

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7497087号
(P7497087)

(45)発行日 令和6年6月10日(2024.6.10)

(24)登録日 令和6年5月31日(2024.5.31)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	47/55 (2017.01)	A 6 1 K	47/55
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 N
A 6 1 K	35/19 (2015.01)	A 6 1 K	35/19
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	35/04 (2006.01)	A 6 1 P	35/04
請求項の数 11 (全56頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2023-61666(P2023-61666)	(73)特許権者	517366013
(22)出願日	令和5年4月5日(2023.4.5)		ノース カロライナ ステート ユニバー シティ
(62)分割の表示	特願2019-513929(P2019-513929)の分割		NORTH CAROLINA STAT E UNIVERSITY
原出願日	平成29年9月13日(2017.9.13)		アメリカ合衆国、ノースカロライナ州
(65)公開番号	特開2023-85470(P2023-85470A)		2 7 6 0 6、ラレー、セカンド フロア
(43)公開日	令和5年6月20日(2023.6.20)		ー、メイン キャンパス ドライブ 1 0
審査請求日	令和5年5月2日(2023.5.2)		2 1
(31)優先権主張番号	62/393,839	(74)代理人	100092783
(32)優先日	平成28年9月13日(2016.9.13)		弁理士 小林 浩
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100120134
			弁理士 大森 規雄
		(74)代理人	100135943
			弁理士 三橋 規樹
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 治療剤送達のための血小板組成物及び方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

血小板細胞と、
化学的リンカー部分と、
治療剤と、を含み、
前記治療剤が、前記化学的リンカー部分を介して前記血小板細胞に共有結合しており、
前記治療剤が抗 P D L 1 抗体、抗 P D 1 抗体、抗 C T L A 4 抗体、抗 C D 4 7 抗体、また
はこれらの組み合わせから選択される、P D L 1 陽性腫瘍を処置するため、原発腫瘍切
除後の患者においてがんを処置するため、がん切除後にがんの再発を抑制するため、およ
び／または、腫瘍切除後の残存微小腫瘍および／または循環腫瘍細胞を処置するための組
成物。

10

【請求項 2】

腫瘍切除後に患者に投与される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記化学的リンカー部分が、マレイミドリンカー、P E G リンカー、P A S 化、及び H
E S 化から選択される、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記血小板細胞がヒト血小板細胞である、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5】

前記血小板細胞が自己由来の血小板細胞である、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の

20

組成物。

【請求項 6】

前記がんが固形腫瘍である、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 7】

前記がんが黒色腫または乳癌である、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8】

追加の治療剤と組み合わせて投与される、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

前記追加の治療剤が抗腫瘍剤である、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記血小板細胞の活性化を介して創傷または外科的切除部位を標的とする、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 11】

前記血小板細胞の活性化時に、創傷または切除部位で血小板由来マイクロ粒子としてさらに放出される、請求項 10 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、参照により本明細書に明示的に組み込まれる、2016年9月13日に出願された米国特許仮出願第62/393,839号の利益を主張するものである。

【0002】

本開示は、治療剤の標的化送達のための組成物及び方法を提供する。本開示はさらに、治療剤（例えば、免疫療法剤）を負荷した血小板を使用してがんの転移または再発を治療または予防する方法を提供する。

【背景技術】

【0003】

手術は、ほとんどの固形腫瘍に対する処置の主な選択肢である。外科的技術の継続的な改善にもかかわらず、腫瘍切除後の残存微小腫瘍及び／または循環腫瘍細胞（CTC）は、依然として課題である。加えて、手術が、がん転移の促進を誘発し得ることもまた示唆されている。多くの患者は、術後に再発性疾患を発症し、これは重大な罹病率と死亡率につながるおそれがある。したがって、術後のがんの再発を防ぐための効果的な戦略構築に多大な関心が寄せられている。それらの中で、がん免疫療法は、近年非常に注目を集めている。免疫療法剤は腫瘍を直接攻撃するのではなく、身体の免疫系を高めてがん細胞を殺す。免疫チェックポイント遮断は、患者のサブセットにおいて長続きする抗腫瘍反応及び長期間の寛解を誘発した。特に、チェックポイント阻害剤は、リンパ球上のプログラム細胞死タンパク質1（PD1）ならびに抗原提示細胞（APC）及び腫瘍細胞上のプログラム細胞死1リガンド1（PDL1）の相互作用を遮断し、様々な種類のがんの処置において目を見張る結果を示した。さらに、最初のPD-L1阻害剤であるアテゾリズマブは、最近FDAから迅速承認を受けた。著しい進歩にもかかわらず、チェックポイント遮断療法の現在の方法は、多くの患者において治療効果が制限される。臨床試験で観察された最大の制限は、自己免疫疾患などの副作用の重篤度であり得る。免疫チェックポイント遮断療法で処置した場合、グレード3/4の有害事象が時々発生している。その一方で、大多数の患者は、これらの薬剤に反応しなかった。がん免疫療法の客観的奏効率（ORR）は、依然として改善が必要である。がん免疫療法をどのように強化するかは、がん免疫学及び免疫療法の分野における中心的テーマの1つとなっている。本明細書に開示される組成物及び方法は、これらのニーズ及び他のニーズに対処する。

【発明の概要】

【0004】

本開示は、疾患、例えばがんの治療及び予防のための血小板組成物及び方法を提供する

10

20

30

40

50

。本明細書に開示される組成物及び方法では、治療剤（例えば、免疫療法剤）が血小板細胞に共有結合している。本発明者らは、血小板細胞の表面にコンジュゲートした免疫療法剤（例えば、抗 P D L 1）が、原発腫瘍切除後のがんの再発を減少させる（及び／または転移を減少させる）ことを見出した。

【 0 0 0 5 】

一態様では、
血小板細胞と、
化学的リンカー部分と、
治療剤と、
を含み、

10

治療剤が前記化学的リンカー部分を介して前記血小板細胞に共有結合している、組成物が、本明細書で提供される。

【 0 0 0 6 】

別の態様では、
血小板細胞と、
化学的リンカー部分と、
治療剤と、
を含む治療上有効量の組成物を、それを必要とする対象に投与することを含み、
治療剤が前記化学的リンカー部分を介して前記血小板細胞に共有結合している、がんの
転移または再発を予防する方法が、本明細書にて開示される。

20

【 0 0 0 7 】

さらなる態様では、
血小板細胞と、
化学的リンカー部分と、
治療剤と、
を含む組成物を対象に投与することを含み、
治療剤が前記化学的リンカー部分を介して前記血小板細胞に共有結合しており、
前記組成物が、前記血小板細胞の活性化を介して創傷または外科的切除部位を標的とする、
治療剤の標的化送達のための方法が、本明細書にて開示される。

【 0 0 0 8 】

30

追加の態様では、
血小板細胞と、
化学的リンカー部分と、
治療剤と、
を含む治療上有効量の組成物を、それを必要とする対象に投与することを含み、
治療剤が前記化学的リンカー部分を介して前記血小板細胞に共有結合している、治療剤
の標的化送達のための方法が、本明細書で提供される。

【 0 0 0 9 】

本願明細書に組み込まれて本願明細書の一部を構成する添付図面は、以下に記載されるいくつかの態様を例示する。

40

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 0 】

【図 1】A ~ F. 抗 P D L 1（P - a P D L 1）による血小板の i n s i t u 活性化は、治療薬の放出を促進する。（a）血小板による原発腫瘍切除部位への抗 P D L 1 抗体（a P D L 1）の送達の模式図である。（b）活性化前（i）及び活性化後（i i 及び i i i）の P - a P D L 1 の T E M 画像である。赤い矢印は、血小板から放出された P M P を示す。大量の生成された P M P 粒子が、電子顕微鏡で観察された。スケールバー：0 . 5 μ m。（c）異なる時点での非活性化血小板及び活性化血小板から放出された a P D L 1 の割合（%）である。（d ~ e）異なる時点での非活性化血小板及び活性化血小板から放出された T N F - α （f）及び I L - 1 β （g）の量である。（f）トランスウェルシス

50

テム（孔径、 $1\mu\text{m}$ ）中で、非活性化 P - a P D L 1（左）及び活性化 P - a P D L 1（右）と同時インキュベートした B 1 6 がん細胞の共焦点免疫蛍光画像である。P - a P D L 1 及び B 1 6 がん細胞を、それぞれ上部区画及び下部区画で培養した。赤色は a P D L 1 シグナルを表し、青色蛍光と緑色蛍光は、それぞれ D A P I と A l e x a f l u o r 4 8 8 コンジュゲートコムギ胚芽凝集素による核と原形質膜を表す。スケールバー： $20\mu\text{m}$ 。エラーバーは、3 反復試料の標準偏差（S D）に基づく。

【図 2】A ~ J。P - a P D L 1 療法による手術床の再発性黒色腫瘍の *i n v i v o* 減少。（a）注射後の異なる時点で採取した血液中の a P D L 1 レベルを測定することによる、マウスにおける P - a P D L 1、遊離 a P D L 1、及び血小板 + a P D L 1 混合物の血液循環曲線である。エラーバーは、3 反復試料の標準偏差（S D）に基づく（ $n = 3$ ）。（b）P - a P D L 1 または等価用量の遊離 a P D L 1 を静脈内注射後のマウスの注射の 2 時間後の蛍光画像（a P D L 1 - C y 5 . 5）である。（c）P - a P D L 1 または遊離 a P D L 1 の静脈内注射から 2 時間後の残存腫瘍を有する創傷の *e x v i v o* 画像である。（図 2 d）（c）に示されるマウスの異なる創傷における平均 a P D L 1 - C y 5 . 5 蛍光シグナル強度である。エラーバーは、3 反復試料の標本平均の標準誤差（s . e . m .）に基づく。（e）（b）に示されるマウスから撮影した残存腫瘍切片の共焦点画像である。画像中、青と赤は、それぞれ D A P I と C y 5 . 5 による核と a P D L 1 のシグナルを表す。スケールバー： $20\mu\text{m}$ 。（f）不完全手術腫瘍モデルの処置のための P - a P D L 1 療法の模式図である。（g）原発腫瘍の除去後の異なる群の B 1 6 F 1 0 腫瘍の *i n v i v o* 生物発光画像である。処置群あたり 3 匹の代表的なマウスを示す。（h）明記された種々の処置後の異なる群のマウスの定量化された腫瘍シグナルである。（i ~ j）処置マウス及び対照マウスの腫瘍増殖曲線（i）及び生存曲線（j）である。生存調査のために処置群あたり 8 匹のマウスを示す。エラーバーは、標本平均の標準誤差（s . e . m .）に基づく。P 値： $*$ は $P < 0 . 0 5$ 。

【図 3】A ~ H。P - a P D L 1 は、強固な T 細胞媒介性の抗腫瘍免疫応答を引き起こした。（a）残存腫瘍の免疫蛍光は、C D 4 + T 細胞及び C D 8 + T 細胞の浸潤を示す。スケールバー： $50\mu\text{m}$ 。（b）腫瘍重量、及び（c）腫瘍 1 グラムあたりの C D 3 + 細胞の絶対数である。エラーバーは、標本平均の標準誤差（s . e . m .）に基づく（ $n = 4$ ）。（d）全 C D 3 + 細胞の C D 4 + T 細胞及び C D 8 + T 細胞の割合（%）、ならびに明記されたように処置されたマウスの残存腫瘍における代表的なドットプロットである。4 つの象限全てにおいてより高い細胞集団は、腫瘍部位において、はるかに多くの C D 3 + 腫瘍浸潤リンパ球を示した。（e）全 C D 3 + 細胞の C D 4 + F o x p 3 + T 細胞の割合（%）、及び明記されたように処置されたマウスの残存腫瘍における代表的なドットプロットである。（f）種々の処置時の腫瘍 1 グラムあたりの C D 8 + 細胞の絶対数である。（g ~ h）種々の処置時の残存腫瘍における腫瘍浸潤 C D 8 + T 細胞及びエフェクティブ C D 4 + T 細胞（e f f e c t i v e C D 4 + T c e l l s）の制御性 T 細胞に対する比である。エラーバーは、標本平均の標準誤差（s . e . m .）に基づく（ $n = 4$ ）。統計的有意性は、T u k e y の事後検定を使用して一元配置分散分析によって算出した。P 値： $*$ は $P < 0 . 0 5$ 、 $**$ は $P < 0 . 0 1$ 、 $***$ は $P < 0 . 0 0 5$ 。

【図 4】A ~ F。P - a P D L 1 療法は、局所的な再発性黒色腫瘍及び転移性疾患の増殖に影響を及ぼした。（a）マウスの不完全な手術及び転移性腫瘍モデルの処置のための P - a P D L 1 療法の模式図である。（b）異なる時点での原発腫瘍の除去後の異なる群の B 1 6 F 1 0 転移の *i n v i v o* 生物発光画像である。処置群あたり 3 匹の代表的なマウスが示される。（c）代表的な肺写真、及び（d）明記された異なる処置後のマウスから収集された H & E 染色された肺切片である。黒い矢印は、肺の転移性腫瘍を示す。スケールバー： $500\mu\text{m}$ 。（e）異なる処置をしたマウスの肺転移小結節の定量化である。結果は、平均 $\pm$ S E M（ $n = 3$ ）として表す。（f）処置マウス及び対照マウスの生存曲線である。生存調査のための処置群あたり 8 匹のマウスを示す。P 値： $*$ は $P < 0 . 0 5$ 。

【図 5】A ~ E。術後 4 T 1 再発癌を処置する P - a P D L 1。（a）異なる時点での原

発腫瘍の除去後の異なる群の4T1転移の*in vivo*生物発光画像である。(b)手術の2週間後の代表的なマウスの写真である。黒い矢印は、手術床(surgical bed)の再発腫瘍を示す。(c)明記された異なる処置後のマウスから収集された代表的な肺写真である。赤い矢印は、肺の腫瘍小結節を示す。(d)異なる処置をしたマウスの肺転移小結節の定量化である。結果は、平均±SEM($n=3$)として表す。(e)処置マウス及び対照マウスの生存曲線である。生存調査のための各処置群あたり8匹のマウスを示す。P値: *は $P<0.05$ 。

【図6】aPDL1結合血小板の共焦点免疫蛍光画像である。FITCコンジュゲート二次抗体を用いて、血小板上のaPDL1画像を検出した。スケールバー: $20\mu\text{m}$ 。

【図7】aPDL1結合血小板のフローサイトメトリーアッセイである。血小板を、異なる実験設定下でaPDL1と共にインキュベートし、ヤギ抗ラットIgG(H+L)二次抗体、FITCを使用してフローサイトメトリーにより分析した。血小板表面へのaPDL1の結合の成功は、スルフィドリル(sulphydryl)及びマレイミドの結合を介して確認された。

10

【図8】A~C。aPDL1結合血小板のコンジュゲーション及び安定性。(a)様々な量のaPDL1をコンジュゲーションのために血小板に添加した。血小板へのaPDL1コンジュゲーションの効率(添加したaPDL1/コンジュゲートしたaPDL1)は、血小板あたり 0.2pg のaPDL1を添加した場合に約75%であった。(b)aPDL1修飾後の血小板の安定性。0時間及び24時間における血小板数分析に基づいてP-aPDL1の数を測定した。(c)経時的な血小板上aPDL1の安定性。エラーバーは、3反復試料の標準偏差(SD)に基づく($n=6$)。

20

【図9】未処置の血小板及びaPDL1コンジュゲート血小板上の表面タンパク質発現である(活性化後にCD62P及びCD40Lを調べた)。

【図10】A~B。活性化後のP-aPDL1の透過電子顕微鏡(TEM)像である。(a)活性化血小板から出る血小板微粒子(PMP)である。(b)P-aPDL1活性化後、多数のPMPがTEMで見られる。サイズバー: aでは 100nm 、bでは $2\mu\text{m}$ 。

【図11】活性化後のP-aPDL1の免疫蛍光画像である。血小板にカルセインを負荷し、緑色蛍光により可視化した。aPDL1をCy3ヤギ抗ラットIgG二次抗体で標識し、赤色蛍光によって可視化した。白い矢印は、血小板から放出されたPMPを示す。

【図12】A~B。トランスウェルシステム中で、P-aPDL1と同時にインキュベートしたB16がん細胞の共焦点免疫蛍光画像である。(a)トランスウェルシステムの模式図である。P-aPDL1及びB16がん細胞を、それぞれ上部区画及び下部区画で培養した。(b)トランスウェルシステム(孔径、 $1\mu\text{m}$)中で、非活性化P-aPDL1及び活性化P-aPDL1と同時にインキュベートしたB16がん細胞の共焦点免疫蛍光画像である。赤(Cy3)蛍光はaPDL1シグナルを表し、青(DAPI)と緑(Alexa Fluor(登録商標)488)蛍光は、それぞれ核と細胞膜からのシグナルを表す。スケールバー: $20\mu\text{m}$ 。

30

【図13】A~C。マウスにおけるaPDL1結合血小板の体内分布である。(a)遊離Cy5.5-aPDL1及びP-aPDL1-Cy5.5の蛍光スペクトルである。血小板にaPDL1をコンジュゲートした後、Cy5.5の強度は、顕著な影響が見られなかった。(b)P-aPDL1及び遊離aPDL1の静脈内注射から2時間後のマウスの異なる臓器における*ex vivo* Cy5.5-aPDL1蛍光画像である。L: 肝臓、Lu: 肺、Sp: 脾臓、H: 心臓、K: 腎臓。(c)(b)に示されるマウスの異なる臓器における平均Cy5.5蛍光シグナル強度である。各処置群あたり3匹のマウスを示す。結果は、平均±SDとして表した。統計的有意性は、t検定によって算出した。P値: **は $P<0.005$ 。

40

【図14】A~B。残存腫瘍切片の共焦点画像である。(a)残存腫瘍切片の共焦点画像である。画像中、青と赤は、DAPIとCy5.5による核とaPDL1のシグナルを表す。(b)(a)のP-aPDL1中の残存腫瘍切片の高倍率画像である。白い矢印は、血小板から放出されたPMP及びaPDL1を示す。

50

【図15】マウス尾部切断出血モデルにおける止血効果である。統計的有意性は、*t* 検定によって算出した。*n.s.* は有意差無し。エラーバーは、3 反復試料の標準偏差 (SD) に基づく (*n* = 10)。

【図16】A ~ D。処置後のマウスのサイトカインレベルである。明記された処置後のマウスの、(a) 局所的サイトカインレベルと (b) 全身性サイトカインレベルである。PD-L1 分析の、(c) 代表的なフローサイトメトリー分析画像と (d) 免疫蛍光画像である (上部、血小板なし；下部、血小板あり)。(マクロファージは、CD11b + GFP - にゲートをかけ、腫瘍細胞は GFP +、CD45 - にゲートをかけ、B 細胞は CD20 + GFP - にゲートをかけ、DC は CD11c + GFP - にゲートをかけた)。エラーバーは、3 反復試料の *s.e.m.* に基づく。統計的有意性は、Tukey の事後検定を使用して一元配置分散分析によって算出した。P 値：* は $P < 0.05$ 、*n.s.* は有意差無し。

10

【図17】残存腫瘍の免疫蛍光は、CD4 + T 細胞及び CD8 + T 細胞の浸潤を示す。スケールバー：50 μ m。

【図18】明記された異なる処置をした、Ki67 を発現する CD8 +、CD4 + Foxp3、及び CD4 + Foxp3 + T 細胞の割合 (%)。統計的有意性は、Tukey の事後検定を使用して一元配置分散分析によって算出した。P 値：* は $P < 0.05$ 、** は $P < 0.01$ 、*** は $P < 0.005$ 。

【図19】A ~ C。原発腫瘍除去後の PMP - aPDL1 及び高用量の aPDL1 の抗腫瘍効率である。(a) 原発腫瘍の除去後の異なる群の B16F10 腫瘍の *in vivo* 生物発光画像である。(b) 明記された種々の処置後の異なる群のマウスの腫瘍増殖曲線である。(c) 明記された種々の処置後 60 日でのマウスの生存曲線である。各処置群あたり 5 匹のマウスを示す。

20

【図20】肺組織の蛍光画像である。青と緑の蛍光は、それぞれ DAPI による核と GFP がん細胞を表す。スケールバー：100 μ m。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本開示は、疾患、例えばがんの治療及び予防のための血小板組成物及び方法を提供する。本明細書に開示される組成物及び方法では、治療剤 (例えば、免疫療法剤) が血小板細胞に共有結合している。本発明者らは、血小板細胞の表面にコンジュゲートした免疫療法剤 (例えば、抗 PDL1) が、原発腫瘍切除後のがんの再発を減少させる (及び / または転移を減少させる) ことを見出した。

30

【0012】

ここで、本発明の実施形態を詳細に参照し、その例を図面及び実施例に例示する。しかしながら、本発明は、多くの異なる形態で具体化することができ、本明細書に記載の実施形態に限定されると解釈されるべきではない。

【0013】

別途定義されていない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書中で使用される「含む (comprising)」という用語及びその変形形態は、「含む (including)」という用語及びその変形形態と同義に使用され、オープンで非限定的な用語である。本明細書では「含む (comprising)」及び「含む (including)」という用語を使用して種々の実施形態を説明しているが、「含む (comprising)」及び「含む (including)」の代わりに「から本質的になる (consisting essentially of)」及び「からなる (consisting of)」という用語がより具体的な実施形態を提供するために使用することができ、また開示される。

40

【0014】

用語

本明細書及び本特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a」、「an」及び「th

50

e」は、文脈上、別段の明確な指示がない限り、複数形の言及を含む。例えば、「細胞 (a c e l l)」という用語は、その混合物を含む複数の細胞を含む。

【 0 0 1 5 】

本明細書中で使用される場合、「～してもよい (m a y)」、「任意に (o p t i o n a l l y)」、及び「～であってもよい (m a y o p t i o n a l l y)」という用語は、互換的に使用され、その状態が生じる場合だけでなく、その状態が生じない場合も含まれることを意味する。したがって、例えば、ある製剤に「賦形剤を含んでもよい」という記載は、該製剤に賦形剤が含まれる場合だけでなく、該製剤に賦形剤が含まれない場合も含まれることを意味する。

【 0 0 1 6 】

本明細書中で使用される場合、「有益な薬剤」及び「活性剤」という用語は、本明細書で互換的に使用され、有益な生物学的効果を有する化学化合物または組成物を指す。有益な生物学的効果には、治療効果（すなわち、障害または他の望ましくない生理状態の治療）と予防効果（すなわち、障害または他の望ましくない生理状態（例えば、がん）の予防）の両方が含まれる。この用語にはまた、本明細書において具体的に言及される有益な薬剤の薬学的に許容可能な、薬理学的に活性な誘導体が包含され、限定されないが、塩、エステル、アミド、プロドラッグ、活性代謝物、異性体、断片、類似体などが含まれる。「有益な薬剤」または「活性剤」という用語が使用される場合、または特定の薬剤が具体的に明確にされる場合、この用語には、その薬剤それ自体だけでなく、薬学的に許容可能な、薬理学的に活性な塩、エステル、アミド、プロドラッグ、コンジュゲート、活性代謝物、異性体、断片、類似体などが含まれると理解されたい。

【 0 0 1 7 】

本明細書中で使用される場合、対象を「処置すること」または対象の「処置」という用語には、疾患または障害、または疾患もしくは障害の症状を予防する、治す、癒やす、軽減する、緩和する、変化させる、治療する、回復させる、改善する、安定化させる、またはそれに影響を及ぼす目的での対象への薬物の投与が含まれる。「処置する」及び「処置」という用語はまた、症状の重症度及び／または頻度の低減、症状及び／または根本原因の除去、症状及び／またはその根本原因の発生の予防、ならびに損傷の改善または治療を指すことができる。

【 0 0 1 8 】

本明細書中で使用される場合、対象における障害または望ましくない生理学的事象を「予防する」という用語は、具体的には、症状及び／またはその根本原因の発生の予防を指し、その対象は、その障害または事象に対して高まった感受性を示す場合もあれば示さない場合もある。

【 0 0 1 9 】

治療剤の「有効量」という用語は、無毒であるが、有益な薬剤が所望の効果をもたらすのに十分な量を意味する。「有効」である有益な薬剤の量は、対象の年齢及び全般状態、個々の有益な薬剤（複数可）などに依存して、対象ごとに変動するものである。したがって、正確な「有効量」を特定することは、必ずしも可能ではない。しかしながら、どの対象の症例にも適切な「有効」量は、通常の実験を使用して、当業者により決定され得る。さらに、本明細書中で使用される場合、そして特段明記されない限り、有益なものの「有効量」はまた、治療上有効な量と予防上有効な量の両方を包含する量を指すことができる。

【 0 0 2 0 】

治療効果を達成するのに必要な薬物の「有効量」は、対象の年齢、性別、及び体重のような要素によって変動し得る。投与レジメンは、最適な治療応答をもたらすように調整することができる。例えば、いくつかに分割した用量を毎日投与してもよく、治療状況の緊急性により示されるように、その用量を比例的に減らしてもよい。

【 0 0 2 1 】

本明細書中で使用される場合、治療剤の「治療的有效量」は、所望の治療結果を達成す

10

20

30

40

50

るのに有効である量を指し、治療剤の「予防的有効量」は、望まれない生理状態を予防するのに有効である量を指す。所与の治療剤の治療的有効量及び予防的有効量は、典型的には、処置される障害または疾患の種類及び重症度、ならびに対象の年齢、性別、及び体重のような要素に関連して変動するものである。

【0022】

「治療的有効量」という用語はまた、所望の治療効果を促進するのに有効な、治療剤の量または治療剤の送達速度（例えば、経時的な量）を指すことができる。所望の正確な治療効果は、処置される状態、対象の忍容性、投与される薬物及び／または薬物製剤（例えば、治療剤（薬物）の効力、製剤中の薬物濃度など）、ならびに当業者によって認識される種々の他の要素にしたがって、変動するものである。

10

【0023】

本明細書中で使用される場合、「薬学的に許容可能な」成分という用語は、生物学的にもそれ以外でも望ましくないものではない成分を指すことができる。すなわち、その成分は、著しく望ましくない生物学的効果を引き起こすことも、それが含まれる製剤の他の成分のいずれとも有害な様式で相互作用することなく、本発明の医薬製剤に組み込まれ得、本明細書に記載のように対象へ投与され得る。賦形剤へ言及するのに「薬学的に許容可能な」という用語が使用される場合は、その成分が毒性学的試験及び製造試験の要求される基準に合致していること、または米国食品医薬品局によって作成された「不活性成分ガイド (Inactive Ingredient Guide)」にそれが含まれることが通常含意される。

20

【0024】

さらに、本明細書中で使用される場合、「薬理学的に活性な」誘導体または類似体にあるような「薬理学的に活性な」（または、単に「活性な」という用語は、元の化合物と同じ種類かつ、ほぼ同等程度の薬理活性を有する誘導体または類似体（例えば、塩、エステル、アミド、コンジュゲート、代謝産物、異性体、断片など）を指すことができる。

【0025】

本明細書中で使用される場合、「混合物」という用語には、該混合物の成分が完全に混和する溶液、ならびに該混合物の成分が完全には混和しない懸濁液及びエマルジョンを含むことができる。

【0026】

30

本明細書中で使用される場合、「対象」という用語は、限定されないが、ヒト、家畜類、イヌ、ネコ、及び他の哺乳動物が含まれる哺乳動物のような生物を指すことができる。治療剤の投与は、対象の処置に有効な用量及び期間で実施可能である。いくつかの実施形態では、前記対象は、ヒトである。いくつかの実施形態では、本発明のシステムの薬物動態プロファイルは、雄の対象と雌の対象で同様である。

【0027】

本明細書中で使用される場合、「併用投与」、「組み合わせ投与」、「同時投与」または「同時に投与される」という表現は、化合物が同じ時点で、または互いに直後に投与されることを意味する。後者の場合、2種の化合物は、観察される結果が、それらの化合物が同じ時点で投与される場合に達成される結果と区別がつかないほど十分に近い時点で投与される。

40

【0028】

本明細書中で使用される場合、「抗体」という用語は、4本のポリペプチド鎖（ジスルフィド結合によって相互接続された2本の重（H）鎖及び2本の軽（L）鎖）で構成された免疫グロブリン分子を指す。本明細書中で使用される場合、「抗体」という用語は、限定されないが、当技術分野において公知の組換え技術によって生成される組換え抗体が含まれる。「抗体」は、ヒト、非ヒト霊長類（例えば、チンパンジー、ヒヒ、アカゲザル、もしくはカニクイザル由来などのヒト）、げっ歯類（例えば、マウス、ラット、ウサギまたはモルモット由来）、ヤギ、ウシもしくはウマの種などの哺乳動物種由来のものを含む任意の起源のもの；またはニワトリ抗体のような鳥種、またはサメ抗体のような魚種由来

50

の任意の起源のものであり得る。「抗体」には、ヒトアイソタイプ I g A₁、I g A₂、I g D、I g G₁、I g G_{2a}、I g G_{2b}、I g G₃、I g G₄、I g E 及び I g M、ならびにこれらの修飾変異体を含む任意のアイソタイプの抗体が含まれる。本明細書の抗体は、目的の「抗原」に対する。好ましくは、抗原は、生物学的に重要なポリペプチドであり、疾患または障害に罹患している哺乳動物への抗体の投与は、その哺乳動物に治療効果をもたらすことができる。しかしながら、非ポリペプチド抗原に対する抗体もまた、検討される。

【0029】

本明細書中で使用される場合、「抗体断片」という用語は、1つ以上のドメイン、または1つ以上のアミノ酸を欠く天然に存在する抗体を指す。典型的には、抗体断片は、そのような天然に存在する抗体の全抗原結合領域またはその可変領域を含む。抗体断片の例には、F_c部分を欠く任意の抗体が含まれる。抗体断片の例にはさらに、F_ab、F_ab'、F_(a b')₂、F_v及びs c F_v断片；ダイアボディ；トリアボディ；テトラボディ；ミニボディ；本質的に1、2または3つの免疫グロブリンドメイン（複数可）からなる抗体、例えばDomain antibodies（商標）；一本鎖抗体；上記のいずれかの二重特異性、三重特異性、四重特異性または多重特異性変異体が含まれる。

10

【0030】

組成物

一態様では、

血小板細胞と、

化学的リンカー部分と、

治療剤と、を含み、

治療剤が前記化学的リンカー部分を介して前記血小板細胞に共有結合している、組成物が、本明細書で提供される。

20

【0031】

一実施形態では、治療剤は、免疫療法剤である。一実施形態では、免疫療法剤は、抗PDL1抗体、抗PD1抗体、抗CTLA4抗体、抗CD47抗体、またはこれらの組み合わせから選択される。一実施形態では、免疫療法剤は、抗PDL1抗体である。

【0032】

一実施形態では、化学的リンカー部分は、マレイミドリンカー、PEGリンカー、PAS化、及びHES化から選択される。一実施形態では、化学的リンカー部分は、マレイミドリンカーである。

30

【0033】

一実施形態では、血小板細胞は、ヒト血小板細胞である。一実施形態では、血小板細胞は、自己由来の血小板細胞である。

【0034】

一実施形態では、

血小板細胞と、

化学的リンカー部分と、

免疫療法剤と、を含み、

免疫療法剤が、化学的リンカー部分を介して血小板細胞に共有結合している、組成物が、本明細書で提供される。

40

【0035】

一実施形態では、

血小板細胞と、

化学的リンカー部分と、

抗PDL1抗体と、を含み、

抗PDL1抗体が、化学的リンカー部分を介して血小板細胞に共有結合している、組成物が、本明細書で提供される。

【0036】

50

一実施形態では、
血小板細胞と、
マレイミドリンカーと、
免疫療法剤と、を含み、
免疫療法剤が、該化学的リンカー部分を介して血小板細胞に共有結合している、組成物が、本明細書で提供される。

【0037】

一実施形態では、
血小板細胞と、
マレイミドリンカーと、
抗PD-L1抗体と、を含み、
抗PD-L1抗体が、該化学的リンカー部分を介して血小板細胞に共有結合している、組成物が、本明細書で提供される。

10

【0038】

治療上有効量の1つ以上の開示された血小板組成物及び薬学的に許容可能な担体を含む医薬組成物が開示される。本明細書にて提供される組成物の投与に適した医薬担体には、個々の投与方法に適していると当業者に公知の任意のそのような担体が含まれる。加えて、前記組成物は、医薬組成物中の唯一の薬学的活性成分として処方されてもよく、または他の活性成分と組み合わせられてもよい。

【0039】

活性化合物（例えば、血小板細胞にコンジュゲートされた免疫療法剤）及びある種の賦形剤を含む本明細書に記載される組成物は、種々の用途において有用であり得る。

20

【0040】

「賦形剤」には、所望の個々の剤形に適するように、あらゆる溶媒、希釈剤または他の液体媒体、分散助剤または懸濁助剤、界面活性剤、等張剤、増粘剤または乳化剤、防腐剤、固体結合剤、滑沢剤などが含まれる。製剤及び/または製造における一般的な考慮事項は、例えば、Remington's Pharmaceutical Science, Sixteenth Edition, E.W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980)、及びRemington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition (Lippincott Williams & Wilkins, 2005)に見出すことができる。薬学的に許容可能な賦形剤はまた、1つ以上の充填剤、結合剤、滑沢剤、流動化剤、崩壊剤などを含み得る。

30

【0041】

例示的な賦形剤には、限定されないが、任意の非毒性の、不活性固体、半固体、または液体の、任意の種類の充填剤、希釈剤、カプセル化材料または製剤補助剤が含まれる。賦形剤として機能し得る材料のいくつかの例としては、限定されないが、ラクトース、グルコース、及びスクロースなどの糖類；コーンスターチ及びジャガイモデンプンなどのデンプン；カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、及びセルロースアセテートなどのセルロース及びその誘導体；トラガント末；モルト；ゼラチン；タルク；カカオバター及び坐剤ワックスなどの賦形剤；ピーナッツ油、綿実油などの油；ベニバナ油；ゴマ油；オリーブ油；コーン油及び大豆油；プロピレングリコールなどのグリコール；エチルオレート及びエチルラウレートなどのエステル；寒天；Tween 80などの界面活性剤；水酸化マグネシウム及び水酸化アルミニウムなどの緩衝剤；アルギン酸；発熱物質非含有水；等張食塩水；リンゲル液；エチルアルコール；ならびにリン酸緩衝液、ならびにナトリウムラウリルスルフェート及びマグネシウムステアレートなどの他の非毒性適合性滑沢剤、ならびに着色剤、離型剤、コーティング剤、甘味剤、香味剤及び芳香剤、防腐剤及び酸化防止剤が含まれ、これらはまた、配合者の判断にしたがって前記組成物中に存在することができる。当業者によって認識され得るように、賦形剤は、組成物が何に有用であるかに基づいて選択され得る。例えば、医薬組成物と共に、賦形剤の選択は、

40

50

投与経路、送達される薬剤、薬剤の送達のタイムコースなどに左右され得、ヒト及び／または動物に、経口的に、直腸内に、非経口的に、大槽内に、腔内に、鼻腔内に、腹腔内に、局所的に（散剤、クリーム剤、軟膏剤、または点剤(d r o p)による）、口腔内に、または経口スプレーもしくは鼻腔内スプレーとして投与され得る。特定の実施形態では、前記組成物は、腫瘍の切除部位またはその近くに注射される。

【 0 0 4 2 】

例示的な希釈剤には、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、リン酸カルシウム、リン酸二カルシウム、硫酸カルシウム、リン酸水素カルシウム、リン酸ナトリウム、ラクトース、スクロース、セルロース、微結晶性セルロース、カオリン、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、塩化ナトリウム、乾燥デンプン、コーンスターチ、粉糖など、及びこれらの組み合わせが含まれる。

10

【 0 0 4 3 】

例示的な顆粒剤及び／または分散剤には、ジャガイモデンプン、コーンスターチ、タピオカスターチ、ナトリウムデンプングリコレート、粘土、アルギン酸、グアーガム、柑橘類パルプ、寒天、ベントナイト、セルロース及び木質生成物、天然スポンジ、陽イオン交換樹脂、炭酸カルシウム、シリケート、炭酸ナトリウム、架橋ポリ（ビニル - ピロリドン）（クロスボピドン）、カルボキシメチルデンプンナトリウム（ナトリウムデンプングリコレート）、カルボキシメチルセルロース、架橋カルボキシメチルセルロースナトリウム（クロスカルメロース）、メチルセルロース、アルファ化デンプン（デンプン 1 5 0 0）、微結晶性デンプン、水不溶性デンプン、カルボキシメチルセルロースカルシウム、マグネシウムアルミニウムシリケート（V e e g u m）、ナトリウムラウリルスルフェート、四級アンモニウム化合物など、及びこれらの組み合わせが含まれる。

20

【 0 0 4 4 】

例示的な界面活性剤及び／または乳化剤には、天然乳化剤（例えば、アカシア、寒天、アルギン酸、アルギン酸ナトリウム、トラガカント、コンドラックス（c h o n d r u x）、コレステロール、キサントラン、ペクチン、ゼラチン、卵黄、カゼイン、羊毛脂、コレステロール、ワックス、及びレシチン）、コロイド状粘土（例えば、ベントナイト [アルミニウムシリケート] 及び V e e g u m [マグネシウムアルミニウムシリケート] ）、長鎖アミノ酸誘導体、高分子量アルコール（例えば、ステアリルアルコール、セチルアルコール、オレイルアルコール、トリアセチンモノステアレート、エチレングリコールジステアレート、グリセリルモノステアレート、及びプロピレングリコールモノステアレート、ポリビニルアルコール）、カルボマー（例えば、カルボキシポリメチレン、ポリアクリル酸、アクリル酸ポリマー、及びカルボキシビニルポリマー）、カラギーナン、セルロース誘導体（例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、粉末セルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルセルロース）、ソルビタン脂肪酸エステル（例えば、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート [T w e e n 2 0]、ポリオキシエチレンソルビタン [T w e e n 6 0]、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート [T w e e n 8 0]、ソルビタンモノパルミテート [S p a n 4 0]、ソルビタンモノステアレート [S p a n 6 0]、ソルビタントリステアレート [S p a n 6 5]、グリセリルモノオレエート、ソルビタンモノオレエート [S p a n 8 0] ）、ポリオキシエチレンエステル（例えば、ポリオキシエチレンモノステアレート [M y r j 4 5]、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリエトキシ化ヒマシ油、ポリオキシメチレンステアレート、及び S o l u t o l ）、スクロース脂肪酸エステル、ポリエチレングリコール脂肪酸エステル（例えば、C r e m o p h o r ）、ポリオキシエチレンエーテル、（例えば、ポリオキシエチレンラウリルエーテル [B r i j 3 0] ）、ポリ（ビニル - ピロリドン）、ジエチレングリコールモノラウレート、トリエタノールアミンオレエート、ナトリウムオレエート、カリウムオレエート、エチルオレエート、オレイン酸、エチルラウレート、ナトリウムラウリルスルフェート、ブルコニック F 6 8、ポロキサマー 1 8 8、臭化セトリモニウム、塩化セチルピリジニウム、塩化ベンザルコニウム、ドクサートナトリウムなど、及び／またはこれ

30

40

50

らの組み合わせが含まれる。

【0045】

例示的な結合剤には、デンプン（例えば、コーンスターチ及びデンプンペースト）、ゼラチン、糖類（例えば、スクロース、グルコース、デキストロース、デキストリン、糖蜜、ラクトース、ラクチトール、マンニトールなど）、天然及び合成ゴム（例えば、アカシア、アルギン酸ナトリウム、アイリッシュモスの抽出物、パンワールガム（panwargum）、ガティガム、イサポール皮（isapol husk）の粘液、カルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、微結晶性セルロース、セルロースアセテート、ポリ（ビニル・ピロリドン）、マグネシウムアルミニウムシリケート（Veegum）、及びカラマツアラボガラクタン）アルギネート、ポリエチレンオキシド、ポリエチレングリコール、無機カルシウム塩類、ケイ酸、ポリメタクリレート類、ワックス、水、アルコールなど、及び／またはこれらの組み合わせが含まれる。

10

【0046】

例示的な防腐剤には、酸化防止剤、キレート剤、抗菌防腐剤、抗真菌防腐剤、アルコール防腐剤、酸性防腐剤、及びその他の防腐剤が含まれる。

【0047】

例示的な酸化防止剤には、アルファトコフェロール、アスコルビン酸、アコルビルパルミテート（acorbypalmitate）、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、モノチオグリセロール、ピロ亜硫酸カリウム、プロピオン酸、プロピルガレート、アスコルビン酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、及び亜硫酸ナトリウムが含まれる。

20

【0048】

例示的なキレート剤には、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）ならびにその塩及び水和物（例えば、エデト酸ナトリウム、エデト酸二ナトリウム、エデト酸三ナトリウム、エデト酸カルシウム二ナトリウム、エデト酸二カリウムなど）、クエン酸ならびにその塩及び水和物（例えば、クエン酸一水和物）、フマル酸ならびにその塩及び水和物、リンゴ酸ならびにその塩及び水和物、リン酸ならびにその塩及び水和物、ならびに酒石酸ならびにその塩及び水和物が含まれる。例示的な抗菌防腐剤には、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、ベンジルアルコール、プロノポール、セトリミド、塩化セチルピリジニウム、クロルヘキシジン、クロロブタノール、クロロクレゾール、クロロキシレノール、クレゾール、エチルアルコール、グリセリン、ヘキセチジン、イミド尿素、フェノール、フェノキシエタノール、フェニルエチルアルコール、フェニル水銀ニトレート、プロピレングリコール、及びチメロサールが含まれる。

30

【0049】

例示的な抗真菌防腐剤には、ブチルパラベン、メチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン、安息香酸、ヒドロキシ安息香酸、カリウムベンゾエート、カリウムソルベート、ナトリウムベンゾエート、ナトリウムプロピオネート、及びソルビン酸が含まれる。

40

【0050】

例示的なアルコール防腐剤には、エタノール、ポリエチレングリコール、フェノール、フェノール系化合物、ビスフェノール、クロロブタノール、ヒドロキシベンゾエート、及びフェニルエチルアルコールが含まれる。

【0051】

例示的な酸性防腐剤には、ビタミンA、ビタミンC、ビタミンE、ベータカロテン、クエン酸、酢酸、デヒドロ酢酸、アスコルビン酸、ソルビン酸、及びフィチン酸が含まれる。

【0052】

他の防腐剤には、トコフェロール、トコフェロールアセテート、デテロキシムメシレー

50

ト (deteroxime mesylate)、セトリミド、ブチル化ヒドロキシアニソール (BHA)、ブチル化ヒドロキシトルエン (butylated hydroxytoluened) (BHT)、エチレンジアミン、ナトリウムラウリルスルフェート (SLS)、ナトリウムラウリルエーテルスルフェート (SLES)、亜硫酸水素ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸カリウム、ピロ亜硫酸カリウム、Glydant Plus、Phenonip、メチルパラベン、Germall 115、Germaben II、Neolone、Kathon、及び Euxyl が含まれる。特定の実施形態では、防腐剤は、抗酸化剤である。他の実施形態では、防腐剤は、キレート剤である。

【0053】

例示的な緩衝剤には、シトレート緩衝液、アセテート緩衝液、ホスフェート緩衝液、塩化アンモニウム、炭酸カルシウム、塩化カルシウム、クエン酸カルシウム、グルビオン酸カルシウム、カルシウムグルセプト、グルコン酸カルシウム、D-グルコン酸、カルシウムグリセロホスフェート、乳酸カルシウム、プロパン酸、カルシウムレプリネート、ペンタン酸、二塩基性リン酸カルシウム、リン酸、三塩基性リン酸カルシウム、水酸化リン酸カルシウム、酢酸カリウム、塩化カリウム、グルコン酸カリウム、カリウム混合物、二塩基性リン酸カリウム、一塩基性リン酸カリウム、リン酸カリウム混合物、酢酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、二塩基性リン酸ナトリウム、一塩基性リン酸ナトリウム、リン酸ナトリウム混合物、トロメタミン、水酸化マグネシウム、水酸化アルミニウム、アルギン酸、発熱物質非含有水、等張食塩水、リンゲル液、エチルアルコールなど、及びこれらの組み合わせが含まれる。

【0054】

例示的な滑沢剤には、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸、シリカ、タルク、モルト、グリセリルベハネート (glyceryl behanate)、硬化植物油、ポリエチレングリコール、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、ロイシン、マグネシウムラウリルスルフェート、ナトリウムラウリルスルフェートなど、及びこれらの組み合わせが含まれる。

【0055】

例示的な天然油には、アーモンド、杏仁、アボカド、パパス、ベルガモット、ブラックカラントシード、ルリヂサ、ケード、カモミール、キャノーラ、キャラウェイ、カルナウバ、ヒマ、シナモン、カカオバター、ココナッツ、タラ肝、コーヒー、トウモロコシ、綿実、エミユ、ユーカリ、月見草、魚、亜麻仁、ゲラニオール、ウリ (gourd)、ブドウ種子、ヘーゼルナッツ、ヒソップ、イソプロピルミリスレート、ホホバ、ククイナッツ、ラバンディン、ラベンダー、レモン、littsea cubeba、マカダミアナッツ、マロウ、マンゴー種子、メドウフォーム種子、ミンク、ナツメグ、オリーブ、オレンジ、オレンジラフィー、パーム、パーム核、モモ核、ピーナッツ、ポピーシード、カボチャ種子、菜種、米ぬか、ローズマリー、ベニバナ、サンダルウッド、サスカナ (sasquana)、セイボリー、シーバックソーン、ゴマ、シアバター、シリコーン、大豆、ヒマワリ、ティーツリー、シスル、ツバキ、ベチパー、クルミ、及び小麦胚芽の油が含まれる。例示的な合成油には、これらに限定されないが、ブチルステアレート、カプリル酸トリグリセリド、カプリン酸トリグリセリド、シクロメチコン、ジエチルセバケート、ジメチコン 360、イソプロピルミリスレート、鉱油、オクチルドデカノール、オレイルアルコール、シリコーンオイル、及びこれらの組み合わせが含まれる。

【0056】

加えて、組成物は、ポリマーをさらに含んでよい。本明細書で検討される例示的なポリマーには、これらに限定されないが、セルロース系ポリマー及びコポリマー、例えばメチルセルロース (MC)、ヒドロキシエチルセルロース (HEC)、ヒドロキシプロピルセルロース (HPC)、ヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC)、メチルヒドロキシエチルセルロース (MHEC)、メチルヒドロキシプロピルセルロース (MHPC)、カルボキシメチルセルロース (CMC) 及びその種々の塩 (例えば、ナトリウム塩を含む)、ヒドロキシエチルカルボキシメチルセルロース (HECMC) 及びその種々の塩、

カルボキシメチルヒドロキシエチルセルロース (CMHEC) 及びその種々の塩などのセルロースエーテル、他の多糖類及び多糖類誘導体 (デンプン、デキストラン、デキストラン誘導体、キトサン、ならびにアルギン酸及びその種々の塩など)、カラギーナン、種々のガム (キサンタンガム、グアーガム、アラビアガム、カラヤガム、ガティガム、コンニャク、及びトラガカントガムを含む)、グリコサミノグリカン及びプロテオグリカン (ヒアルロン酸及びその塩など)、タンパク質 (ゼラチン、コラーゲン、アルブミン、及びフィブリン)、他のポリマー (例えば、ポリラクチド、ポリグリコリド、ポリ (ラクチド - コ - グリコリド) 及びポリ (ϵ - カプロラクトン - コ - グリコリド) などのポリヒドロキシ酸)、カルボキシビニルポリマー及びこれらの塩 (例えばカルボマー)、ポリビニルピロリドン (PVP)、ポリアクリル酸及びその塩、ポリアクリルアミド、ポリアクリル酸 / アクリルアミドコポリマー、ポリアルキレンオキシド (ポリエチレンオキシド、ポリプロピレンオキシド、ポリ (エチレンオキシド - プロピレンオキシド)、及びプルロニックポリマー、ポリオキシエチレン (ポリエチレングリコール)、ポリ無水物、ポリビニルアルコール、ポリエチレンアミン及びポリピリジン、PEG 化脂質 (例えば、PEG - ステアレート、1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ (ポリエチレングリコール) - 1000]、1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ (ポリエチレングリコール) - 2000]、及び 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 - [メトキシ (ポリエチレングリコール) - 5000]) などのポリエチレングリコール (PEG) ポリマー、これらのコポリマー及び塩が含まれる。

【0057】

加えて、組成物は、乳化剤をさらに含んでよい。例示的な乳化剤には、これらに限定されないが、ポリエチレングリコール (PEG)、ポリプロピレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリ - N - ビニルピロリドン及びそれらのコポリマー、ポロキサマー非イオン性界面活性剤、中性水溶性多糖類 (例えば、デキストラン、Ficoll、セルロース)、非カチオン性ポリ (メタ) アクリレート、非カチオン性ポリアクリレート、例えばポリ (メタ) アクリル酸、ならびにこれらのエステルアミド及びヒドロキシアルキルアミド、天然乳化剤 (例えば、アカシア、寒天、アルギン酸、アルギン酸ナトリウム、トラガカント、コンドラックス (chondrux)、コレステロール、キサンタン、ペクチン、ゼラチン、卵黄、カゼイン、羊毛脂、コレステロール、ワックス、及びレシチン)、コロイド状粘土 (例えば、ベントナイト [アルミニウムシリケート] 及び Veegum [マグネシウムアルミニウムシリケート])、長鎖アミノ酸誘導体、高分子量アルコール (例えば、ステアリルアルコール、セチルアルコール、オレイルアルコール、トリアセチンモノステアレート、エチレングリコールジステアレート、グリセリルモノステアレート、及びプロピレングリコールモノステアレート、ポリビニルアルコール)、カルボマー (例えば、カルボキシポリメチレン、ポリアクリル酸、アクリル酸ポリマー、及びカルボキシビニルポリマー)、カラギーナン、セルロース誘導体 (例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、粉末セルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルセルロース)、ソルビタン脂肪酸エステル (例えば、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート [Tween 20]、ポリオキシエチレンソルビタン [Tween 60]、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート [Tween 80]、ソルビタンモノパルミテート [Span 40]、ソルビタンモノステアレート [Span 60]、ソルビタントリステアレート [Span 65]、グリセリルモノオレエート、ソルビタンモノオレエート [Span 80])、ポリオキシエチレンエステル (例えば、ポリオキシエチレンモノステアレート [Myrij 45]、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリエトキシ化ヒマシ油、ポリオキシメチレンステアレート、及び Solutol)、スクロース脂肪酸エステル、ポリエチレングリコール脂肪酸エステル (例えば、Cremophor)、ポリオキシエチレンエーテル、(例えば、ポリオキシエチレンラウリルエーテル [Brij 30])、ポリ (ビニル - ピロリドン)、ジエチレングリコールモノラウレート、トリエタノールアミンオレ

10

20

30

40

50

エート、ナトリウムオレエート、カリウムオレエート、エチルオレエート、オレイン酸、エチルラウレート、ナトリウムラウリルスルフェート、プルロニック F 68、ポロキサマー 188、臭化セトリモニウム、塩化セチルピリジニウム、塩化ベンザルコニウム、ドクサートナトリウムなど、及び／またはこれらの組み合わせが含まれる。ある特定の実施形態では、乳化剤は、コレステロールである。

【0058】

液体組成物には、エマルション剤、マイクロエマルション剤、液剤、懸濁剤、シロップ剤、及びエリキシル剤が含まれる。活性化合物（例えば、血小板細胞にコンジュゲートした免疫療法剤）（血小板細胞にコンジュゲートした免疫療法剤）に加えて、液体組成物は、当技術分野において一般的に使用される不活性希釈剤、例えば、水または他の溶媒、可溶化剤及び乳化剤、例えば、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、エチルカーボネート、エチルアセテート、ベンジルアルコール、ベンジルベンゾエート、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、ジメチルホルムアミド、油（特に綿実、落花生、トウモロコシ、胚芽、オリーブ、ヒマ、及びゴマ油）、グリセロール、テトラヒドロフルフリルアルコール、ポリエチレングリコール類及びソルビタンの脂肪酸エステル、ならびにこれらの混合物などを含有してもよい。不活性希釈剤の他に、経口組成物には、湿潤剤、乳化剤及び懸濁剤、甘味剤、香味剤及び芳香剤のような補助剤もまた含むことができる。

10

【0059】

注射用組成物、例えば、注射用水性または油性懸濁液は、適切な分散剤または湿潤剤及び懸濁剤を使用して公知の技術にしたがって製剤化してもよい。無菌注射製剤はまた、非毒性の非経口的に許容可能な希釈剤または溶媒中の注射液、懸濁液、またはエマルション、例えば、1,3-ブタンジオール中の溶液であり得る。使用され得る医薬組成物または化粧品組成物のための許容可能な媒体及び溶媒は、水、リンゲル液、米国薬局方等張食塩液である。加えて、無菌の不揮発性油が、溶媒または懸濁媒体として従来から使用されている。合成モノグリセリドまたはジグリセリドを含む任意の無刺激の不揮発性油が使用可能である。加えて、オレイン酸などの脂肪酸が、注射剤の調製に使用される。ある特定の実施形態では、粒子が、1% (w/v) のカルボキシメチルセルロースナトリウム及び0.1% (v/v) の Tween 80 を含むキャリア流体中に懸濁される。注射用組成物は、例えば、細菌保持フィルターを通して濾過することによって、または使用前に滅菌水または他の無菌注射媒体に溶解もしくは分散させることができる滅菌固体組成物の形態で滅菌剤を組み込むことによって、滅菌することができる。

20

30

【0060】

いくつかの実施形態では、組成物または治療剤（例えば、本明細書に開示の組成物と組み合わせる追加の治療剤）は、固形組成物で投与することができる。固体組成物には、カプセル剤、錠剤、丸剤、散剤、及び顆粒剤が含まれる。そのような固体組成物では、粒子は、少なくとも1つの賦形剤及び／または a) デンプン、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール、及びケイ酸などの充填剤または増量剤、b) 例えばカルボキシメチルセルロース、アルギネート、ゼラチン、ポリビニルピロリジノン、スクロース、及びアカシアなどの結合剤、c) グリセロールなどの保湿剤、d) 寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモデンプンまたはタピオカスターチ、アルギン酸、ある特定のシリケート、及び炭酸ナトリウムなどの崩壊剤、e) パラフィンなどの溶解遅延剤、f) 四級アンモニウム化合物などの吸収促進剤、g) 例えばセチルアルコール及びグリセロールモノステアレートなどの湿潤剤、h) カオリン及びベントナイト粘土などの吸収剤、ならびに i) タルク、カルシウムステアレート、マグネシウムステアレート、固体ポリエチレングリコール、ナトリウムラウリルスルフェート、及びこれらの混合物などの滑沢剤と共に混合される。カプセル剤、錠剤及び丸剤の場合、剤形はまた、緩衝剤を含んでもよい。ラクトースまたは乳糖、及び高分子量ポリエチレングリコールなどのような賦形剤を使用して、類似の種類の固体組成物を、軟充填ゼラチンカプセル剤及び硬充填ゼラチンカプセル剤の充填剤として用いてもよい。

40

50

【 0 0 6 1 】

錠剤、カプセル剤、丸剤及び顆粒剤は、腸溶性コーティング及び医薬品製剤分野において周知の他のコーティングなどのコーティング及びシェルを用いて調製することができる。これらは任意に乳白剤を含んでもよく、これらが活性成分（複数可）のみを、優先的には腸管のある特定の部分に、任意には遅延した様式で放出する組成物のものであることができる。使用可能な包埋組成物の例には、高分子物質及びワックスが含まれる。

【 0 0 6 2 】

ラクトースまたは乳糖、及び高分子量ポリエチレングリコールなどのような賦形剤を使用して、類似の種類の固体組成物を、軟充填ゼラチンカプセル剤及び硬充填ゼラチンカプセル剤の充填剤として用いてもよい。

10

【 0 0 6 3 】

局所投与または経皮投与用の組成物には、軟膏剤、ペースト剤、クリーム剤、ローション剤、ゲル剤、散剤、液剤、スプレー剤、吸入剤、またはパッチが含まれる。活性化合物（例えば、血小板細胞にコンジュゲートした免疫療法剤）は、必要に応じて、賦形剤、及び任意の必要な防腐剤または緩衝剤と混合される。

【 0 0 6 4 】

軟膏剤、ペースト剤、クリーム剤、及びゲル剤は、活性化合物（例えば、血小板細胞にコンジュゲートした免疫療法剤）に加えて、動物性及び植物性脂肪、油、ワックス、パラフィン、デンプン、トラガカント、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコン類、ベントナイト、ケイ酸、タルク、及び酸化亜鉛、またはこれらの混合物などの賦形剤を含有してもよい。

20

【 0 0 6 5 】

散剤及びスプレー剤は、活性化合物／組成物に加えて、ラクトース、タルク、ケイ酸、水酸化アルミニウム、カルシウムシリケート、及びポリアミド粉末、またはこれらの物質の混合物などの賦形剤を含有することができる。スプレー剤はさらに、クロロフルオロ炭化水素のような慣用の噴射剤を含有することができる。

【 0 0 6 6 】

経皮パッチは、身体への化合物の制御送達を提供するというさらなる利点を有する。このような剤形は、適切な媒体にナノ粒子を溶解または分散させることによって作製することができる。吸収促進剤もまた、皮膚全体にわたって化合物の流動を高めるために使用することができる。速度制御膜を設ける、またはポリマーマトリックスもしくはゲルに粒子を分散させるかのいずれかによって、速度を制御することができる。

30

【 0 0 6 7 】

いくつかの実施形態では、治療剤はナノ粒子にカプセル化することができる。一実施形態では、

血小板細胞と、

化学的リンカー部分と、

治療剤と、を含み、

治療剤が、ナノ粒子内にカプセル化される組成物が、本明細書で提供される。

【 0 0 6 8 】

いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、化学的リンカー部分を介して共有結合する。いくつかの実施形態では、化学的リンカー部分は任意であり、ナノ粒子は血小板細胞に共有結合していない。

40

【 0 0 6 9 】

ナノ粒子は、1以上のポリマーから作製することができる。いくつかの例では、ポリマーには、ポリカルボン酸またはその塩、カルボン酸無水物（例えば、無水マレイン酸）と他のモノマー（例えば、メチル（メタ）アクリレート、アクリル酸など）、親水性ビニルポリマー（ポリビニルアセテート、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン（PVP）、ポリエチレンオキシド（PEO）、ポリ（ビニルピロリドン - コ - ビニルアセテート）など）、ポリメタクリレート、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエ

50

チレンヒマシ油、ポリカプロラクタム、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリ（乳酸 - グリコール酸）、ポリ（乳酸 - コ - グリコール酸）（PLGA）、セルロース誘導体（ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースなど）が含まれる。一例では、ポリマーは50：50のPLGAコポリマーである。他の例では、ポリマーには、キトサン、コラーゲン、アルギネート、ゼラチン、ヒアルロン酸、及びこれらの無毒の金属塩などの天然ポリマーが含まれる。いくつかの実施形態では、ポリマーはハイドロゲル、例えばアルギン酸ハイドロゲルである。親水性ポリマー及び他の媒体は、単独でまたは組み合わせて使用することができ、部分的結晶化、イオン結合、架橋などによって増強された構造的完全性を媒体に付与することができる。

【0070】

10

薬物または治療剤を粒子にカプセル化する方法は、当技術分野において公知である。一般的なカプセル化技術には、これらに限定されないが、噴霧乾燥、界面重合、ホットメルトカプセル化、相分離カプセル化（自発的エマルジョンマイクロカプセル化、溶媒蒸発マイクロカプセル化、及び溶媒除去マイクロカプセル化）、コアセルベーション、低温マイクロスフェア形成、及び転相ナノカプセル化（PIN）が含まれる。これらの方法の概要を以下に述べる。

【0071】

ある特定の実施形態では、本明細書で論じられている組成物に組み込まれるナノ粒子は、多層ナノ粒子である。本明細書に開示される組成物において有用な多層ナノ粒子は、例えば、「連続転相ナノカプセル化」（sPIN）を使用して調製することができる。

20

【0072】

1. 噴霧乾燥

噴霧乾燥技術を使用して、マイクロスフェア/ナノスフェアを形成するための方法は、Mathiowitzらの米国特許第6,620,617号に記載されている。この方法では、ポリマーを塩化メチレンのような有機溶媒または水中に溶解する。粒子に組み込まれる既知量の1以上の活性剤を、ポリマー溶液中に懸濁する（不溶性活性剤の場合）か、または共溶解する（可溶性活性剤の場合）。圧縮ガスの流れにより駆動するマイクロ化ノズルを通じて溶液または分散液を注入し、得られたエアロゾルを加熱された空気のサイクロンに懸濁し、溶媒をマイクロ液滴から蒸発させて、粒子を形成する。この方法を使用して、0.1～10ミクロンの範囲のマイクロスフェア/ナノスフェアを得ることができる。

30

【0073】

2. 界面重合

界面重合もまた、1以上の活性剤をカプセル化するために使用することができる。この方法を使用して、モノマー及び活性剤（複数可）を溶媒に溶解する。第2のモノマーを、第1の溶媒と不混和性の第2の溶媒（典型的には水性）に溶解する。エマルションは、第2の溶液中での攪拌により第1の溶液を懸濁することによって形成される。エマルションが安定化したら、開始剤を水相に添加し、エマルションの各液滴の界面で界面重合を引き起こす。

【0074】

40

3. ホットメルトマイクロカプセル化

マイクロスフェアは、Mathiowitz et al., *Reactive Polymers*, 6:275 (1987)に記載されているホットメルトマイクロカプセル化法を使用して、ポリエステル及びポリ無水物などのポリマーから形成することができる。この方法では、3～75,000ダルトンの間の分子量を有するポリマーの使用が好ましい。この方法では、ポリマーは最初に溶融され、次に、50ミクロン未満に篩分けされた組み込まれる1以上の活性剤の固体粒子と混合される。混合物を（シリコンオイルのような）非混和性溶媒に懸濁し、そして連続的に攪拌しながら、ポリマーの融点より5 高く加熱する。エマルションが安定化したら、ポリマー粒子が固化するまで冷却する。得られたマイクロスフェアを石油エーテルでデカントすることにより洗浄して、流動性のある

50

粉末を得る。

【 0 0 7 5 】

4 . 相分離マイクロカプセル化

相分離マイクロカプセル化技術では、ポリマー溶液を、任意に、カプセル化する 1 以上の活性剤の存在下で撹拌する。撹拌により材料を均一に懸濁し続けながら、ポリマーに対する非溶媒を前記溶液へとゆっくり添加し、ポリマーの溶解度を低下させる。溶媒及び非溶媒中のポリマーの溶解度に応じて、ポリマーは沈殿するか、またはポリマー濃厚相とポリマー希薄相とに分離する。適切な条件下で、ポリマー濃厚相中のポリマーは、連続相との界面に移動し、活性剤（複数可）を、外側ポリマーシェルの有する液滴中にカプセル化する。

10

【 0 0 7 6 】

i n . 自発的エマルションマイクロカプセル化

自発的乳化は、温度の変化、溶媒の蒸発、または化学架橋剤を添加することによって、上で形成された乳化液体ポリマー液滴を固化させることを含む。カプセル化材料（e n c a p s u l a n t）の物理的及び化学的性質、ならびに発生しようとする粒子に任意に組み込まれる 1 以上の活性剤の性質が、カプセル化の適切な方法を決定づける。疎水性、分子量、化学的安定性、及び熱安定性などの要素がカプセル化に影響する。

【 0 0 7 7 】

i i . 溶媒蒸発マイクロカプセル化

溶媒蒸発技術を使用してマイクロスフェアを形成する方法は、E . M a t h i o w i t z e t a l . , J . S c a n n i n g M i c r o s c o p y , 4 : 3 2 9 (1 9 9 0) ; L . R . B e c k e t a l . , F e r t i l . S t e r i l . , 3 1 : 5 4 5 (1 9 7 9) , L . R . B e c k e t a l A m J O b s t e t G y n e c o l 1 3 5 (3) (1 9 7 9) , S . B e n i t a e t a l . , J . P h a r m . S c i . , 7 3 : 1 7 2 1 (1 9 8 4) , 及び M o r i s h i t a e t a l . の米国特許第 3 , 9 6 0 , 7 5 7 号に記載されている。ポリマーを塩化メチレンのような揮発性有機溶媒に溶解する。組み込まれる 1 以上の活性剤を、任意に溶液に添加し、該混合物をポリ（ビニルアルコール）のような界面活性剤を含有する水溶液中に懸濁する。得られたエマルションを大部分の有機溶媒が蒸発するまで撹拌し、固体のマイクロスフェア/ナノスフェアを残す。この方法は、ポリエステル及びポリスチレンのような比較的安定なポリマーに有用である。しかしながら、ポリ無水物のような不安定なポリマーは、水が存在するために製造プロセス中に劣化するおそれがある。これらのポリマーについては、完全に無水の有機溶媒中で実施される以下の方法のいくつかがより有用である。

20

30

【 0 0 7 8 】

i i i . 溶媒除去マイクロカプセル化

溶媒除去マイクロカプセル化技術は、主にポリ無水物のために設計されており、例えば、B r o w n U n i v e r s i t y R e s e a r c h F o u n d a t i o n の W O 9 3 / 2 1 9 0 6 に記載されている。この方法では、塩化メチレンのような揮発性有機溶媒中の選択したポリマーの溶液に、組み込まれる物質を分散または溶解する。この混合物を、シリコンオイルのような有機油中に撹拌することによって懸濁し、エマルションを形成する。この手順によって、1 ~ 3 0 0 ミクロンの間の範囲のマイクロスフェアを得ることができる。マイクロスフェアに組み込むことができる物質には、医薬品、殺虫剤、栄養素、造影剤、及び金属化合物が含まれる。

40

【 0 0 7 9 】

5 . コアセルベーション

コアセルベーション技術を使用する種々の物質のカプセル化手順は、当技術分野、例えば、G B - B - 9 2 9 4 0 6 , G B - B - 9 2 9 4 0 1 , ならびに米国特許第 3 , 2 6 6 , 9 8 7 号、第 4 , 7 9 4 , 0 0 0 号、及び第 4 , 4 6 0 , 5 6 3 号において公知である。コアセルベーションは、高分子溶液を 2 つの不混和性液相に分離することを含む。1 つの相は、濃厚なコアセルベート相であり、これは高濃度のポリマーカプセル化材料

50

(及び任意には1以上の活性剤)を含有し、一方、第2の相は低濃度のポリマーを含有する。濃厚なコアセルベート相内では、ポリマーカプセル化材料は、ナノスケールまたはマイクロスケールの液滴を形成する。コアセルベーションは、温度変化、非溶媒の添加もしくはマイクロ塩の添加(単純コアセルベーション)、または別のポリマーの添加によりインターポリマー複合体が形成され得ること(複合コアセルベーション)により誘発することができる。

【0080】

6. マイクロスフェアの低温キャストイング

制御放出マイクロスフェアの極低温キャストイングの方法が、Gomboltzらの米国特許第5,019,400号に記載されている。この方法では、ポリマーを、任意には1以上の溶解または分散した活性剤と共に溶媒に溶解する。次いで、混合物を、ポリマー液滴を凍結させるポリマー-物質溶液の凝固点未満の温度で、液体非溶媒を含有する容器に噴霧する。該液滴、及び該ポリマーに対する非溶媒が温められると、液滴中の溶媒が解凍され、非溶媒中に抽出され、その結果、マイクロスフェアが固化する。

【0081】

7. 転相ナノカプセル化(PIN)

ナノ粒子はまた、転相ナノカプセル化(PIN)法を使用して形成することができる。この方法では、ポリマーを「良」溶媒に溶解し、薬物のような組み込まれる物質の微粒子をポリマー溶液に混合または溶解し、そして該混合物をポリマーに対する強力な非溶媒へと注ぎ入れると、ポリマーマイクロスフェアを好ましい条件下で自発的に生成し、該ポリマーは、粒子で被覆されるか、または粒子がポリマー中に分散される。例えば、Mathiowitzらの米国特許第6,143,211号を参照のこと。この方法は、例えば、約100ナノメートル~約10ミクロンを含む広範囲のサイズのナノ粒子及びマイクロ粒子の単分散集団を製造するために使用することができる。

【0082】

有利には、エマルションを沈殿前に形成する必要はない。このプロセスは、熱可塑性ポリマーからマイクロスフェアを形成するために使用することができる。

【0083】

8. 逐次転相ナノカプセル化(sPIN)

多層ナノ粒子はまた、本明細書で「連続転相ナノカプセル化」(sPIN)と呼ばれるプロセスによって形成することもできる。sPINは、単分散のナノ粒子集団を形成するのに特に適しており、単分散のナノ粒子集団を実現するための追加の分離ステップを必要としない。

【0084】

sPINでは、コアポリマーが、第1の溶媒に溶解される。活性剤は、コアポリマー溶媒に溶解または分散される。コアポリマー、コアポリマー溶媒、及びカプセル化される薬剤は、連続相を有する混合物を形成し、該コアポリマー溶媒は連続相である。シェルポリマーは、コアポリマーに対して非溶媒であるシェルポリマー溶媒に溶解する。コアポリマー及びシェルポリマーの溶液を共に混合する。その結果、シェルポリマー溶媒の存在によりコアポリマーの曇点での溶解度が低下し、これによりコアポリマーが優先的に相分離し、任意には薬剤がカプセル化する。コアポリマー及びシェルポリマーに対する非溶媒が、この不安定な混合物に添加されると、転相が完了した際にシェルポリマーがコアポリマーを包み込み、二層ナノ粒子が形成される。

【0085】

sPINは、二層ナノ粒子などの多層粒子の調製のための1ステップ手順を提供し、これは、ほぼ瞬間的であり、溶媒の乳化を必要としない。多層粒子を形成するための方法は、Choraの米国特許出願公開第2012-0009267号に開示されている。この開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0086】

粒子は、デンドリマー粒子であり得る。デンドリマーは、シェルまたは分岐分子の層を

10

20

30

40

50

中心コアに連続的に付加することによって成長する三次元ポリマーである。デンドリマーは、制御可能な構造、分散した分子量ではなく単一の分子量、及び多数の制御可能な表面官能基、及び特定のサイズに達すると球状構造を採用する傾向を有するため、直鎖状ポリマーに優る幾つかの利点を有する。デンドリマーは、高度分岐モノマーを共に反応させて単分散、樹木状及びノまたは世代構造のポリマー構造を作製することによって調製される。個々のデンドリマーは、各官能部位に結合した樹状楔状部を有する中心コア分子からなる。デンドリマー表面層は、調製中に使用されるアセンブリモノマーに応じて、デンドリマー表面層上に配置された種々の官能基を有することができる。一般に、デンドリマー官能基は、個々のデンドリマー型の特性を決定づける。これらの設計の結果として、デンドリマーコアは広い空間をとり、そしてコア、シェル、及び特に表面層の化学的性質を改変することによって、これらの物理的性質が微調整され得る。調整可能な性質には、溶解度、毒性、免疫原性、及び生体結合能が含まれる。

10

【0087】

ポリアミドアミン、ポリプロピレンイミン、ポリアリールエーテル及びポリエチレンイミンは、バイオ医薬品用途について研究されているデンドリマーの例である。ポリアミドアミンデンドリマーは、エチレンジアミンコア及びアミドアミン繰り返し分岐構造をベースとしている。これらは、種々の明確に定義された分子量で合成することができる。これらのサイズ及び表面官能基（一級アミン）は、モノマー単位の制御された繰り返し付加の数によって定義され、異なる半世代またはフル世代を生じさせる。これらは水溶性であり、唯一の種類の単分散したデンドリマーであると報告されている。さらに、これらは分子表面に限定される高い電荷密度を示す。

20

【0088】

デンドリマーは、デンドリマー内の空洞に薬物を捕捉することによって、または薬物分子を表面に共有結合させることによって、治療用化合物の担体として使用されてきた。これは、Svensson, S., Eur J Pharm Biopharm (2009) 71: 445 - 462 及び Cheng, Y., J. Pharm. Sci. (2007) 97: 123 - 143 にて概説されている。デンドリマー空洞内の捕捉は小分子に限定され、そして共有結合アプローチは、これまで小薬物がデンドリマー表面から加水分解的または酵素的に切断される系に限定されている。

【0089】

方法

一態様では、血小板細胞と、化学的リンカー部分と、治療剤と、を含む治療上有効量の組成物を、それを必要とする対象に投与することを含み、治療剤が、化学的リンカー部分を介して血小板細胞に共有結合している、がんの転移または再発を予防する方法が、本明細書にて開示される。

30

【0090】

一実施形態では、治療剤は、免疫療法剤である。一実施形態では、免疫療法剤は、抗PD-L1抗体、抗PD-1抗体、抗CTLA-4抗体、抗CD47抗体、またはこれらの組み合わせから選択される。一実施形態では、免疫療法剤は、抗PD-L1抗体である。

40

【0091】

一実施形態では、化学的リンカー部分は、マレイミドリリンカー、PEGリンカー、PAS化、及びHES化から選択される。一実施形態では、化学的リンカー部分は、マレイミドリリンカーである。

【0092】

一実施形態では、血小板細胞は、ヒト血小板細胞である。一実施形態では、血小板細胞は、自己由来の血小板細胞である。

【0093】

50

一実施形態では、がんは、固形腫瘍である。一実施形態では、がんは、黒色腫である。
一実施形態では、がんは、乳癌である。一実施形態では、組成物は、追加の治療剤と組み合わせて投与される。一実施形態では、追加の治療剤は、抗腫瘍剤である。

【0094】

一態様では、
血小板細胞と、
化学的リンカー部分と、
治療剤と、
を含む治療上有効量の組成物を、それを必要とする対象に投与することを含み、
治療剤が、化学的リンカー部分を介して血小板細胞に共有結合している、がんを治療または予防する方法が、本明細書にて開示される。

10

【0095】

さらなる態様では、
血小板細胞と、
化学的リンカー部分と、
治療剤と、
を含む組成物を対象に投与することを含み、治療剤が、化学的リンカー部分を介して血小板細胞に共有結合しており、
組成物が、血小板細胞の活性化を介して創傷または外科的切除部位を標的とする、治療剤の標的化送達のための方法方法が、本明細書にて開示される。

20

【0096】

一実施形態では、該方法は、血小板細胞の活性化時に、創傷または切除部位で血小板由来マイクロ粒子中でさらに放出される治療剤を提供する。

【0097】

一実施形態では、治療剤は、免疫療法剤である。一実施形態では、免疫療法剤は、抗PD-L1抗体、抗PD-1抗体、抗CTLA-4抗体、抗CD47抗体、またはこれらの組み合わせから選択される。一実施形態では、免疫療法剤は、抗PD-L1抗体である。

【0098】

一実施形態では、化学的リンカー部分は、マレイミドリンカー、PEGリンカー、PAS化、及びHES化から選択される。一実施形態では、化学的リンカー部分は、マレイミドリンカーである。

30

【0099】

一実施形態では、血小板細胞は、ヒト血小板細胞である。一実施形態では、血小板細胞は、自己由来の血小板細胞である。

【0100】

がん及び固形腫瘍

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の血小板組成物及び方法は、がんの転移または再発を治療または予防するのに有用である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の血小板組成物及び方法は、切除された固形腫瘍の再発の予防に有用である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物及び方法は、切除された固形腫瘍の転移の予防に有用である。別の実施形態では、予防されるがんの再発は、黒色腫である。別の実施形態では、予防されるがんの再発は、乳癌である。さらなる実施形態では、予防されるがんの再発は、前立腺癌である。

40

【0101】

一態様では、本明細書に記載の方法は、固形腫瘍の再発または転移を予防するために使用され、例えば、固形腫瘍は、とりわけ、黒色腫、肺癌（肺腺癌、基底細胞癌、扁平上皮癌、大細胞癌、細気管支肺胞癌、気管支原性癌、非小細胞癌、小細胞癌、中皮腫を含む）；乳癌（乳管癌、小葉癌、炎症性乳癌、明細胞癌、粘液癌、漿膜腔乳癌を含む）；大腸癌（結腸癌、直腸癌、大腸腺癌）；肛門癌；膵臓癌（膵臓腺癌、膵島細胞癌、神経内分泌腫瘍を含む）；前立腺癌；前立腺腺癌；卵巢癌（漿液性腫瘍、類内膜腫瘍及び粘液性囊胞腺

50

癌を含む卵巣上皮癌または表層上皮性・間質性腫瘍、性索間質性腫瘍）；肝臓及び胆管癌（肝細胞癌、胆管癌、血管腫を含む）；食道癌（食道腺癌及び扁平上皮癌を含む）；口腔及び中咽頭扁平上皮癌；唾液腺腺様嚢胞癌；膀胱癌；膀胱癌腫；子宮の癌（子宮内膜腺癌、眼性、子宮体部漿液性腺癌、子宮明細胞癌、子宮肉腫、平滑筋肉腫、ミューラー管混合腫瘍を含む）；神経膠腫、膠芽腫、髓芽腫、及び脳の他の腫瘍；腎臓癌（腎細胞癌、明細胞癌、ウィルムス腫瘍を含む）；頭頸部の癌（扁平上皮癌を含む）；胃の癌（胃癌、胃腺癌、消化管間質腫瘍）；精巣癌；胚細胞腫瘍；神経内分泌腫瘍；子宮頸癌；消化管、乳房、及び他の器官のカルチノイド；印環細胞癌；肉腫、線維肉腫、血管腫、血管腫症、血管周皮腫、偽血管腫様間質過形成、筋線維芽細胞腫、線維腫症、炎症性筋線維芽細胞性腫瘍、脂肪腫、血管脂肪腫、顆粒細胞腫、神経線維腫、神経鞘腫、血管肉腫、脂肪肉腫、横紋筋肉腫、骨肉腫、平滑筋腫、平滑筋肉腫、皮膚、黒色腫を含む、頸部、網膜芽細胞腫、頭頸部癌、脾臓、脳、甲状腺、精巣、腎臓、膀胱、軟部組織、副腎、尿道、陰茎癌、粘膜肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、脊索腫、悪性線維性組織球腫、リンパ管肉腫、中皮腫、扁平上皮癌を含む間葉系腫瘍；類表皮癌、悪性皮膚付属器腫瘍、腺癌、肝癌、肝細胞癌、腎細胞癌、腎腺癌（hypernephroma）、胆管癌、移行上皮癌、絨毛癌、精上皮腫、胚細胞癌、退形成性神経膠腫；多形膠芽腫、神経芽腫、髓芽腫、悪性髄膜腫、悪性神経鞘腫、神経線維肉腫、副甲状腺癌、甲状腺髄様癌、気管支カルチノイド、褐色細胞腫、脾島細胞癌、悪性カルチノイド、悪性傍神経節腫、黒色腫、メルケル細胞新生物、葉状嚢胞肉腫、唾液癌（salivary cancers）、胸腺癌、ならびに腔癌である。

10

【0102】

20

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の血小板組成物及び方法は、がんの治療または予防に有用である。いくつかの場合では、がんは循環がん細胞（循環腫瘍細胞）である。いくつかの場合では、がんは転移がん細胞である。

【0103】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の血小板組成物は、*in vivo*で循環腫瘍細胞（CTC）を除去または減少させることができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の血小板組成物は、腫瘍の転移を著しく抑制することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の血小板組成物は、がんの再発を著しく抑制することができる（例えば、固形腫瘍切除後に）。

【0104】

30

血小板

血小板は、巨核球から放出される無核細胞断片であり、止血におけるそれらの機能について最もよく知られている。循環血小板の平均寿命は8～9日であり、これは静脈内注射された治療薬の薬物動態を大きく改善し得る。さらに、輸血された血小板は、残存腫瘍が手術後に残る可能性がある外科的創傷部位へと遊走し得る。他方では、血小板が、原発腫瘍から血管系に流れ込み、そして転移をもたらした循環腫瘍細胞（CTC）を認識及び相互作用する能力を有するという証拠が示されている。これらの固有の創傷及びCTC向性特性に加えて、血小板はまた、多くの炎症状態を惹起及び改善する免疫「細胞」と考えることができる。

【0105】

40

いくつかの場合では、血小板組成物は自己由来、すなわち対象から得られた血小板から産生される。いくつかの場合では、血小板組成物は異種由来、すなわち処置される対象以外の供給源から得られた血小板から産生される。

【0106】

いくつかの実施形態では、全血小板細胞を、治療剤にコンジュゲートすることができる。いくつかの実施形態では、治療剤を血小板由来のマイクロ粒子で送達することができる。血小板由来マイクロ粒子（PMPS）は、血小板活性化時に原形質膜から誘導され、活性化血小板は、接着分子及びケモカインを運ぶPMPを放出し、PMP沈着部位での単球捕捉を促進する。これらのPMPは、血小板の活性化（例えばトロンビンによる）後に、血小板から放出される。

50

【 0 1 0 7 】

治療剤

一実施形態では、リンカーを介して血小板にコンジュゲートする治療剤は、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体、抗体断片、核酸または治療薬物（例えば、小分子）からなる群から選択することができる。

【 0 1 0 8 】

一実施形態では、治療剤は、免疫療法剤である。一実施形態では、治療剤は、抗体または抗体断片である。いくつかの実施形態では、治療剤は、抗腫瘍剤である。いくつかの実施形態では、血小板組成物は、血管疾患を処置するための治療剤の送達をターゲットとすることができる。

10

【 0 1 0 9 】

免疫療法剤

一実施形態では、免疫療法剤は、抗 P D L 1 抗体、抗 P D 1 抗体、抗 C T L A 4 抗体、抗 C D 4 7 抗体、またはこれらの組み合わせから選択される。

【 0 1 1 0 】

一実施形態では、免疫療法剤は、抗 P D L 1 抗体である。一実施形態では、抗 P D L 1 抗体は、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、またはアベルマブから選択される。一実施形態では、抗 P D L 1 抗体は、アテゾリズマブ (M P D L 3 2 8 0 A) (R o c h e) である。一実施形態では、抗 P D L 1 抗体は、デュルバルマブ (M E D I 4 7 3 6) である。一実施形態では、抗 P D L 1 抗体は、アベルマブ (M S 0 0 1 0 7 1 8 C) である。

20

【 0 1 1 1 】

一実施形態では、免疫療法剤は、プログラム死タンパク質 1 (P D - 1) 阻害剤またはプログラム死タンパク質リガンド 1 または 2 阻害剤である。P D - 1 阻害剤は、当技術分野において公知であり、例えば、ニボルマブ (B M S) 、ペンブロリズマブ (M e r c k) 、ピジリズマブ (C u r e T e c h / T e v a) 、A M P - 2 4 4 (A m p l i m m u n e / G S K) 、B M S - 9 3 6 5 5 9 (B M S) 、及び M E D I 4 7 3 6 (R o c h e / G e n e n t e c h) が含まれる。

【 0 1 1 2 】

一実施形態では、免疫療法剤は、抗 P D 1 抗体である。一実施形態では、抗 P D 1 抗体は、ニボルマブである。一実施形態では、抗 P D 1 抗体は、ペンブロリズマブである。

30

【 0 1 1 3 】

一実施形態では、免疫療法剤は、抗 C T L A 4 抗体である。一実施形態では、抗 C T L A 4 抗体は、イピリムマブである。

【 0 1 1 4 】

いくつかの実施形態では、免疫療法剤は、追加の治療剤と組み合わせて投与される。いくつかの実施形態では、免疫療法剤は、抗腫瘍剤と組み合わせて投与される。

【 0 1 1 5 】

抗腫瘍剤

いくつかの実施形態では、治療剤は、抗腫瘍剤である。例えば、抗腫瘍剤は、アビラテロンアセテート、A b i t r e x a t e (メトトレキサート) 、A b r a x a n e (パクリタキセル・アルブミン安定化ナノ粒子製剤) 、A B V D 、A B V E 、A B V E - P C 、A C 、A C - T 、A d c e t r i s (プレンツキシマブベドチン) 、A D E 、アドトラスツズマブエムタンシン、A d r i a m y c i n (ドキソルビシン塩酸塩) 、A d r u c i l (フルオロウラシル) 、アファチニブジマレエート、A f i n i t o r (エベロリムス) 、A k y n z e o (ネットピタント・パロノセトロン塩酸塩) 、A l d a r a (イミキモド) 、アルデスロイキン、アレムツズマブ、A l i m t a (ベメトレキセドニナトリウム) 、A l o x i (パロノセトロン塩酸塩) 、A m b o c h l o r i n (クロラムブシル) 、A m b o c l o r i n (クロラムブシル) 、アミノレプリン酸、アナストロゾール、アプレピタント、A r e d i a (パミドロン酸ニナトリウム) 、A r i m i d e x (アナストロゾール) 、A r o m a s i n (エキセメスタン) 、A r r a n o n (ネララビン) 、

40

50

三酸化ヒ素、Arzerra (オファツムマブ)、アスパラギナーゼエルウィニアクリサンチミー、Avastin (ベバシズマブ)、アキシチニブ、アザシチジン、BEACOPP、Becenum (カルムスチン)、Beleodaq (ベリノスタット)、ベリノスタット、ベンダムスチン塩酸塩、BEP、ベバシズマブ、ベキサロテン、Bexxar (トシツモマブ・ヨウ素 I 131 トシツモマブ)、ピカルタミド、BiCNU (カルムスチン)、ブレオマイシン、ブリナツモマブ、Blinicyto (ブリナツモマブ)、ボルテゾミブ、Bosulif (ボスチニブ)、ボスチニブ、ブレンツキシマブベドチン、ブスルファン、Busulfex (ブスルファン)、カバジタキセル、カボザンチニブ-S-マレート、CAF、Campath (アレムツズマブ)、Campptosar (イリノテカン塩酸塩)、カベシタピン、CAPOX、カルボプラチン、カルボプラチン-TAXOL、カルフィルゾミブ、Carmubris (カルムスチン)、カルムスチン、カルムスチン・インプラント、Casodex (ピカルタミド)、CeeNU (ロムスチン)、セリチニブ、Cerubidine (ダウノルピシン塩酸塩)、Cervarix (組換えHPV2価ワクチン)、セツキシマブ、クロラムブシル、クロラムブシル-プレドニゾン、CHOP、シスプラチン、Clafen (シクロホスファミド)、クロファラビン、Clofarex (クロファラビン)、Clolar (クロファラビン)、CMF、Cometriq (カボザンチニブ-S-マレート)、COPP、COPP-ABV、Cosmegen (ダクチノマイシン)、クリゾチニブ、CVP、シクロホスファミド、Cyfos (イホスファミド)、Cyramza (ラムシルマブ)、シタラビン、シタラビン、リボソーマル、Cytosar-U (シタラビン)、Cytosan (シクロホスファミド)、ダブラフェニブ、ダカルバジン、Dacogen (デシタピン)、ダクチノマイシン、ダサチニブ、ダウノルピシン塩酸塩、デシタピン、デガレリクス、デニロイキンディフティトックス、デノスマブ、DepoCyt (リボソーマルシタラビン)、DepoFoam (リボソーマルシタラビン)、デキスラゾキサン塩酸塩、ジヌツキシマブ、ドセタキセル、Doxil (ドキシソルピシン塩酸塩リボソーム)、ドキシソルピシン塩酸塩、ドキシソルピシン塩酸塩リボソーム、Dox-SL (ドキシソルピシン塩酸塩リボソーム)、DTIC-Dome (ダカルバジン)、Efudex (フルオロウラシル)、Elitek (ラスブリカーゼ)、Ellence (エピルピシン塩酸塩)、Eloxatin (オキサリプラチン)、エルトロンボパグオラミン、Emend (アブレピタント)、エンザルタミド、エピルピシン塩酸塩、EPOCH、Erbix (セツキシマブ)、エリブリンメシレート、Erivedge (ピスモデギブ)、エルロチニブ塩酸塩、Erwinaze (アスパラギナーゼエルウィニアクリサンチミー)、Etopophos (エトポシドホスフェート)、エトポシド、エトポシドホスフェート、Evacet (ドキシソルピシン塩酸塩リボソーム)、エベロリムス、Evista (ラロキシフェン塩酸塩)、エキセメスタン、Fareston (トレミフェン)、Farydak (パノビノスタット)、Faslodex (フルベストラント)、FEC、Femara (レトロゾール)、フィルグラスチム、Fludara (フルダラビンホスフェート)、フルダラビンホスフェート、Fluoroplex (フルオロウラシル)、フルオロウラシル、Folex (メトトレキサート)、Folex PFS (メトトレキサート)、FOLFIRI、FOLFIRI-ベバシズマブ、FOLFIRI-セツキシマブ、FOLFIRINOX、FOLFIOX、Foloty (プララトレキセート)、FU-LV、フルベストラント、Gardasil (組換えHPV4価ワクチン)、Gardasil 9 (組換えHPV9価ワクチン)、Gazyva (オビヌツズマブ)、ゲフィチニブ、ゲムシタピン塩酸塩、ゲムシタピン-シスプラチン、ゲムシタピン-オキサリプラチン、ゲムツズマブオゾガマイシン、Gemzar (ゲムシタピン塩酸塩)、Gilotrif (アフアチニブジマレエート)、Gleevec (イマチニブメシレート)、Gliadel (カルムスチン・インプラント)、Gliadel wafer (カルムスチン・インプラント)、グルカルピダーゼ、ゴセレリンアセテート、Halaven (エリブリンメシレート)、Herceptin (トラスツズマブ)、HPV2価ワクチン、組換え、HPV9価ワクチン、組換え、HPV4価ワクチン、組換え、Hycamtin (トポテカン塩酸塩)、Hy

10

20

30

40

50

per - CVAD、Ibrance (パルボシクリブ)、イブリツモマブチウキセタン、イブルチニブ、ICE、Iclusig (ボナチニブ塩酸塩)、Idamycin (イダルビシン塩酸塩)、イダルビシン塩酸塩、イデラリシブ、Ifex (イホスファミド)、イホスファミド、Ifosfamidum (イホスファミド)、イマチニブメシレート、Imbruvica (イブルチニブ)、イミキモド、Inlyta (アキシチニブ)、インターフェロンアルファ - 2b、組換え、Intron A (組換えインターフェロンアルファ - 2b)、ヨウ素 I 131 トシツモマブ・トシツモマブ、イピリムマブ、Iressa (ゲフィチニブ)、イリノテカン塩酸塩、Istodax (ロミデプシン)、イクサベピロン、Ixempra (イクサベピロン)、Jakafi (ルキソリチニブホスフェート)、Jevtana (カバジタキセル)、Kadcyla (アドトラスツズマブエムタンシン)、Keoxifene (ラロキシフェン塩酸塩)、Kepivance (パリフェルミン)、Keytruda (ペンブロリズマブ)、Kyprolis (カルフィルゾミブ)、ランレオチドアセテート、ラパチニブジトシレート、レナリドミド、レンパチニブメシレート、Lenvima (レンパチニブメシレート)、レトロゾール、ロイコボリンカルシウム、Leukeran (クロラムブシル)、ロイプロリドアセテート、Levulan (アミノレブリン酸)、Linfolizin (クロラムブシル)、Lipodox (ドキシソルビシン塩酸塩リボソーム)、リボソーマルシタラビン、ロムスチン、Lupron (ロイプロリドアセテート)、Lupron Depot (ロイプロリドアセテート)、Lupron Depot - Ped (ロイプロリドアセテート)、Lupron Depot - 3 Month (ロイプロリドアセテート)、Lupron Depot - 4 Month (ロイプロリドアセテート)、Lynparza (オラパリブ)、Marqibo (ピンクリスチンスルフェートリボソーム)、Matulane (プロカルバジン塩酸塩)、メクロレタミン塩酸塩、Megace (メゲストロールアセテート)、メゲストロールアセテート、Mekinist (トラメチニブ)、メルカプトプリン、メスナ、Mesnex (メスナ)、Methazolastone (デモゾロミド)、メトトレキサート、Methotrexate LPF (メトトレキサート)、Mexate (メトトレキサート)、Mexate - AQ (メトトレキサート)、マイトマイシンC、ミトキサントロン塩酸塩、Mitozytrex (マイトマイシンC)、MOPP、Mozobil (プレリキサホル)、Mustargen (メクロレタミン塩酸塩)、Mutamycin (マイトマイシンC)、Myleran (ブスルファン)、Mylোসар (アザシチジン)、Mylotarg (ゲムツズマブオゾガマイシン)、Nanoparticle Paclitaxel (パクリタキセル・アルブミン安定化ナノ粒子製剤)、Navelbine (ピノレルピンタルタレート)、ネララビン、Neosar (シクロホスファミド)、ネツピタント・パロノセトロン塩酸塩、Neupogen (フィルグラスチム)、Nexavar (ソラフェニブトシレート)、ニロチニブ、ニボルマブ、Nolvadex (タモキシフェンシトレート)、Nplate (ロミプロスチム)、オビヌツズマブ、Odomzo (ソニデジブ)、OEP A、オフアツムマブ、OFF、オラパリブ、オマセタキシメベスクシナート、Oncaspar (ペグアスパラガーゼ)、オndanセトロン塩酸塩、Ontak (デニロイキン・ディフティトックス)、Opdivo (ニボルマブ)、OPPA、オキサリプラチン、パクリタキセル、パクリタキセル・アルブミン安定化ナノ粒子製剤、PAD、パルボシクリブ、パリフェルミン、パロノセトロン塩酸塩、パロノセトロン塩酸塩・ネツピタント、パミドロ酸二ナトリウム、パニツムマブ、パノビノスタット、Paraplat (カルボプラチン)、Paraplatin (カルボプラチン)、パゾパニブ塩酸塩、ペグアスパラガーゼ、ペグインターフェロンアルファ - 2b、PEG - Intron (ペグインターフェロンアルファ - 2b)、ペンブロリズマブ、ペメトレキセド二ナトリウム、Perjeta (ペルツズマブ)、ペルツズマブ、Platinol (シスプラチン)、Platinol - AQ (シスプラチン)、プレリキサホル、ポマリドミド、Pomalyst (ポマリドミド)、ボナチニブ塩酸塩、プラトレキセート、ブレドニゾン、プロカルバジン塩酸塩、Proleukin (アルデスロイキン)、Prolia (デノスマブ)、Promacta (エルトロン

10

20

30

40

50

ボパグオラミン)、Provence(シブロイセル-T)、Purinethol(メルカプトプリン)、Purixan(メルカプトプリン)、塩化ラジウム223、ラロキシフェン塩酸塩、ラムシルマブ、ラスブリカーゼ、R-CHOP、R-CVP、組換えヒトパピローマウイルス(HPV)2価ワクチン、組換えヒトパピローマウイルス(HPV)9価ワクチン、組換えヒトパピローマウイルス(HPV)4価ワクチン、組換えインターフェロンアルファ-2b、レゴラフェニブ、R-EPOCH、Revlimid(レナリドミド)、Rheumatrex(メトトレキサート)、Rituxan(リツキシマブ)、リツキシマブ、ロミデブシン、ロミブロスチム、Rubidomycin(ダウノルビジン塩酸塩)、ルキソリチニブホスフェート、Sclerosol Intrapleural Aerosol(タルク)、シルツキシマブ、シブロイセル-T、Soma 10
tuline Depot(ランレオチドアセテート)、ソニデジブ、ソラフェニブトシレート、Sprycel(ダサチニブ)、STANFORD V、Sterile Talc Powder(タルク)、Steritalc(タルク)、Stivarga(レゴラフェニブ)、スニチニブマレート、Sutent(スニチニブマレート)、Sylatron(ペグインターフェロンアルファ-2b)、Sylvant(シルツキシマブ)、Synovir(サリドマイド)、Synribo(オマセタキシンメベスクシナート)

、TAC、Tafinlar(ダブラフェニブ)、タルク、タモキシフェンシトレート、Tarabine PFS(シタラビン)、Tarceva(エルロチニブ塩酸塩)、T 20
argretin(ベキサロテン)、Tasigna(ニロチニブ)、Taxol(パクリタキセル)、Taxotere(ドセタキセル)、Temodar(テモゾロミド)、テモゾロミド、テムシロリムス、サリドマイド、Thalomid(サリドマイド)、チオテパ、Toposar(エトポシド)、トボテカン塩酸塩、トレミフェン、Torisel(テムシロリムス)、トシツモマブ・ヨウ素 I 131 トシツモマブ、Tote 30
ct(デクスラゾキサン塩酸塩)、TPF、トラメチニブ、トラスツズマブ、Treanda(ベンダムスチン塩酸塩)、Trisenox(三酸化二ヒ素)、Tykerb(ラパチニブジトシレート)、Unituxin(ジヌツキシマブ)、バンデタニブ、VAMP、Vectibix(パニツムマブ)、VeIP、Velban(ビンブラスチンスルフェート)、Velcade(ボルテゾミブ)、Velsar(ビンブラスチンスルフェート)、ベムラフェニブ、VePesid(エトポシド)、Viadur(ロイプロリドアセテート)、Vidaza(アザシチジン)、ビンブラスチンスルフェート、Vinc 40
asar PFS(ピンクリスチンスルフェート)、ピンクリスチンスルフェート、ピンクリスチンスルフェートリボソーム、ピノレルピンタルタレート、VIP、ビスモデギブ、Voraxaze(グルカルピダーゼ)、ボリノスタット、Votrient(パゾパニブ塩酸塩)、Wellcovorin(ロイコボリンカルシウム)、Xalkori(クリゾチニブ)、Xeloda(カペシタビン)、XELIRI、XELOX、Xgeva(デノスマブ)、Xofigo(塩化ラジウム223)、Xtandi(エンザルタミド)、Yervoy(イピリムマブ)、Zaltrap(Ziv-アフリベルセプト)、Zelboraf(ベムラフェニブ)、Zevalin(イブリツモマブチウキセタン)、Zinecard(デクスラゾキサン塩酸塩)、Ziv-アフリベルセプト、Zofran(オndanセトロン塩酸塩)、Zoladex(ゴセレリンアセテート)、ゾレドロン酸、Zolinz(ボリノスタット)、Zomet(ゾレドロン酸)、Zydelig(イデラリシブ)、Zykadia(セリチニブ)、及びZytiga(アピラテロンアセテート)からなる群から選択することができる。

【0116】

血管疾患の処置方法

血小板はまた、損傷した血管を封止し、出血を止める栓を形成することによって、止血及び血栓症などのいくつかの生理学的及び病理学的プロセスにおいて重要な役割を果たすため、このプラットフォームは、関連する血管疾患の処置のために使用することもできる

10

20

30

40

50

。

【 0 1 1 7 】

本明細書に開示される血小板組成物を対象に投与することを含む、対象における血管疾患の処置方法が、本明細書にて開示される。これらの実施形態では、血小板は、血管疾患、例えば凝固障害または冠動脈再狭窄を処置するための薬物を送達する。例えば、薬物はヘパリンまたはドキソルビシンであり得る。

【 0 1 1 8 】

一態様では、
血小板細胞と、
化学的リンカー部分と、
治療剤と、
を含む治療上有効量の組成物を、それを必要とする対象に投与することを含み、
治療剤が、化学的リンカー部分を介して血小板細胞に共有結合している、血管疾患を治療または予防する方法が、本明細書に提供される。

10

【 0 1 1 9 】

一実施形態では、化学的リンカー部分は、マレイミドリンカー、PEGリンカー、PAS化、及びHES化から選択される。一実施形態では、化学的リンカー部分は、マレイミドリンカーである。

【 0 1 2 0 】

一実施形態では、血小板細胞は、ヒト血小板細胞である。一実施形態では、血小板細胞は、自己由来の血小板細胞である。

20

【 0 1 2 1 】

一実施形態では、血管疾患は、組織損傷、炎症、または心血管疾患である。一実施形態では、組成物は、追加の治療剤と組み合わせて投与される。

【 0 1 2 2 】

いくつかの実施形態では、血小板組成物は、血管疾患、例えば凝固障害または冠動脈再狭窄を治療または予防するための治療剤の送達をターゲットとすることができる。

【 0 1 2 3 】

例えば、いくつかの場合、治療剤は、Adcirca (タダラフィル)、Adempas (リオシグアト)、Agrimol (アナグレリド HCL)、Angiomax (ビバリルジン)、Atacand (カンデサルタンシレキセチル)、Atryn (再構成用アンチトロンビン組換え凍結乾燥粉末)、Azor (アムロジピンベシレート; オルメサルタンメドキシミル)、Baycol (セリバスタチンナトリウム)、Bidil (イソソルビドジニトレート/ヒドララジン塩酸塩)、Brilinta (チカグレロル)、Caduet (アムロジピン/アトルバスタチン)、カプトプリル、Cardizem (R) (注射用ジルチアゼムHCL) Monvial (R)、Cellcept、Cleviprex (クレビジピン)、Corlanor (イバブラジン)、Corlopam、Corvert Injection (イブチリドフマレート注射液)、Covera-HS (ベラパミル)、Crestor (ロスバスタチンカルシウム)、ジルチアゼムHCL、Diovan (バルサルタン)、ドキソルビシン、Dynacirc CR、Edarbi (アジルサルタンメドキシミル)、Edarbyclor (アジルサルタンメドキシミル・クロルタリドン)、Efiel (プラスグレル)、Eliquis (アピキサバン)、Entresto (サクビトリル・バルサルタン)、Epanova (オメガ-3 - カルボン酸)、フェノフィブラート、ヘパリン、Innohep (チンザパリンナトリウム) 注射液、Integrilin、Juxtapid (ロミタピド)、Kengreal (カングレロル)、Kynamro (ミボメルセンナトリウム)、Lescol (フルバスタチンナトリウム)、Lescol (フルバスタチンナトリウム) カプセル、Rx、Letairis (アンブリセンタン)、Levitra (バルデナフィル)、Lexxel (エナラプリルマレート - フェロジピンER)、Lipitor (アトルバスタチンカルシウム)、Liptruzet (エゼチミブ・アトルバスタチン)、Liva

30

40

50

lo (ピタバスタチン)、Mavik (トランドラプリル)、Micardis (テルミサルタン)、Micardis HCT (テルミサルタン・ヒドロクロロチアジド)、Microzide (ヒドロクロロチアジド)、Multaq (ドロネダロン)、Natrecor (ネシリチド)、Niaspan、Normiflo、Nymalize (ニモジピン)、Opsumit (マシテンタン)、ペントキシフィリン、Pindolol、Plavix (クロピドグレルバイサルフェート)、Plavix (クロピドグレルバイサルフェート)、Posicor、Pradaxa (ダビガトランエテキシラートメシレート)、Pravachol (プラバスタチンナトリウム)、Pravachol (プラバスタチンナトリウム)、Prestalia (ペリンドプリルアルギニン・アムロジピンベシレート)、PrinivilまたはZestril (リシノプリル)、ProAmatine (ミドドリン)、Ranexa (ラノラジン)、Remodulin (トレプロスチニル)、ReoPro、REPRONEX (注射液用メノトロピン、USP)、Retavase (レテプラゼ)、Rythmol、Savaysa (エドキサバン)、Soliris (エクリズマブ)、Teczem (エナラプリルマレエート/ジルチアゼムマレート)、Tekamlo (アリスキレン+アムロジピン)、Tekturna (アリスキレン)、Teveten (エプロサルタンメシレート+ヒドロクロロチアジド)、Teveten (エプロサルタンメシレート)、Tiazac (ジルチアゼム塩酸塩)、Tiazac (ジルチアゼム塩酸塩)、Tiazac (ジルチアゼム塩酸塩)、Toprol-XL (メトプロロールサクシネート)、Tribenzor (オルメサルタンメドキシミル+アムロジピン+ヒドロクロロチアジド)、Tricor (フェノフィブラート)、Trilipix (フェノフィブリン酸)、Tyvaso (トレプロスチニル)、Varithena (ポリドカノール注射泡剤)、Vascepa (イコサベントエチル)、Visipaque (イオジキサノール)、Xarelto (リバーロキサバン)、Xarelto (リバーロキサバン)、Zocor、Zontivity (ボラバキサル) からなる群から選択することができる。

10

20

【0124】

リンカー

共有結合アプローチを、化学的リンカーを介して血小板を修飾するために用いることができる。化学的リンカーを使用する利点の1つは、遺伝的变化の必要性が回避されることである。このような二官能性化学的リンカーは、治療剤を血小板細胞に連結することができる。二官能性リンカー基の例には、これらに限定されないが、糖、アミノ酸、アミノアルコール、カルボキシアアルコール、アミノチオールなどのような部分が含まれる。

30

【0125】

いくつかの実施形態では、化学的リンカー部分は、マレイミドリンカー、PEGリンカー、PAS化、及びHES化から選択される。一実施形態では、化学的リンカー部分は、マレイミドリンカーである。

【実施例】

【0126】

以下の実施例は、開示された主題による組成物、方法、及び結果を例示するために以下に記載される。これらの実施例は、本明細書に開示された主題の全態様を含むことを意図するものではなく、むしろ代表的な方法及び結果を例示することを意図している。これらの実施例は、当業者に明らかである本発明の均等物及び変形形態を除外することは意図されない。

40

【0127】

実施例1．術後がん免疫療法のためのチェックポイント阻害剤による血小板のin situ活性化

手術は、ほとんどの固形腫瘍に対する処置の主な選択肢である。外科的技術の継続的な改善にもかかわらず、腫瘍切除後の残存微小腫瘍及び/またはCTCは、依然として課題である¹⁻³。加えて、手術が、がん転移の促進を誘発し得ることもまた示唆されている^{4,5}。多くの患者は、術後に再発性疾患を発症し、これは重大な罹病率と死亡率につな

50

がるおそれがある。したがって、術後のがんの再発を防ぐための効果的な戦略構築に多大な関心が寄せられている。それらの中で、がん免疫療法は、近年非常に注目を集めている⁶。免疫療法剤は腫瘍を直接攻撃するのではなく、身体の免疫系を高めてがん細胞を殺す⁷。免疫チェックポイント遮断は、患者のサブセットにおいて長続きする抗腫瘍反応及び長期間の寛解を誘発した⁸⁻¹⁰。特に、チェックポイント阻害剤は、リンパ球上のプログラム細胞死タンパク質1(PD1)ならびに抗原提示細胞(APC)及び腫瘍細胞上のプログラム細胞死リガンド1(PDL1)の相互作用を遮断し、様々な種類のがんの処置において刺激的な結果を示した¹¹⁻¹⁴。さらに、最初のPD-L1阻害剤であるアテゾリズマブが、最近、米国食品医薬品局(FDA)から迅速承認を受けた¹⁵。著しい進歩にもかかわらず、チェックポイント遮断療法の現在の方法は、多くの患者において治療効果が制限される。臨床試験で観察された最大の制限は、自己免疫疾患などの副作用の重篤度であり得る¹⁶⁻¹⁸。免疫チェックポイント遮断療法で治療した場合、グレード3/4の有害事象が時々発生している^{15, 19}。その一方で、大多数の患者は、これらの薬剤に反応しなかった^{8, 10, 15}。抗PD療法の客観的奏効率には、依然として改善が必要である。抗PD療法をどのように強化するかは、がん免疫学及び免疫療法の分野における中心的テーマの1つとなっている^{6, 11}。

【0128】

抗PD療法の損なわれた処置有効性を説明し得る1つのメカニズムは、静脈内注入された際の正常組織に対するオフターゲット抗体である^{16, 18, 20, 21}。このような状況では、今後のがん免疫療法は、免疫系の全身的活性化よりもむしろ腫瘍部位に特に注目することが望ましい²⁰。さらに、制限された有効性はまた、不十分な腫瘍リンパ球浸潤及びT細胞炎症性腫瘍の微小環境(抗PD療法による臨床的效果に正に関連するPDL1のより高度な発現を含む)に起因し得る²²⁻²⁵。

【0129】

細胞ベースシステムは、赤血球、バクテリアゴースト、ならびに遺伝子操作された幹細胞及び免疫細胞を含む、生物学的薬物担体として最近登場した。^{26, 27}それらの中で、血小板は、巨核球から放出される無核細胞断片であり、止血におけるそれらの機能について最もよく知られている²⁸⁻³¹。循環血小板の平均寿命は8~9日であり^{27, 32}、これは静脈内注射された治療薬の薬物動態を大きく改善し得る。さらに、輸血された血小板は、残存腫瘍が術後に残る可能性がある外科的創傷部位へと遊走し得る³³。他方では、血小板が、原発腫瘍から血管系に流れ込み、そして転移をもたらしたCTCを認識及び相互作用する能力を有するという新たな証拠が示されている³⁴⁻³⁶。血小板を利用して、aPDL1は、治療薬のオフターゲット効果を低減しながら、術後のがん細胞を標的とすることができる。これらの固有の創傷及びCTC向性特性に加えて、血小板はまた、多くの炎症状態を惹起及び改善する免疫「細胞」と考えられる³⁷⁻³⁹。血小板由来ケモカインは、T細胞及び他の免疫細胞を動員して目覚めさせる。可溶性CD40L(sCD40L)の主な供給源として、血小板は、T細胞免疫を高めることができ、樹状細胞(DC)の成熟、及び免疫グロブリンGの産生のためのB細胞アイソタイプスイッチングを誘導するために必要である⁴⁰。PDL1及びPDL2が炎症に応答して上方制御され、これによりPDL1陽性腫瘍がもたらされ、その腫瘍は抗PD療法に対してより感受性が高く、潜在的にORRを改善することもまた報告されている⁴¹⁻⁴²。

【0130】

この実施例では、術後の腫瘍の再発を防ぐために抗PDL1(aPDL1)を血小板の表面に負荷した(図1a)。驚くべきことに、本発明者らは、非活性化血小板へのaPDL1の結合が非常に安定であると同時に、aPDL1の放出が血小板の活性化時に著しく促進され得ることを見出した。したがって、aPDL1放出は、活性化血小板の原形質膜から生成される血小板由来マイクロ粒子(PMP)に起因し得る⁴³。このような構造的変化は、aPDL1がAPC及び腫瘍細胞に結合するのを促進することができる。原発腫瘍の切除後、B16黒色腫及び4T1乳癌腫瘍保持マウスへのaPDL1コンジュゲート血小板(P-aPD1)の静脈内注射により、aPDL1が残存微小腫瘍を有する手術床

10

20

30

40

50

及び血中のCTCに向かって輸送及び蓄積するのを、血小板が助けることができることが示された。T細胞炎症性腫瘍微小環境はまた、腫瘍部位でのPD-L1発現の増加と共に、活性化時の血小板によっても生じた。その間、aPD-L1は、免疫細胞及び腫瘍細胞上のPD-L1を遮断するために、血小板活性化後に放出され得る。これらの結果は、血小板が、標的化放出及び制御放出様式で治療剤（例えば、aPD-L1）を送達するための担体として機能することができ、術後のがんの再発を予防することができることを示す。

【0131】

aPD-L1で装飾された操作された血小板

共有結合アプローチを用いて、二官能性マレイミドリンカーを介してaPD-L1により血小板を扱いやすいように修飾し、遺伝子改変の必要性を回避する⁴⁴。血小板へのaPD-L1の結合を、免疫蛍光法によって調べた（図6）。加えて、マレイミド不含aPD-L1は、血小板に対してわずかな非特異的結合を示した（図7）。酵素結合免疫吸着法（ELISA）は、血小板が、血小板あたり最大約0.3pgまでaPD-L1と容易に結合できることを示した（図8a）。血小板あたり0.1pg及び0.2pgのaPD-L1を結合しても、これらの生存力に有意な影響を及ぼさないこともまた見出された（図8b）。このような共有結合は非常に安定であり、2日以内に有意な放出を示さなかった（図8c）。さらに、細胞接着及び遊走を調節する血小板のいくつかの表面タンパク質を調べた（図9）。まとめると、aPD-L1とのコンジュゲーションは、これらの血小板細胞に著しい損傷を生じなかった。

【0132】

血小板の活性化は治療薬の放出を促進する

血小板の活性化は、接着が起こった後に生じる⁴⁵。血小板は、免疫機能を持つ多くの分子を含む約60の顆粒を含有する³⁸。活性化すると、これらの顆粒は、それらの内包物質を細胞外環境に放出する。これらの内容物の多くは免疫分子としての役割を果たす。例えば、これらは他の免疫細胞を動員して活性化し、T細胞の遊走を誘導し、単球のDCへの分化を増加させることができる。加えて、PMPは、血小板活性化時に原形質膜から誘導され⁴³、活性化血小板は、接着分子及びケモカインを運ぶPMPを放出し、PMP沈着部位での単球捕捉を促進する⁴⁶。aPD-L1修飾血小板（P-aPD-L1）が刺激時に活性化され得るかどうかを調査するために、トロンピンを使用して*in vitro*でP-aPD-L1を活性化した。活性化前後のP-aPD-L1の透過型電子顕微鏡（TEM）画像の観察から、大量の生成されたPMPが電子顕微鏡下で検出された（図1b、図10）。血小板の樹状かつ広がった形態変化もまた観察された。さらに興味深いことに、活性化血小板からのaPD-L1の顕著な放出が、ELISAアッセイによってモニターされた（図1c）。顕著なaPD-L1放出は、血小板活性化時の原形質膜からの解離したPMPに起因するとした。この仮説を試験するために、活性化P-aPD-L1の免疫蛍光イメージングを実施した。血小板をカルセインで染色し、aPD-L1を蛍光二次抗体で染色した（図11）。血小板の活性化後、aPD-L1がPMP上に存在することが検出された。

【0133】

注目すべきことに、いくつかの炎症誘発性サイトカインもまた、活性化時にaPD-L1と共に放出された（図1d~e）。PMP生成による血小板からのaPD-L1の放出をさらに調べるために、トランスウェル培養システムを導入した。aPD-L1コンジュゲート血小板をトランスウェル培養システムの上部区画で培養し、一方、B16がん細胞を下部区画で増殖させた（図12）。インサート膜の微小孔は1µmの直径を有し、PMPが膜を自由に横切ることを可能にした。免疫染色の12時間前に、B16がん細胞を非活性化血小板及び活性化血小板と同時インキュベートした。図1f及び図12に示されるように、血小板が活性化されると、aPD-L1は、がん細胞の膜に結合することが見出された。非活性化血小板とインキュベートされたがん細胞に関しては、下部区画のがん細胞でほとんどシグナルが検出されなかった。まとめると、当該データは、aPD-L1が、活性化血小板から放出され、がん細胞に結合し得ることを示す。

【0134】

再発腫瘍に対する *in vivo* P - aPDL1 療法

血小板表面への aPDL1 の結合は、それらの *in vivo* 挙動を変える可能性を有する。したがって、全身投与後の P - aPDL1 の *in vivo* 薬物動態を健康なマウスで評価した。aPDL1、P - aPDL1、及び同時注射の非コンジュゲート血小板 + a - PDL1 を、同等の aPDL1 用量でマウスに静脈内注射した。血液からの aPDL1 の ELISA 分析は、遊離 aPDL1 (5 . 2 時間) 及び混合物 (5 . 5 時間) と比較して、血小板に結合した aPDL1 については非常に長期間の血液循環半減期 (34 . 8 時間) が達成されたことを示した (図 2 a)。臨床における治療用抗体と比較して比較的短い血液循環時間は、ラット抗マウス IgG のより高い免疫原性及び非特異的結合に起因する。手術により原発腫瘍を不完全に切除した後、それらの創傷向性能を試験した。aPDL1 を Cy5 . 5 によって標識し、次いで血小板にコンジュゲートした。ex vivo 蛍光イメージングのために主要な臓器を収集して、P - aPDL1 または遊離 aPDL1 の注射の 2 時間後に *in vivo* 蛍光イメージングを実施した (図 13)。血小板にコンジュゲートした場合、aPDL1 は、残存腫瘍を有する外科的創傷付近に豊富に存在していたが、遊離 aPDL1 の創傷部位では顕著な蛍光シグナルが検出されなかった (図 2 b)。主要な臓器、及び残存微小腫瘍を有する創傷の ex vivo イメージングにより、P - aPDL1 の創傷向性能がさらに確認された (図 2 c、図 13)。圧倒的な aPDL1 蛍光シグナルが、遊離 aPDL1 を注射したマウスの肝臓で検出されたのに対し、P - aPDL1 は、同じ aPDL1 用量で、遊離 aPDL1 を注射したマウスからのシグナルよりも著しく低い aPDL1 シグナルを肝臓で示した。このことは、P - aPDL1 の血液循環時間がより長いことを示す。その一方で、顕著な強い aPDL1 シグナルが、残存微小腫瘍を有する外科的創傷付近で検出されたのに対し、遊離 aPDL1 に関連する試料では顕著な蛍光シグナルが検出されなかった。蛍光シグナルの定量化により、静脈内注射の 2 時間後、P - aPDL1 の創傷での蓄積が、遊離 aPDL1 のものと比較して、9 . 4 倍超効果的であることが示された (図 2 d)。微小腫瘍切片の共焦点画像により、血小板上にコンジュゲートされた場合に、aPDL1 の腫瘍取り込みが顕著に増加することがさらに確認された (図 2 e、図 14 a)。さらに、血小板から放出された aPDL1 は、蛍光イメージングによって *in vivo* で明らかに観察された (図 14 b)。修飾血小板の止血効果もまた調べた。輸血後のマウス尾部出血時間により、P - aPDL1 処置マウスは、未処置の血小板の輸血で処置したマウスと比較して、出血時間に統計学的に有意な差がないことが示された (図 15)。

【0135】

in vivo で炎症誘発性環境を調査するために、手術部位におけるサイトカインレベルを評価した。原発腫瘍を外科的に除去した後、マウスに血小板を静脈内注射した。2 時間後、創傷組織を集め、培地で 24 時間培養した。次いで、創傷組織の培地をサイトカインの活性について試験した。IL - 1 β 、IL - 6、TNF - α 、及び sCD40L のレベルは、全て、未処置の対照マウス及び創傷を有するマウスのものと比較して、明らかな上昇を示すことが見出された (図 16 a)。血清のサイトカインもまた試験した。興味深いことに、血小板は、血清中のこれらの炎症誘発性サイトカインの分泌を誘導しなかった (図 16 b)。これらの結果は、全身性炎症よりもむしろ局所的炎症環境が、血小板注射により誘発され得ることを示している。局所的炎症誘発性環境は、腫瘍部位で静止前駆リンパ球を活性化リンパ球に変換することによって、aPDL1 免疫療法に寄与する⁴⁷。加えて、腫瘍部位における PDL1 発現もまた調査した。血小板誘導性炎症負荷は、腫瘍浸潤免疫細胞及び腫瘍細胞の PDL1 発現を上方制御し得ることが見出された (図 16 c ~ d)。腫瘍内の PDL1 陽性細胞の増加は、抗 PDL1 免疫療法をさらに増強し、ORR を向上させることができる。^{41, 42}

【0136】

術後に残った残存微小腫瘍を処置するために、B16F10 マウス黒色腫不完全腫瘍切除モデルを使用して、術後性の局所再発を模倣した (図 2 f)。外科的に大部分の腫瘍を

10

20

30

40

50

切除した後（約99%）、マウスに、単回用量のPBS、血小板、aPDL1またはP-aPDL1（aPDL1 = 1 mg / kg）を静脈内注射した。腫瘍増殖をB16F10細胞の生物発光シグナルによってモニターした。P-aPDL1を投与されたマウスが、最小の再発性腫瘍の体積を示したことが示された。8匹のマウスのうち6匹が、検出可能な腫瘍なく、強い反応を示した。一方で、遊離aPDL1処置マウスは、腫瘍増殖のわずかな遅延を示したが、手術床での腫瘍の再発は妨げなかった。血小板のみで処置したマウスにおける腫瘍の再発の予防は、PBS対照のものと同様の効果を示した（図2g~h）。マウスにおける腫瘍のサイズもまた、それらの生存と相関していた。マウスの約75%が、P-aPDL1による処置後60日生存した。対照的に、全ての対照群で、いずれのマウスも60日後に生存しなかった（図2i）。

10

【0137】

P-aPDL1療法によって引き起こされるT細胞媒介性免疫応答

加えて、再発腫瘍からの腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を採取し、16日目に免疫蛍光法及びフローサイトメトリーによって分析した。免疫蛍光染色は、対照群の残存腫瘍が、T細胞浸潤を制限していることを明らかにした。対照的に、P-aPDL1処置マウスの残存腫瘍は、CD8+及びCD4+T細胞の両方によって著しく浸潤されていた（図3a、図17）。腫瘍重量は、10日目のP-aPDL1処置マウスにおいて有意に低く（図3b）、これはまた、残存腫瘍におけるCD3+細胞の絶対数の増加に対応した（図3c）。より顕著なことには、CD8+T細胞の絶対数/腫瘍グラムは、PBS対照と比較してP-aPDL1処置マウスにおいてほぼ10倍増加し、遊離aPDL1処置マウスに対して3倍増加した（図3d~f）。加えて、腫瘍浸潤CD4+FoxP3+T細胞を調べた（図3e）。Tエフェクター細胞対制御性T（Treg）細胞の腫瘍内比率は、P-aPDL1療法後のマウスにおいて有意に高まった（図3f-h）。加えて、細胞周期関連タンパク質Ki67の発現によって測定されるように、P-aPDL1マウスの腫瘍内でのCD8+及びCD4+エフェクターT細胞の高増殖が観察された。エフェクターT細胞とは対照的に、P-aPDL1療法を用いた腫瘍浸潤Treg細胞による増殖の有意な増加はなかった（図18）。総合すれば、これらの観察結果は、P-aPDL1が、aPDL1を腫瘍微小環境に効果的に送達し、強固かつT細胞媒介性の抗腫瘍免疫応答を引き起こすことができることを示している。

20

【0138】

転移性疾患に対するP-aPDL1療法

CTCの処置に対するP-aPDL1の効力をさらに示すために、P-aPDL1が、まず、術後にマウスにB16F10細胞を静脈内注射することによって、実験的転移腫瘍モデルで試験され、これはCTCが原発腫瘍から血液循環へ逃げるのを模倣した（図4a、図19）⁴⁸。手術直後に、マウスに、単回用量のPBS、血小板、aPDL1（aPDL1 = 1 mg / kgまたは2 mg / kg）またはP-aPDL1（aPDL1 = 1 mg / kg）を静脈内注射した。マウスにおけるB16F10細胞の生物発光シグナル（図4b、図19）によれば、遊離aPDL1処置により転移癌を予防することができたが、手術部位での局所的な腫瘍の再発は、2 mg / kgの高用量であっても予防できなかったことが示された。これは、おそらく、aPDL1の蓄積が術後のそれらの残存微小腫瘍に対して不十分なためである（図13）。対照的に、肺全体の写真とそれらのヘマトキシリン及びエオシン（H&E）染色イメージング（図4c~d）ならびに肺組織の蛍光イメージング（図20）によって確認されるように、手術床での腫瘍の再発及び肺転移が、P-aPDL1治療後に著しく減少した。肺における転移部位の平均数は、P-aPDL1で処置した場合に劇的に減少した（図4e）。さらに、処置マウスの生存期間は、対照群と比較して有意に増加した（図4f）。遊離aPDL1と比較したP-aPDL1のより良好な抗癌効果は、がん細胞周辺の抗体の局所濃度の増加に部分的に起因していた（図13）。その一方で、血小板活性化はまた、抗癌効果の機能的要素でもあった。活性化により、コンジュゲートされたaPDL1を放出することができただけでなく、他の多くの免疫細胞を動員してTMEに浸潤させるのにも役立つことができたためである。PDL1遮断に

30

40

50

より、これらの免疫細胞が強力な抗癌免疫反応を誘導し得る。

【0139】

P - a P D L 1 の *i n s i t u* 活性化が、抗癌効果に寄与したかどうかをさらに確認するために、P M P を収集し、a P D L 1 で修飾した (図 19)。これらのマイクロ粒子を直接注射すると、そのままの血小板と比較して抗癌効果が制限され、遊離 a P D L 1 よりもさらに優れていないことが明らかに示された (図 4)。このことは、循環への導入後に P M P が迅速に除去される可能性があることを確認した従来の研究によって説明され得る^{49, 50}。これらの結果は、腫瘍部位における P - a P D L 1 の *i n s i t u* 活性化が、P - a P D L 1 の抗癌効果を増強するための必須の構成要素であることを実証した。

10

【0140】

術後の 4 T 1 再発癌に対する P - a P D L 1

別の種類の癌の術後の再発防止における P - a P D L 1 の効力を評価するために、トリプルネガティブ乳癌 (T N B C) 4 T 1 癌腫瘍モデルで試験を実施した。この実験では、B A B L / c マウスに 4 T 1 腫瘍細胞を皮下 (s . c .) 注射した。皮下に腫瘍を接種した 14 日後、原発腫瘍を手術で切除し、残存微小腫瘍を約 1 % 残した。a P D L 1 と結合した治療用血小板を手術直後にマウスに静脈内注射した。このモデルでは、1 コースの P - a P D L 1 療法が、術後の残存腫瘍の増殖に影響を与えるのに十分意味があった (図 5 a - b)。加えて、遊離 a P D L 1 処置マウスに中央値 16 個の小結節ならびに血小板処置マウス及び未処置のマウスにおいて約 30 個の小結節が見られたのとは対照的に、P - a P D L 1 処置マウスの肺では、ほんのわずかな小結節しか見られなかったため、肺転移に対する治療の効果もまた印象的であった (図 5 c ~ d)。術後に P - a P D L 1 療法を受けたマウスは、対照群とは対照的に実質的な延命効果が得られた。マウスの 75 % が、腫瘍接種後 60 日生存した (図 5 e)。

20

【0141】

要約すると、この例は、a P D L 1 の送達促進のために血小板の *i n s i t u* 活性化を利用し、術後の残存腫瘍細胞を実質的に一掃し、癌の再発を予防することができる。P - a P D L 1 療法は、外科的処置の有効性を最大化することができ、原発腫瘍切除後の癌の再発及び転移のリスクを減少させることができる。a P D L 1 送達のための血小板の使用を超えて、この送達方法はまた、標的化送達及び治療剤の生体応答性放出のためにバイオ微粒子を応用する他の治療剤及び治療にも適用される⁵¹。

30

【0142】

方法及び材料

細胞株

マウス黒色腫細胞株 B 1 6 F 1 0 及びマウス乳癌細胞株 4 T 1 を、American Type Culture Collection から購入した。B 1 6 F 1 0 - l u c - G F P 及び 4 T 1 - l u c - G F P 細胞は、Chapel Hill の The University of North Carolina の Dr . Leaf Huang から贈与された。B 1 6 F 1 0 細胞は、10 % ウシ胎児血清 (Invitrogen, Carlsbad, CA)、100 U / m L のペニシリン (Invitrogen)、及び 100 U / m L のストレプトマイシン (Invitrogen) を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (Gibco, Invitrogen) 中で維持した。4 T 1 細胞は、10 % ウシ胎児血清 (Invitrogen, Carlsbad, CA)、100 U / m L のペニシリン (Invitrogen)、及び 100 U / m L のストレプトマイシン (Invitrogen) を添加した RPMI - 1640 培地 (Gibco, Invitrogen) 中で維持した。マスターセルバンク及びワーキングセルバンクを、受領後すぐに作製した。第 3 継代及び第 4 継代が、腫瘍実験に使用された。細胞は、マイコプラズマの可能性について 3 ヶ月毎に試験された。受領後、細胞の再認証は実施しなかった。

40

【0143】

マウス

50

C57BL/6マウス及びBALB/cマウスを、Jackson Lab (USA) から購入した。全ての実験を通じて、同齢の(6~10週)雌動物を使用した。全てのマウス研究は、Chapel Hillのthe University of North Carolina及びNorth Carolina State Universityの所内動物実験委員会(Institutional Animal Care and Use Committee)によって承認された動物プロトコルの範疇で実施した。実験群のサイズは、統計的検出力、実現可能性、及び倫理的側面のバランスをとるように定義された後、動物福祉に関する規制当局によって承認された。全てのマウスは、Chapel Hillのthe University of North Carolina及びNorth Carolina State Universityの動物実験に関する連邦及び州の方針にしたがって飼育された。

10

【0144】

抗体

in vivoで使用する抗PDL1抗体(aPDL1)を、Biolegend Incから購入した(Cat. #124329, Clone: 10F.9G2)。染色抗体には、製造元の指示にしたがって、蛍光活性化細胞選別(FACS)分析のために、CD3(Thermo Fisher Scientific, Cat. #A18644)、CD4(Thermo Fisher Scientific, Cat. #A18667)、CD8(Thermo Fisher Scientific, Cat. #A18609)、PD1(Biolegend, Cat. #135227)、CD11c(Biolegend, Cat. #117309)、PDL1(Biolegend, Cat. #124311)、CD20(Biolegend, Cat. #150411)、CD11b(Biolegend, Cat. #101211)、CD9(Biolegend, Cat. #124805)、CD41(Biolegend, Cat. #133905)、CD61(Biolegend, Cat. #104307)、CD62P(Biolegend, Cat. #148305)、CD40L(Biolegend, Cat. #106505)、細胞内Ki67(Biolegend, Cat. #652405)、及び細胞内Foxp3(eBioscience, Cat. #71-5775-40)が含まれた。染色細胞をCalibur FACS装置(BD)で分析し、FlowJoソフトウェア(バージョン10)を使用して分析した。ヤギ抗ラットIgG(H+L)二次抗体(Thermo Fisher Scientific, Cat. #A18866)、ウサギ抗ラットIgG(H+L)二次抗体(Thermo Fisher Scientific, Cat. #A18920)、ヤギ抗ラットIgG(minimal x-reactivity)抗体(Biolegend, Cat. #405408)を免疫染色に使用した。

20

30

【0145】

aPDL-1コンジュゲート血小板の調製

記載のように、マウス血小板を単離した。⁵² 手短に言えば、全血をC57BL/6(またはBALB/c)マウスから採取(眼窩静脈叢または伏在静脈からの非ターミナル採血、20匹のマウスを採血に使用)し、1.0mLのクエン酸-リン酸-デキストロース(16mM クエン酸、90mM ナトリウムシトレート、16mM NaH₂PO₄、142mM デキストロース、pH7.4)を含有するプラスチックシリンジに入れ、中断することなく、室温において20分間100gで回転させた。多血小板血漿(PRP)をトランスファーピペット(ワイドオリフィス)を使用して別のチューブに移し、PGE₁を各チューブに1μMの最終濃度まで添加した。(注意: PRPの色が赤みがかっている場合は、これらの試料を廃棄すること)。10分間800gで回転(中断なし)させることにより、血小板をPRPから単離した。血漿を廃棄し、血小板をタイロート緩衝液(134mM NaCl、12mM NaHCO₃、2.9mM KCl、0.34mM Na₂HPO₄、1mM MgCl₂、10mM HEPES、pH7.4)、またはPGE₁を含むPBS(1μMの最終濃度)に慎重にゆっくりと再懸濁させた(注意: チュ

40

50

ープの壁に沿ってゆっくりと緩衝液を流し、攪拌量を最小限に抑えること)。各 *in vivo* 注射には $500 \sim 600 \mu\text{L}$ の全血が必要であった。

【0146】

次いで、血小板の表面を、3ステップで *aPDL-1* によって官能化した。最初に、 $100 \mu\text{L}$ の血小板 (1×10^8) を、*PGE1* ($1 \mu\text{M}$) を含む $400 \mu\text{L}$ の *PBS* ($\text{pH} = 8$) に再懸濁し、室温 (*RT*) で30分間、トラウト試薬 (0.1 mg/mL) (2 -イミノチオラン、*Pierce*) とともにインキュベートした。30分反応させた後、余分なトラウト試薬を10分間 800 g で遠心分離により除去し、タイロード緩衝液 (*PGE1* ($1 \mu\text{M}$) を含む) で3回洗浄した (不要な血小板活性化を避けるために再懸濁せず)。その間、*aPDL-1* を *PBS* ($\text{pH} = 7.4$) 中のスルホスクシンイミジル-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 (*Sulfo-SMCC*, *Pierce*) と、 $1:1.2$ のモル比で、4 で2時間混合した。遠心濾過装置 (分子量カットオフ (*MWCO*) = 10 kDa) を使用して、余分な *Sulfo-SMCC* を除去して、*SMCC* 活性化抗体を精製した。最後に、血小板及び抗体をタイロード緩衝液 (*PGE1* ($1 \mu\text{M}$) を含む) 中で混合した。室温で2時間反応させた後、余分な抗体を遠心分離 (800 g で10分間) によって除去した。沈殿画分を保持し、タイロード緩衝液 (*PGE1* ($1 \mu\text{M}$) を含む) で2回洗浄した。血小板数分析に基づくと、結合後の血小板の回収は 80% より高かった。得られた *aPDL-1*-血小板は、使用するまでタイロード緩衝液 (*PGE1* ($1 \mu\text{M}$) を含む) に室温で保存した。非コンジュゲート血小板は、コンジュゲート血小板から分離しなかった。血小板への *aPDL-1* の最終コンジュゲート量を *ELISA* (*Rat IgG total ELISA kit*, *eBioscience*, *Cat. No. 88-50490-22*) によって測定した。新たに単離した血小板を6時間以内に使用した。血小板活性化マーカー *CD62P* を血小板活性化を評価するために使用した。全ての血小板操作は、室温で実施した。コンジュゲーション効率について調査するために、様々な量の *aPDL-1* をコンジュゲーションのために血小板に添加した。上清中で遠心分離することにより (800 g で10分間)、非コンジュゲート *aPDL-1* を除去した。次いで、沈殿した *P-aPDL-1* をタイロード緩衝液 (*PGE1* ($1 \mu\text{M}$) を含む) によって、2回遠心分離 (800 g で10分間) して洗浄した。その後、*P-aPDL-1* を $100 \mu\text{L}$ の脱イオン水に溶解し、細胞溶解のために超音波で処置して *aPDL-1* を放出させた。血小板への *aPDL-1* のコンジュゲート量を *ELISA* 分析によって測定した。血小板への *aPDL-1* コンジュゲーションの効率 (添加した *aPDL-1* / コンジュゲートした *aPDL-1*) は、血小板あたり 0.2 pg の *aPDL-1* を添加した場合に約 75% であった。 *aPDL-1* 修飾後の血小板の安定性を試験するために、0時間及び24時間における血小板数分析に基づいて *P-aPDL-1* の数を測定した。経時的な血小板に対する *aPDL-1* の安定性について調査するために、*P-aPDL-1* をタイロード緩衝液 (*PGE1* ($1 \mu\text{M}$) を含む) に室温で保存した。 $50 \mu\text{L}$ の *P-aPDL-1* を異なる時点で抽出した。上清中の放出された *aPDL-1* を遠心分離 (800 g で10分間) によって除去した。 *P-aPDL-1* を $100 \mu\text{L}$ の脱イオン水に溶解し、溶解のために超音波で処置して *aPDL-1* を放出させた。血小板への *aPDL-1* のコンジュゲート量を *ELISA* 分析によって測定した。血小板を活性化するために、 0.5 U/mL の *トロンビン* を血小板懸濁液に添加した。血小板活性化の前に *PGE1* を除去した。血小板を 37 で30分間、活性化した。

【0147】

PMP は、既に記載されているように血小板から調製した。⁵³ 実験前に、血小板濃縮物を *トロンビン* (2 U/mL) によって30分間活性化し、10分間 800 g で遠心分離し、*PMP* の豊富な上清を収集した。抗マウス *aIIb β 3* 抗体及び抗マウス *CD62P* (*Pセレクチン*) 抗体を使用したフローサイトメトリー分析により、上清を調べた。次に、*PMP* を上述のように *aPDL-1* と結合させた。結合効率及び安定性を *ELISA* によって調べた。

【0148】

10

20

30

40

50

透過型電子顕微鏡法 (TEM)

その後の調製ステップによる血小板の形状変化を回避するために、血小板を10%の緩衝ホルムアルデヒド溶液と混合することにより血小板の前固定を実施した。前固定の直後に、試料を室温において10分間800gで遠心分離した。上清の廃棄後、血小板を4で90分間、カコジル酸緩衝液、pH 7.2中の2.5%グルタルアルデヒドで固定した(活性化血小板については、上清もTEMイメージングのために収集した)。固定後、血小板を4において10分間800gで遠心分離することにより2回洗浄した。次いで、血小板を2%の酢酸ウラニル及びクエン酸鉛で5分間、順次染色し、次いで銅グリッドに移した。⁵⁴血小板のTEM画像を、80kVでJEOL 2000FX TEM装置によって得た。

10

【0149】

血小板からの抗PDL1及びサイトカインの放出

P-aPDL1を活性化するために、0.5Uのトロンビン/mLをP-aPDL1(500µLのタイロド緩衝液中に約 1×10^8 の血小板、 $n = 3$)懸濁液に37で30分間添加した。50µLのP-aPDL1を異なる時点で抽出した。上清中の血小板から放出されたaPDL1及びサイトカインを、10分間800gで遠心分離することにより収集した。非活性化P-aPDL1を対照とした。上清溶液中の放出されたaPDL1及びサイトカインの量をELISAアッセイによって測定した。(eBioscience, Cat. No. 88-50490-22 (rat IgG)、88-7013-22 (IL1β)、88-7064-22 (IL6)、88-7324-22 (TNF-α)、BMS6010 (sCD40L))。吸光度は、Infinite (登録商標) 200 PROプレートリーダーで読み取った。

20

【0150】

in vivo 薬物動態

3匹のマウスに、遊離aPDL1、P-aPDL1または非コンジュゲート血小板+aPDL1混合物(各マウスにつき、200µLのPBS中のaPDL1、2mg/kg、血小板、 2×10^8)を静脈内注射した。抗凝固チューブを使用して、異なる時点で尾から10µLの血液を抽出した。各試料を100µLの水(Sigma, Cat. No. W4502)に溶解し、細胞溶解のために超音波で処置してコンジュゲートaPDL1を放出させた。aPDL1をRat IgG total ELISA kit (eBioscience, Cat. No. 88-50490-22)によって測定した。in vivo体内分布調査のために、約1%の残存組織を残して原発腫瘍を除去した後、マウスにCy5.5標識した遊離aPDL1またはP-aPDL1を静脈内注射した。in vivo蛍光画像をIVISシステム(付属のCy5.5用の励起/発光フィルターを用いて、露光時間、1秒)により記録した。ex vivoイメージングのために、処置マウスを注射の2時間後に殺した。主要臓器及び組織を収集し、IVISイメージングシステム(付属のCy5.5用の励起/発光フィルターを用いて、露光時間、1秒)(Perkin Elmer Ltd)で撮像した。

30

【0151】

in vivo 腫瘍モデル

癌の再発に対する効果を測定するために、7日後、 1×10^6 の、B16F10(または4T1)またはルシフェラーゼタグ付きB16F10(または4T1)腫瘍細胞のいずれかを、マウスの右側腹部に移植した(腫瘍は約300mm³に達する)。手術床内の残存微小腫瘍を模倣するために、約1%の残存組織を残して腫瘍を切除した³。簡単に記せば、動物を、チャンバー導入によるイソフルラン(維持1~3%、導入最大5%)麻酔で麻酔し、ノーズコーンを介して維持した。腫瘍領域を留め、無菌的に準備した。滅菌器具を使用して、腫瘍の約99%を切除した。創傷をAutoclip Wound Clip Systemによって閉じた。実験的転移モデルのために、200µLのPBS中の 1×10^5 のルシフェラーゼタグ付きB16F10(または4T1)腫瘍細胞を、原発腫瘍の切除後、尾静脈を介してマウスに静脈内注入した。マウスの体重を量り、異なる群に

40

50

ランダムに分けた ($n = 8$)。手術後、マウスに異なる薬物製剤をその直後に静脈内注射した (マウスあたり $200 \mu\text{L}$ の PBS 中に $\text{aPDL1} = 1 \text{ mg/kg}$ 、 $1 \sim 2 \times 10^8$ の血小板) (ここで使用した新たに調製した血小板は、健康なマウスの同じ系統から収集した)。腫瘍負荷をがん細胞の生物発光シグナルによってモニターした。イメージングの前に、マウスを留め、除毛クリームを使用して剃毛した。IVIS Lumina imaging system (Caliper, USA) を使用して画像を撮影した。腫瘍はまた、デジタルノギスでも測定された。腫瘍体積 (mm^3) は、 $(\text{長径} \times \text{短径}^2) / 2$ として計算された。転移負荷を生物発光により評価した。肺の重さを量り、微小転移を数えた。動物は、健康障害の徴候を示した場合、または腫瘍の体積が 2 cm^3 を超えた場合、安楽死させた。

10

【0152】

図5cの転移性肺腫瘍については、標準的なプロトコルにしたがって、インディアインクを使用して肺転移をよりよく可視化した。⁵⁵ マウスを殺し、気管内インク (85 ml の H_2O 、 15 ml のインク、2滴のアンモニア水) 注射及び Fekete 溶液 (5 ml の 70% エタノール、 0.5 ml のホルマリン、及び 0.25 ml の氷酢酸) での固定後、腫瘍負荷を非盲検で定量した。2~6時間後、腫瘍病変は漂白されたが、正常な肺組織は染色されたままだった。

【0153】

加えて、腫瘍を処置後にマウスから切り出し、免疫蛍光染色のために最適切断培地 (O.C.T.) 中で急速凍結した。蛍光標識二次抗体を使用して、 aPDL1 及び血小板または PMP を検出した。H&E 染色のために、肺腫瘍を有する動物を分析のために殺した。肺組織切片を、標準的なプロトコルにしたがって H&E で染色した。全ての H&E 染色切片を Leica 顕微鏡 (Leica DM5500 B) で調べた。

20

【0154】

サイトカイン検出

$\text{IL-1}\beta$ 、 IL-6 、 $\text{TNF-}\alpha$ 、及び sCD40L の局所レベル及び血漿レベルを ELISA (eBioscience) によって測定した。創傷における異なるサイトカインの濃度を測定するため、血小板注射の6時間後、創傷組織を収集し、37℃で12時間培養した。分析のために、 $100 \mu\text{L}$ の培地を除去し、 -80°C で凍結した。血漿中のサイトカインレベルを測定するため、血小板注射の6時間後、分析のために、種々の処置後にマウスから血漿試料を単離し、希釈した。 $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-6 、 $\text{TNF-}\alpha$ 、及び sCD40L の濃度を ELISA (Thermo Scientific) によって測定した。全ての測定を3回実施した。

30

【0155】

共焦点顕微鏡

腫瘍をマウスから切り出し、O.C.Tで急速凍結した。クリオトームを使用して、いくつかのマイクロメートル切片を切断し、スライド上に載せた。切片を氷冷アセトン中で10分間固定した後、PBSで再水和した。BSA (3%) でブロッキング後、切片を一次抗体によって4℃で一晩染色した。蛍光標識二次抗体の添加後、スライドを、共焦点顕微鏡 (Zeiss LSM 710) を使用して分析した。

40

【0156】

in vivo 生物発光と撮像

生物発光画像を、IVIS Spectrum Imaging System (Perkin Elmer Ltd) によって収集した。DPBS (15 mg/mL) 中の d-ルシフェリン (Thermo Scientific (商標) Pierce (商標), Cat #PI88291) を、動物に腹腔内注射 ($10 \mu\text{L/g}$ 体重) した10分後に、Living Image ソフトウェア (Perkin Elmer Ltd) を使用してデータを取得した。生物発光撮像のための露光時間は5分であった。(読み取り時間を最適化するため、IVIS Imaging System を使用して1分間の露光時間で生物発光強度を30分間得た。) 関心領域 (ROI) は、平均放射輝度 (カラーバーで

50

表される光子 $\text{秒}^{-1} \text{cm}^{-2} \text{sr}^{-1}$)として定量化された (I V I S L i v i n g I m a g e 4 . 2) 。

【 0 1 5 7 】

尾部出血アッセイ

尾部出血時間を、末端マウス尾部の先端から3mmを取り除き、直ちに尾部を37℃のPBSに浸すことによって測定した。出血の完全な停止を出血時間のエンドポイントとして定義した。

【 0 1 5 8 】

統計分析

全ての結果は、明記されるように平均値 $\pm$ s.d.、平均値 $\pm$ s.e.m.として表す。特に明記しない限り、生物学的反復実験を全ての実験で使用した。一元配置分散分析 (A N O V A) を3つ以上の群を比較した場合に実施し、有意 (P 0 . 0 5) と判定された場合、T u k e y の事後検定を使用して多重比較を実施した。延命効果はログランク検定により測定した。全ての統計分析は、G r a p h P a d P r i s m (5 . 0) によって実施した。* P 0 . 0 5、** P 0 . 0 1、*** P 0 . 0 0 1。動物実験または他の実験のための試料サイズを予め決定するための統計学的手法は使用しなかった。

【 0 1 5 9 】

参考文献

1 . B a k e r , D . , M a s t e r s o n , T . , P a c e , R . , C o n s t a b l e , W . & W a n e b o , H . T h e i n f l u e n c e o f t h e s u r g i c a l w o u n d o n l o c a l t u m o r r e c u r r e n c e . S u r g e r y 1 0 6 , 5 2 5 - 5 3 2 (1 9 8 9) .

2 . L u k i a n o v a - H l e b , E . Y . e t a l . I n t r a o p e r a t i v e d i a g n o s t i c s a n d e l i m i n a t i o n o f r e s i d u a l m i c r o t u m o r s w i t h p l a s m o n i c n a n o b u b b l e s . N a t . N a n o t e c h n o l . (2 0 1 6) .

3 . S t e p h a n , S . B . e t a l . B i o p o l y m e r i m p l a n t s e n h a n c e t h e e f f i c a c y o f a d o p t i v e T - c e l l t h e r a p y . N a t . B i o t e c h n o l . 3 3 , 9 7 - 1 0 1 (2 0 1 5) .

4 . D e m i c h e l i , R . , R e t s k y , M . , H r u s h e s k y , W . , B a u m , M . & G u k a s , I . T h e e f f e c t s o f s u r g e r y o n t u m o r g r o w t h : a c e n t u r y o f i n v e s t i g a t i o n s . A n n . O n c o l . , m d n 3 8 6 (2 0 0 8) .

5 . C e e l e n , W . , P a t t y n , P . & M a r e e l , M . S u r g e r y , w o u n d h e a l i n g , a n d m e t a s t a s i s : R e c e n t i n s i g h t s a n d c l i n i c a l i m p l i c a t i o n s . C r i t . R e v . O n c o l . H e m a t o l . 8 9 , 1 6 - 2 6 (2 0 1 4) .

6 . K l e v o r n , L . E . & T e a g u e , R . M . A d a p t i n g C a n c e r I m m u n o t h e r a p y M o d e l s f o r t h e R e a l W o r l d . T r e n d s I m m u n o l . (2 0 1 6) .

7 . O ' S u l l i v a n , D . & P e a r c e , E . L . T a r g e t i n g T c e l l m e t a b o l i s m f o r t h e r a p y . T r e n d s I m m u n o l . 3 6 , 7 1 - 8 0 (2 0 1 5) .

8 . R o b e r t , C . e t a l . P e m b r o l i z u m a b v e r s u s I p i l i m u m a b i n A d v a n c e d M e l a n o m a . N . E n g l . J . M e d . 3 7 2 , 2 5 2 1 - 2 5 3 2 (2 0 1 5) .

9 . P o s t o w , M . A . e t a l . N i v o l u m a b a n d i p i l i m u m a b v e r s u s i p i l i m u m a b i n u n t r e a t e d m e l a n o m a . N . E n g l . J . M e d . 3 7 2 , 2 0 0 6 - 2 0 1 7 (2 0 1 5) .

1 0 . S h a r m a , P . & A l l i s o n , J . P . T h e f u t u r e o f

10

20

30

40

50

immune checkpoint therapy. *Science* 348, 56-61 (2015).

11. Wang, C., Ye, Y., Hochu, G.M., Sadeghiifar, H. & Gu, Z. Enhanced Cancer Immunotherapy by Microneedle Patch-Assisted Delivery of Anti-PD1 Antibody. *Nano Lett.* 16, 2334-2340 (2016).

12. Zou, W., Wolchok, J.D. & Chen, L. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations. *Sci. Transl. Med.* 8, 328rv324 (2016).

13. Buchbinder, E.I. & Hodi, F.S. Melanoma in 2015: Immune-checkpoint blockade - durable cancer control. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 13, 77-78 (2016).

14. Smyth, E.C. & Cunningham, D. Encouraging results for PD-1 inhibition in gastric cancer. *Lancet Oncol.* (2016).

15. Rosenberg, J.E. et al. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *The Lancet* 387, 1909-1920 (2016).

16. Naidoo, J. et al. Toxicities of the anti-PD-1 and anti-PD-L1 immune checkpoint antibodies. *Ann. Oncol.*, mdv383 (2015).

17. Mellati, M. et al. Anti-PD-1 and Anti-PDL-1 Monoclonal Antibodies Causing Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* 38, e137-138 (2015).

18. Boutros, C. et al. Safety profiles of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies alone and in combination. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* (2016).

19. Larkin, J. et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 373, 23-34 (2015).

20. Chen, L. & Han, X. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future. *J. Clin. Invest.* 125, 3384-3391 (2015).

21. Weber, J.S., Kahler, K.C. & Hauschild, A. Management of immune-related adverse events and kinetics of response with ipilimumab. *J. Clin. Oncol.* 30, 2691-2697 (2012).

22. Woo, S.R., Corrales, L. & Gajewski, T.F. The STING pathway and the T cell-inflamed tumor microenvironment. *Trends Immunol.* 3

10

20

30

40

50

6, 250 - 256 (2015).

23. Hegde, P. S., Karanikas, V. & Evers, S. The where, the when, and the how of immune monitoring for cancer immunotherapies in the era of checkpoint inhibition. *Clin. Cancer Res.* 22, 1865 - 1874 (2016).

24. Spranger, S. et al. Up-regulation of PD-L1, IDO, and Tregs in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8+ T cells. *Sci. Transl. Med.* 5, 200ra116 - 200ra116 (2013).

10

25. Gajewski, T. F., Schreiber, H. & Fu, Y. X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat. Immunol.* 14, 1014 - 1022 (2013).

26. Fesnak, A. D., June, C. H. & Levine, B. L. Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 16, 566 - 581 (2016).

27. Yoo, J. W., Irvine, D. J., Discher, D. E. & Mitragotri, S. Bio-inspired, bioengineered and biomimetic drug delivery carriers. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 521 - 535 (2011).

20

28. Tamagawa-Mineoka, R. Important roles of platelets as immune cells in the skin. *J. Dermatol. Sci.* 77, 93 - 101 (2015).

29. Franco, A. T., Corken, A. & Ware, J. Platelets at the interface of thrombosis, inflammation, and cancer. *Blood* 126, 582 - 588 (2015).

30

30. Hu, C. M. et al. Nanoparticle biointerfacing by platelet membrane cloaking. *Nature* 526, 118 - 121 (2015).

31. Textor, J. in *Platelet-Rich Plasma* 61 - 94 (Springer, 2014).

32. Harker, L. A. et al. Effects of megakaryocyte growth and development factor on platelet production, platelet life span, and platelet function in healthy human volunteers. *Blood* 95, 2514 - 2522 (2000).

40

33. Nurden, A. T., Nurden, P., Sanchez, M., Andia, I. & Anitua, E. Platelets and wound healing. *Front Biosci.* 13, 3532 - 3548 (2008).

34. Gay, L. J. & Felding-Habermann, B. Contribution of platelets to tumor metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 11, 123 - 134 (2011).

35. Nash, G. F., Turner, L. F., Scully, M. F. & Kakkar, A. K. Platelets and cancer. *Lancet Oncol.* 3, 425 - 430 (2002).

36. Hu, Q. et al. Anticancer Platelet-Mimic

50

king Nanovehicles. *Adv. Mater.* 27, 7043 - 7050 (2015).

37. Garraud, O. Editorial: Platelets as immune cells in physiology and immunopathology. *Front Immunol.* 6, 1 - 3 (2015).

38. Morrell, C.N., Aggrey, A.A., Chapman, L.M. & Modjeski, K.L. Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. *Blood* 123, 2759 - 2767 (2014).

39. Semple, J.W., Italiano, J.E. & Freedman, J. Platelets and the immune continuum. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 264 - 274 (2011).

40. Elzey, B.D. et al. Platelet-mediated modulation of adaptive immunity: A communication link between innate and adaptive immune compartments. *Immunity* 19, 9 - 19 (2003).

41. Seifert, L. et al. The necrosome promotes pancreatic oncogenesis via CXCL1 and Mincle-induced immune suppression. *Nature* 532, 245 - 249 (2016).

42. Topalian, S.L., Drake, C.G. & Pardoll, D.M. Targeting the PD-1/B7-H1 (PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 24, 207 - 212 (2012).

43. Siljander, P.R.M. Platelet-derived microparticles - an updated perspective. *Thromb. Res.* 127, S30 - S33 (2011).

44. Li, J., Sharkey, C.C., Wun, B., Liesveld, J.L. & King, M.R. Genetic engineering of platelets to neutralize circulating tumor cells. *J. Control Release* 228, 38 - 47 (2016).

45. Ruggeri, Z.M. & Mendolicchio, G.L. Adhesion mechanisms in platelet function. *Circ. Res.* 100, 1673 - 1685 (2007).

46. Mause, S.F., von Hundelshausen, P., Zernecke, A., Koenen, R.R. & Weber, C. Platelet microparticles - A transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 1512 - 1518 (2005).

47. Tripathi, S. & Guleria, I. Role of PD1/PDL1 pathway, and TH17 and treg cells in maternal tolerance to the fetus. *Biomed. J.* 38, 25 - 31 (2015).

48. Headley, M.B. et al. Visualization of immediate immune responses to pioneer metastatic cells in the lung. *Nature* 531, 513 - 517 (2016).

49. Flaumenhaft, R. Formation and fate of

10

20

30

40

50

platelet microparticles. Blood Cells Mol. Dis. 36, 182 - 187 (2006).

50. Rand, M. L., Wang, H., Bang, K. W., Packham, M. A. & Freedman, J. Rapid clearance of procoagulant platelet-derived microparticles from the circulation of rabbits. J. Thromb Haemost 4, 1621 - 1623 (2006).

51. Lu, Y., Aimetti, A. A., Langer, R. & Gu, Z. Bioresponsive materials. Nature Reviews Materials 1, 16075 (2016).

10

52. Cazenave, J. - P. et al. Preparation of washed platelet suspensions from human and rodent blood. Platelets and Megakaryocytes: Volume 1: Functional Assays, 13 - 28 (2004).

53. Janowska-Wieczorek, A. et al. Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment after transplantation. Blood 98, 645a - 645a (2001).

20

54. Chevillat, N. F. & Stasko, J. Techniques in electron microscopy of animal tissue. Veterinary pathology 51, 28 - 41 (2014).

55. Zimmerman, M., Hu, X. & Liu, K. Experimental metastasis and CTL adoptive transfer immunotherapy mouse model. Journal of visualized experiments : JoVE (2010).

56. Wang, C. et al. Dataset for In situ Activation of Platelets with Checkpoint Inhibitors for Post-Surgical Cancer Immunotherapy. Figshare <http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.4231766> (2016).

30

【0160】

別途定義されていない限り、本明細書で使用する全ての技術用語及び科学用語は、本開示された発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書で引用した刊行物、及びそれらが引用されている資料は、参照により明確に組み込まれる。

【0161】

当業者であれば、本発明の好ましい実施形態に対して多数の変更及び修正を行うことができ、本発明の趣旨から逸脱することなく、そのような変更及び修正を行うことができることを理解するであろう。したがって、添付の特許請求の範囲は、本発明の真の趣旨及び範囲内に含まれるような全てのそのような同等の均等物を網羅することが意図される。また、本発明は以下を提供する。

40

[1]

血小板細胞と、
化学的リンカー部分と、
治療剤と、を含み、
前記治療剤が、前記化学的リンカー部分を介して前記血小板細胞に共有結合している、
組成物。

[2]

50

前記治療剤が免疫療法剤である、[1]に記載の組成物。

[3]

前記免疫療法剤が、抗 P D L 1 抗体、抗 P D 1 抗体、抗 C T L A 4 抗体、抗 C D 4 7 抗体、またはこれらの組み合わせから選択される、[2]に記載の組成物。

[4]

前記免疫療法剤が抗 P D L 1 抗体である、[3]に記載の組成物。

[5]

前記化学的リンカー部分が、マレイミドリンカー、P E G リンカー、P A S 化、及び H E S 化から選択される、[1] ~ [4] のいずれか一項に記載の組成物。

[6]

前記化学的リンカー部分がマレイミドリンカーである、[5]に記載の組成物。

[7]

前記血小板細胞がヒト血小板細胞である、[1] ~ [6] のいずれか一項に記載の組成物。

[8]

前記血小板細胞が自己由来の血小板細胞である、[1] ~ [6] のいずれか一項に記載の組成物。

[9]

血小板細胞と、

化学的リンカー部分と、

治療剤と、

を含む治療上有効量の組成物を、それを必要とする対象に投与することを含み、

前記治療剤が、前記化学的リンカー部分を介して前記血小板細胞に共有結合している、がんの転移または再発を予防する方法。

[1 0]

前記治療剤が免疫療法剤である、[9]に記載の方法。

[1 1]

前記免疫療法剤が、抗 P D L 1 抗体、抗 P D 1 抗体、抗 C T L A 4 抗体、抗 C D 4 7 抗体、またはこれらの組み合わせから選択される、[1 0]に記載の方法。

[1 2]

前記免疫療法剤が抗 P D L 1 抗体である、[1 1]に記載の方法。

[1 3]

前記化学的リンカー部分が、マレイミドリンカー、P E G リンカー、P A S 化、及び H E S 化から選択される、[9] ~ [1 2] のいずれか一項に記載の方法。

[1 4]

前記化学的リンカー部分がマレイミドリンカーである、[1 3]に記載の方法。

[1 5]

前記血小板細胞がヒト血小板細胞である、[9] ~ [1 4] のいずれか一項に記載の方法。

[1 6]

前記血小板細胞が自己由来のヒト血小板細胞である、[9] ~ [1 4] のいずれか一項に記載の方法。

[1 7]

前記がんが固形腫瘍である、[9] ~ [1 6] のいずれか一項に記載の方法。

[1 8]

前記がんが黒色腫である、[9] ~ [1 6] のいずれか一項に記載の方法。

[1 9]

前記がんが乳癌である、[9] ~ [1 6] のいずれか一項に記載の方法。

[2 0]

前記組成物が、追加の治療剤と組み合わせて投与される、[9] ~ [1 9] のいずれか

10

20

30

40

50

一項に記載の方法。

[2 1]

前記追加の治療剤が抗腫瘍剤である、[2 0]に記載の方法。

[2 2]

血小板細胞と、

化学的リンカー部分と、

治療剤と、

を含む組成物を対象に投与することを含み、

前記治療剤が、前記化学的リンカー部分を介して前記血小板細胞に共有結合しており、

前記組成物が、前記血小板細胞の活性化を介して創傷または外科的切除部位を標的とする、治療剤の標的化送達のための方法。

10

[2 3]

前記組成物が、前記血小板細胞の活性化時に、創傷または切除部位で血小板由来マイクロ粒子中でさらに放出される、[2 2]に記載の方法。

[2 4]

前記治療剤が免疫療法剤である、[2 2]に記載の方法。

[2 5]

前記免疫療法剤が、抗 P D L 1 抗体、抗 P D 1 抗体、抗 C T L A 4 抗体、抗 C D 4 7 抗体、またはこれらの組み合わせから選択される、[2 4]に記載の方法。

[2 6]

20

前記免疫療法剤が抗 P D L 1 抗体である、[2 5]に記載の方法。

[2 7]

前記化学的リンカー部分が、マレイミドリンカー、P E G リンカー、P A S 化、及び H E S 化から選択される、[2 2] ~ [2 6] のいずれか一項に記載の方法。

[2 8]

前記化学的リンカー部分がマレイミドリンカーである、[2 7]に記載の方法。

[2 9]

前記血小板細胞がヒト血小板細胞である、[2 2] ~ [2 8] のいずれか一項に記載の方法。

[3 0]

30

前記血小板細胞が自己由来の血小板細胞である、[2 2] ~ [2 8] のいずれか一項に記載の方法。

[3 1]

血小板細胞と、

化学的リンカー部分と、

治療剤と、

を含む治療上有効量の組成物を、それを必要とする対象に投与することを含み、

前記治療剤が、前記化学的リンカー部分を介して前記血小板細胞に共有結合している、血管疾患を治療または予防する方法。

[3 2]

40

前記治療剤が免疫療法剤である、[3 1]に記載の方法。

[3 3]

前記免疫療法剤が、抗 P D L 1 抗体、抗 P D 1 抗体、抗 C T L A 4 抗体、抗 C D 4 7 抗体、またはこれらの組み合わせから選択される、[3 2]に記載の方法。

[3 4]

前記免疫療法剤が抗 P D L 1 抗体である、[3 3]に記載の方法。

[3 5]

前記化学的リンカー部分が、マレイミドリンカー、P E G リンカー、P A S 化、及び H E S 化から選択される、[3 1] ~ [3 4] のいずれか一項に記載の方法。

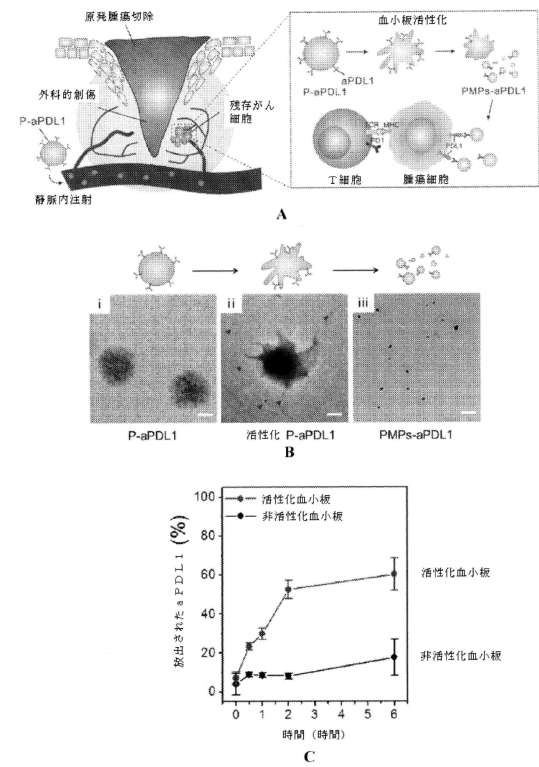
[3 6]

50

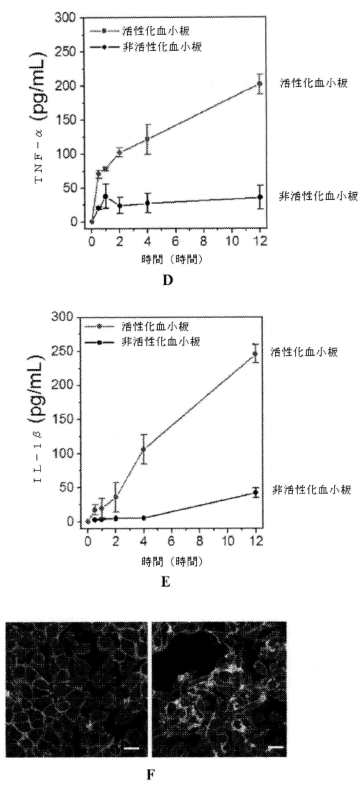
前記化学的リンカー部分がマレイミドリンカーである、[3 5] に記載の方法。
[3 7]
前記血小板細胞がヒト血小板細胞である、[3 1] ~ [3 6] のいずれか一項に記載の方法。
[3 8]
前記血小板細胞が自己由来の血小板細胞である、[3 1] ~ [3 6] のいずれか一項に記載の方法。
[3 9]
前記血管疾患が、組織損傷、炎症、または心血管疾患である、[3 1] ~ [3 8] のいずれか一項に記載の方法。
[4 0]
前記組成物が、追加の治療剤と組み合わせて投与される、[3 1] ~ [3 9] のいずれか一項に記載の方法。

【図面】

【図 1 - 1】



【図 1 - 2】



10

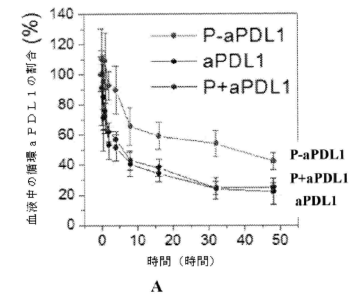
20

30

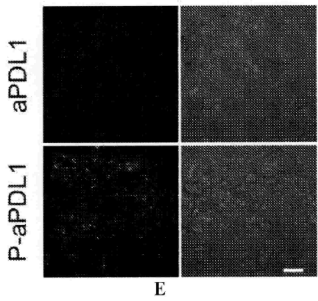
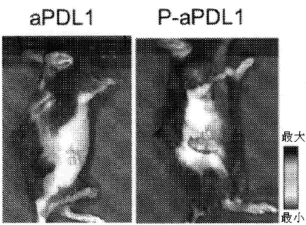
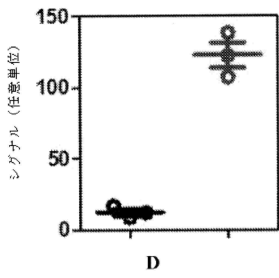
40

50

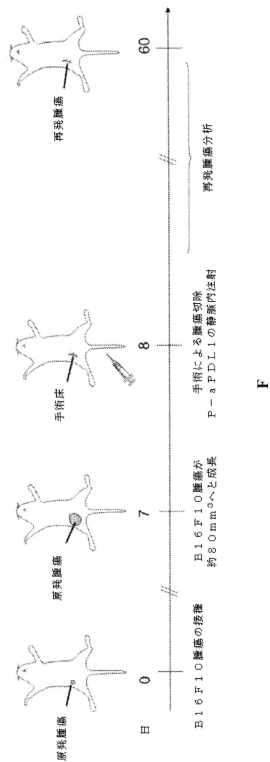
【図 2 - 1】



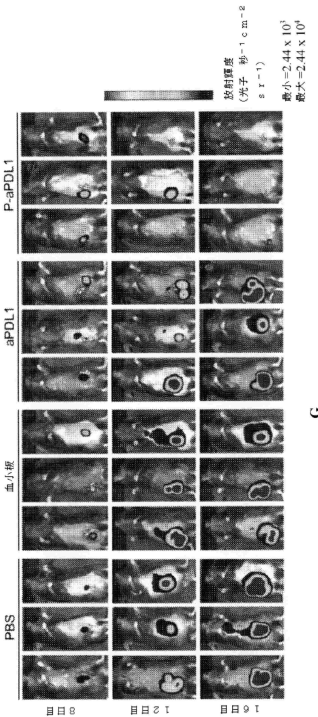
【図 2 - 2】



【図 2 - 3】



【図 2 - 4】



10

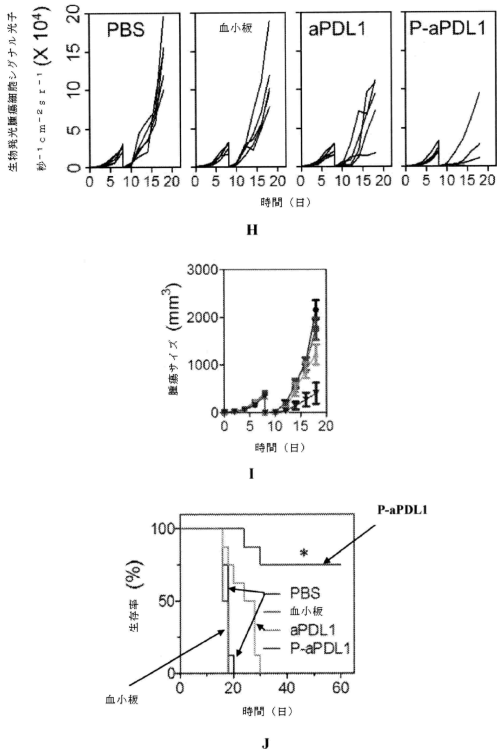
20

30

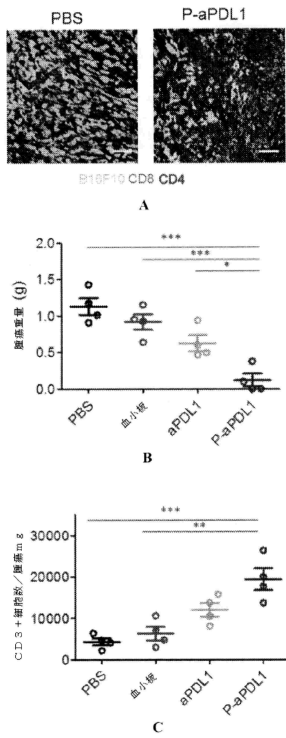
40

50

【図 2 - 5】



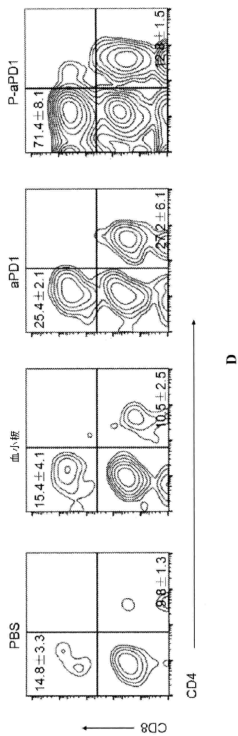
【図 3 - 1】



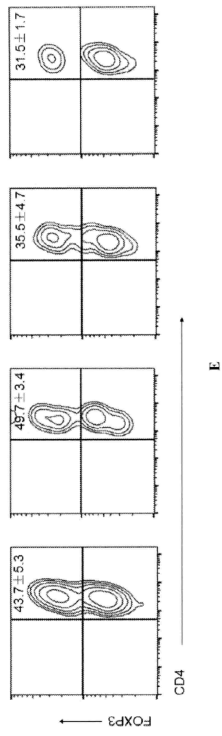
10

20

【図 3 - 2】



【図 3 - 3】

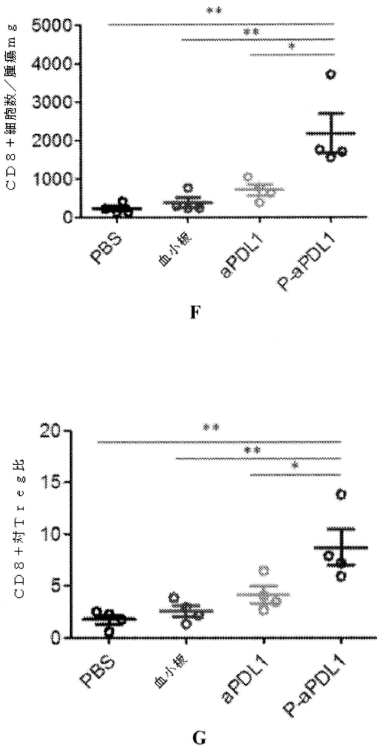


30

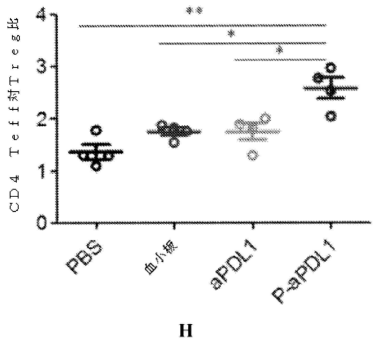
40

50

【図 3 - 4】



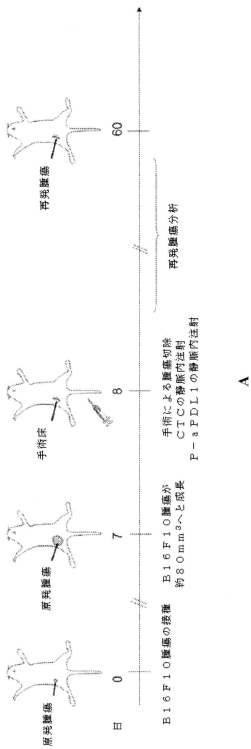
【図 3 - 5】



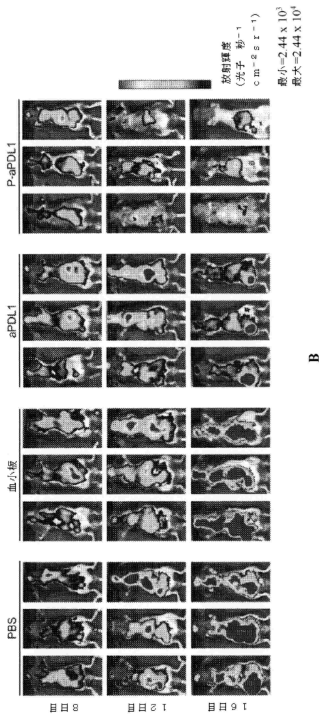
10

20

【図 4 - 1】



【図 4 - 2】

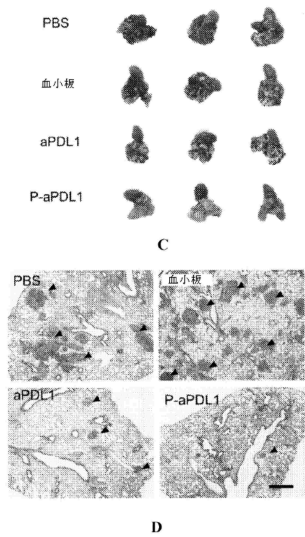


30

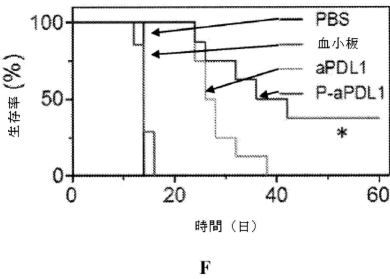
40

50

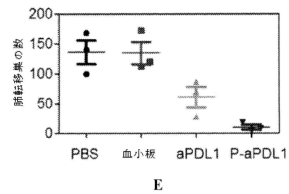
【図 4 - 3】



【図 4 - 4】

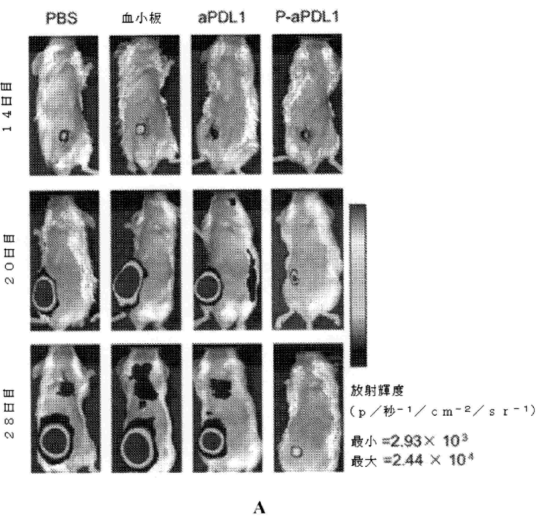


10

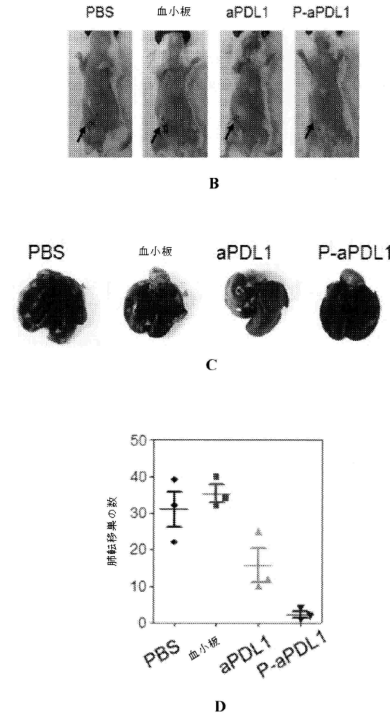


20

【図 5 - 1】



【図 5 - 2】

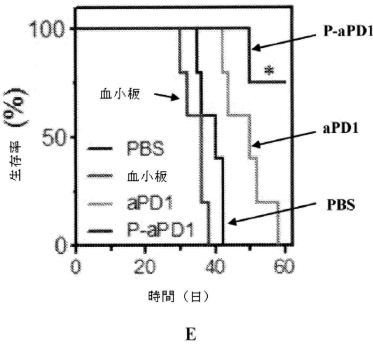


30

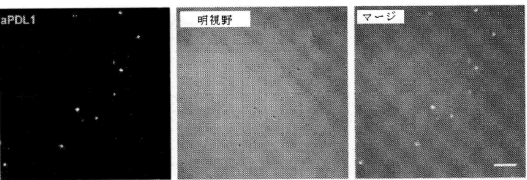
40

50

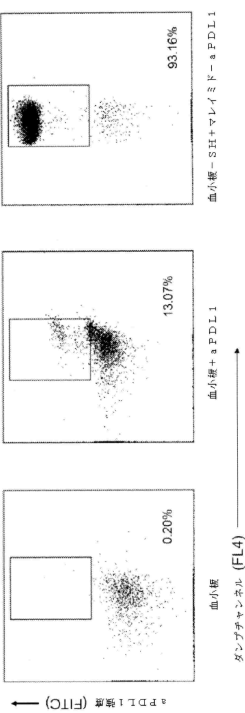
【図 5 - 3】



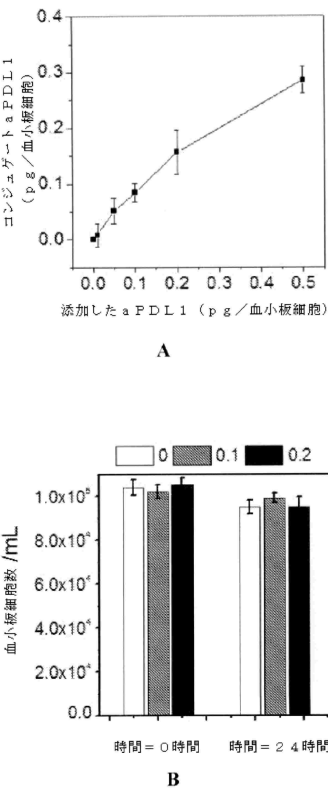
【図 6】



【図 7】



【図 8 - 1】



10

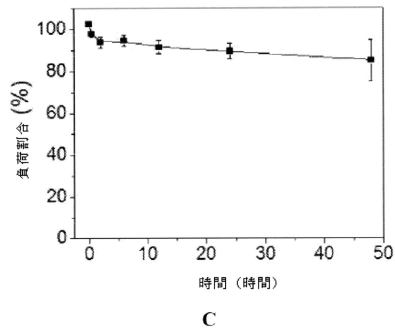
20

30

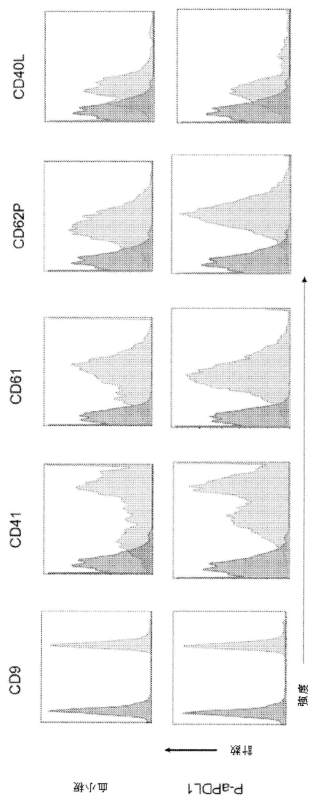
40

50

【図 8 - 2】



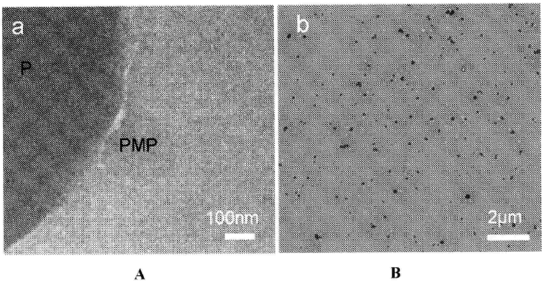
【図 9】



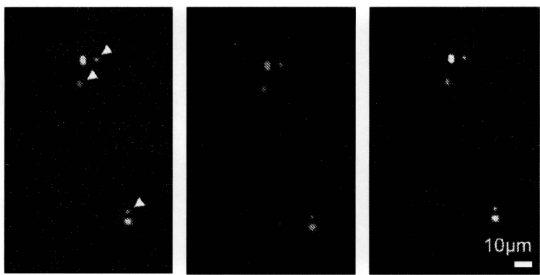
10

20

【図 1 0】



【図 1 1】

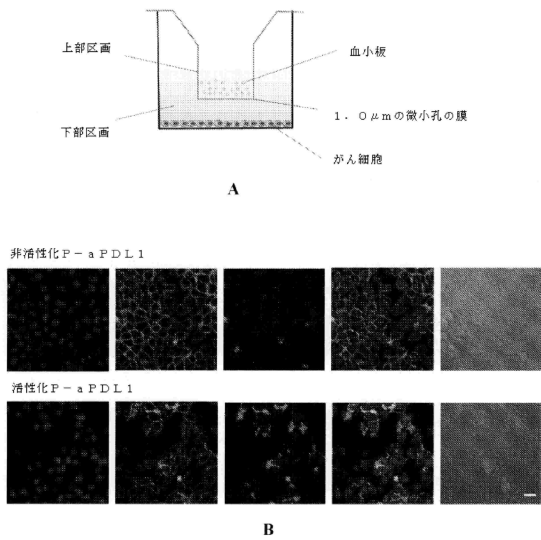


30

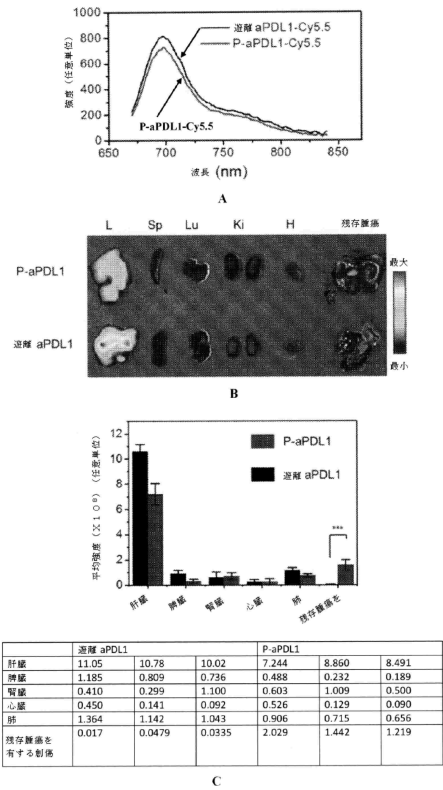
40

50

【図 1 2】



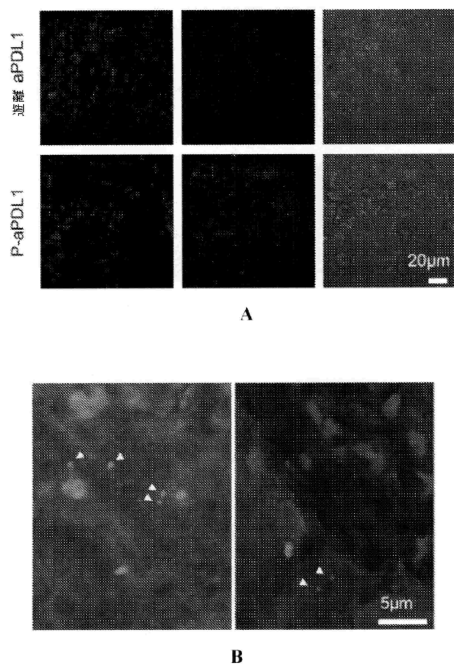
【図 1 3】



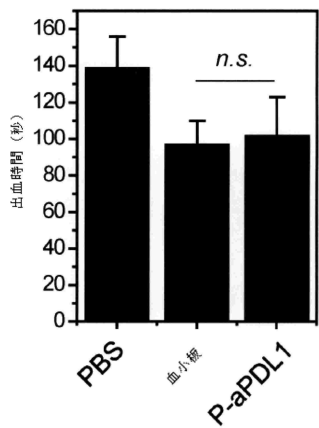
10

20

【図 1 4】



【図 1 5】

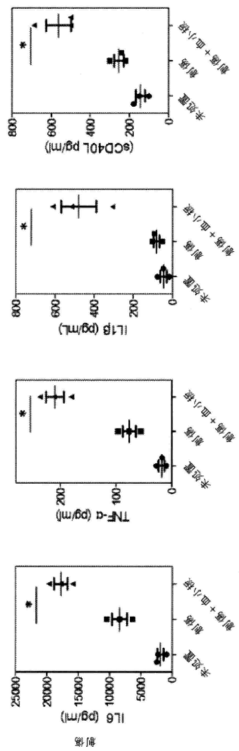


30

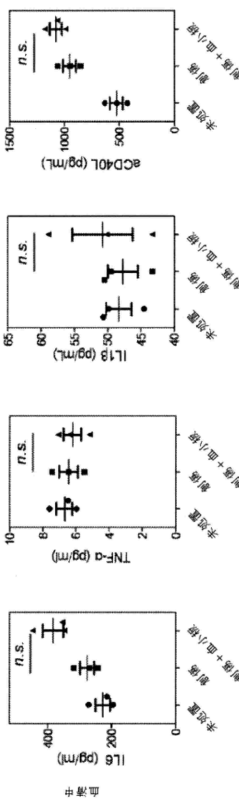
40

50

【図 16 A】



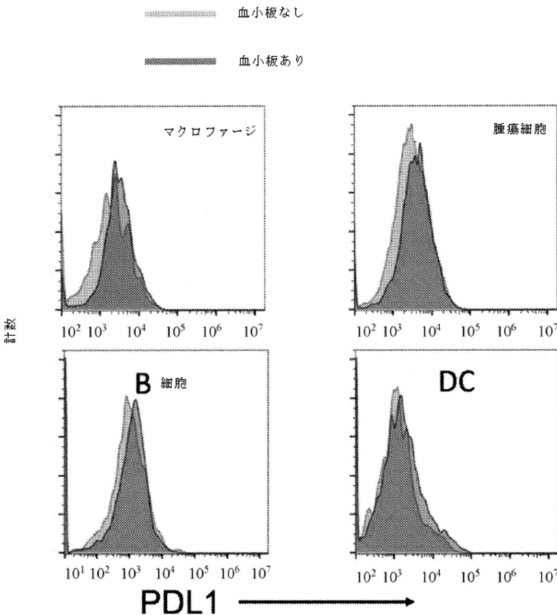
【図 16 B】



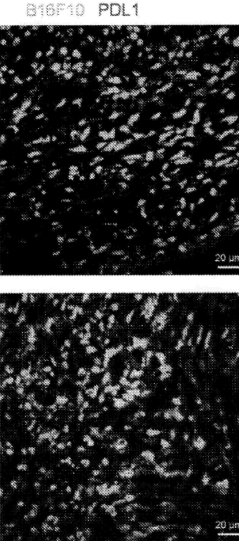
10

20

【図 16 C】



【図 16 D】

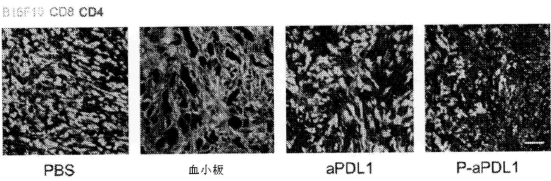


30

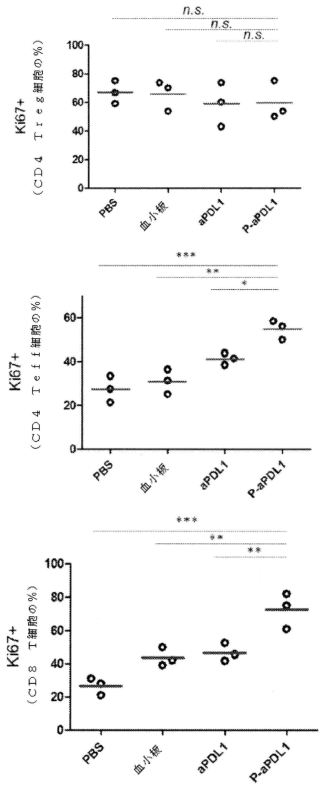
40

50

【 図 1 7 】



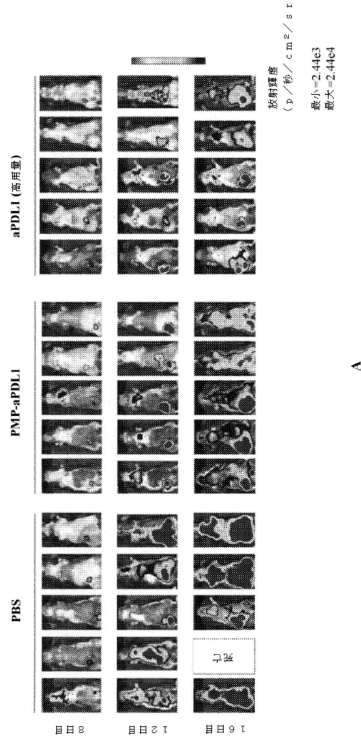
【 図 1 8 】



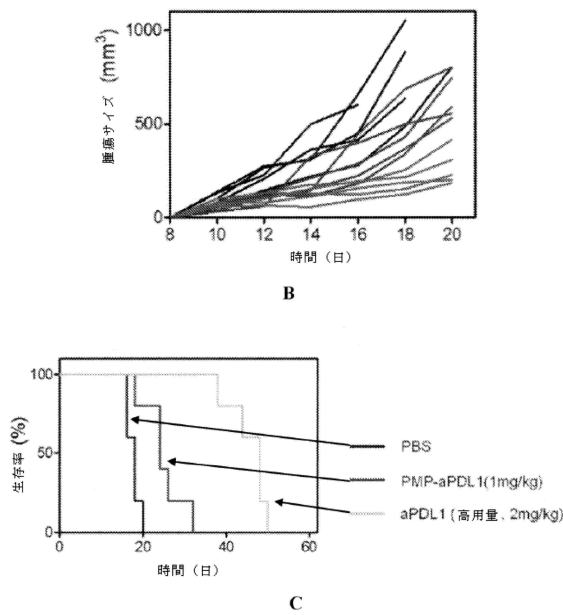
10

20

【 図 1 9 - 1 】



【 図 1 9 - 2 】



30

40

50

【図 20】

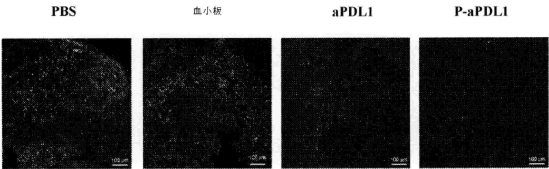


図15Fの模式図

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 45/06 (2006.01)

A 6 1 K 45/06

(72)発明者

グ, チェン

アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 2 7 5 0 2 , エイペックス, ブライアーフィールド ドライ
ブ 1 1 2

(72)発明者

ワン, チャオ

アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 2 7 6 0 6 , ローリー, キングス コート 3 0 3 5 ビー

審査官 佐々木 大輔

(56)参考文献

特表 2 0 0 6 - 5 2 5 8 1 0 (J P , A)

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

国際公開第 2 0 0 6 / 0 7 3 4 4 6 (W O , A 1)

特開平 0 8 - 1 0 9 1 4 2 (J P , A)

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

Pharm. Res., 2013, Vol.30, pp.2785-2794

Federation Proceedings, 1986, Vol.45, No.6, p.1832

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4

A 6 1 K 4 5 / 0 0

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

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

A 6 1 K 3 5 / 0 0 - 3 5 / 7 6 8

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

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