

明 細 書

発明の名称：薬物送達用組成物、その製造方法及びその用途

技術分野

[0001] 本発明は、標的組織・臓器への高い集積性を有し、かつ正常臓器への集積が十分に低減された薬物送達用組成物、その製造方法及びその用途に関する。

背景技術

[0002] 細胞への非ウイルス性の核酸導入法としてリン酸カルシウム共沈殿法が知られている。この方法は、低毒性・非免疫原性で、操作が簡便である等の利点を有するが、核酸の導入効率や発現効率の低さが欠点である。

[0003] 赤池らは、炭酸アパタイト（水酸アパタイト（ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ）の水酸基の一部が炭酸基で置換された化学構造を有する）を担体として用いることで、*in vitro*での核酸導入効率を向上させた（特許文献1、非特許文献1）。即ち、核酸と炭酸アパタイトから構成される複合体粒子をpH8.0からpH6.0に変化させた場合において、pH6.0に変化させてから所定時間内に、pH8.0において存在していた前記複合体粒子の少なくとも50%が溶解する細胞導入剤を開示している。複合体粒子は、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、エンドソームから細胞質へ放出される。エンドソーム内のpHは酸性（約pH5.5）であるため、取り込まれた複合体粒子は、pH7前後からpH5といった外部pHの変化にさらされることにより、複合体粒子は速やかに溶解して核酸を放出し、高い細胞導入効率を得られる。

[0004] しかし、炭酸アパタイト粒子は凝集しやすく、マウスに静注するとすぐに血管塞栓を起こしてマウスが即死するため、*in vivo*投与ができなかった。

[0005] そこで、本発明者らは、試験管等の洗浄に通常用いられる超音波洗浄器を用いて、従来の炭酸アパタイト粒子に対して超音波処理を行うことで、平均

粒子径を50nm以下に細分散化することに成功し、動物への血管投与を可能にした。この微粒子は細胞への物質の取り込み効率を顕著に向上させるとともに、抗腫瘍活性を有する薬物を搭載して腫瘍モデルマウスに静脈内投与すると、腫瘍組織に効率よく該薬物を送達させる一方、リポソームやアテロコラーゲンと比べて肝臓や腎臓への集積が低減され、従来よりも少量の薬物により抗腫瘍活性を大きく向上させることに成功し（特許文献2、非特許文献2）、該炭酸アパタイト微粒子をスーパー炭酸アパタイト（sCA）と命名した。本発明者らは、種々のsiRNAやmiRNA等の治療活性を有する小RNA分子やその他の薬物をsCA粒子に搭載し、動物にin vivo投与することにより、がんをはじめとする種々の疾患に対する治療効果を実証している（例えば、非特許文献3及び4等の総説、非特許文献5を参照）。

[0006] しかしながら、カニクイザルへのsCA単独での静脈内投与により、肝機能異常が認められたことから（非特許文献2）、sCAを用いても肝臓等の正常臓器に依然として集積することが示唆された。またsCAに代表される無機イオンをベースとしたシステムは遺伝子の病巣へのデリバリー効率が低いことが問題視されている（非特許文献3）。

[0007] このように、ヒトへの医薬用途に安全に利用するためには、病巣へのより高い集積性と、肝臓をはじめとする正常臓器への集積の低減化を実現する薬物送達システム（DDS）技術の開発が必須である。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：特許第4536655号公報

特許文献2：特許第5436650号公報

非特許文献

[0009] 非特許文献1：Gene, 2006;376(1):87-94.

非特許文献2：PLoSOne, 2015 Mar 4;10(3):e0116022. doi: 10.1371/journal.pone.0116022.

非特許文献3 : Cancers 2020, 12, 1852; doi:10.3390/cancers12071852

非特許文献4 : Journal of Oncology Volume 200, Article ID 8029721, 14 pages <https://doi.org/10.1155/2020/8029721>

非特許文献5 : Mol Cancer Ther. 2018 May;17(5):977-987. doi: 10.1158/1535-7163.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0010] 本発明の目的は、病巣へのより高い集積性と、肝臓をはじめとする正常臓器への集積の低減化とを実現し、以て、より少ない薬物量で十分な治療効果を奏し得る安全かつ有効なDDS技術を提供することである。

課題を解決するための手段

- [0011] 本発明者らは、sCAを用いた薬物導入では、標的組織・臓器（例、がん病巣）だけでなく、正常臓器である肝臓、脾臓、肺などにも依然として集積し、特に肝臓は高い集積を示すことを見出した（図7）。本発明者らは、その原因として、超音波処理により平均粒子径が50nm以下の粒子が多数を占めるようになった後も、肉眼的にミクロンサイズの粒子が依然として存在する点に着目した（非特許文献2）。そこで、sCA粒子のろ過、レーザーによるナノ粒子化、別の破碎処理の使用、sCA粒子表面のポリエチレングリコール（PEG）修飾など、鋭意検討を重ねたが、いずれも巨大粒子の残存を解消するには至らなかった。
- [0012] 次に、本発明者らは、sCA粒子表面をPEG化するのではなく、粒子が形成する際に、PEGを「くぎ」のように取り込ませて、それに破碎処理を組み合わせることにより微粒子化を図ることを着想した。そこで、平均分子量が2000のPEG誘導体と10000のPEG誘導体を用いて、炭酸アパタイト作製時のバッファーに初めからPEG誘導体を添加したところ、前者では、PEG誘導体なしの場合と比べて肉眼的にsCA粒子量（液体の混濁度）が少なくなったので、分子量10000のPEG誘導体を用いて検討を行った。その結果、従来水槽式超音波洗浄処理や湿式破碎処理では、原

子間力顕微鏡（AFM）観察では粒子が大きすぎて明瞭な像は得られなかったが、Covarisと呼ばれる特殊超音波処理を用いた場合、AFMで粒子が明瞭に同定できる程度に分散化が達成され、動的散乱法（DLS）でも単一のピークが得られ、平均粒子径は650nmとなった。強力なCovaris超音波処理を加えても、粒子内の核酸は水槽式超音波洗浄処理の場合と同程度に分解されずに保全された。

[0013] 粒子形成時にPEG誘導体を添加したsCAにマイクロRNA（miR-34a）を搭載し超音波処理したものを、miR-34a感受性の大腸癌細胞に添加したところ、Covaris処理したsCAは、水槽式超音波洗浄処理した従来のsCAと同程度の細胞障害性を示した。

[0014] DLSで測定したCovaris処理粒子の平均粒子径は650nmであったが、50倍希釈してAFMで測定すると微小な粒子は30nm前後であり、DLSで測定したものが粒子の容積として大部分を占めたので、それが核酸の抗腫瘍効果をもたらすと考え、検証を行った。中空糸膜を用いて、10～50nm、50～200nm及び200～1000nmの粒子にサイズ分画し、各画分に搭載された核酸（MIRTX：非特許文献5）量を測定したところ、200～1000nmの画分に従来のsCAの8分の1量の核酸が存在し、それより小さい画分では検出限界以下であった。MIRTX感受性の膵癌細胞を皮下移植したヌードマウスに各画分及び従来のsCAをそれぞれ静脈内投与したところ、200～1000nmの画分は、sCAに搭載された核酸量の8分の1の核酸量にもかかわらず、従来のsCAよりも有意に腫瘍の増殖を抑制した。一方、それよりも小さい粒子径の画分は腫瘍増殖抑制効果を示さなかった。

以上より、本発明者らは、200～1000nmの画分が抗腫瘍効果の本体であることを実証した。また、このようにして作成した新しいDDSをcNaD1（Controlled inorganic Nanoparticle Drug1）と命名した。

[0015] 蛍光標識した核酸をsCA又はcNaD1に搭載し、担癌マウスに静脈内

投与した後にマウスの腫瘍と正常臓器を摘出し、蛍光強度を測定したところ、 $cNaD1$ に搭載した蛍光核酸は sCA の8分の1量で腫瘍では sCA を投与した場合と同じように光り、一方、肝臓をはじめとする正常臓器への集積は sCA に比べて大きく低減された。

[0016] $cNaD1$ が sCA より顕著に少ない核酸量で、 sCA よりも優れた治療効果を示したことから、本発明者らは、平均分子量2000のPEG誘導体を用いて、粒子形成時にPEG誘導体を取り込ませた。その結果、驚くべきことに、平均分子量2000のPEG誘導体を用いると、超音波処理や中空糸膜による分画処理を必要とせずに、DLSで平均粒子径740nmの単一ピークを示し、そのまま薬物送達用担体として使用することができた。 $cNaD1$ の場合と同様に、 sCA よりも顕著に少ない投与量で有意に優れた抗腫瘍効果を奏し、一方、 sCA と同等の高用量を投与しても、正常組織への集積はほとんど認められなかった。そこで、平均分子量2000のPEG誘導体を用いて調製した粒子を、 $cNaD2$ と命名した。

[0017] 次に、 $cNaD2$ において、PEG誘導体溶解からの時間経過による粒子性能を経時的に調べたところ、PEG誘導体溶解から2、3日後に粒子形成を行った場合に、取り込んだ Ca 量あたりの取り込んだ核酸量(NA/CA 比)が最も高くなり、核酸搭載効率が向上することが明らかとなった。ここで用いたPEG誘導体は、一端がメチル化され、他端にカルボン酸と N -ヒドロキシサクシンイミド(NHS)とのエステルが付加された誘導体であり、加水分解されやすい性質を有する。本発明者らは、加水分解が進行するにつれて粒子中の核酸量が増加することから、末端の5員環は不要ではないかと考え、モノメチル化PEGから末端が遊離カルボン酸のPEG誘導体を合成し、これを用いて粒子を作成して核酸搭載量を $cNaD2$ と比較した。その結果、合成したいずれのモノメチルモノカルボン酸PEGを用いて作った粒子も、 $cNaD2$ と同等もしくはそれ以上の核酸を搭載することができた。モノメチルモノカルボン酸PEGを用いて作った粒子に蛍光標識した核酸を搭載して、担癌マウスへの投与によりの腫瘍及び肝臓への集積を調べたと

ころ、s C Aと比べて腫瘍への蓄積は顕著に増大し、肝臓への集積は顕著に低減された。一方、末端にカルボン酸を有しない通常のP E Gを用いた場合は、s C Aと同等もしくはそれ以下の低い腫瘍特異性を示した。

[0018] 以上のことから、c N a Dに用いるP E Gとしては、末端に1以上のカルボン酸を有するP E G誘導体が好ましいことが示唆されたので、本発明者らは、さらに4種のモノー又はジカルボン酸P E Gを調製して粒子を作成し、これら(c N a D 3～c N a D 6)に蛍光核酸を搭載させて担癌マウスに静脈内投与すると、c N a D 1やc N a D 2と同様に優れた腫瘍集積性と肝臓をはじめとする正常臓器への集積が低減することを確認した。

[0019] 本発明者らは、これらの知見に基づいて本発明を完成するに至った。

[0020] すなわち、本発明は以下のものを提供する。

[項1]

薬物を搭載してなる炭酸アパタイト粒子を含有する組成物であって、該粒子の平均粒子径が500nmより大きく1000nm以下であり、末端に1以上のカルボン酸もしくはその誘導体又はその塩を有するポリエチレングリコール(P E G)誘導体の存在下で一次粒子が形成され、該一次粒子にP E G誘導体を取り込まれていることを特徴とする、組成物。

[項2]

前記P E G誘導体の平均分子量が1000～20000である、項1に記載の組成物。[項3]

前記組成物が、前記P E G誘導体及び／又はその反応物を含有する、項1又は2に記載の組成物。

[項4]

前記P E G誘導体の平均分子量が1000～5000である、項3に記載の組成物。

[項5]

前記P E G誘導体が末端に1以上のカルボン酸又はその塩を有する、項1～4のいずれか1項に記載の組成物。

[項 6]

薬物が核酸である、項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

[項 7]

薬物が抗腫瘍活性を有する、項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

[項 8]

さらにアルブミンを含有する、項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

[項 9]

項 1 に記載の組成物の製造方法であって、薬物及び PEG 誘導体を搭載してなる炭酸アパタイト粒子を、一点集中型超音波照射装置を用いて超音波処理することを含む、方法。

[項 10]

薬物及び PEG 誘導体を搭載してなる炭酸アパタイト粒子が、薬物及びカルシウムイオンを含む第 1 の溶液、リン酸イオン及び炭酸水素イオンを含む第 2 の溶液並びに PEG 誘導体を混合することにより調製される、項 9 に記載の方法。

[項 11]

中空糸膜を用いて、請求項 1 に記載の組成物を濃縮することをさらに含む、項 9 又は 10 に記載の方法。

[項 12]

項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の組成物を含有してなる、薬物送達用組成物。

[項 13]

薬物が抗腫瘍活性を有し、標的組織が腫瘍である、項 12 に記載の薬物送達用組成物。

[項 14]

薬物が抗炎症活性を有し、標的組織が炎症組織である、項 12 に記載の薬物送達用組成物。

発明の効果

[0021] 本発明によれば、病巣へのより高い集積性を有し、かつ肝臓をはじめとする正常臓器への集積が低減され、より少ない薬物量で十分な治療効果を奏する安全かつ有効な薬物送達用組成物が提供される。

図面の簡単な説明

[0022] [図1-1]PEG誘導体の非存在下に粒子形成させた炭酸アパタイト粒子の超音波処理による粒子径の変化を示す図である。

[図1-2]PEG誘導体 (SUNBRIGHT ME-100CS) の存在下に粒子形成させた炭酸アパタイト粒子の超音波処理による粒子径の変化を示す図である。

[図2]PEG誘導体 (SUNBRIGHT ME-100CS) の添加量の粒子形成に及ぼす影響を示す図である。

[図3]超音波処理及び湿式破碎処理後の粒子中の核酸をアガロースゲル電気泳動で検証した結果を示す図である。

[図4]超音波処理の方法を変えてもmiR-34aによる細胞障害能はPEG誘導体の添加の有無にかかわらず同等であることを示す図である。

[図5]sCA-MIRTXとPCANP-MIRTXの各サイズ分画の核酸 (MIRTX) 搭載量の測定結果を示す図である。MIRTXは非特許文献5に記載の抗腫瘍活性を有するmicroRNAである。

[図6]MIRTXを搭載したsCAとPCANP-MIRTXの各サイズ分画による抗腫瘍効果を示す図である。

[図7]sCAとPCANPの200~1,000 nmのサイズ分画に搭載されたAlexa750標識NC (Negative Control) siRNAの腫瘍及び正常臓器への取り込みを示す図である。

[図8]PCANP (200-1000nm) の粒子サイズを示す図である。

[図9]大腸癌DLD1に対するsCA及びcNaD2に搭載されたmiR-136の治療効果を示す図である。

[図10]大腸癌患者由来PDX (patient derived xenograft) から作った大きな腫瘍 (600mm³) に対するcNaD2に搭載されたmicroRNAの治療効果を示す図である。

[図11]膵臓癌Panc-1から作製した癌幹細胞モデル細胞に対するcNaD2に搭載さ

れたSdc4 siRNAの治療効果を示す図である。

[図12-1]Alexa750標識NC siRNAをsCA又はcNaD2に搭載して担癌マウスに投与してから1時間後の腫瘍への核酸の集積を示す図である。

[図12-2]Alexa750標識NC siRNAをsCA又はcNaD2に搭載して担癌マウスに投与してから4時間後の正常臓器への核酸の集積を示す図である。

[図13]cNaD2の粒子サイズを示す図である。

[図14]モノメチルモノカルボン酸PEGの存在下で作製した炭酸アパタイト粒子(sCA-C1-Iris, sCA-C1-Hamari)、cNaD2及びsCAの核酸搭載量の比較を示す図である。上段は粒子量あたりの核酸量、下段はCa量あたりの核酸量を示す。

[図15-1]モノメチルモノカルボン酸PEGの存在下で作製した炭酸アパタイト粒子(Handai-C1, Hamari-C1)、HO-PEG-OHの存在下で作製した炭酸アパタイト粒子、sCA及びsCAの表面をPEG修飾した粒子(Pegylation)にAlexa750標識NC siRNAを搭載し、Ca量を一定(0.1 mg)にして担癌マウスに投与してから1時間後の腫瘍への核酸の集積を示す図である。

[図15-2]モノメチルモノカルボン酸PEGの存在下で作製した炭酸アパタイト粒子(Handai-C1, Hamari-C1)、HO-PEG-OHの存在下で作製した炭酸アパタイト粒子、sCA及びsCAの表面をPEG修飾した粒子(Pegylation)にAlexa750標識NC siRNAを搭載し、Ca量を一定(0.1 mg)にして担癌マウスに投与してから4時間後の正常臓器への核酸の集積を示す図である。

[図16-1]モノメチルモノカルボン酸PEGの存在下で作製した炭酸アパタイト粒子(Handai-C1, Hamari-C1)、HO-PEG-OHの存在下で作製した炭酸アパタイト粒子、sCA及びsCAの表面をPEG修飾した粒子(Pegylation)にAlexa750標識NC siRNAを搭載し、核酸量を一定(15 μ g)にして担癌マウスに投与してから1時間後の腫瘍への核酸の集積を示す図である。

[図16-2]図16-1の経時的変化を示す図である。モノメチルモノカルボン酸PEGの存在下で作製した炭酸アパタイト粒子(Handai-C1, Hamari-C1)、HO-PEG-OHの存在下で作製した炭酸アパタイト粒子、sCA及びsCAの表面をPEG修飾

した粒子 (Pegylation) にAlexa750標識NC siRNAを搭載し、核酸量を一定 (15 μ g) にして担癌マウスに投与してから1時間後 (左パネル) 及び4時間後 (右パネル) の腫瘍への核酸の集積を示す。

[図16-3]モノメチルモノカルボン酸PEGの存在下で作製した炭酸アパタイト粒子 (Handai-C1, Hamari-C1) H0-PEG-OHの存在下で作製した炭酸アパタイト粒子、sCA及びsCAの表面をPEG修飾した粒子 (Pegylation) にAlexa750標識NC siRNAを搭載し、核酸量を一定 (15 μ g) にして担癌マウスに投与してから4時間後の正常臓器への核酸の集積を示す図である。

[図16-4]図16-3の経時的变化を示す図である。モノメチルモノカルボン酸PEGの存在下で作製した炭酸アパタイト粒子 (Handai-C1, Hamari-C1)、H0-PEG-OHの存在下で作製した炭酸アパタイト粒子、sCA及びsCAの表面をPEG修飾した粒子 (Pegylation) にAlexa750標識NC siRNAを搭載し、核酸量を一定 (15 μ g) にして担癌マウスに投与してから1時間後 (左パネル) 及び4時間後 (右パネル) の正常臓器への核酸の集積を示す。

[図17]sCA、sCAの表面をPEG修飾した粒子 (Pegylation) 及びcNaD3～cNaD6の各粒子を構成する核酸とカルシウムの比率 (μ g/mg) を示す図である。

[図18]ジカルボン酸PEGの存在下で作製した炭酸アパタイト粒子 (cNaD6) は、モノメチルモノカルボン酸PEGの存在下で作製した炭酸アパタイト粒子 (cNaD3) と同様の腫瘍、肝臓への集積を示すことを表す図である。Alexa750標識NC siRNAを搭載し、核酸量を一定 (15 μ g) にして担癌マウスに投与したときの核酸の集積を示す。

[図19]大腸癌DLD1に対するcNaD3に搭載されたMIRTXの治療効果を示す図である。

[図20]sCA、用時調製又は凍結乾燥保存したcNaD3に搭載されたAlexa750標識NC siRNAのマウス皮下腫瘍及び肝臓への取り込みを示す図である。

[図21-1]Alexa750標識NC siRNAをsCA又はcNaD1 に搭載してリウマチモデルマウスに投与してから40分後の四肢の炎症関節への核酸の集積を示す図である。

[図21-2]Alexa750標識NC siRNAをsCA又はcNaD1に搭載してリウマチモデルマウスに投与してから45分後の肝臓への核酸の集積を示す図である。

[図22]sCA、cNaD2、cNaD3 (sCA-C1-HAMARI, sCA-C2-Handai) 及びPEG-OHを用いて作製した炭酸アパタイト粒子 (sCA-SIGMA(-OH)) のX線回折解析の結果を示す図である。

発明を実施するための形態

- [0023] 本発明は、薬物を搭載してなる炭酸アパタイト粒子を含有する組成物であって、該粒子の平均粒子径が500nmより大きく1000nm以下であり、PEG誘導体の存在下で一次粒子が形成され、該一次粒子にPEG誘導体を取り込まれていることを特徴とする、組成物（以下、「本発明の組成物」ともいう。）を提供する。
- [0024] 本発明において使用できる炭酸アパタイト及び炭酸アパタイト粒子は公知である。炭酸アパタイトは、水酸アパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) の水酸基 (OH^-) の一部を炭酸基 (CO_3^{2-}) にて置換した化学構造を有し、一般式 $\text{Ca}_{10-m}\text{X}_m(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)_{1-n}\text{Y}_n$ で表すことができる。ここで、Xは、炭酸アパタイトにおけるCaを部分的に置換しうる元素であればよく、例えば、Sr、Mn、希土類元素等を挙げることができる。mは、通常0以上1以下の正数であり、好ましくは0以上0.1以下であり、より好ましくは0以上0.01以下であり、更に好ましくは0以上0.001以下である。Yは、炭酸アパタイトにおける CO_3 を部分的に置換しうる単位であり、OH、F、Cl等を例示することができる。nは、通常0以上0.1以下の正数であり、好ましくは0以上0.01以下であり、より好ましくは0以上0.001以下であり、更に好ましくは0以上0.0001以下である。
- [0025] 炭酸アパタイト粒子は、公知の手法に従って得ることが出来る。例えば、カルシウムイオン、リン酸イオン及び炭酸水素イオンを含有する水溶液を調製することにより得ることが出来る。水溶液中の各イオン濃度は、炭酸アパタイト粒子が形成される限り特に制限されず、下記を参考に適宜設定するこ

とができる。

[0026] 水溶液中のカルシウムイオン濃度は、通常0.1 mM以上であり、好ましくは0.5 mM以上であり、より好ましくは1 mM以上である。カルシウムイオン濃度の上限は、通常1 M以下であり、好ましくは100 mM以下であり、より好ましくは10 mM以下である。

[0027] 水溶液中のリン酸イオン濃度は、通常0.1 mM以上であり、好ましくは0.5 mM以上であり、より好ましくは1 mM以上である。リン酸イオン濃度の上限は、通常1 M以下であり、好ましくは100 mM以下であり、より好ましくは10 mM以下である。

[0028] 水溶液中の炭酸水素イオン濃度は、通常1.0 mM以上であり、好ましくは5 mM以上であり、より好ましくは10 mM以上である。炭酸水素イオン濃度の上限は通常10 M以下であり、好ましくは1 M以下であり、より好ましくは100 mM以下である。

[0029] カルシウムイオン、リン酸イオン及び炭酸水素イオンの供給源は、水溶液中にこれらのイオンを供給可能である限り特に制限されないが、例えば、これらのイオンの塩を水溶液に添加することができる。具体的には、カルシウムイオン源として CaCl_2 または $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を用いることができ、リン酸イオン源として $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を用いることができ、炭酸イオン源として NaHCO_3 を用いることができる。

[0030] 炭酸アパタイト粒子に他の物質を包含させる場合は、炭酸アパタイト粒子を形成する際に、他の物質を水溶液に添加することができる。当該「他の物質」として、任意の薬物及び後述のPEG誘導体が挙げられる。薬物の種類は特に制限されないが、炭酸アパタイト粒子を細胞又は生体への物質の運搬体として用いる場合は、種々の生理活性物質を用いることができる。本明細書において、「搭載」とは、他の物質を運搬可能な状態で炭酸アパタイト粒子と当該他の物質とが任意の態様で接着し、複合体化している状態を含む。従って、炭酸アパタイト粒子の内側だけでなく、外側に当該他の物質が接着した状態も、本発明における「搭載」に含まれる。また、本明細書において

、炭酸アパタイト粒子と当該他の物質との関係について「取り込み」等の用語を用いる場合、「搭載」と実質的に同義である。

[0031] 上記薬物としては、例えば、DNA、RNA、アンチセンス核酸、siRNA、miRNA、アプタマー等の核酸、酵素、ペプチド又はタンパク質、各種ペプチド性ホルモン等のポリペプチド、各種抗がん剤、中枢神経系疾患治療薬、各種抗生物質、末梢神経疾患治療薬、感覚器官疾患治療薬、循環器官疾患治療薬、呼吸器官系疾患治療薬、消化器官系疾患治療薬、ホルモン製剤、泌尿生殖器官疾患治療薬、外皮疾患治療薬、歯科口腔疾患治療薬、ビタミン剤、滋養強壮薬、細胞賦活化薬、抗アレルギー薬、抗炎症薬等を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。これらの薬物は、1種単独で用いてもよいし、2種以上を組み合わせ用いることもできる。薬物が核酸の場合、DNAであってもRNAであっても、それらのキメラ分子であってもよい。また、核酸は一本鎖であっても二本鎖であってもよい。核酸の長さに特に制限はないが、好ましくは、アンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)、siRNA、miRNA、アプタマー等の小核酸分子が挙げられる。

[0032] 好ましい一実施態様においては、該薬物として、抗腫瘍活性を有する化合物を挙げることができる。本発明の組成物が標的化し得るがん種は特に制限されず、任意のがんが挙げられる。例えば、上皮細胞由来の癌であり得るが、非上皮性の肉腫や血液がんであってもよい。より具体的には、例えば、消化器のがん(例えば、食道がん、胃がん、十二指腸がん、大腸がん(結腸がん、直腸がん)、肝がん(肝細胞がん、胆管細胞がん)、胆嚢がん、胆管がん、膵がん、肛門がん)、泌尿器のがん(例えば、腎がん、尿管がん、膀胱がん、前立腺がん、陰茎がん、精巣(睪丸)がん)、胸部のがん(例えば、乳がん、肺がん(非小細胞肺がん、小細胞肺がん))、生殖器のがん(例えば、子宮がん(子宮頸がん、子宮体がん)、卵巣がん、外陰がん、膣がん)、脳腫瘍、頭頸部のがん(例えば、上顎がん、咽頭がん、喉頭がん、舌がん、甲状腺がん)、皮膚のがん(例えば、基底細胞がん、有棘細胞がん)、口

腔がん、血液のがん（白血病、悪性リンパ腫）を含むが、これらに限定されない。好ましくは、固形がん、より好ましくは大腸がん、膵臓がん、乳がん、食道がん、胃がん、前立腺がん等、より好ましくは大腸がん、膵臓がん等が挙げられる。

[0033] 本発明の組成物に搭載される抗腫瘍活性を有する化合物としては、例えば、シクロホスファミド水和物、イホスファミド、チオテパ、ブスルファラン、メルファラン、ニムスチン塩酸塩、ラニムスチン、ダカルパジン、テモゾロミド等のアルキル化剤；メトトレキサート、ペメトレキセドナトリウム水和物、フルオロウラシル、ドキシフルリジン、カペシタビン、タガフル、シタラビン、ゲムシタビン塩酸塩、フルダラビンリン酸エステル、ネララビン、クラドリビン、レボホリナートカルシウム等の代謝拮抗剤；ドキシルピシン塩酸塩、ダウノルピシン塩酸塩、プルルピシン、エピルピシン塩酸塩、イダルピシン塩酸塩、アクリルピシン塩酸塩、アムルピシン塩酸塩、ミトキサントロン塩酸塩、マイトマイシンC、アクチノマイシンD、ブレオマシニン塩酸塩、プペロマシニン塩酸塩、ジノスタチンスチマラマー、カリケアマイシン等の抗生物質、ピンクリスチン硫酸塩、ビンブラスチン硫酸塩、ビンデシン硫酸塩、パクリタキセル等の微小管阻害剤；アナストロゾール、エキセメスタン、レトロゾール、ファドロゾール塩酸塩水和物等のアロマターゼ阻害剤；シスプラチン、カルボプラチン、ネダプラチン、オキサリプラチン等の白金製剤；イリノテカン塩酸塩水和物、ノギテカン塩酸塩、エトボシド、ソブゾキサン等のトポイソメラーゼ阻害剤、プレドニゾロン、デキサメサゾンなどの副腎皮質ステロイド、サリドマイドおよびその誘導体であるレナリドマイド、プロテアーゼ阻害剤であるボルテゾミブ等が挙げられるが、それらに限定されない。

[0034] 低分子量の抗がん剤（例、分子量1000以下）は、直接又はヒドラゾン等を介して水溶性ポリマーに連結して高分子薬剤とすることもできる。水溶性ポリマーの種類は特に制限されないが、例えば、ポリヒドロキシプロピルメタクリルアミド（PHPMA）、スチレン・マレイン酸共重合体等が挙げ

られる。

- [0035] あるいは、抗腫瘍活性を有する化合物としては、例えば、抗EGFR抗体、抗CD40抗体、抗CD33抗体、抗HER2抗体、抗VEGF抗体、抗CTLA-4抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗CD20抗体等の抗体もしくはそのフラグメント、光線力学療法の標的となる感受性物質（例、ポリマー型zinc protoporphyrin (P-ZnPP) やアルブミン結合型indocyanine green (ICG)）等が挙げられる。
- [0036] 別の好ましい実施態様において、例えば、siRNA、shRNA、dsRNA、microRNA、アンチセンス核酸（アンチセンスDNA、アンチセンスRNA）、安定化人工核酸BNA、リボザイム、デコイ核酸、アプタマー等が挙げられる。
- [0037] より具体的には、癌幹細胞の増殖抑制効果を有する種々のmiRNA（例、hsa-miR-136-5p、hsa-miR-3065-3p、hsa-miR-4727-5p、hsa-miR-378g、hsa-miR-181a-5p、hsa-miR-362-5p、hsa-miR-608）（WO2018/181877）；大腸癌、特にKRAS遺伝子に変異の有する大腸癌に対して優れた治療効果を有するmiR4689及びmiR4685-3p（WO2015/133522）；胆管癌、肺癌、急性白血病等の種々のがんに対して抗腫瘍効果が示されているmiR-29b；癌化に関与するKLF5、細胞周期の制御に重要なTFDP1及びMDM2の発現を抑制するmiR-4711-5p（WO2020/246380）；癌幹細胞で高発現するシンデカン4（SDC4）に対するsiRNA（WO20036183）；がんワクチンアジュバントとして有効なCpGオリゴヌクレオチド、好ましくはK型又はD型CpGオリゴヌクレオチド、より好ましくはK型でD型の特性を合わせ持つK3型のCpGオリゴヌクレオチド（WO2018/030338）などが挙げられるが、それらに限定されず、抗腫瘍活性を有することが既知の任意の核酸を用いることができる。また

、前記核酸は、天然の核酸だけでなく、天然の核酸と同等以上の活性を有する限り、そのヌクレオチド配列中の1以上のヌクレオチドが他のヌクレオチドで置換されていたり、欠失・挿入又は付加を含む変異核酸であってもよい。例えば、miR-29bの変異体として、WO2015/133521に開示される核酸を挙げることができる。

[0038] miRNAは、成熟型miRNAであってもよく、またヘアピン型前駆体miRNA (pri-miRNA) や、pri-miRNAの一部が切断されたpre-miRNAであってもよい。siRNAも、成熟型siRNAであってもよく、ヘアピン型の前駆体(shRNA)であってもよい。また、pre-miRNAやshRNAのループ部分がボナック社の開発したアミノ酸(例、プロリン、グリシン、リシン、フェニルアラニン、グルタミン酸、グリシルグリシン)誘導体リンカーで置換されたものであってもよい。

[0039] 本発明の組成物に搭載される核酸は、ヌクレアーゼに対する分解耐性等を付与するために、必要に応じて、一般的に核酸に施される各種修飾がなされていてもよい。このような修飾としては、例えば、2'-Oメチル化等の糖鎖部分の修飾；塩基部分の修飾；ホスホロチオエート化、アミノ化、低級アルキルアミノ化、アセチル化等のリン酸部分の修飾等が挙げられる。

[0040] 本発明の組成物は、腫瘍組織だけでなく、他の疾患部位、例えば、炎症組織に対しても高い選択性をもって薬物を送達することができるので、該組成物に搭載する薬物として、抗炎症作用を有する化合物を挙げることができる。本発明の組成物が標的化し得る炎症組織は特に制限されず、任意の炎症性疾患における炎症部位が挙げられる。例えば、炎症性疾患として、各種の自己免疫疾患(関節リウマチ、SLE、強皮症、多発性筋炎、シェーグレン症候群、ANCA関連性血管炎、ベーチェット病、川崎病、混合性クリオグロブリン血症、多発性硬化症、ギランバレー症候群、筋無力症、1型糖尿病、バセドウ病、橋本病、アジソン病、IPEX、APS type-1)、自己免疫性心筋炎、間質性肺炎、気管支喘息、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、炎症性腸疾患(クローン病、潰瘍性大腸炎)、乾癬、アトピー性皮膚

膚炎、溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、特発性若年性関節炎の多関節炎型等）等をあげることができるが、それらに限定されない。

[0041] 抗炎症作用を有する化合物としては特に制限されず、例えば、ステロイド系抗炎症薬（例、ヒドロコルチゾール、プレドニゾロン、トリアムシノロン、デキサメタゾン、ベタメタゾン）、非ステロイド性抗炎症薬（例、アスピリン、エテンザミド、ジフルニサル、ロキソプロフェン、イブプロフェン、ジクロフェナク、インドメタシン、COX-2阻害薬）、抗リウマチ薬（例、金チオリンゴ酸ナトリウム、ペニシラミン、ロベンザリット、オーラノフィン、ブシラミン、アクタリット、サラゾスルファピリジン、ミゾリビン、メトトレキサート、レフルノミド、タクロリムス、インフリキシマブ、エタネルセプト、アダリムマブ、トシリズマブ、アバタセプト）等が挙げられるが、既知の任意の抗炎症薬又は上記炎症性疾患に対する治療薬を用いることができる。

[0042] 好ましい一実施態様においては、炎症性腸疾患に対する治療活性を有するmiRNAとして、miR-29a及びmiR-29bを挙げることができる（WO2018/199121）。

[0043] また、前記CpGオリゴヌクレオチドは、がんワクチンアジュバントとしてだけでなく、種々の感染症に対するワクチンアジュバントとしても使用することができる。従って、別の実施態様において、CpGオリゴヌクレオチドを搭載する本発明の組成物は、種々の病原体に感染した細胞を標的とすることができる。本発明の組成物が標的化し得る感染細胞は特に制限されず、任意の病原体に感染した細胞が挙げられるが、例えば、例えば、インフルエンザウイルス、トリインフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス、アデノウイルス、SARSウイルス、AIDSウイルス、サイトメガロウイルス、肝炎ウイルス、日本脳炎ウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、水痘・帯状疱疹ウイルス、ポリオウイルス、パピローマウイルス、ヘルペスウイルス、ムンプスウイルス、ロタウイルス、コレラウイルス、狂犬病ウイルス、エボラ出血熱、マールブルグ病、ラッサ熱、クリミア・コンゴ出血熱

等のウイルス性出血熱の原因となるウイルス等；ジフテリア、破傷風、結核菌、肺炎球菌、髄膜炎菌、ブドウ球菌、緑膿菌、百日咳菌、炭疽菌、リッケチア、サルモネラ等；クリプトコッカス・アスペルギルス等の真菌；マラリア原虫等の病原性生物等に感染した細胞を挙げることができる。

[0044] 本発明の組成物がC p Gオリゴヌクレオチドを搭載し、ワクチンアジュバントとして使用される場合、該組成物は、薬物として、さらに有効成分として、上記病原体由来の抗原タンパク質もしくはペプチドを搭載することもできる。

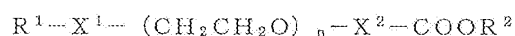
[0045] 炭酸アパタイト粒子の作製に用いる水溶液中の薬物の濃度は、その使用目的に応じて適宜設定することができる。薬物として、抗腫瘍活性を有する化合物を用いる場合は、例えば、 $10 \sim 1000 \mu\text{M}$ 、 $20 \sim 500 \mu\text{M}$ 、又は $40 \sim 200 \mu\text{M}$ の濃度で用いることができる。s i R N A等の核酸を用いる場合は、例えば、 $0.1 \sim 1000 \text{ nM}$ 、 $0.5 \sim 500 \text{ nM}$ 、又は $1 \sim 200 \text{ nM}$ で用いることができる。

[0046] 本発明の組成物は、最終形態としてそれを含むか否かにかかわらず、炭酸アパタイトの一次粒子の形成がP E G誘導体の存在下で行われ、その結果、一次粒子に該P E G誘導体を取り込まれることを特徴とする。ここで「一次粒子」とは、カルシウムイオン、リン酸イオン及び炭酸水素イオンを含有する水溶液に、薬物及びP E G誘導体を添加して、炭酸アパタイトの粒子を形成させた際に得られる粒子を意味し、薬物及びP E G誘導体を搭載するが、その後の処理（例えば、超音波処理やサイズ分画）により、本発明の組成物中に含まれる最終形態としての炭酸アパタイト粒子は、P E G誘導体やその反応物（例、加水分解産物）を含んでいなくともよい。

[0047] 前記P E G誘導体は、末端に1以上のカルボン酸もしくはその誘導体又はその塩を有するものであれば特に制限されず、例えば、下記一般式で表されるP E G誘導体を挙げることができる。

[0048]

[化1]



(式中、 R^1 及び R^2 は、独立して任意の置換基を示し、 X^1 及び X^2 は、独立して任意のリンカーを示す。)

[0049] R^1 としては、例えば、水素原子、水酸基、ハロゲン原子、 C_{1-3} アルキル基（例、メチル基）、 C_{1-3} アルコキシ基（例、メトキシ基）、アミノ基、 $-COOR^2$ ）等が挙げられるが、PEG誘導体やその反応物（例、加水分解産物）が、粒子形成時や、必要に応じて超音波処理を行った後で、平均粒子径が500nmより大きく1000nm以下である炭酸アパタイト粒子を生成させ得る限り、それらに限定されない。

R^2 としては、例えば、水素原子の他、カルボン酸とエステルを形成し得る任意の置換基（例、NHS、p-ニトロフェニル）が挙げられるが、PEG誘導体やその反応物（例、加水分解産物）が、粒子形成時や、必要に応じて超音波処理を行った後で、平均粒子径が500nmより大きく1000nm以下である炭酸アパタイト粒子を生成させ得る限り、それらに限定されない。 $-COOR^2$ がエステル誘導体の場合、 R^2 としては、非酵素的に容易に加水分解して遊離のカルボン酸又はその塩（例、アルカリ金属塩、アンモニウム塩等）を生じる置換基であることが好ましい。

X^1 及び X^2 としては、例えば、酸素原子、窒素原子、 $-Y-CO(CH_2)_m-$ （ m は1～3の整数）、 C_{1-5} アルキル基、単結合等が挙げられ、

Y としては、単結合、 C_{1-3} アルキル基（例、メチル基）、 C_{1-3} アルコキシ基（例、メトキシ基）、アミノ基、酸素原子、硫黄原子、 C_{1-3} アルキルアミノ基（例、エチルアミノ基）、 C_{1-3} アルキルチオ基（例、エチルチオ基）等が挙げられるが、粒子形成時や、必要に応じて超音波処理を行った後で、平均粒子径が500nmより大きく1000nm以下である炭酸アパタイト粒子を生成させ得る限り、それらに限定されない。

あるいは、PEG誘導体は、 R^1 をリンカーとして、上記一般式を構成単位とする分岐鎖型の構造を有していてもよい。

[0050] PEG誘導体の分子量は特に制限されないが、例えば、平均分子量が10

00～20000であり得る。好ましくは、PEG誘導体の平均分子量は1000～15000であり得る。従って、上記一般式において、 n は当該平均分子量を与え得る任意の整数であり得る。特に好ましい一実施態様においては、PEG誘導体の平均分子量は約2000～約10000であり得る。本明細書において「約2000」とは、1500以上2500未満であることを意味し、「約10000」とは、9500以上10500未満であることを意味する。

[0051] 好ましい一実施態様においては、PEG誘導体の平均分子量は1000～5000であり得る。PEG誘導体の分子量が当該範囲にあれば、一次粒子の形成後に超音波処理やサイズ分画を行わずとも、平均粒子径が500nmより大きく1000nm以下である炭酸アパタイト粒子を得ることができる。より好ましくは、本実施態様におけるPEG誘導体の平均分子量は1000～3000であり得、さらに好ましくは約2000であり得る。

[0052] 別の好ましい実施態様においては、PEG誘導体が末端に1以上のカルボン酸又はその塩を有する化合物である。上記一般式において、 COOR^2 がエステル誘導体であるPEG誘導体の場合、PEG誘導体を溶解してから2、3日後に、炭酸アパタイト粒子を形成させると、粒子あたりもしくはCa量あたりの薬物（例、核酸）搭載量が最大となる。これは、PEG誘導体が徐々に加水分解され、末端に遊離のカルボン酸を生じることで、核酸搭載量が増大するためである。従って、末端に1以上のカルボン酸又はその塩を有するPEG誘導体を使用することにより、該誘導体の溶解直後に炭酸アパタイト粒子の形成を行うことができ、有利である。

[0053] 特に好ましい実施態様において、本発明で使用するPEG誘導体として、以下の6種を挙げることができる。

1. $\text{MeO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{COO-NHS}$ （平均分子量10000）
2. $\text{MeO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{COO-NHS}$ （平均分子量2000）

3. $\text{MeO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$ (平均分子量 2000)
4. $\text{MeO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-(\text{CH}_2)_2\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$ (平均分子量 2000)
5. $\text{MeO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{COOH}$ (平均分子量 2000)
6. $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_2\text{COO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$ (平均分子量 2000)

- [0054] 炭酸アパタイト粒子の作製に用いる水溶液中のPEG誘導体の濃度は、例えば、 $0.25 \sim 4 \text{ mg/ml}$ 、好ましくは $0.5 \sim 3 \text{ mg/ml}$ 、より好ましくは $1 \sim 2 \text{ mg/ml}$ であり得る。
- [0055] 各イオン供給源、薬物及びPEG誘導体の混合順序は特に限定されず、目的とする炭酸アパタイト粒子が得られる限り、いかなる混合順序で水溶液を調製してもよい。例えば、カルシウムイオン及び薬物を含有する第1の溶液を調製するとともに、別途、リン酸イオン及び炭酸水素イオンを含有する第2の溶液並びにPEG誘導体を含有する第3の溶液を調製し、第1～第3の溶液を同時もしくは逐次混合して水溶液を調製することができるが、それらに限定されない。
- [0056] 炭酸アパタイト粒子を作製するための水溶液は、炭酸アパタイト粒子が形成される限り、上述する各イオン供給源及び他の物質以外の成分を含んでもよい。例えば、水溶液中に上記組成物中に、フッ素イオン、塩素イオン、Sr、Mn等を添加することにより、炭酸アパタイトにおけるCaまたは CO_3 を部分的に置換してもよい。但し、フッ素イオン、塩素イオン、Sr、Mnの添加量は、形成される複合体粒子のpH溶解性、粒径範囲に著しい影響を与えない範囲内とすることが好ましい。また、炭酸アパタイト粒子を作製するための水溶液は、細胞培養用の各種培地やバッファーを利用して調製することもできる。
- [0057] 炭酸アパタイト粒子は、上記の各イオンを含有する水溶液のpHを $6.0 \sim 9.0$ の範囲に調整し、一定時間放置（インキュベート）することによ

って得ることができる。炭酸アパタイト粒子を形成する際の当該水溶液のpHは、好ましくは7.0以上であり、より好ましくは7.1以上、更に好ましくは7.2以上あり、より更に好ましくは7.3以上、特に好ましくは7.4以上、最も好ましくは7.5以上である。一方、炭酸アパタイト粒子を形成する際の当該水溶液のpHは、好ましくは8.5以下であり、より好ましくは8.0以下である。

[0058] 炭酸アパタイト粒子を形成する際の当該水溶液の温度条件は、炭酸アパタイト粒子が形成される限り特に制限されないが、通常10℃以上であり、好ましくは25℃以上、より好ましくは37℃以上である。一方、温度条件の上限は通常80℃以下であり、好ましくは70℃以下である。

[0059] 炭酸アパタイト粒子を形成するための当該水溶液のインキュベーション時間は、炭酸アパタイト粒子が形成される限り特に制限されないが、通常1分～24時間であり、好ましくは2分～2時間、より好ましくは3～60分間である。粒子形成の有無は、例えば、顕微鏡下で観察することによって確認することができる。

[0060] 本発明の組成物中に含まれる炭酸アパタイト粒子の平均粒子径は、500nmより大きく1000nm以下であれば特に制限されないが、好ましくは、600nm～800nmであり得る。平均粒子径は、自体公知の装置（例、ナノ粒子解析装置 nanoPartica SZ-100V2（堀場製作所製）等）を用いて、動的散乱法（DLS）により測定することができる。DLSによる粒子径分布が単一ピークを示すことが好ましい。平均粒子径を上記範囲内になるように制御することにより、従来のsCAよりも粒子あたりの薬物搭載量が増大し、sCAと比べて、腫瘍や炎症組織などの標的組織により高い集積性を有し、かつ肝臓をはじめとする正常臓器への集積が低減され、より少ない薬物量で十分な治療効果を示すという本発明の顕著な効果が得られる。

[0061] PEG誘導体として、平均分子量が1000～5000、好ましくは1000～3000、より好ましくは約2000のPEG誘導体を使用する場合

、上記のインキュベーションを実施することにより、一次粒子の形成後に超音波処理やサイズ分画を行わずとも、平均粒子径が500nmより大きく1000nm以下である、好ましくは、600nm～800nmである炭酸アパタイト粒子を得ることができる。

従って、当該炭酸アパタイト粒子を含む本発明の組成物は、粒子形成時に使用したPEG誘導体又はその反応物（例、加水分解産物）を含有している。

[0062] 前記の実施態様において、本発明の組成物中に含有されるPEG誘導体又はその反応物の量は、平均粒子径が500nmより大きく1000nm以下である炭酸アパタイト粒子を生成させ得る限り特に制限されないが、通常0.5～2.5重量%であり、好ましくは1～2重量%、より好ましくは1.2～1.8重量%であり得る。

[0063] 一方、PEG誘導体として、平均分子量が5000より大きなもの（例、平均分子量6000以上、7000以上、8000以上、9000以上、10000以上）を使用する場合、上記のインキュベーションを実施することにより形成される炭酸アパタイト粒子は、依然として平均粒子径が大きく（例えば、平均分子量10000のPEG誘導体である日油製SUNBRIGHT（登録商標）ME-100CSを用いた場合、DLSで測定した平均粒子径は2200nm）、従来のsCA粒子作製に使用される水槽式超音波洗浄処理を実施しても、上記の本発明の炭酸アパタイト粒子の要件を満たさない。

そこで、このような実施態様においては、Covarisと呼ばれる一点集中型超音波照射装置を用いて超音波処理を行うことにより、平均粒子径が500nmより大きく1000nm以下である、好ましくは、600nm～800nmである炭酸アパタイト粒子のサブセットを含む組成物を得ることができる。

Covarisは、一般的なソニケーターとは全く異なる周波数を用い、ディッシュ状の超音波発生部より発生させた超音波エネルギーを一極に集中

させて照射することで、高出力で安定したエネルギーを効率よくサンプル処理に利用できるという特徴を有する特殊な超音波処理装置である。当該装置として、例えば、エムエス機器株式会社のCovaris型 S220を用いることができる。また、超音波の照射条件としては、例えば、Peak Incident Power (PIP) : 250W、Duty Factor (DF) : 50%、Cycles per Burst (CPB) : 200、処理時間 : 1200秒等が挙げられるが、当業者であれば、製造者が提供する手引書に従って、適宜照射条件を変更することができる。

[0064] 超音波処理は、アルブミンの存在下（即ち、アルブミンを炭酸アパタイト粒子を含む分散液に添加した状態）で行うことができる。これは、アルブミンと炭酸アパタイト粒子とが共存する環境で超音波振動処理を行うことにより、より微細な粒径を有する炭酸アパタイト粒子が得られ、粒子の再凝集を抑制することも可能となるためである。

[0065] 炭酸アパタイト粒子を含む分散液中に添加するアルブミンの量は、微細化及び／又は再凝集抑制の効果が得られる限り特に制限されないが、例えば、0.01～50mg/ml、好ましくは0.05～10mg/ml、より好ましくは0.1～5mg/ml程度添加することができる。

[0066] 上記の超音波処理により、平均粒子径が500nmより大きく1000nm以下である炭酸アパタイト粒子のサブセットが得られたことの確認は、DLSにより粒子径分布を測定し、平均粒子径を算出することにより、好ましくは粒子径分布が単一ピークを示すことを確認することにより行うことができる。また、原子間力顕微鏡（AFM）を用いて、超音波処理後の分散液を観察・撮影し、明瞭な粒子の像が得られるかを確認することによっても行うことができる。

[0067] 超音波処理後の分散液を希釈してAFMを用いて解析すると、適切な濃度のPEG誘導体を添加した場合、約30nm程度の微小な粒子を確認することができる。このような微小な粒子の混入は、本発明の組成物を薬物送達用として用いた場合、核酸搭載量を低減させ、標的組織への選択性の高い薬物

送達性に好ましくない影響を及ぼすおそれがあるので、分散液中の粒子をサイズ分画することで、目的とする平均粒子径が500nmより大きく1000nm以下である炭酸アパタイト粒子のサブセット（DLSで測定した粒子径分布のピーク領域）を濃縮・精製することが好ましい。サイズ分画の手法としては、例えば、限外ろ過やゲルろ過クロマトグラフィー等の自体公知の方法を用いることができるが、好ましくは、複数の中空糸膜を組み合わせ実施することができる。例えば、平均分子量10000のPEG誘導体である日油製SUNBRIGHT（登録商標）ME-100CSを用いた場合、DLSで測定した超音波処理後の粒子径分布では200～1000nmの間でピーク領域が出現したので、孔径が1000nmと200nmの中空糸膜を用いて、前者で1000nmより大きな粒子を排除し、次いで、後者に通して200nm未満を排除することで200～1000nmの粒子径を有する画分を濃縮・精製することができる。

[0068] 上記のようにして得られる本発明の組成物は、従来のsCAに比べて粒子あたりの薬物搭載能力が顕著に増大しており、そのことが腫瘍や炎症組織等の標的組織への薬物送達性をより高める一因となっている。本発明の組成物の薬物搭載能力は、例えば薬物がmiRNA等の核酸の場合、粒子（OD₆₀₀＝1）あたり、あるいはCa量（1mg）あたりの核酸搭載量（μg）として、通常150～500、好ましくは200～400程度であり得る。

[0069] 本発明の組成物は、そのまま、あるいは、炭酸アパタイト粒子を遠心分離により沈殿させて、生体への投与に適した溶媒に再分散させることにより、非経口的な投与（例えば、静脈内投与、動脈内投与、皮下注射、筋肉注射、局所注入、腹腔内投与など）に好適な医薬組成物として調製することができる。非経口的な投与に好適な製剤としては、水性および非水性の等張な無菌の注射液剤があり、これには抗酸化剤、緩衝液、制菌剤、等張化剤等が含まれていてもよい。また、水性および非水性の無菌の懸濁液剤が挙げられ、これには懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定化剤、防腐剤等が含まれていてもよい。当該製剤は、アンプルやバイアルのように単位投与量あるいは複数回投

与量ずつ容器に封入することができる。また、自体公知の方法により凍結乾燥し、使用直前に適当な無菌のビヒクルに溶解または懸濁すればよい状態で保存することもできる。

[0070] 本発明の組成物は、従来のsCAと比べて、腫瘍などの標的組織により高い集積性を有し、かつ肝臓をはじめとする正常臓器への集積が低減され、より少ない薬物量で十分な治療効果を奏するので、ヒトを含む哺乳動物などへの*in vivo*薬物送達用組成物として用いることができる。該組成物の炭酸アパタイト粒子の含有量は、例えば、組成物全体の0.1ないし100重量%である。

[0071] 本発明の組成物の投与量は、投与の目的、投与方法、疾患の種類、重篤度、投与対象の状態（性別、年齢、体重など）によって異なるが、miRNA等の核酸を搭載させて全身投与する場合、例えば、0.02mg/kg以上5mg/kg以下であり、0.1mg/kg以上5mg/kg以下が望ましい。

[0072] また、本発明の組成物は、*in vitro*で細胞内に薬物を導入するために使用することができる。その場合、目的とする細胞の培地中に本発明の組成物を添加して培養することにより実施することができる。標的の細胞は特に制限されず、例えば、細菌、放線菌、酵母、カビ、植物細胞、昆虫細胞、動物細胞等の任意を細胞に用いることができる。

[0073] 以下、実施例等により、本発明を詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例

[0074] 実施例1 cNaD1 (controlled inorganic nanoparticle drug 1) 及びPCANP (PEG-dependent size-controlled carbonate apatite nanoparticle) の創製
(1) PEG誘導体を取り込ませた炭酸アパタイト粒子の調製

蒸留水100 mLに、0.37 gのNaHCO₃、1 M NaH₂PO₄・2H₂O (90 μL) 及び1 M CaCl₂ (180 μL) を加えて溶解した。これに、式：CH₃O-(CH₂CH₂O)_n-CO(CH₂)₂COO-NH₂で表される分子量の異なる2種のPEG誘導体 (SUNBRIGHT ME-20CS (日油); 平

均分子量2,000及びSUNBRIGHT ME-100CS（日油）；平均分子量10,000）のいずれかを200 mg加え、pH 7.5に調整した。50 mLのファルコンチューブに該バッファー溶液を25 mL分注し（以下、「25 mLバッファー」ともいう）、50 μ gの核酸と1 M CaCl_2 (100 μ L)を加えて、37°Cでインキュベートした。比較のために、PEG誘導体を加えない炭酸アパタイト粒子を同様に調製した。

30分間インキュベート後に、液体中の粒子量（混濁度）を肉眼的に観察したところ、平均分子量10,000のPEG誘導体を添加した場合は、添加しない場合より粒子量はやや少ないものの粒子は形成されていた。一方、平均分子量2,000のPEG誘導体を添加した場合は、明らかに粒子量が少なくなった。そこで、以後の実験では、平均分子量10,000のPEG誘導体を用いることとし、また、インキュベーション時間を60分間として炭酸アパタイト粒子を調製した。

[0075] (2) 粒子の分散化処理の検討

従来のsCA粒子作製に使用されている水槽式超音波洗浄処理、高出力な超音波エネルギーを効率よく照射することができる一点集中型超音波照射装置を用いた特殊超音波処理、並びに湿式微粒化装置を用いた湿式破碎処理を実施し、粒子の分散化の程度を比較した。

[0076] (2-1) 超音波処理

水槽式超音波洗浄処理（以下、「Senjyo」と略記する場合がある）は、株式会社エスエヌディの超音波洗浄機US-101を用いて行った。上記(1)のファルコンチューブを水槽内に留置し、発振周波数38 kHz, 出力80 Wの設定で10分間超音波処理を行った。

特殊超音波処理（以下、「Covaris」と略記する場合がある）では、エムエス機器株式会社のCovaris型 S220を使用して、以下の照射条件にて超音波照射を行った。

PIP : 250 W

DF : 50%

CPB : 200

処理時間 : 1200 sec

[0077] Negative control miRNAを搭載した炭酸アパタイト粒子を、未処理のまま、あるいはSenjyo超音波処理又はCovaris超音波処理をして、粒子径の変化を調べた。粒子径の測定には堀場製作所のナノ粒子解析装置（nanoPartica SZ-100V2）を用い、動的散乱法（DLS）により行った。また、未処理又は超音波処理した粒子を、希釈せずにそのまま原子間力顕微鏡（Atomic force microscope : AFM）（コンパクト原子間力顕微鏡NaioAFM Nanosurf製）で撮影した。それらの結果を図1-1及び1-2に示す。

[0078] PEG誘導体を添加しなかった場合、従来のsCA粒子の超音波処理（Senjyo）では、平均粒子径は1980 nmと大きく、測定範囲外の粒子が多数存在した。一方、Covaris処理の場合は、粒子サイズのピークは複数ではあるが、平均粒子径は740 nmと他に比べて小さくなっており、測定範囲外の粒子は比較的少なかった（図1-1上）。

しかし、いずれの場合もAFMで撮影するには粒子が大きく、明瞭な像は得られなかった

（図1-1下）。

[0079] 一方、PEG誘導体をはじめにバッファーに加えると、各群の粒子径はやや小さくなった（図1-2上）。特にCovaris処理を行った場合、AFMで粒子が明瞭に同定できるほどに分散化が達成された（図1-2下）。平均粒子径は650 nmとなり、そのピークも1つになった（図1-2上）。PEG誘導体（平均分子量10,000）の存在下で炭酸アパタイト粒子を形成させた後Covaris処理を行った粒子をcNaD1（controlled inorganic nanoparticle drug 1）と称する場合がある。

[0080] 25 mLバッファーに添加するPEG誘導体の量を変動（25、50、100 mg）させてそれぞれ粒子を形成させ、Covaris処理後に50倍に希釈してAFMで観察した。その結果、PEG誘導体を25、50 mg添加したところ、粒子サイズはそれぞれ34、28 nmと測定された（図2）。そこで、以後の実験では、特にことわらない限り、PEG誘導体を50 mg/25 mLの濃度で添加することとした。

[0081] （2-2）湿式破碎処理

湿式破碎処理は、スギノマシン社の湿式微粒化装置（スターバーストminimo）を用いて、表1に示す条件にて行った。粒子径の測定は、DLS（装置はMALVERN社のゼータ電位測定装置ゼータサイザーナノ Nano-ZS型を用いた）により実施した。

[0082] [表1]

1. サンプルおよびテスト条件

テスト No.	原料	添加剤	噴射圧力 MPa	パス 回数	処理量 mL	チャンバー
1	サンプル⑤	無	245	10	10	ボール
2	サンプル⑥	無	100	10	10	ボール
3	サンプル①	有	245	10	10	ボール
4	サンプル②	有	100	10	10	ボール
5	サンプル③	有	245	30	10	ボール
6	サンプル⑦	無	245	30	10	ボール
7	サンプル④	有	100	30	10	シングル
8	サンプル⑧	無	245	30	10	シングル

[0083] 結果を表2に示す。DLSで解析した結果、湿式破碎処理後も依然として1000 nm以上の粒子が残存していた。さらに、処理後の粒子は黒く変色しており、粒子の衝突によって熱が70～80℃になることで、変性する可能性が示唆された。

[0084] [表2]

2. 測定結果

測定装置: MALVERN 社製 ゼータ電位測定装置 ゼータサイザーナノ Nano-ZS型

測定セル: デイスボセル 測定溶媒: DW (pH8.4 調整品) 溶質濃度: 1.5g/L 溶媒屈折率: 1.33

テスト No.	Z-Average (d.nm)			
	未処理	5pass	10pass	30pass
1	5282.944	~	4010.835	~
2	~	~	5027.333	~
3	1705.547	1232.351	1521.319	~
4	~	~	1917.327	~
5	~	~	~	1777.326
6	~	~	~	1577.229
7	~	~	2184.48	4824.591
8	~	~	~	1773.175

[0085] (2-3) 核酸量の評価

次に、アガロースゲル電気泳動によって炭酸アパタイト粒子に搭載されたNegative control miRNAの量を調べた。結果を図3に示す。該miRNA単独では25 bp付近にバンドがみられた。PEG誘導体を添加して作製した炭酸アパタイト粒子をSenjyo超音波処理した場合と、Covaris処理した場合とでは、粒子内のmiRNA量は同等であった。一方、セラミックスボールを20～30回衝突させて湿式破碎処理した場合（Starburst）は、大幅に核酸のロスが生じた。

Senjyo超音波処理後の保全された核酸のin vivoでの効果は証明されているので（Mol Cancer Ther. 2018 May;17(5):977-987. doi: 10.1158/1535-7163; Mol Ther Nucleic Acids. 2018 Sep 7;12:658-671. doi: 10.1016/j.omtn.2018.07.007; PLoS One. 2015 May 13;10(5):e0127119. doi: 10.1371/journal.pone.0127119; Mol Cancer Ther. 2014 Apr;13(4):976-85. doi: 10.1158/1535-7163; Br J Cancer. 2020 Mar;122(7):1037-1049. doi: 10.1038/s41416-020-0758-1; Mol Ther Nucleic Acids. 2015 Mar 10;4(3):e231. doi: 10.1038/mtna.2015.5; PLoS One. 2015 Mar 4;10(3):e0116022. doi: 10.1371/journal.pone.0116022; Front Immunol. 2018 Apr 18;9:783. doi: 10.3389/fimmu.2018.00783; Mol Cancer Ther. 2015. PMID: 25904505）、Covaris処理した粒子でも同様の効果が期待された。

[0086] （2－4）細胞障害性評価

miR-34aを搭載した炭酸アパタイト粒子（sCA-miR34a）にSenjyo超音波処理又はCovaris超音波処理を行った。得られた粒子を大腸癌細胞HCT116の培地に添加してインキュベートし、48時間後及び72時間後に、Cell counting kit-8（Dojindo）を用いて細胞生存率を測定し、各粒子のin vitroでの細胞障害性を評価した。本実験では、25 mLバッファにPEG誘導体（SUNBRIGHT ME-100CS）を添加しないサンプル（peg0）、50 mg添加したサンプル（peg50）及び100 mg添加したサンプル（peg100）を調製し、試験した。peg0をSenjyo処理したものが従来のsCA粒子に相当する。sCA-miR34aで処理しなかったHCT116細胞を100%として、各時間での細胞生存率を算出した。その結果、Covaris処理した粒子は、PEG誘導体の添加の有無・添加量にかかわらず、Senjyo処理した粒

子と同等（細胞生存率が48時間で約80%、72時間で約60%）の細胞障害性を示した（図4）。

[0087] (3) DDSの本体の同定

(3-1) 粒子のサイズによる分離

上記(2-1)で示されたように、25 mLバッファーにPEG誘導体（平均分子量10,000）を添加し、Covaris超音波処理を行った炭酸アパタイト粒子（cNaD1）の、DLSで測定した平均粒子径は650 nmであったが、蒸留水で50倍希釈してAFMで測定すると、微小な粒子のサイズは28~34 nmであった。DLSで測定したものが粒子の容積として大部分を占め、核酸の抗腫瘍効果をもたらすと想定されたため、このことを実証すべく粒子のサイズ分画を行った。

[0088] サイズ分画には、以下の4種の修飾ポリエーテルスルホン（mPES）中空糸膜（Spectrum LABS, COM製）を使用した。

- 1) 孔サイズ：1 μm , 表面積：95 cm^2
- 2) 孔サイズ：0.2 micrometer, 表面積：28 cm^2
- 3) 分画分子量：750 kD, 表面積：20 cm^2
- 4) 分画分子量：100 kD, 表面積：20 cm^2

1) の中空糸膜を用いて1,000 nmより大きな粒子を除去し、次いで2) の中空糸膜を用いて200 nmより小さな粒子を除去することで、DLSで測定したcNaD1のピーク領域に相当する200~1,000 nmの粒子画分を得た。さらに、200 nmより小さな粒子を3) の中空糸膜に通して50 nmより小さな粒子を除去することで50~200 nmの粒子画分を得、50 nmより小さな粒子を4) の中空糸膜に通して10 nmより小さな粒子を除去することで10~50 nmの粒子画分を得た。このようにcNaD1を中空糸膜によって異なるサイズ分画に分けた粒子をPEG-dependent size-controlled carbonate apatite nanoparticle (PCANP) と称することがある。

[0089] (3-2) 核酸量の評価

PEG誘導体の非存在下にMIRTX（miR-29b-1-5pの完全相補鎖；Mol Cancer Ther. 2018（上述））を搭載した炭酸アパタイト粒子をSenjyo処理したサンプル

(sCA-MIRTX)、並びにPEG誘導体(SUNBRIGHT ME-100CS)の存在下にMIRTXを搭載した炭酸アパタイト粒子をCovaris処理し、上記のようにして3つにサイズ分画した各サンプル(PCANP-MIRTX)の核酸量を、超微量分光光度計NanoDrop(Thermo Scientific社)を用いて測定した。結果を図5に示す。sCA-MIRTXの核酸量は28.5 μg であったのに対し、PCANP-MIRTXの核酸量は、200~1,000 nmサイズの粒子中に3.5 μg (sCA-MIRTXの約8分の1)であった。50~200 nm及び10~50 nmサイズの粒子中の核酸は検出限界以下であった。

アガロースゲル電気泳動でも核酸量の推定を行い、同じ結果であることを確認した。

[0090] (3-2) in vivo機能評価

MIRTX感受性の膵癌細胞panc1をヌードマウスの皮下に移植し、皮下腫瘍(2個/匹)を作った。以下の6群で抗腫瘍効果を比較検討した。

- 1) Control(非投与)群: マウス3匹, 腫瘍6個
- 2) sCA-miR NC(PEG誘導体の非存在下にnegative control miRNAを搭載した炭酸アパタイト粒子をSenjyo処理した粒子)投与群: マウス3匹, 腫瘍6個
- 3) sCA-MIRTX投与群: マウス4匹, 腫瘍8個
- 4) PCANP-MIRTX(200-1000)投与群: マウス4匹, 腫瘍8個
- 5) PCANP-MIRTX(50-200)投与群: マウス3匹, 腫瘍6個
- 6) PCANP-MIRTX(10-50)投与群: マウス3匹, 腫瘍6個

sCA-miR NC及びsCA-MIRTX投与群では20 μg /回、PCANP-MIRTX(200-1000)投与群では2.5 μg /回、PCANP-MIRTX(50-200)及びPCANP-MIRTX(10-50)投与群では検出感度以下の核酸を、day0, 1, 3, 4, 6, 7, 8, 10に計8回尾静脈より投与した。結果を図6に示す。

PCANP-MIRTX(200-1000nm)投与群は、Control(非投与)群、sCA-miR NC投与群、sCA-MIRTX投与群に比べてday12における腫瘍重量が有意に小さくなった(P値はそれぞれ <0.01 , <0.01 , <0.05)。

一方、sCA-MIRTX投与群は、非投与群に比べて有意に腫瘍が小さくなったが、sCA-miR NCとの間には有意差を認めなかった。

PCANP-MIRTX(50-200)投与群、PCANP-MIRTX(10-50)投与群も、非投与群、sCA-miR NC投与群と腫瘍重量に有意な差は認めなかった。

[0091] 次に、PEG誘導体の非存在下にAlexa750で蛍光標識した核酸を搭載した炭酸アパタイト粒子をSenjyo処理したサンプル(sCA)と、PEG誘導体(SUNBRIGHT ME-100CS)の存在下に蛍光核酸を搭載した炭酸アパタイト粒子をCovaris処理し、200-1,000 nmの粒子サイズに分画したサンプル(PCANP-MIRTX(200-1000))を、粒子作製の翌日に遠沈、生理食塩水に再懸濁して、それぞれ大腸癌細胞HT-29を移植したマウスの尾静脈から投与した。4時間後に腫瘍と正常臓器を摘出し、IVISで蛍光強度を測定した。結果を図7に示す。PCANPに搭載した蛍光核酸はsCAの8分の1の量(5 μ g)で、腫瘍ではsCAに搭載した核酸(40 μ g)を投与した場合と同じように光り、一方、肝臓をはじめとする正常臓器への集積はsCAと比べて大きく減弱した。

[0092] (4) 粒子径の測定

PCANP(200-1000)の粒子径分布をDLS(装置はMALVERN社のゼータ電位測定装置ゼータサイザーナノ Nano-ZS型を用いた)により測定したところ、最大ピーク 717.4 nm, 平均粒子径664.6 nmの単一ピークが得られた(図8)。

[0093] 実施例2 より低分子量のPEG誘導体を用いたcNaD2の作製

実施例1(3)において、PCANP(200-1000)は従来のsCAに比べて粒子量及び搭載する核酸量は低減しているものの(図5)、マウスに静脈内投与すると、腫瘍組織にsCAと同等以上に集積し、sCAより優れた抗腫瘍活性を発揮する一方、正常組織への集積はsCAに比べて顕著に減弱することが見出された(図6, 7)。このような新しい機能を備えた炭酸アパタイト粒子をcNaD1 (controlled inorganic nanoparticle drug 1)と呼称する。実施例1(1)において、PEG誘導体として平均分子量2,000のSUNBRIGHT ME-20CS(日油)を用いた場合に、炭酸アパタイトの粒子量が顕著に少なくなったのは、Covaris処理やサイズ分画を行うことなく、cNaD1と同様の特性を有する粒子が形成される可能性が示唆された。そこで、PEG誘導体(SUNBRIGHT ME-20CS)の存在下に核酸を搭載した炭酸アパタイト粒子cNaD2を形成させ、その抗腫瘍効果と

腫瘍／正常臓器集積性を評価した。

[0094] (1) cNaD2の調製

PEG誘導体として、SUNBRIGHT ME-20CS（日油）を用い、実施例1（1）と同様にして炭酸アパタイト粒子を作製した。インキュベーションは37℃で60分間実施した。

[0095] (2) 抗腫瘍効果

(2-1) 大腸癌DLD1に対するmiR-136搭載したcNaD2の治療効果

miR-136感受性の大腸癌細胞DLD1を用いてヌードマウスに皮下腫瘍を作製し、sCAとcNaD2の両者で抗腫瘍効果を比較検討した（マウスは3-5匹、腫瘍は4-5個）。腫瘍サイズが100 mm³となった時点をday 0として、negative control miRNAを搭載したsCA（sCA-NC）、miRNA-136を搭載したsCA（sCA-136）、miRNA-136を搭載したcNaD2（cNaD2-136）をヌードマウスの尾静脈から投与した。核酸量として、sCA投与群は20 μg/回、cNaD2投与群は5 μg/回を、day 0, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 13に計8回投与した。結果を図9に示す。コントロール（sCA-NC）群と比べて、sCA-136群では、核酸量としてcNaD2-136群の4倍量を投与しているにもかかわらず、有意な腫瘍増殖の抑制がみられなかった。一方、毎回5 μgしか投与しなかったcNaD2-136群では有意に腫瘍サイズと腫瘍重量が小さくなった。これまでにsCA-miRNAやsCA-siRNAで抗腫瘍効果を認めてきた核酸量は40-50 μgであったことから、cNaD2を用いることで、僅か5 μgの核酸量でも抗腫瘍効果を認めたことは画期的である。

[0096] (2-2) 大きな腫瘍に対するcNaD2-miRNAの治療効果

大腸癌患者由来のPDX（patient derived xenograft）を用いてヌードマウスに大きな皮下腫瘍を作製し、sCAとcNaD2の両者で抗腫瘍効果を比較検討した。マウスはsCA-NC 3匹、sCA-miRNA 4匹、cNaD2 4匹を用意し、マウス1匹につき腫瘍を2か所移植した。腫瘍サイズが600 mm³とかなり大きくなった時点をday 0として、sCA-NC（negative control miRNA）、sCA-miRNA（miR-136又はMIRTX）、cNaD2-miRNA（miR-136又はMIRTX）をヌードマウスの尾静脈から投与した。核酸量として、いずれの群も20 μg/回を day 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7,

8に計9回投与した。結果を図10に示す。コントロール (sCA-NC) 群と比べて、sCA-miRNA群では腫瘍増殖の抑制がみられなかったが、cNaD2-miRNA群ではsCA-miRNAと比べてday8, day9で有意に腫瘍体積の縮小を認めた。

[0097] (2-3) 癌幹細胞モデル細胞に対するcNaD2-Sdc4 siRNAの治療効果

腺癌細胞株Panc-1を基に1細胞からヌードマウスに皮下腫瘍を作ることのできるスーパー癌幹細胞 (super Panc-1 CSC) を作製した。これをヌードマウスに移植し、腫瘍体積が70 mm³を超えた時点をday 0として、cNaD2に搭載したSyndecan-4 (SDC4) に対するsiRNA (cNaD2-Sdc4 siRNA) を、20 µg/回の核酸量でday 0, 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9に計9回尾静脈から投与した (マウス4匹、腫瘍8個)。コントロールとして、siRNAを投与しないスーパー癌幹細胞移植マウス3匹、腫瘍6個をおいた。また、sCAに搭載したnegative control siRNAを20 µg/回、並行して静注した対照群もおいた (マウス3匹、腫瘍6個)。結果を図11に示す。cNaD2-Sdc4 siRNAはスーパー癌幹細胞の増殖を著しく抑制した。

[0098] (3) 腫瘍／臓器集積性

ヌードマウスに大腸癌患者由来のPDX (patient derived xenograft) を移植して皮下腫瘍を作成し、Alexa750で標識したnegative control siRNA (NC siRNA) 25 µgをsCAに搭載して尾静脈から静注した。同様にcNaD2にAlexa750標識NC siRNAを、それぞれ5, 10, 25 µg搭載して静注した。1時間後にIVISを用いて蛍光核酸の腫瘍への集積を調べた。その結果、cNaD2を使うと5 µgの核酸量でもsCAで25 µgを投与した以上に腫瘍集積は高まり、sCAと同じ25 µgの核酸量では、cNaD2はsCAの5倍以上の腫瘍集積を示した (図12-1)。

[0099] 尾静脈注射後1時間では、肝臓などで血中の核酸濃度が高く反映されるため、4時間後に正常臓器への核酸の集積をIVISで観察した。sCAでは肝臓をはじめ、肺、腎臓、脾臓に集積がみられたが、cNaD2ではほとんど核酸の集積はみられなかった (図12-2)。平均放射効率を比較すると、同じ25 µgの核酸を投与した場合、肝臓ではsCAはcNaD2の10倍以上、肺と脾臓では4倍以上の集積を示した。

[0100] (4) 粒子径の測定

cNaD2の粒子径分布をDLS（装置はMALVERN社のゼータ電位測定装置ゼータサイザーナノ Nano-ZS型を用いた）により測定したところ、最大ピーク 793.4 nm, 平均粒子径740.0 nmの単一ピークが得られた（図13）。

[0101] (5) PEG溶解後の時間が粒子の核酸搭載能力に及ぼす影響

cNaD2において、PEG誘導体溶解からの時間経過による粒子性能を経時的に調べた。

蒸留水300 mLに、1.11 gの NaHCO_3 、1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (270 μL) 及び1 M CaCl_2 (540 μL) を加えて溶解し、pH 7.4に調整した。50 mLのファルコンチューブに該バッファー溶液を25 mL分注し、0.1 mg/mLのPEG誘導体（SUNBRIGHT ME-20CS（日油））を0.5 mL (50 μg) 加えた。該PEG誘導体溶液として、PEG誘導体を水に溶解してから、5分後、1時間後、8時間後、1日後、2日後及び3日後の6通りの溶液を使用した。10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ のnegative control siRNA (NC siRNA) (53.2 μg) と1 M CaCl_2 (100 μL) (Ca量は合計5.8 mg) を加えて攪拌し、37°Cで60分間インキュベートした。比較のために、PEG誘導体を加えない炭酸アパタイト粒子（sCA）を同様に調製した。インキュベーション終了後、4°C、12,000 rpmで遠心処理し、上清を除去して生理食塩水（pH 8）0.5 mLで粒子を集め、Ca濃度、核酸濃度を測定した。結果を表3に示す。cNaD2の核酸搭載量はPEG誘導体溶解から時間が経過するほど高くなり、PEG誘導体溶解から2～3日後に、Ca量あたりの核酸量（NA/Ca比）は特に高かった。

[0102] [表3]

	5min	1h	8h	1d	2d	3d
投入したNC siRNA 量(μg)	53.2	53.2	53.2	53.2	53.2	53.2
取り込んだNA(μg)	29.6	30.7	28.7	22.6	16.8	19.8
投入したCa量(mg)	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8
取り込んだCa (mg)	0.21	0.19	0.19	0.14	0.07	0.08
NA/Ca ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	140.7	157.3	151.3	163.1	234.3	245.4

[0103] PEG誘導体溶液として、PEG誘導体を水に溶解してから、15分後、1日後、2

日後の3通りの溶液を使用して同様の実験を行い、PEG誘導体の非存在下で粒子形成させた場合（sCA）と粒子性能を比較した。結果を表4に示す。cNaD2はsCAと比べて核酸搭載量が顕著に高かったが、やはりPEG誘導体溶解から時間が経過するほど核酸搭載量は高くなり、特にPEG誘導体溶解から2日後でNA/Ca比は最も高かった。

[0104] [表4]

	iNaD2			sCA
	15min	1d	2d	sCA
投入したNC siRNA量(μg)	53.2	53.2	53.2	53.2
取り込んだNA(μg)	26.2	10.7	15.0	19.3
投入したCa量(mg)	5.8	5.8	5.8	5.8
取り込んだCa (mg)	0.118	0.040	0.044	0.376
NA/Ca (μg/mg)	221.5	266.9	341.1	51.4

[0105] 実施例3 末端がカルボン酸のPEG誘導体を用いたcNaD（cNaD3～cNaD6）の作製

（1）モノメチルモノカルボン酸PEGを用いた粒子の核酸搭載能

実施例1及び2では、末端にカルボン酸とN-スクシンイミド（NHS）とのエステルを有するPEG誘導体を用いたが、PEG誘導体溶解から時間が経過するに従って形成するPCANP2粒子中の核酸量が増加することから、末端のエステルが徐々に加水分解されて、末端に遊離カルボン酸を有する分子が増えるほど粒子の核酸搭載能が増大する可能性が示唆される。

そこで、市販のメトキシPEG-OH（2 kDa）に無水コハク酸を反応させて、SUNBRIGHT ME-20CS（日油）の加水分解産物と同一構造のモノメチルモノカルボン酸PEG（C1-Iris, C1-Hamari）を合成し（IrisやHamariはモノメチルモノカルボン酸PEGを製造した会社名を示す；以下同様）、実施例2（5）と同様にして粒子を形成させ（cNaD3と総称する、cNaD3： $\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-CO}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$

(平均分子量2000))、その核酸搭載能をsCAやcNaD2と比較した。結果を図14に示す。モノメチルモノカルボン酸PEG (C1-Iris, C1-Hamari) はcNaD2と同等以上の核酸搭載能を有し、sCAと比べて顕著に多い核酸を搭載できることが示された。

[0106] (2) モノメチルモノカルボン酸PEGを用いた粒子の腫瘍／正常臓器集積性

モノメチルモノカルボン酸PEG (Handai-C1, Hamari-C1 : cNaD3) を用いてAlexa750で標識したNC siRNAを搭載した粒子を作製し、大腸癌由来PDXを皮下移植したヌードマウスに尾静脈より投与した。比較のために、PEG誘導体の非存在下で粒子形成させたsCA、HO-PEG-OH (Sigma) を用いて粒子形成させたもの、並びにsCAの表面をPEG修飾したもの (Pegylation) を、同様に担癌マウスに投与した。各サンプルにつき、Ca濃度と核酸濃度を測定し、Ca量又は核酸量を揃えて投与を行った。1時間後に腫瘍への集積を、4時間後に正常臓器への集積をIVISで観察した。

[0107] Ca量を一定 (0.1 mg) にして投与した結果を図15-1及び15-2に示す。モノメチルモノカルボン酸PEG (Handai-C1, Hamari-C1) を用いて作製した粒子では、sCAの約3倍の集積を示した (図15-1)。一方、sCAやPegylation、HO-PEG-OH群では肝臓をはじめとする正常臓器への集積がみられたが、モノメチルモノカルボン酸PEGでは核酸の集積は低かった (図15-2)。平均放射効率を比較すると、肝臓ではモノメチルモノカルボン酸PEGはsCAの5分の1以下の集積を示した。Ca量を一定にした場合の各群の投与量を表5に示した。モノメチルモノカルボン酸PEGではsCAと比べてNA/Ca比が高く、より多くの核酸が投与された (表5)。

[0108] [表5]

	sCA	Handai-C1	Hamari-C1	HO-PEG-OH	Pegylation
Ca (mg/ml)	0.550	0.236	0.285	0.566	0.582
0.1 mg Ca injection (ml)	0.182	0.424	0.351	0.177	0.172
NA (µg/ml)	46.92	34.2	45.24	62.64	43.44
NA/Ca	85.364	144.578	158.777	110.734	84.972
injected NA (µg)	8.536	14.488	15.878	11.073	8.497

[0109] 次に、核酸量を一定（15 μ g）にして投与した結果を図16-1～16-4に示す。核酸濃度はNanoDropを用いて測定し、投与前にIVISにより粒子内部に含まれる蛍光量が同等であることを確認した。

モノメチルモノカルボン酸PEG（Handai-C1, Hamari-C1）を用いて作製した粒子では、1時間後に腫瘍においてsCAの2倍以上の集積を示した（図16-1）。4時間後では腫瘍への集積はいずれも減弱した（図16-2）。一方、sCAやPegylation、HO-PEG-OH群では4時間後に肝臓をはじめとする正常臓器への集積がみられたが、モノメチルモノカルボン酸PEGでは核酸の集積は低かった（図16-3）。平均放射効率を比較すると、肝臓ではモノメチルモノカルボン酸PEGはsCAの10分の1以下の集積を示した。1時間後では、sCAやPegylation、HO-PEG-OH群では更に高い集積を示したが、モノメチルモノカルボン酸PEGでは核酸の集積は低かった（図16-4）。

[0110] （3）cNaD4～cNaD6の作製

末端にカルボン酸を有するPEG誘導体cNaD3の効果が示されたので、更に以下の3種の末端にモノカルボン酸またはジカルボン酸を有するPEG誘導体を用い、実施例1（1）と同様にして炭酸アパタイト粒子（cNaD4～cNaD6）を新たに作製した。

1) cNaD4 : $\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-(\text{CH}_2)_2\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$ （平均分子量2000）

2) cNaD5 : $\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{COOH}$ （平均分子量2000）

3) cNaD6 : $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_2\text{COO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CO}(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$ （平均分子量2000）

粒子中のカルシウム量に対する核酸の取り込み量の比率（NA/Ca ratio）はcNaD4（PEGとカルボキシル基との間にアミド結合が存在）ではcNaD3（PEGとカルボキシル基との間にエステル結合が存在）と同レベルであった。cNaD5ではやや低減したが、それでもsCAの2倍程度であった。PEG両端にカルボキシル基を有するジカルボン酸PEG誘導体を用いて作ったcNaD6でも、cNaD3と同程度の高いNA/Ca ratioを達成した（図17）。

[0111] （4）ジカルボン酸PEGを用いた粒子の腫瘍／正常臓器集積性

ジカルボン酸PEGを用いてAlexa750で標識したNC siRNAを搭載した粒子を作

製し、大腸癌由来PDXを皮下移植したヌードマウスに尾静脈より投与した。比較のために、cNaD3、PEG誘導体の非存在下で粒子形成させたsCA、HO-PEG-OH (Sigma) を用いて粒子形成させたもの、並びにsCAの表面をPEG修飾したもの (Pegylation) を、同様に担癌マウスに投与した。各サンプルにつき、Ca濃度と核酸濃度を測定し、核酸量を一定 (15 μ g) にして投与を行った。1時間後に腫瘍と正常臓器への集積をIVISで観察した。その結果を図18に示す。

ジカルボン酸PEGを用いて作製した粒子(cNaD6)では、cNaD3と同等 (sCAの2倍以上) の集積を示した一方、sCAやPegylation、HO-PEG-OH群では肝臓をはじめとする正常臓器への集積がみられたが、cNaD6では核酸の集積はcNaD3と同様に低かった。平均放射効率を比較すると、肝臓では、ジカルボン酸PEGはモノメチルモノカルボン酸PEGと同様、sCAの5分の1以下の集積を示した。

[0112] (5) cNaD3の抗腫瘍活性

MIRTXを搭載した炭酸アパタイト粒子 (cNaD3) を作製し、MIRTX感受性の大腸癌細胞DLD1を皮下移植したヌードマウス (4匹、腫瘍2個/匹) に投与して抗腫瘍効果を検討した。腫瘍サイズが60 mm³となった時点を経たday 1として、MIRTXを搭載したcNaD3をマウスの尾静脈から投与した。核酸量として25 μ g/回を、day 1, 3, 6, 8, 10, 13に計6回投与した。結果を図19に示す。cNaD3-MIRTX投与群では、非投与群 (Parent) と比べて、day 15に有意な腫瘍サイズの縮小が認められた (図19)。

[0113] (6) 凍結乾燥したcNaD3の腫瘍／肝臓集積性

ヌードマウスに大腸癌患者由来のPDXを移植して皮下腫瘍を作製し、Alexa750で標識したnegative control siRNA (NC siRNA) 25 μ gをsCAに搭載して尾静脈から静注した。同様にcNaD3にAlexa750標識NC siRNAを25 μ g搭載して静注した。cNaD3として、用時調製したものと、凍結乾燥して長期保存したものとを用いた。1時間後に腫瘍への集積を、4時間後に肝臓への集積をIVISで観察した。その結果、いずれの場合もcNaD3を使うとsCAと比べて顕著な腫瘍集積を示し、一方、肝臓への集積はほとんど見られなかった (図20)。

[0114] 実施例4 PCANPの炎症組織への集積

PEG誘導体 (SUNBRIGHT ME-100CS) の存在下にAlexa750で標識したnegative control siRNA (NC siRNA) を搭載した炭酸アパタイト粒子をCovaris処理し (cNaD1-Alexa750)、ヒト関節リウマチと免疫病理学的に酷似した自己免疫性関節炎を自然発症するSKGマウス (日本クレアより購入) に尾静脈から静注した。比較のために、sCAにAlexa750標識NC siRNAを搭載して同様に投与した。40分後に四肢の炎症関節、45分後に肝臓への蛍光核酸の集積をIVISで観察した。その結果、cNaD1を使うとsCAと比べて四肢の炎症関節への顕著な集積を示し (図2 1-1)、一方、肝臓への集積はほとんど見られなかった (図2 1-2)。下腹部の発光は膀胱内に尿中の蛍光物質 (Alexa750) が貯留したものを示し、上腹部の発光はAlexa750の肝臓への集積を示す。

[0115] 実施例5 cNaD2及びcNaD3へのPEG誘導体の取り込み

cNaD2及び2種のcNaD3 (sCA-C2-Handai, sCA-C1-HAMARI) について、X線回折法 (XRD) とフーリエ変換赤外分光法 (FT-IR) を用いて物性解析を行った。比較のために、sCA及びPEG-OH (Sigma社製) を用いて作製した粒子 (sCA-SIGMA(-OH)) についても、同様に解析した。XRDにはBurker AXS社製のX線回折装置 (D8 ADVANCE) を、FT-IRには同社製のFT-IRTENSOR IIをそれぞれ使用した。XRDの結果、cNaD2、cNaD3及びsCA-SIGMA(-OH) では、PEG由来のピークが検出され、粒子中にPEGが取り込まれていることが示唆された (図2 2)。同様に、FT-IRでもcNaD2、cNaD3及びsCA-SIGMA(-OH) にPEG由来のピークが検出された。

[0116] cNaD1中のPEG誘導体含量を¹H NMRを用いて定量した。炭酸アパタイト5 mgと既知量のPEG誘導体とを混合し、フマル酸二ナトリウムを内部標準物質として用いて、各検体の¹H NMRを測定し、フマル酸二ナトリウムとPEGの積分値の比から検量線 ($y = 22.58x$; $R^2 = 0.9852$) を作成した。次に、cNaD1をボルテックスでほぼ均一に懸濁し、1 mLずつ分注した。遠心分離後、上清を除去し、残渣を減圧乾燥 (3 mmHg, 室温, 10-12時間) し、乾燥化cNaD1を得た。EDTA・2Na・2H₂O (100 mg) とフマル酸・2Na (10.0 mg) を混合し、1.0 mLのD₂Oに溶解した。この溶液の添加量から、¹H NMR測定サンプル中のEDTA・2Na・2H₂O

の重量を算出した。各検体の¹H NMRを測定し、フマル酸二ナトリウムとPEGの積分値の比の数値を作成した検量線に代入して、乾燥化cNaD1中に含有されるPEG重量を算出した。その結果、乾燥化cNaD1中に含有されるPEGの比率は1.2～1.8% (w/w) であった (表6)。

[0117] [表6]

Sample 番号	1	2	3
乾燥 PEG 化アパタイト(mg) (A)	3.2	3.1	3.2
EDTA・2Na・2H ₂ O (mg)	250	150	150
フマル酸・2Na (mg) (B)	50	15	15
¹ H NMR 積分値の比 (PEG ^{a)} /フマル酸・2Na ^{b)}) (C)	0.026	0.058	0.057
A に含まれる PEG の重量 (mg) (D) ^{c)}	0.058	0.038	0.038
PEG 化アパタイト中の PEG 含有率 (w/w %)	1.8	1.2	1.2

a) 3.7 ppm, -(CH₂CH₂O)_n-.

b) 6.4 ppm, vinyl-H.

c) PEG の重量 (D=B×C/22.58) (mg)

[0118] 実施例6 cNaD2及びcNaD3のゼータ電位

PEG誘導体の有無・種類が異なる以外は同一の条件下で作製したsCA（但し、Senjyo超音波処理あり）、cNaD2及びcNaD3（いずれも核酸を搭載していない）について、Zetasizer Plate readerを用いてゼータ電位を測定した。その結果、いずれの粒子もゼータ電位は0付近であったが、PEG誘導体を取り込むとわずかに正にシフトした (表7)

[0119] [表7]

Sample	Zeta potential (mV)	
	1回目	2回目
sCA	-2.228	-2.535
cNaD3 (HAMARI)	0.1385	-1.835
cNaD2	1.123	-0.5128

産業上の利用可能性

[0120] 本発明の炭酸アパタイト粒子は、*in vivo*で投与した場合に、腫瘍組織等の病巣へのより高い集積性を有するとともに、肝臓をはじめとする正

常臓器への集積が著明に低減される。そのため、より少ない薬物量で所望の治療効果を奏する安全かつ有効な薬物送達用組成物として極めて有用である。

[0121] 本出願は日本で出願された特願2021-006747（出願日：2021年1月19日）を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

- [請求項1] 薬物を搭載してなる炭酸アパタイト粒子を含有する組成物であって、該粒子の平均粒子径が500nmより大きく1000nm以下であり、末端に1以上のカルボン酸もしくはその誘導体又はその塩を有するポリエチレングリコール（PEG）誘導体の存在下で一次粒子が形成され、該一次粒子にPEG誘導体を取り込まれていることを特徴とする、組成物。
- [請求項2] 前記PEG誘導体の平均分子量が1000～20000である、請求項1に記載の組成物。
- [請求項3] 前記組成物が、前記PEG誘導体及び／又はその反応物を含有する、請求項1又は2に記載の組成物。
- [請求項4] 前記PEG誘導体の平均分子量が1000～5000である、請求項3に記載の組成物。
- [請求項5] 前記PEG誘導体が末端に1以上のカルボン酸又はその塩を有する、請求項1～4のいずれか1項に記載の組成物。
- [請求項6] 薬物が核酸である、請求項1～5のいずれか1項に記載の組成物。
- [請求項7] 薬物が抗腫瘍活性を有する、請求項1～6のいずれか1項に記載の組成物。
- [請求項8] さらにアルブミンを含有する、請求項1～7のいずれか1項に記載の組成物。
- [請求項9] 請求項1に記載の組成物の製造方法であって、薬物及びPEG誘導体を搭載してなる炭酸アパタイト粒子を、一点集中型超音波照射装置を用いて超音波処理することを含む、方法。
- [請求項10] 薬物及びPEG誘導体を搭載してなる炭酸アパタイト粒子が、薬物及びカルシウムイオンを含む第1の溶液、リン酸イオン及び炭酸水素イオンを含む第2の溶液並びにPEG誘導体を混合することにより調製される、請求項9に記載の方法。
- [請求項11] 中空糸膜を用いて、請求項1に記載の組成物を濃縮することをさら

に含む、請求項 9 又は 10 に記載の方法。

[請求項12] 請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の組成物を含有してなる、薬物送達用組成物。

[請求項13] 薬物が抗腫瘍活性を有し、標的組織が腫瘍である、請求項 12 に記載の薬物送達用組成物。

[請求項14] 薬物が抗炎症活性を有し、標的組織が炎症組織である、請求項 12 に記載の薬物送達用組成物。