

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7329839号  
(P7329839)

(45)発行日 令和5年8月21日(2023.8.21)

(24)登録日 令和5年8月10日(2023.8.10)

(51)国際特許分類	F I
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 1 2 N 7/00
C 1 2 N 5/078(2010.01)	C 1 2 N 5/078
C 1 2 N 11/16 (2006.01)	C 1 2 N 11/16
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10
B 8 2 Y 40/00 (2011.01)	B 8 2 Y 40/00

請求項の数 4 (全15頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2019-556257(P2019-556257)	(73)特許権者	519365193 コアスター セラピューティクス インク . アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォル ニア州 サンディエゴ メサ・リム・ロー ド 9 9 2 4 スイート ピー
(86)(22)出願日	平成30年4月21日(2018.4.21)	(74)代理人	100082072 弁理士 清原 義博
(65)公表番号	特表2020-519241(P2020-519241 A)	(72)発明者	チャン, エディ, ヨーコン アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォル ニア州 サンディエゴ ジェネシー・アベ ニュー 9 6 6 5 アpartment ケー1
(43)公表日	令和2年7月2日(2020.7.2)	審査官	野村 英雄
(86)国際出願番号	PCT/US2018/028752		
(87)国際公開番号	WO2018/195526		
(87)国際公開日	平成30年10月25日(2018.10.25)		
審査請求日	令和3年3月31日(2021.3.31)		
(31)優先権主張番号	62/488,685		
(32)優先日	平成29年4月21日(2017.4.21)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
前置審査			

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 膜脂質被覆されたナノ粒子および使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

細胞膜を含む外部表面で被覆された単一のウイルスを含む内部コアを有するナノ粒子であって、ここで、細胞膜は、血球に由来し、細胞の内部タンパク質は枯渇されている、ナノ粒子。

【請求項2】

前記ウイルスが腫瘍溶解性ウイルスである、請求項1に記載のナノ粒子。

【請求項3】

前記腫瘍溶解性ウイルスがヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、レオウイルス、アデノウイルス、麻疹ウイルス、パルボウイルス、またはそれらの組み合わせである、請求項2に記載のナノ粒子。

【請求項4】

前記ウイルスがアデノウイルスである、請求項1に記載のナノ粒子。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2017年4月21日に提出された米国仮出願第62/488,685の利益を主張するものであり、当該文献は引用により全体として組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

腫瘍溶解性ウイルス（OV）は癌細胞に優先的に感染し、これを殺傷するウイルスである。ウイルスが増殖し、癌細胞の溶解（腫瘍溶解）を引き起こすか、または癌免疫抑制の微小環境を妨害し、癌細胞を取り除くために身体の免疫応答をトリガーする他のメカニズムを引き起こす。最近の首尾よい臨床データおよび薬物の認可は、腫瘍溶解性ウイルス療法の世間に対する関心を増加させた。腫瘍溶解性ウイルス療法の使用は、癌患者のための転帰を改善するために、他の薬剤、免疫チェックポイント阻害剤、およびT細胞療法と組み合わせることができる。

#### 【0003】

OVの送達経路は、腫瘍内（i.t.）注射、静脈内（i.v.）送達、および腫瘍内注射が主に適用される腹腔内送達を含む。

#### 【発明の概要】

#### 【0004】

本発明によれば、本発明はウイルスまたは同様のものを含む内部コアと、細胞に由来する細胞膜を含む外部表面を無塩水溶液中で混合する工程と；前記外部表面で被覆した前記内部コアを含むナノ粒子を形成するために前記溶液を超音波処理する工程とを含む、特定のナノ粒子の製造プロセスを提供する。

#### 【0005】

一態様では、ウイルスを含む内部コアおよび細胞由来の細胞膜を含む外部表面を含むナノ粒子が本明細書で提供される。

#### 【0006】

（引用による組み込み）

本明細書で言及される刊行物、特許、および特許出願はすべて、あたかも各々の個別の刊行物、特許または特許出願がそれぞれ参照により組み込まれるように具体的かつ個々に指示されるかのような同じ程度、参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0007】

本発明の新規な特徴はとりわけ添付の特許請求の範囲で説明される。本発明の特徴および利点のより良好な理解は、本発明の原理が用いられる例証的な実施形態を説明する以下の詳細な説明と、添付図面とを引用することによって得られる。

【図1】裸のウイルスに対して、それぞれ4分、6分、8分の様々な超音波処理時間を適用することにより調製した異なるサンプルバッチのウイルス検出アッセイの例示的な結果を示す。

【図2】ナノ粒子を調製するプロセスの様々な溶液でのウイルスのコアとRBC膜を組み合わせることにより調製した様々なサンプルバッチのウイルス検出アッセイの例示的な結果を示す。4つのサンプルバッチ（RBC膜と、生理食塩水、スクロース、デキストロースおよびリジン-デキストロースの溶液それぞれのウイルス貯蔵溶液を混合する）および1つのコントロールバッチ（裸のウイルス）が存在する。

【図3】裸のウイルスおよび被覆ウイルスのTEM画像を示す。

【図4】動的光散乱法によって測定された裸のウイルスおよび被覆ウイルスのサイズを示す。

【図5】被覆されたウイルスは、450nmで非常に低い吸光度を示したのに対し、裸のウイルスの1つははるかに高い吸光度を示す、例示的なウイルス検出アッセイの結果を示す。

【図6】被覆ウイルスと比較して、裸のウイルスをもたらず被覆ウイルスナノ粒子が脱被覆プロセスを経た後のフォローアップウイルスの検出アッセイを提供する。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0008】

現在、ほとんどの腫瘍溶解性ウイルス療法は局所注射に制限されており（腫瘍内、i.t.など）、1回の注射で治療効果を達成するのに十分かどうかはまだ調査中である。また、いくつかのOVは急性の一過性の毒性プロフィールを有することが示され、したがって

10

20

30

40

50

、ウイルスの注入は、腫瘍細胞に対するよりもウイルスに対する競合的な免疫応答を誘発する可能性がある。また、OVが血流から急速に除去される可能性があるOVの静脈内送達には問題があり、したがって、頻繁なまたは高用量の投与を必要とし、治療コストの増加と潜在的な安全性の問題につながる。したがって、標的細胞への治療薬の最終的な送達のために、長期間、循環に投与でき、かつとどまることができる、OVを含む組成物を提供することが必要である。

【0009】

ナノ粒子上でステルス部分を達成するために、ポリエチレングリコール(PEG)の採用が用いられることが、当技術分野で知られている。しかしながら、抗PEG免疫反応がトリガーされる場合があり、したがって、このようなアプローチには問題がある。両性イオン材料(例えばポリ(カルボキシベタイン)およびポリ(スルホベタイン))を利用するなどの代替アプローチが提案されている。

10

【0010】

最近、膜脂質と関連する膜タンパク質の両方を含む天然の赤血球膜を用いて被覆することにより、機能化されたナノ粒子を提供するトップダウンの生物模倣アプローチが実現され、長期循環の荷送達を提供する。C-M. J. Hu et al., "Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2011, July 5; 108(27): 10980-10985. を参照。特に、血液細胞(例えば赤血球(RBC)、白血球(WBC)あるいは血小板)に由来する膜脂質は、腫瘍溶解性ウイルスまたは同様のものではなく、様々な材料を被覆するために特に重要である。

20

【0011】

RBCで被覆した腫瘍溶解性ウイルスを用いてナノ粒子を調製する様々な試みが行われたが、既知の方法に従って成功することはなかった。腫瘍溶解性ウイルスまたは同様のものが、RBC膜で被覆されたのは今回が初めてである。本発明の実施によれば、驚くべきことに、本明細書に開示される本発明のナノ粒子を調製するために特定の条件を用いなければならないことが見い出された。

【0012】

本明細書で言及される用語「腫瘍溶解性ウイルス」は、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、レオウイルス、アデノウイルス、麻疹ウイルス、パルボウイルスまたはそれらの組み合わせの非制限的な例を含む。

30

【0013】

ウイルスは、別個に投与された非毒性プロドラッグを、拡散して隣接細胞を殺すことができる強力な細胞毒素に代謝できる酵素をコードする、自殺遺伝子の送達のためのベクターとして使用できることが技術的に知られている。したがって、本明細書に開示される治療薬は、このようなベクター、自殺遺伝子、またはコードする酵素などを含む。

【0014】

本発明によれば、驚くべきことに、ウイルス(治療薬)を含む内部コアと、無塩水溶液中の細胞に由来する細胞膜を含む外部表面とを組み合わせる工程と、前記外部表面で被覆した前記内部コアを含むナノ粒子を形成するために前記溶液に超音波処理を適用する工程と、を含むナノ粒子を製造するプロセスが見い出された。内部コアの細胞膜を被覆するプロセスにおいて、生理食塩水およびPBS溶液などの塩溶液が必要とされる既知の方法とは反対に、無塩水溶液(例えば、糖含有溶液)または同様のもの(水溶液中で糖に類似する特性を有する成分など)が、腫瘍溶解性ウイルスなどのウイルスを被覆するために必要とされる。ウイルスを含む内部コアと、細胞に由来する細胞膜を含む外部表面とを含むナノ粒子が、本発明の実施に従って初めて調製される。驚くべきことに、ウイルスのコアまたは同様のものを含むナノ粒子を調製するプロセスで使用される、5%から15%、7%から14%、9%から11%の無塩水溶液(糖含有溶液など)が必要であることが見い出された。いくつかの実施形態では、ウイルスのコアまたは同様のものを含むナノ粒子を

40

50

製造するプロセスにおいて、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%または15%の無塩水溶液（糖含有溶液など）が必要とされる。

【0015】

いくつかの実施形態では、ウイルスを含む内部コアと、細胞に由来する細胞膜を含む外部表面とを含むナノ粒子を提供する。ある実施形態では、前記ウイルスは腫瘍溶解性ウイルスである。ある実施形態では、前記腫瘍溶解性ウイルスは、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、レオウイルス、アデノウイルス、麻疹ウイルス、パルボウイルス、またはそれらの組み合わせである。ある実施形態では、前記ウイルスはアデノウイルスである。

【0016】

いくつかの実施形態では、前記細胞は、血球、脂肪細胞、幹細胞、内皮細胞、エキソソーム、分泌小胞またはシナプス小胞である。ある実施形態では、前記血球は赤血球、白血球または血小板である。ある実施形態では、前記血球は赤血球である。

10

【0017】

いくつかの実施形態では、ウイルスを含む内部コアおよび細胞に由来する細胞膜を含む外部表面を無塩水溶液中で混合する工程と、前記外部表面で被覆した前記内部コアを含むナノ粒子を形成するために前記溶液に超音波処理を適用する工程とを含むナノ粒子を製造するプロセスが提供される。ある実施形態では、前記無塩水溶液は、糖またはそのようなもの（水溶液中で糖に類似する性質を備えた成分など）を含む。ある実施形態では、前記無塩水溶液は糖溶液である。ある実施形態では、前記糖溶液はスクロースまたはデキストロースを含有する溶液である。いくつかの実施形態において、前記ウイルスは腫瘍溶解性ウイルスである。ある実施形態では、前記腫瘍溶解性ウイルスは、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、レオウイルス、アデノウイルス、麻疹ウイルス、パルボウイルス、またはそれらの組み合わせである。ある実施形態では、前記腫瘍溶解性ウイルスは、アデノウイルスである。いくつかの実施形態において、前記細胞は、血球、脂肪細胞、幹細胞、内皮細胞、エキソソーム、分泌小胞またはシナプス小胞である。ある実施形態では、前記血球は、赤血球、白血球または血小板である。ある実施形態では、前記血球は赤血球である。

20

【0018】

本発明は、腫瘍溶解性ウイルスなどの治療薬を送達するための細胞膜から誘導されたナノ粒子を提供する。薬剤は、腫瘍溶解性ウイルスなどの治療薬を細胞膜脂質を用いて被覆することにより本質的に偽装される。

30

【0019】

いくつかの実施形態において、腫瘍溶解性ウイルスなどの治療薬は、被験者（例えば、患者）の血流内の循環に適合する脂質により被覆される。これにより、特定の分子が正常組織よりも腫瘍組織に蓄積する傾向があるEPR（透過性および保持の増加、*enhanced permeability and retention*）効果を経て、腫瘍の血管系への薬剤の送達を可能にする。EPR効果は、癌組織へのナノ粒子およびリポソーム送達を説明するために通常用いられる。多くの実施例のうちの1つは、金ナノ粒子を用いる熱アブレーションに関する研究である。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるナノ粒子は腫瘍の血管系の近くに蓄積し、治療薬（例えば、OV）は癌細胞と接触する。次に、OVは細胞に感染し、細胞の溶解、死滅、または除去の結果をもたらす。

40

【0020】

いくつかの実施形態では、腫瘍溶解性ウイルスおよび同様のものを含む内部コア、および血球（例えば赤血球（RBCまたは赤血球）、白血球または血小板）、脂肪細胞、幹細胞、内皮細胞などの細胞に由来する細胞膜を含む外部表面を含むナノ粒子が本明細書で提供される。ある実施形態では、細胞膜は赤血球などの血球に由来する。

【0021】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるナノ粒子の調製方法を提供する。例えば、血球は、全血または血液供給業者から入手した処理済み赤血球から精製することがで

50

きる。人間の血液におけるRBCの豊富さ、および個々のドナーからの採血の容易さのため、RBCは膜源として特に有用である。RBCは、赤血球ゴースト(またはRBCゴースト)の形態として提供でき、この場合、内部タンパク質が枯渇しており、膜成分は本質的に無傷のままである。RBCゴーストの使用はまた、被覆プロセスの間で干渉する可能性があるRBC細胞タンパク質の存在も減少させる。いくつかの実施形態において、RBCは、O型陰性血球(すなわち、「ユニバーサルドナー」)である。より多くの被験者に治療薬(例えば、OV)を送達するために、ナノ粒子の調製においてそのような膜源が使用される場合がある。ある実施形態では、個人化されたナノ粒子のバッチのために同じ患者に由来する細胞膜を使用することができる。

#### 【0022】

他のプラットフォーム、例えばPEG被覆ナノ粒子と比較して、RBC膜由来のナノ粒子は、CD47、CD59(MAC阻害タンパク質、補体細胞溶解を回避する)、CD55(DAF)、CD35(CR1)、および身体クリアランスから自身を保護するための免疫グロブリンスーパーファミリーにおける他のメンバーなどの多くの表面マーカーを有する。いくつかの実施形態において、本明細書において被覆するために使用される細胞膜は、細胞表面マーカー、MHC分子、および糖タンパク質などの非脂質成分をさらに包含できる。他の実施形態では、細胞膜はPEGなどの親水性成分をさらに包含できる。

#### 【0023】

本明細書で使用される「細胞膜」という用語は、細胞または出現ウイルス粒子(emergent viral particle)内または周囲の選択的障壁として働く構造を封入するか、または分離する生体膜を指す。細胞膜は、イオンと有機分子に対して選択的に透過性であり、細胞内および細胞外の基質の動きを制御する。細胞膜は、リン脂質単層または二重層、および随意に付随するタンパク質および炭水化物を含む。本明細書で使用されるように、細胞膜は、細胞または細胞小器官の天然に存在する生体膜から得られた膜、またはそれに由来する膜を指す。

#### 【0024】

本明細書で使用されるように、用語「天然に存在する」は自然界に存在するものを指す。

#### 【0025】

本明細書で使用されるように、用語「それに由来する」は、細胞膜の単離、膜の部分または断片の作成、細胞または細胞小器官から採取された膜からまたは膜内の、脂質、タンパク質または炭水化物などの特定の成分の除去および/または添加などの、天然膜のその後の修飾を指す。膜は、任意の適切な方法によって天然に存在する膜から誘導可能である。例えば、膜は細胞から調製または単離することができ、調製したまたは単離した膜は、誘導した膜を形成するために他の物質または材料と組み合わせることができる。別の実施例では、*in vivo*で膜に組み込まれる「非天然の」または「天然の」物質を産生するために細胞を組み換え操作することができ、誘導した膜を形成するために細胞またはウイルス膜は細胞から調製または単離することができる。

#### 【0026】

細胞膜は既知の方法によって調製することができる。例えば、マイクロフルイダイザー(MF)または水などの低張液を使用して細胞を破壊し、その後に生理食塩水またはPBSを用いる限外濾過または透析濾過を行うことができる。場合によっては、イオン強度の高い溶液が豚の肝臓から血液を除去するのに役立ち、そのため、PBSまたはNaCl溶液は、濾過プロセスを通じて細胞内塊を除去するのに役立つ。EDTAなどの抗凝固剤も、例えば不純物を除去するために透析濾過中に使用することができる。いくつかの実施形態では、膜を精製するために、タンジェンシャルフローフィルトレーション(TFF)デバイスまたは遠心分離を使用することができる。精製された膜成分は、BCAタンパク質試験などにより、細胞タンパク質の存在について試験することができる。好ましくは、ほとんどの非膜成分は被覆の前に除去される。

#### 【0027】

多くの努力にもかかわらず、US2013/0337066の手順などの既知の方法

10

20

30

40

50

に従って、腫瘍溶解性ウイルスまたはCRISPRなどのウイルス、ウイルスからのDNA配列は、細胞膜（例えば、RBC膜）によって被覆またはカプセル化できないことが見いだされた。驚くべきことに、細胞膜（例えば、RBCゴースト）は、特定の条件でのみウイルスまたはそのようなものを被覆することが見いだされた。本明細書に開示されるナノ粒子を調製するプロセスは、(1) RBCゴーストおよびOVの混合物の超音波処理(2) スクローズ溶液などの無塩溶液、を必要とする。

**【0028】**

本発明の実施によれば、被覆に適したウイルスには、腫瘍溶解性ウイルスおよび癌細胞に感染し得る他のウイルスを含む。ウイルスは、エンベロープありまたはエンベロープなしの形態であり得る。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターが好ましい。ウイルスベクターは癌細胞に感染して複製（複製能力）できるからである。

10

**【0029】**

（特定の薬学および医学の用語）

本明細書で使用されるような、製剤、組成物、または成分に関する用語「許容可能な」とは、処置されている被験体の一般的な健康状態に対して持続的な有害効果がないことを意味する。

**【0030】**

用語「担体」は、本明細書で使用されるように、細胞または組織への化合物の取り込みを促す比較的無毒な化学化合物または薬剤を指す。

**【0031】**

用語「同時投与」などは、本明細書で使用されるように、一人の患者に対する選択された治療薬の投与を包含することを意味しており、同じあるいは異なる投与経路によって、または同じあるいは異なる時点で薬剤が投与される治療レジメンを含むことを意図している。

20

**【0032】**

用語「希釈剤」は、送達の前に所望の化合物を希釈するために使用される化学化合物を指す。希釈剤はまた、より安定した環境を提供できるので、化合物を安定させるために用いられることもある。緩衝液（pHの制御または維持もまたもたらすことができる）中に溶解した塩は、限定されないが、リン酸緩衝生理食塩溶液を含む当該技術分野の希釈剤として利用される。

30

**【0033】**

「有効な量」または「治療上有効な量」という用語は、本明細書で使用されるように、処置されている疾患または疾病の症状の1つ以上をある程度まで軽減する、投与されている薬剤または化合物の十分な量を指す。その結果は、疾患の徴候、症状、または原因の減少および/または軽減であり得るか、あるいは、生物系の任意の他の所望の変化であり得る。例えば、治療用途のための「有効な量」は、疾患症状の臨床的に有意な減少を提供するために必要とされる、本明細書に開示されるような化合物を含む組成物の量である。任意の個々の場合における適切な「有効な」量は、用量増加試験などの技術を使用して定められてもよい。

**【0034】**

「増強する（enhance）」あるいは「増強すること（enhancing）」という用語は、本明細書で使用されるように、効能または持続時間のいずれかにおいて所望の効果を増加させるか延長することを意味する。したがって、治療薬の効果を増強することに関して、「増強する」という用語は、効能または持続時間のいずれかにおいて、系に対する他の治療薬の効果を増大させるかまたは延長する能力を指す。本明細書で使用されるような「増強有効量」は、望ましい系において別の治療薬の効果を増強するのに十分な量を指す。

40

**【0035】**

「医薬組成物」という用語は、ナノ粒子（すなわち、本明細書に記載されるナノ粒子）と、崩壊剤、結合剤、潤滑剤、担体、安定剤、希釈剤、分散剤、懸濁剤、増粘剤、および

50

／または賦形剤などの他の化学成分との混合物を指す。医薬組成物は、有機体への化合物の投与を促進する。化合物を投与する複数の技術が当該技術分野に存在し、これらは以下を含む：静脈内、経口、エアロゾル、非経口、経眼、肺、および局所的な投与。

【 0 0 3 6 】

「被験体」または「患者」という用語は、哺乳動物を包含する。哺乳動物の例は、限定されないが、以下の哺乳動物のクラスの任意のメンバーを含む：ヒト、チンパンジーなどの非ヒトおよび霊長類、ならびに他の類人猿およびサル種、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ブタなどの家畜、ウサギ、イヌ、およびネコなどの飼育動物、ラット、マウスおよびモルモットなどの、げっ歯類を含む実験甲動物。1つの実施形態において、哺乳動物はヒトである。

10

【 0 0 3 7 】

用語「処置する」、「処置すること」、あるいは、「処置」は、本明細書で使用されるように、疾患または状態の少なくとも1つの症状を緩和するか、軽減するか、あるいは改善すること、追加の症状を予防すること、疾患または状態を阻害すること、例えば、疾患または状態の進行を抑えること、疾患または状態を軽減すること、疾患または疾病の退行を引き起こすこと、疾患または疾病によって引き起こされた状態を軽減すること、あるいは疾患または状態の症状を予防的におよび／または治療的にのいずれかで止めることを含む。

【 0 0 3 8 】

本明細書で説明される様々な実施形態またはオプションのすべては、任意のおよび全てのバリエーションで組み合わせることができる。以下の実施例は、本発明を例証するためにのみ役立つものであり、本発明を限定するものと決して解釈されるべきではない。

20

【実施例】

【 0 0 3 9 】

実施例 1：細胞膜調製の例示的な調製

細胞膜調製（例えば、RBCゴースト調製）は、当該技術分野で知られている。ここで、本発明のナノ粒子調製のための例示的な細胞膜を提供するための、細胞膜を調製する非限定的な例であるRBC細胞膜は以下の通りである。

【 0 0 4 0 】

【表 1】

装置および材料の要件

30

装置／付属物
Millipore Labscale TFF システム
Millipore Pellicon 2 mini TFF フィルター (PXDVPPC50)
0.5mM EDTA
DPBS (10X), カルシウムなし, マグネシウムなし
パックされたRBC, ACD-A抗凝血剤

【 0 0 4 1 】

手順：

1. パックされた赤血球バッグを - 80 の冷蔵庫に入れ、一晚凍結させる。翌朝 4 の冷蔵庫でパックされた赤血球を解凍させる。

2. 0.5mM EDTA 360mL を培地ボトルに注ぎ、冷蔵庫で一晩保存する。

3. pRBCから40mLの血液を培地ボトルに加え、振とうさせてよく混合する。冷蔵庫で30分間穏やかに混合する。

4. 400mLのWFI水をTFF (Millipore社製のLabscale TFF System) プロセスリザーバーに入れ、リザーバーを閉じる。TFFシステムを起動し、流量ノブをレベル4に回す。このシステムを5分間再循環させ、すべての水を浸透ラインに押し込み、フィルター (Millipore社製のPellicon 2

40

50

mini TFF filter、PXDVPPC50)を事前に湿らせる。システムを一時停止する。

5. ステップ3の混合物をTFFプロセスリザーバーに注ぐ。

6. この混合物を100 mLに濃縮する。

7. 400 mL PBSを用いて透析濾過する。PBSをリザーバーにゆっくりと注ぎ、リザーバー内の溶液を100 ± 50 mLに保つ。

8. 200 mL 0.5 mM EDTAにて透析濾過する。EDTA溶液をリザーバーにゆっくりと注ぎ、リザーバー内の溶液を100 ± 50 mLに保つ。

9. 40 mLまで最後の濃縮を行う。圧力を監視し、ポンプ速度を下げて圧力を40 psi未満に保つ。

10. 脂質を50 mLコニカルチューブに送り出し、さらに分析するために-80の冷凍庫に保存し、細胞膜の調製および/またはプロセスを確認する。

#### 【0042】

実施例2：様々な超音波処理時間の研究を用いて既知の方法に従ってウイルスコアを含むナノ粒子の調製の失敗

この手順は、プローブ超音波処理を使用した、1 mLの被覆したウイルス(10<sup>10</sup> VP/mL)の実験室規模のプロセスについて説明している。このプロセスで使用される賦形剤の細胞膜(例えば、赤血球膜)は、原材料として0.1 mLのバックされた赤血球と等価である。以下は、既知の方法に従ってウイルスコアを含むナノ粒子の調製を試みる詳細な説明である。

#### 【0043】

米国公開番号2013/0337066におけるもののような既知の方法に従ってウイルスのコアを含むナノ粒子を調製する最初のいくつかの試みは成功しなかったため、例示的なウイルス(すなわち、ヒト5型アデノウイルス)のコアを含むナノ粒子を調製することを望み、様々な超音波処理時間(4分、6分、および8分)を適用することにより、エネルギー状態を調査することが決定された。

#### 【0044】

装置および材料：以下は、1 mL被覆ウイルスの合成に使用される装置とおよび材料の簡潔な説明である：

#### 【0045】

プローブ超音波発生装置：Qsonica XL2000

#### 【0046】

#### 【表2】

##### 原材料のリスト

名称	説明	注記
アデノウイルス	ヒト5型アデノウイルス	vector biolabsより
混合物で使用される溶液	生理食塩水	既知の方法で記載されている通り
H <sub>2</sub> O	注射のための滅菌水	
RBC膜	実施例1のようにRBC膜誘導プロセスから作製	1.5 mg/mL BCAに基づく

#### 【0047】

##### 手順

1. 1.5 mL微量遠心チューブに800 uLの生理食塩水を加える。

2. 200 μLのRBC膜(1.5 mg/mL)をこのチューブに加え、よく混合する

。これにより、0.3 mg/mL膜のプロセス混合物が作成される。

3. プローブ超音波発生装置の電源を入れ、70%エタノールでプローブを拭き、プローブのみをバイオフィードに移動させる。

4. 超音波破碎機の出力をレベル2に調整する(出力~3W)。

5. プロセス温度を4 未満に保つために、冷水のアイスボックスを準備する。

6. 10 uLのアデノウイルス貯蔵溶液(Vector biolabs、Lot# 20170922)をプロセス混合物に追加する。

7. チューブをアイスボックスに入れる。プローブをチューブに浸す。プローブが底に触れないようにする。

8. 1秒の超音波処理および各超音波処理の間隔を1秒にして、混合物を手動で超音波処理する。このステップを4、6、および8分間維持して、3つのサンプルバッチを作成する。

10

9. 裸のウイルスの場合は、ステップ1~8に従うが、2. で分子グレード水に溶液を変更する。

10. ベンダーの手順(Virusys Corporation、AK290-2)に従って、各バッチのサンドイッチELISAデータを取得する。

#### 【0048】

被覆ウイルスのナノ粒子は、ウイルス検出アッセイによって確認された。アッセイは、サンプルから抗原を捕捉するためにモノクローナル抗アデノウイルス抗体を利用する二重抗体(サンドイッチ)ELISAである。サンプルのインキュベーション後、ビオチン化検出抗体を添加し、このステップの後にHRP-ストレプトアビジンを添加する。ヘキソン抗原の存在は、HRP基質の添加とそれに続く停止試薬の添加により視覚化される。ウェル内の発色は、サンプル中のアデノウイルスヘキソン抗原の存在を示している。定量的な目的のために、Virusysは、定量測定用の標準曲線を作成するためにこの製品とともに使用できる個別のキャリブレーションキット(AK291、アデノウイルス抗原キャリブレーションキット)を提供する。

20

#### 【0049】

結果は、4分間の超音波処理時間を適用すると、ウイルス検出アッセイに基づいてより良い結果が得られることを示している(図1を参照)。しかしながら、すべてのバッチとコントロールサンプル(つまり、裸のウイルスサンプル)の間でエッセイの結果を比較する場合、吸光度の差はウイルスの被覆の成功の根拠になるほど十分に大きくない。したがって、他の条件の変更が必要である。

30

#### 【0050】

実施例3: 高せん断ホモジナイザーによる既知の方法に従ったウイルスコアを含むナノ粒子の調製の失敗

使用した装置および材料は、RBC膜とウイルス貯蔵溶液との混合物のためにPBS溶液を使用したことを除いて、実施例2と同じである。次に、以下に詳述するように、混合物を高せん断ホモジナイザープロセスにかけた。

#### 【0051】

手順:

1. LM10高せん断ホモジナイザー(Microfluidics)の冷却ボックスに冷水を注ぐ。圧縮空気を機械に接続し、空気圧を約120 psiに調整する。

2. 100 mLの脱イオン水でリザーバーを満たし、処理圧力を10 Kpsiに設定する。システムを脱イオン水で2回、PBSで2回洗浄する。

3. 14 mLのPBSと1 mLの細胞脂質(1.5 mg/mL)および50 uLアデノウイルス( $10^{12}$  vp/mL、Vector Biolabs社製)を混合し、混合物をリザーバーに注ぐ。

4. 機械を始動し、高せん断ストロークを5回繰り返す。

5. 製品コンテナからサンプルを収集する。

#### 【0052】

40

50

実験は成功せず、ウイルス検出アッセイを使用してもウイルスは検出されなかった。ウイルスは、装置によって生成される高いせん断力によって潜在的に破壊された。したがって、非ウイルス材料を含むコアへのRBC膜の適用に成功したにもかかわらず、本明細書に開示される例示的なウイルスのコアを含む成功したナノ粒子をもたらす条件はまだ疑問の余地があった。

【0053】

実施例4：様々な混合溶液の変化を伴うウイルスコアを含むナノ粒子の調製の試み

既知の方法と科学的原理に基づいて、RBCゴーストを調製するためにこれらの溶液が使用されたため、RBCの生理食塩水またはPBS溶液の膜での被覆またはカプセル化のプロセスが必要とされる。既知の手順とは異なり、「非伝統的な」手順を検討するために、いくつかの無塩溶液が使用された。

1. 1.5 mLの微量遠心チューブに800 uLの様々な溶液（例えば、生理食塩水、スクロース、デキストロース、リジンデキストロース）を加える。

2. 200 μLのRBC膜（1.5 mg / mL）をチューブに加え、よく混合する。これにより、0.3 mg / mL膜を伴うプロセス混合物が作成される。

3. プロブ超音波発生装置の電源を入れ、70%エタノールでプロブを拭き、プロブのみをバイオフードに移動させる。

4. 超音波破碎機の出力をレベル2に調整する（出力～3W）。

5. プロセス温度を4 未満に保つために、冷水のアイスボックスを準備する。

6. 10 uLのアデノウイルス貯蔵溶液（Vector Biolabs、Lot # 20170922）をプロセス混合物に追加する。

7. チューブをアイスボックスに入れる。プロブをチューブに浸す。プロブが底に触れないようにする。

8. 1秒の超音波処理および各超音波処理の間隔を1秒にして、混合物を手動で超音波処理する。このステップを4分間維持して、様々なバッチを作製する。

9. 調製したバッチの確認および比較のために、ベンダーの手順（Virusys Corporation、AK290-2）に従って、サンドイッチELISAデータを取得する。

【0054】

米国2013/033 7066に記載されている既知の手順に基づいて、生理食塩水またはPBSはナノ粒子を調製するために使用されるべきである。しかしながら、図2に明確に示されるように、ELISAアッセイは、被覆されていないウイルス（コントロール）と比較してほぼ同じ吸光度を示したため、生理食塩水バッチは、カプセル化された（または被覆された）ナノ粒子の非常に悪い結果をもたらした。一方で、予想外かつ驚くべきことに、糖含有溶液バッチ（例えば、スクロース、デキストロース、およびリジンデキストロース）のような無塩溶液バッチは、はるかに低い吸光度を示し、ウイルスコア上のRBC膜のより良い被覆を示している。

【0055】

実施例5：例示的な条件下での腫瘍溶解性ウイルスを伴うRBC膜の被覆：

ウイルス貯蔵溶液とRBC膜の混合物に無塩溶液を使用して予想外に見つかった結果を確認するため、ウイルスコアを含むナノ粒子を調製するために以下に示す例示的な本発明の手順が使用された。

【0056】

装置、材料は、RBC膜とウイルス貯蔵溶液の混合に11%のスクロース溶液を使用したことを除いて、実施例2のものと同様である。

【0057】

10

20

30

40

50

## 【表 3】

## 原材料のリスト

名称	説明	注記
アデノウイルス	ヒト 5 型アデノウイルス	vector biolabsより
スクロース		11%溶液で作製するため
H <sub>2</sub> O	注射のための滅菌水	
RBC膜	実施例 1と同様にRBC膜誘導プロセスから作製	1.5 mg/mL BCAに基づく

10

## 【0058】

## 【表 4】

## 緩衝液および溶液のリスト

名称	説明	量
スクロース溶液	11%	10 mL
被覆プロセス	0.3 mg/mL 膜	1 mL
混合物	BCAに基づく	

20

## 【0059】

## 手順：

1. 1.5 mL 微量遠心チューブに 800  $\mu$ L の 11%スクロース溶液を加える。
2. 200  $\mu$ L の RBC 膜 (1.5 mg/mL) をチューブに加え、よく混合する。これにより、0.3 mg/mL 膜を伴うプロセス混合物ができる。
3. プローブ超音波発生装置の電源を入れ、70%エタノールでプローブを拭き、プローブのみをバイオフィードに移動させる。
4. 超音波破碎機の出力をレベル 2 に調整する (出力 ~ 3 W)。
5. プロセス温度を 4 未満に保つために、冷水のアイスボックスを準備する。
6. 2.5  $\mu$ L の例示的な腫瘍溶解性ウイルス (例えば、アデノウイルス貯蔵溶液 (Vector biolabs、Lot # 20170721.2)) を処理混合物に加え、混合物の約 9% のスクロース溶液を結果としてもたらす。5% から 15% の糖溶液が同様の条件で機能することが当業者によって予想される。
7. チューブをアイスボックスに入れる。プローブをチューブに浸す。プローブが底に触れないようにする。
8. 1 秒の超音波処理および各超音波処理の間隔を 1 秒にして、混合物を手動で超音波処理する。このステップを 4 分間維持して、ウイルスのコアを含むナノ粒子を調製する。
9. 裸のウイルスの場合には、手順 1 ~ 9 に従うが、2. で溶液を分子グレード水に変更する。

30

40

## 【0060】

結果的に得た被覆されたナノ粒子は、透過型電子顕微鏡 (TEM) で画像化された。図 3 は、裸のウイルスと RBC 膜被覆ウイルスとの間の画像比較を示す。粒子サイズの比較

50

を図4に示し、これは被覆層が約10nmであることを示唆している。TEM画像は、ナノ粒子のサイズが110nmから120nm(約118nm)の範囲にあることを示している。

【0061】

図5は、RBC膜被覆ウイルスは検出抗体から保護され、一方で裸のウイルスは明確に示され；吸光度差が非常に十分であり、RBC膜被覆の結果が非常に良好であることを示している。次に、被覆されたナノ粒子はRBC膜を除去するプロセスを経て、その後、同じELISA試験を受けて被覆結果をさらに確認した。

【0062】

被覆除去のために、ELISAプロセスの前に、200uLの被覆ウイルスと50uLのサンプル調製バッファー(Virusys Corporation社製、界面活性剤を含む)を混合する。図6は、RBC膜の除去後にウイルスが再び検出されたことを示しており、先の被覆ウイルスを確認している。

10

【0063】

本発明の好ましい実施形態が本明細書で示され記載されてきたが、こうした実施形態がほんの一例として提供されているに過ぎないということは当業者にとって明白である。多くのバリエーション、変化、および置換が、本発明から逸脱することなく、当業者の心に思い浮かぶであろう。本明細書に記載される本発明の実施形態の様々な代案が、本発明の実施において利用されるかもしれないことを理解されたい。以下の請求項は本発明の範囲を定義するものであり、この請求項とその均等物の範囲内の方法、および構造体がそれによって包含されるものであるということが意図されている。

20

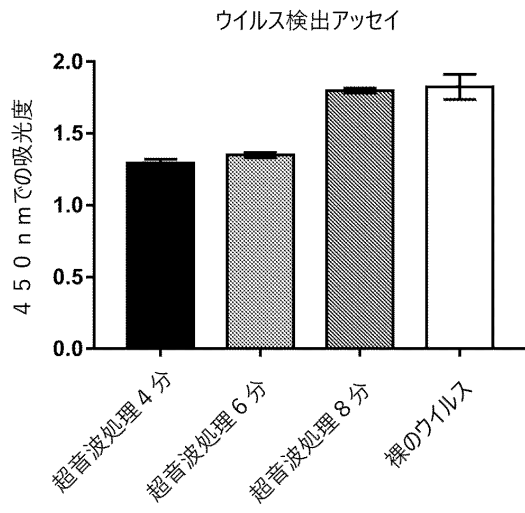
30

40

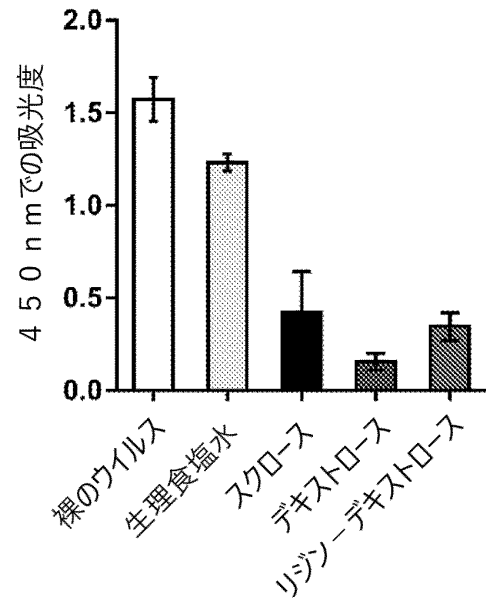
50

【図面】

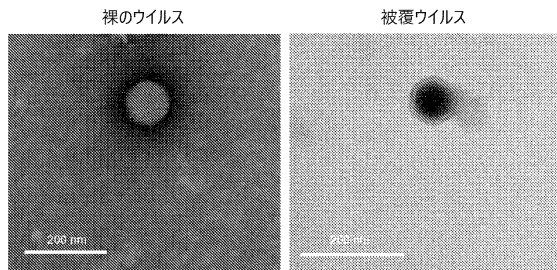
【図 1】



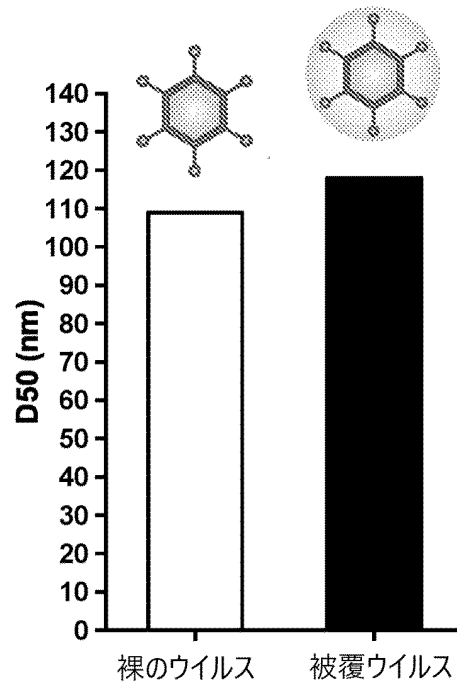
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

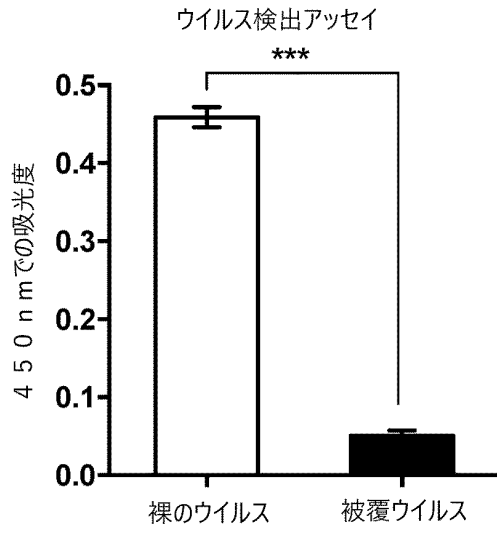
20

30

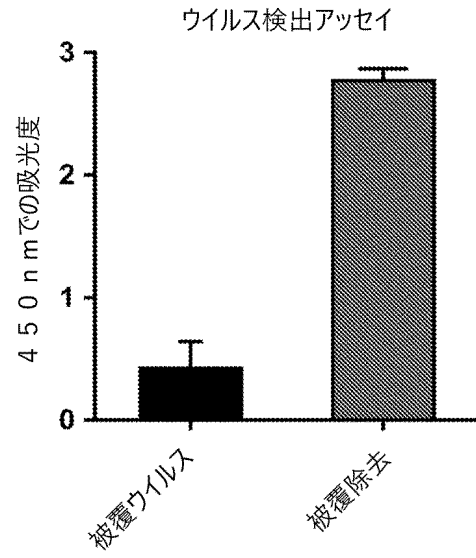
40

50

【図5】



【図6】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

**B 8 2 Y 5/00 (2011.01)**

F I

B 8 2 Y 5/00

(56)参考文献

米国特許出願公開第 2 0 1 0 / 0 2 0 3 0 2 4 ( U S , A 1 )

特表 2 0 1 6 - 5 2 0 5 6 7 ( J P , A )

国際公開第 2 0 1 6 / 1 9 2 4 5 1 ( W O , A 1 )

米国特許出願公開第 2 0 1 6 / 0 3 1 7 5 9 1 ( U S , A 1 )

米国特許出願公開第 2 0 1 5 / 0 2 8 4 6 9 1 ( U S , A 1 )

国際公開第 2 0 0 6 / 0 9 0 8 1 6 ( W O , A 1 )

特表 2 0 0 5 - 5 2 5 9 9 2 ( J P , A )

Duebgen, M., et al. , "Stem Cells Loaded With Multimechanistic Oncolytic Herpes Simplex V  
irus Variants for Brain Tumor Therapy." , J Natl Cancer Inst , 2014年06月11日 , Vol.106,  
No.6 , dju090(pp.1-9) , DOI: 10.1093/inci/dju090 , [online] May 16, 2014

Komarova, S., et al. , "Mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles for delivery of onco  
lytic adenoviruses." , Mol Cancer Ther , 2006年 , Vol.5, No.3 , pp.755-766 , DOI: 10.1158  
/1535-7163.MCT-05-0334

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8

C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

P u b M e d