

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-188443

(P2018-188443A)

(43) 公開日 平成30年11月29日(2018.11.29)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/54 (2017.01)	A 6 1 K 47/54	4 C 0 7 6
A 6 1 K 31/282 (2006.01)	A 6 1 K 31/282	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/575 (2006.01)	A 6 1 K 31/575	4 C 0 8 6
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 2 0 6
A 6 1 K 47/14 (2006.01)	A 6 1 K 47/14	

審査請求 有 請求項の数 50 O L (全 106 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-117597 (P2018-117597)	(71) 出願人	503146324
(22) 出願日	平成30年6月21日 (2018. 6. 21)		ザ ブリガム アンド ウィメンズ ホス ピタル インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願2015-517453 (P2015-517453) の分割		The Brigham and Wom en's Hospital, Inc.
原出願日	平成25年6月14日 (2013. 6. 14)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O 2 1 1 5 ポストン フランシス ストリ ート 7 5
(31) 優先権主張番号	61/689, 950	(74) 代理人	100102978
(32) 優先日	平成24年6月15日 (2012. 6. 15)		弁理士 清水 初志
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100102118
(31) 優先権主張番号	61/797, 484		弁理士 春名 雅夫
(32) 優先日	平成24年12月7日 (2012. 12. 7)	(74) 代理人	100160923
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山口 裕孝

最終頁に続く

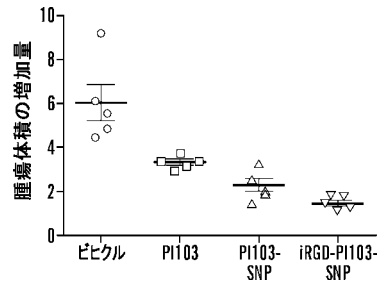
(54) 【発明の名称】 癌を処置するための組成物および該組成物を製造するための方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】薬物送達及び癌の処置方法の提供。

【解決手段】リンカーを介してコレステロールにコンジュゲートされた化学療法剤 ( P I 3 K 阻害剤、タキサン等) を含むコンジュゲート。コンジュゲート及び脂質 ( P E G でコンジュゲートされた脂質等) を含む組成物。リン脂質、標的作用物質、又は抗癌剤等を更に含む組成物。

【選択図】 図 3 B



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

コレステロールにコンジュゲートされた化学療法剤を含む、コンジュゲート。

## 【請求項 2】

両親媒性物質である、請求項1記載のコンジュゲート。

## 【請求項 3】

前記剤が、リンカーを介してコレステロールにコンジュゲートされる、請求項1~2のいずれか一項記載のコンジュゲート。

## 【請求項 4】

リンカーが、-O-、-S-、-S-S-、-NR<sup>1</sup>-、-C(O)-、-C(O)O-、-C(O)NR<sup>1</sup>-、-SO-、-SO<sub>2</sub>-、-SO<sub>2</sub>NR<sup>1</sup>-、置換または非置換アルキル、置換または非置換アルケニル、置換または非置換アルキニル、アリールアルキル、アリールアルケニル、アリールアルキニル、ヘテロアリールアルキル、ヘテロアリールアルケニル、ヘテロアリールアルキニル、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロシクリルアルケニル、ヘテロシクリルアルキニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルキルアリールアルキル、アルキルアリールアルケニル、アルキルアリールアルキニル、アルケニルアリールアルキル、アルケニルアリールアルケニル、アルケニルアリールアルキニル、アルキニルアリールアルキル、アルキニルアリールアルケニル、アルキニルアリールアルキニル、アルキルヘテロアリールアルキル、アルキルヘテロアリールアルケニル、アルキルヘテロアリールアルキニル、アルケニルヘテロアリールアルキル、アルケニルヘテロアリールアルケニル、アルケニルヘテロアリールアルキニル、アルキニルヘテロアリールアルキル、アルキニルヘテロアリールアルケニル、アルキニルヘテロアリールアルキニル、アルキルヘテロシクリルアルキル、アルキルヘテロシクリルアルケニル、アルキルヘテロシクリルアルキニル、アルケニルヘテロシクリルアルキル、アルケニルヘテロシクリルアルケニル、アルケニルヘテロシクリルアルキニル、アルキニルヘテロシクリルアルキル、アルキニルヘテロシクリルアルケニル、アルキルアリール、アルケニルアリール、アルキニルアリール、アルキルヘテロアリール、アルケニルヘテロアリール、アルキニルヘテロアリールからなる群より選択され、1つまたは複数のメチレンが、O、S、S(O)、SO<sub>2</sub>、N(R<sup>1</sup>)<sub>2</sub>、C(O)、C(O)O、C(O)NR<sup>1</sup>、開裂可能な連結基、置換または非置換アリール、置換または非置換ヘテロアリール、置換または非置換複素環によって分断または終結されることが可能であり、R<sup>1</sup>が、水素、アシル、脂肪族または置換脂肪族である、請求項3記載のコンジュゲート。

## 【請求項 5】

リンカーが、C(O)、C(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)、またはC(O)NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C(O)である、請求項4記載のコンジュゲート。

## 【請求項 6】

化学療法剤が、PI3K阻害剤である、請求項1~5のいずれか一項記載のコンジュゲート。

## 【請求項 7】

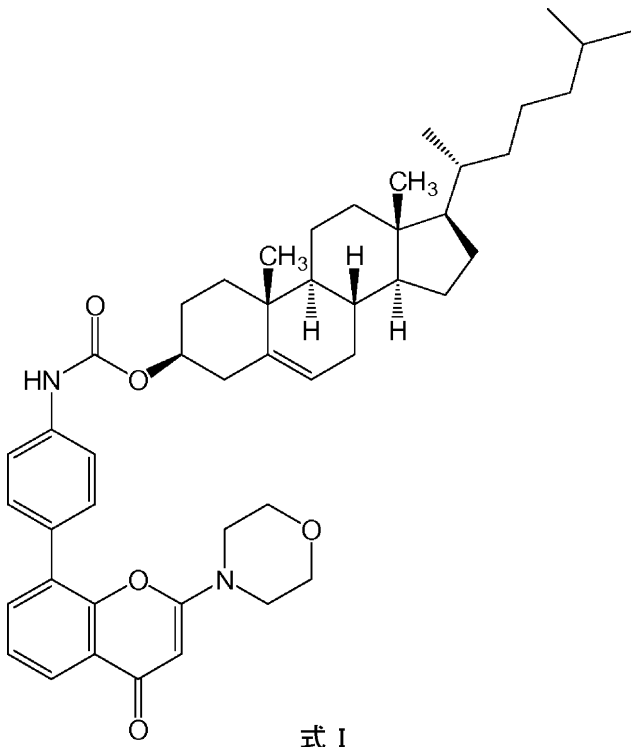
PI3K阻害剤が、PI103、P1828、LY294002、ワートマニン、デメトキシピリジン、IC486068、IC87114、GDC-0941、ペリホシン、CAL101、PX-866、IPI-145、BAY80-6946、BEZ235、P6503、TGR1202、SF1126、INK1117、BKM120、IL147、XL765、パロミド529、GSK1059615、ZSTK474、PWT33597、TG100-115、CAL263、GNE-447、CUDC-907、およびAEZS-136からなる群より選択される、請求項6記載のコンジュゲート。

## 【請求項 8】

PI3K阻害剤が、PI103およびP1828からなる群より選択される、請求項7記載のコンジュゲート。

## 【請求項 9】

式I：



式 I

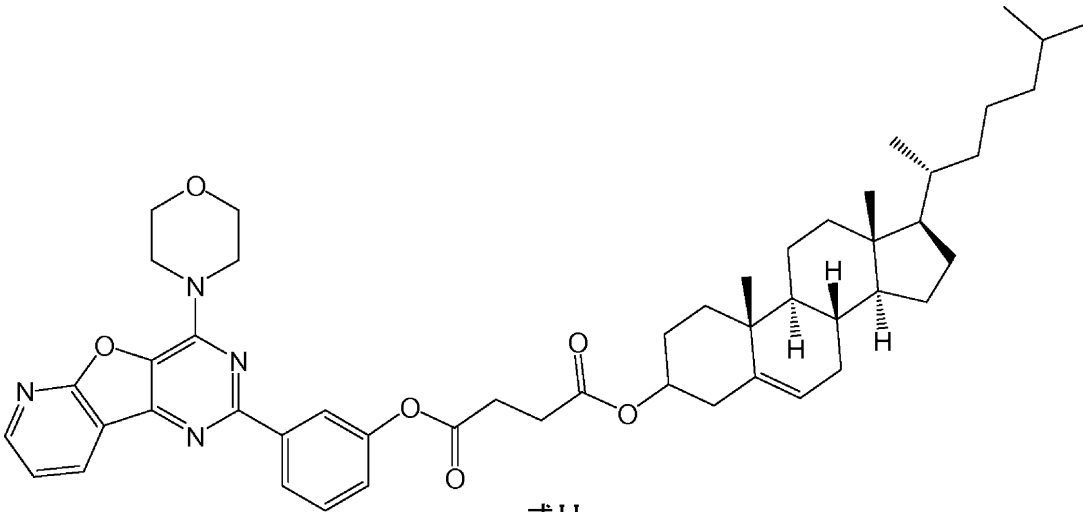
10

20

の構造を有する、請求項6～8のいずれか一項記載のコンジュゲート。

【請求項10】

式II：



式II

30

の構造を有する、請求項6～8のいずれか一項記載のコンジュゲート。

【請求項11】

化学療法剤が、タキサンである、請求項1～5のいずれか一項記載のコンジュゲート。

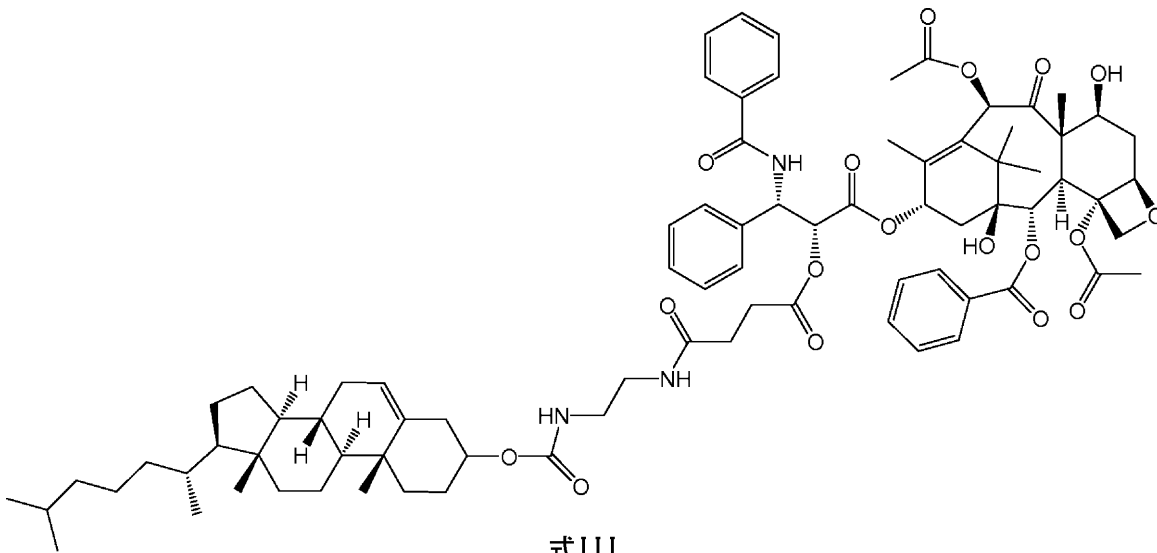
40

【請求項12】

タキサンが、パクリタキセルまたはドセタキセルである、請求項11記載のコンジュゲート。

【請求項13】

式III：



10

の構造を有する、請求項12記載のコンジュゲート。

【請求項14】

請求項1～13のいずれか一項記載のコンジュゲートを含む、組成物。

【請求項15】

約1%～約99% (w/w) のコンジュゲートを含む、請求項14記載の組成物。

20

【請求項16】

コンジュゲートに加えて脂質をさらに含む、請求項14または15記載の組成物。

【請求項17】

約1%～約99% (w/w) の脂質を含む、請求項16記載の組成物。

【請求項18】

コンジュゲートおよび脂質を約10:1～約1:10の比で含む、請求項16または17記載の組成物。

【請求項19】

脂質が、ポリエチレングリコール (PEG) でコンジュゲートされた脂質である、請求項16～18のいずれか一項記載の組成物。

30

【請求項20】

PEGでコンジュゲートされた脂質が、PEGでコンジュゲートされたジアシルグリセロールおよびジアルキルグリセロール、PEGでコンジュゲートされたホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジン酸、PEGでコンジュゲートされたセラミド、PEGでコンジュゲートされたジアルキルアミン、PEGでコンジュゲートされた1,2-ジアシルオキシプロパン-3-アミンおよびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、請求項19記載の組成物。

【請求項21】

PEGでコンジュゲートされた脂質が、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[アミノ(ポリエチレングリコール)-2000] (DSPE-PEG2000) である、請求項20記載の組成物。

40

【請求項22】

リン脂質をさらに含む、請求項14～21のいずれか一項記載の組成物。

【請求項23】

約1%～約99% (w/w) のリン脂質を含む、請求項14記載の組成物。

【請求項24】

コンジュゲートおよびリン脂質を約10:1～約1:10の比で含む、請求項22または23記載の組成物。

【請求項25】

リン脂質および脂質を約10:1～約1:10の比で含む、請求項22～24のいずれか一項記載

50

の組成物。

【請求項 26】

リン脂質が、ホスファチジルコリン、6~22個の炭素原子を有するアシル基を持つホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸、ホスファチジルセリン、スフィンゴミエリン、ホスファチジルグリセロール、およびそれらの任意の組み合わせから選択される、請求項25記載の組成物。

【請求項 27】

リン脂質が、ホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール、レシチン、  
-ジパルミトイル-レシチン、スフィンゴミエリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、N-(2,3-ジ(9-(Z)-オクタデセニルオキシ))-プロパ-1-イル-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド、ホスファチジルエタノールアミン、リゾレシチン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、セファリン、カルジオリピン、セレプロシド、ジセチルホスフェート、ジオレオイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール、ジオレオイルホスファチジルグリセロール、パルミトイル-オレオイル-ホスファチジルコリン、ジステアロイル-ホスファチジルコリン、ステアロイル-パルミトイル-ホスファチジルコリン、ジ-パルミトイル-ホスファチジルエタノールアミン、ジ-ステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン、ジ-ミリストール-ホスファチジルセリン、ジ-オレイル-ホスファチジルコリン、ジミリストールホスファチジルコリン (DMPC)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE)、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン (POPC)、卵ホスファチジルコリン (EPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)、ジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール (DOPG)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール (DPPG)、-ホスファチジルエタノールアミン (POPE)、ジオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシレート (DOPE-mal)、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、請求項26記載の組成物。

10

20

【請求項 28】

ホスファチジルコリンが、L- $\alpha$ -ホスファチジルコリンである、請求項27記載の組成物。

【請求項 29】

標的作用物質をさらに含む、請求項14~28のいずれか一項記載の組成物。

30

【請求項 30】

標的作用物質が、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、酵素、ペプチド模倣体、糖タンパク質、抗体 (モノクローナルまたはポリクローナル) ならびにそれらの一部および断片、レクチン、ヌクレオシド、ヌクレオチド、ヌクレオシドおよびヌクレオチド類似体、核酸、単糖、二糖、三糖、オリゴ糖、多糖、リポ多糖、ビタミン、ステロイド、ホルモン、補因子、受容体、受容体リガンド、ならびにそれらの類似体および誘導体からなる群より選択される、請求項29記載の組成物。

【請求項 31】

標的作用物質が、iRGDである、請求項30記載の組成物。

40

【請求項 32】

請求項1~13のいずれか一項記載の2つ以上の異なるコンジュゲートを含む、請求項14~31のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 33】

コンジュゲートに加え抗癌剤をさらに含む、請求項14~32のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 34】

抗癌剤が、白金化合物、パクリタキセル、カルボプラチン、ボルテゾミブ、ポリノスタット、リツキシマブ、テモゾロミド、ラパマイシン、アルキル化剤、シクロホスファミド、スルホン酸アルキル、ブスルファン、インプロスルファン、ピボスルファン、アジリジ

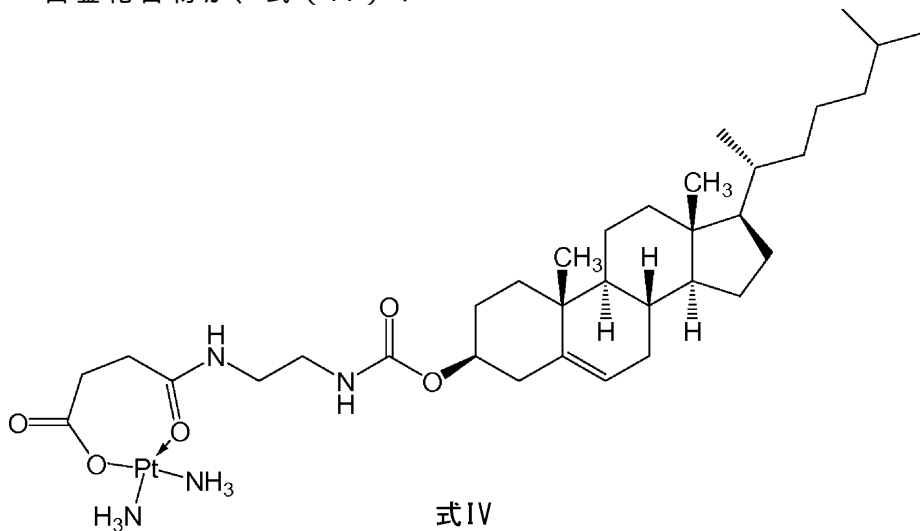
50

ン、エチレンイミン、メチルアメラミン (methylamelamine)、アセトゲニン、カンプトセシン、クリプトフィシン、ナイトロジェンマスタード、ニトロソウレア、抗生物質、エンジン抗生物質、ビスホスホネート、ドキソルビシン、マイトマイシン、代謝拮抗剤、葉酸類似体、プリン類似体、ピリミジン類似体、アンドロゲン、抗副腎剤、エポチロン、マイタンシノイド、トリコテセン、ゲムシタピン、6-チオグアニン、メルカプトプリン、メトトレキサート、ビンブラスチン、エトポシド、イホスファミド、ミトキサントロン、ビンクリスチン、ビノレルビン、ノバントロン、テニポシド、エダトレキサート、ダウノマイシン、アミノプテリン、ゼローダ、イバンドロネート、イリノテカン、トポイソメラーゼ阻害剤、レチノイド、カペシタピン、コンプレタスタチン、ロイコポリン、ラパチニブ、およびエルロチニブである、請求項33記載の組成物。

10

## 【請求項35】

白金化合物が、式(IV)：



20

の化合物である、請求項34記載の組成物。

## 【請求項36】

中性脂質、陽イオン性脂質、陰イオン性脂質、両親媒性脂質、ステロール、またはプログラム可能な融合脂質をさらに含む、請求項14~35のいずれか一項記載の組成物。

30

## 【請求項37】

コンジュゲート、PEGでコンジュゲートされた脂質、およびリン脂質を含む、請求項14~36のいずれか一項記載の組成物。

## 【請求項38】

PEGでコンジュゲートされた脂質がDSPE-PEG2000であり、リン脂質がホスファチジルコリンである、請求項37記載の組成物。

## 【請求項39】

コンジュゲート、PEGでコンジュゲートされた脂質、およびリン脂質を、約10~0.1:10~0.1の比で含む、請求項37または38記載の組成物。

## 【請求項40】

比が、約1.4:1:3または約10:5:1である、請求項39記載の組成物。

40

## 【請求項41】

ナノ粒子である、請求項14~38のいずれか一項記載の組成物。

## 【請求項42】

ナノ粒子が、約5nm~約500nmの直径である、請求項41記載の組成物。

## 【請求項43】

ナノ粒子が、約200nm未満の直径である、請求項41記載の組成物。

## 【請求項44】

請求項1~43のいずれか一項記載の組成物と、任意で薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。

50

## 【請求項 4 5】

請求項1～43のいずれか一項記載の組成物を癌の処置を必要とする患者に投与する工程を含む、癌を処置する方法。

## 【請求項 4 6】

癌が、乳癌、卵巣癌、神経膠腫、消化管癌、前立腺癌、癌腫、肺癌腫、肝細胞癌、精巣癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、膀胱癌、頭頸部癌、肺癌、胃食道癌、および婦人科癌からなる群より選択される、請求項45記載の方法。

## 【請求項 4 7】

対象が、異常なPI3Kを伴う腫瘍細胞を有すると判定された、請求項45～46のいずれか一項記載の方法。

10

## 【請求項 4 8】

1つまたは複数の追加の抗癌治療を患者に同時に施す工程をさらに含む、請求項45～47のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 4 9】

追加の治療が、外科手術、化学療法、放射線療法、温熱療法、免疫療法、ホルモン療法、レーザー療法、抗血管新生療法、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、請求項48記載の方法。

## 【請求項 5 0】

追加の治療が、抗癌剤を患者に投与することを含む、請求項48記載の方法。

## 【請求項 5 1】

請求項1～43のいずれか一項記載の組成物を血糖値の低下を必要とする対象に投与する工程を含む、血糖値を低下させる方法。

20

## 【請求項 5 2】

前記方法が、請求項1～43のいずれか一項記載の組成物を癌の処置を必要とする患者に投与する工程を含む、癌を処置するための請求項1～43のいずれか一項記載の組成物の使用。

## 【請求項 5 3】

癌が、乳癌、卵巣癌、神経膠腫、消化管癌、前立腺癌、癌腫、肺癌腫、肝細胞癌、精巣癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、膀胱癌、頭頸部癌、肺癌、胃食道癌、および婦人科癌からなる群より選択される、請求項52記載の使用。

30

## 【請求項 5 4】

対象が、異常なPI3Kを伴う腫瘍細胞を有すると判定された、請求項52～53のいずれか一項記載の使用。

## 【請求項 5 5】

1つまたは複数の追加の抗癌治療を患者に同時に施す工程をさらに含む、請求項52～54のいずれか一項記載の使用。

## 【請求項 5 6】

追加の治療が、外科手術、化学療法、放射線療法、温熱療法、免疫療法、ホルモン療法、レーザー療法、抗血管新生療法、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、請求項55記載の使用。

40

## 【請求項 5 7】

追加の治療が、抗癌剤を患者に投与することを含む、請求項55記載の使用。

## 【請求項 5 8】

請求項1～43のいずれか一項記載の組成物を血糖値の低下を必要とする対象に投与する工程を含む、血糖値を低下させるための請求項1～43のいずれか一項記載の組成物の使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

関連出願の相互参照

50

本出願は、35 U.S.C. § 119(e)に基づき、2012年6月15日に出願された米国仮出願第61/689,950号および2012年12月7日に出願された第61/797,484号の恩典を主張するものであり、その内容は参照によってその全体が本明細書に組み入れられる。

【0002】

#### 政府支援

本発明は、米国国防省によって授与された助成金第W81XWH-07-1-0482号および第W81XWH-09-0698/700号ならびに米国国立衛生研究所 (National Institutes of Health) によって授与された第1R01CA135242-01A2号の下、連邦政府の支援を受けて成された。米国政府は、本発明に関して特定の権利を有する。

【0003】

#### 技術分野

本明細書に記載の組成物および方法は、薬物送達および癌の処置の技術分野に関する。

【背景技術】

【0004】

#### 背景

世界保健機関 (World Health Organization) によれば、癌による死亡数は、2008年の760万人から2030年には1200万人に増加すると予測されている(1)。この深刻化しつつある問題に取り組むために、最新の治療戦略の発展を推し進めている2つの新たに出現した理論的枠組みは、(i) 分子「標的」治療法の開発へと導く、発癌要因のさらなる理解(2~3)；および(ii) それによって治療指数を改善する、薬物を特異的に腫瘍へ送達するためのナノ技術の使用(4~5)である。しかしながら、これらの2つの理論的枠組みの間の融合は、癌化学療法を改善するまたとない機会を提供することができるが、現時点で大部分が依然として研究中のままである。

【発明の概要】

【0005】

#### 概要

癌を効果的に処置するために必要とされる化学療法剤のレベルは、多くの場合、危険な副作用が起こる可能性のレベルよりもはるかに高い。本発明者らは、腫瘍へ送達される化学療法剤のレベルを増加させながら、一方で、他の組織、たとえば肝臓中の化学療法剤の蓄積を低下させるコンジュゲート、およびこれらのコンジュゲートを含む組成物を設計した。これらのコンジュゲートは、典型的には化学療法剤のナノ製剤化において直面する、封入効率を制限するかまたは最適以下の放出動力学を導入する問題を克服する。

【0006】

1つの局面においては、本明細書において、コレステロールにコンジュゲートされた化学療法剤を含むコンジュゲートを記載する。いくつかの態様において、コンジュゲートは、両親媒性物質である。いくつかの態様において、該剤は、リンカーを介してコレステロールにコンジュゲートされる。いくつかの態様において、リンカーは、-O-、-S-、-S-S-、-NR<sup>1</sup>-、-C(O)-、-C(O)O-、-C(O)NR<sup>1</sup>-、-SO-、-SO<sub>2</sub>-、-SO<sub>2</sub>NR<sup>1</sup>-、置換または非置換アルキル、置換または非置換アルケニル、置換または非置換アルキニル、アリールアルキル、アリールアルケニル、アリールアルキニル、ヘテロアリールアルキル、ヘテロアリールアルケニル、ヘテロアリールアルキニル、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロシクリルアルケニル、ヘテロシクリルアルキニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルキルアリールアルキル、アルキルアリールアルケニル、アルキルアリールアルキニル、アルケニルアリールアルキル、アルケニルアリールアルケニル、アルケニルアリールアルキニル、アルキニルアリールアルキル、アルキニルアリールアルケニル、アルキニルアリールアルキニル、アルキルヘテロアリールアルキル、アルキルヘテロアリールアルケニル、アルキルヘテロアリールアルキニル、アルケニルヘテロアリールアルキル、アルケニルヘテロアリールアルケニル、アルケニルヘテロアリールアルキニル、アルキニルヘテロアリールアルキル、アルキニルヘテロアリールアルケニル、アルキルヘテロシクリルアルキル、アルキルヘ

10

20

30

40

50



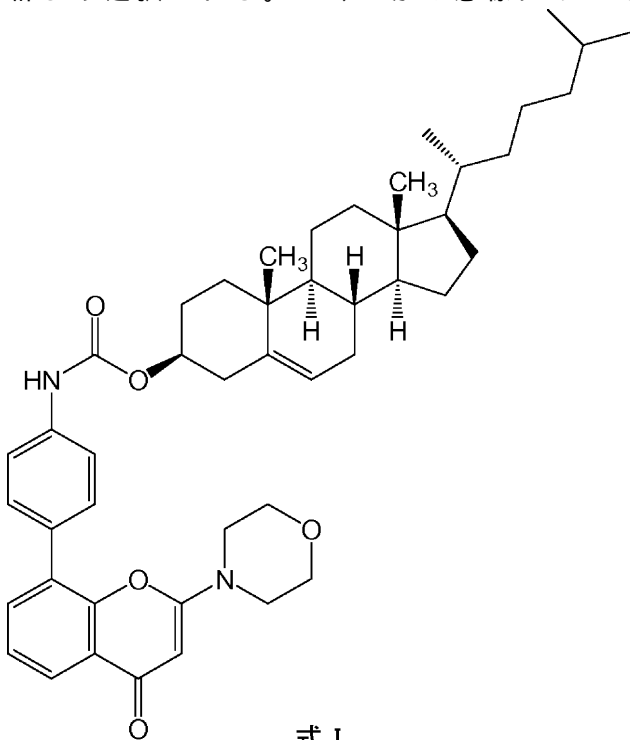
テロシクリルアルケニル、アルキルヘレロシクリルアルキニル、アルケニルヘテロシクリルアルキル、アルケニルヘテロシクリルアルケニル、アルケニルヘテロシクリルアルキニル、アルキニルヘテロシクリルアルキル、アルキニルヘテロシクリルアルケニル、アルキニルヘテロシクリルアルキニル、アルキルアリアル、アルケニルアリアル、アルキニルアリアル、アルキルヘテロアリアル、アルケニルヘテロアリアル、アルキニルヘレロアリアルからなる群より選択され、ここで、1つまたは複数のメチレンは、0、S、S(O)、SO<sub>2</sub>、N(R<sup>1</sup>)<sub>2</sub>、C(O)、C(O)O、C(O)NR<sup>1</sup>、開裂可能な連結基、置換または非置換アリアル、置換または非置換ヘテロアリアル、置換または非置換複素環によって分断または終結されることができ、R<sup>1</sup>は、水素、アシル、脂肪族または置換脂肪族である。いくつかの態様において、リンカーは、C(O)、C(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)、またはC(O)NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C(O)である。

10

## 【0007】

いくつかの態様において、化学療法剤は、PI3K阻害剤である。いくつかの態様において、PI3K阻害剤は、PI103；P1828；LY294002；ワートマニン；デメトキシピリジジ；IC486068；IC87114；GDC-0941；ペリホシン；CAL101；PX-866；IPI-145；BAY80-6946；BEZ235；P6503；TGR1202；SF1126；INK1117；BKM120；IL147；XL765；パロミド529；GSK1059615；ZSTK474；PWT33597；TG100-115；CAL263；GNE-447；CUDC-907；およびAEZS-136からなる群より選択される。いくつかの態様において、PI3K阻害剤は、PI103およびP1828からなる群より選択される。いくつかの態様において、コンジュゲートは、式I：

20



30

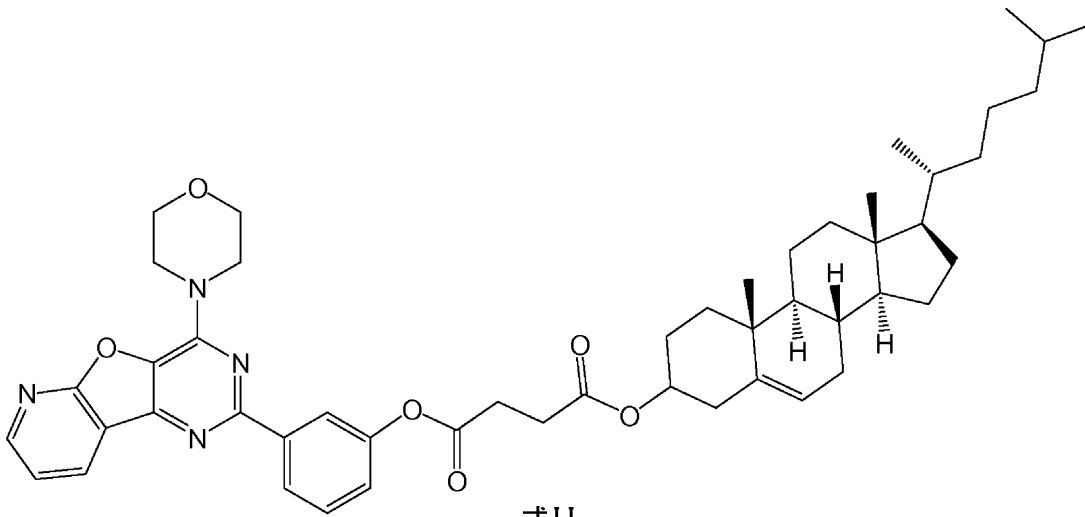
式I

の構造を有することができる。

## 【0008】

40

いくつかの態様において、コンジュゲートは、式II：



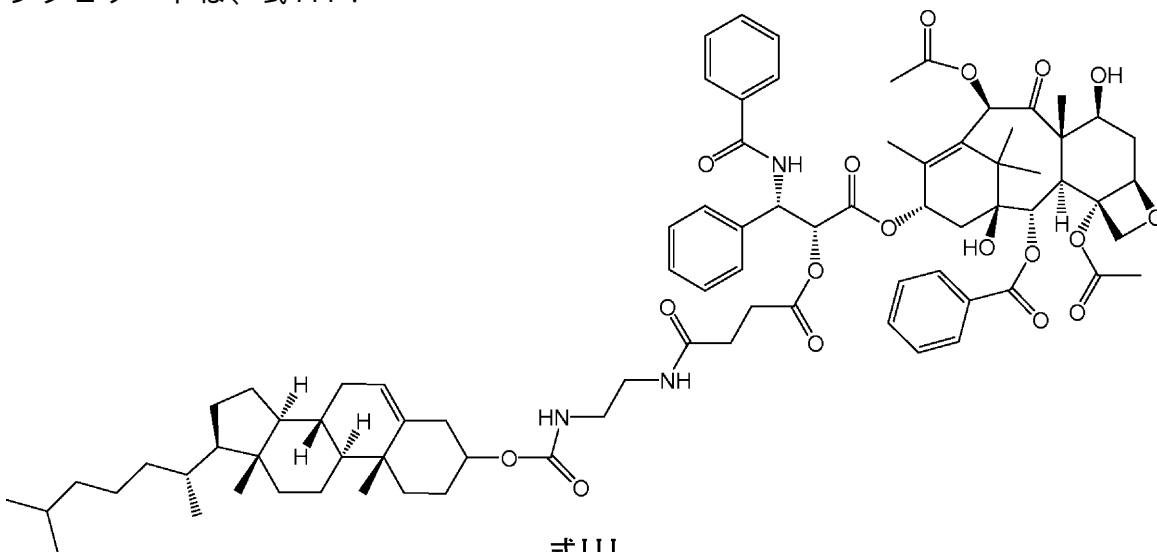
式II

10

の構造を有することができる。

【0009】

いくつかの態様において、化学療法剤は、タキサンである。いくつかの態様において、タキサンは、パクリタキセルまたはドセタキセルである。いくつかの態様において、該コンジュゲートは、式III：



式III

20

30

の構造を有することができる。

【0010】

1つの局面においては、本明細書において、本明細書に記載されるコンジュゲートを含む組成物を記載する。いくつかの態様において、組成物は、約1%～約99% (w/w) のコンジュゲートを含む。いくつかの態様において、組成物は、コンジュゲートに加え脂質をさらに含む。いくつかの態様において、組成物は、約1%～約99% (w/w) の脂質を含む。いくつかの態様において、組成物は、コンジュゲートおよび脂質を約10:1～約1:10の比で含む。いくつかの態様において、脂質は、ポリエチレングリコール (PEG) でコンジュゲートされた脂質である。いくつかの態様において、PEGでコンジュゲートされた脂質は、PEGでコンジュゲートされたジアシルグリセロールおよびジアルキルグリセロール、PEGでコンジュゲートされたホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジン酸、PEGでコンジュゲートされたセラミド、PEGでコンジュゲートされたジアルキルアミン、PEGでコンジュゲートされた1,2-ジアシルオキシプロパン-3-アミンおよびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される。いくつかの態様において、PEGでコンジュゲートされた脂質は、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[アミノ(ポリエチレングリコール)-2000] (DSPE-PEG2000) である。

40

50

## 【0011】

いくつかの態様において、組成物は、リン脂質をさらに含む。いくつかの態様において、組成物は、約1%～約99% (w/w) のリン脂質を含む。いくつかの態様において、組成物は、コンジュゲートおよびリン脂質を約10:1～約1:10の比で含む。いくつかの態様において、組成物は、リン脂質および脂質を約10:1～約1:10の比で含む。いくつかの態様において、リン脂質は、ホスファチジルコリン、6～22個の炭素原子を有するアシル基を持つホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジリンシトール、ホスファチジン酸、ホスファチジルセリン、スフィンゴミエリン、ホスファチジルグリセロールおよびそれらの任意の組み合わせから選択される。いくつかの態様において、リン脂質は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール、レシチン、  
ジパルミトイル-  
レシチン、スフィンゴミエリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、N-(2,3-ジ(9-(Z)-オクタデセニルオキシ))-プロパ-1-イル-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド、ホスファチジルエタノールアミン、リゾレシチン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジリンシトール、セファリン、カルジオリピン、セレプロシド、ジセチルホスフェート、ジオレオイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール、ジオレオイルホスファチジルグリセロール、パルミトイル-オレオイル-ホスファチジルコリン、ジ-ステアロイル-ホスファチジルコリン、ステアロイル-パルミトイル-ホスファチジルコリン、ジ-パルミトイル-ホスファチジルエタノールアミン、ジ-ステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン、ジ-ミリストイル-ホスファチジルセリン、ジ-オレイル-ホスファチジルコリン、ジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE)、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン (POPC)、卵ホスファチジルコリン (EPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)、ジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール (DOPG)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール (DPPG)、  
-ホスファチジルエタノールアミン (POPE)、ジオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシレート (DOPE-mal) およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される。いくつかの態様において、ホスファチジルコリンは、L- $\alpha$ -ホスファチジルコリンである。

10

20

30

## 【0012】

いくつかの態様において、組成物は、標的作用物質をさらに含むことができる。いくつかの態様において、標的作用物質は、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、酵素、ペプチド模倣体、糖タンパク質、抗体 (モノクローナルまたはポリクローナル) ならびにそれらの一部および断片、レクチン、ヌクレオシド、ヌクレオチド、ヌクレオシドおよびヌクレオチド類似体、核酸、単糖、二糖、三糖、オリゴ糖、多糖、リポ多糖、ビタミン、ステロイド、ホルモン、補因子、受容体、受容体リガンド、ならびにそれらの類似体および誘導体からなる群より選択される。いくつかの態様において、標的作用物質は、iRGDである。

40

## 【0013】

いくつかの態様において、組成物は、請求項1～13のいずれか一項記載の2つ以上の異なるコンジュゲートを含む。いくつかの態様において、組成物は、コンジュゲートに加え抗癌剤をさらに含む。いくつかの態様において、抗癌剤は、白金化合物、パクリタキセル；カルボプラチン；ボルテゾミブ；ポリノスタット；リツキシマブ；テモゾロミド；ラパマイシン；アルキル化剤；シクロホスファミド；スルホン酸アルキル；ブスルファン；インプロスルファン；ピボスルファン；アジリジン；エチレンイミン；メチルアメラミン (methylamelamine)；アセトゲニン；カンプトセシン；クリプトフィシン；ナイトロジェンマスタード；ニトロソウレア；抗生物質；エンジイン抗生物質；ビスホスホネート；ドキシソルピシン；マイトマイシン；代謝拮抗剤；葉酸類似体；プリン類似体；ピリミジン類似体；アンドロゲン；抗副腎剤；エポチロン；マイタンシノイド；トリコテセン；ゲムシタピン；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；ピンブラスチン；エトボ

50



## 【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1A】P1-828の、カルバメート連結を介した、コレステロールへのコンジュゲーションを示す合成スキーム。

【図1B】PI103の、エステル連結を介した、コレステロールへのコンジュゲーションを示す合成スキーム。

【図1C】略図は、ホスファチジルコリン(PC)、PI103/P1828-コレステロールコンジュゲートおよびDSPE-PEGからの超分子ナノ粒子(SNP)の集合を示す。

【図1D】動的光散乱を使用して測定された、P1828-SNPの流体力学直径の分布。

【図1E】動的光散乱を使用して測定された、PI103-SNPの流体力学直径の分布。

【図1F】PI103-SNPの高分解能低温透過型電子顕微鏡像(スケールバー=100nm)。

【図1G】サイズ変化によって測定される、4での保存条件中のPI103-SNPの物理的安定性。挿入図は、4でのナノ粒子のゼータ電位の変化を示す。

【図1H】PBS(pH7.4)中および4T1乳癌細胞溶解物中のSNPからのPI103の放出動力学。

【図1I】PBS(pH7.4)(青線)中ならびに4T1細胞からの溶解物(赤線)およびPI3Kを過剰発現する4306卵巣癌細胞からの溶解物(緑線)中のSNPからのP1828の放出動力学。示したデータは、平均±SEMである(各条件で少なくとも3連)。

【図2A】PI3Kを阻害するSNPのインビトロ特性決定を実証する。異なる濃度の遊離PI103またはPI103-SNPが、4T1細胞に及ぼす48時間における効果を示すMTSアッセイ。

【図2B】PI3Kを阻害するSNPのインビトロ特性決定を実証する。異なる濃度の遊離PI103またはPI103-SNPが、4T1細胞に及ぼす72時間における効果を示すMTSアッセイ。

【図2C】PI3Kを阻害するSNPのインビトロ特性決定を実証する。異なる濃度の遊離PI103またはPI103-SNPが、468細胞に及ぼす48時間における効果を示すMTSアッセイ。

【図2D】PI3Kを阻害するSNPのインビトロ特性決定を実証する。異なる濃度の遊離PI103またはPI103-SNPが、468細胞に及ぼす72時間における効果を示すMTSアッセイ。

【図2E】PI3Kを阻害するSNPのインビトロ特性決定を実証する。異なる濃度の遊離PI103またはPI103-SNPが、4306細胞に及ぼす48時間における効果を示すMTSアッセイ。

【図2F】PI3Kを阻害するSNPのインビトロ特性決定を実証する。異なる濃度の遊離PI103またはPI103-SNPが、4306細胞に及ぼす72時間における効果を示すMTSアッセイ。

【図2G】PI3Kを阻害するSNPのインビトロ特性決定を実証する。5μMの遊離PI103またはPI103-SNPのいずれかでの処置後3、9、24および48時間における、4T1細胞中のホスホAKTおよびトータルAKTの発現。

【図2H】PI3Kを阻害するSNPのインビトロ特性決定を実証する。遊離PI103での急性期処置(4時間インキュベーション)が経時的なPI3K活性に及ぼす効果。薬物に曝露させた4時間後、細胞を冷PBSで3回洗浄して、細胞外に残留している薬物を除去した。次に、1%FBSを含有する新しい培地で細胞をインキュベートして、分析用に0、12、24、36および48時間で回収した。

【図2I】PI3Kを阻害するSNPのインビトロ特性決定を実証する。遊離PI103での急性期処置(4時間インキュベーション)が経時的なPI3K活性に及ぼす効果。薬物に曝露させた4時間後、細胞を冷PBSで3回洗浄して、細胞外に残留している薬物を除去した。次に、1%FBSを含有する新しい培地で細胞をインキュベートして、分析用に0、12、24、36および48時間で回収した。

【図2J】PI3Kを阻害するSNPのインビトロ特性決定を実証する。PI103-SNPでの急性期処置(4時間インキュベーション)が経時的なPI3K活性に及ぼす効果。薬物に曝露させた4時間後、細胞を冷PBSで3回洗浄して、細胞外に残留している薬物を除去した。次に、1%FBSを含有する新しい培地で細胞をインキュベートして、分析用に0、12、24、36および48時間で回収した。PI103-SNPは、48時間においても続くAKT活性化の持続的阻害を発現した。

【図2K】PI3Kを阻害するSNPのインビトロ特性決定を実証する。PI103-SNPでの急性期処置(4時間インキュベーション)が経時的なPI3K活性に及ぼす効果。薬物に曝露させた4時間後、細胞を冷PBSで3回洗浄して、細胞外に残留している薬物を除去した。次に、1%FBS

10

20

30

40

50

を含有する新しい培地で細胞をインキュベートして、分析用に0、12、24、36および48時間で回収した。PI103-SNPは、48時間においても続くAKT活性化の持続的阻害を発現した。

【図2L】PI3Kを阻害するSNPのインビトロ特性決定を実証する。4時間および18時間における遊離PI103およびPI103ナノ粒子の内在化を示すグラフ。内在化した薬物の量を紫外-可視分光法によって測定した；統計分析は、スチューデントのt検定を用いて実施した。エラーバーは、平均±SEM；n.s.は、有意でない；\* $p < 0.05$ ；\*\* $p < 0.01$ 。

【図2M】PI3Kを阻害するSNPのインビトロ特性決定を実証する。グラフは、P1828またはP1828-SNPでの処置が4T1乳癌細胞の生存率に及ぼす効果を示す。

【図2N】PI3Kを阻害するSNPのインビトロ特性決定を実証する。グラフは、P1828またはP1828-SNPでの処置が4306細胞の生存率に及ぼす効果を示す。

【図2O】PI3Kを阻害するSNPのインビトロ特性決定を実証する。P1828またはP1828-SNP（5.0および7.0  $\mu\text{M}$ ）での処置が処置後36時間におけるホスホAktレベルに及ぼす効果。

【図3A】同系4T1乳癌マウスモデルにおけるPI103またはPI103-SNPのインビボ有効性。マウスに、一日おきに、PBS（対照群）、遊離PI103、PI103-SNPまたはiRGDでコーティングしたPI103-SNP（全て5mg/kgのPI103に相当する用量）を3回注射した。処置の初日を1日目とした。腫瘍体積を一日おきに11日間測定した。終点は、腫瘍サイズ $> 2000\text{cm}^3$ 、または腫瘍の潰瘍形成もしくは壊死、または動物の死亡とした。

【図3B】1回の注射後11日目の異なる群における腫瘍体積の増加量の分布。PI103-SNPおよびiRGDでコーティングしたPI103-SNPでの処置は、遊離PI103での処置よりも統計的により効果的であった。

【図3C】各群からの腫瘍体積の画像表示。

【図3D】PI103がインスリン耐性に及ぼす効果を示すグラフ。マウスに、単回用量の空NP、遊離PI-103（5mg/kg）およびPI103-SNP（5mg/kg）を注射した。1時間後、マウスにインスリン（0.75ユニット/kg）を注射した。インスリン注射の前および45分後に血糖値を測定した。結果は、平均±SEMである（ $n=5$ ）。統計的有意性は、スチューデントのt検定によって決定した。\*\* $p < 0.01$ 。

【図3E】4T1モデルにおける5mg/kgの用量での遊離PI103またはPI103-SNPの単回用量注射後72時間における、腫瘍中のホスホmTOR、トータルmTOR、ホスホAKT、トータルAKT、アクチン、ホスホ4EBPおよびトータル4EBPの発現。

【図4A】PI103-SNPがK-ras<sup>LSL/+</sup>/Pten<sup>f1/f1</sup>卵巣癌モデルにおいて腫瘍成長を阻害することを実証する。生物発光定量化は、遊離PI103、PI103-SNPおよびiRGD-PI103-SNPで処置したマウスでは、ビヒクルで処置した群と比較して、3回の処置後の腫瘍ルシフェラーゼシグナルが有意に減少したことを示す（ $p < 0.05$ 、一元配置ANOVA分析）。5回の処置後、生物発光定量化は、PI103-SNPに対する応答が遊離PI103に対する応答よりも有意に高かったことを示す（ $p < 0.01$ 、一元配置ANOVA分析）。

【図4B】PI103-SNPがK-ras<sup>LSL/+</sup>/Pten<sup>f1/f1</sup>卵巣癌モデルにおいて腫瘍成長を阻害することを実証する。遊離PI-103、PI103-SNPおよびiRGD-PI103-SNPで処置した動物から抽出した代表的なK-ras<sup>LSL/+</sup>/Pten<sup>f1/f1</sup>腫瘍。

【図4C】PI103-SNPがK-ras<sup>LSL/+</sup>/Pten<sup>f1/f1</sup>卵巣癌モデルにおいて腫瘍成長を阻害することを実証する。薬物毒性は、体重を測定することによって評価した。5回の処置後の毎日の記録からは処置群の体重に差異が認められない。

【図4D】PI103-SNPがK-ras<sup>LSL/+</sup>/Pten<sup>f1/f1</sup>卵巣癌モデルにおいて腫瘍成長を阻害することを実証する。PI3K/mTOR経路マーカーは、ビヒクルでまたは遊離PI103、PI103-SNPおよびiRGD-PI103-SNP（各々、5mg/kgのPI103）で処置したK-ras<sup>LSL/+</sup>/Pten<sup>f1/f1</sup>腫瘍におけるウェスタンブロット法で評価した。PI103-SNPおよびiRGD-PI103-SNPによるmTOR基質の阻害は、遊離薬物群の場合よりも非常に強かった。

【図5】PI103-コレステロールコンジュゲートの<sup>1</sup>H NMRスペクトルを図示する。

【図6】P1828-コレステロールコンジュゲートの<sup>1</sup>H NMRスペクトルを図示する。

【図7】PI-103-コレステロールコンジュゲートのHPLCグラフを図示する。

【図8A】表示は、ホスファチジルコリン（PC）、コレステロールコンジュゲートおよび

10

20

30

40

50

DSPE-PEGから自己集合によって合成された、PI103がカプセル封入されたナノ粒子を示す。

【図8B】表は、異なるナノ粒子製剤がPI-103のサイズおよび取り込み効率に及ぼす効果を示す。

【図8C】遊離薬物としてのおよびPI103がカプセル封入されたナノ粒子からのPI103の放出動力学研究。

【図8D】異なる濃度の遊離PI-103またはPI103がカプセル封入されたナノ粒子が、48時間における4T1細胞の細胞生存率に及ぼす効果を示すMTSアッセイ。

【図8E】5 $\mu$ Mの遊離PI103またはPI-103がカプセル封入されたナノ粒子のいずれかでの処置後48時間における、4T1細胞中のホスホAKTおよびトータルAKTの発現。

【図8F】DLSグラフによって示される、PI103がカプセル封入されたナノ粒子の異なる時間間隔における物理的安定性。

【図9】図9A~9B(図9A)8日経過した皮下腫瘍を担持する4T1乳癌BALB/cマウスにおけるP1828-SNPのインビボ有効性。各動物に、3用量のPBS(対照群について)、5mg/kgの遊離P1828、5mg/kgのP1828-SNPのいずれかを各々一日おきに同じ用量で注射した。腫瘍体積を8日間毎日測定した。各動物についての終点は、腫瘍サイズ>2000cm<sup>3</sup>、または腫瘍の潰瘍形成もしくは壊死、または動物の死亡とした。(図9B)5mg/kgの用量の遊離PI1828またはP1828のナノ粒子のいずれかでの処置の72時間後の腫瘍中のpiAKTの発現。

【図10A】SACNの合成および特性決定を実証する。クロロギ酸コレステリルからコレステロール-シスプラチンコンジュゲートを合成するためのスキームを図示する。略図は、PC、コレステロール-シスプラチンコンジュゲートおよびDSPE-PEGからの自己集合によるSACNの合成を示す。

【図10B】SACNの合成および特性決定を実証する。より低い倍率(上部)および拡大画像(下部)のSACNの高分解能低温透過型電子顕微鏡(high-resolution cryo-TEM)像を図示する(スケールバー、上部、500nm)。

【図10C】SACNの合成および特性決定を実証する。動的光散乱を使用して測定された、SACNの流体力学直径の分布のグラフを図示する。

【図10D】SACNの合成および特性決定を実証する。120時間の期間にわたって定量化された、SACNからの白金のpH依存性放出のグラフを図示する。

【図11A】SACNのインビトロ特性決定を実証する。漸増濃度のシスプラチン、カルボプラチンおよびSACNと48時間インキュベーションした後の、LLC細胞株の細胞生存率のグラフを図示する。

【図11B】SACNのインビトロ特性決定を実証する。漸増濃度のシスプラチン、カルボプラチンおよびSACNと48時間インキュベーションした後の、4T1細胞株の細胞生存率のグラフを図示する。

【図11C】SACNのインビトロ特性決定を実証する。漸増濃度のシスプラチン、カルボプラチンおよびSACNと48時間インキュベーションした後の、7404-CP20細胞株の細胞生存率のグラフを図示する。

【図11D】SACNのインビトロ特性決定を実証する。SACNでの処置がアポトーシスによる細胞死を誘発することを実証する、FACS解析結果を図示する。1 $\mu$ MのPt濃度のカルボプラチン、シスプラチンおよびSACNで処置した4T1細胞の代表的なFACS分布。細胞を24時間インキュベートし、その後これらをAnnexin-V FITCで標識し、ヨウ化プロピジウムで対比染色した。各四分区間は、初期アポトーシス(右下)、後期アポトーシス(右上)、壊死(左上)および正常細胞(左下)における細胞のパーセンテージを表す。示したデータは、n=3の独立した実験からの平均 $\pm$ SEである。

【図11E】SACNのインビトロ特性決定を実証する。シスプラチンまたはSACN(20 $\mu$ MのPt濃度)で処置した7404-CP20細胞中のPtレベルのグラフを図示する。エネルギー依存性のエンドサイトーシスを阻害するために同様の濃度のSACNと4でインキュベートした細胞は、より低い細胞内Pt濃度を示す(\*P<0.05、\*\*P<0.01、ANOVA、Newman-Keulsのポストホック検定)。

10

20

30

40

50

【図1 2 A】4T1乳癌モデルにおけるSACNのインビボ抗腫瘍活性を実証する。シスプラチンまたはSACN（シスプラチンNP）の用量増加に伴う動物の体重減少のグラフを図示する。最大耐量は、20%の体重減少で計算される。

【図1 2 B】4T1乳癌モデルにおけるSACNのインビボ抗腫瘍活性を実証する。MTDの白金用量のシスプラチンで単回投与の白金化学療法を行った後の、4T1マウス乳癌モデルにおける異なる処置群の腫瘍体積の変化を実証するグラフを図示する。

【図1 2 C】4T1乳癌モデルにおけるSACNのインビボ抗腫瘍活性を実証する。MTDの白金用量のシスプラチンでの異なる処置が生存に及ぼす効果のKaplan-Meier曲線のグラフを図示する（ $P=0.0189$ 、傾向性のLogrank検定）。

【図1 2 D】4T1乳癌モデルにおけるSACNのインビボ抗腫瘍活性を実証する。多重用量の処置が4T1乳癌の成長に及ぼす効果を図示する。細胞を0日目に皮下移植した。腫瘍移植後9、11および13日目に、PBS、カルボプラチン（3mg/kg）、シスプラチン（3mg/kgおよび1mg/kg）およびSACN（3mg/kgおよび1mg/kg）（ $n=4$ 、用量は、Pt当量である）でマウスを処置した。上の列は、摘出した腫瘍の代表的な画像を示し、下の列は、アポトーシス用のマーカーであるTUNELについて処理された腫瘍断面を示す。Nikon Ti落射蛍光顕微鏡を使用して、広視野で撮るために20×倍率で撮像した。異なる多重用量処置が腫瘍体積に及ぼす効果の成長曲線のグラフを図示する。

【図1 2 E】4T1乳癌モデルにおけるSACNのインビボ抗腫瘍活性を実証する。多重用量の処置が4T1乳癌の成長に及ぼす効果を図示する。細胞を0日目に皮下移植した。腫瘍移植後9、11および13日目に、PBS、カルボプラチン（3mg/kg）、シスプラチン（3mg/kgおよび1mg/kg）およびSACN（3mg/kgおよび1mg/kg）（ $n=4$ 、用量は、Pt当量である）でマウスを処置した。上の列は、摘出した腫瘍の代表的な画像を示し、下の列は、アポトーシス用のマーカーであるTUNELについて処理された腫瘍断面を示す。Nikon Ti落射蛍光顕微鏡を使用して、広視野で撮るために20×倍率で撮像した。異なる処置群における動物の体重変化のグラフを図示する。

【図1 2 F】4T1乳癌モデルにおけるSACNのインビボ抗腫瘍活性を実証する。多重用量の処置が4T1乳癌の成長に及ぼす効果を図示する。細胞を0日目に皮下移植した。腫瘍移植後9、11および13日目に、PBS、カルボプラチン（3mg/kg）、シスプラチン（3mg/kgおよび1mg/kg）およびSACN（3mg/kgおよび1mg/kg）（ $n=4$ 、用量は、Pt当量である）でマウスを処置した。上の列は、摘出した腫瘍の代表的な画像を示し、下の列は、アポトーシス用のマーカーであるTUNELについて処理された腫瘍断面を示す。Nikon Ti落射蛍光顕微鏡を使用して、広視野で撮るために20×倍率で撮像した。異なる処置が生存に及ぼす効果のKaplan-Meier曲線のグラフを図示する（ $P=0.0022$ 、Logrank Mantel-Cox検定）。

【図1 3】図13A～13Bは、SACNが腎臓を迂回して腫瘍中に優先的に蓄積し、腎臓毒性の低下をもたらすことを実証する。腫瘍移植後9、11および13日目に、PBS、カルボプラチン（3mg/kg）、シスプラチン（3mg/kgおよび1mg/kg）およびSACN（シスプラチンNP、3mg/kgおよび1mg/kg）（ $n=4$ 、用量は、Pt当量である）でマウスを処置した。図13Aは、異なる処置群における摘出した腎臓の重量の棒グラフを図示する。図13Bは、誘導結合プラズマ-MSによって決定される、異なる処置群における白金の組織分布のグラフを図示する。シスプラチン（3mg/kg）処置群に対して $^*P<0.05$ 、 $^{**}P<0.01$ （ANOVA、続く、Newman-Keulsのポストホック検定）。

【図1 4】コレステロール-エチレンジアミンコンジュゲートの $^1H$  NMRスペクトルを図示する。

【図1 5】コレステロール-エチレンジアミン-コハク酸コンジュゲートの $^1H$  NMRスペクトルを図示する。

【図1 6】Ptを有するコレステロール-エチレンジアミン-コハク酸コンジュゲートの $^{195Pt}$  NMRスペクトルを図示する。

【図1 7】コレステロール-エチレンジアミンコンジュゲートの $^{13C}$  NMRスペクトルを図示する。

【図1 8】コレステロール-エチレンジアミン-コハク酸コンジュゲートの $^{13C}$  NMRスペク



トルを図示する。

【図 1 9】図19A～19Bは、K-RasLSL/+/Ptenfl/fl 卵巣癌モデルにおけるSACNのインビボ抗腫瘍活性を実証する。図19Aは、ビヒクルまたはシスプラチンと比較してSACNで処置したマウスで腫瘍ルシフェラーゼシグナルが有意に減少したことを示す、生物発光定量化のグラフを図示する。生物発光の定量化は、Living Image Software 3.1 (商標) を使用することによって達成した。示したデータは、 $n=1$  群当たり3匹の動物の最小値の平均 $\pm$ SE。 $P < 0.05$  (ANOVA、続く、Newman-Keulsのポストホック検定)。図19Bは、ICP-MSによって決定される、異なる処置群における白金の代表的な組織分布のグラフを図示する。これは、腎臓に対して腫瘍中にSACNが優先的に蓄積したことを示す。

【図 2 0】図3Eに示したデータの定量化を図示する。

【図 2 1 A】パクリタキセル-コレステロールナノ粒子の合成および特性決定を図示する。酸に不安定なリンカーを有するパクリタキセルコレステロールコンジュゲートを合成するためのスキームを図示する。

【図 2 1 B】パクリタキセル-コレステロールナノ粒子の合成および特性決定を図示する。ホスファチジルコリン、パクリタキセルコレステロールコンジュゲートおよびDSPE-PEGからの自己集合による、パクリタキセル-コレステロールナノ粒子の合成を示す略図を図示する。

【図 2 1 C】パクリタキセル-コレステロールナノ粒子の合成および特性決定を図示する。異なるモル比のパクリタキセルコレステロールコンジュゲート、ホスファチジルコリンおよびDSPE-PEGを使用することによる、ナノ粒子のサイズおよび負荷率の最適化の表を図示する。サイズ、負荷率、多分散性指数およびゼータ電位の変化を示す。

【図 2 1 D】パクリタキセル-コレステロールナノ粒子の合成および特性決定を図示する。パクリタキセル-コレステロールナノ粒子の高分解能低温透過型電子顕微鏡像を図示する。

【図 2 1 E】パクリタキセル-コレステロールナノ粒子の合成および特性決定を図示する。動的光散乱 (DLS) を使用して測定された、ナノ粒子の流体力学直径の分布のグラフを図示する。

【図 2 1 F】パクリタキセル-コレステロールナノ粒子の合成および特性決定を図示する。(1) PBS (pH7.4) 中の遊離パクリタキセルナノ粒子 (三角形)、(2) 1% DSPE-PEG を使用して合成されたナノ粒子 (三角形)、(3) PBS (pH7.4) 中の30% DSEP-PEGを有するナノ粒子 (四角形) および (4) 4T1細胞溶解物中の30% DSPE-PEGを有するナノ粒子 (円形) からの、パクリタキセルまたはパクリタキセルコレステロールのインビトロ放出のグラフを図示する。データは、平均 $\pm$ SE ( $n=3$ ) を表す。

【図 2 1 G】パクリタキセル-コレステロールナノ粒子の合成および特性決定を図示する。4 で保存中のパクリタキセル-コレステロールナノ粒子の物理的安定性のグラフを図示する。平均粒子サイズの変化は、DLSを使用して測定した。

【図 2 2 A】パクリタキセル-コレステロールナノ粒子のインビトロ特性決定を実証する。漸増濃度の遊離パクリタキセルならびに1% DSPE-PEG、10% DSPE-PEG、20% DSPE-PEG および30% DSPE-PEGを有するパクリタキセル-コレステロールナノ粒子と72時間インキュベーションした後の、4T1細胞株の細胞生存率のグラフを図示する

【図 2 2 B】パクリタキセル-コレステロールナノ粒子のインビトロ特性決定を実証する。漸増濃度の遊離パクリタキセルならびに1% DSPE-PEG、10% DSPE-PEG、20% DSPE-PEG および30% DSPE-PEGを有するパクリタキセル-コレステロールナノ粒子と72時間インキュベーションした後の、MDA-MB-231細胞株の細胞生存率のグラフを図示する

【図 2 2 C】パクリタキセル-コレステロールナノ粒子のインビトロ特性決定を実証する。対照、1% DSPE-PEG および30% DSPE-PEGを有するパクリタキセル-コレステロールナノ粒子で処置した6時間後の、開裂されたカスパーゼ-3および0-アクトチンの発現レベルを示すウエスタンブロット分析の結果を図示する。

【図 2 2 D】パクリタキセル-コレステロールナノ粒子のインビトロ特性決定を実証する。漸増濃度の遊離パクリタキセルおよび30% DSPE-PEGを有するパクリタキセル-コレステ

10

20

30

40

50

ロールナノ粒子で72時間インキュベーションした後の、411細胞株の細胞生存率のグラフを図示する。

【図2 2 E】パクリタキセル-コレステロールナノ粒子のインビトロ特性決定を実証する。漸増濃度の遊離パクリタキセルおよび30%DSPE-PEGを有するパクリタキセル-コレステロールナノ粒子で72時間インキュベーションした後の、MDA-MB-431細胞株の細胞生存率のグラフを図示する。

【図2 2 F】パクリタキセル-コレステロールナノ粒子のインビトロ特性決定を実証する。漸増濃度の遊離パクリタキセルおよび30%DSPE-PEGを有するパクリタキセル-コレステロールナノ粒子で72時間インキュベーションした後の、4306細胞株の細胞生存率のグラフを図示する。

【図2 3 A】PI3K阻害剤PI103と併用したパクリタキセル-コレステロールナノ粒子のインビトロ特性決定を実証する。4T1細胞株において50nMのパクリタキセル-コレステロールナノ粒子で処置した後の異なる時間間隔における、ホスホAkt、トータルAktおよび13-アクトチンの発現レベルを示すウエスタンブロット分析の結果を図示する。

【図2 3 B】PI3K阻害剤PI103と併用したパクリタキセル-コレステロールナノ粒子のインビトロ特性決定を実証する。50nMのPI-103の非存在下および存在下における、50nMのパクリタキセル-コレステロールナノ粒子で処置した後の411細胞中のホスホAktの発現レベルの変化を図示する。

【図2 3 C】PI3K阻害剤PI103と併用したパクリタキセル-コレステロールナノ粒子のインビトロ特性決定を実証する。4T1細胞株において、パクリタキセル-コレステロールナノ粒子およびPI-103を単独で、ならびに1:1のモル比で併用した場合のインビトロ細胞生存率アッセイのグラフを図示する。

【図2 3 D】PI3K阻害剤PI103と併用したパクリタキセル-コレステロールナノ粒子のインビトロ特性決定を実証する。4T1細胞株において、パクリタキセル-コレステロールナノ粒子およびPI-103を単独で、ならびに1:2のモル比で併用した場合のインビトロ細胞生存率アッセイのグラフを図示する。

【図2 3 E】PI3K阻害剤PI103と併用したパクリタキセル-コレステロールナノ粒子のインビトロ特性決定を実証する。2種の薬物を併用した効果を決定するための併用指数の式を図示する。

【図2 3 F】PI3K阻害剤PI103と併用したパクリタキセル-コレステロールナノ粒子のインビトロ特性決定を実証する。個々の薬物および薬物を併用した場合のEC50を得るために使用される4パラメーターHill式を図示する。Bliss独立モデルを使用して、2種の薬物を併用した処置の相加効果を予測する。

【図2 3 G】PI3K阻害剤PI103と併用したパクリタキセル-コレステロールナノ粒子のインビトロ特性決定を実証する。実験データと組み合わせた、薬物の予測された相加効果のグラフの比較を図示する。実験データが相加曲線より下にある場合、薬物が相乗効果を有することを示す。

【図2 3 H】PI3K阻害剤PI103と併用したパクリタキセル-コレステロールナノ粒子のインビトロ特性決定を実証する。Graphpad prismを使用して実験結果から得られたHill式中の4つのパラメーターの表を図示する。

【図2 4 A】411乳癌モデルにおいて、PI-103と併用したパクリタキセル-コレステロールナノ粒子のインビポ抗腫瘍活性を実証する。多重用量の処置が4T1乳癌の成長に及ぼす効果を図示する。細胞を0日目に皮下移植した。腫瘍移植後10日目、14日目および18日目に、PBS、パクリタキセル(3mg/kgおよび10mg/kg)、PI-103(3mg/kg)、パクリタキセル-コレステロールナノ粒子(3mg/kgおよび10mg/kg)、パクリタキセル+PI-103(各3mg/kg)、パクリタキセル-コレステロールナノ粒子+PI-103(各3mg/kg)、iRGDパクリタキセル-コレステロールナノ粒子(3mg/kg)およびiRGDパクリタキセル-コレステロールナノ粒子+PI-103(各3mg/kg)(n=5、用量は、パクリタキセル当量である)でマウスを処置した。摘出した腫瘍の画像を図示する。

【図2 4 B】411乳癌モデルにおいて、PI-103と併用したパクリタキセル-コレステロール

10

20

30

40

50

ナノ粒子のインビボ抗腫瘍活性を実証する。多重用量の処置が4T1乳癌の成長に及ぼす効果を図示する。細胞を0日目に皮下移植した。腫瘍移植後10日目、14日目および18日目に、PBS、パクリタキセル（3mg/kgおよび10mg/kg）、PI-103（3mg/kg）、パクリタキセル-コレステロールナノ粒子（3mg/kgおよび10mg/kg）、パクリタキセル+PI-103（各3mg/kg）、パクリタキセル-コレステロールナノ粒子+PI-103（各3mg/kg）、iRGDパクリタキセル-コレステロールナノ粒子（3mg/kg）およびiRGDパクリタキセル-コレステロールナノ粒子+PI-103（各3mg/kg）（n=5、用量は、パクリタキセル当量である）でマウスを処置した。腫瘍体積のグラフを表す。

【図24C】411乳癌モデルにおいて、PI-103と併用したパクリタキセル-コレステロールナノ粒子のインビボ抗腫瘍活性を実証する。異なる処置群における動物の体重変化のグラフを図示する。統計分析は、ANOVAを用いて実施した。エラーバーは、平均±SEMを表す。遊離パクリタキセル（3mg/kg）または遊離PI-103（3mg/kg）に対して、\*P<0.05、\*\*P<0.01、\*\*\*P<0.001。\*\*\*-iRGDパクリタキセル-コレステロールナノ粒子+PI103。

【発明を実施するための形態】

【0019】

詳細な説明

1つの局面において、本開示は、脂質と共有結合した化学療法剤を含むコンジュゲートを提供する。用語「脂質」は、本明細書において使用される場合、有機溶媒に可溶性の物質を意味し、これには、油、脂肪、ステロール、トリグリセリド、脂肪酸、リン脂質等が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。化学療法剤と脂質は、それらのそれぞれの構造中に存在する反応性官能基を使用して、互いに共有的にコンジュゲートされることができる。用語「反応性官能基」は、別の官能基と反応することが可能な官能基を指す。典型的な反応性官能基としては、ヒドロキシル、アミン、チオール、チアール、スルフィノ、カルボン酸、アミド等が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。脂質および化学療法剤上の反応性官能基は、同一または異なることができる。いくつかの態様において、脂質上の反応性基は、ヒドロキシル、アミン、チオールまたはカルボン酸である。いくつかの態様において、化学療法剤上の反応性基は、ヒドロキシル、アミン、チオールまたはカルボン酸である。

【0020】

非限定的に、脂質は、ステロール脂質、脂肪酸、脂肪アルコール、グリセロ脂質（たとえば、モノグリセリド、ジグリセリドおよびトリグリセリド）、リン脂質、グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、プレノール脂質、糖脂質（saccharolipid）、ポリケチドおよびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されることができる。脂質は、ポリ不飽和脂肪酸またはポリ不飽和脂肪アルコールであることができる。用語「ポリ不飽和脂肪酸」または「ポリ不飽和脂肪アルコール」は、本明細書において使用される場合、その炭化水素鎖中に2個以上の炭素-炭素二重結合を有する脂肪酸またはアルコールを意味する。脂質はまた、高級不飽和脂肪酸または高級不飽和脂肪アルコールであることができる。用語「高級ポリ不飽和脂肪酸」または「高級ポリ不飽和脂肪アルコール」は、本明細書において使用される場合、少なくとも18個の炭素原子および少なくとも3個の二重結合を有する脂肪酸またはアルコールを意味する。脂質は、 $\omega$ -3脂肪酸であることができる。用語「 $\omega$ -3脂肪酸」は、本明細書において使用される場合、一番目の二重結合が酸性基の反対の末端から三番目の炭素-炭素結合に生じる、ポリ不飽和脂肪酸を意味する。

【0021】

いくつかの態様において、脂質は、コレステロール；ジカプリル酸/ジカプリン酸1,3-プロパンジオール；10-ウンデセン酸；1-ドトリアコンタノール；1-ヘプタコサノール；1-ノナコサノール；2-エチルヘキサノール；アンドロスタン；アラキジン酸；アラキドン酸；アラキジルアルコール；ベヘン酸；ベヘニルアルコール；Capmul MCM C10；カプリン酸；カプリン酸アルコール；カプリルアルコール；カプリル酸；飽和脂肪アルコールC12-C18のカプリル酸/カプリン酸エステル；カプリル酸/カプリン酸トリグリセリド；カプリル酸/カプリン酸トリグリセリド；セラミドホスホリルコリン（スフィンゴミエリン、

10

20

30

40

50

SPH) ; セラミドホスホリルエタノールアミン (スフィンゴミエリン、Cer-PE) ; セラミドホスホリルグリセロール ; セロプラスチン酸 ; セロチン酸 ; セロチン酸 ; セリルアルコール ; セテアリルアルコール ; Ceteth-10 ; セチルアルコール ; コラン ; コレスタン ; コレステロール ; cis-11-エイコセン酸 ; cis-11-オクタデカン酸 ; cis-13-ドコセン酸 ; クルイチル (cluytyl) アルコール ; ジホモ- -リノレン酸 ; ドコサヘキサエン酸 ; 卵レシチン ; エイコサペンタエン酸 ; エイコセン酸 ; エライジン酸 ; エライドリノレニルアルコール ; エライドリノレイルアルコール ; エライジルアルコール ; エルカ酸 ; エルシルアルコール ; エストラン ; ジステアリン酸エチレングリコール (EGDS) ; ゲダ酸 ; ゲジルアルコール ; グリセロールジステアリン酸 (I型) EP (プレシロールAT05) ; トリカプリル酸 / カプリン酸グリセロール ; トリカプリル酸 / カプリン酸グリセロール (CAPTEX (登録商標) 355EP/NF) ; モノカプリル酸グリセリル (Capmul MCM C8 EP) ; 三酢酸グリセリル ; トリカプリル酸グリセリル ; トリカプリル酸 / カプリン酸 / ラウリン酸グリセリル ; トリカプリル酸 / トリカプリン酸グリセリル ; トリパルミチン酸グリセリル (トリパルミチン) ; ヘナトリアコンチル酸 (Henatriacontylic acid) ; ヘンエイコシルアルコール ; ヘンエイコシル酸 (Heneicosylic acid) ; ヘプタコシル酸 (Heptacosylic acid) ; ヘプタデカン酸 ; ヘプタデシルアルコール ; ヘキサトリアコンチル酸 (Hexatriacontylic acid) ; イソステアリン酸 ; イソステアリルアルコール ; ラッセル酸 ; ラウリン酸 ; ラウリルアルコール ; リグノセリン酸 ; リグノセリルアルコール ; リノエライジン酸 ; リノール酸 ; リノレニルアルコール ; リノレイルアルコール ; マルガリン酸 ; ミード ; メリシン酸 ; メリシルアルコール ; モンタン酸 ; モンタニルアルコール ; ミリシルアルコール ; ミリスチン酸 ; ミリストレイン酸 ; ミリスチルアルコール ; ネオデカン酸 ; ネオヘプタン酸 ; ネオノナン酸 ; ネルボン酸 ; ノナコシル酸 (Nonacosylic acid) ; ノナデシルアルコール ; ノナデシル酸 ; ノナデシル酸 ; オレイン酸 ; オレイルアルコール ; パルミチン酸 ; パルミトレイン酸 ; パルミトレイルアルコール ; ペラルゴン酸 ; ペラルゴンアルコール ; ペンタコシル酸 (Pentacosylic acid) ; ペンタデシルアルコール ; ペンタデシル酸 ; ホスファチジン酸 (ホスファチデート、PA) ; ホスファチジルコリン (レシチン、PC) ; ホスファチジルエタノールアミン (セファリン、PE) ; ホスファチジルイノシトール (PI) ; ビスリン酸ホスファチジルイノシトール (PIP2) ; リン酸ホスファチジルイノシトール (PIP) ; ミリン酸ホスファチジルイノシトール (PIP3) ; ホスファチジルセリン (PS) ; ポリグリセリル-6-ジステアリン酸 ; プレゲナン ; ジカプリン酸プロピレングリコール ; ジカプリロカプリン酸プロピレングリコール ; ジカプリロカプリン酸プロピレングリコール ; プシリン酸 (Psyllic acid) ; レシノレアック酸 (recinoleaic acid) ; レシノレイル (recinoley) アルコール ; サビエン酸 ; 大豆レシチン ; ステアリン酸 ; ステアリドン酸 ; ステアリルアルコール ; トリコシル酸 ; トリデシルアルコール ; トリデシル酸 ; トリオレイン ; ウンデシルアルコール ; ウンデシレン酸 ; ウンデシル酸 ; バクセン酸 ; -リノレン酸 ; および -リノレン酸からなる群より選択されることができる。

10

20

30

40

50

#### 【0022】

いくつかの態様において、脂質は、コレステロールである。いくつかの態様において、コレステロールは、化学療法剤とコンジュゲートするためのコハク酸エステルおよび / またはコハク酸をさらに含むことができる。

#### 【0023】

本明細書において使用される場合、用語「化学療法剤」は、異常な細胞成長によって特徴付けられる疾患の処置において治療的有用性を有する、任意の化学的または生物学的作用物質を指す。そのような疾患は、腫瘍、新生物および癌、ならびに過形成性成長によって特徴付けられる疾患を含む。これらの作用物質は、癌細胞が継続的な増殖のために依存している細胞活性を阻害するように機能することができる。全ての態様のいくつかの局面において、化学療法剤は、細胞周期阻害剤または細胞分裂阻害剤である。本発明の方法において有用である化学療法剤のカテゴリーは、アルキル化剤 / アルカロイド剤、代謝拮抗剤、ホルモンまたはホルモン類似体および種々の抗新生物薬を含む。これらの作用物質の大部分は、癌細胞に対して直接的または間接的に毒性である。1つの態様において、化学

療法剤は、放射性分子である。当業者は、有用な化学療法剤を容易に同定することができる（たとえば、Slapak and Kufe, Principles of Cancer Therapy, Chapter 86 in Harrison's Principles of Internal Medicine, 14th edition; Perry et al., Chemotherapy, Ch. 17 in Abeloff, Clinical Oncology 2nd ed. 2000 Churchill Livingstone, Inc; Baltzer L, Berkery R (eds): Oncology Pocket Guide to Chemotherapy, 2nd ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1995; Fischer D S, Knobf M F, Durivage H J (eds): The Cancer Chemotherapy Handbook, 4th ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1993 を参照されたい）。いくつかの態様において、化学療法剤は、細胞傷害性化学療法薬であることができる。用語「細胞傷害性作用物質」は、本明細書において使用される場合、細胞の機能を阻害もしくは抑制するおよび/または細胞の破壊を引き起こす物質を指す。該用語は、放射性同位体（たとえば、At211、I131、I125、Y90、Re186、Re188、Sm153、Bi212、P32およびLuの放射性同位体）、化学療法剤および毒素、たとえば細菌、真菌、植物または動物起源の小分子毒素または酵素的活性毒素（それらの断片および/または変異体を含む）を含むことを意図する。

10

## 【0024】

化学療法剤という用語は、異なる作用機序を有する多くの化学療法剤を網羅する広義の用語である。概して、化学療法剤は、作用機序に従って分類される。利用可能な作用物質の多くは、様々な腫瘍の発生経路の代謝拮抗剤であるか、または腫瘍細胞のDNAと反応する。また、トポイソメラーゼIおよびトポイソメラーゼIIのような酵素を阻害する作用物質または抗有糸分裂剤（antimiotic agent）である作用物質もある。

20

## 【0025】

化学療法剤としては、アロマターゼ阻害剤；抗エストロゲン剤、抗アンドロゲン剤（とりわけ前立腺癌の場合において）またはゴナドレリンアゴニスト；トポイソメラーゼI阻害剤またはトポイソメラーゼII阻害剤；微小管活性剤、アルキル化剤、抗新生物剤、代謝拮抗剤または白金化合物；タンパク質もしくは脂質キナーゼ活性またはタンパク質もしくは脂質ホスファターゼ活性を標的化する/減少させる化合物、さらなる抗血管形成化合物または細胞分化プロセスを誘発する化合物；ブラジキニン1受容体またはアンジオテンシンIIアンタゴニスト；シクロオキシゲナーゼ阻害剤、ビスホスホネート、ヘパラナーゼ阻害剤（ヘパラン硫酸の分解を抑制する）、たとえばPI-88、生物応答調節剤、好ましくは、リンホカインまたはインターフェロン、たとえばインターフェロン、ユビキチン化阻害剤または抗アポトーシス経路を遮断する阻害剤；Ras発癌性アイソフォームの阻害剤またはファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤；テロメラーゼ阻害剤、たとえば、テロメスタチン；プロテアーゼ阻害剤、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤、メチオニンアミノペプチダーゼ阻害剤、たとえばベンガミドまたはその誘導体；プロテアソーム阻害剤、たとえばPS-341（ボルテゾミブ/ベルケイド）；血液悪性疾患の処置において使用される作用物質またはFMS様チロシンキナーゼ阻害剤；HSP90阻害剤；ヒストンデアセチラーゼ（HDAC）阻害剤；mTOR阻害剤；ソマトスタチン受容体アンタゴニスト；インテグリンアンタゴニスト；抗白血病化合物；腫瘍細胞傷害アプローチ、たとえば電離放射線；EDG結合剤；アントラニル酸アミドクラスの前駆体阻害剤；リボヌクレオチドレダクターゼ阻害剤；S-アデノシルメチオニンデカルボキシラーゼ阻害剤；VEGFまたはVEGFRに対する抗体；光線力学的療法；血管新生抑制ステロイド；AT1受容体アンタゴニスト；ACE阻害剤等が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

30

40

## 【0026】

他の化学療法剤としては、植物アルカロイド、ホルモン剤およびアンタゴニスト、生物応答調節剤、好ましくはリンホカインまたはインターフェロン、アンチセンスオリゴヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチド誘導体；あるいは種々の作用物質、または他のもしくは公知でない作用機序を有する作用物質が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

## 【0027】

いくつかの態様において、化学療法剤は、ホスホイノシチド3-キナーゼ（PI3-キナーゼ

50

またはPI3K)阻害剤であることができる。ホスホイノシチド3-キナーゼは、ホスファチジルイノシトールのイノシトール環の3位ヒドロキシル基をリン酸化することが可能な関連酵素のファミリーである。これらはまた、ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼとしても知られている。PI3Kは、IRS(インスリン受容体基質)と相互作用し、一連のリン酸化事象を介してグルコースの取り込みを調節する。ホスホイノシトール-3-キナーゼファミリーは、クラスI、IIおよびクラスIIIからなり、クラスIは、唯一、原形質膜の内葉上でPI(4,5)P2をPI(3,4,5)P3へと変換することが可能なクラスである。

#### 【0028】

クラスI PI3Kは、調節サブユニットおよび触媒サブユニットからなるヘテロ二量体分子であり；これらは、配列類似性によってIAサブセットとIBサブセットにさらに分けられる。クラスIA PI3Kは、p110、または触媒サブユニットに結合している5つの調節p85、p55、p50、p85またはp55サブユニットの1つからなる。最初の3つの調節サブユニットは、全て同じ遺伝子(Pik3r1)のスプライス変異体であり、他の2つは、他の遺伝子(p85およびp55について、それぞれ、Pik3r2およびPik3r3)によって発現される。最も高度に発現される調節サブユニットはp85であり、3つの触媒サブユニットは全て別個の遺伝子(p110、p110およびp110について、それぞれ、Pik3ca、Pik3cbおよびPik3cd)によって発現される。最初の2つのp110アイソフォーム(および)は全ての細胞で発現されるが、p110は主に白血球で発現され、これは適応免疫系と並行して進化したと示唆されている。調節p101サブユニットおよび触媒p110サブユニットは、IB型PI3Kを含み、各々単一遺伝子によってコードされる。

10

20

#### 【0029】

クラスIIは、3つの触媒アイソフォーム(C2、C2およびC2)を含むが、クラスIおよびIIIとは異なり調節性タンパク質がない。これらの酵素は、PIからのPI(3)Pの産生を触媒する(また、PI(4)PからPI(3,4)P2も産生し得る)。C2およびC2は全身において発現されるが、しかしながら、C2の発現は肝細胞に限定される。クラスII PI3Kに特有な特徴は、C末端のC2ドメインである。このドメインは、Ca<sup>2+</sup>の結合を調整するために不可欠なAsp残基を欠いており、このことは、クラスII PI3KがCa<sup>2+</sup>非依存的に脂質に結合することを示唆している。クラスIIIは、これらがPIからのPI(3)Pの産生を偏らせるという点でクラスIIと類似しているが、これらが触媒(Vps34)サブユニットと調節(p150)サブユニットのヘテロ二量体として存在するので構造上はクラスIとより類似している。クラスIIIは、主にタンパク質および小胞の輸送に関与すると思われる。

30

#### 【0030】

本明細書において使用される場合、「PI3K阻害剤」は、PI3Kの活性を阻害する作用物質を指し、これは、ホスファチジルイノシトールのイノシトール環の3位ヒドロキシル基のリン酸化のレベルによって測定されるか、またはPI3Kの下流分子の活性および/またはリン酸化(ここで、リン酸化の増加は、PI3K活性を示す)によって測定される。そのような下流分子の例は、当技術分野において公知であり、AKT、SGK、mTOR、GSK3、PSD-95、S6および4EBP1を挙げることができるが、それらに限定されるわけではない。PI3Kの活性を直接的または間接的に測定する方法は、当技術分野において周知であり、非限定的な例として、市販のホスホ-アイソフォーム特異的抗体(たとえば、抗-ホスホ-AKT抗体、Cat No. ab66138 Abcam, Cambridge, MA)を使用して、PI3Kの下流分子のリン酸化のレベルを決定することを含む。

40

#### 【0031】

いくつかの態様において、PI3K阻害剤は、LY294002、PI103および/またはPI828であることができる。PI3K阻害剤のさらなる非限定的な例としては、ワートマニン、デメトキシビリジン、IC486068、IC87114、GDC-0941、ペリホシン、CAL101、PX-866、IPI-145、BAY80-6946、BEZ235、P6503、TGR1202、SF1126、INK1117、BKM120、IL147、XL765、パロミド529、GSK1059615、ZSTK474、PWT33597、TG100-115、CAL263、GNE-447、CUDC-907およびAEZS-136を挙げることができる。

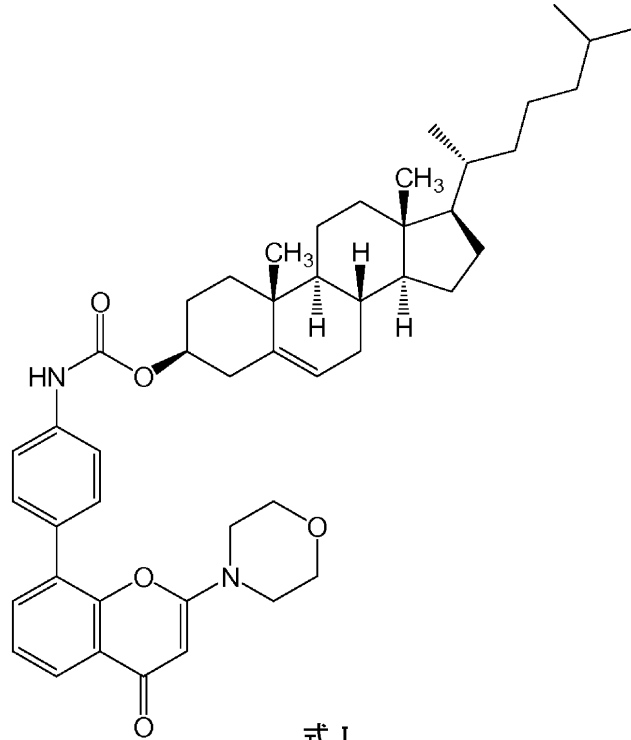
#### 【0032】

50

いくつかの態様において、コンジュゲートは、コレステロールと共有結合したPI3K阻害剤を含む。

【0033】

いくつかの態様において、コンジュゲートは、式Iまたは式II：

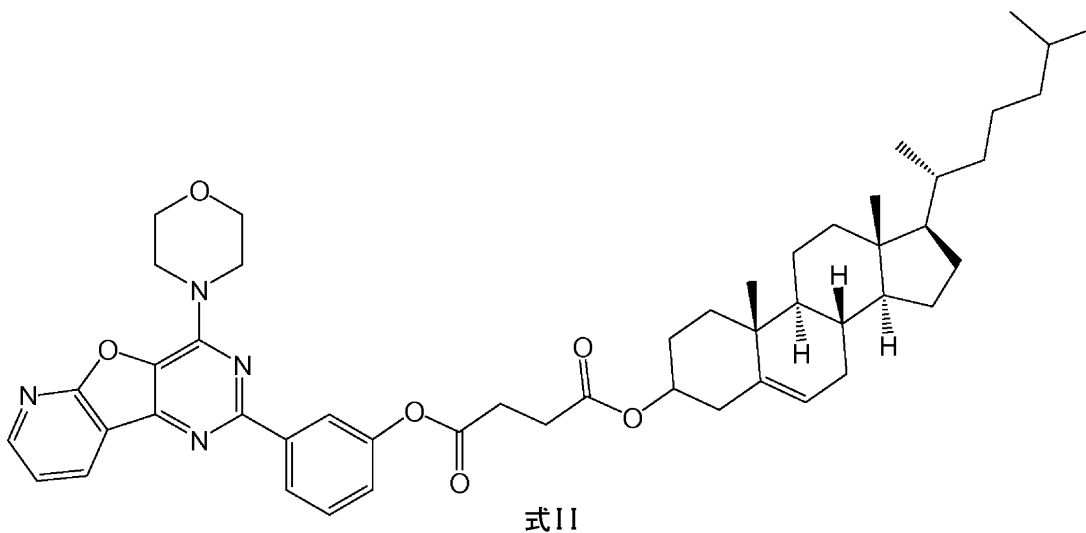


10

20

30

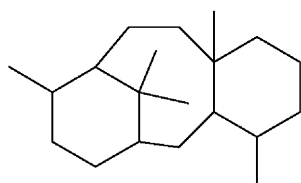
40



で表されるコンジュゲートである。

【0034】

いくつかの態様において、化学療法剤は、タキサンである。用語「タキサン」は、一般に、イチイ属（たとえば、特に非限定的に、ヨーロッパイチイ（*Taxus baccata*）、セイヨウイチイ（*Taxus brevifolia*）、カナダイイチイ（*Taxus canadensis*）、チュウゴクイチイ（*Taxus chinensis*）、日本イチイ（*Taxus cuspidata*）、フロリダイイチイ（*Taxus floridana*）、メキシコイチイ（*Taxus globosa*）、スマトライチイ（*Taxus sumatrana*）、ヒマラヤイチイ（*Taxus wallichiana*）のようなイチイ）の植物によって産生される、ジテルペン含有化合物ならびにそれらの合成および半合形成態を指す。該用語は、核構造：



を含有する化合物を表す。基本的なタキサン核構造は、さらに置換され得るかまたは環中に不飽和を含有し得ることで、一般にタキサンとして公知である多数の化合物を生成する。一般に、そのような化合物は、微小管に干渉して有糸分裂を停止することによって細胞成長を遮断し得る。用語「ジテルペン」は、本明細書において使用される場合、4つのイソプレレン単位から誘導される炭素骨格を有する化合物を意味する。タキサン群の化合物は、パクリタキセルおよびドセタキセルを含む。

10

#### 【0035】

タキサンは、天然源から単離されることができ、また天然の前駆体からも合成されることができ、パクリタキセル (TAXOL (登録商標)、Bristol-Myers Squibb) は、たとえば、パッカチンから調製されることができ、これは、パッカチンのヒドロキシル基 (パクリタキセルのヒドロキシル基になる) に保護基を結合させ、前駆体パッカチンをパクリタキセルに変換し、次に、ヒドロキシル基から保護基を除去するとパクリタキセルが得られる (たとえば、以下を参照されたい; 国際公開公報第93/10076号、国際公開日05/27/93; K. V. Rao、米国特許第5,200,534号; R.A. Holton、米国特許第5,015,744号; PCT 米国特許第92/07990号; V.J. Stella and A.E. Mathew、米国特許第4,960,790号; K.C. Nicolau, Nature 3j54 (1993), pp. 464-466; Nicolau, K. C. et al. Nature 367 (1994) pp.630-634; Holton, R. A., et al. J. Am. Chem. Soc. H6 (1994) pp. 1597-1600; 国際公開公報第93/16059号、国際公開日08/19/93; 欧州特許第528,729号、公開日02/24/93; 欧州特許第522,958号、公開日01/13/93; 国際公開公報第91/13053、国際公開日09/05/91; 欧州特許第414,610号、国際公開日02/27/91; これらの文書の内容は、参照によって本明細書に組み入れられる)。タキサンの非限定的な例としては、パクリタキセルおよびドセタキセル、それらの誘導体およびそれらの混合物を挙げることができる。

20

#### 【0036】

タキサンは、多種多様な癌を処置するために効果的に使用されることができ、パクリタキセルは、たとえば、卵巣癌および乳癌に対して、ならびに悪性黒色腫、結腸癌、白血病および肺癌に対して活性を有することが見いだされた (たとえば、Borman, Chemical & Engineering News, September 2, 1991, pp. 11-18; The Pharmacological Basis of Therapeutics (Goodman Gilman et al., eds.), Pergamon Press, New York (1990), p. 1239; Suffness, Antitumor Alkaloids, in: 「The Alkaloids, Vol. XXV,」 Academic Press, Inc. (1985), Chapter 1, pp. 6-18; Rizzo et al., J. Pharm. & Biomed. Anal. § (2):159-164 (1990); および Biotechnology 9:933-938 (October, 1991) を参照されたい)。パクリタキセルは、癌細胞に対して細胞核中のチューブリンに結合することによって作用し、それによって微小管の分解を遮断し、その結果として細胞分裂を阻害する (Schiff et al., Nature 277:665 (1979))。1つの態様において、タキサンは、パクリタキセルである。

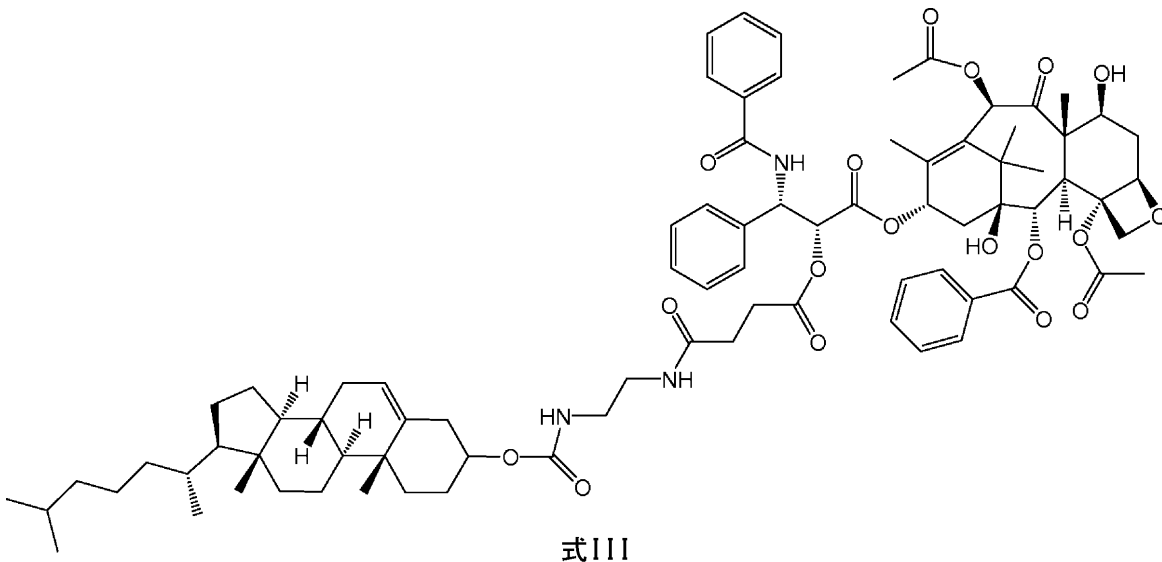
30

#### 【0037】

いくつかの態様において、コンジュゲートは、コレステロールと共有結合したタキサンを含む。いくつかの態様において、コンジュゲートは、式III:

40





10

で表されるコンジュゲートである。

【0038】

いくつかの態様において、化学療法剤は、白金酸塩である。任意の白金化合物が本明細書に記載される方法および組成物において使用されることができる。いくつかの態様において、白金化合物は、白金(II)または白金(IV)化合物である。白金は、少なくとも1つの配位結合を介して脂質に解離可能に結合されることができる。いくつかの態様において、配位結合は、Pt-Oである。いくつかの他の態様において、配位結合は、Pt-Nである。

20

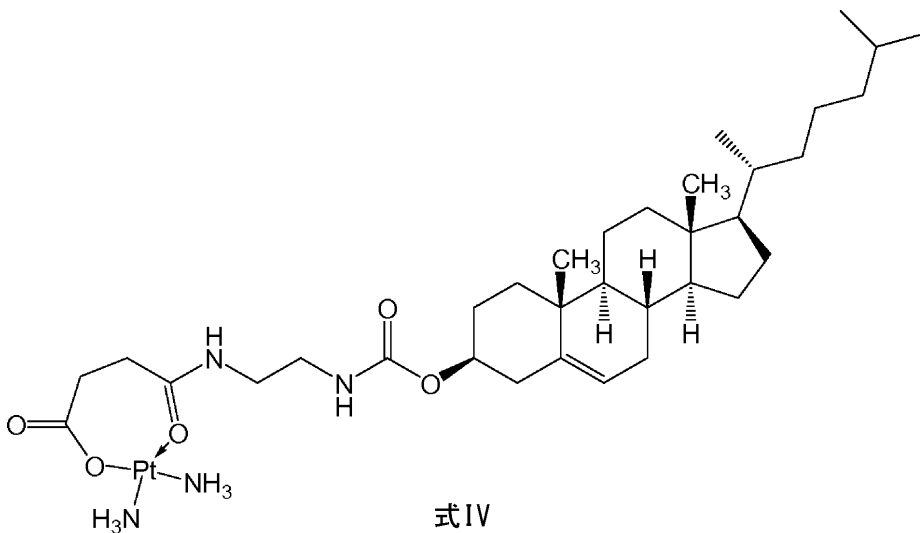
【0039】

いくつかの態様において、白金(II)化合物は、シスプラチン、オキサリプラチン、カルボプラチン、パラプラチン、サトラプラチン(sartraplatin)およびそれらの組み合わせからなる群より選択される。好ましい態様において、白金酸塩は、シスプラチンまたはオキサリプラチンである。シスプラチン[cis-ジクロロジアンミン白金(II)](CDDP)は、抗腫瘍剤の重要なクラスとして出現し、精巣癌、卵巣癌、子宮頸部癌、頭頸部癌および非小細胞肺癌を含む多くの悪性腫瘍の処置に広く使用される(Jamieson, et al, Chem. Rev. (1999), 99(9): 2467-2498)。これはまた、トリプルネガティブ乳癌に活性であることも示された(Leong, et al., J. Clin. Invest. (2007), 117(5): 1370-80)。しかしながら、その使用は、主に腎臓毒性すなわち腎臓への毒性のために用量制限的である(Madias, NE and Harrington, JT, Am. J. (1978), 65(2): 307-14)。

30

【0040】

いくつかの態様において、コンジュゲートは、少なくとも1つの配位結合を介してコレステロールと解離可能に結合した白金を含む。いくつかの態様において、コンジュゲートは、式IV:



10

で表されるコンジュゲートである。

【0041】

白金酸塩（または白金含有化学療法剤）を含む追加のコンジュゲートは、たとえば、米国特許出願公開第2012/0189571号および国際公開公報第2010/091192号（その各々は、参照によってその全体が本明細書に組み入れられる）に記載されている。

【0042】

化学療法剤と脂質（たとえば、コレステロール）は、結合によってまたはリンカーを介して互いに連結されることができる。このリンカーは、その用途に応じて開裂可能または開裂不可能であることができる。特定の態様において、開裂可能なリンカーは、所望の標的まで輸送した後に化学療法剤を放出するために使用されることができる。意図されるコンジュゲーションもしくはカップリング相互作用の性質、または所望の生物学的効果によって、選択されるリンカー群が決められる。

20

【0043】

用語「リンカー」は、化合物の2つの部位を接続する有機部分を意味する。リンカーは、典型的には、直接結合、または原子、たとえば酸素もしくは硫黄、原子団、たとえばNR<sup>1</sup>、C(O)、C(O)O、C(O)NR<sup>1</sup>、SO、SO<sub>2</sub>、SO<sub>2</sub>NH、または原子鎖、たとえば置換または非置換アルキル、置換または非置換アルケニル、置換または非置換アルキニル、アリールアルキル、アリールアルケニル、アリールアルキニル、ヘテロアリールアルキル、ヘテロアリールアルケニル、ヘテロアリールアルキニル、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロシクリルアルケニル、ヘテロシクリルアルキニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルキルアリールアルキル、アルキルアリールアルケニル、アルキルアリールアルキニル、アルケニルアリールアルキル、アルケニルアリールアルケニル、アルケニルアリールアルキニル、アルキニルアリールアルキル、アルキニルアリールアルケニル、アルキニルアリールアルキニル、アルキルヘテロアリールアルキル、アルキルヘテロアリールアルケニル、アルキルヘテロアリールアルキニル、アルケニルヘテロアリールアルキル、アルケニルヘテロアリールアルケニル、アルケニルヘテロアリールアルキニル、アルキニルヘテロアリールアルキル、アルキニルヘテロアリールアルケニル、アルキルヘテロシクリルアルキル、アルキルヘテロシクリルアルケニル、アルキルヘテロシクリルアルキニル、アルケニルヘテロシクリルアルキル、アルケニルヘテロシクリルアルケニル、アルケニルヘテロシクリルアルキニル、アルキニルヘテロシクリルアルキル、アルキニルヘテロシクリルアルケニル、アルキニルヘテロシクリルアルキニル、アルキルアリール、アルケニルアリール、アルキニルアリール、アルキルヘテロアリール、アルケニルヘテロアリール、アルキニルヘテロアリールを含み、ここで、1つまたは複数のメチレンは、O、S、S(O)、SO<sub>2</sub>、N(R<sup>1</sup>)<sub>2</sub>、C(O)、開裂可能な連結基、置換または非置換アリール、置換または非置換ヘテロアリール、置換または非置換複素環によって分断または終結されることができ；R<sup>1</sup>は、水素、アシル、脂

30

40

50

肪族または置換脂肪族である。

【0044】

特定の態様において、リンカーは、分岐リンカーである。分岐リンカーの分岐点は少なくとも三価であることができるが、四価、五価または六価の原子、またはそのような多価性を表す群であることができる。特定の態様において、分岐点は、-N、-N(Q)-C、-O-C、-S-C、-SS-C、-C(O)N(Q)-C、-OC(O)N(Q)-C、-N(Q)C(O)-C、または-N(Q)C(O)O-Cであることができる；ここで、Qは、出現毎に独立して、Hまたは置換されていてもよいアルキルである。他の態様において、分岐点は、グリセロールまたはグリセロール誘導体であることができる。

【0045】

いくつかの態様において、リンカーは、少なくとも1つの開裂可能な連結基を含む。開裂可能な連結基は、細胞の外で十分に安定であるが、標的細胞へ侵入した際に開裂されて、リンカーによって共に保持されている2つの部分を放出する基である。好ましい態様において、開裂可能な連結基は、標的細胞中または第一の参照条件下（たとえば、細胞内条件を模倣するまたはそれに相当するように選択されることができる）において、対象の血液もしくは血清中または第二の参照条件下（たとえば、血液または血清中に見いだされる条件を模倣するまたはそれに相当するように選択されることができる）においてよりも少なくとも10倍またはそれより速く、好ましくは少なくとも100倍速く開裂される。

【0046】

開裂可能な連結基は、開裂因子、たとえばpH、酸化還元電位または分解分子の存在に対して感受性である。一般に、開裂因子は、血清または血液中よりも細胞内においてより多く見られるか、またはより高いレベルもしくは活性で見いだされる。そのような分解因子の例としては、特定の基質に対して選択されるまたは基質特異性を有さない、細胞中に存在する、酸化還元で開裂可能な連結基を還元によって分解することができる、酸化還元剤（たとえば、酸化酵素もしくは還元酵素またはメルカプタンのような還元剤を含む）；エステラーゼ；アミダーゼ；エンドソームまたは酸性環境を生成することができる作用物質、たとえば、5以下のpHを生じる作用物質；一般的な酸として作用することによって酸で開裂可能な連結基を加水分解または分解することができる酵素、ペプチダーゼ（基質特異的であることができる）およびプロテアーゼ、ならびにホスファターゼが挙げられる。

【0047】

リンカーは、特定の酵素によって開裂可能である開裂可能な連結基を含むことができる。リンカー中に組み込まれる開裂可能な連結基のタイプは、標的化される細胞に依存することができる。いくつかの態様において、開裂可能な連結基は、細胞中（または細胞内条件を模倣するように選択されたインビトロ条件下）において、血液または血清中（または細胞外条件を模倣するように選択されたインビトロ条件下）と比較して、少なくとも1.25、1.5、1.75、2、3、4、5、10、25、50または100倍速く開裂される。いくつかの態様において、開裂可能な連結基は、血液中（または細胞外条件を模倣するように選択されたインビトロ条件下）において、細胞中（または細胞内条件を模倣するように選択されたインビトロ条件下）と比較して、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%または1%未満が開裂される。

【0048】

典型的な開裂可能な連結基としては、酸化還元で開裂可能な連結基（たとえば、-S-S-および-C(R)<sub>2</sub>-S-S-、ここで、Rは、HまたはC<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキルであり、少なくとも1つのRは、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキル、たとえばCH<sub>3</sub>またはCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>である）；リン酸ベースの開裂可能な連結基（たとえば、-O-P(O)(OR)-O-、-O-P(S)(OR)-O-、-O-P(S)(SR)-O-、-S-P(O)(OR)-O-、-O-P(O)(OR)-S-、-S-P(O)(OR)-S-、-O-P(S)(OR)-S-、-S-P(S)(OR)-O-、-O-P(O)(R)-O-、-O-P(S)(R)-O-、-S-P(O)(R)-O-、-S-P(S)(R)-O-、-S-P(O)(R)-S-、-O-P(S)(R)-S-、-O-P(O)(OH)-O-、-O-P(S)(OH)-O-、-O-P(S)(SH)-O-、-S-P(O)(OH)-O-、-O-P(O)(OH)-S-、-S-P(O)(OH)-S-、-O-P(S)(OH)-S-、-S-P(S)(OH)-O-、-O-P(O)(H)-O-、-O-P(S)(H)-O-、-S-P(O)(H)-O-、-S-P(S)(H)-O-、-S-P(O)(H)-S-、および-O-P(S)(H)-S-、ここで、Rは、置換されていて

10

20

30

40

50

もよい直鎖または分岐鎖 $C_1-C_{10}$ アルキルである) ; 酸で開裂可能な連結基(たとえば、ヒドラゾン、エステルおよびアミノ酸のエステル、 $-C=NN-$ および $-OC(O)-$ ) ; エステルベースの開裂可能な連結基(たとえば、 $-C(O)O-$ ) ; ペプチドベースの開裂可能な連結基(たとえば、細胞中のペプチダーゼおよびプロテアーゼのような酵素によって開裂される連結基、たとえば、 $-NHCHR^A C(O)NHCHR^B C(O)-$ 、ここで、 $R^A$ および $R^B$ は、2つの隣接するアミノ酸のR基である)が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。ペプチドベースの開裂可能な連結基は、2つ以上のアミノ酸を含む。いくつかの態様において、ペプチドベースの開裂可能な連結は、細胞中に見いだされるペプチダーゼまたはプロテアーゼの基質であるアミノ酸配列を含む。

【0049】

いくつかの態様において、リンカーは、酸に不安定な基を含む。一般に、酸で開裂可能な連結基は、約6.5以下(たとえば、約6.5、6.0、5.5、5.0、4.5、4.0、3.5、3.0以下)のpHの酸性環境で、または一般的な酸として作用し得る酵素のような作用物質によって開裂可能である。

【0050】

いくつかの態様において、リンカーは、 $C(O)$ 、 $C(O)CH_2CH_2C(O)$ 、または $C(O)NH(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_2C(O)$ である。

【0051】

概して、組成物は、任意の量のコンジュゲートを含み得る。たとえば、組成物は、約1% ~ 約99% (w/w) のコンジュゲートを含むことができる。いくつかの態様において、組成物は、本明細書に開示される2つ以上の異なるコンジュゲートを含むことができる。さらに、異なるコンジュゲートは、任意の所望の比で存在することができる。たとえば、異なるコンジュゲートは、約100 : 1 ~ 1 : 100の範囲の比であることができる。

【0052】

コンジュゲートに加え、組成物(たとえば、コンジュゲートを含む粒子)は、1つもしくは複数の追加の脂質および/または他の成分、たとえばコレステロールをさらに含むことができる。いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、他の脂質は、脂質酸化を抑制する、二重層を安定化させる、形成時の凝集を低下させる、またはリガンドを粒子表面に結合するというような多種多様な目的のために組成物に含まれることができる。両親媒性、中性、陽イオン性、陰イオン性の脂質、ステロールおよびリン脂質を含むが、それらに限定されるわけではない、多数の脂質のいずれかが存在することができる。さらに、そのような脂質は、単独でまたは互いに任意に組み合わせられて使用されることができる。いくつかの態様において、組成物は、リポタンパク質粒子、たとえばHDLまたはLDLをさらに含む。組成物は、約1% ~ 約99% (w/w) の追加の脂質または成分を含むことができる。さらに、追加の脂質または成分は、コンジュゲートと10 : 1 ~ 1 : 10の比で存在することができる。2つ以上の異なる追加の脂質が組成物中に存在する場合、各脂質は、独立して、コンジュゲートと10 : 1 ~ 1 : 10の比であることができる。さらに、2つ以上の異なる追加の脂質が組成物中に存在する場合、2つの脂質は10 : 1 ~ 1 : 10の比であることができる。非限定的に、組成物の2つの異なる成分(コンジュゲートおよび脂質、または2つの異なる脂質)は、10 : 1 ~ 1 : 10、5 : 1 ~ 1 : 5、または2.5 : 1 ~ 1 : 2.5の比であることができる。いくつかの態様において、組成物中の2つの異なる成分は、約1 : 1、約1 : 1.2、約1 : 1.5、約1 : 1.7、約1 : 2、約1 : 2.5、約1 : 3、約1 : 3.5、約1 : 4、約1 : 4.5、約1 : 5、約1 : 5.5、約1 : 6、約1 : 6.5、約1 : 7、約1 : 7.5、約1 : 8、約1 : 8.5、約1 : 9、約1 : 9.5、または約1 : 10の比であることができる。組成物が2つより多い成分を含む場合、任意の2つの成分間の比は、任意の他の2つの成分間の比とは独立することができる。

【0053】

粒子組成物中に存在することができる追加の成分としては、二重層を安定化させる成分、たとえばポリアミドオリゴマー(たとえば、米国特許第6,320,017号を参照されたい)、ペプチド、タンパク質、洗剤、脂質誘導體、たとえばホスファチジルエタノールアミンにコンジュゲートされたPEG、ホスファチジン酸にコンジュゲートされたPEG、セラミドに

10

20

30

40

50

コンジュゲートされたPEG（米国特許第5,885,613号を参照されたい）、PEGでコンジュゲートされたジアルキルアミン、PEGでコンジュゲートされた1,2-ジアシルオキシプロパン-3-アミン、および1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DSPE）にコンジュゲートされたPEGを挙げることができる。いくつかの態様において、二重層を安定化させる成分は、DSPE-PEG2000である。

#### 【0054】

組成物はまた、形成時の電荷により誘発される凝集を抑制する粒子の立体安定化からもたらされることができる、形成時の粒子の凝集を低下させるように選択される成分を含むことができる。凝集を低下させる適切な成分としては、ポリエチレングリコール（PEG）で修飾された脂質（すなわち、PEGでコンジュゲートされた脂質）、モノシアロガングリオシドGm1およびポリアミドオリゴマー（「PAO」）（たとえば、米国特許第6,320,017号に記載される）が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。典型的な適切なPEG修飾脂質としては、PEGで修飾されたジアシルグリセロールおよびジアルキルグリセロール、PEGで修飾されたホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジン酸、PEG-セラミドコンジュゲート（たとえば、PEG-CerC14またはPEG-CerC20）、PEGで修飾されたジアルキルアミン、PEGで修飾された1,2-ジアシルオキシプロパン-3-アミン、ならびにPEGでコンジュゲートされたDSPE（たとえば、DSPE-PEG2000）が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。また、PEG、Gm1またはATTAのような、形成時の凝集を抑制する非荷電で親水性の立体障害部分を有する他の化合物を脂質にカップリングさせて、形成時の凝集を低下させることができる。ATTA-脂質は、たとえば、米国特許第6,320,017号に記載されており、PEG-脂質コンジュゲートは、たとえば、米国特許第5,820,873号、第5,534,499号および第5,885,613号に記載されている。典型的には、凝集を低下させるように選択される脂質成分の濃度は、約0.1~15%（脂質のモルパーセント）である。凝集を抑制する化合物は、適切に機能するために必ずしも脂質コンジュゲーションを必要としないことに留意すべきである。溶液中の遊離PEGまたは遊離ATTAは、凝集を抑制するのに十分であることができる。リポソームが形成後に安定である場合、PEGまたはATTAは、対象に投与する前に透析されることができる。

#### 【0055】

中性脂質は、組成物中に存在する場合、生理学的pHで非荷電形態または中性の両性イオン形態のいずれかで存在する多数の脂質種のいずれかであることができる。そのような脂質としては、ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、セラミド、スフィンゴミエリン、ジヒドロスフィンゴミエリン、セファリンおよびセレブロシドが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。本明細書に記載されるリポソーム中で使用するための中性脂質の選択は、概して、リポソームのサイズおよび血流中のリポソームの安定性等を考慮することによって導かれる。好ましくは、中性脂質成分は、2つのアシル基を有する脂質（すなわち、ジアシルホスファチジルコリンおよびジアシルホスファチジルエタノールアミン）である。様々な鎖長および飽和度の多種多様なアシル鎖群を有する脂質が利用可能であるか、または周知の技術によって単離または合成され得る。1つの群の態様において、 $C_6 \sim C_{22}$ （たとえば、 $C_6$ 、 $C_8$ 、 $C_{10}$ 、 $C_{12}$ 、 $C_{14}$ 、 $C_{16}$ 、 $C_{18}$ 、 $C_{22}$ または $C_{22}$ ）の範囲の炭素鎖長を有する飽和または不飽和脂肪酸を含有する脂質が好ましい。加えて、飽和脂肪酸鎖と不飽和脂肪酸鎖との混合鎖を有する脂質が使用されることができる。いくつかの態様において、中性脂質は、ホスファチジルコリン、DOPE、DSPC、POPC、DMPC、DPPCまたは任意の関連ホスファチジルコリンであることができる。本発明において有用な中性脂質はまた、スフィンゴミエリン、ジヒドロスフィンゴミエリン、またはセリンおよびイノシトールのような他の頭部基を有するリン脂質からなることができる。

#### 【0056】

組成物中に存在する場合、ステロール成分は、リポソーム、脂質小胞または脂質粒子の調製の分野において従来使用されるステロールのいずれかであることができる。好ましいステロールは、コレステロールである。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 7 】

組成物中に存在する場合、陽イオン性脂質は、ほぼ生理学的pHで正味の正電荷を帯びている多数の脂質種のいずれかであることができる。そのような脂質としては、N,N-ジオレイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロリド(「DODAC」); N-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル-N,N,N-トリエチルアンモニウムクロリド(「DOTMA」); N,N-ジステアリル-N,N-ジメチルアンモニウムブロミド(「DDAB」); N-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(「DOTAP」); 1,2-ジオレイルオキシ-3-トリメチルアミノプロパン塩化物塩(「DOTAP.Cl」); 3-(N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル)コレステロール(「DC-Chol」); N-(1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N-2-(スベルミンカルボキサミド)エチル)-N,N-ジメチルアンモニウムトリフルオロアセテート(「DOSPA」); ジオクタデシルアミドグリシルカルボキシルスベルミン(「DOGS」); 1,2-ジレオイル(dileoyl)-sn-3-ホスホエタノールアミン(「DOPE」); 1,2-ジオレイル-3-ジメチルアンモニウムプロパン(「DODAP」); N,N-ジメチル-2,3-ジオレイルオキシ)プロピルアミン(「DODMA」); N-(1,2-ジミリスチルオキシプロパ-3-イル)-N,N-ジメチル-N-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド(「DMRIE」); 5-カルボキシルスベルミルグリシンジオカオレイアミド(diocaoleyamide)(「DOGS」); およびジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン5-カルボキシルスベルミル-アミド(「DPPES」)が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。加えて、陽イオン性脂質の多数の市販の調製品、たとえば、LIPOFECTIN(GIBCO/BRLから入手可能なDOTMAおよびDOPEを含む)、およびLIPOFECTAMINE(GIBCO/BRLから入手可能なDOSPAおよびDOPEを含む)などが使用

10

20

30

## 【 0 0 5 8 】

組成物中に存在する場合、陰イオン性脂質は、ほぼ生理学的pHで正味の負電荷を帯びている多数の脂質種のいずれかであることができる。そのような脂質としては、ホスファチジルグリセロール、カルジオリピン、ジアシルホスファチジルセリン、ジアシルホスファチジン酸、N-ドデカノイルホスファチジルエタノールアミン、N-スクシニルホスファチジルエタノールアミン、N-グルタリルホスファチジルエタノールアミン、リシルホスファチジルグリセロール、および中性脂質に結合された他の陰イオン修飾基が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

40

## 【 0 0 5 9 】

本明細書において使用される場合、用語「両親媒性脂質」は、脂質物質の疎水性部分が疎水相に指向し、一方で、親水性部分が水相に指向する、任意の適切な物質を指す。そのような化合物としては、リン脂質、アミノ脂質およびスフィンゴ脂質が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

## 【 0 0 6 0 】

いくつかの態様において、組成物は、リン脂質をさらに含む。リン脂質は、天然起源のリン脂質、たとえば卵黄リン脂質もしくは大豆リン脂質、または合成もしくは半合成起源のリン脂質であることができるが、それらに限定されるわけではない。リン脂質は、ホスファチジルコリン、6~22個の炭素原子を有する規定のアシル基を持つホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジリンノシトール、ホスファチジン酸、ホスファチジルセリン、スフィンゴミエリンまたはホスファチジルグリセロールの純粋な分画または混合物を含むように、部分的に精製または分画されることができる。適切なリン脂質としては、ホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール、レシチン、 $\alpha$ -ジパルミトイル- $\alpha$ -レシチン、スフィンゴミエリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、N-(2,3-ジ(9-(Z)-オクタデセニルオキシ))-プロパ-1-イル-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド、ホスファチジルエタノールアミン、リゾレシチン、リゾホ

50

スファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、セファリン、カルジオリピン、セレブロシド、ジセチルホスフェート、ジオレオイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール、ジオレオイルホスファチジルグリセロール、パルミトイル-オレオイル-ホスファチジルコリン、ジ-ステアロイル-ホスファチジルコリン、ステアロイル-パルミトイル-ホスファチジルコリン、ジ-パルミトイル-ホスファチジルエタノールアミン、ジ-ステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン、ジ-ミリストイル-ホスファチジルセリン、ジ-オレイル-ホスファチジルコリン、ジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE)、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン (POPC)、卵ホスファチジルコリン (EPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)、ジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール (DOPG)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール (DPPG)、-ホスファチジルエタノールアミン (POPE)、ジオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシレート (DOPE-mal) 等が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。また、リン不含脂質も使用されることができる。これらは、たとえば、ステアリルアミン、ドデシルアミン、パルミチン酸アセチル、脂肪酸アミド等を含む。また、他のリン欠乏化合物、たとえば、スフィンゴ脂質、スフィンゴ糖脂質ファミリー、ジアシルグリセロールおよび -アシルオキシ酸も使用されることができる。

10

20

30

40

50

#### 【0061】

また、プログラム可能な融合脂質も、本明細書に記載される組成物中への封入に適する。プログラム可能な融合脂質を含有する粒子は、細胞膜と融合する傾向がほとんどなく、所与のシグナル事象が起こるまでそれらのペイロードを送達する。これによって、組成物が生物体または疾患部位へ投与された後、組成物が細胞と融合する前により均一に分布することが可能になる。シグナル事象は、たとえば、pH、温度、イオン環境または時間の变化であることができる。後者の場合、融合遅延または「クローキング」成分、たとえばATTA-脂質コンジュゲートまたはPEG-脂質コンジュゲートは、経時的に粒子膜の中から外へ簡単に交換されることができる。粒子が体内に適切に分布される頃には、子は融合性となるように十分なクローキング剤を失っている。他のシグナル事象では、疾患部位または標的細胞に関連したシグナル、たとえば腫瘍部位でのより低いpHを選択することが望ましい。

#### 【0062】

1つまたは複数の補助的な界面活性剤が、たとえば、両親媒性作用物質の特性決定のための、または粒子安定化能を改善するもしくは可溶化の改善を可能にするための補助物質として組成物に加えられることができる。そのような補助剤は、薬学的に許容される非イオン性界面活性剤であることができ、それは好ましくは、1つまたは複数のヒドロキシ基を含有する有機化合物のアルキレンオキシド誘導体である。たとえば、エトキシ化および/もしくはプロポキシ化されたアルコールまたはエステル化合物、またはそれらの混合物が一般に入手可能であり、そのような補助物質として当業者に周知である。そのような化合物の例は、ソルビトールと脂肪酸のエステル、たとえばモノパルミチン酸ソルビタンまたはモノパルミチン酸ソルビタン、油性スクロースエステル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビトール脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンステロールエーテル、ポリオキシエチレン-ポリプロポキシアルキルエーテル、ブロック重合体およびセチルエーテル (cetyl ether)、ならびにポリオキシエチレンヒマシ油または硬化ヒマシ油の誘導体およびポリグリセリン脂肪酸エステルである。適切な非イオン性界面活性剤としては、様々な等級のPLURONIC (登録商標)、POLOXAMER (登録商標)、SPAN (登録商標)、TWEEN (登録商標)、POLYSORBATE (登録商標)、TYLOXAPOL (登録商標)、EMULPHOR (登録商標) またはCREMOPHOR (登録商標) 等が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。補助的な界面活性剤はまた、イオン性の界面活性剤、たとえば胆管

物質、コール酸またはデオキシコール酸、それらの塩および誘導体または遊離脂肪酸（たとえば、オレイン酸、リノール酸）等であることができる。他のイオン性界面活性剤は、中でもC<sub>6</sub>-C<sub>24</sub>アルキルアミンまたはアルカノールアミンのような陽イオン性脂質および陽イオン性コレステロールエステルに見いだされる。

【0063】

いくつかの態様において、組成物は、PEGでコンジュゲートされた脂質、およびリン脂質を含む。

【0064】

組成物はまた、標的部分、たとえば、細胞タイプまたは組織に特異的である標的部分を含み得ることができる。標的部分はまた、本明細書において、標的リガンドまたは標的作用物質とも呼ばれる。標的化のために、ポリエチレングリコール（PEG）鎖のような親水性ポリマー鎖の表面コーティングを有する粒子の標的化が提案されている（Allen, et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1237: 99-108 (1995); DeFrees, et al., *Journal of the American Chemistry Society* 118: 6101-6104 (1996); Blume, et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1149: 180-184 (1993); Klivanov, et al., *Journal of Liposome Research* 2: 321-334 (1992); 米国特許第5,013556号; Zalipsky, *Bioconjugate Chemistry* 4: 296-299 (1993); Zalipsky, *FEBS Letters* 353: 71-74 (1994); Zalipsky, in *Stealth Liposomes Chapter 9* (Lasic and Martin, Eds) CRC Press, Boca Raton FL (1995)。リガンド、細胞表面受容体、糖タンパク質、ビタミン（たとえば、リボフラビン）、アプタマーおよびモノクローナル抗体等の他の標的部分も使用されることができる。標的部分は、タンパク質全体またはその断片を含むことができる。標的化メカニズムは、一般に、標的部分が標的、たとえば細胞表面受容体との相互作用に利用可能であるように、標的作用物質がリポソームの表面に位置付けられる必要がある。

【0065】

1つのアプローチとして、標的部分、たとえば受容体結合リガンドが、組成物の成分（たとえば、脂質）に連結されることができる。いくつかの態様において、リガンドは、PEGでコンジュゲートされることができる。多種多様な異なる標的作用物質および方法が当技術分野において公知でかつ利用可能であり、たとえば、Sapra, P. and Allen, TM, *Prog. Lipid Res.* 42(5):439-62 (2003); and Abra, RM et al., *J. Liposome Res.* 12:1-3, (2002) に記載されているものを含む。標的部分でコンジュゲートされた他の脂質は、米国特許出願公報第US2009/0247608号および第US2012/0046478号（その両方の内容は、参照によってその全体が本明細書に組み入れられる）に記載されている。

【0066】

非限定的に、リガンドは、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、酵素、ペプチド模倣体、糖タンパク質、抗体（モノクローナルまたはポリクローナル）ならびにそれらの一部および断片、レクチン、ヌクレオシド、ヌクレオチド、ヌクレオシドおよびヌクレオチド類似体、核酸、単糖、二糖、三糖、オリゴ糖、多糖、リポ多糖、ビタミン、ステロイド、ホルモン、補因子、受容体、受容体リガンド、ならびにそれらの類似体および誘導体からなる群より選択されることができる。

【0067】

いくつかの態様において、標的リガンドは、ポリリシン（PLL）、ポリL-アスパラギン酸、ポリL-グルタミン酸、スチレン-マレイン酸無水物共重合体、ポリ(L-ラクチド-co-グリコリド)共重合体、ジビニルエーテル-マレイン酸無水物共重合体、N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド共重合体（HMPA）、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリビニルアルコール（PVA）、ポリウレタン、ポリ(2-エチルアクリル酸)、N-イソプロピルアクリルアミドポリマー、ポリホスファジン、ポリエチレンイミン、スペルミン（csperrmine）、スペルミジン、ポリアミン、擬ペプチド-ポリアミン、ペプチド模倣ポリアミン、デンドリマーポリアミン、アルギニン、アミジン、プロタミン、チロトロピン、メラノトロピン、レクチン、界面活性剤タンパク質A、ムチン、トランスフェリン、ビスホスホネート、ポリグルタミン酸塩、ポリアスパラギン酸塩、アプタマー、アシアロフェツイン、ヒ

10

20

30

40

50



アルロナン、プロコラーゲン、インスリン、トランスフェリン、アルブミン、アクリジン、クロス-ソラレン (cross-psoralen)、マイトマイシンC、TPPC4、テキサフィリン、サフィリン、多環式芳香族炭化水素 (たとえば、フェナジン、ジヒドロフェナジン)、胆汁酸、コレステロール、コール酸、アダマンタン酢酸、1-ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、1,3-ビス-0 (ヘキサデシル) グリセロール、ゲラニルオキシヘキシル基、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メントール、1,3-プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ミリスチン酸、03- (オレオイル) リトコール酸、03- (オレオイル) コレン酸、ジメトキシトリチルまたはフェノキサジン)、RGDペプチド、放射性標識マーカー、ハプテン、ナプロキセン、アスピリン、ジニトロフェニル、HRP、AP、レクチン、ビタミンA、ビタミンE、ビタミンK、ビタミンB、葉酸、B12、リボフラビン、ビオチン、ピリドキサル、タクソン (taxon)、ピンクリスチン、ピンブラスチン、サイトカラシン、ノコダゾール、ジャブラキノリド (japlakinolide)、ラトランクリンA、ファロイジン、スウィンホリドA、インダノシン、ミオセルビン (mysoservin)、腫瘍壊死因子 (TNF)、インターロイキン-1、インターフェロン、GalNAc、ガラクトース、マンノース、マンノース-6P、糖のクラスター、たとえばGalNAcクラスター、マンノースクラスター、ガラクトースクラスター、アプタマー、インテグリン受容体リガンド、ケモカイン受容体リガンド、セロトニン受容体リガンド、PSMA、エンドセリン、GCP11、ソマトスタチン、細胞接着分子 (CAM) およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されることができる。

10

#### 【0068】

20

標的作用物質は、たとえば正常細胞と比較した癌細胞のように、他の細胞タイプよりも速い速度で特異的な細胞タイプ (複数) に結合および/またはそれに浸透することができる。標的作用物質は、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、ペプチド模倣体、糖タンパク質、レクチン、ヌクレオシド、ヌクレオチド、核酸、単糖、二糖、三糖、オリゴ糖、多糖、リポ多糖、ビタミン、ステロイド、ホルモン、補因子、受容体、受容体リガンド、抗体、抗体の抗原結合断片、ならびにそれらの類似体および誘導体からなる群より選択されることができる。癌細胞の膜に優先的に結合および/または交差する標的作用物質は、当技術分野において公知であり、たとえば、iRGD、RGD、Lyp-1ペプチド (CGNKRTRGC; 配列番号: 3)、NGRペプチド、iNGR、RGRペプチド、CARペプチド、tCARペプチド (CARSKNK; 配列番号: 2); FSH-33、アラトスタチン1、ペンタペプチドCREKA (配列番号: 4)、肝細胞癌標的化ペプチド、ペプチドGFE、抗EGFR抗体および/または抗体断片、特に、セツキシマブ、CendR、iRGDペプチド (RGD-CendRハイブリッドペプチド)、たとえばCEA、ガストリン放出ペプチド受容体、ソマトスタチン受容体、ガラニン受容体、卵胞刺激ホルモン受容体、p32タンパク質、線維芽細胞増殖因子受容体、HepG2、上皮成長因子受容体、インテグリン、6、ニューロピリン-1受容体およびVEGF受容体ならびにそれらの変異体または組み合わせのような癌特異的エピトープに結合する、小分子、抗体および/または抗体断片である。いくつかの態様において、標的作用物質は、iRGD、たとえばCRGDKGPDC (配列番号: 1) の配列を有するペプチドであることができる。

30

#### 【0069】

標的作用物質は、たとえば、本明細書に記載されるナノ粒子の表面に存在することができる、かつ/または本明細書に記載されるナノ粒子の膜または脂質層中に部分的に埋め込まれることができる。標的作用物質を組み込む方法は、当技術分野において公知であり、非限定的な例を本明細書の他の場所に記載する。いくつかの態様において、本明細書に記載される組成物は、2つ以上の標的作用物質を含みむことができるが、たとえば、組成物は、各々が異なる標的作用物質を含むナノ粒子の組み合わせを含むことができ、かつ/または、組成物は、各々が複数の標的作用物質を含むナノ粒子を含むことができる。いくつかの態様において、本明細書に記載される組成物は、1つの標的作用物質、2つの標的作用物質、3つの標的作用物質、またはそれより多くの標的作用物質を含むことができる。

40

#### 【0070】

コンジュゲートを含む組成物は、粒子の形態であることができる。一般に、粒子は、任

50

意の形状または形態、たとえば、球状、棒状、楕円状、円筒状、カプセル状または円盤状の粒子であることができ；これらの粒子は、網状組織または凝集体の一部であることができる。いくつかの態様において、粒子は、微粒子またはナノ粒子である。本明細書において使用される場合、用語「微粒子」は、約1 $\mu\text{m}$ ～約1000 $\mu\text{m}$ の粒子サイズを有する粒子を指す。本明細書において使用される場合、用語「ナノ粒子」は、約0.1nm～約1000nmの粒子サイズを有する粒子を指す。本明細書において使用される場合、用語「粒子」は、リポソーム、エマルション、小胞および脂質粒子を包含する。非限定的に、粒子は、ナノメートル～ミリメートルの任意のサイズを有し得る。

#### 【0071】

概して、本明細書に開示される粒子はナノ粒子であり、かつ約5nm～約500nmの平均直径を有する。いくつかの態様において、粒子は、約75nm～約500nm、約25nm～約250nm、約50nm～約150nm、約75nm～約125nm、約50nm～約500nm、約75nm～約200nm、約100～約175nm、約125nm～約175nm、約40nm～約90nm、または約50nm～約80nmの平均直径を有する。

#### 【0072】

いくつかの態様において、ナノ粒子は、約1 $\mu\text{m}$ 未満の直径、たとえば、約1 $\mu\text{m}$ 以下の直径、約500nm以下の直径、約400nm以下の直径、約300nm以下の直径、約200nm以下の直径、約100nm以下の直径、約50nm以下の直径、または約10nm以下の直径であることができる。いくつかの態様において、ナノ粒子は、1 $\mu\text{m}$ 未満の直径、たとえば、1 $\mu\text{m}$ 以下の直径、500nm以下の直径、400nm以下の直径、300nm以下の直径、200nm以下の直径、100nm以下の直径、50nm以下の直径、または10nm以下の直径であることができる。いくつかの態様において、組成物中のナノ粒子は、約1nm～約1 $\mu\text{m}$ の直径、たとえば、約1nm～約500nmの直径、約1nm～約200nmの直径、約10nm～約200nmの直径、約100nm～約200nmの直径、または約10nm～約100nmの直径であることができる。いくつかの態様において、組成物中のナノ粒子は、1nm～1 $\mu\text{m}$ の直径、たとえば、1nm～500nmの直径、1nm～200nmの直径、10nm～200nmの直径、100nm～200nmの直径、または10nm～100nmの直径であることができる。

#### 【0073】

いくつかの態様において、ナノ粒子は、特異的なサイズ、たとえば約200nm未満の直径のナノ粒子であるように選択されることができる。特定のサイズおよび/またはサイズ範囲のナノ粒子を選択する方法は、当技術分野において公知であり、非限定的な例として、濾過、沈降、遠心分離および/またはクロマトグラフ法、たとえばSECを含むことができる。

#### 【0074】

当業者であれば、粒子は、通常、表示された「サイズ」の周囲の粒子サイズの分布を示すことを理解するだろう。特に指示のない限り、用語「粒子サイズ」は、本明細書において使用される場合、粒子のサイズ分布の様式、すなわち、サイズ分布において最も高い頻度で生じる値を指す。粒子サイズを測定するための方法は当業者に公知であり、たとえば、動的光散乱（たとえば、光子相関分光法、レーザー回折、低角レーザー光散乱（LALLS）および中角レーザー光散乱（MALLS））、光遮蔽法（たとえば、Coulter分析法）、または他の技術（たとえば、レオロジーおよび光学または電子顕微鏡）による。

#### 【0075】

いくつかの態様において、粒子は、実質的に球状であることができる。「実質的に球状」が意味することは、粒子断面の最短の垂直軸に対する最長の垂直軸の長さの比が、約1.5以下であることである。実質的に球状は、対称線を必要としない。さらに、粒子は、粒子のサイズ全体に対して小規模の線または窪みまたは突起等の表面テクスチャリングを有することができるが、依然として実質的に球状であることができる。いくつかの態様において、粒子の最長の軸と最短の軸の間の長さの比は、約1.5以下、約1.45以下、約1.4以下、約1.35以下、約1.30以下、約1.25以下、約1.20以下、約1.15以下、約1.1以下である。いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、表面接触は、実質的に球状である粒子において最小であり、保存時の望ましくない粒子の凝集を最小限に抑える。多くの結晶またはフレークは、凝集がイオン性または非イオン性の相互作用によって起こること

10

20

30

40

50

ができ、広い表面の接触面積を可能にすることができる平面を有する。球体は、非常に小さい面積に対する接触を可能にする。

【0076】

粒子は、たとえば、単分散性または多分散性であることができ、所与の分散の粒子の直径の変動率は変動することができる。いくつかの態様において、粒子は、実質的に同じ粒子サイズを有する。相対的に大きい粒子と相対的に小さい粒子の両方が存在する広範なサイズ分布を有する粒子は、より小さい粒子がより大きい粒子間の隙間を埋めることで、新たな接触面を形成することを可能にする。広範なサイズ分布は、凝集物に結合する多くの接触機会を生み出すことによってより大きな球体を生じることができる。本明細書に記載される粒子は、狭いサイズ分布内にあり、それによって凝集物と接触する機会が最小限に抑えられる。「狭いサイズ分布」が意味することは、小さい球状粒子の10パーセントの体積粒径に対する90パーセントの体積粒径の比が5以下である粒子サイズ分布である。いくつかの態様において、小さい球状粒子の10パーセントの体積粒径に対する90パーセントの体積粒径は、4.5以下、4以下、3.5以下、3以下、2.5以下、2以下、1.5以下、1.45以下、1.40以下、1.35以下、1.3以下、1.25以下、1.20以下、1.15以下、または1.1以下である。

10

【0077】

また、狭いサイズ分布を示すために幾何標準偏差 (GSD) も使用されることができる。GSDの計算は、15.9%未満および84.1%未満のパーセンテージの累積率における有効カットオフ径 (ECD) を決定することを含む。GSDは、15.9%未満のECDに対する84.17%未満のECDの比の平方根に等しい。GSDは、GSD < 2.5である場合に狭いサイズ分布を有する。いくつかの態様において、GSDは、2未満、1.75未満または1.5未満である。1つの態様において、GSDは、1.8未満である。

20

【0078】

いくつかの態様において、組成物は、リポソームの形態である。本明細書において使用される場合、用語「リポソーム」は、脂質層によって内包される任意の区画を包含する。リポソームは、1つまたは複数の脂質膜を有することができる。リポソームは、膜のタイプおよびサイズによって特徴付けられることができる。小さい単一ラメラ小胞 (SUV) は単一の膜を有し、典型的には0.02 ~ 0.05  $\mu\text{m}$ の直径範囲にあり；大きい単一ラメラ小胞 (LUV) は、典型的には0.05  $\mu\text{m}$ より大きい。オリゴラメラ状の大きい小胞およびマルチラメラ状の小胞は、複数の通常は同心円状の膜層を有し、典型的には0.1  $\mu\text{m}$ より大きい。いくつかの非同心的膜を有するリポソーム、すなわち、より大きい小胞内に含有されるいくつかのより小さい小胞は、多胞体小胞と呼ばれる。

30

【0079】

リポソームを形成するために、脂質分子は、伸長された非極性 (疎水性) 部分および極性 (親水性) 部分を含む。分子の疎水性部分および親水性部分は、好ましくは、伸長された分子構造の両端に位置付けられる。そのような脂質が水中に分散される場合、これらは自然にラメラと呼ばれる二重層膜を形成する。ラメラは、脂質分子の2つの単層シートからなり、それらの非極性 (疎水性) 表面は互いに向かい合っており、それらの極性 (親水性) 表面は水性媒体に対面している。脂質によって形成される膜は、細胞膜が細胞の内容物を内包するのと同様に、水相の一部を内包する。したがって、リポソームの二重層は、細胞膜と類似するが、細胞膜中にタンパク質成分は存在しない。

40

【0080】

リポソーム組成物は、当技術分野において公知である多種多様な方法によって調製されることができる。たとえば、米国特許第4,235,871号、第4,897,355号および第5,171,678号；PCT出願公報国際公開公報第96/14057号および国際公開公報第96/37194号；Felgner, P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA (1987) 8:7413-7417, Bangham, et al. M. Mol. Biol. (1965) 23:238, Olson, et al. Biochim. Biophys. Acta (1979) 557:9, Szoka, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (1978) 75: 4194, Mayhew, et al. Biochim. Biophys. Acta (1984) 775:169, Kim, et al. Biochim. Biophys. Acta (1983) 728:339, and

50

Fukunaga, et al. *Endocrinol.* (1984) 115:757 (その全ての内容は、参照によってその全体が本明細書に組み入れられる)を参照されたい。

【0081】

リポソームは、選択されたサイズ範囲で実質的に均等なサイズを有するように調製されることができる。1つの有効なサイズ決定法は、リポソームの水性懸濁液を選択した均一な孔サイズを有する一連のポリカーボネート膜に通して押出すことを含み；膜の孔サイズは、膜に通して押出すことによって生成されたりリポソームの最大サイズにほぼ相当する。たとえば、米国特許第4,737,323号(その内容は、参照によってその全体が本明細書に組み入れられる)を参照されたい。

【0082】

本明細書に記載される組成物はまた、エマルションの形態であることができる。エマルションは、典型的には、ある液体が別の液体中に液滴の形態で分散された不均一系である (Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199; Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volume 1, p. 245; Block in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 2, p. 335; Higuchi et al., in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301)。エマルションは、多くの場合、密接に混合され互いに分散された2つの非混和性の液相を含む二相系である。一般に、エマルションは、油中水(w/o)型または水中油(o/w)型のいずれかのエマルションであり得る。水相が大量の油相中に微粒化されかつ微小な液滴として分散された場合、生じた組成物は油中水(w/o)エマルションと呼ばれる。あるいは、油相が大量の水相中に微粒化されかつ微小な液滴として分散された場合、生じた組成物は水中油(o/w)エマルションと呼ばれる。エマルションは、分散された相に加え追加の成分を含有することができ、本明細書に開示されるコンジュゲートは、水相中もしくは油相中のいずれかに溶液として、またはそれ自体別々の相として存在することができる。また、乳化剤、安定剤、染料および抗酸化剤のような薬学的賦形剤も必要に応じてエマルション中に存在することができる。薬学的エマルションはまた、たとえば、油中水中油(o/w/o)および水中油中水(w/o/w)エマルションの場合のように、2つより多い相からなる多相エマルションであることができる。そのような複合製剤は、多くの場合、単純な二成分エマルションには無いある種の利点を提供する。o/wエマルションの個々の油滴が小さい水滴を内包する多相エマルションは、w/o/wエマルションを構成する。同様に、連続した油相中に安定化された水球中に内包された油滴の系は、o/w/oエマルションを提供する。

【0083】

エマルションは、熱力学的安定性がほとんどないか全くないことによって特徴付けられる。多くの場合、エマルションの分散相または不連続相は、外部相または連続相中によく分散されており、乳化剤の手段または製剤の粘性によってこの形態が維持される。エマルション型の軟膏基剤およびクリーム剤の場合のように、エマルションの相のいずれかは半固体または固体であり得る。エマルションを安定化させる他の手段は、エマルションのいずれかの相に組み込まれ得る乳化剤の使用を必要とする。乳化剤は、大きく4つのカテゴリー：合成界面活性剤、天然の乳化剤、吸収基剤および微細分散固体に分類されることができる (Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199)。

【0084】

界面活性剤としても知られる合成界面活性剤は、エマルションの製剤化において広範な適用性が見いだされており、文献に概説されている (Rieger, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volume 1, p. 19

10

20

30

40

50

9)。界面活性剤は、典型的には両親媒性であり、かつ親水性部分および疎水性部分を含む。界面活性剤の親水性と疎水性の比は、親水性/親油性バランス(HLB)と呼ばれており、かつ製剤の調製において界面活性剤を分類および選択する際の有益なツールである。界面活性剤は、親水性基の性質に基づいて以下の異なるクラス：非イオン性、陰イオン性、陽イオン性および両性に分類されることができる(Rieger, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285)。

【0085】

エマルション製剤中に使用される天然の乳化剤は、ラノリン、蜜蝋、ホスファチド、レシチンおよびアラビアゴムを含む。無水ラノリンおよび親水性ワセリンのような吸収基剤は、これらが水を取り込んでw/oエマルションを形成してもそれらの半固体を一貫して保持できるような親水性を持つ。また、微粉化固体も、とりわけ界面活性剤との組み合わせおよび粘性調製物において、良好な乳化剤として使用されている。これらは、極性無機固体(たとえば、重金属水酸化物)、非膨潤クレイ(たとえば、ベントナイト、アタパルガイト、ヘクトライト、カオリン、モンモリロナイト、コロイド状ケイ酸アルミニウムおよびコロイド状ケイ酸アルミニウムマグネシウム)、顔料および非極性固体(たとえば、炭素またはトリストアリン酸グリセリル)を含む。

10

【0086】

また、多種多様な非乳化材料もエマルション製剤に含まれ、エマルションの特性に寄与することができる。これらには、脂肪、油、蝋、脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪エステル、保湿剤、親水性コロイド、防腐剤および抗酸化剤が挙げられるが、それらに限定されるわけではない(Block, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199)。

20

【0087】

親水性コロイドまたはハイドロコロイドは、天然のゴムおよび合成ポリマー、たとえば、多糖(たとえば、アラビアゴム、寒天、アルギン酸、カラギーナン、グアーガム、カラヤゴムおよびトラガカント)、セルロース誘導体(たとえば、カルボキシメチルセルロースおよびカルボキシプロピルセルロース)、および合成ポリマー(たとえば、カルボマー、セルロースエーテルおよびカルボキシビニルポリマー)を含む。これらは、水中で分散または膨潤してコロイド溶液を形成し、これが、分散相の液滴の周囲に強い界面膜を形成することによっておよび外部相の粘性を増加させることによって、エマルションを安定化させる。

30

【0088】

エマルションは、多くの場合、微生物の成長を容易に援助し得る、糖質、タンパク質、ステロールおよびホスファチドのような多数の成分を含有するため、これらの製剤には多くの場合、防腐剤が取り込まれる。エマルション製剤中に含まれる通常使用される防腐剤は、メチルパラベン、プロピルパラベン、第四級アンモニウム塩、塩化ベンザルコニウム、p-ヒドロキシ安息香酸のエステルおよびホウ酸を含む。また、製剤の劣化を防止するために、通常、エマルション製剤に抗酸化剤も加えられる。使用される抗酸化剤は、フリーラジカル捕捉剤(たとえば、トコフェロール、没食子酸アルキル、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン)、または還元剤(たとえば、アスコルビン酸およびメタ亜硫酸ナトリウム)、および抗酸化共力剤(たとえば、クエン酸、酒石酸およびレシチン)であることができる。

40

【0089】

エマルション製剤の皮膚、経口および非経口経路を介する適用、ならびにそれらの製造方法は、文献に概説されている(Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199)。経口送達用のエマルション製剤は、製剤化が容易であることならびに吸収およ

50

びバイオアベイラビリティの観点から有効であるため、非常に幅広く使用されている (Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199)。

#### 【0090】

いくつかの態様において、本明細書に記載される組成物は、本明細書に開示される2つ以上のコンジュゲートを含むことができる。たとえば、組成物は、式I、II、IIIおよびIVのコンジュゲートから選択される、2つ以上のコンジュゲートを含むことができる。いくつかの態様において、組成物は、式Iのコンジュゲートおよび式IIのコンジュゲート、式Iのコンジュゲートおよび式IIIのコンジュゲート、式Iのコンジュゲートおよび式IVのコンジュゲート、式IIのコンジュゲートおよび式IIIのコンジュゲート、式IIのコンジュゲートおよび式IVのコンジュゲート、または式IIIのコンジュゲートおよび式IVのコンジュゲートを含み得る。いくつかの態様において、2つ以上のコンジュゲートは、同じナノ粒子上に存在することができ、たとえば、単一のナノ粒子は、2つ以上のタイプのコンジュゲートを含むことができる。いくつかの態様において、組成物は、各々異なるコンジュゲート(2つ以上のコンジュゲートの異なる組み)を含む複数の種類のナノ粒子を含むことができる。いくつかの態様において、組成物は、本明細書に記載される2つ以上のコンジュゲート、たとえば、2つのコンジュゲート、3つのコンジュゲート、4つのコンジュゲート、またはそれより多くのコンジュゲートを含むことができる。いくつかの態様において、該2つ以上のコンジュゲートは、2つ以上の種類の化学療法剤、たとえば、PI3K阻害剤および白金酸塩; PI3K阻害剤およびタキサン; 白金酸塩およびタキサン; ならびに/またはPI3K阻害剤、タキサンおよび白金酸塩を含む。

#### 【0091】

いくつかの態様において、本明細書に記載される方法は、癌を有するまたは癌を有すると診断された対象を処置することに関する。癌を有する対象は、現行の癌診断法を使用して医師によって特定されることができる。これらの状態を特徴付けかつ診断の助けとなる癌の症状および/または合併症は、当技術分野において周知であり、腫瘍の成長、癌細胞を内部に持つ臓器または組織の機能障害等が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。たとえば癌の診断の助けとなり得る試験としては、組織生検および組織学的検査が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。また、癌の家族歴または癌の危険因子(たとえば、煙草製品、放射線等)への曝露も、対象が癌を有する可能性が高いかを決定する際のまたは癌の診断を行う際の助けとなることができる。

#### 【0092】

癌としては、腺癌、リンパ腫、芽細胞腫、黒色腫、肉腫、白血病、扁平上皮細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、消化管癌、ホジキンおよび非ホジキンリンパ腫、膵臓癌、膠芽腫、基底細胞癌、胆道癌、膀胱癌、脳腫瘍(膠芽腫および髄芽腫を含む); 乳癌、子宮頸癌、絨毛腫; 結腸癌、大腸癌、子宮内膜癌、子宮内膜癌; 食道癌、胃癌; 様々なタイプの頭頸部癌、上皮内新生物(ポーエン病およびパジェット病を含む); 血液学的新生物(急性リンパ性白血病および骨髄性白血病を含む); カボジ肉腫、ヘアリー細胞白血病; 慢性骨髄性白血病、AIDS関連白血病および成人T細胞白血病リンパ腫; 腎臓癌、たとえば腎細胞癌、T細胞性急性リンパ芽球性白血病/リンパ腫、リンパ腫(ホジキン病およびリンパ球性リンパ腫を含む); 肝臓癌、たとえば肝細胞癌(hepatic carcinoma)およびヘパトーマ(hepatoma)、メルケル細胞腫、黒色腫、多発性骨髄腫; 神経芽細胞腫; 口腔癌(扁平上皮細胞腫を含む); 卵巣癌(上皮細胞から生じるものを含む)、肉腫(平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、脂肪肉腫、線維肉腫および骨肉腫を含む); 膵臓癌; 皮膚癌(黒色腫、間質細胞、生殖細胞および間葉細胞を含む); 前立腺癌、直腸癌; 外陰部癌、腎臓癌(腺癌を含む); 精巣癌(胚性(germinal)腫瘍、たとえば精上皮腫、非精上皮腫(奇形腫、絨毛腫)、間質性腫瘍および生殖細胞腫瘍を含む); 甲状腺癌(甲状腺腺癌および髄様癌を含む); 食道癌、唾液腺癌ならびにウィルムス腫瘍を含む、癌腫を挙げることができるが、

それらに限定されるわけではない。

【0093】

いくつかの態様において、本明細書に記載される方法は、異常なPI3Kシグナル伝達を伴う癌を有すると判定された対象を処置することに関することができる。異常なPI3Kシグナル伝達は、基準レベル、たとえば対象の非癌性細胞におけるレベルまたは健康な対象の集団におけるレベルに対して、増加または減少したシグナル伝達であり得る。PI3Kシグナル伝達レベルは、本明細書の他の場所に記載するように、PI3Kの活性のレベルを直接的または間接的に検査することによって（たとえば、下流分子のレベルおよび/または活性を測定することによって）決定されることができる。いくつかの態様において、異常なPI3Kシグナル伝達を伴う癌は、PTENのレベルの減少、PIK3CAのレベルおよび/または活性の増加、チロシン受容体キナーゼ、AKTまたはRASの突然変異および/またはレベルもしくは活性の増加、および/またはPI3K経路メンバー（たとえば、AKT、S6、4EBP1およびmTOR）のリン酸化の増加を伴う癌であることができる。いくつかの態様において、異常なPI3Kシグナル伝達を伴う癌を有する対象は、耐糖能が低下した対象であることができる。

10

【0094】

本明細書に記載の組成物および方法は、癌を有するまたは癌を有すると診断された対象に投与されることができる。いくつかの態様において、本明細書に記載される方法は、癌の症状を緩和するために、有効量の本明細書に記載される組成物を対象に投与することを含む。本明細書において使用される場合、「癌の症状を緩和する」とは、癌に関連する任意の状態または症状を改善することである。等価な未処置対照と比較した場合、そのような低下は、任意の標準技術によって測定したところ、少なくとも5%、10%、20%、40%、50%、60%、80%、90%、95%、99%またはそれより多い。本明細書に記載される組成物を対象に投与するための多種多様な手段が当業者に公知である。そのような方法としては、経口、非経口、静脈内、筋肉内、皮下、経皮、気道（エアロゾル）、肺内、皮膚、局所、注射または腫瘍内投与を挙げることができるが、それらに限定されるわけではない。投与は、局部または全身であることができる。

20

【0095】

いくつかの態様において、本明細書に記載される組成物（たとえば、PI3K阻害剤を含む組成物）は、血糖値の減少を必要とする対象に投与されることができる。本明細書の実施例において実証するように、PI3K阻害剤を含む組成物は、血糖の減少を誘導することができる。したがって、本明細書において、それを必要とする対象において血糖を低下させる方法、たとえば、耐糖能を改善する方法を記載する。血糖値の減少を必要とする対象は、異常なPI3Kシグナル伝達を伴う癌を有する対象、またはそうでなければ高血糖を有すると診断された対象、たとえば糖尿病または代謝症候群を患う対象であることができる。

30

【0096】

用語「有効量」は、本明細書において使用される場合、疾患または障害の少なくとも1つまたは複数の症状を緩和するために必要な本明細書に記載される組成物の量を指し、かつ所望の効果を提供するのに十分な薬理的組成物の量に関する。そのため、用語「治療有効量」は、典型的な対象に投与した場合に、特定の抗腫瘍効果を提供するのに十分な本明細書に記載される組成物の量を指す。本明細書において使用される場合の有効量はまた、様々な状況において、疾患の症状の発生を遅延させる、疾患の症状の経過を変化させる（たとえば、非限定的に、疾患の症状の進行を遅らせる）、または疾患の症状を回復させるのに十分な量も含む。したがって、一般に、正確な「有効量」を特定することは不可能である。しかしながら、いかなる場合であっても、当業者であれば、ルーチン実験のみを使用して適当な「有効量」を決定することができる。

40

【0097】

有効量、毒性および治療有効性は、たとえば、LD50（集団の50%を致死させる用量）およびED50（集団の50%において治療上有効な用量）を決定するために、細胞培養物または実験動物において標準的な薬学的手順によって決定されることができる。用量は、用いられる剤形および利用される投与経路に応じて変化することができる。毒性効果と治療効果

50

との間の用量比は治療指数であり、LD50/ED50の比で表されることができる。大きな治療指数を示す組成物および方法が好ましい。治療有効用量は、最初に細胞培養アッセイから推定されることができる。また、用量は、細胞培養物または適当な動物モデルにおいて決定されるIC50（すなわち、症状の半最大阻害を達成する本明細書に記載される組成物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成するように、動物モデルにおいて処方されることができる。血漿中レベルは、たとえば、高速液体クロマトグラフィーによって測定されることができる。任意の特定の投与量の効果は、適切なバイオアッセイ、たとえば、とりわけ腫瘍サイズおよび/または腫瘍成長のアッセイによってモニタリングされることができる。投与量は、医師によって決定され、必要に応じて、処置の観測結果に適合するように調整されることができる。

10

#### 【0098】

いくつかの態様において、本明細書に記載される技術は、本明細書に記載される薬学的組成物、および任意で薬学的に許容される担体に関する。薬学的に許容される担体および希釈剤は、生理食塩水、緩衝水溶液、溶媒および/または分散媒体を含む。そのような担体および希釈剤の使用は、当技術分野において周知である。薬学的に許容される担体として役立つことができる材料のいくつかの非限定的な例としては、(1)糖、たとえばラクトース、グルコースおよびスクロース；(2)デンプン、たとえばトウモロコシデンプンおよびジャガイモデンプン；(3)セルロースおよびその誘導体、たとえばカルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、エチルセルロース、微結晶性セルロースおよび酢酸セルロース；(4)粉末トラガカント；(5)麦芽；(6)ゼラチン；(7)潤滑剤、たとえばステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウムおよびタルク；(8)賦形剤、たとえばココアバターおよび坐剤用蠟；(9)油、たとえば落花生油、綿実油、紅花油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油および大豆油；(10)グリコール、たとえばプロピレングリコール；(11)ポリオール、たとえばグリセリン、ソルビトール、マンニトールおよびポリエチレングリコール(PEG)；(12)エステル、たとえばオレイン酸エチルおよびラウリン酸エチル；(13)寒天；(14)緩衝剤、たとえば水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウム；(15)アルギン酸；(16)発熱物質不含水(17)等張生理食塩水；(18)リンゲル液；(19)エチルアルコール；(20)pH緩衝液；(21)ポリエステル、ポリカーボネートおよび/またはポリ無水物；(22)増量剤、たとえばポリペプチドおよびアミノ酸；(23)血清成分、たとえば血清アルブミン、HDLおよびLDL；(22)C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>アルコール、たとえばエタノール；ならびに(23)薬学的製剤中に用いられる他の無毒の適合性物質が挙げられる。また、湿潤剤、着色剤、離型剤、コーティング剤、甘味剤、香味剤、着香剤、防腐剤および抗酸化剤も製剤中に存在することができる。「賦形剤」、「担体」、「薬学的に許容される担体」等の用語は、本明細書において互換的に使用される。いくつかの態様において、担体は、活性剤、たとえば本明細書に記載される組成物の分解を抑制する。

20

30

#### 【0099】

いくつかの態様において、本明細書に記載される組成物、たとえば本明細書に記載されるナノ粒子を含む薬学的組成物は、非経口剤形であることができる。非経口剤形の投与は、典型的には汚染物質に対する患者の自然防御を回避するので、非経口剤形は、好ましくは、無菌であるかまたは患者に投与する前に滅菌することが可能である。非経口剤形の例としては、注射用の調製済み溶液剤、注射用の薬学的に許容されるビヒクルに溶解または懸濁できる調製済み乾燥生成物、注射の調製済み懸濁剤、およびエマルションが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。加えて、制御放出非経口剤形が、患者の投与のために調製され得る（非限定的に、DUROS（登録商標）型剤形および用量ダンピングを含む）。

40

#### 【0100】

本明細書に記載される組成物の非経口剤形を提供するために使用されることができる適切なビヒクルは、当業者に周知である。例としては、無菌水；USP注射用水；生理食塩水；グルコース溶液；水性ビヒクル、たとえば非限定的に、塩化ナトリウム注射、リンゲル

50



注射、デキストロース注射、デキストロースおよび塩化ナトリウム注射、および乳酸化リンゲル注射；水混和性ビヒクル、たとえば非限定的に、エチルアルコール、ポリエチレングリコールおよびプロピレングリコール；ならびに非水性ビヒクル、たとえば非限定的に、トウモロコシ油、綿実油、落花生油、ゴマ油、オレイン酸エチル、ミリスチン酸イソプロピルおよび安息香酸ベンジルが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。また、慣用の制御放出非経口剤形を含む、薬学的に許容される塩の溶解性を変化または改変する化合物も本開示の非経口剤形中に組み込まれることができる。

#### 【0101】

本明細書に記載される薬学的組成物はまた、経口投与に適するように、たとえば、個別剤形、たとえば、錠剤（非限定的に、分割錠またはコート錠を含む）、丸剤、カプレット剤、カプセル剤、チュアブル錠、粉剤小包、カシェ剤、トローチ剤、ウエハー剤、エアロゾルスプレー剤、または液剤、たとえば非限定的に、水溶液、非水溶液、水中油エマルションまたは油中水エマルション中のシロップ剤、エリキシル剤、溶液剤または懸濁剤として製剤化されることができるが、それらに限定されるわけではない。そのような組成物は、所定量の開示した化合物の薬学的に許容される塩を含有し、かつ当業者に周知の薬剤学の方法によって調製され得る。一般に、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Ed., Lippincott, Williams, and Wilkins, Philadelphia PA. (2005) を参照されたい。

10

#### 【0102】

慣用の剤形は、一般に、製剤からの急速または即時的な薬物放出を提供する。薬物の薬理学および薬物動態学に依存して、慣用の剤形の使用は、患者の血液および他の組織中で薬物濃度の広範な変動をもたらすことができる。これらの変動は、多数のパラメーター、たとえば、投薬回数、作用発現、有効期間、治療域の血中レベルの維持、毒性、副作用等に影響することができる。有利には、制御放出製剤は、薬物の作用発現、作用期間、治療濃度域内の血漿中レベルおよび最大血中レベルを制御するために使用されることができる。特に、制御放出または持続放出の剤形または製剤は、薬物の過少量を投与すること（すなわち、最小治療レベルを下回る）および薬物の毒性レベルを超えることの両方によって起こり得る潜在的な有害作用および安全上の懸念を最小限に抑えながら、薬物の最大効力を達成するように使用されることができる。いくつかの態様において、本明細書に記載される組成物は、持続放出製剤で投与されることができる。

20

30

#### 【0103】

制御放出医薬品は、それらの非制御放出対応物によって達成されるものを超えて、薬物療法を改善するという共通の目的を有する。理想的には、医学処置における最適に設計された制御放出調製物の使用は、状態を治癒または制御するために最小限の薬物物質が最小限の時間で用いられることを特徴とする。制御放出製剤の利点は、1) 薬物の活性の延長；2) 投薬回数の減少；3) 患者コンプライアンスの向上；4) 少ない総薬物使用量；5) 局部または全身の副作用の低下；6) 薬物蓄積の最小化；7) 血中レベルの変動の低下；8) 処置有効性の改善；9) 薬物活性の増強または喪失の低下；および10) 疾患または状態の制御速度の改善を含む (Kim, Cherng-ju, Controlled Release Dosage Form Design, 2 (Technomic Publishing, Lancaster, Pa.: 2000)。

40

#### 【0104】

ほとんどの制御放出製剤は、所望の治療効果を迅速にもたらし量の薬物（有効成分）を最初に放出し、この治療的または予防的効果のレベルを長期間にわたって維持するように残りの量の薬物を徐々にかつ持続的に放出するよう設計される。体内でこの薬物の一定のレベルを維持するために、薬物は、代謝されて身体から排泄される薬物の量と置き換わる速度で剤形から放出されるべきである。有効成分の制御放出は、pH、イオン強度、浸透圧、温度、酵素、水および他の生理学的条件または化合物を含むが、それらに限定されるわけではない様々な条件によって刺激されることができる。

#### 【0105】

多種多様な公知の制御または持続放出剤形、製剤およびデバイスが、本開示の塩および

50

組成物と共に使用するために適合されることができる。例としては、米国特許第3,845,770号；第3,916,899号；第3,536,809号；第3,598,123号；第4,008,719号；第5674,533号；第5,059,595号；第5,591,767号；第5,120,548号；第5,073,543号；第5,639,476号；第5,354,556号；第5,733,566号；および第6,365,185B1号（その各々は、参照によって本明細書に組み入れられる）に記載されるものが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。これらの剤形は、所望の放出プロファイルを様々な比率で提供するために、たとえば、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、他のポリマーマトリクス、ゲル、透過性膜、浸透圧システム（たとえば、OROS（登録商標）（Alza Corporation, Mountain View, Calif. USA））、またはそれらの組み合わせを使用して、1つまたは複数の有効成分の緩徐または制御放出を提供するように使用されることができる。

10

## 【0106】

いくつかの態様において、本明細書に開示される処置の方法は、コンジュゲートまたは該コンジュゲートを含む組成物を投与することに加えて、1つまたは複数の追加の抗癌治療法を患者に同時に施すことを含む。典型的な抗癌治療法としては、外科手術、化学療法、放射線療法、温熱療法、免疫療法、ホルモン療法、レーザー療法、抗血管新生療法およびそれらの任意の組み合わせが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

## 【0107】

いくつかの態様において、方法は、コンジュゲートと抗癌剤または化学療法剤を対象に同時投与することを含む。本明細書において使用される場合、用語「抗癌剤」は、癌を処置するために使用され得る、任意の化合物（その類似体、誘導体、プロドラッグおよび薬学的な塩を含む）または組成物を指す。本発明において使用するための抗癌化合物としては、トポイソメラーゼIおよびIIの阻害剤、アルキル化剤、微小管阻害剤（たとえば、タキソール）および血管新生阻害剤が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。典型的な抗癌化合物としては、パクリタキセル（タキソール）；ドセタキセル；ゲムシタピン；アルデスロイキン；アレムツズマブ；アリトレチノイン；アロプリノール；アルトレタミン；アミホスチン；アナストロゾール；三酸化ヒ素；アスパラギナーゼ；BCG Live；ベキサロテンカプセル；ベキサロテングエル；プレオマイシン；静脈ブスルファン；経口ブスルファン；カルステロン；カペシタピン；白金酸塩；カルムスチン；ポリフェプロザン・カルムスチンインプラント（carmustine with Polifeprosan Implant）；セレコキシブ；クロラムブシル；クラドリピン；シクロホスファミド；シタラビン；リポソーマルシタラビン；ダカルバジン；ダクチノマイシン；アクチノマイシンD；ダルベポエチン；リポソーマルダウノルピシン；ダウノルピシン、ダウノマイシン；デニロイキンディフティトックス、デクスラゾキサソ；ドセタキセル；ドキシソルピシン；リポソーマルドキソルピシン；プロピオン酸ドロモスタノロン；エリオットB溶液；エビルピシン；エポエチン；エストラムスチン；リン酸エトポシド；エトポシド（VP-16）；エキセメスタン；フィルグラスチム；フロキシウリジン（動脈内）；フルダラビン；フルオロウラシル（5-FU）；フルベストラント；ゲムツズマブオゾガマイシン；酢酸ゴセレリン；ヒドロキシウレア；イブリツモマブチウキセタン；イダルピシン；イホスファミド；メシル酸イマチニブ；インターフェロン $\gamma$ -2a；インターフェロン $\gamma$ -2b；イリノテカン；レトロゾール；ロイコボリン；レバミゾール；ロムスチン（CCNU）；メクロレタミン（ナイトロジェンマスタード）；酢酸メゲストロール；メルファラン（L-PAM）；メルカプトプリン（6-MP）；メスナ；メトトレキサート；メトキサレン；マイトマイシンC；ミトタン；ミトキサントロン；フェンプロピオン酸ナンドロロン；ノフェツモマブ；LOddC；オブレルベキン；パミドロネート；ペガデマラーゼ；ペグアスパラガーゼ；ペグフィルグラスチム；ペントスタチン；ピボプロマン；プリカマイシン；ミトラマイシン；ポルフィマーナトリウム；プロカルバジン；キナクリン；ラスプリカーゼ；リツキシマブ；サルグラモスチム；ストレプトゾシン；テルビブジン（talbuvudine）（LDT）；タルク；タモキシフェン；テモゾロミド；テニポシド（VM-26）；テストラクトン；チオグアニン（6-TG）；チオテパ；トポテカン；トレミフェン；トシツモマブ；トラスツズマブ；トレチノイン（ATRA）；ウラシルマスタード；バルルピシン；バルトルシタピン（モノバルLDC）；ピンブラスチン；ピノレルピ

20

30

40

50

ン；ゾレドロネート；およびそれらの任意の混合物が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。いくつかの態様において、抗癌剤は、パクリタキセル-炭水化物コンジュゲート、たとえば、米国特許第6,218,367号（その内容は、参照によってその全体が本明細書に組み入れられる）に記載されるようなパクリタキセル-グルコースコンジュゲートである。

【0108】

いくつかの態様において、抗癌剤は、シスプラチン、オキサリプラチン、カルボプラチン、パラプラチン、サトラプラチンおよびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される白金酸塩である。

【0109】

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

【0110】

いくつかの態様において、本明細書に記載される癌を処置する方法は、本明細書に記載される組み合わせのいずれか2つの組み合わせ、たとえば、式Iの構造を有する分子を含むナノ粒子を含む組成物と式IVの構造を有する分子を含むナノ粒子を含む組成物を投与することを含むことができる。いくつかの態様において、本明細書に記載される癌を処置する方法は、本明細書に記載される組成物と第二の作用物質および/または処置の組み合わせを投与することを含むことができる。いくつかの態様において、本明細書に記載される組成物は、タキサンを含む組成物、たとえば、式IVの構造を有する分子を含むナノ粒子とPI3K阻害剤、たとえばPI103との組成物であることができる。

【0111】

特定の態様において、有効用量の本明細書に記載される組成物は、患者に1回に投与されることができる。特定の態様において、有効用量の本明細書に記載される組成物は、患者に繰り返し投与されることができる。全身投与の場合、対象は、治療量の、たとえば0.1mg/kg、0.5mg/kg、1.0mg/kg、2.0mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、15mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、40mg/kg、50mg/kgまたはそれより多くの本明細書に記載される組成物が投与されることができる。

【0112】

いくつかの態様において、初期の処置レジメン後、処置は、より少ない頻度で投与されることができる。たとえば、3か月間にわたって隔週で処置した後、処置は1か月に1回を6か月間もしくは1年間またはそれより長く繰り返されるることができる。本明細書に記載される方法による処置は、状態のマーカーまたは症状のレベル、たとえば腫瘍サイズおよび/または腫瘍成長を、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%または少なくとも90%、またはそれより多く低下させることができる。

【0113】

本明細書に記載される組成物の投与量は、医師によって決定され、必要に応じて、処置の観測結果に適合するように調整されることができる。処置の期間および頻度に関して、処置が治療的有用性を提供するときを決定するために、ならびに投与量を増加または減少させるか否か、投与頻度を増加または減少させるか否か、処置を中断するか否か、処置を再開するか否か、または処置レジメンを他のものに変更するか否かを決定するために対象をモニタリングすることは、熟練の臨床医にとって一般的なことである。投薬スケジュールは、本明細書に記載される組成物に対する対象の感受性のような多数の臨床学的因子に応じて、週に1回～毎日の間で変化することができる。活性化の所望の用量または量は、1回で投与され得るか、または分割用量（subdose）、たとえば2つ～4つの分割用量に分けて投与され得、そして、一定期間にわたって、たとえば1日を通して適当な間隔でまたは他の適当なスケジュールで投与され得る。いくつかの態様において、投与は、長期的に、たとえば、1つもしくは複数の用量および/または処置を数週間または数か月にわたって

10

20

30

40

50

毎日行われることができる。投薬および/または処置スケジュールの例は、1週間、2週間、3週間、4週間、1か月、2か月、3か月、4か月、5か月または6か月、またはそれより長い期間にわたって、毎日、1日2回、1日3回または1日4回、またはそれより多く投与することである。本明細書に記載される組成物は、一定期間、たとえば5分間、10分間、15分間、20分間または25分間にわたって投与されることができる。

#### 【0114】

本明細書に記載される方法による本明細書に記載される組成物の投与の投与量範囲は、たとえば、本明細書に記載される組成物の形態、その効力、および本明細書に記載される状態の症状、マーカーまたは指標がどの程度低下することが望ましいか（たとえば、腫瘍成長に対する望ましい低下率）に依存する。該投与量は、有害な副作用を引き起こすほど多くすべきではない。概して、該投与量は、患者の年齢、状態および性別と共に変化し、当業者によって決定され得る。投与量はまた、任意の合併症が生じた場合に、個々の医師によって調整されることができる。

10

#### 【0115】

本明細書に記載される組成物の、たとえば本明細書に記載される状態の処置における有効性または本明細書に記載される応答を誘発させる有効性は、熟練の臨床医によって決定されることができる。しかしながら、処置は、本明細書に記載される状態の兆候または症状の1つまたは複数が有益な様式で変えられ、他の臨床的に許容される症状が好転または改善されるか、または所望の応答がたとえば本明細書に記載される方法による処置後少なくとも10%誘発される場合に、「効果的な処置」と見なされ、該用語が本明細書において使用される。有効性は、たとえば、本明細書に記載される方法によって処置される状態のマーカー、指標、症状および/もしくは発生率、または適当な任意の他の測定可能なパラメーター、たとえば腫瘍サイズおよび/または腫瘍成長を測定することによって評価されることができる。有効性はまた、入院によって評価される場合には個体が悪化しなかったこと、または医学的介入の必要性（すなわち、疾患の進行が停止する）によっても測定されることができる。これらの指標を測定する方法は、当業者に公知でありかつ/または本明細書に記載される。処置は、個体または動物（いくつかの非限定的な例としては、ヒトまたは動物が挙げられる）における疾患の任意の処置を含み、（1）疾患を阻害すること、たとえば、症状（たとえば、疼痛または炎症）の悪化を抑制すること；または（2）疾患の重症度を軽減する、たとえば、症状の退縮を引き起こすことを含む。疾患の処置のための有効量は、それを必要とする対象に投与されたとき、本明細書においてその用語が定義されたように、その疾患に対して効果的な処置がもたらされるのに十分な量を意味する。作用物質の有効性は、状態の身体的指標または所望の応答（たとえば、腫瘍サイズおよび/または腫瘍成長）を評価することによって決定されることができる。そのようなパラメーターのいずれか1つまたはパラメーターの任意の組み合わせを測定することによって、投与および/または処置の有効性をモニタリングすることは、十分に当業者の技能の範囲内である。有効性は、本明細書に記載される状態の動物モデルにおいて、たとえば癌の処置で評価されることができる。実験動物モデルを使用する場合、処置の有効性は、マーカーの統計的に有意な変化、たとえば腫瘍サイズおよび/または腫瘍成長の低下が観測される場合に証明される。

20

30

40

#### 【0116】

所与の用量の本明細書に記載される組成物の評価を可能にするインビトロアッセイおよび動物モデルアッセイが本明細書において提供される。非限定的な例として、ある用量の組成物の効果は、インビトロ細胞生存率アッセイによって評価されることができる。そのようなアッセイのプロトコルの非限定的な例は、以下のとおりである：細胞、たとえば癌細胞株を本明細書に記載される組成物と接触させて、1つまたは複数の時点で、細胞生存率試薬、たとえばCellTiter 96 Aqueous One Solution試薬（PROMEGA, WI）を使用して生存率を決定する。

#### 【0117】

所与の投与量の有効性はまた、動物モデル、たとえば本明細書の実施例に記載する卵巣

50

癌のマウスモデルにおいて評価されることができる。簡潔に述べると、アデノウイルス保有Creリコンビナーゼの滑液嚢内送達を介して、K-Ras<sup>LSL/+</sup>/Pten<sup>f1/f1</sup>マウスで卵巣腺癌を誘発することができる。マウスに中型～大型の腫瘍ができたなら、たとえば尾静脈注射を介して、本明細書に記載される組成物をマウスに投与することができる。腫瘍イメージングを実施することができ、かつ/またはマウスを屠殺することができる。

【0118】

便宜上、本明細書、実施例および添付の特許請求の範囲において使用されるいくつかの用語および語句の意味を以下に与える。特に指定しない限りまたは文脈から黙示的でない限り、以下の用語および語句は、以下に与える意味を含む。本発明の範囲が特許請求の範囲によってのみ限定されるので、定義は、特定の態様を記載する上で助けとなるように与えるもので、特許請求された発明を限定することを意図するものではない。特に定義しない限り、本明細書において使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって通常理解されるものと同じ意味を有する。当技術分野における用語の使用と本明細書に与えられるその定義との間に明らかな矛盾がある場合、本明細書内に与えられる定義が優先されるものとする。

10

【0119】

便宜上、本明細書、実施例および添付の特許請求の範囲において用いられるある種の用語をここにまとめる。

【0120】

用語「減少させる (decrease)」、「低下された (reduced)」、「低下 (reduction)」または「阻害する (inhibit)」は全て、本明細書において、統計的に有意な量の減少を意味するように使用される。いくつかの態様において、「低下させる (reduce)」、「低下 (reduction)」または「減少させる (decrease)」または「阻害する (inhibit)」は、典型的には、基準レベル (たとえば、所与の処置がない場合) と比較して、少なくとも10%の減少を意味し、たとえば、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、またはそれより多くの減少を含むことができる。本明細書において使用される場合、「低下 (reduction)」または「阻害 (inhibition)」は、基準レベルと比較した場合の完全な阻害または低下を包含しない。「完全な阻害」は、基準レベルと比較した場合の100%阻害である。減少は、好ましくは、所与の障害を有さない個体にとって正常な範囲内として許容されるレベルまで低減することであることができる。

20

30

【0121】

用語「増加された (increased)」、「増加する (increase)」、「増強する (enhance)」または「活性化する (activate)」は全て、本明細書において、統計的に有意な量の増加を意味するように使用される。いくつかの態様において、用語「増加された (increased)」、「増加する (increase)」、「増強する (enhance)」または「活性化する (activate)」は、基準レベルと比較して、少なくとも10%の増加、たとえば、少なくとも約20%、または少なくとも約30%、または少なくとも約40%、または少なくとも約50%、または少なくとも約60%、または少なくとも約70%、または少なくとも約80%、または少なくとも約90%の増加、または最大100%およびそれを含む増加、または基準レベルと比較して、10~100%の間の任意の増加、あるいは、基準レベルと比較して、少なくとも約2倍、または少なくとも約3倍、または少なくとも約4倍、または少なくとも約5倍、または少なくとも約10倍の増加、または2倍~10倍の間の任意の増加またはそれより多い増加を意味することができる。マーカーまたは症状に関して、「増加する (increase)」は、そのようなレベルの統計的に有意な増加である。

40

【0122】

本明細書において使用される場合、「対象」は、ヒトまたは動物を意味する。通常、動

50

物は、霊長類、齧歯類、家畜または狩猟動物等の脊椎動物である。霊長類は、チンパンジー、カニクイザル、クモザルおよびマカクザル、たとえば赤毛猿を含む。齧歯類は、マウス、ラット、ウッドチャック、フェレット、ウサギおよびハムスターを含む。家畜および狩猟動物は、ウシ、ウマ、ブタ、シカ、バイソン、パッファロー、ネコ科、たとえば家ネコ、イヌ科、たとえばイヌ、キツネ、オオカミ、鳥類、たとえばニワトリ、エミュー、ダチョウ、ならびに魚類、たとえばマス、ナマズおよびサケを含む。いくつかの態様において、対象は、哺乳類、たとえば霊長類、たとえばヒトである。用語「個体」、「患者」および「対象」は、本明細書において互換的に使用される。

#### 【0123】

好ましくは、対象は、哺乳類である。哺乳類は、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマまたはウシであることができるが、これらの例に限定されない。ヒト以外の哺乳類は、癌の動物モデルを表す対象として有利に使用されることができる。対象は、雄または雌であることができる。

10

#### 【0124】

対象は、処置を必要とする状態（たとえば、癌）またはそのような状態に関連する1つもしくは複数の合併症と以前に診断された、またはそれに罹患したもしくはそれを有すると特定された対象、および任意で、癌または癌に関連する1つもしくは複数の合併症のための処置をすでに受けた対象であることができる。あるいは、対象はまた、癌または癌に関連する1つもしくは複数の合併症を有すると以前に診断された被験体でもあることができる。たとえば、対象は、1つまたは複数の癌の危険因子または癌に関連する1つまたは複数の合併症を示す対象、または危険因子を示さない対象であることができる。

20

#### 【0125】

特定の状態のための処置を「必要とする対象」は、その状態を有する、その状態を有すると診断された、またはその状態を発症するリスクのある対象であることができる。

#### 【0126】

本明細書において使用される場合、用語「タンパク質」および「ポリペプチド」は、本明細書において互換的に使用され、隣接する残基の  $\alpha$ -アミノ基とカルボキシ基の間のペプチド結合によって互いに連結された一連のアミノ酸残基を指す。用語「タンパク質」および「ポリペプチド」は、そのサイズまたは機能に関わらず、修飾アミノ酸（たとえば、リン酸化、糖化、グリコシル化された、等）およびアミノ酸類似体を含む、アミノ酸のポリマーを指す。「タンパク質」および「ポリペプチド」は、多くの場合相対的に大きいポリペプチドに関して使用され、一方で、用語「ペプチド」は、多くの場合小さいポリペプチドに関して使用されるが、当技術分野におけるこれらの用語の使用法は重複する。用語「タンパク質」および「ポリペプチド」は、本明細書において、遺伝子産物およびその断片に言及する場合に互換的に使用される。したがって、典型的なポリペプチドまたはタンパク質は、遺伝子産物、天然のタンパク質、ホモログ、オルソログ、パラログ、断片および他の等価体、前述の変異体、断片および類似体を含む。

30

#### 【0127】

本明細書において使用される場合、用語「核酸」または「核酸配列」は、リボ核酸、デオキシリボ核酸またはその類似体の単位を組み込んだ任意の分子、好ましくはポリマー分子を指す。該核酸は、一本鎖または二本鎖のいずれかであることができる。一本鎖核酸は、変性した二本鎖DNAの1つの核酸鎖であることができる。あるいは、一本鎖核酸は、任意の二本鎖DNAに由来しない一本鎖核酸であることができる。1つの局面において、該核酸は、DNAであり得る。別の局面において、該核酸は、RNAであることができる。適切な核酸分子は、ゲノムDNAまたはcDNAを含むDNAである。他の適切な核酸分子は、mRNAを含むRNAである。

40

#### 【0128】

用語「作用物質」は、概して、通常存在しないか、または細胞、組織または対象に投与されるレベルで存在しない任意の実体を指す。作用物質は、：ポリヌクレオチド；ポリペプチド；小分子；および抗体またはその抗原結合断片を含む群より選択されることができ

50

るが、それらに限定されるわけではない。ポリヌクレオチドは、RNAまたはDNAであることができ、一本鎖または二本鎖であることができ、そして、たとえばポリペプチドをコードする核酸および核酸類似体を含む群より選択されることができる。ポリペプチドは、非限定的に、関心のある機能を保持する天然のポリペプチド、突然変異ポリペプチドまたはその断片であることができる。作用物質のさらなる例としては、核酸アプタマー、ペプチド-核酸 (PNA)、ロックド核酸 (LNA)、小さい有機分子または無機分子；サッカリド；オリゴ糖；多糖；生体高分子、ペプチド模倣体；核酸類似体および誘導體；細菌、植物、真菌または哺乳類の細胞または組織等の生体物質から作製された抽出物、および天然または合成組成物が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。作用物質は、培地に適用されることができるそこで細胞と接触してその作用を誘導する。あるいは、作用物質は、作用物質をコードしている核酸配列の細胞への導入およびその転写の結果、細胞内で核酸および/またはタンパク質環境刺激を生じるとして細胞内にあることができる。いくつかの態様において、作用物質は、合成および天然の非タンパク質性実体を含むが、それらに限定されるわけではない、任意の化学物質、実体または部分である。特定の態様において、作用物質は、たとえば、非置換もしくは置換アルキル、芳香族またはヘテロシクリル部分から選択される化学部分を有する小分子 (マクロライド、レプトマイシンおよび関連する天然産物またはそれらの類似体を含む) である。作用物質は、所望の活性および/または特性を有すると知られていることができ、または多様な化合物のライブラリーから選択されることができる。本明細書において使用される場合、用語「小分子」は、「天然産物様」である化合物を指すことができるが、しかしながら、用語「小分子」は、「天然産物様」化合物に限定されない。むしろ、小分子は、典型的には、いくつかの炭素-炭素結合を含有し、かつ約50ダルトン超であるが約5000ダルトン (5kD) 未満である分子量を有すると特徴付けられる。好ましくは、小分子は、3kD未満、さらにより好ましくは2kD未満、最も好ましくは1kD未満の分子量を有する。いくつかの場合において、小分子が700ダルトン以下の分子量を有することが好ましい。

10

20

30

40

50

#### 【0129】

本明細書において使用される場合、用語「阻害剤」は、標的発現産物 (たとえば、標的をコードするmRNAまたは標的ポリペプチド) の発現および/または活性を、たとえば少なくとも10%以上、たとえば10%以上、50%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上または98%以上減少させることができる作用物質を指す。たとえばPI3Kの阻害剤の有効性、たとえばPI3Kのレベルおよび/または活性を減少させる能力は、たとえばPI3Kポリペプチド (および/またはそのようなポリペプチドをコードするmRNA) のレベルおよび/またはPI3Kの活性を測定することによって決定されることができる。所与のmRNAおよび/またはポリペプチドのレベルを測定するための方法は当業者に公知であり、たとえば、プライマーを用いたRTPCRはRNAのレベルを決定するために使用されることができ、抗体を用いたウエスタンブロット法はポリペプチドのレベルを決定するために使用されることができる。たとえばPI3Kの活性は、当技術分野において公知の方法および本明細書で上述した方法を使用して決定されることができる。

#### 【0130】

本明細書において使用される場合、用語「処置する (treat)」、「処置 (treatment)」、「処置する (treating)」または「改善 (amelioration)」は、その目的が疾患または障害 (たとえば、癌) に関連する状態の進行または重症度を回復、緩和、改善、阻害、遅延または停止することである治療的処置を指す。用語「処置する (treating)」は、癌に関連する状態、疾患または障害の少なくとも1つの有害作用または症状を低下または緩和することを含む。処置は、概して、1つまたは複数の症状または臨床マーカーが低下する場合に「効果的」である。あるいは、処置は、疾患の進行が低下または停止する場合に「効果的」である。すなわち、「処置 (treatment)」は、処置を行わなかった場合に予想されるものと比較して、症状またはマーカーを改善するだけでなく、症状の進行または悪化を中断または少なくとも遅らせることも含む。有益または所望の臨床結果としては、検出可能か検出不可能か問わず、1つまたは複数の症状の軽減、疾患範囲の縮小、疾患状

態の安定化（すなわち、悪化しない）、疾患の進行の遅延または緩徐、疾患状態の改善または緩和、寛解（部分的か全体的か問わず）、および/または死亡率の減少が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。疾患の用語「処置（treatment）」はまた、疾患の症状または副作用の除去（緩和処置を含む）を提供することも含む。

【0131】

本明細書において使用される場合、用語「薬学的組成物」は、薬学的に許容される担体、たとえば製薬業界において通常使用される担体と組み合わせられた活性剤を指す。語句「薬学的に許容される」は、本明細書においては、正しい医学的判断の範囲内で、妥当な利益/リスク比に見合いながらも、過度の毒性、刺激、アレルギー反応または他の問題もしくは合併症を伴うことなく、ヒトおよび動物の組織との接触における使用に適する化合物、物質、組成物および/または剤形を指すために用いられる。

10

【0132】

本明細書において使用される場合、用語「投与する」は、作用物質を所望の部位に少なくとも部分的に送達させる方法または経路によって、本明細書に開示される化合物を対象へ挿入することを指す。本明細書に開示される化合物を含む薬学的組成物は、対象に効果的な処置をもたらす任意の適当な経路によって投与されることができる。

【0133】

本明細書において使用される場合、用語「両親媒性」は、疎水性部分と疎油性部分、すなわち、少なくとも1つの極性の水溶性基と少なくとも1つの非極性の水不溶性基の両方を有する分子を指す。典型的には、極性の水相と非極性の非水相を有する二相系において、両親媒性分子は2つの相の界面を分割する。より簡単な非限定的な用語として、両親媒性物質は、水性環境と非水性環境の両方に可溶性である分子である。用語「両親媒性物質」は、両親媒性分子を指す。

20

【0134】

用語「統計的に有意な」または「有意に」は、統計的有意性を指し、一般に2標準偏差（2SD）またはより大きい相違を意味する。

【0135】

実施される例以外で、または特に指示のない限り、本明細書において使用される成分の量または反応条件を表す全ての数値は、全ての事例において用語「約」によって修飾されるものと理解されるべきである。用語「約」は、パーセンテージと併せて使用される場合、±1%を意味することができる。

30

【0136】

本明細書において使用される場合、用語「含んでいる（comprising）」または「含む（comprises）」は、組成物、方法および該方法または組成物に必須であるその各成分に関して使用されるが、必須であるか否かを問わず明記されていない要素の包含も受け入れられる。

【0137】

用語「からなる」は、態様の説明に列挙されていない如何なる要素も含まない、本明細書に記載される組成物、方法およびその各成分を指す。

【0138】

本明細書において使用される場合、用語「から本質的になる」は、所与の態様にとって必要な要素を指す。該用語は、その態様の基本および新規または機能的な特徴に実質的に影響を及ぼさない要素の存在を容認する。

40

【0139】

単数形の用語「a」、「an」および「the」は、文脈が明確に他のことを示していない限り、複数形の指示対象を含む。同様に、単語「または」は、文脈が明確に他のことを示していない限り、「および」を含むことを意図する。本明細書に記載される方法および材料と類似または等価な方法および材料がこの開示の実施または試験において使用されることができるが、適切な方法および材料が以下に記載される。略語「たとえば（e.g.）」は、たとえば（Latin *exempli gratia*）に由来するものであり、本明細書において非限定的な

50



例を指すために使用される。したがって、略語「たとえば (e.g.)」は、用語「たとえば (for example)」と同義である。

【0140】

用語「アロマトラーゼ阻害剤」は、本明細書において使用される場合、エストロゲン産生、すなわち、基質アンドロステジオンおよびテストステロンからそれぞれエストロンおよびエストラジオールへの変換を阻害する化合物に関する。該用語としては、ステロイド、とりわけアタメスタン、エキセメスタンおよびホルメスタン；ならびに、特に非ステロイド、とりわけアミノグルテチミド、ログレチミド (roglethimide)、ピリドグルテチミド、トリロスタン、テストラクトン、ケトコナゾール (ketokonazole)、ポロゾール、ファドロゾール、アナストロゾールおよびレトロゾールを含むが、それらに限定されるわけではない。

10

【0141】

用語「抗エストロゲン剤」は、本明細書において使用される場合、エストロゲン受容体レベルでエストロゲンの作用に拮抗する化合物に関する。該用語としては、タモキシフェン、フルベストラント、ラロキシフェンおよびラロキシフェン塩酸塩を含むが、それらに限定されるわけではない。

【0142】

用語「抗アンドロゲン剤」は、本明細書において使用される場合、アンドロゲンホルモンの生物学的効果を阻害することが可能な任意の物質に関し、ピカルタミドが挙げられるが、それに限定されるわけではない。

20

【0143】

用語「ゴナドレリンアゴニスト」としては、本明細書において使用される場合、アバレリクス、ゴセレリンおよび酢酸ゴセレリンが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。ゴセレリンは、米国特許第4,100,274号に開示されており、ZOLADEXとして販売されている。アバレリクスは、たとえば、米国特許第5,843,901号に開示されているように製剤化されることができる。用語「トポイソメラーゼI阻害剤」としては、本明細書において使用される場合、トポテカン、イリノテカン、ギマテカン、カンプトセシンおよびその類似体、9-ニトロカンプトテシンおよび高分子のカンプトセシンコンジュゲートPNU-166148 (国際公開公報第99/17804号の化合物A1) が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

30

【0144】

用語「トポイソメラーゼII阻害剤」としては、本明細書において使用される場合、アントラサイクリン類、たとえばドキソルビシン、ダウノルビシン、エビルビシン、イダルビシンおよびネモルビシン；アントラキノンのミトキサントロンおよびロソキサントロン；ならびにポドフィロトキシン類のエトポシドおよびテニポシドが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【0145】

用語「微小管活性剤」は、タキサン類、たとえばバクリタキセルおよびドセタキセル；ピンカルカロイド類、たとえばピンブラスチン、とりわけ硫酸ピンブラスチン；ピンクリスチン、とりわけ硫酸ピンクリスチンおよびビノレルピン；ディスコデルモリド；コルヒチン；ならびにエポチロン類およびそれらの誘導体、たとえばエポチロンBもしくはDまたはそれらの誘導体を含むが、それらに限定されるわけではない、微小管安定化剤、微小管不安定化剤およびマイクロチューブリン (microtubulin) 重合阻害剤に関する。また、米国特許第6,194,181号、国際公開公報第98/10121号、国際公開公報第98/25929号、国際公開公報第98/08849号、国際公開公報第99/43653号、国際公開公報第98/22461号および国際公開公報第00/31247号に開示されているエポトリン (Epotholine) 誘導体も含まれる。とりわけ好ましいのは、エポトリンAおよび/またはBである。

40

【0146】

アルキル化剤は、水素イオンをアルキル基に置換する能力を有する多官能性化合物である。アルキル化剤の例としては、ビスクロロエチルアミン (ナイトロジェンマスタード、

50

たとえばクロラムブシル、シクロホスファミド、イホスファミド、メクロレタミン、メルファラン、ウラシルマスタード)、アジリジン(たとえば、チオテパ)、スルホン酸アルキルアルコン(たとえば、ブスルファン)、ニトロソウレア(たとえば、カルムスチン、ロムスチン、ストレプトゾシン、BCNU、Gliadel)、テモゾロミド、非古典的アルキル化剤(アルトレタミン、ダカルバジンおよびプロカルバジン)、白金化合物(カルボプラスチン(carboplastin)およびシスプラチン)が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。これらの化合物は、リン酸基、アミノ基、ヒドロキシル基、スルフヒドリル(sulfhydryl)基、カルボキシル基およびイミダゾール基と反応する。生理学的条件下で、これらの薬物はイオン化して、正電荷を持つイオンを生成し、これが感受性の核酸およびタンパク質に結合して、細胞周期の停止および/または細胞死をもたらす。

10

## 【0147】

用語「抗新生物剤」および「代謝拮抗剤」は、癌細胞の生理機能および増殖に不可欠な代謝プロセスを妨害する化合物群を指す。活発に増殖している癌細胞は、大量の核酸、タンパク質、脂質および他の不可欠な細胞構成要素の持続的な合成を必要とする。代謝拮抗剤の多くは、プリンまたはピリミジンヌクレオシドの合成を阻害するか、またはDNA複製の酵素を阻害する。また、いくつかの代謝拮抗剤は、リボヌクレオシドの合成ならびにRNAおよび/またはアミノ酸代謝ならびにタンパク質合成も同様に妨害する。不可欠な細胞構成要素の合成を妨害することによって、代謝拮抗剤は癌細胞の成長を遅延または停止することができる。代謝拮抗剤の例としては、5-フルオロウラシル(5-FU);アスパラギナーゼ;カペシタピン;クラドリピン(2-CDA);シタラピン;DNA脱メチル化剤、たとえば5-アザシチジンおよびデシタピン;エダトレキサート;フロキシウリジン(5-FUdR);リン酸フルダラピン;葉酸アンタゴニスト、たとえばペメトレキセド;ゲムシタピン;ヒドロキシウレア;ロイコボリン;メルカプトプリン(6-MP);メトトレキサート;ペントスタチン;およびチオグアニン(6-TG)が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

20

## 【0148】

用語「タンパク質または脂質キナーゼ活性を標的化/減少させる化合物」としては、本明細書において使用される場合、タンパク質チロシンキナーゼおよび/もしくはセリンおよび/もしくはトレオニンキナーゼ阻害剤または脂質キナーゼ阻害剤、たとえば、i)血小板誘導増殖因子受容体(PDGFR)の活性を標的化、減少または阻害する化合物、とりわけPDGF受容体を阻害する化合物、たとえば、N-フェニル-2-ピリミジン-アミン誘導体、たとえば、イマチニブ、SU101、SU6668およびGFB-111;ii)線維芽細胞増殖因子受容体(FGFR)の活性を標的化、減少または阻害する化合物;iii)インスリン様増殖因子I受容体(IGF-IR)の活性を標的化、減少または阻害する化合物、とりわけIGF-IRを阻害する化合物、たとえば国際公開公報第02/092599号に開示されている化合物、特にtrans-5-(3-ベンジルオキシ-フェニル)-7-(3-ピロリジン-1-イルメチル-シクロブチル)-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-4-イルアミンおよびcis-7-(3-アゼチジン-1-イルメチル-シクロブチル)-5-(3-ベンジルオキシ-フェニル)-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-4-イルアミンまたはこれらの化合物の薬学的に許容される塩;iv)Trk受容体チロシンキナーゼファミリーの活性を標的化、減少または阻害する化合物;v)Axl受容体チロシンキナーゼファミリーの活性を標的化、減少または阻害する化合物;vi)RET受容体チロシンキナーゼの活性を標的化、減少または阻害する化合物;vii)c-kit受容体チロシンキナーゼの活性を標的化、減少または阻害する化合物、とりわけc-Kit受容体を阻害する化合物、たとえばイマチニブ;viii)c-Ablファミリーのメンバーおよびそれらの遺伝子融合産物、たとえば、Bcr-Ablキナーゼの活性を標的化、減少または阻害する化合物、たとえばとりわけc-Ablファミリーのメンバーおよびそれらの遺伝子融合産物の活性を阻害する化合物、たとえばN-フェニル-2-ピリミジン-アミン誘導体、たとえばイマチニブ、PD180970、AG957、NSC680410またはPD173955(ParkeDavis社);ix)タンパク質キナーゼC(PKC)およびセリン/トレオニンキナーゼのRafファミリーのメンバー、MEK、SRC、JAK、FAK、PDKのメンバーおよびRas/MAPKファミリーのメンバー、またはPI3キナーゼ(PI3K)ファミリー、またはPI3-キナーゼ関

30

40

50

連キナーゼファミリーのメンバー、および/またはサイクリン依存性キナーゼファミリー (CDK) のメンバーの活性を標的化、減少または阻害する化合物、とりわけ米国特許第5,093,330号に開示されているスタウロスポリン誘導体、たとえば、ミドスタウリンが挙げられ;さらなる化合物の例としては、たとえば、UCN-01;サフィンゴール;BAY43-9006;プリオスタチン1;ペリホシン;ルモホシン (Ilmofosine);R0318220およびR0320432;G06976;Isis3521;LY333531/LY379196;イソキノリン (isochinoline) 化合物、たとえば国際公開公報第00/09495に開示されているもの;FTI;PD184352またはQAN697 (PI3K阻害剤) を含み;x) タンパク質チロシンキナーゼ阻害剤の活性を標的化、減少または阻害する化合物は、メシル酸イマチニブ (GLEEVEC/GLIVEC) またはチルホスチンを含むが、それらに限定されるわけではない。チルホスチンは、好ましくは低分子量 ( $M_r < 1500$ ) 化合物、またはその薬学的に許容される塩、とりわけベンジリデンマロニトリルクラスまたはS-アリアルベンゼンマロニリル (malonirile) または二基質キノリンクラスの化合物から選択される化合物、さらにとりわけ、チルホスチンA23/RG-50810、AG99、チルホスチンAG213、チルホスチンAG1748、チルホスチンAG490、チルホスチンB44、チルホスチンB44 (+) エナンチオマー、チルホスチンAG555、AG494、チルホスチンAG556およびAG957ならびにアダホスチン (4-[(2,5-ジヒドロキシフェニル)メチル]アミノ)-安息香酸アダマンチルエステル、NSC680410) からなる群より選択される任意の化合物であり;xi) 受容体チロシンキナーゼの上皮成長因子ファミリー (ホモ-またはヘテロ二量体としてのEGFR、ErbB2、ErbB3、ErbB4) の活性を標的化、減少または阻害する化合物、たとえば上皮成長因子受容体ファミリーの活性を標的化、減少または阻害する化合物は、とりわけEGF受容体チロシンキナーゼファミリーのメンバー、たとえばEGF受容体、ErbB2、ErbB3およびErbB4を阻害する、またはEGFもしくはEGF関連リガンドに結合する化合物、タンパク質または抗体であり、特に国際公開公報第97/02266号に概してかつ具体的に開示されている化合物、タンパク質または抗体、たとえば実施例39の化合物、または欧州特許第0564409号、国際公開公報第99/03854号、欧州特許第0520722号、欧州特許第0566226号、欧州特許第0787722号、欧州特許第0837063号、米国特許第5,747,498号、国際公開公報第98/10767号、国際公開公報第97/30034号、国際公開公報第97/49688号、国際公開公報第97/38983号、とりわけ、国際公開公報第96/30347号に開示されている化合物、たとえばCP358774として公知の化合物、国際公開公報第96/33980号に開示されている化合物、たとえば、化合物ZD1839;ならびに国際公開公報第95/03283号に開示されている化合物、たとえば、化合物ZM105180、たとえば、トラスツズマブ (Herceptin (登録商標))、セツキシマブ、ゲフィチニブ (Iressa)、エルロチニブ (Tarceva (商標))、CI-1033、EKB-569、GW-2016、E1.1、E2.4、E2.5、E6.2、E6.4、E2.11、E6.3またはE7.6.3、および7H-ピロロ-[2,3-ピリミジン誘導体 (国際公開公報第03/013541号に開示されている) である。

10

20

30

#### 【0149】

さらなる抗血管形成化合物は、それらの活性に対して別のメカニズムを有する、たとえばタンパク質または脂質キナーゼ阻害に関連しない化合物、たとえばサリドマイド (THALOMID) およびTNP-470を含む。

#### 【0150】

用語「シクロオキシゲナーゼ阻害剤」としては、本明細書において使用される場合、たとえばCox-2阻害剤、5-アルキル置換2-アリアルアミノフェニル酢酸および誘導体、たとえば、セレコキシブ (CELEBREX)、ロフェコキシブ (VIOXX)、エトリコキシブ、バルデコキシブ (BEXTRA) または5-アルキル-2-アリアルアミノフェニル酢酸、たとえば、5-メチル-2-(2'-クロロ-6'-フルオロアニリノ)フェニル酢酸 (ルミラコキシブ、PREXIGE) が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

40

#### 【0151】

用語「ビスホスホネート」としては、本明細書において使用される場合、エトリドロン酸 (etidronic acid)、クロドロン酸、チルドロン酸、パミドロン酸、アレンドロン酸、イバンドロン酸、リセドロン酸およびゾレドロン酸が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

50

## 【0152】

用語「ヘパラーゼ阻害剤」は、本明細書において使用される場合、ヘパリン硫酸分解を標的化、減少または阻害する化合物を指す。該用語としては、PI-88を含むが、それに限定されるわけではない。

## 【0153】

用語「テロメラーゼ阻害剤」は、本明細書において使用される場合、テロメラーゼの活性を標的化、減少または阻害する化合物を指す。テロメラーゼの活性を標的化、減少または阻害する化合物は、とりわけテロメラーゼ受容体を阻害する化合物、たとえばテロメスタチンである。

## 【0154】

用語「メチオニンアミノペプチダーゼ阻害剤」は、本明細書において使用される場合、メチオニンアミノペプチダーゼの活性を標的化、減少または阻害する化合物を指す。メチオニンアミノペプチダーゼの活性を標的化、減少または阻害する化合物は、たとえばベンガミドまたはその誘導体である。

## 【0155】

用語「プロテアソーム阻害剤」は、本明細書において使用される場合、プロテアソームの活性を標的化、減少または阻害する化合物を指す。プロテアソームの活性を標的化、減少または阻害する化合物としては、たとえば、PS-341およびMLN341が挙げられる。

## 【0156】

用語「マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤」または「MMP阻害剤」としては、本明細書において使用される場合、コラーゲンペプチド模倣および非ペプチド模倣阻害剤；テトラサイクリン誘導体、たとえば、ヒドロキサメートペプチド模倣阻害剤バチマスタット；およびその経口的に生物が利用可能な類似体である、マリマスタット（BB-2516）、プリノマスタット（AG3340）、メタスタット（NSC683551）、BMS-279251、BAY12-9566、TAA 211、MMI270BまたはAAJ996が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

## 【0157】

用語「血液悪性疾患の処置に使用される作用物質」としては、本明細書において使用される場合、FMS様チロシンキナーゼ阻害剤、たとえば、Flt-3の活性を標的化、減少または阻害する化合物；インターフェロン；シトシンアラビノシド（Ara-C）；ビスルファン（bisulfan）；およびALK阻害剤、すなわち、未分化リンパ腫キナーゼ（ALK）を標的化、減少またはとりわけ阻害する化合物が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

## 【0158】

用語「FMS様チロシンキナーゼ阻害剤」としては、本明細書において使用される場合、FMS様チロシンキナーゼ受容体の活性を標的化、減少または阻害する化合物、たとえばとりわけFlt-3を阻害する化合物、タンパク質または抗体、たとえばPKC412、ミドスタウリン、スタウロスポリン誘導体、SU11248およびMLN518が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

## 【0159】

用語「HSP90阻害剤」としては、本明細書において使用される場合、HSP90の内因性ATPase活性を標的化、減少または阻害する化合物；ユビキチンプロテアソーム経路を介してHSP90クライアントタンパク質を分解、標的化、減少または阻害する化合物が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。HSP90の内因性ATPase活性を標的化、減少または阻害する化合物は、とりわけHSP90のATPase活性を阻害する化合物、タンパク質または抗体、たとえば17-アシルアミノ-17-デメトキシゲルダナマイシン（17-AAG）、ゲルダナマイシン誘導体；他のゲルダナマイシン関連化合物；ラディシコールおよびHDAC阻害剤である。

## 【0160】

用語「ヒストンデアセチラーゼ阻害剤」または「HDAC阻害剤」は、ヒストンデアセチラーゼ（HDAC）の活性を標的化、減少またはとりわけ阻害する化合物、たとえば酪酸ナトリウムおよびヒドロキサミン酸サブエロイルアニリド（SAHA）に関する。特定のHDAC阻害剤

10

20

30

40

50

は、MS275、SAHA、FK228（以前はFR901228）、トリコスタチンAおよび米国特許第6,552,065号に開示されている化合物、特にN-ヒドロキシ-3-[4-[[[2-(2-メチル-7H-インドール-3-イル)-エチル]-アミノ]メチル]フェニル]-2E-2-プロペンアミドまたはその薬学的に許容される塩、およびN-ヒドロキシ-3-[4-[(2-ヒドロキシエチル){2-(7H-インドール-3-イル)エチル]-アミノ]メチル]フェニル]-2E-2-プロペンアミドまたはその薬学的に許容される塩、とりわけ乳酸塩を含む。

【0161】

用語「mTOR阻害剤」は、セリン/トレオニンmTORキナーゼファミリーの活性/機能を標的化、減少または阻害する化合物に関し、とりわけmTORキナーゼファミリーのメンバーを阻害する化合物、タンパク質または抗体、たとえばCCI-779、ABT578、SAR543、ラバマイシンおよびそれらの誘導体/類似体、AP23573およびAP23841（Ariad社）、エベロリムス（CERTICAN、RAD001）ならびにシロリムス（RAPAMUNE）である。

10

【0162】

「ソマトスタチン受容体アンタゴニスト」は、本明細書において使用される場合、ソマトスタチン受容体を標的化、処置または阻害する作用物質、たとえばオクトレオチドおよびSOM230を指す。用語「インテグリンアンタゴニスト」としては、本明細書において使用される場合、たとえば  $\alpha$ 3アンタゴニストおよび  $\alpha$ 5アンタゴニストが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【0163】

「腫瘍細胞傷害アプローチ」は、電離放射線等のアプローチを指す。上および以下に言及される用語「電離放射線」は、電磁波（たとえば、X線および  $\gamma$ 線）；または粒子（たとえば、 $\alpha$ 粒子および  $\beta$ 粒子）のいずれかを生じる電離放射線を意味する。電離放射線は、放射線療法において提供されるが、それらに限定されるわけではなく、当技術分野において公知である。Hellman, Cancer, 4<sup>th</sup> Edition, Vol. 1, Devita et al., Eds., pp. 248-275 (1993) を参照されたい。

20

【0164】

用語「抗白血病化合物」は、たとえば、Ara-C、すなわち、デオキシシチジンの2'-デオキシリボース（アラビノシド）誘導体である、ピリミジン類似体を含む。また、ヒポキサンチンのプリン類似体、6-メルカプトプリン（6-MP）およびリン酸フルダラビンも含まれる。

30

【0165】

用語「EDG結合剤」は、本明細書において使用される場合、FTY720のようなリンパ球再循環を調節する免疫抑制剤のクラスを指す。

【0166】

用語「リボヌクレオチドレダクターゼ阻害剤」は、フルダラビンおよび/またはAra-C；6-チオグアニン；5-FU；クラドリピン；6-メルカプトプリン（とりわけ、ALLに対してAra-Cと組み合わせたもの）；および/またはペントスタチンを含むが、それらに限定されるわけではない、ピリミジンまたはプリンヌクレオシド類似体を指す。リボヌクレオチドレダクターゼ阻害剤は、とりわけヒドロキシウレアまたは2-ヒドロキシ-7H-イソインドール-1,3-ジオン誘導体、たとえばPL-1、PL-2、PL-3、PL-4、PL-5、PL-6、PL-7またはPL-8である。Nandy et al., *Ada Oncologica*, Vol. 33, No. 8, pp. 953-961 (1994) 参照されたい。

40

【0167】

用語「S-アデノシルメチオニンデカルボキシラーゼ阻害剤」としては、本明細書において使用される場合、米国特許第5,461,076号に開示されている化合物が挙げられるが、それに限定されるわけではない。

【0168】

ACE阻害剤は、ベナゼプリル（CIBACEN）、エナゼプリル（enazepril）（LOTENSIN）、カプトプリル、エナラプリル、ホシノプリル、リシノプリル、モエキシプリル、キナプリル、ラミプリル、ペリンドプリルおよびトランドラプリルを含む。

50

## 【 0 1 6 9 】

細胞生物学および分子生物学における一般的な用語の定義は、"The Merck Manual of Diagnosis and Therapy", 19th Edition, published by Merck Research Laboratories, 2006 (ISBN 0-911910-19-0); Robert S. Porter et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); Benjamin Lewin, Genes X, published by Jones & Bartlett Publishing, 2009 (ISBN-10:0763766321); Kendrew et al. (eds.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8) and Current Protocols in Protein Sciences 2009, Wiley Intersciences, Coligan et al., eds.に見いだすことができる。

10

## 【 0 1 7 0 】

特に指示のない限り、本発明は、たとえば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3 ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA (2001); Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (1995); Current Protocols in Cell Biology (CPCB) (Juan S. Bonifacino et al. ed., John Wiley and Sons, Inc.), and Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique by R. Ian Freshney, Publisher: Wiley-Liss; 5th edition (2005), Animal Cell Culture Methods (Methods in Cell Biology, Vol. 57, Jennie P. Mather and David Barnes editors, Academic Press, 1st edition, 1998) (参照によってそれらの全体が本明細書に全て組み入れられる)に記載されるような標準的な手順を使用して実施した。

20

## 【 0 1 7 1 】

他の用語は、本明細書において、本発明の様々な局面の説明内で定義される。

## 【 0 1 7 2 】

本出願全体に引用される全ての特許および他の刊行物(参考文献、発行済み特許、公開済み特許出願および同時係属特許出願を含む)は、たとえば、本明細書に記載される技術と併せて使用され得るそのような刊行物に記載される方法論を記載および開示する目的で、参照によって本明細書に明示的に組み入れられる。これらの刊行物は、本出願の出願日の前に単にそれらの開示のために提供される。これに関して、本発明者らが、先行発明によってまたは任意の他の理由で、係る開示に先行する資格を有しないことを承認するものと解釈されるべきではない。これらの文書の日付に関する声明または内容に関する表示は全て、出願人が入手可能な情報に基づいており、これらの文書の日付または内容の正確性に関するいかなる承認も認められない。

30

## 【 0 1 7 3 】

本開示の態様の説明は、包括的であること、または本開示を開示された厳密な形態に限定することを意図していない。本開示の具体的な態様およびその例は、例示目的で本明細書に記載されているが、関連する技術分野の当業者に認識されるように様々な等価な変形が本開示の範囲内で可能である。たとえば、方法の工程または機能が所与の順序で示されているが、代替的な態様が異なる順序の機能を実施し得るか、または機能が実質的に同時に実施され得る。本明細書に提供される開示の教示は、必要に応じて他の手順または方法に適用されることができる。本明細書に記載される様々な態様は、組み合わせられてさらなる態様を提供することができる。本開示の局面は、必要ならば、上記参考文献および出願の組成物、機能および概念を用いるように変形することで、本開示の別のさらなる態様を提供することができる。これらのおよび他の変更は、詳細な説明に照らして本開示に対して行われることができる。そのような変形は全て、添付の特許請求の範囲内に含まれることを意図する。

40

## 【 0 1 7 4 】

前述の態様のいずれかの具体的な要素は、他の態様における要素と組み合わせられることができるかまたは他の態様における要素に置換されることができる。さらに、本開示の特定の態様に関連する利点がこれらの態様に照らして記載されているが、他の態様もそのよ

50

うな利点を提示し得、本開示の範囲内に入るために全ての態様が必ずしもそのような利点を提示する必要はない。

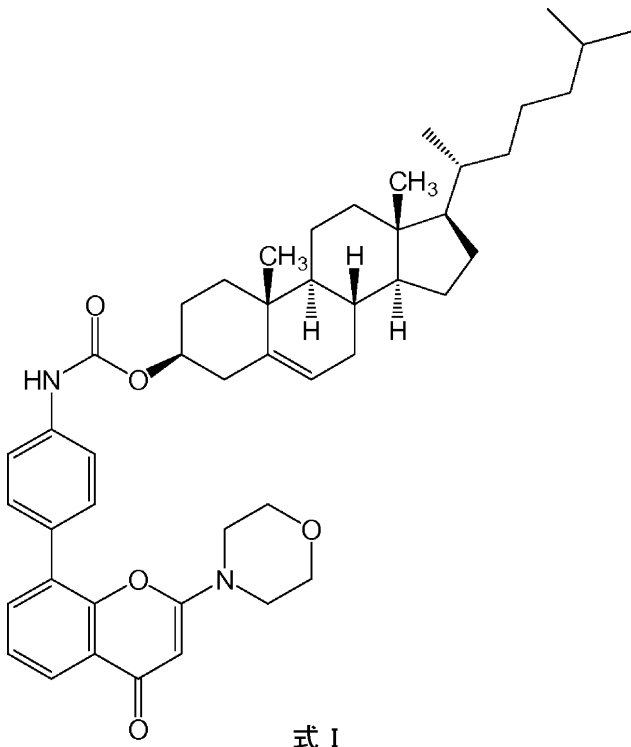
【0175】

本明細書に記載される技術は、以下の実施例によってさらに例示されるが、該実施例は、決して、さらに限定するものとして解釈されるべきではない。

【0176】

本明細書に記載される技術のいくつかの態様は、以下の番号付きのパラグラフのいずれかに従って定義され得る：

1. コレステロールにコンジュゲートされた化学療法剤を含む、コンジュゲート。
2. 両親媒性物質である、パラグラフ1のコンジュゲート。 10
3. 前記剤が、リンカーを介してコレステロールにコンジュゲートされる、パラグラフ1~2のいずれかのコンジュゲート。
4. リンカーが、-O-、-S-、-S-S-、-NR<sup>1</sup>-、-C(O)-、-C(O)O-、-C(O)NR<sup>1</sup>-、-SO-、-SO<sub>2</sub>-、-SO<sub>2</sub>NR<sup>1</sup>-、置換または非置換アルキル、置換または非置換アルケニル、置換または非置換アルキニル、アリールアルキル、アリールアルケニル、アリールアルキニル、ヘテロアリールアルキル、ヘテロアリールアルケニル、ヘテロアリールアルキニル、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロシクリルアルケニル、ヘテロシクリルアルキニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルキルアリールアルキル、アルキルアリールアルケニル、アルキルアリールアルキニル、アルケニルアリールアルキル、アルケニルアリールアルケニル、アルケニルアリールアルキニル、アルキニルアリールアルキル、アルキニルアリールアルケニル、アルキニルアリールアルキニル、アルキルヘテロアリールアルキル、アルキルヘテロアリールアルケニル、アルキルヘテロアリールアルキニル、アルケニルヘテロアリールアルキル、アルケニルヘテロアリールアルケニル、アルケニルヘテロアリールアルキニル、アルキニルヘテロアリールアルキル、アルキニルヘテロアリールアルケニル、アルキニルヘテロアリールアルキニル、アルキルヘテロシクリルアルキル、アルキルヘテロシクリルアルケニル、アルキルヘテロシクリルアルキニル、アルケニルヘテロシクリルアルキル、アルケニルヘテロシクリルアルケニル、アルケニルヘテロシクリルアルキニル、アルキニルヘテロシクリルアルキル、アルキニルヘテロシクリルアルケニル、アルキルアリール、アルケニルアリール、アルキニルアリール、アルキルヘテロアリール、アルケニルヘテロアリール、アルキニルヘテロアリールからなる群より選択され、1つまたは複数のメチレンが、0、S、S(O)、SO<sub>2</sub>、N(R<sup>1</sup>)<sub>2</sub>、C(O)、C(O)O、C(O)NR<sup>1</sup>、開裂可能な連結基、置換または非置換アリール、置換または非置換ヘテロアリール、置換または非置換複素環によって分断または終結されることが可能であり、R<sup>1</sup>が、水素、アシル、脂肪族または置換脂肪族である、パラグラフ3のコンジュゲート。
5. リンカーが、C(O)、C(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)、またはC(O)NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C(O)である、パラグラフ4のコンジュゲート。
6. 化学療法剤が、PI3K阻害剤である、パラグラフ1~5のいずれかのコンジュゲート。
7. PI3K阻害剤が、PI103、P1828、LY294002、ワートマニン、デメトキシピリジン、IC486068、IC87114、GDC-0941、ペリホシン、CAL101、PX-866、IPI-145、BAY80-6946、BEZ235、P6503、TGR1202、SF1126、INK1117、BKM120、IL147、XL765、パロミド529、GSK1059615、ZSTK474、PWT33597、TG100-115、CAL263、GNE-447、CUDC-907、およびAEZS-136からなる群より選択される、パラグラフ6のコンジュゲート。 40
8. PI3K阻害剤が、PI103およびP1828からなる群より選択される、パラグラフ7のコンジュゲート。
9. 式I：

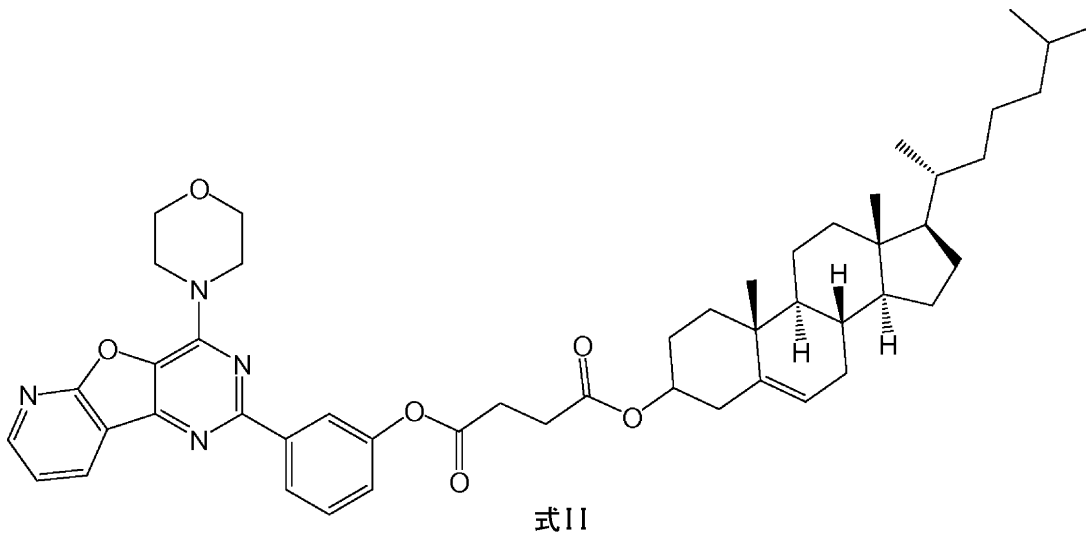


10

20

の構造を有する、パラグラフ6~8のいずれかのコンジュゲート。

10. 式II:



30

の構造を有する、パラグラフ6~8のいずれかのコンジュゲート。

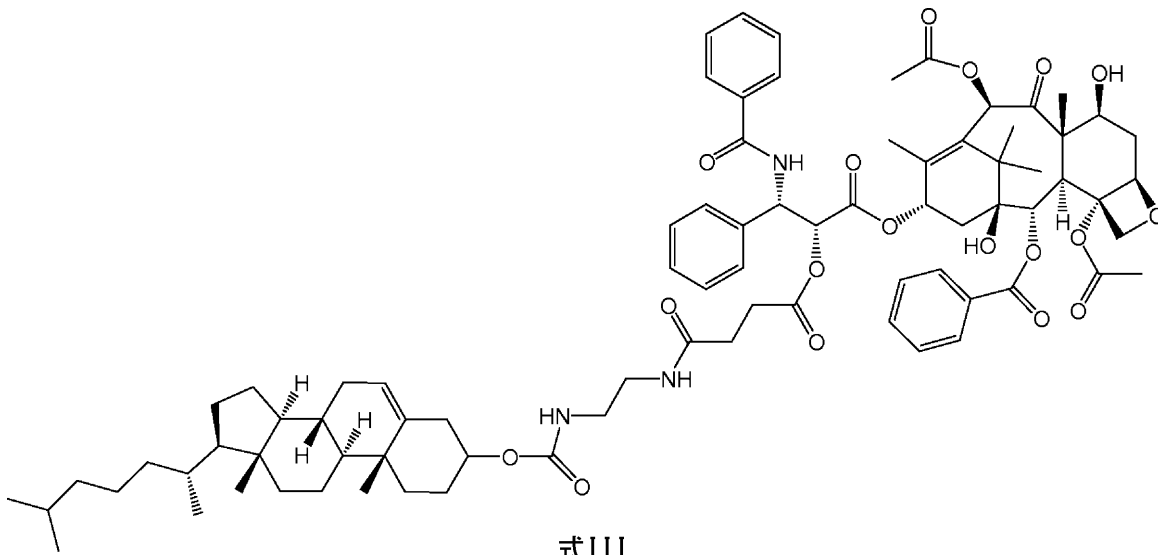
11. 化学療法剤が、タキサンである、パラグラフ1~5のいずれかのコンジュゲート。

12. タキサンが、パクリタキセルまたはドセタキセルである、パラグラフ11のコンジュゲート。

13. 式III:

40





10

の構造を有する、パラグラフ12のコンジュゲート。

14. パラグラフ1~13のいずれかのコンジュゲートを含む、組成物。

15. 約1%~約99%(w/w)のコンジュゲートを含む、パラグラフ14の組成物。

16. コンジュゲートに加えて脂質をさらに含む、パラグラフ14または15の組成物。

17. 約1%~約99%(w/w)の脂質を含む、パラグラフ16の組成物。

18. コンジュゲートおよび脂質を約10:1~約1:10の比で含む、パラグラフ16または17の組成物。

19. 脂質が、ポリエチレングリコール(PEG)でコンジュゲートされた脂質である、パラグラフ16~18のいずれかの組成物。

20. PEGでコンジュゲートされた脂質が、PEGでコンジュゲートされたジアシルグリセロールおよびジアルキルグリセロール、PEGでコンジュゲートされたホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジン酸、PEGでコンジュゲートされたセラミド、PEGでコンジュゲートされたジアルキルアミン、PEGでコンジュゲートされた1,2-ジアシルオキシプロパン-3-アミンおよびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、パラグラフ19の組成物。

21. PEGでコンジュゲートされた脂質が、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[アミノ(ポリエチレングリコール)-2000](DSPE-PEG2000)である、パラグラフ20の組成物。

22. リン脂質をさらに含む、パラグラフ14~21のいずれかの組成物。

23. 約1%~約99%(w/w)のリン脂質を含む、パラグラフ14の組成物。

24. コンジュゲートおよびリン脂質を約10:1~約1:10の比で含む、パラグラフ22または23の組成物。

25. リン脂質および脂質を約10:1~約1:10の比で含む、パラグラフ22~24のいずれかの組成物。

26. リン脂質が、ホスファチジルコリン、6~22個の炭素原子を有するアシル基を持つホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸、ホスファチジルセリン、スフィンゴミエリン、ホスファチジルグリセロール、およびそれらの任意の組み合わせから選択される、パラグラフ25の組成物。

27. リン脂質が、ホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール、レシチン、  
 , -ジパルミトイル- -レシチン、スフィンゴミエリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、N-(2,3-ジ(9-(Z)-オクタデセニルオキシ))-プロパ-1-イル-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド、ホスファチジルエタノールアミン、リゾレシチン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、セファリン、カルジオリピン、セレブロシド、ジセチルホスフェート、ジオレオイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール、ジオレオ

20

30

40

50

イルホスファチジルグリセロール、パルミトイル-オレオイル-ホスファチジルコリン、ジ-ステアロイル-ホスファチジルコリン、ステアロイル-パルミトイル-ホスファチジルコリン、ジ-パルミトイル-ホスファチジリエタノールアミン、ジ-ステアロイル-ホスファチジリエタノールアミン、ジ-ミリストイル-ホスファチジルセリン、ジ-オレイル-ホスファチジルコリン、ジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC)、ジオレオイルホスファチジリエタノールアミン (DOPE)、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン (POPC)、卵ホスファチジルコリン (EPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)、ジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール (DOPG)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール (DPPG)、-ホスファチジリエタノールアミン (POPE)、ジオレオイル-ホスファチジリエタノールアミン4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシレート (DOPE-mal)、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、パラグラフ26の組成物。

10

28. ホスファチジルコリンが、L- $\alpha$ -ホスファチジルコリンである、パラグラフ27の組成物。

29. 標的作用物質をさらに含む、パラグラフ14~28のいずれかの組成物。

30. 標的作用物質が、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、酵素、ペプチド模倣体、糖タンパク質、抗体 (モノクローナルまたはポリクローナル) ならびにそれらの一部および断片、レクチン、ヌクレオシド、ヌクレオチド、ヌクレオシドおよびヌクレオチド類似体、核酸、単糖、二糖、三糖、オリゴ糖、多糖、リポ多糖、ビタミン、ステロイド、ホルモン、補因子、受容体、受容体リガンド、ならびにそれらの類似体および誘導体からなる群より選択される、パラグラフ29の組成物。

20

31. 標的作用物質が、iRGDである、パラグラフ30の組成物。

32. パラグラフ1~13のいずれかの2つ以上の異なるコンジュゲートを含む、パラグラフ14~31のいずれかの組成物。

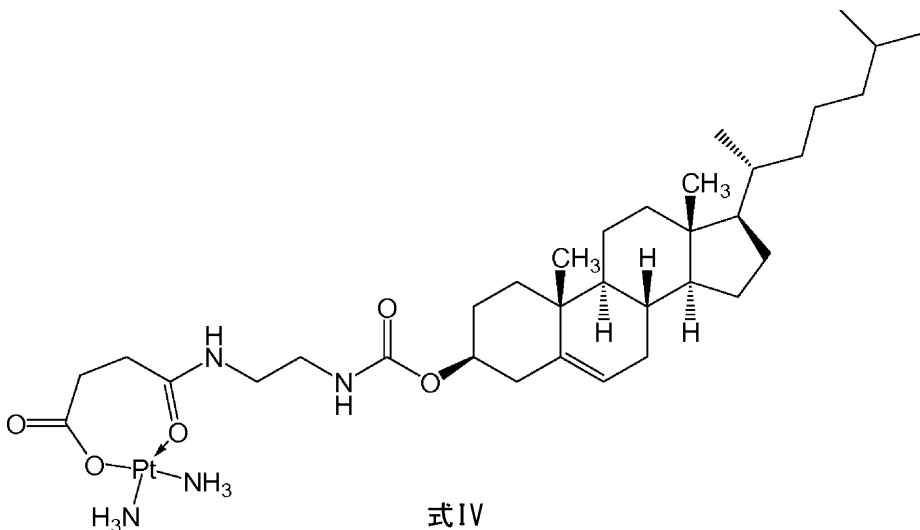
33. コンジュゲートに加え抗癌剤をさらに含む、パラグラフ14~32のいずれかの組成物。

34. 抗癌剤が、白金化合物、パクリタキセル、カルボプラチン、ボルテゾミブ、ポリノスタット、リツキシマブ、テモゾロミド、ラパマイシン、アルキル化剤、シクロホスファミド、スルホン酸アルキル、ブスルファン、インプロスルファン、ピボスルファン、アジリジン、エチレンイミン、メチルアメラミン (methyamelamine)、アセトゲニン、カンプトセシン、クリプトフィシン、ナイトロジェンマスタード、ニトロソウレア、抗生物質、エンジン抗生物質、ビスホスホネート、ドキシソルピシン、マイトマイシン、代謝拮抗剤、葉酸類似体、プリン類似体、ピリミジン類似体、アンドロゲン、抗副腎剤、エポチロン、マイタンシノイド、トリコテセン、ゲムシタピン、6-チオグアニン、メルカプトプリン、メトトレキサート、ビンブラスチン、エトポシド、イホスファミド、ミトキサントロン、ピンクリスチン、ピノレルピン、ノバントロン、テニポシド、エダトレキサート、ダウノマイシン、アミノプテリン、ゼローダ、イバンドロネート、イリノテカン、トポイソメラーゼ阻害剤、レチノイド、カペシタピン、コンプレタスタチン、ロイコボリン、ラパチニブ、およびエルロチニブである、パラグラフ33の組成物。

30

40

35. 白金化合物が、式 (IV) :



10

の化合物である、パラグラフ34の組成物。

36. 中性脂質、陽イオン性脂質、陰イオン性脂質、両親媒性脂質、ステロール、またはプログラム可能な融合脂質をさらに含む、パラグラフ14~35のいずれかの組成物。

37. コンジュゲート、PEGでコンジュゲートされた脂質、およびリン脂質を含む、パラグラフ14~36のいずれかの組成物。

38. PEGでコンジュゲートされた脂質がDSPE-PEG2000であり、リン脂質がホスファチジルコリンである、パラグラフ37の組成物。

20

39. コンジュゲート、PEGでコンジュゲートされた脂質、およびリン脂質を、約10~0.1:10~0.1:10~0.1の比で含む、パラグラフ37または38の組成物。

40. 比が、約1.4:1:3または約10:5:1である、パラグラフ39の組成物。

41. ナノ粒子である、パラグラフ14~38のいずれかの組成物。

42. ナノ粒子が、約5nm~約500nmの直径である、パラグラフ41の組成物。

43. ナノ粒子が、約200nm未満の直径である、パラグラフ41の組成物。

44. パラグラフ1~43のいずれかの組成物と、任意で薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。

45. パラグラフ1~43のいずれかの組成物を癌の処置を必要とする患者に投与する工程を含む、癌を処置する方法。

30

46. 癌が、乳癌、卵巣癌、神経膠腫、消化管癌、前立腺癌、癌腫、肺癌腫、肝細胞癌、精巣癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、膀胱癌、頭頸部癌、肺癌、胃食道癌、および婦人科癌からなる群より選択される、パラグラフ45の方法。

47. 対象が、異常なPI3Kを伴う腫瘍細胞を有すると判定された、パラグラフ45~46のいずれかの方法。

48. 1つまたは複数の追加の抗癌治療を患者に同時に施す工程をさらに含む、パラグラフ45~47のいずれかの方法。

49. 追加の治療が、外科手術、化学療法、放射線療法、温熱療法、免疫療法、ホルモン療法、レーザー療法、抗血管新生療法、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、パラグラフ48の方法。

40

50. 追加の治療が、抗癌剤を患者に投与することを含む、パラグラフ48の方法。

51. パラグラフ1~43のいずれかの組成物を血糖値の低下を必要とする対象に投与する工程を含む、血糖値を低下させる方法。

52. 前記方法が、パラグラフ1~43のいずれかの組成物を癌の処置を必要とする患者に投与する工程を含む、癌を処置するためのパラグラフ1~43のいずれかの組成物の使用。

53. 癌が、乳癌、卵巣癌、神経膠腫、消化管癌、前立腺癌、癌腫、肺癌腫、肝細胞癌、精巣癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、膀胱癌、頭頸部癌、肺癌、胃食道癌、および婦人科癌からなる群より選択される、パラグラフ52の使用。

54. 対象が、異常なPI3Kを伴う腫瘍細胞を有すると判定された、パラグラフ52~53のい

50

ずれかの使用。

55. 1つまたは複数の追加の抗癌治療を患者に同時に施す工程をさらに含む、パラグラフ52~54のいずれかの使用。

56. 追加の治療が、外科手術、化学療法、放射線療法、温熱療法、免疫療法、ホルモン療法、レーザー療法、抗血管新生療法、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、パラグラフ55の使用。

57. 追加の治療が、抗癌剤を患者に投与することを含む、パラグラフ55の使用。

58. パラグラフ1~43のいずれかの組成物を血糖値の低下を必要とする対象に投与する工程を含む、血糖値を低下させるためのパラグラフ1~43のいずれかの組成物の使用。

【実施例】

10

【0177】

実施例1：超分子ナノ粒子を使用したホスファチジルイノシトール3キナーゼの経時的阻害を介した抗腫瘍有効性の増強

この研究において、本発明者らは、ホスファチジルイノシトール3キナーゼ(PI3K)経路を標的化する超分子ナノ粒子の合理的設計の潜在的利点を実証する。20年前のその発見から、研究は、癌の病因における脂質キナーゼのPI3Kファミリーの中心性を確立してきた(6)。PI3Kの3つのクラスの中で、クラスIA PI3Kは、ヒトの癌の促進に最も関係しているPI3Kである(7)。

【0178】

PI3Kのp110 触媒サブユニットをコードするPIK3CA、および調節p85aサブユニットをコードするPIK3R1は、乳癌、神経膠腫、消化管癌、前立腺癌および婦人科癌を含む複数の原発腫瘍において体細胞変異されるかまたは増幅される(7)。また、PI3Kシグナル伝達経路の追加の調節因子も、複数の悪性腫瘍において通常調節解除される。たとえば、PI3Kシグナル伝達の阻害剤である脂質ホスファターゼPTENは、通常不活性化されている腫瘍抑制因子である(8)。また、この経路の活性化も、突然変異されたもしくは増幅されたチロシン受容体キナーゼのレベルで、またはAKTおよびRASの突然変異を介して生じ得る(7)。その結果として、PI3K経路を標的化する小分子阻害剤が刺激的な研究領域として出現し、p110の特異的な触媒サブユニット(a、13.8、y)を阻害するまたはpan-PI3K阻害剤として作用するいくつかの分子が現在開発中である(9)。

20

【0179】

しかしながら、最近の研究は、グルコース恒常性においても主要な役割を果たすとしてp110を示している(10)。実際に、pan-クラスI選択的PI3K阻害剤(NVP-BKM120)を用いた第I相臨床試験からの最近のデータは、用量依存的な高血糖を示し、これはおそらくPI3K阻害と一致するクラス効果の一例である(11)。さらに、研究は、リボソームタンパク質S6等の下流経路タンパク質のリン酸化を遮断するのに、より近位のAKTリン酸化を阻害するのに必要な濃度のおよそ10倍高い濃度のPI3K阻害剤が必要であり得ることを報告した(12)。本発明者らは、PI3K経路の標的化に関連するこれらの課題を克服するための自然なアプローチがナノ技術を使用するものであることを合理的に説明した。

30

【0180】

ナノ構造は、腫瘍内のリンパ液障害を伴う独自の漏出性の血管原性腫瘍血管系を利用することができ、増強された浸透および保持(EPR)効果から生じる腫瘍内薬物濃度の増加をもたらす(13)。しかしながら、ナノ製剤化のための従来のプロセスは、多くの化学療法剤の物理化学的特性と適合しないことが多くの場合にあり、このことが封入効率を制限するかまたは最適以下の放出動力学を導入する可能性がある。実際に、本発明者らのLY294002(最初期の依然として広く使用されているPI3K阻害剤の一つである)を封入する初期の試みは、最適以下の負荷効率をもたらし、これによって、インビボの腫瘍有効性研究への転換が妨げられた(14)。同様に、最近の研究において、ワートマニンがカプセル封入されたポリマーナノ粒子が放射線増感剤として作用することが示されたが(15)、そのような製剤は短期間に全て放出されることから制約があり、これが臨床への転換を困難にしている。

40

50

## 【0181】

最近の研究において、本発明者らは、従来のカプセル封入戦略を超えてナノスケール寸法での超分子集合を促進する分子の合理的再設計へと進む、新たな理論的枠組みを実証した(16)。この超分子ナノ化学の概念は、最初に、Jean Marie Lehnによって想定され、彼は、複雑なナノ構造が、非共有分子間力を介して相互作用する分子構成要素から生まれることができると仮定した(17、18)。ここで、本発明者らは、コレステロールとのコンジュゲーションに続くPI3K阻害剤の合理的修飾が、ナノ粒子への超分子集合を可能にすることを報告する。そのようなPI3Kを標的化する超分子ナノ粒子(SNP)は、抗腫瘍有効性が増強された所望の薬学的プロファイルを示し、標的化分子治療法の開発において新たな理論的枠組みとして出現し得る。

10

## 【0182】

## PI3Kを阻害するSNPの合成および特性決定

最近の研究において、本発明者らは、2つの異なるPI3K阻害剤のピリドフロピリミジンP1103およびP1828(8-プロモ-2-モルホリン-4-イル-クロメン-4-オン)を使用して、超分子ナノ粒子を工学設計した。P1828は、旧世代の広く使用されているPI3K阻害剤LY294002の誘導体であり、これは、アミンリンカーが環外フェニル置換基の4位の水素に挿入されており、カルバメート結合を介したコレステロールへのコンジュゲーションを可能にする(図1A)。過去の研究は、このリンカーを介したコンジュゲーションがPI3KクラスIAイソフォームの触媒部位に対する親和性を維持することを実証している(19)。しかしながら、LY294002のようなP1828は、弱い阻害剤である(19)。そのため、本発明者らは、低いナノモル範囲で優れた効力と、mTORと同様にクラスIA PI3Kに対する選択性を示すことが報告されているP1103を含めた(12)。しかしながら、P1103は、平面の三環式構造が限定的な水溶解度をもたらしたことおよびフェノールのヒドロキシル基が急速にグルクロン化されることから、臨床開発に適切であると見いだされなかった(12)。しかしながら、これらの特性から、P1103は、超分子ナノ粒子を工学設計するための最適な分子になった。図1Bに示すように、エステル結合を介して、フェノールのヒドロキシル基をコレステロール-コハク酸エステル複合体にコンジュゲートした。中間体および生成物は、<sup>1</sup>H、<sup>13</sup>C NMR分光法および質量分析法によって特徴付けた(図5~7)。

20

## 【0183】

本発明者らは、コレステロール-P1828コンジュゲートまたはコレステロール-P1103コンジュゲート、ホスファチジルコリン(PC)および1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[アミノ(ポリエチレングリコール)-2000](DSPE-PEG2000)から、最適化した重量比で、脂質-膜水和自己集合法を使用してSNPを工学設計した(20)(図1C)。その取り込み効率は、コレステロール-P1828SNPについては43%であり、P1103-コレステロールコンジュゲートSNPについては60±5%であった。図1Dに示すように、コレステロール-P1828コンジュゲートは、動的散乱によって決定したところ、108±8.9nmの流体力学直径を有するSNPの形成をもたらした(図1D)。P1103-SNPは、172±1.8nmの平均粒子直径を示した(図1E)。低温透過型電子顕微鏡(cryo-TEM)を使用した超微細構造分析(図1F)は、100nm以下の直径の主に単層構造の形成を明らかにした。TEM測定とDLS測定の間サイズの相違は、細網内皮系からのマスキングを促進することができるPEGコーティングから生じる、水和球に起因することができる(21)。加えて、P1103-SNPのアリコートが1か月にわたって保存し、ナノ構造の安定性の尺度としてサイズおよびゼータ電位を定期的に測定した。図1Gに示すように、この期間中にサイズまたはゼータ電位のいずれにおいても有意な経時的変動は観測されなかった。このことは、該製剤が安定であったことを示す。

30

40

## 【0184】

PI3K阻害剤の放出の経時的動力学を研究するために、SNPをリン酸緩衝食塩水中または細胞溶解物中のいずれかでインキュベートした。PBS中で放出された薬物の量は約20%で飽和したが、細胞溶解物中では薬物の持続放出が観測された(図1H、1I)。このことは、酸性条件および酵素(エステラーゼ)条件でリンカーが開裂したことと一致する。興味深

50

いことに、持続的でかつ増加性の薬物放出はPI103-SNPで観測されたが、P1828の放出速度は有意に低下した。これは、薬物とコレステロールの間のカルバメートリンカーが、PI103-SNP中のエステル結合より安定であることと一致する。

#### 【0185】

対照実験として、本発明者らはまた、PI103を脂質二重層中にカプセル封入したナノ粒子を工学設計した(図8A)。しかしながら、SNPで用いられる脂質比を使用すると、PI103の2%の最小取り込み効率がもたらされ、これは組成比を変えることによって30%まで最適化することができた(図8B)。図8Cに示すように、製剤からのPI103の持続放出が観測された。PI103がカプセル封入されたナノ粒子は、細胞生存率(図8D)およびインビトロにおけるAktリン酸化の阻害(図8E)に対して同様の効果を示したが、経時的光散乱研究は、時間と共にナノ粒子のサイズが増加したことを明らかにし(図8F)、このことから、これらのナノ粒子が不安定で沈殿することが示された(データは示さない)。結果として、このナノ粒子設計を用いてのさらなる研究は続行しなかった。

#### 【0186】

##### 超分子ナノ粒子のインビトロ有効性

本発明者らは、4T1マウス乳癌、MDA-MB-468ヒト乳癌細胞、およびPI3Kを過剰発現する4306卵巣癌細胞株を使用して、インビトロにおけるSNPの有効性を評価した。図2Aおよび2Bに示すように、4T1マウス乳癌細胞株に対する遊離PI103およびPI103-SNPのIC50値は、それぞれ、48時間で $121.5 \pm 3.15$ nMおよび $297.7 \pm 3.57$ nMであり、72時間で $67.26 \pm 3.4$ nMおよび $243.6 \pm 3.4$ nMであった。遊離PI103およびPI103-SNPで処置したMDA-MB-468ヒト乳癌細胞株におけるIC50値は、それぞれ、48時間で $0.445 \pm 0.067$ pMおよび $6.686 \pm 0.0108$ pMであり、72時間で $0.3121 \pm 0.049$ pMおよび $2.049 \pm 0.044$ pMであった(図2Cおよび2D)。4306卵巣癌細胞株については、遊離PI103およびPI103-SNPのIC50値は、それぞれ、48時間で $0.2863 \pm 0.045$ pMおよび $3.698 \pm 0.050$ pMであり、72時間で $0.3916 \pm 0.0493$ pMおよび $2.846 \pm 0.045$ pMであった(図2Eおよび2F)。ウエスタンブロット分析は、等モル濃度のPI103(5pM)では、遊離薬物とSNPの両方で阻害されたAktの基礎リン酸化が、48時間の連続インキュベーションで同等であることを示した(図2G)。興味深いことに、一方で、4時間の一過性の曝露は、遊離PI103の場合においてAktのリン酸化の反動的な増加をもたらしたが、一方で、SNP-PI103はより持続的にAktのリン酸化を阻害した(図2H~2K)。4時間でのPI103の細胞内濃度は、SNP-PI103よりも遊離薬物で処置した細胞においてより高かったが、18時間でのPI103濃度は、PI103-SNPで処置した細胞において依然高い水準にあり、一方、遊離薬物で処置した細胞では微量の薬物が検出されただけであった(図2L)。上記の観測と一致して、PI1828-SNPおよび遊離PI1828は、4T1細胞(図2M)および4306細胞(図2N)に対して同様の細胞傷害性効果を示した。PI103-SNPおよびPI1828-SNPで処置した細胞は、処置の36時間後に同様のAktリン酸化の阻害を示した(図2O)。

#### 【0187】

##### インビボ4T1乳癌モデルにおけるSNPの有効性

次に、本発明者らは、ERおよびPRに対して陰性でありかつ低レベルのマウスHer2/neu等価体を発現する、4T1細胞株におけるPI103-SNPの抗腫瘍有効性を調べた(22)。同系マウスに、4T1型の侵襲性で高転移性の乳癌を移植した。PI3K経路を構成する遺伝子の突然変異は、乳癌の>70%で起こる(23)。本発明者らは、4T1細胞がPI3Kシグナル伝達のアップレギュレーションを介した標準的な化学療法に対して生存応答を高めることを以前に実証している(24)。

#### 【0188】

本発明者らは、遊離薬物としてまたはPI103-SNPとして、5mg/kgのPI103に相当する用量で411腫瘍を有するマウスを処置した。平均腫瘍体積が $100\text{mm}^3$ に達したときに処置を開始した。図3A~3Cに示すように、PI103での処置は、PBS処置対照と比較して腫瘍成長阻害をもたらしたが、処置を停止した後に腫瘍の反動が観測された。対照的に、PI103-SNPでの処置は、研究期間にわたって持続した腫瘍成長阻害をもたらした。これは、SNP群の薬物のレベルが持続したことと一致した。単回注射後、腫瘍内のAktリン酸化は、ビヒクルで

処置した群と比較して、遊離薬物とPI103-SNPの両方によって阻害された(図3E)。PI103は、より効率的であるように思われるが、統計的に有意な差はなかった。興味深いことに、下流のシグナル伝達分子であるmTORおよび4EBPのリン酸化形態は、PI103で処置した腫瘍よりもPI103-SNPで処置した群でより強く阻害された( $P < 0.05$ 、 $t$ 検定)。

【0189】

「ホーミング」ペプチドを使用してナノ粒子を腫瘍に標的化することが抗腫瘍有効性を増加させるか否かを試験するために、別々の群の腫瘍マウスを、iRGDペプチドで表面修飾したPI103-SNPで処置した。図3A~3Cに示すように、そのような処置は、受動取り込みを介して蓄積するSNPを用いて得られた腫瘍阻害よりも大きい腫瘍阻害をもたらした。実際に、過去の観測は、iRGDでコーティングしたナノ構造が、腫瘍特異的かつニューロピリン-1依存的に溢出および組織浸透を増加させたことを示している(25)。腫瘍断面の落射蛍光イメージングは、FAMで標識されたiRGDでコーティングしたPI103-SNPの有意な腫瘍内局所化を明らかにした(データは示さない)。インビボ有効性の増加の根底にあるメカニズムを解明するために、処置後に腫瘍を摘出し、アポトーシス用のマーカーである末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼdUTPニック末端標識(TUNEL)を行った。PI103-SNPでの処置は、遊離PI103での処置よりも大きなアポトーシスをもたらした。iRGDでコーティングしたPI103-SNPは、最高レベルのアポトーシスを誘発し、その後PI103ナノ粒子および遊離PI103が続く。このことは、腫瘍阻害結果と一致する(データは示さない)。

【0190】

PI828-SNP(5mg/kgのPI828に相当、3用量)での処置はまた、インビボにおけるAktリン酸化に対し、遊離PI828と比較して優れた阻害効果(より強い腫瘍成長阻害に言い換えられる)を発揮した(図9A~9B)。しかしながら、この用量で、抗腫瘍有効性は、PI103-SNPを用いて達成された効果よりも有意に低かった。1つの説明としては、LY294002の類似体であるPI828は、PI3Kをマイクロモル範囲で阻害するが、一方でPI103はより強力である。しかしながら、PI103-SNPとPI828-SNPの両方がPI3Kシグナル伝達を阻害したとすると、活性剤の放出動力学は、有効性に重要な役割を果たしており、超分子ナノ粒子の設計において考慮される必要がある可能性が高い。

【0191】

インスリン耐性に及ぼすPI-103-SNPの効果

PI3Kは、真核生物の進化を通じて保存されるインスリンシグナル伝達の媒介において中心的な役割を果たす。p110 $\alpha$ アイソフォームとp110 $\beta$ アイソフォームの両方がインスリンシグナル伝達に参与しているが、グルコース恒常性の維持において主要なのは前者である(10)。そのため、本発明者らは、4T1乳癌モデルにおいてインスリン耐性に及ぼすPI103-SNPの効果調べた。過去の研究(12、20)と一致して、遊離PI-103を注射したマウスは、インスリン注射後に血糖値のわずかな低下を示しただけであった。対照的に、PI103-SNPでまたは対照として空のナノ粒子で事前処置したマウスにインスリンを注射した場合に、血糖値の有意な低下が観測された。

【0192】

インビボK-Ras<sup>LSL/+</sup>/Pten<sup>f1/f1</sup>卵巣癌モデルにおけるPI103-SNPの有効性

本発明者らはまた、K-Ras<sup>LSL/+</sup>/Pten<sup>f1/f1</sup>卵巣癌モデルにおけるPI-103-SNPの効果の評価した(26)。本発明者らは、Ptenを欠損する腫瘍がPI3Kシグナル伝達に依存的であると報告されているという理由で、このモデルを選択した(7)。一方、突然変異されたまたは活性化されたRasを提示する腫瘍は、PI3K阻害剤にあまり応答しないことが報告されている(7)。図4Aに示すように、腫瘍ルシフェラーゼシグナルの生物発光定量化は、3用量の遊離PI-103、PI103-SNP、およびiRGD-PI103-SNPが、ビヒクル対照と比較して、有意な腫瘍退縮をもたらしたことを示す。iRGD-PI-103-SNPの生物発光応答は、5サイクルの処置と比較して3サイクルの処置後に、遊離PI-103よりも統計的に有意に高かったが、これは、iRGDが腫瘍内への浸透および蓄積を促進するという過去の観測と一致する。いずれの処置群においても体重の変化は、観測されなかった(図4C)。異なる群からの腫瘍試料のウエスタンブロット分析によって評価したところ、PI3K/mTOR経路マーカーの発現レベルは

、PI-103ナノ粒子群およびiRGDでコーティングしたPI103ナノ粒子群において、遊離PI-103と比較して、ホスホ-mTOR、ホスホ-AKT、ホスホ-S6、およびホスホ-4EBP1の活性化の有意な阻害を示した(図4D)。

#### 【0193】

超分子ナノ化学、すなわち、非共有分子間力を介して相互作用する分子構成要素からの複雑な化学ナノ構造の開発は、癌セラノスティクスにおいて新たに出現した概念である。実際に、最近の研究において、ガドリニウム(gadolinium)(III)がカプセル封入された超分子ナノ粒子が癌転移の診断において使用された(27)。同様に、本発明者らは、構造活性相関の使用が、白金細胞傷害薬の超分子ナノ構造への集合を促進し、抗腫瘍有効性の増加および腎臓毒性の低下をもたらすことができることを実証した(16)。ここで、本発明者らは、超分子ナノ化学が、PI3Kシグナル伝達経路の効率的な阻害を促進する、分子標的化治療法まで拡張され得ることができると実証する。

10

#### 【0194】

抗癌剤を固体腫瘍に優先的に標的化するためのナノ技術の使用がより一層調査されているが、ナノ製剤の合成のための従来のプロセスは、多くの化学療法剤の物理化学的特性と適合しないことが多くの場合あり、このことが封入効率を制限するかまたは最適以下の放出動力学を導入する。実際に、本発明者らの最近の研究において、本発明者らは、PI103をカプセル封入する試みが、最適以下の負荷率または不安定なナノ粒子の形成をもたらしたことを観測した。そのような課題は、ナノ技術が優れているにもかかわらず、臨床へと転換されているナノ医薬の数を制限している。対照的に、観測された安定性と共にSNPへのより高い取り込み効率は、SNPが臨床への転換を促進し得ることができると示す。

20

#### 【0195】

PI3K阻害剤の臨床への転換が課題となっている(28)。主要な難題はバイオマーカーの選択であるが、ほとんどの研究はAktのリン酸化状態に頼っている(29)。これらの研究と一致して、本発明者らは、卵巣癌モデルにおけるSNP処置が、遊離PI103と比較して、Aktのリン酸化の有意に大きい阻害、ならびに下流のシグナル伝達分子mTOR、S6および4E-BP1のリン酸化の有意に大きい阻害をもたらしたことを観測した。興味深いことに、卵巣癌よりも処置後遅い時点で摘出した乳房腫瘍において、本発明者らは、ホスホ-AktレベルがSNP群と遊離薬物群の場合で同様であったことを観測した。しかしながら、mTORおよびS6キナーゼのリン酸化状態は、SNPでの処置後に有意に阻害され、このことは、遊離薬物と比較して抗腫瘍有効性が増加したこととよく相関した。これらの結果は、下流のシグナルが上流のAktよりもPI3K阻害の有効性の優れたバイオマーカーとなり得ることを示唆している。このバイオマーカー間の予測能力の違いは、おそらく、治療濃度のPI103によって達成される二成分イオン状態の阻害(薬物が急速に除去されるとすぐにスイッチ「オフ」になり得る)と比較して、超分子ナノ粒子からの活性剤の持続放出から生じる阻害が経時的であるためであると詳細に分析されている(12)。

30

#### 【0196】

超分子ナノ粒子を使用して達成されるPI3Kシグナル伝達の持続的阻害は、PI3K阻害剤の臨床への転換において直面する別の課題を潜在的に克服することができる。最近の研究において明らかのように、遊離薬物(PI103)への急性期曝露は、遅い時点でホスホ-Aktレベルの増加をもたらした。そのような経路の反動的な活性化は、過去の報告と一致し(28、30)、受容体チロシンキナーゼのアプレギュレーションを介した恒常性のフィードバックループから生じると報告されている。同様に、mTORC1の阻害は、S6KからIRS1への負のループを軽減し、IGFR1およびPI3K-Aktの活性化を導くことができる(31)。興味深いことに、PI103-SNPでの処置は、ホスホ-Aktシグナルの持続的阻害から明らかのように、このフィードバックループを潜在的に克服することもできる。その理由は、SNPを用いて達成されたPI103の細胞内濃度が、細胞が遊離薬物に曝露された場合よりも高いことであり得る。実際に、最近の論評で、Englemanらは、PI3K阻害剤の有効性の欠損が、標的の不適切な阻害によるものであるか否かまたは標的の完全な阻害が抗腫瘍活性を生じるのに十分でないためであるか否かという問題を提起している(31)。今回の結果は、経路の阻害

40

50



のレベルに加えて、持続放出および標的阻害に関する経時性が抗腫瘍の成果を決定する際の重要な要素となり得ることを示す。興味深いことに、PI103から現在の臨床候補であるGDC-0941の発展の間にも同様の観測がなされ、この観測において、Aktリン酸化が数時間で約90%阻害されることが抗腫瘍活性にとっての必要条件であると考えられたが、このことは、薬物動態学的曝露と薬力学的バイオマーカーの関係が変化することを立証している(9)。

#### 【0197】

この研究において達成された、遊離薬物の細胞内濃度の増加に加えて腫瘍中に受動的に蓄積するナノ粒子の能力は、腫瘍内アポトーシスの増加を可能にする。本発明者らはまた、iRGDペプチド等の活性な標的部分をナノ粒子表面に置くことによってその有効性がさらに改善されることを実証する。第二に、PI3K経路の長期阻害および「フィードバックループ」の欠如をもたらす持続放出は、阻害の継続期間が薬物濃度に加え臨床的成功において重要な決定因子であることもできるという興味深い可能性を生じる。興味深いことに、今回の結果はまた、慣用のツールが空間軸または濃度軸における生物学的相互作用の詳細な分析を促進することができるが、ナノ化学の使用は時間軸における詳細な分析を潜在的に可能にすることができることを強調する。第三に、PI103を含むp110a阻害剤に関連するクラス効果である、PI103-SNPによるインスリン耐性の欠如は、超分子ナノ化学が治療指数に有意に影響することができることを示す。加えて、超分子集合を促進するための化学構造の合理的最適化は、PI103等の親分子に関連する既存の制限を克服し、それによって臨床への転換に失敗した有望な薬物候補が復活する可能性が広がり、それによって薬物バイプラインの減少を再び高めることができる。

10

20

#### 【0198】

材料および方法

SNPの合成および特性決定

PI103-SNPまたはPI828-SNPの合成のために、L- $\alpha$ -ホスファチジルコリン、薬物-コレステロールコンジュゲートおよびDSPE-PEGを(最適化した重量比で)1.0mLのDCMに溶解した。PI103がカプセル封入されたナノ粒子については、L- $\alpha$ -ホスファチジルコリン、コレステロール、DSPE-PEG、およびPI103を異なる重量比で量り取り、PI103をメタノールに溶解する一方、コレステロール、DSPE-PEG、およびホスファチジルコリンは、脱水DCMに溶解した。得られた溶液を丸底フラスコ中でロータリーエバポレーターを用いて蒸発させ、完全に乾燥させた。得られた薄膜を55℃で2時間定速回転させながらPBSで水和した。

30

#### 【0199】

ナノ粒子をSephadexカラムに通して溶出し、続いて、ハンドヘルド小型押出機(フィルターサイズ200nm)によって押出した。サイズをDLSによってチェックし、薬物負荷率を紫外可視分光法によって決定した。放出動力学研究のために、薬物を負荷したナノ粒子(薬物1mg/ml、5ml)を、フロート-a-ライザー(float-a-lyzer)透析管(MWCO=3500ダルトン、Spectrum Lab)中で、PBS緩衝液(pH7.4)、4T1細胞溶解物または4306細胞溶解物に懸濁した。透析管を穏やかに攪拌しながら1LのPBS(pH7.4)に浮遊させ、無限沈下タンク状態をシミュレートした。アリコートの一部100 $\mu$ Lを所定の時間間隔で試料から回収し、等体積のPBS緩衝液に置き換えて、放出された薬物をUV-MS分光光度計によって定量化した。

40

#### 【0200】

細胞生存率アッセイ

4T1乳癌細胞およびMDA MB468乳癌細胞をRPMI中で培養し、4306卵巣癌細胞は10%FBSおよび1%の抗生物質-抗真菌剤100 $\times$ 溶液を補填したDMEM中で培養した。4 $\times$ 10<sup>3</sup>個の細胞を96ウェル平底プレートに播種した。遊離薬物または薬物を負荷したナノ粒子(遊離薬物当量に正規化した)を各96ウェルプレート中に3連で加え、次に、プレートを5%CO<sub>2</sub>雰囲気中、37℃でインキュベートした。所望の期間インキュベーションした後、細胞を洗浄し、20 $\mu$ LのCellTiter 96 Aqueous One Solution試薬(PROMEGA, WI)を含有する100 $\mu$ Lのフェノールレッド不含培地(FBSなし)と共にインキュベートした。2時間インキュベーション

50

ンした後、各ウェルの吸光度を記録した。

【0201】

PI103-SNPの内在化アッセイ

4T1乳癌細胞 ( $1 \times 10^6$  個の細胞) を10mlのペトリディッシュに播種し、遊離PI103または等量のPI103-SNPと共にインキュベートした。5%CO<sub>2</sub> 雰囲気中、37℃で4時間インキュベーションした後、細胞をPBSで3回洗浄し、新しい培地を補充した。所望の時間インキュベーションした後、 $2 \times 10^8$  個の細胞を各試料から溶解し、遠心分離して、上清を回収した。対照として薬物不含細胞を使用して、試料中の薬物の量を紫外可視分光法によって測定した。

【0202】

ウエスタンブロットアッセイ

ウエスタンブロットのために、 $5 \times 10^4$  個の細胞を6ウェルプレートの各ウェルに播種し、遊離薬物または等量の薬物を負荷したナノ粒子と適当な濃度で24時間インキュベートし、続いて、氷冷PBSで洗浄した。タンパク質を回収し、タンパク質溶解物を電気泳動した。次に、膜を、ホスホAKT、トータルAKT、およびアクチン抗体と共に4℃で一晩インキュベートした。TBSTで適当回数洗浄した後、ホースラディッシュペルオキシダーゼコンジュゲート二次抗体と共に膜を1時間インキュベートした。G-box (Syngene) を使用して検出を行って、イメージJソフトウェアによってデンストメトリー定量化を行った。

【0203】

マウス4T1乳癌モデルにおけるSNPの有効性研究

4T1乳癌細胞 ( $1 \times 10^8$ ) を4週齢のBALB/cマウスの側腹に皮下移植した。薬物療法を9日目に開始した。薬物療法は、PBS (対照群について)、遊離薬物 (5mg/kg) およびSNP (5mg/kg) の投与からなった。PI103-SNPについては、薬物療法はまた、iRGD-PI103-SNP群 (5mg/kg) からなった。腫瘍体積および体重を11日間にわたって隔日毎にモニタリングした。腫瘍体積を式  $L \times B^2 / 2$  を使用することによって計算し、腫瘍体積の増加量を  $V_t / V_0$  として計算した ( $V_0$  は、初回注射時点での腫瘍体積とした)。動物の取扱手順は全て、Harvard Institutional Use and Care of Animals Committeeによって承認されたものとした。

【0204】

PI103-SNPを使用したインスリン耐性試験

無作為に給餌させたマウス (マウス4T1乳癌モデル) に、尾静脈注射を介して単回用量の空のナノ粒子 (対照)、遊離PI-103 (5mg/kg) およびPI103-SNPを注射した。新たに調製した0.9%NaCl (0.1ml) 中のインスリン溶液 (0.75U/Kg) を、薬物投与の1時間後にマウスに腹腔内注射した。血糖値計を使用してインスリン注射の前および45分後の血糖値を測定した。

【0205】

マウス卵巣癌腫瘍モデルにおけるPI103-SNPの有効性研究

アデノウイルス保有Creリコンビナーゼの滑液嚢内送達を介して、遺伝子操作したK-Ras<sup>LSL/+</sup>/Pten<sup>f1/f1</sup>マウスで卵巣腺癌を誘発した。腫瘍細胞もAdeno-Creによって一旦活性化されたルシフェラーゼを発現するように操作して、薬物処置前および後の腫瘍イメージングを可能にした。マウスに中型~大型の腫瘍ができたなら、これらを4つの処置群 (ピヒクル、遊離PI-103 5mg/kg、PI-103-SNP 5mg/kg、およびiRGD-PI103-SNP 5mg/kg) の1つに分け、尾静脈注射を介して全ての薬物を投与した。IVIS Lumina II Imaging Systemを使用してインビボでの腫瘍イメージングを実施した。生物発光の定量化は、Living Image Software 3.1 (Caliper Life Sciences) を使用することによって達成した。初期処置の前日 (0日目、ベースライン画像)、3回の処置後、および5回の処置後の日に撮像した。

【0206】

インビボ腫瘍試料のウエスタンブロットアッセイ

動物組織については、-80℃で保存した腫瘍を、液体窒素を使用し乳鉢中にて乳棒で粉碎し、次に、RIPA緩衝液で処理してタンパク質を抽出した。タンパク質の量をBCAアッセイによって測定して、等量のタンパク質溶解物をポリアクリルアミドゲル上で電気泳動し

10

20

30

40

50

、次に、ポリニフッ化ビニリデン膜 (BIO-RAD) に転写して、5% 乳液中でブロッキングした。次に、膜を適当な濃度の一次抗体と共に4 で一晩、次に、ホースラディッシュペルオキシダーゼコンジュゲート二次抗体と共に1時間インキュベートした。SYNGENE社のG-boxを使用して検出を行って、IMAGE-Jソフトウェアによってデンシトメトリー定量化を行った。

#### 【0207】

##### 腫瘍スライスの染色およびイメージング

IHCおよびTUNEL研究のために、Harvard Medical School Core facilityで、腫瘍スライス (5Am) をOCT培地中で凍結した後に切り取った。iRGD標的化画像については、これらの切片をNikon TE2000顕微鏡の緑色フィルター下で直接イメージングした。TUNELイメージング研究のために、腫瘍切片を、標準TMR赤色蛍光末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ媒介dUTPニック末端標識 (TUNEL) キット (In Situ Cell Death Detection Kit, TMR-Red, Roche) で製造業者のプロトコールに従って染色した。赤色フィルターを備えたNikon Eclipse TE2000蛍光顕微鏡を使用して画像を得た。FAM-1RGDをタグ付加したPI 103-コレステロールの有意な内在化をイメージングした。血管をvWF染色キットで染色した。

10

#### 【0208】

##### 統計学

統計分析は、両側スチューデントのt検定および一元配置ANOVA分析、その後のNewman-Keulsのポストホック検定によって決定した。p < 0.05は、有意差を示すものと見なした。

20

#### 【0209】

##### 補足材料および方法

化学試薬は全て分析グレードであり、特に指示しない限りさらに精製することなく供給されたものをそのまま使用した。反応は全て、他に指示のない限り不活性条件下で実施した。

#### 【0210】

ジクロロメタン (DCM)、無水DCM、メタノール、コレステロール、ジメチルアミノピリジン (DMAP)、コハク酸無水物、硫酸ナトリウム、ピリジン、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (EDC)、L-a-ホスファチジルコリン、およびSephadex G-25は、SIGMA-ALDRICHから購入した。PI-103は、SELLECKCHEMから購入した。1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N4アミノ (ポリエチレングリコール) 2000] および小型ハンドヘルド押出機キット (0.2µmのWhatman Nucleopore Track-Etch Membrane、Whatmanフィルターサポート、および1.0mLのHamiltonianシリンジを含む) は、AVANTI POLAR LIPIDS INCから購入した。分析用薄層クロマトグラフィー (TLC) は、EMD LABORATORIESから購入したプレコートシリカゲルアルミニウムシート60 F254を使用して実施した。TLCプレート上のスポットは、UV光下で、および/または過マンガン酸アルカリ溶液での処理、続く加熱によって可視化した。MTS試薬は、PROMEGAによって支給された。カラムクロマトグラフィーは、QUALIGENS社のシリカゲル (230~400メッシュ) を使用して実施した。<sup>1</sup>Hおよび<sup>13</sup>C NMRスペクトルは、Bruker DPX 400MHz分光計で記録した。化学シフトは、<sup>13</sup>Cおよび基準としての重水素化溶媒からの残留<sup>1</sup>Hシグナルを使用して6 (ppm) 単位で報告する。スペクトルは、Mest-Re-C Lite (Mestrelab Research) および/またはXWinPlot (Bruker Biospin) で分析した。エレクトロスプレーイオン化質量スペクトルは、Micromass Q Tof 2 (WATERS) で記録し、データはMASSLYNX 4.0 (WATERS) ソフトウェアで分析した。

30

40

#### 【0211】

##### PI103-コレステロールコンジュゲートの合成

コレステロール (500mg、1.29mmol) を5mlの無水ピリジンに溶解した。コハク酸無水物 (645mg、6.45mmol) および触媒量のDMAPを反応混合物に加えて、清澄な溶液を生成した。反応混合物をアルゴンでフラッシュし、アルゴン雰囲気下で12時間攪拌した。次に、ピリジンを真空下で除去し、粗残渣を30mlのDCM中で希釈した。これを1N HCl (30ml) およ

50

び水 (30ml) で洗浄した。有機層を分離し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮した。反応の完了は、メタノール : DCM (1 : 99) 溶媒混合物でTLCを実施することによって確認した。生成物をさらに精製することなく次の工程に使用した。PI-103 (25mg, 0.072mmol) を3mlの無水DCMに溶解し、続いて、コレステロール-コハク酸 (0.216mmol, 105mg)、EDC (0.216mmol, 41.4mg) およびDMAP (0.216, 26mg) を加えた。反応混合物を、アルゴン下、室温で12時間攪拌した。TLCによってモニタリングして反応が完了したら、反応混合物を10mlのDCMで希釈し、希HClおよび水で洗浄した。有機層を分離し、合わせて、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を真空下で蒸発させ、カラムクロマトグラフィーを使用してメタノール : 塩化メチレン勾配で溶出することによって粗生成物を精製して、PI-103コレステロールコンジュゲートを明黄色の固体 (52mg, 90%) として得た。

10

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz):  $\delta$  8.65 — 8.53 (m, 1H),

8.36 (d,  $J$  8.3 Hz, 1H), 8.19 (d,  $J$  = 1.7 Hz, 1H), 7.56-7.41 (m, 1H), 5.29 (s, 1H), 4.28 - 4.15 (m, 2H), 3.97 - 3.86 (m, 2H), 3.64 (s, 1H), 2.93 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 1H), 2.76 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 1H), 2.35 (s, 1H), 2.17 (s, 1H), 1.59 (s, 4H), 1.29 (d,  $J$  = 34.2 Hz, 3H), 1.25-1.23 (m, 6H), 1.13 - 0.80 (m, 13H), 0.66 (s, 2H), 0.03 (m, 12H). HRMS Calculated for  $[\text{C}501\text{-}164\text{N}406\text{+H}]^+$ : 817.4899 Found: 817.4883

### 【 0 2 1 2 】

P1828- コレステロールコンジュゲートの合成

20

クロロギ酸コレステリル20.0mg (0.044mmol) を2.0mLの脱水DCMに溶解した。これに、2.0mLの脱水DCMに溶解した28mg (0.088mmol) のPI-828を加えた。最後に、脱水DIPEA 15.5 L (0.088mmol) を不活性条件中、室温で滴下した。反応の進行は、薄層クロマトグラフィーによってモニタリングした。24時間後、これを100mLの0.1 (N) HClでクエンチし、該化合物をDCM中に抽出した。DCM中 (0 ~ 5) % Me OHの溶媒勾配を使用して、所望の生成物をカラムクロマトグラフィーによって分離した。

$^1\text{HNMR}$ (300 MHz)  $\delta$ (ppm) = 8.165-8.13(m); 7.59-7.40(m),

芳香族); 6.72(s); 5.98-5.93(m); 5.42-5.40(m); 4.67-4.59(m); 3.75-3.74(m); 3.44-3.40(m); 2.43-2.34(m); 2.04-1.93(m); 1.86-1.77(m); 1.65-1.43(m); 1.35-1.43(m); 1.32-0.85(m)

30

### 【 0 2 1 3 】

PI3Kを阻害するNPの調製 :

PI103-SNP

L-a-ホスファチジルコリン3.5mg (50mol%)、PI103-コレステロールコンジュゲート2.5mg (20mol%)、および1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N4アミノ (ポリエチレングリコール) 2000] (DSPE-PEG) 7.5mg (30mol%) を1.0mLのDCMに溶解した。ロータリーエバポレーターを使用して、薄くて均一な脂質-薬物膜になるまで溶媒を蒸発させた。次に、脂質-薬物膜を、1.0mLの $\text{H}_2\text{O}$ で55 にて1時間水和した。水和したナノ粒子は、明黄色 ~ 白色のように見え、わずかに粘着性質であった。これをSephadex G-25カラムに通し、55 で押出して、200nm以下の粒子を得た。DMF中のPI103-コレステロールコンジュゲートの標準曲線を、紫外-可視分光光度法 (SHIMADZU 2450) を使用して285nmにおける吸光度を測定することによって作製した。既知濃度のナノ粒子をDMFに溶解し、285nmにおける吸光度値を使用して、標準曲線から負荷率を計算した。これは、HPLC法を使用して立証した。iRGDをタグ付加したPI103ナノ粒子を同じ手順によって合成したが、iRGDペプチドは、Ruoslahti教授によって記載されているように、チオールコンジュゲーションを使用して、DSPE-PEG-マレイミドにコンジュゲートさせた。

40

### 【 0 2 1 4 】

PI828-SNP

PI-828でコンジュゲートされたクロロギ酸コレステリル、ホスファチジルコリン、およびDSPE-PEG (重量比5 : 10 : 1) を、DCMに溶解した。得られた溶液を丸底フラスコ中で口

50

ーターエバポレーターを用いて蒸発させ、完全に乾燥させた。得られた薄膜を70℃で2時間定速回転させながらPBSで水和した。ナノ粒子をSephadexカラムに通して溶出し、続いて、ハンドヘルド小型押出機（フィルターサイズ200nm）によって押出した。サイズをDLSによってチェックし、薬物負荷率を紫外可視分光法によって決定した。

#### 【0215】

PI103がカプセル封入されたNP

ホスファチジルコリン、コレステロール、DSPE-PEG、およびPI103を、重量比10:5:1:1で量り取った。PI103はメタノールに可溶性であり、コレステロール、DSPE-PEG、およびホスファチジルコリンは脱水DCMに可溶性であった。溶液を丸底フラスコに取り、ロータリーエバポレーターを使用して蒸発させた。薄膜を完全に乾燥させ、1.0mLのddH<sub>2</sub>Oによって水和した。これを、ロータリーエバポレーター中、55℃で可能な限り速い速度で撹拌した。白色の懸濁液をSephadex G-25カラムに通した。200nmのポリカーボネートフィルター膜を使用し、ハンドヘルド小型押出機（AVANTI）を用いて溶出物を押出した。薬物負荷率をUV分光光度計によって決定した。

#### 【0216】

放出動力学研究

薬物を負荷したナノ粒子（薬物1mg/ml、5ml）を、PBS緩衝液（pH7.4）、4T1細胞溶解物、および4306細胞溶解物（PI828-SNPについては追加的）に懸濁し、透析管（MWCO = 3500ダルトン、Spectrum Lab）中に密封した。透析管を穏やかに撹拌しながら1LのPBS（pH7.4）に浮遊させ、無限沈下タンク状態をシミュレートした。アリコートの一部100pLを所定の時間間隔でインキュベーション培地から回収し、等体積のPBS緩衝液に置き換えて、放出された薬物を紫外-可視分光光度計によって定量化し、累積薬物放出としてプロットした。

#### 【0217】

ナノ粒子の特性決定および安定性研究

ナノ粒子の平均粒子サイズは、Zetasizer Nano ZS90（Malvern, UK）を使用した動的光散乱法によって測定した。10pLのナノ粒子溶液を、DI水を使用して1mlに希釈し、90°の散乱角で各10回の測定を3セット実施して、平均粒子サイズを得た。Zetasizer ZS90を使用し、製造業者のマニュアルに従って、測定に水で希釈したナノ粒子を用いてゼータ電位を測定した。ナノ粒子の物理的安定性を、4℃での保存条件中の平均粒子サイズおよびゼータ電位の変化を測定することによって評価した。

#### 【0218】

PI103-SNPについての低温透過型電子顕微鏡

400メッシュの銅格子の穴の開いた炭素膜によって支持されたガラス化氷中で試料を保存した。3pLの試料懸濁液を清浄格子に塗布して、濾紙で吸い取り、液体エタン中で直ちにガラス化処理することによって試料を調製した。イメージングのために電子顕微鏡に移すまで、格子を液体窒素下で保存した。電子顕微鏡検査は、2つのGatan Sirius CCDカメラ（1つは2K×2Kピクセルであり、1つは4K×4Kピクセルである）を備えたFEI Tecnai Cryo-Bio 200KV FEG TEMを使用し、120KeVで操作することで実施した。-170℃未満の温度で格子を維持するクライオステージを使用して、ガラス状の氷格子を電子顕微鏡に移した。格子の画像を多重スケールで取得し、標本の全体の分布を評価した。より低い倍率でイメージングするための潜在的に適切な標的領域を特定した後、52,000×（0.21nm/ピクセル）および21,000×（0.50nm/ピクセル）の公称倍率で高い倍率画像を取得した。約10~15e/A°<sup>2</sup>の電子線量で、-5pm（21,000×）および-4pm（52,000×）の公称アンダーフォーカス（nominal underfocus）で画像を取得した。

#### 【0219】

細胞生存率アッセイ

4T1乳癌細胞およびMDA MB468乳癌細胞をRPMI中で培養し、4306卵巣癌細胞は10%FBSおよび1%の抗生物質-抗真菌剤100×溶液を補填したDMEM（Invitrogen, 15240-062）中で培養した。4×10<sup>3</sup>個の細胞を96ウェル平底プレートに播種した。遊離薬物または薬物を負荷

したナノ粒子（遊離薬物当量に正規化した）を各96ウェルプレート中に適当な濃度（1、10、100nM、ならびに1、10、および50pM）にて3連で加え、次に、プレートを5%CO<sub>2</sub>雰囲気中、37℃でインキュベートした。所望の期間インキュベーションした後、細胞を洗浄し、20μlのCellTiter 96 Aqueous One Solution試薬（Promega, WI）を含有する100μlのフェノールレッド不含培地（FBSなし）と共にインキュベートした。5%CO<sub>2</sub>雰囲気中、37℃で2時間インキュベーションした後、Epochプレートリーダー（Biotek instruments, VT）を使用して、490nmにおける各ウェルの吸光度を記録した。吸光度は、生存細胞の数を反映する。ブランクを全てのデータから減算し、GraphPad Prism（商標）ソフトウェア（GraphPad, San Diego, CA）を使用して結果を分析した。各実験を独立に3回繰り返した。示したデータは、n=3の平均±SEである。

10

【0220】

#### PI103-SNPの内化アッセイ

4T1乳癌細胞（ $1 \times 10^6$ 個の細胞）を10mlのペトリディッシュに播種し、70%のコンフルエントに達した後、血清不含培地と共に6時間インキュベートした。次に、遊離PI103または等量のPI103-SNPを、無血清培地（1%FBS）中に20pM濃度で加えた。5%CO<sub>2</sub>雰囲気中、37℃で4時間インキュベーションした後、細胞をPBSで3回洗浄し、新しい培地を補充した。所望の時間インキュベーションした後、 $2 \times 10^6$ 個の細胞を各試料から溶解し、遠心分離して、上清を回収した。対照として薬物不含細胞を使用して、試料中の薬物の量を紫外可視分光法によって測定した。

20

【0221】

#### ウエスタンブロットアッセイ

ウエスタンブロットのために、 $5 \times 10^4$ 個の細胞を6ウェルプレートの各ウェルに播種した。細胞が70%のコンフルエントに達したとき、これらを血清不含培地中で6時間インキュベートした。次に、遊離薬物または等量の薬物を負荷したナノ粒子を、無血清培地（1%FBS）中に適当な濃度で加えた。5%CO<sub>2</sub>雰囲気中、37℃で24時間インキュベーションした後、細胞を氷冷PBSで2回洗浄し、プロテアーゼ阻害剤（Roche diagnostic）を補填したRIPA緩衝液を使用して剥離することによってタンパク質を回収した。タンパク質の量をRC Aアッセイによって測定し、等量のタンパク質溶解物を4~20%ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動して、ポリニフッ化ビニリデン膜に転写し、5%粉乳を含むTBST-T中でブロッキングした。次に、膜を、TBST中、ホスホAKT（S473）抗体（1:500希釈）、トータルAKT抗体（1:1000希釈）、およびアクチン（1:2000希釈）抗体（抗体は全て、Cell Signaling Technology社）と共に4℃で一晩インキュベートした。TBSTで適当回数洗浄した後、ホースラディッシュペルオキシダーゼコンジュゲート二次抗体と共に膜を1時間インキュベートした。Syngene社のG-box（商標）を使用して検出を行って、イメージJ（商標）ソフトウェアによってデンシトメトリー定量化を行った。

30

【0222】

#### マウス4T1乳癌モデルにおけるPI828-SNPおよびPI103-SNPの有効性研究

4T1乳癌細胞（ $1 \times 10^5$ ）を4週齢のBALB/cマウス（体重20g、Charles River Laboratories）の側腹に皮下移植した。薬物療法を9日目に開始した。PI828-SNPについては、薬物療法は、PBS（対照群について）、遊離PI828（5mg/kg）、およびPI828-SNP（5mg/kg）の投与からなった。PI103-SNPについては、薬物療法は、PBS（対照群について）、遊離PI-103（5mg/kg）およびPI103-SNP（5mg/kg）および1RGD-PI103-SNP（5mg/kg）（尾静脈注射によって投与した）の投与からなった。腫瘍体積および体重を11日間にわたって隔日毎にモニタリングした。腫瘍体積を式 $L \times B^2/2$ （式中、ノギスを使用して測定した最長直径をLとし、最短直径をBとした）を使用することによって計算した。腫瘍体積の増加量を $V_t1V_0$ （ $V_0$ は、初回注射時点での腫瘍体積とした）として計算した。対照群において対照の平均腫瘍体積が2000mm<sup>3</sup>を超えたときに動物を屠殺した。屠殺後直ちに腫瘍を採取し、さらなる分析のために10%ホルマリン中で保存した。

40

【0223】

#### インビボ腫瘍試料のウエスタンブロットアッセイ

50

動物組織については、-80 で保存した腫瘍を、液体窒素を使用し乳鉢中にて乳棒で粉碎し、次に、RIPA緩衝液で処理してタンパク質を抽出した。タンパク質の量をBCAアッセイによって測定して、等量のタンパク質溶解物をポリアクリルアミドゲル上で電気泳動し、次に、ポリニフ化ビニリデン膜 (Bic-Rad) に転写して、5% 乳剤中でブロッキングした。次に、膜を適当な濃度の一次抗体 (抗体は全て、Cell Signalling Technology社) と共に4 で一晩、次に、ホースラディッシュペルオキシダーゼコンジュゲート二次抗体と共に1時間インキュベートした。Syngene社のG-boxを使用して検出を行って、imageJ (商標) ソフトウェアによってデンストメトリー定量化を行った。

#### 【0224】

##### PI103-SNPを使用したインスリン耐性試験

無作為に給餌させたマウス (マウス4T1乳癌モデル) に、尾静脈注射を介して単回用量の空のナノ粒子 (対照)、遊離PI-103 (5mg/kg)、およびPI103-SNPを注射した。新たに調製した0.9%NaCl (0.1ml) 中のインスリン溶液 (0.75U/Kg) を、薬物投与の1時間後にマウスに腹腔内注射した。血糖値計を使用してインスリン注射の前およびインスリン注射45分後の血糖値を測定した。

#### 【0225】

##### マウス卵巣癌腫瘍モデルにおけるPI103-SNPの有効性研究

アデノウイルス保有Creリコンビナーゼの滑液嚢内送達を介して、遺伝子操作したK-ras<sup>isu+</sup>/Ptenマウスで卵巣腺癌を誘発した。腫瘍細胞もAdeno-Creによって一旦活性化されたルシフェラーゼを発現するように操作して、薬物処置前および薬物処置後の腫瘍イメージングを可能にした。マウスに中型~大型の腫瘍ができたなら、これらを4つの処置群 (ビヒクル、遊離PI-103 5mg/kg、PI-103-SNP 5mg/kg、およびiRGD-PI103-SNP 5mg/kg) の1つに分け、尾静脈注射を介して全ての薬物を投与した。処置は、遊離PI-103およびPI103-SNPについては処置の間に1日おいて10日間にわたって5回投与し、一方、iRGD-PI103-SNPは処置の間に1日休んで7日間にわたって3回投与した。1VIS Lumina II (商標) Imaging Systemを使用してインビボでの腫瘍イメージングを実施した。生物発光の定量化は、Living Image Software 3.1 (商標) (Caliper Life Sciences) を使用することによって達成した。イメージングの前に、腹腔内注射を介して150mg/kgのホタルD-ルシフェリンカリウム塩をマウスに与えた。ルシフェリン注射の5分後、2.5% イソフルレン導入チャンバー中でマウスに麻酔をかけた。この場合、イソフルレンを多岐管で供給することによってマウスを麻酔下に置き、マウスの体温を37 の温度段階に安定的に維持した。ルシフェリン投与の15分後、30秒の曝露時間で生物発光シグナルを収集した。初期処置の前日 (0日目、ベースライン画像)、3回の処置後、および5回の処置後の日に撮像した。

#### 【0226】

##### インビボ腫瘍試料のウェスタンブロット分析

処置の有効性は、ウェスタンブロット分析を介して、処置サイクル後のPI3K/mTORタンパク質の発現を調べることによって定量化した。組織溶解物を4~20% トリスグリシンゲル (Invitrogen) 上で調べ、0.4pMのPVDF膜 (Perkins Elmer) に転写した。非特異的なタンパク質を5% 脱脂粉乳でブロッキングした。一次抗体 (Cell Signaling Technologies、1:1000希釈) をpAkt S473、pS6、pmTOR、p4E-BP1、Akt、S6、mTOR、および4E-BP1と共に使用して一晩インキュベートした。 -アクチンを負荷対照として使用した。次に、抗ウサギIgG二次抗体 (Cell Signaling Technologies、1:2000) を室温で1時間インキュベートした。発現したタンパク質をSupersignal West Pico Chemiluminescence (商標) 基質 (Thermo Scientific) を使用して検出した。

#### 【0227】

##### 腫瘍スライスの染色およびイメージング

1HCおよびTUNEL研究のために、Harvard Medical School Core facilityで、腫瘍スライス (5Am) をOCT培地中で凍結した後に切り取った。iRGD標的化画像については、これらの切片をNikon TE2000 (商標) 顕微鏡の緑色フィルター下で直接イメージングした。TUNELイメージング研究のために、腫瘍切片を、標準TMR赤色蛍光末端デオキシヌクレオチジル

10

20

30

40

50

トランスフェラーゼ媒介dUTPニック末端標識 (TUNEL) キット (In Situ Cell Death Detection Kit, TMR-Red, Roche) で製造業者のプロトコールに従って染色した。赤色フィルターを備えたNikon Eclipse TE2000 (商標) 蛍光顕微鏡を使用して画像を得た。FAM-iRGDをタグ付加したPI103-コレステロールの有意な内在化をイメージングした。血管をvWF染色キットで染色した。

【 0 2 2 8 】

参考文献

1. World Health Organization (2008) WHO Cancer Report, Available at <http://vwww.who.int/cancer/ent>
2. Gschwind A, et al. (2004) The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 4,361-370. 10
3. Zhang J, et al.(2009) Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer* 9, 28-39.
4. Ferrari M (2005) Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer* 5:161-171.
5. Sengupta S, Sasisekharan R. (2007) Exploiting nanotechnology to target cancer. *Br J Cancer* 96: 1315-1319.
6. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. (2006) The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet.* 7:606-19.
7. Engelman JA. (2009) Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer.* 9:550-62.
8. Cantley LC, Neel BG(1999) New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:4240-5. 20
9. Workman P, et al. (2010) Drugging the P13 kinome: from chemical tools to drugs in the clinic. *Cancer Res.*70:2146-57.
10. Knight ZA, et al. (2006) A pharmacological map of the P13-K family defines a role for p110alpha in insulin signaling. *Cell.* 125(4):733-47.
11. Bendell JC, et al. (2012) Phase I, dose-escalation study of BKM120, an oral pan-Class 1 PI3K inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol;* 30(3):282-90.
12. Raynaud FI, et al. (2009) Biological properties of potent inhibitors of class I phosphatidylinositide 3-kinases: from PI-103 through PI-540, PI-620 to the oral agent GDC-0941. *Mo! Cancer Ther.* 8(7):1725-38. 30
13. Yuan F, et al. (1994) Microvascular permeability and interstitial penetration of sterically stabilized (stealth) liposomes in a human tumor xenograft. *Cancer Res* 54:3352-3356.
14. Harfouche R, et al. (2009) Nanoparticle-mediated targeting of phosphatidylinositol-3-kinase signaling inhibits angiogenesis. *Angiogenesis.* 12: 325-38.



15. Karve S, et al (2012). Revival of the abandoned therapeutic wortmannin by nanoparticle drug delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109(21):8230-5.
16. Sengupta P, et al. (2012). Cholesterol-tethered platinum II-based supramolecular nanoparticle increases antitumor efficacy and reduces nephrotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*.109(28):11294-9.
17. Lehn JM (1995) *Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives* (VCH, New York).
18. Lehn JM (2002) *Toward complex matter: Supramolecular chemistry and self-organization*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:4763-4768.
19. Gharbi SI, et al (2007) Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002. *Biochem J*. 404(1):15-21.
20. Sengupta S, et al. (2005) Temporal targeting of tumour cells and neovasculature with a nanoscale delivery system. *Nature* 436:568-572. 10
21. Schipper ML, et al. (2009) Particle size, surface coating, and PEGylation influence the biodistribution of quantum dots in living mice. *Small*. 5(1):126-34.
22. Seavey MM, et al (2009). A novel human Her-2/neu chimeric molecule expressed by *Listeria monocytogenes* can elicit potent HLA-A2 restricted CD8-positive T cell responses and impact the growth and spread of Her-2/neu-positive breast tumors. *Clin Cancer Res*. 15(3):924-32.
23. Miller TW, et al. (2011) Mutations in the phosphatidylinositol 3-kinase pathway: role in tumor progression and therapeutic implications in breast cancer. *Breast Cancer Res*.13(6):224.
24. Goldman J et al. (2012) Chemotherapy-induced Akt survival signaling is regulated by CD44-Ezrin/Radixin Moesin (ERM) scaffolding, dependent on EGFR activity. *Cancer Res*. 72:27. 20
25. Sugahara KN, et al (2009) Tissue-penetrating delivery of compounds and nanoparticles into tumors. *Cancer Cell*. 16(6):510-20.
26. Dinulescu DM, et al. (2005) Role of K-ras and Pten in the development of mouse models of endometriosis and endometrioid ovarian cancer. *Nat Med* 11:63-70.
27. Chen KJ, et al. (2011) A small MRI contrast agent library of gadolinium(III)-encapsulated supramolecular nanoparticles for improved relaxivity and sensitivity. *Biomaterials* 32:2160-2165.
28. Turke AB, Engelman JA. (2010) PIKING the right patient. *Clin Cancer Res*. 16(14):3523-5.
29. Clarke PA, Workman P. (2012) Phosphatidylinositol-3-kinase inhibitors: addressing questions of isoform selectivity and pharmacodynamic/predictive biomarkers in early clinical trials. *J Clin Oncol*. 30(3):331-3. 30
30. Muranen T, et al. (2012) Inhibition of PI3K/mTOR leads to adaptive resistance in matrix-attached cancer cells. *Cancer Cell*. 21(2):227-39.
31. Courtney KD, et al (2010). The PI3K pathway as drug target in human cancer. *J Clin Oncol*. 28(6):1075-83.

#### 【 0 2 2 9 】

実施例2：コレステロールで繋がれた白金IIベースの超分子ナノ粒子は、抗腫瘍有効性を増加させ、腎臓毒性を低下させる

ナノスケールの薬物送達ビヒクルは、癌化学療法薬の担体として広く利用されている。しかしながら、ナノ製剤化のための従来の医薬アプローチは、白金ベースの化学療法薬のような適合しない物理化学的特性を示す分子に課題がある。ここで、本発明者らは、ナノスケール寸法での超分子集合を促進する活性分子の合理的設計を記載する。鑄型としてシスプラチンを使用して、本発明者らは、一定比率のホスファチジルコリンおよび1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[アミノ(ポリエチレングリコール)-2000]とのナノ粒子集合を促進する、独自のモノカルボキシラト (monocarboxylato) および0 Ptの配位環境を介してコレステロール骨格に繋がれた独自の白金(II)の合成を記載する。形成されたナノ粒子は、インビトロにおいてカルボプラチンまたはシスプラチンと比較して、より低いIC50値を示し、かつシスプラチン耐性条件において活性である。加えて、ナノ粒子は、マウス4T1乳癌モデルおよびK-Ras<sup>LSL/+</sup>/Pten<sup>fl/fl</sup>卵巣癌モデルにおいて全身毒性および腎臓毒性が減少し、有意に増強されたインビボ抗腫瘍有効性を示す 40 50

。本明細書に記載する結果は、合理的な薬物設計と超分子ナノ化学の統合が薬物開発のための強力な戦略であることを示す。

#### 【0230】

癌は、米国および多くの西洋諸国において、依然として主要な死亡原因の1つである。加えて、その発生率は、途上国および経済移行国においても増加している(1)。世界保健機関(World Health Organization)は、癌による死亡が2008年の760万人から2030年には全世界で1200万人を超えると推定している(2)。この深刻化しつつある問題に取り組むために、有害作用がより低いより効果的な治療戦略の開発が急務である。これらの目標を達成するためより一層推し進められているアプローチは、抗癌剤を固体腫瘍に優先的に標的化するためのナノ技術の使用である(3)。このアプローチは、増強された浸透および保持(EPR)効果に寄与する、腫瘍内のリンパ排液障害を伴う独自の漏出性の血管原性腫瘍血管系を利用する(4)。実際に、ドキソルビシンペイロードまたはアルブミン-パクリタキセルナノ複合体を担持するナノ粒子は、腫瘍内薬物濃度を増加させ(5、6)、現在臨床に用いられている(7)。しかしながら、ナノ製剤化のための従来のプロセスは、多くの化学療法剤の物理化学的特性と適合しないことが多くの場合にあり、このことが封入効率を制限するかまたは最適以下の放出動力学を導入し得る。

10

#### 【0231】

本明細書において、従来のカプセル封入戦略を超えてナノスケール寸法での超分子集合を促進する分子の合理的設計へと進む、独自の理論的枠組みを記載する。この研究において、シスプラチン[*cis*-ジクロロジアミン白金(II)]を、このアプローチを実証するための一例とした。シスプラチンは、最も広く使用されている化学療法剤の一つであるが(8)、ナノ製剤化に対して重大な問題を引き起こす(9、10)。たとえば、シスプラチンをカプセル封入する立体的に安定化したりポソームであるSPI-077は、薬物放出の欠陥からもたらされる臨床的有効性の低さを示した(11、12)。

20

#### 【0232】

超分子ナノ集合を達成するために、本発明者らは、コレステロールで繋がれたシスプラチン(II)両親媒性物質を合成した。その繋ぎ鎖の設計は、シスプラチンの塩化物脱離基が急速に置換されて、*cis*-Pt[(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>Cl]<sup>+</sup>および*cis*-Pt[(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>]<sub>2</sub><sup>2+</sup>を形成する、「アクア化」のプロセスに発想を得た(8)。自己集合するコレステロール-コハク酸-シスプラチンIIベースのナノ粒子(SACN)は、インビトロおよびインビボにおいて、それぞれ、増加した効力および有効性を示した。加えて、SACNは、腎臓によるクリアランスのためのサイズカットオフを超え(13)、そのため、シスプラチンが関連する腎臓毒性を制限した(14)。本発明者らは、本明細書において、合理的な薬物設計がオングストロームスケールからナノスケールへの超分子寸法の増加を可能にし、それによって独自の生物学的特性を付与することを実証する。さらに、3つの白金酸塩のシスプラチン、カルボプラチンおよびオキサリプラチンだけが、臨床での使用に成功している(8)。既存の白金酸塩と比較して、現行の分子の治療指数が改善した有効性の増加は、次世代の白金ベースの化学療法薬として臨床への転換の可能性を示す。

30

#### 【0233】

コレステロール-コハク酸-Pt(II)分子の合成

40

シスプラチンのアクア化は、 $8 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ の速度定数で、活性種*cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(OH<sub>2</sub>)]<sup>+</sup>および*cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>]<sub>2</sub><sup>2+</sup>の急速な形成をもたらす(15)。対照的に、白金が安定な二座1,1-シクロブタンジカルボキシラトリガンドと配位する、カルボプラチンのアクア化の場合の速度定数は、 $7.2 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ であることが見いだされた。これらのアクア化速度の違いは、それらのDNAへの結合速度と合致し、このことは、アクア化の速度が効力と相関することを示している(16、17)。実際に、本発明者らは、モノカルボキシラトおよびPt配位結合を介して、ポリイソブチレンマレイン酸グルコサミン共重合体にPtがキレートされた場合に、ジカルボキシラト結合を使用してまたはモノカルボキシラトおよびPt配位結合を介してPtがキレートされた場合よりも、pH依存性的かつ効率的にPtを放出することを実証した(18、19)。結果として、本発明者らは、モノカルボキシラトお

50

よび0 Pt配位結合を介してPtがキレートされた配位環境の導入が、効果的な白金酸塩の設計に重要であることを合理的に説明した。所定のスキーム（図10A）に概説するように、本発明者らは、最初に、クロロギ酸コレステリルと過剰のエチレンジアミンを反応させることによって、コレステロール-エチレンジアミンコンジュゲートをほぼ定量的収率（99.1%）で合成した。次に、本発明者らは、コレステロール-エチレンジアミンコンジュゲートとコハク酸無水物を反応させることによって、モノカルボキシラトおよびアミドキレート部分を導入した（収率95%）。最後に、該コンジュゲートとアクア化されたcis-Pt[(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>を、酸性pH（pH=6.4）中、1:1のモル比で反応させて、モノカルボキシラトおよびアミドの0 Pt配位結合によって特徴付けられるコレステロール-シスプラチンコンジュゲートを得た。これは、-1,621.497ppmに独自の単一<sup>195</sup>PtのNMRピークを有することによって示される（図14）。他の中間体は全て、<sup>1</sup>Hおよび<sup>13</sup>C NMR分光法によって特徴付けた（図15~18）。

10

#### 【0234】

##### SACNの合成および特性決定

本発明者らは、コレステロール-コハク酸-白金（II）分子、ホスファチジルコリン（PC）および1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[アミノ（ポリエチレングリコール）-2000]（DSPE-PEG）から、1:2:0.2の重量比で、脂質-膜水和自己集合法を使用してSACNを工学設計した（20）（図10A）。低温透過型電子顕微鏡（cryo-TEM）を使用した超微細構造分析（図10B）は、直径が200nm未満で膜厚が約5nmの主に単一ラメラおよびまれに多重ラメラ構造の形成を明らかにした。動的光散乱から、平均流体力学直径が $141.4 \pm 1.2$ nmであるSACNのサイズ分布がさらに確認された（n=9）（図10C）。シスプラチン放出の動力学を立証するために、SACNを酸性pH5.5で120時間インキュベートした（pH7を対照とする）。図10Dに示すように、SACNは、シスプラチンのpH依存性の持続放出を示した。興味深いことに、放出速度は、ポリマー系を使用して以前に観測された速度よりも遅く、このことは、Pt部分が膜の外部と内部の両方に存在するように、コレステロールが脂質層中に組み込まれることができることを示している。

20

#### 【0235】

##### SACNのインビトロ有効性

SACNのインビトロ有効性を評価するために、本発明者らは、ルイス肺癌腫（LLC）および4T1乳癌細胞株を使用して、細胞生存率アッセイを実施した。細胞生存率は、インキュベーションの48時間後、3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルホフェニル)-2H-テトラゾリウム内塩アッセイを使用することによって定量化した。図11A~11Bに示すように、遊離シスプラチンは、それぞれ $2.91 \pm 0.015$  μMおよび $4.72 \pm 0.016$  μMのIC<sub>50</sub>値で、LLC細胞および4T1細胞の死滅を誘発した。これらの細胞株のどちらにおいても、カルボプラチンは、この濃度範囲で阻害活性を一切示さなかった。興味深いことに、SACNは、4T1細胞とLLC細胞の両方に対して、それぞれ $0.44 \pm 0.016$  μMおよび $1.16 \pm 0.016$  μMのIC<sub>50</sub>値で、シスプラチンよりも効果的であることが見いだされた。次に、本発明者らは、シスプラチン耐性肝細胞癌（7404-CP20）細胞株におけるSACNの有効性を試験した。このアッセイにおける遊離シスプラチンのIC<sub>50</sub>値は、 $42.84 \pm 0.04$  μMであると計算されたが、これは過去に報告された値と一致し（21）、SACNは、 $3.02 \pm 0.013$  μMのIC<sub>50</sub>値で耐性を克服することが見いだされた（図11C）。細胞死のメカニズムを解明するために、本発明者らは、4T1細胞を、IC<sub>50</sub>以下の濃度のSACN、シスプラチン、またはカルボプラチンと共に、24時間インキュベートした。アポトーシスの初期マーカーである、ホスファチジルセリンに結合するFITC-Annexin Vで細胞を標識した。図11Dで明らかのように、白金酸塩での処置は、腫瘍細胞のアポトーシスと壊死の両方を誘発し、シスプラチンとSACNは共にカルボプラチンよりも効果的であった。FITCで標識したSACNを使用した研究は、ナノ粒子がエンドリソソーム区画中に経時的に内在化および局在化したことを明らかにした（たとえば、エンドリソソーム区画中の4時間以内のFITC-SACNの内在化）（データは示さない）。この所見は、腫瘍細胞（4T1および7404-CP20）をFITCで標識したSACNと37 および4 でインキュベートすることによってさらに立証され、SACNの細胞中

30

40

50

への内在化は、後者の条件で減少した（データは示さない）。シスプラチン耐性7404-CP20細胞株におけるSACNの有効性の根底にあるメカニズムを詳細に分析するために、本発明者らは、シスプラチンまたは等価なレベルのPtを含有するSACNとインキュベーションした後の細胞中の細胞内Pt濃度を定量化した。図11Eに示すように、SACNは、シスプラチンと比較して、有意に上昇した細胞内Ptレベルをもたらした。細胞をSACNと4でインキュベートすることは、エネルギー依存性のエンドサイトーシスを阻害し、細胞内Pt濃度をシスプラチンで処置したレベルまで低下させたが、このことは、SACNがエンドサイトーシスを介してこれらの細胞に侵入することができることを立証している。

#### 【0236】

インビボ4T1乳癌モデルにおけるSACNの有効性

SACNのPtの持続放出およびインビトロ有効性の増強によって動機付けられて、本発明者らは、インビボでの抗腫瘍有効性を評価した。第一の工程として、本発明者らは、BALB/cマウスにおける最大耐量（MTD）が、シスプラチンが9mg/kgであることに対して、SACNは16mg/kgであることを確立した（図12A）。次に、本発明者らは、4T1乳房腫瘍（平均腫瘍体積、約100mm<sup>3</sup>）を担持する同系BALB/cマウスに、単回用量のシスプラチン（8mg/kg）を投薬した。他の動物群には、ビヒクル、カルボプラチンまたはSACNを与えた（後者の2つには、8mg/kgのシスプラチン用量に相当するPt用量を与えた）。図12Bに示すように、白金酸塩の全てがビヒクル処置と比較して有意な腫瘍阻害をもたらしたが、SACNが最大腫瘍阻害（対照に対して $P < 0.01$ ）を示し、その後シスプラチンおよびカルボプラチンが続いた。さらに、カルボプラチンまたはシスプラチンでの処置がビヒクル処置対照を超えるわずかな生存の増加を示したが、SACNは、全体的な生存傾向を有意に増加させた（図12C）。

#### 【0237】

次に、本発明者らは、シスプラチン、カルボプラチンまたはSACNでの複数回の低用量処置の効果を試験し、この場合、各場合で最大の白金用量は、シスプラチンのMTDで送達されたPtのレベルまで加えた。より低い用量のシスプラチンまたはSACN（1mg/kgの白金用量に相当する）で処置した2つの追加の群を含めた。図12Dに示すように、シスプラチンでの処置は、用量依存的な腫瘍成長阻害をもたらした。興味深いことに、最大用量では、SACNまたはシスプラチンを用いた腫瘍阻害は同じであったが、より低い用量では、SACNは遊離シスプラチンと比較して優れた抗腫瘍効果を示した（ $P < 0.05$ 、ANOVA）。さらに、シスプラチンは、SACNで処置した群と比較して、平均体重の有意な低下（ $P < 0.05$ 、ANOVA）をもたらした（図12E）、このことは、後者がシスプラチン化学療法に伴う全身毒性を低下させることができることを示している。興味深いことに、より低い用量であっても、SACNとシスプラチンの両方は、より高い用量のカルボプラチンとは対照的に、より大きな腫瘍阻害を示した（図12D~12E）。より高い用量では、シスプラチンとSACNは共に生存を増加させると分かったが、後者がより優れていた（図12F）。

#### 【0238】

インビボ有効性の増加の根底にあるメカニズムを解明するために、処置後に腫瘍を摘出し、アポトーシス用のマーカーであるTUNELで処理した。SACNは、シスプラチンよりも有意に大きなアポトーシスを誘発したが、より高い用量では、SACNとシスプラチンは共に同様のアポトーシスを誘発し、これは腫瘍阻害結果と一致する（データは示さない）。しかしながら、後者の用量レベルでは、低下した腎臓重量および腎障害分子-1（KIM1）発現のアップレギュレーションによって明らかのように、SACNではなくシスプラチンが有意な腎臓毒性をもたらした（図13A）。加えて、摘出した腎臓切片のTUNELは、シスプラチンで処置したマウスにおいて有意なアポトーシスを示したが、一方で、SACNは、より高い用量であってもごくわずかなアポトーシスを実証した（データは示さない）。

#### 【0239】

SACNは腫瘍に向かって優先的に進み腎臓を回避する

SACNを用いた明らかな腫瘍中のアポトーシスの増強および腎臓毒性の低下の根底にあるメカニズムを解明するために、本発明者らは、白金の生体内分布について腫瘍臓器および細網内皮系（RES）臓器を調査した。腫瘍を担持する動物に、シスプラチンまたはSACNを1

10

20

30

40

50

mg/kgおよび3mg/kgの白金に相当する用量で投薬した。図13Bに示すように、RES組織中に白金の用量依存的な蓄積があった（誘導結合プラズマ原子吸収スペクトルを使用して、組織1グラム当たりで定量化した）。興味深いことに、SACN（3mg/kgのPt用量）は、腫瘍において、等量のシスプラチンの投薬後に達成された場合よりも有意に高い濃度をもたらした。さらに、この用量で、シスプラチンは、腎臓において有意に高い白金の集積をもたらした。これが、SACNで処置した群と比較して、シスプラチンが関連する腎臓毒性の要因となり得る。

#### 【0240】

インビボK-Ras<sup>LSL/+</sup>/Pten<sup>f1/f1</sup> 卵巣癌モデルにおけるSACNの有効性

近年、頻繁な体細胞のPTENおよびK-Ras突然変異が、類内膜卵巣癌 (22↓-24)

を含む広範なヒトの癌に關与することが確立されている。図19Aに示すように、SACN（3mg/kgのシスプラチンに相当するPt用量）で処置された中型および大型のK-ras<sup>LSL/+</sup>/Pten<sup>f1/f1</sup> 卵巣癌を担持する動物は、シスプラチン処置と比較してより大きい退縮をもたらした。TUNELは、SACNで処置した腫瘍とシスプラチンで処置した腫瘍の両方でアポトーシスを明らかにした。しかしながら、シスプラチンはネフロンのアポトーシスを誘発したが、SACNでは腎臓中にごくわずかな細胞死が明らかとなり（データは示さない）、これは、シスプラチンで処置した場合と比較して、SACNで処置した後の、腫瘍中のPtレベルの上昇および腎臓中の濃度の低下と相関した（図19B）。

#### 【0241】

考察

超分子化学、すなわち、非共有分子間力を介して相互作用する分子構成要素からの複雑な化学系の開発（25）は、多くの生物学および物理学的概念を説明しかつそれに影響を及ぼす分野として出現した。素晴らしい観点で、Jean-Marie Lehnは、超分子ナノ化学と呼ばれる独自の理論的枠組み想定した（26）。実際、最近になって、ガドリニウム（III）がカプセル封入された超分子ナノ粒子は、感度の増加と共に緩和能を増強し、癌転移の診断のためのツールとして役立つことが示された（27）。別の研究では、カンプトセシンが超分子ナノ粒子中にカプセル封入された（28）。しかしながら、これらの新たに出現した研究は、超分子相互作用を使用して、癌を標的化するための分子をカプセル封入することに焦点を当てているが、本発明者らは、ここで、ナノ構造への超分子集合を可能にするための癌化学療法薬の合理的再設計を報告する。

#### 【0242】

シスプラチン [cis-ジクロロジアミン白金(II)] は、ほとんどの癌にとって第一または第二の化学療法となる選択薬物であるが、その臨床的有効性は、有機カチオン輸送体2によって媒介される近位尿細管と遠位尿細管の両方の尿細管の管周囲取り込みからもたらされる、腎臓毒性のために用量制限的である（29）。>5.5nmのナノ粒子は糸球体濾過を回避することができるので（13）、シスプラチンは、腎臓毒性を潜在的に克服するための超分子ナノ構造への合理的な工学設計のための優れた候補となった。第一の工程として、本発明者らは、cis-白金(II)をコレステロールコハク酸コンジュゲートへのコンジュゲーションを介して両親媒性物質に変換し、これは、親水性-疎水性相互作用から生じる、この白金酸塩のPCおよびDSPE-PEGとのSACNへの超分子集合を促進した（30、31）。選択したコレステロールおよびPCは共に生物の細胞膜の成分であり、コレステロールの3-OH基はコンジュゲーションを容易に受けて、活性剤の薬力学的/薬物動態プロファイルならびに細胞への取り込みを変化させる（32）。PEGを用いたナノ粒子の表面修飾がオプソニンとの相互作用を減少させ（33）、それによってRESによるクリアランスを低下させると報告されているので、DSPE-PEGを組み込んで、SACNに「ステルス」特性を付与した。実際に、上記の仮説と一致して、本発明者らの生体内分布研究は、シスプラチンと比較して腎臓内のPt濃度が有意に低いことによって明らかのように、SACNが腎臓内の糸球体濾過を回避できることを明らかにした。この所見は、SACN処置後に観測された腎臓アポトーシスの減少と同時に起こる、腎臓障害についての初期マーカーであるKIM1の低発現によってさらに

10

20

30

40

50

立証された(34)。さらに、腫瘍に優先的に蓄積したSACNは、そのようなステルスナノシステムがEPR効果を介して腫瘍へ向かって進むと報告された過去の報告と一致する(5)。

#### 【0243】

SACNは腫瘍内濃度の増強を可能にするが、有効性の重要な推進力は、活性cis-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>部分の効率的な放出である。たとえば、安定なシクロブタンジカルボキシレートキレートリガンドは、カルボプラチンのアクア化の速度をシスプラチンより2~4桁低下させ、シスプラチンと同程度の細胞傷害性を得るために4~20倍高い用量のカルボプラチンが必要である(16)。同様に、N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド共重合体が結合した白金であるAP5280は、臨床研究において最小の腎臓毒性を発揮することが見いだされたが(35)、テトラペプチドスパーサーのCOOH末端グリシンにカップリングされたアミノマロン酸キレート剤に白金が保持されるため、カルボプラチンよりも効力が弱かった(36)。そのため、この研究における両親媒性物質の設計の重要性は、白金と脱離基(この場合、コレステロールコハク酸コンジュゲート)の間にモノカルボキシラトおよびPt配位環境を導入することであった。本発明者らは、この配位環境が、配位がより安定なジカルボキシラト連結またはモノカルボキシラトおよびN-Pt連結を介する場合よりも、活性化PtのpH依存的な放出においてより効率的であったことを以前に実証している(18、19)。この所見は、インビトロで観測されかつ腫瘍細胞のアポトーシスおよび壊死の増加によって立証されたように、カルボプラチンと比較してSACNの効力が増加したことと一致する。興味深いことに、SACNはまた、乳癌(4T1)およびLLC細胞において、シスプラチンと比較してわずかに改善された有効性を示し、かつ肝細胞癌(7404-CP20)においてはシスプラチンよりも有意に優れていたが、このことは、従来の白金輸送体がこれらの細胞において突然変異されることに加えて、SACNが7404-CP20細胞への追加の取り込みメカニズムを利用することによって説明することもできる。実際に、蛍光タグ付加されたSACNを使用した本発明者らの研究は、エンドサイトーシスを介した経時的な内在化を明らかにした。

#### 【0244】

エンドサイトーシスの阻害は、SACN処置後のPtの細胞内レベルをシスプラチンでの処置によって達成されたレベルまで減少させた。過去の研究は、コレステロールがカベオリン媒介エンドサイトーシスを通して細胞への取り込みを促進することが示されたと報告しているが(37)、本発明者らは、クロルプロマジン(クラスリン媒介エンドサイトーシスの阻害剤)、ナスタチン(カベオリン媒介エンドサイトーシス阻害剤)、またはサイトカラシンD(マクロピノサイトーシス/食作用の阻害剤)での細胞の前処置がSACNの内在化を完全に消失できなかったことを観測し(データは示さない)、このことは、SACN内在化のメカニズムが余剰性であることを示唆し得る。しかしながら、最近の報告がエンドサイトーシス阻害剤の特異性に疑問を持っていること(38)、および本発明者らの研究において、より低い用量および短いインキュベーション時間であっても、本発明者らが細胞の形態変化を観測したことに留意すべきである。SACNはまた、インビトロの内皮細胞および線維芽細胞によっても同様に内在化した(データは示さない)。いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、インビボにおいて、優先的なEPR媒介性の腫瘍内蓄積、およびSACNが酸性環境において活性化されたcis-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>を放出する性質と併せてSACNが低いpHのエンドリソーム区画内に内在化する傾向は、優先的な腫瘍標的化に寄与し得る。

#### 【0245】

SACNは増加した効力を示すが、本発明者らはまた、シスプラチンと比較して、インビボでのMTDの増加を観測しており、このことは、臨床においてシスプラチンに関連する用量制限を克服することが可能であり得ることを示唆している。4T1乳癌マウスモデルおよび遺伝子操作したK-ras<sup>LSL/+</sup>/Pten<sup>f1/f1</sup>卵巣腺癌マウスモデルがヒトの腫瘍進行を厳密に模倣するので、本発明者らは、本発明者らのインビボ研究のためにこれらのモデルを選択した。興味深いことに、単回のMTD以下の白金用量であってもシスプラチンのMTDと同程度であり、SACNは、腫瘍阻害および生存の両方に関して優れた抗腫瘍有効性を発揮し、これは優先的な蓄積および効力の増加に寄与することもできる。さらに、より低い用量であって

10

20

30

40

50

もSACNがシスプラチンよりも効果的であったので、持続放出から潜在的に生じる、治療結果に関わる規則正しい投薬効果があり得る。興味深いことに、最近の臨床報告は、シスプラチンの規則正しい投薬が抗血管形成効果を発揮することを示している(39)。興味深いことに、本発明者らは、より低い用量のシスプラチンの複数回投与が、単回MTDと比較して、生存の増加により効果的であったことを観測した。この所見は、SACNの治療有効性が投薬レジメンを調整することによって最適化され得ることを示している。

#### 【0246】

本明細書に記載される結果は、合理的な薬物設計と超分子ナノ化学の統合が薬物開発のための強力な戦略を可能にすることを実証する。さらに、白金ベースの化学療法薬が、精巢癌、卵巣癌、子宮頸部癌、子宮内膜癌、膀胱癌、頭頸部癌、肺癌および胃食道癌を含む広範囲な癌のための最先端の治療法を生み出すので、超分子集合による分子寸法の増加からもたらされる有効性の増加および毒性プロファイルの改善は、構築されたナノ構造が処置に効果的であり得ることを示す。

10

#### 【0247】

材料および方法

SACNの合成および特性決定

簡潔に述べると、PC、コレステロール-シスプラチンコンジュゲートおよびDSPE-PEGの薄くて均一な脂質-薬物膜を、ロータリーエバポレーターを使用してコーティングし、次に、60 で1時間水和し、Sephadex G-25カラムに通して、65 で押出して、200nm以下の粒子を得た。ナノ粒子をナノゼータサイザー(nanozetalyzer)を使用しておよびCryo-TEMを使用して分析した。放出動力学について、薬物を負荷したナノ粒子を緩衝液(pH=5.5または7)に懸濁し、透析膜(分子量カットオフ=500Da)中に密封した。透析袋を、30mLのPBS緩衝液中、室温で穏やかに振盪しながらインキュベートした。アリコートインキュベーション培地から所定の時間間隔で回収し、放出された薬物を定量化した。

20

#### 【0248】

細胞生存率/アポトーシスアッセイ

LLC細胞、乳癌細胞株(4T1)および肝細胞癌細胞(CP20)を96ウェル平底プレート(1ウェル当たり $4 \times 10^3$ 個の細胞)に播種した。薬物またはSACNを等量のPt濃度に加え、48時間インキュベートした。Cell-Titer 96 Aqueous One Solution(商標)試薬を使用して生存率を定量化した。Annexin-V-Alexa Fluor(商標)488コンジュゲートおよびヨウ化プロピジウムで染色し、続いて、FACSを使用して細胞のアポトーシスを定量化した。

30

#### 【0249】

SACNの内在化研究

4T1細胞をガラスカバースリップ上に播種し、FITCがカプセル封入されたSACNで30分間~18時間の時間経過にわたって処置した。表示した時間で、細胞をPBS中で2回洗浄し、LysoTracker(商標)red中、37 で30分間インキュベートした。3つのランダム視野で撮った画像を、倒立エピフルオレスセンスデコンボリューション顕微鏡(Nikon)を使用して取り込んだ。SACN内在化におけるエンドサイトーシスの役割を研究するために、細胞を4でインキュベートするかまたはエンドサイトーシス阻害剤で前処置した。

40

#### 【0250】

インビボマウス4T1乳癌モデル

4T1乳癌細胞( $3 \times 10^5$ )を4週齢のBALB/cマウスの側腹に皮下移植した。薬物療法は、SACN(1mg/kgおよび3mg/kgのPt用量に相当)、シスプラチン(1mg/kgおよび3mg/kgのPt用量に相当)、およびカルボプラチン(3mg/kgのPt用量に相当)の静脈内投与からなつた。尾静脈注射によるPBS(100 $\mu$ L)を薬物処置の対照として使用した。処置を移植後9日目に開始し、13日目まで隔日毎に投与した。腫瘍体積および体重を毎日モニタリングした。腫瘍体積を、式 $L \times B^2$ を使用することによって計算した。

#### 【0251】

トランスジェニック卵巣癌腫瘍モデル

アデノウイルス保有Creリコンビナーゼの滑液嚢内送達を介して、遺伝子操作したK-ras

50

LSL<sup>+/+</sup>/Pten<sup>f1/f1</sup>マウスで卵巣腺癌を誘発した。Adeno-Creによって一旦活性化されたルシフェラーゼを発現するように腫瘍細胞を操作して、薬物処置前および薬物処置後の腫瘍イメージングを可能にした。薬物療法は、SACN (3mg/kgのPt用量に相当)、シスプラチン (3mg/kgのPt用量に相当)、またはPBS (100 μL) の尾静脈投与からなされた。各動物に隔日毎の処置過程にわたって3回投薬した。処置の有効性を、ベースラインと比較した処置後の生物発光シグナルの増加倍率を調べることによって定量化した。

#### 【0252】

##### SACNの生体内分布

腫瘍を担持する動物を先に記載したように処置した。臓器を採取して、計量し、濃HNO<sub>3</sub>に溶解した。これらの混合物に30% (体積/体積) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を加え; 得られた溶液を室温で24時間攪拌し、次に、さらに12時間加熱して、液体を蒸発させた。全ての固体残渣を1mLの水に再溶解し、次に、白金の量を誘導結合プラズマ原子吸収分光法/MSによって測定した。

10

#### 【0253】

##### 組織病理学

組織を10%ホルマリン中で固定して、パラフィン包埋し、Harvard Medical School Core Facilityで切片にした。腫瘍および腎臓のパラフィン切片を脱パラフィン化し、標準TMR赤色蛍光TUNELキットで製造業者のプロトコールに従って染色した (In Situ Cell Death Detection Kit (商標)、TMR-Red; Roche)。また、腎臓切片をKIM1発現について免疫標識した。赤色フィルターを備えたNikon Eclipse TE2000 (商標) 蛍光顕微鏡を使用して画像を得た。

20

#### 【0254】

##### 補足材料および方法

反応は全て、他に指示のない限り不活性条件下で実施した。市販の化合物は全て、さらに精製することなく使用した。ジクロロメタン (DCM)、脱水DCM、メタノール、クロロギ酸コレステリル、コレステロール、エチレンジアミン、コハク酸無水物、硝酸銀、硫酸ナトリウム、ピリジン、シスプラチン、L- -ホスファチジルコリン (PC)、sephadex G25、FITCおよび1,2-フェニレンジアミンは、Sigma-Aldrichから購入した; 1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[アミノ(ポリエチレングリコール)2000] (DSPE-PEG) および小型ハンドヘルド押出機キット (0.2 μmのWhatman Nucleopore Track-Etch Membrane (商標)、Whatmanフィルターサポートおよび1.0mLのHamiltonianシリンジを含む) は、Avanti Polar Lipidsから購入した。無水溶媒のジメチルホルムアミド (DMF) は、Acros Organicsによって支給された。リタングステン酸は、Ted Pella社のものでした。分析用TLCは、EMD Laboratoriesから購入したプレコートシリカゲルアルミニウムシート60 F254を使用して実施した。TLCプレート上のスポットは、過マンガン酸アルカリまたはアセトン中の6% ニンヒドリン溶液を使用して可視化した。<sup>1</sup>H NMR (300MHz) および<sup>13</sup>C NMR (75MHz) スペクトルは、Varian Mercury 300 (商標) 分光光度計で得た。化学シフトは、適切な重水素化NMR溶媒を使用し、TMSの0ppmを基準として、百万分の1 (ppm) で表示する。MTS試薬は、Promegaによって支給された。細胞生存率アッセイおよび放出動力学データは、GraphPad Prism (商標) ソフトウェアを使用してプロットした。各試料を少なくとも3連で繰り返した。

30

40

#### 【0255】

##### コレステロール-エチレンジアミンコンジュゲートの合成

コレステロール-エチレンジアミンコンジュゲートの合成のために、エチレンジアミン (化合物2) 1,044 μL (15.58mmol、14当量) を5.0mLの無水DCMに溶解し、続いて、氷で0~5℃まで冷却した。次に、クロロギ酸コレステリル500.0mg (1.113mmol、1.0当量) を5.0mLの無水DCMに溶解して、これを激しく攪拌しながら15分間かけて反応混合物に滴下し、この攪拌を室温になるまで一晩続けた。水 (50mL × 3) およびDCM (50mL)、続いて飽和ブライン水洗浄液を使用して反応物を後処理した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、ロータリーエバポレーターを用いて蒸発させた。明黄色の清澄な油性生成物 (化合物3

50



) を収率99.1%で分離した。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz)  $\delta$  (ppm) =

5.37 (s, 1H), 5.06 (s, 1H), 4.49 (bs, 1H), 3.22–3.20 (m, 2H), 2.82–2.81 (m, 2H), 2.34–2.26 (m, 2H),  
2.02–1.83 (m, 6H), 1.54–0.84 (m, 37H).  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz)  $\delta$  (ppm) = 156.7, 140.1, 122.7, 74.5,  
56.9, 56.3, 50.2, 42.5, 42.0, 39.9, 39.7, 38.8, 37.2, 36.8, 36.4, 36.0, 32.1, 28.5, 28.4, 24.5, 24.1, 23.1,  
22.8, 21.3, 19.6, 18.9, 12.1

#### 【 0 2 5 6 】

コレステロール-エチレンジアミン-コハク酸コンジュゲートの合成

10

コレステロール-エチレンジアミン-コハク酸コンジュゲートの合成のために、化合物3 350mg (0.74mmol、1当量) を5.0mLの無水DCMに溶解した。この混合物に、コハク酸無水物 370.0mg (3.7mmol、5当量) および2mLのピリジンを加えた。攪拌を24時間続け、続いて、0.1N HClおよびDCMで数回後処理した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、蒸発させて、白色の非晶質固体の化合物(化合物5)を得た。収率：95%。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz)  $\delta$  (ppm) =

7.72–7.70 (m, 1H), 7.54–7.53 (m, 1H), 5.37 (s, 1H), 5.07 (s, 1H), 4.49 (bs, 1H), 4.22–4.19 (m, 2H),  
3.36–3.30 (m, 4H), 2.68–2.33 (m, 4H), 2.02–1.83 (m, 6H), 1.54–0.84 (m, 37H).  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz)  
 $\delta$  (ppm) = 174.5, 174.2, 156.3, 140.4, 122.4, 74.5, 56.9, 56.4, 50.1, 42.5, 40.9, 39.3, 36.7, 36.9, 36.0,  
30.6, 29.8, 29.4, 28.4, 28.1, 23.3, 23.0, 19.1, 12.0

20

#### 【 0 2 5 7 】

アクア化されたシスプラチン $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$ の合成

アクア化されたシスプラチン $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$ の合成のために、シスプラチン50mg (0.166mmol、1当量) を10.0mLの $\text{H}_2\text{O}$ に部分的に溶解した。この混合物に、硝酸銀28.0mg (0.166mmol、1当量) を加え、得られた反応混合物を室温で24時間攪拌した。この混合物は乳白色のように見え、塩化銀を25,000  $\times$  gで1時間遠心分離することによって除去した。最後に、アクア化されたシスプラチン(化合物6) を0.2  $\mu\text{m}$ のフィルターに通して濾過することによって得た。

30

#### 【 0 2 5 8 】

コレステロール-シスプラチンコンジュゲートの合成

コレステロール-シスプラチンコンジュゲート(7)の合成のために、化合物5 200mg (0.35mmol、1.0当量) を5.0mLのDMFに溶解した。この混合物に、20.0mLのアクア化されたシスプラチン(化合物6) (濃度5.0mg/mL、1.0当量) を加え、24時間攪拌した。凍結乾燥機を使用して溶媒を蒸発させた。乾燥させた生成物(化合物7)を、500Da分子量カットオフ(MWCO)透析膜を24時間使用し、続いて、凍結乾燥して精製した。 $^{195}\text{Pt-NMR}$  : (ppm) = -1,621.497 (s)。

#### 【 0 2 5 9 】

自己集合するコレステロール-コハク酸-シスプラチンIIベースのナノ粒子を合成する一般手順

40

自己集合するコレステロール-コハク酸-シスプラチンIIベースのナノ粒子(SACN)を合成する一般手順は、以下のとおりである：10.0mgのPC、5.0mgのコレステロール-シスプラチンコンジュゲート(7)および1.0mgのDSPE-PEGを10.0mLのDCMに溶解した。ロータリーエバポレーターを使用して、薄くて均一な脂質-薬物膜になるまで溶媒を蒸発させた。次に、脂質-薬物膜を、1.0mLの $\text{H}_2\text{O}$ で60 にて1時間水和した。水和したナノ粒子は、明黄色～白色のように見え、わずかに粘着性質であった。この混合物をSephadex G-25カラムに通し、65 で押出して、200nm以下の粒子を得た。

#### 【 0 2 6 0 】

SACN中のPt(II)定量化の一般法

50

測定した量のSACNを、DMF中1.2mg/mL濃度の1,2-フェニレンジアミン中にて、100 ℃で2時間加熱した。Pt (II) 量を、紫外-可視分光光度法によって、 $\lambda = 706\text{nm}$ の波長で描かれた標準吸光度対濃度の曲線を使用して計算した (Shimadzu 2450)。この結果は、誘導結合プラズマ原子吸収分光法 (ICP-AAS) ベースの方法を使用して立証された。

#### 【0261】

異なるpHにおけるナノ粒子からのPt (II) の放出動力学

濃縮した薬物負荷ナノ粒子を緩衝液 (pH = 5.5および8.5) に懸濁し、透析膜 (MWCO = 500Da; Spectrum Lab) 中に密封した。透析袋を、30mLのPBS緩衝液中、室温で穏やかに振盪しながらインキュベートした。アリコートの一部500  $\mu\text{L}$ をインキュベーション培地から所定の時間間隔で回収し、放出された薬物を紫外-可視分光光度計 (Shimadzu 2450 (商標)) およびICP-AASによって定量化した。

#### 【0262】

低温透過型電子顕微鏡用の試料調製

400メッシュの銅格子上の穴の開いた炭素膜によって支持されたガラス化氷中で、試料を保存した。3  $\mu\text{L}$ の試料懸濁液を清浄格子に塗布して、濾紙で吸い取り、液体エタン中で直ちにガラス化処理することによって試料を調製した。イメージングのために電子顕微鏡に移すまで、格子を液体窒素下で保存した。電子顕微鏡検査は、FEI Eagle 4K x 4K CCDカメラを備えたFEI Tecnai T12 (商標) 顕微鏡を使用し、120KeVで操作することで実施した。-170 ℃未満の温度で格子を維持するクライオステージを使用して、ガラス状の氷格子を電子顕微鏡に移した。格子の画像を多重スケールで取得し、標本の全体の分布を評価した。より低い倍率でイメージングするための潜在的に適切な標的領域を特定した後、52,000 x (0.21nm/ピクセル) および21,000 x (0.50nm/ピクセル) の公称倍率で高い倍率画像を取得した。約10 ~ 15e/A<sup>2</sup>の電子線量で、-5  $\mu\text{m}$  (21,000 x) および-4  $\mu\text{m}$  (52,000 x) の公称アンダーフォーカスで画像を取得した。

#### 【0263】

細胞生存率アッセイ

ルイス肺癌腫 (LLC) 細胞、乳癌細胞株 (4T1)、および肝細胞癌細胞 (CP20) を、American Type Culture Collectionから購入した。LLC細胞およびCP20細胞をDMEM中で培養し、4T1細胞は、10% FBS、50ユニット/mLペニシリン、および50ユニット/mLストレプトマイシンを補填したRPMI培地1640中で培養した。トリプシン処理した培養LLC細胞、4T1細胞、およびCP20細胞をPBSで2回洗浄し、96ウェル平底プレート (1ウェル当たり4 x 10<sup>3</sup>個の細胞) に播種した。遊離薬物およびSACNを適当な濃度 (0.01、0.1、1、10、20、50  $\mu\text{M}$ のPt濃度) で加えた。次に、プレートを、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気中、37 ℃で48時間インキュベートした。細胞を洗浄し、20  $\mu\text{L}$ のCell-Titer 96 Aqueous One Solution (商標) 試薬 (Promega) を含有する100  $\mu\text{L}$ のフェノールレッド不含培地 (FBSなし) と共にインキュベートした。5% CO<sub>2</sub> 雰囲気中、37 ℃で2時間インキュベーションした後、Epoch (BioTek (商標)) プレートリーダーを使用して、490nmにおける各ウェルの吸光度を記録した。ブランク値を各値から減算し、次に、対照値に対して正規化することによって結果を定量化して、Prism (商標) ソフトウェア (GraphPad) を使用することによって結果を分析した。示したデータは、n = 3の平均  $\pm$  SEである。

#### 【0264】

FITCで標識したSACNの合成

FITCで標識したSACNの合成のために、10.0mgのPC、5.0mgのコレステロール-シスプラチンコンジュゲート 7、1.0mgのDSPE-PEG、および1mgのFITCを、10.0mLのDCMに溶解した。ロータリーエバポレーターを用いて、薄くて均一な脂質-薬物膜になるまで溶媒を蒸発させた。脂質-薬物膜を、1.0mLのH<sub>2</sub>Oで60 ℃にて2時間水和した。水和したナノ粒子は明黄色~白色のように見え、わずかに粘着性質であった。混合物をSephadex G-25カラムに通し、暗所にて65 ℃で押出して、200nm以下の粒子を得た。

#### 【0265】

FITC-SACNの内在化研究

10

20

30

40

50

4T1細胞または7404-CP20細胞を、24ウェルプレートのガラスカバースリップ上にサブコンフルエントまで播種し、次に、FITCがカプセル封入されたSACNで30分間～18時間の時間経過にわたって処置した。表示した時間で、細胞をPBS中で2回洗浄し、LysoTracker Red (商標) (Ex: 577nm; Em: 590nm) 中、37 °Cで30分間インキュベートした。次に、細胞を再度洗浄して、4%パラホルムアルデヒド中で固定し、次に、DAPI (Ex: 350nm; Em: 470nm) で30秒間処理して、Prolong Gold (商標) 退色防止剤 (Invitrogen) を使用して封入した。3つのランダム視野で撮った画像を、UV、青色および緑色フィルターを備えた倒立顕微鏡 (Nikon) を使用して40×で取り込んで、DAPI、FITC、およびLyso Tracker red 蛍光をそれぞれ可視化した。細胞を、FITCがカプセル封入されたCNPまたは陰性対照となるLyso Tracker redのいずれかとのみインキュベートした。薬理的阻害剤は、多くの場合、エンドサイトーシス経路を研究するために使用される。本発明者らは、クラスリン媒介エンドサイトーシス阻害剤としてクロルプロマジン (25 μM)、カベオラ媒介エンドサイトーシス阻害剤としてナスタチン (25 μg/mL)、およびマクロピノサイトーシス/食作用阻害剤としてサイトカラシンD (5 μg/mL) を使用した。細胞を阻害剤で2時間前処置した後、FITC-SACNと4時間インキュベーションし、その後、これらを先に記載したように処理した後イメージングした。他の研究では、Drinらによって記載されるように、細胞を4 °Cでインキュベートして、エネルギー依存性のエンドサイトーシスを遮断した (1)。

10

#### 【0266】

7404-CP20細胞におけるインビトロでの細胞内Ptの定量化

7404-CP20細胞におけるインビトロでの細胞内Ptの定量化のために、5×10<sup>5</sup>個のCP20細胞を100mmの細胞培養ディッシュにプレATINGした。細胞がおよそ70%のコンフルエントになったときに、これら6時間無血清化し、その後薬物を加えた。細胞を、20 μMの遊離シスプラチンもしくはSACNと共に37 °Cで、または同じ用量のSACNと共に4 °Cでのいずれかでインキュベートして、エネルギー依存性の内在化を阻害した。その後、薬物含有培地を除去し、冷PBSを使用して細胞を3回洗浄した。トリプシン処理後に各ディッシュからの細胞数をカウントし、次に、70%硝酸中で一晩溶解した。次に、硝酸を蒸発させ、5%硝酸中で適当に希釈した後、Ptの量をICP-MSによって測定した。

20

#### 【0267】

アポトーシスのFACS解析

4T1細胞を、6ウェルプレート中、1 μMの濃度のSACNまたは遊離シスプラチンまたは遊離カルボプラチンの存在下、37 °Cで24時間インキュベートして成長させた。24時間後、細胞をPBSで洗浄し、0 °Cで回収した。次に、細胞をAnnexin-V-Alexa Fluor 488 (商標) コンジュゲート (Molecular Probes, Invitrogen) で処理し、暗所にて、室温で15分間インキュベートした。次に、細胞をPBSで洗浄し、RNase (1mg/mL; Sigma) を含有するヨウ化プロピジウム (PI) 溶液 (50g/mL; Sigma) と共にインキュベートした。次に、細胞懸濁液をFACS管に移し、Annexin-V/PI染色についてBD FACS Calibur (商標) 装置で分析した。CellQuestPro (商標) ソフトウェア (BD Biosciences) を使用してデータを分析した。

30

#### 【0268】

インビボマウス4T1乳癌モデル

4T1乳癌細胞 (3×10<sup>5</sup>) を4週齢のBALB/cマウス (体重20g; Charles River Laboratories) の側腹に皮下移植した。薬物療法を9日目に開始した。薬物療法は、SACN (1mg/kgおよび3mg/kg)、遊離シスプラチン (1mg/kgおよび3mg/kg)、および遊離カルボプラチン (3mg/kg) の投与からなった (尾静脈注射によって投与した)。尾静脈注射によって投与したPBS (100 μL) を薬物処置の対照として使用した。腫瘍体積および体重を毎日モニタリングした。腫瘍体積を、式 $L \times B^2$  (式中、ノギスを使用して測定した最長直径をLとし、最短直径をBとした) を使用することによって計算した。対照群において対照の平均腫瘍体積が2000mm<sup>3</sup>を超えたときに動物を屠殺した。屠殺後直ちに腫瘍を採取し、さらなる分析のために10%ホルマリン中で保存した。動物の取扱手順は全て、Harvard Institutional Use and Care of Animals Committeeによって承認されたものとした。

40

#### 【0269】

50

### インビボマウス卵巣癌腫瘍モデル

アデノウイルス保有Creリコンビナーゼの滑液嚢内送達を介して、遺伝子操作したK-ras LSL+/Ptenfl/flマウスで卵巣腺癌を誘発した。腫瘍細胞をAdeno-Creによって一旦活性化されたルシフェラーゼを発現するように操作して、薬物処置前および薬物処置後の腫瘍イメージングを可能にした。マウスに中型～大型の腫瘍ができれば、これらを3つの処置群（対照、シスプラチン 3mg/kg、およびSACN）の1つに分け、尾静脈注射を介して全ての薬物を投与した。SACNの用量は、3mg/kgのシスプラチンとPt含量が同等になるように選択した。6日間にわたって投薬の間に1日間隔を置いて、動物に薬物を3回注射した。IVIS Lumina II Imaging System（商標）でインビボでの腫瘍イメージングを実施した。生物発光の定量化は、Living Image Software 3.1（商標）（Caliper Life Sciences）を使用することによって達成した。イメージングの前に、腹腔内注射を介して150mg/kgのホタルD-ルシフェリンカリウム塩をマウスに与えた。ルシフェリン注射の5分後、2.5%イソフルレン導入チャンパー中で動物に麻酔をかけた。この場合、イソフルレンを多岐管で供給することによってマウスを麻酔下に置き、マウスの体温を37℃の温度段階に維持した。ルシフェリン投与の15分後、30秒の曝露時間で生物発光シグナルを収集した。処置の前日（0日目、ベースライン画像）、処置サイクルの途中、および最終処置の翌日に撮像した。ベースラインと比較した処置後の生物発光シグナルの増加倍率を調べることで処置の有効性を定量化した。毒性データの統計分析は、Prism 5（商標）ソフトウェアを用いて、一元配置ANOVA分析試験を使用して分析した。

10

20

#### 【0270】

#### シスプラチンおよびSACNの生体内分布

インビボ実験後、動物を屠殺し、臓器を採取した。次に、臓器を計量して、室温で24時間振盪することによって濃HNO<sub>3</sub>（およそ10mL）に溶解し、次に、100℃で12時間加熱した。これらの混合物に30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を加え、得られた溶液を室温で24時間攪拌し、次に、さらに12時間加熱して、液体を蒸発させた。全ての固体残渣を1mLの水に再溶解し、次に、白金の量を誘導結合プラズマ分光法によって測定した。

#### 【0271】

白金IIは、血漿タンパク質などの他の生体分子中の窒素、硫黄および酸素残基と反応させることができる。これらの反応の結果として、シスプラチンで処置した後に多種多様な白金種が体内に存在し得る。このプロトコールは、血漿タンパク質との反応によって活性薬物から不活性化物になった可能性のある白金を識別せず、規定の時点での全Pt濃度だけを定量化する。本発明者らは、SACNで処置した群とシスプラチンで処置した動物との比較を行った場合にそのような相互作用が正規化されると予測する。しかしながら、生理学的pHに対して酸性pHにおけるSACNからのPt(II)の優先的な放出が、血漿タンパク質との配位による不活性化をより小さくし、かつ腫瘍中の活性化Pt(II)の濃度をより高くする可能性がある。Drin G, Cottin S, Blanc E, Rees AR, Temsamani J (2003) Studies on the internalization mechanism of cationic cell-penetrating peptides. J Biol Chem 278:31192-31201。

30

#### 【0272】

#### 組織病理学およびTUNELアッセイ（アポトーシスアッセイ）

組織を10%ホルマリン中で固定して、パラフィン包埋し、Harvard Medical School Core Facilityで切片にした。腫瘍および腎臓のパラフィン切片を脱パラフィン化し、標準TMR赤色蛍光TUNELキットで製造業者のプロトコールに従って染色した（In Situ Cell Death Detection Kit（商標）、TMR-Red; Roche）。赤色フィルターを備えたNikon Eclipse TE 2000蛍光顕微鏡を使用して画像を得た。

40

#### 【0273】

#### 腎障害分子-1の免疫組織化学的分析

ホルマリン固定したパラフィン包埋組織切片で免疫組織化学的分析を実施した。簡潔に述べると、パラフィン包埋組織切片を脱パラフィン化して、再度水和し、高压鍋内にて0.1Mクエン酸緩衝液（pH6.0）中で20分間抗原回復を行った。次に、スライドをPBS溶液中で

50

洗浄して、3%BSA溶液中で30分間インキュベートし、その後、これらをヤギ抗マウス腎障害分子-1 (Kim-1) 抗体 (R&D Systems) と共に1:500希釈で60分間インキュベートした。スライドをPBS溶液中で洗浄し、抗ヤギ二次抗体 (1:200希釈; R&D Systems) 中でさらに30分間インキュベートした。組織切片の染色をVECTASTAIN ABC (商標) キット (Vector Laboratories) を使用して30分間行い、続いて、ヘマトキシリンで対比染色した。Nikon E CLIPSE 90i (商標) 顕微鏡を使用して撮像した。

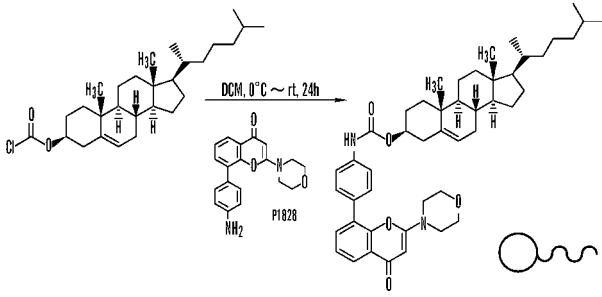
【 0 2 7 4 】

#### 参考文献

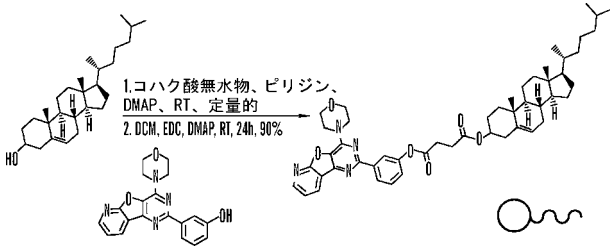
1. Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM (2010) Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **19**:1893–1907 10
2. World Health Organization (2008) WHO Cancer Report, Available at <http://www.who.int/cancer/en/>. Accessed June 12, 2012.
3. Ferrari M (2005) Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer* **5**:161–171.
4. Yuan F, et al. (1994) Microvascular permeability and interstitial penetration of sterically stabilized (stealth) liposomes in a human tumor xenograft. *Cancer Res* **54**:3352–3356.
5. Northfelt DW, et al. (1996) Doxorubicin encapsulated in liposomes containing surface-bound polyethylene glycol: Pharmacokinetics, tumor localization, and safety in patients with AIDS-related Kaposi's sarcoma. *J Clin Pharmacol* **36**:55–63.
6. Desai N, et al. (2006) Increased antitumor activity, intratumor paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of cremophor-free, albumin-bound paclitaxel, ABI-007, compared with cremophor-based paclitaxel. *Clin Cancer Res* **12**:1317–1324. 20
7. Zamboni WC (2008) Concept and clinical evaluation of carrier-mediated anticancer agents. *Oncologist* **13**:248–260.
8. Kelland L (2007) The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* **7**:573–584.
9. Avgoustakis K, et al. (2002) PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin: In vitro nanoparticle degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties. *J Control Release* **79**:123–135.
10. Haxton KJ, Burt HM (2009) Polymeric drug delivery of platinum-based anticancer agents. *J Pharm Sci* **98**:2299–2316.
11. Zamboni WC, et al. (2004) Systemic and tumor disposition of platinum after administration of cisplatin or STEALTH liposomal-cisplatin formulations (SPI-077 and SPI-077 B103) in a preclinical tumor model of melanoma. *Cancer Chemother Pharmacol* **53**:329–336. 30
12. White SC, et al. (2006) Phase II study of SPI-77 (sterically stabilised liposomal cisplatin) in advanced non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* **95**:822–828.
13. Choi HS, et al. (2007) Renal clearance of quantum dots. *Nat Biotechnol* **25**:1165–1170.
14. Madias NE, Harrington JT (1978) Platinum nephrotoxicity. *Am J Med* **65**:307–314.
15. Davies MS, Berners-Price SJ, Hambley TW. (2000) Slowing of cisplatin aquation in the presence of DNA but not in the presence of phosphate: improved understanding of sequence selectivity and the roles of mono-aquated and diaquated species in the binding of cisplatin to DNA. *Inorg Chem* **39**:5603–5613.
16. Knox RJ, Friedlos F, Lydall DA, Roberts JJ (1986) Mechanism of cytotoxicity of anticancer platinum drugs: Evidence that cis-diamminedichloroplatinum(II) and cis-diammine-(1,1-cyclobutanedicarboxylato)platinum(II) differ only in the kinetics of their interaction with DNA. *Cancer Res* **46**:1972–1979. 40
17. Los G, et al. (1991) Cellular pharmacokinetics of carboplatin and cisplatin in relation to their cytotoxic action. *Biochem Pharmacol* **42**:357–363.

18. Paraskar A, et al. (2011) Rationally engineered polymeric cisplatin nanoparticles for improved antitumor efficacy. *Nanotechnology* **22**:265101.
19. Paraskar AS, et al. (2010) Harnessing structure-activity relationship to engineer a cisplatin nanoparticle for enhanced antitumor efficacy. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**:12435–12440.
20. Sengupta S, et al. (2005) Temporal targeting of tumour cells and neovasculature with a nanoscale delivery system. *Nature* **436**:568–572.
21. Shen DW, et al. (1995) Characterisation of high-level cisplatin-resistant cell lines established from a human hepatoma cell line and human KB adenocarcinoma cells: Cross-resistance and protein changes. *Br J Cancer* **71**:676–683.
22. Sato N, et al. (2000) Loss of heterozygosity on 10q23.3 and mutation of the tumor suppressor gene PTEN in benign endometrial cyst of the ovary: possible sequence progression from benign endometrial cyst to endometrioid carcinoma and clear cell carcinoma of the ovary. *Cancer Res* **60**:7052–7056. 10
23. Cuatrecasas M, et al. (1998) K-ras mutations in nonmucinous ovarian epithelial tumors: a molecular analysis and clinicopathologic study of 144 patients. *Cancer* **82**:1088–1095.
24. Dinulescu DM, et al. (2005) Role of K-ras and Pten in the development of mouse models of endometriosis and endometrioid ovarian cancer. *Nat Med* **11**:63–70.
25. Lehn JM. (1995) *Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives* (VCH, New York).
26. Lehn JM. (2002) Toward complex matter: Supramolecular chemistry and self-organization. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:4763–4768.
27. Chen KJ, et al. (2011) A small MRI contrast agent library of gadolinium(III)-encapsulated supramolecular nanoparticles for improved relaxivity and sensitivity. *Biomaterials* **32**:2160–2165. 20
28. Chen KJ, et al. (2012) The therapeutic efficacy of camptothecin-encapsulated supramolecular nanoparticles. *Biomaterials* **33**:1162–1169.
29. Yao X, et al. (2007) Cisplatin nephrotoxicity: A review. *Am J Med Sci* **334**:115–124.
30. Bedu-Addo FK, et al. (1996) Interaction of polyethyleneglycol-phospholipid conjugates with cholesterol-phosphatidylcholine mixtures: Sterically stabilized liposome formulations. *Pharm Res* **13**:718–724.
31. Matsumori N, et al. (2004) An amphotericin B-ergosterol covalent conjugate with powerful membrane permeabilizing activity. *Chem Biol* **11**:673–679.
32. Torchilin VP (2005) Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov* **4**:145–160. 30
33. Mosqueira VC, et al. (2001) Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules. *Biomaterials* **22**:2967–2979.
34. Vaidya VS, et al. (2010) Kidney injury molecule-1 outperforms traditional biomarkers of kidney injury in preclinical biomarker qualification studies. *Nat Biotechnol* **28**:478–485.
35. Rademaker-Lakhai JM, et al. (2004) A Phase I and pharmacological study of the platinum polymer AP5280 given as an intravenous infusion once every 3 weeks in patients with solid tumors. *Clin Cancer Res* **10**:3386–3395.
36. Lin X, et al. (2004) Improved targeting of platinum chemotherapeutics. the antitumour activity of the HPMA copolymer platinum agent AP5280 in murine tumour models. *Eur J Cancer* **40**:291–297. 40
37. Sugano K, et al. (2010) Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport. *Nat Rev Drug Discov* **9**:597–614.
38. Vercauteren D, et al. (2010) The use of inhibitors to study endocytic pathways of gene carriers: Optimization and pitfalls. *Mol Ther* **18**:561–569.
39. Jian W, et al. (2009) Preclinical antitumor and antiangiogenic activity of a metronomic schedule of cisplatin against human transitional cell carcinoma (TCC) *J Clin Oncol* **27**:e16018.

【図 1 A】



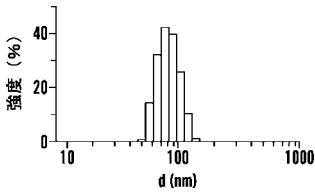
【図 1 B】



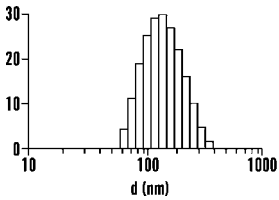
【図 1 C】



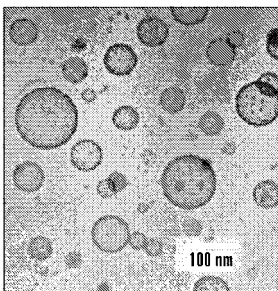
【図 1 D】



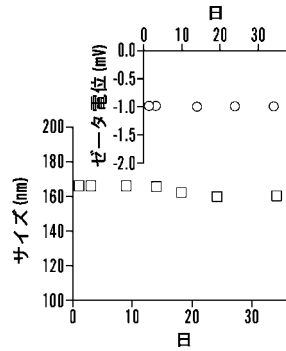
【図 1 E】



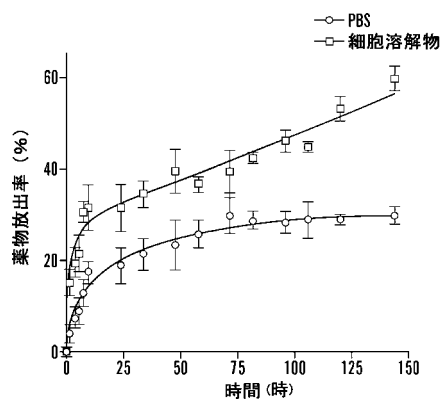
【図 1 F】



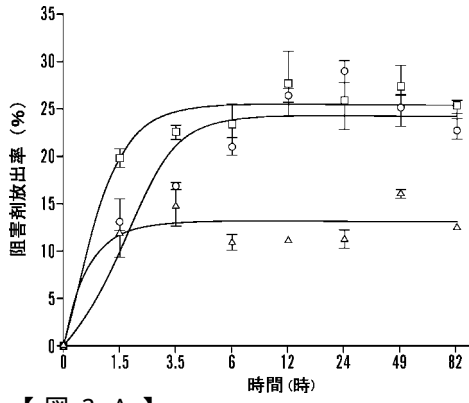
【図 1 G】



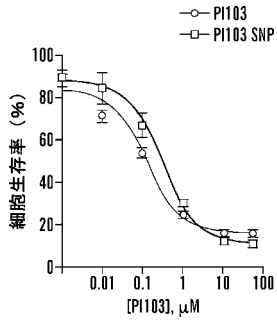
【図 1 H】



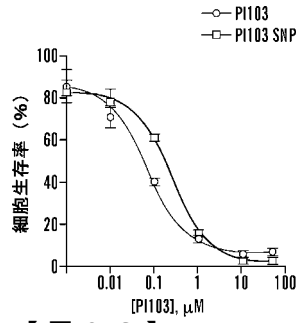
【 図 1 I 】



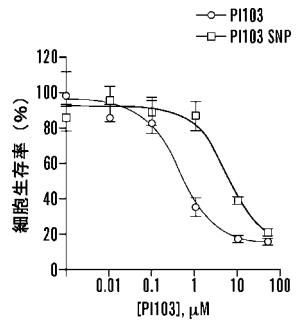
【 図 2 A 】



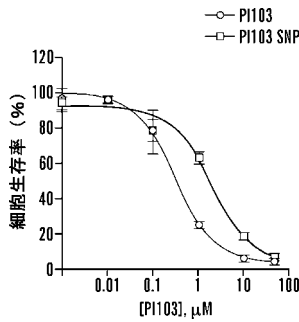
【 図 2 B 】



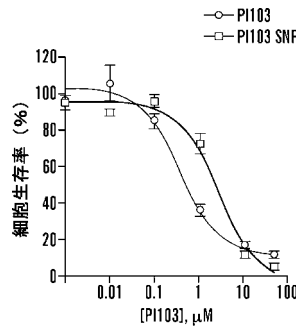
【 図 2 C 】



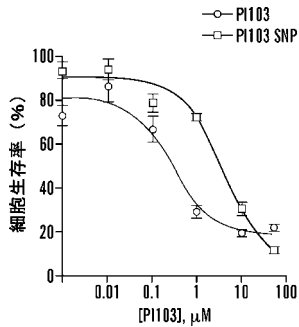
【 図 2 D 】



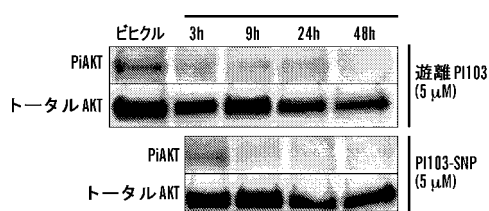
【 図 2 F 】



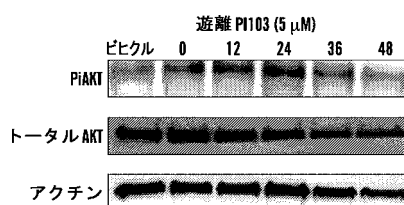
【 図 2 E 】



【 図 2 G 】

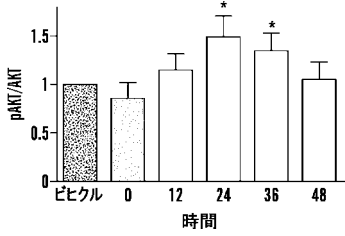


【 図 2 H 】

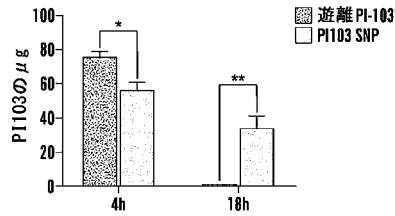




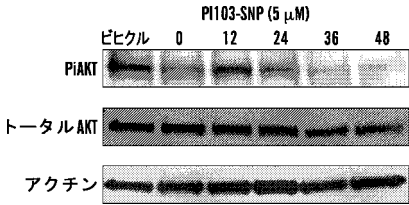
【図 2 I】



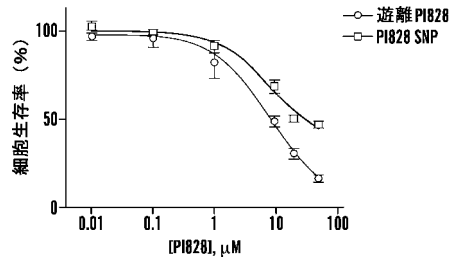
【図 2 L】



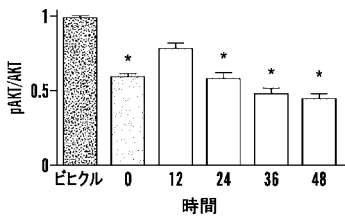
【図 2 J】



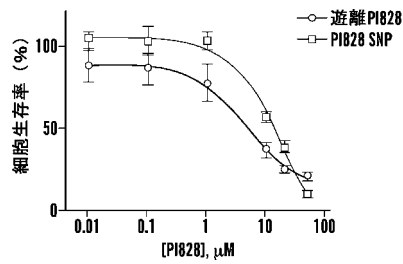
【図 2 M】



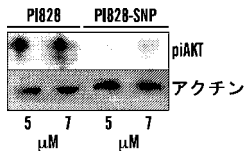
【図 2 K】



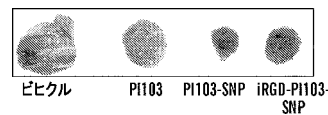
【図 2 N】



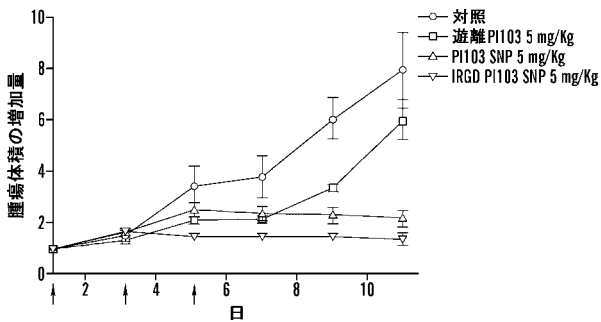
【図 2 O】



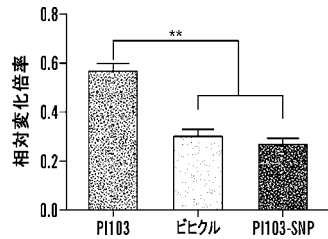
【図 3 C】



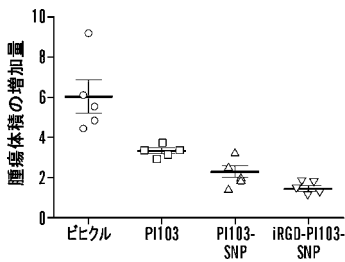
【図 3 A】



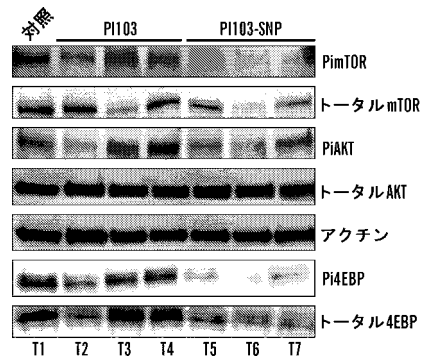
【図 3 D】

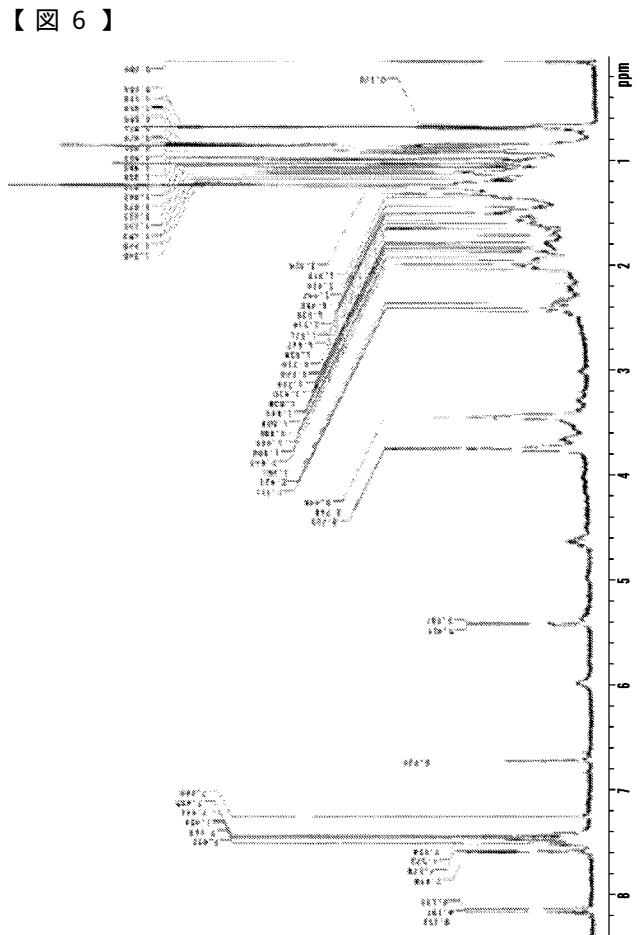
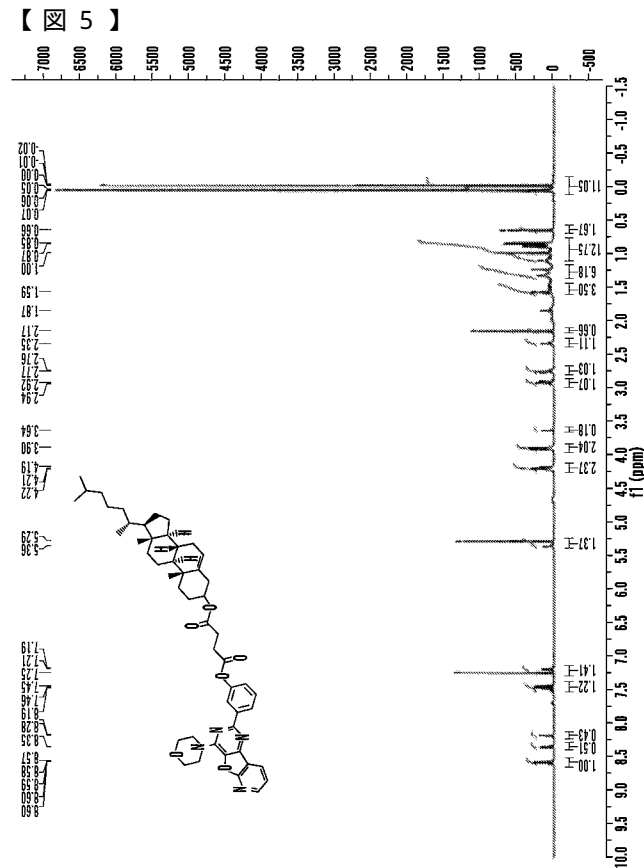
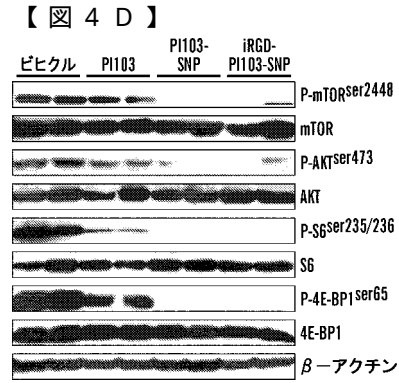
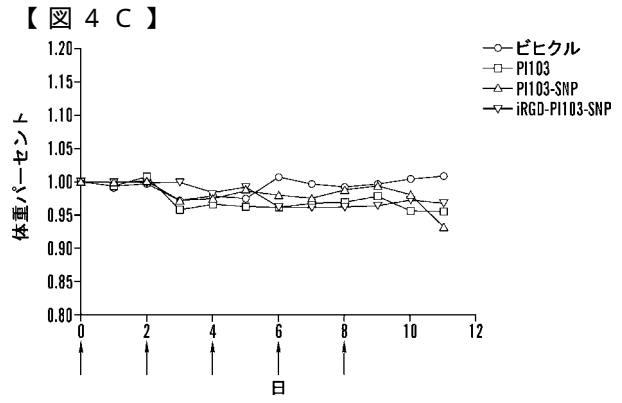
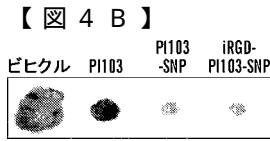
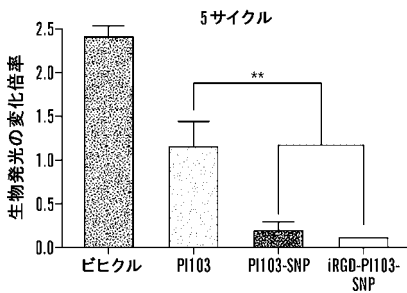
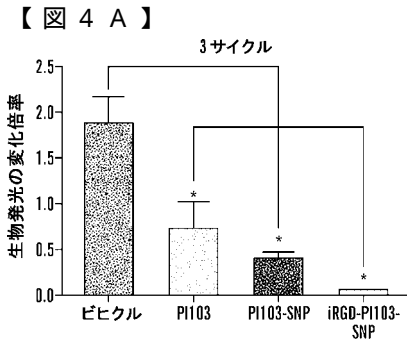


【図 3 B】

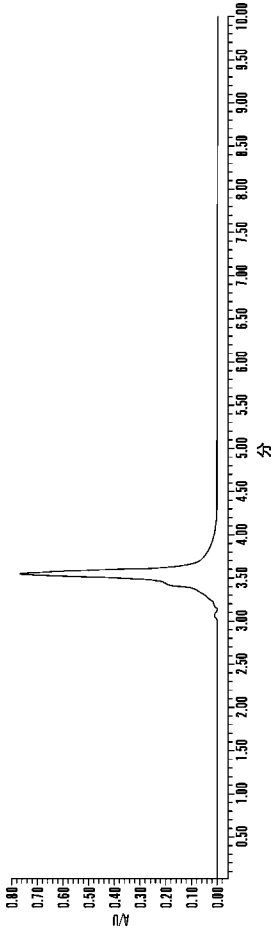


【図 3 E】

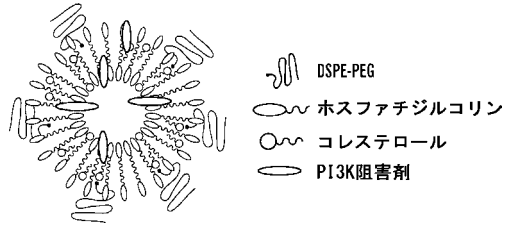




【 図 7 】



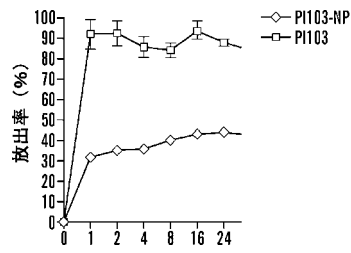
【 図 8 A 】



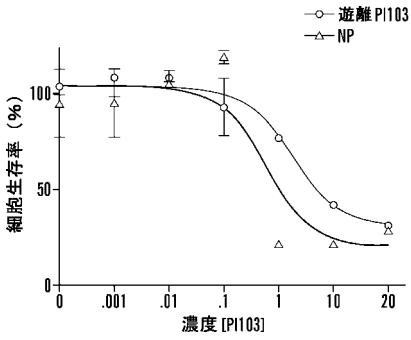
【 図 8 B 】

NO	PI-103 (mg)	コレステロール (mg)	PC (mg)	DSPE-PEG (mg)	サイズ (nm)	取り込み率 (%)
I	1	5	10	1	110	2
II	1	1.2	6.5	2.2	275	14
III	1	1	5	10	296	30

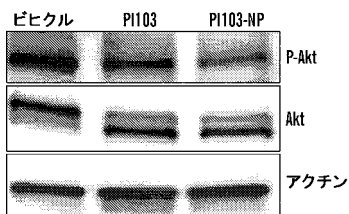
【 図 8 C 】



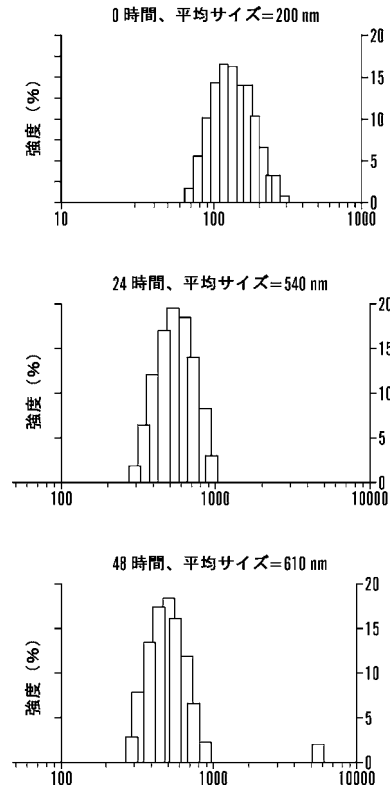
【 図 8 D 】



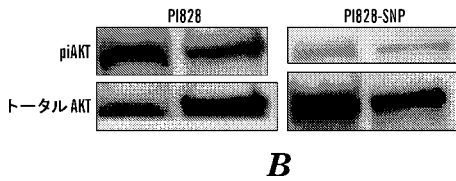
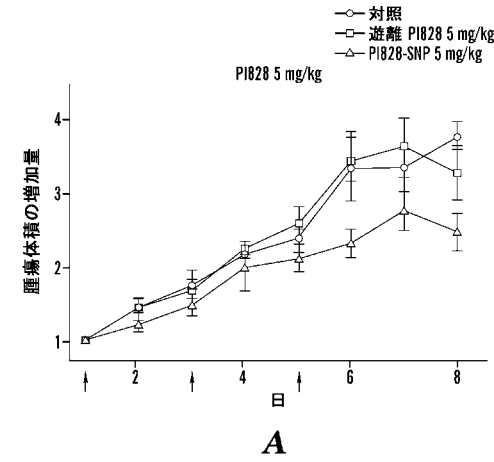
【 図 8 E 】



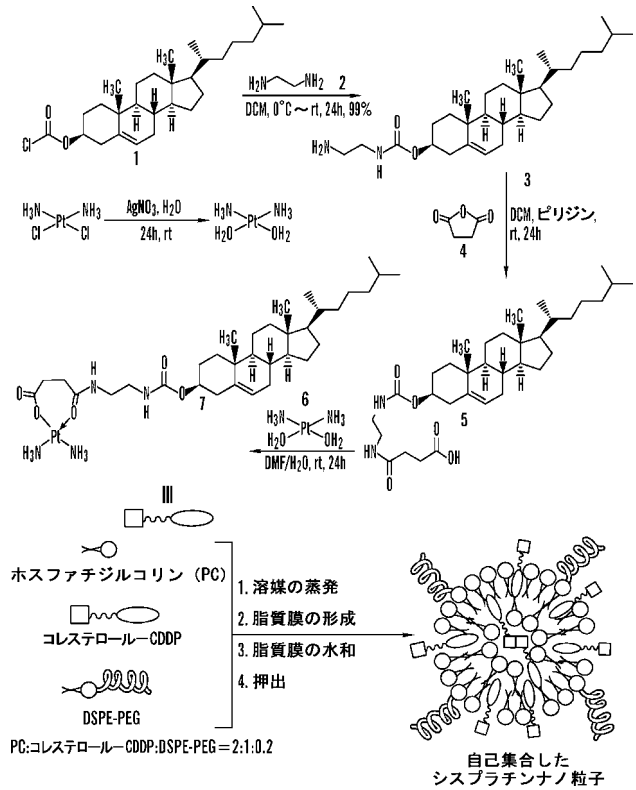
【 図 8 F 】



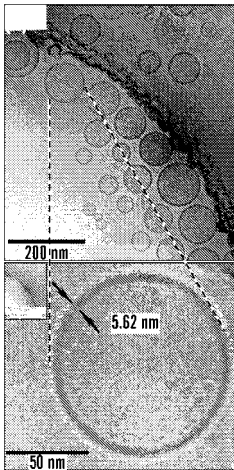
【 図 9 】



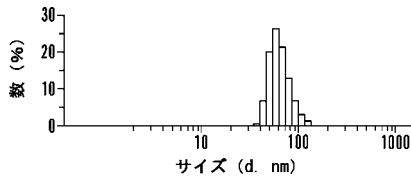
【 図 10 A 】



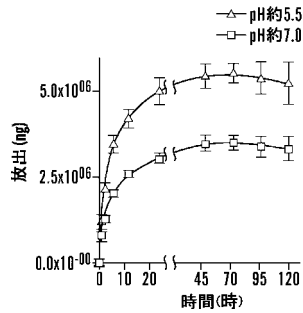
【 図 10 B 】



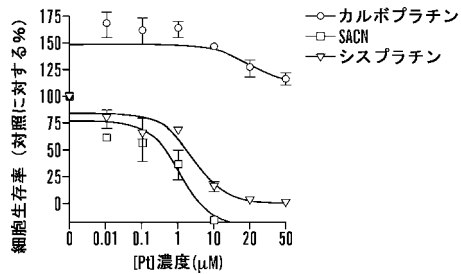
【 図 10 C 】



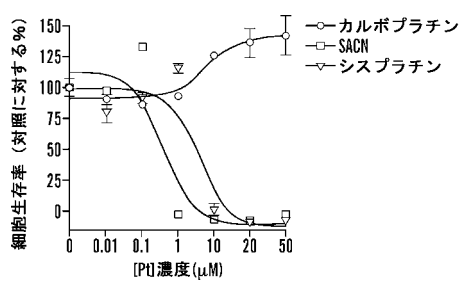
【 図 10 D 】

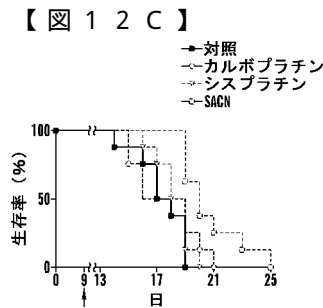
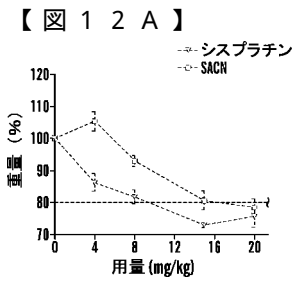
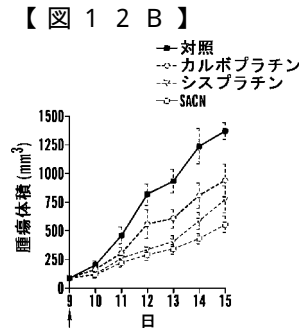
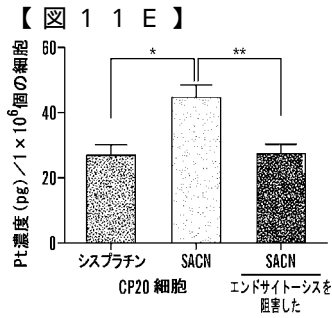
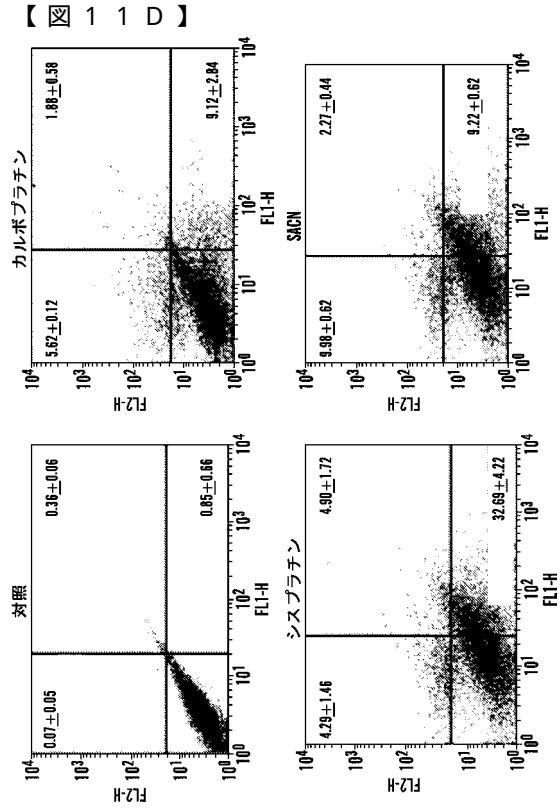
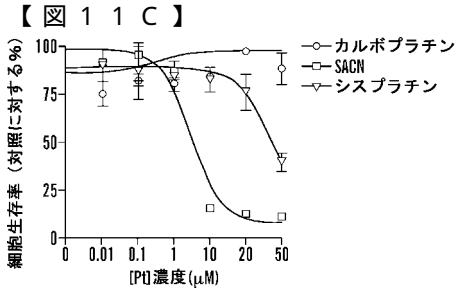


【 図 11 A 】

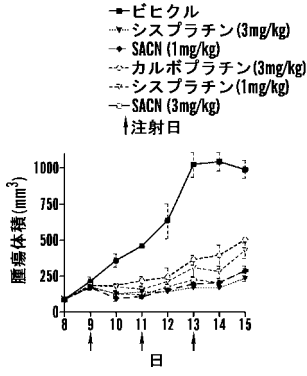


【 図 11 B 】

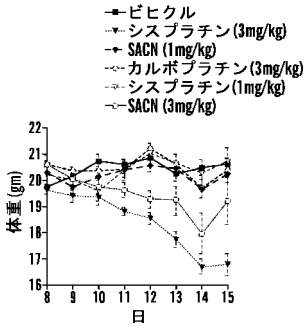




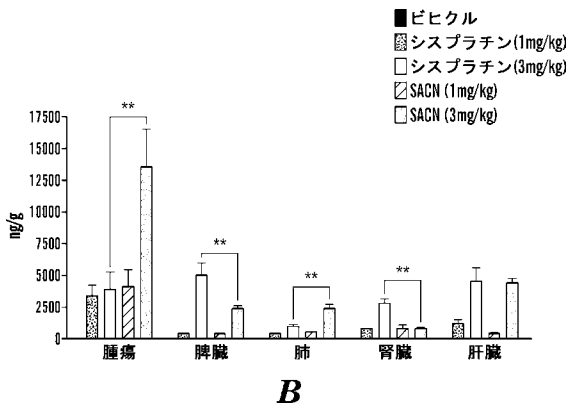
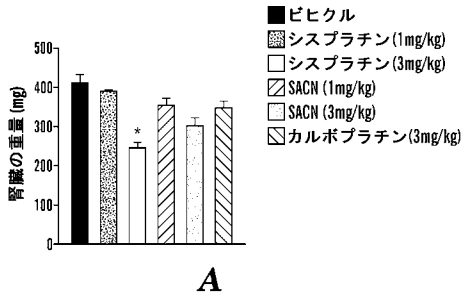
【 図 1 2 D 】



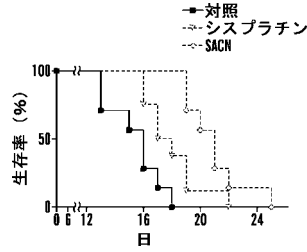
【 図 1 2 E 】



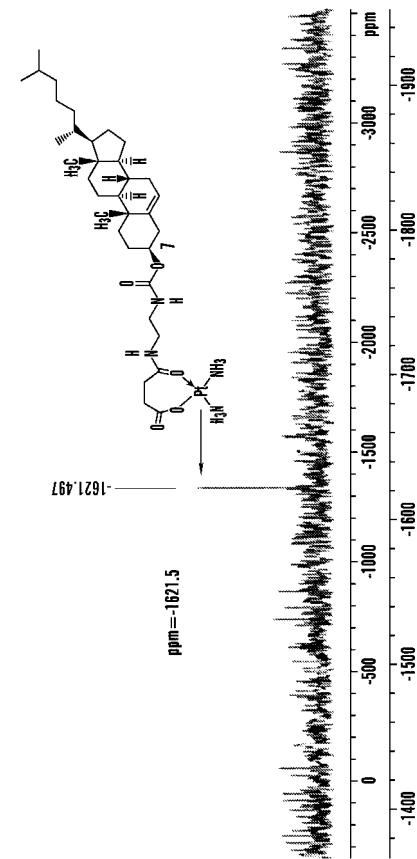
【 図 1 3 】



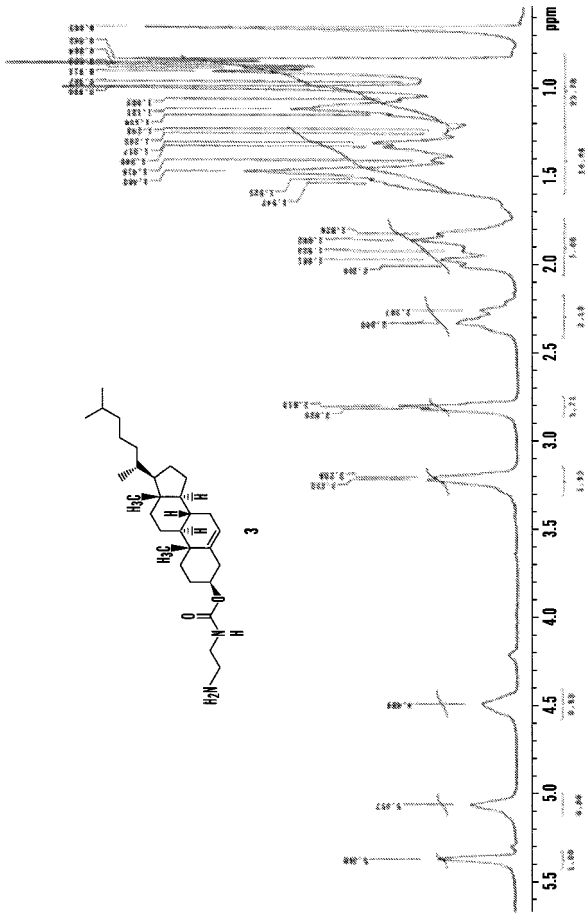
【 図 1 2 F 】



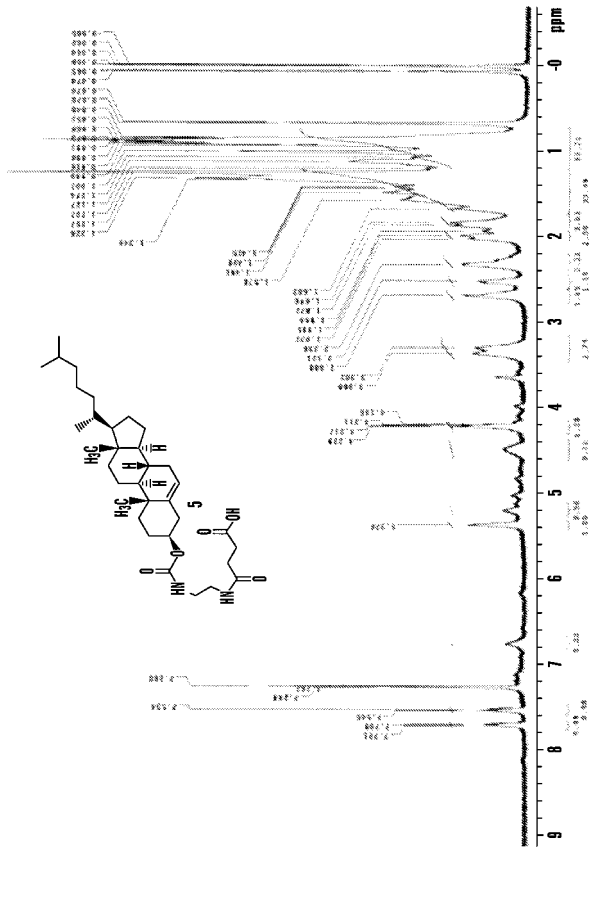
【 図 1 4 】



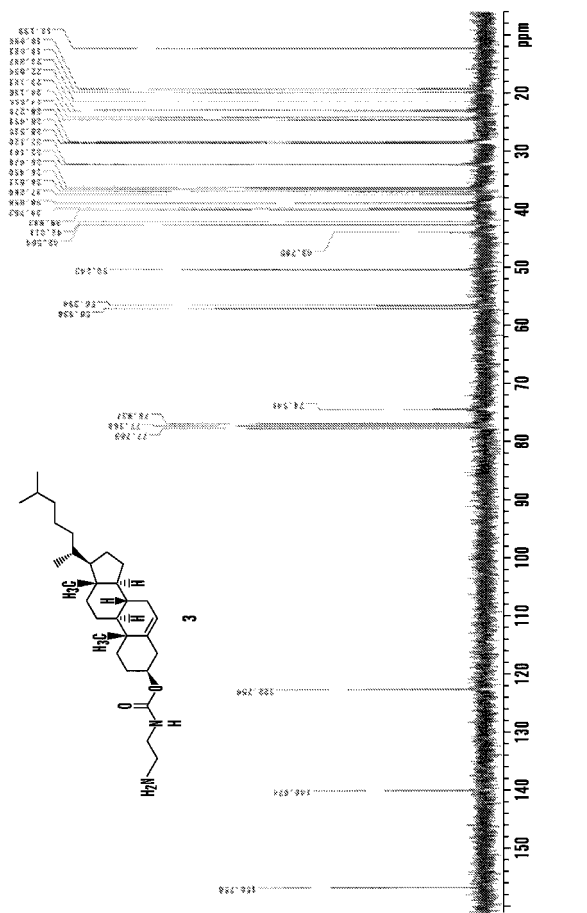
【 図 15 】



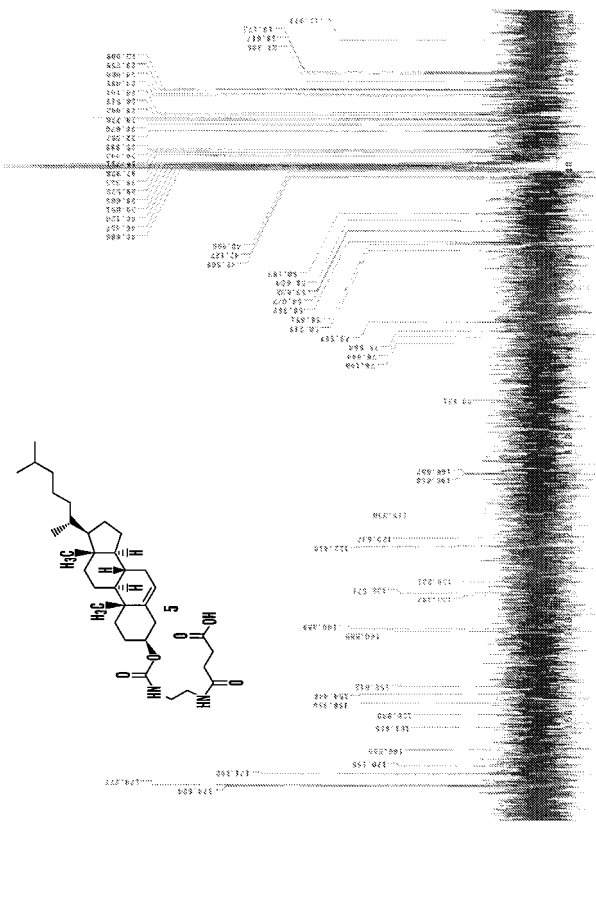
【 図 16 】



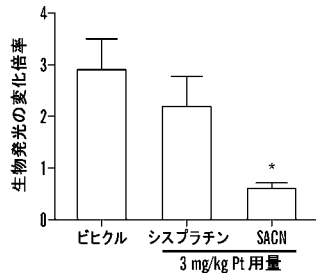
【 図 17 】



【 図 18 】

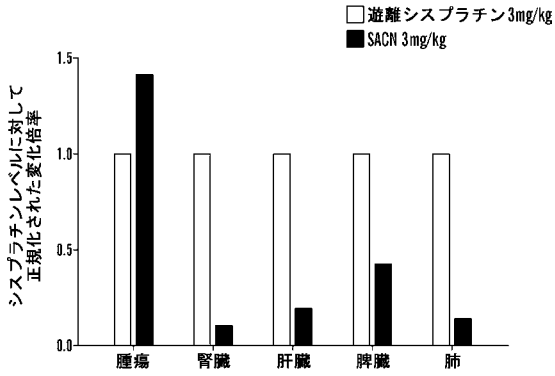
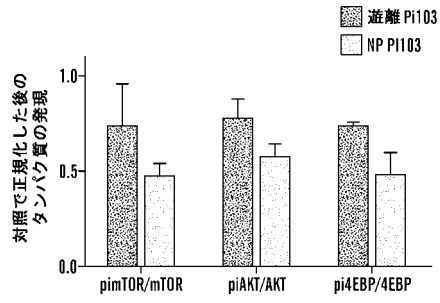


【図 19】



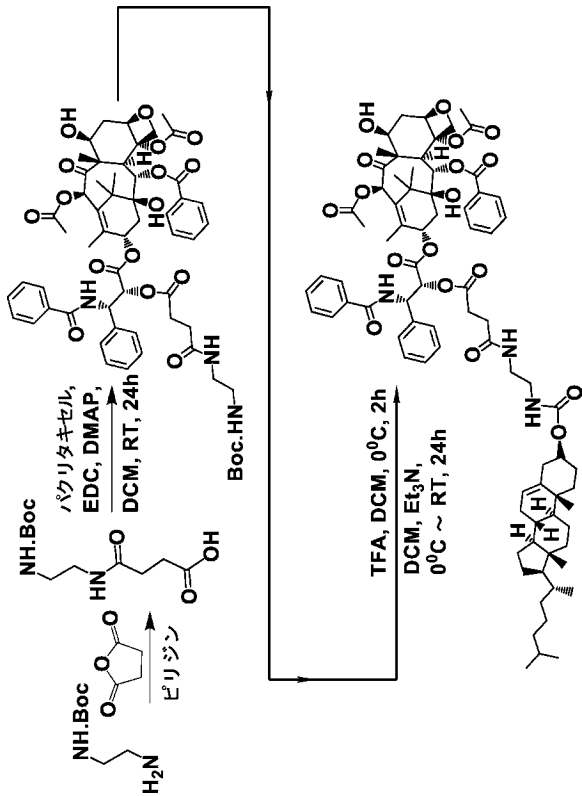
A

【図 20】

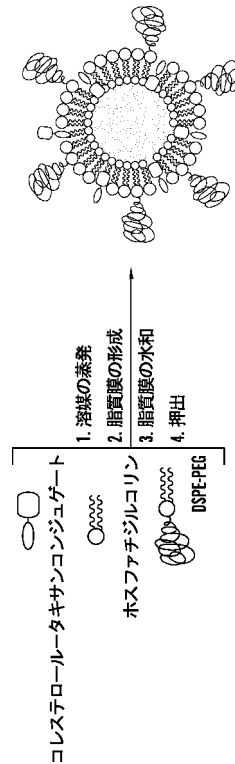


B

【図 21 A】



【図 21 B】

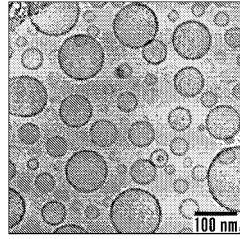




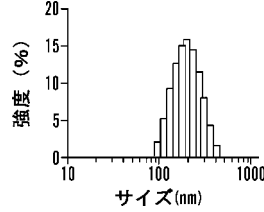
【図 2 1 C】

組成物 (mol%)	サイズ, nm		PDI	負荷率 (%)	ゼータ電位
	PC	DSPE-PEG			
パクリタキセル コレステロール	20	79	0.189	35	-40.4±4.46
	20	70	0.391	55±5	-36.1±4.46
	20	60	0.185	75±8	-20.8±4.47
	20	50	0.188	88±4	-20±7.01
	25	55	0.287	76	-23.9±4.94
	25	45	0.324	62±2	-15.3±4.27
	30	60	0.675	30±20	-40.8±6.30
	30	50	0.303	40	-22.5±7.63

【図 2 1 D】

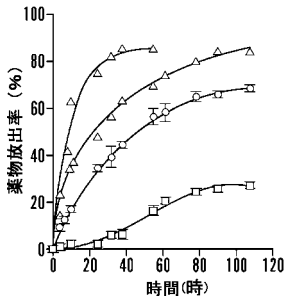


【図 2 1 E】

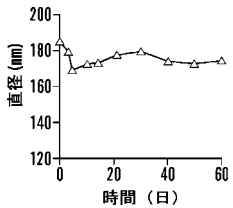


【図 2 1 F】

- △ PBS中の1%DSPE-PEGナノ粒子
- ▽ PBS中の遊離パクリタキセルナノ粒子
- PBS中の30%DSPE-PEGナノ粒子
- ◇ 4T細胞溶解物中の30%DSPE-PEGナノ粒子

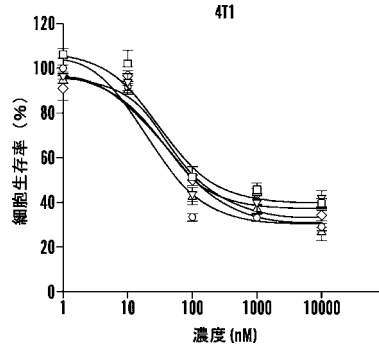


【図 2 1 G】

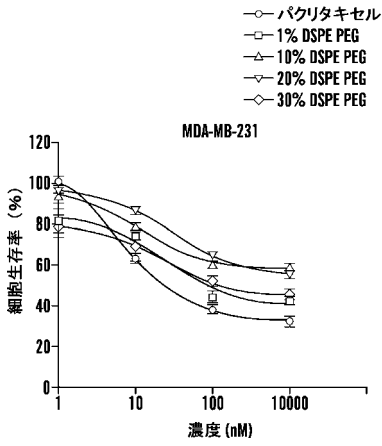


【図 2 2 A】

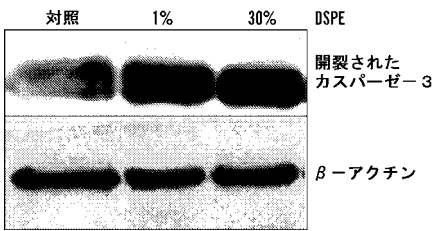
- パクリタキセル
- 1% DSPE PEG
- △ 10% DSPE PEG
- ▽ 20% DSPE PEG
- ◇ 30% DSPE PEG



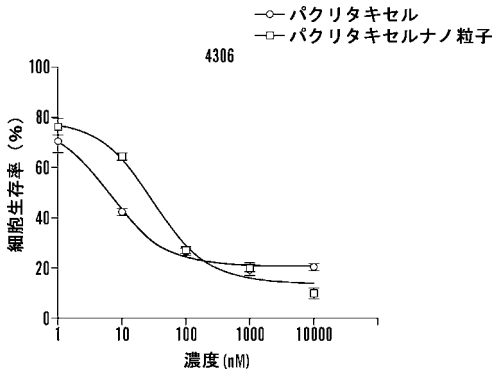
【 図 2 2 B 】



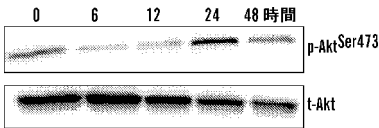
【 図 2 2 C 】



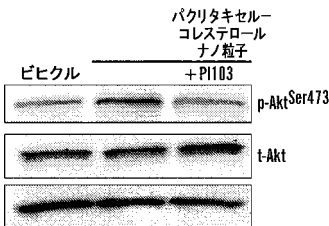
【 図 2 2 F 】



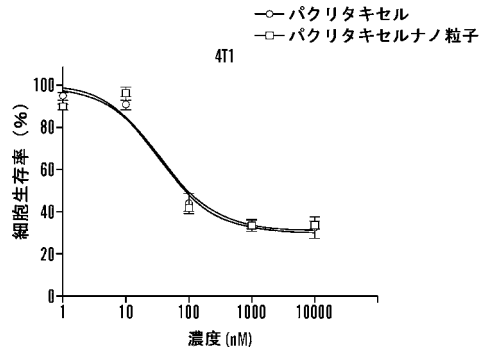
【 図 2 3 A 】



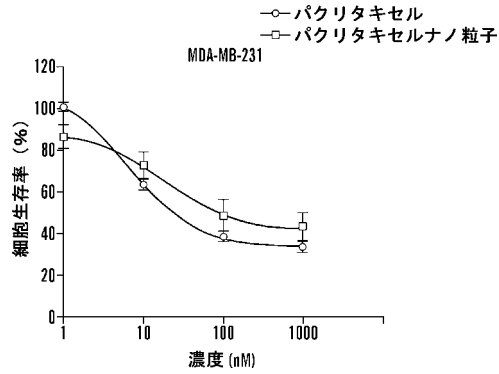
【 図 2 3 B 】



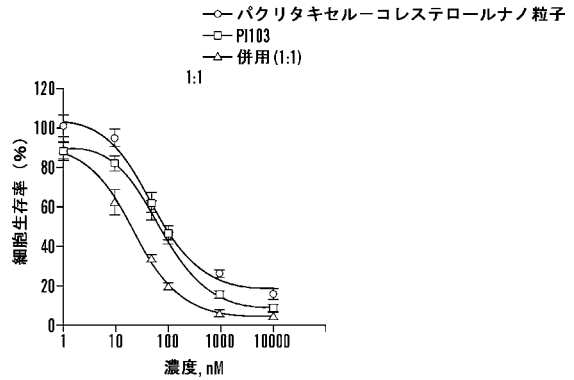
【 図 2 2 D 】



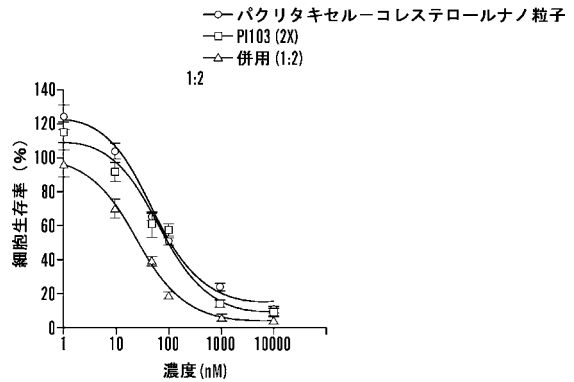
【 図 2 2 E 】



【 図 2 3 C 】



【 図 2 3 D 】



【 図 2 3 E 】

$$CI = \frac{(EC_{50})_{A併用}}{(EC_{50})_A} + \frac{(EC_{50})_{B併用}}{(EC_{50})_B}$$

CI=1 ..... 相加作用 (相互作用なし)  
 CI>1 ..... 拮抗作用  
 CI<1 ..... 相乗作用

【 図 2 3 F 】

Hillの4パラメーター式:

$$Y_A = \text{最小応答}_A + \frac{(\text{最大応答} - \text{最小応答})_1}{(1 + 10^A(\log EC_{50} \cdot x)^A) = \text{Hill係数 A}}$$

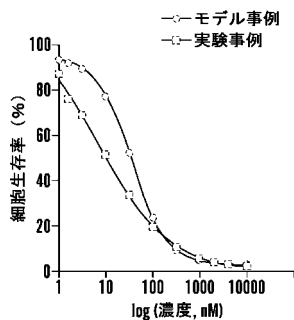
$$Y_B = \text{最小応答}_B + \frac{(\text{最大応答} - \text{最小応答})_2}{(1 + 10^A(\log EC_{50} \cdot x)^A) = \text{Hill係数 B}}$$

Bliss独立モデルを使用して計算された2種の薬物の併用効果,

$$Y_{\text{モデル}} = Y_A \cdot Y_B$$

$$Y_{\text{Exp}} = \text{最小応答}_{併用} + \frac{(\text{最大応答} - \text{最小応答})_{併用}}{(1 + 10^A(\log EC_{50} \cdot x)^A) = \text{Hill係数}_{併用}}$$

【 図 2 3 G 】



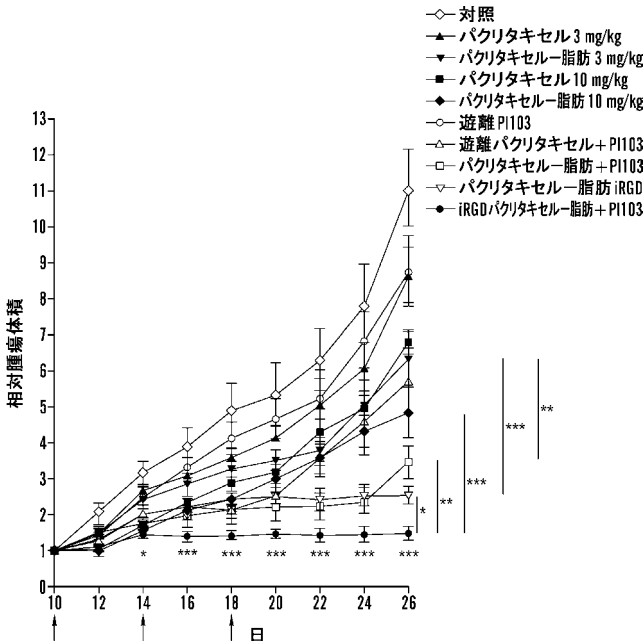
【 図 2 3 H 】

併用	22.42	-0.9106	3.463	92.73	1.325
PI103	80.27	-1.067	8.502	89.32	1.901
バクリタキセル- コレステロールナノ粒子	51.97	-1.095	18.66	103.8	1.716
パラメーター	EC <sub>50</sub> nM	Hill係数	最小応答	最大応答	Log EC <sub>50</sub>

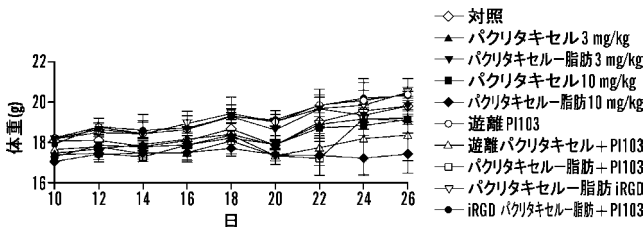
【 図 2 4 A 】



【 図 2 4 B 】



【 図 2 4 C 】





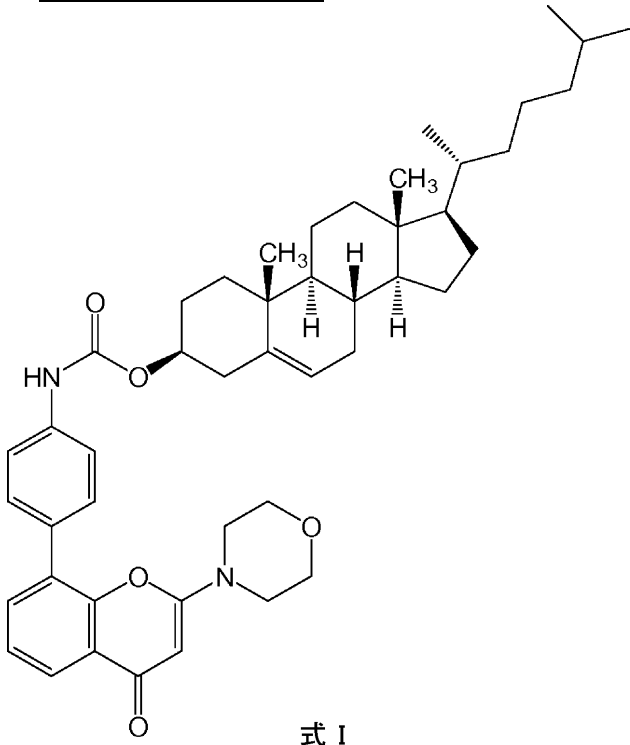
68、IC87114、GDC-0941、ペリホシン、CAL101、PX-866、IPI-145、BAY80-6946、BEZ235、P6503、TGR1202、SF1126、INK1117、BKM120、IL147、XL765、パロミド529、GSK1059615、ZSTK474、PWT33597、TG100-115、CAL263、GNE-447、CUDC-907、およびAEZS-136からなる群より選択される、請求項6記載の超分子ナノ粒子。

【請求項8】

PI3K阻害剤が、PI103およびP1828からなる群より選択される、請求項7記載の超分子ナノ粒子。

【請求項9】

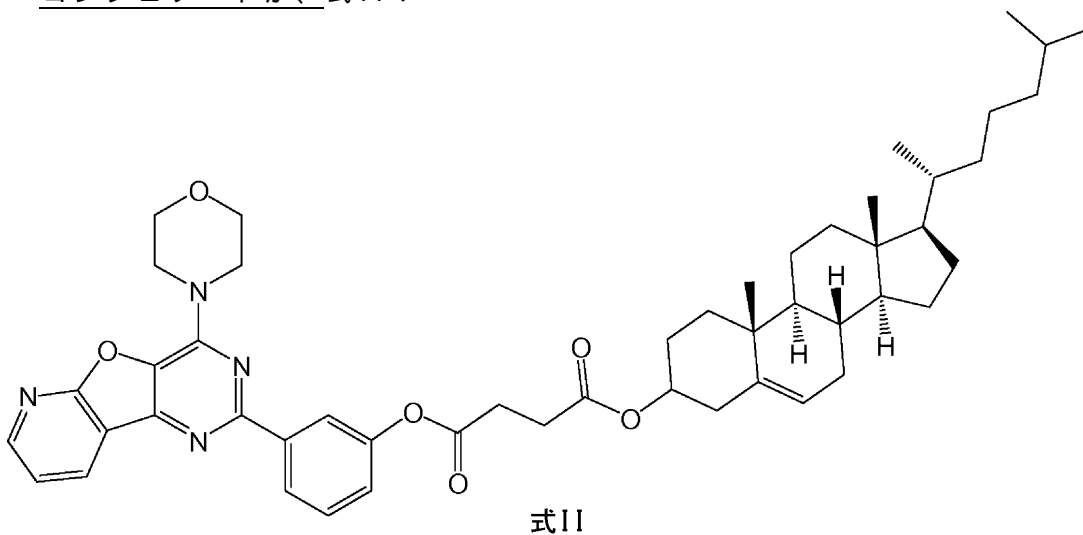
コンジュゲートが、式I：



のコンジュゲートである、請求項6～8のいずれか一項記載の超分子ナノ粒子。

【請求項10】

コンジュゲートが、式II：



のコンジュゲートである、請求項6～8のいずれか一項記載の超分子ナノ粒子。

【請求項11】

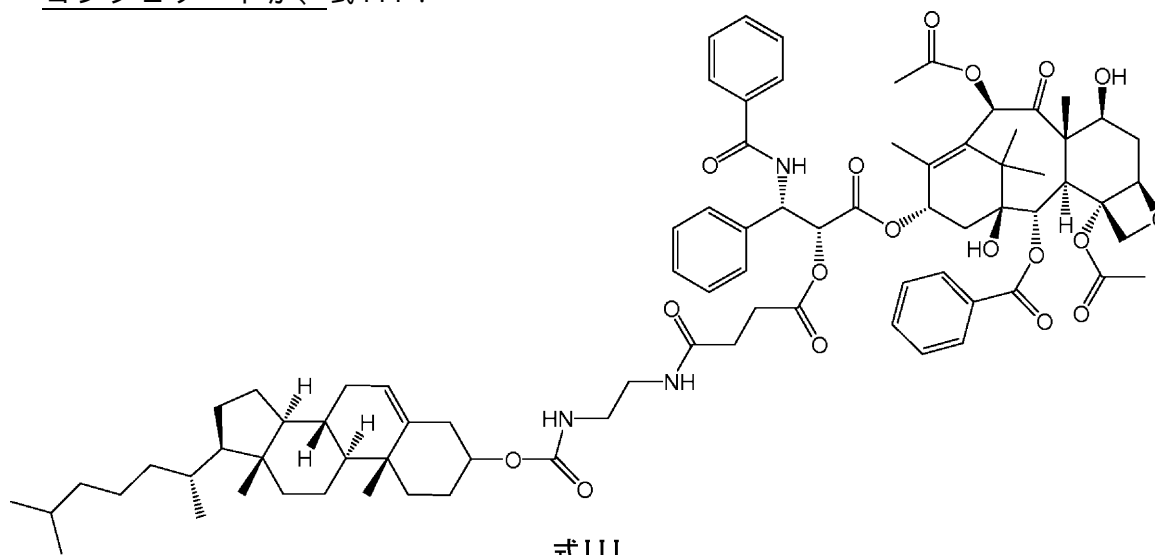
化学療法剤が、タキサンである、請求項1～5のいずれか一項記載の超分子ナノ粒子。

【請求項12】

タキサンが、パクリタキセルまたはドセタキセルである、請求項11記載の超分子ナノ粒子。

【請求項13】

コンジュゲートが、式III：



のコンジュゲートである、請求項12記載の超分子ナノ粒子。

【請求項14】

請求項1～13のいずれか一項記載の超分子ナノ粒子を含む、組成物。

【請求項15】

約1%～約99% (w/w) のコンジュゲートを含む、請求項14記載の組成物。

【請求項16】

コンジュゲートに加えて脂質をさらに含む、請求項14または15記載の組成物。

【請求項17】

約1%～約99% (w/w) の脂質を含む、請求項16記載の組成物。

【請求項18】

コンジュゲートおよび脂質を約10:1～約1:10の比で含む、請求項16または17記載の組成物。

【請求項19】

脂質が、ポリエチレングリコール (PEG) でコンジュゲートされた脂質である、請求項16～18のいずれか一項記載の組成物。

【請求項20】

PEGでコンジュゲートされた脂質が、PEGでコンジュゲートされたジアシルグリセロールおよびジアルキルグリセロール、PEGでコンジュゲートされたホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジン酸、PEGでコンジュゲートされたセラミド、PEGでコンジュゲートされたジアルキルアミン、PEGでコンジュゲートされた1,2-ジアシルオキシプロパン-3-アミンおよびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、請求項19記載の組成物。

【請求項21】

PEGでコンジュゲートされた脂質が、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[アミノ(ポリエチレングリコール)-2000] (DSPE-PEG2000) である、請求項20記載の組成物。

【請求項22】

リン脂質をさらに含む、請求項14～21のいずれか一項記載の組成物。

【請求項23】

約1%～約99% (w/w) のリン脂質を含む、請求項14記載の組成物。

【請求項24】

コンジュゲートおよびリン脂質を約10：1～約1：10の比で含む、請求項22または23記載の組成物。

【請求項25】

リン脂質および脂質を約10：1～約1：10の比で含む、請求項22～24のいずれか一項記載の組成物。

【請求項26】

リン脂質が、ホスファチジルコリン、6～22個の炭素原子を有するアシル基を持つホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸、ホスファチジルセリン、スフィンゴミエリン、ホスファチジルグリセロール、およびそれらの任意の組み合わせから選択される、請求項25記載の組成物。

【請求項27】

リン脂質が、ホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール、レシチン、  
-ジパルミトイル- -レシチン、スフィンゴミエリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、N-(2,3-ジ(9-(Z)-オクタデセニルオキシ))-プロパ-1-イル-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド、ホスファチジルエタノールアミン、リゾレシチン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、セファリン、カルジオリピン、セレブロシド、ジセチルホスフェート、ジオレオイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール、ジオレオイルホスファチジルグリセロール、パルミトイル-オレオイル-ホスファチジルコリン、ジ-ステアロイル-ホスファチジルコリン、ステアロイル-パルミトイル-ホスファチジルコリン、ジ-パルミトイル-ホスファチジルエタノールアミン、ジ-ステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン、ジ-ミリストイル-ホスファチジルセリン、ジ-オレイル-ホスファチジルコリン、ジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン(POPC)、卵ホスファチジルコリン(EPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)、ジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール(DOPG)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール(DPPG)、-ホスファチジルエタノールアミン(POPE)、ジオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシレート(DOPE-mal)、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、請求項26記載の組成物。

【請求項28】

ホスファチジルコリンが、L- $\alpha$ -ホスファチジルコリンである、請求項27記載の組成物。

【請求項29】

標的作用物質をさらに含む、請求項14～28のいずれか一項記載の組成物。

【請求項30】

標的作用物質が、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、酵素、ペプチド模倣体、糖タンパク質、抗体(モノクローナルまたはポリクローナル)ならびにそれらの一部および断片、レクチン、ヌクレオシド、ヌクレオチド、ヌクレオシドおよびヌクレオチド類似体、核酸、単糖、二糖、三糖、オリゴ糖、多糖、リポ多糖、ビタミン、ステロイド、ホルモン、補因子、受容体、受容体リガンド、ならびにそれらの類似体および誘導体からなる群より選択される、請求項29記載の組成物。

【請求項31】

標的作用物質が、iRGDである、請求項30記載の組成物。

【請求項32】

請求項1～13のいずれか一項記載の2つ以上の異なるコンジュゲートを含む、請求項14～31のいずれか一項記載の組成物。

【請求項33】

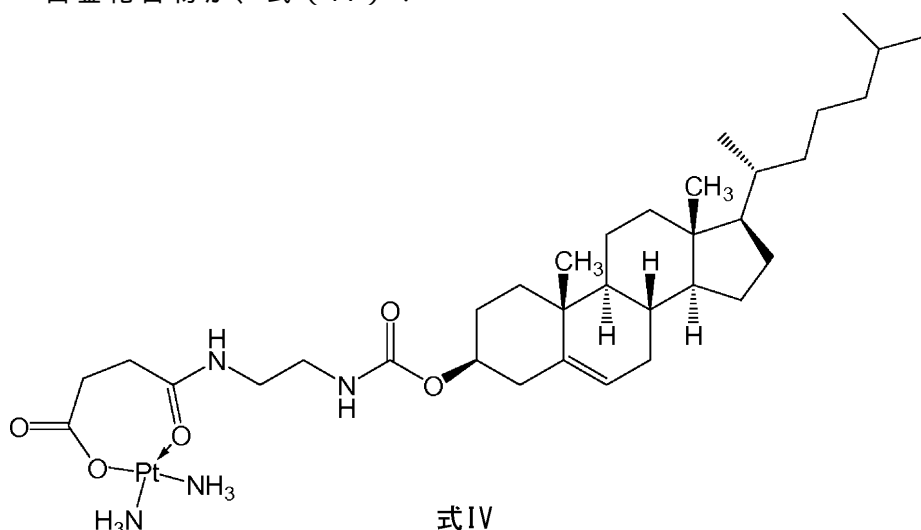
コンジュゲートに加え抗癌剤をさらに含む、請求項14～32のいずれか一項記載の組成物。

## 【請求項34】

抗癌剤が、白金化合物、パクリタキセル、カルボプラチン、ボルテゾミブ、ポリノスタット、リツキシマブ、テモゾロミド、ラパマイシン、アルキル化剤、シクロホスファミド、スルホン酸アルキル、ブスルファン、インプロスルファン、ピボスルファン、アジリジン、エチレンイミン、メチルアメラミン (methylamelamine)、アセトゲニン、カンプトセシン、クリプトフィシン、ナイトロジェンマスタード、ニトロソウレア、抗生物質、エンジン抗生物質、ビスホスホネート、ドキシソルピシン、マイトマイシン、代謝拮抗剤、葉酸類似体、プリン類似体、ピリミジン類似体、アンドロゲン、抗副腎剤、エポチロン、マイタンシノイド、トリコテセン、ゲムシタピン、6-チオグアニン、メルカプトプリン、メトトレキサート、ビンブラスチン、エトポシド、イホスファミド、ミトキサントロン、ピンクリスチン、ビノレルピン、ノバントロン、テニポシド、エダトレキサート、ダウノマイシン、アミノプテリン、ゼローダ、イバンドロネート、イリノテカン、トポイソメラーゼ阻害剤、レチノイド、カペシタピン、コンプレタスタチン、ロイコボリン、ラパチニブ、およびエルロチニブである、請求項33記載の組成物。

## 【請求項35】

白金化合物が、式(IV)：



の化合物である、請求項34記載の組成物。

## 【請求項36】

中性脂質、陽イオン性脂質、陰イオン性脂質、両親媒性脂質、ステロール、またはプログラム可能な融合脂質をさらに含む、請求項14~35のいずれか一項記載の組成物。

## 【請求項37】

コンジュゲート、PEGでコンジュゲートされた脂質、およびリン脂質を含む、請求項14~36のいずれか一項記載の組成物。

## 【請求項38】

PEGでコンジュゲートされた脂質がDSPE-PEG2000であり、リン脂質がホスファチジルコリンである、請求項37記載の組成物。

## 【請求項39】

コンジュゲート、PEGでコンジュゲートされた脂質、およびリン脂質を、約10~0.1:10~0.1:10~0.1の比で含む、請求項37または38記載の組成物。

## 【請求項40】

比が、約1.4:1:3または約10:5:1である、請求項39記載の組成物。

## 【請求項41】

ナノ粒子が、約5nm~約500nmの直径である、請求項14記載の組成物。

## 【請求項42】

ナノ粒子が、約200nm未満の直径である、請求項14記載の組成物。

## 【請求項43】



請求項1～13のいずれか一項記載の超分子ナノ粒子、または請求項14～42のいずれか一項記載の組成物と、任意で薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。

【請求項44】

癌の処置を必要とする患者における癌の処置に使用するための請求項1～13のいずれか一項記載の超分子ナノ粒子、または請求項14～42のいずれか一項記載の組成物。

【請求項45】

癌が、乳癌、卵巣癌、神経膠腫、消化管癌、前立腺癌、癌腫、肺癌腫、肝細胞癌、精巣癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、膀胱癌、頭頸部癌、肺癌、胃食道癌、および婦人科癌からなる群より選択される、請求項44記載の組成物。

【請求項46】

対象が、異常なPI3Kを伴う腫瘍細胞を有すると判定された、請求項44または45記載の組成物。

【請求項47】

1つまたは複数の追加の抗癌治療を患者に同時に施す工程をさらに含む、請求項44～46のいずれか一項記載の組成物。

【請求項48】

追加の治療が、外科手術、化学療法、放射線療法、温熱療法、免疫療法、ホルモン療法、レーザー療法、抗血管新生療法、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、請求項47記載の組成物。

【請求項49】

追加の治療が、抗癌剤を患者に投与することを含む、請求項47記載の使用。

【請求項50】

血糖値の低下を必要とする対象における血糖値の低下に使用するための請求項1～13のいずれか一項記載の超分子ナノ粒子、または請求項14～42のいずれか一項記載の組成物。

## 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	47/24 (2006.01)	A 6 1 K	47/24	
A 6 1 K	47/28 (2006.01)	A 6 1 K	47/28	
A 6 1 K	47/69 (2017.01)	A 6 1 K	47/69	
A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 K	47/42 (2017.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 3
		A 6 1 K	47/42	

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 セングプタ シラディティア

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウォルサム サウス ストリート 606 アパートメント シー

(72)発明者 クルカルニ アシシュ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウォルサム リンデン ストリート 109 アパートメント 21

(72)発明者 ラオ プーアニマ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウォルサム リンデン ストリート 109 アパートメント 21

(72)発明者 ロイ バスカー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ベルモント パーク ロード 26 アパートメント 3

Fターム(参考) 4C076 AA19 AA95 CC27 DD46 DD63F DD70 EE23 EE51 EE59 FF16

FF31 FF36

4C084 AA19 AA22 MA24 NA10 NA12 NA13 NA14 NA15 ZB261 ZC202  
ZC3514C086 AA01 AA02 BA02 BC73 CB22 DA11 GA02 GA12 MA01 MA02  
MA03 MA05 MA24 NA12 NA13 NA14 NA15 ZB26 ZC20 ZC354C206 AA01 AA02 JB16 MA01 MA02 MA03 MA05 MA44 NA12 NA13  
NA14 NA15 ZB26 ZC20 ZC35