

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6776223号
(P6776223)

(45) 発行日 令和2年10月28日 (2020. 10. 28)

(24) 登録日 令和2年10月9日 (2020. 10. 9)

(51) Int. Cl. F I

A 6 1 K 9/127	(2006. 01)	A 6 1 K 9/127
A 6 1 K 9/14	(2006. 01)	A 6 1 K 9/14
A 6 1 K 47/34	(2017. 01)	A 6 1 K 47/34
A 6 1 K 47/24	(2006. 01)	A 6 1 K 47/24
A 6 1 K 47/28	(2006. 01)	A 6 1 K 47/28

請求項の数 13 (全 61 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-503780 (P2017-503780)	(73) 特許権者	514124573
(86) (22) 出願日	平成27年4月1日 (2015. 4. 1)		チルドレンズ ホスピタル ロサンゼルス
(65) 公表番号	特表2017-512840 (P2017-512840A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ロサ
(43) 公表日	平成29年5月25日 (2017. 5. 25)		ンゼルス サンセット ブールバード 4
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/023943		6 5 0
(87) 国際公開番号	W02015/153805	(73) 特許権者	516294838
(87) 国際公開日	平成27年10月8日 (2015. 10. 8)		ナノバレント ファーマシューティカルズ
審査請求日	平成30年3月28日 (2018. 3. 28)		インコーポレイテッド
(31) 優先権主張番号	61/973, 760		アメリカ合衆国 5 9 7 1 8 モンタナ州
(32) 優先日	平成26年4月1日 (2014. 4. 1)		ボーズマン テクノロジー ブールバー
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		ド 9 1 0 スイート ジー
		(74) 代理人	100102978
			弁理士 清水 初志
		(74) 代理人	100102118
			弁理士 春名 雅夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌治療のためのターゲティングされた重合ナノ粒子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

P E G ポリマー鎖を有する少なくとも 1 種の P E G 化重合性脂質を含む重合性脂質、こ
こで、P E G ポリマー鎖を有する P E G 化重合性脂質が m - P E G 2 0 0 0 - P C D A で
ある；及び

非重合性脂質を含む、ハイブリッド重合リボソームナノ粒子であって、
以下を含む、ハイブリッド重合リボソームナノ粒子：

(a)

P E G ポリマー鎖を有する少なくとも 1 種の P E G 化重合性脂質を含む、約 1 5 ~ 4 0 m
o l % の重合性脂質、ここで、P E G ポリマー鎖を有する P E G 化重合性脂質が m - P E
G 2 0 0 0 - P C D A である、ならびに

少なくとも約 1 0 m o l % の両イオン性荷電 (z w i t t e r i o n i c a l l y c
h a r g e d) 脂質、

約 2 0 ~ 4 5 m o l % の中性荷電分子、及び

約 1 ~ 1 5 m o l % の陰性荷電脂質

を含む非重合性脂質；または

(b)

P E G ポリマー鎖を有する少なくとも 1 種の P E G 化重合性脂質を含む、約 1 5 m o l %
の重合性脂質、ここで、P E G ポリマー鎖を有する P E G 化重合性脂質が m - P E G 2 0
0 0 - P C D A である、ならびに

10

20

約 5 1 m o l % の両イオン性荷電脂質、
 約 3 2 m o l % の中性荷電分子、及び
 約 2 m o l % の陰性荷電脂質
 を含む非重合性脂質。

【請求項 2】

P E G ポリマー鎖を有する少なくとも 1 種の P E G 化重合性脂質を含む重合性脂質、こ
こで、P E G ポリマー鎖を有する P E G 化重合性脂質が m - P E G 2 0 0 0 - P C D A で
ある、及び
 非重合性脂質を含む、ハイブリッド重合リポソームナノ粒子であって、
 以下を含む、ハイブリッド重合リポソームナノ粒子：

(a)

h - P E G 1 P C D A 約 1 4 m o l %、
 水素添加大豆 P C 約 5 1 m o l %、
 コレステロール 約 3 2 m o l %、
 m - P E G 2 0 0 0 - D S P E 約 2 m o l %、及び
 m - P E G 2 0 0 0 - P C D A 約 1 m o l %；または

(b)

h - P E G 1 P C D A 約 1 4 m o l %、
 水素添加大豆 P C 約 4 8 m o l %、
 コレステロール 約 3 2 m o l %、
 m - P E G 2 0 0 0 - D S P E 約 2 m o l %、
 m a l - P E G 2 0 0 0 - D S P E 約 3 m o l %、及び
 m - P E G 2 0 0 0 - P C D A 約 1 m o l %；または

(c)

h - P E G 1 P C D A 約 2 4 m o l %、
 水素添加大豆 P C 約 4 1 m o l %、
 コレステロール 約 3 2 m o l %、
 m - P E G 2 0 0 0 - D S P E 約 2 m o l %、及び
 m - P E G 2 0 0 0 - P C D A 約 1 m o l %。

【請求項 3】

P E G ポリマー鎖を有する少なくとも 1 種の P E G 化重合性脂質を含む重合性脂質と、
 非重合性脂質とを含むハイブリッド重合リポソームナノ粒子を提供する工程であって、P
E G ポリマー鎖を有する P E G 化重合性脂質が m - P E G 2 0 0 0 - P C D A である、工
程、

該重合リポソームナノ粒子の膜を隔ててイオン勾配を確立する工程、
 治療用物質を提供する工程、及び
 該治療用物質を該重合リポソームナノ粒子とともにインキュベートし、これにより、該
 重合リポソームナノ粒子に該治療用物質をローディングする工程
 を含む、ハイブリッド重合リポソームナノ粒子に治療用物質をローディングする方法。

【請求項 4】

脂質ミセルを提供する工程、
 ターゲティング物質を提供する工程、
 該ターゲティング物質を該脂質ミセルに結合させる工程、
 P E G ポリマー鎖を有する少なくとも 1 種の P E G 化重合性脂質を含む重合性脂質と、
 非重合性脂質とを含むハイブリッド重合リポソームナノ粒子を提供する工程であって、P
E G ポリマー鎖を有する P E G 化重合性脂質が m - P E G 2 0 0 0 - P C D A である、工
程、及び

該重合リポソームナノ粒子を、該ターゲティング物質と結合した該脂質ミセルとともに
 インキュベートし、これにより、該ターゲティング物質を該重合リポソームナノ粒子に移
 行させる工程

10

20

30

40

50

を含む、ターゲティング物質をハイブリッド重合リポソームナノ粒子に結合させる方法。

【請求項 5】

遊離チオール基を有するターゲティング物質を提供する工程、

P E G ポリマー鎖を有する少なくとも 1 種の P E G 化重合性脂質、少なくとも 1 種のマレイミド末端 (m a l e i m i d e t e r m i n a t e d) P E G 化脂質を含む重合性脂質と、非重合性脂質とを含むハイブリッド重合リポソームナノ粒子を提供する工程であって、P E G ポリマー鎖を有する P E G 化重合性脂質が m - P E G 2 0 0 0 - P C D A である、工程、及び

該重合リポソームナノ粒子を、該遊離チオールを含有する該ターゲティング物質とともにインキュベートし、これにより、該ターゲティング物質を該重合リポソームナノ粒子に共有結合させる工程

10

を含む、ターゲティング物質をハイブリッド重合リポソームナノ粒子に結合させる方法。

【請求項 6】

前記イオン勾配が硫酸アンモニウム勾配及び / または p H 勾配である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 7】

前記 P E G 化重合性脂質が、約 0 . 1 ~ 1、1 ~ 5、5 ~ 1 0、または 1 0 ~ 1 5 m o l % である、請求項 3 ~ 6 いずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記治療用物質が、ドキソルビシン、イリノテカン、シスプラチン、トポテカン、ビンクリスチン、マイトマイシン、パキシリタキソール、シタラピン、ミトキサントロン、A r a - C (シタラピン)、V P - 1 6 (エトポシド)、若しくは s i R N A、またはそれらの組み合わせである、請求項 3、6 および 7 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 9】

前記ターゲティング物質が、

(a) 抗 C D 1 9 抗体、抗 C D 3 4 抗体、抗 C D 9 9 抗体、抗 C D 1 1 7 抗体、抗 C D 1 6 6 抗体、若しくは抗 C A 1 9 - 9 抗体、またはそれらの組み合わせである、または

(b) 癌性細胞上の表面マーカーに特異的に結合できるペプチドである、

請求項 4 ~ 5 および 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 0】

30

前記ターゲティング物質上のチオール基と前記脂質ミセル上のマレイミド基との間の反応を介して、該ターゲティング物質を該脂質ミセルに結合させる、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 1 1】

前記ターゲティング物質上のチオール基と前記重合リポソームの外側表面上のマレイミド基との間の反応を介して、該ターゲティング物質を該重合リポソームの外側表面に結合させる、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記ハイブリッド重合リポソームナノ粒子が、非凝集性ハイブリッド重合リポソームナノ粒子である、請求項 1 または 2 に記載のハイブリッド重合リポソームナノ粒子。

40

【請求項 1 3】

前記ハイブリッド重合リポソームナノ粒子が、非凝集性ハイブリッド重合リポソームナノ粒子である、請求項 3 ~ 1 1 のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

連邦政府支援の研究に関する言明

本発明は、政府支援で全米科学財団より助成金 I I P - 1 1 4 3 3 4 2 号の元で実施された。政府は本発明に特定の権利を有する。

【0 0 0 2】

50

発明の分野

本発明は、ターゲティングされたハイブリッド重合リポソームナノ粒子を新規薬物送達ビヒクルとして用いて病態を治療するための組成物、方法、及びキットに関する。病態にはさまざまな癌が挙げられるが、これらに限定されない。ハイブリッド重合リポソームナノ粒子は癌細胞を標的にし、癌細胞内へ内部移行され、封入されている薬物を放出して癌細胞を損傷／破壊する。

【背景技術】

【0003】

背景

本明細書に引用されているすべての刊行物は、個々の刊行物または特許出願についてそれぞれが参照により本明細書に組み込まれることが具体的かつ個別に指示されている場合と同じ程度に、参照によりその全体が組み込まれるものとする。以下の説明は、本発明の理解に有用となり得る情報を含んでいる。本明細書で提供される任意の情報が先行技術である、若しくは本願で請求する発明に関連していること、または具体的若しくは暗黙のうちに参照される任意の刊行物が先行技術であることを承認するものではない。

【0004】

世界中で、毎年推定350,000人が白血病と診断されており、年間約257,000人が死亡している（国際がん研究機関（International Agency for Research on Cancer））。米国だけでも、推定274,930人が白血病に罹患しており、白血病と診断された全成体の約90パーセントを占めている（世界保健機関）。2012年、新たに47,150人の患者が白血病と診断され、生存が予想されるのはわずか約50パーセントである（米国対がん協会（American Cancer Society））。従来の最先端の治療法は、多くの症例において有効であるものの、白血病患者の生存率の低さから改善が必須であることは明らかである。

【0005】

白血病は治療が非常に高額であり、多くの患者は治療を受けることができない。白血病患者の大半は化学療法で治療される（オハイオ州立大学総合がんセンター）。化学療法を1回受けるだけで治療費は150,000ドルになることがあり、通常、何回かの治療が必要である。任意選択治療である骨髄移植は250,000ドル以上かかることが知られている（Edgar Law Firm, カリフォルニア州サンタ・ローザ）。The National Cancer Institute's Cancer Trends Progress Report: 2011 - 2012 改訂版（非特許文献1）によれば、米国では毎年、54億ドルが白血病治療に費やされている、すなわち、2012年に白血病と診断された47,150人の患者一人あたり114,500ドル超が費やされると予測している。

【0006】

本明細書において、本発明者らは、ハイブリッド重合リポソームナノ粒子（HPLN）を利用して抗癌薬を封入し、封入した抗癌薬を癌細胞まで送達するという薬物送達システムを提供する。記載の送達システムは、任意の対象薬物を実質的に封じ込め、かつ既知の特徴的または特異的な細胞マーカーが存在する任意の組織を標的にするために、使用されることができる。したがって、本発明は、用途が非常に広いプラットフォーム技術を提供する。

【0007】

本明細書に記載のHPLNは、生体適合性があり、かつ、中に封入されている薬物の生物学的利用能を高める、独自のタイプのナノ粒子材料を用いることにより、他の多くのタイプの送達粒子物質に比して大きな利点を提供する。さらに、かかる技術を、粒子特性を調節してカスタマイズし、多量の薬剤をその内部に収め、実際に固化して結晶にする。他とは異なるさらに別の特徴は、腫瘍を標的とする分子を粒子表面に取り付けるカスタマイズ化方法であり、これにより健全な組織を避けながら腫瘍細胞へアクセスする際の粒子の選択性が改善される。

10

20

30

40

50

【0008】

HPLN内封入薬物を使用することにより、癌患者を治療する医師には、非癌細胞に対する用量相関的な毒性が最小化され、既存の抗癌化学療法物質の治療濃度域が有意に広がることにつながるかもしれない。こうした治療を受ける患者の場合、本明細書に記載のHPLNにより、幾つかの重要な特性で達成される、より有効な治療が約束される。すなわち、(a)治療時間の短縮、(b)通信回数の減少、(c)正常組織に対する損傷の低下、(d)より短時間の回復、及び(e)生存可能性の増大である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】The National Cancer Institute's Cancer Trends Progress Report: 2011 - 2012
改訂版

【発明の概要】

【0010】

本発明のさまざまな実施形態は、ハイブリッド重合リポソームナノ粒子(HPLN)を提供する。HPLNは、PEGポリマー鎖を有する少なくとも1種のPEG化重合性脂質を含む重合性脂質、及び非重合性脂質を含んでもよい、または該重合性脂質及び該非重合性脂質からなってもよい。一実施形態において、PEG化重合性脂質はm-PEG2000-PCDAである。

【0011】

本発明のさまざまな実施形態はHPLNを提供する。HPLNは、PEGポリマー鎖を有する少なくとも1種のPEG化重合性脂質を含む重合性脂質(約15~40mol%)、及び非重合性脂質を含んでもよい、または該重合性脂質及び該非重合性脂質からなってもよい。いくつかの実施形態では、非重合性脂質には、両イオン性荷電脂質(少なくとも約10mol%)、中性荷電分子(約20~45mol%)、陰性荷電脂質(約1~15mol%)、及び/またはそれらの組み合わせが含まれる。一実施形態において、PEG化重合性脂質はm-PEG2000-PCDAである。

【0012】

いくつかの実施形態では、重合性脂質は、PEGポリマー鎖を有していない(エチレングリコールユニットが1つのみの「PEG1」)少なくとも1種の重合性脂質を含み、それらにはh-PEG1-PCDA、スルホ-PEG1-PCDA、m-PEG1-PCDA、及びmal-PEG1-PCDAが挙げられるが、これらに限定されない。

【0013】

さまざまな実施形態では、PEGポリマー鎖を有するPEG化重合性脂質は、HPLNの約0.1~1、1~5、5~10、10~15、1~15、15~30、または30~40mol%である。さまざまな実施形態では、PEGポリマー鎖は、約10~150、10~50、50~100、または100~150個のPEGユニットを含む。さまざまな実施形態では、PEGポリマー鎖の分子量は約500~5000、500~2000、または2000~5000Daである。さまざまな実施形態では、PEG化重合性脂質は、(PEG)n-10, 12-ペンタコサジン酸(h-(PEG)n-PCDA、スルホ-(PEG)n-PCDA、m-(PEG)n-PCDA、及びmal-(PEG)n-PCDAの各種誘導体からなる群から選択され、nは、PEGポリマー鎖内のPEGユニットの数であり、かつ約10~150、10~50、50~100、または100~150である。さまざまな実施形態では、PEG化重合性脂質は、PEG(mw)-10, 12-ペンタコサジン酸h-PEG(mw)-PCDA、スルホ-PEG(mw)-PCDA、m-PEG(mw)-PCDA、及びmal-PEG(mw)-PCDAの各種誘導体からなる群から選択され、mwは、PEGポリマー鎖の分子量であり、かつ約500~5000、500~2000、または2000~5000Daである。ある実施形態では、PEG化重合性脂質はPEG2000-10-12-ペンタコサジンアミドまた

10

20

30

40

50

は PEG2000-10-12-ペンタコサジノアート (pentacosadiynoate) である。PEG 化重合性脂質の例には、PEG 化ジイン PC、PEG 化ジイン PE、及び PEG 化 10, 12-ペンタコサジン酸 (PEG-PCDA) 並びにそれらの機能的誘導体及び類似体が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、PEG 化重合性脂質は、脂質分子に結合している PEG 化重合性基を含んで良い。

【0014】

さまざまな実施形態では、両イオン性荷電 (zwitterionically charged) 脂質には、L- α -ジステアロイルホスファチジルコリン、L- α -ホスファチジルコリン水素添加大豆 (水素添加大豆 PC)、またはジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)、1, 2-ジデカノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DDPC)、1, 2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DLPCL)、1, 2-ジミリスチル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DMPC)、1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DPPC)、1, 2-ジアラキドイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DAPC)、1, 2-ジリグノセロイル (diliglyceroyl)-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、ヒト血清アルブミン (HSA) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0015】

さまざまな実施形態では、中性荷電分子には、コレステロール、エルゴステロール、ホパノイド、フィステロール、スタノール、及びステロール、及びそれらの機能的誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0016】

さまざまな実施形態では、陰性荷電脂質には、限定することなく、m-PEG2000-脂質、mal-PEG2000-脂質、(PEG) n -脂質、m-(PEG) n -脂質、mal-(PEG) n -脂質、PEG(mw)-脂質、m-PEG(mw)-脂質、及び mal-PEG(mw)-脂質誘導体が含まれ、脂質は DSPE、DMPE、DLPE、DCPE、DAPE またはジリグノセロイル (diliglyceroyl)-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミンであり、かつ、 n は、PEG ポリマー鎖内の PEG ユニットの数であり、かつ約 10 ~ 150、10 ~ 50、50 ~ 100、または 100 ~ 150 であり、かつ、mw は、PEG ポリマー鎖の分子量であり、かつ約 500 ~ 5000、500 ~ 2000、または 2000 ~ 5000 Da である。

【0017】

さまざまな実施形態において、本発明は、h-PEG1PCDA 約 14 mol %、水素添加大豆 PC 約 51 mol %、コレステロール 約 32 mol %、m-PEG2000-DSPE 約 2 mol %、及び m-PEG2000-PCDA 約 1 mol % を含むハイブリッド重合リポソームナノ粒子を提供する。一実施形態において、HPLN は、本明細書に記載のように HPLN に封入した 1 種以上の治療物質をさらに含む。一実施形態において、HPLN は、本明細書に記載のように HPLN に結合された 1 つ以上の抗体をさらに含む。一実施形態において、HPLN は、HPLN 内に封入した 1 種以上の治療物質及び HPLN に結合された 1 つ以上の抗体を含む。

【0018】

さまざまな実施形態において、本発明は、h-PEG1PCDA 約 14 mol %、水素添加大豆 PC 約 48 mol %、コレステロール 約 32 mol %、m-PEG2000-DSPE 約 2 mol %、mal-PEG2000-DSPE 約 3 mol %、及び m-PEG2000-PCDA 約 1 mol % を含むハイブリッド重合リポソームナノ粒子を提供する。一実施形態において、HPLN は、本明細書に記載のように HPLN に封入した 1 種以上の治療物質をさらに含む。一実施形態において、HPLN は、本明細書に記載のように HPLN に結合された 1 つ以上の抗体をさらに含む。一実施形態において、HPLN は、HPLN 内に封入した 1 種以上の治療物質及び HPLN に結合された 1 つ以上の抗体を含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 9 】

本発明のさまざまな実施形態は、対象において病態を治療し、病態を予防し、病態を有する可能性を低下させ、病態の重症度を軽減させ、かつ／または病態の進行を緩徐にさせる方法を提供する。かかる方法は、本明細書に記載するハイブリッド重合リボソームナノ粒子を提供する工程、及び、治療的有効量のハイブリッド重合リボソームナノ粒子を対象に投与し、これにより、対象において病態を治療し、病態を予防し、病態を有する可能性を低下させ、病態の重症度を軽減させ、かつ／または病態の進行を緩徐にさせる工程を含むか、またはそれらの工程からなる。さまざまな実施形態では、病態は癌である。本発明によれば、ハイブリッド重合リボソームナノ粒子には、H P L N内部にローディングされた治療用物質がさらに含まれる。さらに、本発明によれば、ハイブリッド重合リボソームナノ粒子は、ターゲティング物質を、例えばH P L N表面にさらに含む。いくつかの実施形態では、H P L Nには治療用物質とターゲティング物質の両方が含まれる。

10

【 0 0 2 0 】

本発明のさまざまな実施形態は、対象においてユーイング肉腫を治療し、ユーイング肉腫の再発を予防し、ユーイング肉腫の重症度を軽減させ、かつ／またはユーイング肉腫の進行を緩徐にさせる方法を提供する。かかる方法は、本明細書に記載するハイブリッド重合リボソームナノ粒子を提供する工程、及び、治療的有効量のハイブリッド重合リボソームナノ粒子を対象に投与し、これにより、対象においてユーイング肉腫を治療し、ユーイング肉腫の再発を予防し、ユーイング肉腫の重症度を軽減させ、かつ／またはユーイング肉腫の進行を緩徐にさせる工程を含むか、またはそれらの工程からなる。本発明によれば、ハイブリッド重合リボソームナノ粒子には、H P L N内部にローディングされた治療用物質がさらに含まれる。さらに、本発明によれば、ハイブリッド重合リボソームナノ粒子は、ターゲティング物質を、例えばH P L N表面にさらに含む。いくつかの実施形態では、H P L Nには治療用物質とターゲティング物質の両方が含まれる。

20

【 0 0 2 1 】

本発明のさまざまな実施形態は、対象において急性リンパ芽球性白血病（A L L）を治療し、A L Lの再発を予防し、A L Lの重症度を軽減させ、かつ／またはA L Lの進行を緩徐にさせる方法を提供する。一実施形態において、A L Lは小児A L Lである。かかる方法は、本明細書に記載するハイブリッド重合リボソームナノ粒子を提供する工程、及び、治療的有効量のハイブリッド重合リボソームナノ粒子を対象に投与し、これにより、対象においてA L Lを治療し、A L Lの再発を予防し、A L Lの重症度を軽減させ、かつ／またはA L Lの進行を緩徐にさせる工程を含むか、またはそれらの工程からなる。本発明によれば、ハイブリッド重合リボソームナノ粒子には、H P L N内部にローディングされた治療用物質がさらに含まれる。さらに、本発明によれば、ハイブリッド重合リボソームナノ粒子は、例えばH P L N表面の、ターゲティング物質をさらに含む。いくつかの実施形態では、H P L Nには治療用物質とターゲティング物質の両方が含まれる。

30

【 0 0 2 2 】

本発明のさまざまな実施形態は、対象においてバーキットリンパ腫を治療し、バーキットリンパ腫の再発を予防し、バーキットリンパ腫の重症度を軽減させ、かつ／またはバーキットリンパ腫の進行を緩徐にさせる方法を提供する。かかる方法は、本明細書に記載するハイブリッド重合リボソームナノ粒子を提供する工程、及び、治療的有効量のハイブリッド重合リボソームナノ粒子を対象に投与し、これにより、対象においてバーキットリンパ腫を治療し、バーキットリンパ腫の再発を予防し、バーキットリンパ腫の重症度を軽減させ、かつ／またはバーキットリンパ腫の進行を緩徐にさせる工程を含むか、またはそれらの工程からなる。本発明によれば、ハイブリッド重合リボソームナノ粒子には、H P L N内部にローディングされた治療用物質がさらに含まれる。さらに、本発明によれば、ハイブリッド重合リボソームナノ粒子は、例えばH P L N表面の、ターゲティング物質をさらに含む。いくつかの実施形態では、H P L Nには治療用物質とターゲティング物質の両方が含まれる。

40

【 0 0 2 3 】

50

本発明のさまざまな実施形態は、対象において慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）を治療し、ＣＭＬの再発を予防し、ＣＭＬの重症度を軽減させ、かつ／またはＣＭＬの進行を緩徐にさせる方法を提供する。かかる方法は、本明細書に記載するハイブリッド重合リポソームナノ粒子を提供する工程、及び、治療的有効量のハイブリッド重合リポソームナノ粒子を対象に投与し、これにより、対象においてＣＭＬを治療し、ＣＭＬの再発を予防し、ＣＭＬの重症度を軽減させ、かつ／またはＣＭＬの進行を緩徐にさせる工程を含むか、またはそれらの工程からなる。本発明によれば、ハイブリッド重合リポソームナノ粒子には、ＨＰＬＮ内部にローディングされた治療用物質がさらに含まれる。さらに、本発明によれば、ハイブリッド重合リポソームナノ粒子は、例えばＨＰＬＮ表面の、ターゲティング物質をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＨＰＬＮには治療用物質とターゲティング物質の両方が含まれる。

10

【００２４】

本発明のさまざまな実施形態は、対象において急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）を治療し、ＡＭＬの再発を予防し、ＡＭＬの重症度を軽減させ、かつ／またはＡＭＬの進行を緩徐にさせる方法を提供する。かかる方法は、本明細書に記載するハイブリッド重合リポソームナノ粒子を提供する工程、及び、治療的有効量のハイブリッド重合リポソームナノ粒子を対象に投与し、これにより、対象においてＡＭＬを治療し、ＡＭＬの再発を予防し、ＡＭＬの重症度を軽減させ、かつ／またはＡＭＬの進行を緩徐にさせる工程を含むか、またはそれらの工程からなる。本発明によれば、ハイブリッド重合リポソームナノ粒子には、ＨＰＬＮ内部にローディングされた治療用物質がさらに含まれる。さらに、本発明によれば、ハイブリッド重合リポソームナノ粒子は、例えばＨＰＬＮ表面の、ターゲティング物質をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＨＰＬＮには治療用物質とターゲティング物質の両方が含まれる。

20

【００２５】

本発明のさまざまな実施形態は、対象において骨髄異形成症候群（ＭＤＳ）を治療し、ＭＤＳの再発を予防し、ＭＤＳの重症度を軽減させ、かつ／またはＭＤＳの進行を緩徐にさせる方法を提供する。かかる方法は、本明細書に記載するハイブリッド重合リポソームナノ粒子を提供する工程、及び、治療的有効量のハイブリッド重合リポソームナノ粒子を対象に投与し、これにより、対象においてＭＤＳを治療し、ＭＤＳの再発を予防し、ＭＤＳの重症度を軽減させ、かつ／またはＭＤＳの進行を緩徐にさせる工程を含むか、またはそれらの工程からなる。本発明によれば、ハイブリッド重合リポソームナノ粒子には、ＨＰＬＮ内部にローディングされた治療用物質がさらに含まれる。さらに、本発明によれば、ハイブリッド重合リポソームナノ粒子は、例えばＨＰＬＮ表面の、ターゲティング物質をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＨＰＬＮには治療用物質とターゲティング物質の両方が含まれる。

30

【００２６】

本発明のさまざまな実施形態は、対象において骨肉腫、神経芽細胞腫、または神経膠腫のいずれか１つまたはそれ以上を治療し、骨肉腫、神経芽細胞腫、または神経膠腫のいずれか１つまたはそれ以上の再発を予防し、骨肉腫、神経芽細胞腫、または神経膠腫のいずれか１つまたはそれ以上の重症度を軽減させ、かつ／または骨肉腫、神経芽細胞腫、または神経膠腫のいずれか１つまたはそれ以上の進行を緩徐にさせる方法を提供する。かかる方法は、本明細書に記載するハイブリッド重合リポソームナノ粒子を提供する工程、及び、治療的有効量のハイブリッド重合リポソームナノ粒子を対象に投与し、これにより、対象において骨肉腫、神経芽細胞腫、または神経膠腫のいずれか１つまたはそれ以上を治療し、骨肉腫、神経芽細胞腫、または神経膠腫のいずれか１つまたはそれ以上の再発を予防し、骨肉腫、神経芽細胞腫、または神経膠腫のいずれか１つまたはそれ以上の重症度を軽減させ、かつ／または骨肉腫、神経芽細胞腫、または神経膠腫のいずれか１つまたはそれ以上の進行を緩徐にさせる工程を含むか、またはそれらの工程からなる。本発明によれば、ハイブリッド重合リポソームナノ粒子には、ＨＰＬＮ内部にローディングされた治療用物質がさらに含まれる。さらに、本発明によれば、ハイブリッド重合リポソームナノ粒子

40

50

は、例えばH P L N表面の、ターゲティング物質をさらに含む。いくつかの実施形態では、H P L Nには治療用物質とターゲティング物質の両方が含まれる。

【0027】

本発明のさまざまな実施形態は、本明細書に記載するハイブリッド重合リポソームナノ粒子を含む薬学的組成物を提供する。本発明のさまざまな実施形態は、本明細書に記載される2つ以上のハイブリッド重合リポソームナノ粒子を含む薬学的組成物を提供する。本発明のさまざまな実施形態は、本明細書に記載するハイブリッド重合リポソームナノ粒子を複数含む薬学的組成物を提供する。本発明によれば、ハイブリッド重合リポソームナノ粒子は、その中にローディングした治療用物質、またはそれに結合されたターゲティング物質をさらに含む。本発明によれば、ハイブリッド重合リポソームナノ粒子は、その中にローディングした治療用物質と、それに結合されたターゲティング物質とをさらに含む。

10

【0028】

本発明のさまざまな実施形態は、対象の病態を治療する、予防する、その重症度を軽減させる、及び/またはその進行を緩徐にさせるためのキットを提供する。かかるキットは、ある量の本明細書に記載するハイブリッド重合リポソームナノ粒子、並びに対象における病態を治療する、予防する、その重症度を軽減させる、及び/またはその進行を緩徐にさせるためにハイブリッド重合リポソームナノ粒子を使用するための指示書を含む。一実施形態では、ハイブリッド重合リポソームナノ粒子は、その中にローディングした治療用物質をさらに含む。別の実施形態では、ハイブリッド重合リポソームナノ粒子は、それに結合されたターゲティング物質をさらに含む。さらに別の実施形態では、ハイブリッド重合リポソームナノ粒子は、その中にローディングした治療用物質と、それに結合されたターゲティング物質とをさらに含む。

20

【0029】

本発明のさまざまな組成物、方法、及びキットは、各種の癌を含むがこれらに限定されない多様な病態の治療において有用である。

[本発明1001]

P E G ポリマー鎖を有する少なくとも1種のP E G 化重合性脂質を含む重合性脂質、及び

非重合性脂質

を含む、ハイブリッド重合リポソームナノ粒子。

30

[本発明1002]

P E G ポリマー鎖を有する少なくとも1種のP E G 化重合性脂質を含む重合性脂質（約15 ~ 40m o l % ）、及び

非重合性脂質

を含み、該非重合性脂質が、

両イオン性荷電（z w i t t e r i o n i c a l l y c h a r g e d ）脂質（少なくとも約10m o l % ）、

中性荷電分子（約20 ~ 45m o l % ）、及び

陰性荷電脂質（約1 ~ 15m o l % ）

を含む、本発明1001のハイブリッド重合リポソームナノ粒子。

40

[本発明1003]

P E G ポリマー鎖を有する少なくとも1種のP E G 化重合性脂質を含む重合性脂質（約15m o l % ）、及び

非重合性脂質

を含み、該非重合性脂質が、

両イオン性荷電脂質（約51m o l % ）、

中性荷電分子（約32m o l % ）、及び

陰性荷電脂質（約2m o l % ）

を含む、本発明1001のハイブリッド重合リポソームナノ粒子。

[本発明1004]

50

ポリマー鎖を有する前記 P E G 化重合性脂質が m - P E G 2000 - P C D A である、本発明1001、1002、または1003のハイブリッド重合リポソームナノ粒子。

[本発明1005]

h - P E G 1 P C D A 約14m o l %、

水素添加大豆 P C 約51m o l %、

コレステロール 約32m o l %、

m - P E G 2000 - D S P E 約2m o l %、及び

m - P E G 2000 - P C D A 約1m o l %

を含む、本発明1001のハイブリッド重合リポソームナノ粒子。

[本発明1006]

h - P E G 1 P C D A 約14m o l %、

水素添加大豆 P C 約48m o l %、

コレステロール 約32m o l %、

m - P E G 2000 - D S P E 約2m o l %、

m a l - P E G 2000 - D S P E 約3m o l %、及び

m - P E G 2000 - P C D A 約1m o l %

を含む、本発明1001のハイブリッド重合リポソームナノ粒子。

[本発明1007]

h - P E G 1 P C D A 約24m o l %、

水素添加大豆 P C 約41m o l %、

コレステロール 約32m o l %、

m - P E G 2000 - D S P E 約2m o l %、及び

m - P E G 2000 - P C D A 約1m o l %

を含む、本発明1001のハイブリッド重合リポソームナノ粒子。

[本発明1008]

前記重合リポソームナノ粒子のサイズが約30～200 n mである、本発明1001～1007のいずれかのハイブリッド重合リポソームナノ粒子。

[本発明1009]

前記重合性脂質を重合させるために製造後に約1～35分間 U V 処理されている、本発明1001～1007のいずれかのハイブリッド重合リポソームナノ粒子。

[本発明1010]

押出し成形直後かつ重合前に5～10 で一晩冷却することにより調製されている、本発明1001～1007のいずれかのハイブリッド重合リポソームナノ粒子。

[本発明1011]

少なくとも約1時間～少なくとも約4時間の循環半減期を有する、本発明1001～1007のいずれかのハイブリッド重合リポソームナノ粒子。

[本発明1012]

約30分後に細胞のエンドソームコンパートメントへ内部移行される、本発明1001～1007のいずれかのハイブリッド重合リポソームナノ粒子。

[本発明1013]

中性荷電分子を含み、該中性荷電分子が、コレステロール、エルゴステロール、ホパノイド、フィステロール、スタノール、及びステロール、並びにそれらの機能的誘導体から選択される、本発明1001～1007のいずれかのハイブリッド重合リポソームナノ粒子。

[本発明1014]

前記 P E G ポリマー鎖が、約10～150、10～50、50～100、または100～150個の P E G ユニットを含む、本発明1001～1003のいずれかのハイブリッド重合リポソームナノ粒子。

[本発明1015]

前記 P E G ポリマー鎖の分子量が、約500～5000、500～2000、または2000～5000 D a である、本発明1001～1003のいずれかのハイブリッド重合リポソームナノ粒子。

[本発明1016]

10

20

30

40

50

前記 P E G 化重合性脂質が、約 0.1 ~ 1、1 ~ 5、5 ~ 10、または 10 ~ 15 m o l % である、本発明 1001 ~ 1007 のいずれかのハイブリッド重合リボソームナノ粒子。

[本発明 1017]

前記 P E G 化重合性脂質が、(P E G) n - 10, 12 - ペンタコサジン酸 ((P E G) n - P C D A) 誘導体からなる群から選択され、n が、前記 P E G ポリマー鎖内の P E G ユニットの数であり、かつ約 10 ~ 150、10 ~ 50、50 ~ 100、または 100 ~ 150 である、本発明 1001 ~ 1003 のいずれかのハイブリッド重合リボソームナノ粒子。

[本発明 1018]

前記 P E G 化重合性脂質が、P E G (m w) - 10, 12 - ペンタコサジン酸 (P E G (m w) - P C D A) 誘導体からなる群から選択され、m w が、前記 P E G ポリマー鎖の分子

10

量であり、かつ約 500 ~ 5000、500 ~ 2000、または 2000 ~ 5000 D a である、本発明 1001 ~ 1003 のいずれかのハイブリッド重合リボソームナノ粒子。

[本発明 1019]

前記 P E G 化重合性脂質が、P E G 2000 - 10 - 12 - ペンタコサジンアミドである、本発明 1001 ~ 1003 のいずれかのハイブリッド重合リボソームナノ粒子。

[本発明 1020]

前記重合性脂質が約 15 ~ 40 m o l % である、本発明 1001 ~ 1003 のいずれかのハイブリッド重合リボソームナノ粒子。

[本発明 1021]

前記重合性脂質が不飽和脂質を含む、本発明 1001 ~ 1003 のいずれかのハイブリッド重合リボソームナノ粒子。

20

[本発明 1022]

前記重合性脂質がジアセチレン脂質を含む、本発明 1001 ~ 1003 のいずれかのハイブリッド重合リボソームナノ粒子。

[本発明 1023]

前記重合性脂質が、N - (5' - ヒドロキシ - 3' - オキシペンチル) - 10 - 12 - ペンタコサジンアミド (h - P E G 1 - P C D A)、N - (5' - スルホ - 3' - オキシペンチル) - 10 - 12 - ペンタコサジンアミド (スルホ - P E G 1 - P C D A)、N - [メトキシ (ポリエチレングリコール) - 750] - 10 - 12 - ペンタコサジンアミド (m - P E G 750 - P C D A)、若しくは N - [マレイミド (ポリエチレングリコール) - 1500] - 10 - 12 - ペンタコサジンアミド (m a l - P E G 1500 - P C D A)、またはそれらの組み合わせを含む、本発明 1001 ~ 1003 のいずれかのハイブリッド重合リボソームナノ粒子。

30

[本発明 1024]

前記非重合性脂質が約 80 ~ 85 m o l % である、本発明 1001 ~ 1003 のいずれかのハイブリッド重合リボソームナノ粒子。

[本発明 1025]

前記非重合性脂質が約 30 ~ 60 m o l % である、本発明 1001 ~ 1003 のいずれかのハイブリッド重合リボソームナノ粒子。

[本発明 1026]

前記非重合性脂質が飽和リン脂質を含む、本発明 1001 ~ 1003 のいずれかのハイブリッド重合リボソームナノ粒子。

40

[本発明 1027]

前記非重合性脂質が、P E G ポリマー鎖を有する少なくとも 1 種の P E G 化非重合性脂質を含む、本発明 1001 ~ 1003 のいずれかのハイブリッド重合リボソームナノ粒子。

[本発明 1028]

前記非重合性脂質が、L - a - ホスファチジルコリン水素添加大豆 (水素添加大豆 P C)、ジステアロイルホスファチジルコリン (D S P C)、コレステロール、1, 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ (ポリエチレングリコール) - 2000] (m - P e g 2000 - D S P E)、若しくは 1, 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [マレイミド (ポリエチレングリ

50

コール) - 2000] (mal - Peg 2000 - D S P E)、またはそれらの組み合わせを含む、本発明1001~1003のいずれかのハイブリッド重合リポソームナノ粒子。

[本発明1029]

前記非重合性脂質が、L - α - ホスファチジルコリン、P E - P E G 2000 - 1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ(ポリエチレングリコール) - 2000]、若しくはP E - P E G 2000 - ビオチン、またはそれらの組み合わせを含む、本発明1001~1003のいずれかのハイブリッド重合リポソームナノ粒子。

[本発明1030]

少なくとも約10mol%の両イオン性荷電脂質を含む、本発明1001~1003のいずれかのハイブリッド重合リポソームナノ粒子。

10

[本発明1031]

約10~20、20~30、30~40、40~50、50~60、60~70、70~80、または80~90mol%の両イオン性荷電脂質を含む、本発明1001~1003のいずれかのハイブリッド重合リポソームナノ粒子。

[本発明1032]

約10~60mol%の両イオン性荷電脂質を含む、本発明1001~1003のいずれかのハイブリッド重合リポソームナノ粒子。

[本発明1033]

前記両イオン性荷電脂質がL - α - ジステアロイルホスファチジルコリンを含む、本発明1001~1003のいずれかのハイブリッド重合リポソームナノ粒子。

20

[本発明1034]

前記重合リポソームナノ粒子にローディングされた治療用物質をさらに含み、該治療用物質が、抗腫瘍薬、血液製剤、生体応答調節物質、抗真菌薬、ホルモン、ビタミン、ペプチド、抗結核薬、酵素、抗アレルギー薬、抗凝固剤、循環系作用薬、代謝増強剤、抗ウイルス薬、抗狭心症薬、抗生物質、抗炎症剤、抗原虫薬、抗リウマチ薬、麻薬、アヘン剤、強心配糖体、神経筋遮断薬、鎮静剤、局所麻酔薬、全身麻酔薬、放射性化合物、放射線増感剤、免疫チェックポイント阻害剤、モノクローナル抗体、遺伝物質、siRNAまたはRNAi分子などのアンチセンス核酸、及びプロドラッグからなる群から選択される、本発明1001~1007のいずれかのハイブリッド重合リポソームナノ粒子。

[本発明1035]

前記重合リポソームナノ粒子にローディングされた化学療法薬をさらに含む、本発明1001~1007のいずれかのハイブリッド重合リポソームナノ粒子。

30

[本発明1036]

前記重合リポソームナノ粒子にローディングされた2つ以上の化学療法薬をさらに含む、本発明1001~1007のいずれかのハイブリッド重合リポソームナノ粒子。

[本発明1037]

前記化学療法薬が、ドキソルビシン、イリノテカン、シスプラチン、トポテカン、ビンクリスチン、マイトマイシン、パキシリタキソール(paxlitaxol)、シタラビン、ミトキサントロン、Ara-C(シタラビン)、VP-16(エトポシド)、若しくはsiRNA、またはそれらの組み合わせである、本発明1035または1036のハイブリッド重合リポソームナノ粒子。

40

[本発明1038]

前記重合リポソームナノ粒子の表面に結合されたターゲティング物質をさらに含む、本発明1001~1007のいずれかのハイブリッド重合リポソームナノ粒子。

[本発明1039]

前記重合リポソームナノ粒子の表面に結合された2種以上のターゲティング物質をさらに含む、本発明1001~1007のいずれかのハイブリッド重合リポソームナノ粒子。

[本発明1040]

前記ターゲティング物質が、抗CD19抗体、抗CD34抗体、抗CD99抗体、抗CD117抗体、抗CD166抗体、若しくは抗CA19-9抗体、またはそれらの組み合わせである、本

50

発明1038または1039のハイブリッド重合リポソームナノ粒子。

[本発明1041]

前記ターゲティング物質が、細胞表面分子に特異的に結合できるペプチドである、本発明1038または1039のハイブリッド重合リポソームナノ粒子。

[本発明1042]

前記細胞表面分子が、構造タンパク質、細胞接着分子、膜受容体、キャリアタンパク質、及びチャネルタンパク質からなる群から選択される細胞膜タンパク質である、本発明1041のハイブリッド重合脂質ナノ粒子。

[本発明1043]

前記細胞表面分子が、活性化白血球接着分子 (C D - 166)、糖鎖抗原 (c a r b o h y d r a t e a n t i g e n) 19 - 9 (C A 19 - 9)、 α フェトプロテイン (A F P)、癌胎児性抗原 (C E A)、卵巣癌抗原 (C A - 125)、乳癌抗原 (M U C - 1及び上皮腫瘍抗原 (E T A))、チロシナーゼ悪性黒色腫抗原及び黒色腫関連抗原 (M A G E)、r a s の抗原性異常産物、p 53、ユーイング肉腫抗原 (C D - 99)、白血病抗原 (C D - 19及び C D - 117)、血管内皮成長因子 (V E G F)、上皮成長因子受容体 (E G F R)、H e r 2 / n e u、または前立腺特異的膜抗原 (P S M A)である、本発明1041のハイブリッド重合脂質ナノ粒子。

10

[本発明1044]

前記ターゲティング物質が、ダイアボディ (d i a b o d y)、抗体、リガンド、タンパク質、ペプチド、炭水化物、ビタミン、核酸、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される、本発明1038または1039のハイブリッド重合リポソームナノ粒子。

20

[本発明1045]

前記ターゲティング物質が、エンドサイトーシスまたは細胞膜融合を亢進させる、本発明1038または1039のハイブリッド重合リポソームナノ粒子。

[本発明1046]

前記表面に結合された作用物質をさらに含み、該作用物質が、癌のための治療として免疫応答を誘発する、本発明1038または1039のハイブリッド重合リポソームナノ粒子。

[本発明1047]

前記細胞表面分子が細胞膜タンパク質であり、該細胞膜タンパク質が、ヒトパピローマウイルス (H P V) 陽性の前癌性細胞及び癌細胞のすべてにおいて検出可能である E 6及び E 7タンパク質、または、腫瘍関連 M U C 1及び M U C 4糖タンパク質に基づくムチン糖タンパク質からなる群から選択される、本発明1046のハイブリッド重合脂質ナノ粒子。

30

[本発明1048]

P E G ポリマー鎖を有する少なくとも1種の P E G 化重合性脂質を含む重合性脂質と、非重合性脂質とを含むハイブリッド重合リポソームナノ粒子を提供する工程、

該重合リポソームナノ粒子の膜を隔ててイオン勾配を確立する工程、

治療用物質を提供する工程、及び

該治療用物質を該重合リポソームナノ粒子とともにインキュベートし、これにより、該重合リポソームナノ粒子に該治療用物質をローディングする工程

を含む、ハイブリッド重合リポソームナノ粒子に治療用物質をローディングする方法。

40

[本発明1049]

前記イオン勾配が硫酸アンモニウム勾配及び / または p H 勾配である、本発明1048の方法。

[本発明1050]

前記 P E G ポリマー鎖が、約 10 ~ 150、10 ~ 50、50 ~ 100、または 100 ~ 150 個の P E G ユニットを含む、本発明1048の方法。

[本発明1051]

前記 P E G ポリマー鎖の分子量が、約 500 ~ 5000、500 ~ 2000、または 2000 ~ 5000 D a である、本発明1048の方法。

[本発明1052]

50

前記 P E G 化重合性脂質が、約 0.1 ~ 1、1 ~ 5、5 ~ 10、または 10 ~ 15 m o l % である、
本発明 1048 の方法。

[本発明 1053]

前記 P E G 化重合性脂質が、(P E G) n - 10, 12 - ペンタコサジン酸 ((P E G)
n - P C D A) 誘導体からなる群から選択され、n が、前記 P E G ポリマー鎖内の P E G
ユニットの数であり、かつ約 10 ~ 150、10 ~ 50、50 ~ 100、または 100 ~ 150 である、本発明
1048 の方法。

[本発明 1054]

前記 P E G 化重合性脂質が、P E G (m w) - 10, 12 - ペンタコサジン酸 (P E G (m w) - P C D A) 誘導体からなる群から選択され、m w が、前記 P E G ポリマー鎖の分
子量であり、かつ約 500 ~ 5000、500 ~ 2000、または 2000 ~ 5000 D a である、本発明 1048 の
方法。

10

[本発明 1055]

前記 P E G 化重合性脂質が P E G 2000 - 10 - 12 - ペンタコサジンアミドである、本発
明 1048 の方法。

[本発明 1056]

前記治療物質が、ドキソルビシン、イリノテカン、シスプラチン、トポテカン、ビン
クリスチン、マイトマイシン、パキシリタキソール、シタラビン、ミトキサントロン、A
r a - C (シタラビン)、V P - 16 (エトポシド)、若しくは s i R N A、またはそれら
の組み合わせである、本発明 1048 の方法。

20

[本発明 1057]

脂質ミセルを提供する工程、
ターゲティング物質を提供する工程、
該ターゲティング物質を該脂質ミセルに結合させる工程、
P E G ポリマー鎖を有する少なくとも 1 種の P E G 化重合性脂質を含む重合性脂質と、
非重合性脂質とを含むハイブリッド重合リポソームナノ粒子を提供する工程、及び
該重合リポソームナノ粒子を、該ターゲティング物質と結合した該脂質ミセルとともに
インキュベートし、これにより、該ターゲティング物質を該重合リポソームナノ粒子に移
行させる工程
を含む、ターゲティング物質をハイブリッド重合リポソームナノ粒子に結合させる方法。

30

[本発明 1058]

遊離チオール基を有するターゲティング物質を提供する工程、
P E G ポリマー鎖を有する少なくとも 1 種の P E G 化重合性脂質、少なくとも 1 種のマレ
イミド末端 (m a l e i m i d e t e r m i n a t e d) P E G 化脂質を含む重合性脂
質と、非重合性脂質とを含むハイブリッド重合リポソームナノ粒子を提供する工程、及び
該重合リポソームナノ粒子を、該遊離チオールを含有する該ターゲティング物質ととも
にインキュベートし、これにより、該ターゲティング物質を該重合リポソームナノ粒子に
共有結合させる工程
を含む、ターゲティング物質をハイブリッド重合リポソームナノ粒子に結合させる方法。

40

[本発明 1059]

前記ターゲティング物質が、抗 C D 19 抗体、抗 C D 34 抗体、抗 C D 99 抗体、抗 C D 117
抗体、抗 C D 166 抗体、若しくは抗 C A 19 - 9 抗体、またはそれらの組み合わせである、本
発明 1057 または 1058 の方法。

[本発明 1060]

前記ターゲティング物質が、癌性細胞上の表面マーカーに特異的に結合できるペプチド
である、本発明 1057 または 1058 の方法。

[本発明 1061]

前記ターゲティング物質上のチオール基と前記脂質ミセル上のマレイミド基との間の反
応を介して、該ターゲティング物質を該脂質ミセルに結合させる、本発明 1057 の方法。

[本発明 1062]

50

前記ターゲティング物質上のチオール基と前記重合リポソームの外側表面上のマレイミド基との間の反応を介して、該ターゲティング物質を該重合リポソームの外側表面に結合させる、本発明1058の方法。

[本発明1063]

前記PEGポリマー鎖が、約10～150、10～50、50～100、または100～150個のPEGユニットを含む、本発明1057または1058の方法。

[本発明1064]

前記PEGポリマー鎖の分子量が、約500～5000、500～2000、または2000～5000Daである、本発明1057または1058の方法。

[本発明1065]

前記PEG化重合性脂質が、約0.1～1、1～5、5～10、または10～15mol%である、本発明1057または1058の方法。

[本発明1066]

前記PEG化重合性脂質が、(PEG)_n-10,12-ペンタコサジン酸((PEG)_n-PCDA)誘導体からなる群から選択され、nが、前記PEGポリマー鎖内のPEGユニットの数であり、かつ約10～150、10～50、50～100、または100～150である、本発明1057または1058の方法。

[本発明1067]

前記PEG化重合性脂質が、PEG(mw)-10,12-ペンタコサジン酸(PEG(mw)-PCDA)誘導体からなる群から選択され、mwが、前記PEGポリマー鎖の分子量であり、かつ約500～5000、500～2000、または2000～5000Daである、本発明1057または1058の方法。

[本発明1068]

前記PEG化重合性脂質がPEG2000-10-12-ペンタコサジンアミドである、本発明1057または1058の方法。

[本発明1069]

重合性脂質と非重合性脂質とを含むハイブリッド重合リポソームナノ粒子を提供する工程であって、該重合性脂質が、PEGポリマー鎖を有する少なくとも1種のPEG化重合性脂質を含み、かつ、治療用物質が該重合リポソームナノ粒子にローディングされている、工程、及び

治療的有効量の該ハイブリッド重合リポソームナノ粒子を対象に投与し、これにより、該対象において病態を治療し、該病態を予防し、該病態を有する可能性を低下させ、該病態の重症度を軽減させ、かつ/または該病態の進行を緩徐にさせる工程を含む、該対象において該病態を治療し、該病態を予防し、該病態を有する可能性を低下させ、該病態の重症度を軽減させ、かつ/または該病態の進行を緩徐にさせる方法。

[本発明1070]

前記病態が癌である、本発明1069の方法。

[本発明1071]

前記病態が、ユーイング肉腫、バーキットリンパ腫、骨肉腫、神経芽細胞腫、神経膠腫、ALL、CML、AML、またはMDSのいずれか1つまたはそれ以上である、本発明1069の方法。

[本発明1072]

前記対象がヒトである、本発明1069の方法。

[本発明1073]

前記PEGポリマー鎖が、約10～150、10～50、50～100、または100～150個のPEGユニットを含む、本発明1069の方法。

[本発明1074]

前記PEGポリマー鎖の分子量が、約500～5000、500～2000、または2000～5000Daである、本発明1069の方法。

[本発明1075]

10

20

30

40

50

前記 P E G 化重合性脂質が、約 0.1 ~ 1、1 ~ 5、5 ~ 10、または 10 ~ 15 m o l % である、
本発明 1069 の方法。

[本発明 1076]

前記重合リポソームナノ粒子が、該重合リポソームナノ粒子の表面に結合されたターゲ
ティング物質をさらに含む、本発明 1069 の方法。

[本発明 1077]

前記治療用物質が、ドキソルビシン、イリノテカン、シスプラチン、トポテカン、ビン
クリスチン、マイトマイシン、パキシリタキソール、シタラビン、ミトキサントロン、A
r a - C (シタラビン)、V P - 16 (エトポシド)、若しくは s i R N A、またはそれら
の組み合わせである、本発明 1069 の方法。

10

[本発明 1078]

前記重合リポソームナノ粒子を血管内に、静脈内に、動脈内に、腫瘍内に、筋肉内に、
皮下に、鼻腔内に、腹腔内に、または経口で投与する、本発明 1069 の方法。

[本発明 1079]

前記重合リポソームナノ粒子を 1 回、2 回、3 回、またはそれ以上の回数投与する、本発
明 1069 の方法。

[本発明 1080]

前記重合リポソームナノ粒子を 1 日に 1 ~ 3 回、1 週間に 1 ~ 7 回、または 1 か月間に 1 ~ 9 回
投与する、本発明 1069 の方法。

[本発明 1081]

20

前記重合リポソームナノ粒子を、約 1 ~ 10 日、10 ~ 20 日、20 ~ 30 日、30 ~ 40 日、40 ~ 50
日、50 ~ 60 日、60 ~ 70 日、70 ~ 80 日、80 ~ 90 日、90 ~ 100 日、1 ~ 6 か月、6 ~ 12 か月、また
は 1 ~ 5 年の間投与する、本発明 1069 の方法。

[本発明 1082]

前記重合リポソームナノ粒子を投与して、前記治療用物質を前記対象の体重 1 k g 当
り約 0.001 ~ 0.01、0.01 ~ 0.1、0.1 ~ 0.5、0.5 ~ 5、5 ~ 10、10 ~ 20、20 ~ 50、50 ~
100、100 ~ 200、200 ~ 300、300 ~ 400、400 ~ 500、500 ~ 600、600 ~ 700、700 ~ 800、800 ~
900、または 900 ~ 1000 m g 送達する、本発明 1069 の方法。

[本発明 1083]

前記重合リポソームナノ粒子を投与して、前記治療用物質を前記対象の体表面積 1 m² 当
たり約 0.001 ~ 0.01、0.01 ~ 0.1、0.1 ~ 0.5、0.5 ~ 5、5 ~ 10、10 ~ 20、20 ~ 50、50
~ 100、100 ~ 200、200 ~ 300、300 ~ 400、400 ~ 500、500 ~ 600、600 ~ 700、700 ~ 800、800
~ 900、または 900 ~ 1000 m g 送達する、本発明 1069 の方法。

30

[本発明 1084]

本発明 1001 ~ 1007 のいずれかのハイブリッド重合リポソームナノ粒子を含む薬学的組成
物。

[本発明 1085]

薬学的に許容される賦形剤をさらに含む、本発明 1084 の薬学的組成物。

[本発明 1086]

薬学的に許容される担体をさらに含む、本発明 1084 の薬学的組成物。

40

【図面の簡単な説明】

【0030】

例示的な実施形態を参照図において説明する。本明細書に開示する実施形態及び図は、
限定的ではなくむしろ説明的であることが意図される。

【図 1】本発明のさまざまな実施形態による、H P L N 薬物送達システムの実施形態、す
なわち、(A) H P L N 膜内の仮定的ポリマー「アイランド」の概略図、(B) H P L N
内へのドキソルビシンの受動的ローディングと能動的ローディングのプロセスの対比を表
す図、(C) 薬物をローディングされ、抗体でターゲティングされた H P L N についての
、動的光散乱法による平均粒径、(D) 20 日間に渡る薬物漏出率に関する粒子安定性を
示す。

50

【図2】本発明のさまざまな実施形態による、ターゲティングされた抗CD99結合HPLNの特異的結合及び細胞取込みを示す。上のパネルは、TC32細胞（ユーイング腫瘍細胞）に対する特異的結合を示すFACS解析を表し、下のパネルは細胞への取込みを示す蛍光顕微鏡の画像である。

【図3】本発明のさまざまな実施形態による、ターゲティングされていないHPLN-Dox、ターゲティングされたHPLN-Dox、ドキシル及び遊離ドキソルビシン「Doxo」の細胞毒性IC50を示す。HPLNの各形態、ドキシル及び遊離ドキソルビシンを、ユーイング肉腫細胞（TC32）とともにインキュベートした。平均IC50から、ターゲティングされたHPLNは、ターゲティングされていないHPLN及びドキシルと比してそれぞれ20倍及び40倍高い細胞毒性を有することが示されている。

10

【図4】本発明のさまざまな実施形態による、Xenogen製カメラで測定した相対的腫瘍成長を示す。REH-Luc白血病腫瘍細胞の移植後10日目に、群1のマウスにはIV投与による緩衝液処置のみを行い、群2にはターゲティングされていないHPLNの投与、群3にはターゲティングされていないHPLN/Dox（2mg Dox/kg）の投与、群4には（ターゲティングされた）抗CD-19/HPLN/Dox（2mg Dox/kg）の投与、群5にはドキシル（2mg Dox/kg）の投与、及び群6にはドキソルビシン（2mg Dox/kg）の投与を開始した。本データは幾つかの異なる試験を連続して行った結果をまとめたものである。

【図5】本発明のさまざまな実施形態による、腫瘍の大きさ及び量の顕著な減少を示す。REH-Luc白血病腫瘍細胞の移植後10日目に、対照群マウスにはIV投与による緩衝液処置のみを行い、1週間に1回または1週間に2回の投与群マウスには（ターゲティングされた）抗CD-19/HPLN/Dox（2mg Dox/kg）の投与を開始した。上パネル：28日目の処置群マウスと対照群マウスのXenogen製カメラによる画像。赤色（最大腫瘍塊）から紫色（最小腫瘍塊）までのカラーバーで相対的な腫瘍サイズを比較している。下パネル：Xenogen画像から推定した、0日目から28日目まで経時的に見た相対的腫瘍量のlogスケール。

20

【図6】本発明のさまざまな実施形態による、群1～6において処置されたREH白血病腫瘍を有するマウスの生存曲線を示す。群1には緩衝液処置のみを、群2にはターゲティングされていないHPLNを、群3にはターゲティングされていないHPLN/Dox（2mg Dox/kg）を、群4には（ターゲティングされた）抗CD-19/HPLN/Dox（2mg Dox/kg）を、群5にはドキシル（2mg Dox/kg）を、群6にはドキソルビシン（2mg Dox/kg）を与えた。

30

【図7】本発明のさまざまな実施形態による、未処置対照動物、（ターゲティングされた）抗CD-19ドキソルビシンローディングHPLN処置動物、及び遊離ドキソルビシン処置動物それぞれの動物間における肝臓及び腎臓の酵素機能の比較を示す。処置動物には被験用量の最高用量であるドキソルビシン2.0mg/kgの処置を1週間に2回行った。

【図8】本発明のさまざまな実施形態による、REH-Luc白血病腫瘍の異種移植片を有するマウスの処置群と未処置群の35日目のXenogen製カメラによる画像を示す。赤色（最大腫瘍塊）から紫色（最小腫瘍塊）までのカラーバーで相対的な腫瘍サイズを比較している。マウスを8群に分けた。群1には緩衝液処置のみを行い、群2はターゲティングされていない低用量HPLN/Dox（1mg Dox/kg）で処置し、群3はターゲティングされていない高用量HPLN/Dox（2mg Dox/kg）で、群4は低用量抗CD-19/HPLN/Dox（0.5mg Dox/kg）で、群5は中間用量の抗CD-19/HPLN/Dox（1mg Dox/kg）で、群6は高用量抗CD-19/HPLN/Dox（2mg Dox/kg）で、群7はドキシル（2mg Dox/kg）で、群8はドキソルビシン（2mg Dox/kg）でそれぞれ処置した。腫瘍の大きさ及び量は群6及び群8で顕著に減少している。

40

【図9A】本発明のさまざまな実施形態による、100万個または600万個のREH-Luc細胞の尾静脈注射による異種移植で作製した白血病マウスモデルに抗CD19-H

50

P L N / D o x を投与した場合の有効性反応を示す。白血病細胞注射後 3 日目または 1 0 日目に処置を開始した。(A) は 1 9 日目の結果である。転移性腫瘍量を X e n o g e n 製カメラによる画像から推定した。マウスを、ドキソルピシン 2 m g / k g を含有する抗 C D 1 9 - H P L N の 1 週間に 1 回または 1 週間に 2 回の I V 投与により処置した。腫瘍画像は、ルシフェリンの 1 週間に 1 回の注射後、背側及び腹側の両方から撮影した。総腫瘍量を両側の総和から計算した。

【図 9 B】本発明のさまざまな実施形態による、1 0 0 万個または 6 0 0 万個の R E H - L u c 細胞の尾静脈注射による異種移植で作製した白血病マウスモデルに抗 C D 1 9 - H P L N / D o x を投与した場合の有効性反応を示す。白血病細胞注射後 3 日目または 1 0 日目に処置を開始した。(B) は 2 8 日目の結果である。転移性腫瘍量を X e n o g e n 製カメラによる画像から推定した。マウスを、ドキソルピシン 2 m g / k g を含有する抗 C D 1 9 - H P L N の 1 週間に 1 回または 1 週間に 2 回の I V 投与により処置した。腫瘍画像は、ルシフェリンの 1 週間に 1 回の注射後、背側及び腹側の両方から撮影した。総腫瘍量を両側の総和から計算した。

【図 1 0】本発明のさまざまな実施形態による、T C 7 1 - L u c 細胞の尾静脈注射により作製した転移性異種移植片を有するユーイング腫瘍マウスモデルに抗 C D 9 9 - H P L N / D o x を投与した場合の有効性反応を示す。転移性腫瘍量を X e n o g e n 製カメラによる画像から推定した。マウスを、ドキソルピシン 2 m g / k g を含有する抗 C D 9 9 - H P L N の 1 週間に 2 回の I V 投与により処置した。腫瘍画像(上のパネル)は、ルシフェリンの 1 週間に 1 回の注射後、背側及び腹側の両方から撮影した。総腫瘍量を両側の総和から計算してプロットしたものが下のパネルである。

【図 1 1】本発明のさまざまな実施形態によれば、C D - 9 9 を標的とした H P L N を用いて処置した異種移植したユーイング T C 7 1 腫瘍は、切除した腫瘍組織において H P L N (白色)が局在していることを示している。

【図 1 2】本発明のさまざまな実施形態による、T C 7 1 皮下異種移植で作製したユーイング肉腫マウスモデルを、1 0 日目以降にドキソルピシン 2 m g / k g 含有抗 C D - 9 9 - H P L N / D o x の 1 週間に 2 回の I V 投与により処置した場合の有効性反応を示す。腫瘍量を、図に示す各日に携帯型カリパスを用いて測定した。

【図 1 3】本発明のさまざまな実施形態によれば、E W S - F l i 1 に対する s i R N A を含有する H P L N は、A 6 7 3 ユーイング腫瘍細胞の E W S - F l i 1 をノックダウンできることを示す。上のパネルは、E W S - F l i のノックダウンを示しているウエスタンプロットを図示しており、下のパネルは、E W S - F l i 1 の発現低下を示している Q R T P C R を図示している。

【発明を実施するための形態】

【0 0 3 1】

発明の詳細な説明

本明細書に引用されたすべての参考文献は、ここに完全な記載があるかの如く、参照によりその全体が取り込まれるものとする。特に明記しない限り、本明細書で使用する技術用語及び科学用語は、本発明の属する分野の当業者に共通して理解される意味と同一の意味を持つ。Allenら, Remington: The Science and Practice of Pharmacy 第22版., Pharmaceutical Press (September 15, 2012); Hornyakら, Introduction to Nanoscience and Nanotechnology, CRC Press (2008); Singleton and Sainsbury, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 第3版., revised ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2006); Smith, March's Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 第7版., J. Wiley & Sons (New York, NY 2013); Singleton, Dictionary of DNA and

Genome Technology 第3版., Wiley - Blackwell (November 28, 2012); 及び Green and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 第4版., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2012) は、本出願で使用する多くの用語に対する一般指針を当業者に提供している。抗体の調製法を参考にするには、Greenfield, Antibodies A Laboratory Manual 第2版., Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor NY, 2013); Kohler and Milstein, Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion, Eur. J. Immunol. 1976 Jul, 6(7): 511-9; Queen and Selick, Humanized immunoglobulins, 米国特許第5,585,089号(1996年12月); 及び Riechmann et al., Reshaping human antibodies for therapy, Nature 1988 Mar 24, 332(6162): 323-7を参照にされたい。

10

【0032】

当業者は、本明細書に記載する方法及び材料と類似または同等である多くの方法及び材料を本発明を実施する際に使用できるであろうことを認識するであろう。本発明の他の特徴及び利点は、本発明の実施形態のさまざまな特徴を実施例によって例示する、添付図面と併せた以下の詳細な説明から明らかとなるであろう。事実、本発明は、記載の方法及び材料になんら制限されるものではない。便宜上、明細書、実施例及び添付の請求の範囲など、本明細書内で使用される特定の用語をここに集めている。

20

【0033】

特に断らない限り、または文脈から暗示されない限り、以下の用語及び語句には、下記で提供される意味が含まれる。特に断らない限り、または文脈から明らかでない限り、下記の用語及び語句は、それらの用語または語句がその属する技術分野で獲得した意味を除外するものではない。定義は、個々の実施形態を記載する際の一助となるよう提供されているものであり、また、本発明の範囲は特許請求の範囲の記載によってのみ制限されるため、請求する発明を限定することは意図していない。特に明記しない限り、本明細書で使用する技術用語及び科学用語はいずれも、本発明の属する分野の当業者に共通して理解される意味と同一の意味を持つ。

30

【0034】

本明細書で使用する用語「含む (comprising)」または「含む (comprises)」は、実施形態に有用な組成物、方法、及びそれらそれぞれの成分に関して使用され、さらに、有用であるか否かを問わず、特定されていない要素に対する使用も含まれる。一般に、本明細書で使用する用語は「オープン」用語として広く意図されることが当業者には理解されるであろう (例えば、用語「含む (including)」は「~が挙げられるが、それらに限定されない」として解釈されるべきであり、用語「~を有する」は「少なくとも~を有する」として解釈されるべきであり、用語「含む (includes)」は「~が挙げられるが、それらに限定されない」などとして解釈されるべきである)。

40

【0035】

特に断らない限り、本願の個々の実施形態を説明する文脈で (特に請求項の文脈において) 使用される用語「1つの (a)」及び「1つの (an)」及び「その (the)」及び同様の言及は、単数及び複数の両方をカバーすると解釈することができる。本明細書で数値範囲を詳述する場合、その範囲内に該当する別々の値のそれぞれを個々に言及する簡略した方法として使用することを意図するにすぎない。本明細書中で特に明記しない限り、個々のそれぞれの数値は、それが個々に本明細書で引用されているかの如く本明細書に

50

組み込まれるものとする。本明細書に記載する方法はすべて、本明細書で特に明記したり、ほかに文脈と明らかに矛盾したりしない限り、どのような好適順序でも実施可能である。本明細書の特定の実施形態について用いられるすべての例、または例示的な言い回し（例えば、「～のような」）を使用することで、本願をより明確にすることを意図するにすぎず、ほかに特許請求項される本出願の範囲に制限を設けるものではない。略語「例えば（e.g.）」はラテン語の *exempli gratia* が語源であり、本明細書では非限定的な例を指すために使用される。したがって、略語「例えば（e.g.）」は用語「例えば（for example）」と同義である。明細書内のいかなる言い回しも、特許請求されていない任意の要素について、本出願の実施に不可欠な要素であることを示していると解釈されるべきではない。

10

【0036】

本明細書で使用する場合、用語「治療する（treat）」、「治療（treatment）」、「治療する（treating）」、または「改善（amelioration）」とは、疾患、障害、または医学的状态に関して使用する場合、治療的処置及び予防的または防止的措置の両方を意味し、これにおいて、その目的は、症状または病態の進行または重症度を予防するか、後退させるか、回復させるか、改善するか、阻害するか、減少させるか、緩徐にさせるか、または停止させることである。用語「治療する」には、ある病態の有害な作用または症状の少なくとも1つを低下または緩和させることが含まれる。症状または臨床マーカーの1つ以上を低下させる場合、一般に治療は「有効である」。あるいは、疾患、障害または医学的状态の進行を低下または停止させる場合、治療は「有効である」。すなわち、「治療」には、症状またはマーカーを改善させることだけでなく、未治療の場合に予想される症状の進行または悪化を停止させるかまたは少なくとも緩徐にさせることも含まれる。また、「治療」は、有益な結果を目指す若しくは得ること、または最終的に治療が不成功であったとしても個人に病態が発症する可能性を低下させることを意味し得る。治療を必要としている個人には、すでに病態を有している個人、並びに、病態になりやすい個人または病態が予防されるべき個人が含まれる。

20

【0037】

「有益な結果」または「所望の結果」は、疾患状態の重症度の減少または緩和、疾患状態の悪化予防、疾患状態の治癒、疾患状態の発症予防、患者が疾患状態を発症する可能性の低下、罹患率及び死亡率の低下、及び患者の生命または余命の延長を含んで良いが、これらに限定されない。非限定的な例として、「有益な結果」または「所望の結果」は、1つ以上の症状の回復、障害の程度の減弱、白血病状態の安定化（すなわち、悪化させないこと）、白血病の遅延または緩徐化、及び白血病に関連する症状の改善または緩和であって良い。

30

【0038】

本明細書で使用する「病態（Condition）」及び「疾患状態（disease condition）」は、悪性腫瘍性の細胞増殖性障害または細胞増殖性疾患のあらゆる形態を含んで良いがこれらに限定されない。このような障害の例には癌及び腫瘍が挙げられるが、これらに限定されない。

【0039】

本明細書で使用する「癌」または「腫瘍」とは、身体の臓器及び系が正常に機能することを妨害する制御されない細胞成長、及び/または悪性が良性かを問わないすべての腫瘍性の細胞成長及び細胞増殖、並びにすべての前癌性及び癌性の細胞及び組織をいう。癌または腫瘍を有する対象は、対象体内に存在する、客観的に測定可能な癌細胞を有する対象である。この定義に含まれるのは、良性及び悪性の癌、並びに、休眠腫瘍または微小転移である。発症部位から移動して及び重要臓器に播種する癌は、罹患臓器の機能を低下させて、最終的に対象を死に至らしめる。本明細書で使用する場合、用語「侵襲的」とは、周囲組織に対する浸潤及び破壊する能力をいう。黒色腫は皮膚腫瘍の侵襲型である。本明細書で使用する場合、用語「癌腫」とは、上皮細胞から生じる癌をいう。肉腫は、間葉由来の形質転換細胞から生じる癌である。したがって、癌性の骨組織、軟骨組織、脂肪組織、

40

50

筋組織、血管組織、または造血組織でできている悪性腫瘍は、定義として、肉腫とみなされる。これとは対照的に、上皮細胞に由来する悪性腫瘍は癌腫と呼ばれる。肉腫には、最もよく類似する組織の種類に基づいて、異なる名称が多数付けられている。例えば、骨肉腫は骨に類似し、軟骨肉腫は軟骨に類似し、脂肪肉腫は脂肪に類似し、平滑筋肉腫は平滑筋に類似している。癌の例として、白血病、肉腫、ユーイング肉腫、骨肉腫、神経系腫瘍、脳腫瘍、神経鞘腫瘍、乳癌、結腸癌、癌腫、肺癌、肝細胞癌、胃癌、膵癌、子宮頸癌、卵巣癌、肝癌、膀胱癌、尿路癌、甲状腺癌、腎癌、腎細胞腫、癌腫、黒色腫、頭頸部癌、脳腫瘍、並びに、非限定的にアンドロゲン依存性前立腺癌及びアンドロゲン非依存性前立腺癌を含む前立腺癌が挙げられるが、これに限定されるものではない。脳腫瘍の例には、良性脳腫瘍、悪性脳腫瘍、原発性脳腫瘍、続発性脳腫瘍、転移性脳腫瘍、神経膠腫、多形膠芽腫（GBM）、髄芽腫、上皮細胞腫、星細胞腫、毛様細胞性星細胞腫、乏突起神経膠腫、脳幹部神経膠腫、視神経膠腫、乏突起星細胞腫のような混合膠腫、低悪性度神経膠腫、高悪性度神経膠腫、テント上神経膠腫、テント下神経膠腫、橋膠腫、髄膜腫、下垂体腺腫、及び神経鞘腫瘍が挙げられるが、これに限定されるものではない。神経系腫瘍または神経系新生物とは、神経系を侵すあらゆる腫瘍をいう。神経系腫瘍は、中枢神経系（CNS）の腫瘍、末梢神経系（PNS）の腫瘍、またはCNS及びPNSの両方にある腫瘍であり得る。神経系腫瘍の例には、脳腫瘍、神経鞘腫瘍、及び視神経膠腫が挙げられるが、これらに限定されない。白血病は、「芽球」と呼ばれる未熟白血球が異常に増加することの特徴とする血液または骨髄の癌の一種である。白血病の例には、急性白血病、慢性白血病、リンパ性白血病、骨髄性白血病、急性リンパ性白血病（ALL）、慢性リンパ性白血病（CLL）、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、有毛細胞白血病（HCL）、T細胞性前リンパ球性白血病（T-PLL）、急性前骨髄球性白血病、大顆粒リンパ球性白血病、及び成人T細胞白血病が挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

【0040】

本明細書で使用する場合、用語「投与する（administering）」とは、本明細書に開示する作用物質の少なくとも一部が所望の部位に局在することになる方法または経路で、該作用物質を対象体内に留置することをいう。「投与経路」は、エアロゾル、経鼻、経口、経粘膜、経皮吸収、非経口、経腸、局部（topical）、または局所（local）を含むがこれらに限定されない、当技術分野で公知の任意の投与経路を意味して良い。「非経口」とは、一般に、眼窩内注射、輸注注射、動脈内注射、嚢内注射、心臓内注射、皮内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、肺内注射、脊髄内注射、胸骨内注射、くも膜下腔内注射、子宮内注射、静脈内注射、くも膜下注射、被膜下注射、皮下注射、経粘膜注射、または経気管注射などの注射を伴う投与経路をいう。非経口経路では、組成物は、注射用または注射用の溶液若しくは懸濁液の形態、または凍結乾燥粉末であって良い。経腸経路では、薬学的組成物は、制御放出を可能にする錠剤、ゲルカプセル、糖衣錠、シロップ、懸濁液、溶液、粉末、顆粒、エマルジョン、マイクロ粒子若しくはナノ粒子または脂質小胞若しくはポリマー小胞の形態であり得る。

30

【0041】

本明細書で使用する用語「試料」または「生体試料」は、生物学的生物から採取または単離された試料、例えば対象の腫瘍試料を意味する。例示的な生体試料には、生体液試料、血清、血漿、尿、唾液、腫瘍試料、腫瘍生検及び／または組織試料等が挙げられるが、これに限定されるものではない。生体試料という用語には、上述試料の混合物も含まれる。用語「試料」には、未処置または事前処置した（または事前処理した）生体試料も含まれる。いくつかの実施形態では、試料は、対象由来の1つ以上の細胞を含むことができる。いくつかの実施形態では、試料は、腫瘍細胞試料であり得、例えば、試料は癌細胞、腫瘍由来の細胞、及び／または腫瘍生検を含むことができる。

40

【0042】

本明細書で使用する場合、「対象」はヒトまたは動物を意味する。通常、動物は、霊長類、げっ歯類、飼育動物または狩猟動物などの脊椎動物である。霊長類には、チンパンジ

50

一、カニクイザル、クモザル、及びマカクザル、例えばアカゲザルが挙げられる。げっ歯類には、マウス、ラット、ウッドチャック、フェレット、ウサギ及びハムスターが挙げられる。飼育動物及び狩猟動物には、ウシ、ウマ、ブタ、シカ、バイソン、水牛、ネコ科、例えば飼い猫、及びイヌ科、例えばイヌ、キツネ、オオカミが挙げられる。用語「患者」、「個体」及び「対象」は、本明細書では同じ意味で使用される。一実施形態において、対象は哺乳類である。哺乳類は、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。さらに、本明細書に記載の方法は、飼育動物及び／またはペットの治療に使用できる。

【0043】

本明細書で使用する「哺乳類」とは、ヒト並びにチンパンジー及び他の類人猿種とサル種のような非ヒト霊長類；ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ及びウマのような家畜；イヌ及びネコのような飼育哺乳類；マウス、ラット及びモルモットのようなげっ歯類を含む実験動物などを制限することなく含む、哺乳綱の任意のメンバーをいう。用語により特定の年齢または性別が示されることはない。したがって、雌雄を問わず、成体対象及び新生対象、並びに胎児は、この用語の範囲内に含まれることが意図される。

【0044】

対象は、治療を必要とする病態（例えば、白血病）、若しくはその病態に関連した1つ以上の合併症について、以前に診断されたことがある、またはそのような病態に罹患している、若しくはそのような病態にあることが確認されている対象であり得、任意選択で、その病態または該病態に関連する1つ以上の合併症に対する治療をすでに受けている対象であり得る。あるいは、対象は、病態またはその病態に関連する1つ以上の合併症を有するという診断をそれまでに受けたことがない対象でもあり得る。例えば、対象は、病態またはその病態に関連する1つ以上の合併症について1つ以上の危険因子を示す対象または危険因子を示していない対象であり得る。特定の病態について治療を「～を必要とする対象」は、その病態を有すると疑われる対象、その病態を有するという診断を受けた対象、その病態についてすでに治療を受けたか若しくは治療を受けている対象、その病態について治療を受けていない対象、またはその病態を発症するリスクのある対象であり得る。

【0045】

用語「統計的に有意な」または「有意に」とは、差が認められる統計的な証拠をいう。それは、帰無仮説が実際に真である場合に、その帰無仮説を棄却する決定が為される確率として定義される。かかる決定はp値を用いてなされることが多い。

【0046】

本明細書で使用する場合、「変異体 (variant)」には、保存的アミノ酸変異を含む変異体、SNP変異体、スプライシング変異体、縮重変異体、及び遺伝子の生物学的に活性な部分を挙げることができるが、これに限定されるものではない。本明細書で使用する「縮重変異体 (degenerate variant)」とは、変異核酸配列を有するが、遺伝暗号の冗長性により依然として同じポリペプチドをコードする変異体をいう。本発明によれば、抗体タンパク質（例えば、抗CD19抗体）は、例えば、同定、発現、単離、保管及び／または投与を促進または改善するために修飾されて良いが、このような修飾により抗体タンパク質の機能を許容できないレベルまで低下させてはならない。さまざまな実施形態では、抗体タンパク質の変異体は、野生型抗体タンパク質の機能の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%を有する。

【0047】

用語「機能的」を「同等物」、「類似体」、「誘導體」、「変異体」または「断片」と併用する場合、ある実体若しくは分子の同等物、類似体、誘導體、変異体または断片が有する生物学的、物理的、及び／または化学的活性が、その同等物、類似体、誘導體、変異体若しくはその断片である実体若しくは分子の生物学的、物理的、及び／または化学的活性と実質的に類似していることをいう。

【0048】

本明細書中で特に明記しない限り、本出願との関連で使用される科学のおよび技術的用語は、本開示が属する技術分野の当業者が一般的に理解する意味を持つものとする。本発明は、本明細書に記載する特定の方法、プロトコール、及び試薬等に制限されるものではなく、したがって、これらは異なり得ることを理解されるべきである。本明細書で使用する用語はあくまでも個々の実施形態を説明するためのものであり、本発明の範囲を限定することは意図されず、かかる範囲は添付の請求の範囲によってのみ限定される。

【0049】

標的ナノ送達システムは、治療濃度域を広げ毒性に関する全身治療を最小化する上で有益となり得る。このことは、大部分の癌患者を最終的に死亡させてしまう転移性疾患の治療において特に重要である。外科手術、放射線、及び従来治療が選択肢である充実性腫瘍とは異なり、白血病は血液の癌であり、発症時から播種性の疾患であるため、予後が非常に不良である。これらの疾患では、殺滅される正常組織が多くなり過ぎないように殺腫瘍用量に達することは不可能である。したがって、充実性腫瘍の治療の場合よりも、腫瘍と正常組織との間の薬物送達の区別を大きくするための革新的技術による解決法が一層強く必要とされている。特定経路を阻害できる薬物を使用して現在成功を収めている癌治療法により患者の生存率は改善されてはいるが、残念なことに、すべての癌に当てはまるわけではなく、依然として多種多様な多くの癌で予後は不良なままである。さらに、癌治療法が不完全であるために続発性癌、心臓または肺の損傷、不妊または慢性肝炎といったさまざまな副作用が引き起こされる。したがって、癌患者を治療するために、一刻も早い確実な腫瘍特異的治療が必要とされている。近年の化学療法は、より高用量を特異的に腫瘍まで送達し、正常組織には送達されないようにできれば、より一層有効な療法であり得たと広く認識されている。

【0050】

したがって、本明細書では、重合性脂質及び非重合性脂質が含まれるかまたは該重合性脂質及び該非重合性脂質からなるハイブリッド重合リポソームナノ粒子を提供する。さまざまな実施形態では、重合性脂質は、PEGポリマー鎖を有する少なくとも1種のPEG化重合性脂質を含むかまたは該PEG化重合性脂質からなる。本明細書に記載のHPLNの利点は、PEGポリマー鎖を有するPEG化重合性脂質を存在させることにより、HPLNの安定性が有意に高まることである。例えば、初期のPLN製剤は10, 12-ペンタコサジン酸(PCDA)誘導体(すなわち、ジアセチレン含有脂質)のみで構成されたもので、重合してから50 超に加熱すると、容易に検出できる非常に蛍光な粒子を形成した。しかし、これらのナノ粒子は、治療用物質の送達用に適合させようとすると問題となることがわかった。これらを、予め重合したりリポソームを使用してイオン間の勾配により封入することにより細胞毒性化学療法薬とともに効果的にローディングを試みたが、低濃度の薬物さえもローディングすることができなかった。本明細書に記載するハイブリッドPLNは、PEGポリマー鎖を有する少なくとも1種のPEG化重合性脂質を有する重合性脂質を含むもので、前述の問題を克服し、また、標的細胞に治療用物質を送達するために有効に使用できる。

【0051】

いかなる特定の理論にも束縛されることは望まないが、発明者らは、脂質成分はPLN表面で相分離するのかもしれないと仮定している(例えば、ポリマーパッチでできたアイランドが複数あるように見えるPLN表面を、非重合性脂質膜の海が囲んでいる)。これらのアイランドが一旦形成されると、粒子と粒子の間にある粘着性のポイントとして作用し、これがナノ粒子の凝集に寄与し、製剤不安定性をもたらすと考えられる。この問題を解決するため、本明細書に記載するように、発明者らは、PEG2000-10, 12-ペンタコサジン酸誘導体(PEG2000基を含有する重合性脂質)を重合性脂質成分に導入することにより、粒子表面にPEG基を組み込ませ、それによりサイズが不安定になるという問題の解決を図った。対照的に、初期のPLN製剤(例えば、WO2012155021に記載)では、「ポリマーアイランド」を形成する脂質は、それに結合しているPEG基がないか、または最小量しかなく、このことが粒子のサイズ不安定性(例

えば、凝集)に寄与しているのかもしれない。

【0052】

HPLN製剤中の重合性脂質の量またはポリマー量を増量させると、腫瘍死という点で粒子の有効性が改善されるようである。同様に、重合性脂質の量またはポリマー量を増量させると、粒子にローディングできる薬物量は減少する。したがって、両曲線(良好な有効性、及び高い薬物ローディング量)は、細胞ベース実験及び動物実験で測定した場合に、特定数値において最大となるであろう。本明細書において、本発明者らは、L- α -ジステアロイルホスホチジルコリン(phosphatidylcholine)脂質は10モル%~60モル%でなければならないことを示す。

【0053】

ミセル脂質挿入方法は、ターゲティング分子をHPLN表面に付加するための一つの可能な手段である。別の方法は、マレイミド末端(maleimide-terminated)PEG2000脂質(例えば、Mal-PEG2000-L- α -ジステアロイルホスホチジルエタノールアミン(phosphatidylethanolamine):mal-PEG2000-DSPЕまたはMal-PEG2000-PCDA)を初めに含めてHPLN脂質混合物を製剤化することである。一旦HPLNが形成されたら、ターゲティング分子を、表面のマレイミド基に直接結合させることができる。ミセル挿入方法はそれ自体に制約がある、つまり、HPLN表面上ではPEG濃度はある特定濃度(約5mol%)で限界になるため、それ以上のPEG化脂質をそこに挿入することはできない。約5%を超えるPEG2000表面濃度にした場合、ミセル挿入方法は適用できないであろう。5mol%超のPEG2000脂質成分を初めに含むリボソームを製剤化する方法しか、こうしたHPLNの構築に使用できないであろう。

【0054】

ハイブリッド重合リボソームナノ粒子(HPLN)

さまざまな実施形態において、本発明は、ハイブリッド重合リボソームナノ粒子(HPLN)を提供する。HPLNは、重合性脂質及び非重合性脂質を含んでも良いかまたは該重合性脂質及び該非重合性脂質からなっても良い。重合性脂質は、PEGポリマー鎖を有する少なくとも1種のPEG化重合性脂質を含む。一実施形態において、HPLNは、本明細書に記載のようにHPLNに封入した1種以上の治療用物質をさらに含む。一実施形態において、HPLNは、HPLNに結合された1つ以上の抗体をさらに含む。一実施形態において、HPLNは、HPLN内に封入した1種以上の治療用物質、及びHPLNに結合された1つ以上の抗体を含む。

【0055】

さまざまな実施形態において、本発明は、ハイブリッド重合リボソームナノ粒子(HPLN)を提供する。HPLNは、重合性脂質(約15~40mol%)及び非重合性脂質を含んでも良いかまたは該重合性脂質(約15~40mol%)及び該非重合性脂質からなっても良い。重合性脂質は、PEGポリマー鎖を有する少なくとも1種のPEG化重合性脂質を含む。非重合性脂質は、両イオン性荷電脂質(少なくとも約10mol%)、中性荷電分子(約20~45mol%)、及び陰性荷電脂質(約1~15mol%)を含む。一実施形態において、HPLNは、本明細書に記載のようにHPLN内に封入した1種以上の治療用物質をさらに含む。一実施形態において、HPLNは、HPLNに結合された1つ以上の抗体をさらに含む。一実施形態において、HPLNは、HPLN内に封入した1種以上の治療用物質、及びHPLNに結合された1つ以上の抗体を含む。

【0056】

さまざまな実施形態において、本発明は、ハイブリッド重合リボソームナノ粒子(HPLN)を提供する。HPLNは、重合性脂質(約15mol%)及び非重合性脂質を含んでも良いかまたは該重合性脂質(約15mol%)及び該非重合性脂質からなっても良い。重合性脂質は、PEGポリマー鎖を有する少なくとも1種のPEG化重合性脂質を含む。非重合性脂質は、両イオン性荷電脂質(約47mol%)、中性荷電分子(約32mol%)及び陰性荷電脂質(約6mol%)を含む。一実施形態において、HPLNは、本

明細書に記載のようにH P L Nに封入した1種以上の治療用物質をさらに含む。一実施形態において、H P L Nは、H P L Nに結合された1つ以上の抗体をさらに含む。一実施形態において、H P L Nは、H P L N内に封入した1種以上の治療用物質、及びH P L Nに結合させられた1つ以上の抗体を含む。

【0057】

さまざまな実施形態において、本発明は、ハイブリッド重合リポソームナノ粒子(H P L N)を提供する。H P L Nは、重合性脂質(約15mol%)及び非重合性脂質を含んでも良いかまたは該重合性脂質(約15mol%)及び該非重合性脂質からなっても良い。重合性脂質は、PEGポリマー鎖を有する少なくとも1種のPEG化重合性脂質を含む(約1mol%)。非重合性脂質は、両イオン性荷電脂質(約51mol%)、中性荷電分子(約32mol%)、及び陰性荷電脂質(約2mol%)を含む。一実施形態において、H P L Nは、本明細書に記載のようにH P L Nに封入した1種以上の治療用物質をさらに含む。一実施形態において、H P L Nは、H P L Nに結合された1つ以上の抗体をさらに含む。一実施形態において、H P L Nは、H P L N内に封入した1種以上の治療用物質、及びH P L Nに結合された1つ以上の抗体を含む。

10

【0058】

さまざまな実施形態において、本発明は、h - P E G 1 P C D A 約14mol%、水素添加大豆PC 約51mol%、コレステロール 約32mol%、m - P E G 2 0 0 0 - D S P E 約2mol%、及びm - P E G 2 0 0 0 - P C D A 約1mol%を含むハイブリッド重合リポソームナノ粒子を提供する。一実施形態において、H P L Nは、本明細書に記載のようにH P L Nに封入した1種以上の治療用物質をさらに含む。一実施形態において、H P L Nは、H P L Nに結合された1つ以上の抗体をさらに含む。一実施形態において、H P L Nは、H P L N内に封入した1種以上の治療用物質、及びH P L Nに結合された1つ以上の抗体を含む。いくつかの実施形態では、ハイブリッド重合リポソームナノ粒子を使用して、ユーイング肉腫、バーキットリンパ腫、骨肉腫、神経芽細胞腫、神経膠腫、ALL、CML、AML、またはMDSのいずれか1つまたはそれ以上を治療して良い。

20

【0059】

さまざまな実施形態において、本発明は、h - P E G 1 P C D A 約14mol%、水素添加大豆PC 約48mol%、コレステロール 約32mol%、m - P E G 2 0 0 0 - D S P E 約2mol%、mal - P E G 2 0 0 0 - D S P E 約3mol%、及びm - P E G 2 0 0 0 - P C D A 約1mol%を含むハイブリッド重合リポソームナノ粒子を提供する。一実施形態において、H P L Nは、本明細書に記載のようにH P L Nに封入した1種以上の治療用物質をさらに含む。一実施形態において、H P L Nは、H P L Nに結合させられた1つ以上の抗体をさらに含む。一実施形態において、H P L Nは、H P L N内に封入した1種以上の治療用物質及びH P L Nに結合された1つ以上の抗体を含む。いくつかの実施形態では、ハイブリッド重合リポソームナノ粒子を使用して、ユーイング肉腫、バーキットリンパ腫、骨肉腫、神経芽細胞腫、神経膠腫、ALL、CML、AML、またはMDSのいずれか1つまたはそれ以上を治療して良い。

30

【0060】

さまざまな実施形態において、本発明は、h - P E G 1 P C D A 約24mol%、水素添加大豆PC 約41mol%、コレステロール 約32mol%、m - P E G 2 0 0 0 - D S P E 約2mol%、及びm - P E G 2 0 0 0 - P C D A 約1mol%を含むハイブリッド重合リポソームナノ粒子を提供する。一実施形態において、H P L Nは、本明細書に記載のようにH P L Nに封入した1種以上の治療用物質をさらに含む。一実施形態において、H P L Nは、H P L Nに結合された1つ以上の抗体をさらに含む。一実施形態において、H P L Nは、H P L N内に封入した1種以上の治療用物質及びH P L Nに結合された1つ以上の抗体を含む。いくつかの実施形態では、ハイブリッド重合リポソームナノ粒子を使用して、ユーイング肉腫、バーキットリンパ腫、骨肉腫、神経芽細胞腫、神経膠腫、ALL、CML、AML、またはMDSのいずれか1つまたはそれ以上を治療して良

40

50

い。

【0061】

さまざまな実施形態では、中性荷電分子は、コレステロール、エルゴステロール、ホパノイド、フィステロール、スタノール、及びステロール、並びにそれらの機能的誘導体である。

【0062】

さまざまな実施形態では、本明細書で提供するハイブリッド重合リボソームナノ粒子は、大きさが約30～200nmである。さまざまな実施形態では、本明細書で提供するハイブリッド重合リボソームナノ粒子は、重合性脂質を重合させるために、製造後に約1～35分間UV処理される。さまざまな実施形態では、本明細書で提供するハイブリッド重合リボソームナノ粒子は、押出し成形直後かつ重合前に5～10で一晚冷却することにより調製されている。

10

【0063】

さまざまな実施形態では、本明細書で提供するハイブリッド重合リボソームナノ粒子は、循環半減期が少なくとも約3時間～少なくとも約4時間である。さまざまな実施形態では、本明細書で提供するハイブリッド重合リボソームナノ粒子は、細胞のエンドソームコンパートメントへ約30分後に内部移行される。

【0064】

さまざまな実施形態では、PEGポリマー鎖を有するPEG化重合性脂質は、PLNの約0.1～1、1～5、5～10、または10～15mol%である。さまざまな実施形態では、PEGポリマー鎖は、約10～150、10～50、50～100、または100～150個のPEGユニットを含む。さまざまな実施形態では、PEGポリマー鎖の分子量は約500～5000、500～2000、または2000～5000Daである。さまざまな実施形態では、PEG化重合性脂質は、(PEG)_n-10、12-ペンタコサジン酸((PEG)_n-PCDA)の各種誘導体からなる群から選択され、nは、PEGポリマー鎖内のPEGユニットの数であり、かつ約10～150、10～50、50～100、または100～150である。さまざまな実施形態では、PEG化重合性脂質は、PEG(mw)-10、12-ペンタコサジン酸(PEG(mw)-PCDA)の各種誘導体からなる群から選択され、mwは、PEGポリマー鎖の分子量であり、かつ約500～5000、500～2000、または2000～5000Daである。ある実施形態では、PEG化重合性脂質はPEG2000-10-12-ペンタコサジンアミドまたはPEG2000-10-12-ペンタコサジン酸である。PEG化重合性脂質の例には、PEG化ジンPC、PEG化ジンPE、及びPEG化10、12-ペンタコサジン酸(PEG-PCDA)並びにそれらの機能的な誘導体及び類似体が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、PEG化重合性脂質は、脂質分子に結合しているPEG化重合性基を含んで良い。

20

30

【0065】

さまざまな実施形態では、本明細書で提供するハイブリッド重合リボソームナノ粒子は、少なくとも0.1、0.5、1、5、または10mol%のPEG化重合性脂質を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供するハイブリッド重合リボソームナノ粒子は、少なくとも1mol%のPEG化重合性脂質を含む。その他の実施形態では、本明細書で提供するハイブリッド重合リボソームナノ粒子は、少なくとも10mol%のPEG化重合性脂質を含む。

40

【0066】

さまざまな実施形態では、本明細書で提供するハイブリッド重合リボソームナノ粒子は、機能的部分に結合した脂質を含んで良い。機能的部分の例には、ターゲティング物質、造影剤、及び治療物質、並びにそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。さまざまな実施形態では、本明細書で提供するハイブリッド重合リボソームナノ粒子は、陽性、陰性、または中性の荷電の脂質を含んで良い。

【0067】

50

さまざまな実施形態では、重合性脂質は P L N の約 15 ~ 40 mol % である。さまざまな実施形態では、重合性脂質は、不飽和脂質を含む。さまざまな実施形態では、重合性脂質はジアセチレン脂質を含む。さまざまな実施形態では、重合性脂質は、N - (5' - ヒドロキシ - 3' - オキシペンチル) - 10 - 12 - ペンタコサジインアミド (h - P E G 1 - P C D A)、N - (5' - スルホ - 3' - オキシペンチル) - 10 - 12 - ペンタコサジインアミド (スルホ - P E G 1 - P C D A)、N - [メトキシ (ポリエチレングリコール) - 750] - 10 - 12 - ペンタコサジインアミド (m - P E G 750 - P C D A)、若しくは N - [マレイミド (ポリエチレングリコール) - 1500] - 10 - 12 - ペンタコサジインアミド (m a l - P E G 1500 - P C D A)、またはそれらの組み合わせを含む。さまざまな実施形態では、重合性脂質は尾部が C 25 の脂質である。

10

【0068】

さまざまな実施形態では、非重合性脂質は H P L N の約 80 ~ 85 mol % である。さまざまな実施形態では、非重合性脂質は H P L N の約 75 ~ 85 mol % である。さまざまな実施形態では、非重合性脂質は H P L N の約 30 ~ 60 mol % である。さまざまな実施形態では、非重合性脂質は飽和リン脂質を含む。さまざまな実施形態では、非重合性脂質は、P E G ポリマー鎖を有する少なくとも 1 種の P E G 化非重合性脂質を含む。さまざまな実施形態では、非重合性脂質は、L - α - ホスファチジルコリン水素添加大豆 (水素添加大豆 P C)、ジステアロイルホスファチジルコリン (D S P C)、コレステロール、1, 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ (ポリエチレングリコール) - 2000] (m - P e g 2000 - D S P E)、若しくは 1, 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [マレイミド (ポリエチレングリコール) - 2000] (m a l - P e g 2000 - D S P E)、またはそれらの組み合わせを含む。さまざまな実施形態では、非重合性脂質は、L - α - ホスファチジルコリン、P E - P E G 2000 - 1, 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ (ポリエチレングリコール) - 2000]、若しくは P E - P E G 2000 - ビオチン、またはそれらの組み合わせを含む。さまざまな実施形態では、非重合性脂質は尾部が C 18 の脂質である。

20

【0069】

さまざまな実施形態では、本明細書で提供するハイブリッド重合リポソームナノ粒子は、少なくとも約 10 mol % の両イオン性荷電脂質を含む。さまざまな実施形態では、本明細書で提供するハイブリッド重合リポソームナノ粒子は、約 10 ~ 20、20 ~ 30、30 ~ 40、40 ~ 50、50 ~ 60、60 ~ 70、70 ~ 80、または 80 ~ 90 mol % の両イオン性荷電脂質を含む。さまざまな実施形態では、本明細書で提供するハイブリッド重合リポソームナノ粒子は、約 10 ~ 30、10 ~ 15、15 ~ 20、20 ~ 25、または 25 ~ 30 mol % の両イオン性荷電脂質を含む。本発明のさまざまな実施形態によれば、両イオン性荷電脂質は、L - α - ジステアロイルホスファチジルコリン、L - α - ホスファチジルコリン水素添加大豆 (水素添加大豆 P C)、またはジステアロイルホスファチジルコリン (D S P C) を含むことができる。本発明のさらにさまざまな実施形態によれば、両イオン性荷電脂質は尾部が C 18 の脂質である。

30

【0070】

さまざまな実施形態では、本明細書で提供するハイブリッド重合リポソームナノ粒子は、ハイブリッド重合リポソームナノ粒子にローディングされた治療用物質をさらに含む。本発明によれば、非限定的な治療用物質の例には、抗腫瘍薬、血液製剤、生体応答調節物質、抗真菌薬、ホルモン、ビタミン、ペプチド、抗結核薬、酵素、抗アレルギー薬、抗凝固剤、循環系作用薬、代謝増強剤、抗ウイルス薬、抗狭心症薬、抗生物質、抗炎症剤、抗原虫薬、抗リウマチ薬、麻薬、アヘン剤、強心配糖体、神経筋遮断薬、鎮静剤、局所麻酔薬、全身麻酔薬、放射性化合物、放射線増感剤、免疫チェックポイント阻害剤、モノクローナル抗体、遺伝物質、s i R N A または R N A i 分子などのアンチセンス核酸、及びプロドラッグが挙げられる。

40

【0071】

50

さまざまな実施形態では、本明細書で提供するハイブリッド重合リボソームナノ粒子は、ハイブリッド重合リボソームナノ粒子にローディングされた化学療法薬をさらに含む。さまざまな実施形態では、本明細書で提供するハイブリッド重合リボソームナノ粒子は、ハイブリッド重合リボソームナノ粒子にローディングされた2種以上の化学療法薬をさらに含む。さまざまな実施形態では、化学療法薬は、ドキソルビシン、イリノテカン、シスプラチン、トポテカン、ビンクリスチン、マイトマイシン、パキシリタキソール (p a x l i t a x o l)、シタラビン、ミトキサントロン、A r a - C (シタラビン)、V P - 1 6 (エトポシド)、若しくはs i R N A、またはそれらの組み合わせであり得る。

【0072】

さまざまな実施形態では、本明細書で提供するハイブリッド重合リボソームナノ粒子は、ハイブリッド重合リボソームナノ粒子の表面に結合されたターゲティング物質をさらに含む。さまざまな実施形態では、本明細書で提供するハイブリッド重合リボソームナノ粒子は、ハイブリッド重合リボソームナノ粒子の表面に結合された2種以上のターゲティング物質をさらに含む。さまざまな実施形態では、ターゲティング物質は、ダイアボディ (d i a b o d y)、抗体、リガンド、タンパク質、ペプチド、炭水化物、ビタミン、核酸、及びそれらの組み合わせであり得る。さまざまな実施形態では、ターゲティング物質は、抗C D 1 9 抗体、抗C D 3 4 抗体、抗C D 9 9 抗体、抗C D 1 1 7 抗体、抗C D 1 6 6 抗体、若しくは抗C A 1 9 - 9 抗体、またはそれらの組み合わせである。さまざまな実施形態では、ターゲティング物質は、細胞表面分子に特異的に結合できるペプチドである。本発明によれば、細胞表面分子は、構造タンパク質、細胞接着分子、膜受容体、キャリアタンパク質、及びチャネルタンパク質からなる群から選択される細胞膜タンパク質であり得る。細胞表面分子の例には、活性化白血球接着分子 (C D - 1 6 6)、糖鎖抗原 (c a r b o h y d r a t e a n t i g e n) 1 9 - 9 (C A 1 9 - 9)、 α フェトプロテイン (A F P)、癌胎児性抗原 (C E A)、卵巣癌抗原 (C A - 1 2 5)、乳癌抗原 (M U C - 1 及び上皮腫瘍抗原 (E T A))、チロシナーゼ悪性黒色腫抗原及び黒色腫関連抗原 (M A G E)、r a s の抗原性異常産物、p 5 3、ユーイング肉腫抗原 (C D - 9 9)、白血病抗原 (C D - 1 9 及びC D - 1 1 7)、血管内皮成長因子 (V E G F)、上皮成長因子受容体 (E G F R)、H e r 2 / n e u、または前立腺特異的膜抗原 (P S M A) が挙げられるが、これらに限定されない。本発明によれば、ターゲティング物質 (例えば、抗体またはペプチド) は、合成のものであっても、またはいかなる供給源、例えば、ラット、マウス、モルモット、イヌ、ネコ、ウサギ、ブタ、ウシ、ウマ、ヤギ、ロバ若しくはヒトに由来するものであっても可能である。さまざまな実施形態では、ターゲティング物質はエンドサイトーシスまたは細胞膜融合を亢進させる。

【0073】

さまざまな実施形態では、本明細書で提供するハイブリッド重合リボソームナノ粒子は、癌のための治療として免疫応答を誘発することになる、ハイブリッド重合リボソームナノ粒子の表面に結合された作用物質をさらに含む。本発明によれば、細胞表面分子は細胞膜タンパク質であり得、該細胞膜タンパク質が、ヒトパピローマウイルス (H P V) 陽性の前癌性細胞及び癌細胞のすべてにおいて検出可能であるE 6 タンパク質及びE 7 タンパク質からなる群から選択される。あるいは、ムチン糖タンパク質は、癌治療のための重要な診断用また治療用標的である。肺癌に過剰発現する重要な腫瘍マーカーである腫瘍関連M U C 1 糖タンパク質及び膵管腺癌に固有に発現する重要な腫瘍マーカーである腫瘍関連M U C 4 糖タンパク質に基づくワクチンは、腫瘍細胞の異常なグリコシル化により得られるが、これはそのペプチド骨格が曝露され、腫瘍関連グリコペプチド抗原が形成されることにより起こるものである。さまざまな実施形態では、本明細書で提供するハイブリッド重合リボソームナノ粒子は、ハイブリッド重合リボソームナノ粒子の表面に結合された2つ以上の抗原をさらに含む。

【0074】

さまざまな実施形態において、本発明は、本明細書に記載のハイブリッド重合リボソームナノ粒子に治療用物質をローディングする方法を提供する。かかる方法は、本明細書に

記載するハイブリッド重合リボソームナノ粒子を提供する工程、かかるハイブリッド重合リボソームナノ粒子の膜を隔ててイオン勾配を確立する工程、治療用物質を提供する工程、及びかかる治療用物質をハイブリッド重合リボソームナノ粒子とともにインキュベートし、これにより、ハイブリッド重合リボソームナノ粒子に治療用物質をローディングする工程を含む。さまざまな実施形態では、イオン勾配は硫酸アンモニウム勾配及び/またはpH勾配である。本発明によれば、非限定的な治療用物質の例には、抗腫瘍薬、血液製剤、生体応答調節物質、抗真菌薬、ホルモン、ビタミン、ペプチド、抗結核薬、酵素、抗アレルギー薬、抗凝固剤、循環系作用薬、代謝増強剤、抗ウイルス薬、抗狭心症薬、抗生物質、抗炎症剤、抗原虫薬、抗リウマチ薬、麻薬、アヘン剤、強心配糖体、神経筋遮断薬、鎮静剤、局所麻酔薬、全身麻酔薬、放射性化合物、放射線増感剤、免疫チェックポイント阻害剤、モノクローナル抗体、遺伝物質、siRNAまたはRNAi分子などのアンチセンス核酸、及びプロドラッグが挙げられる。さまざまな実施形態では、治療用物質は化学療法薬である。さまざまな実施形態では、化学療法薬は、ドキソルビシン、イリノテカン、シスプラチン、トポテカン、ビンクリスチン、マイトマイシン、パキシリタキソール、シタラビン、ミトキサントロン、Ara-C(シタラビン)、VP-16(エトポシド)、若しくはsiRNA、またはそれらの組み合わせであり得る。

【0075】

化学療法薬のさらなる例には、アクチノマイシン、アリトレチノイン、全トランス型レチノイン酸、アザシチジン、アザチオプリン、ベバシズマブ、ベキサトテン(Bexate)、プレオマイシン、ボルテゾミブ、カルボプラチン、カペシタビン、セツキシマブ、シスプラチン、クロラムブシル、シクロホスファミド、シタラビン、ダウノルビシン、ドセタキセル、ドキシフルリジン、ドキソルビシン、エピルビシン、エボチロン、エルロチニブ、エトポシド、フルオロウラシル、ゲフィチニブ、ゲムシタビン、ヒドロキシ尿素、イダルビシン、イマチニブ、イピリムマブ、イリノテカン、メクロレタミン、メルファラン、メルカプトプリン、メトトレキサート、ミトキサントロン、オクレリズマブ、オフアツムマブ、オキサリプラチン、パクリタキセル、パニツマブ(Panitumab)、ペメトレキセド、リツキシマブ、タフルボシド(Taflopaside)、テニポシド、チオグアニン(Tioguanine)、トポテカン、トレチノイン、パルルビシン、ベムラフェニブ、ピンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、ビノレルビン、ボリノスタット、ロミデプシン、5-フルオロウラシル(5-FU)、6-メルカプトプリン(6-MP)、クラドリビン、クロファラビン、フロキシウリジン、フルダラビン、ペントスタチン、マイトマイシン、イキサベピロン、エストラムスチン、プレドニゾン、メチルプレドニゾロン、デキサメタゾン、またはそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【0076】

さまざまな実施形態において、本発明は、ターゲティング物質を、本明細書に記載するハイブリッド重合リボソームナノ粒子に結合させる方法を提供する。かかる方法は、脂質ミセルを提供する工程、ターゲティング物質を提供する工程、かかるターゲティング物質を脂質ミセルに結合させる工程、本明細書に記載するハイブリッド重合リボソームナノ粒子を提供する工程、及びかかるハイブリッド重合リボソームナノ粒子を、標的物質と結合した脂質ミセルとともにインキュベートし、これにより、ターゲティング物質をハイブリッド重合リボソームナノ粒子に移行させる工程を含む。ある実施形態では、ターゲティング物質上のチオール基と脂質ミセル上のマレイミド基との間の反応によって、ターゲティング物質を脂質ミセルに結合させる。さまざまな実施形態では、ターゲティング物質は、ダイアボディ、抗体、リガンド、タンパク質、ペプチド、炭水化物、ビタミン、核酸、及びそれらの組み合わせであり得る。さまざまな実施形態では、ターゲティング物質は、抗CD19抗体、抗CD34抗体、抗CD99抗体、抗CD117抗体、抗CD166抗体、若しくは抗CA19-9抗体、またはそれらの組み合わせである。さまざまな実施形態では、ターゲティング物質は、細胞表面分子に特異的に結合できるペプチドである。本発明によれば、細胞表面分子は、構造タンパク質、細胞接着分子、膜受容体、キャリアタン

パク質、及びチャネルタンパク質からなる群から選択される細胞膜タンパク質であり得る。細胞表面分子の例には、活性化白血球接着分子(CD-166)、糖鎖抗原19-9(CA19-9)、 α フェトプロテイン(AFP)、癌胎児性抗原(CEA)、卵巣癌抗原(CA-125)、乳癌抗原(MUC-1及び上皮腫瘍抗原(ETA))、チロシナーゼ悪性黒色腫抗原及び黒色腫関連抗原(MAGE)、rasの抗原性異常産物、p53、ユーイング肉腫抗原(CD-99)、白血病抗原(CD-19及びCD-117)、血管内皮成長因子(VEGF)、上皮成長因子受容体(EGFR)、Her2/neu、または前立腺特異的膜抗原(PSMA)が挙げられるが、これらに限定されない。本発明によれば、ターゲティング物質剤(例えば、抗体またはペプチド)は、合成のものであっても、またはいかなる供給源、例えば、ラット、マウス、モルモット、イヌ、ネコ、ウサギ、ブタ、ウシ、ウマ、ヤギ、ロバ、若しくはヒトに由来するものであっても可能である。

10

【0077】

一実施形態において、本明細書は、ヒト白血病細胞(REH細胞)上のCD-19細胞表面マーカーを本明細書に記載のHPLNの標的にするモノクローナル抗体を結合させることにより調製されるHPLN/Dox粒子を提供する。化学的に還元させた抗CD-19抗体を、マレイミド末端PEG2000リン脂質及びメトキシ末端(methoxy-terminated)PEG2000リン脂質で構成されるミセルに結合させた[Ide及びAllen、2001年]。抗CD-19抗体で標識した部分を有するPEG2000リン脂質ミセルを、HPLN/Doxに曝露させた時に、HPLN膜内に挿入して抗CD-19/HPLN/Dox粒子を得る。結合しなかった抗体及び他の小分子量不純物を除去するため、ターゲティングされた粒子をサイズでろ過して精製した。本発明者らに先立ち、ポリマー含有リボソーム、特に、PEG2000ポリマーアイランドを有する本明細書に記載のHPLN内には、粒子間の粘着性が妨げとなり、PEG化ミセル脂質を挿入できることは誰にも実証すらされていない。事実、ポリマーの存在がそのプロセスの妨げとなると考えるかもしれない。ポリマーの量が増す程、挿入プロセスの妨げが大きくなると考えるかもしれない。しかし、本願に記載のポリマー成分の範囲内では、このような影響がないことを本発明者らの結果は示している。

20

【0078】

ターゲティングされたナノ粒子は、抗がん剤を癌細胞に選択的に送達し、正常細胞に非選択的に送達されることによる予期せぬ細胞毒性及び化学療法の制限的な有効性を克服する可能性を示した。本明細書では、小児及び成人のALL及びユーイング肉腫を治療するために新規ナノ粒子(HPLN)を使用した。ALL及びユーイング腫瘍を標的にするため、それぞれに、抗CD19抗体及び抗CD99抗体を使用した。これらの腫瘍特異的HPLNは、マウスモデルでの腫瘍成長を有効に阻害する。ターゲティング抗体または薬物を除去するとそのような抗腫瘍作用が消失することから、HPLNのこの抗がん作用は、標的癌細胞に対して非常に特異的であり、かつ薬物に依存することを証明している。尾静脈投与では、肝機能及び腎機能検査、全血球数計数または主要臓器の病態において異常は認められなかった。これらのターゲティングされたHPLNは、従来の非ターゲティングPEG-リボソームドキソルビシン製剤(ドキシル(登録商標))よりも優れた細胞毒性を示した。さらに、ターゲティングされたHPLNは、マウスモデルの腫瘍細胞内にみとめられた。したがって、このことは、例えば、小児及び成人のALL及びユーイング肉腫の対象にとって、抗がん剤の安全かつ効率的なターゲティングHPLN送達システムであることを指している。

30

40

【0079】

治療方法

さまざまな実施形態において、本発明は、対象において病態を治療し、病態を予防し、病態を有する可能性を低下させ、病態の重症度を軽減させ、かつ/または病態の進行を緩和にさせる方法を提供する。かかる方法は、本明細書に記載するハイブリッド重合リボソームナノ粒子を提供する工程、及び治療的有效量のハイブリッド重合リボソームナノ粒子を対象に投与し、これにより、対象において病態を治療し、病態を予防し、病態を有する

50

可能性を低下させ、病態の重症度を軽減させ、かつ／または病態の進行を緩徐にさせる工程を含んで良いか、またはそれらの工程からなっている。さまざまな実施形態では、病態はユーイング肉腫、バーキットリンパ腫、骨肉腫、神経芽細胞腫、神経膠腫、ALL、CML、AMLまたはMDSである。いくつかの実施形態では、方法は、化学療法、放射線照射、またはそれらの組み合わせを含むがそれらに制限されない追加治療法を同時または順次に提供することをさらに含んで良い。

【0080】

さまざまな実施形態では、病態は癌である。癌の例には、乳腺の管組織における乳管癌、髄様癌、膠様癌、管状癌、及び炎症性乳癌のような乳癌；卵巣の腺癌及び卵巣から腹腔内へ遊走した腺癌のような上皮性卵巣腫瘍を含む卵巣癌；扁平上皮癌及び腺癌を含む頸部上皮の腺癌のような子宮頸癌；腺癌または骨へ遊走した腺癌から選択される前立腺癌のような前立腺癌；膵管組織の類上皮癌及び膵管の腺癌のような膵癌；膀胱の移行上皮癌、尿路上皮癌（移行上皮癌）、膀胱を覆う粘膜の尿路上皮細胞の腫瘍、扁平上皮癌、腺癌、及び小細胞癌のような膀胱癌；急性骨髄性白血病（AML）、好ましくは末梢血の急性前骨髄球性白血病；扁平上皮癌、腺癌、及び大細胞未分化癌に分類される非小細胞肺癌（NSCLC）並びに小細胞肺癌のような肺癌；基底細胞癌、黒色腫、扁平上皮癌及び扁平上皮癌に発展することがある皮膚病態である日光角化症のような皮膚癌；眼網膜芽腫；眼内（眼）黒色腫；原発性肝癌（肝臓に端を発する癌）；腎臓癌；甲状腺乳頭癌、甲状腺濾胞癌、甲状腺髄様癌及び甲状腺未分化癌のような甲状腺癌；びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、B-細胞免疫芽球性リンパ腫及び小型非切れ込み核細胞性リンパ腫のようなAIDS関連リンパ腫；カポジ肉腫；ユーイング肉腫；、神経膠腫（星細胞腫、未分化星細胞腫、または多形膠芽腫）を含む原発性脳腫瘍、乏突起神経膠腫、上衣細胞腫、髄膜腫、リンパ腫、シュワン細胞腫、及び髄芽腫のような中枢神経系癌；聴神経腫及び神経線維腫とシュワン細胞腫とを含む悪性末梢神経鞘腫瘍（MPNST）のような末梢神経系（PNS）癌；口腔及び口腔咽頭の癌；胃癌のようなリンパ腫、胃間質腫瘍、及びカルチノイド腫瘍；セミノーマ及び非セミノーマを含む胚細胞腫瘍（GCT）、及びライディッヒ細胞腫及びセルトリ細胞腫を含む性腺間質腫瘍のような精巣癌、及び胸腺腫、胸腺がん、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫カルチノイドまたはカルチノイド腫瘍のような胸腺癌が挙げられるが、これらに限定されない。また、上述の方法は、ウイルス誘発性癌の治療に使用できる。主なウイルス-悪性疾患の系には、B型肝炎ウイルス（HBV）、C型肝炎ウイルス（HCV）と肝細胞癌；ヒトリンパ球向性ウイルス1型（HTLV-1）と成人T細胞白血病／リンパ腫、及びヒトパピローマウイルス（HPV）と子宮頸癌が挙げられる。

【0081】

さまざまな実施形態では、対象はヒトである。さまざまな実施形態では、対象は、ヒト、サル、類人猿、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヤギ、ブタ、ウサギ、マウス、及びラットを含むが、これらに限定されない哺乳類の対象である。いくつかの実施形態では、対象は、細菌性、ウイルス性、真菌性、及び寄生虫性の感染症を含むがこれらに限定されない持続的な微生物感染症に罹患している。

【0082】

本発明によれば、ハイブリッド重合リポソームナノ粒子は、内部にローディングされた治療用物質を含む。本発明によれば、非限定的な治療用物質の例には、抗腫瘍薬、血液製剤、生体応答調節物質、抗真菌薬、ホルモン、ビタミン、ペプチド、抗結核薬、酵素、抗アレルギー薬、抗凝固剤、循環系作用薬、代謝増強剤、抗ウイルス薬、抗狭心症薬、抗生物質、抗炎症剤、抗原虫薬、抗リウマチ薬、麻薬、アヘン剤、強心配糖体、神経筋遮断薬、鎮静剤、局所麻酔薬、全身麻酔薬、放射性化合物、放射線増感剤、免疫チェックポイント阻害剤、モノクローナル抗体、遺伝物質、siRNAまたはRNAi分子などのアンチセンス核酸、及びプロドラッグが挙げられる。さまざまな実施形態では、治療用物質は化学療法薬である。さまざまな実施形態では、化学療法薬は、ドキソルビシン、イリノテカン、シスプラチン、トポテカン、ビンクリスチン、マイトマイシン、パキシリタキソール、シタラビン、ミトキサントロン、Ara-C（シタラビン）、VP-16（エトポシド

10

20

30

40

50

）、若しくは s i R N A、またはそれらの組み合わせであり得る。

【 0 0 8 3 】

化学療法薬のさらなる例には、アクチノマイシン、アリトレチノイン、全トランス型レチノイン酸、アザシチジン、アザチオプリン、ベバシズマブ、ベキサトテン、プレオマイシン、ボルテゾミブ、カルボプラチン、カベシタピン、セツキシマブ、シスプラチン、クロラムブシル、シクロホスファミド、シタラビン、ダウノルビシン、ドセタキセル、ドキシフルリジン、ドキソルビシン、エピルビシン、エボチロン、エルロチニブ、エトボシド、フルオロウラシル、ゲフィチニブ、ゲムシタピン、ヒドロキシ尿素、イダルビシン、イマチニブ、イピリムマブ、イリノテカン、メクロレタミン、メルファラン、メルカプトブリン、メトトレキサート、ミトキサントロン、オクレリズマブ、オフアツムマブ、オキサリプラチン、パクリタキセル、パニツマブ、ペメトレキセド、リツキシマブ、タフルボシド、テニボシド、チオグアニン、トポテカン、トレチノイン、バルルビシン、ベムラフェニブ、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、ビノレルビン、ボリノスタット、ロミデプシン、5 - フルオロウラシル (5 - F U)、6 - メルカプトブリン (6 - M P)、クラドリビン、クロファラビン、フロキシウリジン、フルダラビン、ペントスタチン、マイトマイシン、イキサベピロン、エストラムスチン、プレドニゾン、メチルプレドニロン、デキサメタゾン、またはそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 8 4 】

さらに本発明によれば、ハイブリッド重合リボソームナノ粒子は、その表面に結合されたターゲティング物質を含む。さまざまな実施形態では、ターゲティング物質は、ダイアボディ、抗体、リガンド、タンパク質、ペプチド、炭水化物、ビタミン、核酸、及びそれらの組み合わせであり得る。さまざまな実施形態では、ターゲティング物質は、抗 C D 1 9 抗体、抗 C D 3 4 抗体、抗 C D 9 9 抗体、抗 C D 1 1 7 抗体、抗 C D 1 6 6 抗体、若しくは抗 C A 1 9 - 9 抗体、またはそれらの組み合わせである。さまざまな実施形態では、ターゲティング物質は、細胞表面分子に特異的に結合できるペプチドである。本発明によれば、細胞表面分子は、構造タンパク質、細胞接着分子、膜受容体、キャリアタンパク質、及びチャネルタンパク質からなる群から選択される細胞膜タンパク質であり得る。細胞表面分子の例には、活性化白血球接着分子 (C D - 1 6 6)、糖鎖抗原 1 9 - 9 (C A 1 9 - 9)、 α フェトプロテイン (A F P)、癌胎児性抗原 (C E A)、卵巣癌抗原 (C A - 1 2 5)、乳癌抗原 (M U C - 1 及び上皮腫瘍抗原 (E T A))、チロシナーゼ悪性黒色腫抗原及び黒色腫関連抗原 (M A G E)、r a s の抗原性異常産物、p 5 3、ユーイング肉腫抗原 (C D - 1 9)、白血病抗原 (C D - 9 9 及び C D - 1 1 7)、血管内皮成長因子 (V E G F)、上皮成長因子受容体 (E G F R)、H e r 2 / n e u、または前立腺特異的膜抗原 (P S M A) が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 8 5 】

さまざまな実施形態では、ハイブリッド重合リボソームナノ粒子を 1 回、2 回、3 回、またはそれ以上の回数投与する。さまざまな実施形態では、ハイブリッド重合リボソームナノ粒子を 1 日に 1 ~ 3 回、1 週間に 1 ~ 7 回、または 1 か月間に 1 ~ 9 回投与する。さまざまな実施形態では、ハイブリッド重合リボソームナノ粒子を約 1 ~ 1 0 日、1 0 ~ 2 0 日、2 0 ~ 3 0 日、3 0 ~ 4 0 日、4 0 ~ 5 0 日、5 0 ~ 6 0 日、6 0 ~ 7 0 日、7 0 ~ 8 0 日、8 0 ~ 9 0 日、9 0 ~ 1 0 0 日、1 ~ 6 か月、6 ~ 1 2 か月、または 1 ~ 5 年の間投与する。

【 0 0 8 6 】

さまざまな実施形態では、ハイブリッド重合リボソームナノ粒子を投与して、治療用物質を対象の体重 1 k g 当たり約 0 . 0 0 1 ~ 0 . 0 1、0 . 0 1 ~ 0 . 1、0 . 1 ~ 0 . 5、0 . 5 ~ 5、5 ~ 1 0、1 0 ~ 2 0、2 0 ~ 5 0、5 0 ~ 1 0 0、1 0 0 ~ 2 0 0、2 0 0 ~ 3 0 0、3 0 0 ~ 4 0 0、4 0 0 ~ 5 0 0、5 0 0 ~ 6 0 0、6 0 0 ~ 7 0 0、7 0 0 ~ 8 0 0、8 0 0 ~ 9 0 0、または 9 0 0 ~ 1 0 0 0 m g 送達する。さまざまな実施形態では、ハイブリッド重合リボソームナノ粒子を投与して、治療用物質を対象の体表

面積 1 m^2 当たり約 $0.001 \sim 0.01$ 、 $0.01 \sim 0.1$ 、 $0.1 \sim 0.5$ 、 $0.5 \sim 5$ 、 $5 \sim 10$ 、 $10 \sim 20$ 、 $20 \sim 50$ 、 $50 \sim 100$ 、 $100 \sim 200$ 、 $200 \sim 300$ 、 $300 \sim 400$ 、 $400 \sim 500$ 、 $500 \sim 600$ 、 $600 \sim 700$ 、 $700 \sim 800$ 、 $800 \sim 900$ 、または $900 \sim 1000\text{ mg}$ 送達する。一実施形態では、治療物質はドキソルピシン、またはドキソルピシンの機能的同等物、類似体、誘導体若しくは塩である。ある実施形態では、治療物質をヒトに投与する。

【0087】

有効量の治療物質の典型的用量は、既知の治療用化合物を使用している製造者が推奨する範囲の用量であり得、また、細胞でのインビトロ反応または動物モデルでのインビボ反応により当業者に指示されている用量であり得る。そのような用量は典型的に、関連する生物学的活性を失わせることなく約1桁まで濃度または量を減らすことが可能である。実際の用量は、医師の判断、患者の病態、及び治療方法、例えば、関連する培養細胞試料若しくは組織培養組織試料のインビトロでの反応性、または適切な動物モデルで観察された反応に基づく有効性に応じて決定され得る。さまざまな実施形態では、本明細書に記載する用量のいずれか1つまたはそれ以上の有効量の治療物質が対象に投与されるよう、重合リポソームナノ粒子を1日1回（SID/QD）、1日2回（BID）、1日3回（TID）、1日4回（QID）、またはそれ以上の回数投与して良い。

【0088】

いくつかの実施形態では、ある病態の予防段階（すなわち、対象が、かかる病態を発症してはいないが、その病態を発症する可能性が高いかまたは発症する過程にある場合）においてハイブリッド重合リポソームナノ粒子を投与して良い。その他の実施形態では、ある病態の治療段階（すなわち、対象がすでにその病態を発症している場合）においてハイブリッド重合リポソームナノ粒子を投与して良い。非限定的な一例として、標的病態は癌である。

【0089】

本発明によれば、適切な投与方法、例えば、製造者が推奨する投与方法を用いてハイブリッド重合リポソームナノ粒子を投与して良い。本発明によれば、請求の範囲に記載の方法のハイブリッド重合リポソームナノ粒子をさまざまな経路を利用して投与して良く、これらには、エアロゾル、経鼻、経口、経粘膜、経皮吸収、非経口、埋込み型ポンプ、持続注射、局所適用、カプセル、及び/または注射を含むが、これらに限定されない。さまざまな実施形態では、ハイブリッド重合リポソームナノ粒子を血管内に、静脈内に、動脈内に、腫瘍内に、筋肉内に、皮下に、鼻腔内に、腹腔内に、または経口で投与する。

【0090】

薬学的組成物

本発明は、本明細書に記載するハイブリッド重合リポソームナノ粒子をさまざまな薬学的製剤の形態でも提供する。これらの薬学的組成物を、対象の病態を治療する、予防する、罹患する可能性を低下させる、病態の重症度を軽減させる、及び/またはその進行を緩和にさせるために使用して良い。本発明によれば、病態は癌であり得る。ある実施形態では、病態は白血病または肉腫である。

【0091】

一実施形態では、本発明は、本明細書に記載するハイブリッド重合リポソームナノ粒子を含む薬学的組成物を提供する。別の実施形態では、本発明は、本明細書に記載される2つ以上のハイブリッド重合リポソームナノ粒子を含む薬学的組成物を提供する。さらに別の実施形態では、本発明は、本明細書に記載するハイブリッド重合リポソームナノ粒子を複数含む薬学的組成物を提供する。本発明によれば、ハイブリッド重合リポソームナノ粒子は、その中にローディングされた治療物質、及び/またはそれに結合されたターゲティング物質を含む。好ましい薬学的組成物はまた、哺乳類に投与した場合に示す毒性が最小限でもある。

【0092】

さまざまな実施形態では、本発明による薬学的組成物は、いかなる薬学的に許容される

賦形剤も含有することができる。「薬学的に許容される賦形剤」とは、一般に安全、非毒性であり、かつ望ましい薬学的組成物の調製に有用な賦形剤を意味し、これには、獣医学的使用のため並びにヒトの薬学的使用のために許容される賦形剤が含まれる。このような賦形剤は、固形、液体、半固形、またはエアロゾル組成物の場合は気体であって良い。賦形剤の例には、デンプン、糖、微結晶セルロース、希釈剤、造粒剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤、湿潤剤、乳化剤、着色剤、放出剤、コーティング剤、甘味料、矯味剤、香料、防腐剤、抗酸化剤、可塑剤、ゲル化剤、増粘剤、硬化剤、凝固剤 (setting agent)、懸濁剤、界面活性剤、保湿剤、担体、安定化剤、及びそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【0093】

さまざまな実施形態では、本発明による薬学的組成物を、任意の投与経路を介した送達用に製剤化して良い。「投与経路」は、当技術分野で公知のいかなる投与経路を意味しても良く、これらには、エアロゾル、経鼻、経口、経粘膜、経皮吸収、非経口、経腸、局部または局所が挙げられるが、これらに限定されない。「非経口」とは、一般に、眼窩内、輸注、動脈内、嚢内、心臓内、皮内、筋肉内、腹腔内、肺内、脊髄内、胸骨内、くも膜下腔内、子宮内、静脈内、くも膜下、被膜下、皮下、経粘膜、または経気管などの、注射を伴う投与経路をいう。非経口経路では、組成物は、注射または注射用に溶液または懸濁液の形態、または凍結乾燥粉末の形態であって良い。非経口経路では、組成物は、注射または注射用に溶液または懸濁液の形態であって良い。経腸経路では、薬学的組成物は、制御放出を可能にする錠剤、ゲルカプセル、糖衣錠、シロップ、懸濁液、溶液、粉末、顆粒、エマルジョン、マイクロ粒子若しくはナノ粒子または脂質小胞若しくはポリマー小胞の形態であり得る。典型的には、組成物を注射により投与する。こうした投与のための方法は当業者に公知である。ある実施形態では、薬学的組成物を、血管内投与用、静脈内投与用、動脈内投与用、腫瘍内投与用、筋肉内投与用、皮下投与用、鼻腔内投与用、腹腔内投与用、または経口投与用に製剤化する。

【0094】

さまざまな実施形態では、薬学的組成物を1回、2回、3回、またはそれ以上の回数投与する。さまざまな実施形態では、薬学的組成物を1日に1~3回、1週間に1~7回、または1か月間に1~9回投与する。さまざまな実施形態では、薬学的組成物を約1~10日、10~20日、20~30日、30~40日、40~50日、50~60日、60~70日、70~80日、80~90日、90~100日、1~6か月、6~12か月、または1~5年の間投与する。さまざまな実施形態では、本明細書に記載する用量または当業者に公知の用量のいずれか1つまたはそれ以上である有効量の治療用物質が対象に投与されるように、薬学的組成物を1日1回 (SID/QD)、1日2回 (BID)、1日3回 (TID)、1日4回 (QID)、またはそれ以上の回数投与して良い。

【0095】

さまざまな実施形態では、本発明による薬学的組成物は、いかなる薬学的に許容される担体も含有することができる。本明細書で使用する「薬学的に許容される担体」とは、対象化合物を、体のある組織、器官、または部分から体の別の組織、器官、または部分へ運搬または輸送する際に使用される薬学的に許容される材料、組成物、またはビヒクルをいう。例えば、かかる担体は、液体または固体の賦形剤、希釈剤、賦形剤、溶媒、若しくは封じ込め物質、またはそれらの組み合わせであって良い。担体の各成分は「薬学的に許容され」なければならない、これにおいて各成分は製剤の他の成分と適合性がなければならない。また、担体の各成分は、接触し得るあらゆる組織または臓器と接触させての使用に好適でなければならない、すなわち、毒性リスク、刺激作用、アレルギー性反応、免疫原性、またはその治療利益を過度に上回る他の合併症をなんら有してはならない。

【0096】

本発明による薬学的組成物を、経口投与用にカプセル化すること、錠剤化すること、またはエマルジョン若しくはシロップに調製することも可能である。固体または液体の薬学的に許容される担体を、組成物を改善または安定させるため、または組成物の調製を容易

10

20

30

40

50

にするために加えて良い。液体担体には、シロップ、ピーナッツ油、オリーブ油、グリセリン、生理食塩水、アルコール及び水が挙げられる。固体担体には、デンプン、ラクトース、硫酸カルシウム、二水和物、白土 (terra alba)、ステアリン酸マグネシウムまたはステアリン酸、タルク、ペクチン、アラビアゴム、寒天またはゼラチンが挙げられる。担体には、モノステアリン酸グリセリルまたはジステアリン酸グリセリルのような徐放性材料の単材またはワックスと併用したものも含まれて良い。

【0097】

粉碎、混合、造粒、及び、錠剤形態では必要に応じて圧縮を含むか、または硬ゼラチンカプセルでは粉碎、混合、及び充填を含む従来の製薬技術に従い、薬学的調製物を作製する。液体担体を使用する場合、調製物はシロップ、エリキシル剤、エマルジョンまたは水溶性若しくは非水溶性懸濁液の形態となるであらう。そのような液体製剤を、直接経口投与して良いかまたは軟ゼラチンカプセル内に充填して良い。

10

【0098】

本発明による薬学的組成物を、治療的有效量で送達して良い。正確な治療的有效量は、所与の対象における治療有効性の点で最も有効な結果をもたらす組成物量である。この量は多種多様な因子により異なってくるが、これらには、限定することなく、治療用化合物の特徴（活性、薬物動態、薬動学、及び生物学的利用能など）、対象の生理学的状態（年齢、性、疾患の種類と段階、一般身体疾患、所与の用量に対する反応性、及び投薬の種類など）、製剤中の薬学的に許容される1つ以上の担体の性質、及び投与経路が含まれる。臨床及び薬理学の分野の当業者は、例えば、化合物投与に対する対象の反応を監視し、それにしたがって用量を調節することによる日常的な試みによって治療的有效量を決定できるであらう。さらなる指針については、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro ed., 第20版、Williams & Wilkins PA, USA) (2000)を参照にされたい。

20

【0099】

患者に投与する前に、配合成分 (formulant) を組成物に加えて良い。好ましくは液体製剤であって良い。例えば、これらの配合成分として、油、ポリマー、ビタミン、炭水化物、アミノ酸、塩、緩衝剤、アルブミン、界面活性剤、増量剤、またはそれらの組み合わせを挙げて良い。

30

【0100】

炭水化物配合成分には、単糖類、二糖類、若しくは多糖類のような糖若しくは糖アルコール、または水溶性のグルカンが挙げられる。糖類またはグルカンには、フルクトース、デキストロース、ラクトース、グルコース、マンノース、ソルボース、キシロース、マルトース、スクロース、デキストラン、プルラン、デキストリン、 α シクロデキストリンと β シクロデキストリン、可溶性デンプン、ヒドロキシエチルデンプン及びカルボキシメチルセルロース、またはその混合物が挙げられる。「糖アルコール (Sugar alcohol)」は、-OH基を有するC4～C8の炭化水素として定義され、これには、ガラクトチール、イノシトール、マンニトール、キシリトール、ソルビトール、グリセリン、及びアラビトールが挙げられる。上掲したこれらの糖または糖アルコールは、個々別々に使用しても、または組み合わせて使用しても良い。使用する量は、糖または糖アルコールが水溶性調製物に可溶である限り定められた限度はない。一実施形態では、糖または糖アルコールの濃度は1.0 w/v %～7.0 w/v %であり、より好ましくは2.0～6.0 w/v %である。

40

【0101】

アミノ酸配合成分には、左旋性 (L) 形態のカルニチン、アルギニン、及びベタインが挙げられるが、これ以外のアミノ酸を加えて良い。

【0102】

いくつかの実施形態では、配合成分としてのポリマーには、平均分子量が2,000～3,000のポリビニルピロリドン (PVP)、または平均分子量が3,000～5,0

50

00のポリエチレングリコール(PEG)が挙げられる。

【0103】

凍結乾燥前または再調製後の溶液のpH変化を最小限にするため、組成物中に緩衝剤を使用することも好ましい。クエン酸塩、リン酸塩、コハク酸塩、及びグルタミン酸塩を含むがこれらに限定されない大半の任意の生理的緩衝剤を使用して良い。いくつかの実施形態では、濃度は0.01~0.3モル濃度である。製剤に加えることができる界面活性剤は、EP270,799及び同268,110に示されている。

【0104】

循環半減期を延長させるための別の薬物送達システムはリポソームである。リポソーム送達システムを調製する方法は、Gabizonら,Cancer Research(1982)42:4734;Cafiso,Biochem Biophys Acta(1981)649:129;及びSzoka,Ann Rev Biophys Eng(1980)9:467で考察されている。他の薬物送達システムは、当技術分野で公知であり、例えば、Poznanskyら,DRUG DELIVERY SYSTEMS(R.L.Juliano,ed.,Oxford,N.Y.1980),pp.253-315;M.L.Poznansky,Pharm Revs(1984)36:277に記載されている。

【0105】

液体薬学的組成物を調製した後は、分解を予防し無菌性を保つために凍結乾燥して良い。液体組成物の凍結乾燥方法は当業者に公知である。組成物は、使用直前に、滅菌済み希釈剤(例えば、リンゲル溶液、蒸留水、または滅菌生理食塩水)を用いて再調製して良く、これに、さらなる成分を含めて良い。再調製したら、かかる組成物を当業者に公知の方法を用いて対象に投与する。

【0106】

本発明の組成物は、慣例的な、周知の滅菌技術で滅菌して良い。得られた溶液は、使用のために包装されても良いか、または無菌条件下でろ過して凍結乾燥させて良く、凍結乾燥した調製物は投与前に滅菌済み溶液と合わせる。組成物は、生理的条件に近づけるために必要に応じ、pH調節および緩衝剤、等張化剤等、例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、及び安定化剤(例えば、1~20%マルトースなど)のような薬学的に許容される助剤を含有して良い。

【0107】

本発明のキット

さまざまな実施形態において、本発明は、対象の病態を治療する、予防する、その重症度を軽減させる、及び/またはその進行を緩徐にさせるためのキットを提供する。かかるキットは、ある量の本明細書に記載するハイブリッド重合リポソームナノ粒子、並びにかかるハイブリッド重合リポソームナノ粒子を使用して対象における病態を治療する、予防する、その重症度を軽減させる、及び/またはその進行を緩徐にさせるための指示書を含む。本発明によれば、ハイブリッド重合リポソームナノ粒子は、その中にローディングされた治療用物質、及び/または、それに結合されたターゲティング物質を含む。

【0108】

キットは、本発明の組成物を少なくとも1つ含む、材料または成分の集合である。本発明キット内の構成成分の正確な特性は、その意図される目的により異なる。一実施形態では、キットは、特に哺乳類の対象の治療を目的として構成される。別の実施形態では、キットは、特にヒト対象の治療を目的として構成される。さらなる実施形態では、キットは、限定されることなく、家畜、飼育動物、及び実験動物のような対象を治療する獣医学的適用のために構成される。

【0109】

使用説明書をキットに含めて良い。「使用説明書」には典型的に、所望の転帰を得るために、キットの構成成分の使用に際して使用すべき手法を記載した明確な表現が含まれる。必要に応じ、キットには、他の有用な構成成分、例えば、希釈剤、緩衝剤、薬学的に許

10

20

30

40

50

容される担体、シリンジ、カテーテル、アプリケーション、ピペット採取または計測用ツール、包帯材料または当業者により容易に認識されるであろう他の有用な備品一式も含有される。

【0110】

キット内で組み合わせられた材料または構成成分は、それらの操作性及び有用性が保たれる、任意の好都合かつ好適な方法で保存して医師に提供され得る。例えば、かかる構成成分は、溶解形態、脱水形態、または凍結乾燥形態が可能であり、それらを室温、冷蔵温度または凍結温度で提供可能である。構成成分を、典型的には好適な包装材料に収容する。本明細書で使用する場合、語句「包装材料 (packaging material)」とは、発明組成物等のような、キットの内容物を収容するために使用する1つ以上の物理的構造物をいう。かかる包装材料は、好ましくは無菌で汚染物質が存在しない環境を提供するための周知の方法により作製される。本明細書で使用する場合、用語「包装容器 (package)」とは、個々のキット構成成分を保持できる、ガラス、プラスチック、紙、フォイル等のような好適な固体のマトリックスまたは材料をいう。したがって、例えば、包装容器は、好適量の本明細書に記載する組成物を収容するために使用されるガラス製容器であり得る。包装材料には一般に、キットの内容物及び/または目的及び/またはその構成成分を示す外部ラベルが付いている。

10

【実施例】

【0111】

以下の実施例は、説明のみのために提供されるが、本発明の範囲を何ら限定するものではない。

20

【0112】

実施例1：薬物標的送達のためのハイブリッド重合リポソームナノ粒子 (HPLN)

本明細書で提案されているHPLN送達システムを図1に例示する。これらのナノ粒子は、ほぼどのようなサイズ及び組成にでも、広範囲で合成可能である。これらの粒子は、従来のリポソームを模倣しているかまたは正常細胞膜さえも模倣しているが、大きく異なる点を有し、すなわち、壁は所望の任意の架橋度まで架橋されることができ、内容物の経時的損失を防ぎ、かつ、ナノ粒子内での所与の細胞傷害性物質の結晶化をもたらす濃度までイオン勾配を介して該細胞傷害性物質を能動的にローディングすることを可能にすることができる (Federmanら "Enhanced Growth Inhibition of Osteosarcoma by Cytotoxic Polymerized Liposomal Nanoparticles Targeting the Alcam Cell Surface Receptor", Sarcoma, 2012, 126906)。最も重要なことには、粒子表面は、自在に修飾されてほぼすべての種類のターゲティング物質で共有結合により標識されることができる。本発明者らのアプローチでは、白血病または肉腫細胞に選択的に送達される従来剤を極めて高濃度で使用するによる殺腫瘍の改善に焦点を当てているが、今後、実施を重ねることにより多くの異なる腫瘍細胞種を標的にできるようになるであろう。

30

【0113】

多量の(非重合性)リン脂質(水素添加大豆PC)を重合性脂質に含めることにより、新規のハイブリッド-PLN、「HPLN」を作製した。以下はHPLN調製物の非限定的な例である。HPLNを、先に記載の方法(Bruehlら, "Polymerized liposome assemblies: bifunctional macromolecular selectin inhibitors mimicking physiological selectin ligands," Biochemistry, vol. 40, no. 20, pp. 5964-5974, 2001)にしたがって、モル比14:51:32:2:1のh-PEG1PCDA、水素添加大豆PC、コレステロール、並びにm-PEG2000-DSPC及びm-PEG2000-PCDAから調製した。手短かに言えば、脂質を混合し、フィルムに減圧蒸着させた。15mM(総脂質及びコレステロール)の懸濁液になるようフィルムに硫酸アンモニウム155m

40

50

Mを加えた。懸濁液を、バス型超音波発生装置内で65～80℃まで30分加熱した。得られた乳状溶液を、ホモジナイザー/押し出し機(C5、Avestin, Inc.、カナダ、オンタリオ州オタワ)を使用して積層ポリカーボネートメンブレン(80nm)に10回に通して押し出した、約75℃まで加熱した。ほぼ澄明なリポソーム溶液を5℃まで12時間冷却した。室温まで加温した後、Spectrolinker XL-1000 UV Crosslinker (Spectronics Corp.)を用いて1分間UV光照射(254nm)してリポソームを重合させた。得られる青色HPLNを5分間65℃まで加熱し、それらを赤色(蛍光)形態へ変換させた。微量の不溶性汚染物質を除去するため、呈色した溶液を0.2μm酢酸セルロースフィルターに通してシリンジろ過した。

10

【0114】

ドキソルピシンローディングHPLNを作製するため、硫酸アンモニウム含有HPLNをG50 Sepharoseカラム(1×PBSで洗浄)に通して外部緩衝液を交換した。次いで、リポソームをドキソルピシン-HCl(Shandong Tianyu Fine Chemical Co., Ltd.)とともに、HPLN2mgに対しドキソルピシン1mgの濃度で、40分間60℃まで加熱しながらインキュベートした。(図1B、能動的ローディング)。溶液をG50 Sepharoseカラム(1×PBSで洗浄)に通すことによって、封入されなかったドキソルピシンを除去した。Zetasizer Nano-S(Malvern Inst.)で10mMの塩化ナトリウム溶液中の平均粒径測定値を得た(図1C)。

20

【0115】

抗体標識したミセルを得るため、抗体を部分的に還元させて遊離チオール基に曝露し、その後、m-PEG2000-DSPPE及びマレイミド-PEG2000-DSPPE(モル比4:1)で構成されるミセルとともにインキュベートし、溶液をSepharose CL-4Bカラム(1×PBSで洗浄)に通すことによって精製した。抗体でターゲティングされたHPLNを作製するため、dox(またはdoxなし)HPLN溶液を、抗体標識したミセルとともに24時間インキュベートした。溶液をSepharose CL-4Bカラム(1×PBSで洗浄)に通すことによって過剰のミセルを除去して、抗体でターゲティングされたHPLNを得た。

【0116】

あるいは、先に記載の方法(Bruehlら, "Polymerized liposome assemblies: bifunctional macromolecular selectin inhibitors mimicking physiological selectin ligands, J Biochemistry, vol. 40, no. 20, pp. 5964-5974, 2001)にしたがい、mal-HPLNを、モル比14:48:32:2:3:1のh-PEG1PCDA、水素添加大豆PC、コレステロール、並びにm-PEG2000-DSPPE、mal-PEG2000-DSPPE及びm-PEG2000-PCDAから調製した。手短に言えば、脂質を混合し、フィルムに減圧蒸着させた。15mM(総脂質及びコレステロール)の懸濁液になるようフィルムに硫酸アンモニウム155mMを加えた。懸濁液を、バス型超音波発生装置内で65～80℃まで30分加熱した。得られた乳状溶液を、ホモジナイザー/押し出し機(C5、Avestin, Inc.、カナダ、オンタリオ州オタワ)を使用して積層ポリカーボネートメンブレン(80nm)に10回通して押し出し、約65℃まで加熱した。ほぼ澄明なリポソーム溶液を5℃まで12時間冷却した。室温まで加温した後、Spectrolinker XL-1000 UV Crosslinker (Spectronics Corp.)を用いて1分間UV光照射(254nm)してリポソームを重合させた。得られる青色HPLNを5分間65℃まで加熱し、それらを赤色(蛍光)形態へ変換させた。微量の不溶性汚染物質を除去するため、呈色した溶液を0.2μm酢酸セルロースフィルターに通してシリンジろ過した。

40

【0117】

50

ドキソルピシンローディングmal-HPLNを作製するため、硫酸アンモニウム含有HPLNをG50 Sepharoseカラム(1×PBSで洗浄)に通して外部緩衝液を交換した。次いで、リポソームを、40分間60℃まで加熱しながら、ドキソルピシン-HCl(Shandong Tianyu Fine Chemical Co., Ltd.)とともに、HPLN2mgに対しドキソルピシン1mgの濃度でインキュベートした。溶液をG50 Sepharoseカラム(1×PBSで洗浄)に通すことによって、封入されなかったドキソルピシンを除去した。Zetasizer Nano-S(Malvern Inst.)で10mMの塩化ナトリウム溶液中の平均粒径測定値を得た。

【0118】

10

抗体でターゲティングされたHPLNを作製するため、dox(またはdoxなし)mal-HPLN溶液を、抗体(部分的に還元させて遊離チオール基に曝露)とともに24時間インキュベートし、その溶液をSepharose CL-4Bカラム(1×PBSで洗浄)に通すことによって精製した。

【0119】

実施例2

本発明者らは、標的とする癌を治療できるようにしたHPLNナノ粒子を白血病について詳細に試験した。本発明者らは、再発性及び難治性の癌患者を治療するための新規のナノスケール技術を提供する。ターゲティングされた送達ビヒクルにより、ヒト治療抵抗性白血病の異種移植片を有するマウスを首尾よく治療することができる。従来の細胞毒性物質(ピンクリスチンまたはドキソルピシン)などのペイロードで一種類の腫瘍特異的なターゲティングリガンド(CD-19抗体またはCD-117抗体、Fab断片またはダイアボディ)を用いて抗体標識ナノ粒子を合成し、成人白血病に確立されているインビボ方法を用いて腫瘍細胞ターゲティングをマウスモデルで検証し、連続血清化学に続き剖検を行って全身毒性を評価し、さらに、ALL及び/またはAMLマウスについて低用量でのDMET式試験を行った。最適化したHPLNの全身送達及び腫瘍による取り込みを記録して臨床的変換能力について調べ、HPLNが腫瘍に局在することを確認した。

20

【0120】

表1は、CD-19に対するヒト抗体をHPLN上に提示することにより、ナノ粒子のCD-19発現細胞に対する強い認識結合が促進されること; CD-19陰性細胞への非特異的細胞結合が非常に少ないこと(無抗体の対照HPLNと同様); また、これにより、ヒト患者由来の分離したばかりのALL白血病細胞(CHLA3及びUS7R)は、新たに作製した抗hCD-19/HPLNにより積極的に強く認識されやすいことが確認されることを示している。

30

【0121】

(表1) 各種細胞に対するヒト抗CD19抗体結合HPLNの特異的結合

細胞	CD-19	特徴または供給源	hCD-19/HPLN	HPLN
RAJI	(+)	バーキットリンパ腫	99.54	0.88
REH	(+)	ALL(Bリンパ球)、 前駆B白血病	99.7	0.37
697	(+)	ALL (TEL-Jak2)	99.88	0.87
BEL-1	(+)	ALL (MLL-AF4)	99.68	0.09
CHLA3	(+)	ALL(患者)、前駆B白血病	84.92	0.39
US7R	(+)	ALL(患者)、前駆B白血病	99.18	0.51
TC32	(-)	ユーイング肉腫	0.51	0.35
Molt-T	(-)	ALL(Tリンパ球)	0.46	0.45
K562	(-)	CML (BCRL-ABL)	0.15	0.14

10

20

【 0 1 2 2 】

I . ターゲティングされ薬物をローディングされたハイブリッド重合リボソームナノ粒子の構築

製剤最適化：本発明者らは、このアプローチを成功させるためには、極少数のナノ粒子が、それら自体を結合させるのに必要であり、細胞へ内部移行させて細胞を死滅させるように、高用量の細胞毒性薬物を腫瘍細胞に送達することが重要であるということを認識した。そのため、薬物濃度を可能最高レベルにしてPLNに封入することを試みた。能動的ローディングにより、受動的ローディングに比べてより多量の薬物をリボソーム内に組み込むことができた(Haran、1993)。能動的ローディングは、低pHシンク(sink) (「pH勾配」)をリボソーム内側に確立させる方法を使用し、ドキソルビシンのようなアミン担持薬物は、酸性内部を中和するように膜を通り抜ける。薬物は、内部で大部分が晶出するほど、リボソーム内に自由に流入する。公開されているpH勾配による能動的ドキソルビシンローディング法(Haran、1993)をPLNで用いるために、脂質製剤をナノ粒子に調整する必要があった。従来のステルスリボソーム(例えば、「ドキシル(商標)」)と比較して、本発明者らが独自に作製した完全重合PLN製剤では、インキュベーション時間を延長して使用温度を上げた後でさえも、ほんの一部のドキソルビシンしかローディングされないことが示された。多量の(非架橋性または非重合性)リン脂質(水素添加大豆PC)を含めることによって製剤化し直し、ハイブリッド-PLNである「HPLN」を作製した。さらに、重合性脂質部分を修飾して新規HPLNを作製する。すなわち、PEG鎖(例えば、m-PEG2000-PCDA)を有する重合性脂質を、PEG鎖を有していない重合性脂質(例えば、h-PEG1-PCDA)と混合する。

30

40

【 0 1 2 3 】

ここで、ドキシルで報告されているレベル(0.16 $\mu\text{mol Dox} / \mu\text{mol}$ リボソーム構成成分)と同様のレベルのドキソルビシン(0.15 $\mu\text{mol Dox} / \mu\text{mol}$ リボソーム構成成分)をHPLNに組み込むことができた。中心となるインキュベーションは、脂質系ナノ粒子の製剤化し直しにあり、少量の光重合性ジアセチレン脂質を含有するが、なおもUV照射で確実に重合される脂質系ナノ粒子にしたことであった。本発明者ら

50

は、H P L N内への薬物のローディングが、完全重合P L Nリポソーム (F e d e r m a n、2012) より約10倍高いことを見出した。マウス試験を全て実施するため、500mgのH P L N / D o x及び約20mgのC D - 19 (ターゲティング) モノクローナル抗体を調製した。

【0124】

抗体でターゲティングされ、薬物をローディングされたナノ粒子の調製：ナノ粒子の標的をA L L型ヒト白血病細胞 (R E H細胞) 上のC D - 19細胞表面マーカーにするモノクローナル抗体を結合させることにより、最終H P L N / D o x粒子を調製した。化学的に還元させた抗C D - 19抗体を、マレイミド末端P e g 2000リン脂質及びメトキシ末端P e g 2000リン脂質で構成されるミセルに結合させた (I d e n 2001) 。
抗体標識ミセルを予め形成しておいたH P L N / D o xナノ粒子に曝露させると同時に、H P L N膜内へのミセル脂質挿入プロセスが発生し、抗C D - 19 / H P L N / D o x粒子が得られる。結合しなかった抗体及び他の小分子量不純物を除去するため、ターゲティングされた粒子をサイズ排除ろ過により精製した。

【0125】

I I . マウスモデルにおける成人白血病について確立されたインビボ方法を用いた腫瘍細胞ターゲティングの検証

マウス処置：マウスを用いた有効性及び安全性の試験を完全に実施するため、ルシフェラーゼをトランスフェクションしたヒト急性リンパ芽球性白血病 (R E H細胞) 6×10^6 個をN O Gマウスに注射した。このトランスジェニック型特殊マウスは、インターロイキン2受容体 γ (I L 2 R γ) をコードする遺伝子が欠失しており、また、ヒトのi L 3、G M - C S F及びS C Fを発現させる遺伝子が付加されている。注射したヒト白血病細胞が拒絶されないよう、N O Gマウスは、B細胞、T細胞、及びN K細胞の完全な欠失と、サイトカインシグナル伝達の欠損を有する。マウスを6群に分けた。群1には緩衝液処置のみを行い、群2にはターゲティングされていない非ローディングH P L Nを処置し、群3にはターゲティングされていないH P L N / D o x (2mg D o x / kg) を処置し、群4には (ターゲティングされた) 抗C D - 19 / H P L N / D o x (2mg D o x / kg) を処置し、群5にはドキシル (2mg D o x / kg) を処置し、群6には (遊離) ドキソルビシン (2mg D o x / kg) を処置した。

【0126】

白血病細胞の注射後に、1週間に1回X e n o g e n製カメラで撮像し、腫瘍細胞分布と腫瘍量の定量化の両評価に使用した。白血病細胞の注射から10日後、本発明者らのターゲティングされたナノ粒子薬物 (抗C D - 19 / H P L N / D o x) または対照粒子若しくは薬物を1週間に1回の用量でマウスに投与した。投与した薬物量は、各製剤中の総ナノ粒子質量ではなく、活性物質 (ドキソルビシン) 量に基づいた (ただし、群2を除き、これらのマウスには非ローディング形態のH P L Nの同等用量を与えた) 。

【0127】

有効性の結果：急性毒性反応はまったく観察されなかったため、H P L N、及び薬物ローディングH P L Nは、マウスにおいて耐容性が非常に良好であった。遊離ドキソルビシンの処置を受けた群6の動物は、上記に該当しなかった。これらの動物では、体重減少が観察され、薬物処置の結果として病気のような様子であった。処置を受けた群2、3及び群5のマウスでは、腫瘍成長の着実な進行が見られ、群1の未処置マウスと同様であった (図4) 。抗C D - 19 / H P L N / D o x (群4) または遊離薬物 (群6) で処置されたマウスでのみ、腫瘍の有意な縮小が認められた。35日目、対照群と比較して、抗C D - 19 / H P L N / D o x (群4) 処置動物ではほぼ210gの差が、ドキシル (群6) 処置動物では約4分の310gの差があった (図4) 。

【0128】

本発明者らは、ターゲティングされた抗C D - 19 / H P L N / D o xのより高用量の週用量によって対照と比較して腫瘍量が大きく減少されるかどうかを測定したいと考えた。次に行った試験では、抗C D - 19 / H P L N / D o x処置動物と未処置対照動物のみ

を比較した。ここでもやはり、R E H細胞 6×10^6 個をマウスに投与し、ターゲティングされたナノ粒子中 2 mg / kg D o x の用量を1週間に1回または1週間に2回投与した（1週間に2回の用量は、先の試験の週用量の2倍である）。

【0129】

28日目のX e n o g e n 画像には、1週間に2回の投与において、腫瘍の大きさと腫瘍量が、未処置対照または1週間に1回投与よりも顕著に減少していることが明確に示されている（図5及び9）。X e n o g e n の腫瘍画像の線量測定から、1週間に1回投与に対する1週間に2回投与の腫瘍量を計算したところ、腫瘍量が 2.51 log 減少していた。

【0130】

III. 全身毒性の評価

マウスの生存率：開始当初の（1週間に1回の投与）試験のマウスを50日目までの生存について調べた。群4及び群6のマウスは腫瘍量減少を示したものの、遊離薬物ドキソルビシンによる処置（群6）では重篤な副作用が誘導され、これらの動物に体重減少及び不健康な外見をもたらした（体重減少、緩慢な運動、脱毛）。このオフターゲット毒性は、群4（抗CD-19 / H P L N / D o x 中D o x 2 mg / kg ）では観察されず、これらの動物の100%が、健康な外見を呈し、50日目の屠殺まで生存した（図6）。

【0131】

血清化学毒性結果：抗CD-19 - H P L N - D o x を $2.0 \text{ mg D o x / kg}$ を1週間に2回処置し、4週間後に臨床化学検査を分析したところ、肝臓及び腎臓の機能に軽度の変化が示されたが有意な変化ではなかった（図7）。処置動物のクレアチニン、A S T 及びA L T の各値は未処置対照動物の誤差許容範囲内であった。処置動物で尿素窒素のわずかな上昇がみとめられたが、この変化は有意な変化とはみなされない。

【0132】

細胞培養において、単純な（ターゲティングされていない）H P L N / D o x 製剤の有効性が従来の（ターゲティングされていない）リボソームドキソルビシン製剤（ドキシル（商標））に対して予期せず優っていたことは、腫瘍細胞に対する封入薬物の生物学的利用能がH P L N 形態において高くなると考えられることから、このH P L N 薬物送達アプローチを説得力のあるものにしている（図3）。腫瘍細胞を標的とする物質を含めることにより、インビトロでの殺腫瘍効果がさらに10～12倍増大する。ヒト白血病細胞を担持するトランスジェニックマウスにおいて、唯一生存し健康に見えたマウス（50日目の屠殺まで）は、抗CD-19 / H P L N / D o x ナノ粒子中のドキソルビシン 2 mg / kg 用量の処置を受けたマウスであった。この生存応答には、1週間に1回の投与の場合で腫瘍量測定値のほぼ 2.1 log の減少が認められた。抗CD-19 / H P L N / D o x の週用量を単純に2倍にすることで、腫瘍量は約 2.51 log 減少し、オフターゲット毒性の顕著な増加は全くなかった。最高用量のH P L N / D o x で処置した動物の肝臓酵素機能及び腎臓機能を分析したところ、未処置対照動物と比較して、これらの値に有意な変化は認められなかった。さらなる試験では、ポリジアセチレン含有ナノ粒子は、正常組織に対して細胞毒性をほとんどまたは全く示さず、免疫原性が最小限であることが示された。これらすべてのデータを合わせると、H P L N は、ヒト成人白血病、及び他の悪性腫瘍を治療するための非常に重要な薬物送達ビヒクルとして機能し得ることが強く示唆される。

【0133】

実施例3：新規の合成ペプチド親和性物質を用いて、癌細胞を標的とするH P L N を実証する

本発明者らは、H P L N をヒトA L L 腫瘍細胞に選択的に結合させるモノクローナル抗体（抗CD-19）を使用した。ターゲティング抗体はマウス由来であるため、ヒト患者への投与の場合に、反復投与で免疫により異種タンパク質が認識されると問題が生じ得る。したがって、高親和性で高度に安定性であるペプチド親和性物質を作製し使用する。非ヒト由来であるマウスのモノクローナル抗体を使用しなくてすむペプチドベースの親和性物質は、予後不良の癌再発患者において初期に使用するこの新規の標的療法を著しく改善

10

20

30

40

50

する。

【0134】

典型的には、固有の腫瘍細胞表面受容体を発現する細胞に対して、ランダムペプチド配列のファージディスプレイライブラリーをスクリーニングすることにより、遺伝子改変ペプチド物質が見出される。ファージライブラリーは、腫瘍受容体発現を欠失している点のみが異なる、同様の細胞株（陰性細胞株）に対し事前にスクリーニングを行う。この方法により、特異的または非特異的に陰性細胞株に付着するファージをライブラリーから除去する。今度は、新規サブライブラリーは陽性細胞株に対して判断が下され、結合するファージはいずれも、受容体に特異的に認識された結果付着していると考えられる。この方法により、標的は、最良モノクローナル抗体の多くが示す値と同様の低い nM 範囲に近い K_i を有する、非常に高い親和性で結合されることになる。遺伝子改変ペプチドを同定するためのこの設計方法は一般的であり、特定の構造（例えば、 α ヘリックス、 β シート、ターン）または構造に関する先験的知識さえも作業を行うためには必要としない。これらすべての特徴により、白血病細胞をHPLNの標的とさせるために現在使用されている抗体に取って代わることができる、安定なペプチド作製へ向けた本発明者らの取組みが可能になる。

10

【0135】

選別を用いて1つ以上の結合ペプチド配列が分離されたら、検証用及びナノ粒子への組み込み用に2～3個の最高のペプチドを合成する。ナノ粒子を、細胞毒性薬物ペイロード（ドキソルビシン）を用いて合成し、精製してHPLN/Dox粒子を得る。脂質挿入方法により、HPLN/Dox粒子をペプチド標識脂質ミセルに曝露させて遺伝子改変親和性ペプチドを組み込む。最初に、培養ヒトALL細胞（CD-19及びCD-117陽性）及びヒトAML細胞（CD-34陽性）を使用して腫瘍細胞ターゲティングを評価し、その後、ヒト白血病ALL及びAML細胞を注射した異種移植片マウスモデルでインビボでの殺腫瘍を検証する。

20

【0136】

pep-HPLNの作製：小さな粒径分布を得るため押し出し成形を介してリポソームナノ粒子を合成し、その後、能動的（pH勾配）ドキソルビシンローディングを行い、HPLN/dox粒子を作製するための殻の最終重合を行う。チオール含有ペプチド類似体をマレイミド末端Peg脂質とともにインキュベートすることにより、ペプチド末端（peptide-terminated）Peg脂質を調製する（本明細書内で還元モノクローナル抗体について実証した通り）。これらのペプチド末端Peg脂質を他のメトキシ末端Peg脂質と共に混合し、混合ミセルを作製する（Iden 2001）。モノクローナル抗体ミセルの場合と同様に、ペプチド末端Peg脂質ミセルをHPLN/dox粒子とともにインキュベートし、ペプチド脂質をHPLN/dox粒子内に挿入し、pep-HPLN/Doxを作製する。

30

【0137】

腫瘍ターゲティング及び殺腫瘍についてのpep-HPLN/doxのアッセイ：従来の診断用フローサイトメトリー（FACS解析）を使用して、ペプチド標識HPLN（pep-HPLN）と、抗体標識HPLNとを、ALL細胞及びAML細胞に対する親和性結合について比較する。細胞を、ターゲティングされたHPLNに曝露した後、洗浄工程を行い、未結合粒子をすべて除去する。HPLNポリマーの固有の蛍光を利用するFACSでは、pep-HPLNと抗CD（-19、-117、-99または-34）-HPLNとを比較して、細胞結合の相対的な有効性について良好な指標が得られる。HPLN/ペプチド-ミセル比をさまざまに変えて、ターゲティングペプチドの粒子単位でのレベルを最適化した後、インビトロ結合アッセイ法及びインビトロ殺腫瘍試験の両方を実施し、ペプチド誘導性の局在及び取り込みを検証した。

40

【0138】

CD-19、CD-117、CD-99、またはCD-34の陽性腫瘍細胞を標的とするようにpep-HPLNを最適化した後、マウスにおけるインビボ殺腫瘍活性アッセイ

50

法を実施する。前述同様、NOGマウスにルシフェラーゼをトランスフェクションした 6×10^6 個の白血病細胞を注射する。pep-HPLN/Doxによる全身分布及び殺細胞を、ルシフェラーゼをトランスフェクションした白血病細胞の外部Xenogen製カメラ画像により継続的に評価する。確立された腫瘍を形成させた後、後続追加試験を引き続き行う。この方法では、pep-HPLNによる腫瘍量減少を、その治療上の有効性について分析する。この研究により、抗CD-19、-99、-117、または-34モノクローナル抗体によってターゲティングされたHPLNと少なくとも同様に白血病細胞に結合できる合成ペプチドHPLN複合体の首尾良い同定がもたらされ、かつ新規製剤が提供され、該新規製剤は、抗体でターゲティングされたHPLN/Doxに匹敵する殺腫瘍活性を有してインビボで機能する、薬物をローディングされ、遺伝子改変ペプチドでターゲティングされたHPLN (pep-HPLN/Dox) から構成される。

10

【0139】

合成小ペプチドによるHPLNの腫瘍ターゲティングにより、潜在的に免疫原性であるマウス由来抗体のヒトでの使用を回避する、力強い解決法が提供され得る。さらに、マウス由来のモノクローナル抗体を「ヒト化」するための、より伝統的な方法に目を向けることができる。CDR移植、「表面再建 (resurfacing)」、「超ヒト化 (superhumanization)」またはヒストリング含有量最適化のような合理的設計法、及び濃縮またはハイスループット選別を用いた経験的方法が考えられるであろう (Almagro 2008)。これにより、マウス抗体の親和性と特異性を保持しつつ、ヒトに適用した場合に免疫原性が最小限である分子ができる可能性がある。別のアプローチは、ヒト抗体のファージディスプレイライブラリーを使用する方法である。この商業的に利用可能な技術は、何十億もの各種抗体のライブラリーからの、完全ヒト細胞表面標的特異的リードの迅速単離に基づくものである (www.dyax.com)。CD-19、CD-99、CD-117、及びCD-34タンパク質に対するヒト-ファージ抗体構築物の商用ライブラリーの連続パニングを外部委託することで、高親和性の高特異性ヒト抗体がHPLNへの結合から同定されるであろう。

20

【0140】

実施例4：多種のターゲティング物質を単一粒子上に有する、HPLNの優れたターゲティングの実証

ALL細胞上で同定された高レベルのCDに一致する、2種以上のターゲティング物質を使用すると、正常細胞に対してではなく白血病細胞に対してHPLNの選択的親和性が高まる。まず、抗CD-19及び抗CD-117をHPLN/dox粒子上に同時提示 (co-display) させ、結合及び細胞毒性について検査する。また、CD-19及びCD-117に対する小ペプチドターゲティング物質を同時提示するHPLN/Dox製剤を結合性及び細胞毒性について検査する。これらの特徴により、このHPLN薬物送達技術における、全身毒性に対する治療有効域が広がる。

30

【0141】

HPLN/Doxナノ粒子を、異なる2種の抗体またはペプチドを収容するミセルで処理する。ターゲティング物質を組み合わせたHPLNの親和性を、成人白血病培養細胞を用いて腫瘍結合性を評価することにより経験的に決定し、最適化する。優れた結合親和性 (単一物質HPLNそれぞれとの比較) を有する組み合わせHPLNを同定し、最良の細胞殺傷をインビトロで確認した後、インビボでの造腫瘍性の優良性について免疫不全マウスモデルで検証する。

40

【0142】

マルチターゲティング物質HPLN/doxの調製並びに腫瘍ターゲティング及び殺腫瘍についてのマルチターゲティング物質HPLN/doxのアッセイ：新規ターゲティングHPLNを調製し、細胞結合性及び抗腫瘍特性について試験する。抗CD-19抗体及び抗CD-117抗体を用いて、これらの脂質結合モノクローナル抗体の各々からミセルを調製する。また、CD-19及びCD-117に対する小ペプチドターゲティング物質もミセル形成脂質に化学的に結合させる。やはり、脂質挿入によって、抗体 (Ab) また

50

はペプチドで標識したH P L Nを作製する。A b 1 (またはペプチド1)型ミセルとA b 2 (またはペプチド2)型ミセルの比は、同一H P L N / d o x 粒子上でのA b 1 及び2 (またはペプチド1 及び2)の相対的レベルが異なるようにするために異なり得る。親和性腫瘍結合をF A C S 解析で分析し、かつ、マルチターゲティング物質H P L Nを、単一物質で標識したH P L Nと比較する。粒子単位でのレベルと、ターゲティング物質の比とを最適化した後、インビトロでの殺腫瘍を検査して、ターゲティング物質を組み合わせることが細胞内部移行及び細胞毒性薬物の生物学的利用能に有害とはならないことを確認する。最後に、マウスにおいて、殺腫瘍活性アッセイ法のためにインビボで最適化したA b - H P L Nまたはp e p - H P L Nの組み合わせを試験する。ここでもやはり、マルチ物質H P L Nによる全身分布及び殺細胞について、ルシフェラーゼをトランスフェクションしたA L L 細胞を注射した異種移植マウスの外部X e n o g e n 製カメラ画像により継続的に評価する。腫瘍量減少を定量化し、対照動物と比較する。

10

【0143】

この研究により、単一物質でターゲティングされたH P L Nに比して少なくとも2 倍優れた結合性を白血病細胞に対して示す、マルチターゲティング物質H P L Nの首尾良い同定がもたらされ、かつ、単一物質でターゲティングされたH P L Nより優れた殺腫瘍活性を有してインビボで機能する、組み合わせ抗体または組み合わせペプチドでターゲティングされた新規H P L Nが提供される。

【0144】

単一ターゲティング物質によるH P L Nのターゲティングは、薬物を腫瘍細胞に選択的に送達する強力な方法であり、二重物質によるターゲティングは、親和性及び/または選択性が有意に促進され得る。すべてのH P L Nで二重物質が同様に分布されることを保証するのは、H P L Nと2 種の異なるミセル母集団とを単に混合するだけでは困難かもしれない。脂質挿入の動力学によって、特定の粒子に一方のターゲティング物質が濃縮されるかもしれない、異種母集団のマルチターゲティングH P L Nとなり得る。このことは、一方のターゲティング物質を初めに活性マレイミド基を介してH P L N上で粒子表面に結合させてから、次に、第2のターゲティング物質の脂質挿入を行うことで十分に回避できるであろう。二重物質は、結合に関して互いに拮抗する、または標的細胞内への粒子の内部移行を遅延させ、このために、薬物の有効性が低下するかもしれない。このことは、単一表面タンパク質で支配される内部移行を促進させつつ、2 種の異なる表面タンパク質を認識するというさらなる利点を最初の結合イベントから得るために、二重ターゲティング物質の相対的分布を調節することで改善できるであろう。

20

30

【0145】

実施例5：同一のH P L Nにおけるまたは異なる単剤H L P Nのカクテルにおける複数の治療用物質の送達について調べる

本発明者らは、細胞毒性薬物(ドキシソルビシン、ビンクリスチン、イリノテカン、シスプラチン、シタラピンなど)の混合物を同一H P L Nに収容させて用いた併用療法について調べる。あるいは、上記と同種の薬物を、それぞれの単剤H P L Nとして調製するが、異なる種類のH P L N薬物の混合物として投与する。成人白血病(A L L)の現在の治療は、ビンクリスチン、L - アスパラギナーゼ、及びデキサメタゾンまたはプレドニゾンを、ドキシソルビシンと共に、予後が良好な任意のサブセットで用いるカクテルに依存する。薬物のこの組み合わせは、ターゲティングされたH P L N製剤で優先度が高い。

40

【0146】

選択した低分子細胞毒性物質を含有するターゲティングされたH P L Nは、能動的薬物ローディング、及び能動的ローディングを適用できない場合は受動的封入を行うための本明細書に記載の方法を使用して調製されるであろう。インビトロ試験の後、H P L N薬物すべての組み合わせを用いてインビボアッセイ法を行う。

【0147】

ターゲティングされた多剤H P L Nの調製及びアッセイ：新規ターゲティングH P L Nを調製し、細胞結合性及び抗腫瘍特性について試験する。被験薬物(ドキシソルビシン、ピ

50

ンクリスチン、トポテカン、シスプラチン、デキサメタゾン、シタラピンなど)を、LC Laboratories、Sigma-Aldrich、Tocris及びDesano Pharmaceuticalsなどの商用供給業者から入手する。

【0148】

抗癌薬のトポテカン及びピンクリスチンの両方について、pH勾配を介したリポソーム内への能動的ローディング手順が公開されている(Zucker 2010)。この手順により、本発明者らがドキソルビシンで得た濃度と同様の高濃度をHPLN内部に確立することができる。他の被験薬物については、公開されている文献には能動的リポソームローディングの記載はない。これらの薬物について、リポソーム形成緩衝液中の初期濃度を可能な限り高濃度にし、最初の粒子アセンブリ時に薬物を受動的に封入させる。薬物ローディングレベルを、HPLNの破裂及びHPLC分析での定量により決定する。新規薬物それぞれをALL細胞に対して試験する。まず、CD-19を標的としたHPLN中の単一物質として、インビトロ腫瘍細胞培養アッセイ法で試験し、次いで、有望であることを示す新規抗CD-19-HPLN/薬物それぞれについて、それらの薬物組み合わせ少数を可能な限り高い相対濃度で、または現在使用されている(非封入)カクテルに従った比で共封入する。再度インビトロ試験を使用して、組み合わせのいずれかが、等用量の単剤HPLNよりも殺腫瘍に関して優れた有効性を示すかどうかを決定する。標的導入療法と標準的導入療法とが相対するように、標準用量導入プロトコル(standard dosing induction protocol)を反映する組み合わせを作製する。封入した薬物材料量で有効性の改善を示す組み合わせ薬物HPLNを、ヒトALL腫瘍を注射した異種移植マウスに投与する。薬物組み合わせの最良のものを、できれば1つ以上の標的特徴を用いて、ペプチドでターゲティングされたHPLNにおいて再度試験する。

【0149】

この研究により、ALL細胞に対して、ターゲティングされた単剤HPLNより優れた有効性を有する、ターゲティングされた多剤含有HPLNの首尾良い同定がもたらされ、かつ、ターゲティングされた単剤HPLNより優れた殺腫瘍活性を有してインビボで機能する、新規のターゲティングされた多剤HPLNが提供される。

【0150】

ターゲティングされた単剤含有HPLNは、全身型と転移型の両形態の白血病に強力な効果を示す一方で、薬物カクテルは、オフターゲット安全域をさらに押し広げ得る。考えられる欠点は、薬物の組み合わせによっては、相手薬物またはHPLN脂質に不適合となり得ることである。これについては、化学的に適合性がありながら、互いの有効性が相乗効果をもたらすと思われる組み合わせを同定することに目を向けて、より広範囲の薬物組み合わせをスクリーニングすることで是正され得るだろう。有望であることを示すが保管または安定性に問題があるいくつかの組み合わせでは、そのアプローチに焦点を当てることができ、異なる薬物の組み合わせを2つ(またはそれ以上)の異なるターゲティングされたHPLNの母集団に分けて同時投与する。こうした変形は、既存の導入プロトコルと同様に、異なる薬物を、化学療法期間中の異なる時期に投与できるようになるため、実際さらに有利となり得る。

【0151】

実施例6：HPLN粒子パラメータ最適化

インビボでの多くの薬物動態学的/薬力学的プロセスは、HPLNで送達される薬物の有効性に重要な役割を果たすと考えられる。本発明者らは、HPLN製剤が良好な有効性を有することを動物モデルで実証した。しかし、インビボ用粒子の最適化には依然かなり広範な行数にわたるHPLN粒子パラメータが存在する。特定の理論に束縛されることは望まないが、以下の重要パラメータを最適化することができる。(1)HPLN中のポリマーの割合は、薬物放出の有効性、ひいては殺腫瘍有効性を左右し、また正常細胞への粒子毒性にも影響する。(2)PEG化のレベルは、HPLNの循環時間に影響を与えるため、腫瘍内の局在化/腫瘍による取り込み/殺腫瘍速度論も影響される。(3)HPLN

サイズは、腫瘍内の局在化及び殺腫瘍における有効性に影響を与える。(4)粒子単位でのターゲティング物質量は腫瘍内の局在化及び殺腫瘍における有効性に影響を与える。

【0152】

上述パラメータを最適化するため、製剤に修飾を行って、ポリマーの割合の変更、粒径変更及びHPLN上のPEG及びターゲティング分子の量の変更を行う。新規ターゲティングHPLNの調製及び特徴決定を行い、細胞結合及び抗腫瘍特性の試験を実施する。

【0153】

ポリマー内容物。本発明者らは、HPLN/dox製剤中の架橋脂質(h-PEG₁-PCDA)のレベルを上げると、癌細胞に対する細胞毒性が増加する(Federman 2012)という、確かな観察を行った。封入細胞毒性薬物を用いていないPLNは、正常細胞に対して非常に低い毒性を示すことから、上記が脂質それ自体または高分子形態であることから生じる毒性ではないことは明らかである。特定の理論に束縛されることは望まないが、従来のリポソームと比較して、ポリマーが一旦腫瘍細胞内部へ入るとナノ粒子膜を修正して薬物放出を促進すると本発明者らは考える。h-PEG₁-PCDA脂質を増量させるとHPLNがさらに高度に重合されることから、重合度を重ねていった場合にペイロード粒子を用いたインビボでの有効性及び正常細胞毒性(薬物非ローディング粒子)に与える影響を調べる。ポリマー内容物の各種変形は、h-PEG₁-PCDA(重合性脂質)と非架橋脂質成分(水素添加大豆PC)のモル比を変えて達成する。この変更で、HPLN中に形成し得るポリマーの量が再現可能に制御される。特定の理論に束縛されることは望まないが、ジアセチレン脂質は、水素添加大豆PC尾部より炭化水素尾部のほうが著しく長く、これが重合性脂質のアイランドをもたらす相分離(Gaboriau 2001)を促進すると本発明者らは考える。h-PEG₁-PCDA脂質の相対量を増大させると、ポリマードメインのサイズ及び/または数が粒子単位で大きくなるであろう。本明細書に記載する製剤は、h-PEG₁-PCDA脂質と水素添加大豆PC脂質のモル比以外は一定に保たれる。薬物ドキソルビシンをこれまで同様pH勾配により能動的にローディングし、新規類似体をUV重合させる。ポリマー形成の重合度を、640nmでの吸光度により検査する。本発明者らが早期に気づいた問題の一つは、h-PEG₁-PCDA脂質のレベルが高いほど、確立され得る薬物ローディングレベルが低くなること(Federman 2012)であった。各製剤における薬物ローディングをリポソームの破裂により測定し、各製剤の投与では動物に同等量の薬物を与える。有望な製剤を調べるため、ポリマー内容物に関連するHPLN/Dox殺腫瘍効果を最初に細胞培養で決定し、その後、インビボで決定する。別々の実験で、ポリマー重合度をあげることで予期しなかった正常細胞毒性があるかどうか、各種の薬物非ローディング類似体を急性毒性アッセイ法で調べる。

【0154】

PEG化レベル。投与方法が静注(IV)であるため、ターゲティングリガンドと組み合わせるPEG「ステルス」の量を変更する場合、治療転帰を最適化するために循環半減期を保証する必要があるかもしれない。一般に、ある点までは、PEG分子の表面密度を高めると、HPLN表面の免疫系による認識を部分的に妨げるか、またはRESによる非特異的な粒子取込みを低下させ、循環時間を延長をもたらす(John 2003)。循環時間が長くなると、HPLNの腫瘍細胞「発見」及び腫瘍細胞への付着が優良になるだろうという仮定を、各HPLN/Dox製剤の有効性を粒子単位でのPEG量の関数として評価することにより検証する。本明細書に記載する製剤は、リポソーム形成混合物に導入されるPEG脂質の相対量を除いては、一定に保たれるであろう。薬物ローディング、及び不均一ローディングのために必要となる標準化をした後、ターゲティング物質を添加する。文献に示されているように、PEG化が比較的低レベルであっても、ミセル導入方法を介したターゲティング脂質の挿入を有意に遅らせるかもしれない(Ideen 2001)。したがって、最初のリポソーム形成混合物にマレイミド末端PEG脂質を含める従来方法を実施し、メトキシ末端PEG成分を増量させていくにより全体的なPEG含有量を制御する。その後、PEGレベルがさまざまに異なる抗CD-19-HPLN/Dox

10

20

30

40

50

製剤の有効性を動物で試験する。

【0155】

HPLNの ζ 電位測定は製剤の改善に不可欠である。粒子表面に対する変更はコロイド安定性に影響を与える。一般に、特定範囲内の ζ 電位（約 $+30 \sim -30$ mV）はコロイド安定性（非凝集）をもたらすが、その範囲外の電位は望ましくない凝集沈殿が起こり得る。 ζ 電位を測定することで、候補製剤数が減少してHPLNの安定性試験が短縮され、有効期間の延長につながる。 ζ 電位はまた、受動的な（望ましくない）薬物放出及び安定性に影響を与える可能性のある、粒子表面の（荷電）薬物分子の程度も示す。

【0156】

粒径。次に、粒径の影響を調べる。50～200 nmの限られた粒径範囲内であれば、肝臓ろ過またはRESの捕捉によって循環から除去される可能性は最小限に抑えられる。リポソーム押し出し成形で得られる粒径に対する微細な制御で、平均粒径が50、80、100、及び200 nmに集中するHPLN/薬物バッチを調製することができる。これまでの経験を通じて、HPLNのサイズの下限は約30～40 nmであることがわかった。このサイズを下回ると、粒子の曲率は明らかに厳しく脂質充填に影響を与え、重合プロセスが著しく抑制される。

【0157】

初めに、このサイズ試験を抗CD-19/HPLN/Dox製剤に行う。さまざまなサイズの、薬物をローディングされ、ターゲティングされたナノ粒子を、安定性について分析し、その後、動物に投与する。有効性、及び粒径で誘導される血栓性イベントにより生じる異常毒性の両方について調べる。

【0158】

他のパラメータ（PEG化、ポリマー内容物、ターゲティング物質質量等）への改善、並びにターゲティング物質の種類及び薬物カクテルの組み合わせが同定されたので、本明細書で経験的に同定したHPLNサイズ範囲で、循環半減期が最長の至適製剤を構築する。

【0159】

ターゲティング物質レベルの最適化。最後に、ターゲティング物質の量の関数として有効性を検討する。ナノ粒子のインビボターゲティングに関する文献で見られるレベルは、一般に、5～10モルパーセントの範囲であるが、このパラメータをHPLN用に最適化する必要がある。粒子上のターゲティングタンパク質レベルを高くすると、腫瘍結合性は高くなるが、同時に非特異的にオプソニン作用をするタンパク質の付着も促進される。

【0160】

最初にこのターゲティング物質の量を抗CD-19-HPLN/Dox製剤で試験する。マレイミド末端PEG脂質を最初のリポソーム形成混合物に含める従来方法を、mal-脂質量を増量させつつ実施する。低レベル（0.5モル%）のmal-脂質から開始し、最高の約20モル%まで徐々に%レベルを上げてバッチを作製する。抗CD-19-HPLN/Dox製剤の有効性を、まず培養における細胞結合で最初に分析し、細胞結合を全く示さない、または極めて最小限の結合しか示さない製剤は処分する。特定の理論に束縛されることは望まないが、本発明者らは、ターゲティング物質を増量すると、結合レベルのプラトーに達し、おそらくは上限においていくらかの結合低下があると予想している。次いで、インビトロでの結合レベルが同様の、表面量の範囲に対してターゲティング物質をさまざまに変えた製剤を殺腫瘍効果について動物で試験する。

【0161】

この試験を、インビトロ及びインビボ両試験を使用し連動させて実施する。これらのパラメータを変更したので、結合及び殺細胞をインビトロ試験で確認し、有望な製剤をマウスに取り入れる。これらの最適化により新規HPLN製剤は、長期循環、最大細胞結合性、及び正常組織に対する低毒性のために最適化されたナノ粒子特性を有する製剤であると特定される。

【0162】

実施例7：ヒトAML細胞の異種移植マウスモデルにおける、CD-34をターゲティン

10

20

30

40

50

グするHPLNの試験

急性骨髄性白血病（AML）は予後が特に不良であり、成人で最もよく見られる形態である。ヒト患者由来の新鮮なヒトAML細胞を調達し、それらを本発明者らのNOGマウスモデルで試験する。この試験では、患者由来の白血病細胞の異種移植片における同様の有効性を記録する。

【0163】

HPLNをまず抗CD-34モノクローナル抗体で機能化させ、新鮮なヒトAML細胞に対する陽性結合についてインビトロで確認する。結合が実証されたら、抗CD-34/HPLNにドキソルピシンを用いて薬物ローディングする（抗CD19/HPLN/Dox作製時と同様）。最初に、インビトロでの有効性をAML細胞死により評価し、LD50を測定する。抗体に代えてCD-34親和性ペプチドも可能であり、新規CD-34 peptide/HPLN/DoxをAML細胞の結合及び殺レベルについて試験する。最後に、確立されているAML治療プロトコルを反映する細胞毒性物質を含有する薬物ローディングHPLNを調製し、試験する。NOGマウスに新鮮なヒトAML細胞を注射し、ヒトAML細胞の末梢血カウントの実施により、腫瘍殺細胞を1週間に2回、8週間にわたり評価する。

【0164】

CD34をターゲティングし薬物をローディングされたHPLNの取得：上述のように、ターゲティング抗体またはCD-34に対する遺伝子改変ペプチドのいずれかを、標識ミセルの組み込みによりHPLN膜内に組み込む。ここでもやはり先に記載したドキソルピシンローディング方法を用いて、CD-34を標的にするHPLN/Dox粒子を得る。さらに、上記方法を用いて、AML患者の治療に現在使用されている薬物の組み合わせを、ターゲティングされたHPLN製剤中で試験する。このカクテル内の作用物質は、ミトキサントロン、Ara-C（シタラビン）、及びVP-16（エトポシド）であり得る。HPLN内への薬物ローディングを、先に記載した能動的ローディング（ドキソルピシン）または受動的ローディングにより行う。HPLN薬物含有量を、ドキソルピシンについてはFederman 2012に記載の通り、または他の薬物については粒子破裂とその後のHPLCでの定量を行って、再度アッセイする。

【0165】

腫瘍ターゲティング及び殺腫瘍についてのCD-34をターゲティングするHPLN/薬物のアッセイ：新鮮なAML細胞をヒト患者から得て、やはり診断用フローサイトメトリ（FACS解析）を用いてHPLN結合を実証する。抗CD-34抗体またはCD-34ペプチドいずれかにより、AML細胞に対するターゲティングを比較する。ターゲティングペプチド若しくは抗体の粒子単位でのレベルを最適化した後、インビトロ殺腫瘍試験を行い、局在及び取り込みを検証する。インビトロでの殺細胞をCell Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay（RLU）により分析する。

【0166】

CD-34をターゲティングするHPLNをインビトロで最適化した後、インビボ殺腫瘍活性アッセイ法をマウスで実施する。先にALL細胞で実施した通り、NOGマウスにAML細胞 6×10^6 個を注射する。CD-34標的型HPLN/薬物による全身分布及び殺細胞を、ヒトAML細胞の末梢血球数により1週間に2回評価する。治療レジメン完了後、剖検を実施し、肝臓、脾臓、骨髄、及びCNSの残存疾患を評価し、定量化する。

【0167】

この試験により、異種移植マウスモデルにおいてAML白血病細胞に結合し死滅させることができる、CD-34を標的にするHPLNの首尾良い実証がもたらされ、かつ、殺腫瘍活性を有してインビボで機能する、薬物をローディングされCD-34をターゲティングするHPLNで構成されている、新規製剤が提供される。

【0168】

実施例8：ヒトのユーイング肉腫異種移植マウスモデルにおける、CD-99をターゲテ

10

20

30

40

50

リングするHPLNの試験

本発明者らは、ドキソルピシンをローディングされかつCD-99に対する抗体を用いてターゲティングされたHPLN(抗CD-99/HPLN/Dox)の有効性を、NOGマウスにおいて試験した。皮下モデルでは、ルシフェラーゼをトランスフェクションしたユーイング腫瘍を6匹のマウスに移植した。3匹のマウスに緩衝液を与え、別の3匹のマウスに抗CD-99/HPLN/dox(dox 2mg/kg、1週間に2回)を与えた。移植後10日の時点で薬物投与を開始し、腫瘍サイズをカリパス測定で推定した(図12)。転移モデルで、6匹のマウスにTC71-Lucユーイング腫瘍細胞 5×10^6 を尾静脈を介して注射し、移植から3日後に薬物投与を開始した。マウス3匹に抗CD-99/HPLN/dox(dox 2mg/kg、1週間に2回)を与え、別のマウス3匹にはビヒクルのみを与えた(図10)。腫瘍サイズをXenogen製カメラによる画像により推定した。

【0169】

有効性結果：急性毒性反応はまったく観察されなかったため薬物ローディングHPLNはマウスにおいて耐容性が非常に良好であった。前述の試験で、本発明者らは、HPLNは動物に有害作用がないことを示した。体容量は対照群のものと一致し、また、肝臓、腎臓、及び骨髓機能の試験は正常を維持した。しかし、抗CD-99/HPLN/Doxを投与されたマウスは、腫瘍成長の有意な遅延を示した。24日目、皮下モデルにおいて、ターゲティングされたHPLNで処置された動物では未処置対照群に比べてほぼ2.5倍の差があった(図12)。未処置対照マウスの腫瘍成長は24日目までには非常に大きくなり、動物管理プロトコルにより安楽死させなければならなかった。特に期待できるのは、HPLNで処置したマウスで観察された腫瘍成長曲線であった。腫瘍成長は、処置開始後約20日で明らかにプラトーに達した。転移モデルもまた、対照と比較して有意な腫瘍量減少を示した。35日目までには、腫瘍サイズは約4.5倍の縮小になると推定される(図10)。Xenogen写真は、処置動物と対照動物の間の腫瘍サイズの差を劇的に示している(図10)。HPLNで処置したマウスから切除した腫瘍では、HPLNの局在が強く存在することが示された(図11)。

【0170】

実施例9：一般アッセイ方法

最初に細胞ベースの結合アッセイ法及び細胞毒性アッセイ法で製剤を試験することで、新規HPLNの試験を行う。最も有望な類似体を、腫瘍結合性、腫瘍内部移行、及び殺腫瘍の試験用に、ヒトALLまたはAML細胞を担持するマウスに投与する。

【0171】

細胞ベース試験。まず、細胞ターゲティングまたはPEG化構成成分に対して特定の変更を行った場合は、腫瘍細胞結合レベルを測定する。細胞に結合しているHPLNは、ジアセチレンポリマー骨格により固有の蛍光特性を与えられているため視覚化が可能である(Hendrickx 2005)。結合の定量化は、FACScanフローサイトメーターのローダミンチャンネルで蛍光シグナルを測定して行う。結合は、陽性対照、ターゲティングされたHPLN、及び陰性未処置細胞と比較した相対的パーセンテージで表される。

【0172】

細胞結合アッセイ法。白血病細胞株を、4ウェルLab-Tek II Chamber Slides(Thermo Scientific)に播種し、一晚かけて80%コンフルエントな状態に達するようにする。細胞をウェルあたり $50 \mu\text{g/mL}$ のターゲティングされたHPLNで処理し、37℃で4時間インキュベートする。培地を除去し、ウェルを1mLの新鮮培地で洗浄する。細胞固定を、3.7%ホルムアルデヒド含有リン酸緩衝食塩水を用いて4℃で15分間行う。細胞を、VECTASHIELD封入剤を使用してDAPI(Vector Laboratories)とともに標本にし、次いで、Carl Zeiss Axio Imager D1蛍光顕微鏡を用いて観察する。DAPIを用いて細胞をブルー/シヤンのフィルターで視覚化し、ローダミンフィルターを1秒曝露で使用する。結合したHPLNを視覚化する。あるいは、FACScanフロ

ーサイトメーター (Becton Dickinson、カリフォルニア州サンホセ) で結合を定量できる。細胞を固定する前に、プレートを穏やかに攪拌して細胞を脱離させ、溶液をFACS内に注射する。HPLN定量は、ローダミンフィルターを通るシグナルを測定して行う。

【0173】

MTT細胞毒性アッセイ法。白血病細胞株を、10%ウシ胎仔血清 (Gemini Bio products) を含有するダルベッコ改変イーグル培地 (HyCloneカタログ番号SH30022.01) に懸濁させる。細胞を、ペニシリン/ストレプトマイシンを含有する容量100 μ Lの培地で5 約10³個の細胞/ウェルの濃度で96ウェルフォーマットに播種し、一晚インキュベートする。翌日、ウェルを、ターゲティングされたHPLN/薬物、ターゲティングされていないHPLN、従来のリボソーム、または遊離薬物で4時間処理し、次いで、新鮮培地で洗浄する。用量は、logスケールで0.01~100 μ Mの範囲及び0nMの薬物濃度に基づいて加える。0nMウェルはHEPES緩衝生理食塩水で処理する。各処理を3つ組で実施する。細胞を、標準的なCO₂条件下で37 にて72時間インキュベートする。72時間目、すべてのウェルは、リン酸緩衝食塩水中の初期濃度が5 μ g/ μ Lの10 μ Lのチアゾリルブルー臭化テトラゾリウム (Sigma) 溶液で処理され、4時間インキュベートされる。反応は停止し、100 μ Lの15%ドデシル硫酸ナトリウム/15mM HCl溶液を加えて細胞を溶解させ、暗所にて室温で一晩インキュベートする。Bio-Radマイクロプレートリーダーを使用して、570nmのプレート吸光度を読み取る。

【0174】

アポトーシスアッセイ法。薬物処理後 (各薬物につきIC₈₀)、浮游細胞及び結合細胞両方を採取し、アネキシンV-FITCアポトーシス検出キット (Onco gene Research Products、カリフォルニア州サンディエゴ) を製造者提供のプロトコールにしたがって使用するアネキシンV/PI染色に供する。アポトーシスが起きている細胞では、アネキシンVは、細胞質膜の内葉 (inner leaflet) から外葉 (outer leaflet) へ移動するホスファチジルセリンに結合する。PIは、生存細胞、初期アポトーシス細胞及び壊死細胞または後期アポトーシス細胞の区別に使用される。HPLN処置細胞及び未処理細胞から得られる蛍光をFACSscanフローサイトメーターを使用したフローサイトメトリーで測定する。

【0175】

動物試験。インビトロアッセイ法の限界を克服するため、原発性患者の試料及び細胞株の生着が可能なマウス異種移植モデルを作製した。ヒト癌細胞が生着したばかりの異種移植モデルには、インビボでのヒト細胞特異的生物学を検索できるという特有の利点があり、一般に、患者の応答をよりよく模倣すると考えられている。このモデルで、得たばかりのヒト癌細胞を免疫不全マウスに移植し、新規HPLN製剤をインビボで試験する機会を得る。

【0176】

NOGマウス試験。本発明者ら及び他の研究者は、典型的な非肥満糖尿病 (NOD) /SCIDマウスには、ヒト白血病癌細胞の生着を拒絶するNK細胞活性が残存していることを見出した。このことを解決するため、NOD-SCIDマウスでさらなる免疫不全を確立し、このマウスは、インターロイキン2-受容体 γ (IL2R γ) をコードする遺伝子の欠失を有する。さらに、これらのマウスには、ヒトIL3、GM-CSF及びSCFを発現する遺伝子が付加されている。これにより、これらのマウス (NOG) はB細胞、T細胞、及びNK細胞が完全に欠失し、サイトカインシグナル伝達欠損症となった。試験において、NOGマウスはNOD/SCIDマウスよりも異種移植成功率が高いこと、生存期間が延長されること、及び注射された癌細胞の転移率が高いことが認められた。NOGマウスにより長期研究用の優れたモデルが提供される。

【0177】

本発明者らが使用したALL細胞株に対するHPLN製剤の試験に加え、患者由来の分

10

20

30

40

50

離したばかりのAML細胞を用いてさらなる試験を行う。ルシフェラーゼをトランスフェクションしたALL腫瘍細胞をNOGマウスに注射すると、全身分布を有する白血病の異種移植マウスモデルが作製され、ターゲティングされたHPLNによる殺細胞をXenogen製カメラ画像で評価できるようになる。AML細胞の場合、これらは分離したばかりの細胞であり、ルシフェラーゼのトランスフェクションを実施できないため、殺腫瘍及び寛解誘導については患者で、末梢血カウントにより評価することになる。

【0178】

具体的なプロトコールは以下のとおりである。0.5mlの全血を尾静脈から小児用の紫色トップチューブ内に採取し、臨床試験室へ送る。自動血液分析装置で、総赤血球数及び総白血球数、並びに白血球及びリンパ球の自動鑑別された計数が得られる。骨髓芽球数は自動的に生成されるが、顕微鏡分析及び同一採取血液から調製した末梢血塗抹標本計数によって、白血病患者材料で実施したように正確に手動で確認される。生きている動物で骨髓病変を無理なく測定することは、サイズに制約があるため不可能であるが、剖検時に記録に取る（肝臓、脾臓、及びCNS病変も同様）。

【0179】

動物管理に関するNIHガイドラインにしたがい、かつCHLAまたはUSC動物実験委員会(Institutional Animal Care and Use Committee)により承認されているように、マウスを処置する。雄無胸腺ヌード(NOG)マウスはインビボ試験実験に使用され、BALB/cヌード(nu/nu)マウスはPK試験に使用されるであろう。動物に自由に摂食させ、明暗周期が12時間の20±2に空調した部屋で飼育する。全マウスとも、注射時は6～8週齢である。各マウスに、RPMI(without FBSまたは抗生物質)0.2mLに懸濁させたトランスフェクション白血病細胞 6×10^6 を、27ゲージ針を用いて尾静脈から注射する。マウスを用いたすべての実験操作は、層流式フードの無菌条件下で実施する。

【0180】

最大耐用量。MTDとは、許容されかつ十分に確立されている毒性ベースのエンドポイントアッセイ法である。安全に投与できる薬物の最高用量は、その毒性及び耐容性をマウスで調べる非盲検、用量漸増実験で決定される。遊離(非封入)薬物とナノ粒子に封入した形態とでは薬物動態パラメータは非常に異なると考えられるため、従来の毒性/耐容性対照比較は適用できない場合がある。この技術の強みは標的送達にあるので、骨髓毒性などの測定が容易なパラメータが初期評価に選択されることになる。用量(1mg/kg～20mg/kg)が5群のマウス(n=6)にIV注射で投与される。検定力分析(power analysis)は、1群あたり最低5匹のマウスが必要であるとしている。用量制限毒性(DLT)が観察されなければ、MTDが確立されるまで用量は漸増される。MTDは、群内の任意のマウス2匹にDLTをもたらす用量を下回る1用量として定義される。血液、及び腎臓、肝臓、心臓、肺、卵巣、腸、並びに骨髓などのさまざまな臓器が組織病理学用に採取される。これらのHPLN封入化合物のMTDを投与された動物と、遊離薬物をそのMTDで投与した場合とを、上述の成人白血病モデルにおける全試験について、持続する、用量に相関した腫瘍成長阻害を示す単回投与に関して比較する。

【0181】

メトロノミック投与。従来、癌の化学療法薬は、MTDまたはほぼそれに近い用量の薬物を間隔の短いボラス注入で投与され、その後、十分な休薬期間がある。これにより腫瘍量は一時的に改善され延命されるが、憂慮すべき副作用が伴い、最終的には再発するという結果が最も一般的であった。新規メトロノミック投与計画では、休薬期間を設けずに一定間隔で投与を行う(Hanahan 2000)。理論的には低用量の使用により毒性副作用が最小化されるはずである。メトロノミック投与と併用投与戦略により、腫瘍内皮細胞並びに顕性の癌細胞及び、おそらくは腫瘍の他の細胞成分も死滅させることができ、正真正銘の有効性が期待される。真の有効性は、新規細胞毒性投与計画を他の薬物または放射線照射と併せて使用する併用療法でしかもたらされないかもしれない。最良の投与経路及びMTDを確立した後、極低用量のメトロノミック投与計画を用いて、単剤及び併

用剤としてのこれらの化合物のインビボでの有効性を比較する。用量（ 0.2 mg/kg ~ 3 mg/kg ）を、先に決定した実験時間（60日）5群のマウス（ $n = 6$ ）に投与する。これらの化合物は、4匹のマウスに用量0、4、10、及び 20 mg/kg/day にて投与する。7日間の投与の後、投与後0、0.5、1、2、4、8、12及び24時間目に血漿試料を採取する。血漿濃度をLC/MS/MSを使用して監視する。ノンコンパートメント解析を用いてAUC、 $t_{1/2}$ 、 C_{max} 、 T_{max} 、CL、及び%Fを測定する。

【0182】

統計解析。アッセイ法は3つ組で設定し、その結果を平均 $\pm$ SDで表す。治療群間の有意性を測定するために、95%信頼区間をつけた対応のある両側t検定により統計解析及びP値測定を行う。 $P < 0.05$ を有意とみなす。群間有意性の検定にはANOVAを使用する。統計解析にはSAS統計ソフトウェアパッケージ（SAS Institute）を使用する。

10

【0183】

異種移植デルでは、癌細胞を、正常な能力のある免疫系に曝露しない。免疫系が正常な能力を有するマウスでの試験は、野生型マウスの化学発癌物質/放射線照射、または発癌遺伝子送達/挿入変異による処置で実施され得る。白血病誘発に関する及びさまざまな治療に対する応答に関する試験用に、こうしたトランスジェニックマウスを作製するための方法は幾つかある（Zuber 2009）。これらの既知の方法を用いて白血病を担持するマウスを我々は作製することができる。

20

【0184】

参考文献：

1. Federman, NJ, Chan, J, Nagy, JO, Landaw, EM, McCabe, K, Wu, AM, Triche, T, Kang, H, Liu, B, Marks, JD, Denny, CT (2012) Enhanced Growth Inhibition of Osteosarcoma

by Cytotoxic Polymerized Liposomal Nanoparticles Targeting the Alcam Cell Surface Receptor Sarcoma 2012:126909.

2. Haran G, Cohen R, Bar LK, Barenholz Y, (1993) Transmembrane ammonium sulfate gradients in liposomes produce efficient and stable entrapment of amphipathic weak bases. *Biochimica et Biophysica Acta*,1151:201.
3. Iden DL, Allen TM (2001) In vitro and in vivo comparison of immunoliposomes made by conventional coupling techniques with those made by a new post-insertion approach *Biochimica et Biophysica Acta* 1513:207-216. 10
4. Almagro, JC, Fransson, J (2008) Humanization of Antibodies. *Frontiers in Bioscience*,13:1619-1633
5. Zucker D, Barenholz Y. (2010) Optimization of vincristine-topotecan combination--paving the way for improved chemotherapy regimens by nanoliposomes. *J Control Release*. 146(3):326-33. 20
6. Gaboriaud, F, Golan, R, Volinsky, R, Berman, A, Jelinek, R (2001) Organizational and Structural Properties Langmuir Films Composed of Conjugated Polydiacetylene and Phospholipids. *Langmuir* 17:3651-3657.
7. John, AE, Lukacs, NW, Berlin, AA, Palecanda, A, Bargatze, RF, Stoolman, LM, Nagy, JO (2003) Discovery of a potent nanoparticle P-selectin antagonist with anti-inflammatory effects in allergic airway disease. *Faseb J* 17:2296-2298. 30
8. Hendriks, CC, Polhuis, M, Pul-Hootsen, A, Koehorst, RB, van Hoek, A, Zuilhof, H, Sudholter, EJ (2005) Spectroscopic studies of oligodiacetylenes in solution and polymer film. *Phys Chem Chem Phys* 7:548-553.
9. Hanahan, D, Bergers, G, Bergsland, E (2000) Less is more, regularly: metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice. *J Clin Invest* 105:1045-1047. 40
10. Zuber J, Radtke I, Pardee TS, Zhao Z, Rappaport AR, Luo W, McCurrach ME, Yang MM, Dolan ME, Kogan SC, Downing JR, Lowe SW. (2009) Mouse models of human AML accurately predict chemotherapy response. *Genes & Development*, 23:877-889.

【 0 1 8 5 】

上述のさまざまな方法及び技術により、本願を実施するための多数の方法が提供される。もちろん、必ずしも記載のすべての目的または利点を本明細書に記載する任意の特定の実施形態に従って達成できるわけではないことを理解されるべきである。したがって、例

えば、当業者は、方法が、本明細書で教示される一利点または一群の利点を達成または最適化するようにして実施可能であり、必ずしも本明細書で教示または示唆されている他の目的または利点を達成する必要はないことを認識するであろう。本明細書では多種多様な代替物が言及されている。いくつかの好ましい実施形態では、1つ、別、または幾つの特徴が具体的に含まれる一方、他の好ましい実施形態では、1つ、別、または幾つの特徴が具体的に除外され、さらに別の好ましい実施形態では、1つ、別、または幾つの特徴の有利な特徴を含めることによって、特定の一特徴を軽減することを理解されるべきである。

【0186】

さらに、当業者は、異なる実施形態からさまざまな特徴を適用可能であることを認識するであろう。同様に、上記で考察したさまざまな要素、特徴及び工程、並びに、かかる要素、特徴または工程それぞれに対する公知の他の同等物は、当技術分野の当業者が多種多様な組み合わせで採用して、本明細書に記載する原則に従って各種方法を実施することができる。さまざまな要素、特徴、及び工程のうち、別種の実施形態において、あるものは具体的に含まれ、またあるものは具体的に除外されるであろう。

【0187】

本願は、特定の実施形態及び実施例の文脈で開示されているが、本願の実施形態が、具体的に開示されている実施形態以外に、他の代替の実施形態及び/または使用並びにその変更及び等価物にまで及ぶことを当業者は理解するであろう。

【0188】

本願の好ましい実施形態は、本発明者らが知る本願を実施するための最良の形態を含めて、本明細書に記載されている。それらの好ましい実施形態の変形は、上述の説明を読むと、当業者に明らかとなるであろう。当業者は、そのような変形を適宜採用することができること、また、本願は本明細書で具体的に記載した以外の方法で実施可能であることが意図される。したがって、本願の多くの実施形態には、適用法令によって許可されているように、本明細書に添付の特許請求の範囲で引用される主題のあらゆる変更及び等価物が含まれる。さらに、本明細書で特に明記したり、明らかに文脈と矛盾したりしない限り、上記要素について、その考えられるすべての変形のいかなる組み合わせも本願に包含される。

【0189】

本明細書で参照した特許、特許出願、特許出願公開、並びに、論文、書籍、明細書、刊行物、資料、物などの他の資料はいずれも、あらゆる目的のために、この参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。ただし、同出願に関連する処理経過書類、本願文献と矛盾する、若しくは抵触するもの、または現在若しくは今後において本願文献に関するクレームの最も広い範囲に対し制限的な影響を与え得るものを除く。例示のため、説明、定義、及び/または、用語の使用について、組み込まれる任意の資料と本願文献との間に矛盾または抵触がある場合、かかる説明、定義、及び/または用語の使用は、本願文献内のものが優先されるものとする。

【0190】

本明細書に開示する本願の実施形態は本願の実施形態の原則を例示するものであることを理解されるべきである。使用可能な他の変更は、本願の範囲内で可能である。そのため、例として、本願実施形態の代替構成を本明細書の教示に従って用いることができるが、これに限定されない。したがって、本出願の実施形態は、正確に記載され示されているものに限られることはない。

【0191】

本発明のさまざまな実施形態は、上述の詳細な説明に記載されている。これらの説明は上記実施形態を直接説明するが、本明細書に示され記載される具体的な実施形態に対する変更及び/または変形を当業者は考案して良いことが理解される。この記載の範囲となる、そのような変更または変形はいかなるものも、記載内容に含まれることが意図される。特に断りがない限り、明細書及び特許請求の範囲における単語及び語句は、適用可能な技術分野の当業者に通常用いられる慣用的な意味で提供されることを本発明者らは意図する

10

20

30

40

50

。

【0192】

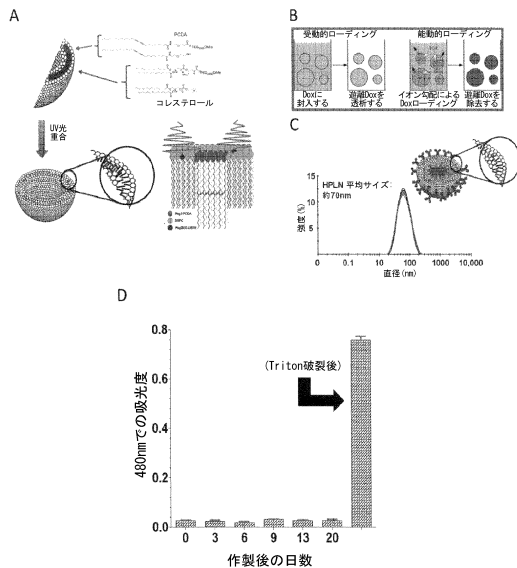
本願提出の時点でその出願人に既知である、本発明のさまざまな実施形態に関する上述の説明はすでに提出されているもので、これは例示及び説明のために意図される。本記載は、網羅することも、また開示される正確な形式に本発明を限定することも意図するものではなく、上記の教示に鑑みて多くの変更及び変形が可能である。記載の実施形態は、本発明の原則及びその実際の応用を説明し、かつ、他の当業者らが本発明をさまざまな実施形態で、意図される特定の使用に適したさまざまな変更を行って、利用できるようにするためのものである。したがって、本発明を実施するために、開示される個々の実施形態に本発明を制限することは意図しない。

10

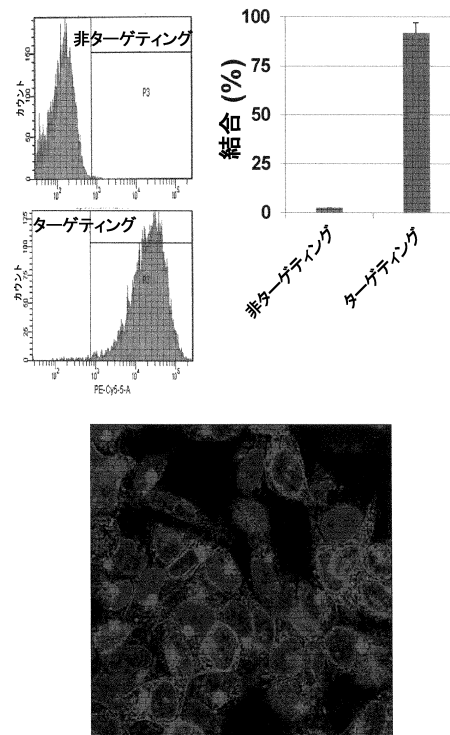
【0193】

本発明の特定の実施形態を示しかつ記載してきたが、本明細書の教示に基づき、本発明及びその広範な態様から逸脱することなく変形及び変更を行って良く、そのため、添付の請求の範囲は、そのような変形及び変更のすべてを包含し、本発明の真の趣旨および範囲内であることは、当業者には明らかであろう。

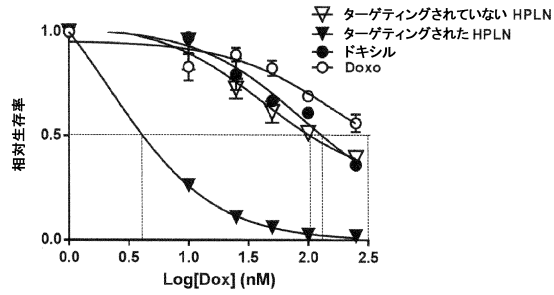
【図1】



【図2】

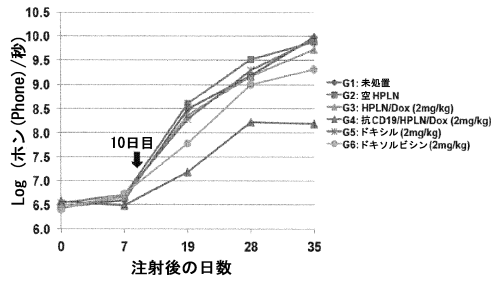


【図3】

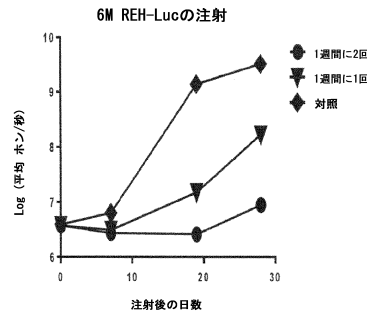
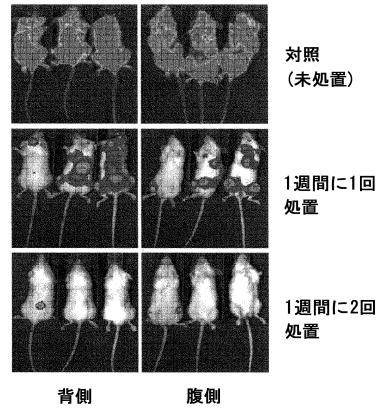


	ターゲティングされた HPLN	ターゲティング されていないHPLN	ドキシル	Doxo
IC ₅₀ (nM)	2.2	42	87.9	155.7

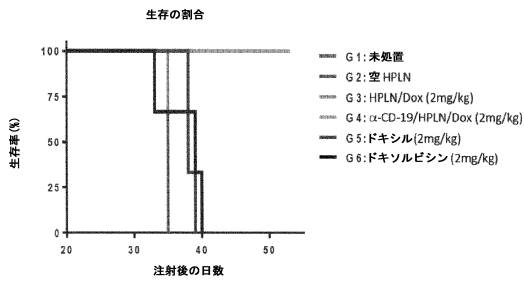
【図4】



【図5】

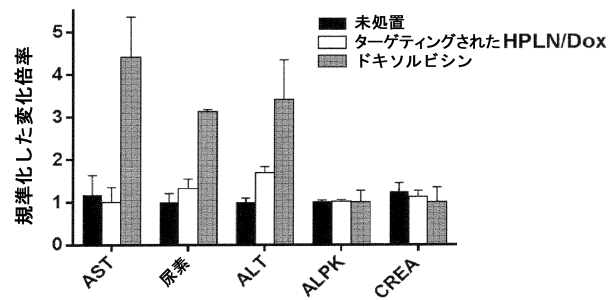


【図6】

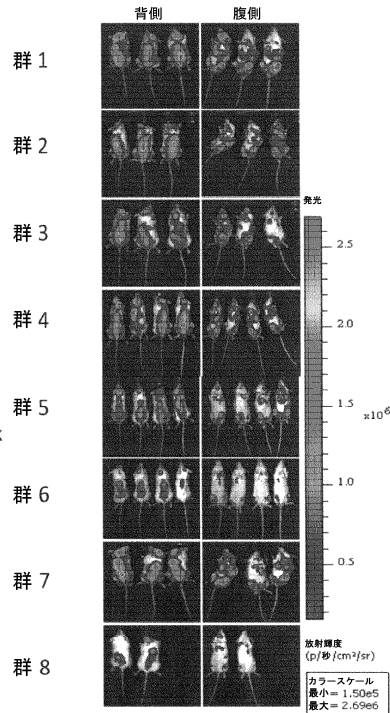


【図7】

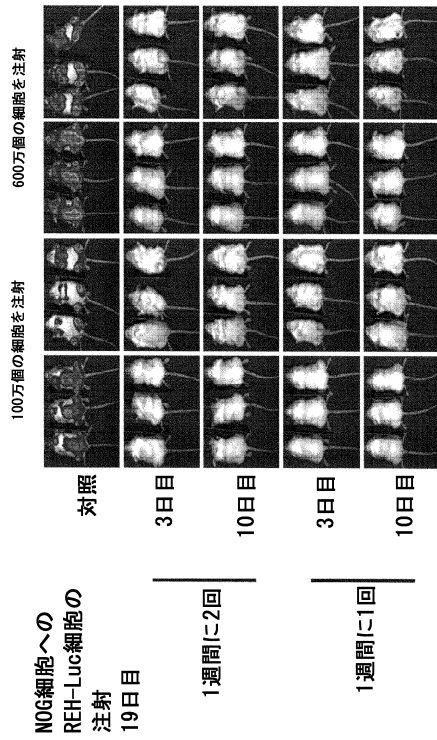
肝臓、腎臓の機能(血清化学)



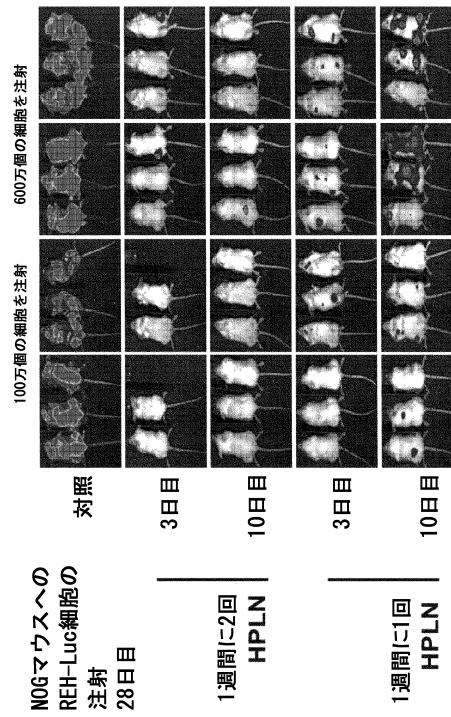
【図8】



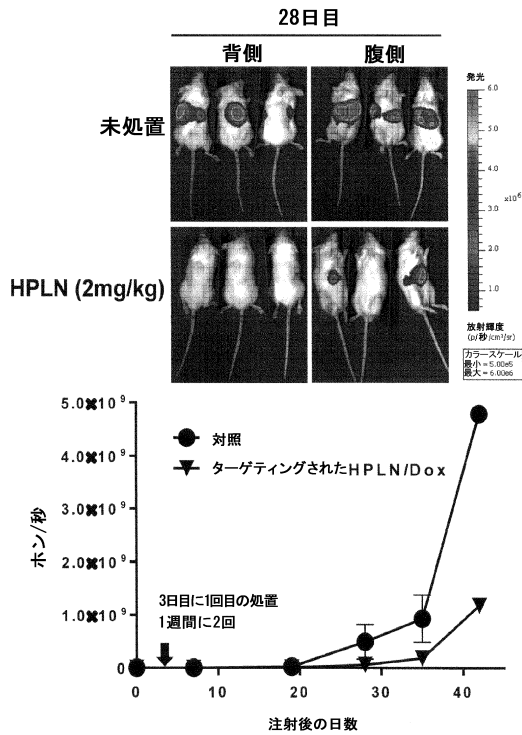
【図 9 A】



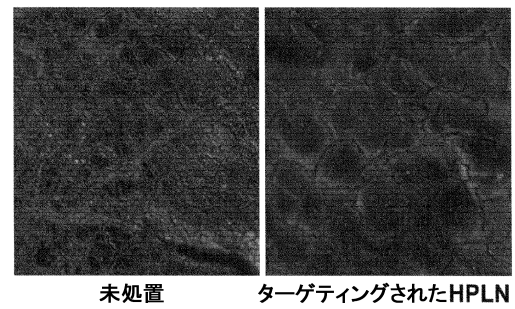
【図 9 B】



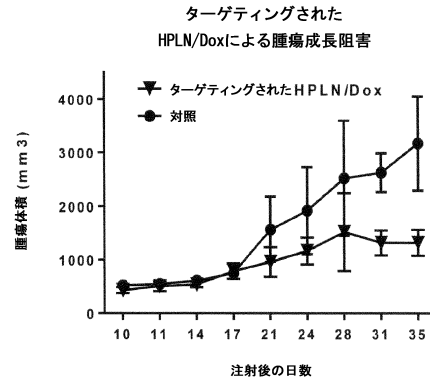
【図 10】



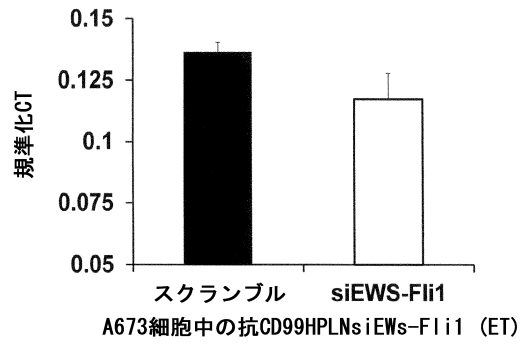
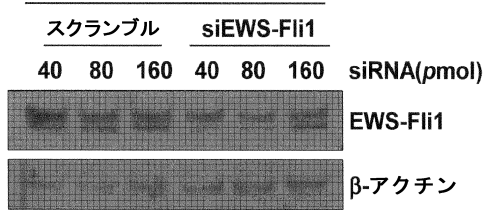
【図 11】



【図 12】



【図 13】

A673

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

A 6 1 K 47/44 (2017.01)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)
A 6 1 K 31/713 (2006.01)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)
A 6 1 K 31/704 (2006.01)
A 6 1 K 31/4745 (2006.01)
A 6 1 K 33/24 (2019.01)
A 6 1 K 31/475 (2006.01)
A 6 1 K 31/407 (2006.01)
A 6 1 K 31/337 (2006.01)
A 6 1 K 31/7068 (2006.01)
A 6 1 K 31/136 (2006.01)
A 6 1 K 31/7048 (2006.01)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)
B 8 2 Y 5/00 (2011.01)
B 8 2 Y 40/00 (2011.01)

F I

A 6 1 K 47/44
A 6 1 K 45/00
A 6 1 K 48/00
A 6 1 K 31/7088
A 6 1 K 31/7105
A 6 1 K 31/713
A 6 1 P 35/00
A 6 1 K 39/395 M
A 6 1 K 39/395 W
A 6 1 K 38/00
A 6 1 K 31/704
A 6 1 K 31/4745
A 6 1 K 33/24
A 6 1 K 31/475
A 6 1 K 31/407
A 6 1 K 31/337
A 6 1 K 31/7068
A 6 1 K 31/136
A 6 1 K 31/7048
A 6 1 P 43/00 1 0 5
B 8 2 Y 5/00
B 8 2 Y 40/00

(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

(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 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ナジ ジョン オー .

アメリカ合衆国 5 9 7 1 5 モンタナ州 ボーズマン リトル ウルフ ロード 3 4 7

(72)発明者 トリシェ ティム

アメリカ合衆国 9 0 0 2 7 カリフォルニア州 ロサンゼルス サンセット ブールバード 4

6 5 0

(72)発明者 カン ヒョンギョオ

アメリカ合衆国 9 0 6 2 1 カリフォルニア州 ブエナパーク ミード ドライブ 5 4 1 5

審査官 井上 能宏

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 2 / 1 5 5 0 2 1 (W O , A 1)

特開平 0 7 - 1 7 3 0 7 9 (J P , A)

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

, Sarcoma, 2012, Vol.2012, Article ID 126906, pp.1-11

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K 9 / 0 0 - 9 / 7 2

A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 1 / 8 0

A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 6 9