

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-512006

(P2019-512006A)

(43) 公表日 令和1年5月9日(2019.5.9)

| (51) Int.Cl.                        | F I                 | テーマコード (参考) |
|-------------------------------------|---------------------|-------------|
| <b>A 6 1 K 47/60 (2017.01)</b>      | A 6 1 K 47/60 Z N A | 2 G 0 4 5   |
| <b>A 6 1 K 47/59 (2017.01)</b>      | A 6 1 K 47/59       | 2 G 0 5 9   |
| <b>A 6 1 K 47/34 (2017.01)</b>      | A 6 1 K 47/34       | 4 C 0 7 6   |
| <b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>      | A 6 1 K 45/00       | 4 C 0 8 4   |
| <b>A 6 1 K 9/16 (2006.01)</b>       | A 6 1 K 9/16        | 4 H 0 4 5   |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 63 頁) 最終頁に続く |                     |             |

|               |                              |          |                     |
|---------------|------------------------------|----------|---------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2018-541254 (P2018-541254) | (71) 出願人 | 593141953           |
| (86) (22) 出願日 | 平成28年8月19日 (2016.8.19)       |          | ファイザー・インク           |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成30年9月28日 (2018.9.28)       |          | アメリカ合衆国10017ニューヨーク州 |
| (86) 国際出願番号   | PCT/US2016/047807            |          | ニューヨーク市イースト・フォーティーセ |
| (87) 国際公開番号   | W02017/138983                |          | カンド・ストリート235        |
| (87) 国際公開日    | 平成29年8月17日 (2017.8.17)       | (74) 代理人 | 100133927           |
| (31) 優先権主張番号  | 62/369,590                   |          | 弁理士 四本 能尚           |
| (32) 優先日      | 平成28年8月1日 (2016.8.1)         | (74) 代理人 | 100137040           |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                      |          | 弁理士 宮澤 純子           |
| (31) 優先権主張番号  | 62/293,609                   | (74) 代理人 | 100147186           |
| (32) 優先日      | 平成28年2月10日 (2016.2.10)       |          | 弁理士 佐藤 真紀           |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                      | (74) 代理人 | 100174447           |
|               |                              |          | 弁理士 龍田 美幸           |
|               |                              | (74) 代理人 | 100185960           |
|               |                              |          | 弁理士 池田 理愛           |
| 最終頁に続く        |                              |          |                     |

(54) 【発明の名称】 E G F Rリガンドを有する治療用ナノ粒子ならびにその作製および使用方法

## (57) 【要約】

本明細書では、一つには、生体適合性ポリマーと、ポリマー - E G F Rリガンドコンジュゲートであって、E G F Rリガンドは、直接または化学リンカーを介してポリマーに共有結合している、ポリマー - E G F Rリガンドコンジュゲートと、治療剤とを含む治療用ナノ粒子が提供される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

治療剤と、

ジブロックポリ(乳)酸-ポリ(エチレン)グリコールコポリマーまたはジブロックポリ(乳)酸-co-ポリ(グリコール)酸-ポリ(エチレン)グリコールコポリマーと、  
PLA-PEG-EGFRリガンドとして表されるポリマーコンジュゲートであって、EGFRリガンドは、直接、間接的に、または化学リンカーを介してPEGに結合または会合しており、PLAは、ポリ(乳)酸であり、PEGは、ポリ(エチレン)グリコールである、ポリマーコンジュゲートと  
を含む治療用ナノ粒子。

10

## 【請求項 2】

約 0.2 ~ 約 35 重量パーセントの治療剤と、

約 50 ~ 約 98 重量パーセントのジブロックポリ(乳)酸-ポリ(エチレン)グリコールコポリマーまたはジブロックポリ(乳)酸-co-ポリ(グリコール)酸-ポリ(エチレン)グリコールコポリマーと、

約 2% ~ 約 12% の PLA-PEG-EGFR リガンド密度であって、EGFR リガンドは、アジド官能化 PEG-PLA に結合または会合しており、PLA は、ポリ(乳)酸であり、PEG は、ポリ(エチレン)グリコールである、PLA-PEG-EGFR リガンド密度と

を含む治療用ナノ粒子。

20

## 【請求項 3】

前記治療用ナノ粒子の流体力学的直径が約 60 ~ 約 150 nm である、請求項 1 から 2 のいずれか一項に記載の治療用ナノ粒子。

## 【請求項 4】

前記流体力学的直径が約 90 ~ 約 140 nm である、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の治療用ナノ粒子。

## 【請求項 5】

約 1 ~ 約 10 重量パーセントの前記治療剤を含む、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の治療用ナノ粒子。

## 【請求項 6】

前記 EGFR リガンドがペプチドである、請求項 1 から 5 に記載の治療用ナノ粒子。

30

## 【請求項 7】

ペプチドが、クリック化学反応によって、ナノ粒子に共有結合性にコンジュゲートされている、請求項 6 に記載の治療用ナノ粒子。

## 【請求項 8】

Ac-DPCTWEVWGRECLQG G K (PEG 4-DBCO)-CONH<sub>2</sub>、Ac-DACTWEVWGRECLQG G K (PEG 4-DBCO)-CONH<sub>2</sub>、Ac-DPCT(2Ind)GEV(5MeO)WGRECLQG G K (PEG 4-DBCO)-CONH<sub>2</sub>、Ac-DPPenTWEVWGREPenLQG G K (PEG 4-DBCO)-CONH<sub>2</sub>、AcDAPenTWEVWGREPenLQG G K (DBCO)-CONH<sub>2</sub>、Ac-DACT(2Ind)GEV(5MeO)WGRECLQ、GGK(DBCO)-CONH<sub>2</sub>、Ac-DPPenT(2Ind)GEV(5MeO)WGREPenLQG G K (DBCO)-CONH<sub>2</sub>、Ac-DAPenT(2Ind)GEV(5MeO)WGREPen、LQG G K (DBCO)-CONH<sub>2</sub>、Ac-DAPenTWEVWGREPenLQG G K (DBCO)-CONH<sub>2</sub>、Ac-DPCTWEVWGRECLQG G K (PEG 5-DBCO)-CONH<sub>2</sub>、Ac-DACT(2Ind)GEV(5MeO)WGRECLQG G K (DBCO)-CONH<sub>2</sub>、AcDPPenT(2Ind)GEV(5MeO)WGREPenLQG G K (DBCO)-CONH<sub>2</sub>、および AcDAPenT(2Ind)GEV(5MeO)WGREPenLQG G K (DBCO)-CONH<sub>2</sub>、Ac-DPCTWEVWGRECLQG G K (PEG 5-DBCO)

40

50

) - CONH<sub>2</sub>、またはこれらの修飾体からなる群から選択される配列を含むペプチジルリガンドにコンジュゲートさせたPLA-PEGを含むナノ粒子。

【請求項 9】

ペプチジルリガンド分子にコンジュゲートさせた約200～約500の前記PLA-PEGを含む、請求項8に記載のナノ粒子。

【請求項 10】

前記PLA-PEGが、アジド官能化PLA-PEGを反応させ、歪み促進型アルキン-アジド付加環化を使用することにより、前記ペプチジルリガンド分子にコンジュゲートされている、請求項8または9に記載のナノ粒子。

【請求項 11】

前記PLA-PEGのPLAが、約15～約17kDaの数平均分子量を有する、請求項1から10のいずれか一項に記載のナノ粒子。

【請求項 12】

前記PLA-PEGのPEGが、約4～約6kDaの数を有する、請求項1から10のいずれか一項に記載のナノ粒子。

【請求項 13】

請求項1から12のいずれかに記載の複数の治療用ナノ粒子と、薬学的に許容できる添加剤とを含む、薬学的に許容できる組成物。

【請求項 14】

それを必要とする患者において固形腫瘍がんを処置する方法であって、請求項1から13のいずれか一項に記載の治療用ナノ粒子を含む治療有効量の組成物を患者に投与することを含む方法。

【請求項 15】

標的化リガンド-ナノ粒子コンジュゲートを特定する方法であって、

- 1) アジド官能化PLA-PEGナノ粒子を用意するステップと、
  - 2) 潜在的なEGFRリガンドを前記アジドPLA-PEGナノ粒子と接触させて、標的化されたナノ粒子を形成するステップと、
  - 3) リガンド親和性および/またはナノ粒子結合について、前記標的化されたナノ粒子をスクリーニングするステップと、
  - 4) 前記潜在的なEGFRリガンドをモジュレートするステップと、
  - 5) ステップ2～4を繰り返して、所望のリガンド親和性および/または結合を有する標的化されたナノ粒子を得るステップと
- を含む方法。

【請求項 16】

前記スクリーニングが表面プラズモン共鳴を使用することを含む、請求項15に記載の方法。

【請求項 17】

モジュレートすることが、リガンドの1つまたは複数のアミノ酸を置き換えすること、挿入すること、または修飾することを含む、請求項14または15に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連技術への相互参照

本出願は、それぞれ参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、2016年2月10日出願の米国仮出願第62/293,609号、および2016年8月1日出願の米国仮出願第62/369,590号の優先権および利益を主張する。

【背景技術】

【0002】

患者へのある種の薬物を送達する(例えば、特定の組織もしくは細胞型を標的とするか、または正常組織ではなく特定の患部組織を標的とする)か、または薬物の放出を制御す

10

20

30

40

50

る系は、有益であると長い間認識されてきた。

【 0 0 0 3 】

例えば、活性薬物を含み、かつ、特定の組織もしくは細胞型を標的とするか、または正常組織ではなく特定の患部組織を標的とする治療法は、標的とされていない体の組織における薬物の量を低減し得る。周囲の非がん組織を死滅させることなしに細胞毒性用量の薬物ががん細胞に送達されることが望ましい状態、例えば、がんを処置するときに、これは特に重要である。有効な薬物標的化は、抗がん療法においては一般的である、望ましくなく、時には生命を危うくする副作用を低減し得る。さらに、このような治療法は、薬物がその他の治療法では到達することができないある種の組織に到達することを可能にし得る。制御放出および/または標的療法を実現する治療法はまた、有効量の薬物を送達できないけれども、これは他のナノ粒子送達系において公知の制限である。

10

【 0 0 0 4 】

例えば、伝統的ながん処置の主要な制約は、健康な細胞に優先した、がん細胞に対する選択性が不十分であることである。最近では、ナノ医療を使用して腫瘍に抗がん剤を効率よく送達することに向けて相当な量の研究がなされている。固形腫瘍がかなりの栄養素および酸素に依存する結果、血管新生が激しくなり、これがひいては、内皮細胞間の大きな間隙の形成につながる。結果として生じる漏れやすい血管系は、腫瘍において、巨大分子およびナノ粒子の、サイズ依存的な、例えば 200 ~ 800 nm の蓄積をもたらす。この形の受動的な標的化は、ナノ医療にとって遊離薬物に優る利点とはなるが、腫瘍細胞に対するまたは腫瘍細胞中への直接の積荷の送達を確実にするものではない。

20

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 5 】

上皮成長因子受容体 ( E G F R ) は、種々のがんにおいて上方調節され、腫瘍増殖と関連付けられており、ナノ治療標的化のための有望な受容体であると一般にみなされている、十分に理解されている標的である。したがって、E G F R を標的とし得るナノ粒子などの標的化ナノ粒子治療法が求められている。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 6 】

本明細書では、治療剤と上皮成長因子受容体を標的とするリガンドとを含むポリマーナノ粒子、ならびにそのような治療用ナノ粒子を作製および使用する方法を記載する。一部の実施形態では、企図されるナノ粒子は、がんの処置に使用することができる。

30

【 0 0 0 7 】

例えば、本明細書では、治療剤と、ジブロックポリ ( 乳 ) 酸 - ポリ ( エチレン ) グリコールコポリマーまたはジブロックポリ ( 乳 ) 酸 - c o - ポリ ( グリコール ) 酸 - ポリ ( エチレン ) グリコールコポリマーと、P L A - P E G - E G F R リガンドとして表されるポリマーコンジュゲートであって、E G F R リガンドは、直接、間接的に、または化学リンカーを介してP E G に結合または会合しており、P L A は、ポリ ( 乳 ) 酸であり、P E G は、ポリ ( エチレン ) グリコールである、ポリマーコンジュゲートを含む治療用ナノ粒子が提供される。

40

【 0 0 0 8 】

さらに、本明細書では、複数の企図される治療用ナノ粒子を含む薬学的に許容できる組成物、およびそれを必要とする患者において固形腫瘍がんを処置する方法であって、企図される治療用ナノ粒子を含む組成物の治療有効量を患者に投与することを含む方法が提供される。

【 0 0 0 9 】

さらに別の態様では、標的化リガンド - ナノ粒子コンジュゲートを特定する方法であって、1) アジド官能化P L A - P E G ナノ粒子を用意するステップと、2) 潜在的なE G F R リガンドをアジドP L A - P E G ナノ粒子と接触させて、標的化されたナノ粒子を形成するステップと、3) リガンド親和性および/またはナノ粒子結合性について、標的化

50

されたナノ粒子をスクリーニングするステップと、4) 潜在的なEGFRリガンドをモジュレートするステップと、5) ステップ2～4を繰り返して、所望のリガンド親和性および/または結合性を有する標的化されたナノ粒子を得るステップとを含む方法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】開示されるナノ粒子を形成するためのエマルジョンプロセスについてのフローチャートである。

【図2A】開示されるエマルジョンプロセスについての流れ図である。

【図2B】開示されるエマルジョンプロセスについての流れ図である。

【図3A】ポリマー成分PLA-PEG-アジドの、市販品として入手可能なHO-PEG-アジドからの合成を示す図である。

【図3B】ポリマーPLA-Cy5蛍光ペイロードの合成を示す図である。

【図4A】DBCO-アミンのPLA-PEG-アジドへのコンジュゲーションを示す図である。

【図4B】PLA-PEG-アジドと反応したときのDBCOアミンの99%の消費を実証する、クリック反応の液体クロマトグラフィー-質量分析(LCMS)による分析を示すグラフである。

【図4C】アジドナノ粒子に適用したときのDBCOアミンの98%の消費を実証する、クリック反応のLCMS分析を示すグラフである。

【図5】DBCOアルデヒドリンカー(上)、EGFのN末端に対する還元的アミノ化のためのDBCO-アルデヒドの調製、および後続のアジド官能化ナノ粒子へのコンジュゲーション(下)を示す図である。

【図6】EGF-DBCOの、Zeba Spinによる精製後(上)、EGF-DBCOがアジド官能化ナノ粒子にクリックされた後(中)、およびZeba Spinによるナノ粒子の精製後(下)のLCMS分析を示すグラフである。

【図7A】EGF競合ELISAによる、EGFナノ粒子およびDBCOリガンドのEGFRへの結合を示すグラフである( $EGF\ IC_{50} = 1.2\ nM$ 、 $EGF-DBCO\ IC_{50} = 2.3\ nM$ 、 $2.5\ \% EGF\ IC_{50} = 9\ nM$ )。

【図7B】EGFR-Fc表面に結合している、EGF、EGF-DBCO、EGFナノ粒子、および基盤アジドナノ粒子のSPR分析を示すグラフである。挿入グラフは、非修飾EGFからのより低いシグナルおよび基盤アジドナノ粒子の最小限の非特異的結合を拡大したものである。PTNPは、非官能化ナノ粒子を示す。

【図8A】報告されたEGFR結合性ペプチドについてのSPR結合データのプロットを示すグラフである。

【図8B】5%および10%でナノ粒子にコンジュゲートさせた選択された文献ペプチド( $1\ mg/mL$ )のSPR分析を示すグラフである。 $2.5\ \% EGF$ ナノ粒子は比較のために示す。

【図9A】EGF競合ELISAによる、遊離リガンドおよびナノ粒子コンジュゲート結合についての相対的な $IC_{50}$ を示すグラフである。 $P_1$ における各アミノ酸をアラニンにより置き換え、結合への影響を、親ペプチドまたはペプチド-NPと比較した。

【図9B】EGFR競合ELISAによる $P_1$ アラニンスキャンナノ粒子結合を示すグラフである( $P_{1-3}\ IC_{50} = 10.3\ \mu g/mL$ 、 $P_1\ IC_{50} = 211\ \mu g/mL$ )。

【図9C】 $1\ mg/mL$ でのSPRによる $P_1$ および $P_{1-3}\ NP$ 結合を示すグラフである。

【図10】EGFの存在下または非存在下での、5%および10%リガンド密度の $P_2$ -NPコンジュゲート( $1\ mg/mL$ )の親和性のSPR分析を示すグラフである。

【図11】EGFの存在下または非存在下での、( $0.25\ mg/mL$ での) $P_2$ -NPコンジュゲート結合のSPR分析を示すグラフである。

10

20

30

40

50

【図 1 2】EGF / P<sub>2</sub> 二重標的化 NP の相乗的な影響を示すグラフである。PTNP は、非官能化ナノ粒子を示す。

【図 1 3】EGFR の結合に肝要な残基を示す、P<sub>2</sub> ペプチドのアラニンスキャンニングの結果を示すグラフである。親ペプチド P<sub>2</sub> の K<sub>D</sub> に対して、SPR によって測定される相対的な結合親和性が各ペプチドについて示される。\* の値は、グラフに出ているより高い。

【図 1 4】ジアミノ酪酸 (Dab) とアスパラギン酸残基との間の内部アミド結合形成の一例を示す図である。

【図 1 5】ペニシラミン (pen) およびホモシステイン (homocys) の構造を示す図である。

【図 1 6】P<sub>2</sub> の代替ジスルフィド変形形態を示すグラフである。Cys 置き換えは、2 つの位置 (Cys 3 または Cys 1 2) それぞれについて示しており、SPR によって測定される相対的な親和性は、親ペプチド (P<sub>2</sub>) の K<sub>D</sub> と比較したものである。\* の値は、グラフに出ているより高い。

【図 1 7】P<sub>2</sub> - ビオチン二量体を示す図 (上)、およびビオチン化 P<sub>2</sub> 誘導体結合の EGF 濃度への依存を示すグラフ (下) である。

【図 1 8】遊離 P<sub>2</sub> を、1 % および 5 % P<sub>2</sub> にコンジュゲートさせたナノ粒子と比較する、P<sub>2</sub> 競合アッセイ結果を示すグラフである。

【図 1 9】別個の動態プロファイルを有するリガンドによる相乗的な NP 結合を示すグラフである。

【図 2 0】SPR による、最適化された P<sub>2</sub> 類似体の 3 . 2 μM での結合を示すグラフである。

【図 2 1 A】多様な濃度での 5 % P<sub>2</sub> . 2 ナノ粒子の SPR センソグラムを示すグラフである。注入終了時点で、センサー表面上のタンパク質密度に対して正規化した、各用量での結合応答をとり、用量に対してプロットしている。

【図 2 1 B】多様な濃度での 5 % P<sub>2</sub> . 2 ナノ粒子の SPR センソグラムを示すグラフである。センサー表面上のタンパク質密度に対して正規化した、各用量での結合応答を、注入終了時点で測定し、用量に対してプロットしている。

【図 2 1 C】SPR によって測定される、単一アミノ酸置換を有する P<sub>2</sub> 類似体を 5 % のリガンド密度で擁するナノ粒子の、EGF の存在下および非存在下での相対的結合を示すグラフである。

【図 2 2】SPR によって測定される、2 つまたは 3 つのアミノ酸置換を有する P<sub>2</sub> 類似体を 5 % のリガンド密度で擁するナノ粒子にコンジュゲートさせたナノ粒子の、EGF の存在下および非存在下での相対的結合を示すグラフである。

【図 2 3 A】EGF なしで、A<sub>4 3 1</sub> 細胞を結合する EGF R 標的化ナノ粒子を示すグラフである。

【図 2 3 B】50 nM の EGF 存在下で、A<sub>4 3 1</sub> 細胞を結合する EGF R 標的化ナノ粒子を示すグラフである。

【図 2 3 C】EGF、P<sub>1 - 3</sub>、および P<sub>2 / 5 5 / 1 0 2</sub> ナノ粒子結合の比較を示すグラフである。

【図 2 4】表示されたナノ粒子の、フローサイトメトリーによってアッセイされる相対的な結合を示すグラフである。

【図 2 5 A】37 °C での EGF、P<sub>1 - 3</sub>、および P<sub>2 / 5 5 / 1 0 2</sub> ナノ粒子の A<sub>4 3 1</sub> 細胞への全結合および内部移行を示すグラフである。

【図 2 5 B】標的化ナノ粒子の内部移行の速度を示すグラフである。

【図 2 6】HPLC および in vitro 放出によって測定された、37 °C での経時的なナノ粒子からの Cys 5 PLA の放出を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本明細書では、治療剤を含むポリマーナノ粒子、ならびに血液脳関門を超えて効率よく

10

20

30

40

50

往來するかかる治療用 E G F R リガンドと治療剤を作製および使用する方法を記載する。

【 0 0 1 2 】

本明細書では、生体適合性ポリマーと、P L A - P E G - E G F R リガンドとして表されるポリマーコンジュゲートであって、E G F R リガンドは、直接または化学リンカーを介して P E G に共有結合しており、P L A は、ポリ（乳）酸であり、P E G は、ポリ（エチレン）グリコールである、ポリマーコンジュゲートと、治療剤とを含む治療用ナノ粒子が提供される。例えば、開示するナノ粒子は、約 0 . 2 ~ 約 1 0 重量パーセントの P L A - P E G - E G F R リガンドを含む場合がある。

【 0 0 1 3 】

本明細書ではまた、治療剤と、約 5 0 ~ 約 7 0 0 個の P L A - P E G - E G F R リガンド分子と、生体適合性ポリマーとを含む治療用ナノ粒子の流体力学的直径を有する治療用ナノ粒子が提供される。

【 0 0 1 4 】

適切な生体適合性ポリマーは、本明細書に記載しており、一部の実施形態では、ジブロックポリ（乳）酸 - ポリ（エチレン）グリコールコポリマー、ポリ（乳）酸、ジブロックポリ（乳 - c o - グリコール）酸 - ポリ（エチレン）グリコールコポリマー、ポリ（乳 - c o - グリコール）酸、およびこれらの混合物からなる群から選択することができる。例えば、企図されるナノ粒子は、数平均分子量が約 1 5 ~ 約 2 0 k D a であるポリ（乳酸）と、数平均分子量が約 4 ~ 約 6 k D a であるポリ（エチレン）グリコールとを含むジブロックポリ（乳）酸 - ポリ（エチレン）グリコールコポリマーを含む場合がある。開示される治療用ナノ粒子は、約 1 0 ~ 約 9 7 重量パーセントのジブロックポリ（乳）酸 - ポリ（エチレン）グリコールコポリマー、または、ある特定の実施形態では、約 4 0 ~ 約 9 0 重量パーセントのジブロックポリ（乳）酸 - ポリ（エチレン）グリコールコポリマーを含み得る。

【 0 0 1 5 】

一部の実施形態では、開示される P L A - P E G - E G F R リガンドは、数平均分子量が約 1 5 ~ 約 2 0 k D a であるポリ（乳酸）（P L A ）と、数平均分子量が約 4 ~ 約 6 k D a であるポリ（エチレン）グリコール（P E G ）とを含む。P L A - P E G - E G F R リガンドコンジュゲートが、P E G と E G F R リガンドそれ自体との間に、許容される化学および / または高分子リンカーを含んでもよいことは理解される。例えば、本明細書では、アジド官能基を使用して（例えばクリック化学反応によって）P E G にコンジュゲートさせたビオチンと、標的化構築物（E G F R 抗体に結合された抗ビオチン抗体を含む E G F R リガンド）とを有するナノ粒子が提供される。

【 0 0 1 6 】

例えば、開示されるナノ粒子は、トランスフェリン受容体（T e r i ）を標的とするまたはそれに結合するのに有効な、本明細書に記載するものなどのペプチドまたは抗体リガンドを含む。ある特定の実施形態では、ナノ粒子は、特定の比のリガンドがコンジュゲートしたポリマー（例えば、P L A - P E G - E G F R リガンド）と非官能化ポリマー（例えば、P L A - P E G または P L G A - P E G ）とを含む。有効量のリガンドが、疾患または障害、例えば、がんの処置のためのナノ粒子と会合するように、ナノ粒子は、最適化された比のこれらの 2 種のポリマーを有することができる。例えば、リガンド密度の増加は、標的結合（細胞結合 / 標的取込み）を増加させ、ナノ粒子を「標的特異的」とし得る。代わりに、ナノ粒子における非官能化ポリマー（例えば、非官能化 P L G A - P E G コポリマー）のある特定の濃度は、炎症および / または免疫原性（例えば、免疫応答を誘発する能力）を制御し、かつナノ粒子が、疾患または障害の処置のために適した循環半減期を有することを可能とする。さらに、非官能化ポリマーは、一部の実施形態では、細胞内皮系（R E S ）を介した循環器系からのクリアランスの速度を低下し得る。このように、非官能化ポリマーは、投与によって粒子が体内を移動することを可能とし得る特徴を有するナノ粒子を提供し得る。一部の実施形態では、非官能化ポリマーは、それ以外の場合では高濃度になってしまうリガンドを相殺することができる。リガンドが高濃度であったな

10

20

30

40

50

ら、対象によるクリアランスが加速され、標的細胞への送達が低下してしまっていた可能性がある。

【0017】

一部の実施形態では、本明細書において開示されているナノ粒子は、ナノ粒子の全ポリマー組成物（例えば、官能化 + 非官能化ポリマー）の概ね 0.1 ~ 50 モルパーセント、例えば、0.1 ~ 30 モルパーセント、例えば、0.1 ~ 20 モルパーセント、例えば、0.1 ~ 10 モルパーセント、例えば、0.1 ~ 2.5 モルパーセントを構成する、EGFR リガンドにコンジュゲートした官能化ポリマーを含み得る。

【0018】

例えば、本明細書では、ポリマー（例えば PLA - PEG）分子と関連した（例えば、直接、またはリンカーもしくは抗体 / 抗体会合を介して間接的に結合した）概ね 50 ~ 約 1000 個のリガンド、例えば、ポリマー分子と関連した約 50 ~ 約 800、約 100 ~ 約 1000、約 200 ~ 約 900、約 500 ~ 約 900、約 600 ~ 約 900 個のリガンドを含むナノ粒子が提供される。例えば、本明細書では、約 50 ~ 約 800 個の PLA - PEG - リンカー - EGFR リガンド分子が企図される。

10

【0019】

一般に、「ナノ粒子」とは、直径（例えば流体力学的直径）が、1000 nm 未満、例えば約 10 nm ~ 約 200 nm である、任意の粒子を指す。開示されている治療用ナノ粒子は、約 60 ~ 約 120 nm、または約 70 ~ 約 120 nm、または約 80 ~ 約 120 nm、または約 90 ~ 約 120 nm、または約 100 ~ 約 120 nm、または約 60 ~ 約 130 nm、または約 70 ~ 約 130 nm、または約 80 ~ 約 130 nm、または約 90 ~ 約 130 nm、または約 100 ~ 約 130 nm、または約 110 ~ 約 130 nm、または約 60 ~ 約 140 nm、または約 70 ~ 約 140 nm、または約 80 ~ 約 140 nm、または約 90 ~ 約 140 nm、または約 100 ~ 約 140 nm、または約 110 ~ 約 140 nm、または約 60 ~ 約 150 nm、または約 70 ~ 約 150 nm、または約 80 ~ 約 150 nm、または約 90 ~ 約 150 nm、または約 100 ~ 約 150 nm、または約 110 ~ 約 150 nm、または約 120 ~ 約 150 nm の直径を有するナノ粒子を含み得る。例えば、開示されるナノ粒子は、約 50 ~ 約 140 nm、約 60 ~ 130 nm、約 70 ~ 約 140 nm の流体力学的直径を有する場合がある。

20

【0020】

ポリマー

一部の実施形態では、ナノ粒子は、ポリマーのマトリックスと、治療剤とを、含んでもよい。一部の実施形態では、治療剤および / または標的化部分（例えば、EGFR 抗体またはペプチド）は、ポリマーマトリックスの少なくとも一部と会合させることができる。例えば、一部の実施形態では、標的化部分（例えば、EGFR リガンド）は、ポリマーマトリックスの表面と共有結合的に会合させることができる。一部の実施形態では、共有結合的会合は、リンカーによって媒介される。治療剤は、ポリマーマトリックスの表面と会合するか、ポリマーマトリックス内にカプセル化されるか、ポリマーマトリックスによって囲まれるか、かつ / またはポリマーマトリックスにわたって分散し得る。

30

【0021】

多種多様のポリマーおよびそこから粒子を形成する方法は、薬物送達の当技術分野において公知である。一部の実施形態では、本開示は、少なくとも 2 つの巨大分子を有するナノ粒子を対象とし、第 1 の巨大分子は、低分子量リガンド（例えば、標的化部分）に結合した第 1 のポリマーを含み、第 2 の巨大分子は、標的化部分に結合していない第 2 のポリマーを含む。ナノ粒子は、1 種または複数のさらなる非官能化ポリマーを場合により含むことができる。

40

【0022】

任意の適切なポリマーを、開示されているナノ粒子において使用することができる。ポリマーは、天然または非天然（合成）のポリマーでよい。ポリマーは、2 種またはそれ超のモノマーを含むホモポリマーまたはコポリマーでよい。配列に関して、コポリマーは、

50



ランダム、ブロックでよい、またはランダムおよびブロック配列の組合せを含むことができる。典型的には、ポリマーは、有機ポリマーである。

【0023】

用語「ポリマー」は、本明細書において使用する場合、当技術分野で使用されるようなその通常の意味を与えられ、すなわち、分子構造は、共有結合によって連結した1つまたは複数の繰り返し単位（モノマー）を含む。繰り返し単位は、全て同一であり得るか、または場合によって、ポリマー内に存在する2種以上のタイプの繰り返し単位があり得る。場合によって、ポリマーは、生物学的に由来するもの、例えば、生体ポリマーでよい。場合によって、さらなる部分、例えば、生物学的部分、例えば、下記に記載したものがまた、ポリマー中に存在し得る。2種以上のタイプの繰り返し単位がポリマー内に存在する場合、ポリマーは、「コポリマー」と言われる。ポリマーを用いる任意の実施形態では、用いられるポリマーは、場合によって、コポリマーであり得ることを理解すべきである。コポリマーを形成する繰り返し単位は、任意の様式で配置し得る。例えば、繰り返し単位は、ランダムな順序で、交互の順序で、またはブロックコポリマーとして配置してもよく、すなわち、それぞれが第1の繰り返し単位（例えば、第1のブロック）を含む1つまたは複数の領域、およびそれぞれが第2の繰り返し単位（例えば、第2のブロック）を含む1つまたは複数の領域などを含む。ブロックコポリマーは、2つ（ジブロックコポリマー）、3つ（トリブロックコポリマー）、またはそれ超の数の別個のブロックを有し得る。

10

【0024】

開示されている粒子は、コポリマーを含むことができ、これは一部の実施形態では、通常、2種またはそれ超のポリマーが一緒に共有結合によって互いに会合している、2種またはそれ超のポリマー（例えば、本明細書に記載されているもの）を説明する。このように、コポリマーは、第1のポリマーおよび第2のポリマーを含んでもよく、これらは一緒にコンジュゲートされて、ブロックコポリマーを形成し、第1のポリマーは、ブロックコポリマーの第1のブロックでよく、第2のポリマーは、ブロックコポリマーの第2のブロックでよい。当然ながら、ブロックコポリマーは、場合によって、ポリマーの複数のブロックを含有してもよく、「ブロックコポリマー」は、本明細書において使用する場合、単一の第1のブロックおよび単一の第2のブロックのみを有するブロックコポリマーのみに限定されないことを当業者は理解する。例えば、ブロックコポリマーは、第1のポリマーを含む第1のブロック、第2のポリマーを含む第2のブロック、および第3のポリマーまたは第1のポリマーなどを含む第3のブロックを含み得る。場合によって、ブロックコポリマーは、任意の数の第1のポリマーの第1のブロック、および第2のポリマーの第2のブロック（およびある特定の場合では、第3のブロック、第4のブロックなど）を含有することができる。さらに、ブロックコポリマーはまた、場合によって、他のブロックコポリマーから形成することができることに留意すべきである。例えば、第1のブロックコポリマーは、別のポリマー（ホモポリマー、生体ポリマー、別のブロックコポリマーなどでよい）にコンジュゲートして複数のタイプのブロックを含有する新規なブロックコポリマーを形成し、かつ/または他の部分（例えば、非ポリマー部分）にコンジュゲートし得る。

20

30

【0025】

一組の実施形態では、本明細書において企図されるポリマー（例えば、コポリマー、例えば、ブロックコポリマー）は、生体適合性ポリマー、すなわち、典型的には、生きている対象中に挿入または注射されたとき、例えば、T細胞応答によるかなりの炎症および/または免疫系によるポリマーの急性拒絶を伴わずに有害な応答を惹起しないポリマーを含む。したがって、本明細書において企図される治療用粒子は、非免疫原性であり得る。非免疫原性という用語は、本明細書において使用する場合、循環抗体、T細胞、もしくは反応性免疫細胞を通常引き起こさないか、または最小レベルのみを引き起こし、個体においてそれ自体に対する免疫応答を通常引き起こさない、その天然状態における内在性成長因子を指す。

40

【0026】

50

生体適合性は典型的には、免疫系の少なくとも一部による材料の急性拒絶を指し、すなわち、対象中に植え込んだ非生体適合性材料が、対象において十分に重大であり得る免疫応答を誘発し、免疫系による材料の拒絶は、適当に制御することができず、材料を対象から除去しなくてはならないような程度であることが多い。生体適合性を決定するための1つの単純な試験は、ポリマーを細胞へと *in vitro* で曝露させることでよい。生体適合性ポリマーは、典型的には中程度の濃度で、例えば、50 マイクログラム /  $10^6$  個の細胞の濃度でかなりの細胞死をもたらさないポリマーである。例えば、生体適合性ポリマーは、細胞、例えば、線維芽細胞または上皮細胞に曝露したとき、たとえこのような細胞によって貪食されるか、そうでなければ取り込まれるかしても、約20%未満の細胞死をもたらし得る。様々な実施形態において有用であり得る生体適合性ポリマーの非限定的例には、ポリジオキサノン (PDO)、ポリヒドロキシアルカノエート、ポリヒドロキシブチレート、ポリ(グリセロールセバシン酸)、ポリグリコリド(すなわち、ポリ(グリコール)酸)(PGA)、ポリラクチド(すなわち、ポリ(乳)酸)(PLA)、ポリ(乳)酸-co-ポリ(グリコール)酸(PLGA)、ポリカプロラクトン、またはこれらおよび/もしくは他のポリマーを含めたコポリマーまたは誘導体が含まれる。

10

20

30

40

50

#### 【0027】

ある特定の実施形態では、企図される生体適合性ポリマーは、生分解性でよく、すなわち、ポリマーは、生理学的環境内、例えば、体内で、化学的および/または生物学的に分解することができる。本明細書において使用する場合、「生分解性」ポリマーは、細胞中に導入されるとき、細胞の機構によって(生物学的に分解可能)、および/または化学プロセス、例えば、加水分解によって(化学的に分解可能)、細胞に対してかなりの毒性効果を伴わずに細胞が再使用または処分することができる成分へと分解されるものである。一実施形態では、生分解性ポリマーおよびこれらの分解副生成物は、生体適合性であり得る。

#### 【0028】

本明細書において開示されている粒子は、PEGを含有してもよい、またはしなくてもよい。さらに、ある特定の実施形態は、ポリ(エステル-エーテル)を含有するコポリマー、例えば、エステル結合(例えば、 $R-C(O)-O-R'$  結合)およびエーテル結合(例えば、 $R-O-R'$  結合)によって結合した繰り返し単位を有するポリマーを対象とすることができる。一部の実施形態では、生分解性ポリマー、例えば、カルボン酸基を含有する加水分解性ポリマーは、ポリ(エチレングリコール)繰り返し単位とコンジュゲートして、ポリ(エステル-エーテル)を形成し得る。ポリ(エチレングリコール)繰り返し単位を含有するポリマー(例えば、コポリマー、例えば、ブロックコポリマー)はまた、「ペグ化」ポリマーと称することができる。

#### 【0029】

一部の実施形態では、ポリマーは、本明細書において「PLGA」と集団的に称される、乳酸およびグリコール酸単位を含むコポリマー、例えば、ポリ(乳酸-co-グリコール酸)およびポリ(ラクチド-co-グリコリド)；ならびに本明細書において「PGA」と称される、グリコール酸単位、ならびに本明細書において「PLA」と集団的に称される、乳酸単位、例えば、ポリ-L-乳酸、ポリ-D-乳酸、ポリ-D,L-乳酸、ポリ-L-ラクチド、ポリ-D-ラクチド、およびポリ-D,L-ラクチドを含むホモポリマーを含めた、ポリエステルであり得る。一部の実施形態では、例示的なポリエステルには、例えば、ポリヒドロキシ酸；ラクチドおよびグリコリドのペグ化ポリマーおよびコポリマー(例えば、ペグ化PLA、ペグ化PGA、ペグ化PLGA、およびその誘導体)が含まれる。一部の実施形態では、ポリエステルは、例えば、ポリ無水物、ポリ(オルトエステル)ペグ化ポリ(オルトエステル)、ポリ(カプロラクトン)、ペグ化ポリ(カプロラクトン)、ポリリシン、ペグ化ポリリシン、ポリ(エチレンイミン)、ペグ化ポリ(エチレンイミン)、ポリ(L-ラクチド-co-L-リシン)、ポリ(セリンエステル)、ポリ(4-ヒドロキシ-L-プロリンエステル)、ポリ[ $-(4-アミノブチル)-L-グリコール酸]$ 、およびその誘導体を含む。

## 【0030】

一部の実施形態では、ポリマーは、PLGAであり得る。PLGAは、乳酸およびグリコール酸の生体適合性および生分解性コポリマーであり、様々な形態のPLGAは、乳酸：グリコール酸の比によって特性決定することができる。乳酸は、L-乳酸、D-乳酸、またはD, L-乳酸でよい。PLGAの分解速度は、乳酸-グリコール酸の比を変化させることによって調節することができる。一部の実施形態では、PLGAは、概ね85：15、概ね75：25、概ね60：40、概ね50：50、概ね40：60、概ね25：75、または概ね15：85の乳酸：グリコール酸比によって特性決定することができる。一部の実施形態では、粒子のポリマー（例えば、PLGAブロックコポリマーまたはPLGA-PEGブロックコポリマー）中の乳酸のグリコール酸モノマーに対する比を選択して、様々なパラメータ、例えば、水の取込み、治療剤の放出および/またはポリマー分解の反応速度について最適化し得る。

10

## 【0031】

PLA-PEGコポリマーの一部としてのPEGは、例えば、リガンドにコンジュゲートされていない場合、末端し、末端基を含む場合もあることが企図される。例えば、PEGは、ヒドロキシル、メトキシもしくは他のアルコキシル基、メチルもしくは他のアルキル基、アリール基、カルボン酸、アミン、アミド、アセチル基、グアニジノ基、またはイミダゾールで末端し得る。他の企図される末端基には、アジド、アルキン、マレイミド、アルデヒド、ヒドラジド、ヒドロキシルアミン、アルコキシアミン、またはチオール部分が含まれる。

20

## 【0032】

当業者は、例えば、開環重合技術（ROMP）などによって、ポリマーをアミンで終端しているPEG基に反応させるEDC（1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩）およびNHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）を使用することによって、ポリマーをペグ化するための方法および技術について知っている。

## 【0033】

開示されている粒子は、例えば、PEGおよびPL(G)Aのジブロックコポリマーを含むことができ、例えば、PEG部分は、約1,000～20,000、例えば、約2,000～20,000、例えば、約2～約10,000（例えば、約5 kDa）の数平均分子量を有してもよく、PL(G)A部分は、約5,000～約20,000、または約5,000～100,000、例えば、約20,000～70,000、例えば、約15,000～50,000（例えば、約16 kDa）の数平均分子量を有してもよい。

30

## 【0034】

例えば、約10～約99重量パーセントのポリ（乳）酸-ポリ（エチレン）グリコールコポリマーまたはポリ（乳）酸-co-ポリ（グリコール）酸-ポリ（エチレン）グリコールコポリマー、または約20～約80重量パーセント、約40～約80重量パーセント、もしくは約30～約50重量パーセント、もしくは約70～約90重量パーセントのポリ（乳）酸-ポリ（エチレン）グリコールコポリマーまたはポリ（乳）酸-co-ポリ（グリコール）酸-ポリ（エチレン）グリコールコポリマーを含む例示的な治療用ナノ粒子が本明細書において開示される。例示的なポリ（乳）酸-ポリ（エチレン）グリコールコポリマーは、約15～約20 kDa、または約10～約25 kDaの数平均分子量のポリ（乳）酸および約4～約6 kDa、または約2 kDa～約10 kDaの数平均分子量のポリ（エチレン）グリコールを含むことができる。

40

## 【0035】

一部の実施形態では、ポリ（乳）酸-ポリ（エチレン）グリコールコポリマーは、約0.6～約0.95、一部の実施形態では、約0.7～約0.9、一部の実施形態では、約0.6～約0.8、一部の実施形態では、約0.7～約0.8、一部の実施形態では、約0.75～約0.85、一部の実施形態では、約0.8～約0.9、および一部の実施形態では、約0.85～約0.95の数平均分子量比率のポリ（乳）酸を有し得る。ポリ（乳）酸の数平均分子量比率は、コポリマーのポリ（乳）酸成分の数平均分子量を、ポリ（

50

乳)酸成分の数平均分子量およびポリ(エチレン)グリコール成分の数平均分子量の合計で除することによって計算し得ることを理解すべきである。

【0036】

開示されているナノ粒子は、約1～約50重量パーセントのポリ(乳)酸またはポリ(乳)酸-c o -ポリ(グリコール)酸(P E Gを含まない)を場合により含んでいてもよい、または約1～約50重量パーセント、もしくは約10～約50重量パーセントもしくは約30～約50重量パーセントのポリ(乳)酸もしくはポリ(乳)酸-c o -ポリ(グリコール)酸を場合により含んでいてもよい。例えば、ポリ(乳)酸またはポリ(乳)酸-c o -ポリ(グリコール)酸は、約5～約15 k D a、または約5～約12 k D aの数平均分子量を有し得る。例示的なP L Aは、約5～約10 k D aの数平均分子量を有し得る。例示的なP L G Aは、約8～約12 k D aの数平均分子量を有し得る。

10

【0037】

治療用ナノ粒子は、一部の実施形態では、約10～約30重量パーセント、一部の実施形態では、約10～約25重量パーセント、一部の実施形態では、約10～約20重量パーセント、一部の実施形態では、約10～約15重量パーセント、一部の実施形態では、約15～約20重量パーセント、一部の実施形態では、約15～約25重量パーセント、一部の実施形態では、約20～約25重量パーセント、一部の実施形態では、約20～約30重量パーセント、または一部の実施形態では、約25～約30重量パーセントのポリ(エチレン)グリコールを含有してもよく、ポリ(エチレン)グリコールは、ポリ(乳)酸-ポリ(エチレン)グリコールコポリマー、ポリ(乳)酸-c o -ポリ(グリコール)酸-ポリ(エチレン)グリコールコポリマー、またはポリ(エチレン)グリコールホモポリマーとして存在し得る。

20

【0038】

E G F Rリガンド

本明細書では、E G F Rリガンドを含み得るナノ粒子が提供される。企図されるE G F R部分は、低分子、ペプチド、またはタンパク質を含み得る。標的化部分は、抗体とすることができ、この用語は、抗体の特徴的な部分である抗体断片を含むものとする。抗体断片には、s c F v、F v、s c F a b、F a b、V H H、またはF ( a b ' ) 2を含めることができる。単鎖標的化部分は、例えば、ファージディスプレイなどの手順を使用して同定することができる。標的化部分は、約50残基までまたはそれを超える長さを有する、標的化ペプチドまたは標的化ペプチド模倣物でよい。開示されるポリマーコンジュゲートは、適切でないかなるコンジュゲーション技術を使用して形成してもよい。

30

【0039】

本明細書で開示するE G F R標的化部分は、一部の実施形態では、開示されるポリマーまたはコポリマー(例えばP L A - P E G)にコンジュゲートさせることができ、そのようなポリマーコンジュゲートが、開示されるナノ粒子の一部を形成する場合もある。例えば、銅を媒介としたアルキン-アジド付加環化化学(C u A A C)を使用して、E G F R標的化ペプチドをP L A - P E Gに、例えば、ナノ粒子の表面上のP E Gに、コンジュゲートさせることができる。別の実施形態では、歪み促進型アジドアルキン付加環化(S P A A C)化学を使用してよい。例えば、(かなり安定であり得る)P E G末端に、またナノ粒子表面上に、標的化リガンドそれ自体ではなく、アジド基を呈する、大規模単一バッチのP L A - P E G - アジドポリマーを合成することができる。このポリマーを用いて形成されたナノ粒子は、ナノ粒子表面上にいくつかのアジド基を有し、対応する歪みアルキン官能基を有するリガンドに、種々の密度で結合させることができる。このようにして、多くの標的化リガンドを1桁のミリグラム量で合成し、ナノ粒子コンジュゲートとしての結合についてスクリーニングすることができる。例えば、ポリマー添加剤および標的化リガンド上のより安定したアジド(N<sub>3</sub>)基を、反応性ジベンゾシクロオクチン部分(D B C O)で官能化することができる。

40

【0040】

他の実施形態では、E G F Rリガンドおよび生体適合性ポリマー(例えば、生体適合性

50

ポリマーおよびポリ(エチレングリコール)は、EDC-NHS 化学反応(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩およびN-ヒドロキシスクシンイミド)などの技術、またはチオール、アミン、または同様に官能化されたポリエーテルの1つの末端にコンジュゲートすることができるマレイミドもしくはカルボン酸が関与する反応を使用して一緒にコンジュゲートし得る。ポリマー-標的化部分コンジュゲートまたはポリマー-薬物コンジュゲートを形成させる標的化部分または薬物およびポリマーのコンジュゲーションは、これらに限定されないが、ジクロロメタン、アセトニトリル、クロロホルム、ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン、アセトンなどなどの有機溶媒中で行うことができる。特定の反応条件は、単に通例の実験法を使用して当業者が決定することができる。

10

#### 【0041】

別の組の実施形態では、コンジュゲーション反応は、カルボン酸官能基(例えば、ポリ(エステル-エーテル)化合物)を含むポリマーと、アミンを含むポリマーまたは他の部分(例えば、EGFR部分)とを反応させることによって行い得る。例えば、標的化部分は、アミンと反応して、アミン含有部分を形成してもよく、これは次いで、ポリマー(例えば、PEG)のカルボン酸にコンジュゲートすることができる。このような反応は、単一ステップの反応として起こり得、すなわち、コンジュゲーションは、中間体、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミドまたはマレイミドを使用することなく行われる。一部の実施形態では、EGFR部分は、リンカー、例えばアミン含有リンカーと反応して、アミン含有部分を形成してもよく、次いで、これは上記のようなポリマーのカルボン酸にコンジュゲートすることができる。アミン含有部分およびカルボン酸末端ポリマー(例えば、ポリ(エステル-エーテル)化合物)の間のコンジュゲーション反応は、一組の実施形態では、(これらに限定されないが)ジクロロメタン、アセトニトリル、クロロホルム、テトラヒドロフラン、アセトン、ホルムアミド、ジメチルホルムアミド、ピリジン、ジオキサン、またはジメチルスルホキシドなどの有機溶媒に可溶化したアミン含有部分を、カルボン酸末端ポリマーを含有する溶液に加えることによって達成し得る。カルボン酸末端ポリマーは、これらに限定されないが、ジクロロメタン、アセトニトリル、クロロホルム、ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン、またはアセトンなどの有機溶媒中に含有し得る。アミン含有部分およびカルボン酸末端ポリマーの間の反応は、場合によって、自発的に起こり得る。コンジュゲートしていない反応物は、このような反応の後に洗い流してもよく、ポリマーは、溶媒、例えば、エチルエーテル、ヘキサン、メタノール、またはエタノール中で沈殿し得る。ある特定の実施形態では、コンジュゲートは、ポリマーのアルコール含有部分およびカルボン酸官能基の間に形成してもよく、これはアミンおよびカルボン酸のコンジュゲートについて上で記載したのと同様に達成することができる。

20

30

#### 【0042】

例えば、開示されるナノ粒子の一部としての、本明細書で企図されるEGFRリガンドには、次の配列(またはその一部分): YHWYGYTPQNV I、LARLLT、CEHGAMEIC、AKFNDYWRW、TDCVIFGLETYCLR、SGCLDALWQCVY、LPDDSLPELICKVR、GPCVLIRDY YLLCLE、VLC HRY YHPICYT、MFCFRWYAGWSCVS、HFYPTKTPGY、AASRALWAFNSD、SYWYWG YTVDIRRG GK、DPCTWEVWGRECLQ、およびSECFPLAPDWLSCILを含むペプチドが含まれる。EGFRペプチドを、非天然アミノ酸、重水素化アミノ酸などを含むように修飾してもよいことは理解される。例えば、開示される配列のトリプトファンを、フェニルアラニン、アラニン、および/または他の天然もしくは非天然アミノ酸により置き換えることができる。追加の実施形態では、EGFRリガンドを、反応性ジベンゾシクロオクチン部分(DBCO)を使用して修飾してもよい。

40

#### 【0043】

例えば、企図されるEGFRリガンドには、約1200~約1900のMWを有するペプチドが含まれる。例示的な修飾EGFRペプチドは、Ac-DPCTWEVWGREC

50

L Q G G K ( P E G 4 - D B C O ) - C O N H 2、A c - D A C T W E V W G R E C L Q  
 G G K ( P E G 4 - D B C O ) - C O N H 2、A c - D P C T ( 2 I n d ) G E V ( 5 M  
 e O ) W G R E C L Q G G K ( P E G 4 - D B C O ) - C O N H 2、A c - D P P e n T  
 W E V W G R E P e n L Q G G K ( P E G 4 - D B C O ) - C O N H 2、A c D A P e n  
 T W E V W G R E P e n L Q G G K ( D B C O ) - C O N H 2、A c - D A C T ( 2 I n  
 d ) G E V ( 5 M e O ) W G R E C L Q、G G K ( D B C O ) - C O N H 2、A c - D P  
 P e n T ( 2 I n d ) G E V ( 5 M e O ) W G R E P e n L Q G G K ( D B C O ) - C O  
 N H 2、A c - D A P e n T ( 2 I n d ) G E V ( 5 M e O ) W G R E P e n、L Q G G  
 K ( D B C O ) - C O N H 2、A c - D A P e n T W E V W G R E P e n L Q G G K ( D  
 B C O ) - C O N H 2、A c - D P C T W E V W G R E C L Q G G K ( P E G 5 - D B C  
 O ) - C O N H 2、A c - D A C T ( 2 I n d ) G E V ( 5 M e O ) W G R E C L Q G G  
 K ( D B C O ) - C O N H 2、A c D P P e n T ( 2 I n d ) G E V ( 5 M e O ) W G R  
 E P e n L Q G G K ( D B C O ) - C O N H 2、および A c D A P e n T ( 2 I n d ) G  
 E V ( 5 M e O ) W G R E P e n L Q G G K ( D B C O ) - C O N H 2、またはこれらの  
 断片からなる群から選択される配列を含む。

10

#### 【 0 0 4 4 】

一実施形態では、(例えば、官能化する / E G F R リガンドに直接または間接的に結合  
 (例えば共有結合)させることのできるアジド基で)官能化された P L A - P E G を有す  
 るナノ粒子が本明細書において提供される。開示されるナノ粒子には、全 P E G 末端基の  
 約 1 0 %、約 2 0 %、約 3 0 % をナノ粒子表面上に有する、官能化された P L A - P E G  
 - (例えば、約 1 0 % ~ 約 4 0 % 官能化 P L A - P E G - アジドを含めることができる (例  
 えば、後続のコンジュゲーションによって、アジドで官能化された、リガンドを有する  
 ナノ粒子となる)。例えば、開示されるナノ粒子は、例えば、( G l y - G l y スペー  
 ーを含む) C 末端のリシン側鎖に対して、約 4 ~ 約 1 2 % のリガンド密度 (例えば、約 5  
 % または約 1 0 % のリガンド密度)を有し、次いで、アジドナノ粒子にコンジュゲートさ  
 せることができる。開示されるナノ粒子は、例えば、ナノ粒子 1 個あたり約 2 0 0 ~ 約 5  
 0 0 個の E G F R リガンド、または約 2 2 5 個、または約 4 5 0 個のリガンド (例えば、  
 約 2 0 0 ~ 約 2 3 0 個のリガンドまたは約 4 0 0 ~ 約 5 0 0 0 個のリガンド)を有する場  
 合がある。

20

#### 【 0 0 4 5 】

##### 治療剤

本開示によれば、例えば、治療剤 (例えば、抗がん剤)、診断薬 (例えば、造影剤、放  
 射性核種、ならびに蛍光、発光、および磁気部分)、予防薬 (例えば、ワクチン)、およ  
 び / または栄養剤 (例えば、ビタミン、無機質など)を含むいかなる薬剤も、開示される  
 ナノ粒子によって送達することができる。送達される、かつ / または開示されるナノ粒子  
 の一部を形成する、例示的な薬剤には、限定はしないが、低分子 (例えば、細胞傷害性薬  
 剤)、核酸 (例えば、s i R N A、R N A i、およびマイクロ R N A 剤)、タンパク質 (例  
 えば、抗体)、ペプチド、脂質、炭水化物、ホルモン、金属、放射性元素および化合物  
 、薬物、ワクチン、免疫薬など、および / またはこれらの組合せが含まれる。

30

#### 【 0 0 4 6 】

活性剤または薬物は、抗新生物剤、例えば、m T o r 阻害剤 (例えば、シロリムス、テ  
 ムシロリムス、またはエベロリムス)、ピンカアルカロイド、例えば、ピンクリスチン、  
 ジテルペン誘導体、またはタキサン、例えば、パクリタキセル (またはその誘導体、例  
 えば、D H A - パクリタキセルもしくは P G - パクリタキセル) またはドセタキセルなどの  
 、治療剤でよい。

40

#### 【 0 0 4 7 】

上で論じたとおり、開示されるナノ粒子は、治療剤を含有し得る。企図される薬剤には  
 、タキサン薬剤、キナーゼ阻害剤などの化学療法剤が含まれる。例えば、開示されるナノ  
 粒子は、(例えば、治療剤) E G F R キナーゼ阻害剤の 1 つまたは複数、例えば、ゲフィ  
 チニブ、エルロトニブ ( e r l o t n i n b )、および / またはラバチニブの 1 つもし

50

くは複数を含む場合がある。イマチニブ、ニロチニブ、ダサチニブ、ボスチニブ、ボナチニブ、パフェチニブ (b a f e t i n i b) などのチロシンキナーゼ阻害剤を含有するナノ粒子も企図される。ナノ粒子のいずれかの実施形態において、ダサチニブを、イマチニブ、ニロチニブ、ダサチニブ、ボスチニブ、ボナチニブ、パフェチニブ、または、例えば、他のいずれかの B c r - A b l チロシンキナーゼ阻害剤の代わりに用いてもよいことになる。

#### 【0048】

一組の実施形態において、治療剤は、薬物または2種以上の薬物の組合せである。例示的な組合せまたは単独治療剤には、化学療法剤、例えば、ドキソルビシン (アドリアマイシン)、ゲムシタピン (g e m z a r)、ダウノルビシン、プロカルバジン、マイトマイシン、シタラビン、エトポシド、メトトレキサート、ベノレルビン (v e n o r e l b i n e)、5 - フルオロウラシル (5 - F U)、ビンブラスチンやピンクリスチンなどのビンカルカロイド、プレオマイシン、パクリタキセル (t a x o l)、ドセタキセル (t a x o t e r e)、カバジタキセル、アルデスロイキン、アスバラギナーゼ、ブスルファン、カルボプラチン、クラドリビン、カンプトテシン、C P T - 11、10 - ヒドロキシ - 7 - エチルカンプトテシン (S N 3 8)、ダカルバジン、S - I カペシタピン、フトラフル、5' - デオキシフルオロウリジン、U F T、エニルウラシル、デオキシシチジン、5 - アザシトシン、5 - アザデオキシシトシン、アロプリノール、2 - クロロアデノシン、トリメトレキサート、アミノプテリン、メチレン - 10 - デアザアミノプテリン (M D A M)、オキサプラチン、ピコプラチン、テトラプラチン (t e t r a p l a t i n)、サトラプラチン、白金 - D A C H、オルマプラチン、C I - 973、J M - 216、およびそれらの類似体、エピルビシン、リン酸エトポシド、9 - アミノカンプトテシン、10, 11 - メチレンジオキシカンプトテシン、カレニテシン、9 - ニトロカンプトテシン、T A S 103、ビンデシン、L - フェニルアラニンマスタード、イホスファミドメホスファミド、ペルホスファミド、トロホスファミドカルムスチン、セムスチン、エポチロン A ~ E、トムデックス、6 - メルカプトブリン、6 - チオグアニン、アムサクリン、リン酸エトポシド、カレニテシン、アシクロビル、バラシクロビル、ガンシクロビル、アマンタジン、リマンタジン、ラミブジン、ジドブジン、ベバシズマブ、トラスツズマブ、リツキシマブ、5 - フルオロウラシル、ならびにこれらの組合せが含まれる。

#### 【0049】

開示されるナノ粒子の一部を形成し得る潜在的に適切な単独または配合薬物の非限定的な例としては、例えば、カバジタキセル、ミトキサントロン、およびミトキサントロン塩酸塩を含む抗がん剤が挙げられる。別の実施形態では、ペイロードは、20 - e p i - 1、25ジヒドロキシビタミンD3、4 - イボメアノール (4 - i p o m e a n o l)、5 - エチニルウラシル、9 - ジヒドロタキソール、アビラテロン、アシビシン、アクラルピシン、アコダゾール塩酸塩 (a c o d a z o l e h y d r o c h l o r i d e)、アクロニン、アシルフィイルベン (a c y l f i i l v e n e)、アデシペノール (a d e c y p e n o l)、アドゼレシン、アルデスロイキン、全 t k 拮抗薬、アルトレタミン、アンバムスチン (a m b a m u s t i n e)、アンボマイシン (a m b o m y c i n)、酢酸アメタントロン (a m e t a n t r o n e a c e t a t e)、アミドクス (a m i d o x)、アミフォスチン、アミノグルテチミド、アミノレプリン酸、アムルビシン、アムサクリン、アナグレリド、アナストロゾール、アンドログラホリド (a n d r o g r a p h o l i d e)、血管新生阻害剤、アンタゴニストD、アンタゴニストG、アンタレリクス、アントラマイシン、抗背方化形態形成タンパク質1、抗エストロゲン薬、抗新生物薬、アンチセンスオリゴヌクレオチド、グリシン酸アフィディコリン、アボトーシス遺伝子モジュレーター、アボトーシスレギュレーター、アプリン酸、A R A - C D P - D L - P T B A、アルギニンデアミナーゼ、アスバラギナーゼ、アスペルリン (a s p e r l i n)、アスラクリン (a s u l a c r i n e)、アタメスタン、アトリムスチン (a t r i m u s t i n e)、アキシナスタチン1 (a x i n a s t a t i n 1)、アキシナスタチン2、アキシナスタチン3、アザシチジン、アザセトロン、アザトキシン、アザチロシン

(azatyrrosine)、アゼテパ、アゾトマイシン(azotomycin)、バ  
 ッカチンIII誘導体、パラノール、パチマスタット、ベンゾクロリン、ベンゾデパ(benzodepa)、ベンゾイルスタウロスポリン(benzoylstauropo  
 rine)、ベータラクタム誘導体、ベータ-アレチン(beta-alethine)  
 、ベタクラマイシンB(betaclamycinB)、ベツリン酸、BFGF阻害剤、  
 ビカルタミド、ビスアントレン、ビスアントレン塩酸塩、ビスアズイジニルスperlmin(bi  
 sazuidinylspermine)、ビスナフィド(bisnafide)、ジメ  
 シル酸ビスナフィド(bisnafide dimesylate)、ビストラテンA(bi  
 strateneneA)、ピセレシン、プレオマイシン、硫酸プレオマイシン、BRC  
 /ABL拮抗薬、プレフレート(breflate)、プレキナルナトリウム、プロピリ 10  
 ミン、ブドチタン(budotitane)、ブスルファン、ブチオニンスルホキシミン  
 、カクチノマイシン(cactinomycin)、カルシボトリオール、カルホスチン  
 C、カルステロン(calusterone)、カンプトテシン誘導体、カナリア痘IL  
 -2、カベシタピン、カラセライド(caraceraide)、カバジタキセル、カル  
 ベチマー(carbetimer)、カルボプラチン、カルボキサミド-アミノ-トリア  
 ザール、カルボキシアミドトリアザール(carboxyamidotriazole)  
 、カレストM3(carestM3)、カルムスチン、earn700、軟骨由来阻害剤  
 、カルピシン塩酸塩、カルゼレシン(carzelesin)、カゼインキナーゼ阻害剤  
 、カスタノスperlニン(castanospernrnine)、セクロピンB、セデフィ  
 ンゴール(cedefingol)、セトロレリクス、クロラムブシル、クロリン、クロ 20  
 ロキノキサリンスルホンアミド(chloroquinoxaline sulfona  
 mide)、シカプロスト(cicaprost)、シロレマイシン(cirolemy  
 cin)、シスプラチン、cis-ポルフィリン、クラドリピン、クロミフェン類似体、  
 クロトリマザール、コリスマイシン(collismycin)A、コリスマイシンB、  
 コンプレタスタチンA4、コンプレタスタチン類似体、コナゲニン(conagenin)  
 、クランベシジン816(crambescidin 816)、クリスナトール(c  
 risnatol)、メシル酸クリスナトール、クリプトフィシン8、クリプトフィシン  
 A誘導体、キュラシンA(curacin A)、シクロペンタアントラキノ、シクロ  
 ホスファミド、シクロプラタム(cycloplatam)、シペマイシン(cypem  
 ycin)、シタラビン、シタラビンオクホスフェート(cytarabine oc 30  
 fosfate)、細胞溶解因子、シトスタチン(cytostatin)、ダカルバジン  
 、ダクリキシマブ(dacliximab)、ダクチノマイシン、ダウノルピシン塩酸塩  
 、デシタピン、デヒドロジデムニンB(dehydrodidemninnB)、デスロレ  
 リン、デキシホスファミド(dexifosfamide)、デキシソルマプラチン(de  
 xormaplatin)、デクスラゾキサン、デクスベラバミル、デザグアニン(de  
 zaguanine)、メシル酸デザグアニン(dezaguanine mesyla  
 te)、ジアジクオン(diaziquone)、ジデムニンB、ジドクス(didox  
 )、ジエチヒオルスperlmin(diethyhiorspermine)、ジヒドロ-5  
 -アザシチジン、ジオキサマイシン(dioxamycin)、ジフェニルスperlムスチ  
 ン(diphenyl spiromustine)、ドセタキセル、ドコサノール、ドラ 40  
 セトロン、ドキシフルリジン、ドキソルピシン、ドキソルピシン塩酸塩、ドロロキシフ  
 エン(droloxifene)、クエン酸ドロロキシフエン(droloxifene  
 citrate)、プロピオン酸ドロモスタノロン、ドロナビノール、ズアゾマイシン  
 (duazomycin)、ズオカンニシンSA(duocannycinSA)、エブ  
 セレン、エコムスチン(ecomustine)、エダトレキセート、エデルホシン(e  
 delfosine)、エドレコロマブ、エフロミチン(eflomithine)、エ  
 フロミチン塩酸塩、エレメン(elemene)、エルサルニトルシン(elsarni  
 trucin)、エミテフル(emitefur)、エンロプラチン(enloplati  
 nin)、エンプロメート(enpromate)、エピプロピジン(epipropi  
 dine)、エピルピシン、エピルピシン塩酸塩、エプリステリド、エルプロザール(e 50



rbulozole)、赤血球遺伝子治療ベクター系、エソルピシン塩酸塩、エストラム  
 スチン、エストラムスチン類似体、リン酸エストラムチンナトリウム、エストロゲン作動  
 薬、エストロゲン拮抗薬、エタニダゾール、エトボシド、リン酸エトボシド、エトプリン  
 (etoprine)、エキセメスタン、ファドロゾール、ファドロゾール塩酸塩、ファ  
 ザラビン(fazarabine)、フェンレチニド、フィルグラスチム、フィナステリ  
 ド、フラボピリドール、フレゼラスチン(flezelastine)、フロクスウリジ  
 ン、フルアステロン(fluastrone)、フルダラビン、リン酸フルダラビン、  
 フルオロダウノルニシン塩酸塩(fluorodaunorunicin hydroc  
 hloride)、フルオロウラシル、フルロシタビン(flurocitabine)  
 、ホルフェニメクス(forfenimex)、ホルメスタン、ホスキドン(fosqu  
 idone)、フォストリエシン、フォストリエシンナトリウム、ホテムスチン、ガドリ  
 ニウムテキサフィリン、硝酸ガリウム、ガロシタビン(galocitabine)、ガ  
 ニレリクス、ゼラチナーゼ阻害剤、ゲムシタビン、ゲムシタビン塩酸塩、グルタチオン阻  
 害剤、ヘプスルファム(hepsulfam)、ヘレグリン、ヘキサメチレンビスアセト  
 アミド、ヒドロキシ尿素、ヒペリシン、イバンドロン酸、イダルビシン、イダルビシン塩  
 酸塩、イドキシフェン、イドラマントン(idramantone)、イホスファミド、  
 イーノホシン(ihnofosine)、イロマスタット、イミダゾアクリドン、イミキ  
 モド、免疫賦活ペプチド、インスリン様成長因子1受容体阻害剤、インターフェロン作動  
 薬、インターフェロンアルファ-2A、インターフェロンアルファ-2B、インターフェ  
 ロンアルファ-N1、インターフェロンアルファ-N3、インターフェロンベータ-IA  
 、インターフェロンガンマ-IB、インターフェロン、インターロイキン、イオベングア  
 ン(iobenguane)、ヨードドキシソルビシン(iododoxorubicin)  
 、イプロプラトム(iproplatom)、イリノテカン、イリノテカン塩酸塩、イロ  
 プラクト(iroplact)、イルソグラジン、イソベンガゾール(isobengaz  
 ole)、イソホモハリコンドリノB(isohomohalicondrinB)、  
 イタセトロン、ジャスブラキノリド、カハラリドF(kahalalideF)、ラメラ  
 リン-Nトリアセテート(lamellarin-N triacetate)、ランレ  
 オチド、酢酸ランレオチド、レイナマイシン(leinamycin)、レノグラスチム  
 、硫酸レンチナン、レプトルスタチン(leptolstatin)、レトロゾール、白  
 血病抑制因子、白血球アルファインターフェロン、酢酸リユープロリド、リユープロリド  
 /エストロゲン/プロゲステロン、リユープロレリン、レバミゾール、リアロゾール、リ  
 アロゾール塩酸塩、線状ポリアミン類似体、親油性二糖ペプチド、親油性白金化合物、リ  
 ソクリンアミド(lissoclinamide)、ロバブラチン、ロンブリシン(lombricine)  
 、ロメトレキソール(lometrexol)、ロメトレキソールナ  
 トリウム、ロムスチン、ロニダミン、ロソキサントロン(losoxantrone)、  
 ロソキサントロン塩酸塩、ロバスタチン、ロキシリピン、ルルトテカン(lurtote  
 can)、ルテチウムテキサフィリンリソフィリン(lutetium texaphy  
 rin lysofylline)、溶解性ペプチド、マイタンシン(maitansin)  
 、マンノスタチンA(mannostatina)、マリマスタット、マソプロコ  
 ール、マスピン、マトリライシン阻害剤、マトリックスメタロプロテインナーゼ阻害剤、メ  
 イタンシン、メクロレタミン塩酸塩、酢酸メゲストロール、酢酸メレンゲストロール、メ  
 ルファラン、メノガリル、メルパロン、メルカプトプリン、メテレリン(meterelin)  
 、メチオニナーゼ(methioninase)、メトトレキセート、メトトレキ  
 セートナトリウム、メトクロブラミド、メトプリン(metoprine)、メツレデパ  
 (meturedepa)、微細藻類タンパク質キナーゼC阻害剤、MIF阻害剤、ミフ  
 ェプリストン、ミルテホシン、ミリモスチム、不適正二本鎖RNA、ミチンドミド(mitindomide)  
 、ミトカルシン(mitocarcin)、ミトクロミン(mitocromin)、ミトギリ  
 ン(mitogillin)、ミトグアゾン、ミトラクトール、ミトマルシン(mitomalcin)、マイトマイシン、マイトマイシン類似体、  
 ミトナフィド(mitonaafide)、ミトスベル(mitosper)、ミトタン、

10

20

30

40

50

ミトトキシ線維芽細胞成長因子 - サボリン、ミトキサントロン、ミトキサントロン塩酸塩、モファロテン (mofarotene)、モルグラモスチム、モノクローナル抗体、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、モノホスホリルリピド a / マイコバクテリウム細胞壁 SK、モピダモール、多剤耐性遺伝子阻害剤、多重腫瘍抑制因子 1 を主体とした治療、マスタード抗がん剤、ミカペルオキシド B (mycaperoxide B)、マイコバクテリア細胞壁抽出物、ミコフェノール酸、ミリアポロン (myriaporone)、n - アセチルジナリン、ナファレリン、ナグレスチブ (nagrestip)、ナロキソン / ペンタゾシン、ナパビン (napavin)、ナフテルピン (naphterpin)、ナルトゲ

ラスチム、ネダブラチン、ネモルビシン (nemorubicin)、ネリドロン酸 (neridronic acid)、中性エンドペプチダーゼ、ニルタミド、ニサマイシン (nisamyacin)、一酸化窒素モジュレーター、窒素酸化物抗酸化剤、ニトルリン (nitruillyn)、ノコダゾール、ノガラマイシン、n - 置換ベンズアミド、O6 - ベンジルグアニン、オクトレオチド、オキセノン (okicenone)、オリゴヌクレオチド、オナプリストン、オンダンセトロン、オラシン (oracin)、経口サイトカイン誘導因子、オルマプラチン (ormaplatin)、オサテロン、オキサリプラチン、オキサウノマイシン (oxaunomycin)、オキシスラン (oxisuran)、パクリタキセル、パクリタキセル類似体、パクリタキセル誘導体、パラウアミン (palauamine)、パルミトイルリゾキシシン (palmitoylrhizoxin)、パミドロン酸、パナキシトリオール (panaxytriol)、パノミフェン (panomifene)、パラバクチン (parabactin)、バゼリプチン (pazelliptine)、ペグアスパラガーゼ、ペルデシン (peldesine)、ペリオマイシン (peliomycin)、ペンタムスチン (pentamustine)、ペントサンポリ硫酸ナトリウム、ペントスタチン、ペントロゾール (pentrozole)、硫酸ペプロマイシン、ペルフルブロン、ペルホスファミド (perfosfamide)、ペリリルアルコール、フェナジノマイシン (phenazinomycin)、フェニルアセテート、ホスファターゼ阻害剤、ピシバニール、ピロカルピン塩酸塩、ピポプロマン、ピポスルファン (piposulfan)、ピラルビシン、ピリトレキシム、ピロキサントロン塩酸塩 (piroxantrone hydrochloride)、プルアセチン (placetin) A、プルアセチン B、プラスミノーゲン活性化因子阻害因子、白金錯体、白金化合物、白金 - トリアミン錯体、ブリカマイシン、プロメスタン (plomestane)、ポルフィマーナトリウム、ポルフィロマイシン、ブレドニムスチン、プロカルバジン塩酸塩、プロピルビス - アクリドン、プロスタグランジン J2、前立腺癌抗アンドロゲン薬、プロテアソーム阻害剤、タンパク質 A を主体とした免疫モジュレーター、タンパク質キナーゼ C 阻害剤、タンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ阻害剤、ピューロマイシン、ピューロマイシン塩酸塩、プルプリン、ピラゾルリン (pyrazorurin)、ピラゾロアクリジン (pyrazoloacridine)、ピリドキシル化ヘモグロビンポリオキシエチレンコンジュゲート、RAF 拮抗薬、ラルチトレキシド、ラモセトロン、RAS ファルネシルタンパク質トランスフェラーゼ阻害剤、RAS 阻害剤、RAS - GAP 阻害剤、脱メチル化レテリプチン (retelliptine demethylated)、エチドロン酸レニウム RE186、リゾキシシン (rhizoxin)、リボプリン (riboprine)、リボザイム、RH レチナルニド (RH retinarnide)、RNAi、ログレットイミド (rogletimide)、ロヒツキン (rohitukine)、ロムルチド、ロキニメックス、ルビギノン B1 (rubiginone B1)、ルボキシル (ruboxyl)、サフィンゴール、サフィンゴール塩酸塩、サイントピン (saintopin)、サルクヌ (sarcnu)、サルコフィトール A (sarcophytol A)、サルグラモスチム、SDI1 模倣物、セムスチン、老化由来阻害因子 1 (senescence derived inhibitor 1)、センスオリゴヌクレオチド、シグナル伝達阻害剤、シグナル伝達モジュレーター、シムトラゼン (simtrazene)

10

20

30

40

50

)、単鎖抗原結合タンパク質、シゾフィラン、ソブゾキサン、ボロカプト酸ナトリウム (sodium borocaptate)、フェニル酢酸ナトリウム、ソルベロール (solverol)、ソマトメジン結合タンパク質、ソネルミン (sonermin)、スパルホサフナトリウム (sparfosafe sodium)、スパルホス酸 (sparfosic acid)、スパルソマイシン、スピカマイシンD (spicamyacinD)、スピロゲルマニウム塩酸塩、スピロムスチン (spiromustine)、スピロプラチン (spiroplatin)、スプレノペンチン (splenopentin)、スポンギスタチン1 (spongistatin 1)、スクアラミン、幹細胞阻害剤、幹細胞分裂阻害剤、スチピアミド (stipiamide)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ストロメライシン阻害剤、スルフィノシン (sulfinosine) 10  
 スロフェヌル (sulofenur)、超活性血管作動性腸ペプチド拮抗薬、スラジスタ (suradista)、スラミン、スウェインソニン、合成グリコサミノグリカン、タリソマイシン (talisomycin)、タリムスチン (tallimustine)、タモキシフェンメチオジド (tamoxifen methiodide)、タウロムスチン (tauromustine)、タザロテン、テコガランナトリウム (tecogalan sodium)、テガフル、テルラピリリウム (tellurapyrylium)、テロメラゼ阻害剤、テロキサントロン塩酸塩 (teloxantro-  
 ne hydrochloride)、テモポルフィン、テモゾロミド、テニボシド、テルオキシロン (teroxirone)、テストラクトン、テトラクロロデカオキシド (tetrachlorodecaoxide)、テトラゾミン (tetrazomine) 20  
 (tetrazomine)、タリブラスチン (thaliblastine)、サリドマイド、チアミプリン (thiamiprine)、チオコラリン (thiocoraline)、チオグアニン、チオテパ、トロンボポエチン、トロンボポエチン模倣物、サイマルファシン、サイモポエチン受容体作動薬、チモトリナン (thymotrinan)、甲状腺刺激ホルモン、チアゾフリ-ン、スズエチルエチオブルプリン (tin ethyl etiopurpurin)、チラバザミン、チタノセンジクロリド (titanocene dichloride)、トポテカン塩酸塩、トプセンチン (topsentin)、トレミフェン、クエン酸トレミフェン、全能性幹細胞因子、翻訳阻害剤、酢酸トレストロン (trestolone acetate)、トレチノイン、トリアセチルウリジン、トリシリピン (tr-  
 iciribine) 30  
 (tr-iciribine)、リン酸トリシリピン (tr-iciribine phosphate)、トリメトレキセ-ート、グルクロン酸トリメトレキセ-ート (trimetrexate glucuronate)、トリプトレリン、トロピセトロン、ツプロゾール塩酸塩 (tubulozole hydrochloride)、ツロステリド (turosteride)、チロシンキナーゼ阻害剤、チロホスチン、UBC阻害剤、ウベニメクス、ウラシルマスタード、ウレデパ (uredempa)、尿生殖洞由来成長阻害因子、ウロキナーゼ受容体拮抗薬、バプレオチド (vapreotide)、バリオリンB (vari-  
 olinB) 40  
 (vari-olinB)、ベラレソール (velaresol)、ベラミン (veramine)、ベルジン (verdin)、ベルテポルフィン、硫酸ビンブラスチン、硫酸ビンクリスチン、ビンデシン、硫酸ビンデシン、硫酸ビネピジン (vinepidine sulfate)、硫酸ビングリシネ-ート (vinglycinate sulfate)、硫酸ビンロイロシン (vinleurosine sulfate)、ビノレルピンもしくは酒石ビノレルピン、硫酸ビンロシジン (vinrosidine sulfate)、ビンキサ-ルチン (vinxaltine)、硫酸ビンゾリジン (vinzolidine sulfate)、ビタキシン (vitaxin)、ボロゾール、ザノテロン (zanoterone)、ゼニプラチン (zeniplatin)、ジラスコルブ (zilascorb)、ジノスタチン、ジノスタチンスチマラマー、またはゾルピシン塩酸塩などの抗がん薬でよい。

# 【0050】

一実施形態では、開示されるナノ粒子が、例えば、活性剤に加えて、疎水性酸を含んでもよい。例えば、開示されるナノ粒子は、疎水性酸（脂肪酸および/または胆汁酸など） 50

を含む場合もあり、かつ／または疎水性酸を含むプロセスによって調製されている。この実施形態では、適切ないずれかの疎水性酸、例えば、カプロン酸、エナント酸、カプリル酸、ペラルゴン酸、カプリン酸、ウンデカン酸、ラウリン酸、トリデカン酸、ミリスチン酸、ペンタデカン酸、パルミチン酸、マルガリン酸、ステアリン酸、ノナデカン酸、アラキジン酸、ヘンエイコサン酸、ベヘン酸、トリコサン酸、リグノセリン酸、ペンタコサン酸、セロチン酸、ヘプタコサン酸、モンタン酸 (montanic acid)、ノナコサン酸、メリシン酸、ヘナトリアコンタン酸 (henatriacontanoic acid)、ラッセロ酸 (lacceroic acid)、プシルル酸 (psylllic acid)、ゲダ酸 (geddic acid)、セロプラスチン酸 (ceroplastic acid)、ヘキサトリアコンタン酸、およびこれらの組合せなどの飽和脂肪酸が企図される。

10

#### 【0051】

不飽和脂肪酸の非限定的な例には、ヘキサデカトリエン酸、アルファ - リノレン酸、ステアリドン酸、エイコサトリエン酸、エイコサテトラエン酸、エイコサペンタエン酸、ヘンエイコサペンタエン酸、ドコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、テトラコサペンタエン酸、テトラコサヘキサエン酸、リノール酸、ガンマ - リノール酸、エイコサジエン酸、ジホモ - ガンマ - リノレン酸、アラキドン酸、ドコサジエン酸、アドレン酸、ドコサペンタエン酸、テトラコサテトラエン酸、テトラコサペンタエン酸、オレイン酸、エイコセン酸、メアド酸 (mead acid)、エルカ酸、ネルボン酸、ルメン酸 (rumenic acid)、 $\alpha$ -カレンド酸、 $\beta$ -カレンド酸、ジャカル酸、 $\alpha$ -エレオステアリン酸、 $\beta$ -エレオステアリン酸、カタルプ酸、プニカ酸、ルメレン酸 (rumelenic acid)、 $\alpha$ -パリナリン酸、 $\beta$ -パリナリン酸、ボッセオペンタエン酸 (bosseopentaenoic acid)、ピノレン酸、ポドカルプ酸、パルミトオレイン酸、バクセン酸、ガドレイン酸、エルカ酸、およびこれらの組合せが含まれる。一部の実施形態では、疎水性酸は、胆汁酸でもよい。胆汁酸の非限定的な例には、ケノデオキシコール酸、ウルソデオキシコール酸、デオキシコール酸、ヒコール酸 (hycolic acid)、ベータ - ムリコール酸、コール酸、アミノ酸抱合胆汁酸、およびこれらの組合せが含まれる。アミノ酸抱合胆汁酸は、適切ないかなるアミノ酸抱合でもよい。一部の実施形態では、アミノ酸抱合胆汁酸は、グリシン抱合胆汁酸またはタウリン抱合胆汁酸である。

20

30

#### 【0052】

開示される治療用ナノ粒子は、ナノ粒子の約 0.2 ~ 約 25 重量パーセント、または、例えば、約 1 ~ 約 10 重量パーセント、約 0.5 ~ 約 6 重量パーセント、約 0.1 ~ 約 3 重量パーセント、もしくは約 2 ~ 約 12 重量パーセントの治療剤を含み得る。

#### 【0053】

一部の実施形態では、治療用ナノ粒子は、ポリマー - 薬物コンジュゲートを含み得る。例えば、薬物は、開示されているポリマーまたはコポリマー（例えば、PLA - PEG）にコンジュゲートしていてもよく、このようなポリマー - 薬物コンジュゲートは、開示されているナノ粒子の一部を形成し得る。例えば、開示されている治療用ナノ粒子は、約 0.2 ~ 約 30 重量パーセントの PLA - PEG または PLGA - PEG を場合により含んでいてもよく、PEG は、薬物（例えば、PLA - PEG - 薬物）で官能化されている。

40

#### 【0054】

##### 医薬製剤

本明細書において開示されているナノ粒子は、別の態様によって、薬学的に許容できる担体と合わさり、医薬組成物を形成し得る。当業者が理解するように、担体は、下記のような投与経路、標的組織の場所、送達される薬物、薬物の送達の時間経過などに基づいて選択し得る。

#### 【0055】

医薬組成物は、経口および非経口経路を含めた当技術分野において公知の任意の手段によって患者に投与することができる。用語「患者」は、本明細書において使用する場合、

50

ヒト、ならびに例えば、哺乳動物、鳥、爬虫類、両生類、および魚を含めた非ヒトを指す。例えば、非ヒトは、哺乳動物（例えば、げっ歯類、マウス、ラット、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、霊長類、またはブタ）であり得る。ある特定の実施形態では、非経口経路が、消化管において見出される消化酵素との接触を回避するために望ましい。このような実施形態によると、組成物は、注射（例えば、静脈内、皮下または筋内、腹腔内注射）、直腸、経膈的、局所的（散剤、クリーム剤、軟膏剤、もしくは点眼剤によるなど）によって、または吸入（スプレーによるなど）によって投与し得る。

#### 【0056】

特定の実施形態では、ナノ粒子は、それを必要とする対象に全身的に、例えば、I V 注入または注射によって投与される。

#### 【0057】

注射可能な調製物、例えば、無菌の注射可能な水性または油性懸濁液は、適切な分散化剤または湿潤剤および懸濁化剤を使用して公知技術によって製剤化し得る。無菌の注射可能な調製物はまた、無毒性の非経口的に許容できる希釈剤または溶媒中の無菌の注射可能な溶液、懸濁液、またはエマルジョン、例えば、1, 3 - ブタンジオール中の溶液でよい。用いることができる許容できるビヒクルおよび溶媒の中には、水、リンゲル液、U . S . P .、および等張食塩液がある。さらに、無菌の不揮発性油は、溶媒または懸濁媒として従来用いられる。この目的のために、合成のモノまたはジグリセリドを含めた任意の刺激の少ない不揮発性油を用いることができる。さらに、脂肪酸、例えば、オレイン酸は、注射剤の調製において使用される。一実施形態では、コンジュゲートを、1 % ( w / v ) のカルボキシメチルセルロースナトリウムおよび0 . 1 % ( v / v ) のT W E E N ( 商標 ) 8 0 を含む担体液に懸濁させる。注射用製剤は、例えば、細菌保持フィルターを通す濾過によって、または使用前に滅菌水もしくは他の無菌の注射可能な媒体に溶解もしくは分散させることができる無菌の固体組成物の形態の滅菌剤を組み込むことによって、無菌化することができる。

#### 【0058】

経口投与のための固体剤形は、カプセル剤、錠剤、丸剤、散剤、および顆粒剤を含む。このような固体剤形において、カプセル化されたか、またはカプセル化されていないコンジュゲートを、少なくとも1種の不活性な薬学的に許容できる添加剤または担体、例えば、クエン酸ナトリウムまたは第二リン酸カルシウム、ならびに/または( a ) 充填剤もしくは増量剤、例えば、デンプン、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール、およびケイ酸、( b ) 結合剤、例えば、カルボキシメチルセルロース、アルギネート、ゼラチン、ポリビニルピロリジノン、スクロース、およびアカシア、( c ) 保湿剤、例えば、グリセロール、( d ) 崩壊剤、例えば、寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモもしくはタピオカデンプン、アルギン酸、ある種のシリケート、および炭酸ナトリウム、( e ) 溶解遅延剤、例えば、パラフィン、( f ) 吸収促進剤、例えば、第四級アンモニウム化合物、( g ) 湿潤剤、例えば、セチルアルコールおよびモノステアリン酸グリセロール、( h ) 吸収剤、例えば、カオリンおよびベントナイトクレイ、ならびに( i ) 滑沢剤、例えば、タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム、およびこれらの混合物と混合する。カプセル剤、錠剤、および丸剤の場合、剤形はまた、緩衝剤を含む。

#### 【0059】

医薬剤を含有するナノ粒子の正確な投与量は、処置される患者を考慮して個々の医師によって選択され、一般に、投与量および投与は、有効量の医薬剤ナノ粒子を処置される患者に提供するように調節されることを認識されたい。本明細書において使用する場合、医薬剤を含有するナノ粒子の「有効量」は、所望の生物学的応答を引き出すのに必要な量を指す。当業者が理解するように、医薬剤を含有するナノ粒子の有効量は、所望の生物学的エンドポイント、送達される薬物、標的組織、投与経路などの要因によって変わり得る。例えば、医薬剤を含有するナノ粒子の有効量は、所望の期間にわたり所望の量の腫瘍サイズの低減をもたらす量であり得る。考慮し得るさらなる要因は、病態の重症度；処置され

10

20

30

40

50

る患者の年齢、体重および性別；食事、投与の時間および頻度；薬物の組合せ；反応感受性；ならびに治療に対する耐性／応答を含む。

#### 【0060】

ナノ粒子は、投与の容易さおよび投与量の均一性のために投与量単位形態で製剤化し得る。「投与量単位形態」という表現は、本明細書において使用する場合、処置される患者に適当なナノ粒子の物理的個別単位を指す。しかし、組成物の一日の総使用量は、正しい医学的判断の範囲内で主治医によって決められることが理解される。任意のナノ粒子について、治療有効用量は、細胞培養アッセイにおいて、または動物モデル、通常、マウス、ウサギ、イヌ、もしくはブタにおいて最初に推定することができる。動物モデルをまた使用して、望ましい濃度範囲および投与経路を達成する。次いで、このような情報を使用して、ヒトにおける投与のための有用な用量および経路を決定することができる。ナノ粒子の治療有効性および毒性、例えば、 $ED_{50}$ （用量は集団の50%において治療的に有効である）および $LD_{50}$ （用量は集団の50%まで致死性である）は、細胞培養物または実験動物において標準的な医薬手順によって決定することができる。毒性効果の治療効果に対する用量比は治療指数であり、これは、 $LD_{50} / ED_{50}$ の比として表すことができる。大きな治療指数を示す医薬組成物は、一部の実施形態では有用であり得る。細胞培養アッセイおよび動物試験から得たデータは、ヒト使用のための投与量範囲の配合において使用することができる。

10

#### 【0061】

一部の実施形態では、本明細書において開示されているナノ粒子を含む冷凍に適した組成物が企図され、冷凍に適した溶液、例えば、糖、例えば、単糖類、二糖類、もしくは多糖類、例えば、スクロースおよび／もしくはトレハロース、ならびに／または塩および／もしくはシクロデキストリン溶液を、ナノ粒子懸濁液に加える。糖（例えば、スクロースまたはトレハロース）は、例えば、粒子が冷凍によって凝集することを防止する凍結防止剤として作用し得る。例えば、複数の開示されているナノ粒子、スクロース、イオン性ハロゲン化物、および水を含むナノ粒子製剤であり、ナノ粒子／スクロース／水／イオン性ハロゲン化物は、約3～40%／10～40%／20～95%／0.1～10%（w/w/w/w）または約5～10%／10～15%／80～90%／1～10%（w/w/w/w）が本明細書において提供される。例えば、このような溶液は、本明細書に開示されているナノ粒子、約5重量%～約20重量%のスクロースおよび約10～100mMの濃度のイオン性ハロゲン化物、例えば、塩化ナトリウムを含み得る。別の例では、複数の開示されているナノ粒子、トレハロース、シクロデキストリン、および水を含むナノ粒子製剤が本明細書において提供され、ナノ粒子／トレハロース／水／シクロデキストリンは、約3～40%／1～25%／20～95%／1～25%（w/w/w/w）または約5～10%／1～25%／80～90%／10～15%（w/w/w/w）である。

20

30

#### 【0062】

例えば、企図される溶液は、本明細書に開示されているナノ粒子、約1重量%～約25重量%の二糖類、例えば、トレハロースもしくはスクロース（例えば、約5重量%～約25重量%のトレハロースもしくはスクロース、例えば、約10重量%のトレハロースもしくはスクロース、または約15重量%のトレハロースもしくはスクロース、例えば、約5重量%のスクロース）、および約1重量%～約25重量%の濃度のシクロデキストリン、例えば、シクロデキストリン（例えば、約5重量%～約20重量%、例えば、10重量%もしくは約20重量%、または約15重量%～約20重量%のシクロデキストリン）を含み得る。企図される製剤は、複数の開示されているナノ粒子（例えば、PLA-PEGおよび活性剤を有するナノ粒子）、および約2重量%～約15重量%（または約4重量%～約6重量%、例えば、約5重量%）のスクロースおよび約5重量%～約20重量%（例えば、約7重量パーセント～約12重量%、例えば、約10重量%）のシクロデキストリン、例えば、HPbCDを含み得る。

40

#### 【0063】

動的光散乱（DLS）を使用して、粒径を測定し得るが、これはブラウン運動に依存し

50

、そのためこの技術は、いくつかのより大きな粒子を検出し得ない。レーザー回折は、粒子および懸濁培地の間の屈折率における差異に依存する。この技術は、サブミクロンからミリメートル範囲にて粒子を検出することができる。相対的に少（例えば、約 1 ~ 5 重量 %）量のより大きな粒子を、ナノ粒子懸濁液中で決定することができる。単一粒子光学検知（SPOS）は、約 0.5  $\mu\text{m}$  の個々の粒子を計数する希薄な懸濁液の光遮蔽を使用する。測定した試料の粒子濃度を知ることによって、凝集体の重量パーセントまたは凝集体濃度（粒子 / mL）を計算することができる。

#### 【0064】

一部の実施形態では、1 種または複数のイオン性ハロゲン化塩は、糖、例えば、スクロース、トレハロースまたはこれらの混合物に対するさらなる凍結保護剤として使用し得る。糖は、二糖類、単糖類、三糖類、および / または多糖類を含んでいてもよく、かつ他の添加剤、例えば、グリセロールおよび / または界面活性剤を含んでいてもよい。場合により、シクロデキストリンを、単独でまたは他の添加剤に加え、凍結保護剤として含んでいてもよく、例えばシクロデキストリンは、イオン性ハロゲン化塩または糖の代わりに加え得る。代わりに、シクロデキストリンを、イオン性ハロゲン化塩および / または糖に加え得る。

#### 【0065】

適切なイオン性ハロゲン化塩は、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、塩化亜鉛、またはこれらの混合物を含み得る。さらなる適切なイオン性ハロゲン化塩は、塩化カリウム、塩化マグネシウム、塩化アンモニウム、臭化ナトリウム、臭化カルシウム、臭化亜鉛、臭化カリウム、臭化マグネシウム、臭化アンモニウム、ヨウ化ナトリウム、ヨウ化カルシウム、ヨウ化亜鉛、ヨウ化カリウム、ヨウ化マグネシウム、またはヨウ化アンモニウム、および / またはこれらの混合物を含む。一実施形態では、約 1 ~ 約 15 重量パーセントのスクロースを、イオン性ハロゲン化塩と共に使用し得る。適切なシクロデキストリンは、  
- シクロデキストリン、  
- シクロデキストリン、  
- シクロデキストリン、またはこれらの混合物を含み得る。本明細書において開示されている組成物における使用のために企図される例示的なシクロデキストリンには、ヒドロキシプロピル -  
- シクロデキストリン（HPBCD）、ヒドロキシエチル -  
- シクロデキストリン、スルホブチルエーテル -  
- シクロデキストリン、メチル -  
- シクロデキストリン、ジメチル -  
- シクロデキストリン、カルボキシメチル -  
- シクロデキストリン、カルボキシメチルエチル -  
- シクロデキストリン、ジエチル -  
- シクロデキストリン、トリ - O - アルキル -  
- シクロデキストリン、グルコシル -  
- シクロデキストリン、およびマルトシル -  
- シクロデキストリンが含まれる。一実施形態では、約 1 ~ 約 25 重量パーセントのトレハロース（例えば、約 10 重量 % ~ 約 15 重量 %、例えば、5 ~ 約 20 重量 %）を、シクロデキストリンと共に使用し得る。一実施形態では、凍結乾燥した医薬組成物は、約 1 ~ 約 25 重量パーセントの - シクロデキストリンを含み得る。例示的な組成物は、PLA - PEG - EGFRL リガンド、活性 / 治療剤、約 4 % ~ 約 6 %（例えば、約 5 重量パーセント）のスクロース、および約 8 ~ 約 12 重量パーセント（例えば、約 10 重量 %）の HPBCD を含むナノ粒子を含み得る。

#### 【0066】

##### 処置方法

一部の実施形態では、標的化ナノ粒子は、疾患、障害、および / または状態を処置し、緩和し、回復させ、軽減し、その発生を遅延させ、その進行を阻害し、その重症度を低減し、かつ / またはその 1 つもしくは複数の症状または特色の発生率を低減するのに使用することができる。一部の実施形態では、がん、例えば、固形腫瘍がん、および / または、例えば、肺がん（例えば、非小細胞肺癌）、肛門がん、および / または多形性神経膠芽腫の処置に標的化ナノ粒子を使用することができ、例えば、処置は、有効量のある特定の開示されたナノ粒子を投与することを含む。他の実施形態では、それを必要とする患者において、炎症性疾患（例えば、乾癬、湿疹、および / またはアテローム性動脈硬化症）を処置し、かつ / または改善する方法であって、有効量の開示ナノ粒子の投与することを含む

方法が、本明細書において提供される。

【0067】

一態様では、がんまたは他の開示される適応症に罹患している対象に組成物を投与する方法が提供される。用語「がん」は、前悪性および悪性のがんを含む。がんには、これらに限定はしないが、血液（例えば、慢性骨髄性白血病、慢性骨髄単球性白血病、フィラデルフィア染色体陽性の急性リンパ芽球性白血病、マントル細胞リンパ腫）、前立腺、胃がん、中咽頭がん、子宮頸がん、肛門がん、胆嚢がん、胆管がん、腸のがん、結腸直腸がん、皮膚がん、例えば、黒色腫または基底細胞癌、肺がん（例えば、小細胞肺がんまたは非小細胞肺がん（例えば、腺癌、扁平上皮癌））、乳がん、頭頸部のがん、気管支がん、膵臓がん、膀胱がん、脳または中枢神経系がん、扁桃腺がん、末梢神経系がん、食道がん、口腔または咽頭のがん、肝臓がん（例えば、肝細胞癌）、腎臓がん（例えば、腎細胞癌）、睾丸がん、胆道がん、小腸または虫垂がん、胃腸間質腫瘍、唾液腺がん、甲状腺がん（例えば、濾胞性甲状腺がんおよび未分化甲状腺がん）、副腎がん、骨肉腫、軟骨肉腫、血液系組織のがん、K R a s 変異を有するがんの処置、治療抵抗性がんの処置などが含まれる。「がん細胞」は、腫瘍（すなわち、固形腫瘍）の形態であるか、対象内で単独で存在する（例えば、白血病細胞）か、またはがん由来する細胞株であり得る。開示されるナノ粒子は、腎細胞癌の処置に使用することができる。別の実施形態では、開示されるナノ粒子は、腎臓がん、多形性神経膠芽腫、マントル細胞リンパ腫、または皮膚カポジ肉腫の処置に使用することができる。

10

20

【0068】

がんは、種々の身体症状と関連し得る。がんの症状は一般に、腫瘍のタイプおよび場所によって決まる。例えば、肺がんは、咳嗽、息切れ、および胸痛をもたらすことが多く、一方、結腸がんは、下痢、便秘、および血便をもたらす。しかし、数例のみを挙げると、下記の症状は一般に、多くのがんに関連することが多い。発熱、悪寒、寝汗、咳、呼吸困難、体重減少、食欲不振、食欲不振症、悪心、嘔吐、下痢、貧血、黄疸、肝腫大、喀血、疲労、倦怠感、認知機能障害、うつ、ホルモンの障害、好中球減少、疼痛、非治癒性の痛み、腫大したリンパ節、末梢性ニューロパシー、および性的機能障害。開示されるナノ粒子は、がんの身体症状の処置に使用することができる。

【0069】

一態様では、がん（例えば、白血病）を処置する方法が提供される。感染症、炎症、胃腸障害などの他の処置方法は、本明細書で開示するとおりに実現することができると理解すべきである。一部の実施形態では、がんの処置は、それを必要とする対象に、所望の結果を実現するのに必要となるような量で、そのような時間をかけて、治療有効量の開示ナノ粒子を投与することを含む。ある特定の実施形態では、開示されるナノ粒子の「治療有効量」とは、がんを処置し、緩和し、回復させ、軽減し、その発生を遅延させ、その進行を阻害し、その重症度を低減し、かつ/またはその1つもしくは複数の症状または特色の発生率を低減するのに有効な量である。

30

【0070】

一態様では、がん（例えば、白血病）に罹患している対象に組成物を投与する方法が提供される。一部の実施形態では、所望の結果（すなわち、がんの処置）を実現するのに必要となるような量で、そのような時間をかけて、対象に粒子を投与することができる。一部の実施形態では、所望の結果（すなわち、がんの寛解）を実現するのに必要となるような量で、そのような時間をかけて、対象に粒子を投与することができる。ある特定の実施形態では、開示されているナノ粒子の「治療有効量」とは、開示されている障害を処置し、緩和し、回復させ、軽減し、その発生を遅延させ、その進行を阻害し、その重症度を低減し、かつ/またはその1つもしくは複数の症状または特色の発生率を低減するのに有効な量である。

40

【0071】

ここでは、臓器移植を受けたことのある患者を、開示されるナノ粒子を投与することにより処置する方法も企図される。ここで企図される他の方法には、結節性硬化症および/

50



または自閉症を有する患者を、有効量の開示ナノ粒子を投与することにより処置する方法が含まれる。

【0072】

本明細書で企図される方法として、例えば、患者、例えば、血管の病変にベアメタルステントが留置されている患者の血管において新生内膜過形成を予防または阻止する方法であって、開示されるナノ粒子を含む組成物を投与することを含む方法が挙げられる。本明細書では、（例えば、ステントが留置されている患者において）再狭窄を処置または予防する方法であって、開示されるナノ粒子を投与することを含む方法も企図される。

【0073】

企図される方法は、クローン病、潰瘍性大腸炎、コラーゲン性大腸炎、リンパ球性大腸炎、虚血性大腸炎、空置性大腸炎（diversion colitis）、ベーチェット病、または分類不能大腸炎などの炎症性腸疾患であり得る炎症性疾患を処置することを含む。他の実施形態では、それを必要とする患者において過敏性大腸症候群を処置する方法が提供される。この方法は、患者に治療有効量のナノ粒子を投与することを含む。一部の実施形態では、ナノ粒子は、治療剤を含有する場合がある。例えば、ある特定の実施形態では、治療剤は、上述のものなどの抗炎症剤である場合がある。

【0074】

治療プロトコルは、健康な個体（すなわち、がんのいずれの症状も示していない、かつ／またはがんと診断されたことがない対象）に、治療有効量の開示されるナノ粒子を投与することを含む。例えば、健康な個体は、がんの発病および／またはがんの症状の発症より前に、開示されるナノ粒子で「免疫化」することもでき、リスクのある個体（例えば、がんの家族歴を有する患者、がんの発病と関連する1つまたは複数の遺伝子変異を有する患者、がんの発病と関連する遺伝的多型を有する患者、がんの発病と関連するウイルスに感染した患者、がんの発病と関連する習慣および／または生活様式を有する患者など）は、がんの症状の発症と実質的に同時（例えば、その48時間以内、24時間以内、または12時間以内）に処置することができる。当然のことながら、がんを有することがわかっている個体は、いつでも処置を受けることができる。

【0075】

他の実施形態では、開示されるナノ粒子を使用して、がん細胞、例えば、骨髄性白血病、がん細胞の成長を阻害することができる。本明細書において使用する場合、「がん細胞の成長を阻害する」または「がん細胞の成長を阻害すること」という用語は、がん細胞成長の速度が、未処置対照がん細胞の観察または予想された成長速度と比べて低減されるような、がん細胞増殖および／もしくは遊走の速度のいずれかの緩慢化、がん細胞増殖および／もしくは遊走の抑止、またはがん細胞の死滅を指す。「増殖を阻害する」という用語は、がん細胞または腫瘍のサイズの縮小または消失、ならびにその転移の可能性の低減も指す場合がある。細胞レベルでのこのような阻害が、患者において、がんのサイズを縮小し、その成長を阻止し、その侵襲性を低減し、またはその転移を予防もしくは阻害し得ることが好ましい。がん細胞成長が阻害されているかどうかは、適切な様々な徴候のいずれかによって、当業者が容易に判定することができる。

【0076】

がん細胞成長の阻害は、例えば、がん細胞の細胞周期の特定の期における停止、例えば、細胞周期のG2/M期における停止によって証明することができる。がん細胞成長の阻害は、がん細胞または腫瘍サイズの直接的または間接的測定によって証明することもできる。ヒトがん患者では、このような測定は、一般に、磁気共鳴画像診断、コンピュータ体軸断層撮影、X線などの、周知の画像診断法を使用してなされる。がん細胞成長は、循環している癌胎児性抗原、前立腺特異的抗原、またはがん細胞成長と互に関係付けられる他のがん特異的抗原のレベルを決定することなどにより、間接的に判定することもできる。がん成長の阻害は、一般に、対象の生存期間の延長および／または健康および幸福の増進とも互に関係付けられる。本明細書では、活性剤およびEGFR標的化部分を含む、本明細書で開示するナノ粒子を患者に投与する方法であって、患者への投与の際、このよ

10

20

30

40

50

うなナノ粒子が、薬剤単独の投与（すなわち、開示されるナノ粒子としてでない）に比べて、分布体積を実質的に縮小し、かつ／または遊離  $C_{max}$  を実質的に低減する方法も提供される。

【0077】

「Drug Loaded Polymeric Nanoparticles and Methods of Making and Using Same」と題された2012年6月26日発行の米国特許第8,206,747号は、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。

【実施例】

【0078】

開示されるナノ粒子について、ここまでは大まかに述べており、以下の実施例を参照することで、これについてより容易に理解されるところとなるが、実施例は、ある特定の態様および実施形態を説明する目的で含めているにすぎず、開示されるナノ粒子を一切限定するものでない。

【0079】

（実施例1）

ナノ粒子エマルジョンプロセス

以下に記載するプロセスでは、油相の固体含有量の増大を使用する。プロセスの全体的なフローチャートを図1に示し、プロセスの流れ図を図2Aおよび2Bに示す。乳化した油相の溶媒含有量を低減することにより、ナノ粒子（NP）の硬化時にクエンチ流体へと損なわれる薬物は、より少なくなる。過度に粘稠になると、約100nmの液滴に乳化し得る能力が制限されかねないので、これを回避するために、固体および溶媒系を選択する。比較的小さい分子量のコポリマー（約16kDa～5kDaのPLA-PEG）を使用することで、製剤は、高い固体含有量で十分に低い粘性を保つことが可能になる。薬物を溶液中に高濃度に保つために、適切な溶媒和力を有する溶媒系を選択する。共溶媒系（通常は79：21の酢酸エチル：ベンジルアルコール）の使用により、80：20のポリマー：活性剤配合で、連続溶液に50%までの固体が見込まれる。

【0080】

活性剤とポリマー（コポリマーおよびリガンドを有するコポリマー）の混合物から構成される有機相を形成する。有機相を、界面活性剤、およびいくらかの溶解した溶媒から構成される水相と、概ね1：5の比（油相：水相）で混合する。高い薬物添加量を実現するために、有機相中の約30%の固体を使用する。

【0081】

活性剤とポリマー（ホモポリマー、コポリマー、およびリガンドを有するコポリマー）の混合物で構成された有機層を形成する。組成および有機溶媒を表1に列挙する。有機相は、界面活性剤、およびいくらかの溶解した溶媒から構成される水相と、概ね1：5の比（油相：水相）で混合される。一次エマルジョンは、単純に混合しながら、またはローターステーターホモジナイザーの使用によって、2つの相の組合せによって形成される。次いで、一次エマルジョンを、高圧ホモジナイザーの使用によって微細エマルジョンに形成する。次いで、微細エマルジョンを、脱イオン水に、混合しながら加えることによって、クエンチする。クエンチ：エマルジョン比は、概ね8.5：1である。次いで、25%（wt%）のTween 80の溶液をクエンチに加え、全体的に概ね2%のTween 80を達成する。これは、カプセル化されていない遊離の薬物を溶解させるのに役立ち、またこれによって、ナノ粒子単離プロセスが実施可能になる。次いで、遠心分離または限外濾過／ダイアフィルトレーションのいずれかによってナノ粒子を単離する。

【0082】

一連の標準のナノエマルジョン条件を以下のとおりに示す。

【0083】

10

20

30

40

## 【表 1】

表1. 標的化ナノ粒子バッチ-固体30%

| 属性          | 模範値                                    |
|-------------|--|
| コポリマー(種類/量) | 16/5 PLA-PEG、40%、リガンド-PEG-PLA として 1wt% |
| 薬物(量)       | 20%                                    |
| 有機溶媒(種類/量)  | 酢酸エチル(EA)、79%                          |
| 有機共溶媒(種類/量) | ベンジルアルコール(BA)、21%                      |
| 水相          | 水中に 1%のコール酸ナトリウム、2%の BA、4%の EA         |
| 油相中の[固体]    | 30 wt%                                 |
| 属性          | 模範値                                    |
| 粒径          | 114.1 nm                               |
| 薬物添加量       | 11.85%                                 |

10

## 【0084】

(実施例 2)

## 材料および方法

別段指摘しない限り、本明細書における実施例の部に記載するすべての実験に、以下の材料および方法を使用した。

20

## 【0085】

## ペプチド合成

CEM Liberty Blueマイクロ波補助自動ペプチド合成装置において、標準のFmoc/tBu固相ペプチド合成(SPPS)を使用して、ペプチド合成を行った。市販品供給元(Novabiochem、Anaspec、Bachem、Chem-Impex)からすべてのアミノ酸を入手した。Rinkアミド樹脂(Novabiochem、カリフォルニア州サンディエゴ)を、活性剤N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド(Sigma-Aldrich)、Oxyma Pure(Novabiochem)、および塩基としてのN,N'-ジイソプロピルエチルアミン(DIEA)と共に使用した。N末端Fmoc基の除去は、ジメチルホルムアミド(DMF)中にて20vol%のピペリジンを使用して実現した。別段指摘しない限り、すべてのペプチドが、N末端においてアセチル化され、C末端においてアミド化された。アセチル化は、DMF中15vol%の無水酢酸(Sigma-Aldrich)溶液を使用して実施した。ペプチドが合成された後、樹脂を20mLのジクロロメタン(DCM)で3回洗浄し、真空下で乾燥した。2.5vol%のトリイソプロピルシラン(TIS、Sigma-Aldrich)、2.5vol%の水、2.5wt%のジチオトレイトール(DTT)、および92.5vol%のトリフルオロ酢酸(TFA、Alfa Aesar)からなる溶液を用い、1~2時間かけて、ペプチドを切断した。樹脂を濾別し、窒素流を使用してTFA溶液を濃縮した。約20体積の冷ジエチルエーテルを使用して、TFA溶液からペプチドを沈殿させ、遠心分離によって収集し、冷エーテル(3回、各20mL)で摩砕した。

30

40

## 【0086】

## ペプチドジスルフィド形成

ペプチドを20%のDMSOに1mg/mLで溶解させ、室温で攪拌することにより、システイン含有粗ペプチドを酸化させて、対応するジスルフィドとした。反応をLC/MSによってモニターした。完了後、固相抽出(2gのSep-Pak tC18カートリッジ、Waters)を使用して粗ペプチドを単離し、凍結乾燥した。ペプチドを水/アセトニトリルに溶解させ、0.1%のTFAを含有するアセトニトリル/水の勾配を用い、250×21.2mmのC18カラム(Phenomenex)を使用する逆相HPLCによって精製した。純粋な画分をプールし、凍結乾燥し、LCMSによって純度が9

50

0 %を超えていることを判定した。エレクトロスプレー質量分析を使用して、正確なペプチド構造を確認した。本明細書で報告するすべてのペプチドが、予想された $m/z$ 値を有した。

#### 【0087】

##### ラクタム生成

部位特異的なラクタム形成を確実にするために、本発明者らは、他の側鎖を保護されたままに、ペプチドを固体支持体に結合されたままにしておきながら、緩酸切断を使用して除去することのできる、メチルトリチル(Mtt)および2-フェニルイソプロピルオキシ(O-2Phipr)保護基を使用した。94%のDCM、5%のTIS、および1%のTFAの混合物を、ゆっくりと樹脂にかけた。遊離Mttは、濃い黄色/橙色の色調を有するので、保護基の遊離は、観察することができる。黄色の色調が認められ、再び薄らぐまで、樹脂に切断溶液をかけた。樹脂をDCM(20mL、3回)およびDMF(20mL、3回)で洗浄した。次に、樹脂を20mLのDMFに浸した後、PyBOP(3当量)およびDIEA(9当量)を加えた。溶液を6時間震盪し、次いでDCM(20mL、3回)で洗浄し、上述のとおり切断した。

10

#### 【0088】

##### P<sub>2</sub>-ビオチン二量体合成

Fmoc-PEG Biotin NovaTag樹脂(Novabiochem)を使用して、P<sub>2</sub>-ビオチン二量体を合成した。ペプチドを切断し、上で報告したとおりに酸化させ、BS(PEG)5(PEG化ビス(スルホスクシンイミジル)スプレート)(ThermoFisher Scientific)を使用して、リシン残基の遊離アミンを介して二量体化した。二量体化反応は、DMF中で、塩基としてのDIEA(6当量)を用いて実施し、次いで、水に希釈し、RP-HPLCによって精製して、P<sub>2</sub>-ビオチン-二量体を得た。この試薬は、P<sub>2</sub>競合ELISAにおいて使用した。予測MWは、5167.9、逆重畳積分による質量:5167.6であり、イオン実測値は、1292.9および1723.5であった。

20

#### 【0089】

##### ペプチドに対するDBCOコンジュゲーションの典型的な手順

粗ペプチドを、(適用可能であれば)ジスルフィド酸化後の銅不使用クリック化学反応のために、DBCOにコンジュゲートさせた。P<sub>1</sub>(22.96mg、11.88μmol)を1.2mLの無水DMFに溶解させた。DBCO-PEG5-NHSエステル(12.4mg、17.8μmol、1.5当量)を、0.3mLの無水DMFに溶解させ、ペプチド溶液に加えた後、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(12.4μL、71.3μmol、6当量)を加えた。反応液を、LCMSによってモニターしながら、1時間攪拌した。1時間後、出発材料が消費され、生成物を、アセトニトリル(0.1%のTFA)および水(0.1%のTFA)を使用するRP-HPLCによって精製した。

30

#### 【0090】

##### LC-MSによるペプチドのインタクト質量測定

アセトニトリル(0.02%のTFA、0.08%のギ酸)および水(0.02%のTFA、0.08%のギ酸)を移動相として使用するAgilent 1200 HPLCを備えたC18 Jupiter(C)カラム(250×2mm、5μm、300、Phenomenex)に、試料を0.5mL/分で注入した。方法は、10分かけて5%~75%へのアセトニトリルの線形勾配とし、ペプチドは、3~10分の範囲内で溶離させ、Agilent 6220 TOFへと誘導された。エレクトロスプレー条件は、気体温度350、毛管電圧3500V、およびフラグメンター120Vからなるものとした。 $m/z$ 質量範囲は、100~3000Daとした。取得ソフトウェアは、Mass Hunter(Agilent)とした。

40

#### 【0091】

##### DBCO-アルデヒドリンカーの合成

DBCO-PEG4-アミン(19.24mg、0.037mmol)をDMF(70

50

0 u L) に溶解させた後、p - ホルミル安息香酸 N - ヒドロキシスクシンイミドエステル ( 9 . 1 m g、0 . 0 3 7 m m o l ) および D I E A ( 3 8 . 4 u L、0 . 2 2 m m o l ) を加えた。反応液を室温で 3 時間攪拌し、その後、L C M S によって完了が示された。粗生成物を R P - H P L C によって精製し、純粋な生成物を凍結乾燥して、1 1 . 3 m g の純粋な生成物を得た ( 収率 4 7 % )。予測 MW は、6 5 5 . 7 5、MW + 1 実測値 = 6 5 6 . 2 9 6 であった。

#### 【 0 0 9 2 】

##### E G F の還元的アルキル化

以前に報告されているものと同様の方法を使用して、組換えヒト E G F ( R & D s y s t e m s ) を D B C O - アルデヒドにコンジュゲートさせた。E G F の溶液 ( 6 . 4 m g、7 . 9 5 m L、P B S 中 0 . 8 0 6 m g / m l ) を 1 m L の酢酸ナトリウム緩衝液 ( 5 0 0 m M、p H 5 . 5 ) と合わせた。D B C O - アルデヒド ( 9 . 9 2 m g、1 5 当量 ) を 9 5 0 u L の D M F に溶解させ、E G F 溶液に加えた。反応液を 3 0 分間攪拌した後、シアノ水素化ホウ素ナトリウム ( 1 0 0 u L、T H F 中 1 M ) を加えて、最終濃度を 1 0 m M とした。反応液を室温で終夜攪拌した。反応を L C M S によってモニターし、所望の生成物への概ね 7 0 % の変換が U V によって検出されたとき、完了したと判定した ( 予測 MW 6 9 8 6 . 9 2、実測 MW 6 9 8 6 . 9 )。Amicon Ultra 5 K Centrifugal Filter Device ( E M D M i l l i p o r e ) を使用して反応混合物を濃縮し、所望の生成物を Z e b a S p i n C o l u m n、7 K M W C O ( T h e r m o F i s h e r ) で精製した。最終生成物の濃度を U V 分析によって決定した。D B C O 部分の完全性を、1 0 当量の 4 - アジドアニリン塩酸塩との反応によって試験した。E G F - D B C O のアジドアニリンとの完全な反応が、L C M S によって観察された ( 予測 MW 7 1 2 1 . 0 6、実測 MW 7 1 2 0 . 8 5 )。

#### 【 0 0 9 3 】

##### P L A - P E G - アジドの合成

1 3 0 のモノマー融解条件下で 2 - エチルヘキサン酸スズ ( I I ) を触媒として使用する D , L - ラクチドの開環重合において、市販品として入手可能な - ヒドロキシ - アジド - ポリエチレングリコール ( H O - P E G - アジド、R a p p P o l y m e r e ) をマクロ開始剤として使用した。得られる P L A - P E G - アジドをジクロロメタンに溶解させ、次いで、メチル t e r t - ブチルエーテル ( M T B E ) およびヘプタン ( 7 0 / 3 0 v / v ) 中に沈殿させることにより回収した。

#### 【 0 0 9 4 】

##### P L A - C y 5 の合成

1 0 k D a の P L A - C O O H ( 1 グラム、0 . 1 m m o l ) を 1 0 m L の D M S O に溶解させ、最終濃度を 1 0 0 m g / m L とした。これに、C y 5 - アミン ( 0 . 0 5 8 g、0 . 1 m m o l )、P y B O P ( 0 . 0 5 2 g、0 . 1 m m o l )、および D I E A ( 0 . 0 8 7 m L、0 . 5 m m o l ) を加えた。カップリング反応を L C M S によってモニターし、完了後、生成物を M B T E 中 2 0 % のヘプタンに沈殿させることにより精製した。得られる青色の固体を濾別し、M T B E 中 2 0 % のヘプタンで洗浄した。

#### 【 0 0 9 5 】

##### ナノ粒子調製

P L A - C y 5 が添加されたナノ粒子の水性懸濁液中での調製についての一般エマルジョン手順は、次のとおりである。1 9 . 8 % のポリマーと 0 . 2 % の P L A - C y 5 とを含む 2 0 % の固体 ( w t % ) で構成された有機相を形成した。有機溶媒は、酢酸エチル ( E A ) およびベンジルアルコール ( B A ) であり、B A が有機相の 2 0 % ( w t % ) を占める。有機相を、水中 0 . 2 5 % のコール酸ナトリウムと 2 % の B A と 4 % の E A ( w t % ) とから構成された水相と、概ね 1 : 5 の比 ( 有機相 : 水相 ) で混合した。一次粗エマルジョンは、単純に混合しながら、またはローターステーターホモジナイザーの使用によって、2 つの相の組合せによって形成された。次いで、一次エマルジョンを、高圧ホモジナイザーの使用によって微細エマルジョンに形成した。次いで、微細エマルジョンを、冷

10

20

30

40

50

えた(0~5%)脱イオン水に混合しながら加えることによりクエンチした。クエンチ：エマルジョン比は、概ね10：1であった。次いで、クエンチにTween-80の35%(wt%)溶液を加えて、Tween-80を全体で概ね4%とした。ナノ粒子を、限外濾過/ダイアフィルトレーションによって単離および濃縮した。

#### 【0096】

ポリマーの特徴付け

ポリマーの数平均分子量、重量平均分子量、および多分散性指数を、Tosoh Biosciences EcoSEC(Model HLC-8320GPC)におけるサイズ排除クロマトグラフによって決定した。試料をTSK Gel Column(4.6mm×15cm、3μm、Tosoh Biosciences #W00013)に注入し(10μL、1mg/mL)、35℃にて0.25mL/分で実施した。

10

#### 【0097】

ナノ粒子サイズ分析

Wyatt DynaProプレートリーダーにおいて、158°で散乱させた830nmレーザーを用いた、25℃の希薄水性懸濁液の動的光散乱(DLS)によって、粒度分布を決定した。粒径分析は、三通りに実施しており、平均粒径の平均値を報告する。すべての試料について、三通りの測定の標準偏差は、3nm以下であった。

#### 【0098】

ゼータ電位分析

Brookhaven InstrumentsのPALS Zeta Potential Analyzerにおいて、ゼータ電位を決定した。試料を1mMのNaCl溶液に希釈して、最終濃度を約1mg/mLのナノ粒子とした。各試料1.7mLをキュベットに加え、各キュベットをBrookhaven ZetaPlusに入れ、次いで、25℃で5分間平衡化した後、測定を行った。

20

#### 【0099】

ELISA

組換えヒトEGFR(5μg/mL、R&D Systems)を、0.1Mの炭酸/炭酸水素緩衝液(Sigma-Aldrich)中に、4℃で一晩かけて、96ウェルプレート上に捕捉した。PBS中2%のBSAを用い、プレートを室温で2時間かけてブロックした。EGFR結合をめぐってEGFと競合することがわかっている、EGFRを標的とするペプチドおよびナノ粒子について、ペプチドおよびナノ粒子(標的化および非標的化)の段階希釈物を、アッセイ緩衝液(PBS中2%のBSA、0.05%のTween-20)中で0.7nMのビオチン化組換えヒトEGF(Molecular Probes)と共に室温で90分間インキュベートした。P<sub>2</sub>リガンドに由来するペプチドおよび標的化ナノ粒子については、ペプチドおよびナノ粒子(標的化および非標的化)の段階希釈物を、アッセイ緩衝液中で1nMのP<sub>2</sub>-ビオチン二量体および50nMの組換えヒトEGF(R&D Systems)と共に室温で90分間インキュベートした。プレートを、0.05%のTween-20を含有するPBS(PBS-T)で3回洗浄し、次いで、アッセイ緩衝液に希釈したストレプトアビジン-HRP(Thermo Fisher Scientific)の1：10,000希釈物と共に、室温で90分間インキュベートした。プレートをPBS-Tでさらに3回洗浄し、次いで、TMB基質(BioRx)と共に室温で15分間インキュベートした。反応を停止溶液(BioRx)で停止させ、マイクロプレートリーダー(SpectraMax M5e、Molecular Devices)において450nmで吸光度を読み取った。

30

40

#### 【0100】

スクリーニングELISA

異なるフォーマットのEGFR結合ELISAを開発して、EGFとの競合が報告されているペプチドをスクリーニングした。以前に記載したELISA法のように、組換えヒトEGFR(5μg/mL、R&D Systems)を、0.1Mの炭酸/炭酸水素緩衝液(Sigma-Aldrich)中に、4℃で一晩かけて、96ウェルプレート

50

上に捕捉した。PBS中2%のBSAを用い、プレートを室温で2時間かけてブロックした。ペプチドを、アッセイ緩衝液(PBS中2%のBSA、0.05%のTween-20)中に、100  $\mu$ Mという1段階の濃度で、0.7 nMのビオチン化組換えヒトEGF(Molecular Probes)と共に、室温で90分間インキュベートした。ペプチドが100% DMSO保存液として復元されたため、アッセイにおけるDMSOの最終濃度は、すべての試料について2%となった。プレートを、0.05%のTween-20を含有するPBS(PBS-T)で3回洗浄し、次いで、アッセイ緩衝液に希釈したストレプトアビジン-HRP(Piece)の1:10,000希釈物と共に、室温で90分間インキュベートした。プレートをPBS-Tでさらに3回洗浄し、次いで、TMB基質(BioFex)と共に室温で15分間インキュベートした。反応を停止溶液(BioFex)で停止させ、マイクロプレートリーダー(SpectraMax M5e、Molecular Devices)において450 nmで吸光度を読み取った。

#### 【0101】

##### 細胞培養

EGFRを過剰発現するヒト表皮癌細胞株A431(ATCC)を、10%のウシ胎児血清(FBS)および100単位/mLのペニシリン-ストレプトマイシンで補充したRPMI培地(組織培養試薬はすべて、Thermo Fisher Scientific製)において、37、5%CO<sub>2</sub>雰囲気中で培養した。

#### 【0102】

##### 表面結合

培養したA431細胞を、 $2 \times 10^6$ 細胞/mLでPBS中5%BSAに再懸濁した。Cy5にコンジュゲートさせた標的化および非標的化ナノ粒子を段階希釈したものを、V底96ウェルプレートにおいてA431細胞と共に4で1時間インキュベートした。試料を氷冷PBSで3回洗浄して、非結合ナノ粒子を除去し、氷冷PBSに再懸濁した。試料をAccuri C6フローサイトメーター(BD Biosciences)で分析した。

#### 【0103】

##### 内部移行アッセイ

表面結合アッセイでのように、培養したA431細胞を、 $2 \times 10^6$ 細胞/mLでPBS中5%BSAに再懸濁した。Cy5にコンジュゲートさせた標的化および非標的化ナノ粒子を段階希釈したものを、V底96ウェルプレートにおいて、A431細胞と共に、37で様々な時間をかけてインキュベートした。試料を氷冷PBSで3回洗浄して、非結合ナノ粒子を除去した。各試料の半分を氷冷PBSに再懸濁し、Accuri C6で分析して、表面に結合したナノ粒子蛍光を発生させた。試料の残りの半分は、0.2 Mの酢酸および0.5 MのNaCl酸洗浄緩衝液で5分間処理した。次いで、試料を遠心分離し、氷冷PBSに再懸濁し、Accuri C6において、保持された蛍光について分析した。

#### 【0104】

##### SPR

Biacore T200機器(GE Healthcare)において、表面プラズモン共鳴(SPR)結合研究を実施した。概ね10,000 RUの抗Fc抗体(GE Healthcare、カタログ番号BR100839)を、CM5デキストランコーティッド金センサーチップ(GE Healthcare、カタログ番号BR100530)のフローセル1および2のそれぞれに、アミンカップリングによって固定した。Fcでタグ付けされた組換えヒトEGFR(rhEGFR-Fc、R&D systems、カタログ番号344-ER-050)をPBS中に10  $\mu$ g/mLで復元し、フローセル2に捕捉した。接触時間および得られたrhEGFR-Fc捕捉量は、分析物の性質、すなわち、ペプチドまたはナノ粒子のどちらであったかにより様々であった。EGF存在下で分析物の結合を試験するとき、rhEGF(R&D Systems、カタログ番号236-EG)のPBS中溶液を、rhEGFR-Fcの一面に予備注入してから、分析物を導

10

20

30

40

50

入した。

#### 【0105】

ペプチド結合アッセイを、0.05体積%の界面活性剤P20および5体積%のDMSOで補充した10mMのPBS緩衝液中にて、25℃で実施した。ペプチドをrhEGFR-Fc表面の全面に60秒間注入した後、60秒間解離させ（緩衝液注入）、10秒パルスの3M MgCl<sub>2</sub>で再生させた。試験する各ペプチドの各濃度について、新たなrhEGFR-Fc表面を作製した。ペプチド結合データを、1:1ラングミュア動態モデルに適合させて、相互作用のオンレート( $k_a$ )、オフレート( $k_d$ )、および/または平衡結合定数(KD)を取得することにより分析した。

#### 【0106】

ナノ粒子結合アッセイを、10mMのHBS-EP+緩衝液(GE Healthcare、カタログ番号BR100669)中にて、25℃で実施した。ナノ粒子をrhEGFR-Fc表面の全面に60秒間注入した後、60秒間解離させ、10秒パルスの3M MgCl<sub>2</sub>で再生させた。試験する各ナノ粒子の各濃度について、新たなrhEGFR-Fc表面を作製した。ナノ粒子センソグラムは、ナノ粒子と標的との間の結合相互作用が多価的な性質をもつために、1:1ラングミュア動態モデルにぴたりと適合させることができなかった。その代わりとして、ナノ粒子結合データを、注入終了後の単一時点における結合応答対濃度のプロットとして示した。

#### 【0107】

Cy5のin vitro放出動態

生理的シンク条件下でin vitroのPLA-Cy5放出動態を決定した。ナノ粒子をリン酸緩衝溶液(PBS)中10%のポリソルベート20に懸濁させ、37℃の水浴中で穏やかに攪拌しながらインキュベートした。定期的に、一定分量の懸濁液を除去し、264,000gで30分間超遠心分離した。上清および超遠心分離前の懸濁液の試料を蛍光(ex650nm、em670nm)分析し、上清中に放出されたPLA-Cy5濃度を、遠心分離していない試料中の合計濃度と比較することにより、放出パーセントを算出した。

#### 【0108】

(実施例3)

クリック化学反応が可能にしたナノ粒子

臨床開発および大規模製造では、受容体を標的とするナノ粒子が、PEG末端において低分子量標的化リガンドに共有結合によってコンジュゲートさせたPLA-PEGを含む標的化ポリマーを組み込むことにより生成される。ナノエマルジョン製造プロセスの際、標的化リガンドは、親水性PEG鎖と共に、ナノ粒子の表面に配向される。標的化ポリマーの合成は、大規模ナノ粒子生成にとって望ましいものの、これには、数百ミリグラムからグラム量の標的化リガンドと、かなりの化学的な手間が必要となる場合があり、これが、より多種類の分子を評価する妨げとなりかねない。したがって、本発明者らは、ナノ粒子にコンジュゲートさせた異なる標的化分子のより迅速かつリガンド効率のよいスクリーニングを可能にする表面コンジュゲーション戦略を開発した。

#### 【0109】

ナノ粒子表面コンジュゲーションを可能にするために、本発明者らは、ほとんどの標的化リガンド中に見出される官能基に対してオルソゴナルとなっており、ナノ粒子の水性懸濁液と適合しており、ナノ粒子保存液の長期貯蔵に対して安定となるであろう、種々の化学事象を探索した。銅を媒介としたアルキン-アジド付加環化化学(CuAAC)は、当初は有望な戦略のように思われたが、この手法は、いくつかの反応条件の評価にもかかわらず、典型的にはスクリーニングにかけられた様々なリガンド(低分子、ペプチド、タンパク質)との適合性に一貫性がないことが判明した。反応が効率よく進まなかったこともあれば、反応中に、リガンドを主体とするかなりの不純物が形成されたこともあった。コンジュゲーション後の分子構造の特徴付けがかなりの難題となることによって、リガンド分解の潜在的可能性が高くなり、したがって、この化学事象は、受容体を標的とするナノ

10

20

30

40

50



粒子の評価に不適切であるとみなされた。

【0110】

最も信頼度が高く効率のよい化学事象は、歪み促進型アジドアルキン付加環化（S P A A C）であった。この手法では、P E G末端に、その後ナノ粒子表面に表出するアジド基を呈する、大規模単一バッチのP L A - P E G - アジドポリマーが合成された。このポリマーが組み込まれているナノ粒子は、表面上にいくつかのアジド基を有し、対応する歪みアルキン官能基を含有するリガンドに、種々の密度で結合させることができる。本発明者らは、反応性と安定性のバランスがとれており、水への溶解性があり、市販品として入手可能であることから、ジベンゾシクロオクチン（D B C O）を選択した。このようにして、多くの標的化リガンドを1桁のミリグラム量で合成し、ナノ粒子コンジュゲートとしての結合についてスクリーニングすることができる。

10

【0111】

H O - P E G - アジドからの、オクタン酸スズを触媒とした開環重合（図3 Aおよび3 B）によって、P L A - P E G - アジドを合成した。ナノ粒子の大部分を占めたポリマーの特性に見合ったポリマー（16 k D aのP L A、5 k D aのP E G）を作製した。このポリマー上のアジド官能基の完全性は、市販品として入手可能なD B C Oアミンとの反応によって確認した（図4 A）。未反応のD B C Oは、紫外線（U V）A 2 8 0および質量分析の両方によって検出され、生成物のP L A - P E G - アジド - D B C Oは、クロマトグラムのP L G A - P E G溶離領域におけるA 2 8 0をモニターすることにより検出される。P L A - P E G - アジドは、280 nmの吸光を伴わないため、吸光度の増大は、反応が進行し、D B C O部分のU V特性がポリマーに移動したことを示す（図4 B）。D B C O部分の吸光性は、トリアゾール環が形成されたときに減少しており、したがって、ポリマーU V吸光度は、出発遊離D B C Oと同じ強度には達しなかったことに留意すべきである。この分析によって、アジド官能基が重合条件の間に変化しなかったことが実証され、D B C Oアミンの99%の消費が観察された。

20

【0112】

フローサイトメトリーおよび他のアッセイにおけるナノ粒子検出を可能にするために、本発明者らは、ナノ粒子構造に蛍光標識を組み込もうと努力を尽くした。クリック化学反応によって、ナノ粒子をリガンドとフルオロフォアの両方で効率よく修飾することが可能になるが、ナノ粒子の表面は、標的化リガンドだけで修飾して、非特異的結合を防ぐことが好ましかった。したがって、ナノ粒子コアに安定してカプセル化することのできるC y 5 蛍光ペイロードを合成した。10 k D aのP L A - カルボン酸ポリマーを、C y 5 - アミンフルオロフォア誘導体にコンジュゲートさせた。このポリマーは、疎水性であり、アッセイ条件下で多くはナノ粒子内にカプセル化されたままとなる十分な分子量を有する。これは、i n v i t r o放出法を使用して確認しており、図26に示されるとおり、T = 0時点でのC y 5の4%の放出に続いて、48時間かけて10%未満のC y 5が示された。

30

【0113】

実施例1および2に記載したとおり、ナノ粒子をナノエマルジョンプロセスによって作製した。簡潔に述べると、ナノ粒子成分（P L A - P E G、P L A - P E G - アジド、およびP L A - C y 5）をすべて、ベンジルアルコールと酢酸エチルとからなる有機相に溶解させた。有機相を、界面活性剤を含有する水相と乳化させ、エマルジョンを高圧ホモジナイザーに通して、所望の液滴サイズを得た。大幅に過剰の水に希釈して、エマルジョン液滴から溶媒を抽出し、粒子を形成することにより、最終エマルジョンを作り出した。最終ステップは、タンジェンシャルフロー濾過とし、カプセル化されていない成分および溶媒を除去した。表2に示すとおり、30%（P L A - P E Gポリマーに対するモル%）のアジドポリマーおよびP L A - C y 5ポリマー（全ポリマーの1重量%）を含めても、粒径または多分散性には、こうした構成要素を含まないナノ粒子に比べて、ほとんど影響がないように思われた。

40

【0114】

50

## 【表 2】

**表2.** PLA-PEG-アジドポリマー、非アジドポリマー、アジド官能化ナノ粒子、および非アジド官能化ナノ粒子の特性。

|          | ポリマー特性   |          |          |           | ナノ粒子特性 |           |
|----------|----------|----------|----------|-----------|--------|-----------|
|          | Mn (NMR) | Mn (SEC) | Mw (SEC) | PDI (SEC) | サイズ    | ゼータ<br>電位 |
| 16-5-アジド | 20246    | 24663    | 27674    | 1.12      | 106.6  | -11.74    |
| 16-5-OMe | 19855    | 24213    | 27380    | 1.13      | 105.1  | -9.21     |

10

## 【0115】

ナノ粒子の最終水性懸濁液は、D B C O - アミンを代用リガンドとして使用することにより、アジド官能基の表面表出および反応性について特徴付けた。アジド基は、ナノ粒子表面上の全 P E G 末端基の 30 % に相当すると予想される。P E G 鎖のすべてがナノ粒子の表面に表出した場合、化学量論量の D B C O アミンが完全に消費されるはずである。実際に、反応は、非常に効率的であり、概ね 100 % の D B C O - アミンが消費され、アジド官能基がナノ粒子表面にほぼ定量的に表出したことが示された（図 4 C）。同じ 30 % のナノ粒子に対して、より少ない化学量論の D B C O リガンドを使用して、表面にコンジュゲートされたりリガンドのレベルが異なるナノ粒子を生成することができる。本発明者らにより、試験した 0 . 25 % ~ 30 % の範囲にかけて、D B C O リガンドの概ね定量的なコンジュゲーションが観察された。反応液は、4 で終夜インキュベートして、ナノ粒子分解および C y 5 ペイロード放出を最小限に抑えた。

20

## 【0116】

したがって、アジドナノ粒子および D B C O 試薬の使用が、ナノ粒子表面上に種々のレベルで標的化リガンドを導入する有効な方法であることが決定された。コンジュゲーションの効率が高いことで、余分なりガンドを必要とせずに済み、コンジュゲーション後の精製は、簡略化され、遊離リガンドが結合アッセイの妨げとなるリスクは、最小限に抑えられる。加えて、投入リガンド化学量論を様々にすることにより、所望のリガンドレベルを正確かつ容易に制御することができる。

30

## 【0117】

（実施例 4）

## E G F 標的化ナノ粒子

こうした研究の陽性対照を設けるために、E G F R の天然におけるリガンドである上皮成長因子（E G F）を、共有結合によって D B C O につないで、ナノ粒子表面へのコンジュゲーションを可能にした（図 5）。E G F は、概ね 6 k D a の、53 アミノ酸のタンパク質である。（N H S エステルなどの）アミド結合を形成する試薬を無秩序に使用して E G F アミノ基（リシンおよび N 末端アミン）を修飾すると、E G F R に対する E G F 親和性は、損なわれかねない。E G F の選択的な N 末端修飾を、二官能性 D B C O - アルデヒドリンカーを用いた還元的アルキル化によって実現した。アルデヒドリンカーを種々の条件下で E G F と反応させ、生成物を L C M S によって分析した。10 ~ 15 当量のアルデヒドおよび 10 m M のシアノ水素化ホウ素ナトリウムを用いた p H 5 . 5 での還元的アルキル化では、単一アルキル化 E G F が大部分を占める結果となり、二重アルキル化または無修飾 E G F がそれぞれ 10 % ~ 20 % となった（表 3）。反応はすべて、50 m M の酢酸ナトリウム緩衝液（p H 5 . 5）中 10 % の D M F（v / v）中で進めた。生成物分布は、L C / M S（280 n m での U V 吸収）によって測定した。

40

## 【0118】

## 【表 3】

表3. EGFの還元的アミノ化についてスクリーニングした反応条件。

| 反応条件       |             |       | 生成物分布                   |            |
|------------|-------------|-------|-------------------------|------------|
| NaCNBH3 mM | アルデヒド<br>当量 | % EGF | % EGF-DBCO <sub>2</sub> | % EGF-DBCO |
| 10         | 5           | 35    | 6                       | 59         |
| 10         | 10          | 26    | 8                       | 66         |
| 10         | 15          | 12    | 16                      | 72         |
| 10         | 20          | 11    | 18                      | 71         |
| 15         | 20          | 7     | 23                      | 70         |
| 20         | 20          | 6     | 26                      | 68         |

10

## 【0119】

還元剤の濃度を増すことで、EGFの消費はより多くなったものの、これによって、より高い割合の二重アルキル化生成物も生じた。二重アルキル化生成物は、活性がより低い場合もあり、またはナノ粒子の架橋につながりかねなかったため、望ましくなかった。加えて、未修飾EGFは、ナノ粒子にコンジュゲートされないはずであり、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）を使用して、その後、除去し得る。得られるDBCO-EGFを、残りの試薬から、脱塩カラムを使用して精製し、次いで、遠心濃縮装置を使用して濃縮した。DBCO部分の完全性は、DBCO-EGF生成物をアジド-アニリン塩酸塩（AAHC）と反応させることにより確認した。単一および二重修飾DBCO-EGFは、AAHCに効率よくコンジュゲートされたが、未修飾EGFは、インタクトなままとなった（図6および表4）。

20

## 【0120】

## 【表 4】

表4. EGF-DBCOコンジュゲーション予測および実測分子量

| 化合物                   | MW計算値  | MW実測値  |
|-----------------------|--------|--------|
| EGF                   | 6347.1 | 6347.6 |
| EGF-DBCO              | 6986.9 | 6986.9 |
| EGF-DBCO <sub>2</sub> | 7626.7 | 7627.2 |
| EGF-DBCO-アジドアニリン      | 7121.1 | 7120.9 |

30

## 【0121】

次に、DBCO-EGFリガンドを、概ね2.5%のリガンド密度（例えば、12のうち1つのアジドがEGFリガンドとコンジュゲートされることになる）で、アジドナノ粒子にコンジュゲートさせ、得られるコンジュゲートを、サイズ排除クロマトグラフィーによって精製した。単一および二重標識DBCO-EGF成分は、ナノ粒子に効率よく結合したが、未修飾EGFは、そのままとなり、SECによって除去された。

40

## 【0122】

## （実施例5）

## EGF-NPの組換えEGFRへの結合

EGFナノ粒子（EGF-NP）の結合特性を、表面プラズモン共鳴（SPR、またはBiacore）によって、また競合ELISAアッセイを使用して評価した。ELISAアッセイでは、ナノ粒子または遊離EGFリガンドを、組換えヒトEGFR-Fcでコートされた96ウェルプレート上への結合をめぐる、市販品として入手可能なビオチン-EGFコンジュゲートと競合させた。組換えヒトEGFR（5 μg/mL、R&D Systems）を、0.1 Mの炭酸/炭酸水素緩衝液（Sigma-Aldrich）中にて、4℃で一晩かけて、96ウェルプレート上に捕捉した。PBS中2%のBSAを用

50

い、プレート室温 (RT) で 2 時間かけてブロックした。ペプチドを、アッセイ緩衝液 (PBS 中 2 % の BSA、0.05 % の Tween-20) 中に、100  $\mu$ M で、0.7 nM のビオチン化組換えヒト EGF (Molecular Probes) と共に、室温で 90 分間インキュベートした。ペプチドが 100 % DMSO 保存液として還元されたため、アッセイにおける DMSO の最終濃度は、すべての試料について 2 % となった。プレートを、0.05 % の Tween-20 を含有する PBS (PBS-T) で 3 回洗浄し、次いで、アッセイ緩衝液に希釈したストレプトアビジン-HRP (Pierce) の 1:10,000 希釈物と共に、室温で 90 分間インキュベートした。プレートを PBS-T でさらに 3 回洗浄し、次いで、TMB 基質 (BioFex) と共に室温で 15 分間インキュベートした。反応を停止溶液 (BioFex) で停止させ、マイクロプレートリーダー (SpectraMax M5e, Molecular Devices) において 450 nm で吸光度を読み取った。図 7 に、この分析の結果を示す。ELISA によって示されるとおり、ナノ粒子および遊離 EGF-DBCO リガンドは、96 ウェルプレート上にコートされた組換えヒト EGF R-Fc 融合タンパク質への結合をめぐって、市販品として入手可能なビオチン-EGF と競合する。DBCO-EGF リガンドは、EGF R への結合が未修飾 EGF の概ね 2 分の 1 であり (例えば、2 倍の高さの IC<sub>50</sub>)、DBCO 修飾化学反応が結合親和性に及ぼす影響は最小限に抑えられたことが示された (図 7A)。ナノ粒子-EGF コンジュゲートは、IC<sub>50</sub> が未修飾 EGF の概ね 10 倍の高さであり、DBCO-EGF の 4 倍の高さであった。しかし、ナノ粒子表面にコンジュゲートさせた EGF は、ナノ粒子の 3 次元構造およびサイズのために、すべてが EGF R と接触するとは予想されなかったことを考えると、これはまったく意外ではない。したがって、EGF のナノ粒子へのコンジュゲーションは、その結合親和性をそれほど変化させなかった。未修飾アジドナノ粒子は、EGF R への結合をめぐって、EGF-ビオチンと競合せず、非特異的ナノ粒子結合は実証されなかった。

#### 【0123】

SPR をオルソゴナルな方法として使用して、組換え EGF R-Fc 融合タンパク質に結合する未修飾 EGF および EGF-ナノ粒子コンジュゲートを特徴付けた。図 7B に示されるとおり、DBCO で修飾した EGF は、ELISA データに一致して、センソグラムがわずかに変化している。EGF ナノ粒子では、分析物の分子質量がより大きいために、未修飾 EGF に比べて明確に大きい応答が得られる。非官能化アジドナノ粒子では、EGF R-Fc でコートされた表面への結合が最小限となり、EGF ナノ粒子の応答が、特異的な受容体結合の結果として生じることを示している。ナノ粒子の EGF R 受容体表面との相互作用が多価的な性質をもち、ナノ粒子の分子量を正確に特徴付けることが困難であるために、この相互作用については平衡結合定数 (K<sub>D</sub>) を決定しなかった。しかし、SPR 曲線の結合動態から、多価的な結合相互作用に関して予想される、緩徐なオフレートに伴う密な相互作用が示唆される。

#### 【0124】

##### (実施例 6)

#### 低分子量 EGF R リガンドスクリーニング

EGF が、EGF R に対するナノ粒子標的化の信頼度の高い概念実証リガンドとして働くが、本発明者らは、ナノ粒子製造プロセスに適合する、より低分子量のリガンドを探索した。最初の手法として、天然におけるリガンド EGF および TGF (トランスフォーミング成長因子アルファ) の 10 アミノ酸長の重複ペプチド断片を合成し、EGF R 競合 ELISA および SPR を使用して、EGF R への結合についてスクリーニングした。残念なことに、また合成された断片のいくつかは EGF R 結合能を保持したことを示した報告とは対照的に、作製したペプチドはいずれも、どちらの方法によっても EGF R への結合を示さなかった (表 5 および 6)。

#### 【0125】

【表 5】

表5. EGF断片

| 名称      | 配列 <sup>a</sup>                                      | K <sub>D</sub> | EGFの<br>阻害% |
|---------|--|----------------|-------------|
| EGFf-1  | H2N-NSDSECPLSH-CONH2                                 | 結合なし           | < 20        |
| EGFf-2  | H2N- <u>C</u> PLSHDGY <u>C</u> L-CONH2               | 実測せず           | 試験せず        |
| EGFf-3  | H2N-DGY <u>C</u> LHDGV <u>C</u> -CONH2 <sup>b</sup>  | 結合なし           | 62.5        |
| EGFf-4  | H2N- HDGVCMYIEA-CONH2                                | 実測せず           | 試験せず        |
| EGFf-5  | H2N-MYIEALDKYA-CONH2                                 | 結合なし           | < 20        |
| EGFf-6  | H2N-LDKYACNC(Acm)VV-CONH2                            | 結合なし           | < 20        |
| EGFf-7  | H2N-C(Acm)NCVVGYIGE-CONH2                            | 結合なし           | < 20        |
| EGFf-8  | H2N-GYIGERCQYR-CONH2                                 | 結合なし           | < 20        |
| EGFf-9  | H2N-RCQYRDLKWW-CONH2 <sup>b</sup>                    | > 100 mM       | 63.8        |
| EGFf-10 | H2N-YRDLKWWELR-CONH2                                 | 結合なし           | < 20        |
| EGFf-11 | H2N- <u>C</u> LHDGVC(Acm)MYIEALDKY <u>A</u> CN-CONH2 | 実測せず           | 試験せず        |
| EGFf-12 | H2N- <u>C</u> MYIEALDKY <u>A</u> CN-CONH2            | 実測せず           | 試験せず        |
| EGFf-13 | H2N- <u>C</u> VVGYIGER <u>C</u> -CONH2               | 実測せず           | 試験せず        |

10

20

<sup>a</sup> ジスルフィド結合によって、下線の付いたシステインが連結されている。Acm保護基は、対になっていないシステイン上に残した。

<sup>b</sup> 遊離システインを介した酸化的二量体化による経時的な結合の減少

【 0 1 2 6 】

【表 6】

表6. TGF断片

| 名称      | 配列 <sup>a</sup>  | K <sub>D</sub> | 100μMでのEGFの阻害% |
|---------|--|----------------|----------------|
| TGFf-1  | H2N-G-Par-GG- <u>C</u> HSGYVGAR <u>C</u> -CONH2              | 結合なし           | 試験せず           |
| TGFf-2  | H2N-G-Par-GG- <u>C</u> FHGTC(Acm)RFLVQEDKPAC <u>C</u> -CONH2 | 結合なし           | 試験せず           |
| TGFf-3  | H2N-G-Par-GG- <u>C</u> PDSHTQFC(Acm)FHGT <u>C</u> -CONH2     | 溶解性でない         | 試験せず           |
| TGFf-4  | H2N-G-Par-GG-ADLLAVVAA-CONH2                                 | 結合なし           | < 20           |
| TGFf-5  | H2N-G-Par-GG-ARCEHADADL-CONH2                                | 結合なし           | < 20           |
| TGFf-6  | H2N-G-Par-GG-SGYVGARCEH-CONH2                                | 結合なし           | < 20           |
| TGFf-7  | H2N-G-Par-GG-AC(Acm)VCHSGYVG-CONH2                           | 結合なし           | < 20           |
| TGFf-8  | H2N-G-Par-GG-QEDKPAC(Acm)VCH-CONH2                           | 結合なし           | < 20           |
| TGFf-9  | H2N-G-Par-GG-CRFLVQEDKP-CONH2                                | 結合なし           | < 20           |
| TGFf-10 | H2N-G-Par-GG-C(Acm)FHGTCRFV-CONH2                            | 結合なし           | < 20           |
| TGFf-11 | H2N-G-Par-GG-SHTQFCFHGT-CONH2                                | 結合なし           | < 20           |
| TGFf-12 | H2N-G-Par-GG-NDCPDSHTQF-CONH2                                | 結合なし           | < 20           |
| TGFf-13 | H2N-G-Par-GG-WSHFNDCPD-CONH2                                 | 結合なし           | < 20           |
| TGFf-14 | H2N-G-Par-GG-ARCHEHADLLA-CONH2                               | 結合なし           | < 20           |

10

20

<sup>a</sup> ジスルフィド結合によって、下線の付いたシステインが連結されている。Acm保護基は、対になっていないシステイン上に残した。

## 【 0 1 2 7 】

文献を見直すと、いくつかのペプチド（MW範囲1200～1900）がEGFRに結合すると報告されていたことが明らかになった。そのペプチドのすべてを合成し、EGFR結合について、SPRを使用して評価した（表7）。すべてがEGFRへの結合をめぐるEGFと競合すると報告されてはいないので、これらのペプチドのスクリーニングに競合ELISAは使用しなかった。驚いたことに、報告されたペプチドの少数だけが、EGFRへの再現可能な結合を示した。図8Aおよび8Bに、これらペプチドについてのSPR結合データの概要を示す。合成された17種のうち5種のペプチドにおいてのみ、ベースラインを上回る結合シグナルが得られ、これらのうち3種だけが、50μM未満の濃度で飽和性結合を示した。全5種の結合性ペプチドおよび抜粋した他の非結合性ペプチドを、C末端側のリシン側鎖にDBC O部分を付けて（Gly-Glyスパーサーを含む）再合成し、次いで、5%および10%のリガンド密度（ナノ粒子1個あたり約225個および450個のリガンド）で、アジドナノ粒子にコンジュゲートさせた。

30

40

## 【 0 1 2 8 】

## 【表 7】

表7. EGFに結合すると報告されたペプチドの配列。

| 配列               | 報告された<br>EGF競合相手 | ペプチドID | 分子量     |
|------------------|------------------|--------|---------|
| SECFPLAPDWLSCIL  | +                | 1      | 1689.79 |
| DPCTWEVWGRECLQ   | —                | 2      | 1717.73 |
| TDCVIFGLETYCLR   | —                | 3      | 1628.77 |
| SGCLDALWQCVY     | —                | 4      | 1353.58 |
| LPDDSLPELICKVR   | —                | 5      | 1652.89 |
| GPCVLIRDYYLLCLE  | —                | 6      | 1765.89 |
| VLCHRYYPICYT     | +                | 7      | 1663.78 |
| MFCFRWYAGWSCVS   | +                | 8      | 1738.72 |
| HFYPTKTPGY       | —                | 9      | 1451.72 |
| AASRALWAFNSD     | —                | 10     | 1307.62 |
| SYWGYTVDIRRGK    | —                | 11     | 1577.76 |
| KTCVSTTFDLWFVCFA | +                | 12     | 1863.87 |
| YHWYGYTPQNV      | +                | 13     | 1538.73 |
| LARLLT           | —                | 14     | 684.46  |
| CEHGAMEIC        | +                | 15     | 988.36  |
| AKFNDYWRW        | +                | 16     | 1283.62 |
| CPAKFSPSVC       | +                | 17     | 1628.77 |
| YCPWKFPDEECY     | —                | 18     | 1688.7  |

10

20

30

40

50

## 【0129】

ナノ粒子のEGFR-Fcへの結合を、SPRを使用して評価した。図8Bに、ナノ粒子コンジュゲートの結合センソグラムを示す。EGF-NPに匹敵するナノ粒子結合シグナルが、P<sub>1</sub>について実証され、わずかに弱めの結合がP<sub>2</sub>について観察された。しかし、他のペプチド-ナノ粒子コンジュゲートについての結合は、こうした条件下で認められなかった。P<sub>2</sub>は、どちらのリガンド密度でもEGFRに結合しなかったものの、ナノ粒子にコンジュゲートさせたP<sub>1</sub>の10mol%での結合応答は、より強くなっており、動態は、5%および10%でのP<sub>2</sub>ナノ粒子より急速であるように思われる（オンおよびオフレート）。P<sub>1</sub>が示したより急速な動態によって、P<sub>1</sub>だけがより高い（10%）リガンド密度でナノ粒子のEGFRへの結合を媒介することができた理由の説明をつけることができる。本発明者らは、粒子により多く添加することでP<sub>1</sub>の局所濃度を増大させると、このリガンドが示した実際の動態にもかかわらず、結合する機会がこれによってより多くなると考えている。肝要な結合要素を特定するために、P<sub>1</sub>をさらに研究した。

## 【0130】

(実施例7)

P<sub>1</sub>の構造活性関係性

ペプチド構造の環状部分内のアミノ酸に対してアラニンスキャンを行って、どのアミノ酸が結合に肝要であったかを判定した。ペプチド内の各アミノ酸を、個々にアラニンにより置き換えた。P<sub>1</sub>は、EGFとの競合を示したため、EGF競合ELISAを使用して、EGFRへの結合について評価した（図9Aおよび表8）。データから、アラニンで変異させたペプチドでは結合が低減したため、このペプチド配列におけるほとんどのアミノ酸が、ペプチドのEGFRへの最適な結合に必要なことが示された。しかし、1種のアミノ酸（Leu6）は、アラニンに変更されたとき、P<sub>1</sub>よりわずかに高い親和性を有するペプチドをもたらした（P<sub>1-3</sub>）。引き続き、P<sub>1-3</sub>上の隣接するアミノ酸のアラニンスキャンを行った。4つの隣接する残基のうちの3つも、アラニンで変異させたペプチドにおけるEGFR結合の低減によって実証されたとおり、EGFRへの結合に

において重要な役割を果たしていた。しかし、1位におけるアラニンは、 $P_{1-3}$ に比べてごくわずかな親和性の向上を示した。

【0131】

【表8】

表8.  $P_1$ アラニンスキャン

| アミノ酸位 | Ac-S <sub>1</sub> E <sub>2</sub> C <sub>3</sub> F <sub>4</sub> P <sub>5</sub> L <sub>6</sub> A <sub>7</sub> P <sub>8</sub> D <sub>9</sub> W <sub>10</sub> L <sub>11</sub> S <sub>12</sub> C <sub>13</sub> I <sub>14</sub> L <sub>15</sub> GGK(DBCO)-CONH2 |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|-------|---|---|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
|       | ペプチドID  | ペプチド相対的IC <sub>50</sub><br>( $P_1$ に対して正規化) |  | 10%NP相対的IC <sub>50</sub><br>( $P_1$ に対して正規化) |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 3     | X   | -   |  | -  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 4     | $P_{1-1}$   | 1.9   |  | 約0.3   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 5     | $P_{1-2}$   | 11.5  |  | > 2.5  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 6     | $P_{1-3}$   | 0.8   |  | 0.05   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 7     | X   |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 8     | $P_{1-4}$   | 2.7   |  | > 3  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 9     | $P_{1-5}$   | 4.4   |  | > 3  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 10    | $P_{1-6}$   | 7.1   |  | > 3  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 11    | $P_{1-7}$   | 3.5   |  | > 3  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 12    | $P_{1-8}$   | 1   |  | > 3  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 13    | X   | -   |  | -  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 1     | $P_{1-3-1}$   | 0.7   |  | 1  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 2     | $P_{1-3-2}$   | > 5   |  | > 10   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 14    | $P_{1-3-3}$   | > 5   |  | > 10   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 15    | $P_{1-3-4}$   | 3.2   |  | > 10   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

10

20

【0132】

すべてのアラニンスキャンペプチドを10mol%でナノ粒子にコンジュゲートさせ、結合について、EGF競合ELISAを使用して評価した。 $P_{1-3}$  (Leu6-Ala)コンジュゲートは、 $P_1$ コンジュゲートに比べて、EGFR結合の増強を示した。図9Bに示されるとおり、 $P_{1-3}$ ナノ粒子の親和性は、 $P_1$ ナノ粒子の概ね20倍増大し、この単一アミノ酸変異が、遊離リガンド親和性にはそれほど影響を及ぼさないものの、ナノ粒子にコンジュゲートさせたとき、EGFRへの結合の予想外の向上につながったことが示された。

30

【0133】

SPR分析を実施して、 $P_1$ および $P_{1-3}$ ナノ粒子のEGFRへの結合を比較した。1mg/mLのナノ粒子濃度での $P_1$ および $P_{1-3}$ ナノ粒子のセンソグラムは、5%の密度で最小限の結合、10%のリガンド密度でより強固な結合を実証している(図9C)。加えて、10%の $P_{1-3}$ ナノ粒子は、10%の $P_1$ ナノ粒子に比べて著しく緩徐なオフレートを示した。したがって、遊離ペプチド親和性のわずかな向上によって、ナノ粒子結合特性に有意な変化がもたらされた。

40

【0134】

EGFR結合の促進が $P_{1-3}$ ナノ粒子によって実現されたが、このリガンドは、EGFとエピトープが共通しており、このため、標的化ナノ粒子がin vivoで天然リガンドと競合するはめになりかねない。加えて、本発明者らは、ナノ粒子表面の装飾が最小限に抑えられるような、より低密度で強固なナノ粒子結合を実現することのできるリガンドを所望したが、これは、粒子の秘匿性および長期循環を維持するために重要となり得る。N-メチルアミノ酸ならびに他の天然および非天然アミノ酸点変異による置き換えを含む、 $P_{1-3}$ の追加の類似体を作製したが、得られるペプチドはいずれも、 $P_{1-3}$ をさらに超えるEGFR結合は一切示さなかった(表9)。

50



【 0 1 3 5 】

【 表 9 】

**表9.** P<sub>1-3</sub> トランケーションおよびN-メチル類似体のK<sub>D</sub>および相対的IC<sub>50</sub>。

| ペプチド                       | 配列 <sup>a</sup>                                | K <sub>D</sub> (μM) |
|----------------------------|--|---------------------|
| P <sub>1-3</sub> トランケーション  |  |                     |
| P <sub>1-3-5</sub>         | Ac-SEC <u>F</u> PAAPDWLSCGGK(DBCO)-CONH2       |                     |
| P <sub>1-3-6</sub>         | Ac-C <u>F</u> PAAPDWLSCGGK(DBCO)-CONH2         | NB                  |
| P <sub>1-3-7</sub>         | Ac-C <u>F</u> PAAPDWLSCGGK(DBCO)--CONH2        | NB                  |
| P <sub>1-3</sub> N-メチルスキャン |  |                     |
| P <sub>1-3-8</sub>         | Ac-SEC <u>F</u> PA(Me)APDWLSCILGGK(DBCO)-CONH2 | NB                  |
| P <sub>1-3-9</sub>         | Ac-SEC <u>F</u> PAAPDWL(Me)SCILGGK-CONH2       | NB                  |
| P <sub>1-3-10</sub>        | Ac-SEC <u>F</u> PAAPDWLSCI(Me)LGGK-CONH2       | NB                  |
| P <sub>1-3-11</sub>        | Ac-SEC <u>F</u> PAAPDWL(Me)SCILGGK-CONH2       | NB                  |
| P <sub>1-3-12</sub>        | Ac-SE(ME) <u>C</u> FPAAPDWLSCILGGK(DBCO)-CONH2 | 4.4                 |
| P <sub>1-3-13</sub>        | Ac-SEC <u>F</u> (ME)PAAPDWLSCILGGK(DBCO)-CONH2 | 1.4                 |
| P <sub>1-3-8</sub>         | Ac-SEC <u>F</u> PA(Me)APDWLSCILGGK(DBCO)-CONH2 | NB                  |
| 交互DBCO配置                   |  |                     |
| P <sub>1-3-14</sub>        | (DBCO)SEC <u>F</u> PAAPDWLSCIL-CONH2           | NB                  |

<sup>a</sup> ジスルフィド結合によって、下線の付いたシステインが連結されている。

【 0 1 3 6 】

( 実施例 8 )

P<sub>2</sub> の構造活性関係性

ナノ粒子結合を媒介することが実証された別の文献 E G F R 結合性ペプチドである P<sub>2</sub> は、E G F も E G F R に結合しているとき、親和性の増強を有することが報告された。しかし、本発明者らの手では、このペプチドの親和性の S P R 分析を E G F 存在下または非存在下で行うと、互角の K<sub>D</sub> が明らかになった ( 表 1 0 )。

【 0 1 3 7 】

【 表 1 0 】

**表10.** アポEGFRに対するP<sub>2</sub>の親和性は、EGFに結合したEGFRに対する親和性と互角である

|   | EGFなし                        | EGFあり                        |
|---|------------------------------|------------------------------|
| k <sub>a</sub> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) | 3.7 ± 0.2 × 10 <sup>4</sup>  | 3.8 ± 0.4 × 10 <sup>4</sup>  |
| k <sub>d</sub> (s <sup>-1</sup> )                 | 9 ± 2 × 10 <sup>-3</sup>     | 7 ± 2 × 10 <sup>-3</sup>     |
| K <sub>D</sub> (M)                                | 2.4 ± 0.3 × 10 <sup>-7</sup> | 1.7 ± 0.6 × 10 <sup>-7</sup> |

【 0 1 3 8 】

興味深いことに、5 % および 1 0 % の両方のリガンド密度での P<sub>2</sub> のナノ粒子コンジュゲートは、結合した E G F の存在下で、E G F R への結合の増強を示した ( 図 1 0 および 図 1 1 )。さらに、E G F と P<sub>2</sub> の両方を含んだ二重標的化ナノ粒子について、相乗効果が認められた ( 図 1 2 )。E G F R は、E G F 結合後に安定化される立体構造変化を経て、E G F R 二量体化を可能にする、より「開いた」立体配置に変形することが知られている。もとのペプチドは、E G F 存在下でのファージディスプレイによって発見され、リボソームコンジュゲートとして研究された。したがって、結合エピトープは、結合状態または非結合状態の E G F R に存在し得るが、エピトープは、E G F R が E G F に結合された状態にあるとき、より接触可能になり、より弱い立体的障害での、ナノ粒子、リボソーム、またはファージ粒子の接近が可能となり得る。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 3 9 】

標的化ナノ粒子送達には、E G Fと競合しなかったリガンドが望ましかったため、P<sub>2</sub>をさらに評価して、その特性を理解し、結合親和性を最適化した。これらの特色をうまくモジュレートして、ナノ粒子結合が向上するようにした。

## 【 0 1 4 0 】

C u A A Cを使用してアジドナノ粒子にコンジュゲートさせることを目的とした、C末端プロパルギルグリシン部分を有する、ペプチドP<sub>2</sub>の類似体が、当初作製された。しかし、後の研究において、S P A A C化学がより効率的であり、コンジュゲーションの際にリガンドの不純物をより発生しにくいことが明らかになったため、アルキンをD B C O部分により置き換えた。やはり、このC末端部分を含有する遊離リガンドを評価して、ペプチドについての構造活性関係性を評価した。

10

## 【 0 1 4 1 】

P<sub>2</sub>に関するアラニンスキャン分析によって、ペプチド構造の肝要な成分が強調された(図13および表11)。詳細には、環状構造および1つの芳香族残基(T r p 8)が、結合にとって最も肝要であった。他の重要な残基には、他の芳香族残基(T r p 5)および残基9~11(G l y - A r g - G l u)が含まれた。残基4、6、および7、ならびに隣接アミノ酸1、2、13、および14(環状部分の外側)は、アラニンに変更されても、結合に対してほとんど乃至まったく影響がなかった。特に、P r o 2のアラニンによる置き換え(P<sub>2</sub>-2)は、控えめながらより高い親和性のペプチドをもたらすように思われた。トランケーション分析では、コアに結合する要素が、システインの間の残基内に含有されていたことが示され、これにより、アラニンスキャン分析が裏付けられた(表12)。

20

## 【 0 1 4 2 】

## 【表11】

表11. P<sub>2</sub> Alaスキャン

| アミノ酸位 | P <sub>2</sub> Alaスキャン |                     |        |
|-------|------------------------|---------------------|--------|
|       | ペプチドID                 | K <sub>D</sub> (μM) | 相対的亲和性 |
| 親     | P <sub>2</sub>         | 0.8                 | 1      |
| 1     | P <sub>2-1</sub>       | 1.3                 | 1.6    |
| 2     | P <sub>2-2</sub>       | 0.6                 | 0.8    |
| 3     | P <sub>2-3</sub>       | nb                  | nb     |
| 4     | P <sub>2-4</sub>       | 4.4                 | 5.7    |
| 5     | P <sub>2-5</sub>       | 75                  | 96     |
| 6     | P <sub>2-6</sub>       | 2.3                 | 2.9    |
| 7     | P <sub>2-7</sub>       | 4.0                 | 5.1    |
| 8     | P <sub>2-8</sub>       | nb                  | nb     |
| 9     | P <sub>2-9</sub>       | 78                  | 100    |
| 10    | P <sub>2-20</sub>      | 50                  | 63     |
| 11    | P <sub>2-11</sub>      | 約300                | >100   |
| 12    | P <sub>2-12</sub>      | nb                  | nb     |
| 13    | P <sub>2-13</sub>      | 1.4                 | 1.8    |
| 14    | P <sub>2-14</sub>      | 1.7                 | 2.1    |

30

40

## 【 0 1 4 3 】

## 【表 1 2】

表12. アルキンの位置が代替的なものを含むトランケーション

| 名称                | 配列 <sup>a</sup>  | $K_D / P_2 K_D$ |
|-------------------|--|-----------------|
| P <sub>2-15</sub> | H2N-DP <u>C</u> TWEVWG <u>R</u> E <u>C</u> -GG-Par-G-CONH2 | 0.9             |
| P <sub>2-16</sub> | H2N- <u>C</u> TWEVWG <u>R</u> E <u>C</u> LG-Par-G-CONH2    | 2.0             |
| P <sub>2-17</sub> | H2N- <u>C</u> TWEVWG <u>R</u> E <u>C</u> -GG-Par-G-CONH2   | 0.4             |
| P <sub>2-18</sub> | H2N-DA <u>C</u> TWEVWG <u>R</u> E <u>C</u> -GG-Par-G-CONH2 | 1.6             |
| P <sub>2-19</sub> | H2N-A <u>C</u> TWEVWG <u>R</u> E <u>C</u> -GG-Par-G-CONH2  | 2.4             |
| P <sub>2-20</sub> | Ac-A <u>C</u> TWEVWG <u>R</u> E <u>C</u> -GG-Par-G-CONH2   | 3.0             |
| P <sub>2-21</sub> | H2N-Par-A <u>C</u> TWEVWG <u>R</u> E <u>C</u> -CONH2       | 6.7             |
| P <sub>2-22</sub> | H2N-DP <u>C</u> TWEVWG <u>R</u> E <u>C</u> -Par-CONH2      | 1.8             |
| P <sub>2-23</sub> | H2N-Par- <u>C</u> TWEVWG <u>R</u> E <u>C</u> -CONH2        | 4.5             |

<sup>a</sup> ジスルフィド結合によって、下線の付いたシステインが連結されている。

## 【0 1 4 4】

ある特定の位置を他のアミノ酸にさらに変異させて、各位置において受け容れられ得る同様のアミノ酸の範囲を決定した（表 1 3）。

## 【0 1 4 5】

10

20

## 【表 1 3】

表13. P<sub>2</sub>の鍵アミノ酸上での点変異

| 名称                | 配列 <sup>a</sup>                                  | K <sub>D</sub> / P <sub>2</sub> K <sub>D</sub> |
|-------------------|--|--|
| Thr-4での置換         |  |  |
| P <sub>2-24</sub> | H2N-DPCAWEVWG <u>RE</u> CLQ-GG-Par-G-CONH2       | 5.45   |
| P <sub>2-25</sub> | H2N-DPCVWEVWG <u>RE</u> CLQ-GG-Par-G-CONH2       | 1.10   |
| P <sub>2-26</sub> | H2N-DPCSWEVWG <u>RE</u> CLQ-GG-Par-G-CONH2       | 1.68   |
| P <sub>2-27</sub> | H2N-DPC-Par-WEVWG <u>RE</u> CLQ-CONH2            | 5.40   |
| Trp-5での置換         |  |  |
| P <sub>2-28</sub> | H2N-DPCTAEVWG <u>RE</u> CLQ-GG-Par-G-CONH2       | 62.49  |
| P <sub>2-29</sub> | H2N-DPCTFEVWG <u>RE</u> CLQ-GG-Par-G-CONH2       | 9.24   |
| Glu-6での置換         |  |  |
| P <sub>2-30</sub> | H2N-DPCTWAVWG <u>RE</u> CLQ-GG-Par-G-CONH2       | 2.89   |
| P <sub>2-31</sub> | H2N-DPCTW-Par-VWG <u>RE</u> CLQ-CONH2            | 0.86   |
| P <sub>2-32</sub> | H2N-DPCTWRVWG <u>RE</u> CLQ-GG-Par-G-CONH2       | 1.21   |
| P <sub>2-33</sub> | H2N-DPCTWGWWG <u>RE</u> CLQ-GG-Par-G-CONH2       | 42.69  |
| Val-7での置換         |  |  |
| P <sub>2-34</sub> | H2N-DPCTWEAWG <u>RE</u> CLQ-GG-Par-G-CONH2       | 5.79   |
| P <sub>2-35</sub> | H2N-DPCTWE-Par-WG <u>RE</u> CLQ-CONH2            | 5.69   |
| P <sub>2-36</sub> | H2N-DPCTWEIWG <u>RE</u> CLQ-GG-Par-G-CONH2       | 3.48   |
| P <sub>2-37</sub> | H2N-DPCTWELWG <u>RE</u> CLQ-GG-Par-G-CONH2       | 10.1   |
| P <sub>2-38</sub> | H2N-DPCTWETWG <u>RE</u> CLQ-GG-Par-G-CONH2       | 12.3   |
| Trp-8での置換         |  |  |
| P <sub>2-39</sub> | H2N-DPCTWEVAG <u>RE</u> CLQ-GG-Par-G-CONH2       | NB   |
| P <sub>2-40</sub> | H2N-DPCTWEVFG <u>RE</u> CLQ-GG-Par-G-CONH2       | 100μmでのNS                                      |
| Gly-9での置換         |  |  |
| P <sub>2-41</sub> | H2N-DPCTWEVWARE <u>CL</u> Q-GG-Par-G-CONH2       | 100μmでのNS                                      |
| P <sub>2-42</sub> | H2N-DPCTWEVWa <u>RE</u> CLQ-GG-Par-G-CONH2       | NB   |
| P <sub>2-43</sub> | H2N-DPCTWEVW-Sar- <u>RE</u> CLQ-GG-Par-G-CONH2   | NB   |
| P <sub>2-44</sub> | H2N-DPCTWEVW-βA- <u>RE</u> CLQ-GG-Par-G-CONH2    | NB   |
| Arg-10での置換        |  |  |
| P <sub>2-45</sub> | H2N-DPCTWEVWGA <u>E</u> CLQ-GG-Par-G-CONH2       | 100μmでのNS                                      |
| P <sub>2-46</sub> | H2N-DPCTWEVWGK <u>E</u> CLQ-GG-Par-G-CONH2       | 13.94  |
| P <sub>2-47</sub> | H2N-DPCTWEVWG-F(pg)- <u>E</u> CLQ-GG-Par-G-CONH2 | 37.08  |
| Glu-11での置換        |  |  |
| P <sub>2-48</sub> | H2N-DPCTWEVWGA <u>E</u> CLQ-GG-Par-G-CONH2       | 100μmでのNS                                      |
| P <sub>2-49</sub> | H2N-DPCTWEVWGRD <u>CL</u> Q-GG-Par-G-CONH2       | 3.39   |

<sup>a</sup> ジスルフィド結合によって、下線の付いたシステインが連結されている。

## 【0 1 4 6】

予想されたとおり、アラニン置換に寛容であった残基は、結合にほとんど影響を及ぼすことなく、他のアミノ酸に同様に変更することができた。ジスルフィド架橋をモジュレートする、または置き換えることができるかを判定するために、一連のラクタムおよびジスルフィド環化ペプチド類似体を作製した。ジアミノ酪酸 (D a b) とアスパラギン酸残基との間の内部アミド結合形成の一例を、図 1 4 に示す。ラクタム環化ペプチドはすべて、

10

20

30

40

50

かなりの活性を失っており、極性がより強めのアミド結合環化は、ペプチド構造内で十分に許容されなかったことが示された（表 1 4 ）。

【 0 1 4 7 】

【 表 1 4 】

**表14.** 種々のアミンおよびカルボン酸を含有するアミノ酸を利用した、ジスルフィド結合のラクタム環化との交換

| 名称                         | 配列  | 結果         |
|----------------------------|---|------------|
| Cys-3およびCys-12におけるジスルフィド置換 |   |            |
| P <sub>2-50</sub>          | H2N-DPCTWEVWGRE-homoC-LQ-GG-Par-G-CONH2       | 4.56       |
| P <sub>2-51</sub>          | H2N-DP-homoC-TWEVWGRECLQ-GG-Par-G-CONH2       | 8.88       |
| P <sub>2-52</sub>          | H2N-DP-homoC-TWEVWGRE-homoC-LQ-GG-Par-G-CONH2 | 14.04      |
| P <sub>2-53</sub>          | H2N-DPCTWEVWGRE-Pen-LQ-GG-Par-G-CONH2         | 2.64       |
| P <sub>2-54</sub>          | H2N-DP-Pen-TWEVWGRECLQ-GG-Par-G-CONH2         | 4.78       |
| P <sub>2-55</sub>          | H2N-DP-Pen-TWEVWGRE-Pen-LQ-GG-Par-G-CONH2     | 1.18       |
| P <sub>2-56</sub>          | H2N-DP-homoC-TWEVWGRE-Pen-LQ-GG-Par-G-CONH2   | > 100 mM   |
| ラクタム置換 <sup>b</sup>        |   |            |
| P <sub>2-58</sub>          | H2N-GDP-Orn-TWEVWGREDLQ-GG-Par-G-CONH2        | 結合なし       |
| P <sub>2-59</sub>          | H2N-GDP-Dap-TWEVWGREDLQ-GG-Par-G-CONH2        | 結合なし       |
| P <sub>2-60</sub>          | H2N-GDPKTWEVWGREELQ-GG-Par-G-CONH2            | 結合なし       |
| P <sub>2-61</sub>          | H2N-GDP-Orn-TWEVWGREELQ-GG-Par-G-CONH2        | 結合なし       |
| P <sub>2-62</sub>          | H2N-GDP-Dab-TWEVWGREELQ-GG-Par-G-CONH2        | 17μmで飽和せず  |
| P <sub>2-63</sub>          | H2N-GDP-Dap-TWEVWGREELQ-GG-Par-G-CONH2        | 結合なし       |
| P <sub>2-64</sub>          | H2N-GDPDTWEVWGREKLQ-GG-Par-G-CONH2            | 結合なし       |
| P <sub>2-65</sub>          | H2N-GDPDTWEVWGRE-Orn-LQ-GG-Par-G-CONH2        | 結合なし       |
| P <sub>2-66</sub>          | H2N-GDPDTWEVWGRE-Dap-LQ-GG-Par-G-CONH2        | 結合なし       |
| P <sub>2-67</sub>          | H2N-GGDPETWEVWGREKLQ-GG-Par-G-CONH2           | 100μmで飽和せず |
| P <sub>2-68</sub>          | H2N-GDPETWEVWGRE-Orn-LQ-GG-Par-G-CONH2        | 結合なし       |
| P <sub>2-69</sub>          | H2N-GDPETWEVWGRE-Dap-LQ-GG-Par-G-CONH2        | 結合なし       |

<sup>b</sup> ラクタム結合によって、下線の付いたアミノ酸が連結されている。

【 0 1 4 8 】

Cys - Cys ジスルフィドを他のジスルフィド結合により置き換えることで、結合の度合いが様々である類似体が作製された。選択されたシステイン類似体を図 1 5 に示し、システイン類似体が結合に及ぼした影響を図 1 6 および表 1 4 に示す。主鎖とジスルフィドとの間に追加のメチレンを有するホモシステイン（homo cys）を含めることは、結合に対して有害であると思われる、より大きな大環状分子は好適でなかったことが示唆された。ペニシラミン（pen）を含めることは、Cys と組み合わせた場合のみ許容されたが、しかし、Pen Pen 類似体は、親 Cys - Cys ペプチドと親和性が互角であった。

【 0 1 4 9 】

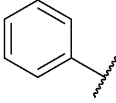
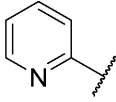
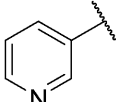
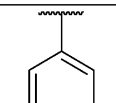
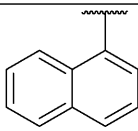
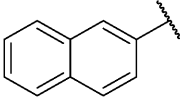
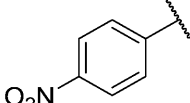
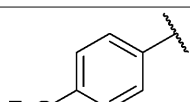
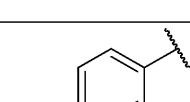
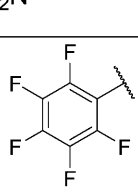
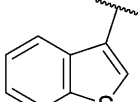
結合親和性を向上させる試みにおいて、ペプチド結合にとって肝要な芳香族残基を、個々に、種々の芳香族アミノ酸により置き換えした（表 1 5 ）。芳香族残基は、EGFR との重要な接触の媒介となるため、受容体との接触が向上しているまたは付加されている代

替官能基を導入することにより、結合を増強することが可能となり得る。それほど肝要でないトリプトファン残基においてフェニルアラニンによる置き換えを行うと、結合の一部が保持されたが、しかし、より肝要な Trp 8 位では、フェニルアラニンが許容されなかった。各トリプトファンを、個々に、15 種の非天然アミノ酸による置き換えも行った。これらのうちの、各位置における 1 種のアミノ酸が、わずかな親和性の向上を示した。5 位における 2 - インダノイル - グリシン残基によって、トリプトファンに比べてわずかに増強された結合を得ることができたが、しかし、8 位におけるこの残基では、結合が完全に無効になった。8 位では、5 - メトキシトリプトファンが、トリプトファンより概ね 2 倍良好であったが、しかし、5 位におけるこのアミノ酸の合成は、不成功であった。

【 0 1 5 0 】

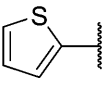
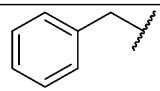
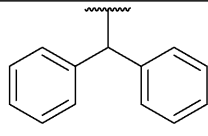
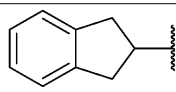
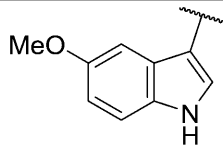
【表 15 - 1】

表15. トリプトファン5および8の非天然芳香族アミノ酸での置換

| Rの名称                  | Rの構造  | 位置  |     | ペプチド ID           | P <sub>2</sub> に対し<br>相対的なK <sub>D</sub> |
|-----------------------|---|-----|-----|-------------------|--|
|                       |   | W5  | W8  |                   |  |
| フェニルアラニン              |    | R   | Trp | P <sub>2-70</sub> | 9.24                                     |
|                       |   | Trp | R   | P <sub>2-71</sub> | > 100                                    |
| 2-ピリジルアラニン-1          |    | R   | Trp | P <sub>2-72</sub> | **                                       |
|                       |   | Trp | R   | P <sub>2-73</sub> | > 100                                    |
| 3-ピリジルアラニン-1          |    | R   | Trp | P <sub>2-74</sub> | 11.8                                     |
|                       |   | Trp | R   | P <sub>2-75</sub> | > 100                                    |
| 4-ピリジルアラニン-1          |    | R   | Trp | P <sub>2-76</sub> | > 100                                    |
|                       |   | Trp | R   | P <sub>2-77</sub> | > 100                                    |
| 1-ナフチルアラニン-1          |   | R   | Trp | P <sub>2-78</sub> | > 100                                    |
|                       |   | Trp | R   | P <sub>2-79</sub> | 42.9                                     |
| 2-ナフチルアラニン-1          |  | R   | Trp | P <sub>2-80</sub> | > 100                                    |
|                       |   | Trp | R   | P <sub>2-81</sub> | > 100                                    |
| 4-ニトロフェニルアラニン-1       |  | R   | Trp | P <sub>2-82</sub> | > 100                                    |
|                       |   | Trp | R   | P <sub>2-83</sub> | > 100                                    |
| 4-トリフルオロメチルフェニルアラニン-1 |  | R   | Trp | P <sub>2-84</sub> | > 100                                    |
|                       |   | Trp | R   | P <sub>2-85</sub> | > 100                                    |
| 4-アミノフェニルアラニン-1       |  | R   | Trp | P <sub>2-86</sub> | 9  |
|                       |   | Trp | R   | P <sub>2-87</sub> | **                                       |
| ペンタフルオロフェニルアラニン-1     |  | R   | Trp | P <sub>2-88</sub> | 8.5                                      |
|                       |   | Trp | R   | P <sub>2-89</sub> | > 100                                    |
| 3-ベンゾチエニルアラニン-1       |  | R   | Trp | P <sub>2-90</sub> | 1.6                                      |
|                       |   | Trp | R   | P <sub>2-91</sub> | 123.5                                    |

【 0 1 5 1 】

【表 15 - 2】

|                 |   |     |     |                    |            |
|-----------------|---|-----|-----|--------------------|------------|
| 2-チエニルアラニン-1    |  | R   | Trp | P <sub>2-92</sub>  | 15.9       |
|                 |   | Trp | R   | P <sub>2-93</sub>  | > 100      |
| ホモフェニルアラニン-1    |  | R   | Trp | P <sub>2-94</sub>  | 9.1        |
|                 |   | Trp | R   | P <sub>2-95</sub>  | > 100      |
| ジフェニルアラニン-1     |  | R   | Trp | P <sub>2-96</sub>  | 8.9        |
|                 |   | Trp | R   | P <sub>2-97</sub>  | > 100      |
| 2-インダニルグリシン-1   |  | R   | Trp | P <sub>2-98</sub>  | <b>0.3</b> |
|                 |   | Trp | R   | P <sub>2-99</sub>  | > 100      |
| 5-メトキシトリプトファン-1 |  | R   | Trp | P <sub>2-100</sub> | **         |
|                 |   | Trp | R   | P <sub>2-101</sub> | <b>0.5</b> |

10

## 【0152】

20

P<sub>2</sub> ペプチド類似体およびナノ粒子コンジュゲートの評価の際に、追加のアッセイを開発して、SPRに対してオルソゴナルなアッセイを用意した。これらのペプチドは、EGFと競合しないため、ビオチン化された新規な二量体型のP<sub>2</sub>を合成した(図17)。EGF存在下でのこのペプチドは、競合ELISAフォーマットで使用するための良好なトレーサーである。図18に、競合する遊離ペプチドP<sub>2</sub>または1%もしくは5%のリガンド密度のNPコンジュゲートからの結果を示す。特に、P<sub>2</sub>は、ナノ粒子にコンジュゲートさせたとき、モル濃度ベースでEGFR結合の向上を示しており、親和性がわずかに低下した天然リガンドEGFとは対照的である。ナノ粒子へのコンジュゲーション、および結果として起こる、多価的な結合によるオフレートの低下は、おそらく、急速なオンレートおよび緩徐なオフレートの結果として生じる高親和性結合を有するEGFリガンドに対してよりも、急速なオンレートおよびオフレートを有するペプチドリガンドに対して、より影響力をもつ。別個の動態プロファイルを有するリガンドを組み合わせると、相乗的なナノ粒子結合を得ることができる(図19)。

30

## 【0153】

構造活性関係性研究において作製された多くの類似体のうち、3種をさらに評価した。それら3種のペプチド(P<sub>2-2</sub>、P<sub>2-102</sub>、およびP<sub>2-55</sub>)をDBCOコンジュゲートとして合成し、親ペプチド(P<sub>2</sub>)と比較した。2つの芳香族変異P<sub>2-98</sub>およびP<sub>2-101</sub>を組み合わせ、1種のペプチド(P<sub>2-102</sub>)とした。P<sub>2-2</sub>は、アラニンスキャンシリーズから生まれ、P<sub>2-55</sub>には、Pen-Pen環化が組み込まれている。図20に示す、これら3種の類似体のSPR分析では、3種すべてにおいて、親ペプチドより親和性が向上していることが示された(P<sub>2</sub>と比べたP<sub>2-2</sub>、P<sub>2-102</sub>、P<sub>2-55</sub>)。ここでも、EGFの存在下または非存在下でのK<sub>D</sub>に、有意差はなかった(表16)。

40

## 【0154】



## 【表 16】

**表16.** P<sub>2</sub>と、アラニン、pen、および芳香族置換が組み込まれている類似体についての結合親和性のSPR分析、ならびにハイブリッドペプチドリガンドのSPR分析。

| リガンド                    | 配列  | K <sub>D</sub> -EGF (nM) | K <sub>D</sub> +EGF (nM) |
|-------------------------|---|--------------------------|--------------------------|
| P <sub>2</sub>          | Ac-DPCTWEVWGRECLQGGK(PEG4-DBCO)-CONH <sub>2</sub>             | 240 ± 30                 | 170 ± 60                 |
| P <sub>2-2</sub>        | Ac-DACTWEVWGRECLQGGK(PEG4-DBCO)-CONH <sub>2</sub>             | 29 ± 10                  | 54 ± 21                  |
| P <sub>2-102</sub>      | Ac-DPCT(2Ind)GEV(5MeO)WGRECLQGGK(PEG4-DBCO)-CONH <sub>2</sub> | 38 ± 14                  | 32 ± 13                  |
| P <sub>2-55</sub>       | Ac-DPPenTWEVWGREPenLQGGK(PEG4-DBCO)-CONH <sub>2</sub>         | 74 ± 14                  | 69 ± 24                  |
| P <sub>2-2/55</sub>     | Ac-DAPenTWEVWGREPenLQGGK(DBCO)-CONH <sub>2</sub>              | 137 ± 56                 | 97 ± 7                   |
| P <sub>2-2/102</sub>    | Ac-DACT(2Ind)GEV(5MeO)WGRECLQGGK(DBCO)-CONH <sub>2</sub>      | 23.8 ± 4.5               | 23.3 ± 0.3               |
| P <sub>2-55/102</sub>   | Ac-DPPenT(2Ind)GEV(5MeO)WGREPenLQGGK(DBCO)-CONH <sub>2</sub>  | 72.0 ± 4.8               | 75.4 ± 1.4               |
| P <sub>2-2/55/102</sub> | Ac-DAPenT(2Ind)GEV(5MeO)WGREPenLQGGK(DBCO)-CONH <sub>2</sub>  | 53 ± 26                  | 33.4 ± 2.9               |

## 【0155】

これら3種の類似体のナノ粒子コンジュゲートを1%および5%のリガンド密度で調製し、SPRおよび/またはP<sub>2</sub>競合ELISAによって評価した。センソグラムデータを適合させてK<sub>D</sub>を導こうとするのではなく、SPRデータを、2分間の注入後に観察された、濃度依存的な結合応答を表す「スナップショット」プロットに変換した(図21A、21B)。こうしたプロットのためのセンソグラム応答データを捕捉レベルで標準化して、実験の差を考慮に入れた。親P<sub>2</sub>にコンジュゲートさせたナノ粒子(5%)についての捕捉正規化された応答を、すべて5%のリガンド密度の新たな類似体と比較すると、EGFの非存在下では、3種すべての類似体について、結合はそれほど向上せず、EGFの存在下では、アラニンおよび芳香族類似体についてはそれほど向上せず、Pen類似体については結合が大きく増大したことが明らかになった(図21C)。ペニシラミンは、アミノ酸のベータ炭素上にgem-ジメチル基を含有しており、このために、立体構造の柔軟性が低減される。このペプチドが、遊離リガンドとして他の類似体に対して優れた結合親和性を表示さなかったことを考えると、このより強固なペプチド構造によって結合動態が変化し、これが、ナノ粒子結合に影響を及ぼし得る可能性がある。

## 【0156】

## 【表 17】

表17. P<sub>2</sub>、ならびにアラニン、pen、および芳香族置換が組み込まれている類似体についての結合親和性のELISA分析。

| リガ<br>ンド           | 配列  | 5%リガンド<br>密度NP              |                             | 1%リガンド<br>密度NP              |                             |
|--------------------|---|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|                    |   | IC <sub>50</sub><br>(μg/mL) | 相対<br>的<br>IC <sub>50</sub> | IC <sub>50</sub><br>(μg/mL) | 相対<br>的<br>IC <sub>50</sub> |
| P <sub>2</sub>     | Ac-DPCTWEVWGRECLQGGK(PEG4-<br>DBCO)-CONH2                 | 4.3                         | 基準                          | 81                          | 基準                          |
| P <sub>2-2</sub>   | Ac-DACTWEVWGRECLQGGK(PEG4-<br>DBCO)-CONH2                 | 3                           | 0.7                         | 17                          | 0.2                         |
| P <sub>2-102</sub> | Ac-<br>DPCT(2Ind)GEV(5MeO)WGRECLQGGK<br>(PEG4-DBCO)-CONH2 | 2.6                         | 0.6                         | 7.6                         | 0.09                        |
| P <sub>2-55</sub>  | Ac-<br>DPPenTWEVWGREPenLQGGK(PEG4-<br>DBCO)-CONH2         | 3.4                         | 0.79                        | 135                         | 1.67                        |

10

20

## 【0157】

ELISAデータを、表17に示している。P<sub>2</sub>競合ELISAの結果は、SPRデータと一致した。P<sub>2</sub>ELISAでは、トレーサーの高親和性結合にEGFが必要となり、したがって、ナノ粒子結合を+/-EGFでアセスメントすることができない。結果は、5%のリガンド密度で、3種すべての類似体コンジュゲートについて、親和性が控えめながら向上したことを示している。

30

## 【0158】

ナノ粒子コンジュゲートとしての3種すべての類似体で中程度の向上があったことを踏まえて、2種または3種すべての類似体の特色が単一ペプチド配列に組み込まれているハイブリッド配列を合成し、遊離リガンドおよびナノ粒子コンジュゲートとして評価した。遊離リガンドのK<sub>D</sub>を分析すると、親和性に対してそれほど影響がないことが明らかになる。一般に、芳香族残基を含めると、親和性が向上すると思われる、遊離リガンド親和性はすべて、EGFの存在に対して非感受性であった(表16)。

## 【0159】

ハイブリッドペプチドのナノ粒子コンジュゲートは、対照的に、結合に多少の有意差を示した。図22に、3種の二重、および1種の三重変異体のSPRスナップショットプロットを示す。最も顕著な傾向は、芳香族残基を含めると、EGF結合の非存在下で、ナノ粒子コンジュゲートのEGFRへの結合が劇的に向上することである。Ala2とPenの組合せは、結合にマイナスの影響を及ぼすように思われる。これは、PenおよびAla2置換だけを含有する二重変異体(P<sub>2-2/55</sub>)を、芳香族置換を含むものと比較することで強調される。このナノ粒子は、EGFの存在下では控えめながらEGFR結合を示すが、しかし、単独での受容体への結合は非常に弱い。芳香族置換を含有するすべてのナノ粒子が、EGF結合の際に、最小限の結合変化を示し、芳香族置換を有する二重および三重変異体リガンドは、全体的なナノ粒子結合の向上を示す。

40

## 【0160】

50

表 18 に示す、 $P_2$  競合 ELISA は、同様の結果を実証し、 $Ala_2 - Pen$  は、5% で、親ペプチド - ナノ粒子コンジュゲートに比べて相対的に変化しなかったが、芳香族置換を含有するハイブリッド類似体は、 $IC_{50}$  値がより低くなっていた。芳香族残基を含有するリガンドは、もとの親ペプチドに比べて親和性が向上していたが、単一置換を有するペプチドと実質的に差がなかった (表 16)。したがって、ナノ粒子結合の明白な向上を、単にリガンド親和性だけによって説明することはできない。

【0161】

【表 18】

表18. 5%でハイブリッドペプチドリガンドにコンジュゲートさせたナノ粒子のELISA結合分析

| リガンド                             | 配列  | $IC_{50}$<br>( $\mu g/mL$ ) | 相対的な差 |
|----------------------------------|---|-----------------------------|-------|
| $P_2$                            | Ac-DPCTWEVWGRECLQGKG(PEG5-DBCO)-CONH <sub>2</sub>           | 6                           | 基準    |
| $P_{2-2/55}$ [DA PenPen]         | Ac-DAPenTWEVWGREPenLQGKG(DBCO)-CONH <sub>2</sub>            | 6.3                         | 1.05  |
| $P_{2-2/102}$ [DA Aro]           | Ac-DACT(2Ind)GEV(5MeO)WGRECLQGKG(DBCO)-CONH <sub>2</sub>    | 3.7                         | 0.62  |
| $P_{2-55/102}$ [Aro PenPen]      | AcDPPenT(2Ind)GEV(5MeO)WGREPenLQGGK(DBCO)-CONH <sub>2</sub> | 2.2                         | 0.37  |
| $P_{2-2/55/102}$ [DA Aro PenPen] | AcDAPenT(2Ind)GEV(5MeO)WGREPenLQGGK(DBCO)-CONH <sub>2</sub> | 1.6                         | 0.27  |

【0162】

(実施例 9)

フローサイトメトリー分析

$PLA - Cy_5$  が組み込まれているペプチドナノ粒子コンジュゲートを、さらに、ヒト上皮癌  $A_{431}$  細胞の表面に発現された EGF R への結合について、フローサイトメトリーによって評価した。ナノ粒子を、EGF の存在下または非存在下で、 $A_{431}$  細胞と共に 4 でインキュベートし、次いで洗浄して、あらゆる非結合ナノ粒子を除去した。ナノ粒子結合をフローサイトメーターで分析した。4 では、EGF R 受容体内部移行が最小限に抑えられ、観察されるシグナルは、主として、細胞表面結合によるものである。

【0163】

図 23 A ~ 23 C に、フローサイトメトリー実験からの代表的なデータを示し、完全なデータを図 24 に示す。図 23 A および 23 B では、 $Pen$  置換を有するナノ粒子コンジュゲートについての結合曲線が比較される。EGF の存在下では、すべてのコンジュゲートが十分に結合したが、EGF の非存在下では、 $Pen$  / 芳香族および三重変異体だけが十分に結合した。細胞結合データの略式プロットと、SPR データである図 22 からの略式プロットとの間には、高度な一致がある。ペニシラミンおよび芳香族を含有する二重変異体、ならびに三重変異体は、最も強力な結合性ナノ粒子であり、詳細には、EGF の存在下または非存在下で、ほぼ同等な結合を示した。

【0164】

EGF、 $P_{1-3}$ 、および三重ハイブリッドナノ粒子コンジュゲートを、直接比較した (図 23 C)。同等なリガンド添加量では試験していないものの、結果は、リガンド選択および最適化手法によって、比較的高い親和性の、EGF R の天然におけるリガンドにコンジュゲートさせたナノ粒子と同様の程度に EGF R 発現細胞を結合することのできる、2 種のナノ粒子コンジュゲートが生み出されたことを示している。

【0165】

10

20

30

40

50

これらのリガンドおよびナノ粒子コンジュゲートを、室温でのSPRおよび4でのフローサイトメトリーを使用してスクリーニングおよび最適化した。SPRとフローサイトメトリーデータの比較的強い相関にもかかわらず、本発明者らは、これらのナノ粒子を*in vivo*で評価しようと考え、したがって、生理的温度でのその結合をアセスメントした。本発明者らは、37でのナノ粒子のA<sub>431</sub>細胞への結合および内部移行を評価した。表面に結合した粒子および内部移行した粒子を含めた合計結合ナノ粒子を、30分間のインキュベート後にアセスメントした(図25A)。次いで、各試料の一部を酸で処理して、表面に結合したナノ粒子を除去した。ナノ粒子と関連する残りの蛍光シグナルは、内部移行した画分を表す(図25B)。興味深いことに、3種すべてのナノ粒子が、30分までに30~60%内部移行しており、効率よく結合および内部移行することがわかった。

【0166】

(実施例10)

ペプチドおよびナノ粒子の特徴付け

抜粋した官能化および非官能化ナノ粒子の粒径およびゼータ電位を表19に示し、選択されたペプチドおよびペプチド-DBCOコンジュゲートの予測および実測分子量を表20に示す。

【0167】

【表19】

**表19. ナノ粒子サイズおよびゼータ電位**

| リガンド                       | 基盤サイズ<br>30%アジド粒子 | サイズ   | サイズ変化 | ゼータ電位 |
|----------------------------|-------------------|-------|-------|-------|
| 2.5% EGF                   | 106.6             | 108.1 | +1.5  | -10.3 |
| 10% P <sub>1</sub>         | 106.6             | 100.3 | -6.3  | -10.4 |
| 5% P <sub>1</sub>          | 73.2              | 78.7  | +5.5  | -17.1 |
| 10% P <sub>1-3</sub>       | 106.6             | 105.9 | -0.7  | -17.1 |
| 5% P <sub>1-3</sub>        | 73.2              | 78.2  | +5.0  | NT    |
| 10% P <sub>2</sub>         | 106.6             | 101.5 | -5.1  | -22.3 |
| 5% P <sub>2</sub>          | 106.6             | 96.3  | -10.3 | -11.4 |
| 5% P <sub>2-55</sub>       | 106.6             | 104.7 | -1.9  | NT    |
| 5% P <sub>2-2</sub>        | 106.6             | 122.6 | +16.0 | NT    |
| 5% P <sub>2-102</sub>      | 106.6             | 88.7  | -17.9 | NT    |
| 5% P <sub>2-2/55</sub>     | 106.6             | 87.2  | -19.4 | NT    |
| 5% P <sub>2-2/102</sub>    | 106.6             | 89.0  | -17.6 | NT    |
| 5% P <sub>2-55/102</sub>   | 106.6             | 84.8  | -21.8 | NT    |
| 5% P <sub>2-2/55/102</sub> | 106.6             | 104.0 | -2.6  | -8.1  |
| 30% N <sub>3</sub> -NP     | -                 | 106.6 | -     | -11.7 |
| 30% N <sub>3</sub> -NP     | -                 | 73.2  | -     | NT    |
| 100% PEG-NP                | -                 | 105.1 | -     | -9.2  |

【0168】

【表 20】

表20. 選択されたペプチドおよびコンジュゲートの予測および実測分子量

| ペプチドID                  | 配列   | MW計算値 (Da) | 逆重量積分によるMW実測値(Da) | m/zイオン実測値     |
|-------------------------|--|------------|-------------------|---------------|
| 1                       | SECFPLAPDWLSCIL  | 1691       | 1691.2            | 846.6         |
| 2                       | DPCTWEVWGRECLQ   | 1718.9     | 1718              | 860           |
| 3                       | TDCVIFGLETYCLR   | 1629.9     | 1629              | 815.5         |
| 4                       | SGCLDALWQCVY   | 1354.6     | 1354.8            | 678.4         |
| 5                       | LPDDSLPELICKVR   | 1653.9     | 1653.2            | 827.6         |
| 6                       | GPCVLIRDYYLLCLE  | 1767.1     | 1767              | 884.49        |
| 7                       | VLCHRYYPICYT   | 1664.9     | 1664.2            | 833.1         |
| 8                       | MFCFRWYAGWSCVS   | 1740.1     | 1740              | 871           |
| 9                       | HFYPTKTPGY   | 1209.4     | 1208.8            | 605.4         |
| 10                      | AASRALWAFNSD   | 1307.5     | 1307              | 654.5         |
| 11                      | SYWGYTVDIR   | 1577.8     | 1577              | 789.5         |
| 12                      | KTCVSTTFDLWFVCFA   | 1867.22    | NS                | NS            |
| 13                      | YHWYGYTPQNV  | 1539.7     | 1539.2            | 770.6         |
| 14                      | LARLLT   | 684.9      | 684.6             | 343.3         |
| 15                      | CEHGAMEIC  | 989.2      | 990.6             | 496.3         |
| 16                      | AKFNDYWRW  | 1284.5     | 1283.8            | 642.9         |
| 17                      | CPAKFSPSVC   | 1035.3     | 1036.8            | 519.4         |
| 18                      | YCPIWKFPDEECY  | 1688.7     | 1689              | 845.5         |
| P <sub>1</sub>          | Ac-SECFPLAPDWLSCILGGK(DBCO)-CONH <sub>2</sub>                        | 2554       | 2553.6            | 1277.8, 852.2 |
| P <sub>1-3</sub>        | Ac-SECFAAPDWLSCILGGK(DBCO)-CONH <sub>2</sub>                         | 2511.9     | 2511.6            | 1256.8, 838.2 |
| P <sub>2</sub>          | Ac-DPCTWEVWGRECLQGGK(DBCO)-CONH <sub>2</sub>                         | 2581.9     | 2581.6            | 1291.8, 861.5 |
| P <sub>2-2</sub>        | Ac-DACTWEVWGRECLQGGK(DBCO)-CONH <sub>2</sub>                         | 2555.9     | 2555.6            | 1278.8, 852.9 |
| P <sub>2-55</sub>       | Ac-DP-Pen-TWEVWGRE-Pen-LQGGK(DBCO)-CONH <sub>2</sub>                 | 2638       | 2637.6            | 1319.8, 880.2 |
| P <sub>2-102</sub>      | Ac-DPCT-(2Ind)G-EV-(5MeO)W-GRECLQGGK(DBCO)-CONH <sub>2</sub>         | 2598.9     | 2598.6            | 1300.3, 867.2 |
| P <sub>2-2/55</sub>     | Ac-DA-Pen-TWEVWGRE-Pen-LQGGK(DBCO)-CONH <sub>2</sub>                 | 2567.9     | 2567.2            | 1284.6, 856.7 |
| P <sub>2-2/102</sub>    | Ac-DACT-(2Ind)G-EV-(5MeO)W-GRECLQGGK(DBCO)-CONH <sub>2</sub>         | 2528.4     | 2528.2            | 1265.1, 843.7 |
| P <sub>2-55/102</sub>   | Ac-DP-Pen-T-(2Ind)G-EV-(5MeO)W-GRE-Pen-LQGGK(DBCO)-CONH <sub>2</sub> | 2655       | 2654.4            | 1328.2, 885.8 |
| P <sub>2-2/55/102</sub> | Ac-DA-Pen-T-(2Ind)G-EV-(5MeO)W-GRE-Pen-LQGGK(DBCO)-CONH <sub>2</sub> | 2629       | 2628.6            | 1315.3, 877.2 |

【0169】

均等物

当業者は、単に通例の実験法を使用して、本明細書に記載されている開示されるナノ粒子の特定の実施形態に対する多くの均等物を認識するか、確認することができる。このような均等物は、下記の特許請求の範囲によって包含されるものとする。

【0170】

参照による組み込み

本明細書において引用した全ての特許、公開された特許出願、ウェブサイト、および他の参照文献の全内容は、参照によりその全体が明確に本明細書において組み込まれている。

【図1】

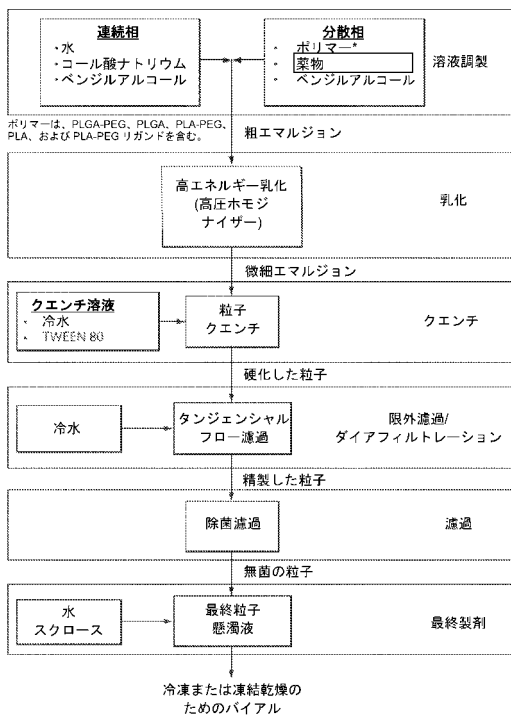


図1

【図2 - 1】

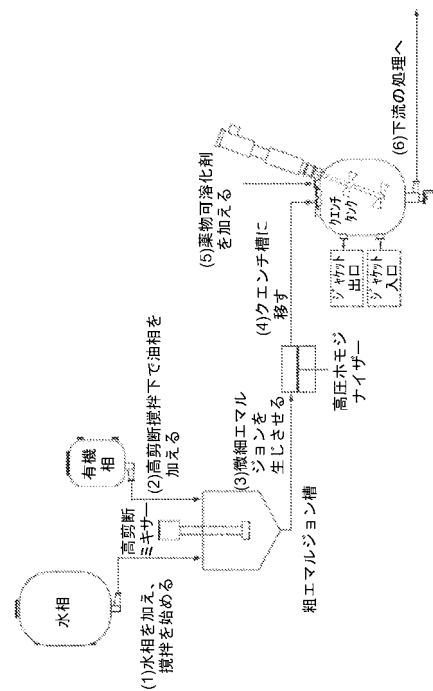


図2A

【 図 2 - 2 】

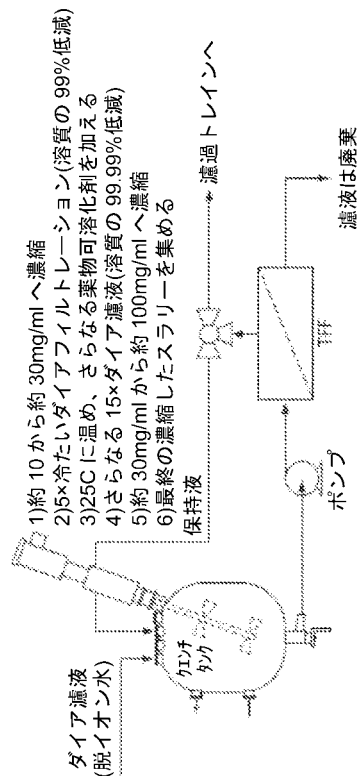


図 2B

【 図 5 】

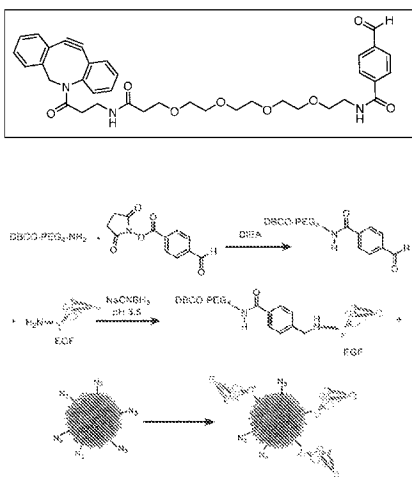


図 5

【 図 3 】

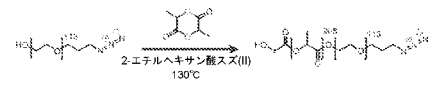
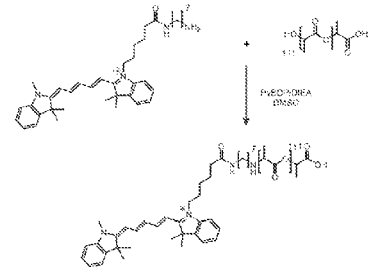


図 3B



【 図 4 】

図 4A

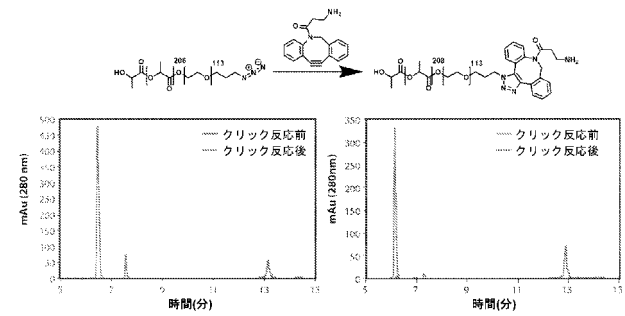


図 4B

図 4C

【 図 6 】

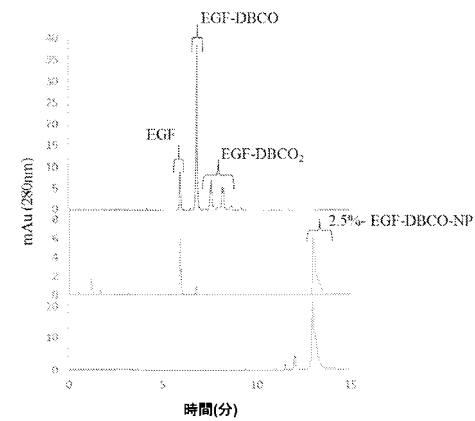


图 6

【図 7】

図 7A

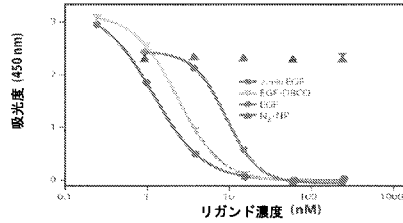
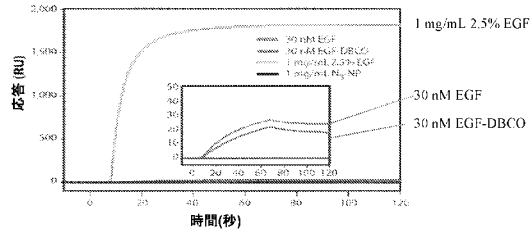


図 7B



【図 8】

図 8A

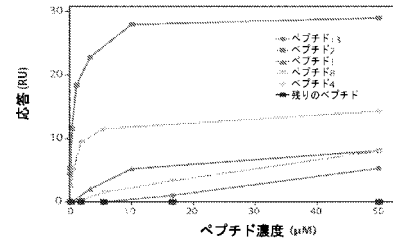
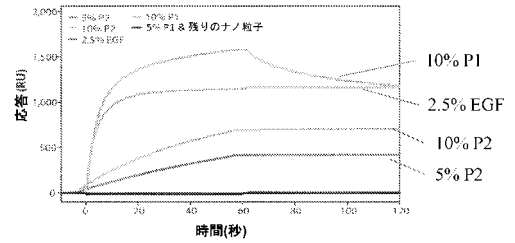
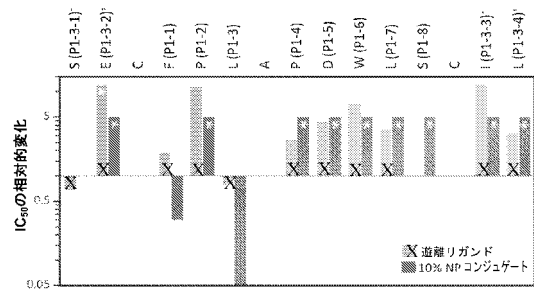


図 8B



【図 9 - 1】



【図 9 - 2】

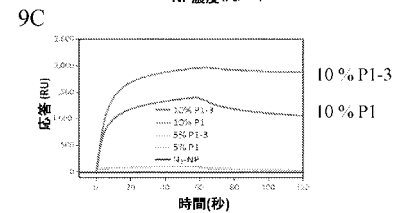
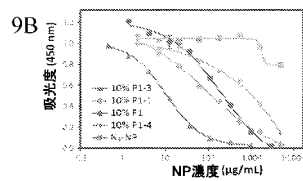


図 9B および 9C

【図 10】

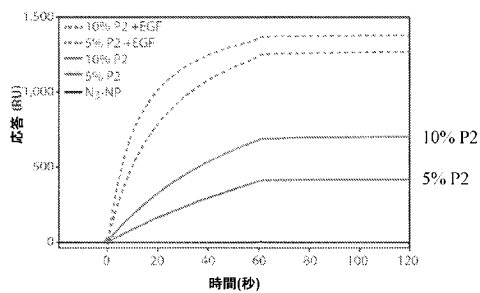


図 10

【図 11】

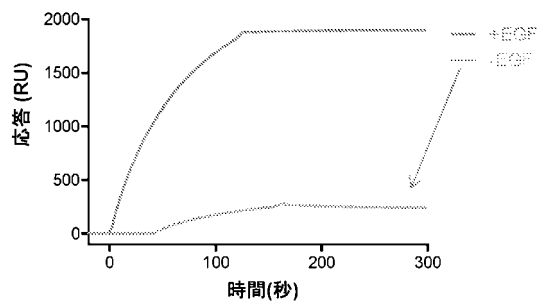


図 11



【図 12】

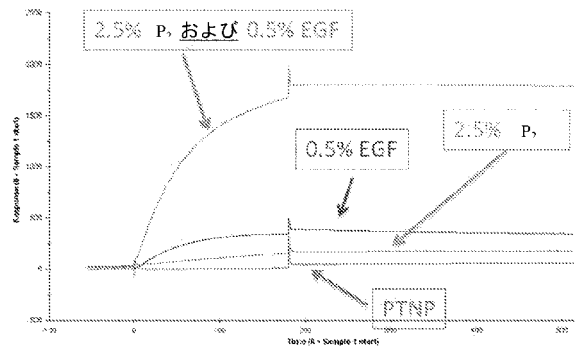


図 12

【図 13】

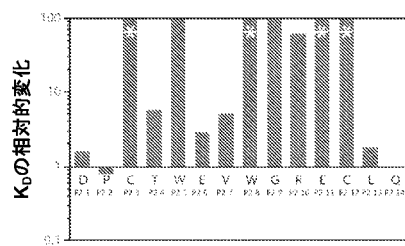


図 13

【図 16】

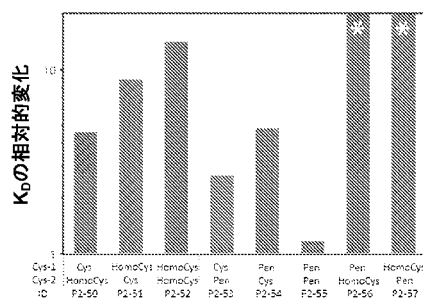


図 16

【図 14】

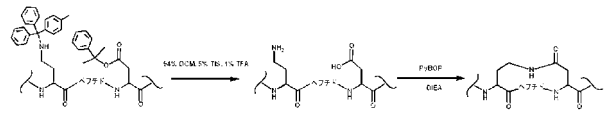


図 14

【図 15】

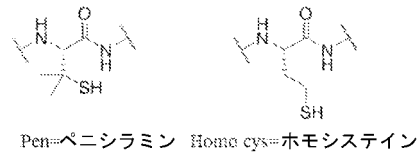


図 15

【図 17】

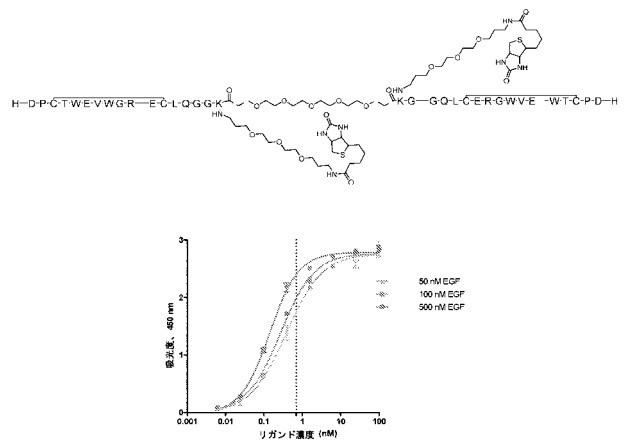


図 17

【図 18】

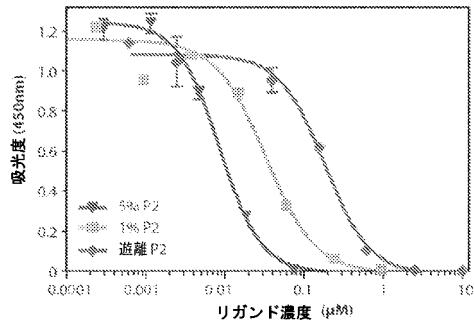


図 18

【図 19】

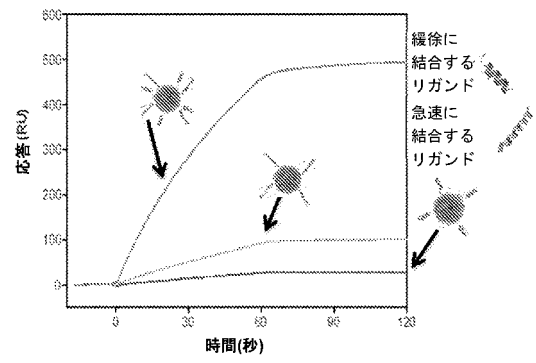
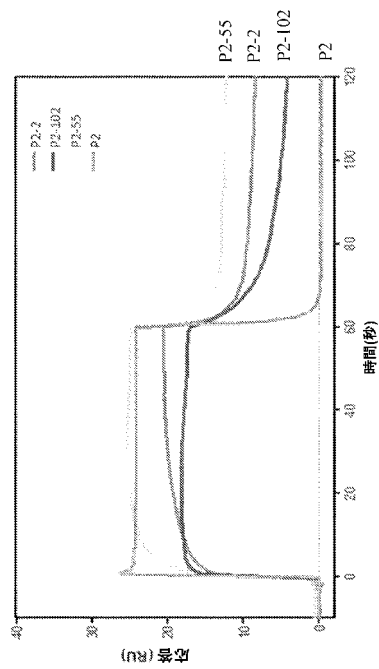


図 19

【図 20】

図 20



【図 21 - 1】

図 21B

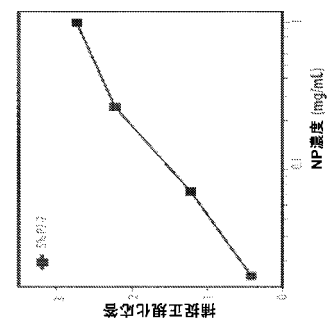
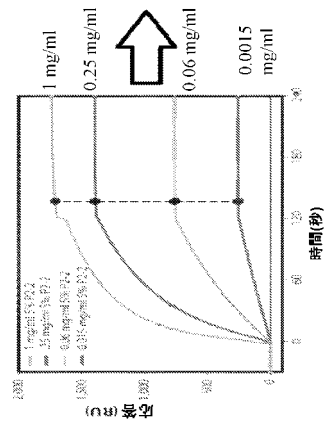


図 21A



【図 2 1 - 2】

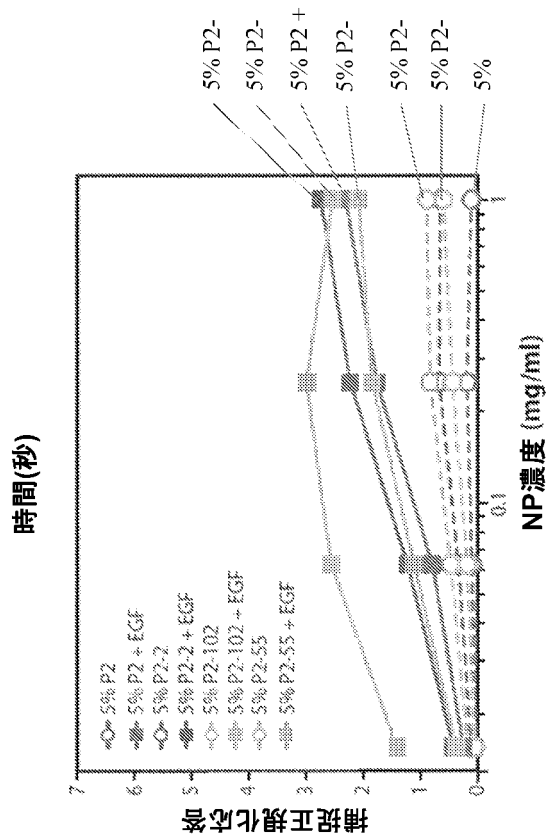


図 21C

【図 2 3】

図 23A

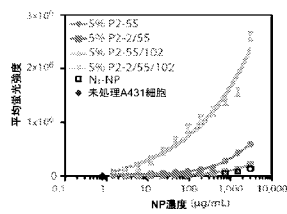


図 23B

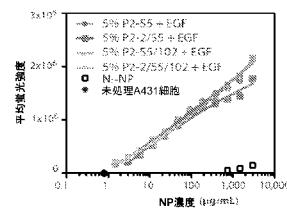
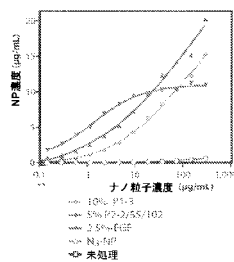
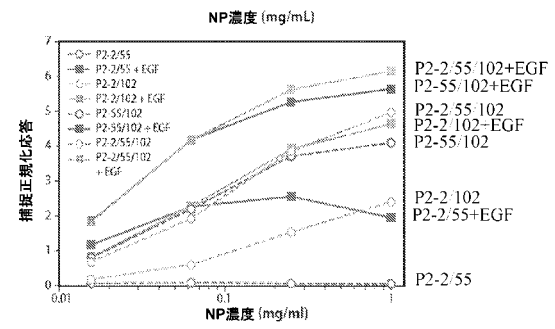


図 23C



【図 2 2】

図 22



【図 2 4】

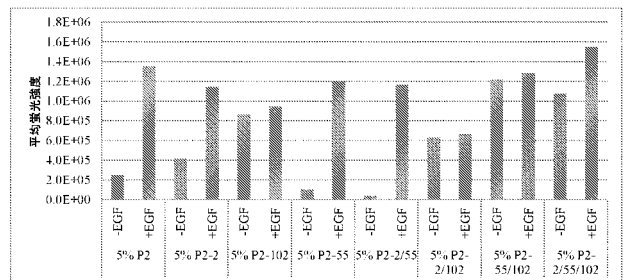


図 24

【図 2 5】

図 25A

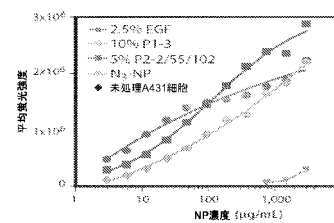
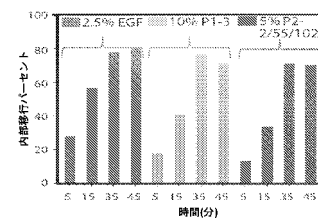


図 25B



【図 26】

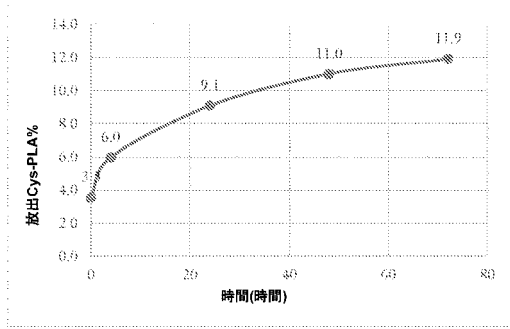


図 26

## 【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT  |  | International application No.<br>PCT/US 16/47807   |
|--|--|--|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC(8) - A61K 47/48, A61K 51/08, A61K 49/08 (2016.01)<br>CPC - A61K47/48, A61K49/085, A61K47/48892<br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC  |  |  |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>IPC(8): A61K 47/48, A61K 51/08, A61K 49/08 (2016.01)<br>CPC: A61K47/48, A61K49/085, A61K47/48892<br>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>USPC: 424/9.32, 424/93.7<br>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>PatBase, Google Patents, Google Scholar, Google Web, search terms: nanoparticle, peptide, PLA-PEG-EGFR, diblock poly(lactic acid)-poly(ethylene)glycol copolymer, diblock poly(lactic acid-co-glycolic acid)-poly(ethylene)glycol copolymer, chemical linker, oligonucleotide, an peptide, peptidyl ligand, azide functionalized, strain-promoted alkyne-azide  |  |  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>  |  |  |
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.  |
| X<br>—<br>Y  | US 2014/035644 A1 (BIND Therapeutics, Inc.) 4 December 2014 (04.12.2014) para [0006], [0014], [0061], [0077], [0088], [0106], [0109], [0127], [0131], [0135], [0143], [0145], [0288]   | 1-3<br>8-10, 15-16   |
| Y  | US 2010/0098681 A1 (WANG et al.) 22 April 2010 (22.04.2010) para [0019], [0047], [0072], [130]   | 8-10   |
| Y  | US 2015/0203538 A1 (SHENZHEN HIGHTIDE BIOPHARMACEUTICAL, LTD.) 23 July 2015 (23.07.2015) para [0027], [0048], [0056], [0075]   | 8-10   |
| Y  | Gong et al. Simple Method To Prepare Oligonucleotide-Conjugated Antibodies and Its Application in Multiplex Protein Detection in Single Cells. Bioconjugate Chem. (2016, Publication Date (Web): 21 December 2015) vol 27, no 1, pp 217-225, pg 219, col 1 para 3, pg 223, col 2 para 1, Fig. 2A | 8-10   |
| Y  | WO 2014/022535 A1 (THE UNIVERSITY OF AKRON) 6 February 2014 (06.02.2014) para [0007]-[0009], [0025], [00121]   | 10   |
| Y  | US 2011/0053842 A1 (CAMPHAUSEN et al.) 3 March 2011 (03.03.2011) para [0028], [0071], [0114], [0242]   | 15-16  |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>   |  |  |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>"&" document member of the same patent family |  |  |
| Date of the actual completion of the international search<br>24 October 2016   |  | Date of mailing of the international search report<br>18 NOV 2016                          |
| Name and mailing address of the ISA/US<br>Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents<br>P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450<br>Facsimile No. 571-273-8300  |  | Authorized officer:<br>Lee W. Young<br>PCT Helpdesk: 571-272-4300<br>PCT OSP: 571-272-7774 |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/47807

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☒ Claims Nos.: 4-7, 11-14, 17  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## フロントページの続き

| (51)Int.Cl.              | F I            | テーマコード(参考) |
|--------------------------|----------------|------------|
| A 6 1 K 45/06 (2006.01)  | A 6 1 K 45/06  |            |
| A 6 1 P 43/00 (2006.01)  | A 6 1 P 43/00  | 1 2 1      |
| A 6 1 K 38/10 (2006.01)  | A 6 1 K 38/10  |            |
| A 6 1 P 35/00 (2006.01)  | A 6 1 P 35/00  |            |
| B 8 2 Y 5/00 (2011.01)   | B 8 2 Y 5/00   |            |
| B 8 2 Y 30/00 (2011.01)  | B 8 2 Y 30/00  |            |
| B 8 2 Y 40/00 (2011.01)  | B 8 2 Y 40/00  |            |
| G 0 1 N 33/68 (2006.01)  | G 0 1 N 33/68  |            |
| G 0 1 N 33/50 (2006.01)  | G 0 1 N 33/50  | Z          |
| G 0 1 N 33/15 (2006.01)  | G 0 1 N 33/15  | Z          |
| G 0 1 N 21/41 (2006.01)  | G 0 1 N 21/41  | 1 0 1      |
| C 0 7 K 14/485 (2006.01) | C 0 7 K 14/485 |            |
| C 0 7 K 17/08 (2006.01)  | C 0 7 K 17/08  |            |

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

(72)発明者 シュテファン イー . ジャーレ

アメリカ合衆国 0 1 7 4 8 マサチューセッツ州 ホプキントン市 ワン・ノークロス・ロード

(72)発明者 ケヴィン マクドンネル

アメリカ合衆国 0 2 4 2 1 マサチューセッツ州 レキシントン市 フォレスト・ストリート  
2 5

(72)発明者 アレン ホーホタ

アメリカ合衆国 0 1 8 8 6 マサチューセッツ州 ウェストフォード市 ポストン・ロード 1  
3

F ターム(参考) 2G045 AA25 CB02 DA36 FA14 FB03

2G059 AA01 BB12 DD02 DD03 DD04 EE02

4C076 AA12 BB01 BB11 BB13 BB15 BB16 BB21 BB27 BB29 BB30

BB31 CC27 EE23 EE24 EE49 EE59 FF70

4C084 AA01 AA02 AA17 AA20 BA01 BA18 DA45 MA02 MA05 MA13

MA28 MA35 MA37 MA41 MA43 MA52 MA55 MA58 MA60 MA63

MA65 MA66 NA05 NA13 NA14 ZB261 ZB262 ZC751

4H045 AA10 AA30 BA62 CA40 DA20 EA20 FA33 FA81