

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-533560

(P2012-533560A)

(43) 公表日 平成24年12月27日(2012.12.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 7/06 (2006.01)</b>	C07K 7/06 ZNA	4C076
<b>C07K 7/08 (2006.01)</b>	C07K 7/08	4C084
<b>A61K 47/42 (2006.01)</b>	A61K 47/42	4C085
<b>A61K 47/34 (2006.01)</b>	A61K 47/34	4C086
<b>A61K 47/48 (2006.01)</b>	A61K 47/48	4H045
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 100 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2012-520795 (P2012-520795)  
 (86) (22) 出願日 平成22年7月15日 (2010.7.15)  
 (85) 翻訳文提出日 平成24年3月7日 (2012.3.7)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2010/042184  
 (87) 国際公開番号 W02011/008992  
 (87) 国際公開日 平成23年1月20日 (2011.1.20)  
 (31) 優先権主張番号 61/225,872  
 (32) 優先日 平成21年7月15日 (2009.7.15)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 506115514  
 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ  
 ティ オブ カリフォルニア  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94  
 607 オークランド フランクリン ス  
 トリート 1111 トウエルフス フロ  
 ア  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74) 代理人 100102118  
 弁理士 春名 雅夫  
 (74) 代理人 100160923  
 弁理士 山口 裕孝  
 (74) 代理人 100119507  
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞における取り込みが制御可能なペプチド

## (57) 【要約】

本明細書の特定の実施形態では、インビボ循環の増加した選択的輸送分子が開示される。一部の実施形態では、本明細書で開示される選択的輸送分子は、式 (A - X - B - C) - M を有し、式中、C は積荷成分であり；A は 5 ~ 9 個の連続した酸性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり、該アミノ酸はアスパルタートおよびグルタマートから選択され；B は 5 ~ 20 個の連続した塩基性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり；X はリンカーであり；かつ M は高分子キャリアである。

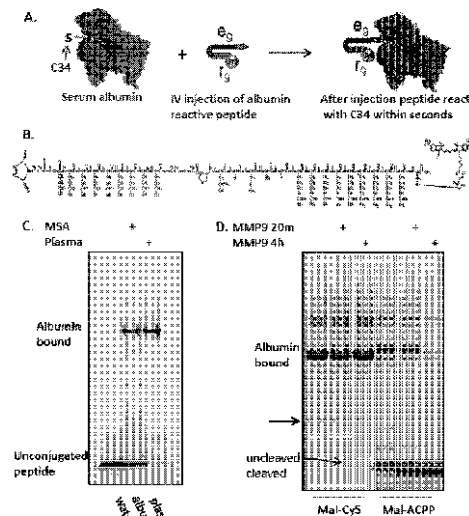


FIGURE 1

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

構造 ( A - X - B - C ) - M の分子であって、  
式中、

C は、少なくとも 1 つの造影剤であり；

A は、5 ～ 9 個の連続した酸性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり、該アミノ酸はアスパルタートおよびグルタマートから選択され；

B は、5 ～ 20 個の連続した塩基性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり；

X は、リンカーであり；かつ

M は、高分子キャリアであり；

ここで M は、A または B に結合している、  
前記分子。

10

## 【請求項 2】

A が 5 ～ 9 個の連続したグルタマートを含む配列を有する、請求項 1 記載の分子。

## 【請求項 3】

B が 5 ～ 12 個の連続したアルギニンを含む配列を有する、請求項 1 記載の分子。

## 【請求項 4】

B が 9 個の連続したアルギニンを含む配列を有する、請求項 1 記載の分子。

## 【請求項 5】

( a ) A が 8 ～ 9 個の連続したグルタマートを含む配列を有し、かつ ( b ) B が 9 個の連続したアルギニンを含む配列を有する、請求項 1 記載の分子。

20

## 【請求項 6】

A および B が D - アミノ酸を含む、請求項 1 記載の分子。

## 【請求項 7】

X が切断可能なリンカーである、請求項 1 記載の分子。

## 【請求項 8】

X がペプチド結合を含む、請求項 1 記載の分子。

## 【請求項 9】

X が 6 - アミノヘキサノイル、5 - アミノ - 3 - オキサペンタノイル、またはそれらの組み合わせを含む、請求項 1 記載の分子。

30

## 【請求項 10】

X がジスルフィド結合を含む、請求項 1 記載の分子。

## 【請求項 11】

X が約 6 ～ 約 30 原子の長さである、請求項 1 記載の分子。

## 【請求項 12】

X が pH 感受性リンカーである、請求項 1 記載の分子。

## 【請求項 13】

X が細胞外空間で切断される、請求項 1 記載の分子。

## 【請求項 14】

X がプロテアーゼ、マトリックスメタロプロテアーゼ、またはそれらの組み合わせにより切断される、請求項 1 記載の分子。

40

## 【請求項 15】

X が還元剤により切断される、請求項 1 記載の分子。

## 【請求項 16】

X が、

PLGLAG、x が任意のアミノ酸である PLGLAx、PLG - C ( me ) - AG、  
ESPAYYTA、および RLQLKL、AND RLQLK ( AC )  
から選択される、請求項 1 記載の分子。

## 【請求項 17】

M が、デンドリマー、デキストラン、PEG ポリマー、またはアルブミンから選択され

50

る高分子キャリアである、請求項 1 記載の分子。

【請求項 18】

M が PEG ポリマーである、請求項 1 記載の分子。

【請求項 19】

C が造影剤、治療薬、またはそれらの組み合わせを含む、請求項 1 記載の分子。

【請求項 20】

C が、蛍光成分、発光成分、リン光成分、蛍光消光成分、放射性成分、放射線不透過性成分、常磁性成分、コントラスト剤、またはそれらの組み合わせから選択される造影剤を含む、請求項 1 記載の分子。

【請求項 21】

C が、化学療法剤、放射線増感剤、アポトーシスを調節する薬剤、および細胞周期を調節する薬剤、シグナル伝達カスケードを調節する薬剤、またはそれらの組み合わせから選択される治療薬を含む、請求項 1 記載の分子。

【請求項 22】

積荷がインドカルボシアニン染料である、請求項 1 記載の分子。

【請求項 23】

積荷がインドカルボシアニン染料、Cy5、Cy5.5、Cy7、IRDYE800CW、ALEXA647、またはそれらの組み合わせである、請求項 1 記載の分子。

【請求項 24】

積荷がMRIコントラスト剤である、請求項 1 記載の分子。

【請求項 25】

積荷が[4, 7, 10-トリス(カルボキシメチル)-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカ-1-イル]アセチルのGd錯体である、請求項 1 記載の分子。

【請求項 26】

構造(A-X-B)<sub>n</sub>-Lの分子であって、  
式中、

Lは、脂質または脂質コート治療薬または造影剤を含み；

Aは、5～9個の連続した酸性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり、該アミノ酸はアスパルタートおよびグルタマートから選択され；

Bは、5～20個の連続した塩基性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり；

Xは、リンカーであり；かつ

Nは、1～20の整数であり；かつ

ここでLは、Bとの結合により(A-X-B)成分に結合している、  
前記分子。

【請求項 27】

Aが5～9個の連続したグルタマートを含む配列を有する、請求項 26 記載の分子。

【請求項 28】

Bが5～12個の連続したアルギニンを含む配列を有する、請求項 26 記載の分子。

【請求項 29】

Bが9個の連続したアルギニンを含む配列を有する、請求項 26 記載の分子。

【請求項 30】

(a) Aが8～9個の連続したグルタマートを含む配列を有し、かつ(b) Bが9個の連続したアルギニンを含む配列を有する、請求項 26 記載の分子。

【請求項 31】

AおよびBがD-アミノ酸を含む、請求項 26 記載の分子。

【請求項 32】

Xが切断可能なリンカーである、請求項 26 記載の分子。

【請求項 33】

Xがペプチド結合を含む、請求項 26 記載の分子。

【請求項 34】

10

20

30

40

50

X が 6 - アミノヘキサノイル、5 - (アミノ) - 3 - オキサペンタノイル、またはそれらの組み合わせを含む、請求項 26 記載の分子。

【請求項 35】

X がジスルフィド結合を含む、請求項 26 記載の分子。

【請求項 36】

X が約 6 ~ 約 30 原子の長さである、請求項 26 記載の分子。

【請求項 37】

X が pH 感受性リンカーである、請求項 26 記載の分子。

【請求項 38】

X が細胞外空間で切断される、請求項 26 記載の分子。

10

【請求項 39】

X がプロテアーゼ、マトリックスメタロプロテアーゼ、またはそれらの組み合わせにより切断される、請求項 26 記載の分子。

【請求項 40】

X が還元剤により切断される、請求項 26 記載の分子。

【請求項 41】

X が、

PLGLAG、x が任意のアミノ酸である PLGLAx、PLG - C(me) - AG、ESPAYYTA、および RLQLKL、AND RLQLK(AC) から選択される、請求項 26 記載の分子。

20

【請求項 42】

脂質がペグ化されている、請求項 26 記載の分子。

【請求項 43】

脂質が PEG(2K) - ホスファチジルエタノールアミンである、請求項 26 記載の分子。

【請求項 44】

治療薬が疎水性である、請求項 26 記載の分子。

【請求項 45】

治療薬が化学療法剤、放射線増感剤、アポトーシスを調節する薬剤、および細胞周期を調節する薬剤、シグナル伝達カスケードを調節する薬剤、またはそれらの組み合わせから選択される、請求項 26 記載の分子。

30

【請求項 46】

治療薬がドキソルビシンまたはパクリタキセルである、請求項 26 記載の分子。

【請求項 47】

構造 (A - X - B)<sub>n</sub> - D の分子であって、  
式中、

D は、デンドリマーであり；

A は、5 ~ 9 個の連続した酸性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり、該アミノ酸はアスパルタートおよびグルタマートから選択され；

B は、5 ~ 20 個の連続した塩基性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり；

40

X は、リンカーであり；かつ

n は、1 ~ 20 の整数であり；かつ

ここで D は、B との結合により (A - X - B) 成分に結合している、  
前記分子。

【請求項 48】

D が少なくとも 1 つの積荷成分を含む、請求項 47 記載の分子。

【請求項 49】

少なくとも 1 つの積荷成分が造影剤、治療薬、またはそれらの組み合わせである、請求項 47 記載の分子。

【請求項 50】

50

少なくとも1つの積荷成分が、蛍光成分、発光成分、リン光成分、蛍光消光成分、放射性成分、放射線不透過性成分、常磁性成分、コントラスト剤、またはそれらの組み合わせから選択される造影剤である、請求項47記載の分子。

【請求項51】

少なくとも1つの積荷成分が、化学療法剤、放射線増感剤、アポトーシスを調節する薬剤、および細胞周期を調節する薬剤、シグナル伝達カスケードを調節する薬剤、またはそれらの組み合わせから選択される治療薬である、請求項47記載の分子。

【請求項52】

少なくとも1つの積荷成分がインドカルボシアニン染料である、請求項47記載の分子。

10

【請求項53】

少なくとも1つの積荷成分がインドカルボシアニン染料、Cy5、Cy5.5、Cy7、Alexa647、IRDYE800CW、またはそれらの組み合わせである、請求項47記載の分子。

【請求項54】

少なくとも1つの積荷成分がMRIコントラスト剤である、請求項47記載の分子。

【請求項55】

少なくとも1つの積荷成分が[4,7,10-トリス(カルボキシメチル)-1,4,7,10-テトラアザシクロデカ-1-イル]アセチルのGd錯体である、請求項47記載の分子。

20

【請求項56】

Aが5~9個の連続したグルタマートを含む配列を有する、請求項47記載の分子。

【請求項57】

Bが5~12個の連続したアルギニンを含む配列を有する、請求項47記載の分子。

【請求項58】

Bが9個の連続したアルギニンを含む配列を有する、請求項47記載の分子。

【請求項59】

(a) Aが8~9個の連続したグルタマートを含む配列を有し、かつ(b) Bが9個の連続したアルギニンを含む配列を有する、請求項47記載の分子。

【請求項60】

30

AおよびBがD-アミノ酸を含む、請求項47記載の分子。

【請求項61】

Xが切断可能なリンカーである、請求項47記載の分子。

【請求項62】

Xがペプチド結合を含む、請求項47記載の分子。

【請求項63】

Xが6-アミノヘキサノイル、5-(アミノ)-3-オキサペンタノイル、またはそれらの組み合わせを含む、請求項47記載の分子。

【請求項64】

Xがジスルフィド結合を含む、請求項47記載の分子。

40

【請求項65】

Xが約6~約30原子の長さである、請求項47記載の分子。

【請求項66】

XがpH感受性リンカーである、請求項47記載の分子。

【請求項67】

Xが細胞外空間で切断される、請求項47記載の分子。

【請求項68】

Xがプロテアーゼ、マトリックスメタロプロテアーゼ、またはそれらの組み合わせにより切断される、請求項47記載の分子。

【請求項69】

50

X が還元剤により切断される、請求項 47 記載の分子。

【請求項 70】

X が、

PLGLAG、x が任意のアミノ酸である PLGLAx、PLG-C(me)-AG、ESPAYYTA、および RLQLKL、AND RLQLK(AC)

から選択される、請求項 47 記載の分子。

【請求項 71】

構造 (A-X-B-C)-M の分子を患者に投与した後に腫瘍を画像化することを含む、患者の腫瘍を画像化する方法であって、

式中、

C は、少なくとも 1 つの造影剤であり；

A は、5～9 個の連続した酸性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり、該アミノ酸はアスパルタートおよびグルタマートから選択され；

B は、5～20 個の連続した塩基性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり；

X は、リンカーであり；かつ

M は、高分子キャリアであり；

ここで M は、A または B に結合している、

前記方法。

【請求項 72】

腫瘍の画像化を、それを必要としている患者において行うための構造 (A-X-B-C)-M の分子の使用であって、

式中、

C は、少なくとも 1 つの造影剤であり；

A は、5～9 個の連続した酸性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり、該アミノ酸はアスパルタートおよびグルタマートから選択され；

B は、5～20 個の連続した塩基性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり；

X は、リンカーであり；かつ

M は、高分子キャリアであり；

ここで M は、A または B に結合している、

前記使用。

【請求項 73】

構造 (A-X-B-C)-M の分子を患者に投与した後に外科的縁を画像化することを含む、患者の腫瘍切除または組織切除のための外科的縁を画像化する方法であって、

式中、

C は、少なくとも 1 つの造影剤であり；

A は、5～9 個の連続した酸性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり、該アミノ酸はアスパルタートおよびグルタマートから選択され；

B は、5～20 個の連続した塩基性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり；

X は、リンカーであり；かつ

M は、高分子キャリアであり；

ここで M は、A または B に結合している、

前記方法。

【請求項 74】

腫瘍切除または組織切除のための外科的縁の画像化を、それを必要としている患者において行うための構造 (A-X-B-C)-M の分子の使用であって、

式中、

C は、少なくとも 1 つの造影剤であり；

A は、5～9 個の連続した酸性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり、該アミノ酸はアスパルタートおよびグルタマートから選択され；

B は、5～20 個の連続した塩基性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり；

Xは、リンカーであり；かつ  
Mは、高分子キャリアであり；  
ここでMは、AまたはBに結合している、  
前記使用。

【請求項75】

構造(A - X - B - C) - Mの分子を患者に投与した後に腫瘍を除去することを含む、  
患者の腫瘍を除去する方法であって、  
式中、

Cは、少なくとも1つの造影剤であり；

Aは、5～9個の連続した酸性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり、該アミノ酸  
はアスパルタートおよびグルタマートから選択され； 10

Bは、5～20個の連続した塩基性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり；

Xは、リンカーであり；かつ

Mは、高分子キャリアであり；かつ

ここでMは、AまたはBに結合している、  
前記方法。

【請求項76】

腫瘍の除去を、それを必要としている患者において行うための構造(A - X - B - C)  
- Mの分子の使用であって、  
式中、 20

Cは、少なくとも1つの造影剤であり；

Aは、5～9個の連続した酸性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり、該アミノ酸  
はアスパルタートおよびグルタマートから選択され；

Bは、5～20個の連続した塩基性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり；

Xは、リンカーであり；かつ

Mは、高分子キャリアであり；

ここでMは、AまたはBに結合している、  
前記使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は、2009年7月15日出願の米国仮出願第61/225,872号の利益を  
主張する。この出願は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

連邦政府による資金提供を受けた研究開発の記載

本発明は、米国防総省認可番号W81XWH-05-1-0183、および米国立衛生  
研究所認可番号NIBIB-K08EB008122に基づく政府の支援により行われた  
。政府は本発明に対し一定の権利を有する。

【背景技術】

40

【0003】

発明の背景

細胞膜は細胞外部との境界を定め、細胞内に出入りする輸送を調節する。膜は、主に脂  
質およびタンパク質からできていて、疎水性の内側を取り囲む形で親水性の表面を提供し  
、物質は細胞に入る前にそこを通過しなければならない。多くの小さい親油性化合物は細  
胞膜を受動的に通過可能であるが、大抵の化合物、粒子および物質は、能動的機構を頼り  
にして生細胞中に入らなければならない。

【発明の概要】

【0004】

本明細書中の特定の実施形態では、(A - X - B - C) - Mの構造の分子が開示され、

50

式中、

Cは、少なくとも1つの造影剤であり；

Aは、5～9個の連続した酸性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり、該アミノ酸はアスパルタートおよびグルタマートから選択され；

Bは、5～20個の連続した塩基性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり；

Xは、リンカーであり；かつ

Mは、高分子キャリアであり；

ここでMは、AまたはBに結合している。

#### 【0005】

一部の実施形態では、Aは、5～9個の連続したグルタマートを含む配列を有している。一部の実施形態では、Bは、5～12個の連続したアルギニンを含む配列を有する。一部の実施形態では、Bは、9個の連続したアルギニンを含む配列を有する。一部の実施形態では、(a) Aは8～9個の連続したグルタマートを含む配列を有し、(b) Bは9個の連続したアルギニンを含む配列を有する。一部の実施形態では、AおよびBは、D-アミノ酸を含む。一部の実施形態では、Xは、切断可能なリンカーである。一部の実施形態では、Xは、ペプチド結合を含む。一部の実施形態では、Xは、6-アミノヘキサノイル、5-アミノ-3-オキサペンタノイル、またはその組み合わせを含む。一部の実施形態では、Xは、ジスルフィド結合を含む。一部の実施形態では、Xは、約6～約30原子の長さである。一部の実施形態では、Xは、pH感受性リンカーである。一部の実施形態では、Xは、細胞外空間で切断される。一部の実施形態では、Xは、プロテアーゼ、マトリックスメタロプロテアーゼ、またはこれらの組み合わせにより切断される。一部の実施形態では、Xは、還元剤により切断される。一部の実施形態では、Xは、PLGLAG、PLGLAx (xは任意のアミノ酸)、PLG-C(me)-AG、ESPAYYTA、およびRLQLKL、AND RLQLK(AC)から選択される。一部の実施形態では、Mは、デンドリマー、デキストラン、PEGポリマー、またはアルブミンから選択される高分子キャリアである。一部の実施形態では、Mは、PEGポリマーである。一部の実施形態では、Cは、造影剤、治療薬、またはその組み合わせを含む。一部の実施形態では、Cは、蛍光成分、発光成分、リン光成分、蛍光消光成分、放射性成分、放射線不透過性成分、常磁性成分、コントラスト剤、またはその組み合わせから選択される造影剤を含む。一部の実施形態では、Cは、化学療法剤、放射線増感剤、アポトーシスを調節する薬剤、および細胞周期を調節する薬剤、シグナル伝達カスケードを調節する薬剤、またはこれらの組み合わせから選択される治療薬を含む。一部の実施形態では、積荷は、インドカルボシアニン染料である。一部の実施形態では、積荷は、インドカルボシアニン染料、Cy5、Cy5.5、Cy7、IRDYE800CW、ALEXA647、またはこれらの組み合わせである。一部の実施形態では、積荷は、MRIコントラスト剤である。一部の実施形態では、積荷は、[4, 7, 10-トリス(カルボキシメチル)-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカ-1-イル]アセチルのGd錯体である。

#### 【0006】

本明細書中の特定の実施形態では、(A-X-B)<sub>n</sub>-Lの構造の分子が開示され、式中、

Lは、脂質または脂質コート治療薬または造影剤を含み；

Aは、5～9個の連続した酸性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり、該アミノ酸は、アスパルタートおよびグルタマートから選択され；

Bは、5～20個の連続した塩基性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり；

Xは、リンカーであり；かつ

nは、1～20の整数であり；かつ

ここでLは、Bとの結合により(A-X-B)成分に結合している。

#### 【0007】

一部の実施形態では、Aは、5～9個の連続したグルタマートを含む配列を有する。一部の実施形態では、Bは、5～12個の連続したアルギニンを含む配列を有する。一部の



実施形態では、Bは、9個の連続したアルギニンを含む配列を有する。一部の実施形態では、(a) Aは、8～9個の連続したグルタマートを有する配列を有し、(b) Bは、9個の連続したアルギニンを含む配列を有する。一部の実施形態では、AおよびBは、D-アミノ酸を含む。一部の実施形態では、Xは、切断可能なリンカーである。一部の実施形態では、Xは、ペプチド結合を含む。一部の実施形態では、Xは、6-アミノヘキサノイル、5-(アミノ)-3-オキサペンタン酸、またはこれらの組み合わせを含む。一部の実施形態では、Xは、ジスルフィド結合を含む。一部の実施形態では、Xは、約6～約30原子の長さである。一部の実施形態では、Xは、pH感受性リンカーである。一部の実施形態では、Xは、細胞外空間で切断される。一部の実施形態では、Xは、プロテアーゼ、マトリックスメタロプロテアーゼ、またはこれらの組み合わせにより切断される。一部の実施形態では、Xは、還元剤により切断される。一部の実施形態では、Xは、PLGLAG、PLGLAx(xは任意のアミノ酸)、PLG-C(me)-AG、ESPAYYT A、およびRLQLKL、AND RLQLK(AC)から選択される。一部の実施形態では、脂質は、ペグ化されている。一部の実施形態では、脂質は、PEG(2K)-ホスファチジルエタノールアミンである。一部の実施形態では、治療薬は、疎水性である。一部の実施形態では、治療薬は、化学療法剤、放射線増感剤、アポトーシスを調節する薬剤、および細胞周期を調節する薬剤、シグナル伝達カスケードを調節する薬剤、またはこれらの組み合わせから選択される。一部の実施形態では、治療薬は、ドキシソルビンまたはパクリタキセルである。

10

20

#### 【0008】

本明細書中の特定の実施形態では、(A-X-B)<sub>n</sub>-Dの構造の分子が開示され、式中、

Dは、デンドリマーであり；

Aは、5～9個の連続した酸性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり、該アミノ酸は、アスパルタートおよびグルタマートから選択され；

Bは、5～20個の連続した塩基性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり；

Xは、リンカーであり；かつ

nは、1～20の整数であり；かつ

ここでDは、Bとの結合により(A-X-B)成分に結合している。

30

#### 【0009】

一部の実施形態では、Dは、少なくとも1つの積荷成分を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つの積荷成分は造影剤、治療薬、またはこれらの組み合わせである。一部の実施形態では、少なくとも1つの積荷成分は、蛍光成分、発光成分、リン光成分、蛍光消光成分、放射性成分、放射線不透過性成分、常磁性成分、コントラスト剤、またはこれらの組み合わせから選択される造影剤である。一部の実施形態では、少なくとも1つの積荷成分は、化学療法剤、放射線増感剤、アポトーシスを調節する薬剤、および細胞周期を調節する薬剤、シグナル伝達カスケードを調節する薬剤、またはこれらの組み合わせから選択される治療薬である。一部の実施形態では、少なくとも1つの積荷成分は、インドカルボシアニン染料である。一部の実施形態では、少なくとも1つの積荷成分は、インドカルボシアニン染料、Cy5、Cy5.5、Cy7、IRDYE800CW、ALEXA647、またはこれらの組み合わせである。一部の実施形態では、少なくとも1つの積荷成分は、MRIコントラスト剤である。一部の実施形態では、少なくとも1つの積荷成分は、[4,7,10-トリス(カルボキシメチル)-1,4,7,10-テトラアザシクロデカ-1-イル]アセチルのGd錯体である。一部の実施形態では、Aは、5～9個の連続したグルタマートを有する配列を有する。一部の実施形態では、Bは、5～12個の連続したアルギニンを含む配列を有する。一部の実施形態では、Bは、9個の連続したアルギニンを含む配列を有する。一部の実施形態では、(a) Aは、8～9個の連続したグルタマートを有する配列を有し、かつ(b) Bは、9個の連続したアルギニンを含む配列を有する。一部の実施形態では、AおよびBは、D-アミノ酸を含む。一部の実施形態では、Xは、切断可能なリンカーである。一部の実施形態では、Xは、ペプチド結合を含む。一部の

40

50

の実施形態では、Xは、6 - アミノヘキサノイル、5 - (アミノ) - 3 - オキサペンタン酸、またはこれらの組み合わせを含む。一部の実施形態では、Xは、ジスルフィド結合を含む。一部の実施形態では、Xは、約6 ~ 約30 原子の長さである。一部の実施形態では、Xは、pH感受性リンカーである。一部の実施形態では、Xは、細胞外空間で切断される。一部の実施形態では、Xは、プロテアーゼ、マトリックスメタロプロテアーゼ、またはこれらの組み合わせにより切断される。一部の実施形態では、Xは、還元剤により切断される。一部の実施形態では、Xは、P L G L A G、P L G L A x (xは任意のアミノ酸)、P L G - C (m e) - A G、E S P A Y Y T A、およびR L Q L K L、A N D R L Q L K (A C) から選択される。

#### 【0010】

本明細書中の特定の実施形態では、患者の腫瘍を画像化する方法が開示される。この方法は、(A - X - B - C) - Mの構造の分子を患者に投与した後に腫瘍を画像化することを含み、式中、

Cは、少なくとも1つの造影剤であり；

Aは、5 ~ 9個の連続した酸性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり、該アミノ酸は、アスパルタートおよびグルタマートから選択され；

Bは、5 ~ 20個の連続した塩基性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり；

Xは、リンカーであり；かつ

Mは、高分子キャリアであり；

ここでMは、AまたはBに結合している。

#### 【0011】

本明細書中の特定の実施形態では、腫瘍の画像化を、それを必要としている患者において行うための(A - X - B - C) - Mの構造の分子の使用が開示されており、式中、

Cは、少なくとも1つの造影剤であり；

Aは、5 ~ 9個の連続した酸性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり、該アミノ酸は、アスパルタートおよびグルタマートから選択され；

Bは、5 ~ 20個の連続した塩基性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり；

Xは、リンカーであり；かつ

Mは、高分子キャリアであり；

ここでMは、AまたはBに結合している。

#### 【0012】

本明細書中の特定の実施形態では、患者の腫瘍切除または組織切除のための外科的縁を画像化する方法が開示されており、(A - X - B - C) - Mの構造の分子を患者に投与した後に外科的縁を画像化することを含み、式中、

Cは、少なくとも1つの造影剤であり；

Aは、5 ~ 9個の連続した酸性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり、該アミノ酸は、アスパルタートおよびグルタマートから選択され；

Bは、5 ~ 20個の連続した塩基性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり；

Xは、リンカーであり；かつ

Mは、高分子キャリアであり；

ここでMは、AまたはBに結合している。

#### 【0013】

本明細書中の特定の実施形態では、腫瘍切除または組織切除のための外科的縁を画像化することを、それを必要としている患者において行うための(A - X - B - C) - M構造の分子の使用が開示され、式中、

Cは、少なくとも1つの造影剤であり；

Aは、5 ~ 9個の連続した酸性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり、該アミノ酸は、アスパルタートおよびグルタマートから選択され；

Bは、5 ~ 20個の連続した塩基性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり；

Xは、リンカーであり；かつ

10

20

30

40

50

Mは、高分子キャリアであり；  
ここでMは、AまたはBに結合している。

【0014】

本明細書中の特定の実施形態では、患者の腫瘍を除去する方法が開示され、(A - X - B - C) - Mの構造の分子を患者に投与した後に腫瘍を除去することを含み、式中、Cは、少なくとも1つの造影剤であり；  
Aは、5～9個の連続した酸性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり、該アミノ酸は、アスパルタートおよびグルタマートから選択され；  
Bは、5～20個の連続した塩基性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり；  
Xは、リンカーであり；かつ  
Mは、高分子キャリアであり；  
ここでMは、AまたはBに結合している。

10

【0015】

本明細書中の特定の実施形態では、腫瘍の除去を、それを必要としている患者において行うための(A - X - B - C) - Mの構造の分子の使用が開示されており、式中、Cは、少なくとも1つの造影剤であり；  
Aは、5～9個の連続した酸性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり、該アミノ酸は、アスパルタートおよびグルタマートから選択され；  
Bは、5～20個の連続した塩基性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり；  
Xは、リンカーであり；かつ  
Mは、高分子キャリアであり；  
ここでMは、AまたはBに結合している。

20

【0016】

本発明の新規性は添付の特許請求の範囲で詳細に説明される。本発明の原理とそれに付随する図を使った下記の実施形態の詳細な説明により、本発明の特色と利点に関し、より良き理解が得られるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】アルブミン反応性選択的輸送分子は、天然アルブミンと強固な反応を作り出し、また、選択的輸送分子はMMP9により切断されうる。(A)は、マウスまたはヒトのアルブミンのC34と反応可能なチオール反応性基を有する遊離ペプチド選択的輸送分子の模式図であり、(B)は、C末端マレイミド基、次にe<sub>9</sub> - (MMP切断基質) - r<sub>9</sub>c (ペイロード)配列を有するアルブミン反応性選択的輸送分子の化学構造であり、この場合、oPLG(Cme)AGが基質で、Cy5が近赤外タグである。(C)アルブミン反応性ペプチドは、水性の精製マウス血清アルブミンおよび新規凍結マウス血漿の両方に1時間で反応する。血漿は、15:1のアルブミン対ペプチド(2nmolのペプチドを有する50μLの40mg/mL MSA)比率によりほぼ完全に反応した。(D)反応した選択的輸送分子は、4時間未満の時間でアルブミンからほぼ完全に切断される。ゲルは、50nM MMP-9酵素で20分および4時間処理した場合の、アルブミンが結合した非切断ペプチド、および切断されたペプチドを示す。

30

40

【図2】アルブミン反応性ペプチドは、HT1080担腫瘍マウスおよびポリオーマ腫瘍で顕著なコントラストを作り出す。(A)HT1080マウスに、切断可能および切断不可能選択的輸送分子と共に3nmolのアルブミン反応性ペプチドを同じ日にIV注入した。マウスを画像化し24時間後に屠殺した。皮膚の剥離前および皮膚の剥離後の各ペプチド当たり2匹のマウスの蛍光画像および腫瘍を矢印で指して示す。(B)上記マウスの腫瘍および筋肉をホモジナイズし、上清をゲル濾過アッセイで測定後、腫瘍中の切断および非切断アルブミン結合ペプチドの両方の存在が認められた。(C)HT1080マウスに、同用量の遊離ペプチドを注入し、取り込みの24時間目に画像化した。アルブミン反応性ペプチドに比べてコントラストは極わずかであった(白色矢印が腫瘍を指している)。(D)また、アルブミン反応性ペプチドをポリオーマミドルT自然発生腫瘍に注入す

50

ることもでき、切断可能および切断不可能ペプチドの間で差異が認められる。

【図3】HT1080腫瘍の組織像は、ほとんどの取り込みは、腫瘍ストローマ界面で起こったことを示している。(A)HT1080腫瘍の低および高倍率の蛍光組織像およびH&E染色像で、切断可能なペプチドでは多くの取り込みが腫瘍ストローマ界面の腫瘍莖膜近傍にあることを示す。(B)切断不可能なペプチドは、切断可能な腫瘍に比べ取り込みが少なかった。

【図4】アルブミン反応性選択的輸送分子では、4T1.2マウス乳房腺癌移植組織で大きなコントラストが得られた。6匹のマウスに3nmolのアルブミン反応性選択的輸送分子を注入した。3匹のマウスは、切断可能なペプチドで、3匹は切断不可能ペプチドとした。マウスを24時間後屠殺し、皮膚を除去し、マウスを画像化した。肺への転移を検出するため、1セットのマウスは非常に大きな腫瘍に成長させた。

【図5】4T1.2マウスにおけるアルブミン反応性選択的輸送分子の腫瘍組織像。(A)は、低および高倍率の4T1.2腫瘍の蛍光組織像およびH&E像で、切断可能なアルブミン反応性ペプチドの腫瘍実質での大きな取り込みおよび間質性侵入領域でのさらに大きな取り込みを示す。壊死領域では、前述の遊離ペプチド注入でみられたような大きな取り込みはなかった。(B)は、取り込みの少ない、切断不可能ペプチドを注入したマウスからの腫瘍の蛍光像およびH&E像を示す。

【図6】アルブミン反応性選択的輸送分子は、特異的な様式で肺転移に取り込まれる。(A)大きな4T1.2腫瘍を有するマウスの肺の全体像で、肺全体にわたり明るい蛍光小斑点が認められる。シグナルは、切断不可能ペプチド注入に比べ、切断可能なペプチドを注入したマウスの小斑点および実質中の方が明るい。(B)肺の蛍光組織像およびH&E像により転移の存在が確認される。(C)切断可能な選択的輸送分子ペプチドで染色された小さい転移。

【図7】3つの主要タイプの選択的輸送分子の比較で、アルブミン反応性選択的輸送分子は、他の構成に対して改善とまではいかないまでも、同等であることを示す。ここに示される3匹の4T1.2担腫瘍マウスを用い、3つの異なる選択的輸送分子デザインを試験し、どれが最良のコントラストを与え、背景組織への特異的取り込みを低減させるかを判定した。左パネルは、最適コントラストになる注入6時間後の遊離ペプチド、次に中央パネルは48時間後のPAMAMデンドリマー、さらに右パネルは、注入24時間後のアルブミン反応性ペプチドを示す。

【図8】選択的輸送分子の血漿に対する前反応により半減期および腫瘍取り込みが大きく増加する。(A)4T1.2担腫瘍マウスへの注入前の選択的輸送分子の新鮮凍結血漿との30分間の前反応により、前反応していない反応ペプチドに比べて、注入の3、24および48時間後の血中濃度が大きく増加した。これらの蛍光像は、前反応なしのアルブミン反応性選択的輸送分子、および血漿と前反応させた選択的輸送分子をそれぞれ有する2匹のマウスのIV注入後の上記の異なる時点で描画した毛細血管を示す。(B)前反応なしと前反応ありのアルブミン反応性選択的輸送分子を有する4T1.2腫瘍の注入48時間後の蛍光像。2匹のマウスに対しそれぞれ同時に注入処置をした。(C)Cy5-マレイミド対照は、選択的輸送分子ペプチドよりも腫瘍中の蓄積が少ない。画像は輝度を5倍にした。

【図9】 $^{111}\text{In}$  標識付けしたアルブミン反応性選択的輸送分子を使って臨床的コントラストが達成できる。(A)0.3nmolの切断可能および切断不可能アルブミン反応性選択的輸送分子を注入したマウスの平面ガンマ画像。黒矢印は、注入48時間後、腫瘍が良いコントラストを呈することを示す。青矢印は、ペプチドが腎臓を通して除去される場合、多くのペプチドは保持され、ゆっくり除去されることを示す。(B)注入48時間後に画像化した、 $^{111}\text{In}$  およびCy5で二重標識したアルブミン結合ペプチドからの腫瘍の蛍光画像。腫瘍蛍光は、標準光学的用量よりも10倍低い用量で検出可能であった。(C)%ID/gで表した複数の組織の体内分布で、切断可能および切断不可能ペプチドの間のわずかな差を示す。さらに大きなペプチドの分布が、肝臓および腎臓でのみ認められた。(D)以前の調査で試験したデンドリマーベースの選択的輸送分子に比べ、アル

10

20

30

40

50

ブミン反応性選択的輸送分子で組織のより大きなコントラストが認められたことを示す表。

【図10】遊離ペプチド薬剤は、重大な毒性を有し、ほとんど治療の活性は持たなかった。(A)遊離ペプチド選択的輸送分子ベース薬剤結合の模式図。蛋白質分解時にポリアルギニン-薬剤が放出され、細胞による取り込みが可能になり、治療活性が付与される。(B)  $\text{Suc-e}_8\text{-xPLGLAG-r}_9\text{-c(ss)}$ -ポドフィロトキシン(選択的輸送分子-Podo)の構造。(C)HT1080異種移植組織を、選択的輸送分子-Podo薬剤共役体および賦形剤、選択的輸送分子、ならびにPodo対照のIP注入により  $10\mu\text{mol/kg}$  で3回処置した(矢印=注入日)。遊離ペプチドPodoの治療活性は選択的輸送分子治療の毒性と関連し、3回投与後重量減少および瀕死が発生した。Podo単独では、治療活性も毒性もなかった。(D)実験期間を通してのマウス体重により、選択的輸送分子および選択的輸送分子-Podo治療が、体重の減少から判断される重大な毒性につながることを示されている。

10

【図11】ドキソルビン共役化デンドリマーの構造と品質管理。(A)抗腫瘍活性に対し選別されたデンドリマーを含む4つのドキソルビンの構造。チオエーテルは安定なチオール共役体である。芳香族化合物、尿素、およびPegは、試験した種々のドキソルビン酸不安定性ヒドラゾンリンカーである。(B)pH7.4およびpH5で18時間処理した種々のデンドリマーのゲル濾過アッセイにより、どのリンカーが最も酸反応性が高いかを判定する。チオエーテルは、遊離ドキソルビン混入がほとんど検出できず、かなりデンドリマーに付着した。芳香族化合物と尿素ヒドラゾンリンカーは、それほど酸反応性ではなく、多くの遊離薬剤混入物があった。Pegリンカーは、ずっと好ましい加水分解能力を有していた。

20

【図12】尿素およびPegドキソルビンヒドラゾンリンカーを試験した動物では画像化が可能となり、治療活性が生じた。(A)ドキソルビン、尿素PAMAMヒドラゾン-Dox、PegPAMAMヒドラゾン-Dox、およびPBS対照で治療したマウスの画像。動物を467/47励起光で励起し、スペクトラムキューブ(spectral cube)データを集めた。ドキソルビン蛍光を画像からデコンボリュートし、自発蛍光に重ね合わせた。(B)両セットのマウスの腫瘍を、切開後のマウスと同様に画像化した。デコンボリュートした蛍光画像を、重ね合わせの画像の下にグレースケールで示す。4つの治療群は、(A)の場合と同じ順番で、実験からの両セットの腫瘍を示す。下のパネルは、明視野像で、1つのセットの半分をカットした腫瘍をスペクトル的にデコンボリュートした画像で、Pegdoxデンドリマーの重要な壊死性コアを示す。(C)1日1回注入を行う尿素およびPegリンカー試験実験の全部で8匹のマウスの腫瘍成長曲線。(D)体重実験の継続期間を通して大きな体重の変化はなかった。

30

【図13】ドキソルビンデンドリマー結合選択的輸送分子の品質管理とマウス実験。(A)多くの大分子量凝集体および遊離ドキソルビンがこの精製法により除去されたことを示すカラム濾過前後の再懸濁ドキソルビンデンドリマーのゲル。(B)酸性条件下でドキソルビンの加水分解される能力を示す合成された3つのデンドリマーのゲル。ゲルは、Peg8でキャップした選択的輸送分子G5PAMAMデンドリマー、Peg4-OHでキャップした選択的輸送分子デンドリマー、および選択的輸送分子を持たないPeg8でキャップしたドキソルビンデンドリマーを示している。(C)  $1\text{mg/kg}$  のデンドリマー含有選択的輸送分子を注入したHT1080異種移植マウスの腫瘍成長曲線で、ドキソルビン単独およびドキソルビン被覆デンドリマーの低用量投与では腫瘍成長を大きく阻害するには不十分であることを示している。

40

【図14】pDox結合Cy5デンドリマーの検証。(A)中性pHまたはpH5で一晩処理したpDoxCy5PAMAMデンドリマーのHPLC結果。pDoxおよびCy5標識付けしたデンドリマーそれぞれの特定に有用な470~490nmおよび645~655nm両方の吸光度出力を示す。pH5でインキュベーション後、470~490チャンネルにpDoxであることが確実な新しいピークが現れた。(B)は、pDox結合および加水分解デンドリマーの高感度蛍光検出および定量に使った異なるHPLCに対する

50

Cy5 吸光度および pDox 蛍光 HPLC 結果を示す。(C) pDox 校正用標準の複数の分解ピークがあることがわかった。

【図15】pDox デンドリマーは、腫瘍成長を遅延させ Cy5 デンドリマー 蛍光は注入 11 日後に検出可能である。(A) は、HT1080 異種移植組織の腫瘍成長曲線で、より高用量の pDox デンドリマーは、賦形剤およびより低用量のものより腫瘍成長を遅延させたことを示している。(B) pDox デンドリマー 治療マウスの屠殺および解剖時に 蛍光像を採取し、11 日後でも実質的な量のデンドリマーがマウス全体に残されていたことを示す。

【図16】選択的輸送分子を合成して、パクリタキセルのアルブミン懸濁液をコートすることが可能である。(A) は、アブラキサン(Abraxis) ウェブサイトから引用した 10 130 nm アルブミン外皮でコートして懸濁したコロイド状パクリタキセルおよびそのナノ粒子の透過電子顕微鏡を示す。ここで、選択的輸送分子をアブラキサンの表面に対して反応させることが可能であることが示されており、これは、腫瘍に対するアブラキサンの標的化を強化するのに使用可能であると思われる。(B) アルブミンに対して 1 および 10 % モルパーセントの選択的輸送分子を、30 分の再懸濁の間に、アブラキサン表面の選択的輸送分子の 84 % までと反応させることができることを示している。この強力な反応は、より長いインキュベーション時間または超音波処理とは無関係である。(C) アブラキサンと反応した時点で、選択的輸送分子は MMP-9 酵素で治療時にナノ粒子から切断可能で、1 時間以内にほぼ完了する。(D) は、選択的輸送分子ペプチドの有無の場合の再懸濁したアブラキサンは、単分散であって、130 nm の z - 平均直径を有する 20 ことを確認する、動的光散乱の結果である。

【図17】ドキソルビシン含有ペグ化リボソームは選択的輸送分子でコート可能である。(A) 選択的輸送分子でコートされたリボソームの模式図。MMP 酵素による切断により CPP 特性の回復および細胞の取り込み強化がなされる。(B) 製剤の間にペグ化リボソームへの組み込み用に合成した DSPE 選択的輸送分子 - Cy5 の化学構造。(C) ドキソルビシン含有の選択的輸送分子でコートしたペグ化リボソームの代表的なサイズと容量 % の関係の動的光散乱プロット。これは、リボソームが z - 平均サイズ 130 nm を有する単分散であることを示している。(D) 選択的輸送分子でコートされるドキソルビシンリボソームは、MMP-9 とのインキュベーション時にリボソーム表面から切断できる。SDS-PAGE により、DSPE - 選択的輸送分子 Cy5 から多くの Cy5 - e<sub>9</sub> が切断されたことが確認された。 30

【図18】リボソーム上の表面選択的輸送分子および培養中の取り込みの間では線形関係があるが、インビボではそれが無い。(A) HT1080 ヒト線維肉腫細胞を選択的輸送分子コートペグ化リボソーム中で 50 μM のドキソルビシンと共に 30 分間インキュベートし、次いで 3 回洗浄した後、最初の治療 1 時間後に画像化した。共焦点顕微鏡により、より多くのモル % の選択的輸送分子含有ペグ化脂質で、より多くのドキソルビシン(緑)の細胞への取り込みがあることが示された。0.3 % および選択的輸送分子リボソーム無しの場合は、画像の再設定なしでは検出困難であった(挿入図)。(B) 0.3、1、および 3 モル % の選択的輸送分子でコートされたリボソームを HT1080 担腫瘍異種移植マウスにドキソルビシンの 3 mg / kg 当量を IV 注入した。この治療を、賦形剤対照(300 mM ショ糖緩衝液)および非標的化ドキソルビシンリボソームと比較した。0.3 % 選択的輸送分子は、10 ~ 17 日目からドキソルビシンリボソームに比べて統計的に有意であった(p 値 < 0.02、t 検定)。それぞれ 2 つの腫瘍を持つ 4 匹のマウスを群毎に処置した(3 % 選択的輸送分子の 3 匹のマウスを除く)。 40

【図19】凝集は治療効果を無くさせる。(A) 動的光散乱結果により、リボソームの調製の際、遠心分離で濃縮後に凝集したことが示された。この凝集は、0.2 μm フィルターを通過後も存在した。左パネルは、0.3 モル % ドキソルビシンリボソーム調製物の微小凝集を示し、右パネルは、新しい非濃縮調製物を示す。(B) 非凝集調製物と一対で試験した際、凝集したリボソームは動物で治療効果が無かった。それぞれ 2 つの腫瘍を有する 4 匹のマウスに、3 mg / kg の 0.3 % 新しい調製物、非標的化ドキソルビシンリ 50

ボソーム、および賦形剤単独を注入した。

【図 20】より少ない選択的輸送分子で、より大きな治療効果が得られる；切断不可能対照ペプチドは、切断可能なペプチドほど効果的ではない。(A) 治療群当たり 8 匹の 1 つの腫瘍保持 H T 1 0 8 0 マウスに、3 m g / k g ドキソルビン当量を 8 および 2 2 日目に注入した。1 リボソーム当たり約 9 または 2 7 選択的輸送分子として、0 . 1 および 0 . 3 モル % ペプチドを標識付けした。このデータは、選択的輸送分子の数を減らすと、腫瘍成長曲線に関する治療効果がさらに増すことを示している。(B) チャートは、1 8、2 1、2 5、および 2 9 日目に t 検定により決定した p 値を示す。それぞれの時点で、9 選択的輸送分子および非標的化対照の間で統計的有意性があり、腫瘍容量で 4 倍にもなる差異があった。このデータは、ペプチドの 0 . 1 および 0 . 3 モル % の非標的化リボソームに対する比較、ならびに切断可能タイプ対切断不可能タイプの比較を示す。(C) 全治療群は実験の終わりまでに重量減があった。

10

【図 21】血液中半減期およびキャリアサイズの間関係。3 0 k D 以上の分子における変動は、キャリアの形による (線状 v s 球状)。

【図 22】リンパ節取り込みは腫瘍および切断の両方に依存する。デキストラン切断可能選択的輸送分子の注入 4 8 時間後における担腫瘍マウス由来 (A) および非担腫瘍マウス (B) の暴露リンパ節の全体像を示す。このような構造の素性は、凍結切片断面組織像 (C) および (D) により確認された (スケールバー = 1 m m)。(E) および (F) は、切断可能 (E) および切断不可能 (F) デキストラン結合ペプチドを注入後 4 8 時間後のマウス由来のリンパ節である (スケールバー = 2 0 0 μ m)。

20

【図 23】リンパ節染色は F 4 / 8 0 産生貪食細胞に限定される。(A) は、リンパ節の c y 5 像の拡大を示す。(B) は、F 4 / 8 0 に対する F I T C - 標識抗体で染色した連続切片を示す。(C) は、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色した連続切片を示す。挿入図は、明るく染色した領域の細胞形態を示す (スケールバー = 2 0 0 μ m)。

【図 24】P E G - 1 2 k D に結合したペプチド。(A) は、4 . 8 n m o l の切断可能 P E G - 1 2 に結合したペプチドを注入 2 時間後のマウスを示す。挿入図は、注入構築物の純粋さを証明する分析ゲルである。(B) は、切断不可能 d - アミノ酸ペプチドに対する同様の結果である。(C) は、時間に対する指示領域の相対強度を示す。

【図 25】アルブミンに結合したペプチド。(A) 分析ゲル結果で、注入液の純度および 4 . 5 n m o l のアルブミンに結合した切断可能ペプチドを注入後 3 6 時間のマウスを示す。(B) は、切断不可能 d - アミノ酸ペプチドに関して同様の結果を示す。(C) は、時間に対する示される領域の正規化強度を示す。

30

【図 26】7 0 k D デキストランに結合したペプチド。(A) は、6 n m o l の 7 0 k D デキストランに結合した切断可能ペプチドを注入 3 6 時間後のマウスを示す。注入液の分析ゲルを各マウスの左側に示す。暗黒色矢印は、所望の生成物と思われるものを指している；明るい色の矢印は、遊離ペプチドを指している。(B) は、切断不可能 d - アミノ酸ペプチドに関して同様の内容を示している。(C) は、時間に対する示される領域の正規化強度を示す。

【図 27】P A M A M デンドリマーに結合したペプチド。(A) は、4 . 5 n m o l の第 5 世代サクシニルキャップ P A M A M デンドリマーに結合した切断可能な (P L G L A X) ペプチドを注入 3 6 時間後のマウスを示す。注入液の分析ゲルを、各マウスの左側に示す。暗黒色矢印は、所望の生成物を示す；明るい色の矢印は、遊離ペプチドを指している。(B) は、類似の P E G - 4 キャップデンドリマーに関して同様の内容を示す。(C) は、時間に対する示される領域の正規化強度を示す。最初の画像はオレンジフィルターで撮影し、2 番目のものは赤色フィルターで撮影したことに注意されたい。

40

【図 28】より急速に切断する配列は、P E G - 4 でキャップされた選択的輸送分子の取り込みを増加させる。(A) 注入液純度、および 3 n m o l の第 5 世代 P E G - 4 キャップ P A M A M デンドリマーに結合した切断可能 (P L G (M e C) A G) ペプチドを注入 4 8 時間後のマウスを示す分析ゲルである。暗黒色矢印は、所望の生成物を示す；明るい色の矢印は、遊離ペプチドを指している。(B) は、P L G L A G を切断配列として使っ

50

た類似の構築物に関して同様の内容を示す。(C)は、時間に対する示される領域の正規化強度を示す。

【図29】選択的輸送分子が結合したデキストランの注入後の動物のT1-MRI画像化。(A)は、注入前および48時間後のPyMTマウスの比較を示す。腫瘍対ファントム比率の比較に有意差がないことに注意されたい。(B)は、注入前および48時間後の野生型マウスの比較を示す。(C)は、非注入野生型およびPyMT注入マウスの推定頸部リンパ節領域の緩和速度を示す。

【図30】PAMAM構築物用純度ゲル。グリシジルおよびPEG-16構築物は、この方法を使った動物への注入用としては許容できないと思われる。

【図31】スルホベンゾイルキャップ化合物を注入したマウスのインビボ経時変化。挿入図は、採取した器官の蛍光像を示す。

【図32】アセチルおよびサクシニルでキャップした dendritic マーを注入したマウスのインビボ像。(A)は、アセチルキャップ dendritic マー注入直後、24時間後および48時間後のマウスの像を示す。蛍光解剖像を示し、T(腫瘍)、L(肝臓)およびK(腎臓)の符号が付されている。(B)は、胸郭上に描画された腫瘍およびバックグラウンド領域の相対強度を示す。比較を容易にするため、最高のバックグラウンド値を1に正規化した。(C)と(D)は、サクシニルキャップ化合物に対して、類似のデータを示す。

【図33】PEG-2、PEG-4、PEG-8およびPEG-12でキャップされた dendritic マーを注入したマウスの代表的インビボ像。(A)は、PEG-2でキャップされた dendritic マー注入直後、24時間後および48時間後のマウスの像を示す。蛍光解剖像を示し、T(腫瘍)、L(肝臓)およびK(腎臓)の符号が付されている。(B)は、胸郭上に描画された腫瘍およびバックグラウンド領域の相対強度を示す。比較を容易にするため、最高のバックグラウンド値を1に正規化した。(C)と(D)は、PEG-4でキャップされた化合物に対して、類似のデータを、(E)と(F)は、PEG-8でキャップされた化合物に対して、類似のデータを示す。PEG-12はPEG-8と類似の挙動をした。

【図34】示されたキャップを有する dendritic マーに対する器官組織像。

【図35】 dendritic マーナノ粒子に結合した選択的輸送分子は、腫瘍中への48時間後もそのままとどまっている局所的取り込みを引き起こす。(A)は新規分子の模式図である。選択的輸送分子は、ポリアニオンを介して結合される。切断時、ポリアニオンが放出され、残された高帯電分子が細胞に付着し、侵入する。(B~D)は、10 nmol の cy5 を注入48時間後の像を示す。(E)は、 dendritic マーナノ粒子に結合した切断可能および全 d-アミノ酸選択的輸送分子を注入した動物由来のスキンバリュー(skin value)を、切断可能遊離ペプチドを注入した動物のものと比較したコマ撮りデータを示す。(F)は、3つのペプチド由来の腫瘍、肝臓、腎臓および筋肉を比較して、標準化取り込み値を示す。遊離ペプチドデータは、6時間後のPLG-C(me)-AGペプチド由来である(MeC=S-メチルシステイン)。

【図36】プロテアーゼ依存性取り込みにより、MMTV-PyMTマウスに切断可能プローブを注入後の残留腫瘍が強調される。(A)は、プローブ注入および皮膚除去後、48時間のPyMTマウスを示す。(B)は、腫瘍の全体除去後の同じマウスを示す。胸筋肉上に腫瘍片が残っている。(C)は、胸筋肉除去後のマウスを示し、挿入図は筋肉である。小片の残留腫瘍が存在する。(D)は、腫瘍と胸筋肉の間の界面で強いプロテアーゼ活性化バンドを示す腫瘍片の断面を示す。(E)は、MMTV-PyMTモデルの切断可能で全 d-アミノ酸プローブに対する標準化した取り込み値を、PAMAM dendritic マー単独に比較して示す。

【図37】 dendritic マーナノ粒子コントラスト剤に結合した選択的輸送分子は輝度が大きく、匹敵する脱消光剤よりも大きなコントラストを示す。(A)および(B)は、選択的輸送分子弾(A)またはProSense、細胞内のカテプシンにより活性化された脱消光プローブ(B)のいずれかを注入した代表的マウスを示す。各マウスは、最良のコントラストになると思われる時間で屠殺された(メーカーのインストラクションに従って、選

10

20

30

40

50



択的輸送分子は48時間、ProSenseでは、24時間)。(E~G)および(H~J)は、それぞれ(A)および(B)のマウス由来肺転移全体像および凍結切片組織像を示す(スケールバー=200μm)。(K)および(L)は、それぞれ(E)および(H)で示された肺転移の定量的取り込みデータおよび蛍光比を示す。

【図38】ガドリニウム含有のデンドリマーナノ粒子に結合した選択的輸送分子は、T1 MRIによるプロテアーゼ活性の可視化を可能とする。(A)プローブ無し(左)、切断可能プローブ(PLG-C(me)-AG:中央)または全d-アミノ酸対照プローブ(plg-(meC)ag:右)を注入48時間後のHT-1080異種移植組織を有する動物の画像。(B)は、注入を受けなかったマウスの値と比較した、切断可能および切断不可能プローブの強度とT1測定値の差を示す。T1および緩和能を水ファントム強度に正規化しスキャン間の変動を考慮に入れた。(C)は、切断可能なまたは全d-アミノ酸対照プローブを注入した動物由来の組織中のガドリニウムの標準化取り込み値を示す。ガドリニウムはICPMSを使って定量化した。

【図39】高い局所的ガドリニウム取り込みのある腫瘍領域は、マクロファージ媒介による筋肉への腫瘍侵入と相互に関係がある。(A)は、T1強調MRI像で、周辺筋肉への腫瘍の浸潤を示す。アキシャル、コロナルおよびサジタルスライスを示す。(B)は、対応する光学像を示す。(C~F):(C)は、cy5蛍光を調べるために画像化した同じ腫瘍の組織切片を示す。(D)は、同じスライスのインサイチュー酵素電気泳動を示す。スケールバーは200μmを示す。(E)は、さらに高い出力でインサイチュー酵素電気泳動を重ね合わせたcy5領域を示す。(F)は、素性を確認する目的のための(E)に示す領域のH/E画像を示す。

【図40】T1 MRIを使った肺のプローブの可視化。高輝度細胞の素性は未確認である。

【発明を実施するための形態】

【0018】

発明の詳細な説明

選択的輸送分子は、治療薬および/または造影剤の特定細胞および/または組織を標的にした送達を可能にする。選択的輸送分子は、(a)分子輸送配列(B部)、(b)B部に結合した積荷(CまたはD部)および(c)細胞への取り込みを抑制または防ぐのに有効である酸性のA部を含む。B部からA部の分離を可能にするリンカーXの切断は、B部および付随する積荷を細胞中に取り込ませるのに有効である。しかし、選択的輸送分子は、短い血漿中半減期、広範囲への分布、および特異的および非特異的取り込みを有する複数の組織からの遅い洗い流しを伴った急速な薬物動態学的送達にさらされる可能性がある。このように、インビボ循環の増加および血管外漏出選択性の調節がなされた選択的輸送分子に対するニーズが存在する。

【0019】

本明細書中の特定の実施形態では、インビボで循環性が増加した選択的輸送分子が開示される。

【0020】

一部の実施形態では、本明細書で開示の選択的輸送分子は、式(A-X-B-C)-Mを有し、Cは、積荷成分;Aは、5~9個の連続した酸性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり、該アミノ酸はアスパルタートおよびグルタマートから選択され;Bは、5~20個の連続した塩基性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり;Xは、リンカーであり;かつMは、高分子キャリアである。

【0021】

一部の実施形態では、本明細書で開示の選択的輸送分子は、式(A-X-B)-Dを有し、Cは、積荷成分;Aは、5~9個の連続した酸性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり、該アミノ酸はアスパルタートおよびグルタマートから選択され;Bは、5~20個の連続した塩基性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり;Xは、リンカーであり;Dは、デンドリマーである。一部の実施形態では、Dは、積荷成分を含む。

## 【0022】

## 定義

下記の用語は、特に他に定めがなければ、そこに記された意味を持つ。

## 【0023】

用語の細胞透過性ペプチド (CPP)、膜輸送配列 (MTS) およびタンパク質伝達ドメインは同義に使われる。本明細書で使われるこの用語は、細胞の細胞膜を通過して転移させるペプチド (ポリペプチドまたはタンパク質) 配列を意味する。一部の実施形態では、CPPは、細胞の細胞膜を通過して細胞外の分子を転移させる。一部の実施形態では、CPPは、細胞膜への直接侵入、エンドサイトーシス媒介侵入、または一時的構造の形成、により細胞膜を通過して転移させる。

10

## 【0024】

本明細書で使用されるように、用語の「アプタマー」は、標的分子との非ワトソン・クリック相互作用に基づく高親和性と特異性を有する他の分子との結合能力に基づいてランダムプールから選択されるDNAまたはRNA分子を指す (例えば、Cox and Ellington, Bioorg. Med. Chem. 9: 2525 - 2531 (2001); Lee et al., Nuc. Acids Res. 32: D95 - D100 (2004)) を参照。一部の実施形態では、アプタマーは、核酸、タンパク質、低分子有機化合物、ビタミン、無機化合物、細胞、および生命体そのものにも、結合する。

## 【0025】

用語の「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、本明細書では同義に使われ、アミノ酸残基のポリマーを指す。この用語は、天然アミノ酸ポリマーならびに1つまたは複数のアミノ酸残基が非天然アミノ酸 (例えば、アミノ酸類似体) であるアミノ酸ポリマーに適用される。この用語は、完全長タンパク質 (すなわち、抗原) を含む任意の長さのアミノ酸鎖を包含し、アミノ酸残基は、ペプチド結合により共有結合されている。本明細書で使われる用語「ペプチド」は、アミノ酸残基のポリマーを指し、通常は、長さは2 ~ 約50残基の範囲である。特定の実施形態では、ペプチドは約2、3、4、5、7、9、10、または11残基 ~ 約50、45、40、45、30、25、20、または15残基の長さの範囲である。特定の実施形態では、ペプチドは8、9、10、11、または12残基 ~ 約15、20または25残基の長さの範囲である。本明細書でアミノ酸配列が提供されている場合は、L-、D-、またはベータアミノ酸の配列タイプ、ならびに逆、反転、および逆反転イソ型も同様に意図されている。また、ペプチドは、1つまたは複数のアミノ酸残基が対応する天然アミノ酸、ならびに天然アミノ酸ポリマーの人工的化学類似体であるアミノ酸ポリマーを含む。さらに、この用語は、ペプチド結合または他の修飾された結合 (例えば、ペプチド結合が - エステル、- エステル、チオアミド、ホスホンアミド、カルバマート、ヒドロキシラート、等で置換されている結合 (例えば、Spatola, (1983) Chem. Biochem. Amino Acids and Proteins 7: 267 - 357 を参照)、アミドが飽和アミンで置換されている結合 (例えば、Skiles et al., 米国特許第4,496,542号 (この特許は、参照により本明細書に組み込まれる)、およびKaltenbronn et al., (1990) Pp. 969 - 970 in Proc. 11th American Peptide Symposium, ESCOM Science Publishers, The Netherlands、等を参照))、により結合されているアミノ酸に適用される。

20

30

40

## 【0026】

用語の「アミノ酸」は、天然および合成アミノ酸、ならびに天然アミノ酸と類似の方式で機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣体を指す。天然アミノ酸は、遺伝暗号によりコードされているもの、ならびに後で修飾されたもので、例えば、ヒドロキシプロリン、- カルボキシグルタマート、およびO-ホスホセリンである。アミノ酸類似体は、天然アミノ酸と同じ基本的化学構造、すなわち、水素に結合したカーボン、カルボキシル基、アミノ基、およびR基、例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルフォキ

50

シド、を有する化合物を指す。このような類似体は、修飾 R 基（例えば、ノルロイシン）または修飾ペプチド骨格を有し、しかも天然アミノ酸と同じ基本的化学構造を維持している。アミノ酸模倣体は、アミノ酸の一般化学構造とは異なる構造を有するが、天然アミノ酸と類似の方式で機能する化学的化合物を指す。アミノ酸は、D アミノ酸または L アミノ酸であってもよい。明細書中のペプチド配列で、小文字はアミノ酸の D 異性体を示している（逆に、大文字はアミノ酸の L 異性体を示している）。

#### 【0027】

本明細書では、アミノ酸は、通常よく知られた 3 文字記号でも、または I U P A C - I U B B i o c h e m i c a l N o m e n c l a t u r e C o m m i s s i o n 推奨の 1 文字記号で呼んでもよい。同様に、ヌクレオチドは、通常受け入れられている 1 文字コードで呼んでもよい。

10

#### 【0028】

コード化配列中の単一アミノ酸または小さいパーセンテージのアミノ酸を変更、追加、または削除する、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質配列への個々の置換、欠失または付加は、「保存的改変変異体」であり、この場合、変更により化学的に類似のアミノ酸によるアミノ酸の置換が生ずることは同業者なら認識しているであろう。機能的に類似のアミノ酸を与える保存的置換表は当技術分野でよく知られている。このような保存的改変変異体は、本発明の多形性変異体、種間相同体、および対立遺伝子を追加し、排除しない。

20

#### 【0029】

下記の 8 つのグループはそれぞれ相互に保存的置換できるアミノ酸を含む：1) アラニン (A)、グリシン (G)；2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)；3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q)；4) アルギニン (R)、リジン (K)；5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V)；6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W)；7) セリン (S)、トレオニン (T)；および 8) システイン (C)、メチオニン (M)（例えば、C r e i g h t o n、P r o t e i n s ( 1 9 8 4 ) を参照）。

#### 【0030】

本明細書で使われる「リンカー」は、本明細書で開示の選択的輸送分子の A 部と B 部を結合（例えば、共有結合で）できる任意の分子である。リンカーには、限定されないが、直鎖または分岐鎖炭素リンカー、複素環式炭素リンカー、ペプチドリリンカー、およびポリエーテルリンカーが含まれる。例えば、ポリ（エチレングリコール）リンカーは、Q u a n t a B i o d e s i g n、P o w e l l、OH から入手可能である。これらのリンカーは、任意選択で、アミドリリンケージ、スルフヒドリルリンケージ、またはヘテロ官能化リンケージを持ってもよい。

30

#### 【0031】

本明細書で使われる用語の「標識」は、本明細書で開示の選択的輸送分子の可視化および/または検出を促進する任意の分子を指す。一部の実施形態では、標識は、蛍光成分である。

#### 【0032】

用語の「キャリア」は、(a) 血漿中半減期および (b) 溶解度を増加させる不活性の分子を意味する。一部の実施形態では、キャリアは系球体濾過を減らすことにより血漿中半減期および溶解度を増加させる。一部の実施形態では、キャリアは腫瘍血管系の血管透過性・滞留性亢進 (E P R) による腫瘍取り込みを増加させる。

40

#### 【0033】

用語の「個体 ( i n d i v i d u a l )」、「患者 ( p a t i e n t )」または「対象 ( s u b j e c t )」は同意義に使われる。本明細書で使われるように、これらは任意の哺乳動物（すなわち、分類学による分類の動物界：脊索動物門：脊椎動物亜門：哺乳綱の任意の目、科、および属の種）を意味する。一部の実施形態では、哺乳動物はヒトである。この用語は、健康ケアワーカー（例えば、医師、登録看護師、上級看護師、医師の助手

50

、看護師、またはホスピスワーカー)の監督(例えば、定常的または断続的な)を特徴とする状況を要求しない、またはこの状況に限定されないことに留意されたい。

#### 【0034】

用語の「投与する(administer)」、「投与(administering)」、「投与(administration)」、等は、本明細書で使用されるように、生物学的な作用を行う所望の部位に薬剤または組成物を送達させるために使用可能な方法を指す。これらの方法には、限定されないが、非経口の注入(例えば、静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内、血管内、鞘内、硝子体内、温浸、または局所)が含まれる。任意選択で本明細書の薬剤と方法と共に採用される投与技術には、例えば、Goodman and Gilman、The Pharmacological Basis of Therapeutics, current ed. (治療薬の薬理学的基礎、最新版); Pergamon; および Remington's, Pharmaceutical Sciences (current edition) (レミントンの薬学(最新版))、Mack Publishing Co., Easton, Pa、で考察されている技術が含まれる。

10

#### 【0035】

本明細書で使用されるように、用語の「薬学的に許容可能な」は、本明細書記載の薬剤の生物活性または特性を抑制しない材料で、相対的に無毒(すなわち、その材料の毒性がその材料の利益を大きく凌いでいる)である材料を指す。一部の例では、薬学的に許容可能な材料は、大きな望ましくない生物学的影響を与えることなく、または有害な形で含まれている組成物の構成成分と大きく相互作用することなく、個体に投与可能である。

20

#### 【0036】

本明細書で使われる用語の「手術」は、物理的介入により作用を操作し、変更し、または引き起こすために使用することが可能な方法を指す。これらの方法には、限定されないが、観血療法、内視鏡外科手術、腹腔鏡下手術、低侵襲手術、およびロボット手術が含まれる。

#### 【0037】

下記の記号が使われる場合は、以下に示す意味を有する: Fl = フルオレセイン; aca = ahx = X = アミノカプロン酸リンカー(-HN-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-CO-); C = L-システイン; E = L-グルタマート; R = L-アルギニン; D = L-アスパルタート; K = L-リジン; A = L-アラニン; r = D-アルギニン; c = D-システイン; e = D-グルタマート; P = L-プロリン; L = L-ロイシン; G = グリシン; V = バリン; I = イソロイシン; M = メチオニン; F = フェニルアラニン; Y = チロシン; W = トリプトファン; H = ヒスチジン; Q = グルタミン; N = アスパラギン; S = セリン; および T = トレオニン。

30

#### 【0038】

##### 選択的輸送分子

細胞内へのおよび外への輸送の調節は細胞の生存継続のために重要である。例えば、細胞膜は、多くの重要な物質の膜透過を促進することができるイオンチャネル、ポンプ、および交換体を含む。しかし、膜貫通輸送は選択的である: 所望の物質の細胞内への侵入を促進し、他のものの退出を促進することに加えて、細胞膜の主要な役割は、物質の無制御な細胞内への侵入を防ぐことである。この細胞膜のバリア機能が、マーカー、薬剤、核酸、および他の外部発生材料の細胞への送達を困難にしている。

40

#### 【0039】

複数の膜転移シグナル(MTS)が特定された。例えば、ヒト免疫不全ウイルス1(HIV-1)のTatタンパク質は、細胞外の環境から細胞内へ入ることができる。アンテナペディアホメオボックスタンパク質由来のドメインは、同様に、細胞に侵入可能である。

#### 【0040】

MTSを含む分子も同様に他の分子と一緒に細胞中に運び込むために使用可能である。

50

最も重要な M T S は、例えば、正に帯電した側鎖を有するアルギニンアミノ酸を多く含むものである。このような陽イオン性ペプチドにより細胞中に輸送される分子は、「積荷」と命名されてもよく、可逆的または非可逆的に陽イオン性ペプチドに結合してもよい。

#### 【 0 0 4 1 】

M T S を含む分子により促進された取り込みは、現状では特異性は無く、多くのまたは全部の細胞への取り込みを強化する。積荷の送達に関し、動物の身体の中の細胞のタイプ、または組織、または位置もしくは領域を標的にする能力を有することが望ましい。従って、我々は、インビボ循環を増加させた選択的輸送分子の必要性を特定した。

#### 【 0 0 4 2 】

一部の実施形態では、本明細書で開示される選択的輸送分子は、式 ( A - X - B - C ) - M を有し、式中、C は、積荷成分であり；A は、5 ～ 9 個の連続した酸性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり、該アミノ酸は、アスパルタートおよびグルタマートから選択され；B は、5 ～ 20 個の連続した塩基性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり；X は、リンカーであり；かつ M は、高分子キャリアである。

10

#### 【 0 0 4 3 】

一部の実施形態では、本明細書で開示される選択的輸送分子は、式 ( A - X - B ) - D を有し、C は、積荷成分であり；A は、5 ～ 9 個の連続した酸性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり、該アミノ酸は、アスパルタートおよびグルタマートから選択され；B は、5 ～ 20 個の連続した塩基性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり；X は、リンカーであり；D は、デンドリマーである。一部の実施形態では、D は、積荷成分を含む。

20

#### 【 0 0 4 4 】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される選択的輸送分子は、直鎖分子である。いくつかの実施形態では、本明細書で開示される選択的輸送分子は、図 1 B に模式的に記されたような環式分子である。いくつかの実施形態では、本明細書で開示される選択的輸送分子は、環式部と直鎖部を含む。

#### 【 0 0 4 5 】

本明細書で開示される選択的輸送分子は、任意の長さであってよい。一部の実施形態では、本明細書で開示される選択的輸送分子は、リンカー X および積荷成分 C の長さを含まずに、約 7 ～ 約 40 アミノ酸長さである。他の実施形態では、特に、複数の非酸性 ( A 部の ) または非塩基性 ( B 部の ) アミノ酸が A 部および B 部の 1 つまたは両方中に含まれる場合は、本明細書で開示される選択的輸送分子の A 部および B 部は合わせて約 50、または約 60、または約 70 アミノ酸長さであってよい。本明細書で開示される選択的輸送分子の環式部は、リンカー X および積荷成分 C の長さを含まずに、約 12 ～ 約 60 アミノ酸を含んでもよい。例えば、本明細書で開示される直鎖選択的輸送分子は、約 5 ～ 約 20 個の塩基性アミノ酸 ( 好ましくは、約 9 ～ 約 16 個の塩基性アミノ酸 ) の塩基性 B 部および約 2 ～ 約 20 個の酸性アミノ酸の酸性 A 部 ( 例えば、約 5 ～ 約 20 個、好ましくは、約 5 ～ 約 9 個の酸性アミノ酸 ) を有してもよい。一部の好ましい実施形態では、本明細書で開示される選択的輸送分子は、約 9 ～ 約 16 個の塩基性アミノ酸の塩基性 B 部および約 5 ～ 約 9 個の酸性アミノ酸を有してもよい。一部の実施形態では、A は 8 個の連続したグルタマート ( すなわち、E E E E E E E E、E<sub>9</sub>、e e e e e e e e e、または e<sub>9</sub> ) で、B は 9 個の連続したアルギニン ( すなわち、R R R R R R R R R、R<sub>9</sub>、r r r r r r r r r、または r<sub>9</sub> )、および X は P L G L A G である。

30

40

#### 【 0 0 4 6 】

一部の実施形態では、選択的輸送分子は、下記に示す式を有する。一部の例では、ペプチド配列は、アミノ酸記号と数で与えられることに注意されたい。この数は、アミノ酸の数を示す ( 例えば、R<sub>9</sub> は R R R R R R R R R または 9 個の連続した L - アルギニンとなり；r<sub>9</sub> は 9 個の連続した D - アルギニンまたは r r r r r r r r r となる ) 。

- EDDDDKA-aca-R<sub>9</sub>-aca-C(Fl)-CONH<sub>2</sub>
- Fl-aca-CRRRRRRRRR-aca-EEEEEEEEEC-CONH<sub>2</sub>
- Fl-aca-CEEEE-aca-RRRRRRRRRC-CONH<sub>2</sub>
- H<sub>2</sub>N-EEEEEDDDDKA-aca-RRRRRRRRR-aca-C(Fl)-CONH<sub>2</sub>
- H<sub>2</sub>N-EDDDDKA-aca-RRRRRRRRR-aca-C(Fl)-CONH<sub>2</sub>
- H<sub>2</sub>N-EEEEEDDDDKARRRRRRRRR-aca-C(Fl)-CONH<sub>2</sub>
- H<sub>2</sub>N-EEDDDDKA-aca-rrrrrrrrr-aca-C(Fl)-CONH<sub>2</sub>
- H<sub>2</sub>N-DDDDDDKARRRRRRRRR-aca-C(Fl)-CONH<sub>2</sub> 10
- H<sub>2</sub>N-EEDDDDKAR-aca-RR-aca-RR-aca-RR-aca-RR-aca-C(Fl)-CONH<sub>2</sub>
- H<sub>2</sub>N-eeeeee-aca-PLGLAG-rrrrrrrrr-aca-c(Fl)-CONH<sub>2</sub>
- EDA-aca-R<sub>5</sub>-aca-C(Fl)-CONH<sub>2</sub>
- EDDDDKA-aca-R<sub>6</sub>-aca-C(DOX)-CONH<sub>2</sub>
- EEEDDDEEEDA-aca-R<sub>9</sub>-aca-Y(<sup>125</sup>I)-CONH<sub>2</sub>
- ededdAAeeeDDDDKA-aca-R<sub>11</sub>-aca-C(Fl)-CONH<sub>2</sub>
- eddedededDDDDKA-aca-R<sub>6</sub>-AGA- R<sub>6</sub>-aca-C(DOX)-CONH<sub>2</sub> 20
- Ggedgddeeeeeedeed-aca-PLGLAG-aca- R<sub>8</sub>-AAA-R<sub>12</sub>-aca-C(Fl)-CONH<sub>2</sub>
- eeddeeddKA-aca-R<sub>7</sub>-aca-C(Fl)-CONH<sub>2</sub>
- eDDDDKA-aca-RGRGRRR-aca-C(Fl)-CONH<sub>2</sub>
- eddddeeeee-aca-PLGLAGKA-aca-R<sub>10</sub>-aca-C(Fl)-CONH<sub>2</sub>
- eeeeeeeeeeeee-aca-DDDDKA-aca-R<sub>20</sub>-aca-C(Fl)-CONH<sub>2</sub>
- eeeeeeeedddd-aca-DDDDKA-aca-R<sub>17</sub>-aca-Y(<sup>125</sup>I)-CONH<sub>2</sub>
- dddddddddddddd-aca-PLGLAG-aca-R<sub>14</sub>-aca-C(DOX)-CONH<sub>2</sub>
- NH<sub>2</sub>-eeeeee-ahx-PLG 30
- LAG-rrrrrrrrr-ahx-c(Fl)-CONH<sub>2</sub>, 「ahx」 はアミノヘキサン酸を示す
- EEEEEDDDDKAXRRRRRRRRRXC(Fl)
- EEEEEDDDDKARRRRRRRRRXC(Fl)
- EDDDDKAXRRRRRRRRRXC(Fl)
- EEDDDDKARXRRXRRXRRXRC(Fl)
- DDDDDDKARRRRRRRRRXC(Fl)
- EEDDDDKAXrrrrrrrrrXC(Fl)
- eeeeeXPLGLAGrrrrrrrrrXc(Fl) 40
- UeeeeeeeXPLGLAGrrrrrrrrrXk(Fl)
- eeeeeXPLGLAGrrrrrrrrrXc(Cy5)
- UeeeeXPLGLAGrrrrrrrrrXc(Cy5)
- UeeeeeeeXPLGLAGrrrrrrrrrXk(Cy5.5)

- 11-kDa PEG]XeeeeeeeeXPLGLAGrrrrrrrrXk(Cy5)
- [11-kDa PEG]XeeeeeeeeXLALGPGrrrrrrrrXk(Cy5)
- Fl-XrrrrrrrrXPLGLAGeeeeeeee-βAla
- Fl-XrrrrrrrrXSGRSAeeeeeeee-βAla
- eeeeeXSGRSAXrrrrrrrrXc(Cy5)
- Fl-rrrrrrrrc-SS-ceeeee
- スクシニル-e<sub>8</sub>-XPLGLAG-r<sub>9</sub>-Xk, Xは6-アミノヘキサノイルを示す
- [11 kDa PEG]-X-e<sub>9</sub>-XPLGLAG-r<sub>9</sub>
- [11-kDa PEG]-X-e<sub>9</sub>-XPLGLAG-r<sub>9</sub>-Xk(Cy5)
- H<sub>2</sub>N-e<sub>6</sub>-XPLGLAG-r<sub>9</sub>-Xc(Cy5)-CONH<sub>2</sub>, X=アミノヘキサン酸
- H<sub>2</sub>N-eeeeee-(ahx)-PLG LAG-rrrrrrrr-(ahx)-c(Fluor)-CONH<sub>2</sub>
- XeeeeeeeeXPLGLAGrrrrrrrrXk
- eeeeeeeeeXLALGPG-rrrrrrrrXk(Cy5)
- mPEG(11kd)-S-CH<sub>2</sub>-CONH-ahx-e<sub>9</sub>-ahx-PLGLAG-r<sub>9</sub>-ahx-k-CONH<sub>2</sub>
- mPEG-S-CH<sub>2</sub>CONH-e<sub>9</sub>-ahx-PLGLAG-r<sub>9</sub>-K[DOTA(Gd)]-CONH<sub>2</sub>
- (11 KDa-mPEG)-e<sub>9</sub>-XPLGLAG-r<sub>9</sub>-[DPK-<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]
- 70 KDa-デキストラン)-e<sub>9</sub>-XPLGLAG-r<sub>9</sub>-[DPK-<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]
- (マウス血清アルブミン)-e<sub>9</sub>-XPLGLAG-r<sub>9</sub>-[DPK-<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>],
- (PAMAM 第5世代デンドリマー)-e<sub>9</sub>-XPLGLAX-r<sub>9</sub>-[DPK-<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]
- (70 KDa デキストラン)-e<sub>9</sub>-XPLGLAX-r<sub>9</sub>-(DOTA-<sup>111</sup>In)
- (11-KDa-mPEG)-e<sub>9</sub>-XPLGLAG-r<sub>9</sub>-K(DOTA-Gd)
- Suc<sub>9</sub>-(70 KDa デキストラン)-e<sub>9</sub>-XPLGLAG-r<sub>9</sub>-K(DOTA-Gd)
- Suc<sub>9</sub>-(70 KDa デキストラン)-e<sub>9</sub>-XPLGLAX-r<sub>9</sub>-K(DOTA-Gd)
- Suc<sub>9</sub>-(70 KDa デキストラン)-e<sub>9</sub>-XPLGLAG-r<sub>9</sub>-K(DOTA-Gd)
- 環式 [スクシノイル-PLGLAG-c(11 KDa-mPEG)-e<sub>9</sub>-XPLGLAG-r<sub>9</sub>-K]-k(Cy5)
- Cy5-X-e<sub>6</sub>-XPLGLAG-r<sub>9</sub>-Xk(Cy5)
- Cy7-X-e<sub>6</sub>-XPLGLAG-r<sub>9</sub>-Xk(Cy5)
- 11 KDa mPEG-e<sub>9</sub>-PLGLAG-r<sub>9</sub>
- Ac-r<sub>9</sub>-k-NH<sub>2</sub>
- mPEG(11kd)-e<sub>9</sub>-XPLGLAG-r<sub>9</sub>-Xk-NH<sub>2</sub>
- e<sub>9</sub>-XPLGLAG-r<sub>9</sub>-Xk-NH<sub>2</sub>

10

20

30

40

【 0 0 4 7 】

【 表 1 】

キャップ	高分子	ポリアニオン	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'...Pn'	ポリカチオン	積荷	C-末端
Suc9	デキストラン (70 KDa)	e9	X	P	L	G	L	A	G	r9	K[DOTA(Gd)]	NH <sub>2</sub>

キャップ	高分子	ポリアニオン	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'...Pn'	ポリカチオン	積荷	C- 末端
Suc	---	e9	X	P	L	G	C(Me)	A	X	r9	DPK	NH <sub>2</sub>
Suc	---	e9	X	P	チエニルAla	G	C(Me)	A	X	r9	DPK	NH <sub>2</sub>
Suc	---	e9	X	P	F(4---Cl)	G	C(Me)	A	X	r9	DPK	NH <sub>2</sub>
Suc	---	e8	X	P	L	G	L	A	G	r9	c[Cy5]	NH <sub>2</sub>
Suc	---	e8	X	P	F(4---Cl)	G	C(Me)	M	X	r9	c[Cy5]	NH <sub>2</sub>
Suc	---	e8	X	P	F(4---Cl)	G	C(Me)	Y	X	r9	c[Cy5]	NH <sub>2</sub>
Suc	---	e8	X	P	F(4---Cl)	G	C(Me)	R	X	r9	c[Cy5]	NH <sub>2</sub>
Suc	---	e8	X	P	F(4---Cl)	G	C(Me)	PhGly	X	r9	c[Cy5]	NH <sub>2</sub>
Suc	---	e8	X	P	F(4---Cl)	G	C(Me)	C(Me)	X	r9	c[Cy5]	NH <sub>2</sub>
---	アルブミン	e9	X	P	L	G	L	A	X	r9	DPK	NH <sub>2</sub>
Suc	---	e8	X	P	C(Me)	G	C(Me)	A	X	r9	c[Cy5]	NH <sub>2</sub>
Suc	---	e8	X	P	チエニルAla	G	C(Me)	A	X	r9	c[Cy5]	NH <sub>2</sub>
Suc	---	e8	X	P	F(4---Cl)	G	C(Me)	A	X	r9	c[Cy5]	NH <sub>2</sub>
Suc	---	e8	X	P	K(Dnp)	G	C(Me)	A	X	r9	c[Cy5]	NH <sub>2</sub>
---	アルブミン	e9	X	P	L	G	L	A	X	r9	DPK	NH <sub>2</sub>
Suc	---	e8	X	P	L	G	C(Me)	M	X	r9	c[Cy5]	NH <sub>2</sub>
Suc	---	e8	X	P	L	G	C(Me)	Y	X	r9	c[Cy5]	NH <sub>2</sub>
Suc127	PAMAM-Gen5	e9	X	P	L	G	L	A	X	r9	DPK	NH <sub>2</sub>
Suc	---	e8	X	P	L	G	C(Me)	A	X	r9	c[Cy5]	NH <sub>2</sub>
Suc9	デキストラン (70 KDa)	e9	X	P	L	G	L	A	G	r9	K[DOTA(Gd)]	NH <sub>2</sub>
Suc127	PAMAM-Gen5	e9	X	P	L	G	L	A	X	r9	k[Cy5]	NH <sub>2</sub>
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	r9	Xc[Cy5]	NH <sub>2</sub>
Ac127	PAMAM-Gen5	e9	X	P	L	G	L	A	X	r9	k[Cy5]	NH <sub>2</sub>
Suc	---	e8	X	P	L	G	L	F(4--- NO2)	A	Xr9	k[Cy5]	NH <sub>2</sub>
Suc127	PAMAM-Gen5	e9	X	P	L	G	L	A	X	r9	k[Cy5]	NH <sub>2</sub>
Suc63	PAMAM-Gen4	e9	X	P	L	G	L	A	X	r9	k[Cy5]	NH <sub>2</sub>
---	アルブミン	e9	X	P	L	G	L	A	G	r9	DPK	NH <sub>2</sub>
Suc136	デキストラン (86 KDa)	e9	X	P	L	G	L	A	X	r9	k[Cy5]	NH <sub>2</sub>
Suc	---	e8	X	P	L	G	L	A	X	r9	k[Cy5]	NH <sub>2</sub>
Suc9	デキストラン (70 KDa)	e9	X	P	L	G	L	A	X	r9	K[DOTA(Gd)]	NH <sub>2</sub>
Suc9	デキストラン (70 KDa)	e9	X	P	L	G	L	A	X	r9	K[DOTA(Gd)]	NH <sub>2</sub>
Suc9	デキストラン (70 KDa)	e9	X	P	L	G	L	A	G	r9	k[Cy5]	NH <sub>2</sub>
Suc9	デキストラン	e9	X	P	L	G	L	A	G	r9	DPK	NH <sub>2</sub>

10

20

30

40



キャップ	高分子	ポリアニオン	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'...Pn'	ポリカチオン	積荷	C- 末端
	(70 KDa)											
Suc	---	e8	X	p	l	g	l	a	g	r9	k[Cy5]	NH <sub>2</sub>
---	アルブミン	e9	X	p	l	g	l	a	g	r9	k[Cy5]	NH <sub>2</sub>
Suc9	デキストラン	e9	X	p	l	g	l	a	g	r9	k[Cy5]	NH <sub>2</sub>
Suc97	デキストラン (500 KDa)	e9	X	P	L	G	L	A	G	r9	k[Cy5]	NH <sub>2</sub>
---	アルブミン	e9	X	P	L	G	L	A	G	r9	k[Cy5]	NH <sub>2</sub>
Suc9	デキストラン (70 KDa)	e9	X	P	L	G	L	A	G	r9	k[Cy5]	NH <sub>2</sub>
---	アルブミン	e9	X	P	L	G	L	A	G	r9	k[Cy5]	NH <sub>2</sub>
Suc		e8	X	P	L	G	L	A	X	r9	k[Cy5]	NH <sub>2</sub>
Suc9	デキストラン (70 KDa)	e9	X	P	L	G	L	A	G	r9	k[Cy5]	NH <sub>2</sub>
---	アルブミン	e9	X	P	L	G	L	A	G	r9	k[Cy5]	NH <sub>2</sub>
---	アルブミン	e9	X	P	L	G	L	A	G	r9	k[Cy5]	NH <sub>2</sub>
---	アルブミン	e9	X	P	L	G	L	A	G	r9	k[Cy5]	NH <sub>2</sub>
Suc9	デキストラン (70 KDa)	e9	X	P	L	G	L	A	G	r9	k[Cy5]	NH <sub>2</sub>
Suc	非結合 アルブミン	e8	X	P	L	G	L	A	G	r9X	k[Cy5]	NH <sub>2</sub>
Suc	---	e8	X	P	L	G	L	A	G	r9X	k[Cy5]	NH <sub>2</sub>
---	アルブミン	e9	X	P	L	G	L	A	G	r9	k[Cy5]	NH <sub>2</sub>
---	mPEG (5 KDa)	e9	x	p	l	g	l	a	g	r9X	k[Cy5]	NH <sub>2</sub>
---	mPEG (11KDa)	e9	X	P	L	G	L	A	G	r9	K[DOTA(Gd)]	NH <sub>2</sub>
---	mPEG (11KDa)	e10	X	P	L	G	F(4- NO <sub>2</sub> )	A	Q	Xr9	k[Cy5]	NH <sub>2</sub>
---	mPEG (11KDa)	e10	X	P	L	G	C(Me)	W	A	Qr9	k[Cy5]	NH <sub>2</sub>
---	mPEG (11KDa)	e9	X	P	L	G	C(Me)	W	A	Qr9	k[Cy5]	NH <sub>2</sub>

10

20

30

40

## 【 0 0 4 8 】

## ペプチドの合成

本明細書で開示される、選択的輸送分子は、例えば、固相ペプチド合成を含む固相合成等の任意の適切な方法により合成される。Fmocを使ったペプチド合成の例を下記の実施例1に示す。例えば、従来のペプチド合成の固相法は、結晶化形態で調製されるか、または溶液中で新しく調製され、N末端での連続的アミノ酸付加に使われるN-アルファ保護アミノ酸無水物から始めてもよい。各残基追加時に、成長しているペプチド(固体支持上の)を酸処理して、N-アルファ保護基を除去し、数回洗浄して残っている酸を除去し、ペプチド末端の反応媒体に対するアクセシビリティを良くする。次にペプチドを活性化N-保護アミノ酸対称無水物と反応させ、固体支持体を洗浄した。各残基付加ステップで、合わせて2つまたは3つの別々の付加反応に対し、アミノ酸付加反応を繰り返し、成

50

長中のペプチド分子の到達%を増やすことができる。典型的には、1～2反応サイクルを使って最初の12残基付加を行い、2～3反応サイクルで残りの残基の付加を行う。

#### 【0049】

ペプチド鎖の成長が完了後、保護されたペプチド樹脂を液体塩酸またはトリフルオロ酢酸等の強酸で処理してブロック解除し支持体からペプチドを放出させる。アミド化されたペプチドを調製するために、合成に使用する樹脂支持体を、樹脂からペプチド切断後にC末端アミドが得られるように選択する。強酸の除去後、ペプチドを1M酢酸溶液中に抽出し凍結乾燥できる。ペプチドをゲル濾過の初期分離により単離して、ペプチドダイマーおよび高分子量ポリマー、さらに望ましくない塩を除去できる。部分精製ペプチドを、分取HPLCクロマトグラフィーでさらに精製し、ペプチドの純度と素性をアミノ酸組成物分析、質量分析および分析HPLCにより確認可能である（例えば、2つの異なる溶媒系を使って）。

10

#### 【0050】

##### ポリヌクレオチドの合成

本明細書の特定の実施形態で、本明細書記載の選択的輸送分子をコードしたポリヌクレオチドが開示される。用語の「ポリヌクレオチド」は、少なくとも10塩基長さのヌクレオチドの重合体を指す。ヌクレオチドには、リボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、またはどちらかのタイプのヌクレオチドの修飾物が含まれる。この用語には、1本鎖および2本鎖型のDNAが含まれる。従って、この用語には、例えば、ベクター、例えば、発現ベクター；自律的に複製するプラスミドまたはウイルス；または原核生物もしくは真核生物のゲノムDNA、中に組み込まれる、または他の配列とは無関係な別の分子（例えば、cDNA）として存在する、組換えDNAが含まれる。

20

#### 【0051】

これらポリヌクレオチドには、明細書記載の選択的輸送分子、またはその一部をコードしたDNA、cDNA、およびRNA配列が含まれる。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドには、プロモーターおよび他の配列が含まれ、宿主細胞中で形質移入（安定でも一時的であってもよい）するためにベクター中に取り込むことができる。

#### 【0052】

発現ベクターの作製および形質移入した細胞中での遺伝子の発現には、当技術分野でよく知られた分子クローニング技術の使用を必要とする。例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning - A Laboratory Manual (分子クローニング - 実験マニュアル)、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989) および、Current Protocols in Molecular Biology (分子生物学の最新プロトコル)、F.M. Ausubel et al., eds., (Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. および John Wiley & Sons, Inc., 最近の増刊) を参照。細胞に目的のポリペプチドの発現をコードした配列を形質移入するために使われる核酸は、通常、ポリペプチドの発現をコードしたヌクレオチド配列に動作可能なように結合した発現制御配列を含む発現ベクターの形態である。本明細書で使われる「動作可能なように結合した (operatively linked)」は、記述された成分が意図したように機能させる関係にあるような近位を指す。コード配列に動作可能なように結合した制御配列は、制御配列に適合する条件下、コード配列の発現が達成されるように連結される。「制御配列」は、それらが連結したコードおよび非コード配列の発現に影響を与えるポリヌクレオチド配列を指す。制御配列には、通常、プロモーター、リボソーム性結合部位、および転写終止配列が含まれる。「制御配列」という用語は、少なくとも発現に影響を与えることができる成分を含むことが意図され、また、その存在が好都合な、例えば、リーダー配列および融合パートナー配列、等の追加の成分を含む。本明細書で使われる用語：ポリペプチド「の発現をコードしたヌクレオチド配列」は、mRNAの転写および翻訳に際しボ

30

40

50

リペプチドを産生する配列を指す。これには、例えば、イントロンを含む配列が含まれる。本明細書で使われる用語の「発現制御配列」は、動作可能なように結合されている核酸配列の発現を調節する核酸配列を指す。発現制御配列は、それらが核酸配列の転写や、必要に応じ、翻訳の制御、調節を行う場合、核酸配列に動作可能なように結合している。従って、発現制御配列には、適切なプロモーター、エンハンサー、転写ターミネーター、タンパク質コード遺伝子の直前の開始コドン（すなわち、A T G）、イントロンや、その遺伝子の正しい読み枠を維持し mRNA、および停止コドンの正しい翻訳をさせるためのスプライシングシグナル、が含まれる。

#### 【0053】

蛍光指示薬コード配列および適切な転写／翻訳制御シグナルを含む発現ベクターを構築するための任意の方法が使用される。これらの方法には、インビトロ組換え DNA 技術、合成技術およびインビボ組換え／遺伝的組換えが含まれる（例えば、Maniatis, et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual（分子クローニング - 実験マニュアル）、Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1989、に記載されている技術を参照）。組換え DNA による宿主細胞の遺伝子導入を当業者にはよく知られている従来技術により行うことができる。

#### 【0054】

宿主が大腸菌（E. coli）等の原核生物の場合、コンピテント細胞（すなわち、DNA 取り込み可能な細胞）は、指数関数的増殖相から採取し、その後 CaCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub> または RbCl で処理した細胞から調製される。特定の例では、宿主細胞のプロトプラスト形成の後に、または電気穿孔により遺伝子導入を行う。

#### 【0055】

宿主が真核生物の場合は、リン酸カルシウム共沈、従来の機械的な手法、例えば、微量注入、電気穿孔、リボソーム封入プラスミドの挿入、またはウイルスベクター等の DNA 形質移入方法が使用可能である。特定の例では、真核細胞は、本明細書で開示の分子をコードした DNA 配列、および選択可能表現型、例えば、単純ヘルペスチミジンキナーゼ遺伝子をコードした第 2 の外来 DNA 分子を同時形質移入される。別の方法は、真核生物ベクター、例えば、シミアンウイルス 40（SV40）またはウシバビローマウイルス、を使って一時的に真核細胞に感染させるまたはこれを遺伝子導入し、タンパク質を発現させることである（Eukaryotic Viral Vectors（真核生物ウイルスベクター）、Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman, ed., 1982）。原核生物または真核生物中に発現した本発明のポリペプチドの単離と精製技術には、任意の従来手段、例えば、分取クロマトグラフ分離および、モノクローナルまたはポリクローナル抗体もしくは抗原の使用を含む方法等の免疫学的な分離を使うことが可能である。

#### 【0056】

##### A 部

本明細書中の特定の実施形態では、インビボで循環を増加させた選択的輸送分子が開示される。

#### 【0057】

一部の実施形態では、本明細書で開示の選択的輸送分子は、式（A - X - B - C）- M を有し、式中、C は、積荷成分であり；A は、5 ～ 9 個の連続した酸性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり、該アミノ酸は、アスパルタートおよびグルタマートから選択され；B は、5 ～ 20 個の連続した塩基性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり；X は、リンカーであり；かつ M は、高分子キャリアである。

#### 【0058】

一部の実施形態では、本明細書で開示の選択的輸送分子は、式（A - X - B）- D を有し、式中、C は、積荷成分であり；A は、5 ～ 9 個の連続した酸性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり、該アミノ酸は、アスパルタートおよびグルタマートから選択され

10

20

30

40

50

；Bは、5～20個の連続した塩基性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり；Xは、リンカーであり；かつDは、デンドリマーである。一部の実施形態では、Dは、積荷成分を含む。

【0059】

一部の実施形態では、本明細書で開示の選択的輸送分子は、式(A-X-B)<sub>n</sub>-Dを有し、式中、Dは、少なくとも2つの積荷成分を含み；Aは、5～9個の連続した酸性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり、該アミノ酸は、アスパルタートおよびグルタマートから選択され；Bは、5～20個の連続した塩基性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり；Xは、リンカーであり；nは、1～20の整数である。

【0060】

一部の発明の特徴を有する分子の実施形態では、ペプチド部Aは、約2～約20個の、または約5～約20個の酸性アミノ酸を含み、一連の酸性アミノ酸（例えば、グルタマートおよびアスパルタートまたは他の酸性アミノ酸）であってもよい。一部の実施形態では、Aは、5～9個の連続したグルタマートを含む配列を有する。

【0061】

一部の実施形態では、A部は、8個の連続したグルタマート（すなわち、EEEEEE E Eまたはeeeeeeee）を含む。

【0062】

酸性のA部は、酸性でないアミノ酸を含んでもよい。酸性のA部は、他の成分、例えば、負に帯電した成分を含んでもよい。本明細書で開示の選択的輸送分子の実施形態では、酸性のA部は、負に帯電した部分、好ましくは、アミノ酸を含まない、生理的なpH下で約2～約20の負電荷を有する部分であってもよい。好ましい実施形態では、A部の負電荷は、B部の正電荷量とおよそ同じである。

【0063】

A部は、L-アミノ酸またはD-アミノ酸である。本発明のいくつかの実施形態では、免疫原性、および付随するペプチダーゼまたはプロテアーゼによる非特異的切断を最小限にとどめるためにD-アミノ酸が好ましい。オリゴ-D-アルギニン配列の細胞による取り込みは、オリゴ-L-アルギニンと同等またはそれより優れていることが知られている。

【0064】

A部は、例えば、ヒドロキシリジン、デスモシン、イソデスモシン、またはその他の非標準的アミノ酸、等の非標準的アミノ酸を含んでもよいことは理解されよう。A部は、例えば、メチル化アミノ酸（例えば、メチルヒスチジン、リジンのメチル化型、等）、アセチル化アミノ酸、アミド化アミノ酸、ホルミル化アミノ酸、ヒドロキシル化アミノ酸、リン酸化アミノ酸、またはその他の修飾アミノ酸、等の翻訳後修飾アミノ酸を含む修飾アミノ酸を含んでもよい。A部は、同様に、非ペプチド結合により結合された部分を含むペプチド模倣成分、および非アミノ酸部により結合されたまたはこれに結合したアミノ酸を含んでもよい。

【0065】

Aがアミノ末端にある場合またはAがカルボキシ末端にある場合、一般的な構造A-X-Bおよび-A-X-B-Cが、有効である。すなわち、ペプチド結合のいずれの向きも許容される。

【0066】

B部（膜透過配列）

本明細書中の特定の実施形態では、インピボ循環の増加した選択的輸送分子が開示される。

【0067】

一部の実施形態では、本明細書で開示されている選択的輸送分子は、式(A-X-B-C)-Mを有し、式中、Cは、積荷成分であり；Aは、5～9個の連続した酸性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり、該アミノ酸は、アスパルタートおよびグルタマート

10

20

30

40

50

から選択され；Bは、5～20個の連続した塩基性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり；Xは、リンカーであり；かつMは、高分子キャリアである。

【0068】

一部の実施形態では、本明細書で開示されている選択的輸送分子は、式(A-X-B)-Dを有し、式中、Cは、積荷成分であり；Aは、5～9個の連続した酸性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり、該アミノ酸は、アスパルタートおよびグルタマートから選択され；Bは、5～20個の連続した塩基性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり；Xは、リンカーであり；かつDは、デンドリマーである。一部の実施形態では、Dは、積荷成分を含む。

【0069】

一部の実施形態では、本明細書で開示されている選択的輸送分子は、式(A-X-B)<sub>n</sub>-Dを有し、式中、Dは、少なくとも2つの積荷成分を含み；Aは、5～9個の連続した酸性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり、該アミノ酸は、アスパルタートおよびグルタマートから選択され；Bは、5～20個の連続した塩基性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり；Xは、リンカーであり；かつnは1～20の整数である。一部の実施形態では、Bは、5～12個の連続したアルギニンを含む配列を有する。一部の実施形態では、Bは、9個の連続したアルギニンを含む配列を有する。

【0070】

一部の発明の特徴を有する分子の実施形態では、ペプチド部Bは、約5～約20個の、または約9～約16個の塩基性アミノ酸を含み、一連の塩基性アミノ酸（例えば、アルギニン、ヒスチジン、リジン、またはその他の塩基性アミノ酸）であってもよい。

【0071】

一部の実施形態では、B部は、9個の連続したアルギニン（すなわち、RRRRRRRRRRまたはrrrrrrrrrr）を含む。

【0072】

塩基性B部は、塩基性でないアミノ酸を含んでもよい。塩基性B部は、他の成分、例えば、正に帯電した成分を含んでもよい。いくつかの実施形態では、塩基性B部は、正電荷部、好ましくは生理的なpH下で約5～約20の陽電荷を有する、アミノ酸を含まない正電荷部であってもよい。好ましい実施形態では、A部の負電荷の量はB部の正電荷の量とおよそ同じである。

【0073】

B部は、L-アミノ酸またはD-アミノ酸のいずれかである。本発明のいくつかの実施形態では、免疫原性、および付随するペプチダーゼまたはプロテアーゼによる非特異的切断を最小限にとどめるためにD-アミノ酸が好ましい。細胞によるオリゴ-D-アルギニン配列の取り込みは、オリゴ-L-アルギニンに対する場合と同じか、それより優れていることが知られている。

【0074】

B部は、例えば、ヒドロキシリジン、デスモシン、イソデスモシン、またはその他の非標準的アミノ酸、等の非標準的アミノ酸を含んでもよいことは理解されよう。B部は、例えば、メチル化アミノ酸（例えば、メチルヒスチジン、リジンのメチル化型、等）、アセチル化アミノ酸、アミド化アミノ酸、ホルミル化アミノ酸、ヒドロキシル化アミノ酸、リン酸化アミノ酸、またはその他の修飾アミノ酸、等の翻訳後修飾アミノ酸を含む修飾アミノ酸を含んでもよい。B部は、同様に、非ペプチド結合により結合された部分を含むペプチド模倣成分、および非アミノ酸部により結合されたまたはこれに結合したアミノ酸を含んでもよい。

【0075】

Xがプロテアーゼにより切断可能なペプチドである実施形態では、Xの切断により生成する新規アミノ末端がBにすでに存在する正電荷に追加する追加正電荷を与えるように、XのC末端がBのN末端へ結合するのが好ましいであろう。

【0076】

10

20

30

40

50

X 部（リンカー）

本明細書中の特定の実施形態では、インビボ循環の増加した選択的輸送分子が開示される。

**【0077】**

一部の実施形態では、本明細書で開示されている選択的輸送分子は、式（A - X - B - C） - Mを有し、式中、Cは、積荷成分であり；Aは、5～9個の連続した酸性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり、該アミノ酸は、アスパルタートおよびグルタマートから選択され；Bは、5～20個の連続した塩基性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり；Xは、リンカーであり；かつMは、高分子キャリアである。

**【0078】**

一部の実施形態では、本明細書で開示されている選択的輸送分子は、式（A - X - B） - Dを有し、式中、Cは、積荷成分であり；Aは、5～9個の連続した酸性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり、該アミノ酸は、アスパルタートおよびグルタマートから選択され；Bは、5～20個の連続した塩基性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり；Xは、リンカーであり；かつDは、デンドリマーである。一部の実施形態では、Dは、積荷成分を含む。

**【0079】**

切断条件

一部の実施形態では、Xは、切断可能なリンカーである。

**【0080】**

一部の実施形態では、リンカーXは、特定の条件または特定の環境の存在下での切断が意図されている。好ましい実施形態では、リンカーXは、生理学的条件下で切断可能である。このようなリンカーXの切断は、例えば、積荷送達が望まれる細胞に関連した特定の病理学的シグナルまたは特定の環境により促進され、または影響を受けてもよい。特異的酵素等の特異的条件によるリンカーXの切断のための設計は、細胞による取り込みのこのような条件が生じている特異的位置への標的化を可能にする。従って、選択的輸送分子が所望の細胞、組織、または領域に対する細胞による取り込みの特異的標的化を提供する1つの重要な手段は、このような標的化細胞、組織、または領域の近傍の状態下で切断されるリンカーX部の設計である。リンカーXの切断後、分子のB～C部はBおよびCの単純な共役体になり、ある場合には、比較的小さい、不活性のリンカーXの残部の切れ残りがある。

**【0081】**

一部の実施形態では、XはpH感受性リンカーである。一部の実施形態では、Xは、塩基性pH条件下で切断される。一部の実施形態では、Xは、酸性pH条件下で切断される。一部の実施形態では、Xは、プロテアーゼ、マトリックスメタロプロテアーゼ、またはこれらの組み合わせにより切断される。一部の実施形態では、Xは、還元剤により切断される。

**【0082】**

1つの重要なクラスのシグナルは、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）の加水分解活性で、これは転移性腫瘍細胞の侵襲的移動に非常に重要である。特定の例では、MMPは、炎症の近傍部位に認められる。特定の例では、MMPは、脳卒中（すなわち、血流減少後の脳損傷を特徴とする障害）の部位近傍で認められる。一部の実施形態では、Xは、MMPにより切断される。従って、本発明の特徴を有する分子の取り込みを、細胞外の環境中の活性MMPを有する特定細胞、組織、または領域に対する、細胞による積荷Cの取り込みに方向付けることができる。

**【0083】**

一部の実施形態では、アミノ酸配列PLGLAG（配列番号1）を含むリンカーXは、マトロプロテアーゼ酵素MMP-2（癌および炎症中の主要MMP）により切断される。このようなリンカーXの切断は、中央のGとL残基の間で起こり、細胞による取り込みを10～20倍増加させる（実施例4参照）。一部の実施形態では、膜に固定されたMMP

10

20

30

40

50

により切断されるように設計されたリンカー X は、その活性が発現細胞の外表面に局在して残るため、特に好ましい。別の実施形態では、積荷 C が厳密な切断位置から拡散し、それによって積荷が空間的に分布することが望まれる場合は、可溶性分泌型 MMP により切断されるように設計されたリンカー X が好ましい。他の MMP で切断可能なその他のリンカー X については実施例 9 で考察する。

#### 【0084】

一部の実施形態では、リンカーは、癌細胞近傍で認められるタンパク分解性酵素または還元性環境により切断されるように設計される。通常、このような環境、またはこのような酵素は正常細胞近傍では見出されない。

#### 【0085】

低酸素は、重要な病理学的シグナルである。例えば、低酸素が癌細胞を照射および化学療法に対しより高い耐性にし、また血管新生を開始させると考えられている。一部の実施形態では、低酸素下にある組織中またはその近傍での切断に適したリンカー X は、B 部および C 部に対し癌細胞、癌組織、梗塞領域、および他の低酸素領域を標的にすることを可能にする。一部の実施形態では、ジスルフィド結合を含むリンカー X は、低酸素性の領域中で選択的に切断され、このような領域中で細胞を積荷送達の標的にする。例えば、漏出細胞または壊死細胞、の存在下の低酸素性環境では、遊離チオール類および他の還元剤が細胞外で利用可能となり、一方、通常は細胞外の環境を酸化性に保つ  $O_2$  は、当然枯渇する。一部の実施形態では、このレドックスバランスの変化がリンカー X 内のジスルフィド結合の還元および切断を促進する。チオールジスルフィド平行を利用するジスルフィド結合に加え、ヒドロキノンに還元されると分解するキノンを含む結合が低酸素性環境で切断されるように設計されたリンカー X で使われる。

#### 【0086】

壊死は、リンカー X の切断を引き起こすのに用いることができる酵素または他の細胞含有物の放出をもたらすことが多い。一部の実施形態では、低酸素でない環境下の壊死領域で切断するように設計されたリンカー X は、カルパイン（または他の壊死細胞から放出されたプロテアーゼ）を含む。このようなリンカー X のカルパインによる切断は、A 部から結合している B - C 部を放出し、まだ完全には漏出性になっていない疾患細胞および隣接細胞に積荷を取り込ませるであろう。

#### 【0087】

アシドーシスは、同様に、酸化的リン酸化から嫌気性解糖および乳酸産生へのワールブルグシフトによって、損傷を受けたまたは低酸素性の組織の部位によく観察される。このような局所的酸性は、酸不安定なリンカー X を作る（例えば、X 中にアセタールまたはビニルエーテル結合を含むことにより）ことにより検知することが可能である。あるいは、または、それに追加して、アシドーシスは、B 内のアルギニンの一部をヒスチジン（唯一 pH 7 以下の陽イオン性になる）で置換することにより、積荷取り込みを引き起こすものとして使用することができる。

#### 【0088】

リンカー

一部の実施形態では、1 つまたは複数のアミノ酸から成るリンカーが、ペプチド配列 A（細胞中への取り込みを防ぐように設計された配列）およびペプチド配列 B（すなわち、MTS）を結合するために使用される。一般的に、ペプチドリナーは、分子を結合させる、または分子間のある程度の最小距離または他の空間的関係を保持することの他に特異的生物活性を持たない。しかし、リンカー成分のアミノ酸は、影響一部の分子特性、例えば、折り畳み構造、正味電荷、または疎水性に影響を与えるように選択可能である。

#### 【0089】

一部の実施形態では、X は、切断可能なリンカーである。

#### 【0090】

一部の実施形態では、リンカーは、可撓性である。一部の実施形態では、リンカーは、剛直である。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 9 1 】

一部の実施形態では、リンカーは、直鎖構造を含む。一部の実施形態では、リンカーは、非直鎖構造を含む。一部の実施形態では、リンカーは、分岐構造を含む。一部の実施形態ではリンカーは、環式構造を含む。

## 【 0 0 9 2 】

一部の実施形態では、Xは、約5～約30原子の長さである。一部の実施形態では、Xは、約6原子の長さである。一部の実施形態では、Xは、約8原子の長さである。一部の実施形態では、Xは、約10原子の長さである。一部の実施形態では、Xは、約12原子の長さである。一部の実施形態では、Xは、約14原子の長さである。一部の実施形態では、Xは、約16原子の長さである。一部の実施形態では、Xは、約18原子の長さである。一部の実施形態では、Xは、約20原子の長さである。一部の実施形態では、Xは、約25原子の長さである。一部の実施形態では、Xは、約30原子の長さである。

10

## 【 0 0 9 3 】

一部の実施形態では、リンカーは結合ペプチドA部（すなわち、細胞による取り込みを防ぐペプチド配列）をペプチドB部（すなわち、MTS配列）に共有結合により結合する。一部の実施形態では、共有結合は、エーテル結合、チオエーテル結合、アミン結合、アミド結合、炭素-炭素結合、炭素-窒素結合、炭素-酸素結合、または炭素-硫黄結合を含む。

## 【 0 0 9 4 】

一部の実施形態では、Xはペプチド結合を含む。ペプチド結合は、L-アミノ酸および/またはD-アミノ酸を含む。本発明のいくつかの実施形態では、付随するペプチダーゼまたはプロテアーゼによる免疫原性および非特異的切断を最小限にとどめるためにD-アミノ酸が好ましい。細胞によるオリゴ-D-アルギニン配列の取り込みは、オリゴ-L-アルギニンの場合と同等か、またはそれより優れていることが知られている。

20

## 【 0 0 9 5 】

本明細書で開示されるリンカーは、例えば、ヒドロキシリジン、デスモシン、イソデスモシン、またはその他の非標準的アミノ酸、等の非標準的アミノ酸を含んでもよいことは理解されよう。本明細書で開示されるリンカーは、例えば、メチル化アミノ酸（例えば、メチルヒスチジン、リジンのメチル化型、等）、アセチル化アミノ酸、アミド化アミノ酸、ホルミル化アミノ酸、ヒドロキシル化アミノ酸、リン酸化アミノ酸、またはその他の修飾アミノ酸、等の翻訳後修飾アミノ酸を含む修飾アミノ酸を含んでもよい。本明細書で開示されるリンカーは、同様に、非ペプチド結合により結合された部分を含むペプチド模倣成分、および非アミノ酸部により結合されたまたはこれに結合したアミノ酸を含んでもよい。

30

## 【 0 0 9 6 】

一部の実施形態では、Xは、PLGLAG、PLGLAX、PLG-C(me)-AG、ESPAYYTA、およびRLQLKL、AND RLQLK(AC)から選択されるペプチドを含む。

## 【 0 0 9 7 】

一部の実施形態では、Xは、以下から選択されるペプチドを含む：PR(S/T)(L/I)(S/T)(配列番号29、括弧中の文字は、示したアミノ酸のどちらかが配列のその位置にあることを示す)；

40

GGAANLVRGG(配列番号30); SGRIGFLRTA(配列番号31);

SGRSA(配列番号32); GFLG(配列番号33); ALAL(配列番号34); FK; PIC(Et)F-F(配列番号35

、ここでC(Et)はS-エチルシステイン（チオールに結合したエチル基を有するシステイン）を示し、「-」は、この配列および以降の配列の典型的切断部位を示す)；



GGPRGLPG (配列番号 36)

HSSKLQ (配列番号 37); LVLA-SSSFGY (配列番号 38); GVSQNY-PIVG (配列番号 39);

GVVQA-SCRLA (配列番号 40); f(Pip)R-S (配列番号 41)

、ここで「f」はD-フェニルアラニンを示し、「Pip」はピペリジン-2-カルボン酸(ピペコリン酸、6員環を持つプロリン類似体)を示す; DEV D (配列番号 42); GWEHD-G (配列番号 43); またはこれらの組み合わせ。

【0098】

一部の実施形態では、Xは、低酸素性条件下で切断される。一部の実施形態では、Xは、ジスルフィド結合を含む。一部の実施形態では、Xは、キニーネを含む。

10

【0099】

一部の実施形態では、Xは、壊死の条件下で切断される。一部の実施形態では、Xは、カルパインにより切断可能な分子を含む。

【0100】

一部の実施形態では、Xは、6-アミノヘキサノイル、5-(アミノ)-3-オキサペンタノイル、またはこれらの組み合わせを含む。一部の実施形態では、Xは、ジスルフィド結合を含む。

【0101】

一部の実施形態では、リンカーはアルキルである。一部の実施形態では、リンカーはヘテロアルキルである。

20

【0102】

一部の実施形態では、リンカーは、アルキレンである。一部の実施形態では、リンカーは、アルケニレンである。一部の実施形態では、リンカーは、アルキニレンである。一部の実施形態では、リンカーは、ヘテロアルキレンである。

【0103】

「アルキル」基は、脂肪族炭化水素基を指す。アルキル成分は、飽和アルキルであっても、不飽和アルキルであってもよい。構造に依存して、アルキル基は、モノラジカルまたはジラジカル(すなわち、アルキレン基)でありうる。

【0104】

「アルキル」成分は、1~10炭素原子であってもよい(本明細書に登場する場合は常に、数値の範囲、例えば、「1~10」は、示された範囲中の各整数を指す; 例えば、「1~10炭素原子」は、アルキル基が、1炭素原子、2炭素原子、3炭素原子、等、10炭素原子まで含んでもよいことを意味する。また、範囲が指定されていない場合の用語「アルキル」の出現にもこの定義が当てはまる)。また、アルキル基は、1~6炭素原子を有する「低級アルキル」でもよい。本明細書記載の化合物のアルキル基は、「C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルキル」または類似の指定により示してもよい。単に例として説明するが、「C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルキル」は、1~4炭素原子がアルキル鎖中にあることを示し、すなわち、アルキル鎖はメチル、エチル、プロピル、イソ-プロピル、n-ブチル、イソ-ブチル、sec-ブチル、およびtert-ブチルから選択されるということである。典型的なアルキル基には、これに全く限定されないが、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ターシャリブチル、ペンチル、ヘキシル、エテニル、プロペニル、ブテニル、等が含まれる。

30

40

【0105】

一部の実施形態では、リンカーは、環構造(例えば、アリール)を含む。本明細書で使われる用語の「環」は、任意の共有結合の閉じた構造を指す。環には、例えば、炭素環化合物(例えば、アリールおよびシクロアルキル)、ヘテロサイクル(例えば、ヘテロアリールおよび非芳香族ヘテロサイクル)、芳香族(例えば、アリールおよびヘテロアリール)、および非芳香族(例えば、シクロアルキルおよび非芳香族ヘテロサイクル)が挙げられる。環は、任意選択として、置換されてもよい。環は単環式でも多環式でもよい。

【0106】

50

本明細書で使われる「アリール」という用語は、環を成形している各原子が炭素原子である芳香族環を指す。アリール環は、5、6、7、8、9、または10以上の炭素原子から形成され得る。アリール基は、任意選択として、置換されてもよい。アリール基の例には、限定されないが、フェニル、ナフタレニル、フェナントレニル、アントラセニル、フルオレニル、およびインデニルが含まれる。構造に依存するが、アリール基はモノラジカルでも、ジラジカル（すなわち、アリーレン基）でもよい。

#### 【0107】

用語の「シクロアルキル」は、リングを形成している各原子（すなわち、骨格原子）が炭素原子である単環式または多環式非芳香族ラジカルを指す。シクロアルキルは、飽和でも部分的不飽和でもよい。シクロアルキル基には、3～10環原子を有する基が含まれる。シクロアルキルには、限定されないが、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、およびシクロオクチルが含まれる。

10

#### 【0108】

一部の実施形態では、環はシクロアルカンである。一部の実施形態では、環はシクロアルケンである。

#### 【0109】

一部の実施形態では、環は芳香族環である。用語の「芳香族」は、 $4n+2$ （ $n$ は整数）の電子を含む非局在化電子系を有する平面環を指す。芳香族環は、5、6、7、8、9、または10以上の原子から形成されてもよい。芳香族化合物は、任意選択で、置換されてもよい。用語の「芳香族」は、炭素環式アリール（例えば、フェニル）および複素環式アリール（または「ヘテロアリール」もしくは「ヘテロ芳香族」）基（例えば、ピリジン）の両方を含む。この用語は、単環または縮合環多環（すなわち、隣接炭素原子対を共有する環）基を含む。

20

#### 【0110】

一部の実施形態では、環は、複素環である。用語の「複素環」は、それぞれO、SおよびNから選択される1～4ヘテロ原子を含むヘテロ芳香族およびヘテロ脂環式基を指し、ここで各複素環基はその環に4～10原子を有するが、但し、前記基の環は2つの隣接するOまたはS原子を含まない。非芳香族複素環基は、環中に3原子のみを有する基を含むが、芳香族複素環基は、環中に少なくとも5原子がなければならない。複素環基はベンゾ縮合環系を含む。3員複素環基の例はアジリジニルである。4員複素環基の例はアゼチジニル（アゼチジンの誘導体）である。5員複素環基の例はチアゾリルである。6員複素環基の例はピリジニルで、10員複素環基の例はキノリニルである。非芳香族複素環基の例は、ピロリジニル、テトラヒドロフラニル、ジヒドロフラニル、テトラヒドロチエニル、テトラヒドロピラニル、ジヒドロピラニル、テトラヒドロチオピラニル、ペペリジノ、モルホリノ、チオモルホリノ、チオキサニル、ピペラジニル、アゼチジニル、オキセタニル、チエタニル、ホモピペリジニル、オキセパニル、チエパニル、オキサゼピニル、ジアゼピニル、チアゼピニル、1,2,3,6-テトラヒドロピリジニル、2-ピロリニル、3-ピロリニル、インドリニル、2H-ピラニル、4H-ピラニル、ジオキサニル、1,3-ジオキサソラニル、ピラゾリニル、ジチアニル、ジチオラニル、ジヒドロピラニル、ジヒドロチエニル、ジヒドロフラニル、ピラゾリジニル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、3-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサニル、3-アザビシクロ[4.1.0]ヘプタニル、3H-インドリルおよびキノリジニルである。芳香族複素環基の例は、ピリジニル、イミダゾリル、ピリミジニル、ピラゾリル、トリアゾリル、ピラジニル、テトラゾリル、フリル、チエニル、イソオキサゾリル、チアゾリル、オキサゾリル、イソチアゾリル、ピロリル、キノリニル、イソキノリニル、インドリル、ベンゾイミダゾリル、ベンゾフラニル、シンノリニル、インダゾリル、インドリジニル、フタラジニル、ピリダジニル、トリアジニル、イソインドリル、プテリジニル、プリニル、オキサジアゾリル、チアジアゾリル、フラザニル、ベンゾフラザニル、ベンゾチオフエニル、ベンゾチアゾリル、ベンゾオキサゾリル、キナゾリニル、キノキサリニル、ナフチリジニル、およびフロピリジニルである。前述の基は、可能な場合はC-結合でもN-結合でもよい。例えば、ピロール由来

30

40

50

の基は、ピロール - 1 - イル (N - 結合) でもピロール - 3 - イル (C - 結合) でもよい。さらに、イミダゾール由来の基は、イミダゾール - 1 - イルもしくはイミダゾール - 3 - イル (両方とも N - 結合) またはイミダゾール - 2 - イル、イミダゾール - 4 - イルもしくはイミダゾール - 5 - イル (全て C - 結合) であってもよい。複素環基は、ベンゾ縮合環系および 1 つまたは 2 つのオキソ (= O) 成分により置換された環系、例えば、ピロリジン - 2 - オンを含む。構造に依存して、複素環基は、モノラジカルでもジラジカル (すなわち、ヘテロシクレン基) でもよい。

#### 【0111】

一部の実施形態では、環は縮合している。用語の「縮合」は、2 つ以上の環が 1 つまたは複数の結合を共有する構造を指す。一部の実施形態では、環は二量体である。一部の実施形態では、環は三量体である。一部の実施形態では、環が置換されている。

10

#### 【0112】

用語の「炭素環式」または「炭素環」は、環を形成している各原子が炭素原子である環を指す。炭素環は、アリアルおよびシクロアルキルを含む。従って、この用語は、炭素環を、環の骨格が炭素以外の少なくとも 1 つの原子 (すなわち、ヘテロ原子) を含む複素環 (「複素環式」) から区別する。複素環は、ヘテロアリアルおよびヘテロシクロアルキルを含む。炭素環および複素環は、任意選択で、置換されてもよい。

#### 【0113】

一部の実施形態では、リンカーは置換される。用語の「任意選択で、置換」または「置換」は、参照基が、下記からそれぞれ独立に選択される 1 つまたは複数の別の基で置換されてもよいことを意味する。C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキル、C<sub>3</sub> - C<sub>8</sub> シクロアルキル、アリアル、ヘテロアリアル、C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub> ヘテロ脂環式、ヒドロキシ、C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルコキシ、アリアルオキシ、C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキルチオ、アリアルチオ、C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキルスルホキシド、アリアルスルホキシド、C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキルスルホン、アリアルスルホン、シアノ、ハロ、C<sub>2</sub> - C<sub>8</sub> アシル、C<sub>2</sub> - C<sub>8</sub> アシルオキシ、ニトロ、C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> ハロアルキル、C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> フルオロアルキル、および C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキルアミノを含むアミノ、および保護されたこれらの誘導体。例として挙げれば、任意選択による置換基は、L s R s であってもよく、ここで各 L s は、結合、- O -、- C (= O) -、- S -、- S (= O) -、- S (= O)<sub>2</sub> -、- NH -、- NHC (= O) -、- C (= O) NH -、S (= O)<sub>2</sub> NH -、- NHS (= O)<sub>2</sub> -、- OC (= O) NH -、- NHC (= O) O -、- (C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキル) -、または - (C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub> アルケニル) - から独立に選択され；また、各 R s は、H、(C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub> アルキル)、(C<sub>3</sub> C<sub>8</sub> シクロアルキル)、ヘテロアリアル、アリアル、および C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> ヘテロアルキルから独立に選択される。任意選択の置換非芳香族基は、1 つまたは複数のオキソ (= O) により置換されてもよい。上記の置換基の内で保護された誘導体を形成することができる保護基は当業者には既知である。

20

30

#### 【0114】

一部の実施形態では、本明細書で開示される選択的輸送分子は、単一のリンカーを含む。その後の治療用量が標的組織中に正しく集中させられるか否かを試験することができるため、画像化用および治療用積荷の両方の取り込みの媒介に対して単一の機序を使用することは、特に有益である。

40

#### 【0115】

一部の実施形態では、本明細書で開示される選択的輸送分子は、複数のリンカーを含む。本明細書で開示される選択的輸送分子が複数のリンカー X を含む場合は、分子の他の部分からの A 部の分離には、全てのリンカー X の切断が必要である。複数のリンカー X の切断は、同時でも逐次でもよい。複数のリンカー X は、異なる特異性のリンカー X を含んでもよく、その場合、A 部の分子の他の部分からの分離には、分子に 2 つ以上の条件または環境 (「細胞外のシグナル」) が発生することが必要である。このように、複数のリンカー X の切断は、このような細胞外シグナルの組み合わせの検出手段としての役目をする。例えば、選択的輸送分子は、塩基性 B 部と酸性の A 部を結合する 2 つのリンカー部 X a および X b を含んでもよい。両方のリンカー X a および X b は、酸性の A 部が塩基性 B 部が

50

ら離れ、B部および積荷成分C（もしあれば）に対し細胞内へ入るための侵入を許す前に切断されなければならない。リンカー領域は、存在しうる別のリンカーとは無関係に塩基性B部または積荷成分Cに結合してもよく、また、必要なら、3つ以上のリンカー領域Xを含んでもよいことは、わかるであろう。

#### 【0116】

2つ以上のリンカーXを組み合わせて使用し、所望の細胞、組織または領域に対する分子の標的化および送達をさらに調節することができる。必要に応じ、細胞外のシグナルの組み合わせを使って、リンカーXの切断特異性を広げるまたは狭めることができる。複数のリンカーXが並列して結合される場合は、A部が分子の残りの部分から分離する前に各リンカーXが切断されなければならないために、切断特異性は狭められる。複数のリンカーXが直列で結合される場合は、いずれか1つのリンカーXの切断によりA部が分子の残りの部分から分離できるので、切断の特異性は広げられる。例えば、プロテアーゼまたは低酸素を検出するために（すなわち、プロテアーゼまたは低酸素の存在下Xを切断するために）、リンカーXは、プロテアーゼ高感受性および低感受性の部位を直列に置くように設計され、どちらか一方が酸性のA部を分離させることになる。あるいは、プロテアーゼおよび低酸素の両方（すなわち、プロテアーゼおよび低酸素のどちらか単独ではなく両方の存在下Xを切断する）の存在を検出するために、リンカーXを、プロテアーゼ感受性部位を少なくとも1対の相互にジスルフィド結合したシステインの間に置くように設計する。この場合、A部の分離には、プロテアーゼ切断およびジスルフィド還元の両方が必要となる。

10

20

#### 【0117】

##### 細胞外の切断

健常細胞では、構造A-X-BまたはA-X-B-Cの無傷の化合物は、A部が存在するため、細胞中に入ることができないであろう。従って、A部が、細胞への取り込みを妨害して、細胞中に取り込まれず、細胞内の酵素にアクセスできないので、健常細胞中でこのような酵素により効果的に切断されないことから、Xを切断するための厳密な細胞間プロセスは、健常細胞中ではXを切断するには有効ではないであろう。しかし、細胞が傷付いたり、または病気である場合（例えば、癌細胞、低酸素性の細胞、虚血性細胞、アポトーシス性細胞、壊死の細胞）は、このような細胞内の酵素が細胞から漏出し、Aの切断が起こり、B部またはB-Cの細胞内への侵入を可能とし、B部または積荷成分Cの隣接細胞への標的化送達をもたらすであろう。一部の実施形態では、Xは細胞外空間で切断される。

30

#### 【0118】

腫瘍周辺の毛細血管および他の外傷部位から漏出することがよくあるという事実が、高分子量分子（例えば、約40kDa以上の分子量）が間質コンパートメントに到達する能力を高めるはずである。リンカーXの切断は通常細胞外であるから、ある程度の巻き添え標識化が期待される。すなわち、適切なプロテアーゼを発現しないが、発現細胞のすぐ近くにある細胞は一部の積荷を受け取る可能性がある。腫瘍に対しては、細胞の表現型の不均質性および疑わしい細胞を高い割合で除去したい望みのために、このような巻き添え標的化は、有益であると考えられる。

40

#### 【0119】

##### 高分子キャリア

本明細書の特定の実施形態では、インビボ循環の増加した選択的輸送分子が開示される。一部の実施形態では、本明細書で開示される選択的輸送分子は、式(A-X-B-C)-Mを有し、式中、Cは積荷成分であり；Aは、5～9個の連続した酸性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり、該アミノ酸は、アスパルタートおよびグルタマートから選択され；Bは、5～20個の連続した塩基性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり；Xは、リンカーであり；かつMは、高分子キャリアである。

#### 【0120】

用語の「キャリア」は、(a)血漿の半減期および(b)溶解度を増やす不活性の分子

50

を意味する。

【 0 1 2 1 】

一部の実施形態では、キャリアは、選択的輸送分子の軟骨への取り込みを減らす。一部の実施形態では、キャリアは、選択的輸送分子の関節への取り込みを減らす。一部の実施形態では、キャリアは、選択的輸送分子の肝臓への取り込みを減らす。一部の実施形態では、キャリアは、選択的輸送分子の腎臓への取り込みを減らす。

【 0 1 2 2 】

一部の実施形態では、キャリアは、糸球体濾過を減らすことにより血漿の半減期および溶解度を増加させる。一部の実施形態では、キャリアは、腫瘍血管系の血管透過性・滞留性亢進（EPR）により腫瘍取り込みを増加させる。組織切除手術における遊離選択的輸送分子とキャリアに結合した選択的輸送分子の比較については表2および実施例8を参照。

10

【 0 1 2 3 】

【表2】

		遊離選択的輸送分子	デンドリマー選択的輸送分子
MDA-MB 435	腫瘍	0.17±0.05 (n=3)	1.065±0.55 (n=3)
	筋肉	0.29±0.068 (n=3)	0.238±0.007 (n=3)
	比率	2.45 (p=0.0004)	4.46 (p=0.031)
HT1080	腫瘍	0.42±0.08 (n=4)	1.8±0.6 (n=8)
	筋肉	0.11±0.08 (n=4)	0.21±0.07 (n=8)
	比率	3.82 (p=0.022)	8.6 (p=0.0009)
8119	腫瘍	0.39±0.12 (n=5)	2.191±0.743 (n=3)
	筋肉	0.11±0.06 (n=5)	0.166±0.023 (n=3)
	比率	3.5 (p=0.006)	13.2 (p=0.004)
B16F10	腫瘍	0.24±0.06 (n=4)	1.069±0.575 (n=3)
	筋肉	0.10±0.03 (n=3)	0.191±0.014 (n=3)
	比率	2.4 (p=0.014)	5.6 (p=0.028)

20

30

【 0 1 2 4 】

一部の実施形態では、MはAに結合している。一部の実施形態では、MはN末端ポリグルタマートの位置でAに結合している。一部の実施形態では、Mは共有結合でA（または、N末端ポリグルタマート）に結合している。一部の実施形態では、共有結合は、エーテル結合、チオエーテル結合、アミン結合、アミド結合、炭素-炭素結合、炭素-窒素結合、炭素-酸素結合、または炭素-硫黄結合を含む。

【 0 1 2 5 】

一部の実施形態では、MはBに結合している。一部の実施形態では、MはC末端ポリアルギニンの位置でBに結合している。一部の実施形態では、Mは共有結合によりB（または、C末端ポリアルギニン）に結合している。一部の実施形態では、共有結合は、エーテル結合、チオエーテル結合、アミン結合、アミド結合、炭素-炭素結合、炭素-窒素結合、炭素-酸素結合、または炭素-硫黄結合を含む。

40

【 0 1 2 6 】

一部の実施形態では、Mは、タンパク質、合成または天然ポリマー、またはデンドリマーから選択される。一部の実施形態では、Mは、デキストラン、PEGポリマー（例えば、PEG 5 kDaおよびPEG 12 kDa）、アルブミン、またはそれらの組み合わせから選択される。一部の実施形態では、MはPEGポリマーである。

50

## 【 0 1 2 7 】

一部の実施形態では、キャリアのサイズは、50～70 kDである。一部の実施形態では、滑液の取り込みを生じることなく、少量の負電荷がペプチドを肝臓の外側に維持する。

## 【 0 1 2 8 】

一部の実施形態では、選択的輸送分子は、アルブミンに結合している。特定の例では、アルブミンは正常な生理学的条件下で糸球体濾液から排出される。一部の実施形態では、選択的輸送分子は、アルブミンと共有結合共役体を形成することが可能なマレイミド等の反応性基を含む。アルブミン含有選択的輸送分子は、切断依存的な方法で腫瘍中の切断された選択的輸送分子の蓄積を強化する。実施例 2 参照。一部の実施形態では、アルブミン共役体は、良好な薬物動態学的特性を有するが、化学合成で取扱うのは難しい。

10

## 【 0 1 2 9 】

一部の実施形態では、選択的輸送分子は PEG ポリマーに結合している。一部の実施形態では、選択的輸送分子は PEG 5 kDa ポリマーに結合している。一部の実施形態では、選択的輸送分子は PEG 12 kDa ポリマーに結合している。一部の実施形態では、5 kDa PEG 共役体は遊離ペプチドと同様の挙動を示した。一部の実施形態では、12 kDa PEG 共役体は、遊離ペプチドに比べ長い半減期を有していた。PEG ポリマーを使った効果の詳細分析に関しては、実施例 5 を参照のこと。

## 【 0 1 3 0 】

一部の実施形態では、選択的輸送分子はデキストランに結合している。一部の実施形態では、選択的輸送分子は 70 kDa デキストランに結合している。一部の実施形態では、種々分子量の混合体になるため、デキストラン共役体は合成と純度の再現が困難である。デキストランを使った効果の詳細分析に関しては、実施例 5 を参照のこと。

20

## 【 0 1 3 1 】

一部の実施形態では、選択的輸送分子はストレプトアビジンに結合している。ストレプトアビジンを使った効果の詳細分析に関しては、実施例 5 を参照のこと。

## 【 0 1 3 2 】

一部の実施形態では、選択的輸送分子は第 5 世代 PAMAM デンドリマーに結合している。デンドリマーを使った効果の詳細分析に関しては、実施例 5 を参照のこと。

## 【 0 1 3 3 】

血漿中半減期および取り込みの変化に関しては、表 3 を参照のこと。

30

## 【 0 1 3 4 】

【表 3】

ペプチド構造	ゲルによる 大凡の 純度	屠殺時 用量/ 時間	大凡の 血漿中 半減期	腫瘍 取り込み (SUV) (平均±SD)	肝臓 取り込み (SUV) (平均±SD)	腎臓 取り込み (SUV) (平均±SD)
12kD-PEG-e <sub>9</sub> - XPLGLAG-r <sub>9</sub> -k(cy5)	>90%	6 nmol 1h	20m	0.51±0.13 (n=7)	1.58±0.79 (n=7)	3.38±1.33 (n=7)
12kD PEG-e <sub>9</sub> -Xplglag-r <sub>9</sub> - k(cy5)	>90%	6 nmol 1h	NA	0.26±0.09 (n=4)	2.52±0.65 (n=4)	7.10±2.38 (n=4)
12kD-PEG-e <sub>9</sub> - XPLGLAG-r <sub>9</sub> -k(cy5)	>90%	6 nmol 1h	NA	0.68±0.17 (n=2)	1.17±0.49 (n=2)	5.33±0.64 (n=2)
12kD PEG-e <sub>9</sub> -Xplglag-r <sub>9</sub> - k(cy5)	>90%	6 nmol 1h	NA	0.31±0.18 (n=2)	0.71±0.17 (n=2)	3.27±0.62 (n=2)
Alb-e <sub>9</sub> -XPLGLAG-r <sub>9</sub> - k(cy5)	~60%	4.8 nmol 48h	3h	0.9±0.3 (n=2)	8.3±2.9 (n=2)	2.8±1.0 (n=2)
Alb-e <sub>9</sub> -Xplglag-r <sub>9</sub> -k(cy5)	~40%	6 nmol 48h	NA	0.2±0.1 (n=2)	11.8±1.1 (n=2)	5.4±0.2 (n=2)
Dex-e <sub>9</sub> -XPLGLAG-r <sub>9</sub> - k(cy5)	評価せず	5 nmol 48h	6h	2.3±2.0 (n=2)	14.2±7.1 (n=2)	3.3±1.9 (n=2)
Dex-e <sub>9</sub> -Xplglag-r <sub>9</sub> -k(cy5)	評価せず	6nmol 48h	NA	0.5±0.2 (n=2)	11.1±1.5 (n=2)	6.1±0.5 (n=2)
ストレプトアビジン-[e <sub>9</sub> - XPLGLAG-r <sub>9</sub> -k(cy5)] <sub>4</sub>	評価せず	4 nmol 48h	4h	0.4±0.0 (n=2)	3.2±0.0 (n=2)	3.7±1.0 (n=2)
G5 PAMAM-[e <sub>9</sub> - XPLGLAX-r <sub>9</sub> - k(cy5)] <sub>2</sub> [Succ] <sub>126</sub>	60%	3 nmol 24h	NA	1.4±0.4 (n=2)	6.6±2.1 (n=2)	1.8±0.4 (n=2)
G5-PAMAM-[e <sub>9</sub> - XPLGLAX-r <sub>9</sub> -k(cy5)] <sub>2</sub> [PEG] <sub>126</sub>	>90%	3 nmol 24h	20h	1.2±0.1 (n=3)	4.1±0.7 (n=3)	2.0±0.2 (n=3)
G5PAMAM-[e <sub>9</sub> - XPLGLAX-r <sub>9</sub> -k(cy5)] <sub>2</sub> [PEG] <sub>126</sub>	>90%	3 nmol 48h	NA	1.36±0.13 (n=3)	5.89±0.55 (n=3)	2.09±0.34 (n=3)
G5PAMAM-[e <sub>9</sub> - XPLGLAG-r <sub>9</sub> -k(cy5)] [PEG] <sub>127</sub>	>90%	3 nmol 48h	NA	0.6±0.1 (0.5,0.7) n=2	3.5±1.7 (2.3,4.7) n=2	1.1±0.0 (1.1,1.1) n=2
G5PAMAM-[e <sub>9</sub> - OPLG(MeC)AG-r <sub>9</sub> - k(cy5)] [PEG] <sub>127</sub>	>90%	3 nmol 48h		0.7±0.5 (0.2-1.2) n=3	1.8±0.8 (0.9-2.3) n=3	1.3±0.4 (1.0-1.7) n=3

10

20

## 【0135】

30

一部の実施形態では、キャリアはキャップされている。キャッピング法については、実施例 1 参照。一部の実施形態では、キャリアのキャッピングは薬物動態学を改善し、親水性を与えることによりキャリアの細胞毒性を減少させる。一部の実施形態では、キャップはアセチル、スクシニル、3 - ヒドロキシプロピオニル、2 - スルホベンゾイル、グリシジル、PEG - 2、PEG - 4、PEG - 8 および PEG - 12 から選択される。キャッピング効果の詳細分析については、実施例 6 を参照のこと。

## 【0136】

## デンドリマー

本明細書の特定の実施形態では、選択的輸送分子が開示される。一部の実施形態では、本明細書で開示される選択的輸送分子は、式 (A - X - B)<sub>n</sub> - D を有し、D は、デンドリマーであり；A は、5 ~ 9 個の連続した酸性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり、該アミノ酸は、アスパルタートおよびグルタマートから選択され；B は、5 ~ 20 個の連続した塩基性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり；X は、リンカーであり；かつ n は 1 ~ 20 の整数であり；D は、B との結合により (A - X - B) 成分と結合している。一部の実施形態では、D は、ポリアルギニン末端との結合により (A - X - B) 成分と結合している。一部の実施形態では、D は少なくとも 1 つの積荷成分を含む。ペプチドのデンドリマーとの共役化の方法に付いては、実施例 1 を参照のこと。

40

## 【0137】

本明細書で使われる「デンドリマー」は、多官能性（または多分岐）分子を意味する。一部の実施形態では、デンドリマーは、中心分子が何回も繰り返して分岐する構造である

50

。一部の実施形態では、デンドリマーはナノ粒子である。

【0138】

一部の実施形態では、Dは、共有結合でB（またはC末端ポリアルギニン）に結合している。一部の実施形態では、共有結合は、エーテル結合、チオエーテル結合、アミン結合、アミド結合、炭素-炭素結合、炭素-窒素結合、炭素-酸素結合、または炭素-硫黄結合を含む。

【0139】

一部の実施形態では、複数の(A-X-B)成分がDに結合している。実施例3を参照。一部の実施形態では、複数の積荷成分がDに結合している。一部の実施形態では、(a)複数の(A-X-B)成分がDに結合し、(b)複数の積荷成分がDに結合している。

10

【0140】

一部の実施形態では、デンドリマーは、アルブミンと共有結合共役体を形成可能なマレイミド等の反応性基を含む。一部の実施形態では、デンドリマーは、選択的輸送分子のC末端でマレイミドリンカーを介して選択的輸送分子と共役される。

【0141】

一部の実施形態では選択的輸送分子のデンドリマーに対する共役により、非共役（または遊離）選択的輸送分子に比べ、血漿中半減期が増加する。一部の実施形態では、選択的輸送分子のデンドリマーに対する共役により、非共役選択的輸送分子に比べ、急性の毒性が減少する。一部の実施形態では、選択的輸送分子のデンドリマーに対する共役により、非共役選択的輸送分子に比べ、滑膜、軟骨および腎臓による取り込みが減少する。

20

【0142】

一部の実施形態では、デンドリマーナノ粒子に共役した選択的輸送分子は、マクロファージ関連腫瘍の標的化に使われる。一部の実施形態では、さらにリシンAを含むデンドリマーナノ粒子に共役した選択的輸送分子は、皮下マクロファージを毒殺するのに使われる。デンドリマーナノ粒子使用効果の詳細分析については、実施例7を参照のこと。

【0143】

積荷

本明細書の特定の実施形態では、インビボ循環の増加した選択的輸送分子が開示される。

【0144】

一部の実施形態では、本明細書で開示される選択的輸送分子は、式(A-X-B-C)-Mを有し、式中、Cは積荷成分であり；Aは、5～9個の連続した酸性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり、該アミノ酸は、アスパルタートおよびグルタマートから選択され；Bは、5～20個の連続した塩基性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり；Xは、リンカーであり；かつMは、高分子キャリアである。

30

【0145】

一部の実施形態では、本明細書で開示される選択的輸送分子は、式(A-X-B)-Dを有し、式中、Cは積荷成分であり；Aは、5～9個の連続した酸性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり、該アミノ酸は、アスパルタートおよびグルタマートから選択され；Bは、5～20個の連続した塩基性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり；Xは、リンカーであり；かつDは、デンドリマーである。一部の実施形態では、Dは、積荷成分を含む。選択的輸送分子に標識を付加する方法については実施例1を参照のこと。

40

【0146】

本明細書で開示される選択的輸送分子は、細胞への取り込みのための異なるタイプの積荷および同じタイプの積荷の異なる種を含む各種の積荷を運ぶのに適している。例えば、異なるタイプの積荷には、マーカー積荷（例えば、蛍光または放射性的標識成分）および治療用積荷（例えば、化学療法用分子、例えば、メトトレキサートまたはドキソルビシン）、またはその他の積荷を含むことができる。異常または病的細胞の破壊が治療に必要な場合、治療の積荷に、「細胞傷害性薬剤」、すなわち細胞の機能を阻害または防止しおよび/または細胞破壊を生じる物質を含むこともできる。

50



## 【0147】

蛍光分子等の積荷の送達は、特定の条件を有する細胞または特殊な状態を示す領域中の細胞を可視化するために使うことができる。例えば、血栓症（血栓形成）は、蛍光またはその他のマーカーを含む積荷をその領域に送達するために、リンカーXが血液血栓形成カスケード中の多くのプロテアーゼ中のどれかにより切断されるように設計することにより可視化可能である。同様に、補体活性化も、蛍光またはその他のマーカーをその領域に送達するために、リンカーXが補体活性化カスケード中のいずれか1つまたは複数のプロテアーゼにより切断されるように設計することにより可視化可能である。このように、蛍光分子は、リンカーXの切断によるA部の放出の際に標的細胞および領域に送達されうるマーカーの一例である。

10

## 【0148】

一部の実施形態では、積荷成分は、造影剤、治療薬、脂質、またはこれらの組み合わせから選択される。

## 【0149】

一部の実施形態では、積荷部分は少なくとも2つの積荷成分を含む。一部の実施形態では、Cはマーカー積荷および治療用の積荷を含む。複数の積荷成分は、例えば、放射性マーカーおよび超音波またはコントラスト剤の両方の送達を可能とし、異なるモードで画像化できる。あるいは、例えば、抗癌薬剤と一緒に放射性積荷の送達により強化された抗癌活性が得られ、または蛍光積荷を伴った放射性積荷の送達により積荷を取り込んだ細胞を見つけ出し特定する複数の手段を可能にする。

20

## 【0150】

積荷成分の付加

積荷成分は、どのような位置でも配向でもBに付加される。積荷成分を、リンカーXの反対側のB部末端に配置する必要はない。Xが切断された後にその付加部が残される限りは、積荷成分のBへの付加の位置はどこであっても許容される。例えば、図2Aおよび2Bに示すように、B部の反対側末端に結合したリンカーXを有するB部の末端またはその近くに付加してもよい。また、積荷成分を、B部の同じ側の末端またはその近くに結合したリンカーXを有するB部の末端またはその近くに付加してもよい。

## 【0151】

分子がデンドリマーを含む場合は、積荷は直接Dに付加される。非限定的例であるが、積荷は次のように付加される：

30

(A - X - B) - D - 積荷。

## 【0152】

一部の実施形態では、積荷成分は、B（もしくは、C末端ポリアルギニン）またはDに共有結合する。一部の実施形態では、共有結合は、エーテル結合、チオエーテル結合、アミン結合、アミド結合、炭素 - 炭素結合、炭素 - 窒素結合、炭素 - 酸素結合、または炭素 - 硫黄結合を含む。

## 【0153】

積荷としての造影剤

一部の実施形態では、積荷成分は蛍光分子、例えば、フルオレセインである。蛍光積荷成分は、蛍光顕微鏡または末固定培養細胞のフローサイトメトリーの測定を容易にする。

40

## 【0154】

一部の実施形態では、積荷成分を、下記を使って標識付けする：ポジトロン放射型断層撮影法（PET）用陽電子放出アイソトープ（例えば、 $^{18}\text{F}$ ）、単一光子放射型コンピュータ断層撮影法（SPECT）用ガンマ線アイソトープ（例えば、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）、磁気共鳴画像（MRI）用常磁性分子またはナノ粒子（例えば、 $\text{Gd}^{3+}$ キレートまたは被覆マグネタイトナノ粒子）、近赤外（near-IR）画像化用近赤外フルオロフォア、バイオルミネセンス画像化用ルシフェラーゼ（ホタル、細菌、または腔腸動物）またはその他の発光分子、または超音波用パーフルオロカーボン充填小胞。

## 【0155】

50

一部の実施形態では、積荷成分は放射性の成分、例えば、 $^{211}\text{At}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $\text{Lu}$ の放射性アイソトープ、およびその他のもの等の放射性アイソトープである。

#### 【0156】

一部の実施形態では、積荷成分は蛍光成分、例えば、蛍光タンパク質、ペプチド、または蛍光染料分子である。一般的な蛍光染料には、限定されないが、キサンテン、例えば、ローダミン、ロドールおよびフルオレセイン、およびそれらの誘導体；ビマン；クマリンおよびそれらの誘導体、例えば、ウンベリフェロンおよびアミノメチルクマリン；芳香族アミン、例えば、ダンシル；スクアラート染料；ベンゾフラン；蛍光シアニン；カルバゾール；ジシアノメチレンピラン、ポリメチン、オキサベンゾアントラン、キサンテン、ピリリウム、カルボスチル、ペリレン、アクリドン、キナクリドン、ルブレン、アントラセン、コロネン、フェナントレセン、ピレン、ブタジエン、スチルベン、ランタニド金属キレート錯体類、希土類金属キレート錯体類、およびこのような染料の誘導体が挙げられる。蛍光染料は、例えば米国特許第4,452,720号、米国特許第5,227,487号、および米国特許第5,543,295号で考察されている。

10

#### 【0157】

一部の実施形態では、積荷成分はフルオレセイン染料である。典型的フルオレセイン染料には、限定されないが、5 - カルボキシフルオレセイン、フルオレセイン - 5 - イソチオシアナートおよび6 - カルボキシフルオレセインが含まれる；他のフルオレセイン染料の例は、例えば、米国特許第6,008,379号、米国特許第5,750,409号、米国特許第5,066,580号、および米国特許第4,439,356号に認められる。積荷成分Cには、ローダミン染料、例えば、テトラメチルローダミン - 6 - イソチオシアナート、5 - カルボキシテトラメチルローダミン、5 - カルボキシロドール誘導体、テトラメチルおよびテトラエチルローダミン、ジフェニルジメチルおよびジフェニルジエチルローダミン、ジナフチルローダミン、ローダミン101塩化スルホニル (TEXASREED (登録商標) の商品名で販売されている)、およびその他のローダミン染料等が含まれてもよい。他のローダミン染料は、例えば、米国特許第6,080,852号、米国特許第6,025,505号、米国特許第5,936,087号、米国特許第5,750,409号に認められる。積荷成分Cには、シアニン染料、例えば、Cy3、Cy3B、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7等を含んでもよい。

20

30

#### 【0158】

上記化合物またはその誘導体の一部には、蛍光に加えてリン光を、またはリン光のみを発するものがある。一部のリン光化合物には、ポルフィリン、フタロシアニン、多環芳香族化合物、例えば、ピレン、アントラセンおよびアセナフテン、等が含まれ、これらは積荷成分であっても、積荷成分に含まれてもよい。積荷成分は、同様に、蛍光消光剤、例えば、(4 - ジメチルアミノフェニルアゾ)安息香酸(DABCYL)基、等であっても、これを含んでもよい。

#### 【0159】

一部の実施形態では、積荷成分は、蛍光標識である。一部の実施形態では、積荷成分は、インドカルボシアニン染料、Cy5、Cy5.5、Cy7、IRDYE800CW、ALEXA647、またはこれらの組み合わせである。一部の実施形態では、積荷成分は、MRIコントラスト剤である。一部の実施形態では、積荷成分は、[4,7,10 - トリス(カルボキシメチル) - 1,4,7,10 - テトラアザシクロデカ - 1 - イル]アセチルのGd錯体である。

40

#### 【0160】

一部の実施形態では、積荷成分は分子標識の全体または一部である。本明細書で使われる「分子標識」は、フルオロフォアおよび蛍光消光剤と相補的な領域を有する一対の結合化合物を意味し、フルオロフォアの蛍光は消光剤によって消光される。相補的な領域の1つまたは両方が積荷成分の一部であってもよい。相補的な領域(例えば、蛍光成分)の1つのみが積荷成分の一部であり、消光剤成分がリンカーXまたは酸性のA部の一部である

50

場合、リンカー X の切断は、蛍光部分の蛍光発光を許容し、切断の検出を可能とするであろう。細胞による取り込みの場合は、分子標識の蛍光部分が細胞の検出を可能とするであろう。例えば、消光剤 Q は酸性の A 部に付加し本発明 Q - A - X - B - C ( 積荷は蛍光で Q によって消光される ) の特徴を有する選択的輸送分子を形成できる。積荷成分の Q による消光は X の切断によって解放され、細胞が取り込んだ B - C 部のマーキングを可能にする。蛍光消光と選択的取り込みの組み合わせは、X を切断できないものに比べ、X 切断可能組織間のコントラストを増加させるはずである。

#### 【 0 1 6 1 】

積荷としての治療薬

一部の実施形態では、積荷成分は治療薬、例えば、癌、虚血組織、または壊死組織の治療に有用な化合物である。

10

#### 【 0 1 6 2 】

治療用として、例えば、適切な種類の積荷には、限定されないが、a) 化学療法剤；b) 放射線増感剤；または c) アポトーシス、細胞周期、またはその他の重大なシグナル伝達カスケードを調節するペプチドまたはタンパク質、が含まれる。

#### 【 0 1 6 3 】

一部の実施形態では、積荷成分は細胞死 ( 例えば、アポトーシスまたは壊死を介した ) を調節する薬剤である。一部の実施形態では、積荷成分はアポトーシス促進剤である。一部の実施形態では、薬剤は抗アポトーシス剤である。一部の実施形態では、薬剤は、以下から選択される：ミノサイクリン；SB - 203580 ( 4 - ( 4 - フルオロフェニル ) - 2 - ( 4 - メチルスルフィニルフェニル ) - 5 - ( 4 - ピリジル ) 1 H - イミダゾール ) ； PD 169316 ( 4 - ( 4 - フルオロフェニル ) - 2 - ( 4 - ニトロフェニル ) - 5 - ( 4 - ピリジル ) - 1 H - イミダゾール ) ； SB 202190 ( 4 - ( 4 - フルオロフェニル ) - 2 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 5 - ( 4 - ピリジル ) 1 H - イミダゾール ) ； RWJ 67657 ( 4 - [ 4 - ( 4 - フルオロフェニル ) - 1 - ( 3 - フェニルプロピル ) - 5 - ( 4 - ピリジニル ) - 1 H - イミダゾール - 2 - イル ] - 3 - ブチン - 1 - オール ) ； SB 220025 ( 5 - ( 2 - アミノ - 4 - ピリミジニル ) - 4 - ( 4 - フルオロフェニル ) - 1 - ( 4 - ピペリジンリル ( p i p e r i d i n y l ) ) イミダゾール ) ； D - JNKI - 1 ( ( D ) - h J I P 175 - 157 - D P r o - D P r o - ( D ) - H I V - T A T 57 - 48 ) ； AM - 111 ( A u r i s ) ； SP600125 ( アントラ [ 1 , 9 - c d ] ピラゾール - 6 ( 2 H ) - オン ) ； JNK 阻害剤 I ( ( L ) - H I V - T A T 48 - 57 - P P - J B D 20 ) ； JNK 阻害剤 I I I ( ( L ) - H I V - T A T 47 - 57 - g a b a - c - J u n 33 - 57 ) ； AS601245 ( 1 , 3 - ベンゾチアゾール - 2 - イル ( 2 - [ [ 2 - ( 3 - ピリジニル ) エチル ] アミノ ] - 4 ピリミジニル ) アセトニトリル ) ； JNK 阻害剤 V I ( H 2 N - R P K R P T T L N L F - N H 2 ) ； JNK 阻害剤 V I I I ( N - ( 4 - アミノ - 5 - シアノ - 6 - エトキシピリジン - 2 - イル ) - 2 - ( 2 , 5 - ジメトキシフェニル ) アセトアミド ) ； JNK 阻害剤 I X ( N - ( 3 - シアノ - 4 , 5 , 6 , 7 - テトラヒドロ - 1 - ベンゾチエン - 2 - イル ) - 1 - ナフトアミド ) ；ジクマロール ( 3 , 3' - メチレンビス ( 4 - ヒドロキシクマリン ) ) ； SC - 236 ( 4 - [ 5 - ( 4 - クロロフェニル ) - 3 - ( トリフルオロメチル ) - 1 H - ピラゾール - 1 - イル ] ベンゼン - スルホンアミド ) ； CEP - 1347 ( C e p h a l o n ) ； CEP - 11004 ( C e p h a l o n ) ；少なくとも Bcl - 2 ポリペプチドの一部を含む人工タンパク質；組換え型 FNK ； V5 ( B a x 阻害剤ペプチド V5 としても知られる ) ； B a x チャンネル遮断薬 ( ( ± ) - 1 - ( 3 , 6 - ジプロモカルバゾール - 9 - イル ) - 3 - ピペラジン - 1 - イル - プロパン - 2 - オール ) ； B a x 阻害ペプチド P5 ( B a x 阻害剤ペプチド P5 としても知られる ) ； Kp7 - 6 ； F A I M ( S ) ( F a s アポトーシス阻害性分子 - s h o r t ) ； F A I M ( L ) ( F a s アポトーシス阻害性分子 - l o n g ) ； F a s : F c ； F A P - 1 ； N O K 2 ； F 2051 ； F 1926 ； F 2928 ； Z B 4 ； F a s M 3 m A b ； E G F ； 740Y - P ； SC3036 ( K K H T D D G Y M P M S P G V A ) ； P I 3 - キナーゼ活性化因子 (

20

30

40

50

Santa Cruz Biotechnology、Inc.) ; Pam3Cys ( ( S ) - ( 2 , 3 - ビス ( パルミトイルオキシ ) - ( 2 RS ) - プロピル ) - N - パルミトイル - ( R ) - Cys - ( S ) - Ser ( S ) - Lys 4 - OH、トリヒドロクロリド ) ; Act1 ( NF - k B 活性化因子 1 ) ; 抗 Ik B 抗体 ; アセチル - 11 - ケト - b - ポスウェル酸 ; アンドログラホリド ; カフェー酸フェネチルエステル ( CAPE ) ; グリオトキシン ; イソヘレニン ; NEMO - 結合ドメイン結合ペプチド

(DRQIKIWFQNRRMKWKKKTALDWSWLQTE)

; NF - k B 活性化阻害剤 ( 6 - アミノ - 4 - ( 4 - フェノキシフェニルエチルアミノ ) キナゾリン ) ; NF - k B 活性化阻害剤 II ( 4 - メチル - N1 - ( 3 - フェニルプロピル ) ベンゼン - 1 , 2 - ジアミン ) ; NF - k B 活性化阻害剤 III ( 3 - クロロ - 4 - ニトロ - N - ( 5 - ニトロ - 2 - チアゾリル ) - ベンズアミド ) ; NF - k B 活性化阻害剤 IV ( ( E ) - 2 - フルオロ - 4' - メトキシスチルベン ) ; NF - k B 活性化阻害剤 V ( 5 - ヒドロキシ - ( 2 , 6 - ジイソプロピルフェニル ) - 1 H - イソインドール - 1 , 3 - ジオン ) ; NF - k B SN50

(AAVALLPAVLLALLAPVQRKRQKLMP)

; オリドニン ; パルテノライド ; PPM - 18 ( 2 - ベンゾイルアミノ - 1 , 4 - ナフトキノン ) ; Ro106 - 9920 ; スルファサラジン ; TIRAP 阻害剤ペプチド

(RQIKIWFNRRMKWKKLQLRDAAPGGAIVS)

; ウィタフェリン A ; ウォゴニン ; BAY11 - 7082 ( ( E ) 3 - [ ( 4 - メチルフェニル ) スルホニル ] - 2 - プロペンニトリル ) ; BAY11 - 7085 ( ( E ) 3 - [ ( 4 - t - ブチルフェニル ) スルホニル ] - 2 - プロペンニトリル ) ; ( E ) - カブサイシン ; 金チオリンゴ酸 ( ATM または AuTM ) ; エボジアミン ; ヒポエストキシド ; IKK 阻害剤 III ( BMS - 345541 ) ; IKK 阻害剤 VII ; IKK 阻害剤 X ; IKK 阻害剤 II ; IKK - 2 阻害剤 IV ; IKK - 2 阻害剤 V ; IKK - 2 阻害剤 VI ; IKK - 2 阻害剤 ( SC - 514 ) ; IkB キナーゼ阻害剤ペプチド ; IKK - 3 阻害剤 IX ; ARRY - 797 ( Array BioPharma ) ; SB - 220025 ( 5 - ( 2 - アミノ - 4 - ピリミジニル ) - 4 - ( 4 - フルオロフェニル ) - 1 - ( 4 - ピペリジンリル ) イミダゾール ) ; SB - 239063 ( トランス - 4 - [ 4 - ( 4 - フルオロフェニル ) - 5 - ( 2 - メトキシ - 4 - ピリミジニル ) - 1 H - イミダゾール - 1 - イル ] シクロヘキサノール ) ; SB - 202190 ( 4 - ( 4 - フルオロフェニル ) - 2 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 5 - ( 4 - ピリジニル ) 1 H - イミダゾール ) ; JX - 401 ( - [ 2 - メトキシ - 4 - ( メチルチオ ) ベンゾイル ] - 4 - ( フェニルメチル ) ピペリジン ) ; PD - 169316 ( 4 - ( 4 - フルオロフェニル ) - 2 - ( 4 - ニトロフェニル ) - 5 - ( 4 - ピリジニル ) - 1 H - イミダゾール ) ; SKF - 86002 ( 6 - ( 4 - フルオロフェニル ) - 2 , 3 - ジヒドロ - 5 - ( 4 - ピリジニル ) イミダゾ [ 2 , 1 - b ] チアゾールジヒドロクロリド ) ; SB - 200646 ( N - ( 1 - メチル - 1 H - インドール - 5 - イル ) - N' - 3 - ピリジニル尿素 ) ; CMPD - 1 ( 2' - フルオロ - N - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - [ 1 , 1' - ビフェニル ] - 4 - ブタンアミド ) ; EO - 1428 ( ( 2 - メチルフェニル ) - [ 4 - [ ( 2 - アミノ - 4 - プロモフェニル ) アミノ ] - 2 - クロロフェニル ] メタノン ) ; SB - 253080 ( 4 - [ 5 - ( 4 - フルオロフェニル ) - 2 - [ 4 - ( メチルスルホニル ) フェニル ] - 1 H - イミダゾール - 4 - イル ] ピリジン ) ; SD - 169 ( 1 H - インドール - 5 - カルボキサミド ) ; SB - 203580 ( 4 - ( 4 - フルオロフェニル ) - 2 - ( 4 - メチルスルフィニルフェニル ) - 5 - ( 4 - ピリジニル ) 1 H - イミダゾール ) ; TZP - 101 ( Tranzyme Pharma ) ; TZP - 102 ( Tranzyme Pharma ) ; GHRP - 6 ( 成長ホルモン放出ペプチド - 6 ) ; GHRP - 2 ( 成長ホルモン放出ペプチド - 2 ) ; EX - 1314 ( Elixir Pharmaceuticals ) ; MK - 677 ( Merck ) ; L - 692 , 429 ( ブタンアミド、3 - アミノ - 3 - メチル - N - ( 2 , 3 , 4 , 5 - テトラヒドロ - 2 - オキソ - 1 - ( ( 2' - ( 1 H - テトラゾール - 5 - イル ) ( 1 , 1' - ビフェニル ) - 4 - イル ) メチル ) - 1 H - 1 - ベンゾアゼピン - 3 - イ

10

20

30

40

50

ル) -、(R) - ) ; EP 1 5 7 2 ( A i b - D T r p - D g T r p - C H O ) ; ジルチ  
 アゼム ; ジルチアゼムの代謝物 ; B R E ( 脳および生殖器官発現タンパク質 ) ; ベラパミ  
 ル ; ニモジピン ; ジルチアゼム ; オメガコノトキシニン ; G V I A ; アムロジピン ; フェロ  
 ジピン ; ラシジピン ; ミベフラジル ; N P P B ( 5 - ニトロ - 2 - ( 3 - フェニルプロピ  
 ルアミノ ) 安息香酸 ) ; フルナリジン ; エリトロポイエチン ; ピペリン ; ヘミン ; ブラジ  
 リン ; z - V A D - F M K ( ベンジルオキシカルボニル - V a l - A l a - A s p ( O M  
 e ) - フルオロメチルケトン ) ; z - L E H D - F M K ( ベンジルオキシカルボニル - L  
 e u - G l u ( O M e ) - H i s - A s p ( O M e ) - フルオロメチルケトン ) ; B - D  
 - F M K ( b o c - アスパルチル ( O m e ) - フルオロメチルケトン ) ; A c - L E H D  
 - C H O ( N - アセチル - L e u - G l u - H i s - A s p - C H O ) ; A c - I E T D  
 - C H O ( N - アセチル - I l e - G l u - T h r - A s p - C H O ) ; z - I E T D -  
 F M K ( ベンジルオキシカルボニル - I l e - G l u ( O M e ) - T h r - A s p ( O M  
 e ) - フルオロメチルケトン ) ; F A M - L E H D - F M K ( ベンジルオキシカルボニル  
 L e u - G l u - H i s - A s p - フルオロメチルケトン ) ; F A M - L E T D - F M K  
 ( ベンジルオキシカルボニル L e u - G l u - T h r - A s p - フルオロメチルケトン )  
 ; Q - V D - O P H ( キノリン - V a l - A s p - C H 2 - O - P h ) ; X I A P ; c I  
 A P - 1 ; c I A P - 2 ; M L - I A P ; I L P - 2 ; N A I P ; サバイピン ; B r u c  
 e ; I A P L - 3 ; ホルチリン ; ロイペプチン ; P D - 1 5 0 6 0 6 ( 3 - ( 4 - ヨード  
 フェニル ) - 2 - メルカプト - ( Z ) - 2 - プロペン酸 ) ; M D L - 2 8 1 7 0 ( Z - V  
 a l - P h e - C H O ) ; カルペプチン ; アセチルカルバスタチン ; M G 1 3 2 ( N - [  
 ( フェニルメトキシ ) カルボニル ] - L - ロイシル - N - [ ( 1 S ) - 1 - ホルミル - 3  
 - メチルブチル ] - L - ロイシニアミド ) ; M Y O D U R ; B N 8 2 2 7 0 ( I p s e n  
 ) ; B N 2 2 0 4 ( I p s e n ) ; A H L i - 1 1 ( Q u a r k P h a r m a c e u t  
 i c a l s ) 、 m d m 2 タンパク質、ピフィスリン - ( 1 - ( 4 - メチルフェニル ) -  
 2 - ( 4 , 5 , 6 , 7 - テトラヒドロ - 2 - イミノ - 3 ( 2 H ) - ベンゾチアゾリル ) エ  
 タノン ) ; トランス - スチルベン ; シス - スチルベン ; リスベラトロール ; ピセタノール  
 ; ラボンチン ; デオキシラボンチン ; プテイン ; カルコン ; イソリキルチゲン ; プテイン  
 ; 4 , 2 ' , 4 ' - トリヒドロキシカルコン ; 3 , 4 , 2 ' , 4 ' , 6 ' - ペンタヒドロキ  
 シカルコン ; フラボン ; モリン ; フィセチン ; ルテオリン ; ケルセチン ; ケンフェロール  
 ; アピゲニン ; ゴッシペチン ; ミリセチン ; 6 - ヒドロキシアピゲニン ; 5 - ヒドロキシ  
 フラボン ; 5 , 7 , 3 ' , 4 ' , 5 ' - ペンタヒドロキシフラボン ; 3 , 7 , 3 ' , 4 '  
 , 5 ' - ペンタヒドロキシフラボン ; 3 , 6 , 3 ' , 4 ' - テトラヒドロキシフラボン ; 7  
 , 3 ' , 4 ' , 5 ' - テトラヒドロキシフラボン ; 3 , 6 , 2 ' , 4 ' - テトラヒドロキシ  
 フラボン ; 7 , 4 ' - ジヒドロキシフラボン ; 7 , 8 , 3 ' , 4 ' - テトラヒドロキシフラ  
 ボン ; 3 , 6 , 2 ' , 3 ' - テトラヒドロキシフラボン ; 4 ' - ヒドロキシフラボン ; 5 -  
 ヒドロキシフラボン ; 5 , 4 ' - ジヒドロキシフラボン ; 5 , 7 - ジヒドロキシフラボン  
 ; ダイゼイン ; ゲニステイン ; ナリングニン ; フラバノン ; 3 , 5 , 7 , 3 ' , 4 ' - ペ  
 ンタヒドロキシフラバノン ; ベラルゴニジン塩化物 ; シアニジン塩化物 ; デルフィニジン  
 塩化物 ; ( - ) - エピカテキン ( 水酸基部位 : 3 , 5 , 7 , 3 ' , 4 ' ) ; ( - ) - カテキ  
 ン ( 水酸基部位 : 3 , 5 , 7 , 3 ' , 4 ' ) ; ( - ) - ガロカテキン ( 水酸基部位 : 3 , 5  
 , 7 , 3 ' , 4 ' , 5 ' ) ( + ) - カテキン ( 水酸基部位 : 3 , 5 , 7 , 3 ' , 4 ' ) ; ( +  
 ) - エピカテキン ( 水酸基部位 : 3 , 5 , 7 , 3 ' , 4 ' ) ; ヒノキチオール ( b - ツジャ  
 プリシン ; 2 - ヒドロキシ - 4 - イソプロピル - 2 , 4 , 6 - シクロヘプタトリエン - 1  
 - オン ) ; L - ( + ) - エルゴチオネイン ( ( S ) - a - カルボキシ - 2 , 3 - ジヒドロ  
 - N , N , N - トリメチル - 2 - チオキソ - 1 H - イミダゾール 4 - エタンアミニウム内  
 塩 ) ; カフェー酸フェニルエステル ; M C I - 1 8 6 ( 3 - メチル - 1 - フェニル - 2 -  
 ピラゾリン - 5 - オン ) ; H B E D ( N , N ' - ジ - ( 2 - ヒドロキシベンジル ) エチレ  
 ンジアミン - N , N ' - ジ酢酸  $\cdot$  H<sub>2</sub>O ) ; アンブロキソール ( トランス - 4 - ( 2 - ア  
 ミノ - 3 , 5 - ジプロモベンジルアミノ ) シクロヘキサン - H C l ; および U - 8 3 8 3  
 6 E ( ( - ) - 2 - ( ( 4 - ( 2 , 6 - ジ - 1 - ピロリジニル - 4 - ピリミジニル ) - 1

- ピペルザイニル)メチル) - 3, 4 - ジヒドロ - 2, 5, 7, 8 - テトラメチル - 2 H - 1 - ベンゾピラン - 6 - オール・2 H C l ) ; - 1' - 5 - メチルニコチンアミド - 2' - デオキシリボース ; - D - 1' - 5 - メチルニコチンアミド - 2' - デオキシリボフラノシド ; - 1' - 4, 5 - ジメチルニコチンアミド - 2' - デオキシリボース ; - D - 1' - 4, 5 - ジメチルニコチンアミド - 2' - デオキシリボフラノシド ; 1 - ナフチル P P 1 ( 1 - ( 1, 1 - ジメチルエチル ) - 3 - ( 1 - ナフタレニル ) - 1 H - ピラゾロ [ 3, 4 - d ] ピリミジン - 4 - アミン ) ; ラベンズスチン A ( 5 - [ [ ( 2, 5 - ジヒドロキシフェニル ) メチル ] [ ( 2 - ヒドロキシフェニル ) メチル ] アミノ ] - 2 - ヒドロキシ安息香酸 ) ; M N S ( 3, 4 - メチレンジオキシ - b - ニトロスチレン ) ; P P 1 ( 1 - ( 1, 1 - ジメチルエチル ) - 1 - ( 4 - メチルフェニル ) - 1 H - ピラゾロ [ 3, 4 - d ] ピリミジン - 4 - アミン ) ; P P 2 ( 3 - ( 4 - クロロフェニル ) 1 - ( 1, 1 - ジメチルエチル ) - 1 H - ピラゾロ [ 3, 4 - d ] ピリミジン - 4 - アミン ) ; K X - 004 ( K i n e x ) ; K X - 005 ( K i n e x ) ; K X - 136 ( K i n e x ) ; K X - 174 ( K i n e x ) ; K X - 141 ( K i n e x ) ; K X 2 - 328 ( K i n e x ) ; K X - 306 ( K i n e x ) ; K X - 329 ( K i n e x ) ; K X 2 - 391 ( K i n e x ) ; K X 2 - 377 ( K i n e x ) ; Z D 4190 ( A s t r a Z e n e c a ) ; N - ( 4 - ブロモ - 2 - フルオロフェニル ) - 6 - メトキシ - 7 - ( 2 - ( 1 H - 1, 2, 3 - トリアゾール - 1 - イル ) エトキシ ) キナゾリン - 4 - アミン ) ; A P 22408 ( A r i a d P h a r m a c e u t i c a l s ) ; A P 23236 ( A r i a d P h a r m a c e u t i c a l s ) ; A P 23451 ( A r i a d P h a r m a c e u t i c a l s ) ; A P 23464 ( A r i a d P h a r m a c e u t i c a l s ) ; A Z D 0530 ( A s t r a Z e n e c a ) ; A Z M 475271 ( M 475271 ; A s t r a Z e n e c a ) ; ダサチニブ ( N - ( 2 - クロロ - 6 - メチルフネイル ( m e t h y l p h n e y l ) ) - 2 - ( 6 - ( 4 - ( 2 - ヒドロキシエチル ) - ビペラジン - 1 - イル ) - 2 - メチルピリミジン - 4 - イルアミノ ) チアゾール - 5 - カルボキサミド ) ; G N 963 ( トランス - 4 - ( 6, 7 - ジメトキシキノキサリン - 2 イルアミノ ) シクロヘキサノール硫酸塩 ) ; ポスチニブ ( 4 - ( ( 2, 4 - ジクロロ - 5 - メトキシフェニル ) アミノ ) - 6 - メトキシ - 7 - ( 3 - ( 4 - メチル - 1 - ビペラジニル ) プロボキシ ) - 3 - キノリンカルボニトリル ) ; またはこれらの組み合わせ。

10

20

30

40

50

#### 【0164】

一部の実施形態では、積荷成分は細胞傷害性薬剤である。一部の実施形態では、積荷成分は、マイタンシン、メトトレキサート ( R H E U M A T R E X ( 登録商標 ) 、アメトプテリン ) ; シクロホスファミド ( C Y T O X A N ( 登録商標 ) ) ; サリドマイド ( T H A L I D O M I D ( 登録商標 ) ) ; パクリタキセル ; ペメトレキセド ; ペントスタチン ; ピボプロマン ; ピクサントロン ; プリカマイシン ; プロカルバジン ; プロテアソーム阻害剤 ( 例えば、ボルテゾミブ ) ; ラルチトレキセド ; レベッカマイシン ; ルビテカン ; S N - 38 ; サリノスポラミド A ; サトラブラチン ; ストレプトゾトシン ; スウェインソニン ; タリキダル ; タキサン ; テガフル - ウラシル ; テモゾロミド ; テストラクトン ; チオテパ ; チオグアニン ; トボテカン ; トラベクテジン ; トレチノイン ; トリブラチンテトラニトラート ; トリス ( 2 - クロロエチル ) アミン ; トロキサシタピン ; ウラシルマスタード ; バルルピシン ; ビンブラスチン ; ピンクリスチン ; ビノレルビン ; ボリノスタット ; ゾスキダル ; またはそれらの組み合わせである。

#### 【0165】

積荷としての脂質

本明細書の特定の実施形態では、選択的輸送分子が開示される。一部の実施形態では、本明細書で開示される選択的輸送分子は、式 ( A - X - B )<sub>n</sub> - L を有し、L は脂質であり ; A は、5 ~ 9 個の連続した酸性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり、該アミノ酸は、アスパルタートおよびグルタマートから選択され ; B は、5 ~ 20 個の連続した塩基性アミノ酸を含む配列を有するペプチドであり ; X は、リンカーである。脂質でカプセル化した治療薬を積荷として使用する効果の詳細分析については実施例 4 を参照のこと

。

## 【 0 1 6 6 】

一部の実施形態では、Lは共有結合によりB（または、C末端ポリアルギニン）に結合している。一部の実施形態では、共有結合には、エーテル結合、チオエーテル結合、アミン結合、アミド結合、炭素 - 炭素結合、炭素 - 窒素結合、炭素 - 酸素結合、または炭素 - 硫黄結合が含まれる。一部の実施形態では、Lは非共有結合の相互作用でBに結合している。

## 【 0 1 6 7 】

一部の実施形態では、複数の（A - X - B）成分がLに結合している。実施例3参照。一部の実施形態では、複数の積荷成分がLによりカプセル化される。一部の実施形態では、（a）複数の（A - X - B）成分がLに結合し；（b）複数の積荷成分がLによりカプセル化される。

## 【 0 1 6 8 】

一部の実施形態では、脂質は疎水性の分子を封入する。一部の実施形態では脂質は治療成分または画像化成分からなる群より選択される少なくとも1つの薬剤を封入する。一部の実施形態では、薬剤はドキシソルピシンである。一部の実施形態では、薬剤はバクリタキセルである。一部の実施形態では、薬剤はタモキシフェンである。一部の実施形態では、薬剤は下記から選択される：アロキシプリン、アセプトロール、アセタゾラミド、アセトヘキサミド、アクリバスチン、アルベンダゾール、アロプリノール、アルブラゾラム、アルプレノロール、アミロリド、アミノグルテチミド、アミオダロンHCl、アムロジピン、アモジアキン、アモキサピン、アンフェタミン、アムホテリシン、アムリノン、アムサクリン、アミルニトラート、アミロバルビトン、アステミゾール、アテノロール、アトロピン、アウラノフィン、アザプロパゾン、アザチオプリン、バルビトン、ベクルアミド、ベクロメタゾン、ベンドロフルアジド、ベニジピン、ベノリラート、ベンタゼパム、ベンズヘキサールHCl、ベンズニダゾール、ベフェニウムヒドロキシナフトアート、ベタカロテン、ベタメタゾン、ベザフィブラート、ビペリデン、ビスコジル、プロマゼパム、プロモクリプチンメシレート、ブロンペリドール、プロチゾラム、プデソニド、ブメタニド、ブスルファン、ブトバルビトン、ブトコナゾールニトラート、カンベンダゾール、カルバマゼピン、カルビマゾール、カルプロマル、クロランブシル、クロルジアゼボキシド、クロルメチアゾール、クロロキン、クロロチアジド、クロルプログアナイルHCl、クロルプロマジン、クロルプロバミド、クロルタリドン、シメチジン、シンナリジン、シノキサシン、シプロフロキサシンHCl、シサプリド、クラリスロマイシン、クリオキノール、クロバザム、クロファジミン、クロフィブラート、クロミフェンシトラート、クロナゼパム、クロチアゼパム、クロトリマゾール、クロキサシリン、クロザピン、コデイン、抱合型エストロゲン、コルチゾンアセタート、シクリジン、シクロスポリン、シプロヘプタジンHCl、ダカルバジン、ダナゾール、ダロジピン、デコキナート、デメクロサイクリン、デスオキシメタゾン、デキサメタゾン、デキサンフェタミン、デキスフェンフルラミン、デキストロプロピオキシフェン、ジアモルヒネ、ジアゼパム、ジアゾキシド、ジクロロフェン、ジクマロール、ジフルニサル、ジギトキシン、ジゴキシン、ジヒドロコデイン、ジヒドロエルゴタミンメシレート、ジヨードヒドロキシキノリン、ジリタゼムHCl、ジロキサニドフロアート、ジメンヒドリナート、ジニトルミド、ジフェノキシラートHCl、ジピリダモール、ジソピラミド、ドンペリドン、ドキシサイクリン、ドロペリドール、エコナゾールニトラート、エノキシモン、エルゴタミン酒石酸塩、エリスロマイシン、エストラジオール、エストラムスチン、エタクリン酸、エチナマート、エチニルエストラジオール、エチオナミド、エトプロバジンHCl、エトトイン、エトドラク、エトボシド、ファモチジン、フェロジピン、フェンブフェン、フェンフルラミン、フェノフィブラート、フェノプロフェンカルシム、フレカイニドアセタート、フルコナゾール、フルコルトロン、フルシトシン、フルドロコルチゾンアセタート、フルナニソン、フルナリジンHCl、フルニソリド、フルニトラゼパム、フルオプロマジン、フルペンチキソールデカノアート、フルフェナジンデカノアート、フルラゼパム、フルルビプロフェン、フルチカソ

10

20

30

40

50

ンプロピオナート、フルセミド、フルゾリドン、ゲムフィプロジル、グリベンクラミド、グリクラジド、グリピジド、グリセリルトリニトラート、グリセオフルビン、グアナベンズアセタート、ハロファントリンH C 1、ハロペリドール、ヒドロコルチゾン、ヒヨスチアミン、イブプロフェン、イミペネム、インドメタシン、イソソルビドジニトラート、イソソルビドモノニトラート、イスラジピン、イトラコナゾール、イベルメクチン、ケトコナゾール、ケトプロフェン、ラベタロール、ラナトシドC、ロムスチン、ロペルアミド、ロラタジン、ロラゼパム、ロルメタゼパム、マレイン酸リスリド、マプロチリンH C 1、マジンドール、メベンダゾール、メクロフェナム酸、メクロジンH C 1、メダゼパム、メジゴキシシン、メドロキシプロゲステロンアセタート、メフェナム酸、メフロキンH C 1、メルファラン、メペンゾラートプロミド、メプロバマート、メブタジノール、メルカプトプリン、メサラジン、メストラノール、メタドン、メタカロニ、メトイン、メトトレキサート、メトスクシミド、メチルフェノバルбитン、メチルプレドニゾロン、メチルテストステロン、マレイン酸メチセルギド、メトラゾン、メトプロロール、メトロニダゾール、ミアンセリンH C 1、ミコナゾール、ミダゾラム、ミノキシジル、マイトマイシン、ミトタン、ミトザントロン、モルヒネ、ナブメトン、ナドロール、ナルブフィン、ナリジクス酸、ナプロキセン、ナタマイシン、ニカルジピンH C 1、ニコウマロン、ニフェジピン、ニモジピン、ニモラゾール、ニトラゼパム、ニトロフラントイン、ニトロフラゾン、ニザチジン、ノルエチステロン、ノルゲストレル、ノルトリプチリンH C 1、ナイスタチン、オメブラゾール、オンダンセトロンH C 1、オルニダゾール、オキサムニキン、オキサニテルエンボナート、オキサトミド、オキサゼパム、オクスカルバゼピン、オクスフェンダゾール、オクスプレノロール、オキシフェンブタゾン、オキシフェンシルシミンH C 1、パクリタキセル、パラメタジオン、ペンタエリトリールテトラニトラート、ペンタゾシン、ペントバルビットン、ペルフェナジンピモジド、フェナセミド、フェニンジオン、フェノバルビットン、フェノキシベンザミンH C 1、フェンスクシミド、フェニルブタゾン、フェニトイン、ピンドロール、ピロキシカム、マレイン酸ピゾチフェン、ブラジクアンテル、ブラゾシンH C 1、プレドニゾロン、プレドニゾン、プリミドン、プロベネシド、プロブコール、プロカルバジンH C 1、プロクロルペラジン、プロゲステロン、プログアニルH C 1、プロプラノロール、プロピルチオウラシル、ピランテルエンボナート、ピリメタミン、キニジンスルファート、抗細菌性薬剤：ベネタミンペニシリン、キニーネスルファート、ラニチジンH C 1、レセルピン、リファンピシン、スピラマイシン、スピロノラクトン、スタノゾロール、スチベストロール、スルコナゾールニトラート、スリンダク、スルファベンズアミド、スルファセトアミド、スルファジアジン、スルファドキシシン、スルファフラゾール、スルファメラジン、スルファメトキサゾール、スルファピリジン、スルファサラジン、スルフィン - ピラゾン、スルピリド、スルチアム、スマトリブタンスクシナート、タモキシフェンシトラート、テマゼパム、テラゾシンH C 1、テルピナフィンH C 1、テルコナゾール、テルフェナジン、テストラクトン、テストステロン、テトラサイクリン、チアベンダゾール、チオリダジン、チボロン、チニダゾール、チオコナゾール、トラザミド、トルブタミド、トラゾドンH C 1、トリアムシノロン、トリアムテレン、トリアゾラム、トリメトプリム、マレイン酸トリミブラミン、トロピカミド、ウンデセン酸、バルプロ酸、ビタミンA、ビタミンB 2、ビタミンD、ビタミンE、ビタミンK、ゾピクロン、またはこれらの組み合わせ。

#### 【0169】

一部の実施形態では、脂質はペグ化されている。一部の実施形態では、脂質はPEG(2K) - ホスファチジルエタノールアミンである。

#### 【0170】

#### 使用方法

#### 組織の標識化

本明細書の特定の実施形態では、それを必要としている患者に本明細書記載の選択的輸送分子の投与することにより組織の標識化(例えば、腫瘍切除用の外科的縁を決めるために)を行う方法が開示される。一部の実施形態では、組織は腫瘍である。一部の実施形態

10

20

30

40

50



では、組織は虚血性組織である。一部の実施形態では、組織は低酸素性の組織である。一部の実施形態では、組織は壊死の組織である。一部の実施形態では、組織はアシドーシス性組織である。一部の実施形態では、組織は病気の組織（例えば、感染病原体に感染した組織、有毒な薬剤に接触した組織、自己免疫障害に罹っている組織、炎症性組織）である。

#### 【0171】

一部の実施形態では、手術中に特定し除去するために組織を標識付けする。一部の実施形態では、患者の腫瘍切除または組織切除のための外科的縁を画像化する方法が本明細書で開示され、この方法は、本明細書で開示される選択的輸送分子を患者に投与した後に外科的縁を画像化することを含む。一部の実施形態では、患者の腫瘍の画像化方法は、本明細書で開示される選択的輸送分子を患者に投与した後に腫瘍を画像化することを含む。一部の実施形態では、患者の腫瘍を除去する方法は、本明細書で開示される選択的輸送分子を患者に投与した後に腫瘍を除去することを含む。

10

#### 【0172】

一部の実施形態では、方法は、手術を受ける予定の患者に本明細書記載の選択的輸送分子を投与することを含む。一部の実施形態では、方法は、手術を受けている患者に本明細書記載の選択的輸送分子を投与することを含む。一部の実施形態では、本明細書記載の選択的輸送分子が患者に全身投与される。一部の実施形態では、本明細書記載の選択的輸送分子が患者に局所的に投与される。

20

#### 【0173】

一部の実施形態では、本明細書で開示の選択的輸送分子は、癌の評価および治療の複数の段階で使用される。一部の実施形態では、二重モダリティ（MRおよび蛍光）選択的輸送分子は、特に、莢膜への浸潤が重要である前立腺等の癌のために、腫瘍学者と放射線科医による手術前のステージ分類を可能とし、非手術的治療の候補である患者の手術を防止できる。一部の実施形態では、二重標識選択的輸送分子から得られる解剖学的および生化学的情報は、複雑な外科手術を計画している外科医にとって有用である。一部の実施形態では、選択的輸送分子の切断部位への強い結合により腫瘍生物学に関する局所情報がもたらされ、これは手術中の蛍光画像化により外科医が最も侵襲的な腫瘍成長領域に集中することを可能にするのみならず、病理学者に手術中の組織像により同様の領域に集中させることも可能となる。手術後、一部の実施形態では、二重プローブは、第2のMRIを使って腫瘍除去完成度の追加的評価も可能にする。

30

#### 【0174】

##### 薬剤送達

本明細書の特定の実施形態では、標的化薬剤送達の方法が開示される。一部の実施形態では、本明細書記載の選択的輸送分子は薬剤を特定の標的（例えば、1個の細胞または複数の細胞）に送達する。一部の実施形態では、本明細書記載の選択的輸送分子は薬剤を腫瘍に送達する。一部の実施形態では、本明細書記載の選択的輸送分子は薬剤を虚血性組織に送達する。一部の実施形態では、本明細書で開示の選択的輸送分子は薬剤を低酸素性組織に送達する。一部の実施形態では、本明細書記載の選択的輸送分子は薬剤を壊死の組織に送達する。一部の実施形態では、本明細書記載の選択的輸送分子は薬剤をアシドーシス性組織に送達する。一部の実施形態では、本明細書記載の選択的輸送分子は薬剤を病気の組織（例えば、感染病原体に感染した組織、有毒薬剤に接触した組織、自己免疫障害に罹っている組織、炎症性組織）に送達する。

40

#### 【0175】

一部の実施形態では、薬剤は細胞の死亡（例えば、アポトーシスまたは壊死を介した）を調節する薬剤である。一部の実施形態では、薬剤は細胞傷害性薬剤である。一部の実施形態では、薬剤は、マイタンシン、メトトレキサート（RHEUMATREX（登録商標）、アメトプテリン）；シクロホスファミド（CYTOXAN（登録商標））；サリドマイド（THALIDOMID（登録商標））；パクリタキセル；メトレキセド；ペントスタチン；ピボプロマン；ピクサントロン；プリカマイシン；プロカルバジン；プロテアソ

50

ーム阻害剤（例えば；ボルテゾミブ）；ラルチトレキセド；レベッカマイシン；ルビテカン；S N - 3 8；サリノスポラミドA；サトラブラチン；ストレプトゾトシン；スウェインソニン；タリキダル；タキサン；テガフル - ウラシル；テモゾロミド；テストラクトン；チオテパ；チオグアニン；トポテカン；トラベクテジン；トレチノイン；トリブラチンテトラニトラート；トリス（2 - クロロエチル）アミン；トロキサシタピン；ウラシルマスタード；バルルピシン；ピンブラスチン；ピンクリスチン；ピノレルピン；ポリノスタット；ゾスキダル；またはこれらの組み合わせである。一部の実施形態では、薬剤はアポトーシス促進剤である。一部の実施形態では、薬剤は抗アポトーシス剤である。一部の実施形態では、薬剤は以下から選択される：ミノサイクリン；S B - 2 0 3 5 8 0（4 -（4 - フルオロフェニル） - 2 -（4 - メチルスルフィニルフェニル） - 5 -（4 - ピリジル）1 H - イミダゾール）；P D 1 6 9 3 1 6（4 -（4 - フルオロフェニル） - 2 -（4 - ニトロフェニル） - 5 -（4 - ピリジル） - 1 H - イミダゾール）；S B 2 0 2 1 9 0（4 -（4 - フルオロフェニル） - 2 -（4 - ヒドロキシフェニル） - 5 -（4 - ピリジル）1 H - イミダゾール）；R W J 6 7 6 5 7（4 - [ 4 -（4 - フルオロフェニル） - 1 -（3 - フェニルプロピル） - 5 -（4 - ピリジニル） - 1 H - イミダゾール - 2 - イル ] - 3 - ブチン - 1 - オール）；S B 2 2 0 0 2 5（5 -（2 - アミノ - 4 - ピリミジニル） - 4 -（4 - フルオロフェニル） - 1 -（4 - ペリジンリル）イミダゾール）；D - J N K I - 1（（D） - h J I P 1 7 5 - 1 5 7 - D P r o - D P r o -（D） - H I V - T A T 5 7 - 4 8）；A M - 1 1 1（A u r i s）；S P 6 0 0 1 2 5（アントラ [ 1 , 9 - c d ] ピラゾール - 6（2 H） - オン）；J N K 阻害剤 I（（L） - H I V - T A T 4 7 - 5 7 - P P - J B D 2 0）；J N K 阻害剤 I I I（（L） - H I V - T A T 4 7 - 5 7 - g a b a - c - J u n 3 3 - 5 7）；A S 6 0 1 2 4 5（1 , 3 - ベンゾチアゾール - 2 - イル（2 - [ [ 2 -（3 - ピリジニル）エチル ] アミノ ] - 4 ピリミジニル）アセトニトリル）；J N K 阻害剤 V I（H 2 N - R P K R P T T L N L F - N H 2）；J N K 阻害剤 V I I I（N -（4 - アミノ - 5 - シアノ - 6 - エトキシピリジン - 2 - イル） - 2 -（2 , 5 - ジメトキシフェニル）アセトアミド）；J N K 阻害剤 I X（N -（3 - シアノ - 4 , 5 , 6 , 7 - テトラヒドロ - 1 - ベンゾチエン - 2 - イル） - 1 - ナフトアミド）；ジクマロール（3 , 3' - メチレンビス（4 - ヒドロキシクマリン））；S C - 2 3 6（4 - [ 5 -（4 - クロロフェニル） - 3 -（トリフルオロメチル） - 1 H - ピラゾール - 1 - イル ] ベンゼン - スルホンアミド）；C E P - 1 3 4 7（C e p h a l o n）；C E P 1 1 0 0 4（C e p h a l o n）；B c l - 2 ポリペプチドの少なくとも一部を含む人工タンパク質；組換え型 F N K；V 5（B a x 阻害剤ペプチド V 5 としても知られる）；B a x チャンネル遮断薬（（±） - 1 -（3 , 6 - ジプロモカルバゾール - 9 - イル） - 3 - ピペラジン - 1 - イル - プロパン - 2 - オール）；B a x 阻害ペプチド P 5（B a x 阻害剤ペプチド P 5 としても知られる）；K p 7 - 6；F A I M（S）（F a s アポトーシス阻害性分子 - s h o r t）；F A I M（L）（F a s アポトーシス阻害性分子 - l o n g）；F a s：F c；F A P - 1；N O K 2；F 2 0 5 1；F 1 9 2 6；F 2 9 2 8；Z B 4；F a s M 3 m A b；E G F；7 4 0 Y - P；S C 3 0 3 6（K K H T D D G Y M P M S P G V A）；P I 3 - キナーゼ活性化因子（S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y、I n c .）；P a m 3 C y s（（S）（2 , 3 - ビス（パルミトイルオキシ） -（2 R S） - プロピル） - N - パルミトイル -（R） - C y s -（S） - S e r（S） - L y s 4 - O H、トリヒドロクロリド）；A c t 1（N F - k B 活性化因子 1）；抗 I k B 抗体；アセチル - 1 1 - ケト - b - ボスウェル酸；アンドログラホリド；カフェー酸フェネチルエステル（C A P E）；グリオトキシシン；イソヘレニン；N E M O - 結合ドメイン結合ペプチド  
(DRQIKIWFQNRRMKWKKKTALDWSWLQTE)

；N F - k B 活性化阻害剤（6 - アミノ - 4 -（4 - フェノキシフェニルエチルアミノ）キナゾリン）；N F - k B 活性化阻害剤 I I（4 - メチル - N 1 -（3 - フェニルプロピル）ベンゼン - 1 , 2 - ジアミン）；N F - k B 活性化阻害剤 I I I（3 - クロロ - 4 - ニトロ - N -（5 - ニトロ - 2 - チアゾリル） - ベンズアミド）；N F - k B 活性化阻害

10

20

30

40

50

剤 I V ( ( E ) - 2 - フルオロ - 4 ' - メトキシスチルベン ) ; N F - k B 活性化阻害剤  
V ( 5 - ヒドロキシ - ( 2 , 6 - ジイソプロピルフェニル ) - 1 H - イソインドール - 1  
, 3 - ジオン ) ; N F - k B S N 5 0

(AAVALLPAVLLALLAPVQRKRQKLMP)

; オリドニン; パルテノライド; P P M - 1 8 ( 2 - ベンゾイルアミノ - 1 , 4 - ナフト  
キノン ) ; R o 1 0 6 - 9 9 2 0 ; スルファサラジン; T I R A P 阻害剤ペプチド

(RQIKIWFNRRMKWKKLQLRDAAPGGAIVS)

; ウィタフェリン A ; ウォゴニン; B A Y 1 1 - 7 0 8 2 ( ( E ) 3 - [ ( 4 - メチルフ  
ェニル ) スルホニル ] - 2 - プロペンニトリル ) ; B A Y 1 1 - 7 0 8 5 ( ( E ) 3 - [

( 4 - t - ブチルフェニル ) スルホニル ] - 2 - プロペンニトリル ) ; ( E ) - カブサイ  
シン; 金チオリンゴ酸 ( A T M または A u T M ) ; エボジアミン; ヒポエストキシド; I

K K 阻害剤 I I I ( B M S - 3 4 5 5 4 1 ) ; I K K 阻害剤 V I I ; I K K 阻害剤 X ; I  
K K 阻害剤 I I ; I K K - 2 阻害剤 I V ; I K K - 2 阻害剤 V ; I K K - 2 阻害剤 V I ;

I K K - 2 阻害剤 ( S C - 5 1 4 ) ; I k B キナーゼ阻害剤ペプチド; I K K - 3 阻害剤  
I X ; A R R Y - 7 9 7 ( A r r a y B i o P h a r m a ) ; S B - 2 2 0 0 2 5 ( 5

- ( 2 - アミノ - 4 - ピリミジニル ) - 4 - ( 4 - フルオロフェニル ) - 1 - ( 4 - ピペ  
リジンリル ) イミダゾール ) ; S B - 2 3 9 0 6 3 ( トランス - 4 - [ 4 - ( 4 - フルオ

ロフェニル ) - 5 - ( 2 - メトキシ - 4 - ピリミジニル ) - 1 H - イミダゾール - 1 - イ  
ル ] シクロヘキサノール ) ; S B - 2 0 2 1 9 0 ( 4 - ( 4 - フルオロフェニル ) - 2 -

( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 5 - ( 4 - ピリジニル ) - 1 H - イミダゾール ) ; J X - 4  
0 1 ( - [ 2 - メトキシ - 4 - ( メチルチオ ) ベンゾイル ] - 4 - ( フェニルメチル ) ピ

ペリジン ) ; P D - 1 6 9 3 1 6 ( 4 - ( 4 - フルオロフェニル ) - 2 - ( 4 - ニトロフ  
ェニル ) - 5 - ( 4 - ピリジニル ) - 1 H - イミダゾール ) ; S K F - 8 6 0 0 2 ( 6 - (

4 - フルオロフェニル ) - 2 , 3 - ジヒドロ - 5 - ( 4 - ピリジニル ) イミダゾ [ 2 , 1  
- b ] チアゾールジヒドロクロリド ) ; S B - 2 0 0 6 4 6 ( N - ( 1 - メチル - 1 H -

インドール - 5 - イル ) - N ' - 3 - ピリジニル尿素 ) ; C M P D - 1 ( 2 ' - フルオロ -  
N - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - [ 1 , 1 ' - ビフェニル ] - 4 - ブタンアミド ) ; E

O - 1 4 2 8 ( ( 2 - メチルフェニル ) - [ 4 - [ ( 2 - アミノ - 4 - プロモフェニル )  
アミノ ] - 2 - クロロフェニル ] メタノン ) ; S B - 2 5 3 0 8 0 ( 4 - [ 5 - ( 4 - フ

ルオロフェニル ) - 2 - [ 4 - ( メチルスルホニル ) フェニル ] - 1 H - イミダゾール -  
4 - イル ] ピリジン ) ; S D - 1 6 9 ( 1 H - インドール - 5 - カルボキサミド ) ; S B

- 2 0 3 5 8 0 ( 4 - ( 4 - フルオロフェニル ) - 2 - ( 4 - メチルスルフィニルフェニ  
ル ) - 5 - ( 4 - ピリジニル ) 1 H - イミダゾール ) ; T Z P - 1 0 1 ( T r a n z y m e

P h a r m a ) ; T Z P - 1 0 2 ( T r a n z y m e P h a r m a ) ; G H R P - 6  
( 成長ホルモン放出ペプチド - 6 ) ; G H R P - 2 ( 成長ホルモン放出ペプチド - 2 ) ;

E X - 1 3 1 4 ( E l i x i r P h a r m a c e u t i c a l s ) ; M K - 6 7 7 ( M  
e r c k ) ; L - 6 9 2 , 4 2 9 ( ブタンアミド、3 - アミノ - 3 - メチル - N - ( 2 ,

3 , 4 , 5 - テトラヒドロ - 2 - オキソ - 1 - ( ( 2 ' - ( 1 H - テトラゾール - 5 - イ  
ル ) ( 1 , 1 ' - ビフェニル ) - 4 - イル ) メチル ) - 1 H - 1 - ベンゾアゼピン - 3 -

イル ) - 、 ( R ) - ) ; E P 1 5 7 2 ( A i b - D T r p - D g T r p - C H O ) ; ジル  
チアゼム; ジルチアゼムの代謝物; B R E ( 脳および生殖器官発現タンパク質 ) ; ベラバ

ミル; ニモジピン; ジルチアゼム; オメガコノトキシン; G V I A ; アムロジピン; フェ  
ロジピン; ラシジピン; ミベフラジル; N P P B ( 5 - ニトロ - 2 - ( 3 - フェニルプロ

ピルアミノ ) 安息香酸 ) ; フルナリジン; エリトロポイエチン; ピペリン; ヘミン; ブラ  
ジリン; z - V A D - F M K ( ベンジルオキシカルボニル - V a l - A l a - A s p ( O

M e ) - フルオロメチルケトン ) ; z - L E H D - F M K ( ベンジルオキシカルボニル -  
L e u - G l u ( O M e ) - H i s - A s p ( O M e ) - フルオロメチルケトン ) ; B -

D - F M K ( b o c - アスパルチル ( O m e ) - フルオロメチルケトン ) ; A c - L E H  
D - C H O ( N - アセチル - L e u - G l u - H i s - A s p - C H O ) ; A c - I E T

D - C H O ( N - アセチル - I l e - G l u - T h r - A s p - C H O ) ; z - I E T D

10

20

30

40

50

- FMK (ベンジルオキシカルボニル - Ile - Glu (OMe) - Thr - Asp (OMe) - フルオロメチルケトン) ; FAM - LEHD - FMK (ベンジルオキシカルボニル Leu - Glu - His - Asp - フルオロメチルケトン) ; FAM - LETD - FMK (ベンジルオキシカルボニル Leu - Glu - Thr - Asp - フルオロメチルケトン) ; Q - VD - OPH (キノリン - Val - Asp - CH<sub>2</sub> - O - Ph) ; XIAP ; cIAP - 1 ; cIAP - 2 ; ML - IAP ; ILP - 2 ; NAIP ; サバイピン ; Bruce ; IAPL - 3 ; ホルチリン ; ロイペプチン ; PD - 150606 (3 - (4 - ヨードフェニル) - 2 - メルカプト - (Z) - 2 - プロペン酸) ; MDL - 28170 (Z - Val - Phe - CHO) ; カルペプチン ; アセチルカルバスタチン ; MG132 (N - [(フェニルメトキシ)カルボニル] - L - ロイシル - N - [(1S) - 1 - ホルミル - 3 - メチルブチル] - L - ロイシンアミド) ; MYODUR ; BN82270 (Ipsen) ; BN2204 (Ipsen) ; AHLi - 11 (Quark Pharmaceuticals) ; mdm2 タンパク質、ピフィスリン - (1 - (4 - メチルフェニル) - 2 - (4, 5, 6, 7 - テトラヒドロ - 2 - イミノ - 3 (2H) - ベンゾチアゾリル) エタノン) ; トランス - スチルベン ; シス - スチルベン ; リスベラトロール ; ピセタノール ; ラボンチン ; デオキシラボンチン ; プテイン ; カルコン ; イソリキルチゲン ; プテイン ; 4, 2', 4' - トリヒドロキシカルコン ; 3, 4, 2', 4', 6' - ペンタヒドロキシカルコン ; フラボン ; モリン ; フィセチン ; ルテオリン ; ケルセチン ; ケンフェロール ; アピゲニン ; ゴッシベチン ; ミリセチン ; 6 - ヒドロキシアピゲニン ; 5 - ヒドロキシフラボン ; 5, 7, 3', 4', 5' - ペンタヒドロキシフラボン ; 3, 7, 3', 4', 5' - ペンタヒドロキシフラボン ; 3, 6, 3', 4' - テトラヒドロキシフラボン ; 7, 3', 4', 5' - テトラヒドロキシフラボン ; 3, 6, 2', 4' - テトラヒドロキシフラボン ; 7, 4' - ジヒドロキシフラボン ; 7, 8, 3', 4' - テトラヒドロキシフラボン ; 3, 6, 2', 3' - テトラヒドロキシフラボン ; 4' - ヒドロキシフラボン ; 5 - ヒドロキシフラボン ; 5, 4' - ジヒドロキシフラボン ; 5, 7 - ジヒドロキシフラボン ; ダイゼイン ; ゲニステイン ; ナリンゲニン ; フラバノン ; 3, 5, 7, 3', 4' - ペンタヒドロキシフラバノン ; ペラルゴニジン塩化物 ; シアニジン塩化物 ; デルフィニジン塩化物 ; ( - ) - エピカテキン (水酸基部位 : 3, 5, 7, 3', 4') ; ( - ) - カテキン (水酸基部位 : 3, 5, 7, 3', 4') ; ( - ) - ガロカテキン (水酸基部位 : 3, 5, 7, 3', 4', 5') ( + ) - カテキン (水酸基部位 : 3, 5, 7, 3', 4') ; ( + ) - エピカテキン (水酸基部位 : 3, 5, 7, 3', 4') ; ヒノキチオール (b - ツジヤプリシン ; 2 - ヒドロキシ - 4 - イソプロピル - 2, 4, 6 - シクロヘプタトリエン - 1 - オン) ; L - ( + ) - エルゴチオネイン ( (S) - a - カルボキシ - 2, 3 - ジヒドロ - N, N, N - トリメチル - 2 - チオキソ - 1H - イミダゾール 4 - エタンアミニウム内塩) ; カフェー酸フェニルエステル ; MCI - 186 (3 - メチル - 1 - フェニル - 2 - ピラゾリン - 5 - オン) ; HBED (N, N' - ジ - (2 - ヒドロキシベンジル) エチレンジアミン - N, N' - ジ酢酸・H<sub>2</sub>O) ; アンプロキソール (トランス - 4 - (2 - アミノ - 3, 5 - ジプロモベンジルアミノ) シクロヘキサン - HCl ; および U - 83836E ( ( - ) - 2 - ( (4 - (2, 6 - ジ - 1 - ピロリジニル - 4 - ピリミジニル) - 1 - ピペルザイニル) メチル) - 3, 4 - ジヒドロ - 2, 5, 7, 8 - テトラメチル - 2H - 1 - ベンゾピラン - 6 - オール・2HCl) ; - 1' - 5 - メチルニコチンアミド - 2' - デオキシリボース ; - D - 1' - 5 - メチルニコチンアミド - 2' - デオキシリボフラノシド ; - 1' - 4, 5 - ジメチルニコチンアミド - 2' - デオキシリボース ; - D - 1' - 4, 5 - ジメチルニコチンアミド - 2' - デオキシリボフラノシド ; 1 - ナフチル PP1 (1 - (1, 1 - ジメチルエチル) - 3 - (1 - ナフタレニル) - 1H - ピラゾロ [3, 4 - d] ピリミジン - 4 - アミン) ; ラベンズスチン A (5 - [[ (2, 5 - ジヒドロキシフェニル) メチル] [ (2 - ヒドロキシフェニル) メチル] アミノ] - 2 - ヒドロキシ安息香酸) ; MNS (3, 4 - メチレンジオキシ - b - ニトロスチレン) ; PP1 (1 - (1, 1 - ジメチルエチル) - 1 - (4 - メチルフェニル) - 1H - ピラゾロ [3, 4 - d] ピリミジン - 4 - アミン) ; PP2 (3 - (4 - クロロフェニル) 1 - (

1, 1 - ジメチルエチル) - 1H - ピラゾロ [ 3 , 4 - d ] ピリミジン - 4 - アミン) ; K X - 0 0 4 ( K i n e x ) ; K X - 0 0 5 ( K i n e x ) ; K X - 1 3 6 ( K i n e x ) ; K X - 1 7 4 ( K i n e x ) ; K X - 1 4 1 ( K i n e x ) ; K X 2 - 3 2 8 ( K i n e x ) ; K X - 3 0 6 ( K i n e x ) ; K X - 3 2 9 ( K i n e x ) ; K X 2 - 3 9 1 ( K i n e x ) ; K X 2 - 3 7 7 ( K i n e x ) ; Z D 4 1 9 0 ( A s t r a Z e n e c a ; N - ( 4 - ブロモ - 2 - フルオロフェニル ) - 6 - メトキシ - 7 - ( 2 - ( 1 H - 1 , 2 , 3 - トリアゾール - 1 - イル ) エトキシ ) キナゾリン - 4 - アミン ) ; A P 2 2 4 0 8 ( A r i a d P h a r m a c e u t i c a l s ) ; A P 2 3 2 3 6 ( A r i a d P h a r m a c e u t i c a l s ) ; A P 2 3 4 5 1 ( A r i a d P h a r m a c e u t i c a l s ) ; A P 2 3 4 6 4 ( A r i a d P h a r m a c e u t i c a l s ) ; A Z D 0 5 3 0 ( A s t r a Z e n e c a ) ; A Z M 4 7 5 2 7 1 ( M 4 7 5 2 7 1 ; A s t r a Z e n e c a ) ; ダサチニブ ( N - ( 2 - クロロ - 6 - メチルフネイル ) - 2 - ( 6 - ( 4 - ( 2 - ヒドロキシエチル ) - ピペラジン - 1 - イル ) - 2 - メチルピリミジン - 4 - イルアミノ ) チアゾール - 5 - カルボキサミド ) ; G N 9 6 3 ( トランス - 4 - ( 6 , 7 - ジメトキシキノキサリン - 2 イルアミノ ) シクロヘキサノール硫酸塩 ) ; ポスチニブ ( 4 - ( ( 2 , 4 - ジクロロ - 5 - メトキシフェニル ) アミノ ) - 6 - メトキシ - 7 - ( 3 - ( 4 - メチル - 1 - ピペラジニル ) プロボキシ ) - 3 - キノリンカルボニトリル ) ; またはこれらの組み合わせ。

10

#### 【 0 1 7 6 】

その他の用途

20

一部の実施形態では、積荷成分が造影剤およびガドリニウムである選択的輸送分子が転移を画像化するのに使用される。一部の実施形態では、積荷成分が造影剤およびガドリニウムである選択的輸送分子が長期的実験に使われ、炎症が顕性転移の前に発生するのか、またはその直後なのか判断される ( 図 4 0 ) 。一部の実施形態では、積荷成分が造影剤およびガドリニウムである選択的輸送分子が MMP が重要な役割を果たし、MMP および炎症の可視化が疾患 ( 例えば、腸疾患、関節リウマチ、または多発性硬化症 ) 過程の理解を改善するために有用である障害の画像化に使用される。選択的輸送分子をデンドリマーナノ粒子に共役し、さらにナノ粒子がガドリニウムにも共役している効果の詳細分析については、実施例 4 0 を参照のこと。

30

#### 【 0 1 7 7 】

一部の実施形態では、デンドリマーナノ粒子に結合した選択的輸送分子はマクロファージ関連腫瘍の標的化に使われる。一部の実施形態では、デンドリマーナノ粒子に結合し、ナノ粒子がさらにリシン A を含む選択的輸送分子は皮下マクロファージを毒殺するのに使われる。

#### 【 0 1 7 8 】

#### 医薬組成物

本明細書の特定の実施形態では、本明細書で開示の選択的輸送分子を含む医薬組成物が開示される。本明細書の医薬組成物は、医薬剤として使われる製剤中への活性薬剤の処理を促進する賦形剤および補助薬を含む 1 つまたは複数の生理学的に受容可能な担体と共に処方される。適切な処方を選択される投与経路に依存する。医薬組成物に関する概要が、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Nineteenth Ed (レミントン: 薬学の科学と実践、第 19 版) (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995); Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences (レミントンの薬学)、Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 1975; Liberman, H. A. and Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms (医薬品の剤形)、Marcel Dekker, New York, N. Y., 1980; および Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Seventh

40

50

Ed. (医薬品の剤形と薬剤デリバリーシステム、第7版) (Lippincott Williams & Wilkins、1999)に記述されている。

【0179】

特定の実施形態では、本明細書で開示される医薬組成物は、さらに薬学的に許容可能な希釈剤、賦形剤、またはキャリアを含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、他の薬物または医薬剤、キャリア、アジュバント、例えば、保存剤、安定化剤、湿潤剤または乳化剤、溶解推進剤、浸透圧調製塩、および/または緩衝剤を含む。さらに、医薬組成物は、他の治療的に価値のある物質も含む。

【0180】

特定の実施形態では、本明細書で開示される医薬組成物は、任意の適切な投与経路で患者に投与される。この投与経路には、限定されないが、非経口（静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内、血管内、鞘内、硝子体内、注入、または局所）投与が含まれる。

【0181】

筋肉内、皮下、または静脈内注射に適した製剤には、生理学的に受容可能な無菌で水性のまたは非水性の溶液、分散物、懸濁液または乳剤、および無菌の注射可能溶液または分散液に再構成できる無菌の粉末が含まれる。適切な水性および非水性キャリア、希釈剤、溶剤、または賦形剤の例には、水、エタノール、ポリオール（プロピレングリコール、ポリエチレン-グリコール、グリセリン、クレモホル、等）、適切なそれらの混合物、植物油（例えば、オリーブ油）および注射可能有機エステル、例えば、エチルオレアートが含まれる。例えば、レシチン等のコーティングの使用によって、分散液の場合は必要粒径の維持によって、および界面活性剤の使用によって、適切な流動度が維持される。皮下注入に適した製剤も同様に、任意選択の添加物、例えば、保存剤、湿潤剤、乳化剤、および分配剤（dispensing agent）を含む。

【0182】

静脈内注入用として、活性薬剤は、任意選択で、水溶液、好ましくは、生理学的に適合した緩衝液、例えば、ハンクス溶液、リンゲル液、または生理的食塩水の緩衝液中で処方される。

【0183】

非経口注入は、任意選択で、ボラス注入または連続注入を含む。注入用製剤は、任意選択で、ユニット投与量剤形、例えば、アンプルまたは多数回用量容器に防腐剤を添加して用意される。一部の実施形態では、本明細書記載の医薬組成物は、油性または水性の賦形剤中の無菌の懸濁液、溶液または乳化物として非経口の注入に適した形であり、製剤化剤、例えば、懸濁、安定化および/または分散剤を含む。非経口の投与用医薬製剤には、水溶性型活性薬剤の水溶液が含まれる。さらに、懸濁液は、任意選択で、必要に応じて油性注入懸濁液として調製される。

【0184】

一部の実施形態では、本明細書記載の医薬組成物は、正確な投与量の単回投与に適したユニット剤形である。ユニット剤形では、製剤は、適切な量の明細書で開示の活性薬剤を含むユニット用量に分割される。一部の実施形態では、ユニット投与量は、離散性の量の製剤を含むパッケージの形である。非限定的例は、パッケージ化した錠剤またはカプセル剤、およびバイアルまたはアンプルに入れた粉末である。一部の実施形態では、水性の懸濁液組成物は単回用量の再封できない容器に入れてパッケージ化される。あるいは、複数回用量の再封可能な容器が使用され、この場合、通常は組成物中に防腐剤を含める。単なる例ではあるが、非経口注入用製剤は、アンプル（これに限定されない）を含むユニット剤形で、または多数回用量容器で、防腐剤を添加して、用意される。

【実施例】

【0185】

実施例1：ペプチド合成

細胞による取り込みを調節できると思われる多くのペプチドを合成した。次の記号が使われている場合は、示された意味を有する：Fl = フルオレセイン；aca = ahx = X

10

20

30

40

50

= アミノカプロン酸リンカー ( - HN - ( CH<sub>2</sub> )<sub>5</sub> - CO - )、C = L - システイン、E = L - グルタマート、R = L - アルギニン、D = L - アスパルタート、K = L - リジン、A = L - アラニン、r = D - アルギニン、c = D - システイン、e = D - グルタマート、P = L - プロリン、L = L - ロイシン、G = グリシン、V = バリン、I = イソロイシン、M = メチオニン、F = フェニルアラニン、Y = チロシン、W = トリプトファン、H = ヒスチジン、Q = グルタミン、N = アスパラギン、S = セリン、および T = トレオニン。

# 【 0 1 8 6 】

下記で考察する配列で、小文字はアミノ酸の D 異性体を示している。

# 【 0 1 8 7 】

ペプチドを、ペプチド合成装置 ( Pioneer Peptide Synthesis System : Applied Biosystems ) による固相合成法ならびに市場で入手可能な Fmoc アミノ酸、樹脂、およびその他の薬剤を使って合成した。ペプチドを TFA / チオアヌソール / トリイソプロピルシランまたは TFA / チオアヌソール / トリイソプロピルシラン / エタンジチオールを使って切断した。

10

# 【 0 1 8 8 】

5 - ( および - 6 ) カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステルでペプチドのアミノ基に、または 5 - ヨードアセトアミドフルオレセインでペプチドのチオール基にペプチドの標識付をした。

# 【 0 1 8 9 】

粗製ペプチドを HPLC で精製し、一晚凍結乾燥した。

20

# 【 0 1 9 0 】

各ペプチド組成物を質量分析により確認した。

# 【 0 1 9 1 】

選択的輸送分子の合成 ( 以降、ペプチド 1 と呼ぶ )

Suc - e<sub>8</sub> - ( Aop ) - PLGC9Me ) AG - r<sub>9</sub> - c - NH<sub>2</sub> を標準的 Fmoc 固相ペプチド合成法により合成した。樹脂上にあるうちに、コハク酸無水物を使った反応により、N 末端スクシニル基をペプチドに付加した。室温で標準的混合物 ( チオアヌソール、トリイソプロピルシランおよびエタンジチオール各 2 % を含むトリフルオロ酢酸 ) 中で一晚置いてペプチドを樹脂から切断した。トリフルオロ酢酸の大部分をロータリーエバポレーターで除去し、50 % ヘキサンのジエチルエーテル溶液を添加し、ペプチドを遠心分離により回収した。集めた固形物を 50 % ヘキサンのエーテル溶液で 3 回洗浄し一晚真空乾燥した。ペプチドを HPLC で 15 % ~ 30 % アセトニトリルの水および 0 . 05 % TFA 中溶液を使って精製し、粗製ペプチドからの 30 % 収率を得た。正確な生成物をエレクトロスプレー質量分析により確認した : 計算値 3271 . 5 Da、測定値 3271 . 8 Da。

30

# 【 0 1 9 2 】

ペプチド標識 dendrimer 2 の合成

25 mg のペプチド 1 を N<sub>2</sub> 中で 2 mL DMSO に溶解し 2 . 3 mg の 2 - ニトロ - 4 - スルホフェニル 6 - マレイミドヘキサノアートナトリウム塩および 20 μL の N - メチルモルホリンと反応させた。室温で 3 時間攪拌後、反応混合物の LC - MS 分析により 90 % 超反応が完了していることが示された。反応混合物を 0 に冷却し、150 mg の PAMAM dendrimer および 2 mL の 1 M ヘプス緩衝液 ( pH 7 . 8 ) を添加して 5 で 2 日間攪拌した ( 以降、反応混合物 2 と呼ぶ )。

40

# 【 0 1 9 3 】

Cy5 およびペプチド標識付けした dendrimer 3 の合成

1 . 2 mg Cy5 モノ ( N - ヒドロキシスクシンイミド ) を反応混合物 2 に添加し、5 で一晚攪拌した ( 以降、反応混合物 3 と呼ぶ )。

# 【 0 1 9 4 】

キャップした Cy5 およびペプチド標識 dendrimer 4 の合成

166 mg の MeO ( CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub> O )<sub>3</sub> CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub> CO - ( N - ヒドロキシスクシ

50

ンイミド)エステルを5 で反応混合物3に添加し、その温度で3日間攪拌した。粗製生成物を10 mLの水で希釈し、10 kDa分画分子量の膜で8回濾過して低分子量混入物を除去した。サイズ排除カラムを使ったHPLCにより純度99%で収率72%の結果が得られた。既知の重量の精製した最終生成物を水に溶解し、 $250,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ の消衰係数を仮定した650 nmのCy5吸光度の測定では、デンドリマー当たり平均3個のフルオロフォアであった。785 nmの静的多角度光散乱では、見かけの分子量が72.9 kDaであった。785 nmの静的光散乱では4.6 nmの流体力学的半径が得られた。

#### 【0195】

DOTA、Cy5およびペプチド標識デンドリマー5の合成

30当量のDOTAモノ-N-ヒドロキシスクシニムドエステルのヘス緩衝液溶液を反応混合物3と反応させ、5 で一晩攪拌した(以降、反応混合物5と呼ぶ)。

#### 【0196】

キャップしたDOTA、Cy5およびペプチド標識デンドリマー6の合成

反応混合物5を950当量のmPEG4NH<sub>2</sub>と反応させ、5 で3日間攪拌した。粗製生成物をキャップしたCy5およびペプチド標識デンドリマー4の記載と同様に精製後、凍結乾燥した。収率は78%であった。

#### 【0197】

キャップしたDOTA、Cy5およびペプチド標識デンドリマー6のGd添加

25 mgのキャップしたDOTA、Cy5およびペプチド標識デンドリマー6を1 mLの0.5 M酢酸アンモニウムおよび1 mLの水に溶解した。反応混合物を100  $\mu\text{L}$ の0.5 GdCl<sub>3</sub>と混合し、光遮断下、室温で3日間攪拌した。5回の水洗により小分子を除去した。過剰の水を10 kDa分画分子量の膜フィルターを通した遠心分離により除去した。最終的に、Gd添加生成物7を一晩凍結乾燥し、青色のふわふわした固体を得た。純粋な生成物を秤量し、水に再溶解して200  $\mu\text{M}$ 溶液を得た。秤量した少量分量を0.5 mLの濃硝酸と2時間混合した。誘導結合プラズマ質量分析によりGdの定量測定を行い、デンドリマー当たり平均15 Gdの結果を得た。650 nmの吸光度に基づいて、デンドリマー当たりのCy5標識の数は3であることが確認された。

#### 【0198】

実施例2：アルブミン共役選択的輸送分子

ペプチドの合成

遊離N末端およびC末端システインを有するペプチドを固相合性により合成した。ペプチド配列e<sub>9</sub>-oPLGC(me)AG-r<sub>9</sub>-c-NH<sub>2</sub>を切断可能なペプチド(oは5-アミノ-3-オキサペンタノイルリンカー、C(me)はS-メチルシステインである)として、またe<sub>9</sub>-(Peg2)<sub>2</sub>-r<sub>9</sub>-cを切断不可能ペプチドとして合成した。HPLCで切断および精製後、ペプチドをNMM添加DMF中で過剰のCy5-モノマレイミドと反応させた。反応完了後、ペプチドを同条件下、予備反応としてマレイミドプロピオン酸-PFPエステとさらに反応させた。HPLC質量分析で反応をモニターし、HPLCで精製した。DOTA標識ペプチドを作るために、ペプチドペプチドのN末端およびペプチドのC末端上のアルギニンとシステインの間のk(Dota)に(Peg4)を固相合成により付加した。これら2つの二重標識ペプチドの配列は、切断可能なペプチドはMal-Peg4-e<sub>9</sub>-oPLGC(Cme)AG-r<sub>9</sub>-k(DOTA)-c(Cy5)であり、切断不可能ペプチドはmal-Peg4-e<sub>9</sub>-Peg4-r<sub>9</sub>-k(DOTA)-c(Cy5)である。

#### 【0199】

アルブミンとの反応および酵素切断アッセイ

最初、マレイミドペプチドをマウス血清アルブミン(Sigma)40 mg/mLまたは新しい凍結マウス血漿と1時間反応させた。試料をトリシン緩衝10~20%ポリアクリルアミドゲルに供し、UVPゲルイメージャーでCy5蛍光を調べるために画像化した。酵素切断アッセイのために、Cy5-モノマレイミドおよび切断可能なマレイミドペプ

10

20

30

40

50



チド  $2 \text{ nmol}$  を  $40 \text{ mg/mL}$  のマウス血清アルブミンと  $25 \text{ mM}$  ヘプス緩衝液中で反応させた。次にストックを  $50 \text{ nM}$  の組換え型 MMP-9 (EMD Biosciences) で  $1:10$  に希釈し  $5 \text{ mM}$  にして、4 時間 20 分消化させた後、トリシゲルにかけ Cy5 を調べるために画像化した。

【0200】

#### 動物

ヌードマウスの左 #2 乳房脂肪パッドに  $2 \times 10^6$  HT1080 ヒト線維肉腫細胞を注入した。注入後 5 ~ 7 日に実験を行った。ポリオマミドル T マウス (PyMT) を Lesley Ellies から入手し、中から大の大きさの腫瘍が各乳房脂肪パッドにある場合、9 ~ 12 週齢にペプチドを IV 注入した。百万個のマウス乳房腺癌 4T1.2 細胞 (Robyn Anderson, University of Melbourne から入手) をヌードマウス (図 4 および 7) と Balb/c マウス (図 8 および 9) の左乳房脂肪パッドに注入し、5 ~ 20 日後ペプチドを注入し、画像化した。

【0201】

#### 光学的画像化および組織加工

腫瘍細胞の注入後 5 ~ 20 日で腫瘍が十分な大きさになった場合は、ペプチドを IV 注入し、Maestro 小動物イメージャー (CRI) で画像化した。動物をイソフルランの過剰投与により屠殺後解剖した。肺転移を調べるため、肺を OCT 凍結保護物質で満たし、小動物イメージャーで画像化した。屠殺時点で尾部静脈から出血させて血液測定を行い、毛細管に集めた。次に、この管を Cy5 蛍光ペプチドの存在下、小動物イメージャーを使って画像化した。ゲル濾過アッセイ用の組織処理として、 $30 \text{ mg}$  の組織を  $1\%$  SDS トリス緩衝液中でホモジナイズ後、 $80^\circ\text{C}$  で 10 分間加熱し、遠心分離した。次に上清を  $1:10$  に希釈し、トリシゲルに供し蛍光画像化した。

【0202】

#### 蛍光組織像

各マウス由来の腫瘍と肺を冷凍型に入れ OCT 媒質中で凍結後、 $10 \mu\text{m}$  の凍結切片を切り出した。Cy5 蛍光を使って、組織を蛍光解剖顕微鏡上で画像化した。次に、同じ切片または連続切片をヘマトキシリンとエオシン (H&E) で染色した。

【0203】

#### $^{111}\text{In}$ 放射性同位元素実験

$3.6 \text{ nmol}$  の切断可能および切断不可能マレイミド選択的輸送分子を  $1.2 \text{ mCi } ^{111}\text{In}$  と  $10 \text{ mM NaOAc}$   $\text{pH } 7.0$  中、 $40^\circ\text{C}$  で 1 時間反応させた。反応後、 $100 \text{ nmol}$  の非放射性  $\text{InCl}_3$  を添加し、さらに 1 時間インキュベートし、未反応 DOTA とキレート形成させた。インキュベーション後、ペプチドストック反応物を  $5 \text{ kDa}$  アミコンカラム (amicon column) を通して遠心分離し、未反応の非放射性および放射性  $\text{In}$  を洗い流した。反応混合物のゲル濾過アッセイを行い、蛍光イメージャーを使って露光し、全ての  $^{111}\text{In}$  がペプチドと反応したことを確認した。カラム濾過後、放射能の  $1/3$  が回復した。次に、3 匹のマウスに約  $50 \mu\text{Ci}$  の  $0.3 \text{ nmol}$  ペプチドを IV 注入した。次に、マウスをブラナーガンマ画像化および光学的画像化 (Optix, GE healthcare) を使って 48 時間まで画像化した後、安楽死させた。マウス組織を採取し、シンチレーションバイアル中に入れ、秤量と計数カウントを行って  $\text{ID/g}\%$  を測定した。比較のため、 $\text{ID/g}\%$  の比を計算し、共同研究者の Edmund Wong がデンドリマーを使って行った以前の同様の実験のレベルと比較した。

【0204】

#### アルブミン反応性マレイミド選択的輸送分子の合成

アルブミン反応性選択的輸送分子の合成には、標準的遊離ペプチド合成を凌ぐ、1 段反応および精製が要求される。スクシニルキャップ  $\text{e}_8\text{N}$  末端ではなく、 $\text{NH}_2\text{-e}_9\text{-}$  切断部位 -  $\text{r}_9\text{-c}$  (Cy5) -  $\text{NH}_2$  としてペプチドを合成した。次に、ヘテロ二官能性リンカーを、マレイミド型の N 末端上の遊離アミンおよび  $\text{NHS}$  エステルと反応させるこ

10

20

30

40

50

とができる。リンカーは、短い親水性の p e g 鎖、またはより高い疎水性の炭素鎖を含む。最初の合成時に、マレイミドプロピオン酸 P F P エステル、マレイミド P e g 8 スクシンイミジルエステル、およびマレイミド P e g 2 4 スクシンイミジルエステルが全て作られる。P F P エステルは、古典的な P e g スクシンイミジルエステルに比べ、反応が著しく速く、収率も高い。P e g 8 および P e g 2 4 を精製するのは困難で、反応は非効率的であったので、我々は、プロピオン酸リンカーに注力した。最終的配列：m a l - e g - o P L G ( C m e ) A G - r g - c ( c y 5 ) が得られている模式的ペプチド構造を図 1 A と 1 B に示す。親水性が高く、x P L G L A G . 5 3 よりもうまく動作するという理由で、ペプチドは o P L G ( C m e ) A G の切断部位を有するように作られた。

#### 【0205】

マレイミド選択的輸送分子および酵素切断の試験管中での検証

マレイミド選択的輸送分子をマウス血清アルブミンおよび血漿と水性の条件下で反応させ、ペプチドがアルブミンと試験管中で反応することを確認した。これらのデータは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 ( P A G E ) の結果によれば、ペプチドとアルブミンの混合の 1 時間の間に大部分のペプチドが M S A または血漿アルブミンと反応することを示している ( 図 1 C )。血漿の方が完遂度が幾分高く反応が進むように見える。マレイミド C y 5 とマレイミド選択的輸送分子のアルブミンへの予備的反応後、共役体を M M P - 9 で処理し、r g - c ( C y 5 ) ペプチドが効果的にアルブミンから切断されることを確認した。これは、選択的輸送分子は生理学的条件下でアルブミンと反応するのみならず、M M P によって切断されうること示唆している ( 図 1 D )。

#### 【0206】

H T 1 0 8 0 マウスを使った、マレイミド選択的輸送分子の担腫瘍マウスへの注入によって切断不可能ペプチドおよび遊離ペプチドに比較して、より優れたコントラストが得られる

検証されたインビトロ機序を使って、H T 1 0 8 0 ヒト線維肉腫担腫瘍マウスにペプチドを注入し、前のバージョンの選択的輸送分子と比較して優れた腫瘍標的化能があるのかどうかを調べた。マレイミドペプチドが遊離の選択的輸送分子と構造的に類似であるため、最初の実験では、1 0 n m o l の用量を使用した。このペプチドは、遊離ペプチドに比べ、遙かに長い半減期およびずっと大きな動物への取り込みを有することが明らかになった。そのため、用量を 3 n m o l に減らした ( データは示していない )。各 2 匹のマウスに切断可能なマレイミドペプチドを注入し、2 匹のマウスに、切断不可能選択的輸送分子 M a l - e g - ( P e g 2 ) 2 - r g - c ( C y 5 ) を注入した。マウスを 2 4 時間まで画像化した。各ペプチドに対し、皮膚をつけたまま、および皮膚を除去した後の 2 匹のマウスの画像を図 2 A に示す。切断可能なペプチドでは、切断不可能なペプチドに比べ取り込みが遙かに大きかった。次に、腫瘍および筋肉をホモジナイズし、上清に対しゲル濾過アッセイを行い、ペプチドが切断されたのか、切断されないのか、非切断でアルブミンに結合しているのかを判定した ( 図 2 B )。予想されるように、切断可能なペプチドを注入したマウスの腫瘍中に切断およびアルブミン結合ペプチドがみとめられ、切断不可能ペプチドを注入したマウス中では、非切断遊離ペプチドおよびアルブミン結合ペプチドが認められた。筋肉中には、検出可能なペプチドは認められなかった。低用量時のアルブミン反応遊離ペプチドとしてのこの取り込みレベルは、遊離ペプチドよりも極めて大きかった。動物に 3 n m o l の S u c - e g - x P L G L A G - r g - c ( C y 5 ) を注入した場合、注入 2 4 時間後に腫瘍取り込みを検出するのは困難であった ( 図 2 C )。P y M T マウスの入手可能性が限られているため、これは 2 匹のマウスのみ結果であるが、2 匹の P y M T 遺伝子導入マウスに切断可能および切断不可能ペプチドを注入した場合、取り込みは大きく、識別可能であった ( 図 2 D )。

#### 【0207】

切断可能および切断不可能マレイミドペプチドを注入したマウスから H T 1 0 8 0 腫瘍を集め、蛍光組織像用の処理をした。凍結切片を、C y 5 蛍光を調べるため画像化し、連続切片を H & E 染色して、特異な取り込み特性に関し顕微鏡レベルでより優れた感触を得

10

20

30

40

50

た。H T 1 0 8 0 腫瘍で前にみてきたように、腫瘍の無血管コア中への取り込みは極わずかであったが、むしろペプチドは腫瘍ストローマ界面の周辺の組織中で、より深い取り込みが少し増えた(図3A)。この取り込み分布は、遊離ペプチドでみてきたものと非常に類似している。切断不可能なペプチドでは、切断可能なペプチドでみられた腫瘍実質の端部またはより深い内側の取り込みとはかなり異なっていた(図3B)。

#### 【0208】

転移性の同系乳房腺癌腫瘍に関し、大および小腫瘍中でH T 1 0 8 0 と類似の分布を有する特異な取り込みがあった

アルブミン反応性ペプチドを4 T 1 . 2 同系乳房腺癌腫瘍モデルに注入した。この腫瘍モデルは、いかに良好に選択的輸送分子が転移を標的化できるかを判定するのに使用可能である肺および硬骨を含む離れた組織に4 T 1 . 2 細胞が生来的に転移するという事実を含む多くの利点がある。最初に、3 n m o l の切断可能および切断不可能ペプチドを、各3匹ずつのマウスに注入した。腫瘍がずっと大きくなり、コントラストが大きな腫瘍でも残存するかどうか、また肺その他への転移が検出できるかどうか判断できるようになった場合に、1セットのマウスで実験を行った。24時間後、マウスを屠殺して、切断可能および切断不可能腫瘍の蛍光の間に明らかな差を認めた(図4)。図3のH T 1 0 8 0 腫瘍のように腫瘍を凍結後切片化し、この4 T 1 . 2 モデルでさらに差が大きいことを示した。切断可能なペプチドを注入したマウスでは、H T 1 0 8 0 と異なり、腫瘍全体にわたり明るい蛍光取り込みがあり、また、間質浸潤の領域ではさらに明るい取り込みが認められた(図5A)。遊離ペプチドとは異なり、低倍率像でラベル表示されているように、壊死の腫瘍細胞中での取り込みはずっと小さかったが、これは古典的遊離ペプチドとは異なる。切断不可能ペプチド注入の腫瘍では、拡散した取り込みがあり、この取り込みは切断可能なペプチドより少なく、また明瞭でもなかった(7.5B)。

#### 【0209】

図3に示す大きな腫瘍を有するマウスの肺を解剖した。肺葉の蛍光画像化で認められるように、肺全体にわたり小さな転移があるように見えた(図6A)。次に肺を凍結して切片を切り出し、蛍光画像化を行ってC y 5 ペプチドを検出した。この画像化により切断不可能なペプチドに比べて切断可能なペプチドを注入したマウスの転移中の選択的輸送分子取り込みの増加が認められた(図6B)。取り込みは、転移の端部でより多く、遊離ペプチドの場合のように病巣の深くへ侵入しているようには見えなかった。しかし、さらに小さいマイクロ転移が特定された場合は、より多くの選択的輸送分子取り込みが認められ、おそらくアルブミンペプチドが緻密なコア部よりも、露出端部と小さい転移に対しての標識化により適しているのであろうことが示唆される(図6C)。

#### 【0210】

図3に示す大きな腫瘍を有するマウスの肺を解剖した。肺葉の蛍光画像化で認められるように、肺全体にわたり小さな転移があるように見えた(図6A)。次に肺を凍結して切片を切り出し、蛍光画像化を行ってC y 5 ペプチドを検出した。この画像化により、切断不可能なペプチドに比べて切断可能なペプチドを注入したマウスの転移中の選択的輸送分子取り込みの増加が認められた(図6B)。取り込みは、転移の端部でより多く、遊離ペプチドの場合のように病巣の深くへ侵入しているようには見えなかった。しかし、さらに小さいマイクロ転移が特定された場合は、より多くの選択的輸送分子取り込みが認められ、おそらくアルブミンペプチドが緻密なコア部よりも、露出端部と小さい転移に対しての標識化により適しているのであろうことが示唆される(図6C)。

#### 【0211】

腫瘍のコントラスト創出に関して、アルブミン反応性選択的輸送分子は他の選択的輸送に比べよいとは言えないまでも同等である

アルブミン反応性ペプチドは、以前設計された選択的輸送分子よりも同等なのか、さらに良いのかを判定するために、1セットのマウスをそれらの最適の時間と用量を用いて並べて試験した。4 T 1 . 2 細胞をヌードマウスに注入し、腫瘍が約6mmのサイズの場合は、動物にS u c - e<sub>8</sub> - x P L G L A G - r<sub>9</sub> - c (C y 5) 遊離ペプチド(10nm

o 1)、G 5 - P A M A M (選択的輸送分子) 6 (C y 5) 3 デンドリマー (2 n m o l)、5 3 - および M a l - e g - o P L G (C m e) A G - r g - c (C y 5) (3 n m o l) を注入した。遊離ペプチド注入マウスを画像化し、6 時間後、デンドリマーの場合は 4 8 時間で、マレイミドの場合は 2 4 時間で安楽死させた。皮膚剥がさない場合と剥がした場合の各マウスの画像を最大輝度にして図 7 に示す。この図は、種々の組織の相対的コントラストとバックグラウンド取り込みを示す。これらのデータは、アルブミン反応性およびマレイミドペプチドが特に良好に作用し、一方、遊離ペプチドは良好であるが、他の組織中でも大きな取り込みがあることを示している。

#### 【0 2 1 2】

マレイミドペプチドのさらなる最適化および分布特性

10

マレイミドペプチドの体内分布を調べる際、血漿とのインサイチュー反応のための遊離ペプチドとして注入した場合、注入後、ほとんどのペプチドは腎臓へ行くことが明らかになった。予備反応が血漿中半減期を延長し、おそらく腫瘍取り込みを増加させることを考えて、我々は、最初にマウス血清アルブミンとの予備反応を試みた。直感に反して、このことがさらに短い血漿半減期と低い腫瘍取り込みの原因であることが明らかになった。我々は、市販のマウス血清アルブミンは、ゲル電気泳動から明らかのように、マウス血液からより速く排出されるであろう他の分子に対してある種の化学状態にあるオリゴマーを含むのであろうと仮定をした。新鮮凍結マウス血漿がマウス血清アルブミンよりもペプチドと速く反応する (図 1 C) ことを観察した後で、我々は、新鮮凍結血漿と予備反応させたペプチドを注入することに決めた。2 匹のマウスに未反応または血漿予備反応ペプチドのそれぞれを注入し、血液を 3、2 4 および 4 8 時間後に採取した。驚いたことに、予備反応させたペプチドを注入したマウスの全ての時点で、マレイミドを注入したマウスより高い血漿中ペプチドレベルが得られた (図 8 A)。動物を画像化し、4 8 時間後に屠殺したとき、予備反応させたマウスの腫瘍で、明らかに大きな量の腫瘍中取り込みが認められた (図 8 B)。この一連の実験の一環として、蛍光非選択的輸送分子アルブミンのための対照として C y 5 - モノマレイミドを注入した。このマウスの蛍光画像化では、腫瘍の蛍光が有意に少なく、コントラストが E P R 効果のみでなく、選択的輸送分子の存在にも関係していることを示唆している (図 8 C)。

20

#### 【0 2 1 3】

強いコントラストを得るための十分な腫瘍標的化体内分布に関して、D o t a ( <sup>1 1 1</sup> I n ) 選択的輸送分子ペプチドが臨床的に重要になる

30

アルブミン反応性選択的輸送分子で達成されるコントラストのレベルが臨床的画像化に十分かどうかを判断するために、D O T A 標識マレイミドペプチドを合成し、ペプチドが <sup>1 1 1</sup> I n とキレートを作ることができるようにした。ペプチドは、C y 5 および D O T A の両方を含み、二重のモダリティの画像化を行うことができる。ペプチドを水性の条件下 <sup>1 1 1</sup> I n で標識付けし 5 0 μ C i のペプチドを、血漿との予備反応をせずに、0 . 3 n m o l の用量 (光学的画像化に使用した用量よりも 1 0 倍少ないペプチド用量) で各動物に注入した。次にマウスをブラナーガンカメラおよび光学的イメージャーで画像化し、4 8 時間までの種々の時点で放射能と蛍光の両方を検出した。図 9 A は、切断可能および切断不可能ペプチドを注入し、4 8 時間後の 2 匹のマウスである。黒色矢印は腫瘍を指し、際だったコントラストがよくわかる。また、青色の矢印は腎臓を指し、最大量の取り込みを示す臓器である。光学的画像化で、検出可能な唯一の器官は腫瘍であり、腎臓と肝臓は、蛍光浸透の限界のため、インタクトマウスでは認識できなかった (図 9 B)。治療当たり 3 匹のマウスから摘出した組織の体内分布を図 9 C に示す。この図は、切断可能なペプチドでは、8 % I D / g までの選択的輸送分子が腫瘍に送達されたことを示す。予想外に、切断不可能なペプチドは、切断可能なペプチドより統計的に取り込みが少なくはなかったが、差は存在する。腫瘍コントラストが過去に試験した他の選択的輸送分子構築物と比較してどの程度良好かの感触を得るために、我々は、これらのアルブミン反応性選択的輸送分子および P A M A M デンドリマーに対する、重要な近くの組織を比較した腫瘍のコントラスト取り込み比を計算した。アルブミン反応性マレイミドペプチドの腫瘍の血液

40

50

、皮膚、および筋肉に対する比は、我々が放射標識を使って過去に試験した全てのデンドリマーより優れている（図9D）。しかし、切断可能と切断不可能のコントラスト比はそれほど強い印象を与えるものではない。この理由の多くは、マレイミドおよびデンドリマーの両配置に対するEPR効果に起因するものであろう。

#### 【0214】

#### 実施例3：デンドリマー結合選択的輸送分子

##### ポドフィロトキシン動物実験

選択的輸送分子ポドフィロトキシン（選択的輸送分子 - p o d o）共役体を p o d o - s s - ピリジンと S u c - e g - x P L G L A G - r g - c を反応させて合成後、HPLCで精製し、質量分析で確認した。ペプチドをTFA塩として貯蔵し、収率を質量分析で測定した。動物実験のため、無胸腺のヌードマウスの乳房脂肪パッドに  $1 \times 10^6$  HT1080 ヒト線維肉腫細胞を注入した。1週間後、腫瘍が  $30 \sim 50 \text{ mm}^3$  になったときに、マウスに一日おきに1回、合計3回、 $10 \mu\text{mol} / \text{kg}$  のポドフィロトキシン、選択的輸送分子単独、または選択的輸送分子 - p o d o を IP 注入した。治療群あたり3匹のマウスを定期的に秤量し、腫瘍を測定した。選択的輸送分子および選択的輸送分子 - p o d o 治療群の著しい重量減少のために、10日後マウスを安楽死させた。

#### 【0215】

##### ドキソルビンPAMAMデンドリマーの品質管理

表面にドキソルビンが結合したPAMAMデンドリマーを使用した。簡単に述べれば、リンカーを合成し、G5 PAMAMデンドリマーの表面に反応させた。最後に、ドキソルビンをデンドリマーに反応させ、Amicon遠心分離カラムで精製した。収率を重量と消衰係数として  $11,500 / (\text{M} \cdot \text{cm})$  を使って計算したドキソルビン濃度から求めた。チオエーテルおよび3つの異なるヒドラゾンデンドリマーリンカーを図11に示す（図中、チオエーテル、芳香族、尿素、またはPegリンカーと表示した）。デンドリマーからのドキソルビンの加水分解に関し試験した全てのデンドリマーをPBS pH 7.4または50 mM酢酸ナトリウムpH 5に入れて18～22時間かけて希釈し、トリシン緩衝SDSゲルに供した。その後、ゲルを488 nm励起および600 nm発光のUVイメージャーで画像化した。選択的輸送分子ドキソルビンデンドリマーをデンドリマー当たり6ドキソルビンおよび6選択的輸送分子を使って合成した。選択的輸送分子の構造は、S u c - e g - o P L G C ( m e ) A G - r g - c としたが、理由はこれが高速切断MMP基質であり、チオールを介してデンドリマーと反応したからである。さらなる精製のために、デンドリマーを凍結乾燥後、50%プロピレングリコールおよび50%20 mMトリス緩衝液中で再懸濁した。デンドリマーを0.2 μmナイロンフィルターを通して遠心分離し、全ての凝集物を除去した。濾過前後の試料をゲル濾過アッセイに供し、精製を確認したが、驚いたことに、この精製により大量の遊離ドキソルビンおよび高分子量凝集物が除去された。

#### 【0216】

デンドリマーを1つのpDoxおよび3つのCy5でコートして近赤外でデンドリマーを明るく蛍光発光させることを目的として、pDoxデンドリマーを合成した。前に記載したようにpH 7.4とpH 5の緩衝液中で一晩インキュベートしたpDoxデンドリマー試料をHPLC/質量分析に供した。30～60%アセトニトリル水溶液を使って逆相カラムの0.5%TFA勾配でHPLCを行った。ドキソルビン（470～490）およびCy5（645～655）吸光度ピークをモニターし、pH 5試料の新しいドキソルビンのピークを明らかにした。このピークは、質量分析から遊離pDoxに基づくものと解明された。定量的ため、デンドリマーに対し、前のものとは別の蛍光検出器を有する0.14%TFA含有10～90%ACN勾配カラムのC18逆相カラムを使って、さらにHPLCを行った。デンドリマーに対し、異なるカラムおよび異なる条件になると考えられる2つのカラムの間で別々に実行した。デンドリマーから加水分解されたpDoxの定量的ために、200 pmolの試料を注入し、12、36、および60 pmolのpDox単独の検量線と比較した。しかし、図14からわかるように、pDox標準は劣化し

ていることがこの実験で明らかになった。

#### 【0217】

##### ドキシソルビシンデンドリマーを使った動物実験

複数の実験のなかで、HT1080含有ヌードマウスには特異的単回用量のドキシソルビシンデンドリマーを注入した。ドキシソルビシン/デンドリマーの注入、用量、数および治療/対照%を、この実験のそれぞれについて表4に示す。マウス重量と腫瘍容量を定期的に測定した。尿素およびPegヒドラゾンデンドリマーに対しては、注入7日目にマウスを分光的に画像化した。Maestro(CRI)スペクトルデコンボリューションシステムおよびソフトウェアを使って、ドキシソルビシン蛍光(赤)を自発蛍光(緑)から分離した。腫瘍を取り出し、スペクトルデコンボリューションおよび明視野で画像化した。芳香族とチオエーテルデンドリマーに対しては、各治療群あたり4匹のマウスの割り当てであったが、デンドリマー合成収率が限られているため、尿素とPegヒドラゾンデンドリマーには、2匹のマウスのみとなった。選択的輸送分子デンドリマー実験に対しては、治療あたり4匹のマウスに、各マウスへの単回用量として2mg/kgのドキシソルビシンを注入した。この実験用として、各マウスは2つの腫瘍を有し、治療群あたり合計8腫瘍になる。pDox-デンドリマー実験に対しては、治療あたり3匹のマウスに単回用量を注入し、各マウスは2つの腫瘍を有する。pDoxデンドリマーマウスの注入後11日目にmaestro小動物イメージャーで画像化し、デンドリマーマウス中のCy5標識を検出した。これにより、実質的な量の蛍光がマウス中に残されていることが明らかになった。マウス中でCy5が全身にわたり非常に多量に分布したため、皮膚が青色に見えた。

10

20

#### 【0218】

遊離選択的輸送分子ポドフィロトキシン共役体はペプチドによって薬剤より大きな活性を示した

遊離ペプチド薬剤共役体の成功の見込みは低かったが、我々は、少なくとも1つの共役体を調査する価値はあると判断した。そのため、Suc-seg-xPLGLA-glyc(ss-ポドフィロトキシン)を合成し、細胞培養試験を行った。このペプチドが細胞に対しマイクロモル以下の毒性を有することが分かり、また、ペプチド合成が非常に難しいということはなかったため、動物で試験する価値があると判断した。そのため、選択的輸送分子を図10Aに示すように合成した。最終構造を図10Bに示す。出発用量を決めるために、ポドフィロトキシン自体を試験し、腫瘍収縮のための有効量を測定した。治療はしないが腫瘍成長を大きく遅らせるためには、44μmol/kgの一日おき3回注入で十分であることがわかった。ポドフィロトキシンによる明らかな毒性の兆候はなかった(データは示さず)。これらの結果は、48~100μmol/kgポドフィロトキシンの多数回投与後、極わずかな毒性が認められたとする文献中のデータと類似していた。最初の選択的輸送分子実験のために、44μmol/kgの用量の選択的輸送分子-podoを試みることにしたが、この用量では急性毒性であることがわかった。この用量で、まさに選択的輸送分子による大きな毒性があると判断された(4章で考察するように)。そのため、マウスに有毒でない値まで用量を減らす必要が生じた。

30

#### 【0219】

繰り返された毒性の問題のために、HT1080担腫瘍マウスのIP注入剤として投与する選択的輸送分子-podoの用量を10μmol/kgまで減らした。各治療群あたり3匹のマウスに一日おきに3回用量、1回用量を注入した。治療群は、ポドフィロトキシン(podo)単独、選択的輸送分子-podo、選択的輸送分子単独、およびH<sub>2</sub>O賦形剤とした。両方の選択的輸送分子ペプチドは中程度の腫瘍成長減速を起こしたが、ポドフィロトキシンのこの治療用量は効果的でないことが明らかになった(10.1C)。これらの結果に基づいて、低下した腫瘍成長は、ポドフィロトキシンには関係なく、むしろ選択的輸送分子の存在に関係があることが明らかになった。この場合の選択的輸送分子は最大耐容IV用量でIP投与されたことがわかっていて、腫瘍成長曲線の他に、選択的輸送分子および選択的輸送分子-Podo両方を注入したマウスは実験の間に大きな体重減少を生じ、ペプチドによる全身性の毒性があったことを示唆している(図10D)。こ

40

50

これらのデータは、さらに、選択的輸送分子毒性を理由として、ポドフィロトキシン等の薬剤共役体は遊離ペプチド形態を考慮に入れてはいけないことを示唆している。最後に、選択的輸送分子 - G F L G - ドキソルビンペプチドを試みたが、安全用量では、いかなる治療の活性も見いだすことができなかった（データは示さず）。

#### 【0220】

ヒドラゾン結合を介したドキソルビシンの P A M A M デンドリマーに対する共役により抗腫瘍効果が認められる

治療送達用に最も有望であると考えた選択的輸送分子配置は、薬剤の G 5 P A M A M デンドリマーへの直接結合であった。r<sub>g</sub> - 薬剤共役体の課題およびヒドラジンが作用するというヒントから、最初は、ドキソルビンに付加した安定なチオエーテルリンカーまたは種々の酸不安定ヒドラゾンリンカーを有する共役体に的を絞ることにした。このことが、我々がこれらのタイプの共役体を有する動物の治療活性があるかどうか判断することを可能にした。前に考察したように、ヒドラゾンリンカーの利益は、ネイティブな薬剤がリンカーの加水分解により放出されることである。合成した4つのリンカーの構造を安定なチオエーテルリンカーおよび次の3つのヒドラゾンリンカーに関する図11Aに示す。これらのリンカーをG5PAMAMデンドリマーと反応させ、最終ステップとして、ドキソルビシンをリンカーと反応させた。純度および酸感受性を試験するため、デンドリマー共役体を酢酸ナトリウムpH5またはリン酸塩緩衝食塩水pH7.4中で決められた時間インキュベートした。これらの実験は同時には行わなかったが、定性的差異は明らかで、pegリンカーが最も加水分解感受性が高いことを示した。尿素と芳香族リンカーは、酸処理に対し感受性が特に高くはないが、尿素リンカーの方がやや安定性が高いようであった。チオエーテルは明らかに最も安定で、最低量の遊離ドキソルビン混入物が認められた（図11B）。不幸にも、我々はこれらのうちのいずれの分子も、遊離ドキソルビン混入物の完全でない状態で得ることが出来ていないが、その割合は小さかったのでマウス中のこれらの分子の試験を続行した。

#### 【0221】

全ての4つのドキソルビン結合デンドリマーをHT1080担腫瘍マウスへの単回用量注入により試験し、結果を表4にまとめた。この表は、実験の終わり時点での対照に対する治療の%体積であり、その薬剤がどの程度の抗腫瘍活性を有するかを示す。他の2つのヒドラゾンデンドリマーの62%および65%に比較して27%の賦形剤対照に対する腫瘍体積を有し、チオエーテルリンカーは対照と差がないことにより、最大の酸感受性を有するpeg結合デンドリマーが最良の結果を得たことが明らかになった。図12A~Dは、尿素およびpegヒドラゾンリンカーに対する、マウスの画像、腫瘍成長曲線、およびマウス体重の変化を示す。驚いたことに、これらpegおよび尿素リンカー-doxデンドリマーの両方とも、注入7日後のスペクトルでコンポジットションを使った蛍光画像化で検出可能であった（図12A、B）。腫瘍成長曲線を描画する際、peg-ヒドラゾン腫瘍では、注入後の過程の間に大きな腫瘍サイズ縮退があることが明らかになった（図12C）。これらの2匹のマウスでは、わずか2.5（マウス1）および6.5mg/kg（マウス2）ドキソルビン注入後、顕著な抗腫瘍効果が認められた。これらの実験からは毒性の兆候はなかった（図12D）。この実験により、pegリンカーが大きな腫瘍成長抑制を示し、試験した他の全てのドキソルビンデンドリマーよりも優れていることが明らかになった。しかし、全ての実験の中で、対照薬剤ドキソルビンおよびリボソームドキソルビン（Doxil）は、抗腫瘍活性に関していつもデンドリマーを打ち負かしている。これは、より高い用量の対照を使ったという事実による可能性があり、また、それらが非常に効果的な薬剤であるという理由にもよる。毒性判断するために用量漸増手法を使った、より多くのマウスによるさらに多くのデータと、それによる治療指数が出てくるまでは、これらのデータからは、デンドリマー薬剤共役体が対照よりも優れているかどうかは判定できない。

#### 【0222】

10

20

30

40

【表 4】

分子	スケジュール	賦形剤	ドキソルビシン用量	治療/対照 (%)
G5 PAMAM(Dox-ヒ ドラゾン) <sub>3</sub> (芳香族) 安定ヒ ドラゾン	単回 iv	PBS	8.3 mg/kg	62
G5 PAMAM(Dox-ヒ ドラゾン) <sub>2,4</sub> (尿素) 安定ヒ ドラゾン	単回 iv	PBS	3 mg/kg	65
G5 PAMAM(Dox-ヒ ドラゾン) <sub>2,8</sub> {Peg}最も酸に不安定	単回 iv	PBS	4.5 mg/kg	27
G5 PAMAM -(チオエーテル-Dox) <sub>3</sub> 安定共有結合リンカー	単回 iv	PBS	5 mg/kg	100

## 【 0 2 2 3 】

ドキソルビシン結合 dendrimer への選択的輸送分子の付加が溶解度を顕著に減少させる dendrimer 上で最も良く作動するヒドラゾンリンカーを選別後、新しいバッチの表面に結合した選択的輸送分子を有する dendrimer を合成した。我々は、中程度の数であれば、以前 Cy 5 含有 dendrimer であった溶解度の問題をもたらさないであろうことを期待して、6 選択的輸送分子および 6 ドキソルビシンを有する G 5 P A M A M dendrimer を合成した。原理的には、100 を超える薬剤を表面に付加することは可能であるが、我々は、MRI 調査用の 30 ガドリニウム分子を有する dendrimer で見られたような著しい溶解度の問題を予想したため、この選択枝を避けた。我々は、P A M A M dendrimer 上の全ての未反応アミノ基をキャッピングしてさらに溶解度を高めるために P e g 8 または P e g 4 - O H キャップを有する 2 つの異なる dendrimer を合成した。これは、キャッピング剤として P e g 4 を使った光学的小および MRI dendrimer とも異なる。他の調査での P e g 4 に比較して、P e g 8 および P e g 4 - O H でさらに凝集が少ないことが認められた（データは示さず）。最初に、dendrimer を凍結乾燥後プロピレングリコールに懸濁させた。この画分は多くの量の遊離ドキソルビシンおよび凝集物を有しており、そのため 0.2 μm フィルターを通して濾過し、凝集物と遊離ドキソルビシンの両方が減少したが完全ではなかった（10.4 A）。次に、各 dendrimer、P e g 8 d o x dendrimer 単独、P e g 8 選択的輸送分子 d o x dendrimer、および P e g 4 - O H 選択的輸送分子 d o x dendrimer を pH 5 および pH 7.4 で一晩インキュベートし、ドキソルビシンの加水分解を検出した。これらの dendrimer のそれぞれで、低い pH の場合はドキソルビシンの加水分解が増加したが、これらのデータは劇的なものではなかった（10.4 B）。条件が極めて酸性であったことが理由で、トリス緩衝液の添加前のプロピレングリコールへの再懸濁中に多くのドキソルビシンを失った、と考えている。幾分落胆したが、供給および溶解度上の制約から、1 mg / kg のドキソルビシン当量をマウスに注入することにした。これらの dendrimer は、おそらく遊離ドキソルビシンとしてさえ有効ではない低用量が理由で、腫瘍成長に対して顕著な効果が無いことがわかった（図 13 C）。

## 【 0 2 2 4 】

より強力な 2 - ピロリノドキソルビシンは選択的輸送分子 dendrimer の効力を高めるが、この薬剤は不安定である

選択的輸送分子コート dendrimer に付随する溶解度と凝集問題が主要な問題であることが認識された。凝集の原因となると思われる複数の変数があり、その内最も重要な 2 つは、表面上の選択的輸送分子の数および結合した薬剤の数であると思われる。そのため、我々は、選択的輸送分子の数を dendrimer あたりおよそ 4 に減らすことにした。さらに、ドキソルビシンをやめて 500 倍強力な 2 - ピロリノドキソルビシン（p D o x）を使



うことにした。これらの共役体は治療の活性のために注入が必要なデンドリマーの量を減らし、より少ない薬剤でのデンドリマーのコーティングを可能にし、またはこのような高濃度が必要でないようにし、最終的に溶解度の問題を少なくするであろう。最後に、我々はデンドリマーの凝集減少がデンドリマー表面上の負に帯電したCy5に役立っていることを見出したが、そのため、Cy5をpDoxデンドリマーに添加した。このようにして、3つのCy5、1つのpDoxを有し、さらに4つの選択的輸送分子が存在するまたは存在しない、G5デンドリマーを作製した。

#### 【0225】

これらのデンドリマーの試験の前に、pDoxに対するHT1080含有マウス最大耐容用量は、腫瘍成長を顕著に遅らせる用量である0.1mg/kgであることを見出した。2匹のマウスはそれぞれ0.3および1mg/kgのpDox注入後24時間以内に死亡した。この用量は、これらのマウスのドキソルビシンに対する最大耐容用量よりも約50~100倍低い。

#### 【0226】

pDoxを合成し、前に考察したドキソルビシンデンドリマーと同様に、ヒドラゾンリンカーを介してデンドリマーと反応させた。pDoxがデンドリマーと反応したことを確認するのは困難であった。標識化は極めて遅く、吸光度はUV分光法で検出できなかった。検出は、プレートリーダーで測定する蛍光スペクトルによってのみ可能で、pDoxがデンドリマーに結合したことは明らかであったが、定量は出来なかった。デンドリマーを、次にpH5緩衝液中でインキュベートし、LC/MSによりpDoxを検出することを試みた。加水分解後、pDoxの吸光度はHPLC吸光度検出器で検出可能で、ピークを質量分析により確認した(図14A)。しかし、濃度を確認することは出来なかった。次に、蛍光検出器付HPLCを使ってpDoxの濃度を測定し、蛍光標準と比較した(図14B)。これらのデータから、1倍数の範囲内でpDoxを定量出来る確信が持てたが、分解の問題からこれらの測定値が非常に正確であるとは言えない。高感度分析HPLCおよび質量スペクトルを使って、pDoxには厳しい安定性の問題があり、複数のピークに分解することを見付けた(図14C)。安定性は、課題標識化収率がデンドリマーあたり1pDox未満になるという十分大きな課題になる可能性があった。しかし、2、3のマウスに選択的輸送分子コートのないデンドリマーを注入し、少なくともある程度のレベルの抗腫瘍活性があるのかどうかを判断した。これらの実験により、0.1mg/kg未満の用量のpDoxデンドリマーで、実質的な抗腫瘍効果が示されたが、pDoxの安定性と低い標識化効率のため、実験を放棄した(図15A)。注入後11日目のマウスの画像化で、腫瘍中の実質的な量のpDoxCy5デンドリマーが認められ、適切で安定なデンドリマー薬剤の組み合わせが合成されれば、この取り組みまだ価値のある将来性があることを示している(図15B)。低標識化効率および選択的輸送分子pDoxデンドリマーと同じ用量のpDoxデンドリマーを確実に注入することが不可能に近いという理由により、pDoxデンドリマー含有選択的輸送分子は、試験されることはなかった。

#### 【0227】

### 実施例4：リボソームに結合した選択的輸送分子

#### ナノ粒子のための選択的輸送分子ペプチド合成

選択的輸送分子をアブラキサンと反応させるために、次のペプチドを前の章で記載したように固相合成により合成した：c-e<sub>9</sub>-oPLG(Cme)AG-r<sub>9</sub>-k。次に、DMFおよびNMM中で粗製ペプチドのN末端システインにCy5-モノマレイミドを反応させた。ペプチドをHPLCで精製し、DMFおよびNMM中でマレイミドプロピオン酸PFPEステルと反応させた。精製後、最終ペプチド構造は、c(Cy5)-e<sub>9</sub>-oPLG(Cme)AG-r<sub>9</sub>-k(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-マレイミド)であった。DSPE-選択的輸送分子に対しては、-Cy5-e<sub>9</sub>-oPLG(Cme)AG-r<sub>9</sub>-cおよびe<sub>9</sub>-(Peg<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-r<sub>9</sub>-cを固相化学およびHPLCを用いた精製によりペプチドを合成した。ペプチドをDMFおよびNMM中で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-[マレイミド(ポリエチレングリコール)-2

000] (DSPE - Peg (2000) - マレイミド) (Avanti Polar Lipids) と反応させ、次に、反応をHPLCでモニターした。反応完了近くで、Cy5 - NHS エステルを添加し、この反応をHPLCでモニターした。合成完了後、DSPE - 選択的輸送分子 - Cy5 をHPLCにより精製した。

#### 【0228】

選択的輸送分子のアブラキサンに対する反応およびペプチドの切断

Cy5 - 選択的輸送分子 - マレイミドペプチドを、アルブミンに対し1および10%モルパーセントを生理食塩水中で再懸濁したアブラキサン懸濁液に入れ、混合した。反応管をバスソニケーター (bath sonicator) で30秒の超音波処理を3回行うか、または室温で触らずに30分または24時間放置する。最終時点で、トリシン試料緩衝液で反応を止め、90℃で10分間加熱する。次に、試料を10~20%トリシン緩衝ゲルに供し、UVPゲルイメージャーでCy5蛍光を調べるために画像化を行った。酵素切断アッセイ用として、選択的輸送分子リボソームおよびアブラキサンを20mMトリス150mM NaCl中の50nM組換え型MMP-9 (EMD) と共に特定の時間インキュベートし、トリシン試料緩衝液を添加して反応を停止させ、90℃で10分間加熱した。次に、試料を10~20%トリシン緩衝ゲルに供し、UVPゲルイメージャーで蛍光による画像化を行った。

10

#### 【0229】

動的光散乱による選択的輸送分子ナノ粒子のキャラクタリゼーション

リボソームとアブラキサンの調製試料を合成した濃縮物から2mg/mLのヒスチジンpH6.5で緩衝した300mMショ糖溶液中に1:100に希釈した。次に、試料をZetasizer (Malvern) を使って動的光散乱により測定した。平均10回の測定から2~3の測定値を採取しサイズを強度と容量の関数として測定した。次に、容量%とサイズ (nm) で結果をプロットし試料が単分散ガウス分布のサイズを持つのか、または凝集しているかを示した。

20

#### 【0230】

リボソーム選択的輸送分子の合成

水素添加大豆ホスファチジルコリン: コレステロール: 1,2-ジステアロイル-sn-グリセロール-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] (DSPE - Peg (2000) (Avanti Polar Lipids) が11:7:1の割合で前の調査と同様に合計30μmolの脂質で脂質ケーキを作ることによりリボソームを合成した。リボソーム含有選択的輸送分子として、DSPE - 選択的輸送分子 - Cy5のDSPE - Peg (2000) に対するモル比率の異なるものをケーキ形成の前に混合した。250mM硫酸アンモニウムおよび50mMショ糖ヒスチジン緩衝液0.33mg/mLを使って加熱とバス超音波処理することにより脂質ケーキを水和した。多重層リボソーム (小胞) を60℃に加熱し、プローブソニケータ (probe sonicator) を使って2分間超音波処理し小単層リボソーム (小胞) (SUV) を作った。次に、SUVを60℃でheat block mini-extruder (Avanti Polar Lipids) を使って最初0.2μm、次に0.1μm膜フィルター (Whatman) を通して20回押出を行った。押出後、セファデックスG25 (Sigma - Aldrich) カラムを使って、リボソームをpH6.5の300mMショ糖2mg/mLショ糖緩衝液へ緩衝液交換を行って、全てのリボソーム外硫酸アンモニウムを除去した。その後、リボソームを15mgのドキシソルピシンと共に60℃で1時間インキュベートし、次に、セファロースCL-4Bカラム (Sigma - Aldrich) を通して濾過後、4℃で貯蔵した。濃度測定のため、リボソームを1.5%トリトン-X溶液で破壊し、バス超音波処理機で超音波処理して、11,500M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>を消衰係数として使って吸光度により総ドキシソルピシン濃度を測定した。

30

40

#### 【0231】

選択的輸送分子ドキシソルピシンリボソーム中のドキシソルピシンの細胞画像化

HT1080細胞を96ウエルのカバーガラス底プレートに蒔き、種々のリボソーム製

50

剤で25分間、無血清の状態で治療した。次に、細胞を30分かけて3回洗浄し、共焦点顕微鏡 (Zeiss、LSM 5 Live) で488nmレーザーと550LP発光フィルターを使ってドキシソルピシン蛍光を調べるために画像化を行った。治療後、細胞に対し、正常成長培地中にある間および画像化間のインキュベーションの間、72時間までの画像化を行った。

#### 【0232】

選択的輸送分子リボソーム試験のための動物実験

ヌードマウスの右または左および左乳房脂肪パッドに $1 \times 10^6$ 細胞を皮下注入し異種移植組織を作製した。1週間後の腫瘍が $50 \sim 250 \text{ mm}^3$ に成長後、マウスに、賦形剤、ドキシソルピシンリボソーム、または選択的輸送分子コートドキシソルピシンリボソームを約 $3 \text{ mg/kg}$ のドキシソルピシンの量で静脈内 (IV) 注入した。マウス腫瘍測定および体重測定を定期的な間隔を置いて実施した。一部の実験マウスに対しては、第2の用量を注入した。腫瘍体積が最大近くになると、動物を屠殺し、腫瘍を秤量して画像化した。全動物プロトコルは、UCSD IACUCの承認を受けた。治療群を増やし、さらに大きなn数にするには、より多くのリソースが必要であったため、図20の実験はExplora Biosciencesで行った。

#### 【0233】

選択的輸送分子コートアブラキサン合成および検証

ナノ粒子を標的にするために選択的輸送分子を使う1つの方法は、アルブミンバクリタキセル懸濁物の表面をペプチドでコートすることである。7章で考察したものに類似の、アルブミンと反応可能な選択的輸送分子を合成した。この設計の配列は、(Cy5)-cys-oPLG(Cme)AG-r-g-maleimideであり(図16A)、maleimideがアルブミン上のC34と反応し、次に、切断時にCy5-cysがアブラキサンから切り離されるであろうことを狙っている。合成と精製後、アルブミン分子に対し1%および10%モル当量の選択的輸送分子を、新たに懸濁させたアブラキサンと、動物への注入に適した高濃度で混合した。30分および24時間後、並発反応を停止し、一部は超音波処理を行った。驚いたことに、超音波処理にもかかわらず、生理食塩水(注入緩衝液)中で反応は30分未満に完結するまで進行したことがわかった(ゲル電気泳動法(図16B))。1%および10%の出発選択的輸送分子に対し、それぞれ84%および70%の選択的輸送分子がアルブミンと反応したことが明らかになった。これは、遊離ペプチドとして残ったものに対するアルブミンと反応したものの蛍光累積強度により測定した。ペプチドがアブラキサンと反応後、0.3%、1%、3%選択的輸送分子を含む、および選択的輸送分子を含まない反応混合物の動的光散乱測定によりナノ粒子が非凝集で約130nmのz-平均を有することが示された(図16C)。アブラキサンと反応した選択的輸送分子をMMP-9酵素と共にインキュベートすると、Cy5-cysがナノ粒子から容易に切断された(ゲル電気泳動法による検出(図16D))。これらの明瞭で単純な結果から、次の実験シリーズは、これらの共役体の動物中の治療活性を試験することになる。

#### 【0234】

選択的輸送分子でコートされたリボソームの合成と検証

図17Aに示すように選択的輸送分子を表面に有するリボソームを合成するために、選択的輸送分子が結合したリン脂質を最初に合成する必要がある。このため、次のペプチドを合成した: Cy5-cys-oPLG(Cme)AG-r-cys。この配列で、ペプチド上の遊離チオールは、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロール-3-ホスホエタノールアミン-N-[maleimide (polyethylene glycol)-2000](DSPE-PEG(2000)maleimide)と反応可能である。後の切断により、ガドリニウムデンドリマーが合成された方法では不可能であった事をインビトロで確認することが出来るという理由から、Cy5をN末端と反応させた<sup>53</sup>。反応するとすぐ、ペプチドをDSPE-選択的輸送分子-Cy5として精製し(構造図17B)、リボソームに組み込むために使用した(図17A)。最初、我々はDSPE-選択的輸送分子-Cy5を、あらかじめ作られた医薬グレードのドキシル(Doxil)中に組み込むつもりであったが、ドキシ

ル単独に比べ腫瘍の収縮の点で不成功であった。後でわかったのだが、選択的輸送分子を組み込まれたことを確認する方法がない時点では、我々はあまりにも多くの選択的輸送分子をリボソーム中に組み込みすぎていた。

#### 【0235】

研究室で、リボソームを11:7:1の水素添加大豆ホスファチジルコリン(HSPC):コレステロール:DSP-EPEG(2000)の組成で作製したが、これは医薬ドキシル製剤をできる限り反映している。水和および脂質を100nm膜を通した押出を行う前に、混合種々のモル比の選択的輸送分子を混合することにより種々の濃度のDSP-EPEG-選択的輸送分子-Cy5を含むリボソームを作製した。濃度はDSP-EPEG(2000)で0.1~3モル%の範囲であり、これらはリボソームあたり約9~270個の選択的輸送分子の範囲になる。動的光散乱測定によりリボソームの平均サイズ(z-平均)が約130nmである事が確認された。代表的%容量VSサイズプロットを図17Cに示す。選択的輸送分子が表面上に存在することを確認するために、リボソームを試験管中でMMP-9で処理し、酵素が選択的輸送分子にアクセスし、ペプチドが酵素により切断されたことを確認した(図17D)。

10

#### 【0236】

選択的輸送分子がドキソルビシンの細胞中への取り込みを増やす

リボソームに組み込まれた選択的輸送分子の検証の後で、我々は、選択的輸送分子がドキソルビシンの培養中の細胞への取り込みを増やすかどうか知ることを望んだ。このため、HT1080ヒト線維肉腫細胞を種々の量の選択的輸送分子を含むリボソームと共にインキュベートした。1時間の長いインキュベーションの後の細胞内ドキソルビシンの量は、選択的輸送分子表面上のリボソーム量の増加と共に増えた(図18A)。多くの量のドキソルビシン取り込みがあったが、全処理のほとんどの薬剤は主にエンドソームの窪み中にある様に見えた。しかし、画像を明るくすると、細胞の核の内部で検出できることが明らかになった(図18A挿入図)。

20

#### 【0237】

選択的輸送分子でコートされたリボソームの抗腫瘍効力はリボソームをコーティングしている選択的輸送分子の数に依存する

これらの励みになるデータに基づいて、選択的輸送分子リボソームを担腫瘍マウスに注入し、選択的輸送分子でコートされたリボソームが非標的化リボソームよりも高い抗腫瘍効果を持ちうるかどうかを判断した。HT1080担腫瘍マウスの治療群あたり4マウスに3mg/kgドキソルビシン当量のリボソームを注入した。治療群あたりの主要数を増やす目的で、各マウスは2つの腫瘍を有した。腫瘍が50~200mm<sup>3</sup>であるときに、マウスにDSP-EPEG(2000)リボソーム、非標的化ドキソルビシンリボソームおよび賦形剤単独(ショ糖緩衝液)に対し0.3、1、および3モル%の選択的輸送分子を単回IV注入した。注入後17日間定期的にマウス体重および腫瘍容量を定期的に測定した。腫瘍容量の%変化を時間に対しプロットし、最大の抗腫瘍活性が0.3%選択的輸送分子ドキソルビシンリボソームで得られたことが明らかになった。1%および非標的化リボソームは、抗腫瘍活性は類似しており、3%のものはずっと悪かった。これらのデータからは、より少ない数のリボソーム表面の選択的輸送分子が治療の活性を増加させることが示唆されるが、これは組織培養時の取り込みとは逆である(図18A、B)。10日目から17日目の0.3%および非標的化リボソームの間にはp値<0.02の両側t-検定で統計的有意差があった。全実験継続期間中、全実験でマウスは健常のまま残り、リボソームの毒性による有意な重量減もなかった(データは示さず)。

30

40

#### 【0238】

凝集が選択的輸送分子でコートされたリボソームの効果を抑止する

Amiconカラムを使った遠心分離により濃縮したとき、リボソームの凝集の問題が生じる場合があることが明らかになった。凝集があると治療効果は消滅する。おそらく複数のタイプの標的化ナノ粒子に付随する問題であることを理解した上で、この問題を明確にし避ける必要がある。そのため、2つのバッチの0.3%選択的輸送分子リボソームの

50

サイズおよび分散を動的光散乱により測定した。凝集のあった遠心分離したバッチおよび新しい非濃縮バッチは正常分散であることが確認された（図 19 A）。光散乱の測定をしないでも、リポソームを 0.2  $\mu$ m 膜フィルターを通して室温で押出して、大きな抵抗があるかどうかを測定することで凝集は定量的に測定可能である。凝集に関する問題がなければ、リポソームは容易に押出可能であるが、凝集が存在すれば抵抗が増える。凝集が腫瘍成長抑制に影響を与えるかどうかを試験するため、2つのバッチの HT 1080 異種移植組織マウスに注入した。各 2つの腫瘍を持つマウスに、分散 0.3% 選択的輸送分子リポソーム（4 マウス）ならびに、残りの凝集 0.3% 選択的輸送分子リポソーム（3 マウス）、非標的化リポソーム（4 マウス）、および賦形剤対照（3 マウス）の 3 mg / kg ドキソルビシン当量を注入した。この実験により、前に示したように、分散リポソームは非常に効果的であるが、リポソームが凝集すると全ての治療活性が消滅することが確認された（図 19 B）。これらの結果から、効果が完全に消滅するので、全てのナノ粒子調製物の測定および凝集のないことの確認が重要であることが強調される。

#### 【0239】

標的化選択的輸送分子リポソームは切断不可能選択的輸送分子および非標的化リポソームよりも大きな治療効果を有する

選択的輸送分子標的化リポソームで得られた有望な結果により、2つのさらなる変数の試験に至った。1つ目は、表面の選択的輸送分子の数をさらに減らすことであり、2つ目は、強化された治療活性が選択的輸送分子の切断依存であるか否かを判定することであった。そこで、リポソームを 0.1 と 0.3% 表面上選択的輸送分子（それぞれ、表面に約 9 個と 27 個の選択的輸送分子）の MMP 切断可能なペプチドおよび切断不可能なペプチド（Cy5-e<sub>9</sub>-(Peg2)<sub>2</sub>-r<sub>9</sub>-c）として再作製した。実験群を治療当たり 8 マウスに増やし、実験は起こりうるどのようなバイアスも除くために独立業務請負人に行わせた。それぞれ 1つの腫瘍を有する 8 匹の HT 1080 担腫瘍マウスに 3 mg / kg 当量のドキソルビシンリポソームを 2 回（8 日目と 22 日目）注入し、薬剤処方間の差を強調するようにした（図 20 A）。驚くべきことに、0.1% 選択的輸送分子治療がこの群では最も効果的で、非標的化リポソーム（21 日目と 28 日目）に比べ平均腫瘍容量で 4 倍超減少を示した。切断可能な選択的輸送分子が非標的化リポソームより優れていることに加えて、切断可能選択的輸送分子は、切断不可能選択的輸送分子より効果的であった。類似の付加数の選択的輸送分子と比較して、両セットの切断可能な選択的輸送分子リポソームは、切断不可能ペプチドよりも小さいマウス中の腫瘍容量を示し、これらの差は複数の時点で有意であった（p 値 < 0.05）（図 20 B）。実験の終わりまでに、全治療群のマウスは病気になり、体重減があったが、薬剤治療が原因である、または選択的輸送分子含有マウスが未治療および賦形剤対照マウスよりも全て悪いという証拠はなかった（図 20 C）。血小板数が 0.1% の切断可能および切断不可能マウスで賦形剤単独治療群より少ないことを除いて、血液学的分析では、群間の有意差が無いことが明らかになった（データは示さず）。

#### 【0240】

#### 実施例 5：キャリアの選別

##### 構築物の合成

簡潔に述べれば、ペプチドを N 末端チオアセトイミド C 末端リジンを用いて合成した。リジンは NHSE ステル経由で Cy5 に結合するために使われ、システインは示された高分子量キャリアにマレイミドリンカー経由で結合するために使われた。ストレプトアビジン結合分子を作るために、4 個の選択的輸送分子をストレプトアビジンに直接結合させるために使用される C 末端のビオチンからペプチドを合成した。PAMAM デンドリマーベース構築物を除いて、種々の構築物をサイズ排除 HPLC で精製し、純度を独立にトリシゲル電気泳動法により評価した。2つの技術の間に、いくつかの矛盾が観察されたが、おそらく遊離ペプチドの高分子量キャリアに対する非特異的固着およびマレイミドリンカーの切断によると思われる。電気泳動技術を使ってさらなる精製をする努力がなされたがこれはほとんどは効果的でなかった。PAMAM デンドリマーベースの構築物を 10

k D 分画分子量の膜を通して遠心分離により精製した。

#### 【0241】

##### 画像化

MMTVプロモーターにより駆動されたポリオーマミドルT導入遺伝子(PyMT)を発現している動物をLesley Elliesから入手した。HT-1080異種移植組織を有するヌード動物を社内で作るか、またはExplora Biosciencesから入手した。どちらの場合も、3~5cmの直径になるとすぐその腫瘍を使った。動物にケタミン/ミダゾラム(80mg/kg、40mg/kg)で麻酔をかけ、示された構築物を尾部静脈から注入した。例によって、動物を麻酔から覚める最初の1時間ずっと観察した。それらに再麻酔をかけ、6時間、12時間、24時間、および48時間の時点で必要に応じ画像化した。最後の画像化の後で、ハロタンの過剰投与により動物を屠殺した。使った画像化システムは時間と共に進化した。ペグ化されているほとんどの共役体に対しては、簡単なライトボックスが使われるが、示されたイメージは、スペクトルデコンボリーションイメージャーで最初に得られたそのものである。アルブミン、デキストランおよびPAMAM dendrimer共役体を620/20励起フィルターを使い、680nmで画像を集めて試験した。ストレプトアビジン共役体を640/48励起フィルターを使い、700nmで画像を集めて試験した。

10

#### 【0242】

##### 標準化取り込み値

標準化取り込み値を最初は組織特異的較正をしないで測定し、後で組織特異性および光源の変化を考慮するための再調整を行った。簡潔に述べれば、前に述べたように、30mgの組織をSDS緩衝液(20mMトリスpH7.6、1%SDS)中でホモジナイズした。管を凍結し、Maestroマウスイメージャー(ex=620/20または640/48、em=680nmまたは700nm)を使って画像化した。較正は両セットのフィルターに対し別々に行った。画像分析をAdobe Photoshopを使って行った。

20

#### 【0243】

##### 組織像

凍結切片を10μmに切り出し、蛍光解剖顕微鏡(cy5:ex620/60、em640/48)を使って解析した。FITCタグ付きF-480抗体(1Nヤギ血清で15分間ブロッキングし、1:50で1%ヤギ血清のPBS溶液(Caltag)中へ希釈し、4で一晩処理)を使って氷冷アセトン中、10分間固定した組織に対し抗体染色を行った。

30

#### 【0244】

##### 磁気共鳴画像化

動物にイソフルランで麻酔をかけ(誘導3%、維持1~1.5%)、磁場中にいる間、呼吸のモニタリングシステムを使ってモニターした。UCSDの7T磁石とGEインターフェイスを使って画像化を行った。各動物に対し数回のスキャンを行った:脂肪抑制T1強調スピンエコー(Tr=400ms、Te=8ms、スライス厚さ0.3mm、マトリックス512x512、10NEX)、T2アナトミカル(Tr=3000ms、Te=20ms、スライス厚さ0.3mm、マトリックス512x512)、1NEX、およびT1シリーズ(Tr=150ms、250ms、500ms、1000ms、4000ms、Te=12ms)。

40

#### 【0245】

##### 血液中半減期はキャリアの分子量とともに増加する

予想したように、血液中半減期はキャリアのサイズとともに変化し、遊離ペプチドおよび5kDPEG共役体の数分からPEG-4キャップ第5世代PAMAM dendrimerに結合した選択的輸送分子の10時間以上まで広がっている。デキストランおよびアルブミン共役体は中位にあり、血液中半減期はそれぞれ2~3時間および6~7時間であった。一般的に、高分子量共役体は主要不純物として遊離ペプチドを含んでいるので、血漿中

50

半減期測定を、多くの場合、注入の約30分後に開始した(図21)。

#### 【0246】

同じキャリアに結合した切断可能および切断不可能選択的輸送分子の間で、少なくとも2倍の腫瘍による取り込みの差が観察された。

#### 【0247】

アルブミンおよびデキストラン両共役体を切断可能および切断不可能選択的輸送分子を使って合成した。両方のキャリアに対し、48時間の時点で約2倍の取り込みの差が認められ(表3)、キャリアに結合した選択的輸送分子が切断されたことを示している。さらに、ゲル電気泳動法により、48時間時点で腫瘍中に残っている主要蛍光種は切断生成物であることが明らかになった。

#### 【0248】

【表3】

ペプチド構造	ゲルによる 大凡の 純度	屠殺時 用量/ 時間	大凡の 血漿中 半減期	腫瘍 取り込み (SUV) (平均±SD)	肝臓 取り込み (SUV) (平均±SD)	腎臓 取り込み (SUV) (平均±SD)
12kD-PEG-e <sub>9</sub> - XPLGLAG-r <sub>9</sub> -k(cy5)	>90%	6 nmol 1h	20m	0.51±0.13 (n=7)	1.58±0.79 (n=7)	3.38±1.33 (n=7)
12kD PEG-e <sub>9</sub> -Xplglag-r <sub>9</sub> - k(cy5)	>90%	6 nmol 1h	NA	0.26±0.09 (n=4)	2.52±0.65 (n=4)	7.10±2.38 (n=4)
12kD-PEG-e <sub>9</sub> - XPLGLAG-r <sub>9</sub> -k(cy5)	>90%	6 nmol 1h	NA	0.68±0.17 (n=2)	1.17±0.49 (n=2)	5.33±0.64 (n=2)
12kD PEG-e <sub>9</sub> -Xplglag-r <sub>9</sub> - k(cy5)	>90%	6 nmol 1h	NA	0.31±0.18 (n=2)	0.71±0.17 (n=2)	3.27±0.62 (n=2)
Alb-e <sub>9</sub> -XPLGLAG-r <sub>9</sub> - k(cy5)	~60%	4.8 nmol 48h	3h	0.9±0.3 (n=2)	8.3±2.9 (n=2)	2.8±1.0 (n=2)
Alb-e <sub>9</sub> -Xplglag-r <sub>9</sub> -k(cy5)	~40%	6 nmol 48h	NA	0.2±0.1 (n=2)	11.8±1.1 (n=2)	5.4±0.2 (n=2)
Dex-e <sub>9</sub> -XPLGLAG-r <sub>9</sub> - k(cy5)	評価せず	5 nmol 48h	6h	2.3±2.0 (n=2)	14.2±7.1 (n=2)	3.3±1.9 (n=2)
Dex-e <sub>9</sub> -Xplglag-r <sub>9</sub> -k(cy5)	評価せず	6nmol 48h	NA	0.5±0.2 (n=2)	11.1±1.5 (n=2)	6.1±0.5 (n=2)
ストレプトアビジン-[e <sub>9</sub> - XPLGLAG-r <sub>9</sub> -k(cy5)] <sub>4</sub>	評価せず	4 nmol 48h	4h	0.4±0.0 (n=2)	3.2±0.0 (n=2)	3.7±1.0 (n=2)
G5 PAMAM-[e <sub>9</sub> - XPLGLAX-r <sub>9</sub> - k(cy5)] <sub>2</sub> [Succ] <sub>126</sub>	60%	3 nmol 24h	NA	1.4±0.4 (n=2)	6.6±2.1 (n=2)	1.8±0.4 (n=2)
G5-PAMAM-[e <sub>9</sub> - XPLGLAX-r <sub>9</sub> -k(cy5)] <sub>2</sub> [PEG] <sub>126</sub>	>90%	3 nmol 24h	20h	1.2±0.1 (n=3)	4.1±0.7 (n=3)	2.0±0.2 (n=3)
G5PAMAM-[e <sub>9</sub> - XPLGLAX-r <sub>9</sub> -k(cy5)] <sub>2</sub> [PEG] <sub>126</sub>	>90%	3 nmol 48h	NA	1.36±0.13 (n=3)	5.89±0.55 (n=3)	2.09±0.34 (n=3)
G5PAMAM-[e <sub>9</sub> - XPLGLAG-r <sub>9</sub> -k(cy5)] [PEG] <sub>127</sub>	>90%	3 nmol 48h	NA	0.6±0.1 (0.5,0.7) n=2	3.5±1.7 (2.3,4.7) n=2	1.1±0.0 (1.1,1.1) n=2
G5PAMAM-[e <sub>9</sub> - OPLG(MeC)AG-r <sub>9</sub> - k(cy5)] [PEG] <sub>127</sub>	>90%	3 nmol 48h		0.7±0.5 (0.2-1.2) n=3	1.8±0.8 (0.9-2.3) n=3	1.3±0.4 (1.0-1.7) n=3

#### 【0249】

組織調査からはキャリア結合切断可能選択的輸送分子はMMP-2産生腫瘍ストローマにより大きく取り込まれるように見える

遊離ペプチドのように、シュラブネルベースのペプチド共役体の取り込みは、MMTVプロモーターにより駆動されたポリオーマミドルT抗原を含む遺伝子導入マウス中のストローマに局在化した。抗体の染色により、このストローマ取り込みはMMP-2の存在と共存することが示された。一部の動物、特にiNOS-/-遺伝子型の動物では、扁平上皮異形成のMMP-9発現領域が、特に、アルブミン結合プローブで強調された。これらの領域は活性のMMPを含むことがインサイチュー酵素電気泳動によって確認された。

#### 【0250】

センチネルリンパ節中で切断可能選択的輸送分子はマクロファージにより切断される

ポリグルタマート経路で高分子量キャリアに結合した選択的輸送分子の48時間後の免疫適格性マウスのリンパ節への取り込みがあるということが早期に観察されている。従来、第5世代PAMAMデンドリマーならびに70kDデキストラン、ストレプトアビジンおよびアルブミンで、これが観察されたことがなかった。全d-アミノ酸対照ペプチドを注入した動物では、PyMTマウス中への腫瘍への取り込みが減少した(図22)。また、このことは、非担腫瘍動物中ではずっと少ない程度で発生し、これが腫瘍依存性プロセスであることを示唆している。r<sub>g</sub>-FITCおよびe<sub>g</sub>-XPLGLAG-r<sub>g</sub>-cy5の皮下同時注入がリンパ節中の同時染色をもたらさなかったので、ペプチドの切断もリンパ節自体で発生しているようである。フロイント完全アジュバントの事前注入による全身性活性炎症のある動物が、動物における腫瘍と類似の方式でペプチドを取り込んだが、このことは、選択的輸送分子を活性化しているリンパ節中の活性化したマクロファージに関係があることを示唆している。結局のところ、リンパ節への浸潤のある動物のセンチネルリンパ節中で、浸潤のない動物より多くの取り込みがあるが、取り込みはF-480発現マクロファージと共存し、従って、これは単純に浸潤腫瘍存在下のより多くのマクロファージの活性化が原因であるとするのが可能である(図23)。

#### 【0251】

PEG(5kDおよび12kD)

5kD PEGおよび12kD PEGに結合したペプチドをHT-1080異種移植組織を有するヌードマウスに、動物あたり6nmolの用量で注入した(図24)。通常、5kD PEG共役体は約5分の血液中半減期を有し、遊離ペプチドに類似した挙動を行うが、12kD PEG共役体は約20分のさらに長い半減期を有する。対照として、スクランブルバージョンのPLGLAG切断可能配列(LALGPGと表記)およびd-アミノ酸バージョンPLGLAG配列(plglagと表記)も注入した。2つの陰性対照はHT-1080異種移植組織で類似の標準的取り込み値を示したが、我々はd-アミノ酸バージョンを以降の実験で使用することにした。そのときの入手の都合上、ポリオーマ遺伝子導入マウスを野生型およびiNOS-/-バックグラウンドで試験した。得られた値が大きく違わなかったため、以下に示した取り込み値は両方のタイプのPyMTマウスプールに対するものとした。当時は組織特異的校正の必要性に気付かなかったため、これらのデータは単純に肝臓と腎臓組織からの校正を使ってはじめてから処理した。表3のペグ化ペプチドのデータは、後で組織特異的校正を受けており、2つの因子により腫瘍値を減らし、2つの因子で脾臓値を増やして、Maestroを使って集めた他のデータと大体同様のこれらのデータを得た。肝臓および腎臓は両方とも遊離ペプチドに比べ取り込み減少を示す。これは、約50%の注入ペプチドが1時間までに尿排出されたことによると思われる。

#### 【0252】

ペグ化ペプチドの初期の実験後、いくつかの変形したものを試験した。ファージディスプレイにより特定されたMMP-2のためのESPAYYTA切断配列は腫瘍への取り込みの改善をもたらさなかったが、肝臓への取り込みの増加につながった。PLGWAG配列も、uPAに対するXSGRSAX配列と同様に、腫瘍への取り込みの減少、および肝臓への取り込みの増加につながった。分子への全体的負電荷の付与が腫瘍を含む全器官からのより速い洗い流しの原因となった。チオルファンおよびアクチノニン等のメタロプロテアーゼおよびメタロペプチダーゼ阻害剤の事前注入は腎臓への取り込みを50%まで減少させ、これらの器官への取り込みが切断依存性であることを示唆している。これらの他の器官中でゼラチン切断実体の存在が酵素電気泳動像ゲルにより確認された。予期されたように、腫瘍取り込みもまた、阻害剤の注入で減少する。

#### 【0253】

アルブミン

次に、MMP切断可能選択的輸送分子およびその全d-アミノ酸対照ペプチドをアルブミン(正常な生理学的条件下で糸球体の濾液から排出されるタンパク質)と結合させた(



図 25)。ペプチドは HPLC で純粋であるように見えたが、ゲル電気泳動法では、50% もの cy5 が不純物に結合している可能性があることが示された。それでも、これらのペプチドを nNOS-/- バックグラウンド中のポリオーマウス専用として試験した。遺伝的背景は、その時点ですぐに入手可能であることを基準にして選択したが、後で nNOS-/- および野生型マウスからの腫瘍を酵素電気泳動像ゲルを使って比較したとき、腫瘍 MMP 活性化は大きく違わなかった。皮膚に対する腫瘍の最大コントラストは 36 時間付近であったが、動物を 4 ~ 6 nmol ペプチドを注入 48 時間後屠殺した。ペグ化ペプチドと同様に、アルブミンペプチドに対する較正も、最初は単純に肝臓および腎臓基準を使って行い、他のペプチドと比較を行うため、後で調整する必要があった。アルブミンは試験した中で良好なキャリアの 1 つであった；しかし、当時の化学合成プロセスでは、DOTA キレート剤にガドリニウムを挿入するのに加熱ステップが必要であった。アルブミンはタンパク質であるため、この加熱ステップはアルブミンを変性する可能性があり、T1 MRI 薬剤設計のためのその可能性を制約する。

#### 【0254】

##### デキストラン

次に、MMP 切断可能および全 d-アミノ酸対照ペプチドを 70 kD デキストランに結合し、野生型バックグラウンドの PyMT マウスで試験した。デキストラン合成を目指していくつかの試みを行ったが、精製を HPLC 保持時間のカットオフにより行った。電気泳動法で解析すると、合成が信頼できるものかどうか確かではなかった。典型的例としては、ゲルのトップ部にスミアがあるもの（紫の矢印）が、遊離ペプチドと同様にゲルの底部にスミアがあるもの（緑の矢印）および遊離ペプチドのおよそ 2 倍の大きさのスミアがあるもの（ピンクの矢印）があった。各合成物は、比率は異なるが同じ 3 つの成分を含んでいるように思われる。最良のマウス画像は、図 26 に示すように、高分子量種が多いバッチ由来のものであった。次のミドルターコイズ種が大部分であるインジウム標識バージョンはインビトロで MMP-9 によりうまく切断されず、低分子量種は遊離ペプチドに結合していないと思われる。表 3 の取り込み値は、PLGLAG および plglag の最初のバッチで得たものである。

#### 【0255】

##### ストレプトアビジン

3 つめの試験したキャリアはストレプトアビジンであった。このスキームでは、ビオチン化ペプチドが容易にストレプトアビジンに結合でき、その結果、構築物合成が大きく促進される。しかし、SUV 値は期待はずれで、注入液中での析出物は、ビオチン化選択的輸送分子の沈殿によると思われる極めて問題となるものであった。

#### 【0256】

##### 第 5 世代 PAMAM デンドリマー

高分子量キャリアシリーズの最後の分子として、1725 は 2 つの MMP 切断可能選択的輸送分子に結合した第 5 世代 PAMAM デンドリマーとした。残りの 126 結合部位はスクシニル基でキャップした。その前身物質の多くより純粋であるが、（遊離ペプチドを主要不純物としてゲル電気泳動法で 60%）、10 分未満のオーダーの第一相および 10 ~ 15 時間オーダーの第 2 相という 2 相性の血液中半減期を有するように見えた。トリシゲル電気泳動法で、72 時間までペプチドが腫瘍中に蓄積するように思われ（図 27）、その時点で腫瘍中に存在するほとんどのペプチドが切断されていることを示している。比較的合成が容易であることおよび有望なインビボで特性のため、第 5 世代 PAMAM- (e<sub>9</sub>-XPLGLAX-r<sub>9</sub>-k(cy5))<sub>2</sub>(succ)<sub>126</sub> を合成した。例によって、HPLC 分析は分子が純粋である事を示したが、ゲル電気泳動法は注入液中に遊離ペプチドの存在を示した。電気泳動的技術および塩濃度を使った試料をさらに精製する努力は成功しなかった。この分子を HT-1080 担腫瘍ヌード遺伝子導入 PyMT マウスに種々の濃度で注入した。SUV 値は低濃度で上昇したが、我々の分子検出能力は低下した。最良の使用濃度は、3 nmol 注入液または 1.5 nmol 注入液であるように見え、動物を 24 時間後に屠殺した。ゲル電気泳動法は、腫瘍と器官中のほとんどのペプチ

ドが切断され、どの器官にも出発物質が特定されないことを示した。

#### 【0257】

スクシニル化PAMAM dendrimer上の高速切断配列の試験

高速切断配列を使った効果を試験するために、スクシナートキャップを有する2つの dendrimerを合成した。1つ目は標準的MMP配列PLGLAXを利用し、2つ目には、P1部位でLをチエニルアラニン(ThA)残基で置換した類似の配列を含めた。この変形により、肝臓への取り込みが2倍に増え腫瘍への取り込みが2.5倍減少した。

#### 【0258】

ペグ化PAMAM dendrimerおよびその変異体の試験

別の実験で、PLGLAXを、PEG4キャップを有するPLGLAGおよびPLG-C(me)-AGと比較した。これらの分子はゲル電気泳動法で約90%の純度であった。PLGLAG配列の使用は、類似の肝臓への取り込みと同様に、PLGLAXに比べて腫瘍取り込み低下の原因であると思われる。ロイシンをメチルシステイン(MeC)の置換により肝臓への取り込みに2倍の減少が生じたが、腫瘍への取り込みはPLGLAXと同様であった。腫瘍の取り込みはPLGLAXおよびPLG-C(me)-AGの間で同じままであったが、肝臓への取り込みは2倍減少した。従って、PLG-C(me)-AGは、高分子量キャリアに対する使用に優れた基材であると見なされる(図28)。

#### 【0259】

T1-MRIを使ったデキストラン結合選択的輸送分子の試験

最後に、大用量注入時にキャリア結合選択的輸送分子がMRIで見ることが出来る十分な積荷を送達可能かどうかを試験するために、いくつかのバージョンのデキストラン結合ガドリニウム標識選択的輸送分子を合成した。DOTAキレート化基中にガドリニウムを挿入するために必要な加熱ステップに耐えることができる最大の取り込みが可能なキャリアであるという理由で、デキストランを選んだ。次に、これらの分子を動物に注入し、7T MRIスキャナを使って画像化した。エコー時定数を保持しておき、いくつかの緩和時間で画像を撮っていくつかの組織のT<sub>1</sub>値を算出した。腫瘍と筋肉平均のシグナルを腫瘍容量に対する強度を、Amiraソフトウェアを使って平均化することにより決定した。この手順を進めていて、我々は7Tでの水ファントムのT<sub>1</sub>値が、文献値の約3sに比べ、2.6±0.4s(n=21)であることを見出した。差は水の中のイオンの存在によると思われ、この水は2重に蒸留していないこと、および主に経時的な磁石の安定性を得るために使われていることから、このことはありうることである。スキャナは少し経時的な不整合があり、しばしば実験の途中でクラッシングしたので、毎日、水ファントムのT<sub>1</sub>値に対して腫瘍のT<sub>1</sub>値を正規化した。脂肪抑制画像から計算した強度値も同様に処理した。

#### 【0260】

4バッチのデキストラン共役体をMR画像化で試験し4つの異なる結果を得た。1つ目のバッチ(1746)は、かろうじて腫瘍に取り込まれたが、センチネルリンパ節には取り込まれたように見はえなかった。定量的には、48時間後の腫瘍中には、通常1nmol/gプローブ未満であったが、リンパ節中のプローブの存在が明らか(図29)であったため、各デキストランに結合した4選択的輸送分子を用いてプローブを再合成した。このペプチド(1810)を、マウスに注入し、3nmol/gの最大腫瘍取り込みを得た。このスキャナでは技術的に困難であることから、いずれの分子のT<sub>1</sub>値も取らなかった。前のペプチドと異なり、このペプチドは、また、インジウム111で放射標識を行った。3番目のデキストランベース光学的構築物(1921)をコントラスト剤注入の前後の両方で、T<sub>1</sub>で調査した。この分析で、腫瘍中のガドリニウムの存在は、T<sub>1</sub>強調画像上の腫瘍強度の増加および腫瘍T<sub>1</sub>の減少と相互に関係があるはずである。不幸にも、腫瘍中のガドリニウム取り込みは1nmol/g未満であり、腫瘍T<sub>1</sub>に何らかの変化があったにしても、ほとんど相互に関係づけられなかった。最後に、4つ目のデキストラン共役体を作製し、2024と名付けた。画像化データも集めず、腫瘍取り込みは、またしても約1nmol/gであったが、リンパ節取り込みは、検出限界の10nmol/gを超え

10

20

30

40

50

た。これは、我々の最初の観察をある程度検証したが、現段階では、低い腫瘍取り込み、および大きいパッチ間不整合のために、MR画像化用の候補としては、デキストランベースシュラブネルペプチドを放棄した。

【0261】

#### 実施例6：キャリアのキャッピング

この実施例は、キャッピング基の dendritic 分子の薬物動態学に与える効果を調査する。ここでは、いくつかの異なるキャッピング基を使ってキャッピングのマウス中の血漿中半減期、腫瘍取り込みおよび腫瘍浸透に与える効果を試験した。

【0262】

#### 動物

2つのタイプの動物をこれらの実験に使用した。(a) 注入時約5~7mmサイズのHT-1080異種移植組織を有する無胸腺のヌードマウスおよび(b) PyMTマウス。

【0263】

#### 血漿中半減期の測定

大凡の血漿中半減期を得るために、約10μLの血液を、30分、1時間、2時間および6時間の時点でヘパリン添加毛細管に集めた。血液をMaestroで画像化し、強度をImageJを使って計算した。自然対数を取って強度を線形化した。血漿中半減期 =  $0.693 / m$  ; 式中、mはラインの傾斜。

【0264】

#### 結果と考察

我々は、最初、アセチル、スクシニル、3-ヒドロキシプロピオニル、2-スルホベンゾイル、グリシジル、PEG-2、PEG-4、PEG-8およびPEG-12、を含む「純粋な」キャップを有する分子で試験した。HPLCを使って分子を精製し、純度をトリシゲル電気泳動法で確認した(図30)。動物への注入に際しては、プローブはいくつかのパターンのうちの1つに当てはまる挙動をした。3-ヒドロキシプロピオニル、2-スルホベンゾイル、およびグリシドール、を含む一部は、注入後最初の5分の間に血流から急速に除去された(図31)。これらの分子では、取り込みはほとんど肝臓であり、それらは、程度の差はあれ、次の48時間までに除去された。より少ないが、腎臓、唾液腺でも、限定的には腫瘍にも取り込まれている。

【0265】

2つ目のパターンは、スクシニルおよびアセチルキャップ化合物で観察された。これらの分子は十分小さいので、やはり腎臓から排泄される。生理的なpHで、スクシニルキャップ dendritic 分子は高度に負に帯電しており、動物中の血漿中半減期  $3.2 \pm 0.9$  時間を有する。注入後48時間で、関節、肝臓および腎臓での蓄積が大部分であった。対照的に、アセチルキャップ dendritic 分子は中性帯電で、より好ましい薬物動態学的特性を有し、平均血漿中半減期  $5.6 \pm 2.5$  時間であった。48時間では、アセチルキャップ dendritic 分子は、何らの組織特異的蓄積もなかった。スクシニルおよびアセチルキャップ dendritic 分子の排出は、一部は肝胆性であり、一部は腎性である。注入直後、24時間後および48時間後のこれら各 dendritic 分子の画像を図32に示す。

【0266】

3つめの取り込みパターンは、異なる長さのポリエチレングリコール成分でコートした dendritic 分子で生ずる。PEG-2およびPEG-4 dendritic 分子は、それぞれ血漿中半減期  $8.4 \pm 1.3$  時間および  $13.9 \pm 2.9$  時間で排出されるが、早い時点で、膀胱蛍光が少し観察されたので腎性排出は限られている可能性がある。PEG-8およびPEG-12コート dendritic 分子の血液半減期はそれぞれ  $13.9 \pm 2.9$  時間、 $11.6 \pm 1.6$  時間、および  $18.1 \pm 3.7$  時間であった。全てのこれら dendritic 分子は、スクシニルおよびアセチルキャップ分子よりもさらに固有性の大きい腫瘍標的指向化特性を有し、腫瘍中よりも肝臓中の標準化取り込み値が約2倍大きかった(表5)。このことは、画像から容易に見て取れ、腫瘍蓄積が時間と共に緩やかに増加した(図33)。

【0267】

10

20

30

40

50

【表 5】

	腫瘍 (HT- 1080) SUV	肝臓 SUV	腎臓 SUV	筋肉 SUV	血漿中 半減期(h) (N/P混合)
G4-PAMAM-PEG-8 <sub>128</sub>	0.4±0.2 (0.2-0.7) n=3	0.8±0.2 (0.6-1.0) n=3	0.4±0.0 (0.4-0.4) n=3	0.1±0.0 (0.1-0.1) n=3	9.9±1.2 (8.0-11.3) n=5
G5-PAMAM-アセチル <sub>128</sub>	0.8±0.5 (0.3-1.2) n=3	2.1±0.5 (0.8-2.7) n=3	1.7±0.7 (1.0-2.3) n=3	0.2±0.0 (0.2-0.3) n=3	5.6±2.5 (2.4-8.0) n=5
G5-PAMAM-スクシニル <sub>128</sub>	0.7±0.3 (0.4-0.9) n=3	7.8±2.0 (6.1- 10.0) n=3	0.4±0.2 (0.2-0.5) n=3	0.1±0.1 (0.1-0.2) n=3	3.2±0.9 (1.8-4.3) n=5
G5-PAMAM- ヒドロキシプロパニル <sub>128</sub>	NA	NA	NA	NA	<5m
G5-PAMAM-スルホベンゾイル <sub>128</sub>	NA	NA	NA	NA	<5m
G5-PAMAM-PEG-2 <sub>128</sub>	1.4±0.7 (0.7-2.1) n=3	4.0±0.4 (3.7-4.5) n=3	0.7±0.2 (0.8-0.9) n=3	0.4±0.1 (0.4-0.5) n=3	8.4±1.3 (7.0-10.2) n=4
G5-PAMAM-PEG-4 <sub>128</sub>	2.4±0.6 (1.9-3.1) n=3	4.1±0.3 (3.7-4.4) n=3	0.9±0.1 (0.8-0.9) n=3	0.4±0.1 (0.4-0.5) n=3	13.9±2.9 (11.3-17.9) n=4
G5-PAMAM-PEG-8 <sub>128</sub>	1.7±0.5 (1.4,2.2) n=2	3.8±1.1 (3.0,4.6) n=2	0.7±0.1 (0.6,0.8) n=2	0.5±0.2 (0.4,0.6) n=2	11.5±1.6 (10.2-13.3) n=3
G5-PAMAM-PEG-12 <sub>128</sub>	2.1±0.1 (2.0,2.1) n=2	4.6±1.4 (3.6,5.6) n=3	0.9±0.2 (0.7,1.0) n=3	0.4±0.1 (0.4,0.5) n=3	18.1±3.7 (15.8-22.4) n=3
G6-PAMAM-PEG-4 <sub>128</sub>	1.7±1.0 (1.0,2.4) n=2	1.7±0.0 (1.7,1.7) n=2	0.9±0.3 (1.2,0.7) n=2	0.2±0.1 (0.1,0.3) n=2	25.2±5.9 (19.6-33.5) n=4

## 【0268】

高分子量キャリアの2つ目の懸念は、腫瘍への浸透の欠如である。HT-1080異種移植組織で試験した全ての dendrimer の全体組織像で拡散した腫瘍浸透が観察され、このことがキャップ PAMAM dendrimer に関しては課題ではないことがわかった。他の器官は、異なるキャップで非常に特徴的な取り込みパターンを示した。例えば、アセチルコート dendrimer は、腎臓により取り込まれ、スクシナートコート dendrimer は肝臓、腎臓および脾臓により取り込まれ、また PEG コート dendrimer は、腫瘍を含む全ての器官への拡散性取り込みを示す(図34)。

## 【0269】

## 実施例7：選択的輸送分子の dendrimer ナノ粒子への結合

この実施例では、我々は、いくつかの選択的輸送分子を dendrimer に結合させることにより、インビボでプロテアーゼ活性を検知し標的化することができる標的化二重標識プローブを設計し、動物全身の光学的、MRI および組織像的手法の両方を使ってそれらのマウス中の浸潤性腫瘍を強調する能力を試験した。

## 【0270】

## 合成

簡単に述べれば、ペプチドをC末端システインと合成し、マレイミド結合を介して PAMAM dendrimer に結合した。ペプチドに結合後、およそ3つの cy5 分子または15~20のDOTAをアミド結合を介して dendrimer に結合させた。最後に、残っているアミノ基をPEG-4でキャップした。cy5のない構築物のために、ガドリニウムのキレート化をグリシン緩衝液(pH6)中、80℃で3時間行った。2重標識を有する構築物のために、ガドリニウムの冷温キレート化が必要であった(酢酸アンモニウム緩衝液、pH6一晚)。全ての3つのケースで、精製を10kD分画分子量の膜を通して遠心分離

により行った。cy 5 標識構築物のために、デンドリマーの濃度を化合物の合計重量により評価した。デンドリマーの濃度をCy 5 の吸光度と比較してデンドリマーに対するCy 5 の数を評価した。ガドリニウム標識構築物のために、また合成直後と注入時に、デンドリマーの濃度を重量により評価し、誘導結合高周波プラズマ質量分析法によりガドリニウムの濃度を評価した。可能なときはいつでも、トリシングル電気泳動法により別々に純度を評価し、100%に近いことがわかった。

#### 【0271】

##### 動物

HT-1080 腫瘍(3~8mm)含有ヌードマウスおよび遺伝子導入PyMTマウスを使用した。

#### 【0272】

##### 光学的画像化

動物に80mg/kgのケタミンと40mg/kgのミダゾラムで麻酔をかけた。1~3nmolの各プローブを静脈内に注入した。動物をMaestroスペクトルデコンボリューションイメージャー(700nm)で640/48励起フィルター(CRI、Boston、MA)を使って最初の注入後1時間まで、1sおよび3sで画像化した。画像化後、動物をケージに戻し、デルタフェーズパッドを使って暖めた。6時間、24時間および48時間で、動物に再麻酔をかけ画像化した。48時間後、動物を屠殺し、器官を採取し組織を凍結した。

#### 【0273】

##### 光学的標準化取り込み値

凍結組織を解凍し、蛍光誘導のない状況下で代表的30mg試料を切り出した。PyMT腫瘍のように異種起源であると思われる一部の腫瘍に対しては、2~3つのこのような30mg試料を別々に処理し平均化した。次に、各30mg組織切片を100μL SDS溶解緩衝液(1%SDS、20mMトリス緩衝液、pH7.6)に添加し、使い捨て乳棒を使って粉碎後、80℃で10分加熱した。次に、細胞溶解を確実にするため、試料を4秒間ずつ、2回レンジ加熱した。試料の均等の処置を確実にするため、管を10分遠心分離し、凍結して、凍結している間にMaestroスペクトルデコンボリューションイメージャーを使って画像化した。積算強度をImageJを使って計算した。デンドリマーあたりのcy 5 標識数の変動のため、各共役体別々に2点の較正を行った。標準試料として非注入動物由来の腫瘍、肝臓、腎臓および筋肉から30mg試料を切り出して調製し、それに100nMの最終濃度の注入ペプチドを注入して、前記のように処理した。共役体の1つからの濃度曲線に基づいて、濃度に対する信号の直線性を仮定した。標準化取り込み値(SUV)を(cy 5 nmol/30mg組織)/(合計注入nmol/合計動物重量)として定義した。

#### 【0274】

##### 蛍光組織像

HT1080およびPyMT腫瘍から20μm、およびPyMT転移から25μmの切片を切り出し、Zeiss Lumar解剖顕微鏡(露光時間5~15秒、ex620/60、em700/75)を使って調べた。インサイチュー酵素電気泳動用として、DQゼラチンをEMDから入手し、メーカーのインストラクションに従って処理した。標準のヘマトキシリンおよびエオシン手続きを使って連続切片を染色した。

#### 【0275】

##### MR画像化

動物に麻酔をかけ、光学的画像化で記載したように注入した。48時間で、動物をUCSDの7T磁石に入れ、イソフルオラン(3%初期量、1%維持用量)を使って麻酔をかけ、T1強調RARE(Tr=2595ms、Te=7.5ms、NEX=10、スライス厚さ0.3mm、収集マトリックス256x256)、T1強調MSME(Tr=498ms、Te=8ms、10NEX、スライス厚さ0.3mm、収集マトリックス128x256)およびTru-FISP(シングルショット、スライス厚さ0.5mm、Tr

10

20

30

40

50

= 3、 $T_e = 1.5 \text{ ms}$ 、4 NEX、収集マトリックス  $128 \times 128$  ) を使って画像化し、 $T_1$  値を得た。MR 画像化データを Paravision (Brucker) または Amira 4.1.1 (Mercury) を使って処理した。

#### 【0276】

##### ガドリニウム標準化取り込み値

48 時間の画像化実行後、動物を屠殺し、組織を取り出して凍結した。その後、これらを解凍、秤量、硝酸への溶解後、West Coast Analytical Services (Santa Fe Springs, California) へ送付し、ICP-MS を使ってガドリニウムの定量分析を行った。 $2 \mu\text{L}$  の注入液を同様に処理し、定量分析のため同所に送付した。標準化取り込み値 (SUV) を、(ガドリニウム  $\text{nmol}$  / 組織重量) / (合計注入  $\text{nmol}$  / 合計動物重量) と定義した。

10

#### 【0277】

デンドリマーナノ粒子に結合した選択的輸送分子は遊離選択的輸送分子より好ましい体内分布を有する

キャリア結合選択的輸送分子が腫瘍中で選択的に切断される能力を保持しているかどうかを判定するため、2つの構築物を合成し、HPLCと蛍光ゲル電気泳動法を使って純度を評価した。1つ目は、マレイミドリリンカーを介してペプチドC末端で切断可能なペプチドに結合したデンドリマーで、2つ目は、対照として使用する全d-アミノ酸ペプチドを有する類似の化合物である(図35a)。デンドリマーナノ粒子に結合し新しい選択的輸送分子をヌード異種移植動物に注入した場合は、皮膚蛍光が大幅に減少し、また関節取り込みがほとんど消滅し、胸郭に対する腫瘍の比率が劇的に増加して、ときには6倍にも達した(図35b~d)。さらに、蛍光は48時間も残存し、一方、その時間までにほとんどの遊離選択的輸送分子が洗い流された(図35d)。この新しい分子の血漿中半減期は、遊離ペプチドベースプローブの10分未満に対して、約9時間に増えた。定量分析およびd-アミノ酸対照ペプチドとの比較により、現れた約半分のシグナルは、血管透過性・滞留性亢進のみによることが示された(切断可能ペプチドの腫瘍SUVは $1.8 \pm 0.6$ 、 $n = 8$ であったのに対し切断不可能ペプチドでは $0.9 \pm 0.3$ 、 $n = 5$ であった)。対照的に、切断可能遊離ペプチド(suc-e<sub>8</sub>-OPLG-C(me)-AG-r<sub>9</sub>-c(cy5))の6時間目の腫瘍SUVはすでに $0.2 \pm 0.0$  ( $n = 3$ )まで低下していた(両方の場合とも、6時間後、 $p < 0.05$  (図35f))。

20

30

#### 【0278】

デンドリマーナノ粒子に結合した選択的輸送分子は自然発生乳癌モデル中の小領域の残存腫瘍に取り込まれる

我々は、次に、デンドリマーナノ粒子に結合した選択的輸送分子をPyMT乳癌モデルで試験した。HT-1080異種移植組織を有するヌード動物はうまくカプセル化された腫瘍を有していたが、さらに浸潤性の高いPyMTモデルにより、われわれのプローブが、腫瘍減量後筋肉に浸潤した残存腫瘍の小さい領域でも検出可能かどうかを判定する機会が得られた(図36a~c)。図36dは、胸筋筋肉のすぐ隣の $200 \mu\text{m}$ の残存腫瘍片の組織分析を示す。前の実験のように、ほとんどの取り込みは腫瘍と筋肉の間のストローマ界面で起きている。最終的には、我々は、標準的取り込み値を使って、取り込みの約33%は切断に起因し、残りの66%は血管透過性・滞留性亢進に起因することを示すことができた(切断可能プローブの $1.5 \pm 0.3$ 、 $n = 6$ に対し切断不可能プローブで $1.0 \pm 0.3$ 、 $n = 5$ 、 $p < 0.05$ ) (図36e)。MMP-2およびMMP-9の両方に対し1体のMMTV-PyMT同種接合ヌル動物により腫瘍標準化取り込み値0.9が得られ、MMP-2および-9が切断の原因である可能性があることを示している(データは示さず)。

40

#### 【0279】

デンドリマーナノ粒子に結合した選択的輸送分子は現在利用可能な光学的脱消光技術を改善する

我々の新規光学的プローブが現在使用されている技術を改善するかどうかを試験するた

50

めに、我々のデンドリマーナノ粒子に結合した選択的輸送分子の取り込みと、通常使用されている脱消光プローブ (ProSense、VisEn Medical) の取り込みと脱消光とを同じPyMT動物モデルで比較した。我々のプローブがより少ない肝臓蛍光を使ってより強力な全体シグナルを発することのみならず (図37a~c)、我々は、PyMTマウスにおいて統計的に有意な筋肉対腫瘍比の改善を示すこともできた (図37d)。さらに、肺の転移の画像化では、我々のプローブは小さい (< 200  $\mu$ m) 転移を容易に検出でき、約半分のシグナルは微小転移周辺の明るいマクロファージ由来であり、残りの半分のシグナルは微小転移それ自身由来であった (図37e~g)。対照的に、ProSenseは転移の中央部を主に染色し、端部をほとんど未染色のまま残し、さらに小さい転移をほとんど染色しなかった (図37h~j)。肺の定量結果を図37HとLに示す。ProSenseはカテプシンを標的にするため、我々は、細胞外のMMPを標的にする類似のプローブにも着目した。MMP検知に関する文献の結果を再現することは出来たが、露光時間がProSenseまたはデンドリマーナノ粒子に結合した選択的輸送分子よりも5倍長く、また、PyMTモデルで得られたコントラストはProSenseより質が悪いことがわかった (データは示さず)。

#### 【0280】

デンドリマーナノ粒子に結合した選択的輸送分子はT1 MRI用に十分な量のガドリニウムを腫瘍に送達できる

デンドリマーナノ粒子に結合した選択的輸送分子の理論的利点の1つは、異なるペイロード分子に結合する能力である。溶解度に関する潜在的懸念に対処するために、我々は、デンドリマーあたり15~30ガドリニウム分子のみを結合させ、より可溶性の高いポリエチレングリコール成分を加えた。PyMTマウスの大きく変動する腫瘍の問題に対処するため、HT-1080異種移植組織に切り替えた。一連のファントムを添加し、スキャン間の変動を抑えた。定量化のために、全強度を隣接水ファントムに対し正規化した。我々は、組織中に存在するガドリニウムによって、非注入対照に対しガドリニウム注入マウス由来腫瘍の強度の増加に相関があるT1の減少が認められることを期待した。実際、48時間で腫瘍のT1が22%低下し、強度が15%上昇した (図38a~d)。この結果は、誘導結合高周波プラズマ質量分析法を使って別に測定した腫瘍中の30~40  $\mu$ Mのガドリニウムの存在と合致した。対照的に、全d-アミノ酸陰性対照を注入した動物中のガドリニウム濃度は顕著に低かった (図38e、 $p < 0.05$ )。これらの変化は大きくはないが、シグナル強度の統計的に有意な増加とT1の減少およびガドリニウムの存在との相関により、この差は本当であり、前に仮定したようにプローブが腫瘍を標的化していることが確認される。

#### 【0281】

二重標識プローブは取り込みが腫瘍/ストローマ界面にある炎症のMMP産生領域に濃縮されていることを立証する

切断可能プローブを注入した動物のMRI画像の、時折発生するのであるが顕著な1つの特徴は、腫瘍周辺の明るいエッジの存在で、ときには隣の実質中へ潜り込んでいた。これらの明るいエッジが意味のあることなのかどうかを判断するために、ガドリニウムおよびcy5の両方を有する二重標識プローブを合成し、HT-1080担腫瘍動物に注入した。この動物をMRIと蛍光で画像化し (図39aとb)、屠殺後、小片の明るい領域を取り出し組織像用に凍結した。組織像では、2つのタイプの取り込みが存在することが明らかであった。予想されたように、腫瘍実質全体に拡散取り込みが起こった。しかし、腫瘍が筋肉に浸潤している領域での非常に明るいスポットの存在のために、MR上で認められるものに対する組織的相関の観点からは、この取り込みの多くは不明瞭である (図39c)。インサイチュー酵素電気泳動およびヘマトキシリンエオシン染色を使ってこれらの明るいスポットの原因を調査したが、予想したように、それらはMMP産生マクロファージの存在と相関関係があった (図39d~f)。よりうまくカプセル化され、浸潤性も少ない腫瘍中では、蛍光画像化およびT1強調MRIの両方を使って調べて、これらの明るいスポットはなかった。

10

20

30

40

50

## 【0282】

## 実施例8：腫瘍縁の可視化

この実施例では、選択的輸送分子を使って、手術の間にさらに客観的に可視化可能かどうかを調査する。我々は、選択的輸送分子の誘導のある場合と無い場合の手術に対する、外科床(surgical bed)での残存腫瘍細胞および無腫瘍生存を比較した。

## 【0283】

## 動物

HT1080ヒト線維肉腫細胞(ATCC)またはMDA-MB435ヒト黒色腫細胞を有する異種移植組織を使用した。8119マウス乳房腺癌細胞およびB16F10マウス黒色腫細胞を有する同種移植組織を実験室で作製した。 $1 \times 10^6$ 細胞(8119またはB16F10)を白子C57BL/6マウスの左脇腹に筋肉内注入した。腫瘍最大直径サイズが約1cmになるまで(約7~10日)、腫瘍同種移植組織をモニターした。

10

## 【0284】

## 蛍光光学画像化

蛍光光学画像化を、蛍光解剖顕微鏡(Lumar、Zeiss(GFP：露光時間0.5~1秒、ex470/40nm;em525/50nm;Cy5：露光時間0.5~1秒、ex620/60nm;em700/75nm))またはOV100小動物イメージングシステム(オリンパス(GFP：露光時間0.5~1秒、ex475/40;em530/50;Cy5：露光時間1.5~3秒、ex620/60nm;em700/75nm))で行った。

20

## 【0285】

## 蛍光取り込み

簡単に述べると、30mgの組織をホモジナイズし、SDS緩衝液中で加熱し、凍結後、蛍光で画像化した。SUUV値((mol/g組織)/(注入mol/動物重量))の蛍光実験値を同様に処理したペプチド注入組織から得た検量線と比較することにより測定した。

## 【0286】

## 生存手術

上記で詳述した8110細胞またはB16F10細胞を有する同種移植組織で生存手術を行った。動物に80mg/kgのケタミンと40mg/kgのダゾラムで麻酔をかけた。脱毛クリーム剤で毛を除去後、動物に準備処置をして、滅菌した布で包んだ。腫瘍上の皮膚切開後、皮膚弁を大きく展開後、収縮させた。白色光照明を用いて、解剖顕微鏡(Lumar、Zeiss)下で顕微手術器具を使用して腫瘍切除を行った。止血を手持ち型焼灼器(Accu-Temp、Medtronic)で行った。白色光照明で判断して、完全な腫瘍除去後、動物をCy5蛍光誘導治療群または分子誘導なしの標準手術治療群に無作為に割り付けた。選択的輸送分子誘導治療群に入っている動物に、Cy5標識 dendリマー選択的輸送分子(2nmol)を腫瘍切除開始48時間前に注入した。初期手術の間の偏りを除くために、手術外科医が動物が初期腫瘍除去後に受ける治療群に関し半盲検とした。このケースで半盲検は、手術外科医が、動物が後で受ける予定になっている治療群を特定しないように意識的努力をすることを意味する。しかし、尾部静脈注入により選択的輸送分子で動物を治療した人が腫瘍切除を行った人と同じ人であることが時折あったという理由で、個別の動物の視認特徴による動物の特定が避けられない場合もあった。

30

40

## 【0287】

白色光照明で判断して完全な腫瘍切除後、Cy5用励起および発光パラメーターを使って解剖範囲全体を評価した。蛍光シグナル像を隣接モニター上に表示し、全Cy5陽性の組織病巣を摘出した。蛍光誘導のある場合または無い場合の腫瘍除去が完了後、皮膚切開を断続的単純縫合で修復し(6-0絹、Ethicon)、動物をケージに戻し麻酔から回復させた。

## 【0288】

動物の腫瘍再発を週3回調べた。腫瘍再発のあるなしに拘わらず全動物を手術後6ヶ月

50



で屠殺した。

#### 【0289】

##### 残存腫瘍細胞の定量化

手術後の残存腫瘍細胞の定量化を前に詳述したように作製したHT1080の異種移植組織に対し行った。動物に80mg/kgのケタミンおよび40mg/kgのミダゾラムを使って麻酔をかけた。皮膚切開と収縮後、腫瘍を解剖顕微鏡(Zeiss、Lumar)を使った顕微手術の技術により除去した。

#### 【0290】

GFP、遊離選択的輸送分子(10nmol;手術前6時間)または dendritic 選択的輸送分子(2nmol;手術前48時間)を使った生存調査で前に詳述したように、腫瘍切除の蛍光誘導を行った。GFP誘導治療群の動物に対し、GFP用励起および発光パラメーターを使って解剖範囲全域にわたり手術野を評価した。蛍光シグナル像を隣接するモニター上に表示し、全GFP陽性の組織病巣を摘出した。選択的輸送分子治療群の動物の治療を上述の生存と同様に行った。腫瘍切除の完了後、全ての近接範囲に少なくとも5mmのマージンを持たせて残されている外科床を切除し、Alu配列を解析した。残されている外科床に対し残存腫瘍細胞のAlu PCR解析を行った。PCRアッセイは、検出可能に至るまでに必要なサイクル数を測定し、サイクル数はソースDNA量の対数に比例するので、残存腫瘍DNAを対数単位で表した。

#### 【0291】

##### 二重標識ACPPによる蛍光およびMR画像化

上述のように、HT1080異種移植組織を作製した。マウスの手術前MR画像化を行った。次に、マウスに麻酔をかけ、上述のように蛍光誘導下、腫瘍を取り出した。腫瘍除去完了後、マウスをMR画像化室に運び、手術後のMRスキャン像を得た。Amiraソフトウェア(Mercury、Carlsbad、CA)を使って腫瘍容量を手動で3次元的に定量化した。手術前および手術後の画像を使って腫瘍容量定量化を別の人による盲検方式で行った。

#### 【0292】

##### Cy5標識ACPPによる腫瘍画像化

選択的輸送分子が腫瘍および正常組織間で区別をつけて取り込まれるかどうかを試験するために、遺伝子導入マウス(ライン8119、MMTV-PyMT)中の自然発生乳腺癌由来の同種移植組織および免疫コンピテントマウス中に移植されたマウス黒色腫細胞株B16F10、ならびにヌードマウスに異種移植されたヒト癌細胞株(MDA-MB435黒色腫およびHT1080線維肉腫)、にCy5標識選択的輸送分子を静脈内注入して、切断不可能選択的輸送分子を除去するのに十分な時間後、画像化した。赤外領域近傍での組織による吸収が少ないことから、Cy5を標識マーカーとして選択した。我々は、単離選択的輸送分子ペプチド(遊離選択的輸送分子)およびPAMAM dendritic 選択的輸送分子ペプチド(dendritic 選択的輸送分子)の両方を試験した。正常組織または切断不可能ペプチドで治療したどちらの組織よりも多い状態で、全腫瘍がCy5標識遊離選択的輸送分子および dendritic 選択的輸送分子を保持していることがわかった。さらに、全腫瘍タイプで、正常組織に対する腫瘍の比率は、選択的輸送分子に比べ、 dendritic 選択的輸送分子の方が大きいことがわかった(表2)。

#### 【0293】

【表 2】

		遊離選択的輸送分子	デンドリマー選択的輸送分子
MDA-MB 435	腫瘍	0.17±0.05 (n=3)	1.065±0.55 (n=3)
	筋肉	0.29±0.068 (n=3)	0.238±0.007 (n=3)
	比率	2.45 (p=0.0004)	4.46 (p=0.031)
HT1080	腫瘍	0.42±0.08 (n=4)	1.8±0.6 (n=8)
	筋肉	0.11±0.08 (n=4)	0.21±0.07 (n=8)
	比率	3.82 (p=0.022)	8.6 (p=0.0009)
8119	腫瘍	0.39±0.12 (n=5)	2.191±0.743 (n=3)
	筋肉	0.11±0.06 (n=5)	0.166±0.023 (n=3)
	比率	3.5 (p=0.006)	13.2 (p=0.004)
B16F10	腫瘍	0.24±0.06 (n=4)	1.069±0.575 (n=3)
	筋肉	0.10±0.03 (n=3)	0.191±0.014 (n=3)
	比率	2.4 (p=0.014)	5.6 (p=0.028)

## 【0294】

選択的輸送分子は切除断端で腫瘍の輪郭を描く

正常および腫瘍組織間のマージンの輪郭を描く選択的輸送分子の能力を評価するために、腫瘍の外科的切除の前に、GFP形質移入細胞株MDA-MB435を異種移植したヌードマウスにCy5標識遊離選択的輸送分子を静脈内注入した。腫瘍がうまくカプセル化されている場合は、選択的輸送分子誘導のない標準的外科的技術で完全な腫瘍除去ができ（GFP蛍光および組織分析からも明らかのように）、選択的輸送分子誘導が外科的切除の有効性を改善しないことが明らかになった（データは示さず）。しかし、腫瘍が周辺の組織への浸潤性がある場合は、選択的輸送分子誘導により、白色光では明瞭でない（他の組織の下に埋もれている、または腫瘍の外観が周辺の正常組織とは容易には区別できないために）腫瘍の領域を可視化する能力がもたらされた。

## 【0295】

蛍光画像化誘導に対する遊離およびデンドリマー選択的輸送分子の比較

遊離選択的輸送分子とデンドリマー選択的輸送分子の蛍光画像化誘導に対する腫瘍切除手術の間の有用性を評価するために、どちらかのバージョンのCy5蛍光標識ペプチドをGFP形質移入MDA-MB435を異種移植したマウスに注入した。遊離選択的輸送分子およびデンドリマー選択的輸送分子のバックグラウンドに対するその腫瘍の目視蛍光コントラストおよびインビボ手術の間の使用し易さを比較した（各条件n=16）。遊離選択的輸送分子に比べて、デンドリマー選択的輸送分子のバックグラウンド蛍光に対する腫瘍のより高いコントラスト、および注入フルオロフォアの量で正規化したときの、デンドリマー選択的輸送分子のより強い絶対腫瘍蛍光が明らかになった。デンドリマー選択的輸送分子による治療で、皮膚と軟骨によるより少ない非特異的取り込みと共に、腫瘍によるより多い蛍光取り込みが生ずることが示された（表2）。我々は、癌細胞の存在に依存しないリンパ節ならびに脂肪組織への遊離およびデンドリマー選択的輸送両分子の限られた蛍光取り込みに言及しなかった。これは、これら両組織中に豊富に存在するマクロファージによる非特異的取り込みに起因すると思われる。

## 【0296】

Alu-PCRによる残存腫瘍脂肪の定量化

選択的輸送分子誘導による腫瘍切除の有効性を定量化するために、我々は、Alu-PCRを使い外科的切除後に腫瘍床中に残されている残存ヒト（癌）細胞数を測定した。ヒ

ト A l u 配列定量化により  $1 \times 10^6$  マウス細胞中の 1 つのヒト腫瘍細胞と等価物を検出することができることが示された。そのため、ヒト A l u P C R を使って腫瘍縁を感度良く検出可能である。標準的な方法で行った非誘導手術による残存腫瘍細胞数 ( $\log [DNA] = 4.63 \pm 0.82$ 、 $n = 10$ 、両側スチューデント t - 検定、 $p = 0.005$ ) に比べて、デンドリマー選択的輸送分子誘導による残存腫瘍細胞数 ( $\log [DNA] = 3.67 \pm 0.47$ 、 $n = 10$ ) が手術部位で 10 倍少なくなったこと (すなわち、残存癌細胞の 90% 減少) が明らかになった。対照的に、切除を誘導するために癌細胞に固有の G F P 蛍光を使った手術 ( $\log [DNA] = 4.0 \pm 1.4$ 、 $n = 7$ ) または遊離選択的輸送分子を使った手術 ( $\log [DNA] = 4.67 \pm 0.33$ 、 $n = 6$ ) では、標準的非誘導手術 ( $\log [DNA] = 4.63 \pm 0.82$ 、 $n = 10$ 、それぞれ、 $p = 0.26$  および  $0.91$ ) に比べて、有効性の改善が示されなかった。異種移植組織内の細胞が選択圧のために G F P 発現が損なわれ、そのため腫瘍床の G F P 蛍光調査中に一部の癌細胞が検出からはずれた可能性があり、結果的に不完全な腫瘍切除になったという仮説を立てている。さらに、G F P 蛍光は生きている動物中の組織とヘモグロビンにより吸収されるため、手術床の表面にない腫瘍は見逃される可能性がある。遊離選択的輸送分子誘導による癌除去有効性の改善の無いことは、腫瘍組織による少ない遊離選択的輸送分子取り込みを反映していると思われ、これにより、デンドリマー選択的輸送分子における腫瘍と隣接正常組織との間のコントラスト (4.46 倍) に比べ、遊離選択的輸送分子におけるコントラスト (2.45 倍) が低下した。この観察と整合性があるが、遊離選択的輸送分子誘導を使った場合と比べて、デンドリマー選択的輸送分子誘導によって残存腫瘍細胞が有意に減少している (両側スチューデント t - 検定、 $p = 0.0005$ )。

10

20

#### 【0297】

A C P P 誘導手術により得られた外科的試料の組織学的解析

多い蛍光取り込みと悪性細胞の存在の間の相関を定量化するため、我々は、個別 A C P P 誘導切除試料の組織学的解析を行った。デンドリマー選択的輸送分子プローブは、93.33% の特異性割合である (すなわち、H & E 組織学的解析により、デンドリマー選択的輸送分子誘導切除から得られた 15 試料中の 14 試料で癌細胞が認められた)。

#### 【0298】

デンドリマー選択的輸送分子誘導手術で、さらに小さい M R I 測定残存腫瘍容量が得られた

30

標準的比誘導手術に対するデンドリマー選択的輸送分子誘導手術後の残存腫瘍容量を比較するために、C y 5 およびガドリニウムキレートの両方を含むデンドリマー選択的輸送分子で治療した H T 1080 細胞を異種移植したマウスの M R 画像化を行った。腫瘍容量を蛍光選択的輸送分子誘導腫瘍切除の前後で M R 画像を使って盲検方式により定量化した。M R I スキャンの容量分析によると、標準的非誘導手術 ( $0.016 \pm 0.008 \text{ mm}^3$  ( $n = 2$ )) に比べて、C y 5 選択的輸送分子蛍光誘導による手術 ( $0.003 \pm 0.002 \text{ mm}^3$  ( $n = 2$ )) により約 5 倍の残存腫瘍減少がもたらされたことがわかった。この結果からは、標本数が小さいことが原因と思われる理由で統計的有意性は得られなかったが (片側スチューデント t - 検定、 $p = 0.08$ )、残存腫瘍細胞減少を示す A l u P C R 定量化による上記の結果と一致している。

40

#### 【0299】

選択的輸送分子誘導手術による無腫瘍生存の改善

手術が選択的輸送分子誘導によりなされた場合、腫瘍再発が影響を受けるかどうかを試験するために、C y 5 標識デンドリマー選択的輸送分子を、遺伝子導入マウス中の自然発生腫瘍 (ライン 8119、M M T V - P y M T) 由来、または黒色腫細胞株 (B 16 F 10) 由来の細胞を同種移植した免疫適格性マウスに注入した。腫瘍がうまくカプセル化されている場合は、選択的輸送分子誘導があっても無くても完全な腫瘍切除が行えるため、選択的輸送分子誘導では、何らのさらなる生存のための恩恵が得られなかった (データは示さず)。しかし、腫瘍が周辺の組織へ浸潤している場合には、デンドリマー選択的輸送分子誘導なしで腫瘍を摘出したマウスに比べ、デンドリマー選択的輸送分子誘導により腫

50

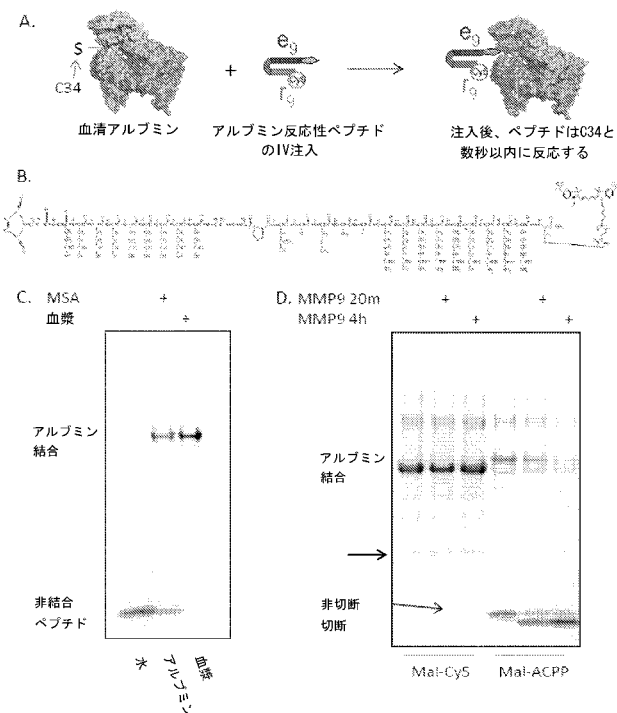
瘍を摘出したマウスでは、無腫瘍生存が改善されることが明らかになった。黒色腫細胞株 B 1 6 F 1 0 を同種移植したマウスでは、デンドリマー選択的輸送分子誘導手術により無腫瘍生存の 2 倍の改善が短期間でもたらされ（手術後 8 週後で 2 0 % に対する 4 0 % ）、また、長期間では 5 0 % の無腫瘍生存がもたらされた（ 2 4 週後で 2 2 % に対し 3 3 % 、ウィルコクソン検定、 $p = 0 . 0 5$  ）。遺伝子導入 8 1 1 9 乳癌細胞株で同種移植したマウスでは、標準的手術に比べて、デンドリマー選択的輸送分子誘導による手術により長期間（ 2 4 週 ）で 5 倍の無腫瘍生存改善が得られた（手術後 2 0 週で 1 0 % に比べ 5 0 % 、ウィルコクソン検定、 $p = 0 . 0 3$  ）。

#### 【 0 3 0 0 】

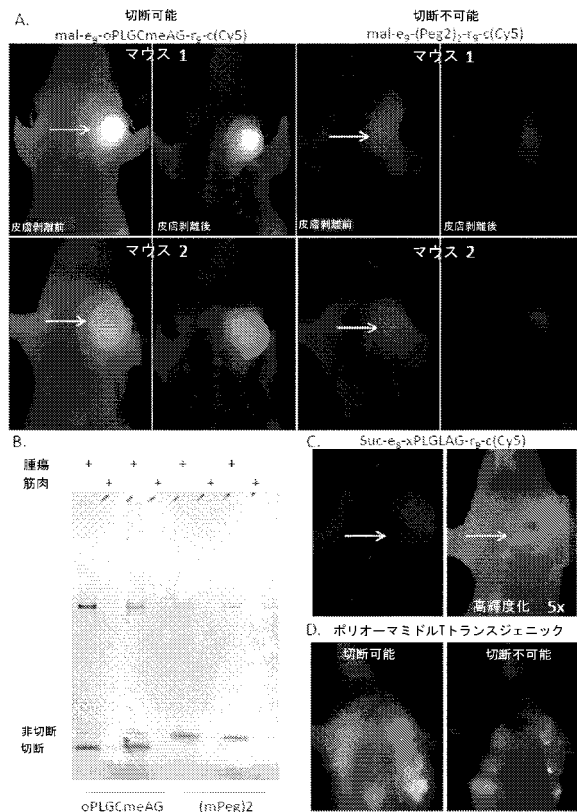
本明細書で本発明の好ましい実施形態を示し記載してきたが、このような実施形態が単に例としての目的のみで提供されていることは当業者には明らかであろう。当業者なら本発明から解離することなく多くの変化、改変、および置き換えを思いつくであろう。本発明の実施にあたって本明細書記載の本発明の実施形態に対する種々の選択枝を採用可能であることは理解されるべきである。添付の特許請求の範囲は本発明の範囲を定義し、また、それによりこの特許請求の範囲の範囲内の方法および構造ならびにその等価物を包含することが意図されている。

10

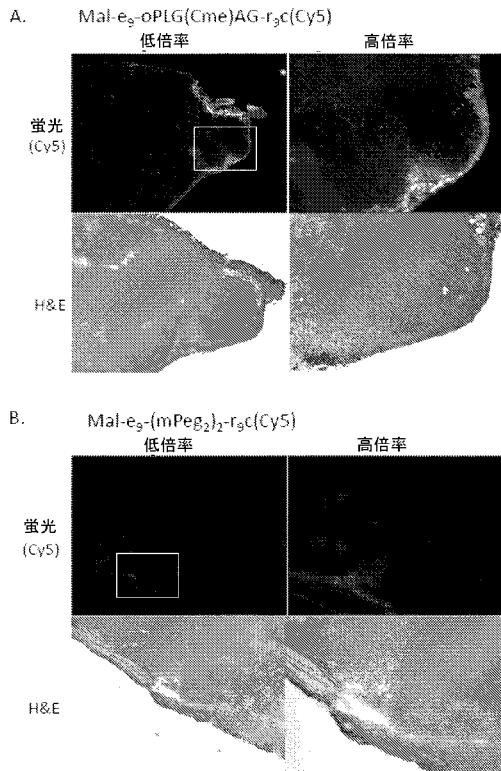
#### 【 図 1 】



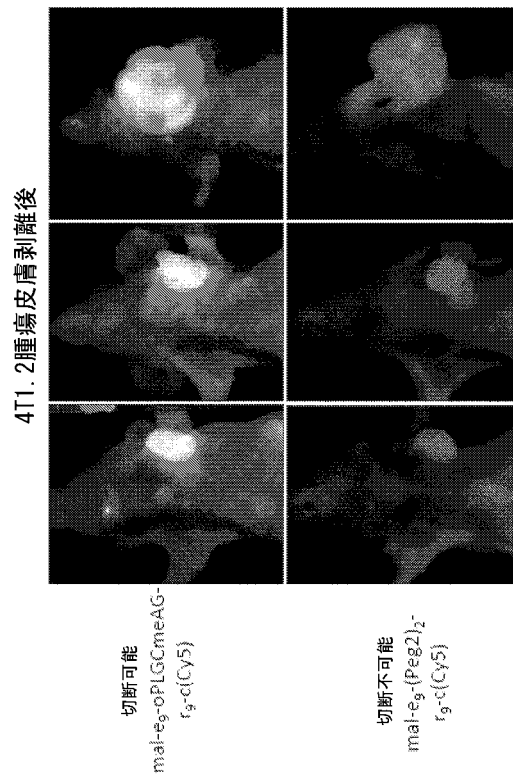
#### 【 図 2 】



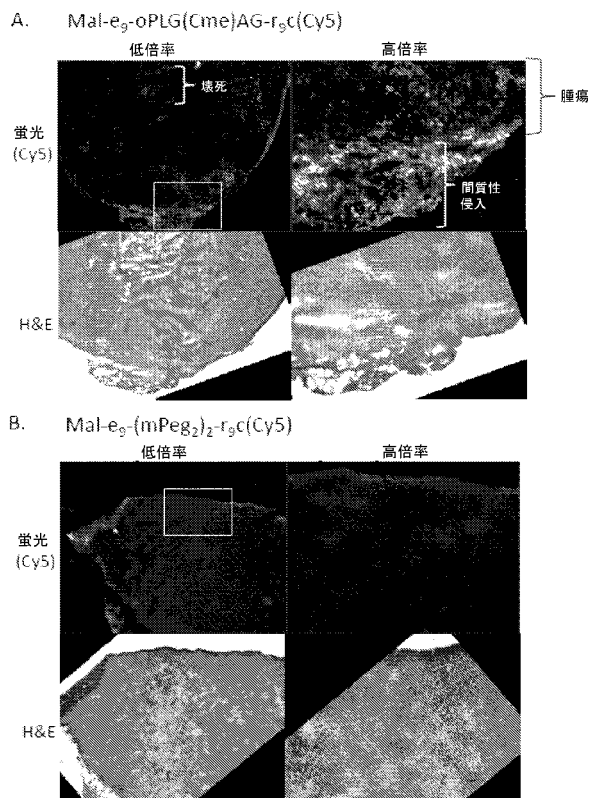
【 図 3 】



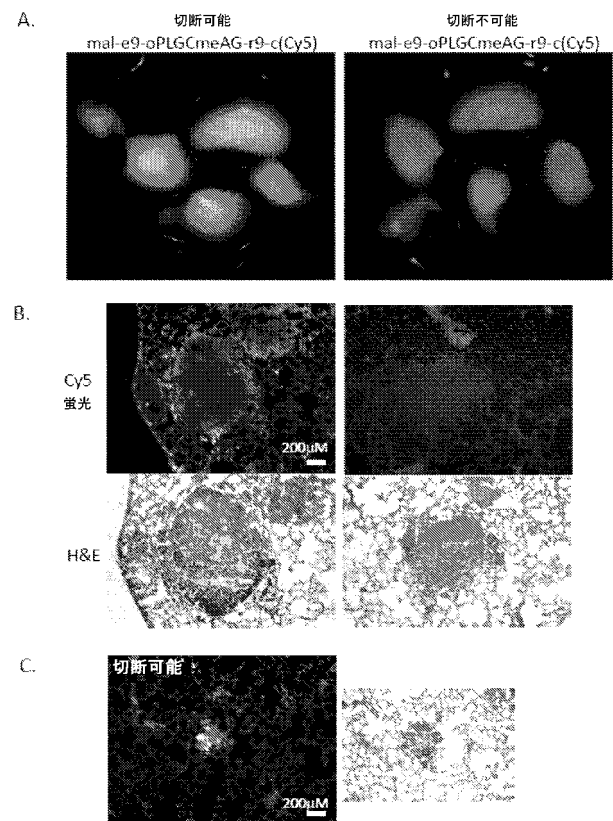
【 図 4 】



【 図 5 】



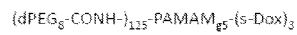
【 図 6 】



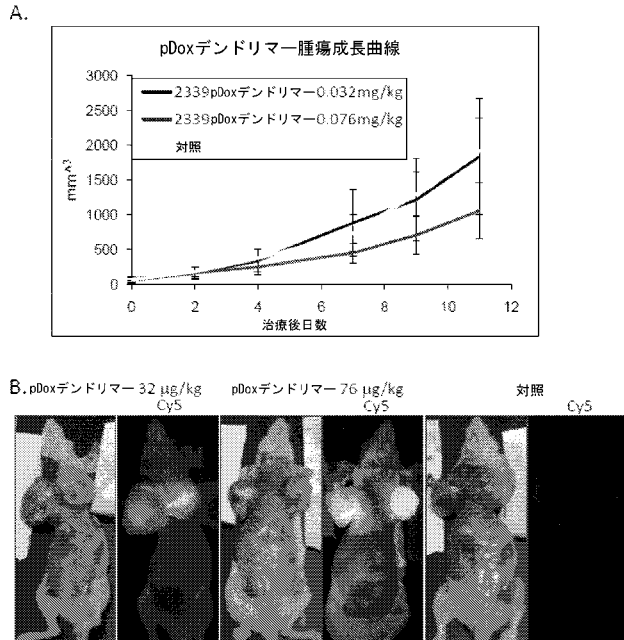


【 図 1 1 】

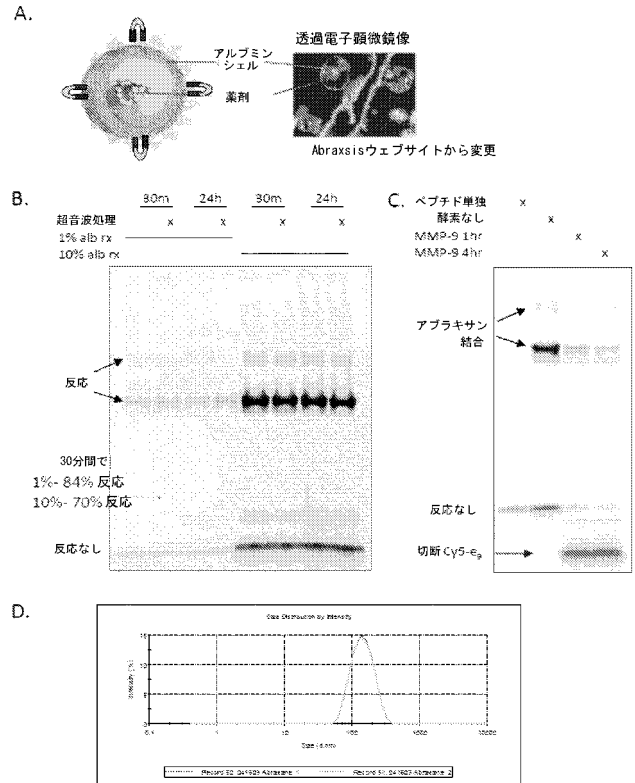
A. チオエーテル



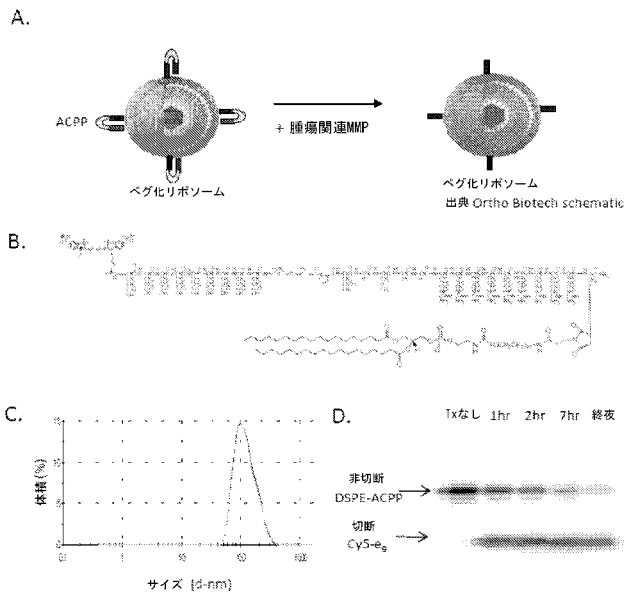
【図 15】



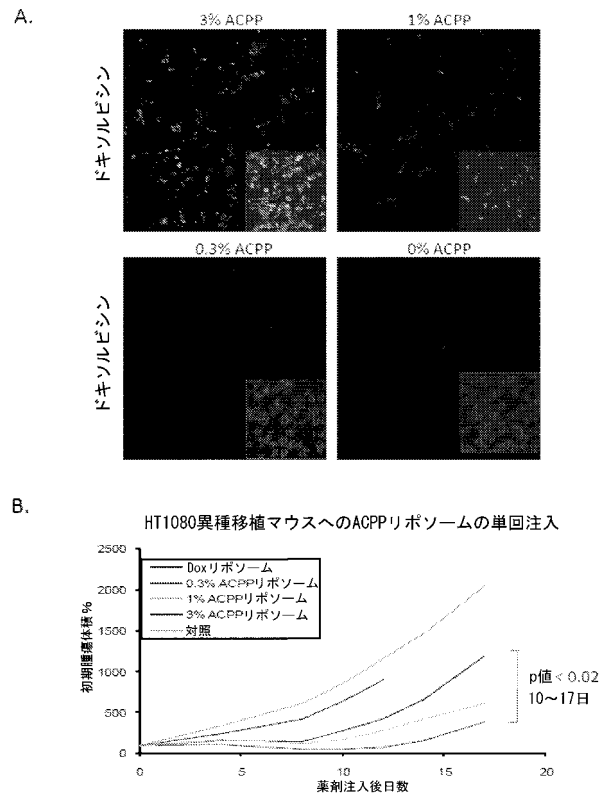
【図 16】



【図 17】

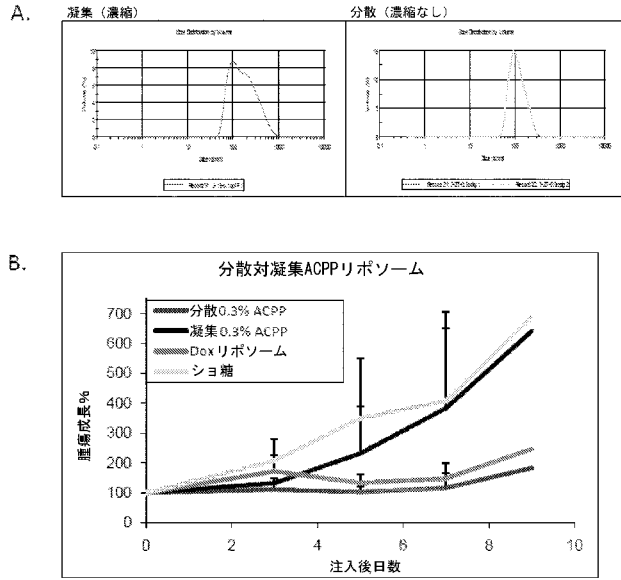


【図 18】

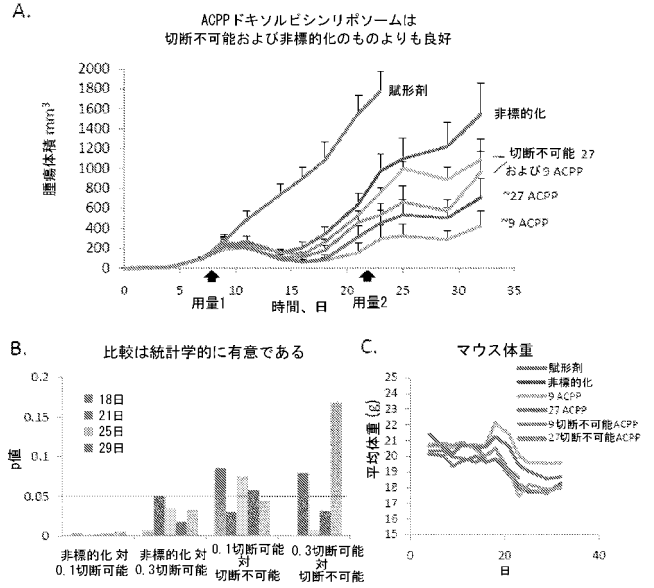




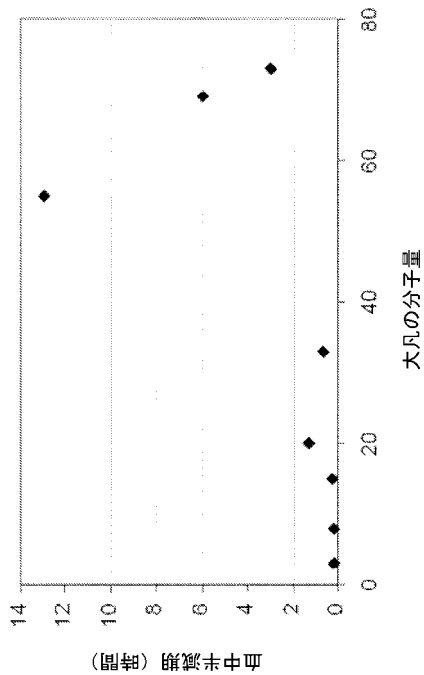
【図 19】



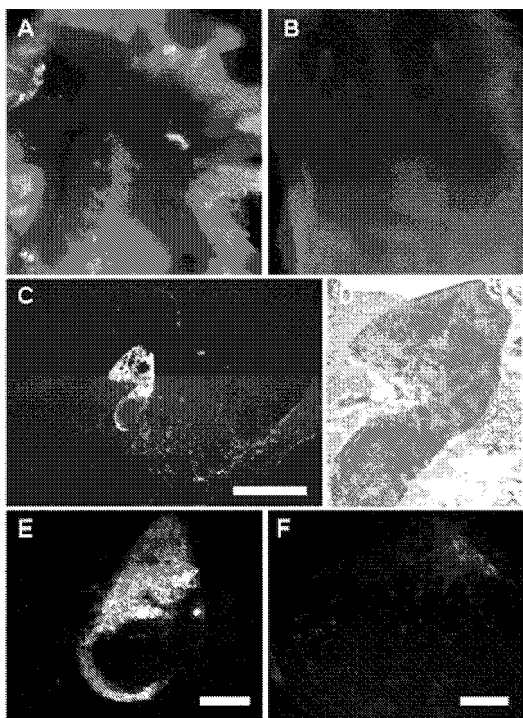
【図 20】



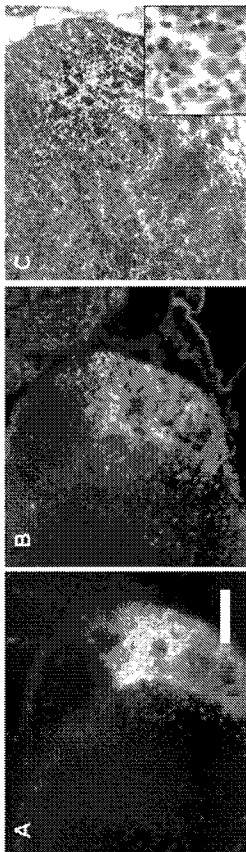
【図 21】



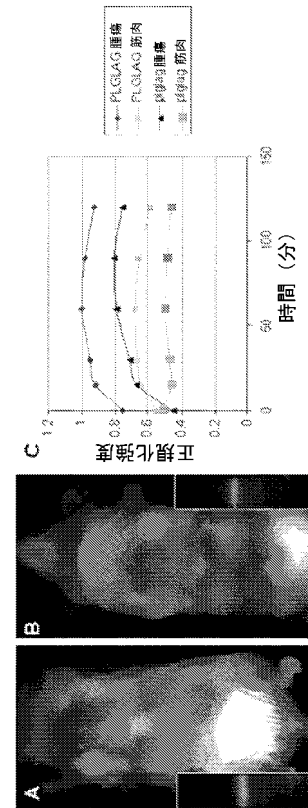
【図 22】



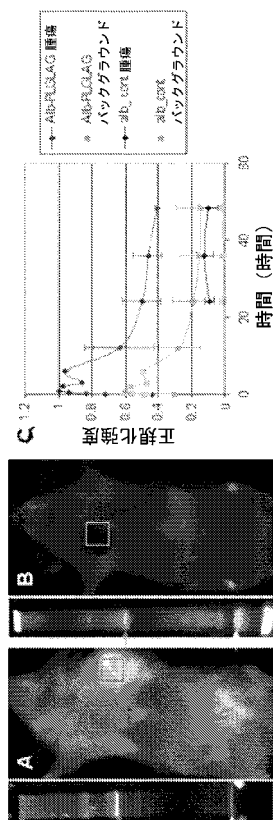
【図 2 3】



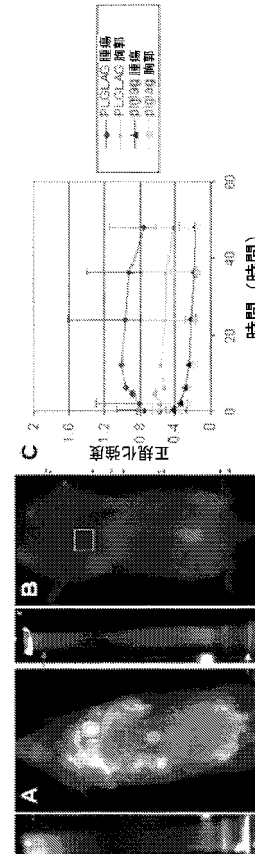
【図 2 4】



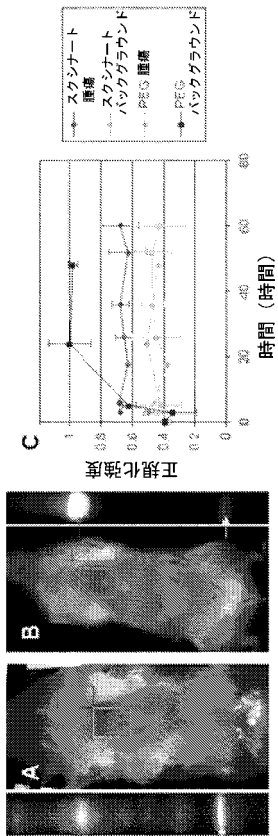
【図 2 5】



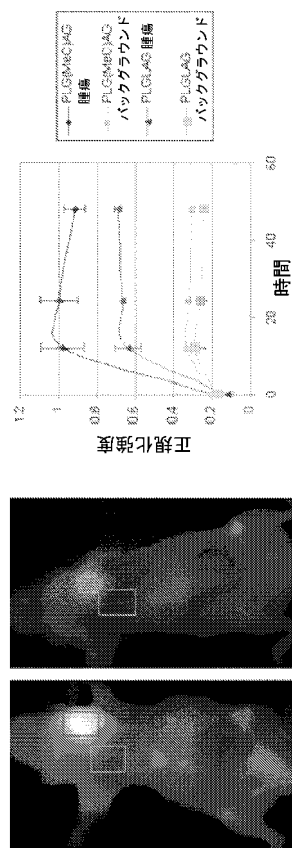
【図 2 6】



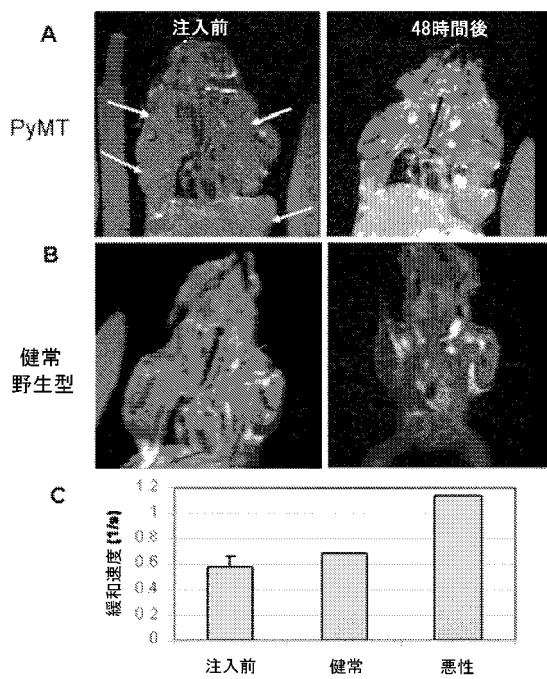
【図 27】



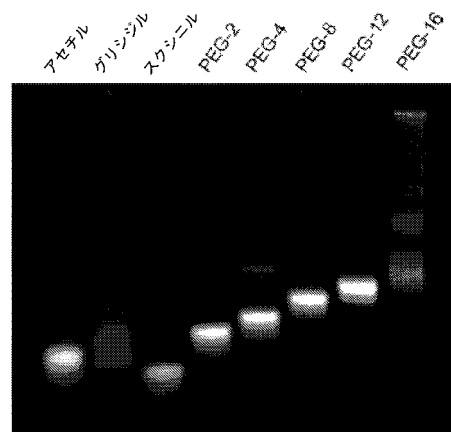
【図 28】



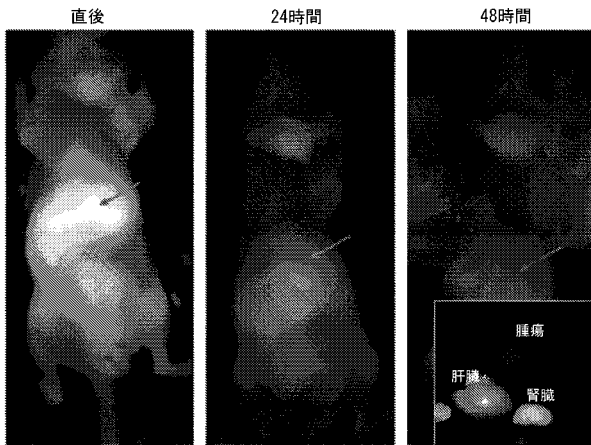
【図 29】



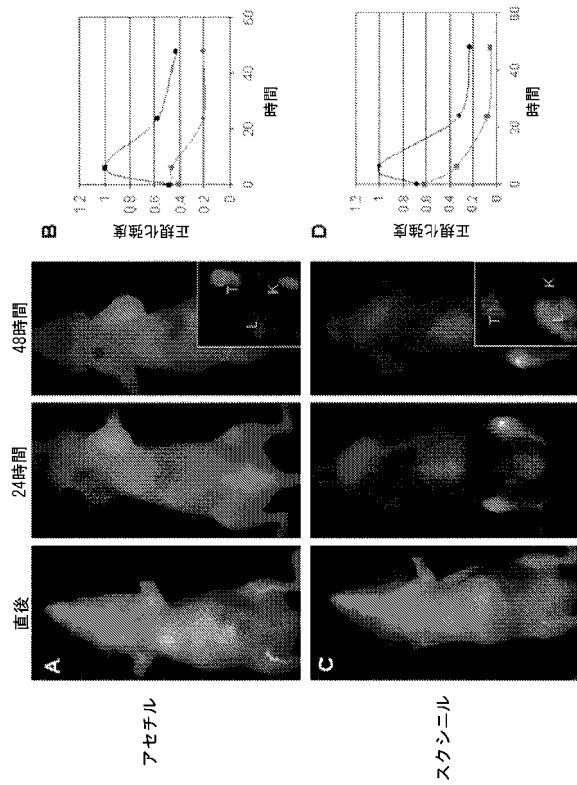
【図 30】



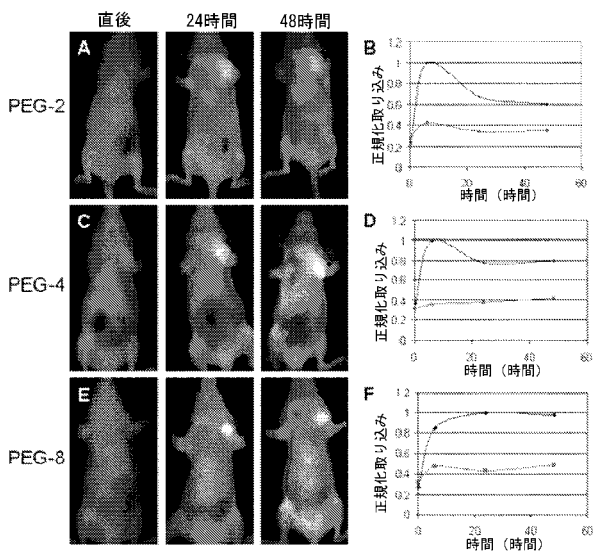
【図 3 1】



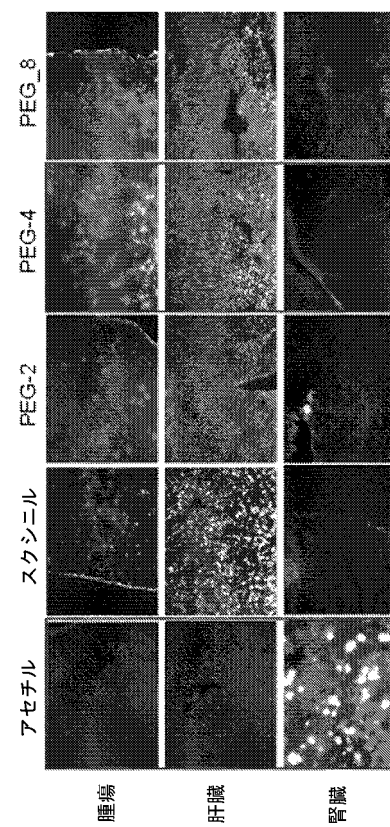
【図 3 2】



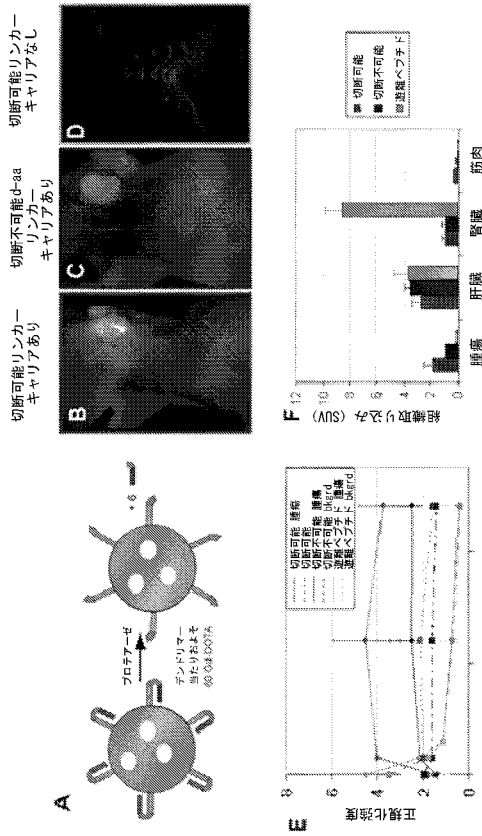
【図 3 3】



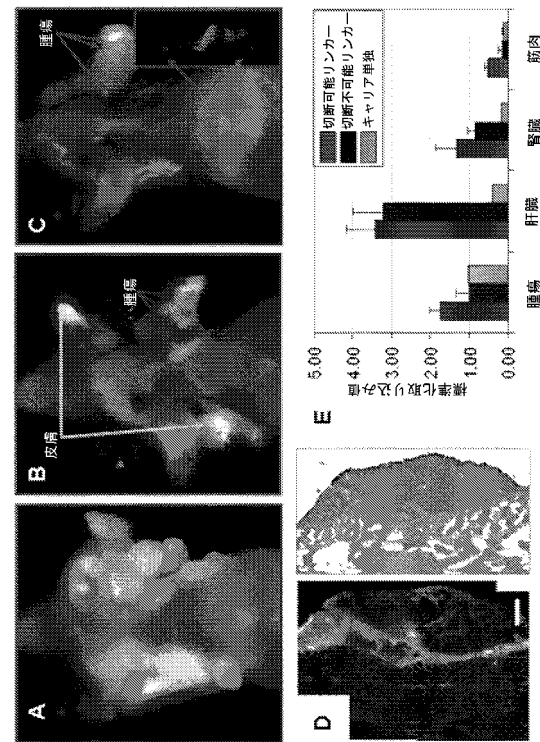
【図 3 4】



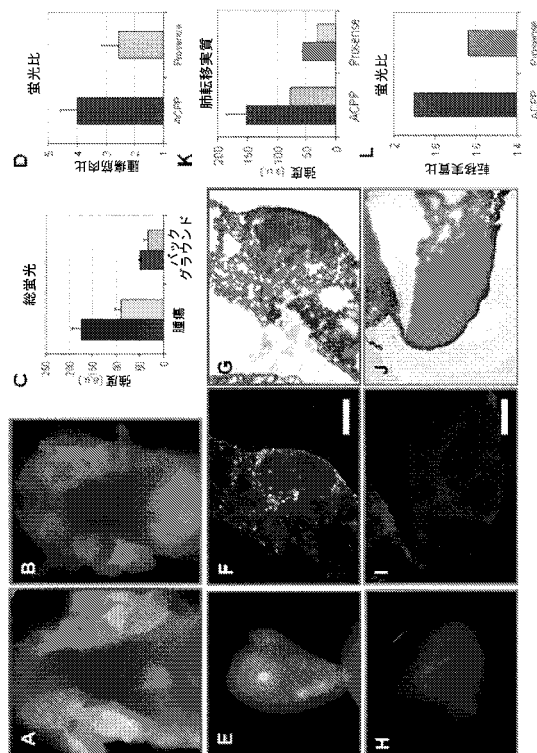
【図 3 5】



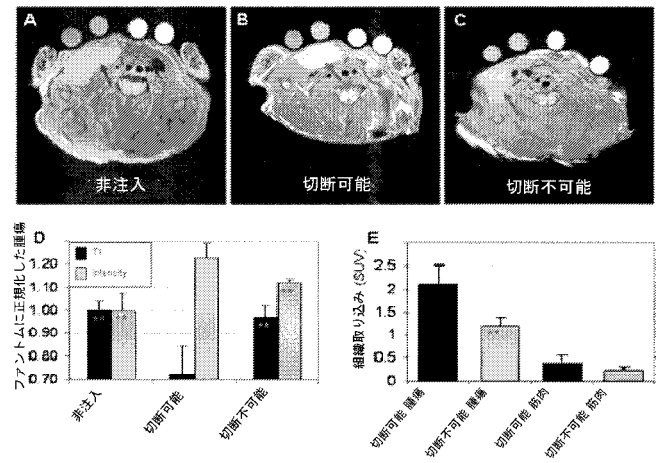
【図 3 6】



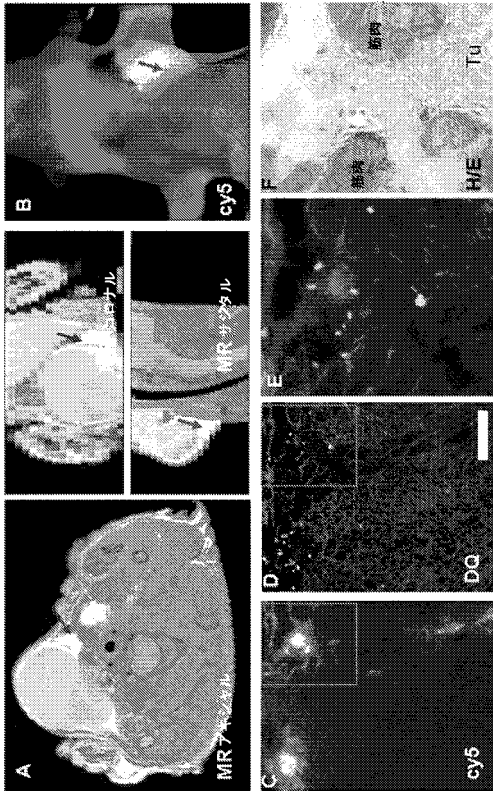
【図 3 7】



【図 3 8】





【図 39】



【図 40】



## 【 国際調査報告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. <b>PCT/US2010/042184</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>C07K 7/06(2006.01)i, C07K 7/08(2006.01)i, G01N 33/52(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, A61K 47/42(2006.01)i, A61K 49/00(2006.01)i</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K 7/06; A61K 49/00; A61K 51/00; C12N 15/86; C07K 16/46; C12Q 1/68; A61K 31/727; G01N 31/00; C08G 59/14; A61K 49/10		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: (A-X-B-C), peptide, dendrimer, dextran, PEG polymer		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2007-0041904 A1 (TAO JIANG et al.) 22 February 2007 See Abstract, paragraphs[0020], [0065], [0079], [0082], [0093], [0115]	1-70,72,74,76
A	US 2001-0021763 A1 (J. MILTON HARRIS) 13 September 2001 See Abstract, claim 13	1-70,72,74,76
A	US 2004-0241096 A1 (BOGDANOV ALEXEI et al.) 02 December 2004 See Abstract, claim 28	1-70,72,74,76
A	US 2009-0004118 A1 (NIE SHUMING et al.) 01 January 2009 See Abstract, claim 3	1-70,72,74,76
A	US 2004-0009122 A1 (JO KLAVERNESS et al.) 15 January 2004 See Abstract, claim 1	1-70,72,74,76
A	US 05910300A A (TOURNIER; HERVE et al.) 08 June 1999 See Abstract, claim 1	1-70,72,74,76
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 APRIL 2011 (25.04.2011)		Date of mailing of the international search report <b>26 APRIL 2011 (26.04.2011)</b>
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer PARK, Yeong-Gwan Telephone No. 82-42-481-8407 

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2010/042184

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

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

1. ☒ Claims Nos.: 71, 73 and 75  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 71, 73 and 75 pertain to methods for treatment or diagnosis of the human body by therapy, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

**Remark on Protest**

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



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/US2010/042184**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2007-0041904 A1	22.02.2007	AU 2006-247057 A1	23.11.2006
		CA 2543919 A1	12.05.2005
		CA 2611468 A1	23.11.2006
		EP 1691846 A1	23.08.2006
		EP 1896085 A1	12.03.2008
		JP 2007-511209 A	10.05.2007
		KR 10-2008-0015866 A	20.02.2008
		US 2005-0107583 A1	19.05.2005
		US 2006-0041105 A1	23.02.2006
		US 2007-041904 A1	22.02.2007
		US 7431915 B2	07.10.2008
		WO 2005-042034 A1	12.05.2005
		WO 2006-125134 A1	23.11.2006
US 2001-0021763 A1	13.09.2001	US 2003-0220447 A1	27.11.2003
		US 2005-0158273 A1	21.07.2005
		US 2005-0171328 A1	04.08.2005
		US 6214966 B1	10.04.2001
		US 6515100 B2	04.02.2003
		US 6864350 B2	08.03.2005
		US 7655747 B2	02.02.2010
US 2004-0241096 A1	02.12.2004	US 2002-0127629 A1	12.09.2002
		US 6737247 B2	18.05.2004
US 2009-0004118 A1	01.01.2009	AU 2005-294214 A1	20.04.2006
		CA 2583389 A1	20.04.2006
		CN 101438252 A	20.05.2009
		EP 1812864 A2	01.08.2007
		JP 2008-515915 A	15.05.2008
		WO 2006-042146 A2	20.04.2006
		WO 2006-042146 A3	20.04.2006
US 2004-0009122 A1	15.01.2004	AU 1997-47182 B2	17.05.2001
		AU 1997-47866 B2	17.05.2001
		CN 1234742 A0	10.11.1999
		CN 1238700 A0	15.12.1999
		EP 0946202 A2	13.08.2003
		EP 0946202 B1	10.09.2003
		EP 0963209 A2	15.12.1999
		EP 0963209 A2	31.05.2000
		EP 0971747 A2	19.01.2000
		EP 0971747 B1	28.12.2005
		EP 0973552 A2	26.01.2000
		EP 0973552 B1	01.03.2006
		EP 0977600 A2	09.02.2000
		EP 0977600 B1	30.06.2004
		EP 0991427 A2	12.04.2000
		EP 1007101 A2	14.06.2000

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/US2010/042184**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		EP 1007101 B1	17.05.2006
		EP 1442751 A1	04.08.2004
		EP 1442751 B1	20.06.2007
		JP 2001-502719 A	27.02.2001
		JP 2001-503407 A	13.03.2001
		JP 2001-511765 A	14.08.2001
		JP 2002-511845 A	16.04.2002
		JP 2002-515889 A	28.05.2002
		KR 10-2000-0052829 A	25.08.2000
		KR 10-2000-0052830 A	25.08.2000
		US 06051207A A	18.04.2000
		US 2001-0016587 A1	23.08.2001
		US 2002-0102217 A1	01.08.2002
		US 2002-102215 A1	01.08.2002
		US 2003-0228254 A1	11.12.2003
		US 2004-009122 A1	15.01.2004
		US 2004-0141922 A1	22.07.2004
		US 2005-0002865 A1	06.01.2005
		US 2005-0201930 A1	15.09.2005
		US 2007-0036722 A1	15.02.2007
		US 6261537 B1	17.07.2001
		US 6264914 B1	24.07.2001
		US 6264917 B1	24.07.2001
		US 6331289 B1	18.12.2001
		US 6524552 B2	25.02.2003
		US 6610269 B1	26.08.2003
		US 6680047 B2	20.01.2004
		US 6921525 B2	26.07.2005
		US 7182934 B2	27.02.2007
		US 7413727 B2	19.08.2008
		WO 98-18495 A2	07.05.1998
		WO 98-18496 A2	07.05.1998
		WO 98-18497 A2	07.05.1998
		WO 98-18498 A2	07.05.1998
		WO 98-18500 A2	07.05.1998
		WO 98-18501 A2	07.05.1998
		WO 98-47541 A1	29.10.1998
US 05910300A A	08.06.1999	EP 0800545 A1	14.03.2001
		EP 0800545 B1	18.06.2003
		EP 0800545 B2	02.03.2011
		JP 04-018141 B2	05.12.2007
		JP 10-512617 A	02.12.1998
		WO 97-16474 A1	09.05.1997

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード ( 参考 )
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/00	C
A 6 1 K 51/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/00	A
A 6 1 K 31/337 (2006.01)	A 6 1 K 49/02	A
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/02	C
	A 6 1 K 31/337	
	A 6 1 P 35/00	

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

(74)代理人 100142929  
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699  
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845  
弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889  
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 チェン ロジャー  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ラ ホヤ アイドル アワー レーン 2 6 6 5

(72)発明者 アギレラ トッド  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンディエゴ エルバート ウェイ 1 1 4 4 4

(72)発明者 オルソン エミリア  
アメリカ合衆国 ワシントン州 シアトル ボイルストン アベニュー 1 4 1 6 アパートメント 5 0 2

(72)発明者 ジャン タオ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンディエゴ ジンジャーウッド コート 1 0 6 3 7

(72)発明者 グエン クエン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 デルマール ルー セイント ラファエル 1 4 0 9 4

F ターム(参考) 4C076 AA12 AA13 AA16 AA17 AA22 BB13 BB15 BB16 CC27 CC41  
EE23 EE38 EE41 EE59 FF68  
4C084 AA17 MA05 MA17 MA21 MA22 MA23 MA63 MA65 MA66 ZB262  
ZC78

【要約の続き】

