナノ粒子は、転移部の増殖の抑止に関して2.4倍良好な有効性を示した。16日目、肺を摘出し、肺上の表面転移結節を計数した。図8Eに示す表面結節データは、生物発光を用いて評価した生物発光転移量データと整合する。表面結節の低減における2.3倍良好な有効性は、薬物ナノ粒子を赤血球に自己集合させることによって得られた。マウスの肺のＨ＆Ｅ解析によってこの結果を確認した（図10）。また、図8Fに示す体重変化データおよび図11に示すＨ＆Ｅ解析データにより、いずれの処置も有意な毒性とは関連していないことが示された。動物の生存期間

の延長に関する治療薬の有効性を評価するための別個の試験を実施した。図8Gに示されるように、早期転移モデルとは異なり、薬物ナノ粒子単独の使用では、なんら生存度の有益性はもたらされなかった。しかしながら、赤血球上で自己集合している薬物ナノ粒子を用いた処置（ELeCt）では、動物の生存度が有意に改善され、生存期間の中央値が28.5日間から37日間に延びた。特に、便乗薬物ナノ粒子の投与を受けた8匹のマウスのうち1匹は少なくとも48日間、生存し続けた。

【０１７３】

いくつかの化学療法剤は、赤血球上で効率的に自己集合された生分解性ナノ粒子に搭載させることができる。他の化学療法剤の送達のためのELeCtプラットフォームの使用の実現可能性を試験するため、カンプトテシン、パクリタキセル、ドセタキセル、5-フルオロウラシル、ゲムシタビン、メトトレキサートおよび5-フルオロウラシル＋メトトレキサートの組み合わせを含む他の6つの一般的な化学療法剤またはその組み合わせを選択し、これらを生分解性PLGAナノ粒子内に搭載させた。多様な物理化学的特性（図12および表2に示す）を有するにもかかわらず、結合効率は異なるが、種々の化学療法剤搭載ナノ粒子を赤血球に自己集合させることができた（図9）。このようなデータは、生分解性薬物ナノ粒子を赤血球に自己集合させるこのアプローチ（ELeCt）が、選択された化学療法薬を、起源が異なる原発腫瘍である肺転移部に送達するための多用途プラットフォームであることの裏付けとなる。

【０１７４】

考察

高い血液処理能力および高密度の狭い毛細血管などの独自の生理学的特長のため、肺は、原発腫瘍部位からの逃避腫瘍細胞が拡散し得る主要器官のうちの1つである［31］。実際、進行期のがん患者の30～55％が肺転移を有する［32］。肺転移の処置は、これが典型的にはより侵攻性的に進行するため、原発腫瘍の処置より難しい［33］。全身性の化学療法は肺転移に対する1つの標準的な処置選択肢である。しかしながら、その有効性は、肺内での効果的でない標的指向化および不充分な集積のため、通常、望ましいものとはほど遠い。また、従来型のナノ粒子媒介性薬物送達でも、所望の作用部位での良好な局所化が達成できない［34］。本明細書において、有効な肺転移の処置のための化学療法を増進させるための赤血球便乗プラットフォーム（赤血球上で自己集合した薬物搭載生分解性ナノ粒子）からなるELeCtを記載する。

【０１７５】

従来型のナノメディシンでは、化学療法薬ペイロードの標的指向性送達を向上させるための能動的標的指向性（active targeting）リガンドの結合が使用される［10,11,35～39］。この研究で開発したELeCtプラットフォームでは、標的部位の特有の生理機能（高剪断応力）およびそれに応答して化学療法薬ペイロードが外れることを利用する、完全に新しいパラダイムを活用する。本発明者らの薬物動態および生体内分布データは、ELeCtプラットフォームが、遊離薬物およびナノ粒子単独と比べて2つの重要な特長-血中循環時間の長期化および肺転移部への集積の改善を有することを示す。実際、どちらの特長も肺転移の処置に有利である。循環時間の長期化はこれまでの報告と整合する［27,40］。赤血球への便乗により、ナノ粒子には細網内皮系（RES）器官による免疫認識があまり起こらず、より長期間、循環系内に留まることが可能となる［27,28,40］。ELeCtによってもたらされる高濃度の血液中ペイロード薬物により、より多くの薬物が循環腫瘍細胞と相互作用して死滅させることが可能となろう。本明細書に示したインビトロ剪断試験データは、赤血球からの薬物ナノ粒子の脱離が剪断依存的であり、これが、ペイロード化学療法薬を標的肺転移部位に精密に送達するためにプラットフォームを使用する根拠となることを示す。大部分の薬物ナノ粒子が低剪断応力でも脱離したことに注目されたい。この要素により、この技術を伴うさらなる探索ため、赤血球に対する薬物ナノ粒子の結合強度を調節するために薬物ナノ粒子の表面修飾を検討することの必要性が強調された。本発明者らの生体内分布データにより、赤血球上における生分解性ナノ粒子の自己集合（ELeCt）プラットフォームでは、高い濃度のペイロード化学療法薬を肺転移部位に短期間で送達できるこ

とが示された。印象的なことに、ELeCtプラットフォームでは、20分間で薬物ナノ粒子単独の使用と比べて16.6倍多くの薬物が転移を有する肺に送達された。比較において、標的指向性リガンドを使用する従来型の標的指向性ナノメディシンアプローチでかかる高い送達の向上を得ることができるのは稀である［17,41］。さらに、最大の腫瘍集積は、ナノメディシンの特性にもよるが、通常、有意に長い時点（12～24時間）に示される［42］。ELeCtプラットフォームによる薬物ナノ粒子の迅速な標的指向性送達により、腫瘍増殖の抑止のための有益性がもたらされよう。例えば、典型的なナノメディシンは、その材料の起源に関係なく、通常、初期バースト薬物放出を有し、したがって早期の薬物漏出が引き起こされ［43］、治療有効性が減弱される可能性があり、多くの場合、毒性がもたらされる。EleCtプラットフォームによって得られる迅速な標的指向性送達は、この問題点を回避する可能性を有する。また、驚くことではないが、肺区域のイメージングにより、沈着したナノ粒子は肺区域全体に、肺転移結節の内部と外部の両方に分布することが示された。転移結節の外部に沈着したナノ粒子は、薬物を放出するための薬物レザーバとしての機能を果たす能力を有し、薬物は、すぐ近くにある転移結節に移動することができる。

【０１７６】

本発明者らのインビボ有効性データは、ELeCtプラットフォームによる化学療法薬の向上した標的指向性送達により、早期および末期の両方の肺転移部の増殖を抑止するための有益性がもたらされ得ることを示す。早期の肺転移モデルにおいて、遊離薬物または薬物ナノ粒子単独を用いた処置では肺転移の進行のいくらかの減速が示された。しかしながら、その抗転移有効性は、動物の生存が有意に長くなるほど充分に効果的でない。比較において、ELeCtプラットフォームでは、遊離薬物または薬物ナノ粒子単独の使用と比べて100～300倍良好な抗転移有効性をもたらすことができた。より重要なことには、この抗転移有効性の改善により動物の生存の有意な延長がもたらされ、32日目までに、肺転移を有するマウスの生存期間の中央値は対照群と比べて長くなった。データにより、ELeCtプラットフォームは、化学療法を早期の肺転移の有効な処置にできる能力を有することが示された。末期転移モデルでは、薬物ナノ粒子単独の投与によって肺転移部の増殖を有意に抑止すること、および生存期間を改善することはできなかった。ELeCtプラットフォームでは肺転移の進行を有意に減速させることができ、動物の生存度を適度に改善することができる。明らかに、この治療薬の抗転移有効性は治療薬の開始時点と密接に関連している。開発した治療薬のさらにより末期の肺転移での処置の有効性はまだ不明である。また、治療薬の薬物用量およびスケジュールのその抗転移有効性に対する効果を明らかにするために、将来的に試験を行なうことも必要かもしれない。

【０１７７】

現段階での理解に基づくと、疎水性相互作用、静電相互作用および水素結合形成が、赤血球への薬物搭載生分解性ナノ粒子の自己集合に寄与しているのかもしれない［27］。本発明者らの薬物ナノ粒子結合データは、モデル薬物搭載ナノ粒子、この場合ではドキソルビシンが、マウス赤血球上に非常に高い結合効率で自己集合し得ることを示す。この特長は、ELeCtプラットフォームワークの作成に極めて重要である。投与され得る赤血球の数は上限を有し、個々の赤血球上において高い薬物用量を有することのみが化学療法薬の治療濃度をもたらし得る。また、本発明者らのデータは、赤血球に対する薬物ナノ粒子の供給インキュベーション比を変えることによって赤血球上の薬物用量を調整することができる、したがって、具体的な肺転移条件に応じて薬物投薬量を変えることができる可能性がもたらされることも示す。ドキソルビシン以外にも、一般的に使用されている種々の化学療法剤またはその組み合わせを生分解性ナノ粒子に搭載させることができた。さらに、このような薬物搭載ナノ粒子も、結合効率は異なるが、マウス赤血球上に同様に自己集合する。これにより、起源が異なる原発部位である肺転移を処置するためにELeCtプラットフォームを使用するための新たな扉が開かれる。肺転移は、乳がん、膀胱がん、黒色腫など、および多くの他の異なる原発腫瘍起源を有し得る。異なる起源に由来する転移は好ましくは特異的な化学療法剤によって処置される［44,45］。ELeCtプラットフォームは、その原発腫瘍起源に応じた最適な化学療法剤を搭載することにより、異なる肺転移を処置す

るための多用途プラットフォームとなる能力を有する。より興味深いことには、本発明者らのデータは、薬物搭載生分解性ナノ粒子がヒト赤血球上に効率的に自己集合され、肺に相当する剪断応力下では脱離したことも示す。また、生分解性ナノ粒子（PLGA）を調製するために使用される材料は、いくつかのFDA承認済のうちの一部の製品である［46］。したがって、このプラットフォーム技術は応用可能性を有する。

【０１７８】

要約すると、肺転移を処置するための化学療法剤の肺生理学支援型剪断応答的標的指向性送達を可能にする、赤血球上において薬物搭載生分解性ナノ粒子が自己集合している赤血球活用化学療法（ELeCt）プラットフォームを開発した。赤血球上で自己集合している薬物ナノ粒子は、内因的機構的高剪断応力に応答して、転移を有する肺内で精密に外され得る。一般的に使用されている種々の化学療法剤を生分解性ナノ粒子に搭載させることができ、さらに、赤血球上に成功裡に自己集合するように作製することができる。このプラットフォームでは、罹病状態の肺に、ナノ粒子単独の使用と比べて一桁多い含有量のモデル薬物（ドキソルビシン）が成功裡に送達された。より重要なことには、このプラットフォームにより、化学療法で肺転移部の増殖を有効に抑止すること、および生存度を有意に改善することが可能となった。概して、ELeCtプラットフォームは、起源が異なる原発腫瘍である肺転移を処置するための多用途ストラテジーであり得、大きな応用可能性を有する。

【０１７９】

材料および方法

ナノ粒子の調製および特性評価。ドキソルビシン（DOX）が封入されたPLGAナノ粒子を、ナノ沈殿法を用いて調製した。簡単には、5 mgのDOXを500μLのメタノールと5μLのトリエチルアミン（TEA）に溶解させた。これを、20 mgのPLGAを含有している1 mLのアセトンに添加した。次いでこの混合物を10 mLの1%ポリビニルアルコール（PVA）溶液中に定常撹拌下で、シリンジポンプを1 mL/分で用いて注入した。粒子を定常撹拌下で一晩維持した後、回転式エバポレーションを用いて有機溶媒を除去した。形成された粒子を12000 gで15分間、遠心分離し、上清みを、薬物搭載の定量のために解析した。次いで粒子を脱イオン水中に再懸濁させ、そのサイズ、ゼータ電位および多分散指数について、動的光散乱（Malvern Zen3600）および走査型電子顕微鏡法（Zeiss FESEM Supra 55VP,Zeiss FESEM Ultra 55）を用いてアセスメントした。ナノ粒子を、合計2回の洗浄で脱イオン水を用いて洗浄した後、最後にこれをPBS中に懸濁させた。他の化学療法薬を含有するナノ粒子を、上記のものと同様のナノ沈殿手法を軽微な修正を伴って用いて調製した。

【０１８０】

血液の収集および処理。マウス全血を心臓穿刺により、ヘパリンプレコートシリンジを用いて収集し、使用前はBD Microtainer（登録商標）血液収集チューブ内に保存した。全血を1000 gで10分間、4℃にて遠心分離し、血清およびバフィーコート層を赤血球区画から除去した。単離された赤血球を冷PBSで3回、さらに洗浄し、650 gで15分間、4℃にて遠心分離した後、最後にこれを10%ヘマトクリットの濃度でPBS中に懸濁させた（赤血球ストック溶液）。BioIVT（NY,USA）から入手したヒト全血を、マウス血液と同じ手順を用いて処理し、保存した。この試験では、実験ごとに新たに処理した赤血球を使用した。

【０１８１】

赤血球への薬物ナノ粒子の自己集合および特性評価。等体積の赤血球ストック溶液と薬物ナノ粒子懸濁液をAxygen（商標）1.5 mL容自立型スクリューキャップチューブ内で混合し、上下逆さにすること、およびピペッティングによってさらに充分に混合した。次いでチューブをチューブリボルバー（Thermo Fisher Scientific）上で40分間回転させた。便乗された赤血球を次いで、4℃にて100 gで5分間の遠心分離によってペレット化し、未吸収粒子を注意深く除去し、ペレットを1mLの1×PBSで再度洗浄し、結合が緩い粒子を除去した。便乗された赤血球を最後に10%v/vで1×PBS中に再懸濁させ、さらなる特性

評価またはインビボ試験のために使用した。

【０１８２】

便乗効率および赤血球上の薬物搭載を、蛍光測定を用いて測定した。蛍光を用いた定量では、25μLの赤血球を、脱イオン水を用いて溶解させ、薬物含有量を、DOX蛍光（励起/発光　470/590 nm）を使用し、プレートリーダー（Tecan Safire 2（登録商標）,NC,USA）にて定量した。種々のナノ粒子：赤血球比でのナノ粒子担持赤血球の割合（%）を、フローサイトメトリー（BD LSR Analyser II（商標）,CA,USA）を使用し、DOX蛍光（発光/励起　470/590 nm）を用いて調べ、共焦点顕微鏡法（Upright Zeiss LSM 710 NLO（商標）ready,Germany）によって確認した。赤血球へのナノ粒子の自己集合を、走査型電子顕微鏡法（Zeiss FESEM Supra 55VP（商標）,Zeiss FESEM Ultra 55）を用いて確認した。簡単には、便乗された赤血球を、2.5%グルタルアルデヒド溶液を用いて固定し、漸増勾配エタノール中で洗浄した後、ヘキサメチルジシラザン（HMDS）を用いて化学的に乾燥させた。最後に、試料をスパッタコートした（EMT 150T ES金属スパッターコーター,PA,USA）後、イメージングした。

【０１８３】

インビトロ血清安定性試験および剪断試験。血清安定性試験では、便乗されたマウス赤血球およびヒト赤血球を1 mLのウシ胎仔血清（FBS）またはヒト血清（BioIVT製）中で、12 rpmのチューブリボルバー上で37℃にてインキュベートした。このような条件は低剪断の生理学的環境を模倣している。20分間のインキュベーション後、細胞を250 gで5分間の遠心分離によってペレット化し、1×PBS中に10%v/vまで再懸濁させた。次いで25μLの赤血球を、脱イオン水を用いて溶解させ、残存薬物含有量を、DOX蛍光（励起/発光　470/590 nm）を用いてプレートリーダー（Tecan Safire 2（登録商標））にて定量した。

【０１８４】

剪断試験では、便乗されたマウス赤血球およびヒト赤血球を10 mLのFBSまたはヒト血清中でインキュベートした。回転剪断（6 Pa）を血清中の赤血球に、円筒形のコケット（coquette）型粘度計（1mmのギャップ、AR-G2レオメーター、TA instruments,DE,USA）を用いて20分間印加した。剪断の印加中は、ウォータージャケットを用いて試料を37℃に維持した。このような条件は、肺に相当する高剪断の生理学的環境を模倣している。20分後、細胞を250 gで10分間の遠心分離によってペレット化し、1×PBS中に10%v/vまで再懸濁させた。次いで25μLの赤血球を、脱イオン水を用いて溶解させ、残存薬物含有量を、DOX蛍光（励起/発光　470/590 nm）を用いてプレートリーダー（Tecan Safire 2（登録商標））にて定量した。

【０１８５】

動物。雌C57BL/6マウス（7～9週齢）をCharles River Laboratories（MA,USA）から購入した。実験はすべて、ケンブリッジにあるハーバード大学の文理学部（Faculty of Arts and Sciences）（FAS）の動物実験委員会（IACUC）により承認済のプロトコルに従って行なった。

【０１８６】

インビボ薬物動態および生体内分布試験。薬物動態（PK）試験では、健常雌C57BL/6マウスを使用した。遊離DOX、DOX搭載ナノ粒子（NP）および赤血球上で自己集合している薬物ナノ粒子（RBC-NP）（全ての群でn＝3）を尾静脈内に5.2 mg/kgの用量で静脈内注射した。血液試料をマウスから顎下出血により、注射の2分後、15分後、30分後、2時間後および5時間後に収集した。血漿を細胞成分から、5000 rpmで10分間、遠心分離することによって分離した。DOXを、両方の区画（30μL）から150μLのアセトニトリルを用いて抽出した。薬物含有量を、勾配移動相溶媒を使用してAgilent C-18カラム（Poroshell（商標）120、EC-C18、3.0×100 mm、2.7μm）に流す逆相液体クロマトグラフィー-質量分析（LC-MS、Agilent 1290/6140 UHPLC,CA,USA）を用いて定量した。

【０１８７】

生体内分布試験では、1×10^5のB16F10-Luc細胞を雌C57BL/6マウスの尾静脈内に静脈内注射した。移植の14日後、マウスに、遊離DOX、DOX搭載ナノ粒子（NP）および赤血球上で自己集合している薬物ナノ粒子（RBC-NP）（全ての群でn＝3）を尾静脈内に5.2 mg/kgの用量で静脈内注射した。注射の20分後および6時間後にマウスを致死させ、器官を、さらなる処理のために採取した。1 mLの冷却した脱イオン水を各器官に添加し、器官を、ハイシェアホモジナイザー（IKA T-10 Basic（登録商標）Ultra turrax,NC,USA）を用いてホモジナイズした。DOXをホモジネートから、アセトニトリル（ホモジネート:アセトニトリルが1:4）を用いて抽出し、薬物含有量を、DOX蛍光（発光/励起 470/590 nm）を用いてプレートリーダー（Tecan Safire 2（登録商標））にて定量したデータを、器官の重量に対して正規化した薬物含有量（μg）として表示する。

【０１８８】

罹病状態の肺内におけるナノ粒子の分布では、1×10^5のB16F10-Luc細胞を雌C57BL/6マウスの尾静脈内に静脈内注射した。移植の28日後、マウスに、DOX搭載ナノ粒子（NP）および赤血球上で自己集合している薬物ナノ粒子（RBC-NP）を注射した。注射の20分後、マウスを安楽死させ、そのままの肺を収集した。肺を、冷却した1×PBSで2回洗浄した後、4％パラホルムアルデヒド溶液中に一晩、固定した。固定された肺を次いで、Tissue Tek OCT（商標）コンパウンド（Sakura Finetek）中で凍結させ、クリオスタット（Leica CM1950（商標）,IL,USA）を用いて切片化した。切片化組織を、Fluroshield（登録商標）を用いてマウントしてDAPIで染色し（励起/発光 340/488 nm）、共焦点顕微鏡（Upright Zeiss LSM 710 NLO（商標）ready）を用いて解析した。

【０１８９】

インビボ実験的肺転移モデルでの有効性試験。実験的肺転移モデルを、雌C57BL/6マウスの尾静脈内への1×10^5のB16F10-Luc細胞の静脈内注射によって確立した。処置群での有効性を、早期および末期の転移モデルにおいて評価した。マウスを、肺における生物発光強度に基づいて、治療薬の最初の注射の1日前に無作為化した。対照（生理食塩水）群および5.2 mg/kgの用量での3つの処置群（DOX-NP、RBC-NP、遊離DOX）を、その有効性について評価した（特に記載のない限り、全ての群でn＝7）。

【０１９０】

早期転移モデルでは、処置を、移植の翌日に開始して行なった。6日間で4回の注射を、すなわち移植後1、3、5および7日目に行なった。移植後6、8、10、12、18、23、31日目、マウスに、インビボイメージング（Perkin Elmer IVIS Spectrum（商標）,MA,USA）を用いてイメージングを行なった。簡単には、マウスに、150μLの30 mg/mLのXenolight（商標）-D-ルシフェリン含有生理食塩水を腹腔内注射した。注射の15分後、マウスに、インビボイメージングを用いてイメージングを行なった。平均放射輝度（生物発光強度）を、ソフトウェアLiving system（登録商標）を用いて評価した。動物を、その生存度についてさらにモニタリングした。

【０１９１】

末期の転移モデルでは、処置を移植の1週間後に行なった。6日間で4回の注射を、すなわち移植後7、9、11および13日目に行なった。マウスにイメージングを6、8、10、12および16日目に、上記のようなインビボイメージングを用いて行なった。平均放射輝度を、ソフトウェアLiving system（登録商標）を用いて評価した。16日目、マウスを安楽死させ、肺を摘出し、10％ホルマリンを用いて固定した。固定された肺を表面結節の計数およびH＆E解析に使用した。末期モデルでの生存度を、注射スケジュールを上記のようにすることによって評価した。（対照および処置群でn＝8）。

【０１９２】

統計解析。データはすべて、平均±SEMとして示す。スチューデントのt検定、テューキーのHSD解析を伴う一元配置ANOVA、またはマンホイットニー検定を用いて有意性を判定した。統計解析はすべて、Graphpad Prism（商標）6ソフトウェアを用いて行なった。カプラン・マイヤー生存曲線の解析では、ログランク（マンテル・コックス）解析を使用した。p値は、種々の有意性レベルを表す、p＜0.05＊、p＜0.01＊＊、p＜0.001＊＊＊

。フローサイトメトリー解析はすべて、FlowJo（商標）ソフトウェアを用いて行なった。

【０１９３】

参考文献

[1] R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal, Cancer statistics, 2019, CA Cancer J Clin 69(1) (2019) 7-34.

[2] J.D. Emery, K. Shaw, B. Williams, D. Mazza, J. Fallon-Ferguson, M. Varlow, L.J. Trevena, The role of primary care in early detection and follow-up of cancer, Nat Rev Clin Oncol 11(1) (2014) 38-48.

[3] S.A. Eccles, D.R. Welch, Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies, Lancet 369(9574) (2007) 1742-57.

[4] A.C. Society, Cancer Prevention & Early Detection Facts & Figures 2019-2020. 2019).

[5] F. Cardoso, E. Senkus-Konefka, L. Fallowfield, A. Costa, M. Castiglione, E.G.W. Group, Locally recurrent or metastatic breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up, Ann Oncol 21 Suppl 5 (2010) v15-9.

[6] M. Reck, S. Popat, N. Reinmuth, D. De Ruysscher, K.M. Kerr, S. Peters, E.G.W. Group, Metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up, Ann Oncol 25 Suppl 3 (2014) iii27-39.

[7] G. Morgan, R. Ward, M. Barton, The contribution of cytotoxic chemotherapy to 5-year survival in adult malignancies, Clin Oncol (R Coll Radiol) 16(8) (2004) 549-60.

[8] B.A. Chabner, T.G. Roberts, Jr., Timeline: Chemotherapy and the war on cancer, Nat Rev Cancer 5(1) (2005) 65-72.

[9] A. Schroeder, D.A. Heller, M.M. Winslow, J.E. Dahlman, G.W. Pratt, R. Langer, T. Jacks, D.G. Anderson, Treating metastatic cancer with nanotechnology, Nat Rev Cancer 12(1) (2011) 39-50.

[10] D. Peer, J.M. Karp, S. Hong, O.C. FaroKHzad, R. Margalit, R. Langer, Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy, Nat Nanotechnol 2(12) (2007) 751-760.

[11] J. Shi, P.W. Kantoff, R. Wooster, O.C. Farokhzad, Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities, Nat Rev Cancer 17(1) (2017) 20-37.

[12] Z. Zhao, A. Ukidve, V. Krishnan, S. Mitragotri, Effect of physicochemical and surface properties on in vivo fate of drug nanocarriers, Adv Drug Deliv Rev (2019).

[13] E. Blanco, H. Shen, M. Ferrari, Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery, Nat Biotechnol 33(9) (2015) 941-51.

[14] S. Mitragotri, P.A. Burke, R. Langer, Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals: formulation and delivery strategies, Nat Rev Drug Discov 13(9) (2014) 655-72.
[15] S. Barua, S. Mitragotri, Challenges associated with Penetration of Nanoparticles across Cell and Tissue Barriers: A Review of Current Status and Future Prospects, Nano Today 9(2) (2014) 223-243.
[16] J.W. Nichols, Y.H. Bae, Odyssey of a cancer nanoparticle: from injection site to site of action, Nano Today 7(6) (2012) 606-618.
[17] S. Wilhelm, A.J. Tavares, Q. Dai, S. Ohta, J. Audet, H.F. Dvorak, W.C.W. Chan, Analysis of nanoparticle delivery to tumours, Nat Rev Mater 1(5) (2016).
[18] Y. Zhong, F. Meng, C. Deng, Z. Zhong, Ligand-directed active tumor-targeting polymeric nanoparticles for cancer chemotherapy, Biomacromolecules 15(6) (2014) 1955-69.
[19] X.H. Peng, Y.Q. Wang, D.H. Huang, Y.X. Wang, H.J. Shin, Z.J. Chen, M.B. Spewak, H. Mao, X. Wang, Y. Wang, Z. Chen, S.M. Nie, D.M. Shin, Targeted Delivery of Cisplatin to Lung Cancer Using ScFvEGFR-Heparin-Cisplatin Nanoparticles, Acs Nano 5(12) (2011) 9480-9493.
[20] F. Pastorino, C. Brignole, D. Di Paolo, B. Nico, A. Pezzolo, D. Marimpietri, G. Pagnan, F. Piccardi, N. Cilli, R. Longhi, D. Ribatti, A. Corti, T.M. Allen, M. Ponzoni, Targeting liposomal chemotherapy via both tumor cell-specific and tumor vasculature-specific ligands potentiates therapeutic efficacy, Cancer Res 66(20) (2006) 10073-10082.
[21] J.D. Byrne, T. Betancourt, L. Brannon-Peppas, Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics, Adv Drug Deliv Rev 60(15) (2008) 1615-26.
[22] R. Kanasty, J.R. Dorkin, A. Vegas, D. Anderson, Delivery materials for siRNA therapeutics, Nat Mater 12(11) (2013) 967-77.
[23] T. Lammers, W.E. Hennink, G. Storm, Tumour-targeted nanomedicines: principles and practice, Br J Cancer 99(3) (2008) 392-7.
[24] N. Bertrand, J. Wu, X. Xu, N. Kamaly, O.C. Farokhzad, Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology, Adv Drug Deliv Rev 66 (2014) 2-25.
[25] Y. Zou, Y. Liu, Z. Yang, D. Zhang, Y. Lu, M. Zheng, X. Xue, J. Geng, R. Chung, B. Shi, Effective and Targeted Human Orthotopic Glioblastoma Xenograft Therapy via a Multifunctional Biomimetic Nanomedicine, Adv Mater 30(51) (2018) e1803717.
[26] S. Wang, G. Yu, Z. Wang, O. Jacobson, R. Tian, L.S. Lin, F. Zhang, J. Wang, X. Chen, Hierarchical Tumor Microenvironment-Responsive Nanomedicine for Programmed Delivery of Chemotherapeutics, Adv Mater (2018) e1803926.
[27] A.C. Anselmo, V. Gupta, B.J. Zern, D. Pan, M. Zakrewsky, V. Muzykantov, S. Mitragotri, Delivering Nanoparticles to Lungs while Avoiding Liver and Spleen through Adsorption on Red Blood Cells, Acs Nano 7(12) (2013) 11129-11137.
[28] J.S. Brenner, D.C. Pan, J.W. Myerson, O.A. Marcos-Contreras, C.H. Villa, P. Patel, H. Hekierski, S. Chatterjee, J.Q. Tao, H. Parhiz, K. Bhamidipati, T.G. Uhler, E.D. Hood, R.Y. Kiseleva, V.S.

Shuvaev, T. Shuvaeva, M. Khoshnejad, I. Johnston, J.V. Gregory, J. Lahann, T. Wang, E. Cantu, W.M. Armstead, S. Mitragotri, V. Muzykantov, Red blood cell-hitchhiking boosts delivery of nanocarriers to chosen organs by orders of magnitude, Nat Commun 9 (2018).

[29] Z. Zhao, S. Lou, Y. Hu, J. Zhu, C. Zhang, A Nano-in-Nano Polymer-Dendrimer Nanoparticle-Based Nanosystem for Controlled Multidrug Delivery, Mol Pharm 14(8) (2017) 2697-2710.

[30] S. Rezvantalab, N.I. Drude, M.K. Moraveji, N. Guvener, E.K. Koons, Y. Shi, T. Lammers, F. Kiessling, PLGA-Based Nanoparticles in Cancer Treatment, Front Pharmacol 9 (2018) 1260.

[31] F. van Zijl, G. Krupitza, W. Mikulits, Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration, Mutat Res 728(1-2) (2011) 23-34.

[32] S. DS, Secondary Lung Tumors. 2019 2019).

[33] N.K. Altorki, G.J. Markowitz, D.C. Gao, J.L. Port, A. Saxena, B. Stiles, T. McGraw, V. Mittal, The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis, Nat Rev Cancer 19(1) (2019) 9-31.

[34] S. Ramalingam, C. Belani, Systemic chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer: Recent advances and future directions, Oncologist 13 (2008) 5-13.

[35] V.P. Chauhan, R.K. Jain, Strategies for advancing cancer nanomedicine, Nat Mater 12(11) (2013) 958-962.

[36] S.A. Costa, D. Mozhdehi, M.J. Dzuricky, F.J. Isaacs, E.M. Brustad, A. Chilkoti, Active Targeting of Cancer Cells by Nanobody Decorated Polypeptide Micelle with Bio-orthogonally Conjugated Drug, Nano Lett 19(1) (2019) 247-254.

[37] S.S. He, C. Le, Q.F. Zhang, J.X. Ding, X.J. Liang, X.S. Chen, H.H. Xiao, X.Y. Chen, D.F. Zhou, Y.B. Huang, Tailoring Platinum(IV) Amphiphiles for Self-Targeting All-in-One Assemblies as Precise Multimodal Theranostic Nanomedicine, Acs Nano 12(7) (2018) 7272-7281.

[38] P. Guo, J. Yang, D. Liu, L. Huang, G. Fell, J. Huang, M.A. Moses, D.T. Auguste, Dual complementary liposomes inhibit triple-negative breast tumor progression and metastasis, Sci Adv 5(3) (2019) eaav5010.

[39] A.K. Kosmides, J.W. Sidhom, A. Fraser, C.A. Bessell, J.P. Schneck, Dual Targeting Nanoparticle Stimulates the Immune System To Inhibit Tumor Growth, Acs Nano 11(6) (2017) 5417-5429.

[40] E. Chambers, S. Mitragotri, Long circulating nanoparticles via adhesion on red blood cells: Mechanism and extended circulation, Exp Biol Med 232(7) (2007) 958-966.

[41] Q. Dai, S. Wilhelm, D. Ding, A.M. Syed, S. Sindhwani, Y.W. Zhang, Y.Y. Chen, P. MacMillan, W.C.W. Chan, Quantifying the Ligand-Coated Nanoparticle Delivery to Cancer Cells in Solid Tumors, Acs Nano 12(8) (2018) 8423-8435.

[42] D. Rosenblum, N. Joshi, W. Tao, J.M. Karp, D. Peer, Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics, Nat Commun 9 (2018).

[43] N. Kamaly, B. Yameen, J. Wu, O.C. Farokhzad, Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release, Chem Rev 116(4) (2016) 2602-2663.

[44] P.S. Steeg, Targeting metastasis, Nat Rev Cancer 16(4) (2016) 201-218.

[45] Y. Gao, J.J. Xie, H.J. Chen, S.E. Gu, R.L. Zhao, J.W. Shao, L. Jia, Nanotechnology-based intelligent drug design for cancer metastasis treatment, Biotechnol Adv 32(4) (2014) 761-777.

[46] H.K. Makadia, S.J. Siegel, Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier, Polymers-Basel 3(3) (2011) 1377-1397.

【０１９４】

材料。ポリ（乳酸・グリコール酸）（PLGA）（65:35）Resomer（登録商標）653、メトトレキサート、カンプトテシン、5-フルオロウラシル、ヘパリンナトリウム、fluroshield（登録商標）、DMEM、ウシ胎仔血清（FBS）、ペニシリン ストレプトマイシン（Pen Strep）は、Sigma Aldrich（MO,USA）から入手した。ドキソルビシン塩酸塩、ドセタキセル、パクリタキセルおよびゲムシタビン塩酸塩は、L. C. Laboratories（MA,USA）から入手した。Nunc（商標）Lab-Tek（商標）II Chamber Slide（商標）System、細胞染色バッファー、ピューロマイシン、リン酸緩衝生理食塩水（1×）、Axygen（商標）1.5mL容自立型スクリューキャップチューブは、Thermo Fischer Scientific（MA,USA）から入手した。ルシフェラーゼ発現B16-F10黒色腫細胞株（B16F10-Luc）はImanis Life Sciences（MN,USA）から入手した。ヒト全血および血清はBioIVT（NY,USA）から入手した。Xenolight-D-ルシフェリンカリウム塩はPerkin Elmer（MA,USA）から入手した。ヘパリンリチウムコートマイクロティナチューブはBD medical technology（NJ,USA）から入手した。CellTiter 96（登録商標）AQueous One Solution Cell Proliferation Assay（MTS）キットはPromega（CA,USA）から入手した。Tissue Tek OCTコンパウンドはSakura Finetek（CA,USA）から入手した。0.9%生理食塩液はTeknova（CA,USA）から入手した。パラホルムアルデヒドはElectron Microscopy sciences（PA,USA）から入手した。他の化学薬品はすべて、試薬等級であり、Sigma Aldrich（MO,USA）から入手した。

【０１９５】

細胞培養。B16F10-Luc細胞を、37℃および5%CO2に維持した加湿インキュベータ内で培養した。この細胞を、10%FBS、1%のPen Strepおよび1μg/mLのピューロマイシンを補給したDMEM培地中で培養した。細胞は3～4回継代した後、使用した。

【０１９６】

インビトロ薬物放出試験。DOX含有ナノ粒子を1 mLの完全培地（DMEM＋10%FBS）中に再懸濁させ、チューブリボルバー上で37℃にてインキュベートした。定時の時点で、粒子を12000 gで15分間、遠心分離し、上清みを解析のために収集した。粒子を1mLの新鮮放出培地中にさらに再懸濁させ、37℃で次の時点までインキュベートした。試料は、インキュベーションの開始後1、2、4、6、12および24時間目に採取した。累積放出を、DOXをフルオロフォアとして使用し（励起/発光 470/590 nm）、プレートリーダー（Tecan Safire 2（登録商標）,NY,USA）にて定量した。

【０１９７】

粒子の内在化および細胞毒性試験。粒子の内在化を、フローサイトメトリーおよび共焦点顕微鏡法を用いて確認した。フローサイトメトリー解析では、2×106のB16F10-Luc細胞を12ウェルプレート内にプレーティングし、一晩接着させた。次いでプレートに吸引を行ない、1 mLの新鮮培地を各ウェルに添加した。30μgのナノ粒子を各ウェルに添加し、インキュベータ内で37℃にて20分間、2時間または6時間インキュベートした。既定の時点の後、ウェル内の培地を完全に吸引し、PBSで3回洗浄し、細胞をプレートから、0.25 トリプシン/EDTA溶液を用いて剥がした。PBSで洗浄した後、この細胞を、フローサイ

トメトリー（BD LSR Analyser II,CA,USA）によりDOXフルオロフォアを用いて解析した。

【０１９８】

共焦点顕微鏡法では、2×105のB16F10-Luc細胞をNunc（商標）Lab-Tek（商標）II Chamber Slide（商標）System（Thermo Fischer Scientific）の個々のチャンバ内にプレーティングし、一晩接着させた。次いでプレートに吸引を行ない、1 mLの新鮮培地を各ウェルに添加した。30μgのナノ粒子を各ウェルに添加し、インキュベータ内で37℃にて20分間、2時間または6時間インキュベートした。既定の時点の後、ウェル内の培地を完全に吸引し、細胞をPBSで3回洗浄した後、4%パラホルムアルデヒドで固定した。固定された細胞を、Fluroshield（登録商標）を用いてマウントしてDAPIで染色し（励起/発光 340/488 nm）、共焦点顕微鏡法（Upright Zeiss LSM 710 NLO ready,Germany）を用いて解析した。

【０１９９】

搭載PLGA粒子、非搭載PLGA粒子および遊離DOXの細胞毒性を、CellTiter 96（登録商標）AQueous One Solution Cell Proliferation Assay（MTS）を製造業者の使用説明書に従って用いてアセスメントした。簡単には、2000個のB16-F10-Luc細胞を96ウェルプレート内に播種し、一晩接着させた。次いで培地を吸引し、異なる濃度の種々の製剤を含有している培地と置き換え、37℃で24時間インキュベートした。20μlのCellTiter 96（登録商標）AQueous One Solution試薬をウェルに添加し、加湿インキュベータ内で37℃にて4時間インキュベートした。490 nmにおける吸光度を、プレートリーダー（Epoch II,Biotek systems,VT,USA）を用いて読み取った。用量応答曲線を各製剤に対して、可変傾斜モデル（4パラメータ-用量応答曲線）により、Graphpad Prism 6を用いてフィットさせ、IC50値を、同じソフトウェアを用いて計算した。

【０２００】

種々の化学療法剤搭載生分解性PLGAナノ粒子の調製。化学療法剤搭載生分解性PLGAナノ粒子はすべて、ナノ沈殿法を軽微な修正を伴って用いて調製した。メトトレキサート、5-フルオロウラシル、5-フルオロウラシル＋メトトレキサート、およびカンプトテシンを搭載したナノ粒子を調製するため、2 mgの薬物（5-フルオロウラシル＋メトトレキサートでは1 mgずつ）を200μLのDMSOに溶解させた。次いで薬物溶液を、1 mLのアセトンに溶解させている20 mgのPLGAと混合した。その後の工程は、DOX搭載PLGAナノ粒子の調製の場合と同じである。ドセタキセルおよびパクリタキセルを搭載したナノ粒子を調製するため、20 mgのPLGAと2 mgの薬物を1 mLのアセトンに溶解させ、有機相を形成した。その後の工程はDOX搭載PLGAナノ粒子の調製のとおりである。ゲムシタビンを搭載したナノ粒子を調製するため、2 mgのゲムシタビン塩酸塩を0.5 mLのメタノールと5μLのトリエチルアミン（TEA）に溶解させ、この薬物溶液を、1 mLのアセトンに溶解させた20 mgのPLGAに添加した。その後の工程は、DOX搭載PLGAナノ粒子の調製の場合と同じである。全ての粒子を12000 gで15分間収集し、脱イオン水を用いて3回洗浄した。ナノ粒子のサイズおよびゼータ電位を、動的光散乱（Malvern Zen3600）を用いて測定した。

【０２０１】

（表２）種々の化学療法剤搭載PLGAナノ粒子の物理化学的特性

	平均直径 (nm)	ゼータ電位 (mV)	PDI
カンプトテシン	231.3 ± 6.5	-27.9 ± 1.3	0.250 ± 0.038
パクリタキセル	222.0 ± 9.7	-30.3 ± 1.4	0.342 ± 0.043
ドセタキセル	182.2 ± 8.1	-26.5 ± 1.2	0.256 ± 0.092
5-フルオロウラシル	167.7 ± 4.7	-29.4 ± 0.5	0.196 ± 0.020
ゲムシタビン	139.5 ± 1.8	-28.0 ± 0.8	0.068 ± 0.044
メトトレキサート	211.1 ± 2.5	-21.8 ± 0.5	0.236 ± 0.016
5-フルオロウラシル+メトトレキサート	197.7 ± 6.2	-25.7 ± 0.3	0.278 ± 0.021

【０２０２】

PLGA a: 50:50、エステル末端、ランダムコポリマー、分子量38000～54000。PLGA b: 50:50、酸末端、ランダムコポリマー、分子量38000～54000。PLGA c: 85:15、エステル末端、ランダムコポリマー、分子量50000～75000。PLGA d: 65:35、酸末端、ランダムコポリマー、分子量24000～38000。

【０２０３】

実施例3: 赤血球固定型全身免疫療法（EASY）:全身性投与によって可能になる肺転移の処置の局所免疫回復

腫瘍微小環境における局所免疫回復は、肺転移などの進行期のステージのがんを有する患者において腫瘍を処置するために体そのものの免疫系を用いるための有望なストラテジーである。本明細書において、肺転移の進行を制御するための、到達困難な転移部位における局所免疫回復を可能にする新たなストラテジー、赤血球固定型全身免疫療法（EASY）を記載する。簡単には、ケモカインを事前に搭載させたナノ粒子であるImmunoBaitを、便乗（hitch a ride）させた赤血球上で集合させ、転移部位の近傍に精密に沈着させる。ImmunoBaitはケモカインを緩徐に放出し、ケモカイン勾配を回復させることによって局所微小環境を調節し、続いて、転移部位へのエフェクター免疫細胞の浸潤の有意な向上もたらす。EASYにより、自然発生乳がん肺転移モデルにおいて肺転移の進行が顕著に抑止され、動物の生存が有意に長くなった。本発明者らの研究結果は、EASYが、肺転移に対処するための、到達困難な肺転移部位での局所免疫調節に効果のあるストラテジーであることを示す。

【０２０４】

所望の転帰を得るための免疫系の微調整である免疫調節は、近代の治療の研究の最前線となっている[1～8]。免疫細胞の表現型を操作することによって体そのものの免疫系を制御することにより、疾患状態の病理学的転帰に劇的な影響を及ぼすことができる[2,4,5,9～12]。その趣旨で、かなりの科学的取り組みが免疫調節の空間的制御に対して、すなわち免疫微小環境の局所改変に対して注力されている[13～16]。従来より、局所免疫調節は、主に免疫調節剤の部位特異的送達の不備および身体の深部組織への限定的な到達可能性のため難題となっている[15]。静脈内投与により組織の大部分への直接到達が助長されはするが、多くの場合、免疫調節効果を空間的に制限することにおいては不合格である。ナノテクノロジーの出現があっても、標的指向性免疫調節は、免疫調節剤が封入されたナノ担体を、多くの場合、捕捉してその効果を局所ではなく全身性にする体内の単核食細胞系のため難題となっている[17,18]。

【０２０５】

がん免疫療法は、腫瘍微小環境を「コールド」型から「ホット」型に変換させる免疫調節ストラテジーの利益を大きく受けている[11,19～23]。アポトーシスによるがん細胞死によってすぐに抗原が放出され、抗原が樹状細胞に提示され、細胞がリンパ節にホーミングし、抗原特異的応答が発現し、エフェクター免疫細胞の部位特異的ホーミングにより、細胞傷害性免疫応答によって最終的にアポトーシス性腫瘍細胞死が引き起こされるというChen and Mellmanに記載のがん免疫サイクルによれば、どの工程でも、より効果のある治療応答を推進するために免疫学的に介入することができる[24]。がん免疫サイクル内のこれらの全ての段階のうち、エフェクター免疫細胞の部位特異的ホーミングは、有効な抗腫瘍応答を得るための有望な標的であるが、依然として大きな課題のままである[11,20,22]。これは、主として、腫瘍微小環境自体に走化性生物学的製剤であるケモカインが内因的に枯渇していること、およびケモカイン勾配を再確立させるため、したがって、エフェクター免疫細胞の成功裡のホーミングを得るために免疫回復を局所的に得ることができるストラテジーの不備のためであり得る[25,26]。

【０２０６】

本明細書において、進行期の肺転移モデルにおいて全身性投与後に局所免疫回復を得ることができる赤血球固定型全身免疫療法（EASY）という新たなアプローチを記載する（図13）。赤血球上にアンカリングされたナノ粒子は、剪断力依存的に肺内で特異的に外れ、通常は到達困難な転移部位内に大量に集積される。エフェクター免疫細胞を誘引できるCXC型のケモカインであるCXCL10をPLGAナノ担体内に封入した（ImmunoBait）。転移結節の近傍へのImmunoBaitの部位特異的送達によって局所ケモカイン勾配が回復し、エフェクター免疫細胞を誘引して細胞傷害性だが局所性の免疫応答をイリシット（illicit）できる。この免疫回復により、乳がんの自然発生肺転移モデルにおいて表面転移結節の数の減少および生存度の改善がもたらされ、効果のある治療応答を推進するための全身性投与によって可能な微小環境の局所調節を得ることができるEASYの能力が強調される。

【０２０７】

最適な肺への標的指向性のためのPLGAナノ粒子の材料特性の改変

PLGAナノ粒子の材料設計によって最適な肺への標的指向性を得るための一組の実験を実施した。PLGAポリマーの最も重要な材料特性のうちの2つである組成（乳酸：グリコール酸の比、L:G比）と表面の化学的性質（酸末端またはエステル末端）[27]を最適化のためのパラメータとして選択した。その趣旨で、4つの異なるPLGAポリマー（表４）を選択してナノ粒子を調製した。種々のPLGAナノ粒子が赤血球上で集合しているが（図19）、高いL:G比および酸末端を有するPLGAナノ粒子（PLGA-d）が、赤血球に対する最も高い結合効率を示した（図14A）。生体適合性アッセイ（図14Bおよび図20A～20C）により、PLGA-dで引き起こされる担体赤血球に対するダメージは、その他の対応物と比べて比較的最小限であることが示された。興味深いことに、インビトロ剪断試験の実験によれば、酸末端型ポリマーはL:G比が高いほど、高剪断応力（6 Pa）ではナノ粒子脱離の割合（%）が高く、低剪断応力では早期の脱離が少なくなった（図14Cおよび図21）。PLGA-dは高剪断応力において、全てのPLGA候補のうちで最も高い脱離を示した。さらに、インビボ生体内分布データ（図22A）により、赤血球上に便乗している種々のPLGAナノ粒子の器官特異的標的指向性はインビトロ剪断データと相関することが示された。具体的には、高い早期の脱離を有するナノ粒子（PLGA-a）は脾臓などの低剪断器官への標的指向性を示したが、高い正味のナノ粒子脱離を示すナノ粒子（PLGA-cおよびPLGA-d）では、肺および腎臓などの高剪断器官内への集積の向上が示された。特に、PLGA-dは、赤血球上で集合しつつ、最良の肺への標的指向能力を示した（図14Dおよび14E）。その高い結合効率、担体赤血球に対する最小限のダメージおよび肺への優れた標的指向性を考慮し、PLGA-d（65:35 L:G比、酸末端）を、さらなる試験のための最有力候補として確立した。

【０２０８】

ナノ粒子と肺内皮間の迅速で効率的な相互作用は、担体赤血球から剪断離脱した後のナノ粒子の長期保持の前提条件である。ICAM-1は肺内皮内に、特に罹病状態の肺内に過剰発現されることが報告されている[28～30]。これに基づき、抗ICAM-1抗体の結合によって

、脱離したナノ粒子と肺内皮間の相互作用が向上し得るかどうかを探索した。2D細胞培養試験において、CLSMイメージングデータ（図14F）により、PLGAナノ粒子に抗ICAM-1抗体を結合することにより、その肺内皮細胞との相互作用の高速化および向上がもたらされることが示された。さらに、経時的生体内分布データ（図22Bおよび図14G～14H）により、抗ICAM-1抗体の非存在下では、赤血球への便乗により、遊離のナノ粒子単独と比べて有意に多くのナノ粒子が肺に送達されるが、ナノ粒子は20分間までしか留まらないことが明らかになった。明確な比較として、ナノ粒子に抗ICAM-1抗体を結合すると、その肺内保持が少なくとも6時間まで有意に長くなった。

【０２０９】

赤血球上へのImmunoBaitの自己集合

1.88μg/mgケモカインの搭載および75％の封入効率を有するケモカイン搭載型PLGAナノ粒子であるImmunoBaitを、ダブルエマルジョン法を用いて調製した。単分散型の球状ImmunoBaitナノ粒子は187.3 nmの平均直径および-24.5 mVのゼータ電位を有した。（図15A～15C）。それぞれインビトロでの便乗条件、血清環境、および局所組織環境を刺激するPBS、FBSおよび完全培地中でのImmunoBaitからのケモカインの放出では、バーストの後、徐放パターンが示され、放出可能なペイロードのほとんどが6時間以内に放出された（図15D）。また、ケモカインは、FBSおよび完全培地中よりPBS中の方がずっと遅く放出され、これは、便乗プロセスの際のケモカインのロスを最小限にするために有益である。ImmunoBaitが赤血球上に効率的に集合し得るかどうかを試験するため、ケモカインを蛍光プローブのAlexa Fluor 647で標識した。図15Eに示すCLSMデータにより、マウス赤血球上へのImmunoBaitナノ粒子の効率的な集合が示された。ImmunoBaitナノ粒子：マウス赤血球の比を増大させることにより、ImmunoBaitナノ粒子担持マウス赤血球の割合（％）は有意に増大した（図23A～23C）。具体的には、ImmunoBait：赤血球の比が1000:1において、マウス赤血球の＞90％がImmunoBaitナノ粒子を担持していた（図15F）。SEMイメージングデータにより、マウス赤血球上へのImmunoBaitナノ粒子の効率的な集合が確認された（図15G）。CXCL10の他に、他のケモカイン（GM-CSF）、サイトカイン（IL-2、IL-12およびIL-15）ならびに免疫チェックポイント阻害剤（抗PD-1抗体）を担持しているImmunoBaitもまた、マウス赤血球に効率的に結合された（図24）。さらに、ImmunoBaitナノ粒子は、結合効率は低いがヒト赤血球上にも集合される（図25A～25B）。

【０２１０】

次に、ImmunoBaitナノ粒子の便乗によって担体赤血球に引き起こされる有害効果があればそれを検出するための一組のアッセイを行なった。ホスファチジルセリンの表面発現は、赤血球が老化状態またはダメージ状態であるという表示であり、そのインビボクリアランスを加速させる[31,32]。図15Hに示されるように、試験した全ての比率のImmunoBaitナノ粒子の便乗で、担体赤血球上に表面ホスファチジルセリンの明白な過剰発現は引き起こされなかった。また、凝集アッセイ[33]（図15I）ならびに浸透圧脆弱性アッセイ[34]（図26および図15J）のデータにより、ImmunoBaitナノ粒子の便乗によってもたらされる担体赤血球の凝集および浸透圧ストレスに対する感受性の変化は有意でないことが明らかになった。このような生体適合性試験により、赤血球上へのImmunoBaitナノ粒子の集合によって引き起こされる担体赤血球に対するダメージは最小限であることが示された。

【０２１１】

EASYを用いた肺転移部位内へのImmunoBaitの標的指向性送達

ImmunoBaitが担体赤血球から、肺に相当する生理学的高剪断応力に応答して脱離し得るかどうかを試験するため、ImmunoBait担持赤血球を3、10または20分間剪断するインビトロ剪断試験をまず実施した。SEMイメージングデータ（図16A）により、赤血球の表面上に存在するナノ粒子の数は、剪断後、顕著に減少することが明らかになった。定量分析によってこの研究結果を確認した（図16B）。ImmunoBaitの脱離は剪断依存性であり、肺に相当する剪断応力（6 Pa）で剪断した場合、ナノ粒子の＞60％が3分以内に放出された。

【０２１２】
　次に、生体内分布試験を早期の乳がんの自然発生肺転移モデルにおいて実施した。図16C～16Eに示されるように、赤血球へのImmunoBaitナノ粒子の便乗により、肝臓内に集積されるナノ粒子の数が減少し、これは、これまでの報告と整合する[33,35]。また、健常マウスモデルと同様、赤血球上で集合すると、その遊離対応物と比べて有意に多くのImmunoBaitが転移を有する肺に送達された。特に、抗ICAM-1抗体の存在下では、赤血球上で集合すると、静脈内投与の20分間後、その遊離対応物と比べて約27倍多くのImmunoBaitが罹病状態の肺内に集積された。さらに、ImmunoBaitは、転移を有する肺内に少なくとも6時間保持された。図16Dに示されるように、肺転移巣へのImmunoBaitの送達の向上により、94という高い、高い血中に対する肺内の比率がもたらされ、ペイロード勾配の確立の根拠となった。末期の肺転移モデルでのさらなる生体内分布試験により、ImmunoBaitが末期肺転移巣でもまた、進行期の病理学的条件下であっても生理学的高剪断応力に応答して沈着し得ることが示された（図16F）。
【０２１３】
　次に、転移を有する肺内におけるImmunoBaitの分布を調べるために肺区域を解析した。図16Gに示されるように、赤血球便乗アプローチにより、相当な量のImmunoBaitを「到達困難な」転移部位に送達することができた。具体的には、ImmunoBaitのほとんどは転移結節周囲に分布していたが、一部は転移結節内にも深く進入していた。
【０２１４】
赤血球固定型全身免疫療法（EASY）によって可能になった免疫回復
　これまでの試験では、黒色腫肺転移の進行とともに、エフェクターT細胞などのエフェクター免疫細胞の転移部位内への浸潤が有意に抑止され、これは主に、ケモカイン（CXCL9とCXCL10）勾配の喪失によるものであると報告されている[36]。CXCL10ケモカイン勾配をモニタリングするための経時的試験を乳がんの自然発生肺転移モデルにおいて実施した（図16H）。図27A～27Bおよび図16Iに示されるように、血中に対する肺内のCXCL10ケモカイン勾配は、肺転移の進行とともに有意に小さくなり、肺転移巣における免疫抑止の発現が示された。EASYによって送達されたImmunoBaitによって免疫回復がもたらされ得るかどうかを試験するため、ケモカイン勾配アッセイを行なった（図16J）。具体的には、ケモカイン製剤の静脈内投与20分後または6時間後、マウスを致死させ、肺内および血中のCXCL10ケモカイン濃度をアッセイした。図16K～16Mに示されるように、EASYによって送達されたImmunoBaitによってのみ、長期持続性のケモカイン勾配の回復がもたらされた。抗ICAM-1抗体を有する遊離ImmunoBaitでは、充分なケモカインを肺に送達することができず、大きなケモカイン勾配を確立することができなかった。5倍高い用量の遊離ケモカインを送達するという挑戦的比較対照を使用した。5×遊離ケモカイン製剤では、高含有量のケモカインが、高いバイオアベイラビリティのおかげで血液および肺の両方に送達され、投与後20分で小さいケモカイン勾配が生じた。しかしながら、この勾配は維持され得なかった。明確な比較として、EASYによって送達されたImmunoBaitでは、高濃度のCXCL10ケモカインを肺に送達することができ、大きなケモカイン勾配が少なくとも6時間維持され得た。
【０２１５】
赤血球固定型全身免疫療法（EASY）のインビボでの処置有効性
　肺転移部位での免疫回復により、局所微小環境が、細胞傷害性免疫応答に有利である「ホット」状態に調節され得、肺転移の進行が制御される潜在的可能性を有し得る[36～38]。この仮説を試験するため、肺転移の制御に対するEASYの有効性を乳がんの自然発生肺転移モデルにおいて評価した。図17Aに示されるように、マウスは、10日間で合計4回の用量の治療薬の投与を受け、最初の用量は原発腫瘍の切除の7日後に投与した。生物発光イメージングデータ（図17B）によって示されるように、EH-ImmunoBait群では、他の群と比べて顕著に遅い肺転移の進行が示された。最後の用量の2日後、マウスを致死させ、摘出肺上の表面結節を計数した。図17Cに示されるように、EH-ImmunoBaitによってのみ、対照群と比べて有意に少ない肺転移量がもたらされた。具体的には、EH-ImmunoBait

では、肺転移の進行の抑止において、それぞれ5×遊離ケモカイン群および遊離ImmunoBait群と比べて3.5倍および6.0倍良好な有効性が示された。EH-ImmunoBaitによって得られた全肺転移抑止率は87.4％という高いものであった（図17D）。さらに、EH-ImmunoBait群の8匹のうち2匹のマウスが37日目に有していた視認可能な肺結節は2個未満であった。摘出肺の定性的画像により、他の処置薬と比べてEH-ImmunoBaitの高い有効性が確認された（図17Eおよび図28）。さらに、EH-ImmunoBaitによって処置されたマウスの肺重量は対照群および他の処置群より顕著に小さく、健常マウスに近い（図17F）。全処置期間において、有意な体重減少はいずれの処置群でも観察されず、明白な毒性がこれらの処置薬と関連していることは示されなかった（図17G）。マウスの器官のH＆E染色データにより、これらの処置薬の安全性が確認された（図29）。次に、EASYアプローチによって乳がんの自然発生肺転移を有するマウスの生存期間が長くなり得るかどうかを評価するために、生存度の試験を実施した。マウスは、図17Aに示したものと同じスケジュールに従って治療薬の投与を受けた。EH-ImmunoBaitによる処置では、動物の生存度が対照群および他の処置群と比べて有意に改善され、生存期間の中央値がほぼ3倍長くなった（図17H）。また、6匹のうち1匹のマウスは少なくとも65日間生存した。次に、末期の乳がんの自然発生肺転移モデルでの末期の肺転移の処置におけるEASYの有効性を試験した（図30A）。図30B～30Cに示されるように、EH-ImmunoBaitにより、遊離のImmunoBait単独と比べて有意に低減された肺転移量がもたらされ、EASYは末期転移モデルにおいても有効性を示すことが示された。

【０２１６】

肺転移の進行を抑止するためのEASYによって可能となった免疫回復の機構

EASYによって送達されたImmunoBaitの観察された抗転移有効性の基礎となる細胞機構を理解するため、種々の処置後の肺転移巣内の免疫細胞をプロファイリングするための試験を実施した（図18A）。CXCL10は、すべて抗腫瘍応答に有利であるTh1 CD4、エフェクターCD8およびNK細胞などの、CXCR3受容体を発現している特定の類型の免疫細胞に対する強力な化学誘引物質である。[25,39～41]。図31Aに示されるように、EH-ImmunoBaitにより、対照（生理食塩水）と比べて全CD4細胞の1.5倍の増加がもたらされた。さらに、生理食塩水群と比べて有意に多く（2.0倍の増加）のIFN-γ＋Th1 CD4細胞が、EH-ImmunoBaitによって処置されたマウス肺転移巣において観察された（図18B）。Th1 CD4細胞は、IFN-γおよびTNF-αなどの1型サイトカインを分泌し、腫瘍の免疫学的制御に有利な炎症促進性環境を維持する[1,42]。肺転移巣内の全CD8 T細胞は、種々の処置群間で有意に異ならなかった（図31B）。しかしながら、EH-ImmunoBaitでは、その他の群と比べて肺転移巣内へのエフェクターCD8 T細胞の浸潤の有意な向上が誘導された（図18D～18G）。具体的には、対照および他の処置と比べてIFN-γ＋CD8細胞の1.7～2.0倍の増加およびグランザイムB＋CD8細胞の1.7～2.3倍の増加がEH-ImmunoBaitによって得られた。また、適応免疫細胞の他に、EASYによって送達されたImmunoBaitによって、自然免疫細胞、特に、NK細胞および樹状細胞の肺転移巣内への浸潤が有意に変化することも観察された（図18H～18Jおよび図31C）。図18H～18Iに示されるように、EH-ImmunoBaitの投与後、肺転移巣へのNK細胞の浸潤の有意な改善が観察された。EH-ImmunoBait群におけるNK細胞の総数は対照群および他の処置群より1.4～1.8倍多かった。注目すべきことに、EH-ImmunoBait群では、他の群と比べて顕著に多い量のCD11c＋樹状細胞も観察された（図31C）。さらに、EH-ImmunoBait群における浸潤CD11c＋樹状細胞は、対照群および他の処置群と比べて有意により活性化された状態（CD86＋）であった（図31Dおよび図18K）。この研究結果は、CXCL10が樹状細胞に対する強力な化学誘引物質でないため予想外である。本明細書において、Th1、エフェクターCD8およびNK細胞の浸潤によって引き起こされる腫瘍細胞死によってより多くの腫瘍関連抗原が生成し、樹状細胞の浸潤およびその後のその活性化がもたらされることが想定される[43,44]。上記の免疫細胞プロファイリングデータにより、EASYによって可能となった免疫回復により肺転移巣内へのエフェクター免疫細胞の浸潤が有意に向上することが明白に示された。さらに、エフェクター免疫細胞の浸潤の改善により、肺転移巣内のサイトカインプロフィールが有

意に調節された。EH-ImmunoBait群における炎症性サイトカインレベルは概ね対照群および他の処置群より高かった（図32）。特に、EH-ImmunoBait群におけるIFN-γおよびTNF-αの濃度は対照群または他の処置群より有意に高い（図18L～18M）。また、抗炎症性サイトカインIL-10のレベルはEH-ImmunoBait群においてその他の群より低かった（図18N）。より興味深いことに、EH-ImmunoBait群におけるCXCL10ケモカインの濃度もまた、他の群より顕著に高く（図18O）、成功裡の免疫回復がさらに確認された。

【０２１７】

考察

要約すると、「到達困難な」肺転移部位における局所免疫回復を可能にする肺転移の管理のための赤血球媒介性全身投与アプローチである赤血球固定型全身免疫療法（EASY）が本明細書に記載されている。EASYは、赤血球の表面上にアンカリングされたImmunoBait（ケモカイン搭載ナノ粒子）からなる。全身性の静脈内投与後、ImmunoBaitは、肺転移巣内の生理学的高剪断応力に応答して速やかに担体赤血球から外れ、精密に転移部位に沈着する。改変されたImmunoBaitは肺転移巣内に保持された状態になり、ペイロードケモカインを放出し続け、これにより、喪失したケモカイン勾配の再確立が可能となり、したがって転移部位の免疫学的微小環境が局所的に回復する。回復した局所免疫微小環境によってエフェクター免疫細胞、例えばTh1 CD4、エフェクターCD8、NKおよび活性化された樹状細胞の転移部位内への浸潤の有意な改善がもたらされることがさらに実証されている。有望なことに、EASYにより、乳がんの自然発生肺転移モデルにおいて肺転移の進行を有意に抑止することができ、動物の生存度を顕著に改善することができた。EASYは、到達困難な肺転移部位における局所免疫回復を可能にでき、かつ一連の免疫調節剤を部位特異的送達することによって局所肺内微小環境を調節するための効果のあるストラテジーであり得る、まさしく最初の全身性投与アプローチのうちの1つである。

【０２１８】

方法

細胞株および動物

ルシフェラーゼ発現4T1乳癌細胞株（4T1-Luc）は、Imanis Life Sciences（MN,USA）から入手した。4T1-Luc細胞は、37℃および5％CO_2に維持した加湿インキュベータ内で培養した。この細胞を、10％FBS、1％Pen-Strepおよび0.1 mg/mLのG418を補給したRPMI-1640培地中で培養した。ヒト肺微小血管内皮細胞（HLMVEC）およびHLMVEC増殖培地はSigma Aldrich（MO,USA）で購入した。HLMVECはHLMVEC増殖培地中で製造業者の使用説明書に従って培養した。細胞は2～3回継代した後、使用した。雌Balb/cマウス（7～8週齢）はCharles River Laboratories（MA,USA）から購入した。実験はすべて、ケンブリッジにあるハーバード大学の文理学部（FAS）の動物実験委員会（IACUC）により承認済のプロトコルに従って行なった。

【０２１９】

ImmunoBaitの調製および特性評価

CXCL10が封入されたPLGAナノ粒子であるImmunoBaitを、ダブルエマルジョン法を用いて調製した。簡単には、50μgのCXCL10を200μLの0.1％ウシ血清アルブミン含有PBSに溶解させた。これを20 mgのPLGAを含有している1 mLのジクロロメタンに添加した。混合物を短時間、超音波処理し、次いで、11 mLの1.5％ポリビニルアルコール（PVA）溶液に定常撹拌下で滴下した。混合物全体を40秒間、プローブ式で超音波処理した。形成された粒子を定常撹拌下で一晩維持し、有機溶媒を除去した。粒子を12,000 gで10分間、遠心分離し、上清みを、薬物搭載の定量のために解析した。次いで粒子を脱イオン水中に再懸濁させ、そのサイズ、ゼータ電位および多分散指数について、動的光散乱（Malvern Zen3600,PA,USA）、走査型電子顕微鏡法（Zeiss FESEM Supra 55VP,Zeiss FESEM Ultra 55,Germany）および透過型電子顕微鏡法（JEOL 2100,MA,USA）を用いてアセスメントした。ナノ粒子を、合計2回の洗浄で脱イオン水を用いて洗浄した後、最後にこれをPBS中に懸濁させた。定量および生体内分布試験のため、蛍光オボアルブミン/CXCL10をPLGA内に、上記の方法を用いて封入した。

【０２２０】
インビトロ薬物放出試験
　CXCL10含有ナノ粒子（ImmunoBait）を1 mLのPBS、FBSおよび完全培地（DMEM＋10％FBS）中に再懸濁させ、チューブリボルバー上で37℃にてインキュベートした。定時の時点で、粒子を12,000 gで10分間、遠心分離し、上清みを解析のために収集した。粒子を1mLの新鮮放出培地中にさらに再懸濁させ、37℃で次の時点までインキュベートした。試料は、インキュベーションの開始後1、2、4、6および12時間目に採取した。各放出培地中における累積放出を、ELISAを用いて定量した。
【０２２１】
血液の収集および処理
　マウス全血を心臓穿刺により、ヘパリンプレコートシリンジを用いて収集し、使用前はBD Microtainer（登録商標）血液収集チューブ内に4℃で保存した。全血を1,000 gで10分間、4℃にて遠心分離し、血清およびバフィーコート層を赤血球区画から除去した。単離された赤血球を、冷却した1×PBSで3回さらに洗浄し、650 gで15分間、4℃にて遠心分離した後、最後にこれを10％ヘマトクリットの濃度で1×PBS中に懸濁させた。この溶液を、この試験での赤血球ストック溶液とみなす。
【０２２２】
赤血球へのImmunoBaitの集合
　等体積の赤血球ストック溶液とImmunoBaitナノ粒子懸濁液をAxygen（商標）1.5 mL容自立型スクリューキャップチューブ内で混合し、上下逆さにすること、およびピペッティングによってさらに充分に混合した。次いでチューブをチューブリボルバー（Thermo Fisher Scientific）上で40分間回転させた。便乗された赤血球を次いで、4℃にて100 gで5分間の遠心分離によってペレット化し、未吸収粒子を注意深く除去し、ペレットを1mLの1×PBSで再度洗浄し、結合が緩い粒子を除去した。抗ICAM-1抗体の結合のため、ImmunoBaitナノ粒子または便乗された赤血球のペレットを0.5 mg/mLの抗ICAM-1抗体溶液中にさらに20分間、再懸濁させた。便乗された赤血球を最後に10％v/vで1×PBS中に再懸濁させてさらなる特性評価に使用するか、または20％v/vで1×PBS中に再懸濁させてインビボ試験に使用した。
【０２２３】
自然発生肺転移モデルの確立
　乳がんの自然発生肺転移モデルを確立するため、1×10^6個の4T1-Luc細胞を雌Balb/cマウスの左の乳腺脂肪体内に同所的に注入した。移植の19日後（早期モデル）または32日後（末期モデル）のいずれかで、原発腫瘍を外科的に切除した。原発腫瘍切除の6日後、マウスに150μLの30 mg/mLのXenolight-D-ルシフェリン含有生理食塩水を腹腔内注射した。注射の15分後、マウスに、インビボイメージング（IVIS Spectrum）を用いてイメージングを行なった。マウスを、原発腫瘍切除後6日目の肺における原発腫瘍体積および生物発光強度に基づいて異なる群に無作為化した。
【０２２４】
疾患モデルでのインビボ生体内分布試験
　早期または末期の乳がん肺転移モデルを上記のようにして確立した。原発腫瘍切除の7日後、マウスに、ImmunoBait、便乗ImmunoBait、抗ICAM-1結合型ImmunoBaitおよび抗ICAM-1が結合している便乗ImmunoBait（全ての群でn＝3）を尾静脈内に静脈内注射した。ImmunoBaitナノ粒子を、アルブミン担体タンパク質にコンジュゲートさせたAlexa Fluor 647によって蛍光標識した。注射の20分後および6時間後にマウスを致死させ（n＝3/時点/群）、器官（肝臓、肺、脾臓、腎臓、心臓、脳および血液）を、さらなる処理のために採取した。処理では、1 mLの冷却したRIPA溶解バッファー（1×）を各器官に添加し、器官を、ハイシェアホモジナイザー（IKA T-10 Basic（登録商標）Ultra turrax,Germany）を用いてホモジナイズし、ナノ粒子含有量を蛍光により、プレートリーダー（Tecan Safire 2（登録商標）,Switzerland）にて定量した。
【０２２５】

インビボでの乳がんの自然発生肺転移モデルにおける有効性試験

早期の乳がんの自然発生肺転移モデルでは、処置を、原発腫瘍切除の1週間後に開始して行なった。10日間で4回の注射を、すなわち26、29、32および35日目に行なった。代表マウスにイメージングを25、28、31、34および37日目に、インビボイメージング（IVIS Spectrum（商標））を用いて行なった。簡単には、マウスに150μLの30 mg/mLのXenolight（商標）-D-ルシフェリン含有生理食塩水を腹腔内注射した。注射の15分後、マウスに、インビボイメージングを用いてイメージングを行なった。37日目、マウスを安楽死させ、インドインク溶液を気管内注射し、肺を摘出し、Feket液を用いて固定した。固定された肺を、表面結節の計数に使用した。早期モデルにおける生存度を、注射スケジュールを上記のようにすることによって評価した（n＝6）。末期の肺転移モデルでは、4回の用量の処置を2日毎に行ない、最初の用量は原発腫瘍切除の7日後（39日目）に投与した。最後の用量の2日後（50日目）、マウスを安楽死させ、摘出肺上の結節を計数した。

【０２２６】

ケモカイン勾配アッセイ

血中および肺内のCXCL10濃度の経時的変化を早期の肺転移モデルにおいて測定した。腫瘍移植の19日後、腫瘍を外科的に切除した。腫瘍切除の4、10および22日後、マウスを安楽死させ、血液を心臓穿刺によって収集し、肺を摘出した（全ての時点でn＝5）。処理では、プロテアーゼ阻害剤を含有している0.5 mLの冷却した組織抽出バッファーを各肺に添加し、肺を、ハイシェアホモジナイザー（IKA T-10 Basic（登録商標）Ultra turrax,Germany）を用いてホモジナイズした。肺内および血中のCXCL10含有量を、ELISAを用いて定量した。

【０２２７】

早期の肺転移モデルにおいて以下のとおりにケモカイン勾配アッセイを実施した。この治療薬のケモカイン勾配回復能を評価するため、早期自然発生肺転移モデルを、本文中に先に記載のようにして確立した。1つの生理食塩水処置群および3つの処置群（5×遊離CXCL10ケモカイン、抗ICAM-1を有するImmunoBait、および抗ICAM-1を有するImmunoBaitに便乗された赤血球）をこの試験に含めた。処置を、外科処置の1週間後に開始して行なった。2回セットの注射を外科処置後7日目と10日目に行なった。（各群の各時点でn＝4～5）。2回目の注射の20分後および6時間後にマウスを致死させ、血液を心臓穿刺によって収集し、肺を摘出した。肺内および血中のケモカイン含有量を上記のようにして定量した。

【０２２８】

免疫細胞およびサイトカインのプロファイリング

種々の抗体カクテルパネルを、CD45（Biolegend、カタログ番号:103116、クローン:30-F11）、CD3（Biolegend、カタログ番号:100218、クローン:17A2）、CD4（Biolegend、カタログ番号:100421、クローン:GK1.5）、CD8a（Biolegend、カタログ番号:100711、クローン:53-6.7）、NKp46（Biolegend、カタログ番号:137606、クローン:29A1.4）、CD11c（Biolegend、カタログ番号:117307、クローン:N418）、グランザイムB（Biolegend、カタログ番号:372208、クローン:QA16A02）、IFN-γ（Biolegend、カタログ番号:505849、クローン:XMG1.2）、IFN-γ（Biolegend、カタログ番号:505806、クローン:XMG1.2）、CD86（Biolegend、カタログ番号:105011、クローン:GL-1）およびAm Cyan Live/dead細胞染色キット（Thermo Fischer Scientific,MA,USA）から作成した。抗体はすべて、使用前に至適希釈率で希釈した。

【０２２９】

免疫細胞プロファイリングでは、早期自然発生肺転移を上記のようにして確立した。1つの生理食塩水処置群および3つの処置群（5×遊離CXCL10ケモカイン、抗ICAM-1を有するImmunoBait、および抗ICAM-1を有するImmunoBaitに便乗された赤血球）をこの試験に含めた。処置を、外科処置の1週間後に開始して行なった。3回セットの注射を原発腫瘍切除後7、10および13日目に行なった。最後の注射の1日後、マウスを安楽死させ、

肺を摘出した。肺細胞の単細胞懸濁液を、肺解離キット（Miltenyi Biotec,Germany）を製造業者の使用説明書に従って用いて形成した。細胞を上記の抗体で染色し、フローサイトメトリー（BD LSR Analyser II（商標）.,NJ USA）によって解析した。

【０２３０】

サイトカインプロファイリングでは、モデルの確立および処置は上記のものと同じにした。最後の注射の1日後、マウスを安楽死させ、肺を摘出した。処理では、プロテアーゼ阻害剤を含有している0.5 mLの冷却した組織抽出バッファーを各肺に添加し、肺を、ハイシェアホモジナイザー（IKA T-10 Basic（登録商標）Ultra turrax,Germany）を用いてホモジナイズした。サイトカインプロファイリングを、LEGENDplex（商標）Mouse Inflammation Panel（Biolegend,CA,USA）を製造業者の使用説明書に従って用いて行ない、フローサイトメトリー（BD LSR Analyser II.,NJ USA）を用いて解析した。CXCL10濃度をELISAによって定量した。

【０２３１】

統計解析

実験はすべて、少なくとも3回繰り返した。統計解析はすべて、Graphpad prism（商標）8ソフトウェアを用いて行なった。データはすべて、平均±SEMとして示す。スチューデントのt検定、テューキーのHSD解析を伴う一元配置ANOVA、またはマンホイットニー検定を用いて有意性を判定した。カプラン・マイヤー生存曲線の解析では、ログランク・トレンド検定（Log-rank test for trend）を使用した。p値は、種々の有意性レベルを表す、p＜0.05＊、p＜0.01＊＊、p＜0.001＊＊＊、p＜0.0001＊＊＊＊。フローサイトメトリー解析はすべて、FlowJo（商標）10ソフトウェアを用いて行なった。

【０２３２】

方法の補足

材料

化学薬品および試薬はすべて、Sigma Aldrich（MO,USA）から入手し、特に記載のない限り、さらに精製せずに使用した。CXCL10/IP-10、IL-10、IL-15、GM-CSFはPeproTech（NJ,USA）から入手した。Nunc（商標）Lab-Tek（商標）II Chamber Slide（商標）System、細胞染色バッファー、G418（ジェネティシン）、マウスIP-10 ELISAキット、Alexa Fluor 647オボアルブミン、Alexa Fluor 750 NHS試薬、Alexa Fluor 647 NHS試薬、リン酸緩衝生理食塩水（1×）、Axygen（商標）1.5mL容自立型スクリューキャップチューブは、Thermo Fischer Scientific（MA,USA）から入手した。ヒト全血および血清はBioIVT（NJ,USA）から入手した。Xenolight-D-ルシフェリンカリウム塩はPerkin Elmer（MA,USA）から入手した。ヘパリンリチウムコートマイクロティナチューブはBD medical technology（MA,USA）から入手した。LEGENDplex（商標）Mouse Inflammation PanelとFilter Plateおよび抗ICAM-1抗体（カタログ番号:116102、クローン:YN 1/1.7.2）はBioLegend（CA,USA）から入手した。組織解離チューブおよび肺解離キットはMiltenyi Biotec（Germany）から入手した。Tissue Tek OCTコンパウンドはSakura Finetek（CA,USA）から入手した。0.9%生理食塩液はTeknova（CA,USA）から入手した。パラホルムアルデヒドはElectron Microscopy sciences（PA,USA）から入手した。外科用機器はBraintree Scientific,Inc.（MA,USA）から入手した。

【０２３３】

ナノ粒子の内在化試験

ナノ粒子の内在化を、フローサイトメトリーおよび共焦点顕微鏡法を用いて確認した。フローサイトメトリー解析では、2×10^{6}個のHLMVEC細胞を12ウェルプレート内にプレーティングし、一晩接着させた。次いでプレートに吸引を行ない、1 mlの新鮮培地を各ウェルに添加した。30μgのAlexa Fluor 647標識ナノ粒子を各ウェルに添加し、インキュベータ内で37℃にて20分間または6時間インキュベートした。既定の時点の後、ウェル内の培地を完全に吸引し、PBSで3回洗浄し、細胞を、セルスクラッパーを用いて軽くスクラップした。この細胞を共焦点顕微鏡（Upright Zeiss LSM 710 NLO ready）によって

解析した。

【０２３４】

便乗された赤血球の特性評価および生体適合性

便乗効率および赤血球上に搭載されたナノ粒子を、蛍光測定を用いて測定した。蛍光を用いた定量では、25μLの赤血球を、脱イオン水を用いて溶解させ、ナノ粒子含有量を、蛍光を用いてプレートリーダー（Tecan Safire 2（登録商標）,Switzerland）にて定量した。赤血球へのナノ粒子の結合を、走査型電子顕微鏡法（Zeiss FESEM Supra 55VP, Zeiss FESEM Ultra 55,Germany）を用いて確認した。簡単には、便乗された赤血球を、2.5%グルタルアルデヒド溶液を用いて固定し、漸増勾配エタノール中で洗浄した後、ヘキサメチルジシラザン（HMDS）を用いて化学的に乾燥させた。最後に、試料をスパッタコートした（EMT 150T ES金属スパッターコーター,PA USA）後、イメージングした。

【０２３５】

生体適合性試験では、浸透圧脆弱性および凝集のアッセイを先に記載のとおりに行なった[1]。

【０２３６】

インビトロ剪断試験

ナノ粒子をAlexa Fluor 647-OVAによって標識し、剪断試験に使用した。低剪断試験では、便乗されたマウス赤血球を1 mLのFBS中で、12 rpmのチューブリボルバー上で37℃にてインキュベートした。20分間のインキュベーション後、細胞を250 gで5分間の遠心分離によってペレット化し、1×PBS中に10%v/vまで再懸濁させた。次いで25μLの赤血球を、脱イオン水を用いて溶解させ、残存薬物含有量を、蛍光を用いてプレートリーダー（Tecan Safire 2（登録商標）,Switzerland）にて定量した。

【０２３７】

高剪断試験では、便乗されたマウス赤血球を10 mLのFBS中でインキュベートした。回転剪断（6 Pa）を血清中の赤血球に、シリンディリカル（cylindirical）クエット型粘度計（1mmのギャップ、AR-G2レオメーター、TA instruments）を用いて20分間印加した。剪断の印加中は、ウォータージャケットを用いて試料を37℃に維持した。このような条件は高剪断の生理学的環境を模倣している。20分後、細胞を250 gで10分間の遠心分離によってペレット化し、1×PBS中に10%v/vまで再懸濁させた。次いで25μLの赤血球を、脱イオン水を用いて溶解させ、残存ナノ粒子含有量を、蛍光を用いてプレートリーダー（Tecan Safire 2（登録商標）,Switzerland）にて定量し、走査型電子顕微鏡法（Zeiss FESEM Supra 55VP,Zeiss FESEM Ultra 55,Germany）を用いて確認した。

【０２３８】

肺内におけるナノ粒子の分布

罹病状態の肺内におけるナノ粒子の分布では、1×10^6個の4T1-Luc細胞を雌Balb/cマウスの左の乳腺脂肪体内に同所的に注入した。移植の19日後、腫瘍を外科的に切除した。腫瘍切除の28日後、マウスに、抗ICAM-1を有するAlexa Fluor 647標識ナノ粒子および抗ICAM-1を有する蛍光ナノ粒子に便乗された赤血球を注射した。注射の20分後、マウスを安楽死させ、そのままの肺を収集した。肺を、冷却した1×PBSで2回洗浄した後、4%パラホルムアルデヒド溶液中に一晩、固定した。固定された肺を次いで、Tissue Tek OCTコンパウンド（Sakura Finetek,CA,USA）中で凍結させ、クリオスタット（Leica CM 1950,Germany）を用いて切片化した。切片化した組織を、Fluroshield（登録商標）を用いてマウントしてDAPIで染色し（励起/発光　340/488 nm）、共焦点顕微鏡（Upright Zeiss LSM 710 NLO ready,Germany）を用いて解析した。

【０２３９】

健常マウスでのインビボ生体内分布試験

種々のPLGAを用いた生体内分布試験では、健常雌Balb/cマウスを使用した。Alexa Fluor 750-OVA封入NPおよび便乗NP（全ての群でn＝3）を尾静脈内に静脈内注射した。注射の20分後にマウスを致死させ、器官（肝臓、肺、脾臓、腎臓、心臓、脳および血液）を、さらなる処理のために採取した。包括的生体内分布では、Alexa Fluor 750-OVA封

入NP、便乗NP、Alexa Fluor 750-OVAが封入され、抗ICAM-1を有するNPおよび抗ICAM-1を有する便乗NP（遊離NPはn＝3および便乗NPはn＝6）を尾静脈内に静脈内注射した。注射の20分後、2時間後、6時間後および24時間後にマウスを致死させ、器官（肝臓、肺、脾臓、腎臓、心臓、脳および血液）を、さらなる処理のために採取した。処理では、1 mLの冷却したRIPA溶解バッファー（1×）を各器官に添加し、器官を、ハイシェアホモジナイザー（IKA T-10 Basic（登録商標）Ultra turrax,Germany）を用いてホモジナイズし、ナノ粒子含有量を、蛍光測定によりプレートリーダー（Tecan Safire 2（登録商標）,Switzerland）にて定量した。

【０２４０】

乳がんの自然発生肺転移モデルでの末期における有効性

末期における有効性では、自然発生肺転移モデルを、雌Balb/Cマウスの左の乳腺脂肪体内への1×10^6個の4T1-Lucの同所性注入によって確立した。移植の32日後、腫瘍を外科的に切除した。処置を、外科処置の1週間後に開始して行なった。4回の注射を2日毎に行なった。最後の注射の2日後（50日目）、マウスを安楽死させ、インドインク溶液を気管内注射し、肺を摘出し、先に記載のようなFeket液を用いて固定した[2]。固定された肺を、表面結節の計数に使用した。

【０２４１】

（表４）4つのPLGA候補の特性。

	PLGA-a	PLGA-b	PLGA-c	PLGA-d
L: G 比*	50:50	50:50	85:15	65:35
末端基	エステル末端	酸末端	エステル末端	酸末端

＊ポリマー中のグリコール酸に対する乳酸のモル比

【０２４２】

参考文献

1. Grivennikov, S.I., Greten, F.R. & Karin, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* **140**, 883-899 (2010).
2. Ha, D. et al. Differential control of human Treg and effector T cells in tumor immunity by Fc-engineered anti-CTLA-4 antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 609-618 (2019).
3. Hubbell, J.A., Thomas, S.N. & Swartz, M.A. Materials engineering for immunomodulation. *Nature* **462**, 449-460 (2009).
4. Wing, J.B., Tanaka, A. & Sakaguchi, S. Human FOXP3(+) Regulatory T Cell Heterogeneity and Function in Autoimmunity and Cancer. *Immunity* **50**, 302-316 (2019).
5. Tanoue, T. et al. A defined commensal consortium elicits CD8 T cells and anti-cancer immunity. *Nature* **565**, 600-605 (2019).
6. Singhal, S. et al. Human tumor-associated monocytes/macrophages and their regulation of T cell responses in early-stage lung cancer. *Sci Transl Med* **11** (2019).

7. O'Brien, K.L. & Finlay, D.K. Immunometabolism and natural killer cell responses. *Nat Rev Immunol* **19**, 282-290 (2019).
8. Li, Q. & Verma, I.M. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* **2**, 725-734 (2002).
9. Zou, W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* **6**, 295-307 (2006).
10. Libby, P. & Lichtman, A.I. Modulating Adaptive Immunity in Vascular Disease: CD4 to the Fore. *J Am Coll Cardiol* **73**, 1824-1826 (2019).
11. Restifo, N.P., Dudley, M.E. & Rosenberg, S.A. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat Rev Immunol* **12**, 269-281 (2012).
12. Carbo, A. et al. Systems modeling of molecular mechanisms controlling cytokine-driven CD4+ T cell differentiation and phenotype plasticity. *PLoS Comput Biol* **9**, e1003027 (2013).
13. Salabarria, A.C. et al. Local VEGF-A blockade modulates the microenvironment of the corneal graft bed. *Am J Transplant* (2019).
14. Tan, R.P. et al. Bioactive Materials Facilitating Targeted Local Modulation of Inflammation. *JACC Basic Transl Sci* **4**, 56-71 (2019).
15. Dellacherie, M.O., Seo, B.R. & Mooney, D.J. Macroscale biomaterials strategies for local immunomodulation. *Nature Reviews Materials* (2019).
16. Zhao, Z.M., Ukidve, A., Dasgupta, A. & Mitragotri, S. Transdermal immunomodulation: Principles, advances and perspectives. *Adv Drug Deliver Rev* **127**, 3-19 (2018).
17. Zhao, Z., Ukidve, A., Krishnan, V. & Mitragotri, S. Effect of physicochemical and surface properties on in vivo fate of drug nanocarriers. *Adv Drug Deliv Rev* (2019).
18. Blanco, E., Shen, H. & Ferrari, M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat Biotechnol* **33**, 941-951 (2015).
19. Pardoll, D.M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* **12**, 252-264 (2012).
20. Rosenberg, S.A. Decade in review-cancer immunotherapy: entering the mainstream of cancer treatment. *Nat Rev Clin Oncol* **11**, 630-632 (2014).
21. Qian, Y. et al. Molecular-Targeted Immunotherapeutic Strategy for Melanoma via Dual-Targeting Nanoparticles Delivering Small Interfering RNA to Tumor-Associated Macrophages. *Acs Nano* **11**, 9536-9549 (2017).
22. Riley, R.S., June, C.H., Langer, R. & Mitchell, M.J. Delivery technologies for cancer immunotherapy. *Nat Rev Drug Discov* **18**, 175-196 (2019).
23. Yang, W. et al. In Situ Dendritic Cell Vaccine for Effective Cancer Immunotherapy. *Acs Nano* **13**, 3083-3094 (2019).

24. Chen, D.S. & Mellman, I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* **39**, 1-10 (2013).
25. Nagarsheth, N., Wicha, M.S. & Zou, W.P. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* **17**, 559-572 (2017).
26. Homey, B., Muller, A. & Zlotnik, A. Chemokines: agents for the immunotherapy of cancer? *Nat Rev Immunol* **2**, 175-184 (2002).
27. Makadia, H.K. & Siegel, S.J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers-Basel* **3**, 1377-1397 (2011).
28. Muro, S. et al. Control of endothelial targeting and intracellular delivery of therapeutic enzymes by modulating the size and shape of ICAM-1-targeted carriers. *Mol Ther* **16**, 1450-1458 (2008).
29. Scherpereel, A. et al. Cell-selective intracellular delivery of a foreign enzyme to endothelium in vivo using vascular immunotargeting. *Faseb J* **15**, 416-426 (2001).
30. Guo, P. et al. ICAM-1 as a molecular target for triple negative breast cancer. *P Natl Acad Sci USA* **111**, 14710-14715 (2014).
31. Lee, S.J., Park, S.Y., Jung, M.Y., Bae, S.M. & Kim, I.S. Mechanism for phosphatidylserine-dependent erythrophagocytosis in mouse liver. *Blood* **117**, 5215-5223 (2011).
32. Oldenborg, P.A. et al. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science* **288**, 2051-+ (2000).
33. Brenner, J.S. et al. Red blood cell-hitchhiking boosts delivery of nanocarriers to chosen organs by orders of magnitude. *Nat Commun* **9** (2018).
34. Pan, D.C. et al. Nanoparticle Properties Modulate Their Attachment and Effect on Carrier Red Blood Cells. *Sci Rep-Uk* **8** (2018).
35. Anselmo, A.C. et al. Delivering Nanoparticles to Lungs while Avoiding Liver and Spleen through Adsorption on Red Blood Cells. *Acs Nano* **7**, 11129-11137 (2013).
36. Clancy-Thompson, E. et al. Melanoma Induces, and Adenosine Suppresses, CXCR3-Cognate Chemokine Production and T-cell Infiltration of Lungs Bearing Metastatic-like Disease. *Cancer Immunol Res* **3**, 956-967 (2015).
37. Binnewies, M. et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med* **24**, 541-550 (2018).
38. Wang, H. & Mooney, D.J. Biomaterial-assisted targeted modulation of immune cells in cancer treatment. *Nat Mater* **17**, 761-772 (2018).
39. Tokunaga, R. et al. CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation - A target for novel cancer therapy. *Cancer Treat Rev* **63**, 40-47 (2018).
40. Hu, J.M. et al. CXCL9, CXCL10 and IFN gamma favor the accumulation of infused T cells in tumors following IL-12 plus doxorubicin treatment. *J Immunol* **196** (2016).
41. Pfirschke, C., Siwicki, M., Liao, H.W. & Pittet, M.J. Tumor Microenvironment: No Effector T Cells without Dendritic Cells. *Cancer Cell* **31**, 614-615 (2017).
42. Zhu, J.F. & Paul, W.E. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* **112**, 1557-1569 (2008).
43. Quail, D.F. & Joyce, J.A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* **19**, 1423-1437 (2013).
44. Palucka, K. & Banchereau, J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer* **12**, 265-277 (2012).

補足情報のための参考文献

1. Pan, D. et al. The Effect of Polymeric Nanoparticles on Biocompatibility of Carrier Red Blood Cells. *PLoS One* **11**, e0152074 (2016).
2. Miretti, S. et al. A Mouse Model of Pulmonary Metastasis from Spontaneous Osteosarcoma Monitored In Vivo by Luciferase Imaging. *Plos One* **3** (2008).

【０２４３】

実施例4: 肺転移由来のがん　局所および全身性の腫瘍抑制のための免疫療法

腫瘍に対する免疫応答を原発巣の場所において誘起することは、免疫抑制性の微小環境および内因的免疫利用不可能性のため困難である。転移は、特に肺内ではがん細胞を露出させ、免疫処置に対する独自の機会が開かれる。本明細書において、赤血球固定型全身免疫療法という、転移を活用し、この生理学的逆境を局所および全身性の腫瘍抑制のための独自の治療機会に変換させるプラットフォームを記載する。簡単には、ケモカインナノ粒子を赤血球にアンカリングさせると、これにより、粒子が主に肺内の転移性がん細胞の近傍に沈着するが全身性集積は最小限となることが可能となり、これによりエフェクター免疫細胞の有意な浸潤がもたらされ、特異的抗原の必要性が全くないインサイチュー免疫処置がもたらされた。自然発生乳がん肺転移モデルに基づいたインビボ結果により、このストラテジーによって局所肺転移の進行が顕著に抑止され、動物の生存が有意に長くなることが示された。さらに、このストラテジーによるインサイチュー免疫処置により、再負荷を受けた遠隔腫瘍の増殖を有意に抑制する全身性免疫誘起された。このような研究結果は、肺転移にがんワクチン接種の有効な機会が開かれ、赤血球固定型全身免疫療法が、この機会を種々のがんの処置に活用するための効果のあるストラテジーであることを示す。

【０２４４】

がん免疫療法により、がんを処置するためのアプローチにおいてパラダイムシフトが誘導されている。ここ数十年間で種々の免疫療法アプローチが探索されており、中でも、免疫チェックポイント阻害剤および適応T細胞療法は、近年、大きな臨床的成果が得られている。1～7　具体的には、がん免疫療法で、従来型の介入（例えば化学療法）では医学的に治すことができないと考えられていた患者の全生存期間ならびに無増悪生存期間の改善において有意な影響が示されている。2,8　がん免疫療法の利点の1つは、欠陥細胞に対して体そのものの免疫系を関与させ、それにより、免疫学的記憶を誘導し、再発を予防する能力を有するようにすることである[9,10]。がん免疫療法のこのような顕著な能力にもかかわらず、腫瘍に対する免疫応答をその原発巣の場所で起こすことは依然として難題のままである。これは主に、腫瘍細胞の露出を低減させる大きな腫瘍サイズおよび抗腫瘍免疫の誘導を抑止する免疫抑制性の腫瘍環境のためである[11～13]。

【０２４５】

多くの患者では、がんと診断される時点までに、腫瘍細胞は既に第2の器官に転移している[14,15]。その独自の生理学的特長のため、肺は転移の主要部位であり、腫瘍の異なる原発起源からの細胞が最終的に肺内に入り、制御不能に増殖する[16]。その侵攻性の性質のため、転移は一般的に原発腫瘍よりも管理が困難であり、現在、利用なスタンドアローン治療薬はない[17,18]。また、転移部位における有効な免疫応答の誘導は免疫抑制性の微小環境の急速な発達によっても妨害される。具体的には、転移部位におけるケモカインランドスケープ（landscape）が内因的変化を受け、エフェクター免疫細胞のホーミングが制限され、それにより免疫応答がブロックされる。[19～21]。しかしながら、微小環境の急速な変化があっても、転移（特に、早期転移）では、通常、がん細胞は、高灌流状態で免疫活性な器官、例えば肺に露出される。これにより、転移のこの独自の生理学を活発な抗がん免疫応答を誘起するために利用する機会が開かれる。

【０２４６】

ここで、本発明者らは、赤血球媒介性肺標的指向化を用いて、肺内の露出がん細胞に影響を及ぼす[22,23]。具体的には、本発明者らは、前例のない量の免疫活性ナノ粒子を、肺

内の転移性がん細胞と共局在するように送達し、本発明者らが赤血球固定型全身免疫療法（EASI、本明細書では互換的に「EH-ImmunoBait」とも称する）と称する、転移の進行を制御し、全身性腫瘍抑制のためのインサイチュー適応性応答を生じさせる方法を実現する。本発明者らは、ケモカイン（CXCL10）が封入され、エフェクター免疫細胞を誘引することができ、赤血球の表面上にアンカリングされるナノ粒子であるImmunoBaitを作り出した。担体赤血球とImmunoBaitとの相互作用を改変することにより、ImmunoBaitは特異的に赤血球表面から外れ、肺内の転移部位に集積する。ImmunoBaitの部位特異的集積によって局所ケモカイン勾配が回復し、エフェクター免疫細胞が誘引されて局在的細胞傷害性免疫応答が誘起され、これによりさらに全身性免疫が誘導された。自然発生乳がん肺転移モデルに基づいた本発明者らのインビボでの結果により、EASIによって転移性腫瘍量の減少および生存度の改善がもたらされることが示された。さらに、肺転移巣におけるインサイチュー免疫処置によって全身性免疫がもたらされ、これにより腫瘍再負荷後の遠隔腫瘍の増殖が抑制された。このような研究結果により、転移の生物学的逆境を転移性がんに対する独自の治療機会に変換させることができるEASIの能力が強調される。

【０２４７】

最適な標的指向性のためのナノ粒子の材料特性の改変

赤血球へのナノ粒子のアンカリングは、効率的な表面接触および赤血球膜の伸展が必要とされる非共有結合性の結合プロセスであり、このプロセスは、赤血球膜とナノ粒子の間の非共有結合性相互作用、例えば静電相互作用、疎水性相互作用、および水素結合形成によって媒介される（図34A～34E）。この理解のもとで、本発明者らは、最適な器官標的指向性を得るために、ポリ（乳酸・グリコール酸）（PLGA）ナノ粒子の組成（乳酸：グリコール酸の比、L:G比）および表面の化学的性質（酸末端またはエステル末端）[24]を改変するための一組の実験を実施した。その趣旨で、4つの異なるPLGAポリマー（表５）を選択してナノ粒子を調製した。一般に、高いL:G比で高い疎水性がもたらされる。酸末端（エステル末端ではなく）は細胞膜との水素結合の形成が可能である。種々のPLGAナノ粒子が赤血球にアンカリングされ得た（図19）が、高い疎水性および水素結合形成能力を有する、高いL:G比および酸末端を有するPLGAナノ粒子（PLGA-d）において、赤血球に対する最も高い結合効率が示された（図14A）。生体適合性アッセイ（図14Bおよび図20A～20C）により、PLGA-dで引き起こされる担体赤血球に対するダメージは、その他の設計と比べて比較的最小限であることが示された。興味深いことに、インビトロ剪断試験の実験により、酸末端型ポリマーのL:G比が高いほど、肺毛細血管内の剪断応力に相当する高い剪断応力（6 Pa）[25～27]において高い割合（%）のナノ粒子脱離がもたらされ、静脈内の剪断応力に相当する低い剪断応力[25,26]における早期の脱離は少ないことが示された（図14C、図35）。PLGA-dは、高剪断応力において、全てのPLGA候補のうちで最大の脱離を示した。さらに、インビボ生体内分布データ（図22A）により、赤血球上に便乗している種々のPLGAナノ粒子の器官特異的標的指向性はインビトロ剪断データと相関することが明らかになった。赤血球上に便乗している種々のPLGAナノ粒子は、その赤血球との結合強度に応じて特定の器官への標的指向性を示した。全般的に、PLGA-dが表面にアンカリングしている赤血球で最良の肺への標的指向能力が示された（図14Dおよび図14E）。高い結合効率、担体赤血球に対する最小限のダメージおよび肺への優れた標的指向性を考慮し、PLGA-d（65:35 L:G比、酸末端）を最有力候補として確立し、この実施例において、後の全ての試験で使用した。

【０２４８】

赤血球便乗系のインビボ追跡（図36A～36F）により、アンカリングされたナノ粒子は担体赤血球から5分以内に速やかに脱離し、主に肺内に沈着するが、担体赤血球は少なくとも24時間、循環状態のままであることが示された。便乗ナノ粒子の肺内沈着は、1）赤血球が狭い毛細血管内を流れることによる赤血球の機械的押し込みの際の内皮への機械的刺激誘導性ナノ粒子移動および2）狭い肺毛細血管内で剪断離脱するナノ粒子の剪断誘導性脱離に基づく。高い毛細血管密度の存在および静脈内投与後の初回通過の器官であることが合わさり、肺が粒子沈着の主要部位となる[23,28]。粒子が赤血球から脱着すると、ナ

ノ粒子と内皮間のロバストな相互作用が速やかに得られ、長期粒子保持が確保されるはずである。ICAM-1は、肺内皮（特に、罹病状態の肺内）[29～31]および一部の特定のがん、例えばトリプルネガティブ乳がんに過剰発現されることが報告されている[31,32]。これに基づき、本発明者らは、抗ICAM-1抗体の結合（データ示さず）によって脱離したナノ粒子と肺内皮間の相互作用が向上し得るかどうかを探索した。aICAM-1抗体は遊離ナノ粒子および便乗ナノ粒子に効率的に結合された。その一方で、遊離ナノ粒子および便乗ナノ粒子に対するaICAM-1の結合効率は、それぞれ15.4±6.7μgの抗体/mgナノ粒子および6.5±3.4μgの抗体/mgナノ粒子であった。抗ICAM-1抗体の結合は、剪断下での赤血球からのナノ粒子のインビトロ脱離に有意に影響しなかった（図37）。2D細胞培養試験において、共焦点レーザー走査型顕微鏡法（CLSM）イメージングデータ（図14F）により、PLGAナノ粒子に抗ICAM-1抗体を結合することにより、その肺内皮細胞との相互作用の向上がもたらされることが示された。さらに、経時的生体内分布データ（図22Bおよび図14G～14H）により、赤血球に便乗するナノ粒子に抗ICAM-1抗体を結合すると、その肺内保持が有意に長くなり、保持時間が20分間から少なくとも6時間に高まることが明らかになった。

【０２４９】

赤血球上へのImmunoBaitのアンカリング

1.88μg/mgケモカインの搭載および75％の封入効率を有するImmunoBait粒子を、ダブルエマルジョン法を用いて調製した。単分散型の球状のImmunoBaitナノ粒子は187.3 nmの平均直径および-24.5 mVのゼータ電位を有した（図14I～14K）。ImmunoBaitからのケモカインの放出はバーストの後、徐放パターンを示した（図14L）。放出されたケモカインは良好な構造的完全性が維持され、天然のケモカインと同様の分子量および二次構造パターンが示された（図38A～38B）。ImmunoBaitが赤血球に効率的にアンカリングし得るかどうかを試験するため、本発明者らは、ケモカインを蛍光プローブのAlexa Fluor 647で標識した。CLSMデータ（図14M）により、マウス赤血球上へのImmunoBaitの効率的なアンカリングが示された。マウス赤血球に対するImmunoBaitの供給比を上げることにより、マウス赤血球の＞90％がImmunoBaitを担持していた（図23A～23Cおよび図14N）。走査型電子顕微鏡法（SEM）イメージングデータにより、マウス赤血球上へのImmunoBaitの効率的なアンカリングを確認した（図14O）。CXCL10の他に、別のケモカイン（GM-CSF）、サイトカイン（IL-2、IL-12およびIL-15）または免疫チェックポイント阻害剤（抗PD-1抗体）を担持しているImmunoBaitもまた、マウス赤血球に効率的にアンカリングされた（図24）。さらに、ImmunoBaitは、結合効率は低いがヒト赤血球上にもアンカリングし得た（図25A～25B）。

【０２５０】

次に、本発明者らは、ImmunoBaitのアンカリングによって担体赤血球に引き起こされる有害効果があればそれを検出するための一組のアッセイを行なった。試験した全ての比率のImmunoBaitの便乗で、担体赤血球上に表面ホスファチジルセリンの明白な過剰発現（赤血球の老化およびダメージのマーカー[33,34]）は引き起こされなかった（図14P）。また、凝集アッセイ[28]（図14Q）ならびに浸透圧脆弱性アッセイ[35]（図26および図14R）のデータにより、ImmunoBaitのアンカリングによってもたらされる担体赤血球の凝集および浸透圧ストレスに対する感受性の変化は最小限であることが明らかになった。このような生体適合性試験により、赤血球上へのImmunoBaitのアンカリングによって引き起こされる担体赤血球に対するダメージは最小限であることが示された。

【０２５１】

EASIを用いた転移部位へのImmunoBaitの標的指向性送達によって局所ケモカイン勾配の回復がもたらされた

インビトロ剪断試験データ（図39A～39B）により、赤血球からのImmunoBaitの脱離は剪断依存性であり、肺で予測される剪断応力（6 Pa）[23,25～27]において、ナノ粒子の＞60％が担体赤血球から3分以内に放出されることが明らかになった。次に、本発明者らは生体内分布試験を早期の乳がんの自然発生肺転移モデルにおいて実施した。図16C～16

Eに示されるように、赤血球上へのImmunoBaitの便乗により、肝臓内に集積されるナノ粒子の数が減少し、これは、これまでの報告と整合する[23,28]。遊離の対応物との比較では、有意に多くのImmunoBaitが、転移を含む肺に送達された。抗ICAM-1抗体を含めることにより、静脈内投与の20分後のアセスメント時、赤血球上にアンカリングされたImmunoBaitが罹病状態の肺内に、粒子単独より約27倍多く集積されることが可能になった。さらに、抗ICAM-1抗体含有ImmunoBaitは肺内に少なくとも6時間保持された。図16Dに示されるように、肺転移巣へのImmunoBaitの送達の向上により、108という感動的に高い血中に対する肺内の比率がもたらされ、ペイロード勾配の確立の根拠となった。さらなる生体内分布試験により、進行期の病理学的条件下の末期モデルにおいてでも（図16F）、ImmunoBaitは、種々の転移段階の肺転移巣内に同様の効率で沈着し得ることが示され（図40A～40B）、腫瘍の生理学の変化がImmunoBaitの沈着に及ぼす影響は最小限であることが示された。さらに、食細胞の枯渇によって肺転移巣内のImmunoBaitの沈着は低減されず（図41A～41B）、ImmunoBaitが主に肺の食細胞によって取り込まれるのではないことが示された。

【０２５２】

本発明者らは、次いで、肺転移巣内におけるImmunoBaitの分布を調べるために肺区域を解析した。図16Gおよび16Oに示されるように、EASIにより、相当な量のImmunoBaitをこのような到達困難な転移部位に送達することができた。具体的には、ImmunoBaitのほとんどは転移結節周囲に分布していたが、一部は転移結節内にも深く進入していた。

【０２５３】

次に、本発明者らは、CXCL10ケモカイン勾配をモニタリングするための経時的試験を乳がんの自然発生肺転移モデルにおいて実施した（図16H）。図27A～27Bおよび図16Iに示されるように、血中に対する肺内のCXCL10ケモカインの固有の勾配は、肺転移の進行とともに有意に小さくなり、肺転移巣内での免疫抑制性の微小環境の発達が示された。EASIによって免疫回復がもたらされ得るかどうかを試験するため、本発明者らはケモカイン勾配アッセイを行なった（図16J）。図16P～16Rに示されるように、EASIにより、長期持続性のケモカイン勾配の回復がもたらされた。抗ICAM-1抗体を有する遊離ImmunoBaitでは、充分なケモカインを肺に送達することができず、大きなケモカイン勾配を確立することができなかった。5倍高い用量の遊離ケモカインを送達するという挑戦的比較対照を使用した。5×遊離ケモカイン製剤では、高含有量のケモカインが、高いバイオアベイラビリティのおかげで血液および肺の両方に送達され、投与後20分で小さいケモカイン勾配が生じた。しかしながら、この勾配は維持され得なかった。明確な比較として、EASIでは、高濃度のCXCL10ケモカインを肺に送達することができ、大きなケモカイン勾配が72時間に至るまで維持され得た。ImmunoBaitの保持時間と比べてケモカイン勾配の持続期間が長いことは、免疫回復により腫瘍微小環境内でCXCL10の内因性発現がもたらされるという可能性によって起こったのかもしれない。さらに、ケモカイン勾配アッセイにより、CXCL10の他に、EASIは他のケモカイン、例えばRANTESの勾配も回復させることができることが示された（図42A～42C）。

【０２５４】

EASIによって局所エフェクター細胞の浸潤がもたらされ、これにより転移の進行および生存度の改善有意に抑止された

転移部位でのケモカイン勾配の回復によって誘起されるインサイチュー免疫応答を評価するため、本発明者らは、種々の処置後の肺転移巣内の免疫細胞をプロファイリングするための試験を実施した（図18A）。CXCL10は、特定の類型の免疫細胞、例えばすべて抗腫瘍応答に有利であるTh1 CD4、エフェクターCD8およびNK細胞に対する強力な化学誘引物質である[11,36～38]。図43Aに示されるように、EASIにより、対照（生理食塩水）と比べて全CD4細胞の1.4倍の増加がもたらされた。さらに、本発明者らにより、EASIによって処置された肺転移巣では生理食塩水群との比較において有意に多い（2.2倍の増加）IFN-γ＋Th1 CD4細胞が観察された（図18B～18C）。肺転移巣内の全CD8 T細胞は、種々の処置群間で有意に異ならなかった（図43B）。しかしながら、EASIでは、その他の群

と比べてIFN-γ＋CD8細胞の浸潤（1.8～2.0倍の増加）およびグランザイムB＋CD8細胞の浸潤（1.6～2.2倍の増加）が有意に向上した（図18D～18G）。適応免疫細胞の他に、本発明者らにより、EASIによって、自然免疫細胞（NK細胞）の浸潤が有意に変化することもまた観察された。EASIによって対照群および他の処置群と比べて1.4～1.8倍高いNK細胞浸潤が得られた。上記の免疫細胞プロファイリングデータにより、EASIによって可能となった免疫回復によって肺転移巣内へのエフェクター免疫細胞の浸潤が有意に向上することが明白に示された。具体的には、Th1 CD4細胞は、IFN-γおよびTNF-αなどの1型サイトカインを分泌し、腫瘍の免疫学的制御に有利な炎症促進性環境を維持する[39,40]。エフェクターCD8細胞およびNK細胞は、がん細胞の直接的な細胞傷害性死滅を推進する主要な寄与因子である[41,42]。さらに、他の器官での免疫プロファイリング（図44A～44B）により、他の器官、例えば肝臓および脾臓の試験した免疫細胞は、肺のものと比べてEASIによる影響は少ないことが示された。さらに、免疫細胞の浸潤の改善により、肺転移巣内のサイトカインプロフィールが有意に調節された。EASI群における炎症性サイトカインレベルは概ね対照群および他の処置群より高かった（図32）。特に、対照および他の処置と比べて、EASIにより有意に高いIFN-γおよびTNF-αの濃度がもたらされた（図18L,18M）。より興味深いことには、EASI群におけるCXCL10ケモカインの濃度もまた、他の群より顕著に高く、成功裡の免疫回復がさらに確認された。

【０２５５】

肺転移部位での免疫回復により、局所微小環境が、細胞傷害性免疫応答に有利である「ホット」状態に調節され得、肺転移の進行が制御される潜在的可能性を有し得る[20,43,44]。この仮説を試験するため、本発明者らは、肺転移の制御に対するEASIの有効性を乳がんの自然発生肺転移モデルにおいて評価した（図17A）。生物発光イメージングデータ（図17B）によって示されるように、EASIで群は、他の群と比べて顕著に遅い肺転移の進行が示された。最後の用量の2日後、マウスを安楽死させ、摘出肺上の表面結節を計数した。図17Cに示されるように、EASIでは、肺転移の進行の抑止において、それぞれ5×遊離ケモカイン群および遊離ImmunoBait群と比べて3.5倍および6.0倍良好な有効性が示された。さらに、EASI群の8匹のうち2匹のマウスが37日目に有していた視認可能な結節は2個未満であった。別個の一組の実験において（図17I）、より高用量の遊離ImmunoBait（10×）ではなんら抗転移効果はもたらされなかった。その一方で、EASIは、CXCL10が抗CXCL10抗体によって中和された場合、抗転移有効性が失われることがわかった（図17I）。摘出肺の定性的画像により、他の処置と比べてEASIの有効性の方が高いことが確認された（図17E、図28および図45A）。さらに、EASIによって処置されたマウスの肺重量は、その他の処置群と比較すると健常マウスに近い（図17F）。また、体重データ（図17Gおよび図45B）ならびにマウス器官のH＆E染色データ（図29）により、高用量の遊離ケモカイン（5×）および遊離ImmunoBait（10×）を含むいずれの処置も、明白な毒性との関連はないことが示された。次に、本発明者らは、マウスが図17Aに示したものと同じスケジュールに従って治療薬の投与を受ける生存度の試験を実施した。EASIによる処置では対照群および他の処置群と比べて動物の生存度が有意に改善され、生存期間の中央値がほぼ3倍長くなった（図17J）。また、EASI群の16匹のうち3匹のマウスが試験全体を通して生存した。次に、本発明者らは、末期の肺転移の抑止におけるEASIの有効性を末期の乳がんの自然発生肺転移モデルにおいて試験した（図30A）。図30B～30Cに示されるように、EASIによって遊離のImmunoBait単独と比べて肺転移量の有意な低減がもたらされ、EASIは末期転移モデルにおいても有効性を示すことが示された。

【０２５６】

EASIによってインサイチュー免疫処置が誘導され、全身性免疫および遠隔腫瘍抑制がもたらされた

EASIにより、免疫活性な器官である肺内で露出した転移巣細胞と共局在しているエフェクター免疫細胞の浸潤の向上がもたらされた。これにより、全身性の抗腫瘍免疫を生じさせることができるかもしれないインサイチュー免疫処置を誘導するために、露出したがん細胞を利用する機会が開かれる。この仮説を試験するため、本発明者らは、まず、EASI処

置後の肺転移巣からリンパ球を単離し（図33A）、これを4T1細胞とともに共培養した。図33Bに示されるように、EASI群から単離されたリンパ球では、生理食塩水群由来のものと比べて有意に高い腫瘍細胞死滅がもたらされた。次に、本発明者らは、肺転移巣内の抗原提示細胞（APC）ランドスケープをアッセイした。図46A～46Bに示されるように、EASIにより、有意に多い樹状細胞（CD45＋CD11c＋）の肺転移巣内浸潤がもたらされ、この細胞は、より活性化された状態であった。具体的には、EASIによる処置後、生理食塩水群と比べて2.6倍多い活性化型樹状細胞（CD45＋CD11c＋CD86＋）が存在した（図33C～33D）。このようなデータにより、EASIはインサイチュー抗原提示およびAPC活性化を可能にできることが示された。NK細胞は腫瘍微小環境への樹状細胞の動員を刺激することを示唆する証拠文献が増え続けているため45～48、樹状細胞の浸潤の向上はNK細胞の浸潤の改善によって引き起こされ得る。また、腫瘍細胞死滅の向上によって引き起こされる腫瘍抗原の露出によってAPC活性化がもたらされたかもしれない。次に、本発明者らは、インサイチュー免疫処置によって全身性免疫が生じるかどうかを試験した。図33E～33Fに示されるように、EASIによって処置されたマウスの血中には対照と比べて3.1倍多いCD8細胞が存在した。また、EASIにより、血中において対照（生理食塩水）群と比べてIFN-γ＋CD8細胞の2.93倍の増加およびグランザイムB＋CD8細胞の2.7倍の増加がもたらされた（図33G～33J）。このような血中免疫プロファイリングデータにより、EASIによって全身性免疫応答が誘導され、より多くのCD8およびエフェクターCD8細胞が生じることが明らかになった。さらに、本発明者らは、EASIによるインサイチュー免疫処置によって生じる全身性免疫によって遠隔腫瘍の抑制がもたらされ得るかどうかを試験するための腫瘍再負荷試験を実施した（図33K）。治療薬の最後の投薬の2日後、遠隔腫瘍をマウスの右脇腹に移植した。「EASI」群の他に2つの対照群、「健常」（事前に腫瘍移植を受けていない年齢適合マウス）および「対照-生理食塩水」（処置薬として生理食塩水の投与を受けたマウス）を試験に含めた。図33L～33Nに示されるように、EASIでは、健常群および対照-生理食塩水群と比べて、再移植された遠隔腫瘍の増殖が有意に抑制された。試験終了時に摘出した腫瘍の重量データ（図33I）および定性的画像（図33P）により、EASIの有効性の方が良好であることが確認された。腫瘍再負荷試験の全てのデータにより、肺転移巣内での集中的な局所免疫回復によってインサイチュー免疫処置が誘導され得、これにより全身性免疫が生じて全身性の腫瘍発育が抑止されることが実証された。

【０２５７】

考察

腫瘍に対する免疫応答をその天然の場所で起こすことは、その大きなサイズおよび免疫抑制性の環境のため困難である。原発腫瘍とは異なり、転移では、がん細胞が免疫活性な器官、例えば肺内で露出しており、したがって免疫処置の機会が開かれる。しかしながら、これは、転移部位が急速に内因的変化を受けて免疫抑制状態を獲得するという事実のため、実行することが困難である。本研究では、肺内での露出を活用することにより、本発明者らは、免疫活性な器官である肺内で大用量の免疫活性化剤を露出したがん細胞と共局在させ、局所性ならびに全身性のがん抑制のためのインサイチュー免疫処置を誘導することを可能にする赤血球固定型全身免疫療法（EASI）を開発した。

【０２５８】

EASIは、赤血球媒介性肺標的指向化というこれまでに確立された思想を基に構築されている[22,23]。しかしながら、肺標的指向化によって局所の病態を緩和することに重点を置いたこれまでの報告とは異なり、EASIでは、肺内での免疫相互作用によって媒介される全身性転帰が実証されている。具体的には、EASIでは、肺内でがん細胞が露出していることを利用して、全身性応答をもたらすインサイチュー免疫処置を得る。他のすばらしい既報の細胞送達系、例えば、共有結合性の結合または特異的結合を伴う、細胞の「バックパッキング（backpacking）」[49～51]およびERY1結合型赤血球[52, 53]とは対照的に、EASIは、赤血球上に非共有結合性の自然発生的相互作用によってアンカリングされたImmunoBait（ケモカインナノ粒子）からなる。この設計により、EASIはImmunoBaitを特異的に外して肺毛細血管内皮上に沈着させることが可能となる。ここで、肺毛細血管内皮は、その

狭いサイズおよび内因的生理学的変化のため、転移の際に循環腫瘍細胞が定着することを好む。また、ICAM-1が肺内皮（転移の際）[54]および一部の特定の型のがん細胞（例えばトリプルネガティブ乳がん[31]）で過剰発現するため、抗ICAM-1抗体をImmunoBaitに結合させることにより、ImmunoBaitとがん細胞との共局在化が促進された。

【０２５９】

本発明者らにより、肺転移部位においてImmunoBaitをEASIによって得られる局所転移環境と共局在させることで、ケモカイン勾配が特異的に回復され得ることが実証された。この局所免疫微小環境の調節によって免疫カスケードが活性化され、それによりエフェクター免疫細胞の浸潤の有意な向上がもたらされ、続いて、肺転移の進行の抑止および動物の生存度の改善という強力な治療有効性が推進される。さらに、転移部位でのがん細胞の細胞傷害性免疫性死滅によってインサイチュー抗原提示細胞活性化がもたらされ、続いて、全身に高値のCD8およびエフェクターCD8細胞の生成が誘導され、これによって遠隔腫瘍の発育に抵抗することができた。このようなデータにより、EASIによって転移の際のがん細胞の露出がインサイチュー免疫処置のための治療機会に変換されたことが実証される。EASIにより、進行期のステージのがんに対する潜在的治療アプローチがもたらされる。具体的には、インサイチュー免疫処置によって誘起される全身性抗がん免疫応答により、進行期のステージのがん患者に多くの場合で起こる腫瘍の再発または他の器官への転移が予防され得る。これまでの試験では注射部位を変えることが示唆され、赤血球への便乗によってナノ粒子は注射血管のすぐ下流の器官を標的とすることができる[28]。このことを考慮すると、EASIは、肺以外の他の器官内の転移においてインサイチュー免疫処置を誘導するために適用することができる。

【０２６０】

参考文献

1. Restifo, N.P., Dudley, M.E. & Rosenberg, S.A. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. Nat Rev Immunol 12, 269-281 (2012).

2. Pardoll, D.M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer 12, 252-264 (2012).

3. Rosenberg, S.A. Decade in review-cancer immunotherapy: entering the mainstream of cancer treatment. Nat Rev Clin Oncol 11, 630-632 (2014).

4. Qian, Y. et al. Molecular-Targeted Immunotherapeutic Strategy for Melanoma via Dual-Targeting Nanoparticles Delivering Small Interfering RNA to Tumor-Associated Macrophages. Acs Nano 11, 9536-9549 (2017).

5. Riley, R.S., June, C.H., Langer, R. & Mitchell, M.J. Delivery technologies for cancer immunotherapy. Nat Rev Drug Discov 18, 175-196 (2019).

6. Shah, N.J. et al. A biomaterial-based vaccine eliciting durable tumour-specific responses against acute myeloid leukaemia. Nat Biomed Eng 4, 40-51 (2020).

7. Neelapu, S.S. et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. N Engl J Med 377, 2531-2544 (2017).

8. Fesnak, A.D., June, C.H. & Levine, B.L. Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer 16, 566-581 (2016).

9. Sharma, P., Hu-Lieskovan, S., Wargo, J.A. & Ribas, A. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. Cell 168, 707-723 (2017).

10. Mellman, I., Coukos, G. & Dranoff, G. Cancer immunotherapy comes of age. Nature 480, 480-489 (2011).

11. Nagarsheth, N., Wicha, M.S. & Zou, W.P. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. Nat Rev Immunol 17, 559-572 (2017).

12. Vijayan, D., Young, A., Teng, M.W.L. & Smyth, M.J. Targeting immunosuppressive adenosine in cancer. Nat Rev Cancer 17, 765 (2017).

13. Chauhan, V.P. et al. Reprogramming the microenvironment with tumor-selective angiotensin blockers enhances cancer immunotherapy. Proc Natl Acad Sci U S A 116, 10674-10680 (2019).

14. Gupta, G.P. & Massague, J. Cancer metastasis: building a framework. Cell 127, 679-695 (2006).

15. Schroeder, A. et al. Treating metastatic cancer with nanotechnology. Nat Rev Cancer 12, 39-50 (2011).

16. Institute, N.C. (National Cancer Institute, 2019).

17. Cardoso, F. et al. Locally recurrent or metastatic breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol 21 Suppl 5, v15-19 (2010).

18. Eckhardt, B.L., Francis, P.A., Parker, B.S. & Anderson, R.L. Strategies for the discovery and development of therapies for metastatic breast cancer. Nat Rev Drug Discov 11, 479-497 (2012).

19. Homey, B., Muller, A. & Zlotnik, A. Chemokines: agents for the immunotherapy of cancer? Nat Rev Immunol 2, 175-184 (2002).

20. Clancy-Thompson, E. et al. Melanoma Induces, and Adenosine Suppresses, CXCR3-Cognate Chemokine Production and T-cell Infiltration of Lungs Bearing Metastatic-like Disease. Cancer Immunol Res 3, 956-967 (2015).

21. Altorki, N.K. et al. The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis. Nat Rev Cancer 19, 9-31 (2019).

22. Zhao, Z., Ukidve, A., Gao, Y., Kim, J. & Mitragotri, S. Erythrocyte leveraged chemotherapy (ELeCt): Nanoparticle assembly on erythrocyte surface to combat lung metastasis. Sci Adv 5, eaax9250 (2019).

23. Anselmo, A.C. et al. Delivering Nanoparticles to Lungs while Avoiding Liver and Spleen through Adsorption on Red Blood Cells. Acs Nano 7, 11129-11137 (2013).

24. Makadia, H.K. & Siegel, S.J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. Polymers-Basel 3, 1377-1397 (2011).
25. Paszkowiak, J.J. & Dardik, A. Arterial wall shear stress: observations from the bench to the bedside. Vasc Endovascular Surg 37, 47-57 (2003).
26. Chatterjee, S. Endothelial Mechanotransduction, Redox Signaling and the Regulation of Vascular Inflammatory Pathways. Front Physiol 9, 524 (2018).
27. Malek, A.M., Alper, S.L. & Izumo, S. Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. Jama-J Am Med Assoc 282, 2035-2042 (1999).
28. Brenner, J.S. et al. Red blood cell-hitchhiking boosts delivery of nanocarriers to chosen organs by orders of magnitude. Nat Commun 9 (2018).
29. Muro, S. et al. Control of endothelial targeting and intracellular delivery of therapeutic enzymes by modulating the size and shape of ICAM-1-targeted carriers. Mol Ther 16, 1450-1458 (2008).
30. Scherpereel, A. et al. Cell-selective intracellular delivery of a foreign enzyme to endothelium in vivo using vascular immunotargeting. Faseb J 15, 416-426 (2001).
31. Guo, P. et al. ICAM-1 as a molecular target for triple negative breast cancer. P Natl Acad Sci USA 111, 14710-14715 (2014).
32. Guo, P. et al. Dual complementary liposomes inhibit triple-negative breast tumor progression and metastasis. Science Advances 5 (2019).
33. Lee, S.J., Park, S.Y., Jung, M.Y., Bae, S.M. & Kim, I.S. Mechanism for phosphatidylserine-dependent erythrophagocytosis in mouse liver. Blood 117, 5215-5223 (2011).
34. Oldenborg, P.A. et al. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. Science 288, 2051-+ (2000).
35. Pan, D.C. et al. Nanoparticle Properties Modulate Their Attachment and Effect on Carrier Red Blood Cells. Sci Rep-Uk 8 (2018).
36. Tokunaga, R. et al. CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation - A target for novel cancer therapy. Cancer Treat Rev 63, 40-47 (2018).
37. Hu, J.M. et al. CXCL9, CXCL10 and IFN gamma favor the accumulation of infused T cells in tumors following IL-12 plus doxorubicin treatment. J Immunol 196 (2016).
38. Pfirschke, C., Siwicki, M., Liao, H.W. & Pittet, M.J. Tumor Microenvironment: No Effector T Cells without Dendritic Cells. Cancer Cell 31, 614-615 (2017).
39. Zhu, J.F. & Paul, W.E. CD4 T cells: fates, functions, and faults. Blood 112, 1557-1569 (2008).
40. Grivennikov, S.I., Greten, F.R. & Karin, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. Cell 140, 883-899 (2010).
41. Hsu, J. et al. Contribution of NK cells to immunotherapy mediated by PD-1/PD-L1 blockade. J Clin Invest 128, 4654-4668 (2018).

42. Vivier, E., Ugolini, S., Blaise, D., Chabannon, C. & Brossay, L. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. Nat Rev Immunol 12, 239-252 (2012).
43. Binnewies, M. et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. Nat Med 24, 541-550 (2018).
44. Wang, H. & Mooney, D.J. Biomaterial-assisted targeted modulation of immune cells in cancer treatment. Nat Mater 17, 761-772 (2018).
45. Bottcher, J.P. et al. NK Cells Stimulate Recruitment of cDC1 into the Tumor Microenvironment Promoting Cancer Immune Control. Cell 172, 1022-+ (2018).
46. Barry, K.C. et al. A natural killer-dendritic cell axis defines checkpoint therapy-responsive tumor microenvironments. Nat Med 24, 1178-1191 (2018).
47. Harizi, H. Reciprocal crosstalk between dendritic cells and natural killer cells under the effects of PGE2 in immunity and immunopathology. Cell Mol Immunol 10, 213-221 (2013).
48. Nguyen, K.B. & Spranger, S. Modulation of the immune microenvironment by tumor-intrinsic oncogenic signaling. J Cell Biol 219 (2020).
49. Schmid, D. et al. T cell-targeting nanoparticles focus delivery of immunotherapy to improve antitumor immunity. Nat Commun 8 (2017).
50. Tang, L. et al. Enhancing T cell therapy through TCR-signaling-responsive nanoparticle drug delivery. Nature Biotechnology 36, 707-+ (2018).
51. Stephan, M.T., Moon, J.J., Um, S.H., Bershteyn, A. & Irvine, D.J. Therapeutic Cell Engineering Using Surface-Conjugated Synthetic Nanoparticles. J Immunother 33, 866-866 (2010).
52. Kontos, S., Kourtis, I.C., Dane, K.Y. & Hubbell, J.A. Engineering antigens for in situ erythrocyte binding induces T-cell deletion. P Natl Acad Sci USA 110, E60-E68 (2013).
53. Lorentz, K.M., Kontos, S., Diaceri, G., Henry, H. & Hubbell, J.A. Engineered binding to erythrocytes induces immunological tolerance to E. coli asparaginase. Sci Adv 1, e1500112 (2015).
54. Masuda, Y., Murata, Y., Hayashi, M. & Nanba, H. Inhibitory effect of MD-Fraction on tumor metastasis: Involvement of NK cell activation and suppression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 expression in lung vascular endothelial cells. Biol Pharm Bull 31, 1104-1108 (2008).

【０２６１】
方法
細胞株および動物
ルシフェラーゼ発現4T1乳癌細胞株（4T1-Luc）は、Imanis Life Sciences（MN,USA）から入手した。4T1-Luc細胞は、37℃および5％CO2に維持した加湿インキュベータ内で培養した。この細胞を、10％FBS、1％Pen-Strepおよび0.1 mg/mLのG418を補給したRPMI-1640培地中で培養した。ヒト肺微小血管内皮細胞（HLMVEC）およびHLMVEC増殖培地はSigma Aldrich（MO,USA）で購入した。HLMVECはHLMVEC増殖培地中で製造業者の使用説明書に従って培養した。細胞は2～3回継代した後、使用した。雌Balb/cマウス（7～8週齢）はCharles River Laboratories（MA,USA）から購入した。実験はすべて、ケンブリッジにあるハーバード大学の文理学部（FAS）の動物実験委員会（IACUC）により承認済のプロトコルに従って行なった。
【０２６２】

ImmunoBaitの調製および特性評価

CXCL10が封入されたPLGAナノ粒子であるImmunoBaitを、ダブルエマルジョン法を用いて調製した。簡単には、50μgのCXCL10を200μLの0.1%ウシ血清アルブミン含有PBSに溶解させた。これを20 mgのPLGAを含有している1 mLのジクロロメタンに添加した。混合物を短時間、超音波処理し、次いで、11 mLの1.5%ポリビニルアルコール（PVA）溶液に定常撹拌下で滴下した。混合物全体を40秒間、プローブ式で超音波処理した。形成された粒子を定常撹拌下で一晩維持し、有機溶媒を除去した。粒子を12,000 gで10分間、遠心分離し、上清みを、薬物搭載の定量のために解析した。次いで粒子を脱イオン水中に再懸濁させ、そのサイズ、ゼータ電位および多分散指数について、動的光散乱（Malvern Zen3600,PA,USA）、走査型電子顕微鏡法（Zeiss FESEM Supra 55VP,Zeiss FESEM Ultra 55,Germany）および透過型電子顕微鏡法（JEOL 2100,MA,USA）を用いてアセスメントした。ナノ粒子を、合計2回の洗浄で脱イオン水を用いて洗浄した後、最後にこれをPBS中に懸濁させた。定量および生体内分布試験のため、蛍光オボアルブミン/CXCL10をPLGA内に、上記の方法を用いて封入した。

【０２６３】

血液の収集および処理

マウス全血を心臓穿刺により、ヘパリンプレコートシリンジを用いて収集し、使用前はBD Microtainer（登録商標）血液収集チューブ内に4℃で保存した。全血を1,000 gで10分間、4℃にて遠心分離し、血清およびバフィーコート層を赤血球区画から除去した。単離された赤血球を、冷却した1×PBSで3回さらに洗浄し、650 gで15分間、4℃にて遠心分離した後、最後にこれを10%ヘマトクリットの濃度で1×PBS中に懸濁させた。この溶液を、この試験での赤血球ストック溶液とみなす。

【０２６４】

赤血球へのImmunoBaitのアンカリング

等体積の赤血球ストック溶液とImmunoBaitナノ粒子懸濁液をAxygen（商標）1.5 mL容自立型スクリューキャップチューブ内で混合し、上下逆さにすること、およびピペッティングによってさらに充分に混合した。次いでチューブをチューブリボルバー（Thermo Fisher Scientific）上で40分間回転させた。便乗された赤血球を次いで、4℃にて100 gで5分間の遠心分離によってペレット化し、未吸収粒子を注意深く除去し、ペレットを1mLの1×PBSで再度洗浄し、結合が緩い粒子を除去した。抗ICAM-1抗体の結合のため、ImmunoBaitナノ粒子または便乗された赤血球のペレットを0.5 mg/mLの抗ICAM-1抗体溶液中にさらに20分間、再懸濁させた。便乗された赤血球を最後に10%v/vで1×PBS中に再懸濁させてさらなる特性評価に使用するか、または20%v/vで1×PBS中に再懸濁させてインビボ試験に使用した。インビボ有効性試験用の便乗された試料の内毒素レベルをPierceTM LAL Chromogenic Endotoxin Quantification Kit（ThermoFisher）によって評価した。アッセイ結果により、試料の内毒素レベルは低いことが示された（0.02 EU/用量未満）。

【０２６５】

自然発生肺転移モデルの確立

乳がんの自然発生肺転移モデルを確立するため、1×106個の4T1-Luc細胞を雌Balb/cマウスの左の乳腺脂肪体内に同所的に注入した。移植の19日後（早期モデル）または32日後（末期モデル）のいずれかで、原発腫瘍を外科的に切除した。原発腫瘍切除の6日後、マウスに150μLの30 mg/mLのXenolight-D-ルシフェリン含有生理食塩水を腹腔内注射した。注射の15分後、マウスに、インビボイメージング（IVIS Spectrum）を用いてイメージングを行なった。マウスを、原発腫瘍切除後6日目の肺における原発腫瘍体積および生物発光強度に基づいて異なる群に無作為化した。

【０２６６】

疾患モデルでのインビボ生体内分布試験

早期または末期の乳がん肺転移モデルを上記のようにして確立した。全ての生体内分布試験で、17μgのナノ粒子を含有している製剤を使用した。原発腫瘍切除の7日後、マウ

スに、ImmunoBait、便乗ImmunoBait、抗ICAM-1結合型ImmunoBaitおよび抗ICAM-1が結合している便乗ImmunoBaitを尾静脈内に静脈内注射した。ImmunoBaitナノ粒子を、アルブミン担体タンパク質にコンジュゲートさせたAlexa Fluor 647またはAlexa Fluor 750によって蛍光標識した。食細胞枯渇の場合では、マウスにおいて、血管内食細胞を有効に枯渇させることが示されている（28）クロドロネートを5 mg/mLで含む200μLのClodrosome（登録商標）を、便乗された試料のi.v.注射の48時間前にi.v.注射した。注射の20分後および6時間後にマウスを致死させ、器官（肝臓、肺、脾臓、腎臓、心臓、脳および血液）を、さらなる処理のために採取した。処理では、1 mLの冷却したRIPA溶解バッファー（1×）を各器官に添加し、器官を、ハイシェアホモジナイザー（IKA T-10 Basic（登録商標）Ultra turrax,Germany）を用いてホモジナイズし、ナノ粒子含有量を蛍光により、プレートリーダー（Tecan Safire 2（登録商標）, Switzerland）にて定量した。注入量パーセント（percent injected dose: ID%）は、特定の器官における全ナノ粒子蛍光量を全ての器官の全ナノ粒子蛍光量で割り算したものと定義した。

【０２６７】

インビボでの乳がんの自然発生肺転移モデルにおける有効性試験

早期の乳がんの自然発生肺転移モデルでは、処置を、原発腫瘍切除の1週間後に開始して行なった。ImmunoBaitまたは抗ICAM-1抗体を含む便乗ImmunoBaitを有効性および生存度の試験に使用した。10日間で4回の注射を、すなわち26、29、32および35日目に行なった。抗CXCL10抗体を有する便乗しているImmunoBaitの群では、EASIのi.v.投与の直後に、100μgのラット抗マウスCXCL10中和抗体を腹腔内投与した。代表マウスにイメージングを25、28、31、34および37日目に、インビボイメージング（IVIS Spectrum）を用いて行なった。簡単には、マウスに、150μLの30 mg/mLのXenolight-D-ルシフェリン含有生理食塩水を腹腔内注射した。注射の15分後、マウスに、インビボイメージングを用いてイメージングを行なった。37日目、マウスを安楽死させ、インドインク溶液を気管内注射し、肺を摘出し、Feket液を用いて固定した。固定された肺を、表面結節の計数に使用した。早期モデルにおける生存度を、注射スケジュールを上記のようにすることによって評価した（n＝15～16）。末期の肺転移モデルでは、4回の用量の処置を2日毎に行ない、最初の用量は原発腫瘍切除の7日後（39日目）に投与した。最後の用量の2日後（50日目）、マウスを安楽死させ、摘出肺上の結節を計数した。有効性試験では、遊離のケモカイン（5×）および遊離ImmunoBait（10×）にそれぞれ12.5μgおよび25μgのCXCL10を含めたこと以外に、注射する製剤には2.5μgのCXCL10ケモカインを含めた。

【０２６８】

ケモカイン勾配アッセイ

血中および肺内のCXCL10濃度の経時的変化を早期の肺転移モデルにおいて測定した。腫瘍移植の19日後、腫瘍を外科的に切除した。腫瘍切除の4、10および22日後、マウスを安楽死させ、血液を心臓穿刺によって収集し、肺を摘出した（全ての時点でn＝5）。処理では、プロテアーゼ阻害剤を含有している0.5 mLの冷却した組織抽出バッファーを各肺に添加し、肺を、ハイシェアホモジナイザー（IKA T-10 Basic（登録商標）Ultra turrax,Germany）を用いてホモジナイズした。肺内および血中のCXCL10含有量を、ELISAを用いて定量した。

【０２６９】

早期の肺転移モデルにおいて以下のとおりにケモカイン勾配アッセイを実施した。この治療薬のケモカイン勾配回復能を評価するため、早期自然発生肺転移モデルを、本文中に先に記載のようにして確立した。1つの生理食塩水処置群および3つの処置群（12.5μgのCXCL10を含む5×遊離CXCL10ケモカイン、2.5μgのCXCL10を含む抗ICAM-1を有するImmunoBait、および抗ICAM-1を有し、2.5μgのCXCL10を含むImmunoBaitに便乗された赤血球）をこの試験に含めた。処置を、外科処置の1週間後に開始して行なった。2回セットの注射を外科処置後7日目と10日目に行なった。（各群の各時点でn＝4～6）。2回目の注射の20分後、6時間後、24時間後、48時間後および72時間後にマウスを致死

させ、血液を心臓穿刺によって収集し、肺を摘出した。肺内および血中のケモカイン含有量を上記のようにして定量した。

【０２７０】

免疫細胞およびサイトカインのプロファイリング

種々の抗体カクテルパネルを、CD45（Biolegend、カタログ番号:103116、クローン:30-F11）、CD3（Biolegend、カタログ番号:100218、クローン:17A2）、CD4（Biolegend、カタログ番号:100421、クローン:GK1.5）、CD8a（Biolegend、カタログ番号:100711、クローン:53-6.7）、NKp46（Biolegend、カタログ番号:137606、クローン:29A1.4）、CD11c（Biolegend、カタログ番号:117307、クローン:N418）、グランザイムB（Biolegend、カタログ番号:372208、クローン:QA16A02）、IFN-γ（Biolegend、カタログ番号:505849、クローン:XMG1.2）、IFN-γ（Biolegend、カタログ番号:505806、クローン:XMG1.2）、CD86（Biolegend、カタログ番号:105011、クローン:GL-1）およびAm Cyan Live/dead細胞染色キット（Thermo Fischer Scientific,MA,USA）から作成した。抗体はすべて、使用前に至適希釈率で希釈した。

【０２７１】

免疫細胞プロファイリングでは、早期自然発生肺転移を上記のようにして確立した。1つの生理食塩水処置群および3つの処置群（12.5μgのCXCL10を含む5×遊離CXCL10ケモカイン、2.5μgのCXCL10を含む抗ICAM-1を有するImmunoBait、および抗ICAM-1を有し、2.5μgのCXCL10を含むImmunoBaitに便乗された赤血球）をこの試験に含めた。処置を、外科処置の1週間後に開始して行なった。3回セットの注射を原発腫瘍切除後7、10および13日目に行なった。最後の注射の1日後、マウスを安楽死させた。血液を心臓穿刺によって収集し、肺、肝臓および脾臓などの器官を摘出した。器官の細胞の単細胞懸濁液を、対応する器官の解離キット（Miltenyi Biotec,Germany）を製造業者の使用説明書に従って用いて形成した。細胞を上記の抗体で染色し、フローサイトメトリー（BD LSR Analyser II.,NJ USA）によって解析した。

【０２７２】

サイトカインプロファイリングでは、モデルの確立および処置は上記のものと同じにした。最後の注射の1日後、マウスを安楽死させ、肺を摘出した。処理では、プロテアーゼ阻害剤を含有している0.5 mLの冷却した組織抽出バッファーを各肺に添加し、肺を、ハイシェアホモジナイザー（IKA T-10 Basic（登録商標）Ultra turrax,Germany）を用いてホモジナイズした。サイトカインプロファイリングを、LEGENDplex（商標）Mouse Inflammation Panel（Biolegend,CA,USA）を製造業者の使用説明書に従って用いて行ない、フローサイトメトリー（BD LSR Analyser II.,NJ USA）を用いて解析した。CXCL10濃度をELISAによって定量した。

【０２７３】

統計解析

実験はすべて、少なくとも3回繰り返した。統計解析はすべて、Graphpad prism 8ソフトウェアを用いて行なった。データはすべて、平均±s.e.m.として示す。スチューデントのt検定、テューキーのHSD解析を伴う一元配置ANOVA、またはマンホイットニー検定を用いて有意性を判定した。カプラン・マイヤー生存曲線の解析では、マンテル・コックス検定を使用した。p値は、種々の有意性レベルを表す、p＜0.05＊、p＜0.01＊＊、p＜0.001＊＊＊、p＜0.0001＊＊＊＊。フローサイトメトリー解析はすべて、FlowJo（商標）10ソフトウェアを用いて行なった。

【０２７４】

方法の補足

材料

化学薬品および試薬はすべて、Sigma Aldrich（MO,USA）から入手し、特に記載のない限り、さらに精製せずに使用した。PLGA（50:50　酸末端、50:50　エステル末端、85:15　エステル末端、および65:35　酸末端）はSigma-Aldrich（MO,USA）から購入した。mPEG-PLGAはPolySciTech（IN,USA）から購入した。CXCL10/IP-10、IL-10、IL-

15およびGM-CSFはPeproTech（NJ,USA）から入手した。Nunc（商標）Lab-Tek（商標）II Chamber Slide（商標）System、細胞染色バッファー、G418（ジェネティシン）、マウスIP-10 ELISAキット、Alexa Fluor 647オボアルブミン、Alexa Fluor 750 NHS試薬、Alexa Fluor 647 NHS試薬、リン酸緩衝生理食塩水（1×）、Axygen（商標）1.5mL容自立型スクリューキャップチューブ、PierceTM LAL発色性エンドトキシン定量キットおよびCXCL10 モノクローナル抗体は、Thermo Fischer Scientific（MA,USA）から入手した。ヒト全血および血清はBioIVT（NJ,USA）から入手した。Xenolight-D-ルシフェリンカリウム塩はPerkin Elmer（MA,USA）から入手した。ヘパリンリチウムコートマイクロティナチューブはBD medical technology（MA,USA）から入手した。LEGENDplex（商標）Mouse Inflammation PanelとFilter Plate、組換えマウスRANTES（カタログ番号:594208）および抗ICAM-1抗体（カタログ番号:116102、クローン:YN 1/1.7.2、カタログ番号:353102、クローン:HA58）はBioLegend（CA,USA）から入手した。組織解離チューブおよび肺解離キットはMiltenyi Biotec（Germany）から入手した。Tissue Tek OCTコンパウンドはSakura Finetek（CA,USA）から入手した。0.9％生理食塩液はTeknova（CA,USA）から入手した。パラホルムアルデヒドはElectron Microscopy Sciences（PA,USA）から入手した。外科用機器はBraintree Scientific,Inc.（MA,USA）から入手した。Clodrosome（登録商標）はEncapsula NanoSciences（TN,USA）から入手した。

【０２７５】

インビトロ薬物放出試験

CXCL10含有ナノ粒子（ImmunoBait）を1 mLのPBS、FBSおよび完全培地（DMEM＋10％FBS）中に再懸濁させ、チューブリボルバー上で37℃にてインキュベートした。定時の時点で、粒子を12,000 gで10分間、遠心分離し、上清みを解析のために収集した。粒子を1mLの新鮮放出培地中にさらに再懸濁させ、37℃で次の時点までインキュベートした。試料は、インキュベーションの開始後1、2、4、6および12時間目に採取した。各放出培地中における累積放出を、ELISAを用いて定量した。また、放出されたCXCL10ケモカインをMALDI-TOFおよび円二色性分散計によって特性評価し、任意の分子量および構造の変化があればそれを検出した。

【０２７６】

ナノ粒子の内在化試験

ナノ粒子の内在化を、共焦点顕微鏡法を用いて確認した。フローサイトメトリー解析では、2×106個のHLMVEC細胞を12ウェルプレート内にプレーティングし、一晩接着させた。次いでプレートに吸引を行ない、1 mlの新鮮培地を各ウェルに添加した。30μgのAlexa Fluor 647標識ナノ粒子を各ウェルに添加し、インキュベータ内で37℃にて20分間または6時間インキュベートした。既定の時点の後、ウェル内の培地を完全に吸引し、PBSで3回洗浄し、細胞を、セルスクラッパーを用いて軽くスクラップした。この細胞を共焦点顕微鏡（Upright Zeiss LSM 710 NLO ready）によって解析した。

【０２７７】

赤血球のPEG化

赤血球のPEG化を、本発明者らのグループによる既報の方法に従って行なった。1 簡単には、赤血球を、10 mg/mLの塩化シアヌル官能基化5-kDa m-PEG（C-mPEG、sigma Aldrich）を含むPBS中で30分間インキュベートした。C-mPEGは、赤血球表面上のアミン基と共有結合を形成した。未反応のC-mPEGを、遠心分離によって赤血球をペレット化することにより排除した後、PBSを用いて2回洗浄を行なった。PEG化された赤血球を、使用のためにPBS中に再懸濁させた。

【０２７８】

便乗された赤血球の特性評価および生体適合性

便乗効率および赤血球上に搭載されたナノ粒子を、蛍光測定を用いて測定した。蛍光を用いた定量では、25μLの赤血球を、脱イオン水を用いて溶解させ、ナノ粒子含有量を、蛍光を用いてプレートリーダー（Tecan Safire 2（登録商標）,Switzerland）にて定量

した。赤血球へのナノ粒子の結合を、走査型電子顕微鏡法（Zeiss FESEM Supra 55VP, Zeiss FESEM Ultra 55,Germany）を用いて確認した。簡単には、便乗された赤血球を、2.5％グルタルアルデヒド溶液を用いて固定し、漸増勾配エタノール中で洗浄した後、ヘキサメチルジシラザン（HMDS）を用いて化学的に乾燥させた。最後に、試料をスパッタコートした（EMT 150T ES金属スパッターコーター,PA USA）後、イメージングした。生体適合性試験では、浸透圧脆弱性および凝集のアッセイを先に記載のとおりに行なった。2

【０２７９】

インビトロ剪断試験

ナノ粒子をAlexa Fluor 647-OVAによって標識し、剪断試験に使用した。低剪断試験では、便乗されたマウス赤血球を1 mLのFBS中で、12 rpmのチューブリボルバー上で37℃にてインキュベートした。20分間のインキュベーション後、細胞を250 gで5分間の遠心分離によってペレット化し、1×PBS中に10％v/vまで再懸濁させた。次いで25μLの赤血球を、脱イオン水を用いて溶解させ、残存薬物含有量を、蛍光を用いてプレートリーダー（Tecan Safire 2（登録商標）,Switzerland）にて定量した。高剪断試験では、便乗されたマウス赤血球を10 mLのFBS中でインキュベートした。回転剪断（2 Pa、6 Paまたは10 Pa）を血清中の赤血球に、円筒形のクエット型粘度計（1 mmのギャップ、AR-G2レオメーター、TA instruments）を用いて20分間印加した。剪断の印加中は、ウォータージャケットを用いて試料を37℃に維持した。このような条件は高剪断の生理学的環境を模倣している。20分後、細胞を250 gで10分間の遠心分離によってペレット化し、1×PBS中に10％v/vまで再懸濁させた。次いで25μLの赤血球を、脱イオン水を用いて溶解させ、残存ナノ粒子含有量を、蛍光を用いてプレートリーダー（Tecan Safire 2（登録商標）,Switzerland）にて定量し、走査型電子顕微鏡法（Zeiss FESEM Supra 55VP,Zeiss FESEM Ultra 55,Germany）を用いて確認した。

【０２８０】

肺内におけるナノ粒子の分布

罹病状態の肺内におけるナノ粒子の分布では、1×106個の4T1-Luc細胞を雌Balb/cマウスの左の乳腺脂肪体内に同所的に注入した。移植の19日後、腫瘍を外科的に切除した。腫瘍切除の28日後、マウスに、17μgの、抗ICAM-1を有するAlexa Fluor 647標識ナノ粒子および抗ICAM-1を有する蛍光ナノ粒子に便乗された赤血球を注射した。注射の20分後、マウスを安楽死させ、そのままの肺を収集した。肺を、冷却した1×PBSで2回洗浄した後、4％パラホルムアルデヒド溶液中に一晩、固定した。固定された肺を次いで、Tissue Tek OCTコンパウンド（Sakura Finetek,CA,USA）中で凍結させ、クリオスタット（Leica CM1950,Germany）を用いて切片化した。切片化した組織を、Fluroshield（登録商標）を用いてマウントしてDAPIで染色し（励起/発光　340/488 nm）、共焦点顕微鏡（Upright Zeiss LSM 710 NLO ready,Germany）を用いて解析した。

【０２８１】

健常マウスでのインビボ生体内分布試験

種々のPLGAを用いた生体内分布試験では、健常雌Balb/cマウスを使用した。17μgのNPを含む用量のAlexa Fluor 750-OVA封入NPおよび便乗NP（全ての群でn＝3）を尾静脈内に静脈内注射した。注射の20分後にマウスを致死させ、器官（肝臓、肺、脾臓、腎臓、心臓、脳および血液）を、さらなる処理のために採取した。包括的生体内分布では、Alexa Fluor 750-OVA封入NP、便乗NP、Alexa Fluor 750-OVAが封入され、抗ICAM-1を有するNPおよび抗ICAM-1を有する便乗NP（遊離NPはn＝3、便乗NPはn＝6）を尾静脈内に静脈内注射した。注射の20分後、2時間後、6時間後および24時間後にマウスを致死させ、器官（肝臓、肺、脾臓、腎臓、心臓、脳および血液）を、さらなる処理のために採取した。処理では、1 mLの冷却したRIPA溶解バッファー（1×）を各器官に添加し、器官を、ハイシェアホモジナイザー（IKA T-10 Basic（登録商標）Ultra turrax,Germany）を用いてホモジナイズし、ナノ粒子含有量を、蛍光測定によりプレートリーダー（Tecan Safire 2（登録商標）,Switzerland）にて定量した。

【０２８２】
乳がんの自然発生肺転移モデルでの末期における有効性
　末期における有効性では、自然発生肺転移モデルを、雌Balb/Cマウスの左の乳腺脂肪体内への1×106個の4T1-Lucの同所性注入によって確立した。移植の32日後、腫瘍を外科的に切除した。処置を、外科処置の1週間後に開始して行なった。4回の注射を2日毎に行なった。注射用量は早期モデルの場合と同じである。最後の注射の2日後（50日目）、マウスを安楽死させ、インドインク溶液を気管内注射し、肺を摘出し、先に記載のようなFeket液を用いて固定した。3　固定された肺を、表面結節の計数に使用した。
【０２８３】
腫瘍再負荷試験
　腫瘍再負荷試験を早期の乳がんの自然発生肺転移モデルにおいて実施し、処置（対照-生理食塩水、EASI）を、原発腫瘍切除の1週間後に開始して行なった。抗ICAM-1抗体を含む便乗ImmunoBaitを有効性および生存度の試験において使用した。10日間で4回の注射を、すなわち26、29、32および35日目に行なった。最後の注射の2日後（37日目）、1×106個の4T1-Luc細胞を、疾患マウスまたは事前に腫瘍移植を受けていない年齢適合健常マウスの右脇腹に皮下移植した。対照-生理食塩水群のマウスは、体調不良のため腫瘍再移植の10日後に安楽死させた。腫瘍増殖を53日目まで測定した。53日目、マウスを安楽死させ、摘出した腫瘍の重量を測定した。
【０２８４】
補足結果
赤血球へのナノ粒子のアンカリングの機構
　本発明者らの仮説は、1）便乗プロセスは接触依存性である、すなわちナノ粒子は、明らかにRBC膜に接近し、膜を伸展させ、最終的に、主に非共有結合力によって膜内に係留状態となることができるはずである。2）膜の伸展後、粒子は、膜の表面張力と、膜とナノ粒子表面間の非共有結合力、例えば静電相互作用、疎水性相互作用および水素結合形成との間の熱力学的平衡のため、RBC膜に結合されたままとなることが可能である、というものである。
【０２８５】
　第1の仮説を試験するため、本発明者らはまず、ナノ粒子と赤血球膜の表面接触を抑止するために赤血球の表面上にPEGをコンジュゲートさせた。図34Bによれば、RBC表面上のPEGによってRBCへのナノ粒子の接近が障害され、それにより便乗効率が50％低下した。このようなデータは、赤血球表面へのナノ粒子のアンカリングが本当に接触依存性であることを示す。次に、本発明者らは、赤血球膜の伸展を抑止するために赤血球を固定した。図43Aに示されるように、固定RBCの場合、RBCの便乗効率はゼロまで劇的に低下し、ナノ粒子が膜を伸展させることができない場合、ナノ粒子はRBC膜に結合できないことが示された。この試験は、ナノ粒子のアンカリングに膜の伸展が必要とされること、すなわち接近が障害されるか、または伸長を抑止するために膜を化学的に固定すると、便乗プロセスは劇的に影響を受けることを示す。
【０２８６】
　第2の仮説を試験するため、本発明者らは、ナノ粒子と赤血球膜間の全体的な非共有結合性相互作用を抑止するためにPBS中ではなく血清中で便乗実験を実施した。おそらく血清タンパク質はナノ粒子周囲にコロナを形成し、またRBCも被覆し、それにより全体的なナノ粒子-RBC相互作用がマスキング/低減されるであろう。図43Cに示されるように、PBSとの明確な対比において、便乗培地として血清を使用することによって便乗効率が60％低下し、非共有結合性相互作用が大いに赤血球膜上でのナノ粒子の保持を担っていることが示された。
【０２８７】
　本発明者らは、RBC膜の伸展後に適所でのナノ粒子の保持を担う実際の非共有結合力としては、静電相互作用、疎水性相互作用、および水素結合形成が挙げられるという仮説をたてる。本発明者らのこれまでの試験において、本発明者らは、正電荷を有するナノ粒子

は超高効率（＞40％）で赤血球に結合され、静電相互作用が赤血球へのナノ粒子の結合に極めて重要な役割を果たしていることが示唆されることを報告した 4。これは、赤血球膜が負電荷を担持しているため理解できることである。しかしながら、負電荷を有するナノ粒子もまた赤血球に効率的に結合することができ、この場合、静電相互作用は関与していない。本発明者らは、ナノ粒子と赤血球膜間の疎水性相互作用が、この場合にナノ粒子を適所に保持するための主要な役割因子であるという仮説をたてる。この仮説を試験するため、本発明者らは、ナノ粒子を親水性のPEGで覆うことによって疎水性相互作用を抑止した。図43Dに示されるように、PEG修飾されたナノ粒子の場合、全体的な便乗効率はほぼ75％低下し、このプロセスが効率的に起こるためには疎水性結合力が不可欠であることが示される。静電相互作用および疎水性相互作用の他に、本発明者らは、他の非共有結合性相互作用、例えば水素結合形成もまた、赤血球膜上でのナノ粒子の保持に大きな役割を果たしているという仮説をたてる。この仮説を試験するため、本発明者らは、赤血球に対する（同じ組成物の）エステル末端のPLGAナノ粒子および酸末端のPLGAナノ粒子の結合を比較した。エステル末端のPLGAナノ粒子の方が疎水性であるが、酸末端のナノ粒子は細胞膜と水素結合を形成することができる。図43Eに示されるように、酸末端のナノ粒子ではなくエステル末端のナノ粒子を使用した場合、便乗効率は驚くべきことに25％低下した。これは、便乗が主に疎水性結合力によって支配されていると考えられることを考慮すると予想外であった。この結果は、H結合形成によってもまた、ある程度、便乗が制御されることを示す。

【０２８８】

要約すると、本発明者らのデータに基づくと、赤血球へのナノ粒子のアンカリングは、ナノ粒子がRBC膜に接近し、競合的な遮蔽性のタンパク質/力がない場合、接触依存的にRBC膜を伸展させる、という機構案に従っている可能性がある。この後、ナノ粒子はRBC膜とナノ粒子表面間の非共有結合性誘引力（静電相互作用、疎水性結合力およびH結合形成）のため適所に保持される。

【０２８９】

異なる材料特性を有するPLGAナノ粒子の赤血球からの脱離

本発明者らの機構試験（図43A～43E）により、疎水性相互作用と水素結合形成の両方が赤血球へのナノ粒子の結合に寄与することが示される。非剪断条件下では、H結合形成と疎水性相互作用の両方が、赤血球上にナノ粒子を保持するのに充分に強い。PLGA-dはバランスのとれた疎水性と水素結合形成能力を有し、したがって、非剪断条件下では赤血球に対して最も高い親和性を示す。しかしながら、H結合形成は比較的疎水性相互作用より弱い。したがって、剪断条件下では、弱い水素結合の方が壊れやすく、赤血球からナノ粒子が外れる。水素結合は赤血球へのPLGA-dの結合のための優勢な力であるため、剪断条件下では、より多くのナノ粒子が赤血球から外れた（図35）。

【０２９０】

インビボでの赤血球からのImmunoBaitの脱離

インビボでの便乗された赤血球系をさらに特性評価するため、本発明者らはこの系を二重標識し、ここで、担体赤血球はCellTrace（商標）Far Redによって標識し、ナノ粒子はFITCによって標識した（図36A）。本発明者らは、二重標識した便乗された赤血球系を注射し、異なる時点で血液を収集し、便乗された系をフローサイトメトリーによって解析した。図36Bおよび図36Dに示されるように、担体赤血球は血中に少なくとも24時間残存した。対照的に、図36Cおよび図36Eに示されるように、担体赤血球上のナノ粒子のほとんど（＞95％）は担体赤血球から＜5分で速やかに脱離し、図36Fに示す生体内分布データにより、脱離したナノ粒子はほとんどが肺内に沈着することが示された。図36A～36Fに示すデータを本発明者らのこれまでの試験5と合わせると、赤血球上にアンカリングされたナノ粒子は、当たった最初の毛細血管床で速やかに剪断離脱されることが示される。静脈内注射の場合、肺は、担体赤血球が出会い、従って、アンカリングしているほとんどのナノ粒子を他の器官ではなくここに沈着させる毛細血管が多い最初の器官である。

【０２９１】

（表５）４つのＰＬＧＡ候補の特性。

	PLGA-a	PLGA-b	PLGA-c	PLGA-d
L: G 比*	50:50	50:50	85:15	65:35
末端基	エステル末端	酸末端	エステル末端	酸末端

＊ポリマー中のグリコール酸に対する乳酸のモル比

【０２９２】

補足情報のための参考文献

1. Chambers, E. & Mitragotri, S. Long circulating nanoparticles via adhesion on red blood cells: mechanism and extended circulation. Exp Biol Med (Maywood) 232, 958-966 (2007).

2. Pan, D. et al. The Effect of Polymeric Nanoparticles on Biocompatibility of Carrier Red Blood Cells. PLoS One 11, e0152074 (2016).

3. Miretti, S. et al. A Mouse Model of Pulmonary Metastasis from Spontaneous Osteosarcoma Monitored In Vivo by Luciferase Imaging. Plos One 3 (2008).

4. Zhao, Z., Ukidve, A., Gao, Y., Kim, J. & Mitragotri, S. Erythrocyte leveraged chemotherapy (ELeCt): Nanoparticle assembly on erythrocyte surface to combat lung metastasis. Sci Adv 5, eaax9250 (2019).

5. Brenner, J.S. et al. Red blood cell-hitchhiking boosts delivery of nanocarriers to chosen organs by orders of magnitude. Nat Commun 9 (2018).

【０２９３】

実施例5: 天然の抗原提示機能のバイオミミクリーによる赤血球推進型免疫処置

赤血球は本来、循環系内の一部の特定の細菌病原体を捕捉し、これを酸化的ストレスによって死滅させ、脾臓内の抗原提示細胞（ＡＰＣ）に提示する。赤血球のこの自然免疫機能を活用することにより、本発明者らは、ナノ粒子を赤血球の表面から脾臓内のＡＰＣに提示する赤血球駆動型免疫標的指向化（Erythrocyte Driven Immune Targeting）（ＥＤＩＴ）を開発した。抗原性のナノ粒子を赤血球表面上に吸着させた。吸着させるナノ粒子の数密度を操作することにより、慣用的には赤血球媒介性送達系の標的である肺ではなく主に脾臓内に送達された。赤血球に送達されるナノ粒子の脾臓への提示により、対照と比べて、抗原に対する抗体応答の改善、高いセントラルメモリーＴ細胞応答および低い制御性Ｔ細胞応答がもたらされた。免疫応答の向上により、予防モデルにおいて腫瘍進行が減速した。このような研究結果は、ＥＤＩＴが全身性免疫を向上させるための有効なストラテジーであることを示す。

【０２９４】

赤血球細胞は、血中の一部の特定の病原体を捕捉し、これを脾臓内の免疫細胞に提示するという独自の機能を果たす。本発明者らは、赤血球細胞のこの自然免疫機能に基づき、ワクチンナノ粒子を脾臓に送達するためのバイオミメティクスストラテジーを開発した。この「天然アジュバント」ストラテジーにより、外来アジュバントを必要とすることなく、強いワクチン接種応答が誘導された。

【０２９５】

序論

赤血球は、ヒトの体内の細胞の８０％超を占め、組織への酸素送達という主要な機能を果

たす。酸素輸送に加え、赤血球はまた、免疫学的に非常に重要ないくつかのさらなる機能も果たす。例えば、天然の寿命が尽きると、老化した赤血球は脾臓内で、非炎症性経路で食作用を受ける（1）。この独自の機構は、自己免疫障害における応用および抗薬物抗体の産生の低減のための抗原に対する寛容性の発現のためにすばらしく活用されている（2～4）。具体的には、赤血球膜に結合している抗原性ペプチドが脾臓内で、老化した赤血球とともに捕捉され、したがって、赤血球に独自の捕捉の非炎症性経路のため抗原に対する寛容原性応答が生じる。

【０２９６】

最近、赤血球は、別の興味深い対照的な自然免疫機能に関与しているとみられている（5,6）。具体的には、赤血球は、循環系内の免疫複合体および細菌を自身の表面上に捕捉し、これを肝臓内のクッパー細胞および脾臓内のプロフェッショナル抗原提示細胞（APC）に、担体赤血球を捕捉することなく渡す（7～11）。血中の細菌種、例えばブドウ球菌属（Staphylococcus）およびプロピオニバクテリウム属（Propionibacterium）は静電誘引のため赤血球膜に結合し、担体赤血球によるオキシサイトーシス（oxycytosis）によって死滅する。その後、赤血球はこれを、自身が封鎖されることなく肝臓および脾臓内の細胞に譲り渡す（9,12）。APCによる選択的カーゴ取込みの厳密な機構は不明であるが、細菌カーゴによって誘導される一過的な膜改変が赤血球とAPC間のクロストークの増強に関与しているとみられる（13,14）。ここで、本発明者らは、脾臓内に抗原を提示するというこの赤血球の生来の独自の能力を活用し、抗原に対する細胞免疫応答および体液性免疫応答を生じさせるためのバイオミメティクスストラテジーを開発する（図47A～47F）。

【０２９７】

赤血球に分子を結合することは、いくつかの生物医学的用途で活用されている（15）。一連のペイロード、例えばタンパク質（2～4）、治療薬（16）およびナノ粒子（17～19）が、種々の治療用途のために赤血球表面に結合されているか、あるいは赤血球内に封入されている（20）。赤血球表面へのカーゴの結合は、化学的コンジュゲーション（16）、グリコホリンAなどの特異的受容体との結合（4）、ソルタギング（2）または受動吸着（19）により、酸素輸送というその生理学的機能が損なわれることなくもたらされている。赤血球上への便乗のこれまでのアプローチはすべて、担体赤血球に誘導される摂動を最小限にすることに基づいており、これにより、注射後において循環が長期化するか、または毛細血管内皮内に捕捉されるかのいずれかとなっている（17,19,21）。ここで、本発明者らは、本発明者らが赤血球駆動型免疫標的指向化（Erythrocyte Driven Immune Targeting）（EDIT）と称する方法である、結合しているナノ粒子の送達を肺ではなく主に脾臓に誘導して細胞性免疫および体液性免疫を得る便乗系を作り出した。

【０２９８】

結果

抗原性カーゴの合成および特性評価

モデル抗原としてオボアルブミン（OVA）を選択し、200 nmのカルボキシル基含有ポリスチレン（PS-COOH）の表面をキャップして、タンパク質でキャップされたナノ粒子（NP）を作成し、これを赤血球に結合させた（図48A）。1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（EDC）ケミストリーを用いて既報のとおりにOVAを200 nmのNPに結合させた（22）。NP上におけるOVAの搭載は広い範囲にわたって制御することができた（図52A～52B）が、約43 ug/mgという中間の搭載量の粒子を残部の試験で使用した（図48B）。ナノ粒子に対するOVA結合をサイズおよびゼータ電位の測定によって確認した。OVA結合によってNPの流体力学的サイズが191 nmから234 nmに増大した（図48C）。さらに、NP上におけるカルボキシル基のコンジュゲーションもまた、-40.4 mVから-21.4 mVまでのゼータ電位の低下から明らかであった（図48D）。OVAコンジュゲーションはNPの多分散度に影響を及ぼさなかった（図48E）。これは、走査型電子顕微鏡法（SEM）を行なうことによってさらに確認された。未修飾のナノ粒子およびコンジュゲート型ナノ粒子のSEM画像は、どちらの場合も単分散性のナノ粒子を示し（図48F）、OVAコンジュゲーションが有した多分散度に対する効果は無視できることが示される。

【０２９９】
物理化学的特性の特性評価の他に、本発明者らはまた、OVA-NPを樹状細胞の活性化による内在化についても特性評価した。OVAおよびOVA-NPはどちらも樹状細胞によって取り込まれた（図53A）。しかしながら、OVA-NPは遊離OVAと比べて有意に多い量で取り込まれ、これは共焦点走査型レーザー顕微鏡法（CLSM）画像によっても確認された（図53B）。CD80の上方調節の観点から評価される、樹状細胞に対する共刺激効果により、OVA-NPは、その可溶性対応物と比べてCD80発現を有意に上方調節し、陽性対照のリポ多糖（LPS）と同等であることが明らかになった（図48G）。本発明者らはまた、500 nmのPSをOVAで、200 nmのPLGAをOVAで（PLGA-OVA-200）、および200 nmのPS-COOHをスカシガイヘモシアニン（KLH）のサブユニット1で（PS-KLH-200）キャッピングし、このアプローチの一般性を確認した。それぞれのタンパク質を種々の型の粒子に同じEDCケミストリーを用いて結合させたこれらの組み合わせの粒子の物理化学的特性を評価し（表６）、また、これらの粒子を、樹状細胞によって内在化された状態になり、その結果として細胞を活性化する能力についても特性評価した（図54A～54D）。粒子はすべて単分散型であり、樹状細胞の活性化による優れた内在化を示した。裸のナノ粒子自体、細胞を成熟させることができる（23）が、OVA-NPの便乗の有益性のアセスメントにおいて特に重要ではなく、したがって本試験には含めなかった。

【０３００】
脾臓内への引き渡しを得るためのナノ粒子-赤血球便乗の改変
ナノ粒子の便乗は、本質的に物理的な2つの工程（17,19,24）である、接触を開始するための赤血球表面におけるナノ粒子の吸着と、接着強度を向上させるためのナノ粒子周囲の膜の伸展とによって起こる。これらのいずれか一方では充分でない。ナノ粒子が赤血球と接触しない場合、接着は開始されず、膜の伸展が抑止された場合、接着は弱く、ナノ粒子は洗浄中に脱落する。結合の際に競合タンパク質（血清）の導入があると、便乗は本質的に抑止される。この阻害効果は、血清の添加が25％であっても見られる。同時に、本発明者らのデータでは、グルタルアルデヒドで固定されたRBCを使用すると、膜が硬くなることによって便乗がほぼ消失することが実証されている（図55A～55C）。インキュベーションの際のNP：赤血球比を75:1から300:1に上げると、赤血球に結合するナノ粒子の数が細胞1つあたり12個から24個に増加した。しかしながら、比をさらに600:1に上げると、驚くべきことにナノ粒子の搭載は赤血球1つあたり約18個まで減少し、これはおそらく、便乗懸濁液中に過剰にナノ粒子が存在し、それにより、必要な赤血球-ナノ粒子相互作用が障害されたためである（図49A）。赤血球上のナノ粒子の存在は、SEM（図56A～56C）および便乗された赤血球のフローサイトメトリー解析によって確認した。具体的には、ナノ粒子担持赤血球の割合（％）は、75:1の比での68％から、600:1の比での＞95％に増大した（図49B）。

【０３０１】
赤血球への便乗は、肺毛細血管内における高剪断応力および内皮との密接な接触による赤血球の押し込みのために赤血球表面上のナノ粒子が肺内で剪断離脱するため、これまで肺への標的指向性に関して探索されてきた（17,18）。ナノ粒子担持赤血球が肺を逸出してそのカーゴを他の器官（この場合は脾臓）に送達するのを可能にするためには、肺での取込みを低減することが必須である。その趣旨で、本発明者らは、肺毛細血管に相当する6 Paの剪断応力において、NP：赤血球比の関数として便乗ナノ粒子のインビトロ剪断抵抗を試験した。赤血球からのNPの放出は、おそらく高粒子搭載量での赤血球の硬直のため、搭載量が75:1から600:1に上がるにつれて（図49C）、減少した（24）。したがって、粒子が肺内で機械的に外れるのを避けるためには、高ナノ粒子搭載量での充分な流動性/剪断抵抗性が必要とされる。

【０３０２】
脾臓への標的指向性は、肺内で機械的に外れるのを避けるために充分な搭載量、剪断抵抗性の維持、および脾臓内での捕捉を促すための赤血球膜改変の誘導によって媒介された。赤血球の膜の改変の程度は、NPの用量によって制御した。赤血球膜改変を、赤血球膜上

のホスファチジルセリン発現の観点から定量化した。300:1および600:1のNP：赤血球比での赤血球のインキュベーションにより、非搭載の未処理赤血球と比べてホスファチジルセリン発現の中程度の増大が引き起こされた（図49D）。また、便乗プロセスにより、おそらくナノ粒子による物理的マスキングのため、CD47発現が減少した（図57A）。さらに、光学的凝集アッセイにより、マトリックス形状の凝集塊が形成された陽性対照のポリスチレンビーズと比べて、ナノ粒子とともにインキュベートした赤血球の目視での凝集/連銭形成はないことが示された（図49E）。凝集がないことは、NP便乗赤血球をインビボで注射することが可能であることを示す（25）。

【０３０３】

インビボでのナノ粒子の分布に対するナノ粒子搭載の効果を、搭載比はすべて異なるが注射体積は同じ赤血球の静脈内注射の20分後の生体内分布を調べることにより評価した。採取した器官、特に肺および脾臓の蛍光強度を評価した（図49F）。低NP：赤血球比（75:1および150:1）では高い肺内:脾臓内集積比（約3）がもたらされたが、高搭載（300:1のNP：赤血球比では、肺内集積より高い脾臓内集積が示された（肺内:脾臓内の比は約0.8）。比をさらに600:1まで上げると、この場合も、おそらく300:1よりナノ粒子結合が少なくなるため肺内集積に有利であった（図49A）。PS発現データ（図49D）は、赤血球膜は600:1のインキュベーション比で最も影響を受けることを示す。まとめると、このような研究結果は、300:1が（例えばこの条件下での）脾臓への標的指向性に最適な搭載比であることを示す（図49G）。したがって、300:1のNP：赤血球比を残部の試験に選択した。本発明者らの最適な系のための肺内:脾臓内集積比は、1未満である（肺内において＜40%ID/g）。肺を標的とする赤血球便乗ナノ粒子に関する典型的な試験におけるこの比率は、約10である（肺内において＞100%までのID/g）（17）。本発明者らはまた、赤血球とナノ粒子をフローサイトメトリーによって別々に追跡することにより、注射された便乗ナノ粒子（300:1のNP：赤血球比）の薬物動態も評価した。注射された赤血球の割合は注射後、時間とともに（≦24時間）変化はなかったが、便乗ナノ粒子は血流から急速に消失し、注射の20分後という早期の時点で循環系内に残存しているのは1%未満であり、血流からの急速なクリアランスが示された（図49H）。これにより、おそらく便乗された赤血球上のホスファチジルセリン発現がナノ粒子の引き渡し後に減少するために、赤血球はそのペイロードを特定の器官に速やかに送達できるとともに自身のクリアランスに耐えることができることが明白に示された（図57B）。

【０３０４】

次に、本発明者らは、静脈内注射の20分後、6時間後および24時間後の便乗ナノ粒子の経時的生体内分布を調べ、これを等価な遊離のナノ粒子の生体内分布と比較した（図49I、58A～58B）。遊離のナノ粒子は肝臓および脾臓内に集積した。赤血球に便乗しているNPは、脾臓内の方が高い集積を示した（図49J）。赤血球への便乗を用いることで約150%ID/gの脾臓用量が得られたのは本発明者らの試験が初めてである。脾臓内の集積の方が高いこと（対照と比べて約1.5倍の改善）は、6時間後であっても遊離のナノ粒子と比べて有意であり、注射の24時間後に至るまで維持された（図49J）。さらなる試験により、試験した他の粒子の組み合わせでも一過的なダメージを誘導することができ、このストラテジーにより、さまざまな粒子で引き渡しを行なうことができることが明らかになった（図59A～59D）。

【０３０５】

赤血球によって脾臓に送達されたナノ粒子が食細胞によって、またはプロフェッショナル抗原提示細胞（APC）によってピックアップされるかどうかをアセスメントするため、本発明者らは、マウスにおいてクロドロネート（26）を用いて食細胞枯渇を行ない、便乗ナノ粒子の注射の20分後に生体内分布を調べ、2つの免疫学的に活性な器官、肝臓および脾臓を送達効率の変化について評価した。クロドロネートリポソームは、肝臓の類洞（sinus）および脾臓内の細網内皮系のマクロファージを一過的に無能力にする（26）。この介入により、認識機能、食作用および外来化合物の提示が、宿主防御において抗原提示機能を引き継ぐ他の細胞、例えば樹状細胞に委任されることになる。食細胞枯渇によって肝臓

内取込みが有意に低減された（約2.5倍）が、脾臓内取込みには有意な変化は引き起こされず、脾臓内のナノ粒子がバイアブルであり、APCによって内在化され、食作用を受けないことが示された（図49K）。

【０３０６】

脾臓内へのナノ粒子の引き渡しの免疫学的帰結

本発明者らは、赤血球表面から脾臓に送達された便乗ナノ粒子の体液性応答および細胞性応答の両方を特性評価した。体液性免疫では、本発明者らは、週に1回の注射を3週間の後、2回のミョウバンベースの体液性抗原刺激で構成されるワクチン接種スケジュールを使用した（図50A）。抗原刺激の1日前（-1日目）の抗OVA抗体（IgG）力価は、便乗OVA-NP、遊離OVA-NPまたは可溶性OVA間に有意差は示されなかった。最後の抗原刺激の13日後に評価した抗体力価は便乗OVA-NP（EDIT）で最も高く、遊離のナノ粒子より有意に高く（約3倍）可溶性タンパク質より有意に高かった（約4倍）。OVA-NPと遊離OVA間に差はみられなかった（図50B）。これにより、その他の群と比べて高いOVA特異的体液性応答を誘導するEDITの能力が実証された。

【０３０７】

また、EDITによって生じる細胞性免疫もアセスメントした。マウスをEDITまたはOVA-NPにより週1回で3週間、免疫処置し、採取した脾細胞での包括的免疫プロファイリングを、最後のワクチン接種の5日後に行なった（図50C）。フローサイトメトリー解析により、EDITでは、脾臓内において対照群と比べてCD3＋CD8＋細胞の有意な向上が示されることが示された（約1.7倍）。興味深いことに、遊離のナノ粒子（NP）単独では同じ効果は示されなかった（図50D～50E）。CD8亜型のより掘り下げた解析を行ない、本発明者らは、一群の抗原感作T細胞に相当する（27,28）CCR7＋CD62L＋T細胞が、EDIT群では遊離NP群および対照群の両方と比べて顕著に増加していることを見出した。具体的には、EDIT群は未処理群およびOVA-NP群よりそれぞれ8倍および2.2倍多い抗原感作細胞を有していた（図50F～50G）。さらに、本発明者らの解析により、抗原感作セントラルメモリーT細胞の増加は、対応するCD25＋FOXP3＋制御性T細胞表現型の減少とも関連していることも明らかになり、EDIT群は未処理群またはOVA-NP群よりそれぞれ、4倍および2.5倍少ないTreg細胞を有していた（図50H～50I）。肺組織において局所的に有意な細胞性免疫効果はみられず（図60A～60B）、脾臓送達およびその結果としての全身性効果の方が支配的であることが示された。

【０３０８】

免疫応答の向上により腫瘍予防モデルにおいて介入時間枠が改善される

細胞性治療応答を誘導するEDITの能力を試験するため、本発明者らは、マウスをOVA、EDIT、または遊離OVA-NPで週1回、3週間、免疫処置する予防ワクチン接種試験を設計した。陽性対照としてCpGを使用した。最後のワクチン接種の1日後、EG-7 OVA細胞の皮下移植によってマウスを抗原刺激し、腫瘍増殖をモニタリングした（図51A）。体重によって示されるように、ワクチン接種の間、いずれの処置群にも明白な毒性は誘導されなかった（図61）。また、最後のワクチン接種後、種々の処置群を注射したマウスから脾細胞を単離し、そのインビトロ特異的標的細胞死滅能力を評価した。EDITで免疫処置したマウス由来の脾細胞では、標的に対するエフェクターの比（E:T比）が低くても有意な特異的死滅が実証された（図51B）。EDIT群のみで、試験した全ての比率において死滅効率の変化倍数が1より上に維持された（図51C）。これらの両方の試験により、EDITでは任意の他のワクチン接種と比べて高いOVA特異的応答が誘導されることが示された。腫瘍増殖動態により、EDIT免疫処置が有効であったことが明白に実証されている。具体的には、腫瘍移植の17日後、EDIT免疫処置により対照群と比べて約2.9倍遅い増殖がもたらされたが、遊離のNP群では対照群と比べて有意差は示されず（図51D）、一方、13日目、EDITでは対照群およびNP群と比べて約4.6倍および約3.5倍がもたらされた（図51E）。換言すると、EDIT免疫処置によって誘導されたセントラルメモリーは、抗原で刺激した場合にEG-7 OVAに対するエフェクター免疫応答において成功裡に現れ、外来アジュバントを必要とすることなく、腫瘍増殖速度を陽性対照CpGと同程度に有効に有意に遅くすることができる

。遊離NP自体はかかるメモリー効果を示さない。種々の処置群全ての個々の腫瘍増殖曲線は、対照群およびNP群では、増殖曲線がEDIT群およびCpG群と比べてずっと速く指数関数的であることを示す（図51F～51I）。驚いたことに、EDIT群のマウスのうち1匹は試験過程全体を通して無腫瘍のままであった。EDITによって腫瘍の指数関数性が有意に延期され、それにより代替ストラテジーでの治療介入のための時間枠が増えた。

【０３０９】

考察

赤血球は、酸素供給プロセスを行なうことにより、生理学的恒常性の維持に重要な役割を果たす。しかしながら、赤血球は自然免疫系の積極的な構成員でもある。一部の特定の病原体は赤血球の細胞膜に結合することができ、赤血球内の酸化種によって無力化され、最終的に脾臓内の免疫細胞に物理的に引き渡されることが報告されている（8,9）。これにより、赤血球の表面から脾臓への抗原提示を活用する、脾臓を標的とするためのバイオミメティクスストラテジーである赤血球駆動型免疫標的指向化（EDIT）を開発する真の機会がもたらされる。

【０３１０】

従来より、赤血球への便乗は、肺毛細血管内での赤血球の伸長によって起こる剪断応力によって肺内で粒子を外し得るため、肺標的指向化用途のために探索されている（17,18）。これにより、カーゴを脾臓に送達することが難しくなっている。ナノ粒子の分布を肺から脾臓にそらすことにおける支配的な要素は、赤血球に対するナノ粒子の初期供給比であった。このパラメータの調整によって肺内における剪断抵抗の改善が補助され、したがって肺で脱離するナノ粒子の割合をより少なくすることが可能となり、したがって、より多くの割合が、別の場所を標的とするのに利用可能となった。同時に、赤血球膜に対してわずかな改変を誘導すると、脾臓を天然の標的にすることが可能となった。インビトロ剪断試験により、NP:赤血球供給比を上げると剪断誘導性脱離が有意に低減されることが示された。高いNP:赤血球供給比では、便乗された赤血球上のナノ粒子密度が高くなることが、おそらく、この剪断抵抗の改善の原因である。赤血球は搭載が多いほど硬くなり、したがって肺毛細血管内での生体機械伸長に抵抗し（24）、それにより肺内集積が低減される。赤血球の表面から脾臓内のAPCへの病原体移動の天然経路は不明であったが、接着性病原体によって引き起こされる膜改変が強く関与しているとみられている。この属性を本発明者らの系において、供給物のNP：赤血球比を制御し、ホスファチジルセリンの上方調節の観点から、一時的なダメージを評価することにより、改変した。ホスファチジルセリンの上方調節は、赤血球との樹状細胞の相互作用を促進させることが公知である（13,14）。これにより、高いナノ粒子：赤血球比におけるCD47受容体のマスキングと合わさって、おそらく、「自己喪失」赤血球上のナノ粒子がこの細胞による取込みを受けやすくなっている（29）。

【０３１１】

インビトロ剪断抵抗および一過的なホスファチジルセリン発現に対するNP：赤血球比の効果に基づき、最適なNP：赤血球の比として300:1を選択した。また、この比では、脾臓におけるナノ粒子の効率的な送達および持続的存在ももたらされた。赤血球またはその膜に関する過去の研究（その老化が脾臓への標的指向化に活用された）とは対照的に、本発明者らの場合では、粒子のみが脾臓に送達される一方で赤血球は循環系内に残存し続け、赤血球膜へのダメージは、一時的なものであって、脾臓への引き渡しに充分であるが、赤血球自体の隔離をもたらさないことが示される。このように、EDITにより、脾臓（特に脾臓における抗原提示細胞）への標的指向化のための新たな経路がもたらされる。食細胞枯渇試験により脾臓内の粒子は食細胞内には位置していないことが示され、これは、当該粒子はAPC内に存在することを示しており、この存在は免疫調節に活用可能である。

【０３１２】

全般的に、体液性免疫応答および細胞性免疫応答の治療的評価では、それぞれのOVA負荷は、処置を行なった後に行ない、治療の転帰をモニタリングした。したがって、このような実験デザインにより、本発明者らは、本発明者らの予防ワクチン接種に対するメモリ

ー応答を追跡することができた。体液性免疫応答および細胞性免疫応答は強いワクチン接種効果を示し、EDITでは、遊離のナノ粒子と比べて3倍高い抗体力価、2.2倍多い抗原感作セントラルメモリーT細胞および2.5倍少ない制御性T細胞が示された。さらに、転帰をELISA（抗OVA IgG抗体について）および特異的細胞死滅アッセイ（脾細胞の細胞毒性について）によってアセスメントし、これらの応答が高度に特異的であることが示された。

【０３１３】

このアジュバント効果は、血液媒介性感染症、例えばマラリアに対するワクチン接種のために有効に使用され得、全般的な思想を、静脈内ワクチン接種後の全身性または組織特異的メモリー応答を発現させるためにあてはめることができる（17,30）。概念実証として、EDITによって生じた免疫応答は予防モデルにおいて治療応答を推進するために成功裡に利用された。EDIT媒介性免疫処置では、がん免疫サイクル（31）の平衡相を増大させることによって腫瘍増殖を有意に減速させることができ、外来アジュバントCpGと等しく良好に機能し、それにより治療介入の時間枠が増大した。CpGとEDITのストラテジー間にはいくつかの違いが認められ得る。非天然分子であるCpGとは異なり、RBCはここでは天然アジュバントとしての機能を果たす。さらに、CpGは一般的にワクチンと混合され、したがって注射部位から離れて拡散することが可能であり、これは潜在的な安全性の懸念が生じ得る。対照的に、EDITは、ナノ粒子が摂動状態の赤血球に結合している場合でのみ活性であり、これにより本質的に安全性プロフィールが改善される。最後に、本発明者らのデータにより、EDITには、種々のサイズのもの、合成材料または生体材料のものを含む200 nmを超えるPSのナノ粒子を組み込むことができることが確認される。

【０３１４】

したがって、EDITによりワクチン接種ストラテジーのための新たな展望がもたらされる。いくつかのアジュバントが文献に報告されており、クリニックで使用されている（32）。多くの場合、アジュバントは非ヒト起源であり、それがなぜ免疫応答が誘発されるのかの主な理由である。かかるアジュバントベースのストラテジーは、抗原を、最初のガストンラモンのミョウバンアジュバントのような免疫系を刺激するある種の外来の化学薬品/物質と混合することに基づいている。対照的に、本発明者らは、「天然アジュバントとしての機能を果たして免疫応答を刺激する、抗原の赤血球媒介性送達を報告する。身体の最も「自己」である細胞に基づくアジュバントフリー治療薬は安全なワクチンの開発を推し進める独自の様式である。

【０３１５】

要約すると、本発明者らは、赤血球の自然免疫機能を利用して脾臓への効率的なナノ粒子の引き渡しを改変するバイオミメティクスストラテジーを開発した。基本的に、これは、ナノ粒子自体に対する大がかりな修飾を伴わない、ナノ粒子を脾臓に送達するための新規な経路である。EDITによるナノ粒子の引き渡しにより、治療応答を推進し得る強い免疫学的記憶がもたらされた。このプラットフォームは、特定の修飾なしにナノ粒子を脾臓へと標的指向化するための融通のきくストラテジーである。

【０３１６】

材料および方法

材料

カルボン酸ポリスチレンナノ粒子はPolysciences,Inc.（PA,USA）から購入した。PLGAナノ粒子およびヘキサメチルジシラザン（HMDS）はSigma Aldrich（MO,USA）から購入した。GM-CSFはPeproTech（NJ,USA）から入手した。Nunc（商標）Lab-Tek（商標）II Chamber Slide（商標）System、細胞染色バッファー、Alexa Fluor 647オボアルブミン、Alexa Fluor 647 NHS試薬およびリン酸緩衝生理食塩水（1×）、1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（EDC）、2-（N-モルホリノ）エタンスルホン酸（MES）は、Thermo Fischer Scientific（MA,USA）から入手した。ヘパリンリチウムコートマイクロティナチューブはBD medical technology（MA,USA）から入手した。組織解離チューブおよび肺解離キットはMiltenyi Biotec（Germany）から入手した。0.9％生理食塩液はTeknova（CA,USA）から入手した。パラホルムアルデヒドはE

lectron Microscopy sciences（PA,USA）から入手した。Clodrosome（登録商標）はEncapsula NanoSciences（TN,USA）から入手した。免疫細胞染色用の蛍光プローブコンジュゲート型抗体はすべて、Biolegend（CA,USA）から購入した。

【０３１７】

抗原コートポリスチレンナノ粒子の調製および特性評価

抗原コートポリスチレンナノ粒子を、EDCベースの方法を用いて調製した。簡単には、表面カルボン酸基（PS-COOH）を有する2 mgのポリスチレンナノ粒子をMESバッファー（pH5.5）中に15分間懸濁させ、カルボン酸基を活性化した。続いて、1 mgの抗原タンパク質を添加し、穏やかな振盪下、室温で4時間反応させた。未コンジュゲートタンパク質を、12000 gで15分間のナノ粒子の遠心分離によって排除した。タンパク質のコンジュゲーション効率を、上清み中の未コンジュゲートタンパク質を、蛍光ベースの方法を用いて定量することによって測定した。タンパク質コートナノ粒子を、脱イオン（DI）水を用いて2回洗浄した。粒子をDI水中に再懸濁させ、そのサイズ、ゼータ電位および多分散指数について、動的光散乱（Malvern Zen3600,PA,USA）および走査型電子顕微鏡法（Zeiss FESEM Supra 55VP,Zeiss FESEM Ultra 55,Germany）を用いてアセスメントした。ナノ粒子を使用直前に1×PBS中に再懸濁させた。抗原コートPLGAナノ粒子を、同じ方法を用いて調製した。

【０３１８】

樹状細胞（DC）によるナノ粒子の内在化およびナノ粒子によるDCの活性化

JAWII DC（ATCC（登録商標）CRL-11904（商標））をATCC（VA,USA）から入手した。これを、リボヌクレオシド、デオキシリボヌクレオシド、4 mMのL-グルタミン、1 mMのピルビン酸ナトリウムおよび5 ng/mlのマウスGM-CSF,80%;ウシ胎仔血清,20%を有するアルファ最小必須培地中で培養した。抗原でコートされたナノ粒子の内在化を、フローサイトメトリーおよび共焦点顕微鏡法によって評価した。フローサイトメトリー解析では、2×10^6個のJAWII DCを12ウェルプレート内に播種し、一晩接着させた。培地を交換した後、ナノ粒子を添加した。Alexa Fluor 647で標識した、抗原でコートされたナノ粒子30μgを各ウェルに添加し、37℃で24時間インキュベートした。次いで培地を除去し、細胞を、PBSを用いて3回洗浄した。細胞を、セルスクラッパーを用いて軽くスクラップした。この細胞をフローサイトメトリー（BD LSR Analyzer II,CA,USA）によって解析した。共焦点顕微鏡法では、2×10^5個のJAWII DCを2ウェルチャンバに播種し、フローサイトメトリー解析の場合と同様に処理した。細胞をPBSで洗浄した後、細胞を4%（パラホルムアルデヒド）PFAで10分間固定した。次いで細胞を0.01%Triton-X100で透過処理し、細胞核をDAPIで染色した。処理した細胞に、共焦点顕微鏡法（Upright Zeiss LSM 710 NLO ready）によってイメージングを行なった。

【０３１９】

抗原でコートされたナノ粒子によるDCの活性化を評価するため、2×10^6個のJAWII DCを12ウェルプレート内に播種し、一晩接着させた。細胞を、抗原でコートされたナノ粒子とともに、ナノ粒子取込みのフローサイトメトリー解析と同じプロトコルを用いてインキュベートした。処理後、細胞をPBSで3回洗浄し、ウェルから0.25%トリプシン/EDTA溶液を用いて剥がした。細胞を、フロー用染色バッファーを用いて2回洗浄し、CD80についてPE-CD80抗体（Biolegend,CA,USA）を用いて染色した。染色された細胞をフローサイトメトリー（BD LSR Analyzer II,CA,USA）によって解析した。

【０３２０】

抗原でコートされたナノ粒子の赤血球細胞（RBC）への便乗

マウス全血を、末梢からの（terminal）心臓穿刺により、ヘパリンコートシリンジを用いて収集し、BD Microtainer血液収集チューブ内に保存した。氷上で＞30分間撹拌した後、収集した全血を1000 gで10分間、4℃にて遠心分離し、血清およびバフィーコート層を除去した。RBC層を、冷PBSを用いて3回洗浄し、650 gで15分間4℃にて遠心分離した。洗浄されたRBCをPBS中に、10%（RBCストック溶液）のヘマトクリットで再懸濁させ、後の使用のために4℃で保存した。

【０３２１】
抗原でコートされたナノ粒子のRBCへの便乗を、既報の方法（18）を用いて実施した。簡単には、上下逆さにすること、およびピペッティングによって、等体積の抗原コートナノ粒子を等体積の10％RBCストック溶液と混合した。次いでこの混合物をリボルバー上で12 rpmにて40分間回転させた。便乗されたRBCを未結合のナノ粒子から4℃にて100 gで5分間の遠心分離によって分離した。次いで、便乗された試料を、PBSを用いて2回洗浄し、最後に、さらなる特性評価および後の使用のためにPBS中に10％（v/v）の濃度で再懸濁させた。RBC上の便乗ナノ粒子の数を、蛍光ベースの方法を用いて定量した。25μLの便乗されたRBC試料（既知数のRBCを有する）を、DI水を用いて溶解させ、ナノ粒子濃度を、ナノ粒子の蛍光をプレートリーダーにて測定することにより定量した。種々のナノ粒子対RBC比でのナノ粒子担持RBCの割合（％）を、フローサイトメトリー（BD LSR Analyzer II,CA,USA）を使用し、Alexa Fluor 647蛍光を用いて求め、共焦点顕微鏡法（Upright Zeiss LSM 710 NLO ready,Germany）によって確認した。走査型電子顕微鏡法（SEM）（Zeiss FESEM Supra 55VP,Zeiss FESEM Ultra 55）を用いて、抗原でコートされたナノ粒子のRBCへの便乗を確認した。簡単には、便乗された試料を、4％グルタルアルデヒドを用いて1時間固定した。これをPBSで2回洗浄して未反応のグルタルアルデヒドを除去した。次に、固定された便乗された細胞を漸増エタノール濃度（50から100％v/v）での逐次洗浄に供した後、最後に、これをヘキサメチルジシラザン（HMDS）中に再懸濁させ、その後、イメージングを行なった。インビトロ剪断試験を既報のとおりに行なった（18）。簡単には、便乗されたRBCを10 mlのウシ胎仔血清中に再懸濁させ、6 Paの回転剪断を、クエット型粘度計（AR-G2,TA Instruments,DE,USA）を用いて20分間印加した。結合状態のままのナノ粒子を、蛍光を用いて既報のとおりに定量した。

【０３２２】
担体RBCへのナノ粒子の便乗の影響を、既報のような凝集アッセイ（25）およびホスファチジルセリン（PS）アッセイ（24）によって評価した。簡単には、凝集アッセイでは、1％のヘマトクリットの未処理RBCまたは便乗されたRBCを96ウェルU底プレート上に分注した。プレートをそのまま37℃で1時間置き、次いで凝集をアセスメントした。担体赤血球に対するダメージが報告されていることを考慮して200 nmのカルボン酸ポリスチレンナノ粒子に便乗されたRBCを陽性対照として使用した。PSアッセイでは、0.01％のヘマトクリットの未処理RBCおよび便乗されたRBCを、蛍光性Annexin V-Alexa Fluor 488（PSに結合）とともに15分間、2 mMの$CaCl_2$を含むバッファー中でインキュベートした。染色した後、試料を、フローサイトメトリー（BD LSR Analyzer II,CA,USA）を用いて解析した。

【０３２３】
動物
雌のBalb/cおよびC57BL/6マウス（7～9週齢）をCharles River Laboratories（MA,USA）から購入した。動物実験はすべて、ケンブリッジにあるハーバード大学の文理学部の動物実験委員会により承認済のプロトコルに従って行なった。

【０３２４】
生体内分布試験
生体内分布試験はすべて、健常雌Balb/cマウスにおいて行なった。生体内分布試験用の抗原コートナノ粒子はAlexa Fluor 647標識抗原を用いて調製した。簡単には、雌Balb/cマウス（7～9週齢）に、遊離または便乗抗原ナノ粒子を、7 ugの抗原を含む用量で静脈内投与した。食細胞枯渇を伴う試験では、食細胞は、製剤のi.v.注射の48時間前に、5 mg/mLのクロドロネートを含む200μLのClodrosome（登録商標）のi.v.投与によって枯渇させた。製剤投与の20分後、6時間後または24時間後、マウスを安楽死させ、血液、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺および脳を含む主要器官を摘出した。抽出した器官イメージングを、インビボイメージング（PerkinElmer IVIS Spectrum,MA,USA）を用いて行なった。器官内の蛍光を、IVISソフトウェアを用いて、器官のROIを解析することにより定量した。関心対象の器官における蛍光量を、試験した全ての器官における全蛍光量で割り算す

ることによって、器官内に集積したナノ粒子の注入量パーセント（ID%）を推定した。

【０３２５】

便乗系のインビボ追跡では、RBCをCellTrace（商標）CFSEによって標識し、抗原でコートされたナノ粒子をAlexa Fluor 647によって標識した。この二重標識便乗系を雌Balb/cマウス（7～9週齢）にi.v.投与した。血液を所定の時点（投与の0分後、20分後、6時間後および24時間後）に収集した。収集された血液をフロー用染色バッファー中で1:100の希釈率で希釈し、フローサイトメトリー（BD LSR Analyzer II,CA,USA）によって解析した。

【０３２６】

EDITによって誘導された免疫応答の特性評価

EDITによって誘導された体液性免疫応答および細胞性免疫応答を健常Balb/cマウスにおいてアセスメントした。体液性応答を評価するため、雌Balb/cマウス（7週齢）に遊離オボアルブミン（OVA）、OVAコートナノ粒子および便乗OVAコートナノ粒子を7 ugのOVAを含む用量で0、7および14日目にi.v.投与した。続いて、3回用量の免疫処置の7日後および14日後、マウスの皮下に2回用量のミョウバンアジュバント含有OVA（7 ugのOVAと70 ugのミョウバン）を負荷した。血液を、最初の用量の負荷の1日前および2回目の用量の負荷の13日後に収集した。収集された血液における抗OVA IgG抗体力価をELISAにより既報の方法を用いて測定した。（33）

【０３２７】

細胞性応答を評価するため、雌Balb/cマウス（7週齢）に生理食塩水、オボアルブミン（OVA）コートナノ粒子および便乗OVAコートナノ粒子を7 ugのOVAの用量で3回の用量を毎週（0、7および14日目）i.v.投与した。最後の用量の5日後（19日目）、マウスの脾臓および肺を収集した。器官の細胞の単細胞懸濁液を、対応する器官の解離キット（Miltenyi Biotec,Germany）を製造業者の使用説明書に従って用いて形成した。細胞を抗体で染色し、フローサイトメトリー（BD LSR Analyser II.,NJ USA）によって解析した。種々の抗体カクテルパネルを、CD45（Biolegend、カタログ番号:103116、クローン:30-F11）、CD3（Biolegend、カタログ番号:100218、クローン:17A2）、CD4（Biolegend、カタログ番号:100421、クローン:GK1.5）、CD8a（Biolegend、カタログ番号:100711、クローン:53-6.7）、NKp46（Biolegend、カタログ番号:137606、クローン:29A1.4）、CD11c（Biolegend、カタログ番号:117307、クローン:N418）、グランザイムB（Biolegend、カタログ番号:372208、クローン:QA16A02）、IFN-γ（Biolegend、カタログ番号:505849、クローン:XMG1.2）、IFN-γ（Biolegend、カタログ番号:505806、クローン:XMG1.2）、CD86（Biolegend、カタログ番号:105011、クローン:GL-1）およびAm Cyan Live/dead細胞染色キット（Thermo Fischer Scientific,MA,USA）から作成した。抗体はすべて、使用前に至適希釈率で希釈した。

【０３２８】

腫瘍試験

EG-7 OVA（ATCC（登録商標）CRL-2113（商標））をATCC（VA,USA）で入手した。細胞を、1.5 g/Lの重炭酸ナトリウム、4.5 g/Lのグルコース、10 mMのHEPESおよび1.0 mMのピルビン酸ナトリウムを含むように調整し、0.05 mMの2-メルカプトエタノールおよび0.4 mg/mlのG418,90%;ウシ胎仔血清,10%を補給した2 mMのL-グルタミンを有するRPMI 1640培地中で培養した。継代回数の少ない細胞は、インビボ使用前に2～3回継代した。

【０３２９】

EG-7 OVA腫瘍の増殖の制御におけるEDITの有効性を予防モデルにおいて試験した。雌C57BL/6マウス（7週齢）を遊離OVA（生理食塩水中）、OVAナノ粒子、便乗OVAナノ粒子および遊離OVA＋CpG ODN 1826（10 ug）で、7 ugのOVAを含む用量で0、7および14日目に免疫処置した。最後の免疫処置の1日後（15日目）、5×10^5個のEG-7 OVA細胞を右の乳腺脂肪体内に皮下移植した。腫瘍移植後、腫瘍サイズおよびマウスの体重をモニタリングした。

【０３３０】
統計解析
　統計解析はすべて、Graphpad prism 8ソフトウェアを用いて行なった。正規性検定を用いて正規性を調べた。スチューデントのt検定および一元配置ANOVAとテューキーのHSD検定を使用し、有意性を判定した：p＜0.05＊、p＜0.01＊＊、p＜0.001＊＊＊、p＜0.0001＊＊＊＊。フローサイトメトリー解析はすべて、FCS Express 7.0ソフトウェアを用いて行なった。
【０３３１】
参考文献
1. T. R. Klei, S. M. Meinderts, T. K. van den Berg, R. van Bruggen, From the Cradle to the Grave: The Role of Macrophages in Erythropoiesis and Erythrophagocytosis. *Front Immunol* **8**, 73 (2017).
2. N. Pishesha *et al.*, Engineered erythrocytes covalently linked to antigenic peptides can protect against autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, 3157-3162 (2017).
3. K. M. Lorentz, S. Kontos, G. Diaceri, H. Henry, J. A. Hubbell, Engineered binding to erythrocytes induces immunological tolerance to E. coli asparaginase. *Sci Adv* **1**, e1500112 (2015).
4. S. Kontos, I. C. Kourtis, K. Y. Dane, J. A. Hubbell, Engineering antigens for in situ erythrocyte binding induces T-cell deletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, E60-68 (2013).

5. H. L. Anderson, I. E. Brodsky, N. S. Mangalmurti, The Evolving Erythrocyte: Red Blood Cells as Modulators of Innate Immunity. *J Immunol* **201**, 1343-1351 (2018).
6. V. Pretini *et al.*, Red Blood Cells: Chasing Interactions. *Front Physiol* **10**, 945 (2019).
7. J. Baum, R. H. Ward, D. J. Conway, Natural selection on the erythrocyte surface. *Mol Biol Evol* **19**, 223-229 (2002).
8. H. Minasyan, Mechanisms and pathways for the clearance of bacteria from blood circulation in health and disease. *Pathophysiology* **23**, 61-66 (2016).
9. H. Minasyan, Phagocytosis and oxycytosis: two arms of human innate immunity. *Immunol Res* **66**, 271-280 (2018).
10. C. Halma *et al.*, Elimination of soluble 123I-labeled aggregates of IgG in patients with systemic lupus erythematosus. Effect of serum IgG and numbers of erythrocyte complement receptor type 1. *Arthritis Rheum* **34**, 442-452 (1991).
11. J. C. Edberg, E. Wright, R. P. Taylor, Quantitative analyses of the binding of soluble complement-fixing antibody/dsDNA immune complexes to CR1 on human red blood cells. *J Immunol* **139**, 3739-3747 (1987).
12. C. Damgaard *et al.*, Viable bacteria associated with red blood cells and plasma in freshly drawn blood donations. *PLoS One* **10**, e0120826 (2015).
13. D. B. Nguyen *et al.*, Regulation of phosphatidylserine exposure in red blood cells. *Cell Physiol Biochem* **28**, 847-856 (2011).
14. D. Z. de Back, E. B. Kostova, M. van Kraaij, T. K. van den Berg, R. van Bruggen, Of macrophages and red blood cells; a complex love story. *Front Physiol* **5**, 9 (2014).
15. C. H. Villa, A. C. Anselmo, S. Mitragotri, V. Muzykantov, Red blood cells: Supercarriers for drugs, biologicals, and nanoparticles and inspiration for advanced delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* **106**, 88-103 (2016).
16. K. Danielyan *et al.*, Cerebrovascular thromboprophylaxis in mice by erythrocyte-coupled tissue-type plasminogen activator. *Circulation* **118**, 1442-1449 (2008).
17. J. S. Brenner *et al.*, Red blood cell-hitchhiking boosts delivery of nanocarriers to chosen organs by orders of magnitude. *Nat Commun* **9**, 2684 (2018).
18. Z. Zhao, A. Ukidve, Y. Gao, J. Kim, S. Mitragotri, Erythrocyte leveraged chemotherapy (ELeCt): Nanoparticle assembly on erythrocyte surface to combat lung metastasis. *Sci Adv* **5**, eaax9250 (2019).
19. A. C. Anselmo *et al.*, Delivering nanoparticles to lungs while avoiding liver and spleen through adsorption on red blood cells. *ACS Nano* **7**, 11129-11137 (2013).
20. V. Bourgeaux, J. M. Lanao, B. E. Bax, Y. Godfrin, Drug-loaded erythrocytes: on the road toward marketing approval. *Drug Des Devel Ther* **10**, 665-676 (2016).

21. Z. Zhao, A. Ukidve, V. Krishnan, S. Mitragotri, Effect of physicochemical and surface properties on in vivo fate of drug nanocarriers. *Adv Drug Deliv Rev* **143**, 3-21 (2019).
22. S. Kumar, A. C. Anselmo, A. Banerjee, M. Zakrewsky, S. Mitragotri, Shape and size-dependent immune response to antigen-carrying nanoparticles. *J Control Release* **220**, 141-148 (2015).
23. S. U. Frick *et al.*, Functionalized polystyrene nanoparticles trigger human dendritic cell maturation resulting in enhanced CD4+ T cell activation. *Macromol Biosci* **12**, 1637-1647 (2012).
24. D. C. Pan *et al.*, Nanoparticle Properties Modulate Their Attachment and Effect on Carrier Red Blood Cells. *Sci Rep* **8**, 1615 (2018).
25. D. Pan *et al.*, The Effect of Polymeric Nanoparticles on Biocompatibility of Carrier Red Blood Cells. *PLoS One* **11**, e0152074 (2016).
26. S. G. Moreno, Depleting Macrophages In Vivo with Clodronate-Liposomes. *Methods Mol Biol* **1784**, 259-262 (2018).
27. M. D. Martin, V. P. Badovinac, Defining Memory CD8 T Cell. *Front Immunol* **9**, 2692 (2018).
28. H. Unsoeld, H. Pircher, Complex memory T-cell phenotypes revealed by coexpression of CD62L and CCR7. *J Virol* **79**, 4510-4513 (2005).
29. T. Yi *et al.*, Splenic Dendritic Cells Survey Red Blood Cells for Missing Self-CD47 to Trigger Adaptive Immune Responses. *Immunity* **43**, 764-775 (2015).
30. P. A. Darrah *et al.*, Prevention of tuberculosis in macaques after intravenous BCG immunization. *Nature* **577**, 95-102 (2020).
31. D. S. Chen, I. Mellman, Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* **39**, 1-10 (2013).
32. A. Di Pasquale, S. Preiss, F. Tavares Da Silva, N. Garcon, Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. *Vaccines (Basel)* **3**, 320-343 (2015).
33. Z. Zhao *et al.*, Engineering of a hybrid nanoparticle-based nicotine nanovaccine as a next-generation immunotherapeutic strategy against nicotine addiction: A focus on hapten density. *Biomaterials* **123**, 107-117 (2017).

【０３３２】

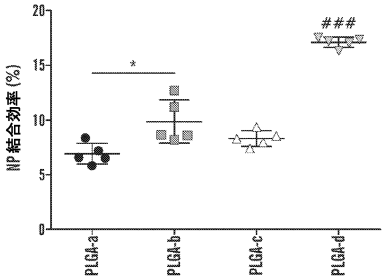
（表６）種々の粒子の組み合わせの物理化学的特性

粒子	サイズ (nm) *	多分散度 (PDI)*	ゼータ電位 (mV)*
PS-OVA-500	540.93 ± 13.03	0.072 ± 0.031	-21.5 ± 0.1
PLGA-OVA-200	155.73 ± 1.03	0.064 ±0.033	-21.26 ± 0.2
PS-KLH-200	261.43 ± 2.98	0.073 ± 0.01	-3.08 ± 0.21

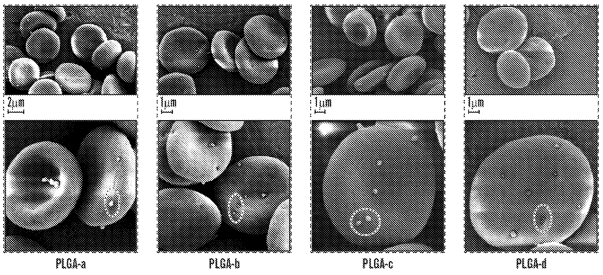
＊平均±s.e.m.として示したデータ

【図面】

【図１】

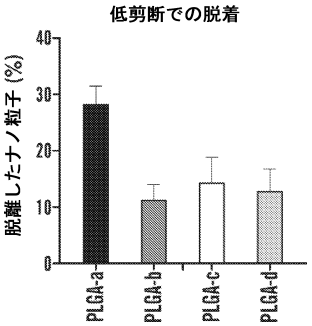


A

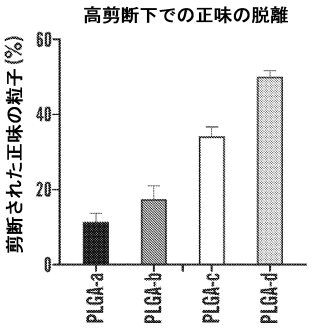


B

【図２】

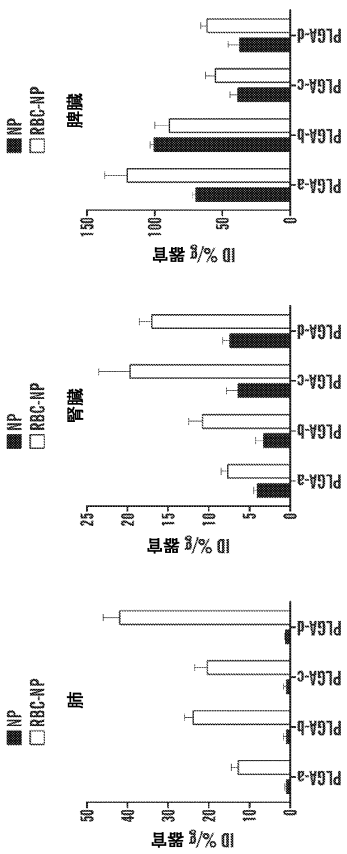


A

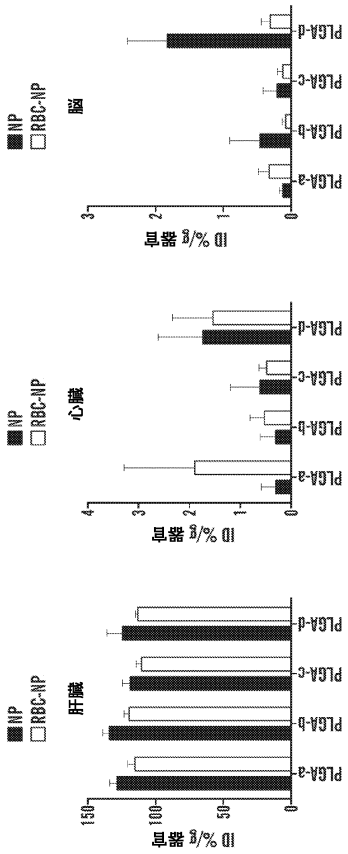


B

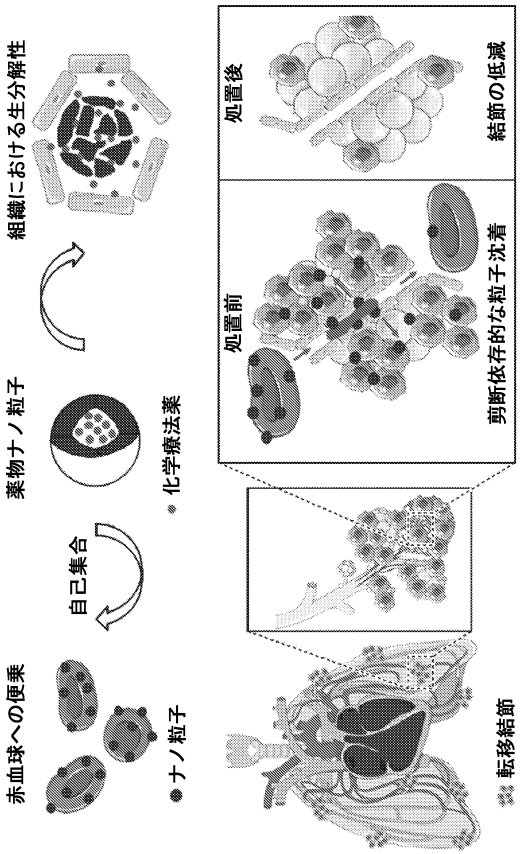
【図３－１】



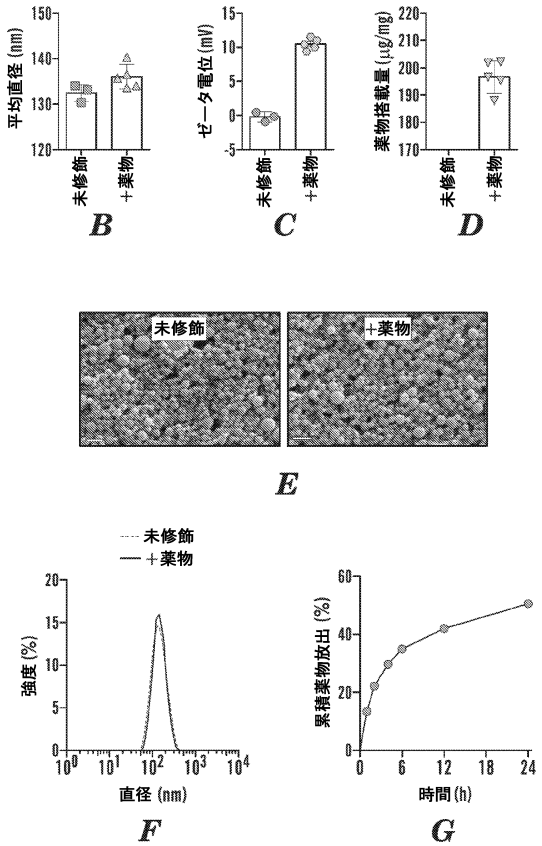
【図３－２】



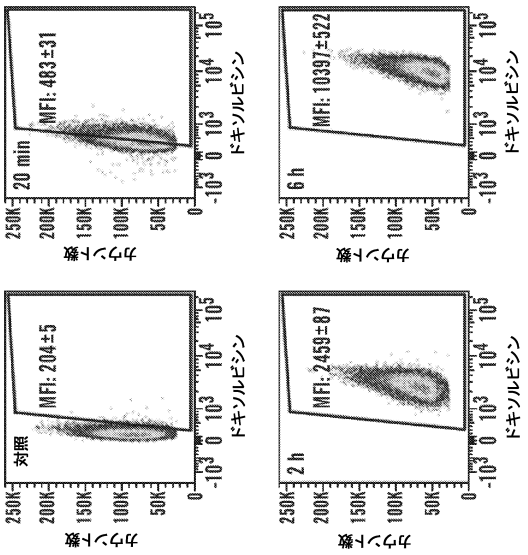
【図４－１】



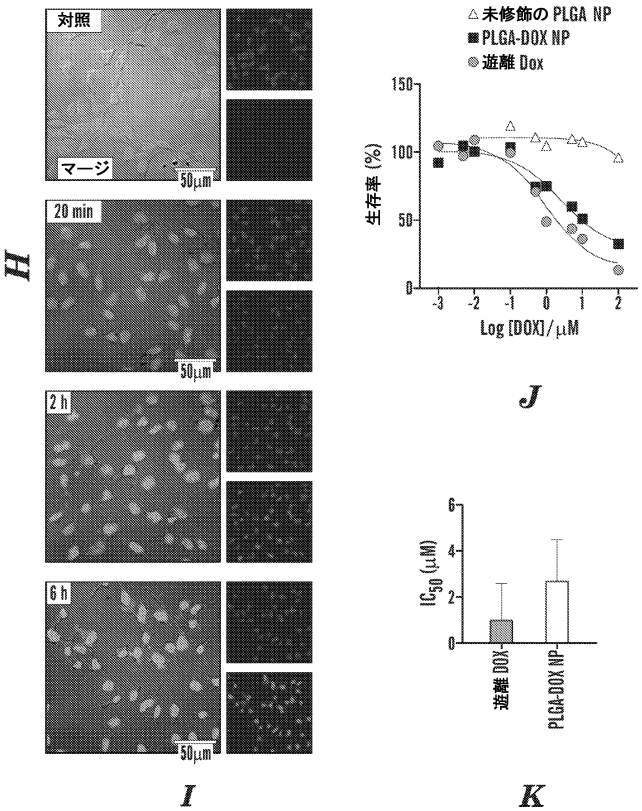
【図４－２】



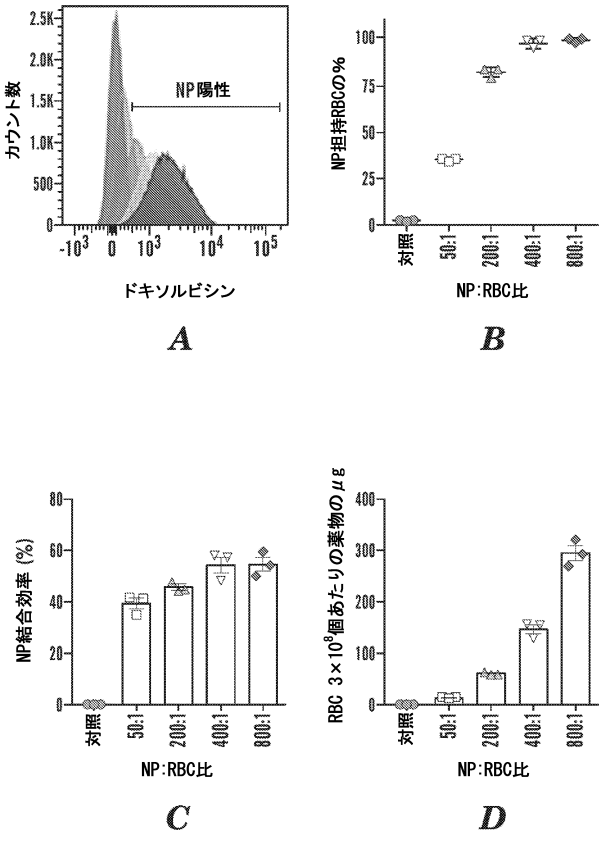
【図４－３】



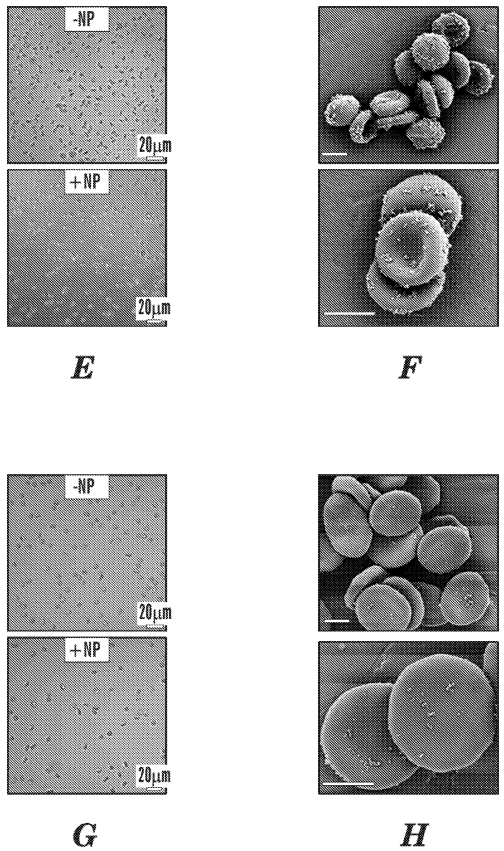
【図４－４】



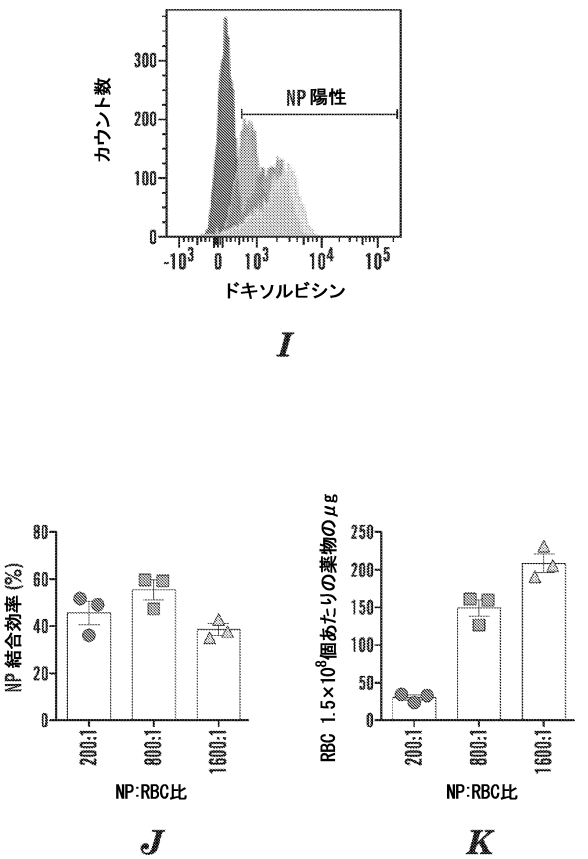
【図５－１】



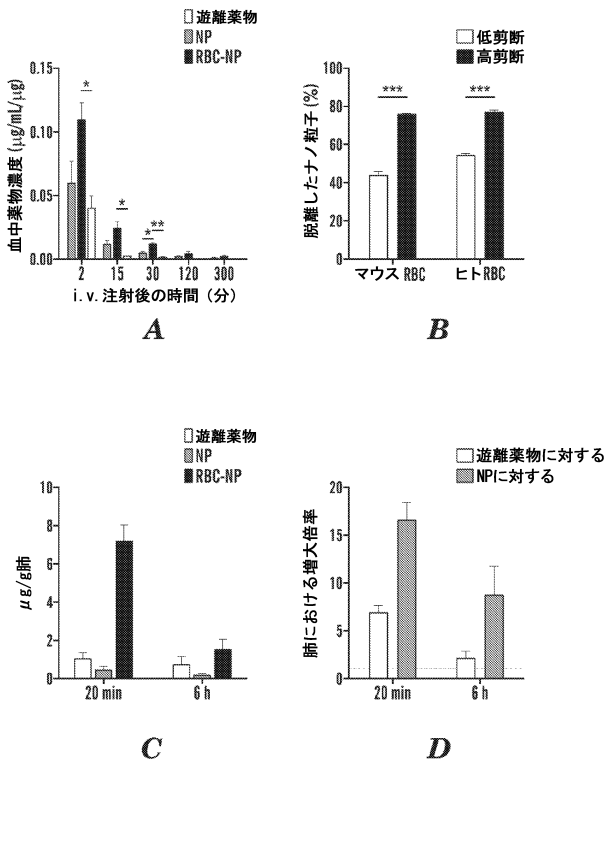
【図５－２】



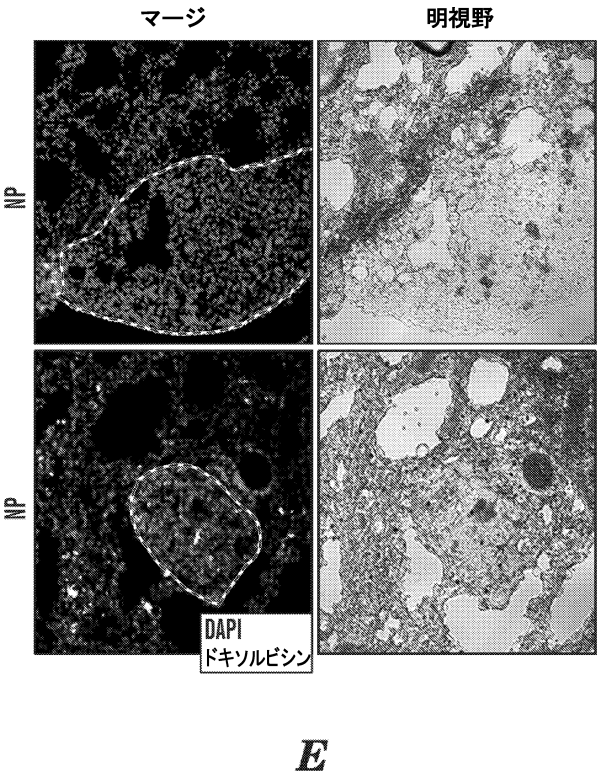
【図５－３】



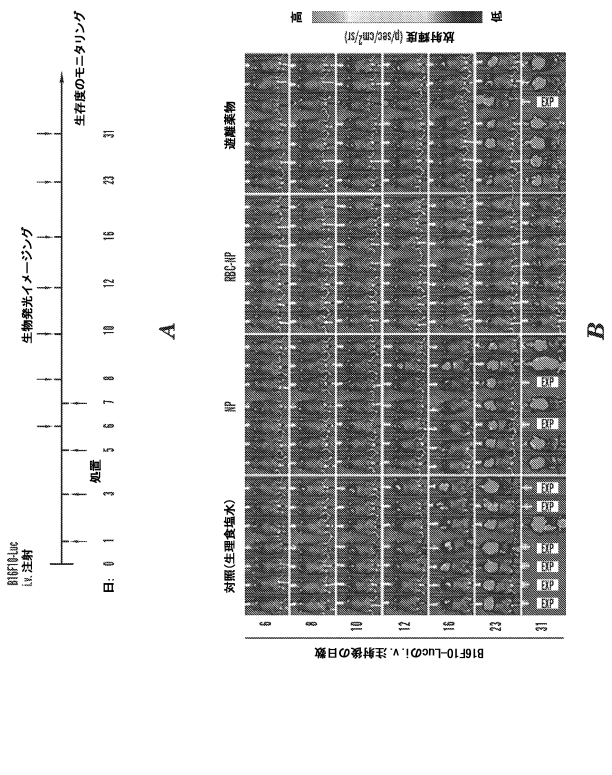
【図６－１】



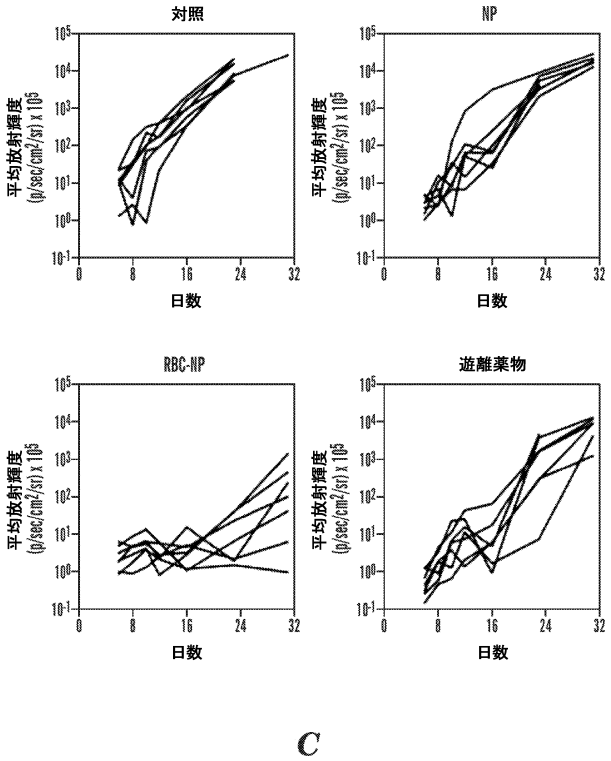
【図６－２】



【図７－１】

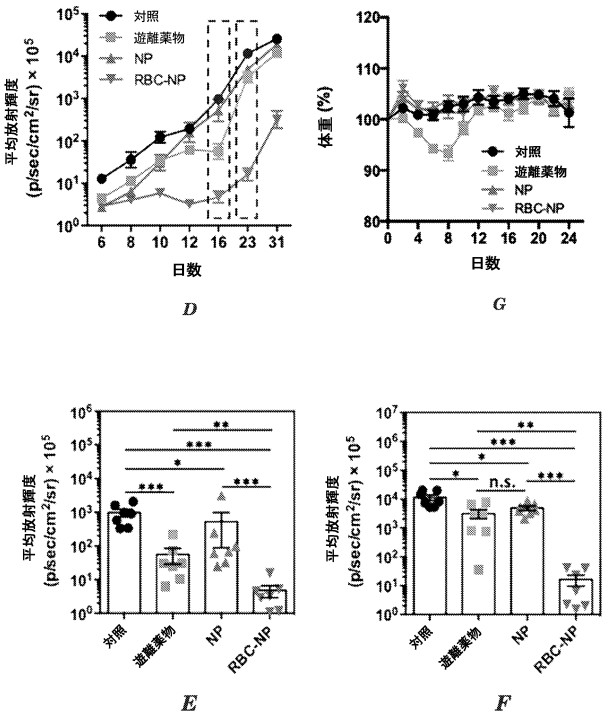


【図７－２】



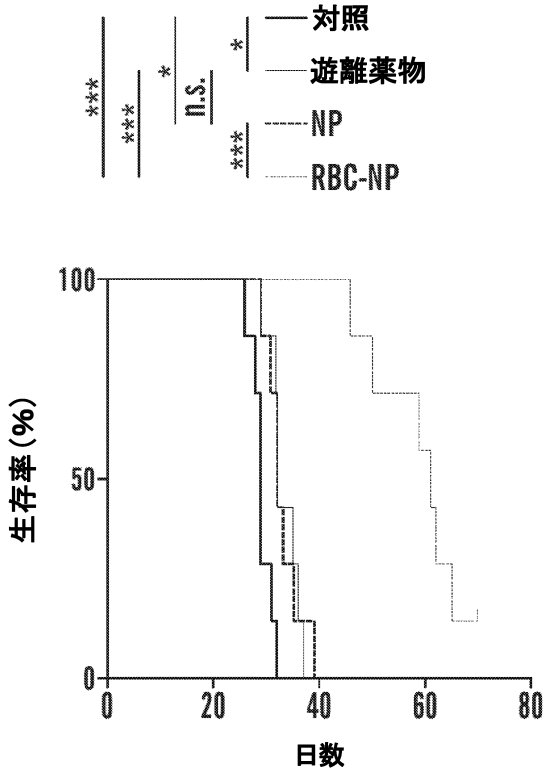
C

【図７－３】



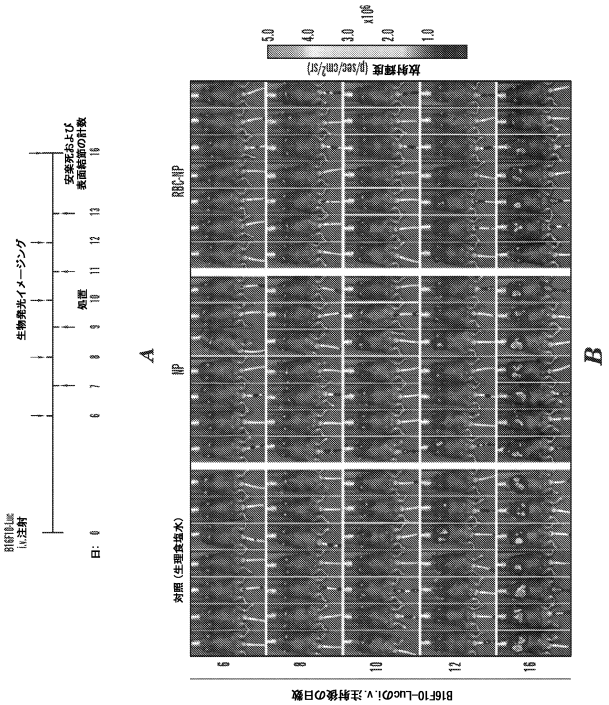
D *E* *F* *G*

【図７－４】

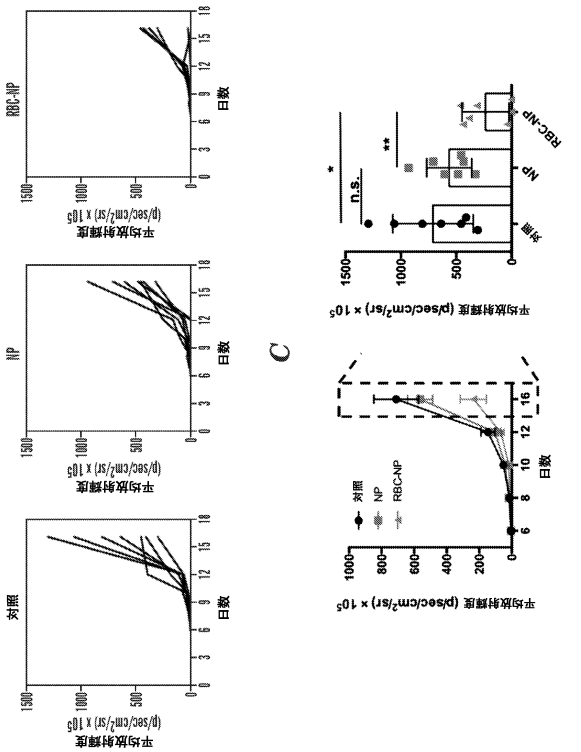


H

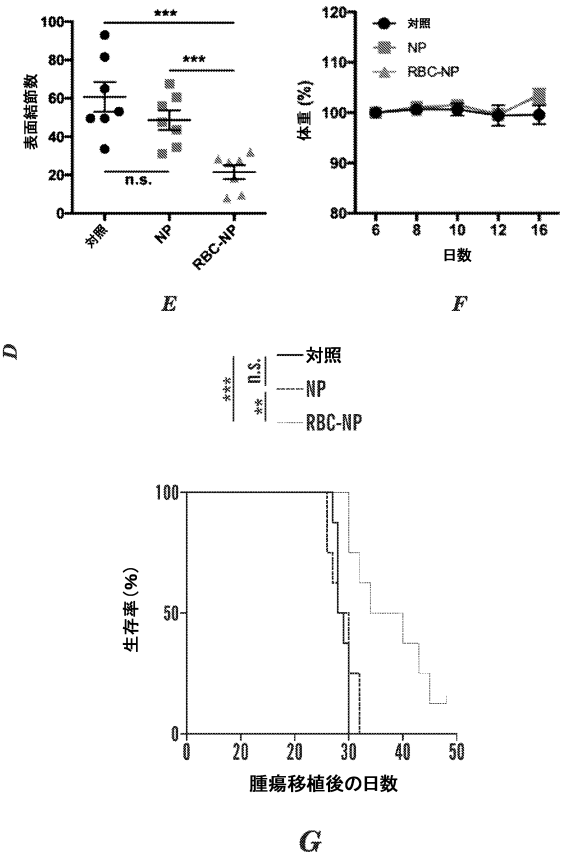
【図８－１】



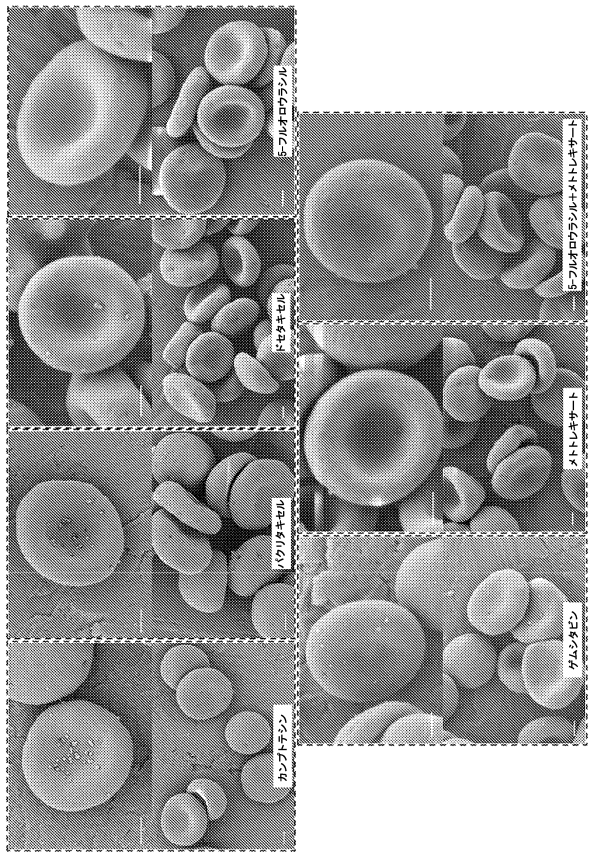
【図８－２】



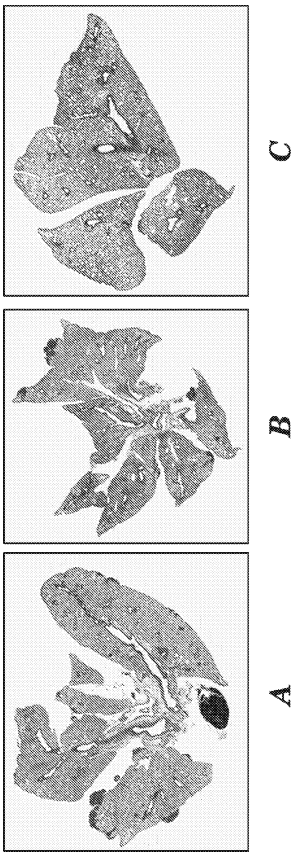
【図８－３】



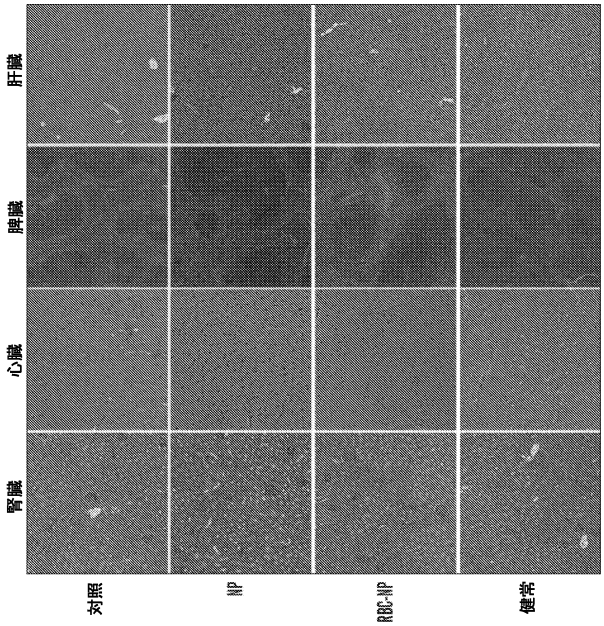
【図９】



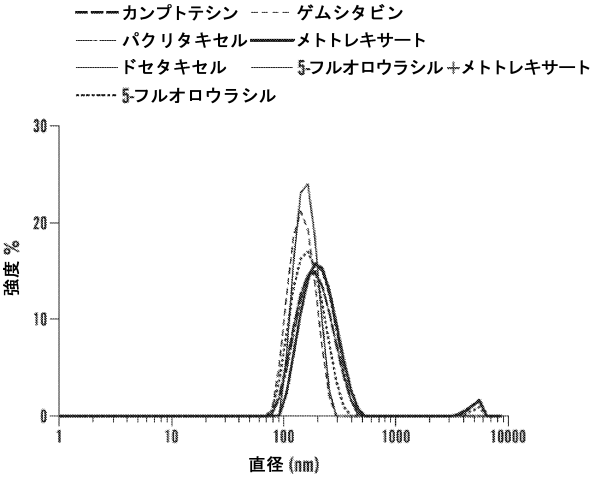
【図１０】



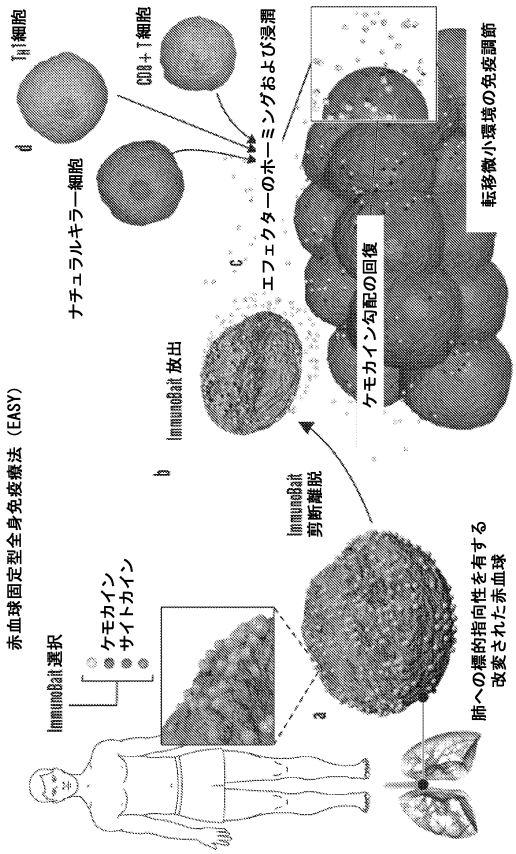
【図１１】



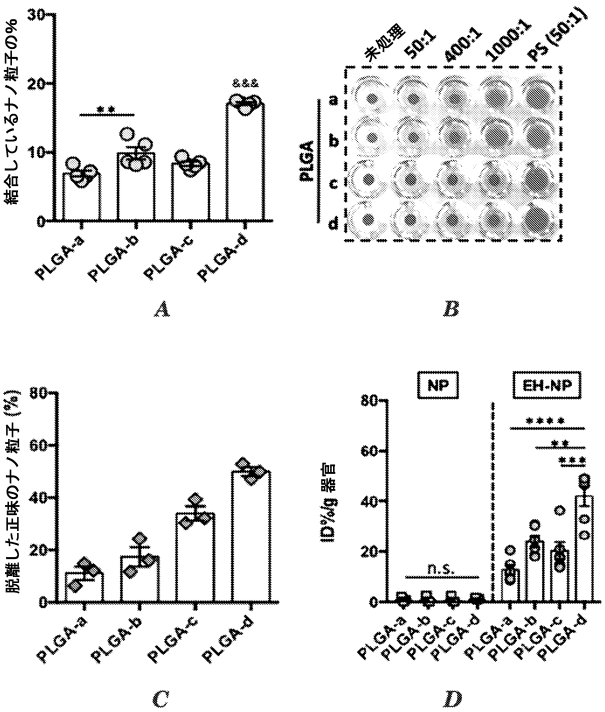
【図１２】



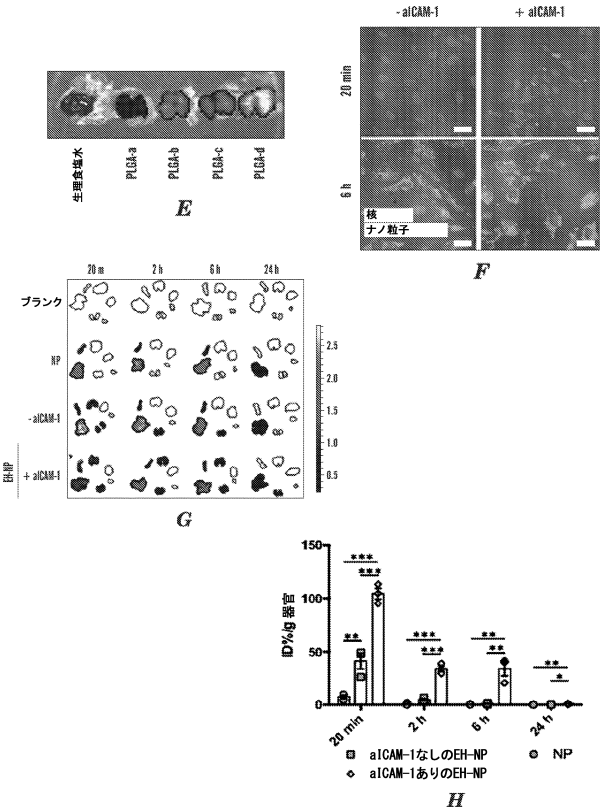
【図１３】



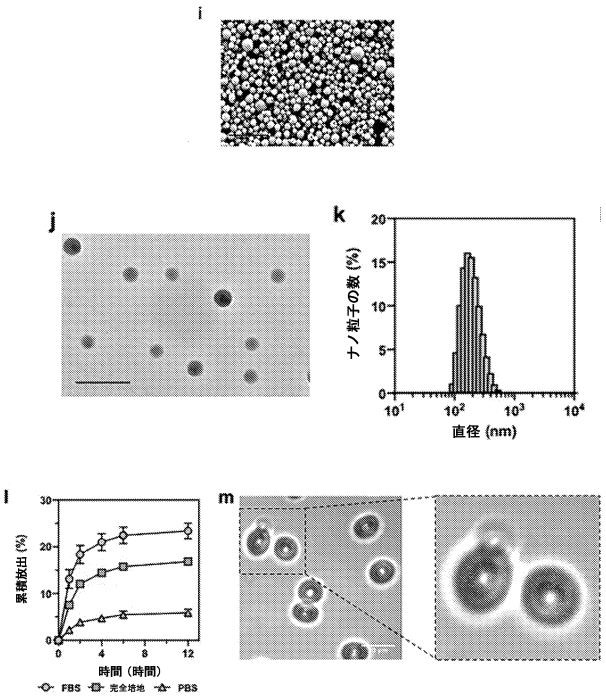
【図１４－１】



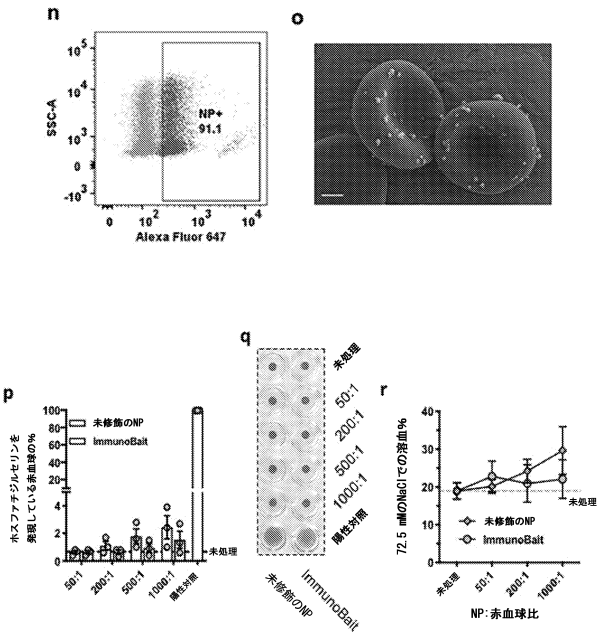
【図１４－２】



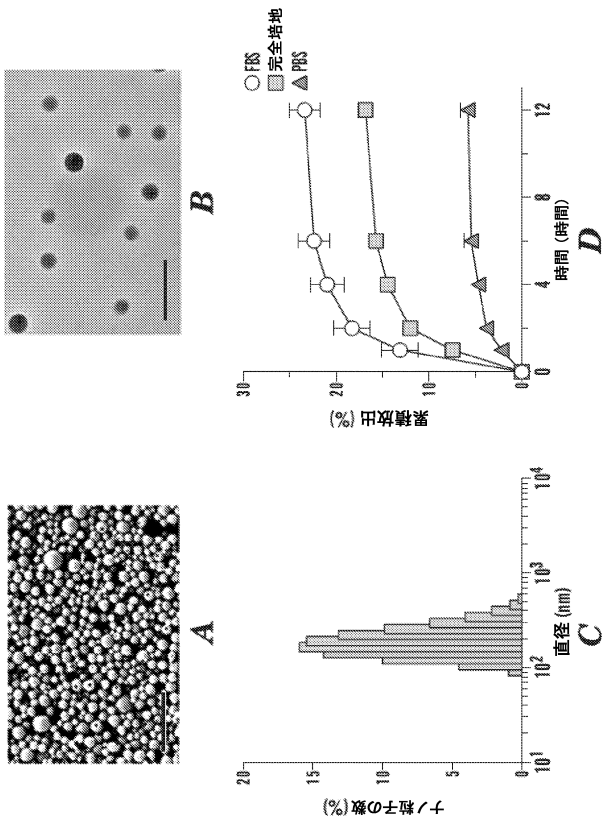
【図１４－３】



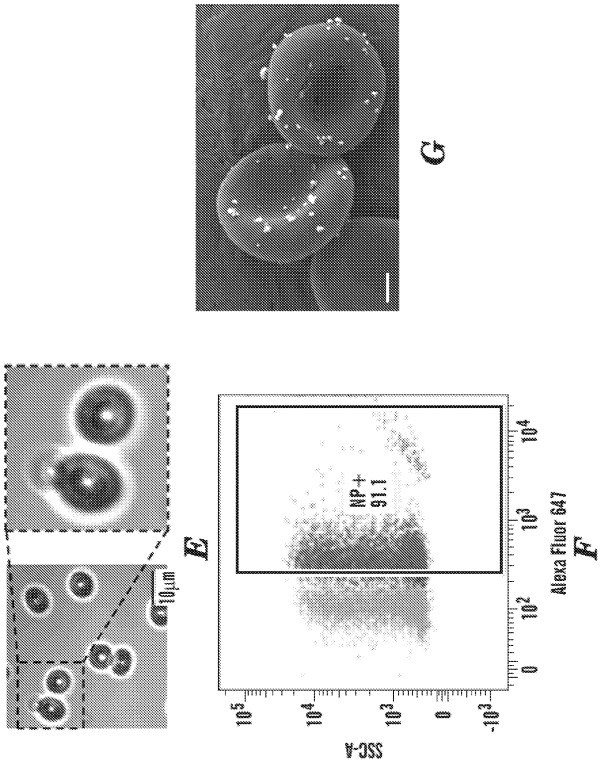
【図１４－４】



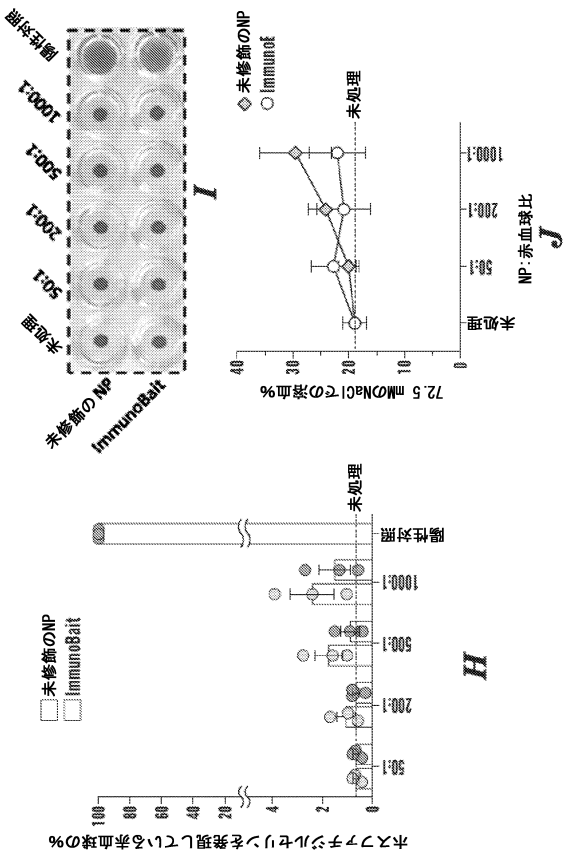
【図１５－１】



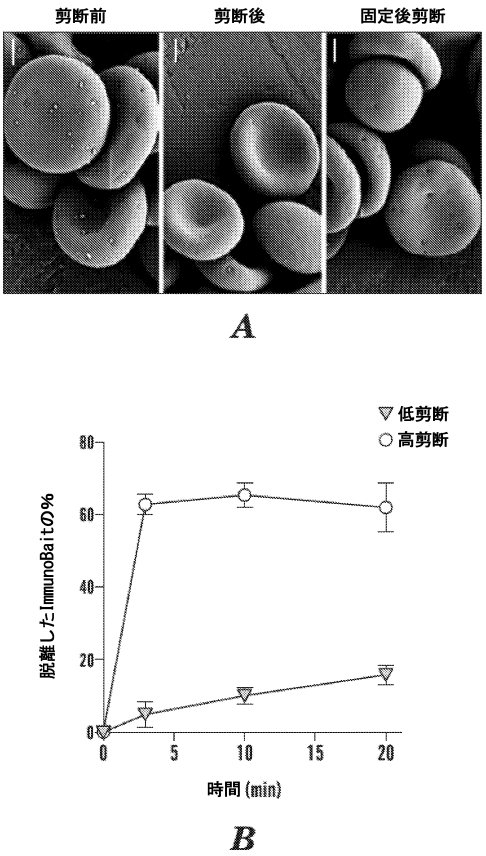
【図１５－２】



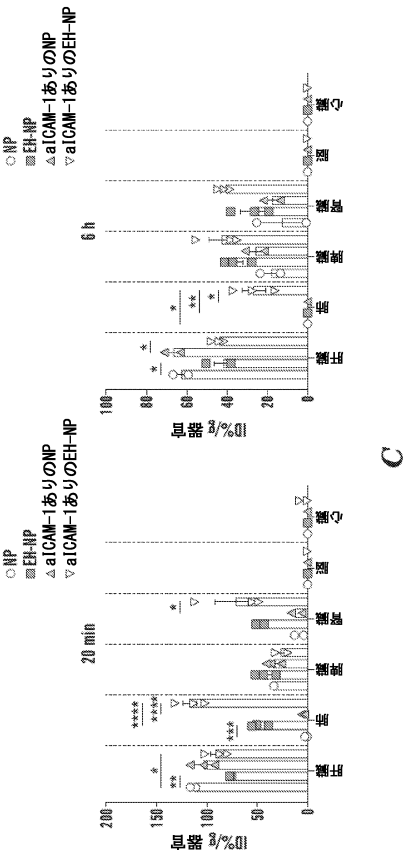
【図１５－３】



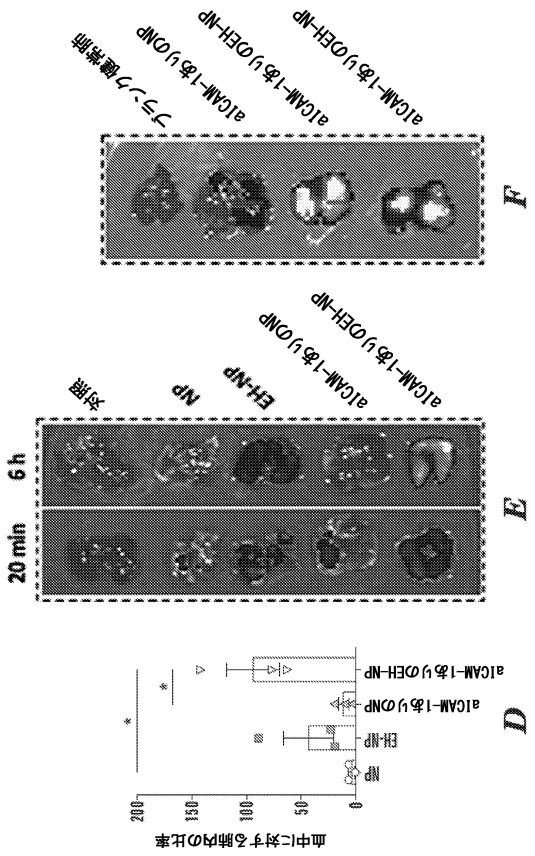
【図１６－１】



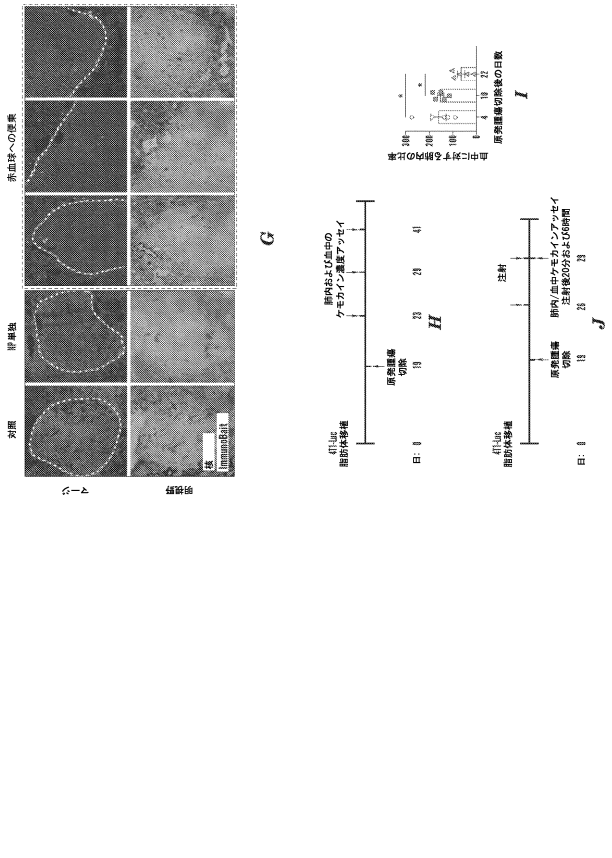
【図１６－２】



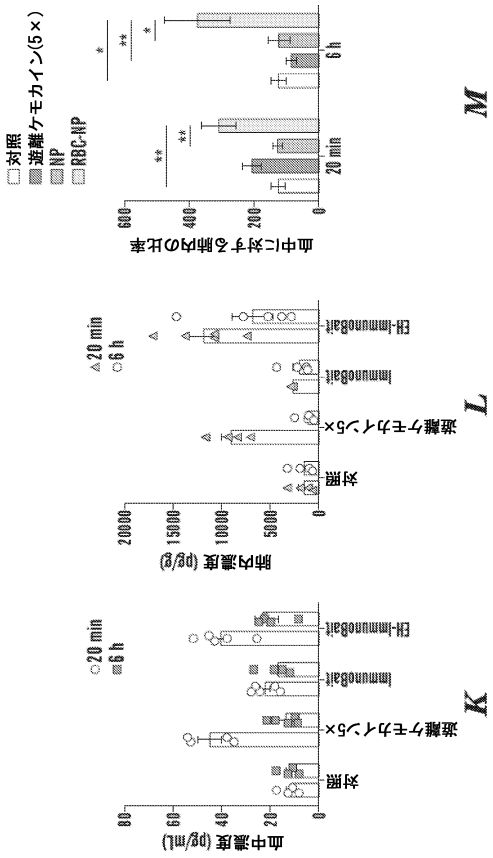
【図１６－３】



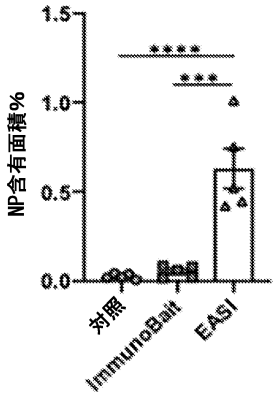
【図１６－４】



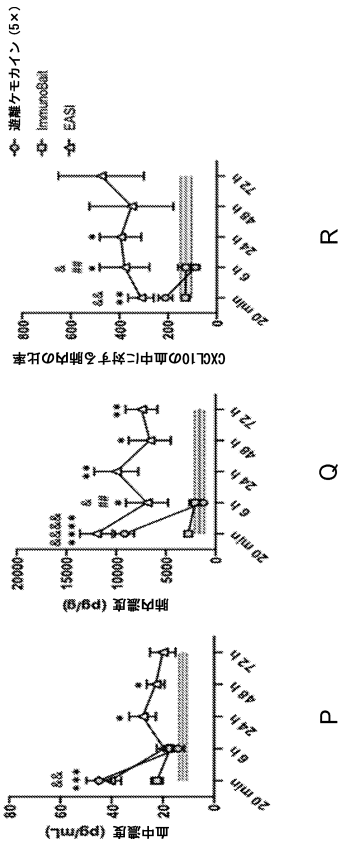
【図１６－５】



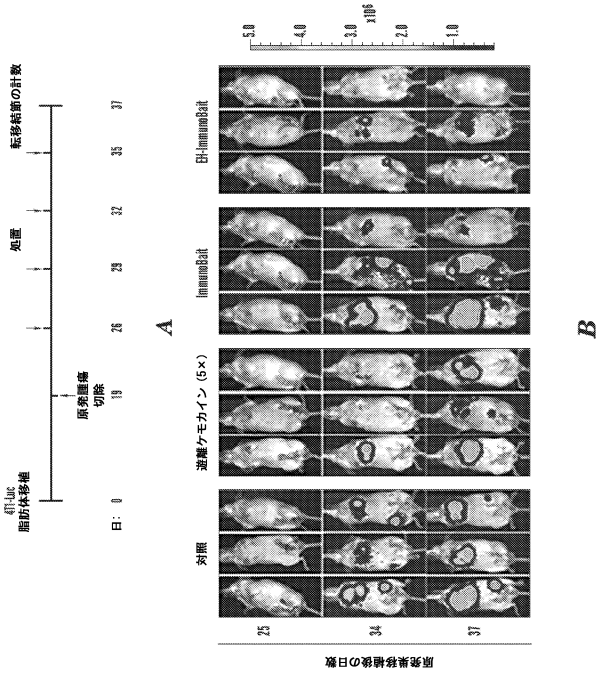
【図１６－６】



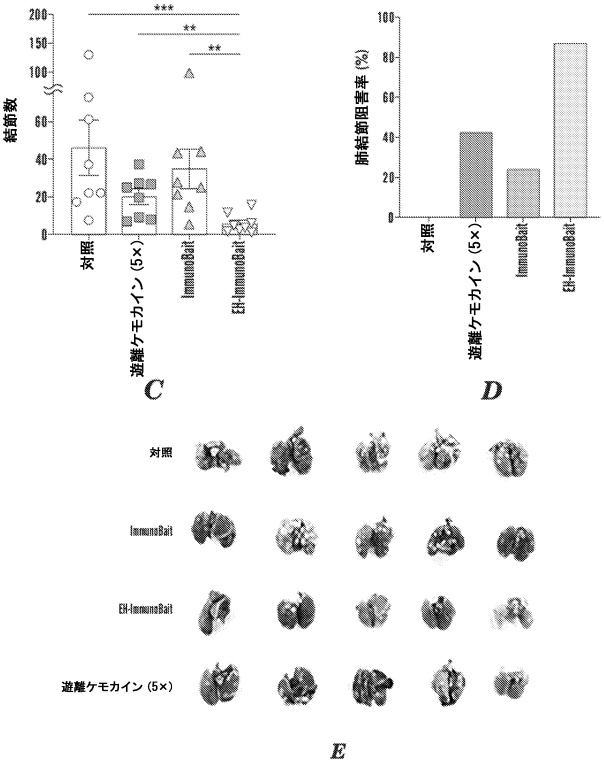
【図１６－７】



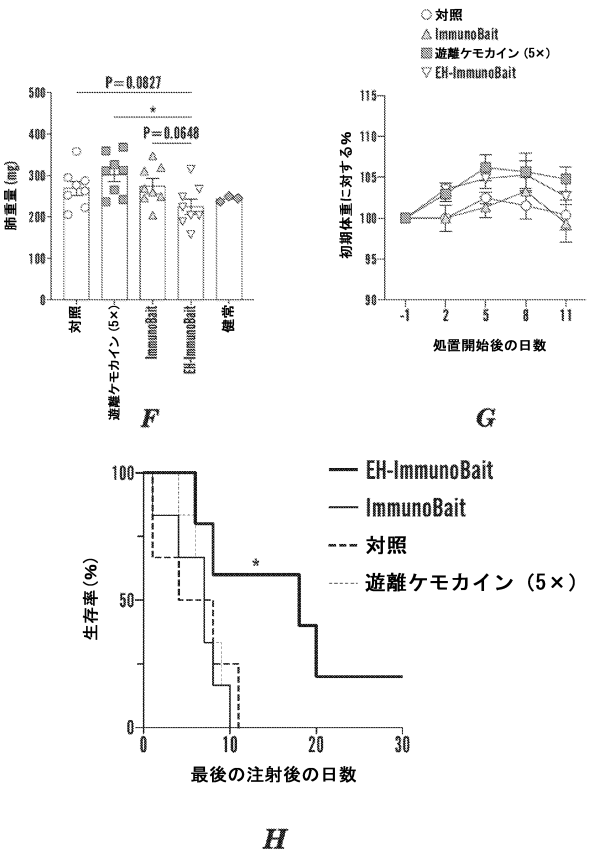
【図１７－１】



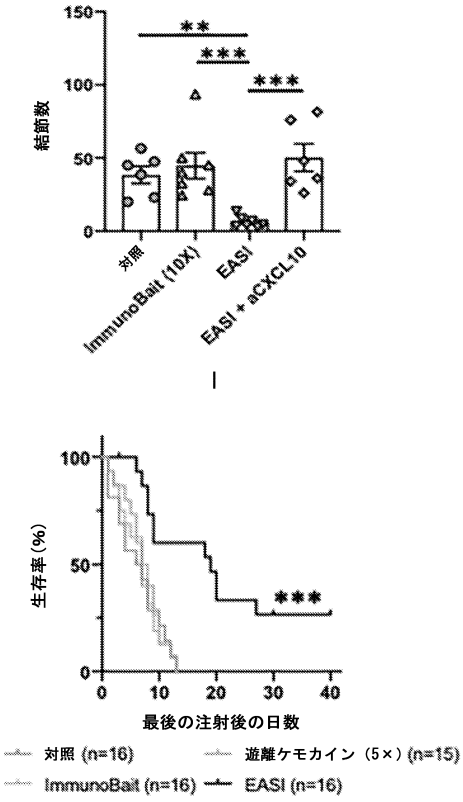
【図１７－２】



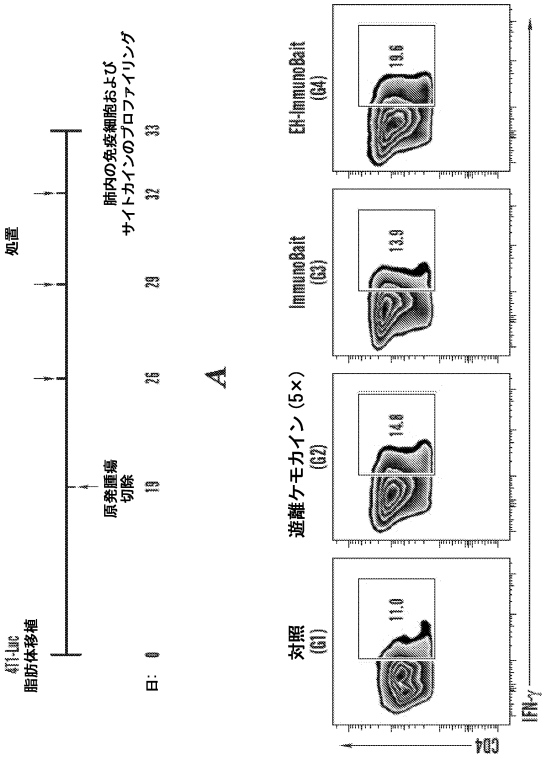
【図１７－３】



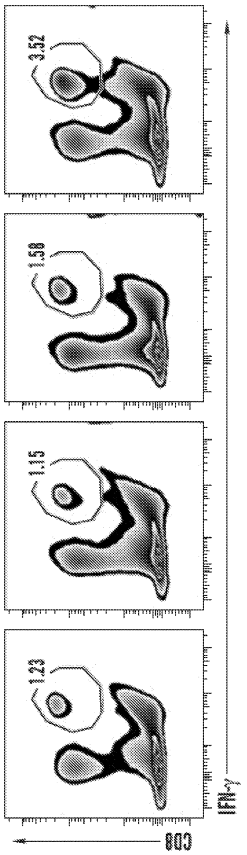
【図１７－４】



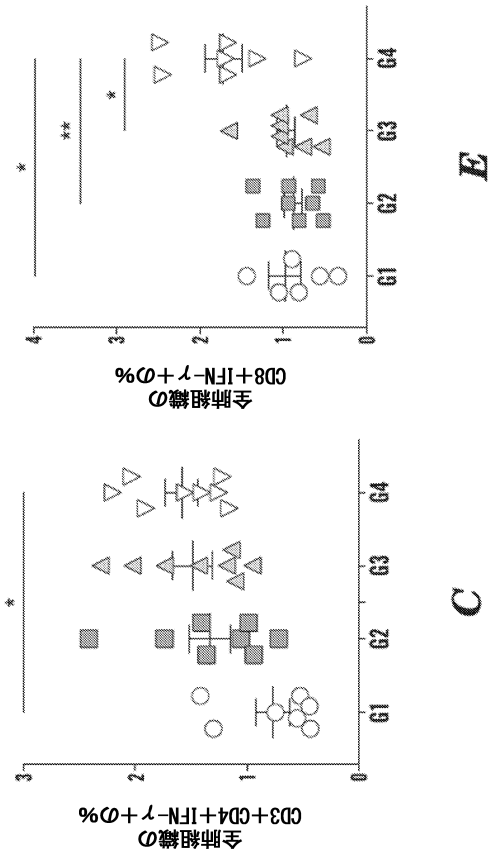
【図１８－１】



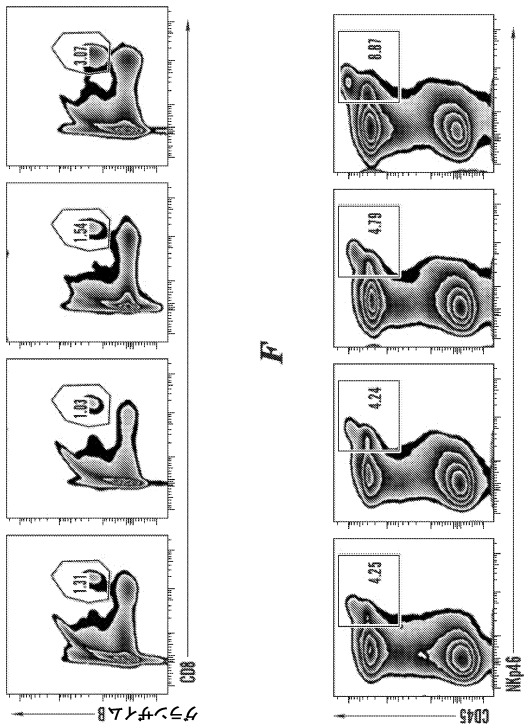
【図１８－２】



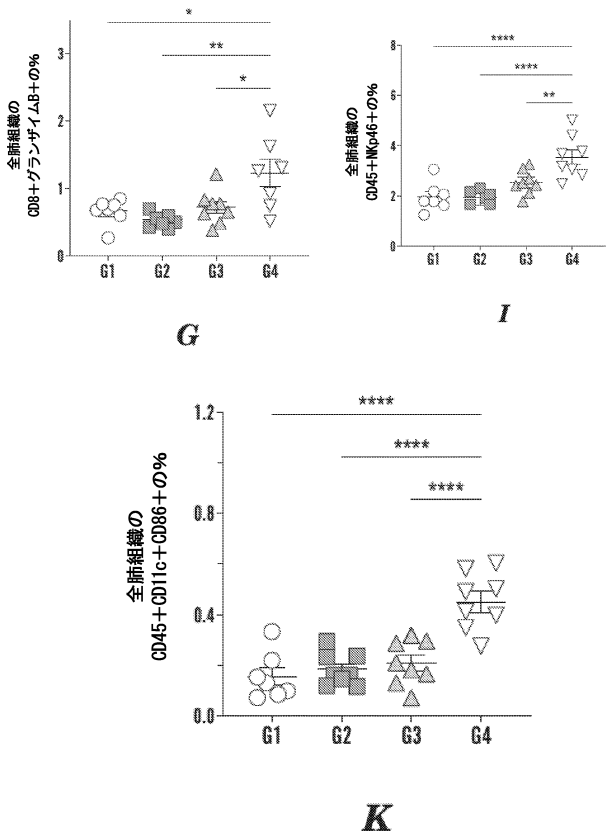
【図１８－３】



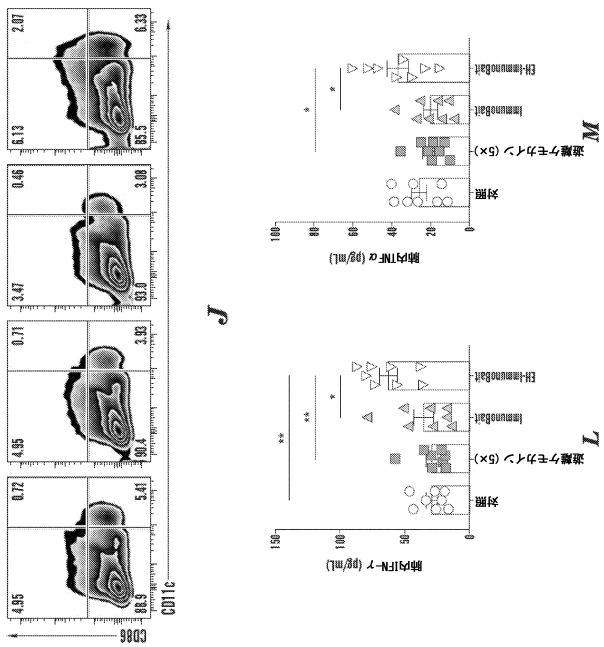
【図１８－４】



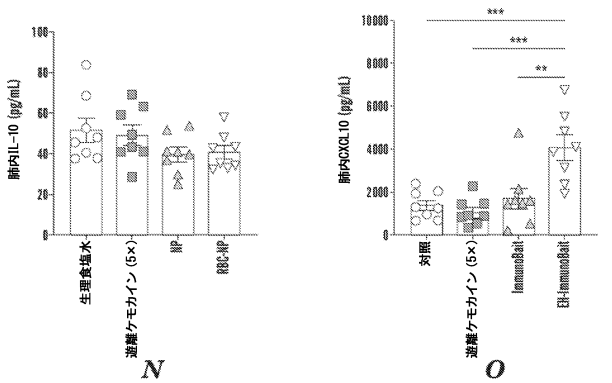
【図１８－５】



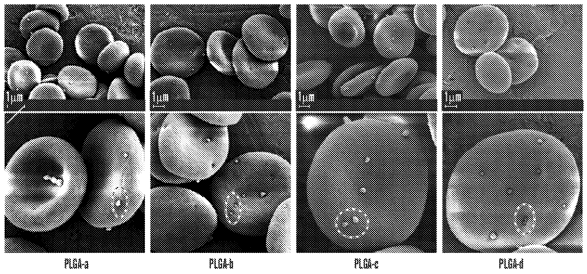
【図１８－６】



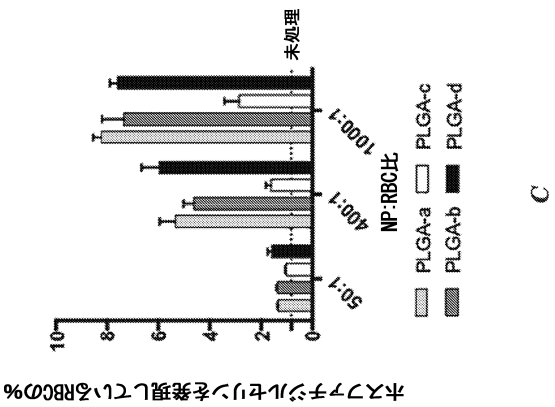
【図１８－７】



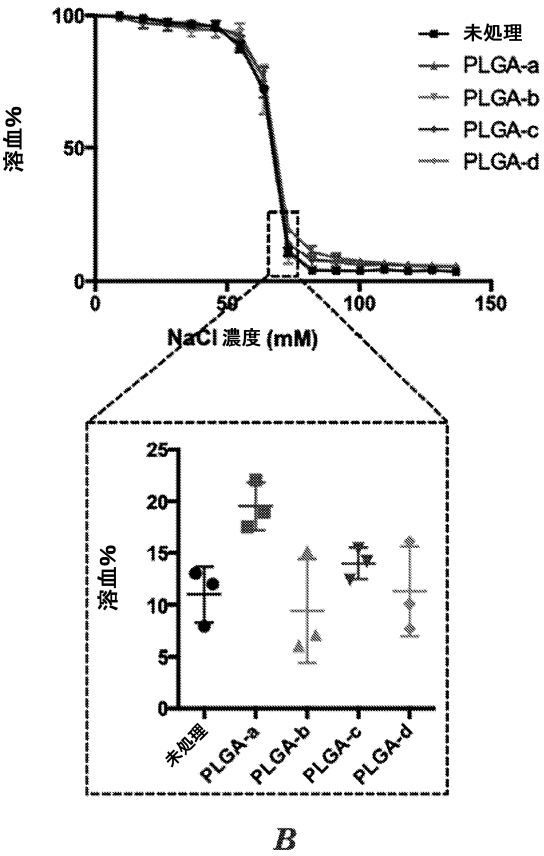
【図１９】



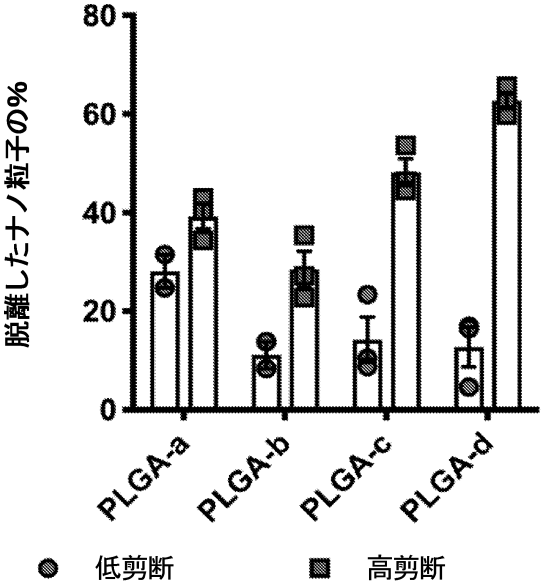
【図２０－１】



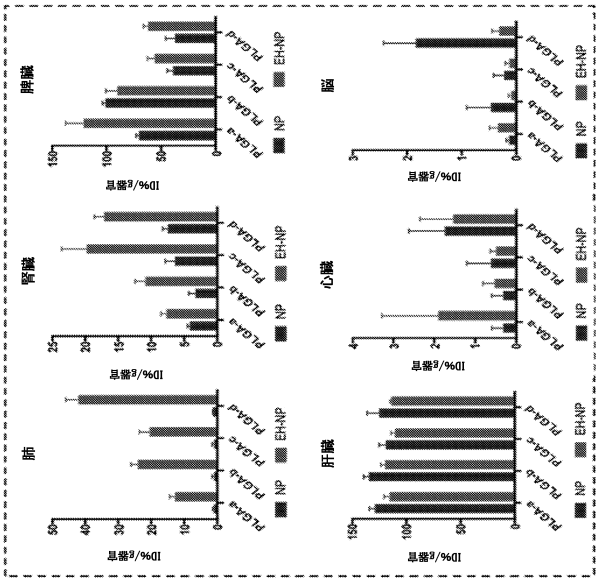
【図２０－２】



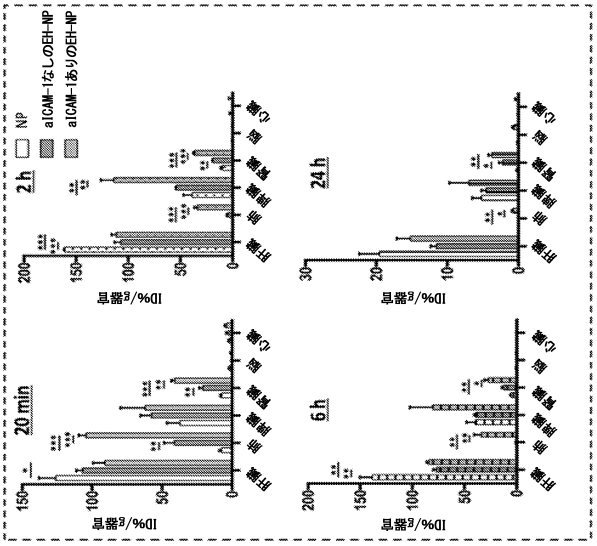
【図２１】



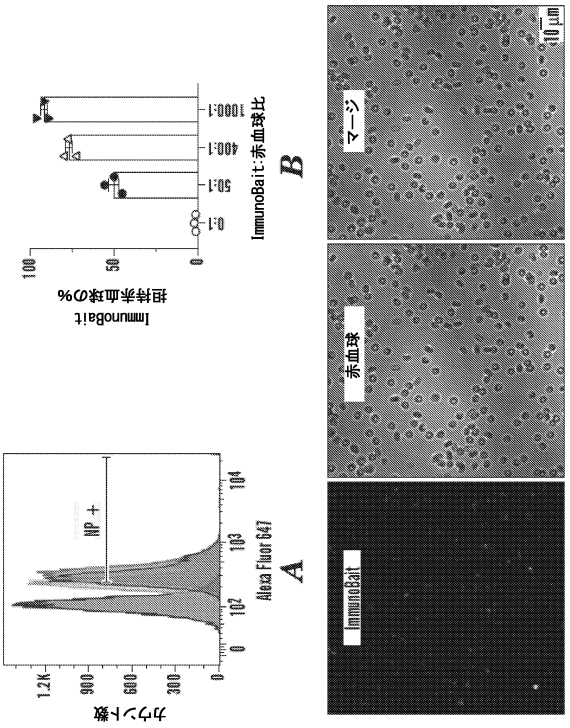
【図２２Ａ】



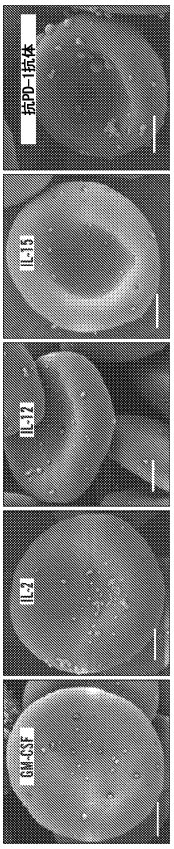
【図２２Ｂ】



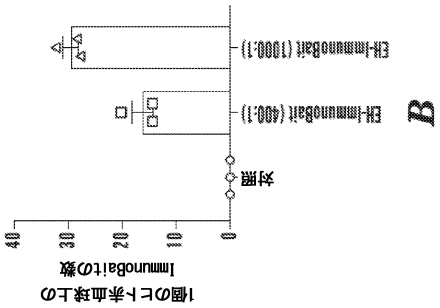
【図２３】

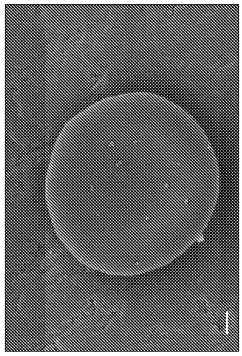


【図２４】

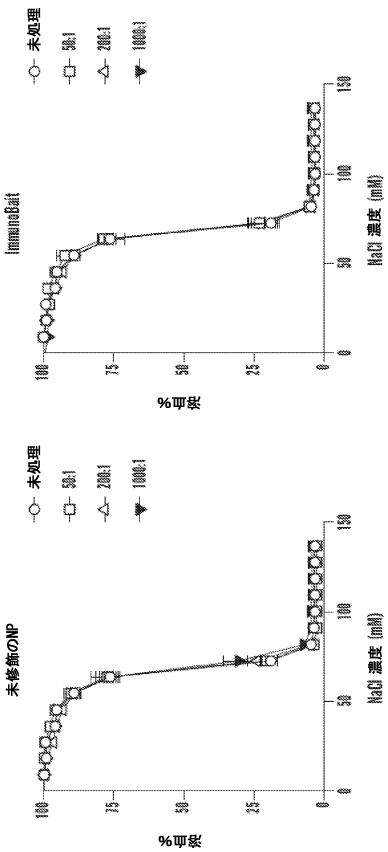


【図２５】

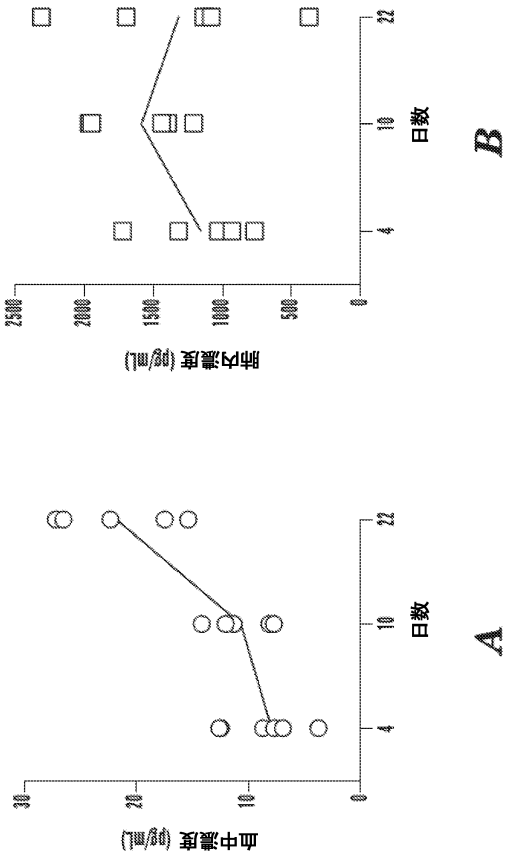




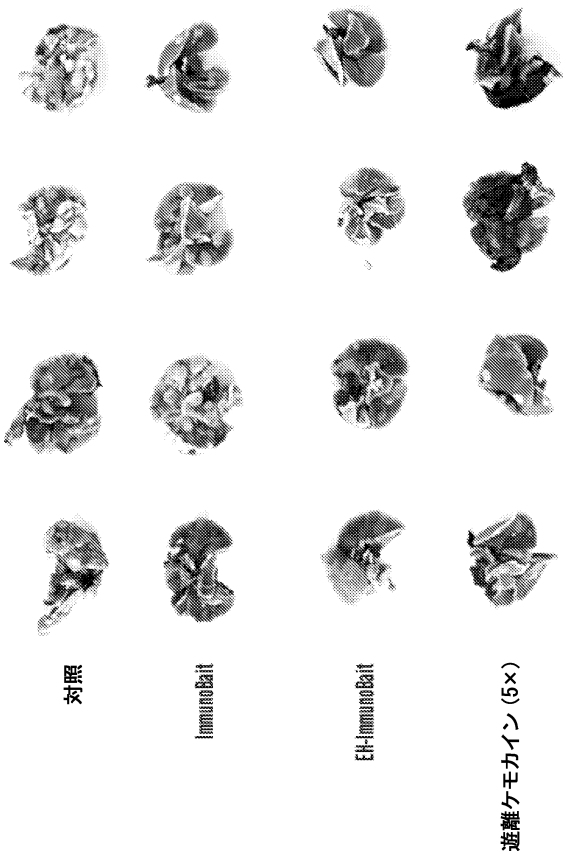
【図２６】



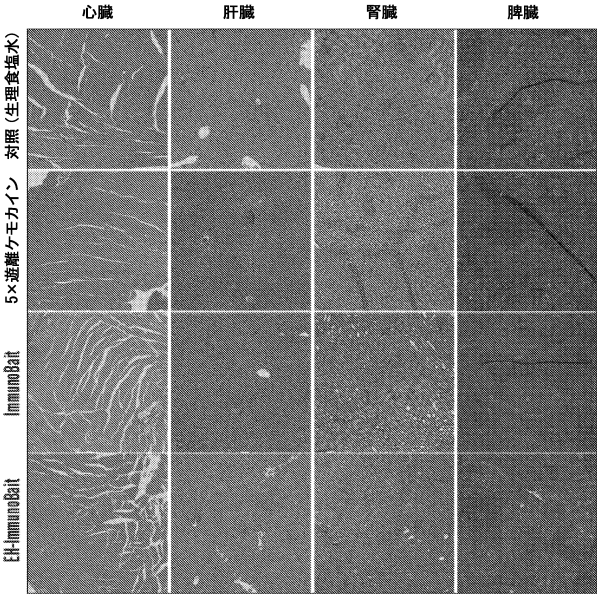
【図２７】



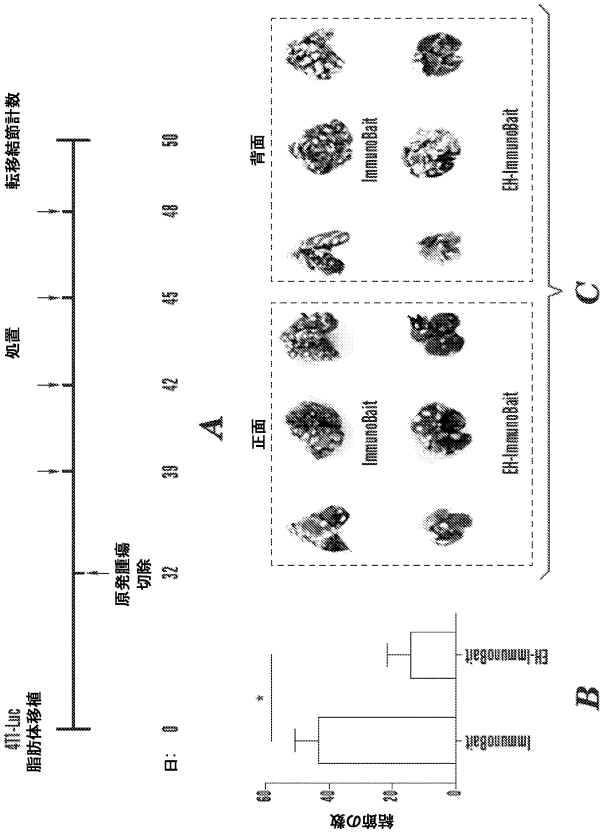
【図２８】



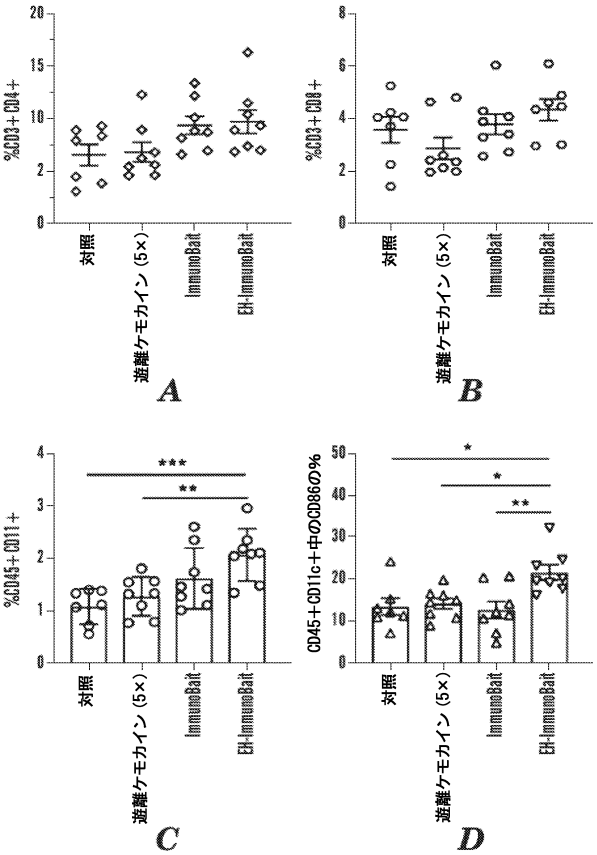
【図２９】



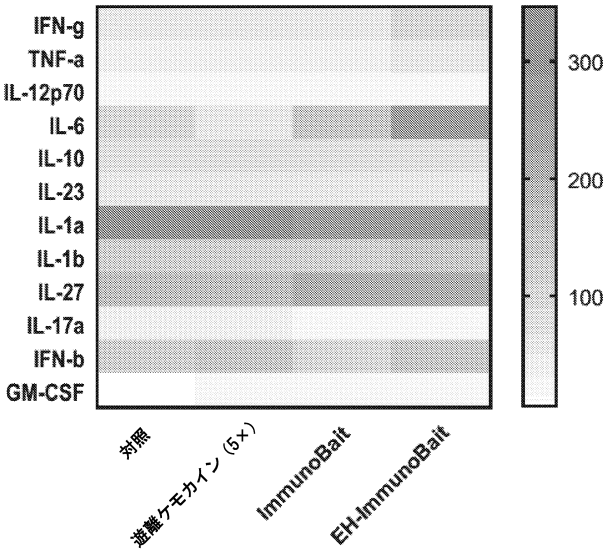
【図３０】



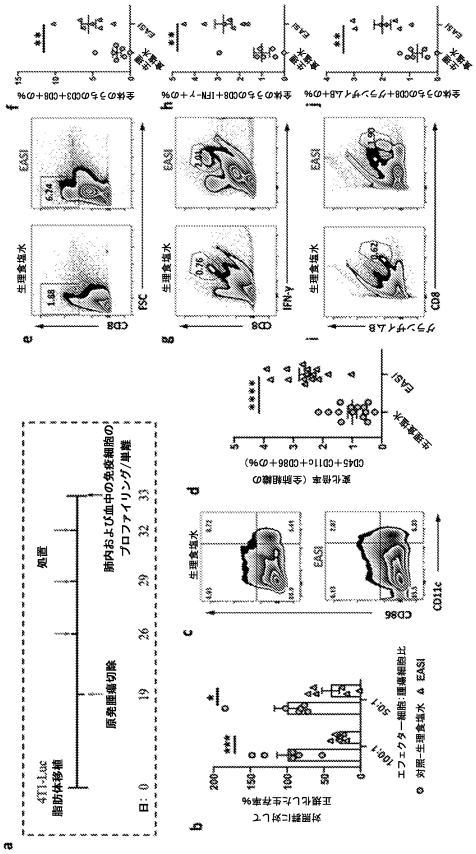
【図３１】



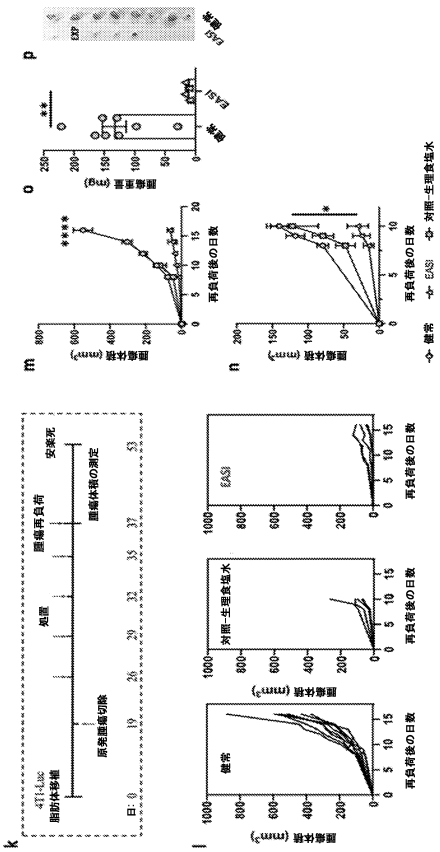
【図３２】



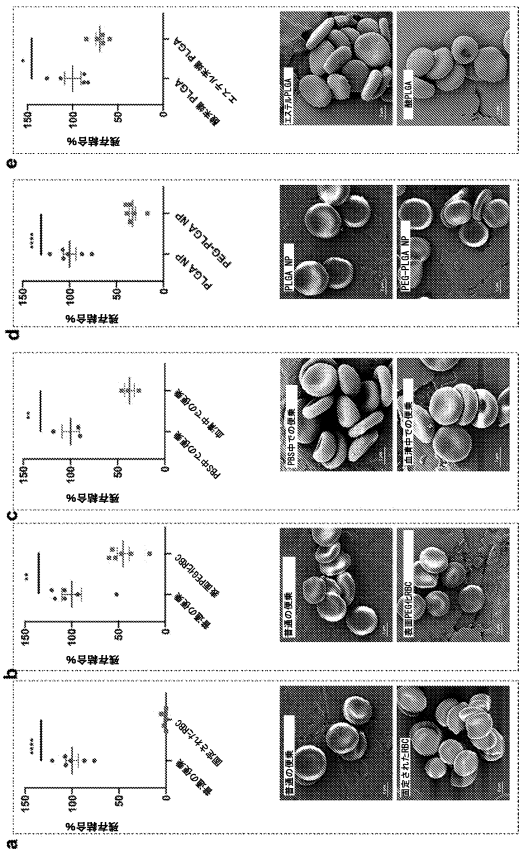
【図３３－１】



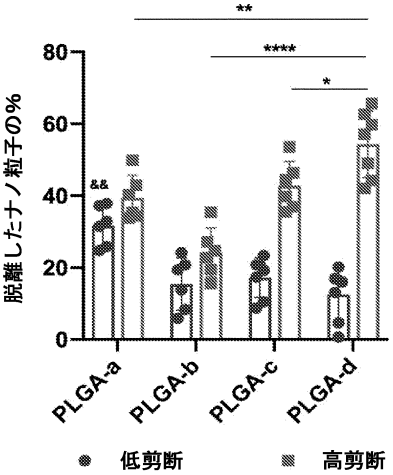
【図３３－２】



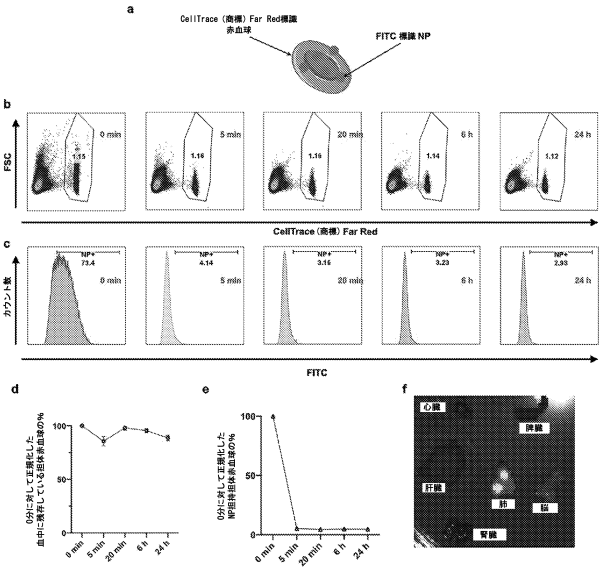
【図３４】



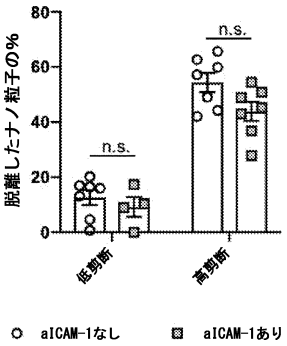
【図３５】



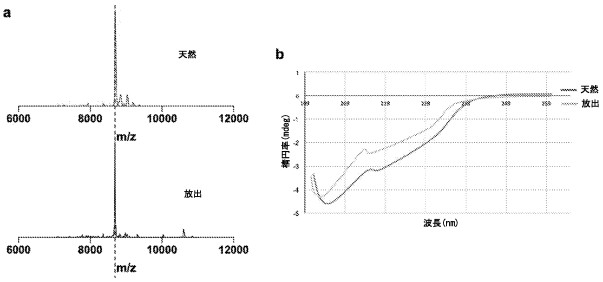
【図３６】



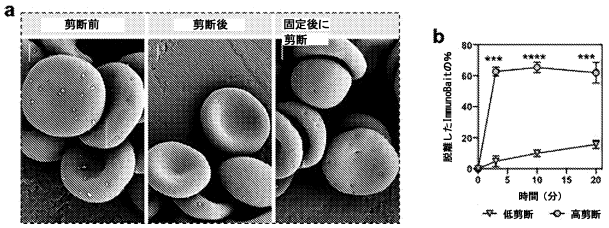
【図３７】



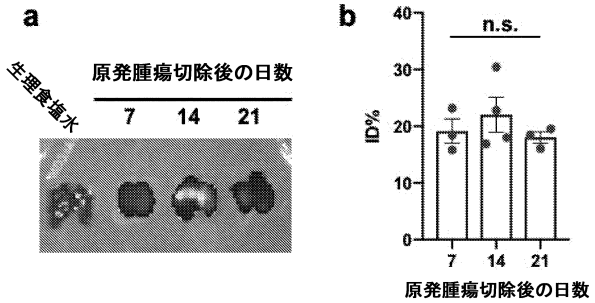
【図３８】



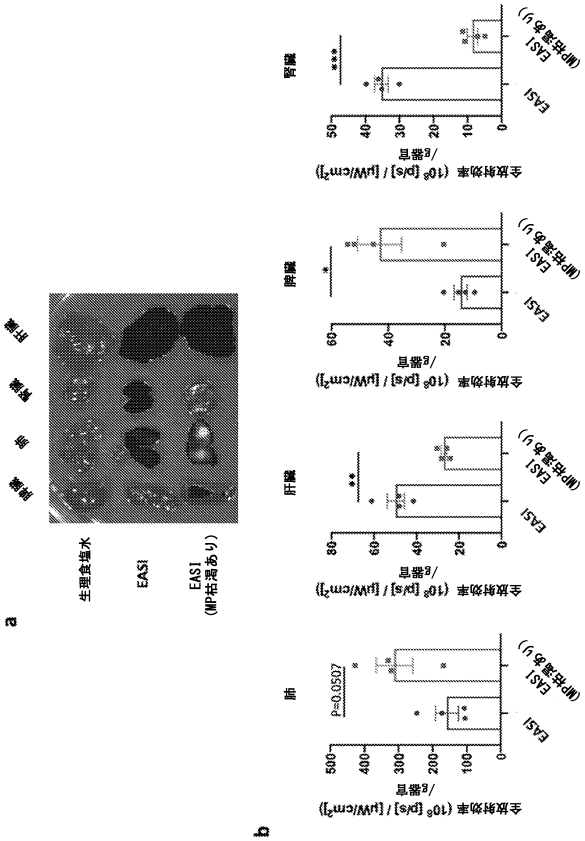
【図３９】



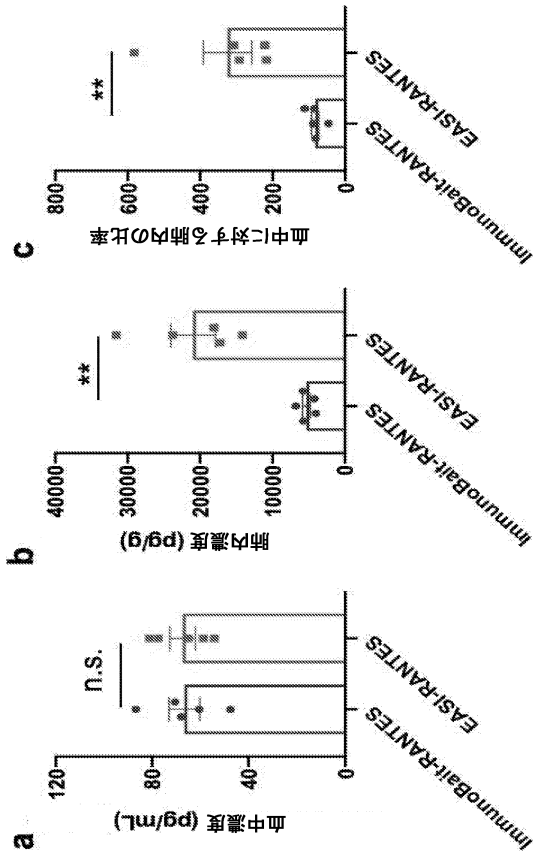
【図４０】



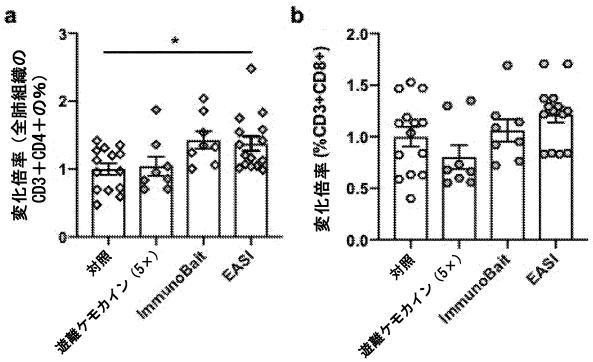
【図４１】



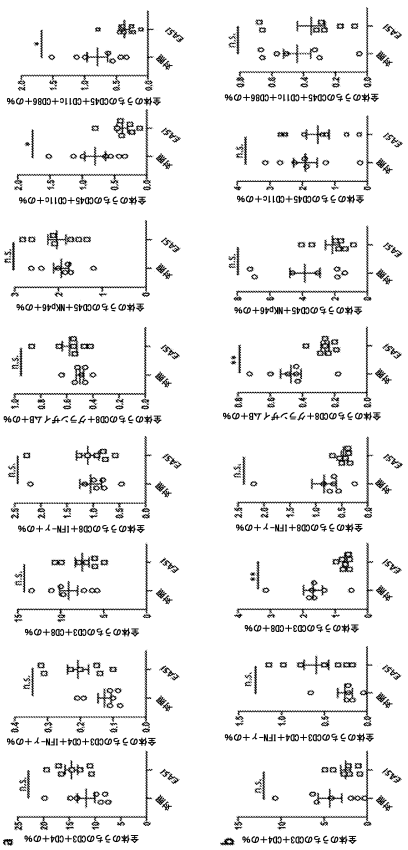
【図４２】



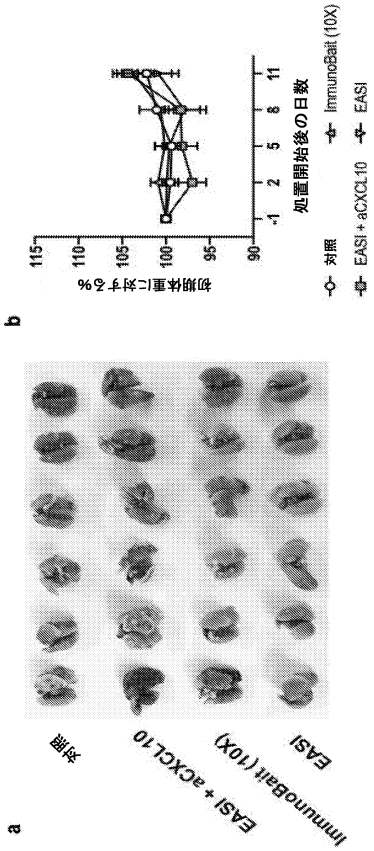
【図４３】



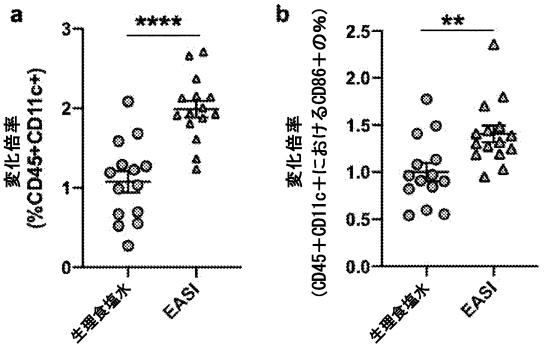
【図４４】



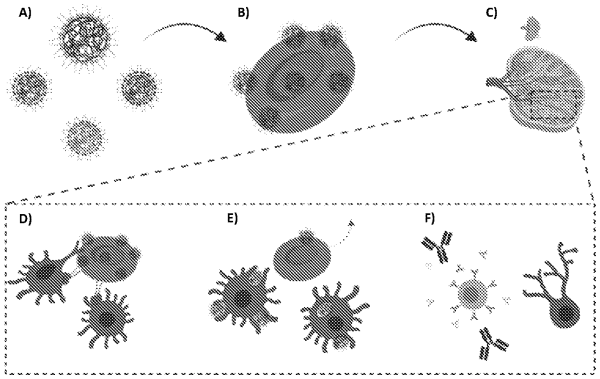
【図４５】



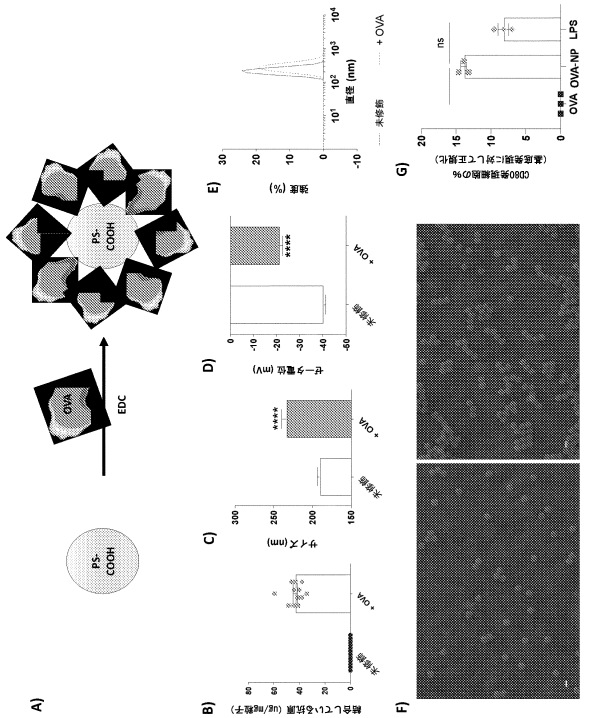
【図４６】



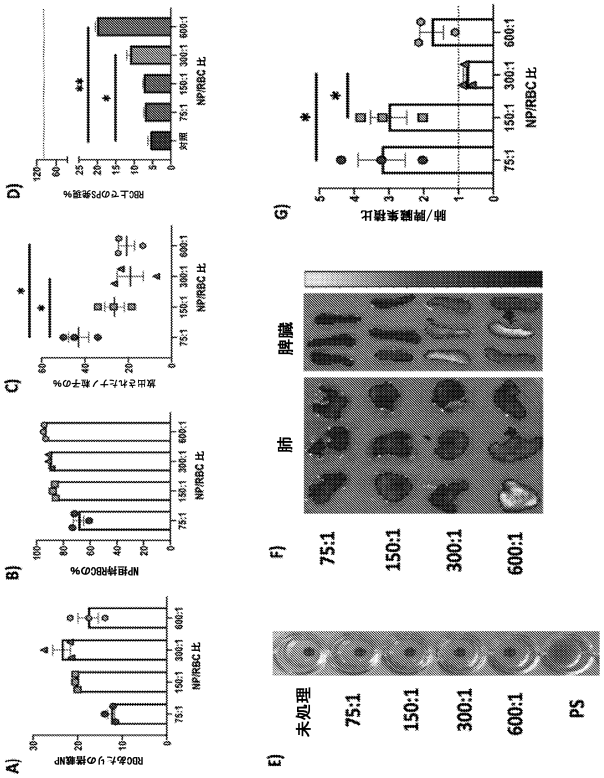
【図４７】



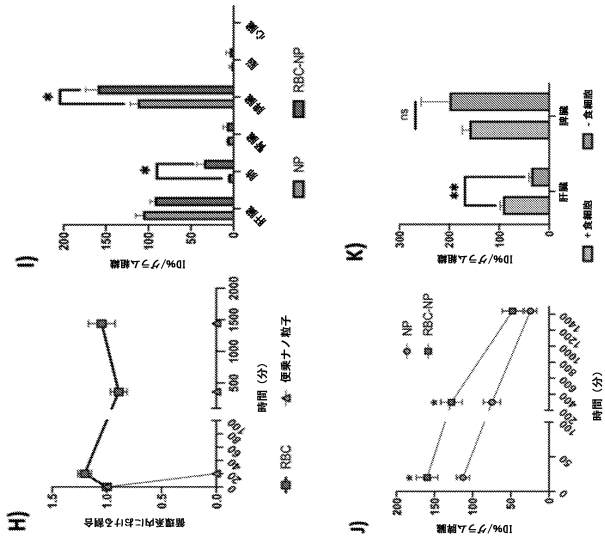
【図４８】



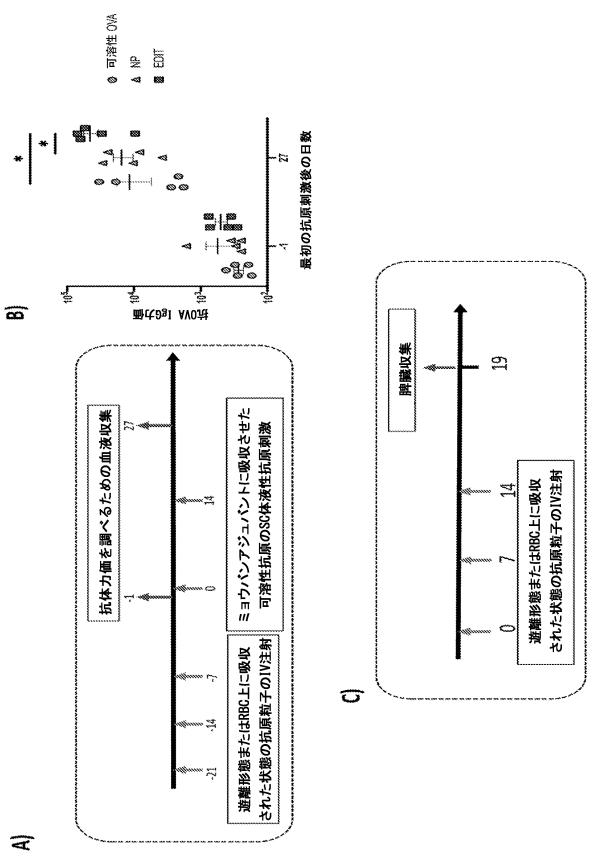
【図４９－１】



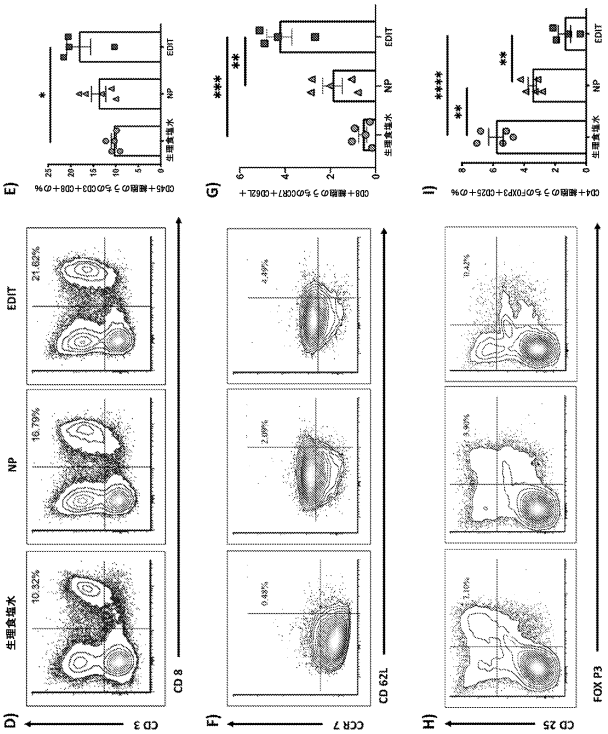
【図４９－２】



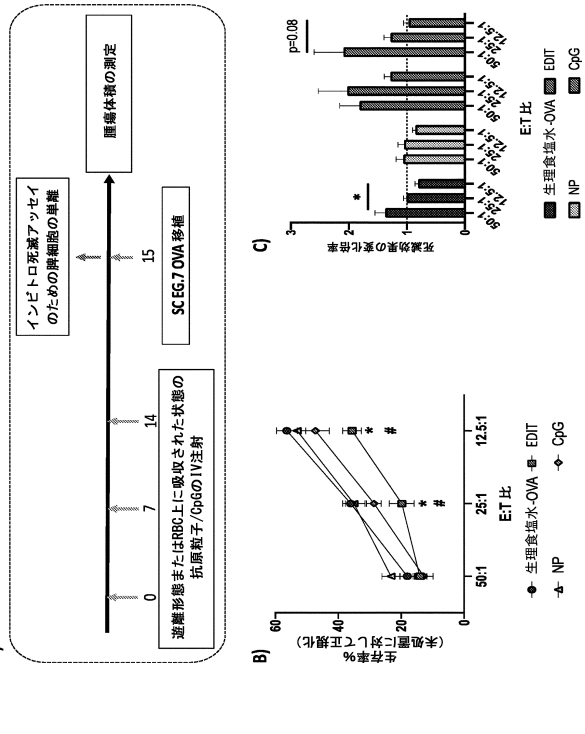
【図５０－１】



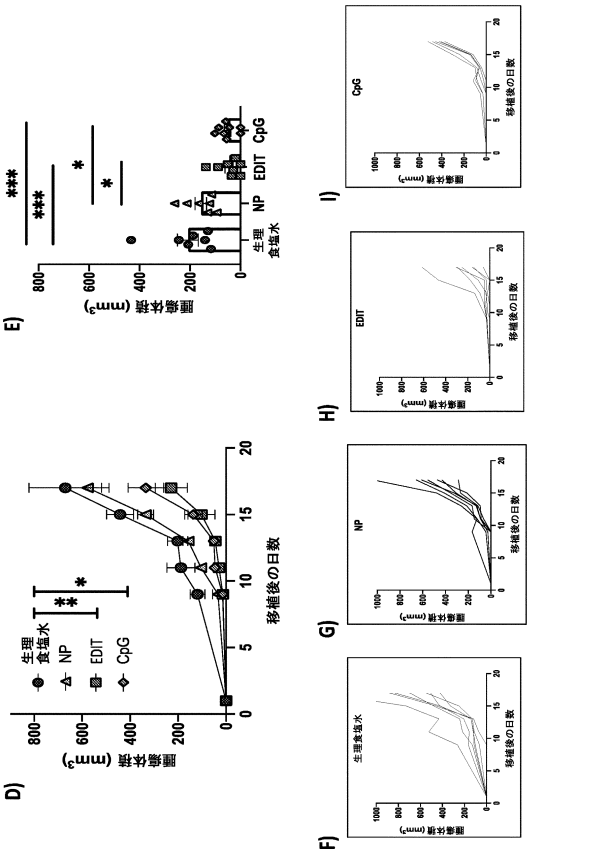
【図５０－２】



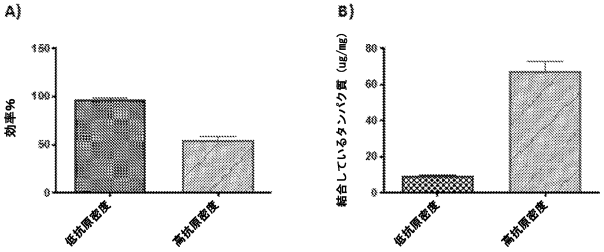
【図５１－１】



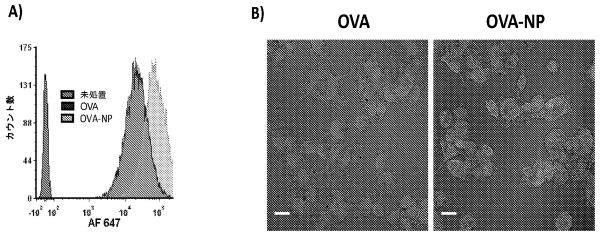
【図５１－２】



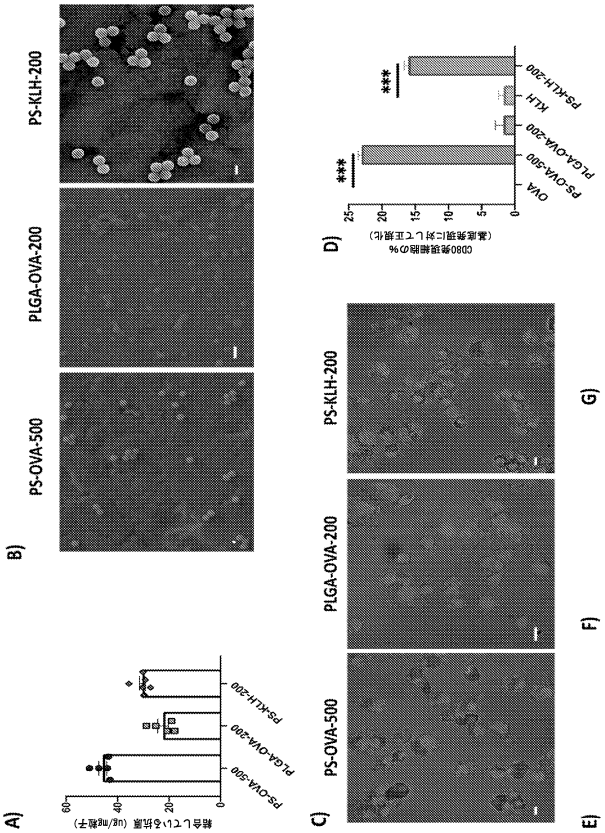
【図５２】



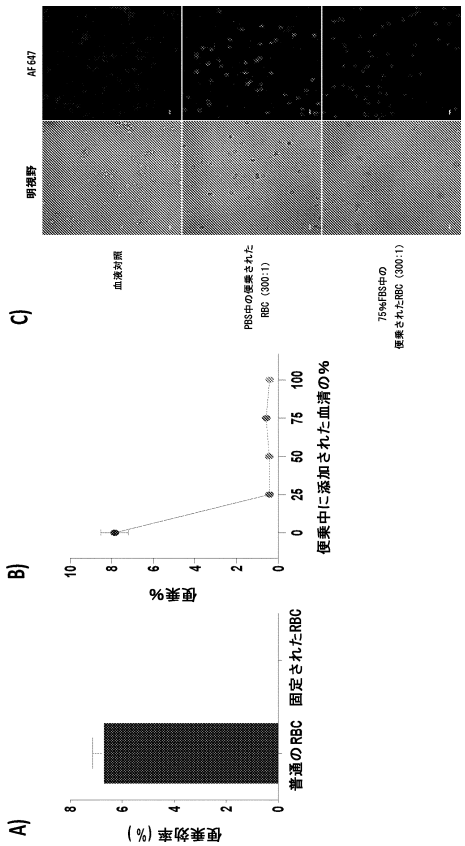
【図５３】



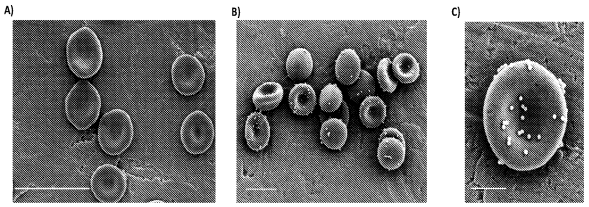
【図５４】



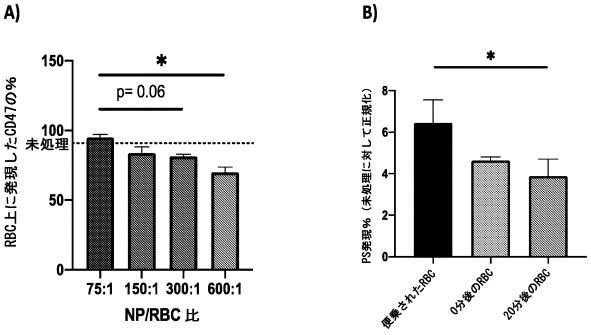
【図５５】



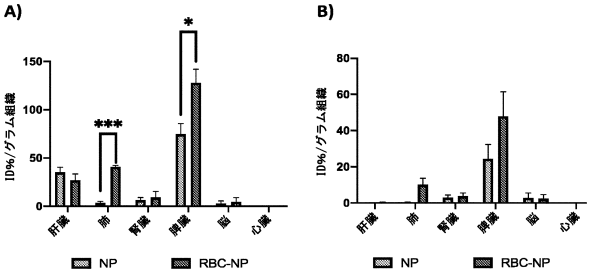
【図５６】



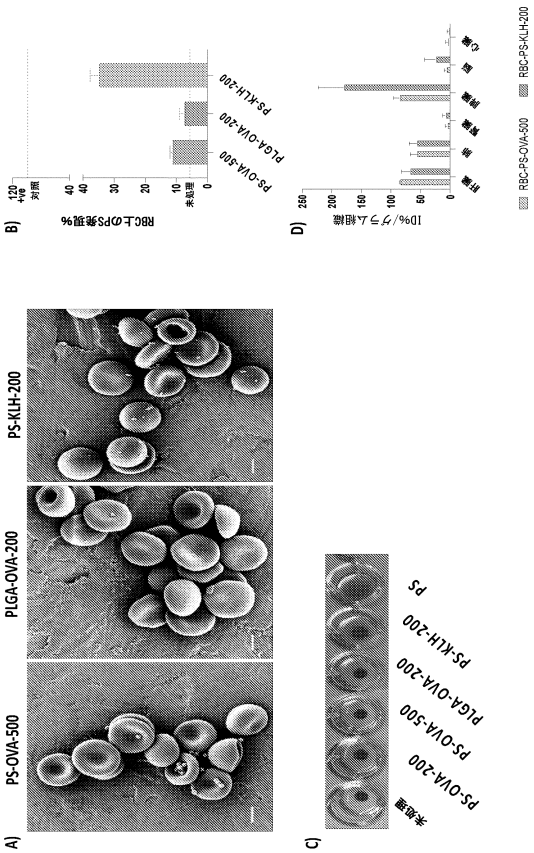
【図５７】



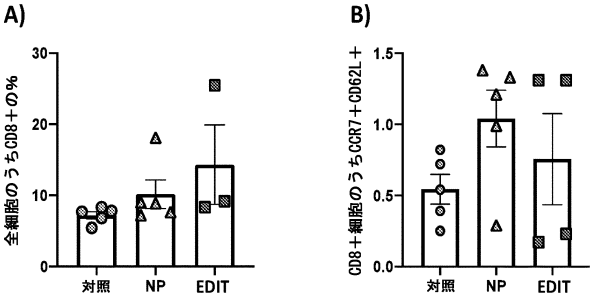
【図５８】



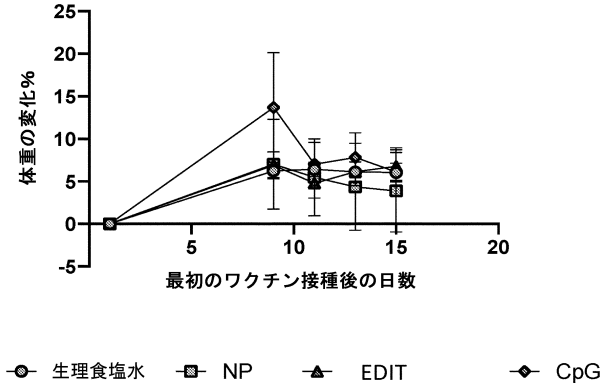
【図５９】



【図６０】



【図６１】


体重の変化%
25
20
15
10
5
0
-5
5
10
15
20
最初のワクチン接種後の日数
生理食塩水
NP
EDIT
CpG

フロントページの続き

(51)国際特許分類		ＦＩ		
Ａ６１Ｋ	*31/513 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/513	
Ａ６１Ｋ	*31/7068(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7068	
Ａ６１Ｋ	*31/519 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/519	
Ａ６１Ｋ	*31/573 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/573	
Ａ６１Ｋ	*39/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/00	Ｚ
Ａ６１Ｋ	*38/20 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/20	
Ａ６１Ｐ	*43/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１２１
Ａ６１Ｐ	*35/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00	
Ａ６１Ｐ	*13/12 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	13/12	
Ａ６１Ｐ	*11/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	11/00	

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72)発明者 ミトラゴトリ サミル
アメリカ合衆国 ０２４２０ マサチューセッツ州 レキシントン タイラー ロード １７
(72)発明者 ウキドゥヴェ アンヴェイ アシシュ
アメリカ合衆国 ０２１４３ マサチューセッツ州 サマービル カルヴィン ストリート ２０ アパートメント １
(72)発明者 チャオ ゾンミン
アメリカ合衆国 ０２１３８ マサチューセッツ州 ケンブリッジ フォーセット ストリート ９０ アパートメント２－５０８
審査官 田澤 俊樹

(56)参考文献 国際公開第２００４／０３２９７０（ＷＯ，Ａ２）
国際公開第２０１９／００４３３８（ＷＯ，Ａ１）
特表２０１４－５１８２００（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ ４７／００－４７／６９
９／００－９／７２
３１／００－３３／４４
４５／００
３９／００
３８／２０
Ａ６１Ｐ １／００－４３／００
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）