

(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2016-516774

(P2016-516774A)

(43) 公表日 平成28年6月9日(2016.6.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	4 C 0 7 6
A 6 1 K 31/714 (2006.01)	A 6 1 K 31/714	4 C 0 8 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 6
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K 45/06	
A 6 1 K 41/00 (2006.01)	A 6 1 K 41/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 88 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2016-507609 (P2016-507609)	(71) 出願人	515252307
(86) (22) 出願日	平成26年4月8日 (2014.4.8)		ユニバーシティー オブ ノースキャロラ
(85) 翻訳文提出日	平成27年12月7日 (2015.12.7)		イナ アット チャペル ヒル
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/033337		UNIVERSITY OF NORTH
(87) 国際公開番号	W02014/168950		CAROLINA AT CHAPEL
(87) 国際公開日	平成26年10月16日 (2014.10.16)		HILL
(31) 優先権主張番号	61/809,695		アメリカ合衆国、ノースキャロライナ 2
(32) 優先日	平成25年4月8日 (2013.4.8)		7599-4105、チャペル ヒル、イ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ースト キャメロン アベニュー 222
			、バイナム ホール 308、シービー
			#4105
			222 E. Cameron Aven
			ue, 308 Bynum Hall,
			CB #4105, Chapel H
			ill, North Carolina
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 光応答性化合物

(57) 【要約】

本願に開示される主題は、光応答性化合物及びその使用方法を提供する。光応答性化合物は、光解離性分子と、当該光解離性分子に付加される蛍光体を含む。更に、本願に開示される主題は、赤血球を用いて光応答性化合物を送達する、疾患の治療のための薬剤送達システムに関する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

光解離性分子と、当該光解離性分子に付加される第 1 の活性剤とを含み、ここで、
前記第 1 の活性剤は、蛍光体を含み；

当該化合物が光に曝露されるとき、前記第 1 の活性剤と前記光解離性分子との少なくとも 1 つの結合が破壊される、化合物。

【請求項 2】

前記光解離性分子が、コバラミン又はその誘導体若しくは類縁体である請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

前記光解離性分子が、アルキルコバラミンである請求項 1 又は 2 に記載の化合物。

【請求項 4】

第 2 の活性剤を更に含む請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 つに記載の化合物。

【請求項 5】

前記第 2 の活性剤が、生物活性剤を含む請求項 4 に記載の化合物。

【請求項 6】

前記第 2 の活性剤が、第 2 の蛍光体を含む請求項 4 に記載の化合物。

【請求項 7】

前記第 2 の活性剤が、酵素、有機触媒、リボザイム、有機金属、タンパク質、糖タンパク質、ペプチド、ポリアミノ酸、抗体、核酸、ステロイド、抗生物質、抗ウイルス剤、抗真菌剤、抗がん剤、抗糖尿病剤、鎮痛剤、拒絶剤、免疫抑制剤、サイトカイン、炭水化物、撥油性物質、脂質、細胞外マトリクス、脱灰した骨基質、医薬、化学療法剤、細胞、ウイルス、ウイルスベクター及びプリオンから選択される請求項 4 に記載の化合物。

【請求項 8】

前記第 2 の活性剤が、抗関節リウマチ薬を含む請求項 4 に記載の化合物。

【請求項 9】

前記蛍光体が、コバラミンのコバルト中心及びコバラミンのリボース 5' -OH の少なくとも一方に付加されている請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 つに記載の化合物。

【請求項 10】

前記光解離性分子と前記第 1 の活性剤との間に配置されたリンカーを更に含む請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 つに記載の化合物。

【請求項 11】

前記リンカーが、アルキル、アリール、アミノ、チオエーテル、カルボキサミド、エステル、エーテル又はそれらの組合せを含む請求項 10 に記載の化合物。

【請求項 12】

前記リンカーが、プロピルアミン、エチレンジアミン若しくはそれらの組合せ又はそれらの誘導体を含む請求項 10 に記載の化合物。

【請求項 13】

前記光解離性分子と前記第 2 の活性剤との間に配置されたリンカーを更に含む請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 つに記載の化合物。

【請求項 14】

前記光が、約 500 nm ~ 約 1000 nm の波長を含む請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 つに記載の化合物。

【請求項 15】

前記光が、約 1000 nm ~ 約 1300 nm の波長を含む請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 つに記載の化合物。

【請求項 16】

医薬的に許容される担体を更に含む請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 つに記載の化合物。

【請求項 17】

請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 つに記載の化合物の有効量を対象の投与部位に投与するこ

10

20

30

40

50

と；及び

次いで前記投与部位を光に曝露すること
を含む疾患の治療方法。

【請求項 18】

前記光解離性分子が、コバラミンである請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

コバラミンが、アルキルコバラミンである請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記化合物が、第 2 の活性剤を更に含む請求項 17 に記載の方法。

【請求項 21】

前記第 2 の活性剤が、生物活性剤である請求項 17 に記載の方法。

【請求項 22】

前記第 2 の活性剤が、第 2 の蛍光体を含む請求項 17 に記載の方法。

【請求項 23】

前記第 2 の活性剤が、酵素、有機触媒、リボザイム、有機金属、タンパク質、糖タンパク質、ペプチド、ポリアミノ酸、抗体、核酸、ステロイド、抗生物質、抗ウイルス剤、抗真菌剤、抗がん剤、抗糖尿病剤、鎮痛剤、抗拒絶剤、免疫抑制剤、サイトカイン、炭水化物、撥油性物質、脂質、細胞外マトリクス、脱灰した骨基質、医薬、化学療法剤、細胞、ウイルス、ウイルスベクター及びプリオンから選択される請求項 17 に記載の方法。

【請求項 24】

前記蛍光体が、コバラミンのコバルト中心及びコバラミンのリボース 5' -OH の少なくとも一方に付加されている請求項 17 に記載の方法。

【請求項 25】

前記化合物が、前記コバラミンと前記第 1 の活性剤との間に配置されたリンカーを更に含む請求項 17 に記載の方法。

【請求項 26】

前記リンカーが、アルキル、アリール、アミノ、チオエーテル、カルボキサミド、エステル、エーテル又はそれらの組合せである請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記リンカーが、プロピルアミン、エチレンジアミン若しくはそれらの組合せ又はそれらの誘導体である請求項 25 に記載の方法。

【請求項 28】

前記光が、約 500 nm ~ 約 1000 nm の波長を含む請求項 17 に記載の方法。

【請求項 29】

前記光が、約 1000 nm ~ 約 1300 nm の波長を含む請求項 17 に記載の方法。

【請求項 30】

前記投与部位が、腫瘍自体、腫瘍内又は腫瘍近傍である請求項 17 に記載の方法。

【請求項 31】

前記疾患が、関節リウマチである請求項 17 に記載の方法。

【請求項 32】

前記疾患が、がんである請求項 17 に記載の方法。

【請求項 33】

前記疾患が、糖尿病である請求項 17 に記載の方法。

【請求項 34】

前記化合物が、経口投与、経皮投与、吸入、鼻内投与、局所投与、腔内投与、点眼、耳内投与、脳内投与、直腸投与、非経口投与、静脈内投与、動脈内投与、筋肉内投与、皮下投与及びそれらの組合せの少なくとも 1 つによって投与される請求項 17 ~ 33 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 35】

光解離性分子、生物活性剤及び脂質を含み、ここで、

10

20

30

40

50

前記生物活性剤及び前記脂質は、前記光解離性分子に付加されている、化合物。

【請求項 36】

前記光解離性分子に付加される蛍光体を更に含む請求項 35 に記載の化合物。

【請求項 37】

前記光解離性分子が、コバラミンである請求項 36 に記載の化合物。

【請求項 38】

少なくとも 1 つの膜層と請求項 35 に記載の化合物とを含み、ここで、

前記請求項 35 に記載の化合物は、前記少なくとも 1 つの膜層に組み込まれている、細胞の膜。

【請求項 39】

前記少なくとも 1 つの膜層に組み込まれている蛍光体を更に含む請求項 38 に記載の細胞の膜。

【請求項 40】

前記膜が、赤血球の膜である請求項 38 に記載の細胞の膜。

【請求項 41】

赤血球と、光解離性分子及び生物活性剤を含む第 1 の化合物と、脂質とを含み、ここで

、
前記生物活性剤及び前記脂質が、前記光解離性分子に付加されており、
前記化合物が、赤血球の細胞の膜に組み込まれている、薬剤送達システム。

【請求項 42】

前記化合物が、蛍光体を更に含む請求項 41 に記載の薬剤送達システム。

【請求項 43】

請求項 38 に記載の細胞の膜又は請求項 41 に記載の薬剤送達システムのいずれか 1 つを対象の投与部位に投与すること；及び

次いで前記対象を光に曝露すること
を含む疾患の治療方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本願は、2013年4月8日に提出された米国仮特許出願番号61/809,695（その開示全体が参照により本明細書に組み込まれる）の優先権を主張する。

【0002】

米国政府の権益

本願に開示される主題は、米国国立衛生研究所による助成第CA079954号の下、米国政府の支援でなされたものである。米国政府は、本願に開示される主題に関して一定の権利を有する。

【0003】

技術分野

本願に開示される主題は、光応答性(photo-responsive)化合物に関する。具体的には、
本願に開示される主題は、光応答性のコバラミン及びその使用方法に関する。

【背景技術】

【0004】

背景

光応答性化合物は、生化学的及び生物学的プロセスの時空的制御のための並外れて強力なツールとして注目されている。機序的には、光は、結合の開裂を媒介するために用いられ、結合の開裂により不活性な剤(化合物)から生物学的に活性な剤への変換が開始される(Lee, H. M.ら, 2009; Brieke, C.ら, 2012. Klan, P.ら, 2013)。光応答性試薬が細胞内の生化学的経路を操作するために用いられており、光感受性ナノ粒子が細胞毒性剤を部位選択的に送達するために用いられているが、光活性化に必要とされる波長が短い(<450

10

20

30

40

50

nm) ために、いずれもその可能性には限界がある。短波長は、生体に損傷を負わせ、特定の組織に吸収されない波長域(optical window of certain tissues)(例えば600~1300 nm)の恩恵を受けることができない(Tromberg, B. J.ら, 2000)。更に、現行の化合物の光分解のために利用可能な波長域の狭さが、異なった波長でオルソゴナルに活性化できる光応答性種のファミリーを設計する可能性を制限している(Goguen, B. N.ら, 2011; Hagen, V.ら, 2005; Kantevari, S.ら, 2010; Menge, C.ら, 2011; Priestman, M. A.ら, 2011)。

【0005】

1つの代替法として、現行の技術は、二光子技術の光を利用する。二光子の光によって活性化された物質は、長波長の可視/近赤外(IR)領域に十分に含まれる波長によって活性化されてきた。しかしながら、生物学的に有用な二光子吸収剤は利用可能ではない(Bort, G.ら, 2013)。更に、二光子の光は、生物学的な応用のために常に理想的であるというわけではない。それゆえ、改良された光応答性化合物のニーズが残されている。

10

【0006】

簡単な要約

この要約は、本願に開示される主題のいくつかの実施態様を記載し、多くの場合、これらの実施態様の変形及び置換を挙げている。この要約は、数々の様々な実施態様の例示に過ぎない。所与の実施態様についての1又はそれより多くの代表的特徴に関する言及も同様に例示である。このような実施態様は、典型的には、言及された特徴を伴っていてもよいし、伴っていなくてもよい；同様に、これらの特徴は、この要約に列挙されているか否かを問わず、本願に開示される主題のその他の実施態様に適用してもよい。冗長な繰り返しを避けるために、この要約は、特徴の可能な組合せの全てを列挙又は示唆することはしない。

20

【0007】

本願に開示される主題は、光解離性(photolabile)分子と、該光解離性分子に付加される第1の活性剤(agent)を含み、ここで、第1の活性剤は、蛍光体を含む、化合物を提供する。いくつかの実施態様において、第1の活性剤と光解離性分子との少なくとも1つの結合は、化合物が光に曝露されるとき、破壊され、及び/又は開裂する。

いくつかの実施態様において、化合物の光解離性分子はコバラミン又はその誘導体若しくは類縁体である。いくつかの実施態様において、光解離性分子は、アルキルコバラミンである。

30

いくつかの実施態様において、化合物は、第2の活性剤を含む。特定の実施態様において、第2の活性剤は、生物活性剤を含む。いくつかの実施態様において、第2の活性剤は、第2の蛍光体を含む。

いくつかの実施態様において、第2の活性剤は、酵素、有機触媒、リボザイム、有機金属、タンパク質、糖タンパク質、ペプチド、ポリアミノ酸、抗体、核酸、ステロイド、抗生物質、抗ウイルス剤、抗真菌剤、抗がん剤、抗糖尿病剤、鎮痛剤、抗拒絶剤(antirejection agent)、免疫抑制剤、サイトカイン、炭水化物、撥油性物質、脂質、細胞外マトリクス、脱灰した骨基質、医薬、化学療法剤、細胞、ウイルス、ウイルスベクター、プリオン及び/又はそれらの組合せから選択される。特定の実施態様において、第2の活性剤は、抗関節リウマチ薬である。

40

【0008】

本開示のいくつかの実施態様において、化合物の蛍光体は、コバラミンのコバルト及びコバラミンのリボース5'-OHの少なくとも一方に付加されている。

【0009】

更に、本開示のいくつかの実施態様においては、光解離性分子と第1の活性剤との間に配置されたリンカーが提供される。いくつかの実施態様において、リンカーは、アルキル、アリール、アミノ、チオエーテル、カルボキサミド、エステル、エーテル又はそれらの組合せを含む。更に、いくつかの実施態様において、リンカーは、プロピルアミン、エチレンジアミン若しくはそれらの組合せ又はそれらの誘導体を含む。

【0010】

50

いくつかの実施態様において、本開示は、光解離性分子と第2の活性剤との間に配置されたリンカーを提供する。

本願に開示される主題は、いくつかの実施態様において、約500 nm～約1000 nm波長を含む光を更に提供する。いくつかの実施態様において、光は、約1000 nm～約1300 nmの波長を含む。いくつかの実施態様において、光は、約500～約1300 nmの波長を含む。

【0011】

いくつかの実施態様において、本願に開示される化合物は、医薬的に許容される担体を更に含む。

更に、本開示のいくつかの実施態様において提供されるのは、疾患の治療方法である。方法は、本願の開示による化合物の有効量を対象の投与部位に投与する工程と、次いで投与部位を光に曝露する工程とを含む。いくつかの実施態様において、この方法は、光解離性分子としてコバラミンを含む化合物を投与することを含む。いくつかの実施態様において、コバラミンは、アルキルコバラミンである。

10

【0012】

いくつかの実施態様において更に提供されるのは、第2の活性剤を更に含む化合物を投与することを含む方法である。いくつかの実施態様において、第2の活性剤は、生物活性剤である。いくつかの実施態様において、第2の活性剤は、第2の蛍光体を含む。いくつかの実施態様において、第2の活性剤は、酵素、有機触媒、リボザイム、有機金属、タンパク質、糖タンパク質、ペプチド、ポリアミノ酸、抗体、核酸、ステロイド、抗生物質、抗ウイルス剤、抗真菌剤、抗がん剤、抗糖尿病剤、鎮痛剤、抗拒絶剤、免疫抑制剤、サイトカイン、炭水化物、撥油性物質、脂質、細胞外マトリクス、脱灰した骨基質、医薬、化学療法剤、細胞、ウイルス、ウイルスベクター、プリオン及び/又はそれらの組合せから選択される。

20

【0013】

いくつかの実施態様において、本願に開示される主題は、上記の方法において用いられる蛍光体が、コバラミンのコバルト中心若しくはコバラミンのリボース5'-OH又はそれらの組合せに付加されている態様を提供する。

更に、開示される方法のいくつかの実施態様において、化合物は、コバラミンと第1の活性剤との間に配置されたリンカーを含む。いくつかの実施態様において、リンカーは、アルキル、アリール、アミノ、チオエーテル、カルボキサミド、エステル、エーテル又はそれらの組合せを含む。いくつかの実施態様において、リンカーは、プロピルアミン、エチレンジアミン若しくはそれらの組合せ又はそれらの誘導体を含む。

30

【0014】

本開示の方法のいくつかの実施態様において、光は、約500 nm～約1000 nmの波長を含む。いくつかの実施態様において、光の波長は、約1000 nm～約1300 nmである。いくつかの実施態様において、光の波長は、約600 nm～約900 nmである。

【0015】

いくつかの実施態様において、本開示は、投与部位が腫瘍自体、腫瘍内又は腫瘍近傍である態様を提供する。いくつかの実施態様において、治療される疾患の非限定的な例は、関節リウマチ、がん及び糖尿病の少なくとも1つを含む。

40

【0016】

いくつかの実施態様において、本開示は、経口投与、経皮投与、吸入、鼻内投与、局所投与、腔内投与、点眼、耳内投与、脳内投与、直腸投与、非経口投与、静脈内投与、動脈内投与、筋肉内投与、皮下投与及びそれらの組合せによって、化合物を投与することを含む方法を提供する。

【0017】

いくつかの実施態様において更に提供されるのは、光解離性分子、生物活性剤及び脂質を含み、生物活性剤及び脂質が光解離性分子に付加される化合物である。いくつかの実施態様において、化合物は、光解離性分子に付加される蛍光体を更に含む。いくつかの実施態様において、光解離性分子は、コバラミンである。

50

【0018】

更に、本開示は、細胞の膜を提供する。細胞の膜は、少なくとも1つの膜層と、少なくとも1つの膜層に組み込まれた少なくとも1つの本開示による化合物とを含む。いくつかの実施態様において、細胞の膜は、少なくとも1つの膜層に組み込まれた蛍光体を更に含む。いくつかの実施態様において、細胞の膜は、赤血球の膜である。

【0019】

本願に開示される主題のいくつかの実施態様においては、薬剤送達システムが提供される。薬剤送達システムは、赤血球と、光解離性分子、生物活性剤及び/又は脂質を含む第1の化合物とを含み、生物活性剤及び脂質は光解離性分子に付加されている。いくつかの実施態様において、化合物は、赤血球細胞の膜に組み込まれている。いくつかの実施態様において、薬剤送達システムの化合物は、少なくとも1つの蛍光体を更に含む。

10

【0020】

本開示のいくつかの実施態様においては、疾患の治療方法が提供される。この方法は、本明細書に記載される化合物、細胞の膜及び薬剤送達システムのうちの少なくとも1つを対象の投与部位に投与すること；及び次いで対象及び/又は投与部位を、本明細書に記載される特定の波長を有する光に曝露することを含む。

【0021】

いくつかの実施態様において、本開示は、光解離性分子に付加される第1の活性剤を含む化合物を対象に投与することを含み、ここで、第1の活性剤と光解離性分子との間の少なくとも1つの結合は、化合物が第1の波長を有する光に曝露されるときに破壊され、更に、第1の活性剤と光解離性分子との間の少なくとも1つの更なる結合は、化合物が第2の波長を有する光に曝露されるときに破壊される、疾患の治療方法を提供する。開示される方法のいくつかの実施態様において、化合物は、蛍光体、酵素、有機触媒、リボザイム、有機金属、タンパク質、糖タンパク質、ペプチド、ポリアミノ酸、抗体、核酸、ステロイド、抗生物質、抗ウイルス剤、抗真菌剤、抗がん剤、抗糖尿病剤、鎮痛剤、拒絶剤、免疫抑制剤、サイトカイン、炭水化物、撥油性物質、脂質、細胞外マトリクス若しくはそれらの組合せ、脱灰した骨基質、医薬、化学療法剤、細胞、ウイルス、ウイルスベクター、プリオン及び/又はそれらの組合せから選択される第2の活性剤も含む。特定の実施態様において、第2の活性剤は、光解離性分子に付加されていてもよい。更に、いくつかの実施態様において、第2の活性剤と光解離性分子との間の少なくとも1つの結合は、化合物が第1の波長を含む光に曝露されるときに破壊され、及び/又は第2の活性剤と光解離性分子との少なくとも1つの結合は、化合物が第2の波長を含む光に曝露されるときに破壊される。開示される方法のいくつかの実施態様において、光は、約500 nm～約1300 nm；約500 nm～約1000 nm；及び/又は約1000 nm～約1300 nmの第1及び/又は第2の波長を含む。

20

30

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】光分解時間に応じたコバラミン-コンジュゲート画分(X_i)のグラフを表す。546 ± 10 nmバンドパスフィルターを用いたCbl-1 (10 µM、四角)及びCbl-2 (10 µM、円)の光分解(Xeフラッシュランプ)。

40

【図2】光分解波長に応じた混合物中コバラミン-コンジュゲートの光分解収量の観点から、4つのコバラミン-コンジュゲートの順次的かつ選択的な光分解を示す。順次的な照射[(a) 777 nm (b) 700 nm (c) 646 nm (d) 546 nm]は、それぞれCbl-5、Cbl-6、Cbl-3及びCbl-1を順次光分解する。

【図3】区画化収容のスキーム図を示す。Cbl-7のコバラミンは、ミトコンドリアを標的とする薬剤であるBODIPY(登録商標) 650をエンドソームに留めている(光分解前)。650 nmの照射は、Co-BODIPY(登録商標) 650リンカーを開裂させ、細胞毒性のBODIPY(登録商標) 650をエンドソームから逃がし(光分解後)、ミトコンドリアに蓄積する(光分解後)。

【図4】HeLa細胞において赤色光で誘導されたBODIPY(登録商標) 650の転移を示す。(a)は、光分解前のCbl-7を示す。(b)は、エンドソームマーカーであるローダミンB-デキスト

50

ランを示す。(c)は、(a)及び(b)の重合せを示す。(d)は、光分解後のCbl-7を示す。(e)は、ミトコンドリアマーカであるMitoTracker(登録商標) Greenを示す。(f)は、(d)及び(e)の重合せを示す。送信されたイメージに基づいて、(a)、(b)及び(c)においてHeLa細胞の外縁を示す。

【図5】アルキルコバラミン及びアルキルコバラミン-蛍光体コンジュゲートの構造を説明する。

【図6】コバラミン-TAMRAコンジュゲート(Cbl-1)の構造(スキームS1)を示す。

【図7】-(3-アセトアミドプロピル)コバラミン(Cbl-2)の合成(スキームS2)を説明する。

【図8】コバラミン-蛍光体コンジュゲート(Cbl-3、Cbl-4、Cbl-5、Cbl-6及びCbl-7)の一般的な合成(スキームS3)を説明する。

【図9】SulfoCy5(カルボン酸)及びBODIPY(登録商標) 650(カルボン酸)の構造(スキームS4)を示す。

【図10】補酵素B₁₂-TAMRAコンジュゲート(AdoCbl-1)の合成(スキームS5)を説明する。

【図11】補酵素B₁₂-蛍光体コンジュゲート(AdoCbl-2、AdoCbl-3及びAdoCbl-4)の一般的な合成(スキームS6)を説明する。

【図12】コバラミン-蛍光体コンジュゲート(Cbl-1、Cbl-3、Cbl-4、Cbl-5、Cbl-6及びCbl-7)の一般的な光分解(スキームS7)を説明する。

【図13】スキームS8を説明する。AdoCbl-蛍光体コンジュゲート(AdoCbl-1、AdoCbl-2、AdoCbl-3及びAdoCbl-4)の光分解により、ヒドロキシコバラミン-蛍光体(B_{12a}-蛍光体)コンジュゲート並びにアデノシン-1及びアデノシン-2が生じる。

【図14】Xeフラッシュランプを546 ± 10 nmで用いるMeCbl(10 µM、四角)からヒドロキシコバラミン(円)への光により誘導された変換を説明する。データは、3回の独立したアッセイの標準誤差を伴う平均として表す。

【図15】Xeフラッシュランプを546 ± 10 nmで用いるCbl-1(10 µM、四角)からヒドロキシコバラミン(円)への光により誘導された変換を説明するグラフである。データは、3回の独立したアッセイの標準誤差を伴う平均として表す。

【図16】Xeフラッシュランプを546 ± 10 nmで用いる-(3-アセトアミドプロピル)コバラミン(Cbl-2、10 µM、四角)からヒドロキシコバラミン(円)への光により誘導された変換を説明するグラフである。データは、3回の独立したアッセイの標準誤差を伴う平均として表す。

【図17】Xeフラッシュランプを646 ± 10 nmで用いるCbl-3(10 µM、四角)からヒドロキシコバラミン(円)への光により誘導された変換を説明するグラフである。データは、3回の独立したアッセイの標準誤差を伴う平均として表す。

【図18】Xeフラッシュランプを730 ± 10 nmで用いるCbl-4(10 µM、四角)からヒドロキシコバラミン(円)への光により誘導された変換を説明するグラフである。データは、3回の独立したアッセイの標準誤差を伴う平均として表す。

【図19】Xeフラッシュを780 ± 10 nmで用いるCbl-5(10 µM、四角)からヒドロキシコバラミン(円)への光により誘導された変換を説明するグラフである。データは、3回の独立したアッセイの標準誤差を伴う平均として表す。

【図20】分光蛍光計を用いての、546 nmにおける励起及び580 nmにおける蛍光発光のモニタリングによる、光分解されたCbl-1(1 µM)の蛍光増大を示すグラフである。データは、3回の独立したアッセイの平均として表す。

【図21】4つの異なる波長(546 nmで5分間、646 nmで5分間、727 nmで20分間及び777で10分間)にチューニングされた分光蛍光計を用いての、光分解されたCbl-1(1 µM)の蛍光増大を示す棒グラフである。データは3回の独立したアッセイの標準誤差を伴う平均として表す。

【図22】分光蛍光計を用いての、646 nmにおける励起及び662 nmにおける蛍光発光のモニタリングによる、光分解されたCbl-3(1 µM)の蛍光増大を示すグラフである。データは、3回の独立したアッセイの平均として表す。

10

20

30

40

50

【図 2 3】4つの異なる波長(546 nmで5分間、646 nmで5分間、727 nmで20分間及び777で10分間)にチューニングされた分光蛍光計を用いての、光分解されたCbl-3 (1 μ M)の蛍光増大を示す。データは、3回の独立したアッセイの標準誤差を伴う平均として表す。

【図 2 4】分光蛍光計を用いての、727 nmにおける励起及び752 nmにおける蛍光発光のモニタリングによる、光分解されたCbl-4 (1 μ M)の蛍光増大を示す。データは、3回の独立したアッセイの平均として表す。

【図 2 5】4つの異なる波長(546 nmで5分間、646 nmで5分間、727 nmで20分間及び777で10分間)にチューニングされた分光蛍光計を用いての、光分解されたCbl-4 (1 μ M)の蛍光増大を示す。データは、3回の独立したアッセイの標準誤差を伴う平均として表す。

【図 2 6】分光蛍光計を用いての、777 nmにおける励起及び794 nmにおける蛍光発光による、光分解されたCbl-5 (20 μ M)の蛍光増大を示す。データは、3回の独立したアッセイの平均として表す。

【図 2 7】4つの異なる波長(546 nmで5分間、646 nmで5分間、727 nmで20分間及び777で10分間)にチューニングされた分光蛍光計を用いての、光分解されたCbl-5 (20 μ M)の蛍光増大を示す。データは3回の独立したアッセイの標準誤差を伴う平均として表す。

【図 2 8】Cbl-1、Cbl-3、Cbl-4、Cbl-5及びCbl-6の吸収スペクトルを示す。

【図 2 9】分光蛍光計を用いての、700 nmにおける励起及び715 nmにおける蛍光発光のモニタリングによる光分解されたCbl-6 (1 μ M)の蛍光増大を示す。データは、3回の独立したアッセイの平均として表す。

【図 3 0】4つの異なる波長(546 nmで5分間、646 nmで5分間、710 nmで3分間及び777で10分間)にチューニングされた分光蛍光計を用いての、光分解されたCbl-6 (1 μ M)の蛍光増大を示す。データは、3回の独立したアッセイの標準誤差を伴う平均として表す。

【図 3 1】Cbl-5、Cbl-6、Cbl-3及びCbl-1 (それぞれ25 nM)の混合物の順次的な光分解を示す。波長[777 nmで3分間(Cbl-5)、700 nmで3分間(Cbl-6)、650 nmで3分間(Cbl-3)及び546 nmで3分間(Cbl-1)]への順次的な曝露に起因する蛍光増大と光分解コントロール溶液(546 nmで25分間)の蛍光増大とを比較することによって、光分解比を測定した。

【図 3 2】Xeフラッシュランプを546 \pm 10 nmで用いる、AdoCbl (10 μ M、四角)からヒドロキソコパラミン(円)への光によって誘導された変換を示す。データは、3回の独立したアッセイの標準誤差を伴う平均として表す。

【図 3 3】Xeフラッシュランプを546 \pm 10 nmで用いる、AdoCbl-1 (10 μ M、四角)からヒドロキソコパラミン-TAMRAコンジュゲート(円)への光によって誘導された変換を示す。データは、3回の独立したアッセイの標準誤差を伴う平均として表す。

【図 3 4】Xeフラッシュランプを546 \pm 10 nmで用いる、AdoCbl (10 μ M、円)及びAdoCbl-1 (10 μ M、四角)の光分解を示す。データは、3回の独立したアッセイの標準誤差を伴う平均として表す。

【図 3 5】分光蛍光計を用いての、646 nmにおける励起及び660 nmにおける蛍光発光のモニタリングによる、光分解されたCbl-7溶液(100 nM)の蛍光増大を示す。データは、3回の独立したアッセイの平均として表す。

【図 3 6】4つの異なる波長(546 nmで5分間、646 nmで5分間、727 nmで20分間及び777で10分間)にチューニングされた分光蛍光計を用いての、光分解されたCbl-7溶液(100 nM)の蛍光増大を示す。データは、3回の独立したアッセイの標準誤差を伴う平均として表す。

【図 3 7】650 nmにおける光分解時のHeLa細胞中におけるCbl-7の蛍光増大を示す。(a) 0分 (b) 5分 (c) 10分 (d) 15分。イメージング及び光分解は、Cy5フィルターキューブを備えたOlympus IX-81 widefield蛍光顕微鏡を用いて行った。

【図 3 8】Cy5フィルターキューブを用いてイメージングされた、Cbl-7を積んだHeLa細胞の蛍光増大を時間ごとに示す。

【図 3 9】暗中でのインキュベーション(5h)時に、HeLa細胞のCbl-7がエンドソームに保持されていることを示す。(a) Cbl-7 (500 nM; ex/em 650/665 nm) (b) エンドソームマーカーであるローダミンB-デキストラン (1 mg/mL; ex/em 570/590 nm) (c) (a)及び(b)の重合せ。Mander係数 = 0.81。

10

20

30

40

50

【図40】光応答性剤の3つの代表例を説明する：コフィリン(3)、光活性化されたプロテインキナーゼC (PKC)のセンサー(4)及び天然物であるボナスステロン(5)。

【図41】有機コバラミンの光分解を説明する。光感受性の補酵素 B_{12} (6;ここで、 $R = 5'$ -デオキシアデノシル又はH)において、 Co^{3+} -アルキル結合の溶血性の開裂を光によって誘導し、Cbl (Co^{+2}) 7及びアルキルラジカル8産物を最初に得ることを含む(スキーム1)。

【図42】付加される蛍光体の励起波長での光分解を受けたCbl-蛍光体の誘導体(TAMRAを含むものを含む)を説明する(546 nm, 9/10)。

【図43】コバラミンからの光放出された生物活性種の構造を説明する：Cbl-BODIPY(登録商標) 650 11、Cbl-cAMP 12及びCbl-ドキシソルピシン13。

【図44】Cbl-Cy5誘導体(左)及びCbl-Dylight (登録商標) 800誘導体(右)のそれぞれ646及び777 nmにおけるオルソゴナルな応答を説明する。

【図45】蛍光体で置換されたコンジュゲート(14)およびその光分解産物(15)の構造を示す。

【図46】メトトレキサート(16)及びデキサメタゾン(19)のCbl誘導体(17及び21)の波長依存的な光放出を説明する。いずれの薬剤も関節リウマチ(RA)治療に常用されている。16中強調されたカルボキシレートは活性に必須ではなく、この部位には様々な置換基(ペプチド、抗体及びポリマーを含む)がコンジュゲートされている(Majumdar 2012; Wang 2007; Everts 2002)。この議論に最も関連するのは、所期の光分解産物(18) ($X = H, OH$)に類似/同一の抗炎症性のN-アルキルカルボキサミドMTX誘導体の配置である(Heath 1986; Rosowsky 1986; Piper 1982; Rosowsky 1981; Szeto 1979)。DEX (19)は、その他の多くの短鎖アシル化Dex誘導体(例えば22)のように、皮膚/眼への浸透を促進するように設計されているか(Markovic 2012; Civiale 2004)、又はその水溶性の低さに起因して筋肉内デポ製剤として注入されるときに放出持続型として機能するように設計されている(Samtani 2005)アセテート(20) ($R = Me$)として医薬的にも利用可能である。

【図47】中性かつ水性の好氣的な条件下でメルカプタンを23に曝露することによるチオラト-Cbl (24)の合成を示す(スキーム2)。空気中における光分解は、 $Co(III)$ 種に酸化される $Co(II)$ -Cbl産物と、ジスルフィド又は酸化物に変換されるチルラジカルとを生じる(スキーム2) (Tahara, 2013)。

【図48】ビタミン B_{12} グルタチオン-Cbl (25)及びチオラト-Cbl N-アセチルCys 26の細胞内における主要形態の1つの構造を説明する。空気中における光分解は、 $Co(III)$ 種に酸化される $Co(II)$ -Cbl産物と、ジスルフィド又は酸化物に変換されるチルラジカルとを生じる(スキーム2)。

【図49】プロテインキナーゼの基質(28)のCbl-Cys類似体(30-33)の構造を説明する。

【図50】細胞膜上で保護的なタンパク質の覆いに隠れた、リピド化された光放出性生物活性剤(R)を示す。(a) 1つのアンカーを介して膜に結合した生物活性剤R及び(b) 2つのアンカーを介して膜に結合した2つのCysを含有する生物活性ペプチド。

【図51】RBC膜に包埋された/光放出性の誘導体(35)及び(36)の構造を説明する。

【図52】リジン誘導体(37)の構造を説明する。

【図53】内皮単層を横断しての白血球の移動(1-5)を説明するダイアグラムである。抗炎症剤は、CAMの発現、単球-ECの相互作用及び細胞の移動をブロックする。参考文献Muller 2008から抜粋。

【図54】RBC表面の(a)脂質-Cbl-スパーサー-GRGDSYを説明するダイアグラムである。(b) RGDペプチド及びインテグリン間の複数の相互作用に起因するRBC及びEC間の高い親和性は、単球が移動しようとするのをブロックする。

【図55】(a)内皮層に結合したRBCからの局在化した薬剤(黒色の点)の光放出は、(b)付着していないRBCからの薬剤の光放出よりも、内皮層及び下部チャンバ中のT細胞/滑膜細胞による薬剤の取込みを亢進することを説明する。

【図56】薬剤/蛍光体 B_{12} コンジュゲートの構造を示す。

【図57】蛍光体アンテナの構造を示す。

10

20

30

40

50

【図 5 8】膜アンカーの合成を示す。

【図 5 9】MTX- C_{18} - B_{12} の合成及び精製を示す。

【図 6 0】単官能化コバラミンの合成を示す。

【図 6 1】MTX B_{12} (Cbl-2)の合成を示す。

【図 6 2】デアセチルコルヒチンの合成を示す。

【図 6 3】コルヒチン- C_{18} - B_{12} (Cbl-3)の合成を示す。

【図 6 4】コルヒチン- B_{12} (Cbl-4)の合成を示す。

【図 6 5】デキサメタゾン- C_{18} - B_{12} (Cbl-5)の合成を示す。

【図 6 6】5-TAMRA- C_{18} - B_{12} (Cbl-6)の合成を示す。

【図 6 7】5-FAM- C_{18} - B_{12} (Cbl-7)の合成を示す。

【図 6 8】Cy5- C_{18} (FI-1)の合成を示す。Cy5- C_{18} (FI-1) (4)の合成。a) $Br(CH_2)_5CO_2H$, KI, CH_3CN b) CH_3I c) マロンアルデヒドジアニリド, AcOH, Ac_2O d) 2, ピリジン, AcOH e) DIC (N,N' -ジイソプロピルカルボジイミド), TEA, オクタデシルアミン, CH_2Cl_2 , Cy5, 以前に報告されたとおりに合成した(Kiyose, K.; Hanaoka, K.; Oushiki, D; Nakamura, T.; Kajimura, M.; Suematsu, M.; Nishimatsu, H.; Yamane, T.; Terai, T.; Hirata, Y.; 及び Nagano, T. JACS. 2010, 132, 15846-15848)。

【図 6 9】Cy7- C_{18} (FI-2)の合成を示す。Cy7- C_{18} (6)の合成。a) N-[5-(フェニルアミノ)-2,4-ペンタジエニリデン]アニリンモノヒドロクロリド, AcOH, Ac_2O , b) 7, AcOH, ピリジン c) DIC, TEA, オクタデシルアミン, CH_2Cl_2 。

【図 7 0】Dy800- C_{18} (FI-4)の合成を示す。Dy800- C_{18} (12)の合成。a) 3-メチルブタノン, AcOH; KOH, MeOH, PrOH b) (10): 1,3-プロパンスルтон, o-ジクロロベンゼン(11): $Br(CH_2)_5CO_2H$, o-ジクロロベンゼン c) 3-クロロ-2,4-トリメチレングルタコンジアニルヒドロクロリド, AcONa, EtOH d) 10 e) フェノキシナトリウム, DMF f) DIC, DIPEA, オクタデシルアミン, DMF。

【図 7 1】RBC膜から光開裂したCbl-6及びCbl-7を説明する。525 nm光を用いての、赤血球に結合したコバラミン(それぞれCbl-7及びCbl-6)からのフルオレセイン放出及びTAMRA放出。

【図 7 2】 C_{18} コンジュゲート蛍光体を用いると、近IR (NIR)におけるFAMの光開裂が増大することを説明する。FI-1 (650 nm)、FI-2 (700 nm)及びFI-3 (730 nm)を用いての(Cbl-7からの)フルオレセイン放出。赤血球には、1 μM のCbl-7及び5 μM の蛍光体- C_{18} を積めた。光分解は、上述した波長の光を用いて30分間行った。注目すべきことに、コバラミン(a k_a B_{12})単独は、最大約550 nmの光を吸収する；したがって、この波長を超える光を吸収するためには、アンテナ蛍光体の存在が必要である。

【図 7 3】650 nm光を用いる放出に最適な[Cbl-6]:[FI-1]比の測定に関するグラフを説明する。

【図 7 4】MTX標準曲線を説明する。

【図 7 5】赤血球の膜からのメトトレキサート(MTX)の光放出を説明する。525 nm光及び650 nm光を用いての、赤血球(RBC)からのMTXの経時的放出。各ペアの左のバーは5 μM FI-1及び1 μM Cbl-1の存在を示す。各ペアの右のバーはCbl-1のみを含む。FI-1は、650 nmにおける効率的な薬剤放出のために明らかに必須である。

【図 7 6】メトトレキサート(円)及び光分解されたメトトレキサート(三角)を用いてのDHFRの阻害を示すMTX DHFR阻害アッセイを説明する。

【図 7 7】コルヒチン標準曲線を説明する。

【図 7 8】コルヒチン- c_{18} - b_{12} (cbl-3) オクタノール/ h_2o の移動を説明する。(Cbl-3から)光分解されたコルヒチンは、オクタノールから水中へと拡散し、10分において光分解が最大になるまでその水中量が増大する。分子の疎水的な性質に起因して、平衡状態においては、開裂後であってもオクタノールに分配されがちであるが、開裂するまでは検出可能な水中への移動はない。

【図 7 9】HeLa細胞に対するコルヒチンの効果を説明する。コルヒチンは陽性対照として働く。コルヒチンを多く加えるにつれ、チューブリンネットワークは破壊される。

10

20

30

40

50

【図 8 0】cbI-3を積んだRBCを用いるHeLa細胞処理の効果を説明する。a) 光分解なしの、CbI-3を積んだRBCに曝露されたHeLa細胞。b) 525 nm光を20分間照射した、CbI-3を積んだRBCに曝露されたHeLa細胞。c) RBCも光への曝露もなしのHeLa細胞。d) RBCなしで20分間525 nmで光分解したHeLa細胞。

【図 8 1】デキサメタゾンを用いるHeLa細胞処理の効果を説明する。GR の分布に対するデキサメタゾンの効果。ステロイド受容体は、a) デキサメタゾンがないことに起因して、細胞質中に均一に分布する。b) では、250 nMのデキサメタゾン添加後に、受容体が核へ移動する。c) 500 nMのデキサメタゾンを用いる場合にも同じことが観察される。

【図 8 2】cbI-5を積んだRBCを用いるHeLa細胞処理の効果を説明する。これらはGR で染色されたHeLa細胞である。a) 光分解なしのCbI-5を積んだRBC。b) RBCなし及び光分解なし。c) 525 nm光に20分間曝露された、CbI-5を積んだRBC。d) RBCなしで20分間525光に曝露。

【図 8 3】cbI-5を積んだRBCを用いるHeLa細胞処理及び光分解前の除去の効果を説明する。CbI-5がRBC及び細胞培養物と平衡にあるか否かを決定するため、a) では、CbI-5を積んだRBCをHeLa細胞に曝露し、次いで光分解前に除去した。GR は影響を受けなかった。これは、光分解が起こるまで、デキサメタゾンがRBC上にあることを示している。b) CbI-5を積んだRBCに曝露され、次いで光分解せずに洗浄した細胞を含む。c) 光分解されたが、RBCに曝露されなかったHeLa細胞を含む。

【図 8 4】異なる波長での、cbI-5を積んだRBCを用いるHeLa細胞処理の結果を説明する。530及び780 nmで照射された、CbI-5を積んだRBCに曝露されたHeLa細胞。

【図 8 5】cbI-5及びfI-4 RBCを用いるHeLa細胞処理の結果を説明する。 C_{18} -デキサメタゾン- B_{12} /Dylight 800 RBCの780 nmにおける放出。

【図 8 6】溶血試験の結果を説明する。溶血は、親油性薬剤複合体のそれぞれについて異なる濃度で測定した。RBCは、それぞれの場合において、5 μ M以下の積込み濃度まで安定である。

【図 8 7】チャネル中に薬剤を含むメソ多孔性シリカナノ粒子及びコバラミンでキャップされたチャネルを含むメソ多孔性シリカナノ粒子を説明する。

【図 8 8】メソ多孔性シリカナノ粒子のチャネルをキャップする蛍光体-CbI構造体を説明する。

【図 8 9】コバラミンでキャップされたメソ多孔性シリカナノ粒子(FI-MSN)からのフルオレセイン放出を説明する。蛍光強度は、ブランクのバックグラウンドサンプルに対する比である。サンプルは暗中で保管(5 h)し、その後2つの時間単位(30分)に分けて光分解した(525 nm)。それぞれ光に曝露し、サンプルを混合した(2.5 h)。

【発明を実施するための形態】

【0023】

例示的な実施態様に関する詳細な説明

本願に開示される主題の1以上の実施態様の詳細を本明細書で説明する。本明細書に記載の実施態様の変更及びその他の実施態様は、本明細書に提供される情報に触れた当業者にとって明らかである。本明細書に提供される情報及び特に、記載された例示的な実施態様の具体的詳細は、主に明確な理解のために提供され、不必要な限定がそこから理解されてはならない。矛盾する場合には、定義を含めて、本明細書の記載が制する。

【0024】

各実施例は、本開示の説明のために提供され、それに限定するものではない。事実、本開示の教示に対して、本開示の範囲を逸脱することなく様々な変更及び変形が可能であることが当業者に明らかである。例えば、1つの実施態様の一部として説明又は記載された特徴を別の実施態様に適用して、更に別の実施態様とすることができる。

【0025】

本開示の単数形の特徴又は限定に関する全ての言及は、反対のことが記載されているか又は言及がなされた文脈によって反対のことが明確に示唆されていない限り、対応する複数形の特徴又は限定を含むものとし、その逆もまた然りとする。

【 0 0 2 6 】

本明細書で用いる方法又はプロセス工程の全ての組合せは、反対のことが記載されているか又は言及がなされた文脈によって反対のことが明確に示唆されていない限り、任意の順序で行ってもよい。

【 0 0 2 7 】

本開示の方法及び組成物(それらの構成要件を含む)は、本明細書に記載の実施態様の必須要素及び限定並びに本明細書に記載の更なる若しくは最適な構成要件又はその他有用なものを含むか、それらからなるか、又はそれらから本質的になっていてもよい。

【 0 0 2 8 】

本願に開示される主題は、光応答性化合物を含み、特に、特定の実施態様は、光応答性リガンドに付加されている、コバルトを含む化合物を含む。いくつかの実施態様において、本開示の化合物は、コバラミンを含む。いくつかの実施態様において、光応答性リガンドは、蛍光体である。

10

【 0 0 2 9 】

本開示の光応答性化合物が光に曝露されるとき、蛍光体とコバラミンとの少なくとも1つの結合が開裂する。本明細書で用いるように、用語「光開裂性」、「光放出性」、「光活性化」、「光応答性」等は、光曝露時に1以上の結合が破壊される化合物を記載するために互換可能に用いられる。

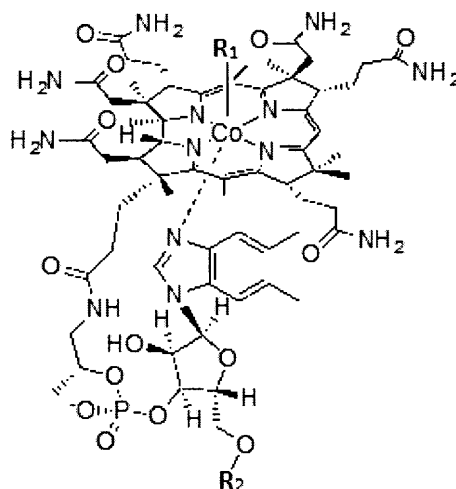
【 0 0 3 0 】

特定の実施態様において、本開示の化合物は、以下に示す式(I)：

20

【 化 1 】

(I)



30

(式中、R₁及びR₂は、互いに同一であってもよいが、又は異なってもよく、R₁及びR₂の少なくとも1つは、蛍光体、H及び/又はアルキルである)によって表される構造を含む。

40

【 0 0 3 1 】

特定の実施態様において、式(I)を含む化合物は、活性剤(例えば、細胞毒性種)、酵素インヒビター、酵素アクチベーター及び/又は生化学センサーを含むものとして記載することもできる。

更に、本願に開示される主題は、本明細書に記載される化合物の医薬的に許容される塩又は医薬的に許容される誘導体も含む。

上記のとおり、いくつかの実施態様において、本開示の化合物は、コバラミンを含む。いくつかの実施態様において、コバラミンは、置換されたコバラミンである。例えば、本開示のコバラミンは、アルキルコバラミン、例えばメチルコバラミンであり得る。いくつかの実施態様において、本開示の化合物は、置換されたコバロキシム、例えばアルキルコ

50

バロキシムを含む少なくとも1つのコバロキシムを含む。

【0032】

本明細書で用いるように、用語「置換された」は、有機化合物の許容される全ての置換基を含むことが意図される。広義には、許容される置換基は、有機化合物、ペプチド、脂質、オリゴヌクレオチド及びオリゴ糖の非環状及び環状の、分枝鎖状及び非分枝鎖状の、炭素環及びヘテロ環の、芳香族及び非芳香族の置換基を含む。置換基の例は、例えば本明細書に記載されるものを含む。許容される置換基は、適切な有機化合物について、1以上であってもよく、同一であってもよいし異なってもよい。本開示の目的のために、コバラミンは、アルキル置換基及び/又は本明細書に記載される有機化合物の許容される置換基(本実施態様の化合物の変形を誘導するものを含む)を含んでいてもよい。本開示は、如何なる形においても、有機化合物の許容される置換基によって限定されることを意図しない。

10

【0033】

アルキル置換基に関して、用語「アルキル」は、一般式 C_nH_{2n+1} (式中、 n は、約1~約18又はそれ以上である)のアルキル基をいう。この基は、直鎖状であってもよいし、分枝鎖状であってもよい。アルキルは、本明細書で用いるとき、「低級アルキル」も含み、これは一般式 C_nH_{2n+1} (式中、 n は、約1~約6である)のアルキル基をいう。いくつかの実施態様において、 n は、約1~約3である。例としては、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、 n -ブチル、 sec -ブチル、 t -ブチル、イソブチル、 n -ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、 n -ヘキシル等を含む。本明細書を通じて、「アルキル」は、非置換アルキル基及び置換されたアルキル基の両方を指すものとして一般に用いられ、これと同じことが本明細書に記載される他の基(例えばシクロアルキル等)についてもあてはまる。

20

【0034】

更に、当業者に公知の適切な蛍光体を、本願に開示される主題の実施態様において用いてもよい。用語「蛍光体」は、本明細書で用いるように、エネルギー(例えば光)を受容し得るか及び/又はそれによって励起され得る化合物種をいう。蛍光体は、エネルギーを受容するか及び/又はそれによって励起されたときに蛍光を発する。

【0035】

本実施態様の化合物において用いることができる蛍光体の例は、アルキル-テトラメチル-ローダミン(例えば5-カルボキシテトラメチルローダミン(TAMRA))、sulfo-Cy5、ATTO 725、Alexa Fluor(登録商標) 700、BODIPY(登録商標) 650、5-Fam、Cy3、Alexa Fluor(登録商標) 546、Alexa Fluor(登録商標) 555、Alexa Fluor(登録商標) 568、Atto 590、DyLight(登録商標) 594、CF 594、Alexa Fluor(登録商標) 594、ATTO 610、Alexa Fluor(登録商標) 610、Texas Red、ATTO 620、CF 620、Red 630、ATTO 633、CF 633、Alex Fluor(登録商標) 633、DyLight 633、Alexa Fluor(登録商標) 635、Cy5、CF 640、ATTO 647、Alexa Fluor(登録商標) 647、CF 647、DyLight(登録商標) 650、IRDye 650、ATTO 655、Alexa Fluor(登録商標) 660、CF 660、Alexa Fluor(登録商標) 680、IRDye 680、Atto 680、DyLight(登録商標) 680、CF 680、Red 681、Alexa Fluor(登録商標) 700、Atto 700、IRDye 700、NIR 700、NIR 730、ATTO 740、Alexa Fluor(登録商標) 750、Cyto 750、CF 750、Cy7、IRDye 750、DyLight 755、Cy7.5、Cyto 770、Alexa Fluor(登録商標) 790、CF 770、Cyto 780、IRDye 800、DyLight 800、Cyto 840及びQdots、Trilite Nanocrystals、alloyed Quantum Dots、CdS Type Quantum dots、Cd Se Type Quantum dots、Core-Shell Type Quantum Dotsを含む量子ドットファミリー又はそれらの組合せを含む。

30

40

【0036】

加えて、本実施態様の化合物において用いることができる蛍光体の例は、Alexa Fluor(登録商標) 610、Alexa Fluor(登録商標) 633、Alexa Fluor(登録商標) 647、Alexa Fluor(登録商標) 660、Alexa Fluor(登録商標) 680、Alexa Fluor(登録商標) 700、Alexa Fluor(登録商標) 750、BODIPY(登録商標) FL、BODIPY(登録商標) TMR、BODIPY(登録商標) 493/503、BODIPY(登録商標) 499/508、BODIPY(登録商標) 507/545、BODIPY(登録商標) 530/550、BODIPY(登録商標) 577/618、BODIPY(登録商標) 581/591、BODIPY(登録商標) 630/650

50

、BODIPY(登録商標) 650/665, Cy-2, Cy-3, Cy-5, Cy-7, エオシン, Fluo-4, フルオレセイン, Lucifer yellow, NBD, Oregon Green(登録商標) 488, PyMPO, ローダミンレッド, スルホンローダミン, テトラメチルローダミン及び/又はTexas Red(登録商標)を含む。

【0037】

いくつかの実施態様において、「蛍光体」は、例えばバイオレット、青色、シアン、緑色、黄緑色、黄色、橙色、赤橙色、赤色、遠赤外、近赤外又は赤外を含む特定波長の光エネルギーを吸収し、異なる波長の光エネルギーを発する分子を含む。この用語は、例えばバイオレット、青色、シアン、緑色、黄緑色、黄色、橙色、赤橙色、赤色、遠赤外及び/又は赤外を含む様々なスペクトルを発する分子を包含する。

【0038】

10

1つの実施態様において、蛍光体は、バイオレット蛍光色素、青色蛍光色素、シアン蛍光色素、緑色蛍光色素、黄緑色蛍光色素、黄色蛍光色素、橙色蛍光色素、赤橙色蛍光色素、赤色蛍光色素、遠赤外蛍光色素、近赤外蛍光色素又は赤外蛍光色素である。蛍光色素の非限定的な例は、例えばクマリン、シアニン、フルオレセイン、イソシアネート、イソチオシアネート、インドカルボシアニン、インドジカルボシアニン、ビリジルオキサゾール、フィコエリスリン、フィコシアニン、o-フタルデヒド(フタルアルデヒド)及びローダミンに由来する色素を含む。

【0039】

蛍光体及び任意にその他の分子は、様々な段階で化合物に付加することができる。例えば、コバラミンを含む実施態様においては、蛍光体は、コバラミンのコバルト中心、コバラミンのリボース 5'-OH、コバラミンの他の位置又はそれらの組合せに直接又はリンカーを介して付加することができる。同様に、コバロキシムを含む実施態様においては、蛍光体は、コバロキシムのコバルト中心に直接又はリンカーを介して付加することができる。

20

【0040】

特定の実施態様において、化合物と蛍光体又は他の付加分子との間のリンカーは、2以上の分子とコンジュゲートできる任意の適切な分子であり得る。例えば、いくつかの実施態様において、リンカーは、アルキル、アリール、アミノ、チオエーテル、カルボキサミド、エステル、エーテル及び/又はそれらの組合せである。当業者は、本願に開示される主題の特定の実施態様において用いることができる他のリンカーを理解する。よって、リンカーは、化合物及び/又は蛍光体の両方に結合(例えば共有結合)する原子又は分子であり得る。リンカーの例は、プロピルアミン、エチレンジアミン若しくはそれらの組合せ又はそれらの誘導体を含む。

30

【0041】

本明細書で用いる用語「アリール」は、限定されないが、ベンゼン、ナフタレン、フェニル、ビフェニル、フェノキシベンゼン等を含む炭素系の芳香族基を含む基である。用語「アリール」は、ピアリール(例えばナフタレン又はビフェニル)又は「ヘテロアリール」(これは、当該芳香族基の環中に組み込まれた少なくとも1つのヘテロ原子を有する芳香族基を含む基として定義される)も含む。ヘテロ原子の例は、限定されないが、窒素、酸素、硫黄及びリンを含む。同様に、用語「アリール」にも包含される用語「非ヘテロアリール」は、ヘテロ原子を含まない芳香族基を含む基を定義する。アリール基は、置換されていてもよいし、置換されていなくてもよい。アリール基は、限定されないが、任意に置換された本明細書に記載のアルキル、シクロアルキル、アルコキシ、アルケニル、シクロアルケニル、アルキニル、シクロアルキニル、アリール、ヘテロアリール、アルデヒド、アミノ、カルボン酸、エステル、エーテル、ハライド、ヒドロキシ、ケトン、アジド、ニトロ、シリル、スルホ-オキシ又はチオールを含む1以上の基で置換されていてもよい。

40

【0042】

本明細書で用いる用語「エステル」は、式-OC(O)A¹又は-C(O)OA¹(式中、A¹は、任意に置換されたアルキル、シクロアルキル、アリール等であり得る)によって表される。この用語は「ポリエステル」を含み、これは、本明細書で用いるように、式-(A¹O(O)C-A²-C(O

50

$\text{O})_a$ -又は $-(\text{A}^1\text{O}(\text{O})\text{C}-\text{A}^2-\text{OC}(\text{O}))_a$ - (式中、 A^1 及び A^2 は、独立して、任意に置換されたアルキル、シクロアルキル、アリール等であり得、「a」は、1~500の整数である)によって表される。

【0043】

本明細書で用いる用語「エーテル」は、式 A^1OA^2 (式中、 A^1 及び A^2 は、独立して、任意に置換されたアルキル、シクロアルキル、アリール等であり得る)によって表される。この用語は「ポリエーテル」を含み、これは、本明細書で用いるように、式 $-(\text{A}^1\text{O}-\text{A}^2\text{O})_a$ - (式中、 A^1 及び A^2 は、独立して、任意に置換されたアルキル、シクロアルキル、アリール等であり得、「a」は、1~500の整数である)によって表される。

【0044】

本明細書で用いる用語「チオール」は、式-SHによって表される。

いくつかの実施態様において、蛍光体は、活性剤、例えばBODIPY (登録商標) 650であり得る。用語「活性剤」は、対象における生物学的又は化学的事象を変更、促進、加速、延長、阻害、活性化、排除又は影響する化合物又は物体を指すために本明細書で用いられる。更に、本開示の化合物のいくつかの実施態様は、第2の活性剤を更に含んでいてもよく、特定の実施態様では、第2の活性剤は、第2の蛍光体を含む。

【0045】

また、本開示の活性剤は、限定されないが、酵素、有機触媒、リボザイム、有機金属、タンパク質、糖タンパク質、ペプチド、ポリアミノ酸、抗体、核酸、ステロイド分子、抗生物質、抗ウイルス剤、抗真菌剤、抗がん剤、鎮痛剤、抗拒絶剤、免疫抑制剤、サイトカイン、炭水化物、撥油性物質、脂質、細胞外マトリクス及び/又はその不可分な構成要素、脱灰した骨基質、医薬、化学療法剤、細胞、ウイルス、ウイルスベクター及びプリオンを含む。

【0046】

いくつかの実施態様において、化合物は、特定の波長において及び/又は所定範囲の波長を超えると光活性化されるようにチューニングしてもよい。いくつかの実施態様において、化合物は、当該化合物に含まれる蛍光体を適切に選択することによって、特定の波長において光活性化されるようにチューニングしてもよい。

【0047】

いくつかの実施態様において、化合物は活性剤を含む。化合物は、特定の波長を有する光によって活性化され、当該化合物から活性剤が切り離されるまで不活性な状態のままであり得る。

いくつかの実施態様において、化合物は、当該化合物に付加される蛍光体によって吸収される光の波長に相当する波長によって光活性化されるようにチューニングしてもよい。いくつかの実施態様において、化合物は、付加される蛍光体の励起スペクトルに概ね相当する波長を有する光への曝露によって最も急速に活性化される。この点につき、いくつかの実施態様において、化合物は、付加される蛍光体を励起するものよりも短い波長を有する光に曝露されるときに、光活性化されないか、又は少なくとも光活性化速度が低減される。

【0048】

特定の実施態様において、化合物は、付加される蛍光体を励起するものよりも長い波長を有する光に曝露されるときに、光活性化されないか、又は少なくとも光活性化速度が低減される。更に、いくつかの実施態様において、化合物は、付加される蛍光体を励起するものよりも短い波長又は長い波長の光に曝露されるときに、光活性化されないか、又は少なくとも光活性化速度が低減される。

【0049】

この点につき、用語「光」は、本明細書において、ある化合物を活性化できる電磁氣的放射を指すために用いられる。いくつかの実施態様において、光は、紫外光、可視光、近赤外光(NIR)又は赤外光(IR)を含む。一般に、光は、その波長が増大するにつれて組織の深くまで侵入することから、比較的長波長の光で活性化された化合物は、腫瘍及び/又は

10

20

30

40

50

組織深部のその他の標的を標的化するために特によく適合し得る。いくつかの実施態様の化合物は、500 nmを超える波長を有する光によって光活性化されるという驚くべき予期せぬ利点を有する。その他の実施態様の本開示の化合物は、1000 nmを超える波長を有する光によって光活性化することができる。

【0050】

より具体的には、本明細書で用いるように、光は、約500 nm～約1300 nmの波長のエネルギーを指し得る。特定の実施態様において、光は、約500 nm、約550 nm、約600 nm、約650 nm、約700 nm、約750 nm、約800 nm、約850 nm、約900 nm、約950 nm、約1000 nm、約1050 nm、約1100 nm、約1150 nm、約1200 nm、約1250 nm又は約1300 nmの波長のエネルギーを指し得る。その他の実施態様において、光は、約500 nmを超える、約550 nmを超える、約600 nmを超える、約650 nmを超える、約700 nmを超える、約750 nmを超える、約800 nmを超える、約850 nmを超える、約900 nmを超える、約950 nmを超える、約1000 nmを超える、約1050 nmを超える、約1100 nmを超える、約1150 nmを超える、約1200 nmを超える、約1250 nmを超える波長及び/又はより一層長い波長のエネルギーを指し得る。

【0051】

本願に開示される主題は、本明細書に開示される化合物を含む医薬組成物を更に含む。このような医薬組成物は、少なくとも1つの医薬的に許容される担体を含んでもよい。この点につき、用語「医薬的に許容される担体」は、滅菌済みの水性又は非水性の溶液、分散液、懸濁液又は乳液、並びに使用直前に滅菌済みの注入可能な溶液又は分散液中に再構成するための滅菌済みの粉体をいう。例えば、レシチンのようなコーティング剤を用いることによって、分散液の場合には必要とされる粒子サイズに維持することによって、及び界面活性剤を用いることによって、適切な流動性を維持することができる。これらの組成物は、保存剤、湿潤剤、乳化剤及び分散剤のようなアジュバントを含んでもよい。パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸等のような様々な抗細菌剤及び抗真菌剤を含ませることによって、微生物の作用の予防を確実にしてもよい。また、糖、塩化ナトリウム等のような浸透圧調整剤を含ませることも望ましいことであり得る。注入可能な医薬製剤の吸収延長は、吸収を遅らせるモノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンのような物質を含ませることによって達成できる。注入可能なデポ製剤は、ポリラクチド-ポリグリコリド、ポリ(オルトエステル)及びポリ(無水物)のような生分解性ポリマーに薬剤のマイクロカプセル化マトリクスを形成させることによって製造される。ポリマーに対する薬剤の比及び用いる具体的なポリマーの性質に依存して、薬剤放出速度をコントロールすることができる。注入可能なデポ製剤は、身体の組織に適合可能なリポソーム又はマイクロエマルジョン中に薬剤をトラップすることによっても製造される。注入可能な製剤は、例えば、細菌を保持するフィルターを通しての濾過によって、又は滅菌している薬剤を、使用直前に滅菌済みの水又はその他の滅菌済みの注入可能な媒体に溶解又は分散できる滅菌済みの固体組成物の形態とすることによって滅菌できる。適切な不活性の担体は、ラクトースのような糖を含み得る。

【0052】

適切な製剤は、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、殺菌用抗生物質及び当該製剤を意図された受容者の体液と等張にする溶媒を含み得る水性及び非水性の滅菌済みの注入可能な溶液；並びに懸濁剤及び増粘剤を含み得る水性及び非水性の滅菌済みの懸濁液を含む。

【0053】

組成物は、油性又は水性ビヒクル中の懸濁液、溶液又は乳液の形態であってもよく、懸濁剤、安定化剤及び/又は分散剤のような製剤用の剤を含んでもよい。あるいは、活性剤は、使用前に適切なビヒクル、例えば滅菌済みのパイロジェンフリーな水で構成するための粉体であってもよい。

【0054】

製剤は、単回用量又は複数回用量の容器、例えば密封したアンプル及びバイアル中に存在していてもよく、使用直前に滅菌済みの液体担体の添加のみを要する凍結状態又は凍結

乾燥状態で保存してもよい。

【0055】

経口投与のために、組成物は、例えば、結合剤(例えば予めゼラチン化されたコーンスターチ、ポリビニルピロリドン又はヒドロキシプロピルメチルセルロース)；充填剤(例えばラクトース、微結晶セルロース又はリン酸水素カルシウム)；滑沢剤(例えばステアリン酸マグネシウム、タルク又はシリカ)；崩壊剤(例えばポテトスターチ又はカルボキシメチルスターチナトリウム)；又は湿潤剤(例えばラウリル硫酸ナトリウム)のような医薬的に許容される賦形剤を用いて、慣用の技術によって製造された錠剤又はカプセル剤の剤形であってもよい。錠剤は、当業者に公知の方法によってコーティングされていてもよい。

【0056】

経口投与のための液体製剤は、例えば、溶液、シロップ又は懸濁液の剤形であってもよいし、使用前に水又はその他の適切なビヒクルで構成するための乾燥物として提供されてもよい。このような液体製剤は、懸濁剤(例えばソルビトールシロップ、セルロース誘導体又は水素化食用油)；乳化剤(例えばレシチン又はアカシア)；非水性ビヒクル(例えば、アーモンド油、油性エステル、エチルアルコール又は分画植物油)；及び保存剤(例えばメチルベンゾエート又はプロピル-p-ヒドロキシベンゾエート又はソルビン酸)のような医薬的に許容される添加剤を用いて慣用の技術によって製造できる。また、製剤は、緩衝塩、着香剤、着色剤及び甘味剤を必要に応じて含んでもよい。経口投与のための製剤は、活性化化合物の放出を制御するように適切に製剤化してもよい。バツカル投与のために、組成物は、慣用の方法で製剤化された錠剤又はトローチ剤の剤形であってもよい。

【0057】

また、化合物は、インプラント又は注入のための製剤として製剤化されてもよい。よって、例えば、化合物は、適切なポリマー材料若しくは疎水性材料(例えば許容される油中の乳剤として)又はイオン交換樹脂と共に製剤化してもよいし、又は難溶性の誘導体(例えば難溶性の塩)としてもよい。

【0058】

また、化合物は、直腸用の組成物(例えばココアバター又はその他のグリセリドのような慣用の坐剤用基剤坐剤又は停留浣腸剤を含む)、クリーム剤又はローション剤又は経皮パッチに製剤化されてもよい。

【0059】

本願に開示される主題は、化合物又は組成物の投与に有用なデバイスと共に包装された、本明細書に記載される化合物又は医薬組成物を含み得るキットを更に含む。当業者が認識するとおり、適切な投与補助デバイスは、選択される化合物若しくは組成物の製剤及び/又は所望の投与部位に依存する。例えば、化合物又は組成物の製剤が対象への注入に適している場合、デバイスはシリンジであり得る。別の例としては、所望の投与部位が細胞培養培地である場合、デバイスは滅菌済みのピペットであり得る。

【0060】

更に、本願に開示される主題は、がんのような疾患を治療する方法を含む。いくつかの実施態様において、該方法は、本明細書に記載される化合物の1つを含む化合物を、それを必要とする対象の投与部位に投与すること、及び次いで化合物を投与した後に対象の投与部位を光に曝露することを含む。上記のとおり、光は、いくつかの実施態様において、約500 nm～約1300 nmの波長を有する光であり得る。この点につき、より長い波長の光は、深部の組織を標的化するために特に有用であり得る。

【0061】

本開示のいくつかの方法において、複数の化合物を対象に投与し、次いで所定の順序で異なる波長を有する光に投与部位を曝露する。したがって、このような実施態様においては、複数の時点における化合物の投与を要することなく、所定の順序で異なる活性剤の効果を投与部位に順次的に与えることができる。よって、単に投与部位に曝露される光の波長を調節することによって、異なる活性剤により対象を治療することができる。

【0062】

10

20

30

40

50

更に、いくつかの方法において、投与後の化合物は、対象の細胞のエンドソーム経路によって内在化する。その後、細胞が光に曝露されるとき、活性剤を化合物から切り離すか、及び/又はエンドソームから細胞質中へ放出することができる。このプロセスによって、いくつかの実施態様では、化合物を活性化する波長を有する光に細胞を曝露するまで、細胞を傷つけないでおくことが可能である。

【0063】

用語「投与」は、化合物及び/又はそれを含む医薬組成物を対象に提供する方法をいう。このような方法は、当業者に周知であり、限定されないが、経口投与、経皮投与、吸入による投与、鼻内投与、局所投与、腔内投与、点眼、耳内投与、脳内投与、直腸投与及び非経口投与(静脈内投与、動脈内投与、筋肉内投与及び皮下投与のような注入を含む)を含む。投与は、連続的であってもよいし、又は断続的であってもよい。様々な態様において、製剤は、治療のために投与することができる；すなわち、存在している疾患又は状態(例えば、がん、腫瘍等)を治療するために投与することができる。更なる様々な態様において、製剤は、予防のために投与することができる；すなわち、疾患又は状態の予防のために投与することができる。

10

【0064】

いくつかの実施態様において、対象は、化合物の有効量を投与される。この点につき、用語「有効量」とは、望ましい結果を達成するため又は望ましくない状態に対する効果を得るために十分な量をいう。例えば、「治療有効量」とは、望ましい治療結果を達成するため又は望ましくない症状に対する効果を得るために十分であるが、有害な副作用を引き起こすには一般に不十分な量をいう。特定の患者についての具体的な治療上有効な投与レベルは、治療すべき疾患及びその重篤度；使用する具体的な組成物；患者の年齢、体重、通常健康状態、性別及び食事；投与時間；投与経路；使用する具体的な化合物の排出速度；治療期間；使用する具体的な化合物及び医薬分野において周知の類似の要素と組み合わせ又は同時に用いられる薬剤を含む様々な要素に依存する。例えば、化合物の投与量を、望ましい治療効果を達成するために必要とされるレベルよりも低いレベルから開始して、望ましい効果を達成するまで徐々に投与量を増大することは、十分に当業者の能力の範囲内である。所望の場合には、効果的な1日あたりの投与を複数回の投与に分けてもよい。結果として、単回用量の組成物は、1日の投与量を構成する量又はそれらを複数に分けた量を含み得る。投与量は、禁忌の場合には個々の医師が調整してもよい。投与量は、変動してもよいし、1日又は数日間、毎日1回以上投与してもよい。手引きは、所定クラスの医薬品に適した投与量に関する文献において見出すことができる。更なる様々な態様において、製剤は、「予防的有效量」；すなわち、疾患又は状態の予防に有効な量で投与してもよい。

20

30

【0065】

更に、用語「対象」又は「それを必要とする対象」は、特定の疾患、病的状態、異常等に関連する症状を任意に示す投与標的をいう。本明細書に開示される方法の対象は、脊椎動物、例えば哺乳動物、魚類、鳥類、爬虫類又は両生類であり得る。よって、開示される方法の対象は、ヒト、非ヒト霊長類、ウマ、ブタ、ウサギ、イヌ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ネコ、モルモット又はげっ歯類であり得る。この用語は、特定の年齢又は性別を指すものではない。よって、雄性であるか又は雌性であるかに拘りなく、成人及び新生の対象並びに胎児が包含されることを意図する。患者は、疾患又は異常に冒された対象をいう。用語「対象」は、ヒト及び獣医学的な対象を含む。

40

【0066】

いくつかの実施態様において、対象は、1以上の新生物性又は超増殖性の疾患、異常、病変又は状態に罹患するか又はそのように診断される。よって、対象において曝露される投与部位は、このような疾患、状態等(例えば腫瘍)に非常に近接しているか又はその位置であり得る。このような疾患、状態等の例は、限定されないが、結腸、腹部、骨、胸部、消化器系、食道、肝臓、脾臓、腹膜、内分泌腺(副腎腺、副甲状腺、下垂体、精巣、卵巣、子宮頸、胸腺、甲状腺)、眼、頭部及び頸部、神経(中枢及び末梢)、リンパ系、骨盤、

50

皮膚、軟組織、脾臓、胸郭、膀胱及び非尿生殖器系に位置する新生物(がん又は腫瘍)を含む。その他のがんは、限定されないが、結腸がん、心臓腫瘍、膵臓がん、黒色腫、網膜芽腫、グリア芽腫、肺がん、腸のがん、精巣がん、胃がん、神経芽細胞腫、粘液腫、筋腫、リンパ腫、内皮腫、骨芽細胞腫、骨巨細胞腫、骨肉腫、軟骨肉腫、腺腫、乳がん、前立腺がん、カボジ肉腫及び卵巣がん又はそれらの転移を含む濾胞性リンパ腫、p53変異を伴うがん腫及びホルモン依存性の腫瘍を含む。

【0067】

対象は、細胞生存能の異常な増大に関連する疾患又は状態、例えば、限定されないが、白血球(急性白血病(例えば急性リンパ球性白血病、骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性及び赤白血病を含む急性骨髄性白血病)及び慢性白血病(例えば慢性骨髄性(顆粒性)白血病及び慢性リンパ球性白血病)を含む)、真性赤血球増加症、リンパ腫(例えばホジキン病及び非ホジキン病)、多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン症、重鎖病、及び固形腫瘍(限定されないが、例えば線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫(endotheliosarcoma)、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫(lymphangioendotheliosarcoma)、滑液腫瘍、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸がん、膵臓がん、乳がん、卵巣がん、前立腺がん、扁平上皮細胞がん、基底細胞がん、腺がん、汗腺がん、脂腺がん、乳頭がん、乳頭腺がん、嚢胞腺がん、髄様がん、気管支原性がん、直腸細胞がん、肝がん、胆管がん、絨毛がん、セミノーマ、胎生期がん、ウィルムス腫瘍、子宮頸がん、精巣がん、肺がん、小細胞肺がん、膀胱がん、上皮性がん、グリオーマ、星細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫および網膜芽腫のような肉腫及びがん腫を含む)のような悪性の進行及び/又は転移及び関連する疾患に罹患していてもよい。上記の状態、疾患等並びに当業者に明らかなものは、本明細書においてまとめて「がん」と呼ばれる。

【0068】

用語「治療」又は「治療する(こと)」は、疾患、病的状態又は異常を治癒、緩和、安定化又は予防する意図をもってする対象の医療的な管理をいう。この用語は、積極的な治療、すなわち疾患、病的状態又は異常の改善を具体的な目的とする治療を含み、根治療法、すなわち関連する疾患、病的状態又は異常の原因を除去することを目的とする治療も含む。加えて、この用語は、対症療法、すなわち疾患、病的状態又は異常を治癒するよりもむしろ症状を緩和するために設計された治療；予防治療、すなわち関連する疾患、病的状態又は異常の進展を最小化するか又は部分的に若しくは完全に阻害することを目的とする治療；及び補助的治療、すなわち関連する疾患、病的状態又は異常の改善を目的とする別の具体的療法を補助するために用いられる治療を含む。

【0069】

投与部位を光に曝露する工程について、曝露する方法は、具体的な状況におけるニーズを満たすために変更してもよい。したがって、光は、日光、可視光及び/又はレーザー光を含み得る。また、いくつかの実施態様において、光は、紫外光、可視光、近赤外光又は赤外光を含む。更に、光は、レーザー光源、タングステン光源、可視光源等から当ててもよい。光は、比較的特定された投与部位に当てられてもよいし、例えばレーザー技術、ファイバー、内視鏡、生検針、プローブ、チューブ等を用いて当てられてもよい。このようなプローブ、ファイバー又はチューブは、例えば、対象の身体の腔又は孔に、又は対象の皮下に若しくは経皮的に直接挿入し、対象に投与された化合物を光に曝露してもよい。

【0070】

光源は、色素レーザー又はダイオードレーザーも含み得る。ダイオードレーザーは、比較的小さく費用効率の高い設計であること、設置が容易なこと、線量測定及び校正が自動化されていること及び稼働寿命が長いことに起因して、特定の用途に有利であり得る。ダイオードレーザーを含む特定のレーザーは、比較的低温度でも作動するので、冷却装置を更に備える必要がない。いくつかの実施態様において、光源は、電池を電力源とする。また、光源は、拡散性物質を有するインフレータブルバルーンのような拡散チップ等を用い

て提供されてもよい。

【0071】

光は、具体的な用途に必要な光活性化を提供する強度及び時間で対象に当てることができる。いくつかの実施態様において、本開示に提供される治療方法は、比較的低用量の化合物を投与すること、及び/又は比較的低強度の光を数時間又は数日間にわたって投与部位に曝露することを含む。いくつかの実施態様において、この低用量の手法は、正常な組織の損傷を最小化しつつ優れた腫瘍制御を可能にする。

【0072】

関節リウマチ(RA)は、米国人口の1%が罹患する進行性の炎症性自己免疫疾患である(Majithia, 2007)。RAは、年間25万人の入院及び1000万回の通院の原因となっている。2010年の報告は、400億ドル(2005年、ドル)のRAの社会的費用を報告した(Birnbaum, 2010)。RA患者は、典型的には、関節の痛み、腫れ、圧痛及び熱感を含む症状を呈する。原因は不確かなままであるが、複数の関節の症状は、滑膜/関節空隙へのリンパ球および単球の流入、炎症促進性サイトカインの産生、骨および軟骨の破壊および他の関節への疾患の広がりとその後の全身性症状の結果である。究極的には、これは取り返しのつかない関節の損傷、変形及び身体障害をもたらす。冒された関節に抗炎症剤を直接注入することが治療上有益であることが50年以上前から知られている(Hollander, 1951)。しかしながら、日常的に複数の関節に複数回注入することは実行可能な治療の選択肢ではない(Mitragotri, 2011)。

【0073】

「生物製剤」(例えば、TNF、IL-1等を標的化する抗体)の最近の紹介によれば、それらは、診断時に他の薬剤を用いる積極的治療と併用してRAの進行速度を低減した(Kukar, 2009)。にも拘らず、RA療法には、一般に、望ましくない副作用(穏やかなものから重篤なものまで)を通常もたらす頻繁かつ長時間の投与が必要とされる。例えば、グルココルチコイドに依存するRA患者のおよそ50%(Huscher 2009)は、体重増加、骨粗鬆症、糖尿病、高血圧、皮膚の脆弱性及び全身的に免疫力が低いことから起こる感染症を含む、長期使用の結果に対処しなければならない(Basschant, 2012)。当然、望ましくない全身性の効果を低減するためにRAの関節に選択的に送達できる治療薬の開発に大きな関心が寄せられている(Mitragotri 2011; Fiehn 2010; Ulbrich 2010)。

【0074】

RA患者には併用療法が有利であるため、送達システムは、異なる薬剤を精緻な空間的および時間的制御をもって分配するのに十分な程度ロバストでなければならない。がんの管理において強力な応用のようである1つの可能性は、疾患部位において治療剤を活性化するために光を用いることである。例えば、光学的療法は、破壊のためにマーキングされた組織に、局所的に集中した細胞毒性の O_2 を送達する(Shirasu 2013)。より近年になって、光活性化プロドラッグの開発が注目されている(Shamay 2011; Thompson 2010; Yavlovich 2010)。しかしながら、一般に、後者は、組織への浸透力に乏しい短波長(<450 nm)が光活性化に必要とされるという事実によって制限されている。更に、この狭い波長範囲では、異なるプロドラッグを波長特異的に区別する能力が非常に制限されている。

【0075】

本願に開示される主題のいくつかの実施態様において、光応答性構築物は、組織に吸収されない波長域(600~1000 nm)で機能する。いくつかの実施態様において、光応答性構築物は、波長特異的に応答して、異なる生物学的作用(例えば異なる薬剤の放出)を引き起こすように設計されている。いくつかの実施態様において、化合物は、限定されないが関節リウマチ、がん及び糖尿病を含む疾患を治療するために用いられる。

【0076】

本開示のいくつかの実施態様では、赤血球(RBC)を用いる薬剤送達システムを開示する。

赤血球は、「薬剤送達システムの王様」として記載されている(Muzykantov 2010)。それらは、生体適合性であり、最大120日の寿命を有し、その他の薬剤の担体よりもサイズ

10

20

30

40

50

が非常に大きいので比較的大量の薬剤を運搬できる。しかしながら、「RBC (赤血球)担体からの実用的に有用な放出制御は、達成困難な目標のままである」(Muzykantov 2010)。慣用の光解離性試薬を用いる放出の光制御は、可視スペクトル(最大600 nm)の短波長領域を吸収するヘモグロビンの存在に起因して実行可能ではない。

【0077】

いくつかの実施態様において、本開示は、この制限を克服し、RBCからの治療剤の空間的かつ時間的な放出制御を初めて提供するRBCベースの薬剤送達システムを提供する。

【0078】

ペプチドベースのRA療法の新たなファミリーは、免疫抑制性ではなく有望な免疫調節性に起因して、大いに注目されている(Getting 2009; Luger 2007; Yang 2013)。しかしながら、これらのペプチドは、血中で急速に分解する。いくつかの実施態様において、本願に開示される主題は、それを必要とする対象の疾患を治療するための、ペプチド送達システム及び方法を提供する。具体的には、本開示のいくつかの実施態様は、保護的な覆いでペプチドを安定化させ、意図された作用部位(そこでは、その後、光に曝露されるときに、ペプチドが局所的に放出される)にペプチドを送達するための薬剤送達システム及び方法を提供する。

10

【0079】

「[RAの]成功といえる新たな治療法は、安全性が良好又は改善されている点で優れている必要があるだけでなく、患者が自分自身で投与できるように製剤化されていることも必要である」と提唱されている(Minter 2013)。本願に開示される主題のいくつかの実施態様において、既存の光送達システム(例えば「低レベルレーザー療法」において用いる手法(Bjordal 2008))を併用して、患者の手の炎症部位の治療に応用する治療方法が提供される。

20

【0080】

小分子、ペプチド、タンパク質及び核酸を含む生物学的に活性な試薬の光活性化可能な形態が多く報告されている(Lee 2009)。したがって、この戦略は、(a)生物学的活性に必須の剤における重要な官能基の特定、及び(b)その光開裂部分の共有結合的な修飾を要する。この戦略は、しばしば、光活性化可能なATPを記載する影響力の大きい1978年の論文(Kaplan 1978)までさかのぼる。後者はATPアーゼによって認識されない。しかしながら、光分解(～330 nm)時にATPが生成され、次いで加水分解される。2つの基準が光開裂波長に影響する：(a)存在する色素団(例えばニトロベンジル基)のスペクトル及び(b)開裂する結合(例えばニトロベンジルのC-O)の性質。全ての光感受性の基について、効率的な光開裂の効果を得るために必要とされる最小のエネルギーがある(Aujard 2006)。多様なその他の光開裂性/光変換性部分が記載されている(Klan 2013)。それらが吸収する波長はある程度変化する(350～500 nm)が、それらの光分解波長依存性は、上記で列挙した2つの基準によって予め決まる。

30

【0081】

本開示のいくつかの実施態様において、光活性化可能な剤の創出のための新たな戦略が提供される。この戦略は、1978年から用いられているアプローチからの著しい発展に相当する。いくつかの実施態様において、本開示は、(a)組織への浸透が最大となる波長(例えば、600～900 nm)を薬剤の活性化に用いること、(b)種々の光活性化可能な治療剤に特異的な波長をコード化できることによって波長依存的な区別を可能にすること、及び(c)光応答性構築物を興味ある薬剤/剤の任意の位置に付加できることによって、生体分子の活性に必須の重要な官能基が光開裂性の基で共有結合的に修飾されなければならないという制約を排除することを提供する。

40

【0082】

ペプチドはその治療上の可能性のために大きな注目を受け続けるであろうが、殆どが血中において急速に取り除かれるか、及び/又は分解される。本開示は、いくつかの実施態様において、タンパク質分解感受性ペプチドを提供し、RBC細胞膜を覆うタンパク質の覆いに「隠れる」ことができることを証明する。後者は、波長コード化(wavelength-encode

50

d) 構築物とカップリングしていることによって、所望の生体部位におけるペプチド放出を促進し、したがってプロテアーゼへの曝露が制限されている。

【0083】

いくつかの実施態様では、関節炎動脈滑膜関節界面の工学的に操作された3次元モデル(複数のヒト細胞株を含む)を用いて、波長コード化薬剤送達技術の効果を評価する。

【実施例】

【0084】

実施例

以下の具体的だが非限定的な実施例によって本願に開示される主題を更に説明する。実施例は、本願に開示される主題に関連する開発及び実験の過程における様々な時点で収集したデータを代表するデータの集積を含み得る。

以下の実施例は、とりわけ、蛍光体が付加される特定の例示的なアルキルコバラミン化合物の合成及び特徴決定について記載する。

【0085】

ヒドロキシコバラミンヒドロクロリド(B_{12a})は、MP Biomedicalsから購入した。TAMRAは、AnaSpecから購入した。SulfoCy5スクシンイミジルエステルは、Lumiprobeから購入した。BODIPY(登録商標) 650スクシンイミジルエステル、MitoTracker(登録商標) Green及びローダミンBデキストラン(10 000 MW)は、Invitrogenから購入した。Dylight(登録商標) 800スクシンイミジルエステルは、Thermo Fisher Scientificから購入した。その他の全ての蛍光体及び試薬は、Sigma-Aldrichから購入した。全ての蛍光体及び試薬は、更に精製することなく用いた。546 \pm 10 nmバンドパスフィルターは、Newportから購入した。646 \pm 10, 700 \pm 10, 730 \pm 10及び780 \pm 10 nmバンドパスフィルターは、Cheshire Opticalから購入した。全てのイメージングは、Lambda LS3キセノンアーク灯及びHamamatsu C8484 CCDカメラを備えたOlympus IX81倒立蛍光顕微鏡を用いて行った。

【0086】

-(3-アミノプロピル)コバラミン1は、文献記載の手順に従って、ヒドロキシコバラミン及び3-クロロプロピルアミンヒドロクロリドから製造した(Smeltzer, C. C.; Cannon, M. J.; Pinson, P. R.; Munger, J. D., Jr.; West, F. G.; Grissom, C. B. Org. Lett., 2001, 3, 799 - 801)。文献記載の手順に従って精製を行い、橙色の固体を得た(0.0154 g, 68%); $C_{65}H_{98}N_{14}O_{14}PCo$ (M^{1+})について算出したESI MS: m/z = 1388.7, 観測値 1388.7; (M^{2+})についての算出: m/z = 694.3, 観測値 694.5; (M^{3+})についての算出: m/z = 463.1, 観測値 462.9 (Priestman, M. A.; Shell, T. A.; Sun, L.; Lee, H.-M.; Lawrence, D. S. Angew. Chem. 2012, 124, 7804 - 7807; Angew. Chem. Int. Ed. 2012, 51, 7684 - 7687)。

【0087】

コバラミン-TAMRAコンジュゲート(Cbl-1)の合成は、図6に示されるようにして行った: Cbl-1は、文献記載の手順に従って、-(3-アミノプロピル)コバラミン1及び5-カルボキシトラメチルローダミン(TAMRA)から製造した。文献記載の手順に従って精製を行い、赤色の固体を得た(82%); $C_{90}H_{118}N_{16}O_{18}PCo$ (M^{2+})について算出したESI MS: m/z = 900.4, 観測値 900.5; (M^{3+})について算出: m/z = 600.3, 観測値 600.3 (Priestman, M. A.; Shell, T. A.; Sun, L.; Lee, H.-M.; Lawrence, D. S. Angew. Chem. 2012, 124, 7804 - 7807; Angew. Chem. Int. Ed. 2012, 51, 7684 - 7687)。

【0088】

-(3-アセトアミドプロピル)コバラミン(Cbl-2)の合成は、図7に示されるようにして行った: N,N,N',N'-テトラメチル-O-(N-スクシンイミジル)ウラニウムテトラフルオロボレート(TSTU, 0.0242 g, 80 μ mol)、酢酸(0.0022 g, 38 μ mol)及びDIPEA (0.0234 g, 181 μ mol)を、2:2:1のジメチルホルムアミド:ジオキサン:水の溶液(250 μ L)中で1 h混合した。-(3-アミノプロピル)コバラミン1 (0.0052 g, 3.7 μ mol)を添加し、反応液を18時間混合した。線形勾配2溶媒系(溶媒 A: 0.1% TFA/H₂O; 溶媒 B: 0.1% TFA/CH₃CN)を97:3 (0分)から10:90 (40分)まで変化するA:B比で用いるHPLC (分取C-18カラム)によ

て所望の化合物を精製した。凍結乾燥によって溶媒を除去し、橙色の固体を得た(0.0039 g, 73%); $C_{67}H_{100}N_{14}O_{15}PCo$ (M^+) について算出したESI MS: $m/z = 1430.7$, 観測値 1431.7; (M^{2+}) について算出: $m/z = 715.3$, 観測値 715.5。

【0089】

コバラミン-蛍光体コンジュゲート(Cbl-3, Cbl-4, Cbl-5, Cbl-6及びCbl-7)の合成及び特徴決定は、図8に示されるようにして行った。

コバラミン-蛍光体コンジュゲートの一般的な合成: 蛍光体のN-ヒドロキシスクシンイミドエステル(1 eq.), (3-アミノプロピル)コバラミン1 (1.5 eq.)及びジイソプロピルエチルアミン(6 eq.)をジメチルホルムアミド中で18時間混合した。線形勾配2溶媒系(溶媒 A: 0.1 % TFA/ H_2O ; 溶媒 B: 0.1% TFA/ CH_3CN)を97:3 (0分)から10:90 (40分)まで変化するA:B比で用いるHPLC (分取C-18 カラム)によって所望の化合物を精製した。凍結乾燥によって溶媒を除去し、固体を得た。

【0090】

コバラミン-SulfoCy5 コンジュゲート(Cbl-3)は、図9に示される: 青色の固体、89%; $C_{97}H_{134}N_{16}O_{22}PS_2Co$ (M^{2+}) について算出したESI MS: $m/z = 1014.4$, 観測値 1013.6; (M^{3+}) について算出: $m/z = 676.3$, 観測値 676.4。

【0091】

コバラミン-ATTO 725コンジュゲート(Cbl-4): 青色の固体、66%; $C_{90}H_{118}N_{16}O_{18}PCo-ATTO\ 725$ (M^{2+}) について推定したESI MS: $m/z = 892.9$, 観測値 893.2; (M^{3+}) について推定: $m/z = 595.3$, 観測値 595.9 (カルボン酸であるATTO 725の式及び正確な質量は報告されていない)。

【0092】

コバラミン-Dylight(登録商標) 800コンジュゲート(Cbl-5): 青色の固体、92%; $C_{90}H_{118}N_{16}O_{18}PCo-Dylight800$ (M^{2+}) について推定したESI MS: $m/z = 1141.1$, 観測値1139.8; (M^{3+}) について推定: $m/z = 760.7$, 観測値760.4 (カルボン酸であるDylight(登録商標) 800の式及び正確な質量は報告されていない)。

【0093】

コバラミン-Alexa Fluor(登録商標) 700コンジュゲート(Cbl-6): 青色の固体、72%, $C_{90}H_{118}N_{16}O_{18}PCo-Alexa\ Fluor$ (登録商標) 700 (M^{2+}) についての観測したESI MS: $m/z = 1179.9$, (M^{3+}) についての観測値: $m/z = 787.0$ (カルボン酸であるAlexa Fluor(登録商標) 700の式及び正確な質量は報告されていない)。

【0094】

コバラミン-BODIPY(登録商標) 650コンジュゲート(Cbl-7)は、図9に示される: 青色の固体、88%, $C_{94}H_{124}N_{18}O_{17}PBF_2Co$ (M^{2+}) について算出したESI MS: $m/z = 957.9$, 観測値958.7; (M^{3+}) について算出: $m/z = 638.3$, 観測値638.6。

【0095】

アルキル-テトラメチル-ローダミン(TAMRA)部分を含むCbl-1は、アルキルコバラミンのコバルト中心に固定し(Priestman, M. A.ら, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2012)、光開裂レポーターとして用いた。図5は、アルキルコバラミン及びアルキルコバラミン-蛍光体コンジュゲートの構造を含む。図6は、コバラミン-TAMRAコンジュゲート(Cbl-1)の構造である(スキームS1)。付加される蛍光体の蛍光を消光するコバラミンの能力に起因して、Cbl-1の光分解時には蛍光の増大が観られていた(Priestman, M. A.ら, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2012. Lee, M.ら, Org. Lett. 2009. Smeltzer, C. C.ら, Org. Lett. 2001. Jacobsen, D. W. Methods Enzym. 1980. Rosendahl, M. S.ら, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 1982. Jacobsen, D. W.ら, J. Inorg. Biochem. 1979)。付加される蛍光体の蛍光を消光するコバラミンの能力は、蛍光体とコリン環系との接触による消光の結果であった(Lee, M.; Grissom, C. B. Org. Lett. 2009)。理論又はメカニズムに拘束されないが、接触による消光は、蛍光共鳴エネルギー移動とは異なり、エネルギー移動が生じるために、蛍光体及びクエンチャーのそれぞれ発光波長と吸収波長との重複を必要としない。Co-アルキル結合が弱い(<30 kcal/mol)という事実に鑑みれば(Halpern, J.ら, J. Am. Che

10

20

30

40

50

m. Soc. 1984. Kozlowski, P. M.ら, J. Chem. Theory Comput. 2012及びそれらで引用された参考文献)、コバラミンによって吸収される波長を超える波長(>560 nm)で励起された蛍光体は、それらの励起状態のエネルギーをコリン環に移動することによってCo-C結合の切断を促進できるようであった。

【0096】

Cbl-1中のTAMRA及びコリン部分は、500~570 nmの光を吸収する。TAMRA-媒介性エネルギー移動機構は、メチルコバラミン(MeCbl)及び付加される蛍光体を有しないアルキルコバラミンモデル(Cbl-2)のそれよりもCo-C結合の開裂を加速し得る。MeCbl及びCbl-2(それぞれ 1.9 ± 0.2 及び $2.1 \pm 0.3 \mu\text{M}^{-1}/\text{分}$ 、図14及び15)は、似たような速度で光分解された。対照的に、Cbl-1は、その蛍光体を含まないカウンターパートであるMeCbl及びCbl-2の2倍の速度($3.8 \pm 0.3 \mu\text{M}^{-1}/\text{分}$)で光分解した(図1及び16)。したがって、付加される蛍光体は、Co-C結合の光開裂を促進する役割を果たすことができる。

10

【0097】

コリン環によって吸収されるものよりも長い励起波長を有するいくつかの蛍光体をアルキルコバラミンフレームワークに付加した。UV-Vis(図17)及びLC/MS(表3)によって評価されたように、SulfoCy5誘導体であるCbl-3($\lambda_{\text{ex}} 650 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} 660 \text{ nm}$)は光分解され($646 \pm 10 \text{ nm}$)、完全に B_{12a} に変換された。LC/MSにより、3つのSulfoCy5誘導体、アルデヒド、アルデヒドに変換されるヒドロパーオキシド及びアルキル産物が形成されることが明らかとなった(スキームS4)。対照的に、暗中で維持したCbl-3並びに646 nmに曝露されたCbl-1(表1)は、それらの構造的完全性を保持した。

20

【0098】

Cbl-1と同様に、Cbl-3は、光分解時に蛍光の増大を示した(表1及び図21)。Atto725(Cbl-4, $\lambda_{\text{ex}} 730 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} 750 \text{ nm}$)及びDylight(登録商標)800(Cbl-5, $\lambda_{\text{ex}} 775 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} 794 \text{ nm}$)の誘導体も製造して調べた。それぞれ 730 ± 10 及び $780 \pm 10 \text{ nm}$ におけるCbl-4及びCbl-5の光分解をLC/MSによって確認した(図18及び19、表4及び5)。Cbl-3を用いたときのように、Cbl-4及びCbl-5は、LC/MSで確認したところ、いずれも暗中で安定であった。加えて、これら長波長へのTAMRA誘導体(Cbl-1)の曝露による構造的完全性に対する観察可能な効果はなかった(表1)。

【0099】

波長選択的な光開裂の潜在的可能性を評価するため、コバラミン-蛍光体コンジュゲートの各々を、表1に概説するようにして、546、646、727及び777 nmに曝露した。Cbl-1は、600 nmを超える光を吸収せず、>600 nmの光への曝露による影響を受けなかった。類似して、Cbl-3、Cbl-4及びCbl-5については、546 nm(表1)又はこれら化合物により吸収されるものよりも長波長への曝露時の影響が小さいか又は全く示さなかった。例えば、650 nm光を吸収する蛍光体が付加されるCbl-3は、727及び777 nmの照射に対して不活性であった。ATTO 725が付加されるCbl-4は、646 nmにおいて顕著なショルダー吸収及び777 nmにおいて非常に弱い吸収を示した。Cbl-4は、646 nmにおける穏やかな光分解及び777 nmにおける非常に微小な光分解を示すことによって、予測可能な様式で応答した。最後に、Dylight(登録商標)800で修飾されたCbl-5は、646 nm及び727 nmにおける光分解に影響されないが、予想どおり777 nmに応答した。理論又はメカニズムに拘束されないが、これらの試験された例示的な実施態様は、コバラミン-蛍光体コンジュゲートが、付加される蛍光体の励起スペクトルに一致する波長に応答して、急速に光分解できることを示す。

30

40

【0100】

【表 1】

	%蛍光増大@ λ_{ex}			
	546 nm	646 nm	727 nm	777 nm
Cbl-1	730 ± 130	*	*	*
Cbl-3	32 ± 7	250 ± 50	*	*
Cbl-4	260 ± 20	140 ± 20	420 ± 20	36 ± 2
Cbl-5	*	*	*	29 ± 3
Cbl-6	21 ± 5	17 ± 3	37 ± 1	*
Cbl-7	110 ± 10	220 ± 30	*	*

10

20

30

40

表1. 546 nm (5分)、646 nm (5分)、727 nm (20分)及び777 nm (10分)の光での光分解時のコバラミン-蛍光体コンジュゲートの蛍光増大のパーセント。*は<6%である。

【0101】

表1の結果は、適切な照射順序及び波長の選択によって、コバラミンで置換された誘導体の混合物中の特定の化合物を選択的に光分解できることを示唆する。777 nmでCbl-4が示す光分解が微量であることから、Cbl-4を、Alexa Fluor(登録商標) 700が付加されたコンジュゲートであるCbl-6 (700 nmに感受性だが777 nmに耐性)で置き換えた。777 nmにおけるCbl-5、Cbl-6、Cbl-3、Cbl-1の混合物の照射では、Cbl-5だけが光分解した(図2a)。その後、700 nmに混合物を曝露し、Cbl-3又はCbl-1に影響を与えることなくCbl-6からその光分解産物への変換を誘発した(図2b)。最後に、646及び546 nm (図2c及び2d)で順次照射して、Cbl-3及びCbl-1を選択的に光分解した。したがって、光分解を特定の波長にチューニングできただけでなく、適切な蛍光体の選択及び波長の照射順序によって、4つの化合物は、予測可能な形で、オルソゴナルかつ順次的に光分解された。

【0102】

更に、以下の実施例は、蛍光体がアルキルコバラミンのリボース5'-OHに付加されている化合物の合成及び特徴を検証する。具体的には、以下の実施例は、このような化合物を用いて、Co-アルキル結合の光開裂を促進できるか否かを調査する(チャート1、AdoCbl-1~AdoCbl-4)。

補酵素B₁₂-TAMRAコンジュゲート(AdoCbl-1)の合成及び特徴を図10に示す。

【0103】

補酵素B₁₂-エチレンジアミンコンジュゲート2の合成：

補酵素B₁₂(0.0209 g, 13 μ mol)及び1,1-カルボニルジ-(1,2,4-トリアゾール) (0.0142

50

g, 87 μmol)を、オーブンで乾燥させた丸底フラスコに添加した。容器をArでパージした。乾燥ジメチルホルムアミド(0.2 mL)をフラスコに添加し、混合物を室温で1 h攪拌した。エチレンジアミン(0.0270 g, 450 μmol)を反応混合物に添加し、攪拌を更に18 h続けた。所望の化合物を、線形勾配2溶媒系(溶媒 A: 0.1% TFA/H₂O; 溶媒 B: 0.1% TFA/H₃CN)を97:3 (0分)から10:90 (40分)まで変化するA:B比で用いるHPLC (分取C-18カラム)によって精製した。凍結乾燥による溶媒の除去により、橙色の固体(0.0189 g, 86%)を得た; C₇₅H₁₀₇N₂₀O₁₈PCo (M²⁺)について算出したESI MS: m/z = 832.9, 観測値 833.4; (M³⁺)について算出: m/z = 555.2, 観測値 556.2.

【0104】

補酵素B₁₂-TAMRAコンジュゲート(Ado-Cbl-1)の合成: N,N,N',N'-テトラメチル-O-(N-スクシンイミジル)ウラニウムテトラフルオロボレート(TSTU, 0.0139 g, 46 μmol)、TAMRA (0.0127 g, 30 μmol)およびDIPEA (0.0230 g, 178 μmol)を、2:2:1のジメチルホルムアミド:ジオキサン:水の溶液(250 μL)中で2時間混合した。補酵素B₁₂-エチレンジアミンコンジュゲート2 (0.0039 g, 2.3 μmol)を添加し、反応物を18時間混合した。線形勾配2溶媒系(溶媒 A: 0.1% TFA/H₂O; 溶媒 B: 0.1% TFA/CH₃CN)を97:3 (0分)から10:90 (40分)まで変化するA:B比で用いるHPLC (分取C-18カラム)によって所望の化合物を精製した。凍結乾燥によって溶媒を除去し、赤色の固体を得た(0.0026 g, 53%); C₁₀₀H₁₂₈CoN₂₂O₂₂P (M²⁺)について算出したESI MS: m/z = 1039.4, 観測値1039.8; (M³⁺)について算出: m/z = 693.0, 観測値693.6; (M⁴⁺)について算出: m/z = 519.7, 観測値520.5.

10

補酵素B₁₂-蛍光体コンジュゲート(AdoCbl-2, AdoCbl-3及びAdoCbl-4)の合成及び特徴を図11に示す。

20

【0105】

コバラミン-蛍光体コンジュゲートの一般的な合成:

蛍光体としてのN-ヒドロキシスクシンイミドエステル (1 eq.)、補酵素B₁₂-エチレンジアミンコンジュゲート2 (1.5 eq.)及びジイソプロピルエチルアミン(6 eq.)をジメチルホルムアミド中で18時間混合した。線形勾配2溶媒系(溶媒 A: 0.1% TFA/H₂O; 溶媒 B: 0.1% TFA/CH₃CN)を97:3 (0分)から10:90 (40分)まで変化するA:B比で用いるHPLC (分取C-18カラム)によって所望の化合物を精製した。凍結乾燥によって溶媒を除去し、固体を得た。

【0106】

補酵素B₁₂-SulfoCy5コンジュゲート(AdoCbl-2): 青色の固体, 87%, C₁₀₇H₁₄₂N₂₂O₂₆PS₂Co (M²⁺)について算出したESI MS: m/z = 1152.5, 観測値1152.7; (M³⁺)について算出: m/z = 768.3, 観測値768.8.

30

【0107】

補酵素B₁₂-ATTO 725コンジュゲート: 青色の固体(AdoCbl-3), 69%, C₇₅H₁₀₆N₂₀O₁₈PCo-Atto725 (M²⁺)について推定したESI MS: m/z = 1031.4, 観測値1032.3; (M³⁺)について推定: m/z = 687.6, 観測値688.5 (カルボン酸であるATTO 725の式及び正確な質量は報告されていない)。

【0108】

補酵素B₁₂-Dylight(登録商標) 800コンジュゲート(AdoCbl-4): 青色の固体, 90%, C₇₅H₁₀₆N₂₀O₁₈PCo-Dylight(登録商標) 800 (M²⁺)について推定したESI MS: m/z = 1279.6, 観測値1279.6; (M³⁺)について推定: m/z = 853.1, 観測値853.2 (カルボン酸であるDylight(登録商標) 800の式及び正確な質量は報告されていない)。

40

【0109】

MeCbl、Cbl-1、Cbl-2、AdoCbl及びAdoCbl-1の光分解速度の比較

一般的な手順: 546 \pm 10 nmに選択的なバンドパスフィルターを備えたOriel Xeフラッシュランプ(800 mJ, 62 Hz)を用いて、光分解を行った。アルキルコバラミンからヒドロキソコバラミンへの変換は、Perkin Elmer Lambda 2 UV/Vis分光光度計を用いて、350 nmにおける混合物の吸収をモニタリングすることによって測定した(Taylor, R. T.; Smucker, L.; Hanna, M. L.; Gill, J. Arch. Biochem. Biophys. 1973, 156, 521 - 533.)。

50

【 0 1 1 0 】

Cbl-6及びCbl-7 光分解産物の測定

一般的な手順：Cbl-6及びCbl-7の光分解は、それぞれ 700 ± 10 nm及び 646 ± 10 nmに選択的なバンドパスフィルターを備えたOriel Xe フラッシュランプ (800 mJ, 62 Hz)を用いて2 h行った。線形勾配2 溶媒系 (溶媒 A: 0.1%ギ酸/ H_2O ; 溶媒 B: 0.1%ギ酸/ CH_3CN)を97:3 (0~5分)から3:97 (5~18分)まで変化するA:Bで用いるLC/MSによって、得られたサンプル(100 μ L)を分析した。

【 0 1 1 1 】

補酵素 B_{12} (AdoCbl)誘導体を用いた(9)。TAMRAで置換された誘導体であるAdoCbl-1 ($2.9 \pm 0.3 \mu M^{-1}/m$)についての546 nmでの光分解速度は、その天然に存在する非標識のカウンターパートであるAdoCbl ($1.7 \pm 0.2 \mu M^{-1}/m$)のその2倍近くであった(図32~34)。理論又はメカニズムに拘束されないが、このことは、TAMRAの励起が光分解増大を担うことの証拠である。次いで、SulfoCy5 (AdoCbl-2)、Atto725 (AdoCbl-3)及びDylight800 (AdoCbl-4)を含む長波長の蛍光体を含むAdoCbl-コンジュゲートを調製し、コバラミン部分が吸収する波長を超える波長(すなわち、 >600 nm)においてCo-アルキル結合の光開裂を誘導できるか否かを調べた。

10

【 0 1 1 2 】

AdoCblの光分解によって、アデノシン、アデノシン-5'-アルデヒド及び5'-パーオキシアデノシンが生じることが示されている(9)。LC/MSによって、AdoCbl及びAdoCbl-1に対する546 nmの照射によりこれらの産物が生ずることを確認した(表6)。対照的に、 <600 nmの光だけを吸収するAdoCbl及びAdoCbl-1の両方が、600 nmを超える波長において光分解に耐性であった(表7及び8)。SulfoCy5 (ϵ_{ex} 650 nm)が付加されているAdoCbl-2は、546及び646 nmに曝露されるときにアデノシン産物を生ずるが、730及び780 nmの光による影響は受けなかった(表9)。AdoCbl-3 (Atto725, ϵ_{ex} 730 nm)は、546、646及び730 nmに曝露されたときにアデノシン光分解産物を生じたが、780 nmでは生じなかった(表10)。加えて、AdoCbl-3は546及び730 nmで完全に光分解したが、646 nmに曝露したときには相当な量の開始物質が残った。観察された部分的な光分解は、AdoCbl-3中に含まれるAtto725が646 nm領域で小さなショルダー吸光を示すことと一貫し得る。最後に、Dylight800 (ϵ_{ex} 780 nm)含有AdoCbl-4は、546、730及び780 nmの照射にตอบสนองして、期待されたアデノシン産物を生じた(表11)。部分的な光分解は、730 nmで観察され、Dylight800のショルダー吸光に起因し得る。AdoCbl-4は、この波長における吸収がないことに起因して、646 nmで光分解に耐性であった。よって、これらの例示的な実施態様について、コバラミンのCoに付加される化合物の光分解による放出は、リボース5'-OHに付加される蛍光体の励起スペクトルに基づいてチューニング可能であった。

20

30

【 0 1 1 3 】

表2~12は、蛍光体がアルキルコバラミンのリボース5'-OHに付加される化合物の特性を示す。

【 0 1 1 4 】

【表 2】

光分解条件	保持時間(分)	質量観測値	意味する構造
暗中	12.2	900.7 (M^{2+}), 600.8 (M^{3+})	Cbl-1
	10.0	665.1 (M^{2+})	ヒドロキシコバラミン
546 nm	12.8	486.2 (M^+)	TAMRA-1
	13.1	504.2 (M^+)	TAMRA-2
	13.7	470.2 (M^+)	TAMRA-3

10

表2. 暗中で保管され、546 ± 10 nmで20分間光分解 (Xeフラッシュランプ) されたCbl-1コンジュゲート (10 μM)

20

【 0 1 1 5 】

【表 3】

光分解条件	保持時間(分)	質量観測値	意味する構造
暗中	11.6	1013.6 (M^{2+}), 676.4 (M^{3+})	Cbl-3
646 nm	9.7	665.0 (M^{2+})	ヒドロキシコバラミン
	11.8	712.3 (M^+)	SulfoCy5-1
	12.0	730.2 (M^+)	SulfoCy5-2
	12.4	696.3 (M^+)	SulfoCy5-3

30

40

表3. 暗中で保管され、Xeフラッシュを用いて646 ± 10 nmで20分間光分解されたCbl-3 (10 μM)

【 0 1 1 6 】

【表 4】

光分解条件	保持時間(分)	質量観測値	意味する構造
暗中	12.3	893.2 (M^{2+}), 595.9 (M^+)	Cbl-4
646 nm	9.7	665.0 (M^{2+})	ヒドロキシコバラミン
	13.3	473.3 (M^+)	Atto725-1
	13.6	489.3 (M^+)	Atto725-2
	14.2	455.2 (M^+)	Atto725-3

10

表4. 暗中で保管され、Xeフラッシュランプを用いて730 ± 10 nmで150分間光分解された Cbl-4 (10 μM)

20

【0117】

【表 5】

光分解条件	保持時間(分)	質量観測値	意味する構造
暗中	12.9	1139.7 (M^{2+}), 760.4 (M^{3+})	Cbl-5
780 nm	9.9	665.0 (M^{2+})	ヒドロキシコバラミン

30

表5. 暗中で保管され、Xeフラッシュランプを用いて780 ± 10 nmで3 h光分解されたCbl-5 (10 μM)

【0118】

【表 6】

光分解条件	保持時間(分)	質量観測値	意味する構造
暗中	11.6	1179.9 (M^{2+}), 787.0 (M^{3+})	Cbl-6
700 nm	9.794	665.0 (M^{2+})	ヒドロキシコバラミン
	10.581	1061.0 (M^+), 531.3 (M^{2+}), 264.2 (M^{4+})	Alexa700-2

10

表6. 暗中で保管され、Xeフラッシュランプを用いて700 ± 10 nmで2 h光分解されたCbl-6 (20 μM)

【0119】

【表 7】

光分解条件	保持時間(分)	質量観測値	意味する構造
暗中	10.4	790.4 (M^{2+}), 527.4 (M^{3+})	AdoCbl
546 nm	2.6	284.1 (M^+)	アデノシン-1
	5.5	284.1 (M^+)	アデノシン-2
	9.6	664.9 (M^{2+})	ヒドロキシコバラミン
646 nm	10.4	790.4 (M^{2+}), 527.4 (M^{3+})	AdoCbl
730 nm	10.5	790.4 (M^{2+}), 527.4 (M^{3+})	AdoCbl
780 nm	10.4	790.4 (M^{2+}), 527.4 (M^{3+})	AdoCbl

20

30

40

表7. 暗中で保管され、Xeフラッシュランプを用いて546 ± 10 nm (20分)、646 nm (20分)、730 nm (150分)及び780 nm (3 h)で光分解されたAdoCbl (10 μM)

【0120】

【表 8】

光分解条件	保持時間(分)	質量観測値	意味する構造
暗中	11.7	1039.9 (M^{2+}), 520.4 (M^{3+})	AdoCbl-1
546 nm	2.5	284.1 (M^+)	アデノシン-1
	5.4	284.1 (M^+)	アデノシン-2
	11.6	914.3 (M^{2+}), 609.8 (M^{3+})	ヒドロキシコバラミン
646 nm	11.7	1039.9 (M^{2+}), 520.4 (M^{3+})	AdoCbl-1
730 nm	11.7	1039.9 (M^{2+}), 520.4 (M^{3+})	AdoCbl-1
780 nm	11.7	914.3 (M^{2+}), 609.8 (M^{3+})	AdoCbl-1

10

20

表8. 暗中で保管され、Xeフラッシュランプを用いて546 ± 10 nm (20分)、646 nm (20分)、730 nm (150分)及び780 nm (3 h)で光分解されたAdoCbl-1 (10 μM)

【 0 1 2 1 】

【表 9】

光分解条件	保持時間(分)	質量観測値	意味する構造
暗中	11.6	1152.7 (M^{2+}), 768.8 (M^{3+})	AdoCbl-2
546 nm	2.5	284.0 (M^+)	アデノシン-1
	4.9	284.1 (M^+)	アデノシン-2
	11.4	1027.4 (M^{2+}), 684.9 (M^{3+})	B _{12a} -SulfoCy5
646 nm	2.5	284.1 (M^+)	アデノシン-1
	5.3	284.1 (M^+)	アデノシン-2
	11.5	1027.0 (M^{2+}), 685.2 (M^{3+})	B _{12a} -SulfoCy5
730 nm	11.6	1152.5 (M^{2+}), 768.8 (M^{3+})	AdoCbl-2
780 nm	11.6	1152.7 (M^{2+}), 768.8 (M^{3+})	AdoCbl-2

表9. 暗中で保管され、Xeフラッシュランプを用いて546 ± 10 nm (20分)、646 nm (20分)、730 nm (150分) 及び780 nm (3 h) で光分解されたAdoCbl-2 (10 μM)

【 0 1 2 2 】

【表 10】

光分解条件	保持時間(分)	質量観測値	意味する構造
暗中	11.8	1032.3 (M^{2+}), 688.5 (M^{3+})	AdoCbl-3
546 nm	2.4	284.1 (M^+)	アデノシン-1
	12.3	906.8 (M^{2+}), 604.8 (M^{3+})	B _{12a} -Atto725
646 nm	2.6	284.1 (M^+)	アデノシン-1
	12.0	1032.3 (M^{2+}), 688.5 (M^{3+})	AdoCbl-3
	12.2	907.4 (M^{2+}), 605.0 (M^{3+})	B _{12a} -Atto725
730 nm	2.4	284.1 (M^+)	アデノシン-1
	4.4	284.1 (M^+)	アデノシン-2
	12.3	906.7 (M^{2+}), 604.8 (M^{3+})	B _{12a} -Atto725
780 nm	11.9	1032.4 (M^{2+}), 688.5 (M^{3+})	AdoCbl-3

表10. 暗中で保管され、Xeフラッシュランプを用いて546 ± 10 nm (20分)、646 nm (20分)、730 nm (150分)及び780 nm (3 h)で光分解されたAdoCbl-3 (10 μM)

【0123】

【表 1 1】

光分解条件	保持時間(分)	質量観測値	意味する構造
暗中	12.8	1279.6 (M^{2+}), 853.3 (M^{3+})	AdoCbl-4
546 nm	2.4	284.0 (M^+)	アデノシン-1
	4.9	284.0 (M^+)	アデノシン-2
	12.5	1153.5 (M^{2+}), 769.0 (M^+)	B _{12a} -Dylight800
646 nm	12.8	1279.0 (M^{2+}), 853.0 (M^{3+})	AdoCbl-4
730 nm	2.4	284.0 (M^+)	アデノシン-1
	4.7	284.1 (M^+)	アデノシン-2
	12.6	1154.2 (M^{2+}), 769.2 (M^{3+})	B _{12a} -Dylight800
780 nm	2.1	284.0 (M^+)	アデノシン-1
	12.4	1154.2 (M^{2+}), 769.2 (M^{3+})	B _{12a} -Dylight800

表11. 暗中で保管され、Xeフラッシュランプを用いて546 ± 10 nm (20分)、646 nm (20分)、730 nm (150分)及び780 nm (3 h)で光分解されたAdoCbl-4 (10 µM)

【 0 1 2 4 】

【表 1 2】

光分解条件	保持時間(分)	質量観測値	意味する構造
暗中	14.0	958.7 (M^{2+}), 639.5 (M^{3+})	Cbl-7
646 nm	9.6	665.0 (M^{2+})	ヒドロキソコバラミン
	16.9	586.3 (M^+)	Bodipy650-3

表12. 暗中で保管され、Xeフラッシュランプを用いて646 ± 10 nmで2 h光分解されたCbl

-7 (20 μ M)

【0125】

以下の実施例は、活性剤を例示の化合物とコンジュゲートでき、その後化合物から活性形態で放出できることを示す。特に、光活性化されるまで生化学的/生物学的に不活性な生物学的試薬は、生物学的活性のための官能基を共有結合的に修飾すること(例えば重要なヒドロキシル基からニトロベンジルエーテルへの変換)によって調製できる。コバラミン単独の応用の可能性は、Co-アルキル結合の光分解によって生物学的活性に一般には必要とされない官能基(アルキル、アルデヒド、ヒドロパーオキシド)が生じるために制限され得る。しかしながら、細胞の区画化性質を前提として、生物活性化合物は、光を用いてそれらの細胞内での局在を変更することによって、不活性形態から活性形態に変換できる。例えば、ミトコンドリアを標的化する細胞毒性剤をいくつかの他の細胞部分に隔離することによって、その毒性は妨害される。その後の光分解によって、細胞毒性剤がその細胞内の作用部位に移動し、それによって細胞死を誘発することができる。

10

【0126】

この実施例では、ミトコンドリアベースのメカニズムによって細胞毒性であるBODIPY(登録商標) 650蛍光体が付加されたCbl-7を調製した。コバラミン誘導体はエンドソームに取り込まれ保持され得るので、付加されたBODIPY(登録商標) 650部分(治療剤としての可能性がある)をエンドソームにトラップした。本明細書に記載したその他の実施態様と同様に、付加された蛍光体によって吸収された波長(蛍光分光計において646 nm)でCbl-7を光分解すると、対応する蛍光増大が生じた(220 \pm 30%, 表1, 図35)。その励起スペクトルに基づいて、Cbl-7は、700 nmを超える波長に影響されない(図36)。LC/MSデータは、646 nmの光によって、アルキル誘導体であるBODIPY(登録商標) 650-3が主に生じたことを明らかにした(図12, スキームS7, 表12)。

20

【0127】

エンドソームマーカーであるローダミンB-デキストランを用いて示されたように、Cbl-7はエンドソームに蓄積した(Mander係数0.77)。実際、暗中で5時間後であっても、Cbl-7はエンドソームに保持されていた(図39)。650 nm光でのCbl-7を含む細胞の照射は、蛍光分光計で観察されたもの(220 \pm 30%)に類似して、蛍光を増大した(230 \pm 6%, 図37~38)。加えて、650 nm光は、ミトコンドリアマーカーであるMitotracker(登録商標) Greenによって評価されたように、エンドソームからミトコンドリアへのBODIPY(登録商標) 650蛍光の移動を促進した(Mander係数: 0.97)。

30

【0128】

この実施例は、遠赤外線及び近IR蛍光体を用いて波長選択的に生物学的活性を制御できることを記載する。

組織に吸収されない波長域は、可視及び近IRスペクトル(600~1000 nm)からなり、光の組織浸透が最大となる。< 600 nmの領域は、循環系においてはヘモグロビンによって、皮膚においてはメラニンによって目立たず、>1000 nmの光は水によって浸透を妨害される。これらの考察は、生きている動物における細胞及び生化学レベルの情報を提供できる生体内イメージングのための試薬設計において重要である(Pittet 2011)。

【0129】

最適化された特性(光安定性、輝度、水溶性)を有する遠赤外及び近IR蛍光体のホストは商業的に入手可能であり(Owens 1996)、そのうちいくつかは臨床的用途が見出されている(Owens 1996; East 2009; Kiesslich 2003)。更に、組織に吸収されない波長域のサイズは、更なる機会を提供する: 「~600から1000 nmまでと組織に吸収されないイメージングのための波長域が大きいことは、イメージングチャネル同士間を通じての顕著な漏れなしに1回の実験で複数の蛍光プローブの使用を可能にし...マルチチャネルイメージングは、複数の標的又は予後指標の同時観察を容易にし、究極的には疾患診断の改善をもたらす可能性を大いに有している」(Hilderbrand 2010)。

40

【0130】

組織に吸収されない波長域でのイメージングのために確立されている進展および機会と

50

は際立って対照的に、生物学的活性を制御するための光の使用は、一般に短い可視波長を用いる単一試薬に制限されたままである。遠赤外及び近IR光を用いる生物学的制御のストラテジが近年記載されている(Shell 2014)。更に、このストラテジは、利用可能な遠赤外及び近IR蛍光体が多いことの恩恵を受けて、研究者が、予め決められた波長に特異的に、複数の生物活性剤の作用を独立して制御することを可能にする。

【0131】

光活性化剤の生物学的応用は、光媒介性の酵素インヒビター及びセンサー、抗がん療法、生物材料及び診断を含む生化学から医療まで多岐にわたる(Lee 2009; Lawrence 2005)。細胞内の時空的事象を調べるために、例えば、酵素センサー及びインヒビター、遺伝子発現アクチベーター及びタンパク質の光活性化可能な類似体が調製された(Dai 2007; Vel dhuyzen 2003; Wang 2006; Wood 1998; Lin 2002; Singer 2005)。3つの代表例は、光応答性剤の生物学的有用性を説明する：(a) コフィリンの光活性化可能な形態により、コフィリンが細胞のハンドルの要素として機能することが示された(Ghosh 2002; Ghosh 2004)；(b) 光活性化プロテインキナーゼC (PKC) センサーにより、PKC が分裂前期において活性であり、分裂中期への移行に必須であることが明らかにされた(Dai 2007)；(c) 天然物であるボナステロン5をベースとする光活性化遺伝子発現系により、単一細胞における遺伝子制御のための動態が解明された(Singer 2005; Larson 2013)。

【0132】

ニトロベンジル部分は、図40 (3~5)に示されるように、光除去可能な官能基として機能する。ある数のその他の光応答性の基が数十年にわたり紹介されているが、光感受性のニトロベンジルで修飾されたATP類似体が報告されたために、ニトロベンジル誘導体は、光応答性剤の構築のために用いられる標準的な光開裂性の基であり続けている。近年、この分野の試みは、二光子技術に注がれている(Aujard 2006; Gug 2008)。ある光開裂性の色素団は、2つの同時に吸収された(<1 fs)長波長光子のエネルギーを足し合わせることができ、そうでなければ、短波長(350 nm)で起きる現象を駆動するために近IR光(例えば>700 nm)を使用する機会を提供する。しかしながら、二光子技術には難題がある。まず、二光子による横断面は狭い平面に限られており、このことは、光放出可能な物質質量及び適用領域のサイズを制限する。より重要なことには、そして最近のレビューで特記されているように、効率的に光分解でき、かつ、生物学的条件下で用いることができる二光子感受性の保護基を得ることは「達成困難な目標のままである」(Bort 2013)。

【0133】

有機コバラミンの光分解。Barker及びその同僚が補酵素B₁₂ (6;式中R = 5'-デオキシアデノシル又はH)の光感受性を記載してから50年以上になる(Barker, 1958)。そのときから、広範多種のアルキル化コバラミン(アルキル化Cbl)が報告されている(Dolphin, 1964)。

【0134】

光は、Co³⁺-アルキル結合の均一な開裂を誘導し、まずCbl(Co²⁺) 7及びアルキルラジカル8産物を与える(図41のスキーム1)。その後、後者は、アルキル、アルコール及び/又はアルデヒド誘導体を生成し、一方Cbl(Co²⁺)は水と合わさってCbl(Co³⁺)(OH)を生ずる。この研究により、RCH₂= アデノシル及び他の様々な置換基であるこれらの産物が確認される。Cbl及びそのアルキル化されたカウンターパートは、340~380 nmの範囲の、~420 nmの、及び500~560 nmの広範な光を吸収する。これらのいずれかの波長での照射は、高い量子収量(0.1~0.4)をもってCo-アルキル結合の切断を誘導する(Taylor 1973)。これまで、Co-アルキル結合の光感受性は、光活性化可能な生物活性化合物を創り出すためには用いられてこなかった。

【0135】

有機コバラミンの遠赤外及び近IR光分解。Co³⁺-アルキル結合は弱く(<30 kcal/mol)、コリン環が吸収するものを超える波長(>560 nm)が、光開裂のためにエネルギー的に十分であることを示唆している。実際、算出値は、1100 nm程度の長さの波長が有機Cbl中のCo-C結合を開裂させるのに必要なエネルギーを有することを示している。「アンテナ」をCb

Iに付加して、長波長の光に関連付けられるエネルギーをCo-コリン環系に捕捉及び移動させることができるであろうか。「アンテナ」仮説は、Co (9)及びリボース環のヒドロキシ部分(10)に付加したアルキル鎖に多様な蛍光体を付加することによって検証されている(図42) (Shell 2014) :

(1) 全てのCbl-蛍光体誘導体は、付加される蛍光体(TAMRA (546 nm, 9/10)、sulfoCy5及びBODIPY(登録商標) 650 (646 nm)、Alexa Fluor(登録商標) 700 (700 nm)、ATTO 725 (727 nm)及びDylight(登録商標) 800 (777 nm)を含む)の励起波長で光分解を受けた。要するに、光分解の波長は、商業的に入手可能な蛍光体の励起スペクトルに基づいて容易に設計される。

(2) (1)の結果として、適切な波長での照射によって、最大4つの異なる有機Cbl誘導体の混合物から個々の化合物を選択的に光分解することができる。

(3) 以下に記載する生物活性種を含む多様なR基(10)を光放出させることができる。

【0136】

コバラミンからの生物活性種の光放出

光応答性の小分子は、一般に、光開裂性部分を有する生物活性に必須の官能基を修飾することによって調製されている。しかしながら、光応答性化合物を構築するためのより一般的なアプローチが、Cblで実現可能である。Cbl-コンジュゲートは、細胞に浸透性でないか、又はがん細胞の場合には、エンドソームに取り込まれ保持される(Bagnato 2004; Gupta 2008)。エンドソームへの隔離及び/又は細胞への不浸透性は同じ効果を有する：活性種は、意図された細胞内標的と相互作用することができない。このことを念頭において、3つのCbl-コンジュゲートを調製し、調査した(Shell 2014) :

Cbl- BODIPY(登録商標) 650 11: BODIPY(登録商標) 650はミトコンドリア毒素であるが(Kamkaew 2013; Awuah 2012)、コンジュゲートは暗中で非毒性である。650 nmでの照射は、がん細胞において、ミトコンドリアへのBODIPY(登録商標) 650の移動を急速に開始する。

【0137】

Cbl-cAMP 12: cAMPは、細胞骨格に顕著な効果を有するが、コンジュゲート12は、暗において、REF52線維芽細胞の挙動に対して不活性である。照射は、ストレス線維の喪失、細胞の縮小及び円形化、cAMP依存性タンパク質キナーゼシグナル伝達経路についての公知の結果を誘導する(Oishi 2012)。

【0138】

Cbl-ドキシソルピシン13: ドキシソルピシンは、広範に用いられる心毒性の抗がん剤である(Patil 2008; Volkova 2011)。HeLa細胞におけるこのコンジュゲートの細胞毒性を照射時間ごとに調べた。光だけの処理又は光分解なしの13への曝露は、細胞の生存能に対して効果を有しない。対照的に、13存在下における照射時間の増大によって細胞死が光量依存的に増大し、究極的にはドキシソルピシン単独による細胞死を再現している。

【0139】

要するに、遠赤外及び近IR蛍光体は、広範な臨床的应用ができる。次の実施例に記載されるように、これらの蛍光体を用いれば、波長選択的に生物活性を制御し、複数の光応答性種を時空的に制御できる。

【0140】

この実施例は、波長コード化光応答性分子構築物に関する。コバラミンベースの光応答性構築物の範囲及び制限を調査する。波長により制御されるコバラミン-薬剤コンジュゲート(赤色、遠赤外及び近IRにおいて活性である)のセットを得た。加えて、暗におけるチオラトコバラミンの安定性及び照射時における光開裂を促進する構造上の特徴を特定する。ペプチド療法の担体としてのチオラトコバラミンの応用性を評価する。

【0141】

この研究は、Cblベースの光応答性構築物の範囲及び制限に焦点を当てて、オルソゴナルに制御された波長応答性構築物のセットを特定し、治療用ペプチドの送達に用いるチオラトコバラミンの光化学的特性を調査する。

10

20

30

40

50

【0142】

波長コード化：オルソゴナルな制御の探索。前の実施例に記載されているように、4つの異なる種を、長波長～短波長、すなわち777 nm、700 nm、646 nm、546 nmの順次照射によって光分解した。(Shell 2014)この具体的な実験において用いる4つの蛍光体について、より長波長の蛍光体より短波長の蛍光体を励起する領域の光を吸収するので、選択的な活性化のためには順次的な光分解が必要であった。光によって開始する事象について所望の順序がある場合、順次的な照射は十分である。しかしながら、完全にオルソゴナルな制御は順序に依存しないので、生物学的制御の観点からより柔軟である。光応答性構築物の非干渉性のオルソゴナルなペアが特定されている：Cbl-SulfoCy5及びCbl-DyLight(登録商標) 800は、646 nm及び777 nmで光化学的に区別可能である(図44)。結果的に、それらは、具体的な照射順序を依拠する必要なく、個別に光によって操作することができる。この研究の目標は、光分解による放出の定量を確立すること及び波長特異的な応答物質のトリ-及びテトラ-オルソゴナルな基を特定することである。生物医薬的な合理性を以下の更なる実施例で検討する。

10

【0143】

広範多種の商業的に入手可能な赤色、遠赤外及び近IR蛍光体がある：PromoFluor (Promokine)、DY (Dyomics)、ATTO (Atto-TEC)、HiLyte(登録商標) Fluor (AnaSpec)、Alexa Fluor(登録商標) (Invitrogen)、DyLight(登録商標) (Pierce)等。これら蛍光体の多くについての光物理的特性のまとめは、fluorophores.orgウェブサイトで見つけることができる。

20

【0144】

紙面の制限上膨大な可能性についての詳細な議論はしないが、2つの実施例によって、以下で採用するストラテジを説明する。トリ-オルソゴナルな基：ATTO 594 (λ_{ex} 602 nm), IRDye700DX (λ_{ex} 689 nm)及びPromo-Fluor-840 (λ_{ex} 843 nm)。テトラ-オルソゴナルな基：ATTO 594 (λ_{ex} 602 nm), IRDye700DX (λ_{ex} 689 nm), DY-751 (λ_{ex} 751 nm)及びPromo-Fluor-840 (λ_{ex} 843 nm)。励起波長が重複しないように蛍光体を選択した。記載されるようにして、これらの蛍光体を含むメチル-Cbl誘導体(14)を合成する(図45)(Shell 2014)。

【0145】

波長指向性で化合物特異的な光放出を選択性(任意に20倍に設定する)について評価する。この基準を満たさない蛍光体-Cblは、その他の商業的に入手可能な蛍光体で置き換える。

30

【0146】

吸収/励起スペクトルが特定の波長における光感受性を予測するための手引きとして機能するが、蛍光体の消光係数、蛍光体からCblへのエネルギー移動の効率及び量子収量()のような変数は、2以上の蛍光体-Cblを区別できる度合に寄与する。光分解速度は、これらの誘導体の波長選択性の定量的評価のために、全ての化合物(14)についての波長ごとに得るべきである。産物の生成速度は、吸収分光法によって容易に評価される；光分解産物(15)のスペクトルは、出発物質であるアルキル-Cbl 14のそれとは著しく異なる(図45)。

40

【0147】

第二に、リード蛍光体で置換されたコンジュゲート(14)の指定波長における λ_{ex} を測定することができる。 λ_{ex} によって、波長ごとの光感受性/光放出の減少を定量できる。 λ_{ex} は、典型的には、同時に起こる標準物質の光分解によって測定(「化学光量計」)されるが、 $K_3[Fe(C_2O_4)_3]$ (250～500 nm)及びメソ-ジフェニルヘリアントレン(475～610 nm)の両標準物質は、いずれも、我々の技術に必要な波長帯域を欠いている。測定された照射量を用いるある方向からのサンプル照射及び光源に対する90°における光分解産物(15)の定量によって行うアルキル-Cblの λ_{ex} の直接的な評価を開発する。

【0148】

メトトレキサート(16)及びデキサメタゾン(19)のCbl誘導体(17及び21)の波長依存的な光

50

放出も評価することができる(図46)。いずれの薬剤もRA治療に常用されている。(16)において蛍光を付したカルボキシレートは活性に必須ではなく、(ペプチド、抗体及びポリマーを含む)様々な置換基がこの部位にコンジュゲートされてきた(Majumdar 2012; Wang 2007; Everts 2002)。この議論に最も関係があるのは、所期の光分解産物(18) ($X = H, OH$)に類似/同一である、抗炎症性のN-アルキルカルボキサミドMTX誘導体の配置である(Heath 1986; Rosowsky 1986; Piper 1982; Rosowsky 1981; Szeto 1979)。DEX (19)もまた、その他の多くの短鎖アシル化DEX誘導体(例えば22)と同様に、皮膚/眼球の透過性を促進する(Markovic 2012; Civiale 2004)又は水溶性の低さに起因して筋肉内デポ製剤として注入されるときに放出持続型として機能する(Samtani 2005)ように設計されているアセテート(20) ($R = Me$)として医薬的に利用可能である。(17)及び(21)の波長による区別が可能な型は、LC-MSによって、及び後の実施例に記載の細胞ベースの研究においては商業的なELISAキットによって、緩衝液中で評価される。(17)及び(21)は、Cblからの光放出前又は後に活性又は不活性であるように設計されていない(図46)。

10

【0149】

光応答性チオラトコバラミン。抗炎症性ペプチドベースの剤は大きな注目を受けている(Luger 2007; Bohm 2012)。(17)のようにCbl-アミノ手(handle)又は(20)のようにCbl-カルボキシル手にペプチドをカップリングさせることは確かに可能であるが、所定のペプチドフレームワークに複数の求核物質又は求電子物質が存在する蓋然性は、このような合成アプローチを面倒にし得る。このことを念頭において、チオラトコバラミン(チオラト-Cbl)を調製し、特性を調べた。

20

【0150】

チオラト-Cbl (24)は容易に調製される：単純に、中性かつ水性の好氣的条件下にメルカプタン(23)を置く(図47、スキーム2)。グルタチオン-Cbl (25)は、ビタミンB₁₂の主要な細胞内形態の1つである(Pezacka 1990; Brasch 1999)。N-アセチルCys (26) (図48)を含む少数のその他のチオラト-Cblが記載されている(Pezacka 1990; Brasch 1999)。

【0151】

空気中での光分解により、Co(III)種に酸化されるCo(II)-Cbl産物、及びジスルフィド又は酸化物に変換されるチルラジカルが生じる(図47、スキーム2)(Tahara 2013)。蛍光体で置換されたN-アセチルCys-Cbl誘導体(27)の光開裂を調べ、非標識チオラト-Cbl ((27)において $R = CH_3$)が400 nm未満の波長で光分解されるだけであることを見出した。しかしながら、(27)の蛍光体で置換された誘導体は、蛍光体によって吸収される波長で光開裂する。以下の疑問に対処する：

30

【0152】

(i) 光応答性チオラト-Cblの調製のための構造的な要件は何か。プロテインキナーゼの基質(28)のいくつかのCbl-Cys類似体(30~33)を調製した(図49)。(33)を除く全てのCbl-ペプチドが暗中で安定である。暗中で安定なCbl-ペプチドの光開裂速度は著しく変化する： $(32) (12x) > (31) (2x) > (30) (1x)$ 。これらの結果は、近傍の官能基が光化学的な開裂速度及び暗中における安定性に影響することを示唆する。特に、直近のミクロ環境は、光で生成した高親和性の[Co(II)Cbl/チル]ラジカルペアの分離能力に影響し得る(これは光分解率を制御することで知られている)(Peng 2010)。

40

【0153】

暗中での安定性を確実にするが急速な光分解による放出を促進するそれらのCys-Cblミクロ環境を特定することができる。このことは、Ac-Xaa-Cys-Yaa-アミドトリペプチドのCblコンジュゲートの安定性及び光応答性を調べることによって評価される。Xaa及びYaaの位置で19の異なるアミノ酸を含む(CysはXaa及びYaaから排除される)ペプチドライブラリを調製する。1ウェル当たり1ペプチドで合成された361-メンバーのライブラリを、(i) HO-Co^{III}-Cblに曝露して、対応するペプチド-S-Co^{III}-Cblコンジュゲートを調製する。(ii) 吸収分光法によって、コンジュゲートの暗中における経時的な安定性；及び(iii) 波長ごとの光開裂速度(360、440及び550 nm)を評価する。これは、局所的な構造がCys-Cblの暗安定性/光応答性にどのようにして影響するかについての情報を提供し、したがっ

50

て暗中安定性及び光開裂を促進する配列を特定する。非天然構造の特徴を調べることも可能である(Lee 1999; Lee 2000; Yeh 2001)。

【0154】

(ii) チオラト-Cblは波長指向性でオルソゴナル制御に感受性であるか。単純なチオラト-Cblは短波長(<400 nm)での光分解にのみ感受性であるが、蛍光アンテナ(例えばクマリン、Cy3、Atto550; 27参照)を付加することにより、より長波長において光応答性となり得る。光応答性は550 nmにまで広がる。(27)に一連の遠赤外及び近IRアンテナを挿入できる(ここでは、NAcCysは、ペプチドライブラリ研究から特定されたリードで置き換えられる)。暗中安定性、光応答性及びオルソゴナルな波長応答性の試薬セットが得られるかを調べる。光分解速度及び を得る。

10

【0155】

(iii) ペプチドベースの生物活性種をチオラト-Cblから放出できるか。Xaa-Cys-Yaaのリード配列が特定され、遠赤外/近IRにおけるオルソゴナルな波長指向性光放出が実行可能であると仮定すれば、2つのペプチドベース抗炎症性剤が付加されたCbl-トリペプチドコンジュゲートの暗中安定性/光応答性を調べることができる: 13アミノ酸の -メラニン細胞刺激ホルモン(-MSH) (Getting 2009; Luger 2007)及びアネキシン-1ペプチドフラグメントAc2-26 (Yang 2013)。

【0156】

添付のライブラリで特定されたCys含有トリペプチドを含む遊離ペプチドの生物活性をここで記載されるようにして評価する。万一、ペプチドが生物学的に不活性である場合には、Xaa-Cys-Yaaと抗炎症性ペプチド配列との間にスペーサー(例えばSer-Gly)を挿入する必要がある。ペプチドの生物活性が確認されれば、一般式(27)の蛍光体-Cbl-ペプチドを調製する。波長ごとの暗中安定性及び光分解の比速度をこれらの各々について記録し、対比する。チオラト-Cblの光物理的特性が不十分である場合には(例えば暗中において不安定である、遠赤外光で照射時に放出が乏しい等)、ヒュスゲン反応のような生物学的に正統な化学的手法を用いて、適切に誘導体化されたアルキル-Cblにペプチドを付加することは実行可能である(Best 2009; Kolb 2001)。

20

【0157】

この実施例は、波長コード化薬剤送達を記載する。生物活性剤が赤血球の膜の高密度で集合したタンパク質の覆いに隠れ、その後光放出され、治療剤、セカンドメッセンジャー及び酵素センサーを含む活性種を生成することが証明されている。この確認済みのストラテジを、その他の実施例で開発された波長コード化構築物と組み合わせて、薬剤放出ビヒクルの新たなファミリーを創出する。このストラテジは、複数の薬剤放出のタイミング及び空間を別々に制御するための潜在能力ある手段を提供することに加えて、血液のタンパク質分解性の環境から治療用ペプチドを保護するための潜在的可能性のある一般的アプローチを提供する。

30

【0158】

波長コード化薬剤送達。今回は、NSAID、グルココルチコイド及び疾患修飾性抗リウマチ薬(DMARD)の混合物を用いてRAを治療する。DMARDは疾患の進行を遅らせ、一連の小分子を含む: 数例挙げると、MTX (16) (図46)、クロロキン、シクロスポリンA、D-ペニシリン、様々な金属塩及びスルファサラジン。「生物製剤」は、DMARDの比較的新たなファミリーであり、抗体ベースの剤であるインフリキシマブ、エタネルセプト、アダリムマブ、セルトリズマブ及びゴリムマブを含む(Kukar 2009)。加えて、いくつかのペプチドベースの剤は、並外れたDMARD挙動を示しているが、殆どのペプチドにとって悩ましい薬物動態特性によって制限されている(Luger 2007; Bohm 2012)。これらの薬剤全てについて光活性化可能な形態を創出することは現実的ではない。代わりに、グルココルチコイド(DEX, 19)、DMARD (MTX, 16)及び2つのペプチド(-MSH及びAc2-16)を用いて、波長コード化薬剤送達の有用性を調べる。以下で概説するアプローチは、RA貯蔵庫における薬剤の殆どでなくとも多くに適用可能である。

40

【0159】

50

光放出可能な表面積込み型治療薬の担体としての赤血球。これらの実施例で概説する研究は、新たなシリーズの遠赤外/近IR光応答性剤の光物理的特性を調査するために設計されている。Cblは、それらの活性を妨害しない形で、意図的に生物活性剤に組み込まれる(すなわち17、21及びペプチド)。代わりに、生物活性を制御するための代替法を開発した：細胞の膜の高密度に集合したタンパク質の覆いに生物活性剤を隠し、その後光放出し、活性剤を生じさせる(図50) (Nguyen 2013)。このストラテジにおいては、隠れた生物活性剤とその脂質アンカーとの間に光開裂性の基を挿入する。この実施例は、このこと及び類似のストラテジを用いて、波長コード化薬剤送達ビヒクルを構築しようとするものである。

【0160】

上記のとおり、赤血球は、「薬剤送達システムの王様」として記載されている(Muzykantov 2010)。生物活性剤を含む薬剤は、赤血球の内部に、又はその細胞表面に付加することにより、容易に導入できる(Muzykantov 2013)。図50に示すように、RBC表面の慣用のニトロベンジル基(35) (Nguyen 2013) ($\lambda = 360$ nm)及びCbl種(36) ($\lambda = 550$ nm)を用いる表面ストラテジは、プロテアーゼ及びプロテインキナーゼセンサーを隠し、光放出する(図51)。これらの研究は、ヘモグロビンの大半が除去されたRBCゴーストを用いて行った。しかしながら、ゴーストは、正常な赤血球の循環寿命を欠いている。光放出を制御して通常のRBCを光応答性薬剤担体として用いるために、ヘモグロビンの吸収範囲を超える波長を用いてもよい。

【0161】

図50の脂質アンカーの主な要件は3つである：(i) 疎水性部分、(ii) 蛍光体及び(iii) Cblが付加する部位。多くの選択肢を利用できるが、まず、RBC膜に包埋された光放出性の誘導体(35)及び(36)を首尾よく提供したものと類似のストラテジを用いる(Nguyen 2013; Smith Unpublished Results)。リジン誘導体(37) (図52)を調製する；合成プロトコル(Leschke 1997)は、一連の蛍光体及び脂質を用いるために必要な柔軟性を提供する。蛍光体 = アセチルである誘導体をコントロールとして用いて、様々な波長における光放出速度を対比する。薬剤は、アミド(MTX; 17)、エステル(DEX; 21)、チオラト- (ペプチド; 27)又はそれらの変形としてCblに付加される。以下のことを調査する：(i) RBCからの生物活性剤の波長依存的な放出及び(ii) RBC-Cbl-薬剤混合物に対する波長依存的なオルソゴナル制御。

【0162】

小分子及びペプチドはいずれも、RBCのタンパク質の覆いに隠れることができることが証明されているが(Nguyen 2013)、-MSH及びAc2-26のようなより大きなペプチドがRBC表面の1つの部位を介して付加されるときに(図50a)、それらの生物学的受容体にとって利用不可能であるか否かはわからない。したがって、(iii)当該形態の誘導体も調べる：Xaa-Cys(Cbl-脂質)-Yaa-ペプチド-Xaa-Cys(Cbl-脂質)-Yaa。RBC表面の2つの部位における付加(図50b)によってペプチドが膜と平行になり、光放出されるまで生物学的に利用不可能となると推定される。最後に、とりわけプレートに置かれた線維芽細胞(RBCは非付着性である)の存在下におけるこれら誘導体の(iv)暗中安定性を調べる。具体的には、RBC膜から線維芽細胞の膜へのリピド化Cblの望ましくない移動が暗中でのインキュベーション時に起こるか否かを調べる。これらの実験は、RBC膜から浸出する可能性がある別の種(37)であるアルブミンを含む血清の存在下で行う。RBCからその他の細胞又は可溶性タンパク質へのリピド化Cblの望ましくない移動が観察されれば、 C_{18} アンカーを(a) 膜親和性を向上させるためにジアシルホスホリピドで置き換えるか、又は(b) RBC膜にCbl部分を共有結合的に付加する。

【0163】

光放出可能な内部積込み型治療薬の担体としての赤血球。薬剤は、赤血球の内部に積めてもよい。例えば、RBCは、遊離の薬剤単独よりも寿命が向上したDEXを継続的に送達するために用いられている(Rossi 2006)。薬剤の積込みは、RBCを低張性溶液に曝露する(これにより膜中に小さな孔が形成される)ことによって容易に達成される。薬剤を取り込んだ

10

20

30

40

50

後、等張性溶液を用いて孔を閉じる。この手順は極端に穏やかで、RBCの機能的完全性を維持する(Muzykantov 2010; Biagiotti 2011)。次いで、薬剤を含むRBCを患者に再び導入する。

【0164】

DEXは、不拡散性かつ細胞不浸透性の薬剤の形態であるDEX-21-ホスフェートとして、RBCに積む。DEX-21-ホスフェートは、RBC中でゆっくりと加水分解して、DEX（これは赤血球の外に拡散する）を生成する。このゆっくりと放出される形態のDEXは、嚢胞性線維症、血管拡張性運動失調、潰瘍性大腸炎及びクローン病の治療薬として様々な臨床試験がなされている(Rossi 2004; IEDAT01; Bossa 2008; Castro 2007)。DEX-21-ホスフェート/RBCは、潜在的に一般的なストラテジのためのモデルとして機能する：RBC中における薬剤の細胞内隔離。Cbl誘導体が膜浸透性ではないので、蛍光体-Cbl-薬剤は、RBCから漏れ出さないと推定される。薬剤-Cbl結合の光分解時に、切り離された薬剤は自由にRBCから逃れる。

10

【0165】

以下の疑問を調査する：(i) 蛍光体-Cbl-生物活性剤を低張積込みによってRBCに導入し、暗中で保持できるか。(ii) 適切な波長における照射時に生物活性剤は放出され得るか。

【0166】

更に、RBCの適切な代替物として機能する多様なナノテクノロジーを利用できる。例えば、メソ多孔性シリカナノ粒子は、多様な薬剤を積んだハニカム構造中に数百の空のチャンネルを含む(Vivero-Escoto 2010; Li 2012; Coll 2013)。これらのチャンネルは、光開裂性の種を含む矢印の部分でキャップされている(Croissant 2013; Mal 2003; Wan 2013)。チャンネルキャッピング剤の光による除去は、薬剤の放出をもたらす。チャンネルの直径は、小さな薬剤からタンパク質までをカプセル化するように変えることができる(Popat 2011)。結果的に、蛍光体-Cblでのチャンネルキャッピングは、波長により規定される様式で薬剤、ペプチド及びタンパク質を放出するための手段を提供する。メソ多孔性シリカナノ粒子(及びその他のナノテクノロジー)は、光コード化ストラテジへの応用に有用な構築物として機能し得る。

20

【0167】

この更なる実施例は、部位標的化抗炎症剤のオンデマンドでの制御を検出するための、波長コード化薬剤特異的放出を記載する。波長コード化薬剤送達ストラテジの効果は、複数のヒト細胞株ベースの動脈/滑膜界面3Dモデルを用いて評価する。ある特定の構築物の光依存性及び波長依存性の能力は、動脈内皮、免疫系及び滑膜の細胞モデルにおける炎症促進性のシグナル及び細胞接着分子の発現をブロックし得る。ずれ流動条件下における関節炎滑膜モデルへの白血球の経内皮的な移動をブロックするこれらの剤の能力を調べる。更に、波長コード化薬剤送達を用いて、血管系-滑膜関節界面3Dモデルにおいて特定の治療剤を分配できるか否かを調べる。

30

【0168】

波長コード化薬剤特異的放出：部位標的化抗炎症剤のオンデマンドでの制御の評価

関節炎動脈/滑膜界面の複数ヒト細胞株ベース3Dモデルを用いて、波長標的化薬剤送達の効果の評価する。関節炎滑膜に関与している炎症を起こした内皮血管系は、白血球(例えば単球、CD4+ T細胞)を引き付ける炎症促進性サイトカインを放出する。白血球は、細胞接着分子(CAM)によって、炎症を起こした内皮に結合し、その後血管壁を通じて滑膜に移動する。更なる細胞事象(単球マクロファージ)及び生化学的事象(白血球による炎症促進性シグナルの放出)を生じ、これらは究極的には滑膜関節の構成要素の損傷をもたらす。MTX及びDEXは、これら及びその他の炎症促進性のシグナル/挙動をブロックする。加えて、-MSH及び関連する誘導体は、「ステロイドの打撃的な特性を有するが副作用はない」と記載されている(Getting 2009)。残念ながら、-MSHは、血中で急速にタンパク質分解を受ける(Catania 2004)。また、ペプチドAc2-26は、素晴らしいRA抗炎症作用を示す(Yang 2013)。

40

【0169】

50

いくつかの剤の特性を評価するために、単独および3Dコンビネーションの両方で、4つの細胞タイプを調査する：(i) HMEC-1は、血管内皮のまさに最良のモデルの1つと一般に考えられている内皮細胞(EC)株である。代替のEC株として、商業的に入手可能なHUVECも用いられる。(ii) THP-1は、「血管炎症中の単球-マクロファージとその他の血管細胞との相互連絡の役割に関する知見を得る」ために、一般に用いられる単球細胞株である。加えて、商業的なキットを用いて、RA末梢血単核細胞(PBMC)から単球(CD14+)を単離する。(iii) T細胞は、最大50%の滑膜組織細胞(これらの殆どがCD4+である)を含む。それらは、同様にRA PBMCから単離される。(iv) RA患者からのヒト滑膜細胞を用いて、滑膜細胞環境をモデリングする。

【0170】

これらの実施例における光応答性剤は、水溶性(ws)で単分子の物体であるが、その他は担体(RBC又はメソ多孔性シリカ)と結合されている。「ws」及び「rbc」は、Cblが付加される薬剤の性質を指す。例えば、 MTX_{ws} は、水溶性のCbl結合MTX誘導体である。(i) 生化学的レベル及び(ii) 細胞レベルで、及び(iii) 多重波長制御を用いて、以下の一連の実験を行う：

【0171】

(i) 生化学的制御：HMEC-1及びTHP-1細胞株はいずれも、サイトカイン(IL-1、IL-6、IL-8及びTNF)の産生及び放出による炎症の活性化、細胞表面CAM(ICAM-1、VCAM-1、E-セレクチン)の発現及びNF- κ Bの活性化に応答する；生化学的応答は、MTX、DEX、Ac2-26及びMSHによって阻害されることが知られている(Luger 2007; Everts 2002; Chan 2010; Chen 2002; Nehme 2008; Joyce 1997; Peshavariya 2013)。加えて、MTXは、HMEC-1及びリンパ球におけるアデノシン放出を促進することが知られている(Morabito 1998)。

【0172】

アデノシンの抗炎症性は、CAM産生のブロッキングに少なくとも部分的に帰せられる(Linden 2012)。HMEC-1/HUVEC、THP-1/単離された単球、及び白血球において炎症応答を波長依存的に抑制するCbl-剤の能力を調査する。ここでは、1つの実施例を明示して議論し、行った実験を例証する。

【0173】

MSH_{rbc} ：赤血球表面のタンパク質の陰に隠れたMSHは、光放出されるまで、他細胞の受容体と相互作用することができないと推定される(図50)。加えて、タンパク質分解に対する MSH_{rbc} の安定性を評価する。MSHの極めて有望な抗炎症性にも拘らず、IV投与されたときのその半減期は、血清プロテアーゼに起因して、たった数分に過ぎない(Bohm 2012; Catania 2004)。その他のペプチドが、RBCのタンパク質の覆いに隠れるときに、光放出されるまでタンパク質分解から保護されることが以前に報告されている(Nguyen 2013; Smithの公表されていない結果)。MSHに作用することが既知のプロテアーゼの存在下におけるMSH及び MSH_{rbc} (図50；1つ及び2つの部位に付加)のタンパク質分解に対する相対的安定性が測定されている(Bohm 2012)。血清中における相対的安定性も評価されている。生物学的サイレンス及びタンパク質分解に対する安定性を確実にするために、ペプチドの脂質アンカー部位を変化させる必要があり得ることに留意する。最後に、その他の抗炎症性物質とは異なり、MSHは、CD4+ T細胞を制御性T細胞(Treg)(これは、免疫応答を著しく阻害するために機能し、自己免疫疾患の有望な治療に大いに関与する)にトランスフォームすることが知られている(Wright 2011)。CD4+ T細胞からTregへの光依存性 MSH_{rbc} トランスフォームは、以前に記載されたプロトコルを用いて評価する(Taylor 2011)。

【0174】

これらの実施例のCbl-試薬の大半は、照射の前後で生物活性である(すなわち、サイトカインの活性化及びCAM発現をブロックする)。Cbl付加物がDEX置換基を膜不浸透性にし、よって光分解前に細胞内受容体に結合できないと推定されるため、DEX-Cbl_{ws}は例外である蓋然性が高い。対照的に、全てのRBC-ベースのCbl-試薬は、光放出されるまで不活性なように設計されていると推定される。

【0175】

10

20

30

40

50

(ii) 細胞性の制御：RAの特徴は、滑膜/滑液膜への/における白血球の動員及び蓄積である。関節炎滑膜への白血球の経内皮的な移動は、白血球及び内皮細胞(EC)の両方によって媒介される。この移動(及び薬剤による妨害)のインビトロモデルは、一般に、コラーゲンゲル上で培養されたEC単層からなる(図53)(Muller 2008; Shulman 2009)。走化性物質(例えばRANTES、MCP-1)に応答しての、活性化された(TNF) EC単層を横切るRA患者から単離されたTHP-1細胞及び単球の移動を定量する。暗中における及び予め照射されるときにの経内皮的な移動をブロックするDEX_{ws}、MTX_{ws}、MSH_{ws}、Ac2-26_{ws}、DEX_{rbc}、MTX_{rbc}、MSH_{rbc}及びAc2-26_{rbc}の能力が特記されている。抗炎症薬の光放出は、TNF で刺激されるEC CAMの発現/RANTESで刺激された単球を抑制することによって、経内皮的な移動をブロックすることが期待される。ここでは、1つの実施例を明示して議論する。

10

【0176】

刺激されたRA内皮を標的化するいくつかのノナペプチドを含む広範多種の「RGD」ペプチドが細胞接着を促進することが記載されている(Yang 2011; Wythe 2013; Lee 2002)。GRGDSY 配列は、ポリマーに付加されたときであってもECに結合することが知られているので(Lin 1992)、最初の研究に用いる。一般構造が脂質-CbI-スパーサー-GRGDSYの様々な類似体を調製し、RBC細胞表面にこの脂質-ペプチドコンジュゲートを挿入する(図54a)。次いで、内皮単層移動アッセイ系にRBCを導入する。他者がRGDで修飾されたRBCを記載しており、これらがECに結合することが示されていることに留意する(Fens 2010)。これらの以前に記載されたRBCは、表面のタンパク質にRGDペプチドを共有結合的に付加することによって調製したが、本明細書に記載される脂質をアンカーとするRGDペプチドは、類似の挙動を示すと推定される。顕微鏡観察によって、及び単球のゲル層への移動が、結合したRBCによってブロック/妨げられるとの期待によって、内皮単層へのRBC結合を確認する(図54b)。細胞表面からのRGDペプチドの光開裂によって、内皮単層からRBCが放出され、単球の結合/移動を回復する。

20

【0177】

RBC/ECの接触が記載したとおりに起こると仮定して、トランスウェル法を用いて、ECと接触しているRBCからの抗炎症薬の光放出(図55a)が溶液中で遊離しているRBCからの放出(図55b)よりも強力な効果を示すか否かを評価する。これは、図55a及び図55bにおいて等量のRBCに曝露されたECからの炎症性タンパク質発現レベル[生化学的制御(i)]を比較することによって分析する。

30

【0178】

RBCから放出された抗炎症剤が、RA患者から単離された活性化(CD3及びCD28)T細胞及び滑膜細胞において炎症性の生化学的応答を下方調節する能力も評価する。これらの細胞をトランスウェルプレートの下側チャンバに置くことにより、内皮バリアにより動脈系から分離された関節炎滑膜の3Dモデルとする。RBC放出時の MSH及びAc2-26は、内皮単層を横断し、下側チャンバにおける炎症性の挙動に影響することができ得るであろうか。これらの実験は、MSH及びAc2-26のタンパク質分解に対する安定性(図55a/55b参照)を攻撃するために、上側チャンバにおける血清の存在下で行う。最後に、上側区画が流入口及び排出口を有し、ずれ流動条件を模倣するチャンバが開発されている(Muller 2008)。フローチャンバーは、光活性化のための搭載されたレーザー及びイメージ撮像のためのデジタルレコーディングと一体化された独自の顕微鏡に取り付けることができる。

40

【0179】

前のセクションで議論したように、水溶性CbI-ペプチドは、タンパク質分解に感受性である。小さなキャピラリー中における長時間のRBC/EC接触(図55a)は有害であり得ることに留意する；したがって、薬剤放出後のRBC排出は重要である。

【0180】

(iii) 多重-波長制御：いくつかの実施態様において、本開示は、特定の波長を用いて異なる抗炎症剤の放出を制御する能力を有する化合物の実施態様を提供する。最初の実験は、異なる薬剤を含むRBCの混合物からの波長特異的な放出を調べる。

【0181】

50

DEX (Neogen Corporation)及びMTX (Alpha Labs)検出のためのイムノアッセイは商業的に入手可能であり、MSH及びAc2-26ペプチドは、LC-MSによって検出可能である。関節炎動脈/滑膜モデルを用いて、図55aのストラテジの拡張を続ける。

【0182】

理論に拘束されることを望まないが、内皮単層にRBCをドッキングすること、1つの波長で薬剤という積荷を降ろすこと、及び第2の波長でRBCを切り離すことは実行可能であると考えられる。その光開裂性Cbl (脂質-Cbl-スパーサー-GRGDSY、図54a)を有するリビド化RGDペプチドは、このアプローチに従う。究極的には、光誘導されたRBCのドッキング、薬剤の積降し及びRBC切離しによってこのことを更に拡張し得る。要するに、この技術は、薬剤の拡散性の変更、細胞表面からのペプチド/薬剤の放出、及び細胞の付着/切離しを含む複数の生物学的現象を別々に制御する可能性を提供するので、大いに実行可能である。

10

【0183】

この研究において、光活性化可能な剤の創出のための新たなストラテジが開発されており、これは1978年から定番のアプローチからの著しい発展に相当する。これらの剤は、組織に吸収されない波長域で作動するだけでなく、特定の波長に応答するようにコード化され得る。一連の、波長で惹起される抗炎症薬/コバラミンコンジュゲートを調製する。後者は、「薬剤送達システムの王様」RBCを用いて送達され、長波長応答性構築物の利用可能性に起因して今や実行可能である。加えて、タンパク質分解に感受性のペプチドがRBC細胞膜のタンパク質の覆いに「隠れる」ことができることが証明されており、このことは、治療剤としてのペプチドを送達するための有望な、可能性のある一般的ストラテジを提供する。最後に、時空的に制御された薬剤送達の治療的有用性は、関節炎動脈/滑膜界面を模倣するように設計された複数のヒト細胞株ベース3Dモデル系を用いて調べる。

20

【0184】

次いで、高度に選択的な薬剤送達のための赤血球膜からの抗炎症剤の近IR媒介性放出の特定例の合成プロセス及び特徴について記載する。

図56は、Cbl-1 (メトトレキサート)、脂質尾部なしのCbl-2 (メトトレキサート)、Cbl-3 (コルヒチン)、脂質尾部なしのCbl-4 (コルヒチン)、Cbl-5 (デキサメタゾン)、Cbl-6 (TAMRA)、Cbl-7 (フルオレセイン aka FAM)を含む薬剤/蛍光体B12コンジュゲートの構造を示す。図57は、蛍光体アンテナの構造を含む。

30

【0185】

膜アンカー1の合成(図58): オクタデシルアミニルシアノコバラミン(1): シアノコバラミン(200 mg, 148 μ mol, mw = 1355)を10 mLの無水DMSOに溶解し、CDT (121 mg, 740 μ mol, mw=164)を添加する。溶液を45分間攪拌する。急速に攪拌されているこの溶液に、オクタデシルアミン (398 mg, 1.48 mmol, mw=269)を添加する。得られた混合物を1時間攪拌し、90 mL エーテル/クロロホルムに添加する。得られた沈殿を遠心分離及びデカンテーションによって回収する。ペレットを真空中に乾燥させ、10 mL EtOHを加える。二量体化されたオクタデシルアミンは白色の沈殿物を形成する。これを遠心分離によって除去し、コバラミンを40 mL エーテル/クロロホルム中で沈殿させ、遠心分離及びデカンテーションによって回収する。ペレットをEtOH中に溶解させ、8カラム容量中で0~100%のH₂O:MeOH線形勾配を用いて100 g C18フラッシュカラムで精製する。C₁₈で修飾されたコバラミンを100% MeOHで溶出し、75%の収率で得る(Grissom, C; Lee, M. Org. Lett. 2009, 11, 2499-2502)。

40

【0186】

オクタデシルアミニルコバラミン (1): 赤色の固体, 75%, C₈₂H₁₂₅CoN₁₅O₁₅P⁻ (M²⁺) について算出したESI MS = 825.98, 観測値(Grissom, C; Lee, M. Org. Lett. 2009, 11, 2499-2502)。

【0187】

膜アンカーの合成: 2a (図58): 3-アミノプロピルオクタデシルアミニルコバラミン(2a): 1 (100 mg, 61 μ mol, mw=1651)を10 mLのEtOHに溶解させ、N₂下で脱気する。NH₄Br (

50

500 mg, 5% w/v) 及び Zn 粉末 (200 mg, 3 mmol) を添加し、N₂ 下で 20 分間溶液を撹拌する。このスラリーに 3-クロロプロピルアミンヒドロクロリド (40 mg, 305 μ mol, mw=130) を添加する。得られた混合物を継続的な N₂ 流下で 3 時間撹拌する。赤色から橙色への色の変化を観察する。遠心分離によって亜鉛を除去し、エーテル:クロロホルム (50 mL) 中でコバラミンを 2 回再結晶化させる。得られた沈殿を遠心分離及びデカンテーションによって回収する。ペレットを真空下に乾燥させ、10 mL EtOH を添加する。UV-Vis 分析により、アルキル化が完全に行われたことを明らかにする。8 カラム容量中で 0 ~ 100 % の H₂O:MeOH (0.1% TFA) 線形勾配を用いて 100 g C₁₈ フラッシュカラムで 2a を精製する。2a を 100% MeOH で溶出する。

【 0 1 8 8 】

3-アミノプロピルオクタデシルアミノコバラミン (2a): 橙色の固体, [収率不明], C₈₄H₁₃₃CoN₁₅O₁₅P⁻ (M²⁺) について算出した ESI MS = 842.96 が観測される。

【 0 1 8 9 】

膜アンカーの合成: 2b (図 58): オクタデシルアミノコバラミンブチレート (2b): 1 (100 mg, 61 μ mol, mw = 1651) を 10 mL の EtOH 中に溶解させ、N₂ 下で脱気する。NH₄Br (500 mg, 5% w/v) 及び Zn 粉末 (200 mg, 3 mmol) を添加し、N₂ 下で 20 分間溶液を撹拌する。このスラリーに、4-クロロ酪酸 (30 μ L, 305 μ mol, mw = 122, d = 1.24) を添加する。得られた混合物を、継続的な N₂ 流下で 3 時間撹拌する。赤色から橙色への色の変化を観察する。亜鉛を遠心分離によって除去し、エーテル:クロロホルム (50 mL) 中でコバラミンを 2 回再結晶化させる。得られた沈殿を遠心分離及びデカンテーションによって回収する。ペレットを真空下に乾燥させ、10 mL EtOH を添加する。UV-Vis 分析により、アルキル化が完全に行われたことを明らかにする。8 カラム容量中で 0 ~ 100 % の H₂O:MeOH (0.1% TFA) 線形勾配を用いる 100 g C₁₈ フラッシュカラムで 2b を精製する。2b を 100% MeOH で溶出する。

【 0 1 9 0 】

3-アミノプロピルオクタデシルアミノコバラミン (2a): 橙色の固体, C₈₅H₁₃₃CoN₁₄O₁₇P⁻ (M²⁺) について算出した ESI MS = 855.95 が観測される。

【 0 1 9 1 】

MTX-C₁₈-B₁₂ の合成 (図 59): メトトレキサートオクタデシルアミノコバラミン (cbl-1): メトトレキサート (30 mg, 66 μ mol, mw=454)、N,N,N',N'-テトラメチル-O-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)ウロニウムヘキサフルオロホスフェート (HBTU, 25 mg, 66 μ mol, mw=379)、及び N,N-ジイソプロピルエチルアミン (DIPEA, 58 μ L, 332 μ mol, mw=129, d=0.74) を 5 mL の DMF に溶解させ、5 分間撹拌する。2a (120 mg, 71 μ mol, mw=1681) を添加し、溶液を一晩撹拌する。2a 及び Cbl-1 は HPLC によって分離できないので、1,4,5,6,7,7-ヘキサクロロ-5-ノルボルネン-2,3ジカルボン酸無水物 (37 mg, 185 μ mol, mw = 370) を添加する。溶液を 30 分間撹拌し、次いで、精製直前まで融解しないように注意して -80 で凍結させる。Viva C4 分取カラム 5 μ m, 250 x 21.2 mm (Restek) を用いて、H₂O:ACN, 0.1% TFA, 溶出時間 46 分で Cbl-1 を精製する。

【 0 1 9 2 】

メトトレキサートオクタデシルアミノコバラミン (Cbl-1): 橙色の固体, 37%, C₁₀₄H₁₅₃CoN₂₃O₁₉P⁻ (M²⁺) について算出した ESI MS = 1059.7, 観測値 1060.3; (M³⁺) = 706.5, 観測値 707.2。

【 0 1 9 3 】

単官能化コバラミンの合成: 3a (図 60): 3-アミノプロピルコバラミン (3a): シアノコバラミン (200 mg, 148 μ mol, mw=1355) を 10 mL の MeOH 中に溶解させ、N₂ 下で脱気する。NH₄Br (500 mg, 5% w/v) 及び Zn 粉末 (200 mg, 3 mmol) を添加し、N₂ 下で 20 分間溶液を撹拌する。このスラリーに 3-クロロプロピルアミンヒドロクロリド (40 mg, 305 μ mol, mw = 130) を添加する。得られた混合物を、継続的な N₂ 流下で 3 h 撹拌する。赤色から橙色への色の変化を観察する。亜鉛を遠心分離によって除去し、エーテル:クロロホルム (50 mL) 中でコバラミンを 2 回再結晶化させる。得られた沈殿を遠心分離及びデカンテーションによって回収した。ペレットを真空下に乾燥させ、10 mL EtOH を添加する。UV-Vis 分析により

10

20

30

40

50

、アルキル化が完全に行われたことを明らかにする。8カラム容量中で0～100%のH₂O:MeOH (0.1% TFA)線形勾配を用いて100 g C₁₈フラッシュカラムで3aを精製する。3aを50% MeOHで溶出する。

【0194】

単官能化コバラミンの合成：3b (図60)：コバラミンブチレート(3b)：シアノコバラミン (200 mg, 148 μmol, mw = 1355)を10 mLのMeOHに溶解し、N₂下で脱気する。NH₄Br (500 mg, 5% w/v)及びZn粉末(200 mg, 3 mmol)を添加し、N₂下で20分間溶液を撹拌する。このスラリーに、3-クロロプロピルアミンヒドロクロリド (40 mg, 305 μmol, mw = 130)を添加する。得られた混合物を、継続的なN₂流下で3時間撹拌する。赤色から橙色への色の変化を観察する。垂鉛を遠心分離によって除去し、エーテル:クロロホルム(50 mL)中でコバラミンを2回再結晶化させる。得られた沈殿を遠心分離及びデカンテーションによって回収する。ペレットを真空下に乾燥させ、10 mL EtOHを添加する。UV-Vis分析により、アルキル化が完全に行われたことを明らかにする。8カラム容量中で0～100%のH₂O:MeOH (0.1% TFA)線形勾配を用いて100 g C₁₈フラッシュカラムで3bを精製する。3bを60% MeOHで溶出する。

10

【0195】

MTX-B₁₂(Cbl-2)の合成：(図61)：メトトレキサートコバラミン (Cbl-2)：メトトレキサート (30 mg, 66 μmol, mw = 454)、N,N,N',N'-テトラメチル-O-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)ウロニウムヘキサフルオロホスフェート (HBTU, 25 mg, 66 μmol, mw=379)、及びN,N-ジイソプロピルエチルアミン(DIPEA, 58 μL, 332 μmol, mw = 129, d = 0.74)を、5 mLのDMF中に溶解させ、5分間撹拌する。3a (98 mg, 71 μmol, mw = 1386)を添加し、溶液を一晩撹拌する。8カラム容量中で0～100%のH₂O:MeOH (0.1% TFA)線形勾配を用いて100 g C₁₈フラッシュカラムでCbl-2を精製する。

20

【0196】

メトトレキサートコバラミン(Cbl-2)：橙色の固体，65%，C₈₆H₁₁₇CoN₂₁O₁₈P⁻(M²⁺)について算出したESI MS = 910.9，観測値 912.6；(M³⁺) = 607.2，観測値 608.8。

【0197】

デアセチルコルヒチンの合成は、上記のとおり、図62に示す(Lebeau, L.; Ducray, P.; Mioskowski, C. SYNTH. COMMUN. 1997, 27, 293-296.)。

コルヒチン-C₁₈-B₁₂(Cbl-3)の合成を図63に示す。コルヒチンオクタデシルアミニルコバラミン(Cbl-3)：2b (63 mg, 37 μmol, mw = 1681)、N,N,N',N'-テトラメチル-O-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)ウロニウムヘキサフルオロホスフェート (HBTU, 10 mg, 26 μmol, mw = 379)、及びN,N-ジイソプロピルエチルアミン(DIPEA, 15 μL, 86 μmol, mw = 129, d = 0.74)を、2 mLのDMF中に溶解させ、5分間撹拌する。4 (10 mg, 28 μmol, mw = 1386)を添加し、溶液を一晩撹拌する。Viva C4分取カラム 5 μm, 250 x 21.2 mm) (Restek)を用いて、H₂O:CH₃CN, 0.1% TFA, 溶出時間35分でCbl-3を精製する。

30

【0198】

コルヒチンオクタデシルアミニルコバラミン (Cbl-3)：橙色の固体，C₁₀₅H₁₅₃CoN₁₅O₂₁P⁻(M²⁺)について算出したESI MS = 1025.0，観測値 1026.5；(M³⁺) = 683.3，観測値 684.5。

40

コルヒチン-B₁₂(Cbl-4)の合成を図64に示す：コルヒチンコバラミン(Cbl-4)：3b (58 mg, 41 μmol, mw = 1416)、N,N,N',N'-テトラメチル-O-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)ウロニウムヘキサフルオロホスフェート(HBTU, 10 mg, 26 μmol, mw = 379)、及びN,N-ジイソプロピルエチルアミン(DIPEA, 15 μL, 86 μmol, mw = 129, d = 0.74)を、2 mLのDMF中に溶解させ、5分間撹拌する。4 (10 mg, 28 μmol, mw = 1386)を添加し、溶液を一晩撹拌する。8カラム容量中で0～100%のH₂O:MeOH (0.1% TFA)線形勾配を用いて100 g C₁₈フラッシュカラムでCbl-4を精製する。

【0199】

コルヒチンコバラミン(Cbl-4)：橙色の固体，C₈₆H₁₁₆CoN₁₄O₂₀P⁻(M²⁺)について算出したESI MS = 877.4，観測値 878.5；(M³⁺) = 584.9，観測値 586.2。

50

【 0 2 0 0 】

DEX-C₁₈-B₁₂(Cbl-5)の合成を図65に示す。デキサメタゾンスクシニルオクタデシルアミニルコバラミン (Cbl-5) : 5 (6 mg, 12 μmol, mw = 492)、N,N,N',N'-テトラメチル-O-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)ウロニウムヘキサフルオロホスフェート (HBTU, 5 mg, 12 μmol, mw = 379)、及びN,N-ジイソプロピルエチルアミン(TEA, 10 μL, 57 μmol, mw = 129, d = 0.74)を、1 mLのDMF中に溶解させ、5分間攪拌する。2a (30 mg, 18 μmol, mw = 1681)を添加し、溶液を一晩攪拌する。Viva C4分取カラム 5 μm, 250 x 21.2 mm) (Restek)を用いてH₂O:CH₃CN, 0.1% TFA, 溶出時間62分でCbl-5を精製する。

【 0 2 0 1 】

デキサメタゾンスクシニルオクタデシルアミニルコバラミン (Cbl-5): 橙色の固体, C₁₁₀H₁₆₄CoN₁₅O₂₂P⁻(M²⁺)について算出したESI MS = 1078.1, 観測値 1079.3。

【 0 2 0 2 】

5-TAM-C₁₈-B₁₂(Cbl-6)の合成を図66に示す。5-TAMRAオクタデシルアミニルコバラミン (Cbl-6) : 5-TAMRA (5 mg, 12 μmol, mw = 430)、N,N,N',N'-テトラメチル-O-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)ウロニウムヘキサフルオロホスフェート (HBTU, 4.5 mg, 12 μmol, mw=379)、及びN,N-ジイソプロピルエチルアミン(DIPEA, 8.3 μL, 48 μmol, mw = 129, d=0.74)を、5 mLのDMFに溶解させ、5分間攪拌する。2a (20 mg, 12 μmol, mw = 1681)を添加し、溶液を一晩攪拌する。Viva C₄分取カラム 5 μm, 250 x 21.2 mm) (Restek)を用いて、H₂O:CH₃CN, 0.1% TFA, 溶出時間46分でCbl-6を精製する。

【 0 2 0 3 】

5-TAMRAオクタデシルアミニルコバラミン(Cbl-6) : 赤色の固体, C₁₀₉H₁₅₄CoN₁₇O₁₉P⁻(M²⁺)について算出したESI MS = 1047.5, 観測値 1048.7; (M³⁺) = 698.3, 観測値 699.3。

【 0 2 0 4 】

5-FAM-C₁₈-B₁₂(Cbl-7)の合成を図67に示す。5-FAMオクタデシルアミニルコバラミン (Cbl-7) : 5-FAM (5 mg, 12 μmol, mw=430)、N,N,N',N'-テトラメチル-O-(N-スクシンイミジル)ウロニウムテトラフルオロボレート(TSTU, 3.6 mg, 12 μmol, mw=301)、及びN,N-ジイソプロピルエチルアミン(DIPEA, 8.3 μL, 48 μmol, mw = 129, d = 0.74)を、5 mLのDMF中に溶解させ、5分間攪拌する。2a (20 mg, 12 μmol, mw = 1681)を添加し、溶液を一晩攪拌する。Viva C₄分取カラム 5 μm, 250 x 21.2 mm) (Restek)を用いて、H₂O:CH₃CN, 0.1% TFA, 溶出時間46分でCbl-7を精製する。

【 0 2 0 5 】

5-FAM-オクタデシルアミニルコバラミン (Cbl-7) : 橙色の固体, C₁₀₄H₁₄₃CoN₁₅O₁₉P⁻(M²⁺)について算出したESI MS = 1020.0, 観測値 1021.5; (M³⁺) = 680.0, 観測値 681.2。

【 0 2 0 6 】

Cy5-C₁₈(Fl-1)の合成を図68に示す。Cy5-C18 (4)の合成。a) Br(CH₂)₅CO₂H, KI, CH₃CN b) CH₃I c) マロンアルデヒドジアニリド, AcOH, Ac₂O d) 2, ピリジン, AcOH e) DIC (N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド), TEA, オクタデシルアミン, CH₂Cl₂。Cy5は、以前に報告されたようにして合成する(Kiyose, K.; Hanaoka, K.; Oushiki, D; Nakamura, T.; Kajimura, M.; Suematsu, M.; Nishimatsu, H.; Yamane, T.; Terai, T; Hirata, Y.; 及びNagano, T. JACS. 2010, 132, 15846-15848)。

【 0 2 0 7 】

Cy7-C₁₈(Fl-2)の合成を図69に示す。Cy7-C18の合成。(6) a) N-[5-(フェニルアミノ)-2,4-ペンタジエニリデン]アニリンモノヒドロクロリド, AcOH, Ac₂O b) 7, AcOH, ピリジン c) DIC, TEA, オクタデシルアミン, CH₂Cl₂ (Kiyose, K.; Hanaoka, K.; Oushiki, D; Nakamura, T.; Kajimura, M.; Suematsu, M.; Nishimatsu, H.; Yamane, T.; Terai, T; Hirata, Y.; and Nagano, T. JACS. 2010, 132, 15846-15848)。

【 0 2 0 8 】

Alexa-700-C₁₈(Fl-3)の合成。Fl-3: Alexa Fluor(登録商標) 700 NHS-エステル (1 mg, 1 μmol, mw = 1086)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(DIPEA, 5 μL, 29 μmol, mw = 129, d = 0.74)、及びオクタデシルアミン (5 mg, 19 μmol, mw = 269)を、500 μL DMFに

10

20

30

40

50

溶解させ、攪拌によって一晚混合する。得られた混合物を5:1の $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 混合物(5 mL)に注ぐ。 CH_2Cl_2 層を4 mL H_2O で洗浄(3x)する。フラッシュクロマトグラフィシリカカラム(30 g)によって、 $\text{MeOH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (0.1% TFA)線形勾配0~80%で精製する。精製したリビド化蛍光体を回転蒸発によって濃縮する(留意点: Alexa Fluor(登録商標)700の構造は開示されていない。したがって、実験だけを載せる)。

【0209】

Dy800- C_{18} (FI-4)の合成を図70に示す。Dy800- C_{18} (12)の合成。a) 3-メチルブタノン, AcOH; KOH, MeOH, PrOH b) (10): 1,3-プロパンスルホン, o-ジクロロベンゼン (11): $\text{Br}(\text{CH}_2)_5\text{CO}_2\text{H}$, o-ジクロロベンゼン c) 3-クロロ-2,4-トリメチレングルタコンジアニルヒドロクロリド, AcONa, EtOH d) 10 e) フェノキシナトリウム, DMF f) DIC, DIPEA, オクタデシルアミン, DMF。

【0210】

【表13】

時間	フロー (mL/min)	水	CH_3CN
0	8	90	10
10	8	90	10
30	8	45	55
45	8	35	65
60	8	25	75
65	8	0	100
75	8	0	100
80	8	90	10
90	8	90	10

表13は、カラム C_4 についてのHPLC勾配を示す。

【0211】

更に、これらの実施例は、蛍光体がRBC膜から放出されることについて記載する。

525 nm光を用いての赤血球膜からのTAMRA及びフルオレセイン(FAM)放出の証明: 赤血球を1 mM MgCl_2 を含む1x PBSで洗浄3xし、10%ヘマトクリットに希釈する。10%ヘマトクリットの赤血球に、(TAMRAを放出する)Cbl-6又は(フルオレセインを放出する)Cbl-7を1 μM の最終濃度となるように添加する。次いで、赤血球をRTで20分間インキュベートし、その後1 mM MgCl_2 を含む1x PBS中で洗浄3xする。最後の洗浄後、赤血球を10%ヘマトクリットに再懸濁し、様々な時点において525 nm光に曝露する。光分解後、赤血球溶液を1,000 gで遠心分離し、蛍光プレートリーダーを用いて、TAMRA (Ex: 550 nm Em: 580 nm)またはフルオレセイン(Ex: 492 nm Em: 519 nm)の放出について上清を分析した。

【0212】

図71は、RBC膜から光開裂したCbl-6及びCbl-7を示す。525 nm光を用いての、赤血球に結合したコバラミン(それぞれCbl-7及びCbl-6)からのフルオレセイン放出及びTAMRA放出。

【0213】

NIR光を用いての、赤血球膜からのTAMRA (Cbl-6から)及びフルオレセイン(Cbl-7から)放出の証明。赤血球を1 mM MgCl_2 を含む1x PBS中で洗浄3xし、10%ヘマトクリットに希釈する。10%ヘマトクリットの赤血球に、Cbl-6又はCbl-7を1 μM の最終濃度となるように、

及びFI-1, FI-2, FI-3又はFI-4のいずれかを5 μ Mの最終濃度となるように添加する。次いで、赤血球をRTで20分間インキュベートし、その後1 mM MgCl_2 を含む1x PBS中で洗浄3xする。最後の洗浄後、赤血球を10%ヘマトクリットに再懸濁し、650、700、730又は780 nm光に30分曝露する。光分解後、赤血球溶液を1,000 gで遠心分離し、蛍光プレートリーダーを用いて、TAMRA (Ex: 550 nm Em: 580 nm)又はフルオレセイン(Ex: 492 nm Em: 519 nm)の放出について上清を分析する。

【0214】

図72は、 C_{18} コンジュゲート蛍光体を用いることによるFAM光開裂の近IR (NIR)への延長を示す。FI-1 (650 nm)、FI-2 (700 nm)及びFI-3 (730 nm)を用いるフルオレセイン(Cbl-7から)放出。1 μ M Cbl-7及び5 μ M 蛍光体- C_{18} を赤血球に積む。光分解は、上記した波長の光を用いて30分間行う。留意点：コバラミン(aka B_{12})単独は最大約550 nmの光を吸収する；したがって、この波長を超える光を吸収するためには、アンテナ蛍光体の存在が必要である。

10

【0215】

TAMRAの最適な放出のためのFI-1に対するCbl-6の比の決定。1 mM MgCl_2 を含む1x PBSで赤血球を洗浄3xし、10%ヘマトクリットに希釈する。10%ヘマトクリットの赤血球に、Cbl-6を最終濃度1 μ Mとなるように、FI-1を最終濃度0、1、5、10及び50 μ Mとなるように添加する。次いで、赤血球をRTで20分間インキュベートし、その後1 mM MgCl_2 を含む1x PBS中で洗浄3xする。最後の洗浄後、赤血球を10%ヘマトクリットに再懸濁し、650 nm光に30分間曝露する。光分解後、赤血球溶液を1,000 gで遠心分離し、蛍光プレートリーダーを用いて、TAMRA (Ex: 550 nm Em: 580 nm)放出について上清を分析する。図73は、650 nm光を用いて最適放出比[Cbl-6]:[FI-1]を決定することについて実証する。

20

【0216】

この更なる実施例は、MTX赤血球膜の光放出について記載する。

表14は、LC-MSによるMTX濃度の測定を示す。UV-Vis検出器、1260 infinity蛍光検出器、及び394ウェルプレートからの6110 quadrapole質量分析計を備えた1200 series Agilent HPLCに75 μ Lのサンプルを注入する。移動相は、 $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ (0.1% FA)からなる(勾配を以下の表14に示す)。用いるカラムは、Viva C_4 分析用カラム 5 μ m, 50 x 21.2 mm (Restek)である。MTX開裂産物の溶出を示す3.1~3.7分の300 nmにおけるUV吸収曲線下面積を取ることによって濃度を測定し、この積分を既知の標準と比較する。質量のカットオフは450ダルトンである。蛍光検出器ex. 365 nm em. 470 nmは、既知の光分解産物を検出する。

30

【0217】

【表 1 4】

時間	フロー (mL/min)	水	CH3CN
0	1	97	3
1	1	97	3
8	1	20	80
10	1	20	80
11	1	97	3
15	1	97	3

10

20

【 0 2 1 8 】

図74は、MTX標準曲線を示す。1 μ M、500 nM、100 nM、50 nM及び10 nMの濃度のCbl-1希釈液を調製する。これらは、インタクトなCbl-1が検出されなくなるまで525 nm光下で光分解する。次いで、LC-MS分析のために100 μ Lのアリコートを取り、各濃度について曲線下面積を算出する。これを3連で(in triplicate)行い、得られた標準曲線との比較によって、全ての[MTX]データを生成する。

【 0 2 1 9 】

赤血球膜からのメトトレキサート(MTX)の光放出。1 mM $MgCl_2$ を含む1x PBS中で赤血球を洗浄3xし、10%ヘマトクリットに希釈する。10%ヘマトクリットの赤血球に、Cbl-1を最終濃度1 μ M及び/又はFl-1を5 μ Mとなるように添加する。次いで、赤血球をRTで20分間インキュベートし、その後1 mM $MgCl_2$ を含む1x PBS中で洗浄3xする。最後の洗浄後、赤血球を10%ヘマトクリットに再懸濁し、525又は650 nm光に10、30及び60分間曝露する。光分解後、赤血球溶液を1,000 gで遠心分離し、LC/MSによるMTX放出のために上清を分析する。

30

【 0 2 2 0 】

図75は、MTX-C18-B12 (CBI-1)がRBCから放出されることを証明する。525 nm光及び650 nm光を用いての、RBCからのMTXの経時的な放出。橙色は、5 μ M Fl-1及び1 μ M Cbl-1の存在を示す。青色のサンプルは、Cbl-1だけを含む。よって、Fl-1は、650 nmにおける効率的な薬剤放出に必要である。

【 0 2 2 1 】

メトトレキサートDHFR阻害アッセイ。ジヒドロ葉酸レダクターゼ活性を、Sigma Dihydrofolate Reductase Assay Kitを用いてモニタリングする。このキットを用いて、NADPHからNADP⁺への変換をモニタリングする。簡潔には、1.5 mU DHFR、100 μ M NADPH及び1x assay buffer (キットに提供される)を含むアッセイバッファーを調製する。蛍光プレートリーダー(Ex: 340 nm Em: 450 nm)を用いて、様々な濃度のMTX又はMTX-C₁₈-B₁₂ (100 nm ~ 5 μ M)から光分解されたMTXでのDHFR活性の阻害をモニタリングする。

40

【 0 2 2 2 】

図76は、MTXのDHFR阻害アッセイを示す。DHFRは、メトトレキサート(円)及び光分解されたメトトレキサート(三角)によって阻害される。

LC-MSによるコルヒチン濃度の測定(表15)。UV-Vis検出器、1260 infinity蛍光検出器、及び394ウェルプレートからの6110 quadrupole質量分析計を備えた1200 series Agilent

50

HPLCに75 μ Lのサンプルを注入する。移動相は、 $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ (0.1% FA) からなる (勾配を以下の表に示す)。用いるカラムは、Viva C₄分析用カラム 5 μ m, 50 x 21.2 mm (Restek) である。コルヒチン開裂産物の溶出を示した4.1~4.8分の360 nmにおけるUV 吸収曲線下面積を取ることによって濃度を測定し、この積分と既知の標準とを比較した。質量のカットオフは400ダルトンである。

【 0 2 2 3 】

【表 1 5】

時間	フロー (mL/min)	水	CH_3CN
0	1	97	3
1	1	97	3
8	1	20	80
10	1	20	80
11	1	97	3
15	1	97	3

10

20

【 0 2 2 4 】

コルヒチンの標準曲線。10%アリルアルコール及び水中5 μ M、1 μ M、500 nM及び100 nMの濃度のCbl-3希釈液を調製する。これらは、インタクトなCbl-3が検出されなくなるまで、525 nm光下で光分解する。次いで、LC-MS分析のために100 μ Lのアリコートを取り、各濃度についての曲線下面積を算出する。これを3連で行い、その後、得られた標準曲線と比較することによって全てのコルヒチン濃度のデータを生成する。図77は、コルヒチン標準曲線を示す。

30

【 0 2 2 5 】

図78は、コルヒチン-C₁₈-B₁₂ (Cbl-3)のオクタノール/ H_2O 移動を示す。(Cbl-3から)光分解されたコルヒチンはオクタノールから水へと拡散し、10分で最大の光分解が得られるまでその水中量は増大する。分子の疎水性に起因して、平衡状態においては、開裂後であってもオクタノールに分配されがちであるが、開裂が起こるまで水中への検出可能な移動はない。

【 0 2 2 6 】

C₁₈-B₁₂-メトトレキサートを積んだRBCを用いるHeLa細胞の処理。12ウェル組織培養プレートにHeLa細胞を4.4x 10⁴細胞/ウェルの密度で置き、5% CO₂エアーの湿度調整インキュベータ中のDMEM (10% FBS, 1% Pen-Strep)中に37 °Cで維持する。翌日、細胞をPBSで洗浄2xし、次いで、L-15培地中のCbl-1を積んだRBCの懸濁液300 μ L (5%ヘマトクリットで5 μ Mの積込み量)又は300 μ LのL-15 (コントロール細胞)で処理する。細胞を暗中で維持するか、又は緑色LED光源(PAR38; 500~570 nmの発光; 5 mWの電力)に15分間曝露する。血清濃度を0.5%にするために小アリコートのFBS含有培地を添加し、その後湿度調整インキュベータ中37 °Cに細胞を置く。48時間後、細胞を1 mLのPBSで洗浄3xし、400 μ LのL-15培地を各ウェルに加え、その後80 μ LのMTS試薬を添加する(Promega Cell Titer 96 Aquio us One Solution)。細胞をMTS試薬と共に3 h、37 °Cでインキュベートし、492 nmにおける吸収をプレートリーダー(Perkin Elmer HTS 7000)を用いて測定する。

40

50

【0227】

分配試験。1.5 mLの清浄な遠心分離チューブ中で、試験分子(5 μ M)を含むオクタノール(250 μ L)をdH₂O (250 μ L)と十分に混合し、10分間平衡化させ、10分間21,000 gで遠心分離を行った。525 nm LEDを用いて0、1、5、10及び20分間サンプルを光分解し、振盪により混合し、15分間平衡化させる。その後、10分間21,000 gで遠心分離する。所望の層からアリコートを取り、懸案の化合物に特異的なLC-MS法によって、それぞれの濃度を測定する。

【0228】

コルヒチンを用いるHeLa細胞の処理。1.5 \times 10⁵細胞/ウェルの密度で6ウェルのガラス底プレート(Mattek)にHeLa細胞を置き、5% CO₂エアーの湿度調整インキュベータ中、DMEM (10% FBS, 1% Pen-Strep)中に37 °Cで維持する。翌日、37 °Cの湿度調整インキュベータ中で、細胞をコルヒチン(Sigma C9754; DMSO中の1 mMストック)又はDMSOでそれぞれ30分又は1時間処理する。インキュベーション時間の終了時に、1 mLのメタノールを用いて、室温で10分間細胞を固定する。1 mLのPBSで細胞を洗浄2 x し、5%ロバ血清中で1 hブロッッキングする。その後、抗体希釈バッファー(1% BSA; 0.3% Triton-X-100; PBS)中に1:100で希釈したマウス抗チューブリン抗体(Cell Signaling 3873S)と共に4 °Cで一晩インキュベートする。次いで、PBSで細胞を洗浄(3 x 5分)し、抗体希釈バッファー中に1:500で希釈した抗マウスAlexa Fluor(登録商標) 488二次抗体(Life Technologies A21202)と共にインキュベートする。PBSで細胞を洗浄(3 x 5分)後、Hamamatsu C8484カメラ、40Xの位相差対物レンズ及びFITC フィルターキューブを備えたOlympus IX81倒立顕微鏡(Semrock)を用いてイメージを撮像する。Metamorph softwareを用いてイメージング分析を行う。

10

20

【0229】

図79は、HeLa細胞に対するコルヒチンの効果を示す。これはポジティブコントロールである。コルヒチンを多く加えるほど、チューブリンネットワークは破壊される。

Cbl-3を積んだRBCを用いるHeLa細胞の処理。24ウェルガラス底プレート(Mattek)にHeLa細胞を3.3 \times 10⁴細胞/ウェルの密度で置き、5% CO₂エアーの湿度調整インキュベータ中、37 °CでDMEM (10% FBS, 1% Pen-Strep)中に維持する。翌日、細胞をPBSで2回洗浄し、100 μ LのL-15培地を添加する。次いで、PBS (5%ヘマトクリットで6 μ Mの積込み量)又は250 μ L PBS (コントロール細胞)中のCbl-3を積んだ赤血球の懸濁液250 μ Lで細胞を処理する。次いで、細胞を、暗中37 °Cの湿度調整インキュベータ中に維持するか、又は5、10又は20分間室温で530 nm LED投光照明(PAR38; 500 ~ 570 nmの発光; 5 mWの電力)に曝露する。光分解後、全ての細胞を37 °Cの湿度調整インキュベータ中で1時間インキュベートする。インキュベーション時間の終了時に、PBSで細胞を洗浄3 x 1 mLし、次いで、1 mLのメタノールを用いて、室温で10分間固定する。PBSで細胞を洗浄2 x 1 mLし、5%ロバ血清中で1 hブロッッキングする。その後、抗体希釈バッファー(1% BSA; 0.3% Triton-X-100; PBS)中に1:100で希釈したマウス抗チューブリン抗体(Cell Signaling 3873S)と共に4 °Cで一晩インキュベートする。次いで、細胞をPBS (3 x 5分)で洗浄し、抗体希釈バッファー中に1:500で希釈した抗マウスAlexa Fluor(登録商標) 488二次抗体(Life Technologies A21202)と共にインキュベートする。PBS (3 x 5分)で細胞を洗浄後、Hamamatsu C8484カメラ、40Xの位相差対物レンズ及びFITCフィルターキューブ(Semrock)を備えるOlympus IX81倒立顕微鏡を用いてイメージを撮像する。Metamorph softwareを用いてイメージング解析を行う。

30

40

【0230】

図80は、HeLa細胞に対するCbl-3の効果を示す。a) 光分解することなく、Cbl-3を積んだRBCに曝露されたHeLa細胞。b) 525 nm光で20分間照射された、Cbl-3を積んだRBCに曝露されたHeLa細胞。c) RBCも光曝露もなしのHeLa細胞。d) RBCなし及び525 nmで20分間光分解したHeLa細胞。

【0231】

以下の実施例は、デキサメタゾンの光放出について記載する。6ウェルガラス底プレート(Mattek)にHeLa細胞を7.5 \times 10⁴細胞/ウェルの密度で置き、5% CO₂エアーの湿度調整インキュベータ中、37 °CでDMEM (10% FBS, 1% Pen-Strep)中に維持する。翌日、湿度調整イ

50

ンキュベータ中で、様々な濃度のデキサメタゾン(DMSO中1 mMストック)又はDMSOで、1時間37℃で細胞を処理する。インキュベーション時間の終了時に、PBS中の4% PFAを用いて、10分間室温で細胞を固定し、次いでPBSで洗浄1xし、その後1 mLのメタノールを用いて、室温で5分間処理する。PBSを用いて細胞を洗浄2 x 1 mLし、その後抗体希釈バッファー(1% BSA; 0.3% Triton-X-100; PBS)中に1:100で希釈したウサギ抗GR 抗体(abcam 3580)と共に一晩4℃でインキュベートする。次いで、PBS (3 x 5分)を用いて細胞を洗浄し、抗体希釈バッファー中に1:500で希釈した抗ウサギAlexa Fluor(登録商標) 488二次抗体(Life Technologies A21206)と共に1時間室温でインキュベートする。PBS (3 x 5分)で細胞を洗浄し、Hoescht 33342 (PBS中100 µg/mL)を30分間アブライして、PBSで更に洗浄する。その後、Hamamatsu C8484カメラ、40Xの位相差対物レンズ及びFITCフィルターキューブ(Semrock)を備えたOlympus IX81倒立顕微鏡を用いてイメージを撮像する。Metamorph softwareを用いてイメージング解析を行う。 10

【0232】

図81は、GR の分配に対するデキサメタゾンの効果を示す。a)では、デキサメタゾンが存在しないことに起因して、ステロイド受容体は、細胞質中に均等に分配される。b)では、250 nMデキサメタゾンの添加後に受容体が核に移動し、c)では、500 nMデキサメタゾンを用いて同じことが観察される。

【0233】

Cbl-5を積んだRBCを用いるHeLa細胞の処理。12ウェルガラス底プレート(Mattek)にHeLa細胞を 2.5×10^4 細胞/ウェルの密度で置き、5% CO₂エアーの湿度調整インキュベータ中、DMEM (10% FBS, 1% Pen-Strep)中37℃で維持する。翌日、PBSで細胞を洗浄2xし、次いでL-15培地(5%ヘマトクリットで1 µMの積込み量)又は500 µL L-15 (コントロール細胞)中のCbl-5を積んだ赤血球の懸濁液500 µLで処理する。次いで、細胞を、暗中37℃で湿度調整インキュベータ中に維持するか、又は10、20又は30分間室温で525 nM LED投光照明(PAR38; 500~570 nmの発光; 5 mWの電力)に曝露する。光分解後、湿度調整インキュベータ中で、全ての細胞を1時間37℃でインキュベートする。インキュベーション時間の終了時に、PBSで細胞を洗浄3 x 1 mLし、次いでPBS中の4% PFAを用いて10分間室温で固定し、次いでPBSで洗浄1xし、1 mLのメタノールを用いて室温で5分間処理する。その後、PBSで細胞を洗浄2 x 1 mLし、次いで抗体希釈バッファー(1% BSA; 0.3% Triton-X-100; PBS)に1:100で希釈したウサギ抗GR 抗体(abcam 3580)と共に4℃で一晩インキュベートする。次いで、PBSで細胞を洗浄(3 x 5分)し、抗体希釈バッファー中に1:500で希釈した抗ウサギAlexa Fluor(登録商標) 488二次抗体(Life Technologies A21206)と共に1時間室温でインキュベートする。最後に、PBSで細胞を洗浄(3 x 5分)する。その後、Hamamatsu C8484カメラ、40Xの位相差対物レンズ及びFITCフィルターキューブを備えたOlympus IX81倒立顕微鏡(Semrock)を用いて、イメージを撮像する。Metamorph softwareを用いてイメージング解析を行う。 20 30

【0234】

図82は、GR 染色したHeLa細胞を示す。a) 光分解なしのCbl-5を積んだRBC。b) RBCなし及び光分解なし。c) 525 nm光に20分間曝露されたCbl-5を積んだRBC。d) 20分間525光に曝露したRBCなし。 40

【0235】

Cbl-5を積んだRBCでのHeLa細胞の処理及び光分解前の除去(漏れ試験)。6ウェルガラス底プレート(Mattek)にHeLa細胞を 8.8×10^4 細胞/ウェルの密度で置き、5% CO₂エアーの湿度調整インキュベータ中、DMEM (10% FBS, 1% Pen-Strep)中に37℃で維持する。翌日、PBSで細胞を洗浄2xし、次いでL-15培地(5%ヘマトクリットで1 µMの積込み量)中のCbl-5を積んだ赤血球の懸濁液250 µL又は250 µL L-15 (コントロール細胞)で処理する。次いで、湿度調整インキュベータ中で暗中1 h、37℃で細胞をインキュベートする。1時間のプレインキュベーション後、PBSで細胞を洗浄3 x 1 mLし(暗室; 赤色安全光)、2 mLのL-15を各ウェルに添加する。次いで、洗浄した細胞を緑色LED光源(PAR38; 500~570 nmの発光; 5 mWの電力)に曝露するか、又は暗中15分間室温で維持する。光分解後、湿度調整インキュ 50

ベータ中で、1時間37℃で全ての細胞をインキュベートする。2回目のインキュベーション時間の終了時に、PBSで細胞を洗浄3 x 1 mLし、次いでPBS中の4% PFAを用いて10分間室温で固定し、次いでPBSで洗浄1xし、1 mLのメタノールを用いて室温で5分間処理する。その後、PBSで細胞を洗浄2 x 1 mLし、次いで抗体希釈バッファ(1% BSA; 0.3% Triton-X-100; PBS)中に1:100で希釈したウサギ抗GR抗体(abcam 3580)と共に4℃で一晩インキュベートする。次いで、PBSで細胞を洗浄(3 x 5分)し、抗体希釈バッファに1:500で希釈した抗ウサギAlexa Fluor(登録商標) 488二次抗体(Life Technologies A21206)と共に1時間室温でインキュベートする。最後に、PBSで細胞を洗浄(3 x 5分)する。Hamamatsu C8484カメラ、40Xの位相差対物レンズ及びFITCフィルターキューブ(Semrock)を備えたOlympus IX81倒立顕微鏡を用いてイメージを撮像する。Metamorph softwareを用いてイメージング解析を行う。

10

【0236】

図83は、デキサメタゾン-RBCの漏れ試験の結果を示す。Cbl-5がRBC及び細胞培養物と平衡にあるか否かを決定するため、a)では、Cbl-5を積んだRBCをHeLa細胞に曝露し、次いで光分解前に除去した。GRは影響を受けず、光分解が起こるまで、デキサメタゾンがRBC上に留まっていることを示唆する。b)は、Cbl-5を積んだRBCに曝露されていない細胞を含み、その後光分解することなく洗浄する。c)は、光分解されたが、RBCに曝露されていないHeLa細胞を含む。

【0237】

Cbl-5を積んだRBCを伴うHeLa細胞の異なる波長での処理。12ウェルガラス底プレート(Mattek)にHeLa細胞を 2.5×10^4 細胞/ウェルの密度で置き、5% CO₂エアーの湿度調整インキュベータ中で、DMEM (10% FBS, 1% Pen-Strep)中37℃で維持する。翌日、細胞をPBSで洗浄2xし、L-15培地(5%ヘマトクリットで1 µMの積込み量)中のCbl-5を積んだRBCの懸濁液500 µL又は50 µL L-15 (コントロール細胞)で処理する。次いで、細胞を、湿度調整インキュベータ中で暗中37℃で維持するか、又は緑色LED光源(PAR38; 500~570 nmの発光; 5 mWの電力)若しくは780 nm LED光(社内で作製; 7 mW)に15分間室温で曝露する。光分解後、湿度調整インキュベータ中で、1時間37℃で全ての細胞をインキュベートする。インキュベーション時間の終了時に、PBSで細胞を洗浄3 x 1 mLし、次いでPBS中の4% PFAを用いて10分間室温で固定し、PBSで洗浄1xし、1 mLのメタノールを用いて5分間室温で処理する。その後、細胞をPBSで洗浄2 x 1 mLし、次いで抗体希釈バッファ(1% BSA; 0.3% Triton-X-100; PBS)中に1:100で希釈したウサギ抗GR抗体(abcam 3580)と共に4℃で一晩インキュベートする。次いで、細胞をPBSで洗浄(3 x 5分)し、抗体希釈バッファ中に1:500で希釈した抗ウサギAlexa Fluor(登録商標) 488二次抗体 (Life Technologies A21206)と共に1 h室温でインキュベートする。最後に、細胞をPBSで洗浄(3 x 5分)する。その後、Hamamatsu C8484カメラ、40Xの位相差対物レンズ及びFITCフィルターキューブ(Semrock)を備えたOlympus IX81倒立顕微鏡を用いてイメージを撮像する。Metamorph softwareをイメージング解析のために用いる。

20

30

【0238】

図84は、530及び780 nmで照射された、Cbl-5を積んだRBCに曝露したHeLa細胞の結果を示す。

40

Cbl-5及びFl-4 RBCでのHeLa細胞の処理。35 mmガラス底ディッシュ(Mattek)にHeLa細胞を 1.1×10^5 細胞/ウェルの密度で置き、5% CO₂エアーの湿度調整インキュベータ中で、DMEM (10% FBS, 1% Pen-Strep)中37℃で維持する。翌日、細胞をPBSで洗浄2xし、次いでL-15培地(5%ヘマトクリットで1 µMの積込み量)中のCbl-5/Fl-4を積んだRBC懸濁液100 µL又は10 µL L-15 (コントロール細胞)で処理する。細胞を暗中に維持するか、又は780 nm LED光(7 mWの電力)に10、20、30、40若しくは50分間曝露する。光分解後、回収するまで、全ての細胞を湿度調整インキュベータ中で37℃に置く。光分解時間の終了時に、細胞をPBSで洗浄3 x 1 mLし、次いでPBS中の4% PFAを用いて10分間室温で固定し、PBSで洗浄1xし、1 mLのメタノールを用いて5分間室温で処理する。その後、細胞をPBSで洗浄2 x 1 mLし、次いで抗体希釈バッファ(1% BSA; 0.3% Triton-X-100; PBS)中に1:100で希釈した

50

ウサギ抗GR 抗体 (abcam 3580)と共に一晩4 でインキュベートする。次いで、細胞をPBSで洗浄(3 x 5分)し、抗体希釈バッファ中に1:500で希釈した抗ウサギAlexa Fluor(登録商標) 488二次抗体 (Life Technologies A21206)と共に1時間室温でインキュベートする。最後に、細胞をPBSで洗浄(3 x 5分)する。その後、Hamamatsu C8484カメラ、40Xの位相差対物レンズ及びFITCフィルターキューブ(Semrock)を備えたOlympus IX81倒立顕微鏡を用いてイメージを撮像する。Metamorph softwareをイメージング解析のために用いる。

【0239】

図85は、C₁₈-デキサメタゾン-B₁₂/Dylight 800 RBCの780 nm放出の結果を示す。

この更なる実施例は、MTX、コルヒチン及びデキサメタゾンの溶血試験を示す。

溶血試験のための方法。PBS (100 µL ; 5 µM、10 µM、20 µM及び40 µM)中の所定のコバラミン薬剤複合体(Cbl-1、Cbl-3又はCbl-5)を含む1.5 mLエッペンドルフに、PBS (10%ヘマトクリット)中のRBC 100 µLを添加した。更なる3つのサンプルには、RBCで処理したPBSを含ませた。3つのサンプルに0.1% SDSを含ませ、RBCを添加した。最終濃度は、0.5% SDS; 0 µM、2.5 µM、5 µM、10 µM及び20 µM リピド化-B₁₂-薬剤であった。軽くはじいて細胞を混合し、300 gで30分間遠心分離した。サンプルを再びホモジナイズし、4 で一晩インキュベートした。サンプルを1000 gで5分間ペレット形成させた。150 µLの上清を96ウェルプレートに置き、UV-Visにより550 nmで分析した。正確な測定のために、SDSサンプルを10倍希釈した。SDS吸光度の10倍を完全な溶血とみなし、PBSで処理した血液を完全にインタクトとみなし、これらのサンプルからの吸光度を残るサンプルのバックグラウンドから差し引いた。

【0240】

【数1】

$$\% \text{溶血} = \frac{\text{サンプルの吸光度}}{100\% \text{溶血時の吸光度}} \times 100\%$$

【0241】

図86は、MTX、コルヒチン及びデキサメタゾンでは溶血試験の結果を示す。親油性薬剤複合体の各々について、異なる濃度で溶血を測定した。それぞれの場合において、RBCは、5 µM以下の積込み濃度で安定である。

【0242】

この実施例は、メソ多孔性シリカナノ粒子中のコバラミンに薬剤を付加する必要があることを記載する。図87~89に示すように、コバラミンベースの光応答性構築物によってメソ多孔性シリカナノ粒子中に薬剤をキャップする。図89は、コバラミンでキャップされたメソ多孔性シリカナノ粒子(FI-MSN)からのフルオレセイン放出を説明する。蛍光強度は、ブランクバックグラウンドサンプルと比較する。サンプルを暗中で保管(5h)し、その後2回に分けて光分解(525 nm)した(30分)。各光曝露後、サンプルを混合(2.5h)した。

【0243】

ナノ粒子から放出され得る薬剤の例としては、限定されないが、ドキソルビシン、タキソテル、カンプトテシン、様々なsiRNA、シスプラチン、リファンピシン及びイソニアジド、ジフテリア毒素、5-フルオロウラシル、イタコナゾール(Itaconazole)、シトクロムC、インスリン、cAMP、イブプロフェン、バンコマイシン、レスベラトロール、エストラジオール、カプトプリル、アスピリン、イリノテカン塩酸、ゲンタマイシン、エリスロマイシン、アレンドロネート、サルビアノリン酸Bを含む。

【0244】

本明細書で用いる以下の用語は、当業者は熟知していると思われるが、本願に開示される主題の説明を容易にするために定義を説明する。

その他の定義がない限り、本明細書で用いる全ての技術用語及び科学用語は、本願に開示される主題が属する分野の当業者により共通に理解されるものと同じ意味を有する。本

10

20

30

40

50

明細書で記載したものと類似又は等価の方法、装置及び材料を本願に開示される主題の実用又は試験において用いることができるが、ここでは代表的な方法、装置及び材料を記載する。

【0245】

長く続く特許法の慣例に従って、用語「a」、「an」及び「the」は、特許請求の範囲を含む本願の出願書類において用いられるとき、「one or more」を指す。したがって、例えば「a fluorophore」というとき、これの複数形等を含む。

【0246】

そうでないと示さない限り、本明細書及び特許請求の範囲において量、特性等を表す全ての数字は、用語「約」により全ての実例が修飾されるものと理解すべきである。したがって、反対のことが示されない限り、本明細書及び特許請求の範囲で規定される数値パラメータは、本願に開示される主題により得ようとする所望の特性に依存して変化し得るおおよそのものである。

10

【0247】

本明細書で用いるように、用語「約」は、質量、重量、時間、容量、濃度又はパーセンテージの値又は量について言及する場合、記載された方法を行うのに適切であるときには、記載された量から、いくつかの実施態様においては $\pm 20\%$ 、いくつかの実施態様においては $\pm 10\%$ 、いくつかの実施態様においては $\pm 5\%$ 、いくつかの実施態様においては $\pm 1\%$ 、いくつかの実施態様においては $\pm 0.5\%$ 、及びいくつかの実施態様においては $\pm 0.1\%$ の変動を包含することを意味する。

20

【0248】

本明細書で用いるように、範囲は、「約」ある具体的値から、及び/又は「約」別の具体的値までと表すことができる。また、本明細書に開示される多くの値が存在すること、及びその値自体に加えて、各値が「約」具体的値としても本明細書で開示されていると理解される。例えば、値「10」が開示される場合、「約10」も開示されている。また、2つの具体的ユニット間の各ユニットも開示されていると理解される。例えば、10及び15が開示される場合、11、12、13及び14も開示されている。

更に、本願に開示される主題は、そこに記載される全ての言及(これらは全体が参照により本明細書に組み込まれる)を含む。

30

【0249】

参考文献

本明細書を通じて、様々な参考文献が記載される。これら全ての参考文献は、以下に列挙するものを含めて、参照により本明細書に組み込まれる。

【0250】

1. Majithia, V., and Geraci, S.A. (2007). Rheumatoid arthritis: diagnosis and management. *Am J Med* 120, 936-939.

2. Birnbaum, H., Pike, C., Kaufman, R., Marynchenko, M., Kidolezi, Y., and Cifaldi, M. (2010). Societal cost of rheumatoid arthritis patients in the US. *Curr Med Res Opin* 26, 77-90.

40

3. Hollander, J.L., Brown, E.M., Jr, Jessar, R.A., and Brown, C.Y. (1951). Hydrocortisone and cortisone injected into arthritic joints: Comparative effects of and use of hydrocortisone as a local antiarthritic agent. *Journal of the American Medical Association* 147, 1629-1635.

4. Mitragotri, S., and Yoo, J.W. (2011). Designing micro- and nano-particles for treating rheumatoid arthritis. *Arch Pharm Res* 34, 1887-1897.

5. Kukar, M., Petryna, O., and Efthimiou, P. (2009). Biological target

50

ts in the treatment of rheumatoid arthritis: a comprehensive review of current and in-development biological disease modifying anti-rheumatic drugs. *Biologics* 3, 443-457.

6. Huscher, D., Thiele, K., Gromnica-Ihle, E., Hein, G., Demary, W., Dreher, R., Zink, A., and Buttgereit, F. (2009). Dose-related patterns of glucocorticoid-induced side effects. *Ann Rheum Dis* 68, 1119-1124.

7. Baschant, U., Lane, N.E., and Tuckermann, J. (2012). The multiple facets of glucocorticoid action in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 8, 645-655. 10

8. Fiehn, C. (2010). Methotrexate transport mechanisms: the basis for targeted drug delivery and ss-folate-receptor-specific treatment. *Clin Exp Rheumatol* 28, S40-45.

9. Ulbrich, W., and Lamprecht, A. (2010). Targeted drug-delivery approaches by nanoparticulate carriers in the therapy of inflammatory diseases. *J R Soc Interface* 7 Suppl 1, S55-66. 20

10. Shirasu, N., Nam, S.O., and Kuroki, M. (2013). Tumor-targeted photodynamic therapy. *Anticancer Res* 33, 2823-2831.

11. Shamay, Y., Adar, L., Ashkenasy, G., and David, A. (2011). Light induced drug delivery into cancer cells. *Biomaterials* 32, 1377-1386.

12. Thompson, S., Self, A.C., and Self, C.H. (2010). Light-activated antibodies in the fight against primary and metastatic cancer. *Drug Discov Today* 15, 468-473.

13. Yavlovich, A., Smith, B., Gupta, K., Blumenthal, R., and Puri, A. (2010). Light-sensitive lipid-based nanoparticles for drug delivery: design principles and future considerations for biological applications. *Mol Membr Biol* 27, 364-381. 30

14. Tromberg, B.J., Shah, N., Lanning, R., Cerussi, A., Espinoza, J., Pham, T., Svaasand, L., and Butler, J. (2000). Non-invasive in vivo characterization of breast tumors using photon migration spectroscopy. *Neoplasia* 2, 26-40.

15. Rai, P., Mallidi, S., Zheng, X., Rahmanzadeh, R., Mir, Y., Elrington, S., Khurshid, A., and Hasan, T. (2010). Development and applications of photo-triggered theranostic agents. *Adv Drug Deliv Rev* 62, 1094-1124. 40

16. St Denis, T.G., Dai, T., Izikson, L., Astrakas, C., Anderson, R.R., Hamblin, M.R., and Tegosa, G.P. (2011). All you need is light: antimicrobial photoinactivation as an evolving and emerging discovery strategy against infectious disease. *Virulence* 2, 509-520.

17. Vatansever, F., Ferraresi, C., de Sousa, M.V., Yin, R., Rineh, A., Sharma, S.K., and Hamblin, M.R. (2013). Can biowarfare agents be defeated with light? *Virulence* 4. 50

18. Muzykantov, V.R. (2010). Drug delivery by red blood cells: vascular carriers designed by mother nature. *Expert Opin Drug Deliv* 7, 403-427.
19. Getting, S.J., Kaneva, M., Bhadresa, Y., Renshaw, D., Leoni, G., Patel, H.B., Kerrigan, P.M., and Locke, I.C. (2009). Melanocortin peptide therapy for the treatment of arthritic pathologies. *ScientificWorldJournal* 9, 1394-1414.
20. Luger, T.A., and Brzoska, T. (2007). alpha-MSH related peptides: a new class of anti-inflammatory and immunomodulating drugs. *Ann Rheum Dis* 66 Suppl 3, iii52-55. 10
21. Yang, Y.H., Morand, E., and Leech, M. (2013). Annexin A1: potential for glucocorticoid sparing in RA. *Nat Rev Rheumatol* 9, 595-603.
22. Minter, R.R., Cohen, E.S., Wang, B., Liang, M., Vainshtein, I., Reses, G., Eghobamien, L., Harrison, P., Sims, D.A., Matthews, C., Wilkinson, T., Monk, P., Drinkwater, C., Fabri, L., Nash, A., McCourt, M., Jermutus, L., Roskos, L., Anderson, I.K., and Sleeman, M.A. (2013). Protein engineering and preclinical development of a GM-CSF receptor antibody for the treatment of rheumatoid arthritis. *Br J Pharmacol* 168, 200-211. 20
23. Bjordal, J.M., Lopes-Martins, R.A., Joensen, J., Couppe, C., Ljunggren, A.E., Stergioulas, A., and Johnson, M.I. (2008). A systematic review with procedural assessments and meta-analysis of low level laser therapy in lateral elbow tendinopathy (tennis elbow). *BMC Musculoskelet Disord* 9, 75.
24. Lee, H.M., Larson, D.R., and Lawrence, D.S. (2009). Illuminating the chemistry of life: design, synthesis, and applications of "caged" and related photoresponsive compounds. *ACS Chem Biol* 4, 409-427. PMID: PMC2700207. 30
25. Kaplan, J.H., Forbush, B., 3rd, and Hoffman, J.F. (1978). Rapid photolytic release of adenosine 5'-triphosphate from a protected analogue: utilization by the Na:K pump of human red blood cell ghosts. *Biochemistry* 17, 1929-1935.
26. Aujard, I., Benbrahim, C., Gouget, M., Ruel, O., Baudin, J.B., Neveu, P., and Jullien, L. (2006). o-nitrobenzyl photolabile protecting groups with red-shifted absorption: syntheses and uncaging cross-sections for one- and two-photon excitation. *Chemistry* 12, 6865-6879. 40
27. Klan, P., Solomek, T., Bochet, C.G., Blanc, A., Givens, R., Rubina, M., Popik, V., Kostikov, A., and Wirz, J. (2013). Photoremovable protecting groups in chemistry and biology: reaction mechanisms and efficacy. *Chem Rev* 113, 119-191.
28. Shell, T.A., Shell, J.R., Rodgers, Z.L., and Lawrence, D.S. (2014). Tunable Visible and Near-IR Photoactivation of Light-Responsive Compounds by Using Fluorophores as Light-Capturing Antennas. *Angew Chem Int Ed Engl*. 53, 875-8 50

78. PMID: 24285381. PMCID in progress.

29. Pittet, M.J., and Weissleder, R. (2011). Intravital imaging. *Cell* 147, 983-991.

30. Luo, S., Zhang, E., Su, Y., Cheng, T., and Shi, C. (2011). A review of NIR dyes in cancer targeting and imaging. *Biomaterials* 32, 7127-7138.

31. Owens, S.L. (1996). Indocyanine green angiography. *Br J Ophthalmol* 80, 263-266.

10

32. East, J.M., Valentine, C.S., Kanchev, E., and Blake, G.O. (2009). Sentinel lymph node biopsy for breast cancer using methylene blue dye manifests a short learning curve among experienced surgeons: a prospective tabular cumulative sum (CUSUM) analysis. *BMC Surg* 9, 2.

33. Kiesslich, R., Fritsch, J., Holtmann, M., Koehler, H.H., Stolte, M., Kanzler, S., Nafe, B., Jung, M., Galle, P.R., and Neurath, M.F. (2003). Methylene blue-aided chromoendoscopy for the detection of intraepithelial neoplasia and colon cancer in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 124, 880-888.

20

34. Hilderbrand, S.A., and Weissleder, R. (2010). Near-infrared fluorescence: application to in vivo molecular imaging. *Curr Opin Chem Biol* 14, 71-79.

35. Lee, H., Larson, D., and Lawrence, D. (2009). Illuminating the Chemistry of Life: Design, Synthesis, and Applications of Caged and Related Photosensitive Compounds. *ACS Chem Biol*. PMCID: PMC2700207.

36. Lawrence, D.S. (2005). The preparation and in vivo applications of caged peptides and proteins. *Curr Opin Chem Biol* 9, 570-575.

30

37. Dai, Z., Dulyaninova, N.G., Kumar, S., Bresnick, A.R., and Lawrence, D.S. (2007). Visual snapshots of intracellular kinase activity at the onset of mitosis. *Chem Biol* 14, 1254-1260. PMCID: PMC2171364.

38. Veldhuyzen, W.F., Nguyen, Q., McMaster, G., and Lawrence, D.S. (2003). A light-activated probe of intracellular protein kinase activity. *J Am Chem Soc* 125, 13358-13359.

39. Wang, Q., Dai, Z., Cahill, S.M., Blumenstein, M., and Lawrence, D.S. (2006). Light-regulated sampling of protein tyrosine kinase activity. *J Am Chem Soc* 128, 14016-14017.

40

40. Wood, J.S., Koszelak, M., Liu, J., and Lawrence, D.S. (1998). A Caged Protein Kinase Inhibitor. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 7145-7146.

41. Lin, W., Albanese, C., Pestell, R.G., and Lawrence, D.S. (2002). Spatially discrete, light-driven protein expression. *Chem Biol* 9, 1347-1353.

42. Singer, R.H., Lawrence, D.S., Ovrzyn, B., and Condeelis, J. (2005). Imaging of gene expression in living cells and tissues. *J Biomed Opt* 10, 051406

50

43. Curley, K., and Lawrence, D.S. (1998). Photoactivation of a Signal Transduction Pathway in Living Cells. *J Amer Chem Soc* 120, 8573-8574.
44. Curley, K., and Lawrence, D.S. (1999). Caged Regulators of Signaling Pathways. *Pharmacol. Ther.* 82, 347-354.
45. Curley, K., and Lawrence, D.S. (1999). Light-activated proteins. *Curr Opin Chem Biol* 3, 84-88. 10
46. Ghosh, M., Ichetovkin, I., Song, X., Condeelis, J.S., and Lawrence, D.S. (2002). A new strategy for caging proteins regulated by kinases. *J Am Chem Soc* 124, 2440-2441.
47. Ghosh, M., Song, X., Mouneimne, M., Sidani, M., Lawrence, D.S., and Condeelis, J.S. (2004). Cofilin promotes actin polymerization and defines the direction of cell motility. *Science* 304, 743-736.
48. Dai, Z., Dulyaninova, N.G., Kumar, S., Bresnick, A.R., and Lawrence, D.S. (2007). Visual snapshots of intracellular kinase activity at the onset of mitosis. *Chem. Biol.* 14, 1254-1260. PMID: PMC2171364. 20
49. Larson, D.R., Fritzsche, C., Sun, L., Meng, X., Lawrence, D.S., and Singer, R.H. (2013). Direct observation of frequency modulated transcription in single cells using light activation. *Elife* 2, e00750. PMID: PMC3780543.
50. Gug, S., Charon, S., Specht, A., Alarcon, K., Ogden, D., Zietz, B., Leonard, J., Haacke, S., Bolze, F., Nicoud, J.F., and Goeldner, M. (2008). Photolabile glutamate protecting group with high one- and two-photon uncaging efficiencies. *Chembiochem* 9, 1303-1307. 30
51. Bort, G., Gallavardin, T., Ogden, D., and Dalko, P.I. (2013). From one-photon to two-photon probes: "caged" compounds, actuators, and photoswitches. *Angew Chem Int Ed Engl* 52, 4526-4537.
52. Barker, H.A., Weissbach, H., and Smyth, R.D. (1958). A Coenzyme Containing Pseudovitamin B(12). *Proc Natl Acad Sci U S A* 44, 1093-1097.
53. Dolphin, D., Johnson, A.W., and Rodrigo, R. (1964). Some Reactions of the Vitamin B 12 Coenzyme and Its Alkyl Analogues. *Ann N Y Acad Sci* 112, 590-600. 40
54. Taylor, R.T., Smucker, L., Hanna, M.L., and Gill, J. (1973). Aerobic photolysis of alkylcobalamins: quantum yields and light-action spectra. *Arch Biochem Biophys* 156, 521-533.
55. Halpern, J., Kim, S.-H., and Leung, T.W. (1984). Cobalt-carbon bond dissociation energy of coenzyme B12. *J. Am. Chem. Soc.* 106, 8317-8319.
56. Kozlowski, P.M., Kumar, M., Piecuch, P., Li, W., Bauman, N.P., Han 50

sen, J.A., Lodowski, P., and Jaworska, M. (2012). The Cobalt-Methyl Bond Dissociation in Methylcobalamin: New Benchmark Analysis Based on Density Functional Theory and Completely Renormalized Coupled-Cluster Calculations. *Journal of Chemical Theory and Computation* 8, 1870-1894.

57. Bagnato, J.D., Eilers, A.L., Horton, R.A., and Grissom, C.B. (2004). Synthesis and characterization of a cobalamin-colchicine conjugate as a novel tumor-targeted cytotoxin. *J Org Chem* 69, 8987-8996.

58. Gupta, Y., Kohli, D.V., and Jain, S.K. (2008). Vitamin B12-mediated transport: a potential tool for tumor targeting of antineoplastic drugs and imaging agents. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 25, 347-379.

59. Kamkaew, A., Lim, S.H., Lee, H.B., Kiew, L.V., Chung, L.Y., and Burgess, K. (2013). BODIPY dyes in photodynamic therapy. *Chem Soc Rev* 42, 77-88.

60. Awuah, S.G., and You, Y. (2012). Boron dipyrromethene (BODIPY)-based photosensitizers for photodynamic therapy. *RSC Advances* 2, 11169-11183.

61. Oishi, A., Makita, N., Sato, J., and Iiri, T. (2012). Regulation of RhoA signaling by the cAMP-dependent phosphorylation of RhoGDI α . *J Biol Chem* 287, 38705-38715.

62. Patil, R.R., Guhagarkar, S.A., and Devarajan, P.V. (2008). Engineered nanocarriers of doxorubicin: a current update. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 25, 1-61.

63. Volkova, M., and Russell, R., 3rd (2011). Anthracycline cardiotoxicity: prevalence, pathogenesis and treatment. *Curr Cardiol Rev* 7, 214-220.

64. Kuhn, H.J., Braslavsky, S.E., and Schmidt, R. (1989). Chemical actinometry. *Pure Appl. Chem.* 61, 187-210.

65. Majumdar, S., Anderson, M.E., Xu, C.R., Yakovleva, T.V., Gu, L.C., Malefyt, T.R., and Siahaan, T.J. (2012). Methotrexate (MTX)-cIBR conjugate for targeting MTX to leukocytes: conjugate stability and in vivo efficacy in suppressing rheumatoid arthritis. *J Pharm Sci* 101, 3275-3291.

66. Wang, D., Miller, S.C., Liu, X.M., Anderson, B., Wang, X.S., and Goldring, S.R. (2007). Novel dexamethasone-HPMA copolymer conjugate and its potential application in treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 9, R2.

67. Everts, M., Kok, R.J., Asgeirsdottir, S.A., Melgert, B.N., Moolenaar, T.J., Koning, G.A., van Luyn, M.J., Meijer, D.K., and Molema, G. (2002). Selective intracellular delivery of dexamethasone into activated endothelial cells using an E-selectin-directed immunoconjugate. *J Immunol* 168, 883-889.

68. Heath, T.D., Lopez, N.G., Piper, J.R., Montgomery, J.A., Stern, W.H., and Papahadjopoulos, D. (1986). Liposome-mediated delivery of pteridine antifolates to cells in vitro: potency of methotrexate, and its α and γ substituents. *Biochim Biophys Acta* 862, 72-80.

69. Rosowsky, A., Bader, H., Radike-Smith, M., Cucchi, C.A., Wick, M.M., and Freisheim, J.H. (1986). Methotrexate analogues. 28. Synthesis and biological evaluation of new gamma-monoamides of aminopterin and methotrexate. *J Med Chem* 29, 1703-1709.
70. Piper, J.R., Montgomery, J.A., Sirotnak, F.M., and Chello, P.L. (1982). Syntheses of alpha- and gamma-substituted amides, peptides, and esters of methotrexate and their evaluation as inhibitors of folate metabolism. *J Med Chem* 25, 182-187. 10
71. Rosowsky, A., Forsch, R., Uren, J., and Wick, M. (1981). Methotrexate analogues. 14. Synthesis of new gamma-substituted derivatives as dihydrofolate reductase inhibitors and potential anticancer agents. *J Med Chem* 24, 1450-1455.
72. Szeto, D.W., Cheng, Y.C., Rosowsky, A., Yu, C.S., Modest, E.J., Piper, J.R., Temple, C., Jr., Elliott, R.D., Rose, J.D., and Montgomery, J.A. (1979). Human thymidylate synthetase--III. Effects of methotrexate and folate analogs. *Biochem Pharmacol* 28, 2633-2637. 20
73. Markovic, B.D., Vladimirov, S.M., Cudina, O.A., Odovic, J.V., and Karlijikovic-Rajic, K.D. (2012). A PAMPA assay as fast predictive model of passive human skin permeability of new synthesized corticosteroid C-21 esters. *Molecules* 17, 480-491.
74. Civiale, C., Bucaria, F., Piazza, S., Peri, O., Miano, F., and Enea, V. (2004). Ocular permeability screening of dexamethasone esters through combined cellular and tissue systems. *J Ocul Pharmacol Ther* 20, 75-84. 30
75. Samtani, M.N., Lohle, M., Grant, A., Nathanielsz, P.W., and Jusko, W.J. (2005). Betamethasone pharmacokinetics after two prodrug formulations in sheep: implications for antenatal corticosteroid use. *Drug Metab Dispos* 33, 1124-1130.
76. Bohm, M., and Grassel, S. (2012). Role of proopiomelanocortin-derived peptides and their receptors in the osteoarticular system: from basic to translational research. *Endocr Rev* 33, 623-651.
77. Pezacka, E., Green, R., and Jacobsen, D.W. (1990). Glutathionylcobalamin as an intermediate in the formation of cobalamin coenzymes. *Biochem Biophys Res Commun* 169, 443-450. 40
78. Brasch, N.E., Hsu, T.-L.C., Doll, K.M., and Finke, R.G. (1999). Synthesis and characterization of isolable thiolatocobalamin complexes relevant to coenzyme B₁₂-dependent ribonucleoside triphosphate reductase. *J. Inorg. Biochem* 76, 197-209.
79. Suarez-Moreira, E., Hannibal, L., Smith, C.A., Chavez, R.A., Jacobsen, D.W., and Brasch, N.E. (2006). A simple, convenient method to synthesize cobalamins: synthesis of homocysteineylcobalamin, N-acetylcysteineylcobalamin, 2-N-a 50

cetylamino-2-carbomethoxyethanethiolatocobalamin, sulfitocobalamin and nitrocobalamin. Dalton T., 5269-5277.

80. Tahara, K., Matsuzaki, A., Masuko, T., Kikuchi, J., and Hisaeda, Y. (2013). Synthesis, characterization, Co-S bond reactivity of a vitamin B12 model complex having pentafluorophenylthiolate as an axial ligand. Dalton Trans 42, 6410-6416.

81. Peng, J., Tang, K.C., McLoughlin, K., Yang, Y., Forgach, D., and Sension, R.J. (2010). Ultrafast excited-state dynamics and photolysis in base-off B12 coenzymes and analogues: absence of the trans-nitrogenous ligand opens a channel for rapid nonradiative decay. J Phys Chem B 114, 12398-12405.

10

82. Lee, T.R., and Lawrence, D.S. (1999). Acquisition of high-affinity, SH2-targeted ligands via a spatially focused library. J Med Chem 42, 784-787.

83. Lee, T.R., and Lawrence, D.S. (2000). SH2-directed ligands of the Lck tyrosine kinase. J Med Chem 43, 1173-1179.

84. Yeh, R.H., Lee, T.R., and Lawrence, D.S. (2001). From consensus sequence peptide to high affinity ligand, a "library scan" strategy. J Biol Chem 276, 12235-12240.

20

85. Best, M.D. (2009). Click chemistry and bioorthogonal reactions: unprecedented selectivity in the labeling of biological molecules. Biochemistry 48, 6571-6584.

86. Kolb, H.C., Finn, M.G., and Sharpless, K.B. (2001). Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. Angew Chem Int Ed Engl 40, 2004-2021.

30

87. Nguyen, L.T., Oien, N.P., Allbritton, N.L., and Lawrence, D.S. (2013). Lipid pools as photolabile "protecting groups": design of light-activatable bioagents. Angew Chem Int Ed Engl 52, 9936-9939. PMCID: PMC3840492.

88. Muzykantov, V.R. (2013). Drug delivery carriers on the fringes: natural red blood cells versus synthetic multilayered capsules. Expert Opin Drug Deliv 10, 1-4.

89. Smith, W., and Lawrence, D.S. unpublished results.

40

90. Leschke, C., Storm, R., Breitweg-Lehmann, E., Exner, T., Nurnberg, B., and Schunack, W. (1997). Alkyl-substituted amino acid amides and analogous di- and triamines: new non-peptide G protein activators. J Med Chem 40, 3130-3139.

91. Krantz, A. (1997). Red cell-mediated therapy: opportunities and challenges. Blood Cells Mol Dis 23, 58-68.

92. Rossi, L., Serafini, S., Pierige, F., Castro, M., Ambrosini, M.I.,

50

Knafelz, D., Damonte, G., Annese, V., Latiano, A., Bossa, F., and Magnani, M. (2006). Erythrocytes as a controlled drug delivery system: clinical evidences. *J Control Release* 116, e43-45.

93. Biagiotti, S., Paoletti, M.F., Fraternale, A., Rossi, L., and Magnani, M. (2011). Drug delivery by red blood cells. *IUBMB Life* 63, 621-631.

94. Rossi, L., Castro, M., D'Orio, F., Damonte, G., Serafini, S., Bigli, L., Panzani, I., Novelli, G., Dallapiccola, B., Panunzi, S., Di Carlo, P., Bellia, S., and Magnani, M. (2004). Low doses of dexamethasone constantly delivered by autologous erythrocytes slow the progression of lung disease in cystic fibrosis patients. *Blood Cells Mol Dis* 33, 57-63.

10

95. Intra-Erythrocyte Dexamethasone Sodium Phosphate in Ataxia Teleangiectasia Patients (IEDAT01). <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01255358>

96. Bossa, F., Latiano, A., Rossi, L., Magnani, M., Palmieri, O., Dallapiccola, B., Serafini, S., Damonte, G., De Santo, E., Andriulli, A., and Annese, V. (2008). Erythrocyte-mediated delivery of dexamethasone in patients with mild-to-moderate ulcerative colitis, refractory to mesalamine: a randomized, controlled study. *Am J Gastroenterol* 103, 2509-2516.

20

97. Castro, M., Rossi, L., Papadatou, B., Bracci, F., Knafelz, D., Ambrosini, M.I., Calce, A., Serafini, S., Isacchi, G., D'Orio, F., Mambrini, G., and Magnani, M. (2007). Long-term treatment with autologous red blood cells loaded with dexamethasone 21-phosphate in pediatric patients affected by steroid-dependent Crohn disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 44, 423-426.

98. Vivero-Escoto, J.L., Slowing, II, Trewyn, B.G., and Lin, V.S. (2010). Mesoporous silica nanoparticles for intracellular controlled drug delivery. *Small* 6, 1952-1967.

30

99. Li, Z., Barnes, J.C., Bosoy, A., Stoddart, J.F., and Zink, J.I. (2012). Mesoporous silica nanoparticles in biomedical applications. *Chem Soc Rev* 41, 2590-2605.

100. Coll, C., Bernardos, A., Martinez-Manez, R., and Sancenon, F. (2013). Gated silica mesoporous supports for controlled release and signaling applications. *Acc Chem Res* 46, 339-349.

40

101. Croissant, J., Maynadier, M., Gallud, A., Peindy N'dongo, H., Nyalosaso, J.L., Derrien, G., Charnay, C., Durand, J.O., Raehm, L., Serein-Spirau, F., Cheminet, N., Jarrosson, T., Mongin, O., Blanchard-Desce, M., Gary-Bobo, M., Garcia, M., Lu, J., Tamanoi, F., Tarn, D., Guardado-Alvarez, T.M., and Zink, J.I. (2013). Two-photon-triggered drug delivery in cancer cells using nanoimpellers. *Angew Chem Int Ed Engl* 52, 13813-13817.

102. Mal, N.K., Fujiwara, M., and Tanaka, Y. (2003). Photocontrolled reversible release of guest molecules from coumarin-modified mesoporous silica. *Nature* 421, 350-353.

50

103. Wan, X., Liu, T., Hu, J., and Liu, S. (2013). Photo-degradable, protein-polyelectrolyte complex-coated, mesoporous silica nanoparticles for controlled co-release of protein and model drugs. *Macromol Rapid Commun* 34, 341-347.
104. Popat, A., Hartono, S.B., Stahr, F., Liu, J., Qiao, S.Z., and Qing Max Lu, G. (2011). Mesoporous silica nanoparticles for bioadsorption, enzyme immobilisation, and delivery carriers. *Nanoscale* 3, 2801-2818.
105. Catania, A., Gatti, S., Colombo, G., and Lipton, J.M. (2004). Targeting melanocortin receptors as a novel strategy to control inflammation. *Pharmacol Rev* 56, 1-29. 10
106. Bouis, D., Hospers, G.A., Meijer, C., Molema, G., and Mulder, N.H. (2001). Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. *Angiogenesis* 4, 91-102.
107. Zvaifler, N.J., Boyle, D., and Firestein, G.S. (1994). Early synovitis--synoviocytes and mononuclear cells. *Semin Arthritis Rheum* 23, 11-16. 20
108. Kang, Y.M., Zhang, X., Wagner, U.G., Yang, H., Beckenbaugh, R.D., Kurtin, P.J., Goronzy, J.J., and Weyand, C.M. (2002). CD8 T cells are required for the formation of ectopic germinal centers in rheumatoid synovitis. *J Exp Med* 195, 1325-1336.
109. Chan, E.S., and Cronstein, B.N. (2010). Methotrexate--how does it really work? *Nat Rev Rheumatol* 6, 175-178.
110. Chen, W., Lee, J.Y., and Hsieh, W.C. (2002). Effects of dexamethasone and sex hormones on cytokine-induced cellular adhesion molecule expression in human endothelial cells. *Eur J Dermatol* 12, 445-448. 30
111. Nehme, A., and Edelman, J. (2008). Dexamethasone inhibits high glucose-, TNF-alpha-, and IL-1beta-induced secretion of inflammatory and angiogenic mediators from retinal microvascular pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49, 2030-2038.
112. Joyce, D.A., Steer, J.H., and Abraham, L.J. (1997). Glucocorticoid modulation of human monocyte/macrophage function: control of TNF-alpha secretion. *Inflamm Res* 46, 447-451. 40
113. Peshavariya, H.M., Taylor, C.J., Goh, C., Liu, G.S., Jiang, F., Chan, E.C., and Dusting, G.J. (2013). Annexin peptide Ac2-26 suppresses TNFalpha-induced inflammatory responses via inhibition of Rac1-dependent NADPH oxidase in human endothelial cells. *PLoS One* 8, e60790.
114. Morabito, L., Montesinos, M.C., Schreiber, D.M., Balter, L., Thompson, L.F., Resta, R., Carlin, G., Huie, M.A., and Cronstein, B.N. (1998). Methotrexate and sulfasalazine promote adenosine release by a mechanism that requires ecto-5'-nucleotidase-mediated conversion of adenine nucleotides. *J Clin Invest* 50

101, 295-300.

115. Linden, J., and Cekic, C. (2012). Regulation of lymphocyte function by adenosine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32, 2097-2103.

116. Wright, G.P., Stauss, H.J., and Ehrenstein, M.R. (2011). Therapeutic potential of Tregs to treat rheumatoid arthritis. *Semin Immunol* 23, 195-201.

117. Taylor, A.W., and Lee, D.J. (2011). The alpha-melanocyte stimulating hormone induces conversion of effector T cells into treg cells. *J Transplant* 2011, 246856. 10

118. Muller, W.A., and Luscinskas, F.W. (2008). Assays of transendothelial migration in vitro. *Methods Enzymol* 443, 155-176.

119. Shulman, Z., and Alon, R. (2009). Chapter 14. Real-time in vitro assays for studying the role of chemokines in lymphocyte transendothelial migration under physiologic flow conditions. *Methods Enzymol* 461, 311-332.

120. Grisar, J., Aringer, M., Koller, M.D., Stummvoll, G.H., Eselbock, D., Zwolfer, B., Steiner, C.W., Zierhut, B., Wagner, L., Pietschmann, P., and Smolen, J.S. (2004). Leflunomide inhibits transendothelial migration of peripheral blood mononuclear cells. *Ann Rheum Dis* 63, 1632-1637. 20

121. Yang, Y.H., Rajaiah, R., Ruoslahti, E., and Moudgil, K.D. (2011). Peptides targeting inflamed synovial vasculature attenuate autoimmune arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 12857-12862.

122. Wythe, S.E., DiCara, D., Taher, T.E., Finucane, C.M., Jones, R., Bombardieri, M., Man, Y.K., Nissim, A., Mather, S.J., Chernajovsky, Y., and Pitzalis, C. (2013). Targeted delivery of cytokine therapy to rheumatoid tissue by a synovial targeting peptide. *Ann Rheum Dis* 72, 129-135. 30

123. Lee, L., Buckley, C., Blades, M.C., Panayi, G., George, A.J., and Pitzalis, C. (2002). Identification of synovium-specific homing peptides by in vivo phage display selection. *Arthritis Rheum* 46, 2109-2120.

124. Lin, H.B., Garcia-Echeverria, C., Asakura, S., Sun, W., Mosher, D.F., and Cooper, S.L. (1992). Endothelial cell adhesion on polyurethanes containing covalently attached RGD-peptides. *Biomaterials* 13, 905-914. 40

125. Fens, M.H., Storm, G., Pelgrim, R.C., Ultee, A., Byrne, A.T., Gaillard, C.A., van Solinge, W.W., and Schiffelers, R.M. (2010). Erythrophagocytosis by angiogenic endothelial cells is enhanced by loss of erythrocyte deformability. *Exp Hematol* 38, 282-291.

126. Neogen Corporation. http://www.neogen.com/Toxicology/pdf/Catalogs/Forensic_Catalog_13.pdf

127. Alpha Labs. <http://www.alphalabs.co.uk/product-information/diagnostic-products/clinical-chemistry/methotrexate.aspx> 50

128. (a) Lee, H. M.; Larson, D. R.; Lawrence, D. S. *ACS Chem. Biol.* 2009, 4, 409-27. (b) Brieke, C.; Rohrbach, F.; Gottschalk, A.; Mayer, G. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2012, 51, 8446-76. (c) Klan, P.; Solomek, T.; Bochet, C. G.; Blanc, A.; Givens, R.; Rubina, M.; Popk, V.; Kostikov, A.; Wirz, J. *Chem. Rev.* 2013, 113, 119-91.
129. Tromberg, B. J.; Shah, N.; Lanning, R.; Espinoza, J.; Pham, T.; Svendsen, L.; Butler, J. *Neoplasia* 2000, 2, 26 - 40. 10
130. (a) Goguen, B. N.; Aemissegger, A.; Imperiali, B. J. *Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 11038-41. (b) Hagen, V.; Dekowski, B.; Nache, V.; Schmidt, R.; Geibler, D.; Lorenz, D.; Eichhorst, J.; Keller, S.; Kaneko, H.; Benndorf, K.; Wiesner, B. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2005, 44, 7887-91. (c) Kantevari, S.; Matsuzaki, M.; Kanemoto, Y.; Kasai, H.; Ellis-Davies, G. C. *Nat. Methods* 2010, 7, 123-5. (d) Menge, C.; Heckel, A. *Org. Lett.* 2011, 13, 4620-3. (e) Priestman, M. A.; Sun, L.; Lawrence, D. S. *ACS Chem. Biol.* 2011, 6, 377-84.
131. Bort, G.; Gallavardin, T.; Ogden, D.; Dalko, P.I. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2013, doi: 10.1002/anie.201204203. [Epub ahead of print]. 20
132. Priestman, M. A.; Shell, T. A.; Sun, L.; Lee, H.-M.; Lawrence, D. S. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2012, 51, 7684-7.
133. Taylor, R. T.; Smucker, L.; Hanna, M. L.; Gill, J. *Arch. Biochem. Biophys.* 1973, 156, 521-3.
134. (a) Lee, M.; Grissom, C. B. *Org. Lett.* 2009, 11, 2499-502. (b) Smeitzer, C. C.; Cannon, M. J.; Pinson, P. R.; Munger, J. D., Jr.; West, F. G.; Grissom, C. B. *Org. Lett.* 2001, 3, 799-801. (c) Jacobsen, D. W. *Methods Enzym.* 1980, 67, 12-9. (d) Rosendahl, M. S.; Omann, G. M.; Leonard, N. J. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1982, 79, 3480-4. (e) Jacobsen, D. W.; Holland, R. J.; Montejano, Y.; Huennekens, F. M. J. *Inorg. Biochem.* 1979, 10, 53-65. 30
135. (a) Halpern, J.; Kim, S.-H.; Leung, T. W. *J. Am. Chem. Soc.* 1984, 106, 8317-9. (b) Kozlowski, P. M.; Kumar, M.; Piecuch, P.; Li, W.; Bauman, N. P.; Hansen, J. A.; Lodowski, P.; Jaworska, M.; J. *Chem. Theory Comput.* 2012, 8, 1870 - 94 and references cited therein.
136. Schwartz, P. A.; Frey, P. A. *Biochemistry* 2007, 46, 7284 - 92. 40
137. Lee, H. M.; Priestman, M. A.; Lawrence, D. S. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 1446-7.
138. (a) Bagnato, J. D.; Eilers, A. L.; Horton, R. A.; Grissom, C. B. *J. Org. Chem.* 2004, 69, 8987-96. (b) Gupta, Y.; Kohli, D. V.; Jain, S. K. *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst.* 2008, 25, 347-78.
139. (a) Kamkaew, A.; Lim, S. H.; Lee, H. B.; Kiew, L. V.; Chung, L. Y.; Burgess, K. *Chem. Soc. Rev.* 2013, 42, 77-88. (b) Awuah, S. G.; You, Y. *RSC Advances* 2012, 2, 11169-83. (c) Lim, S. H.; Thivierge, C.; Nowak-Sliwinska, P.; Han, 50

J.; van den Bergh, H.; Wagnieres, G.; Burgess, K.; Lee, H. B. J. Med. Chem. 2010, 53, 2865-74.

140. (a) Bochet, C. G. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2001, 40, 2071-3. (b) Kotzur, N.; Briand, B.; Beyermann, M.; Hagen, V. J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 16927-31.

141. Al-Saigh, H. Y.; Kemp, T. J. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2 1983, 6 15-9.

10

142. Agostinis, P., et al. CA Cancer J. Clin. 2011, 61, 250-281.

143. Allison, R. R.; Bagnato, V. S.; Sibata, C. H. Future Oncol. 2010, 6(6), 929-940.

144. Smeltzer, C. C.; Cannon, M. J.; Pinson, P. R.; Munger, J. D., Jr.; West, F. G.; Grissom, C. B Org. Lett., 2001, 3, 799 - 801.

145. Priestman, M. A.; Shell, T. A.; Sun, L.; Lee, H.-M.; Lawrence, D. S. Angew. Chem. 2012, 124, 7804 - 7807; Angew. Chem. Int. Ed. 2012, 51, 7684 - 7 687.

20

146. The formula and exact mass of Atto725, carboxylic acid have not been reported.

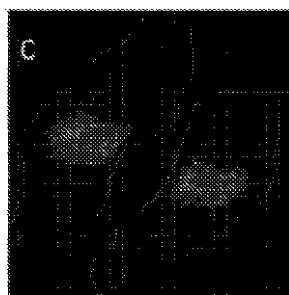
147. The formula and exact mass of Dylight800, carboxylic acid have not been reported.

148. The formula and an accurate mass of Alexa700, carboxylic acid have not been reported.

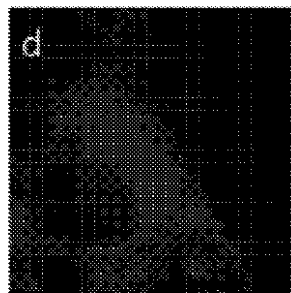
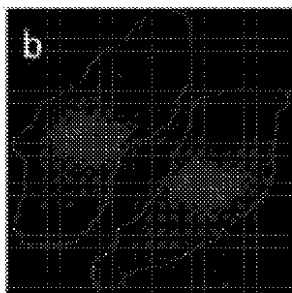
30

149. Taylor, R. T.; Smucker, L.; Hanna, M. L.; Gill, J. Arch. Biochem. Biophys. 1973, 156, 521 - 533.

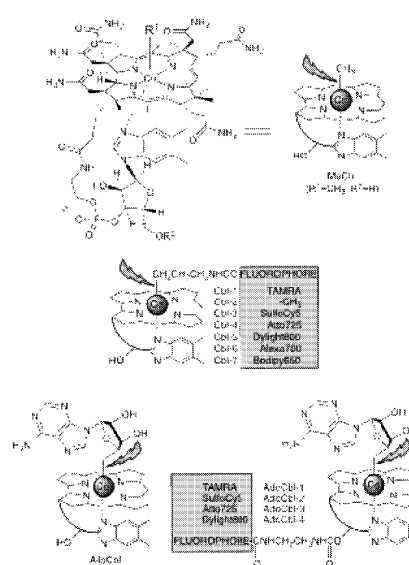
【 図 4 c 】



【 図 4 d 】



【 図 5 】



【 図 4 f 】

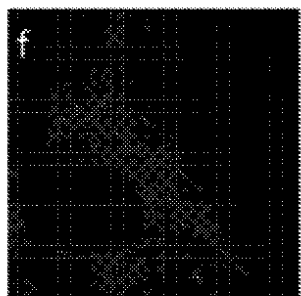


FIG. 5

【 図 6 】

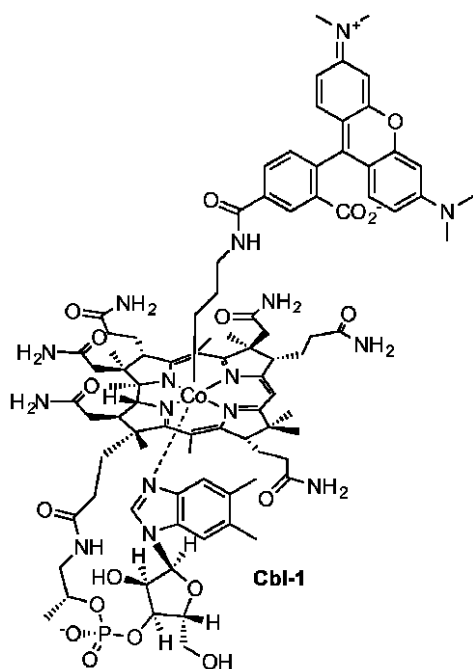


FIG. 6

【 図 8 】

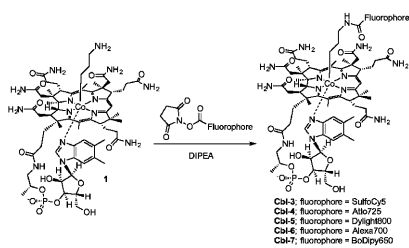


FIG. 8

【 図 7 】

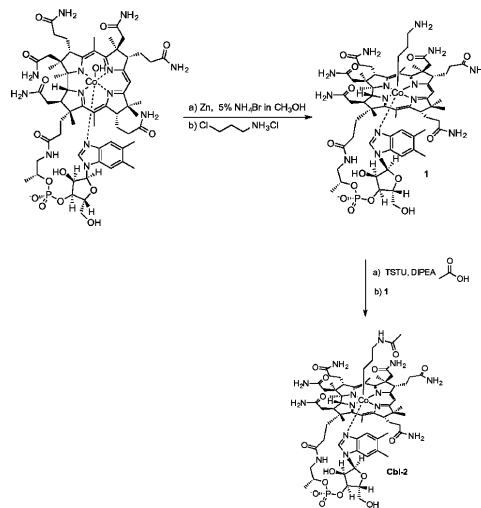


FIG. 7

【 図 10 】

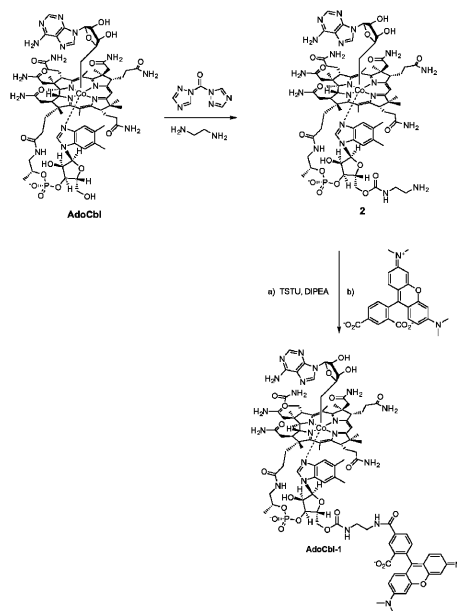


FIG. 10

【 図 1 1 】

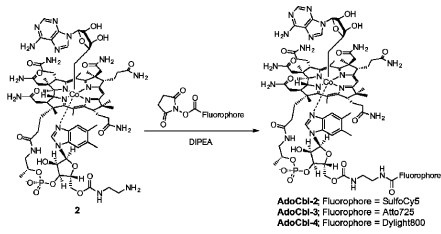


FIG. 11

【 図 3 7 】



FIG. 37

【 図 3 9 】

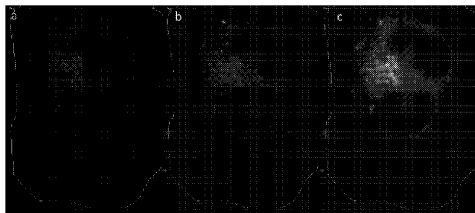


FIG. 39

【 図 5 2 】

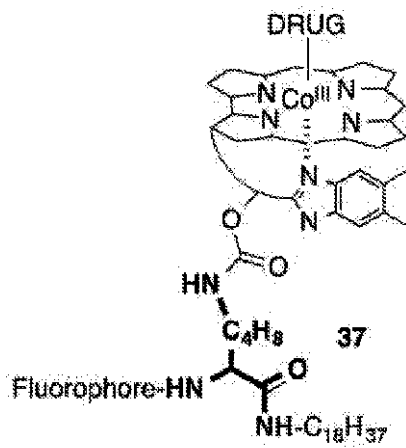


FIG. 52

【 図 5 8 】

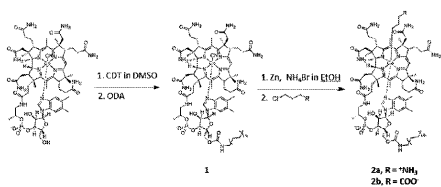


FIG. 58

【 図 4 0 】

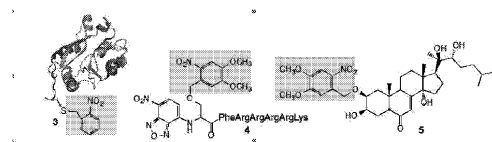


FIG. 40

【 図 4 2 】

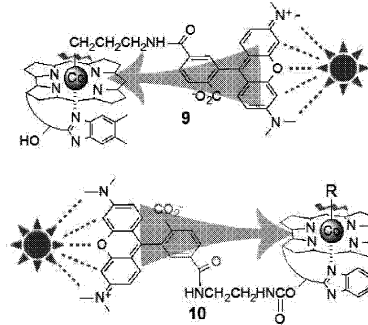


FIG. 42

【 図 4 3 】

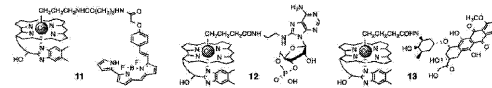


FIG. 43

【 図 5 9 】

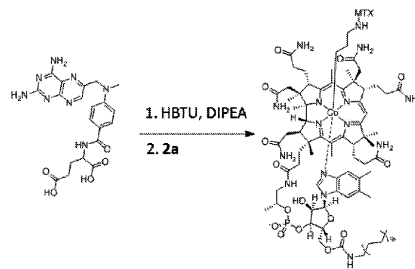


FIG. 59

【 図 6 0 】

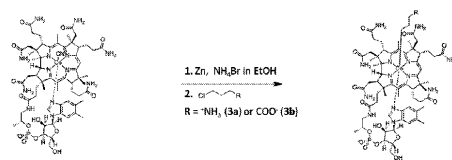


FIG. 60

【 図 6 1 】

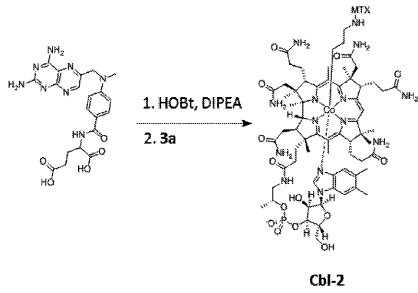


FIG. 61

【 図 6 3 】

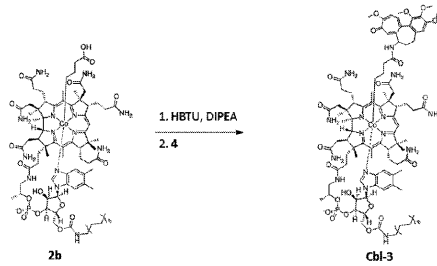


FIG. 63

【 図 6 4 】

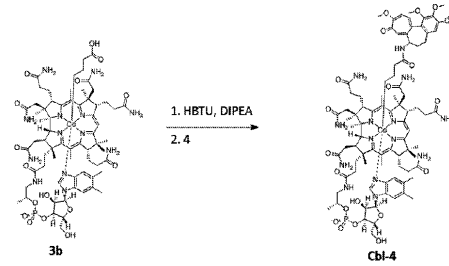


FIG. 64

【 図 6 6 】

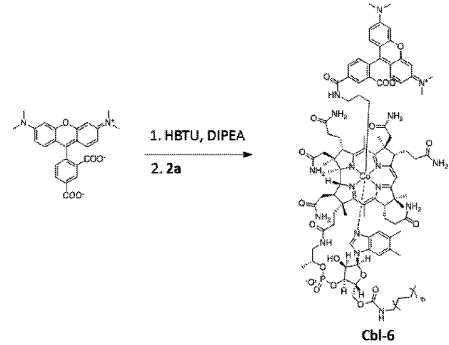


FIG. 66

【 図 6 7 】

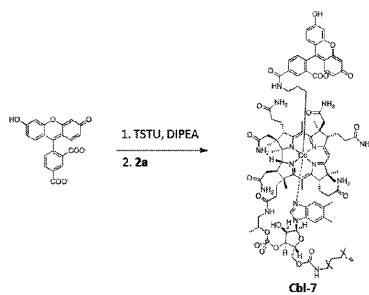


FIG. 67

【 図 6 8 】

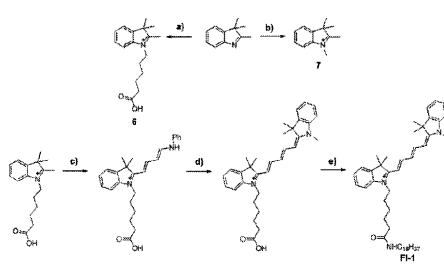


FIG. 68

【 図 6 9 】

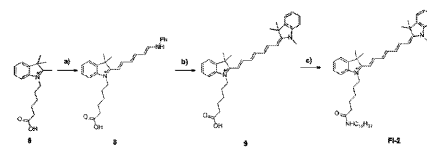


FIG. 69

【 図 7 0 】

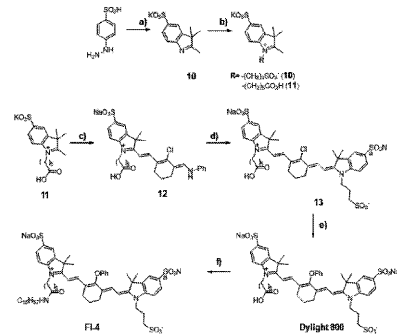


FIG. 70

【 図 8 0 】

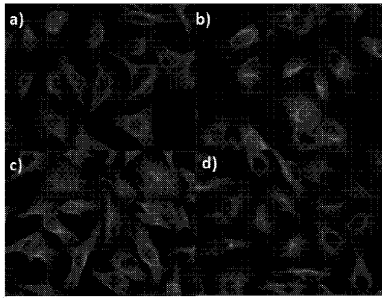


FIG. 80

【 図 8 1 】

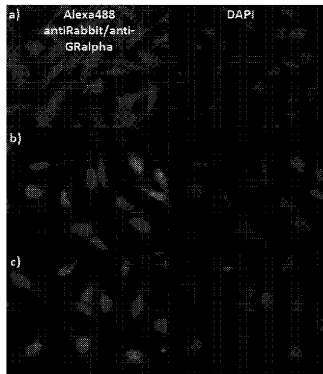


FIG. 81

【 図 8 2 】

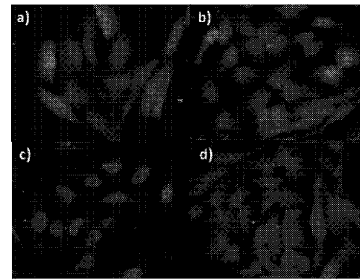
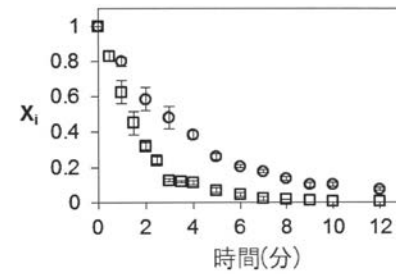
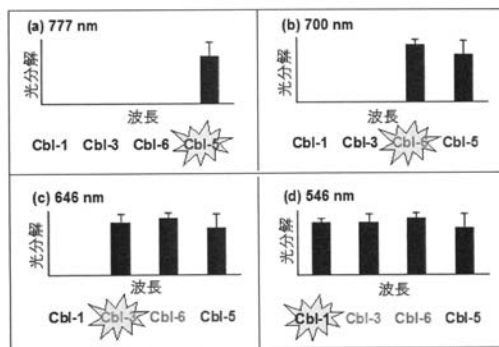


FIG. 82

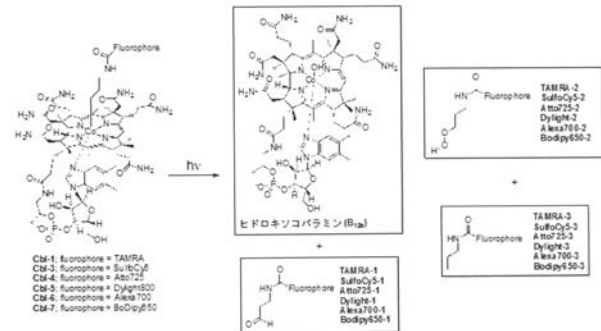
【 図 1 】



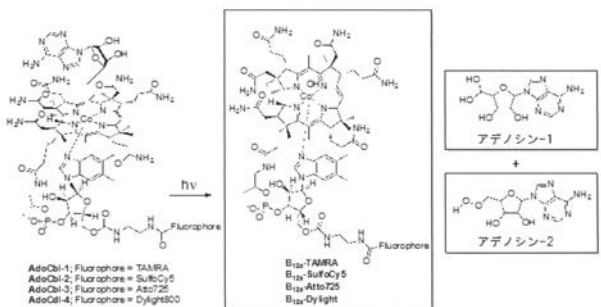
【 図 2 】



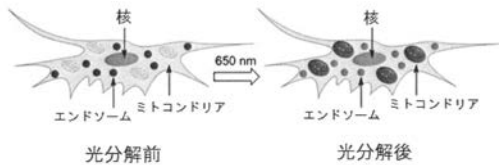
【 図 1 2 】



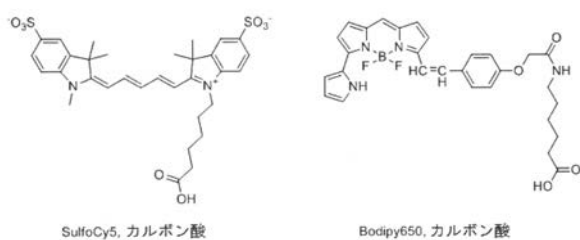
【 図 1 3 】



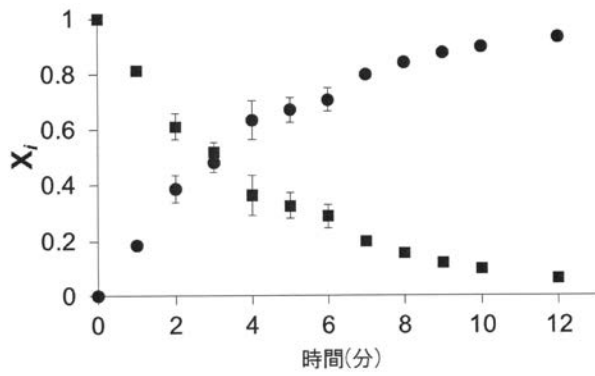
【 図 3 】



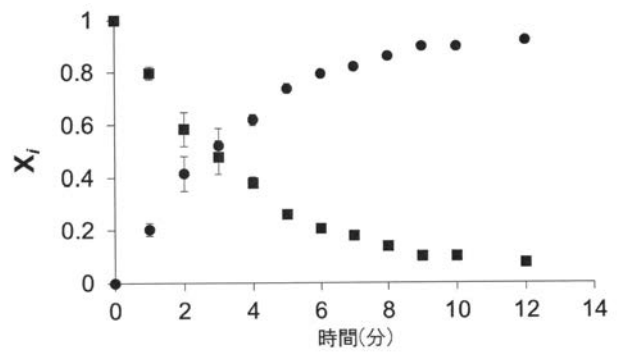
【 図 9 】



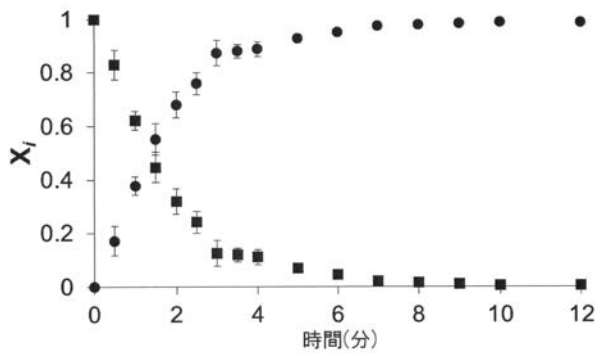
【図 1 4】



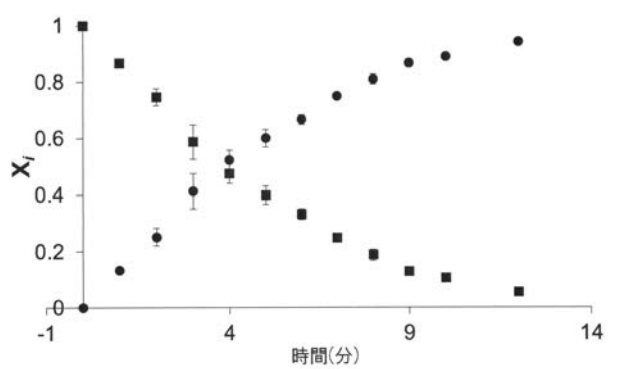
【図 1 6】



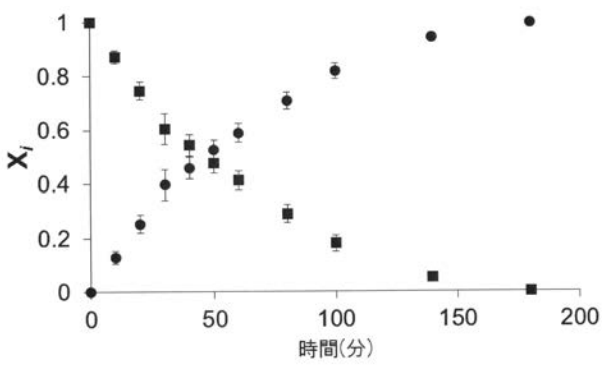
【図 1 5】



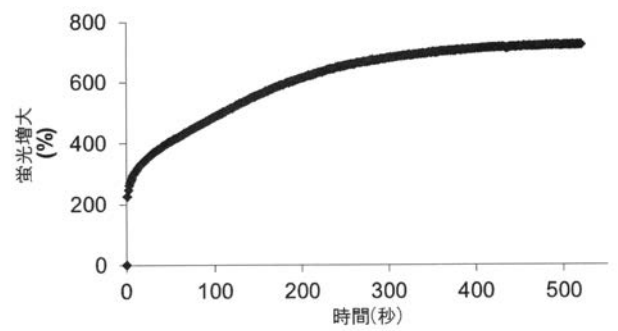
【図 1 7】



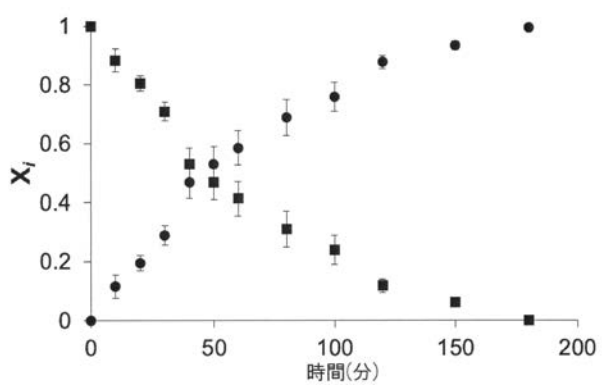
【図 1 8】



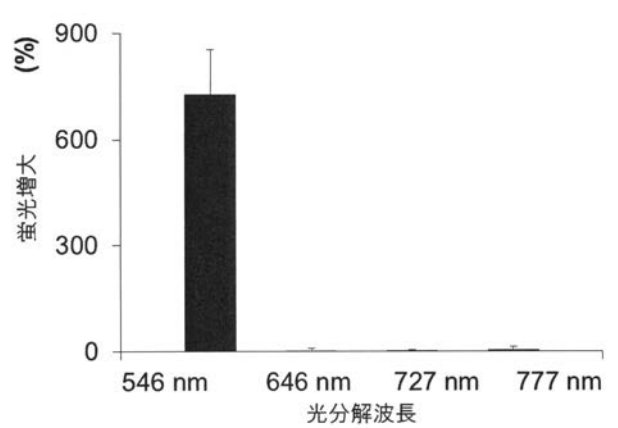
【図 2 0】



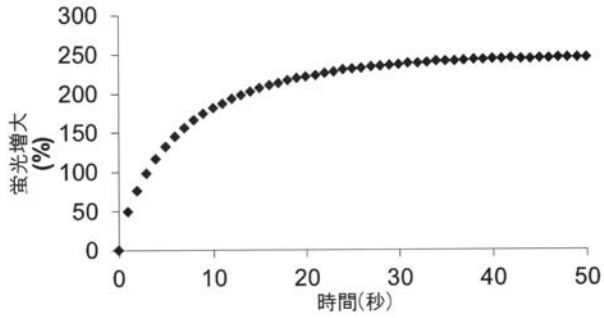
【図 1 9】



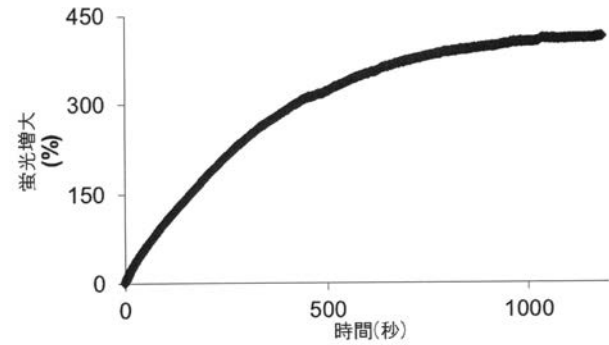
【図 2 1】



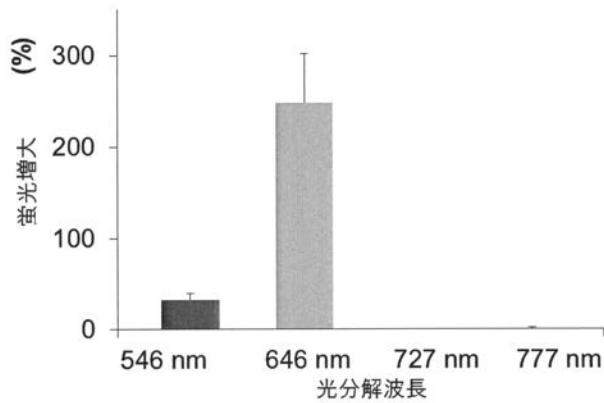
【図 2 2】



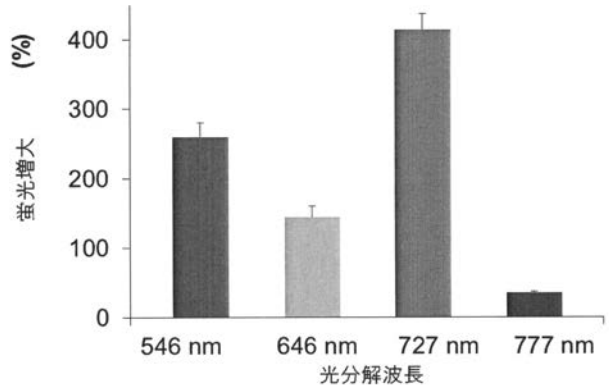
【図 2 4】



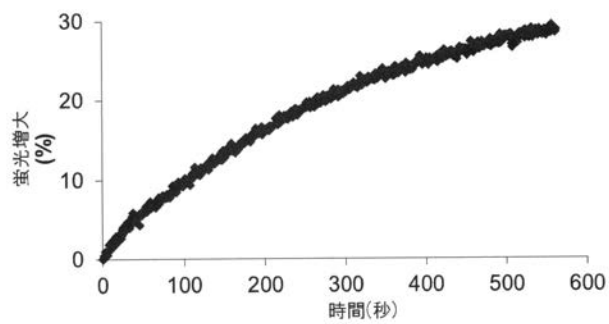
【図 2 3】



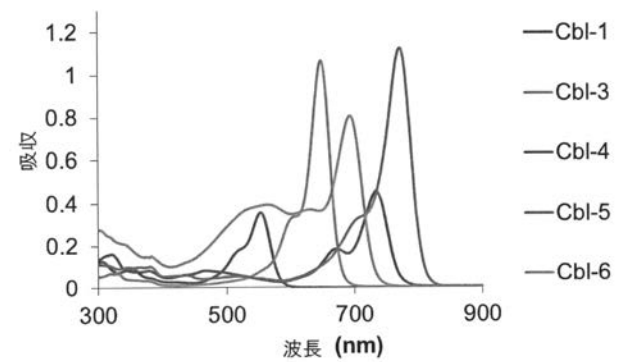
【図 2 5】



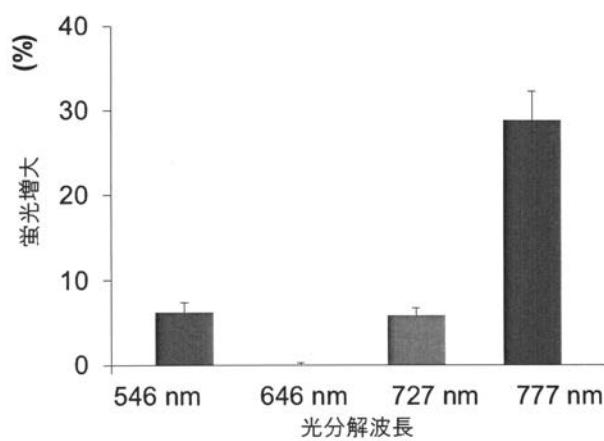
【図 2 6】



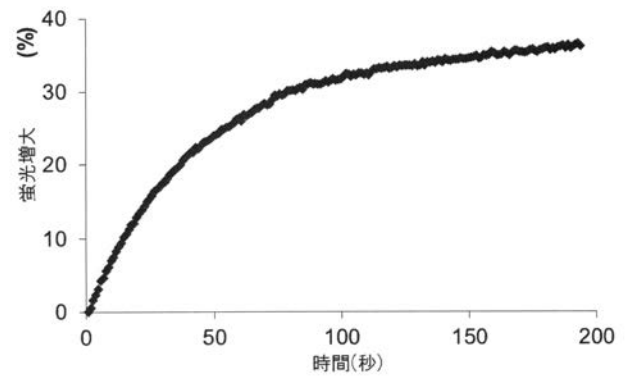
【図 2 8】



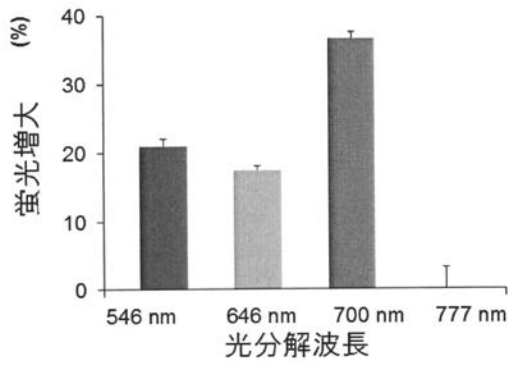
【図 2 7】



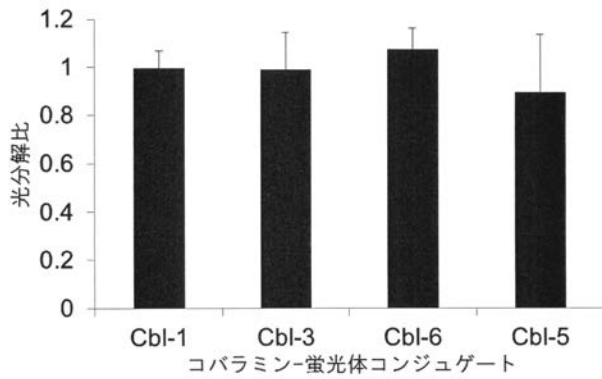
【図 2 9】



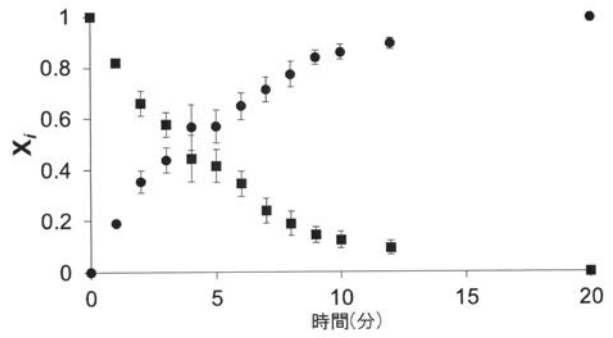
【図 3 0】



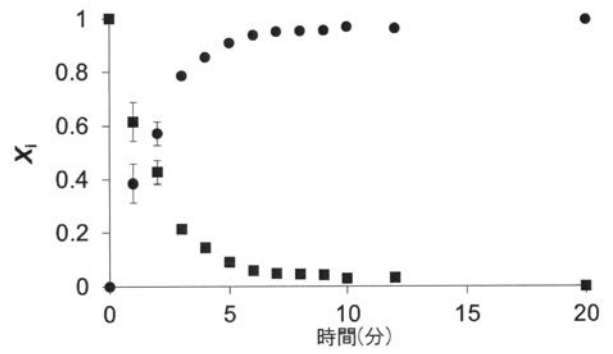
【図 3 1】



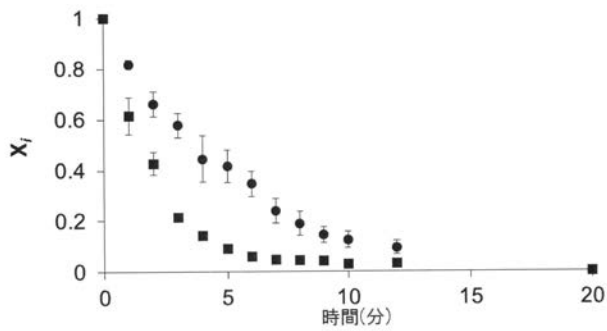
【図 3 2】



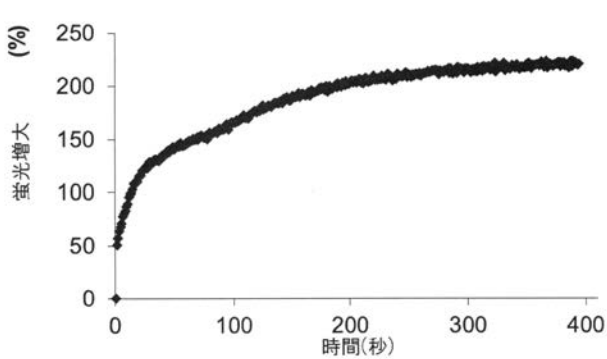
【図 3 3】



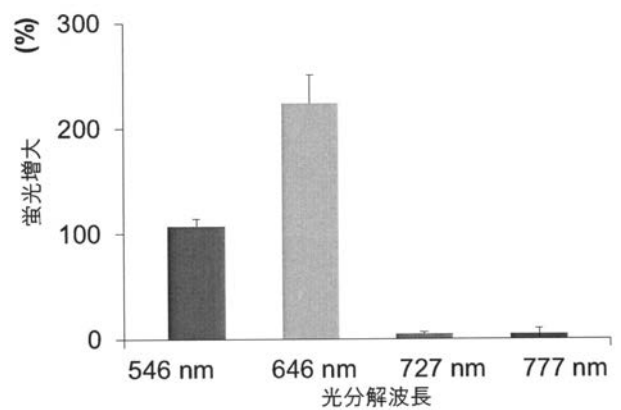
【図 3 4】



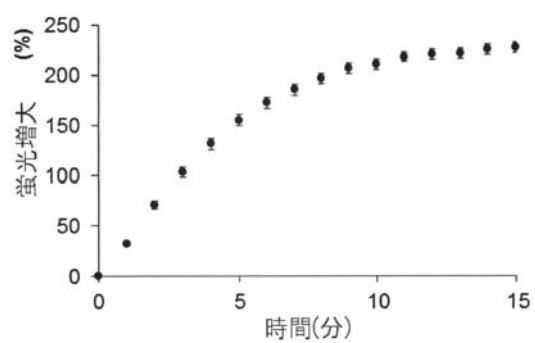
【図 3 5】



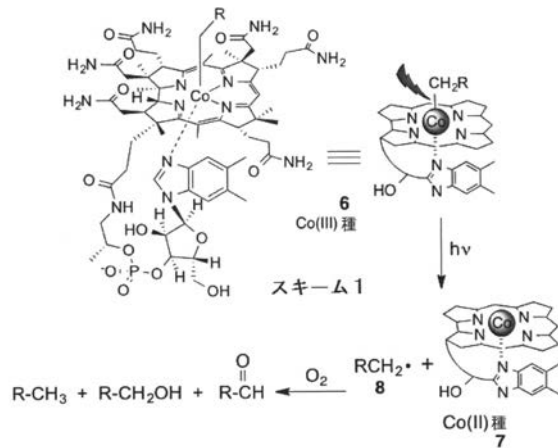
【図 3 6】



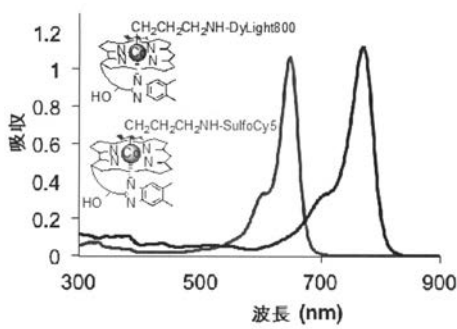
【図 3 8】



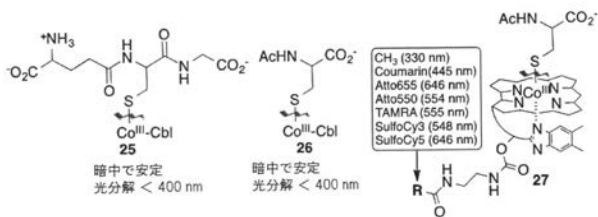
【図 4 1】



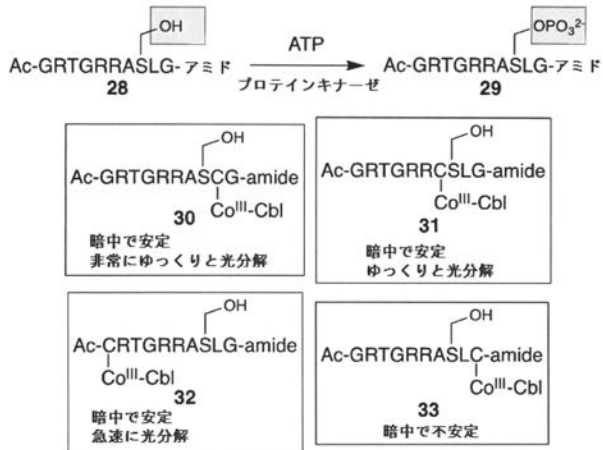
【図 4 4】



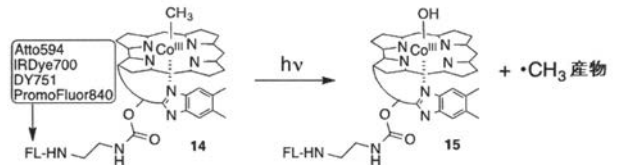
【図 4 8】



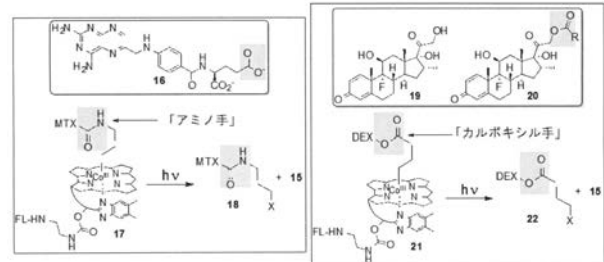
【図 4 9】



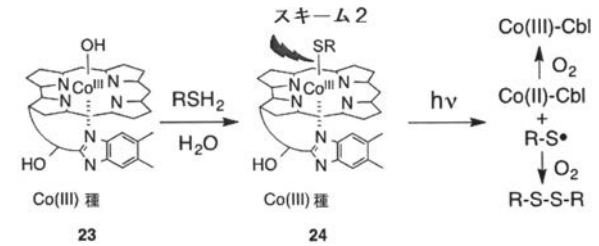
【図 4 5】



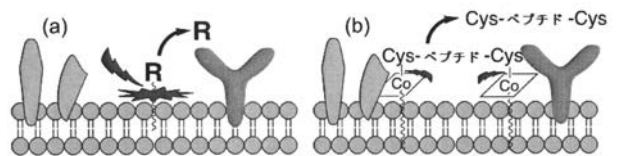
【図 4 6】



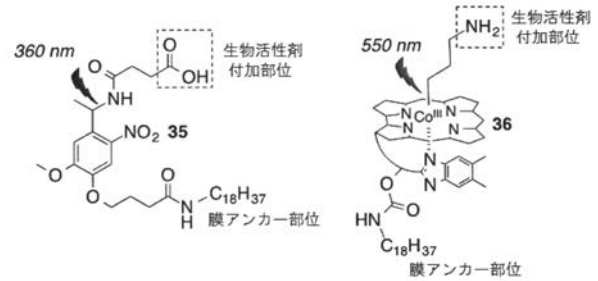
【図 4 7】



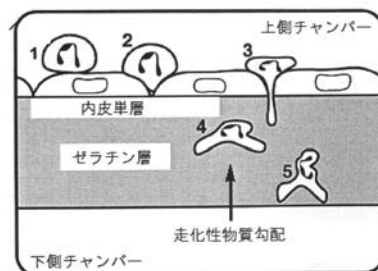
【図 5 0】



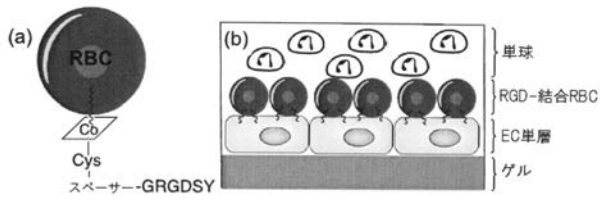
【図 5 1】



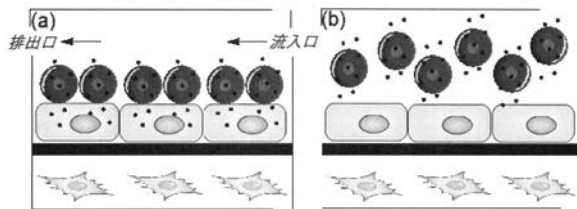
【図 5 3】



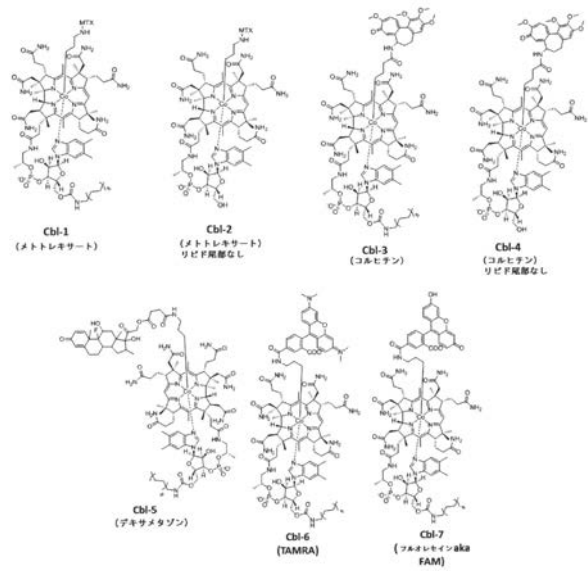
【図 5 4】



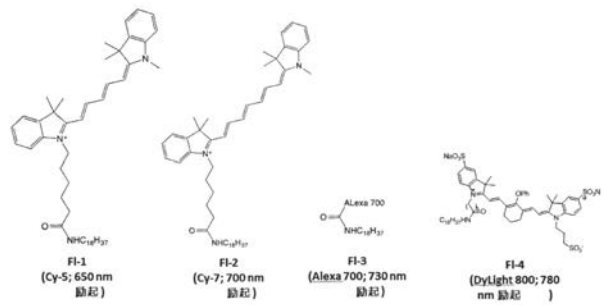
【図 5 5】



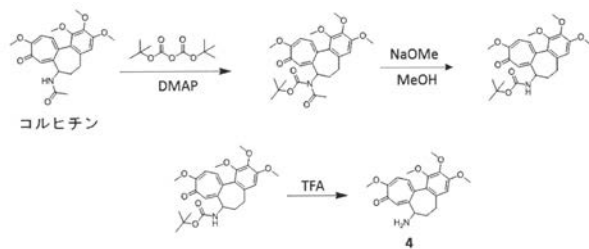
【図 5 6】



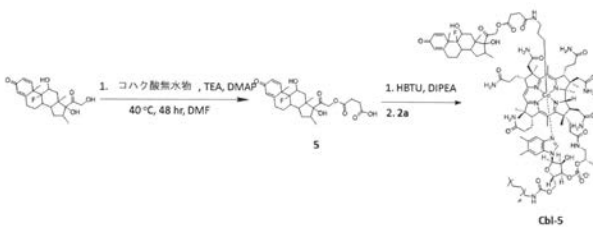
【図 5 7】



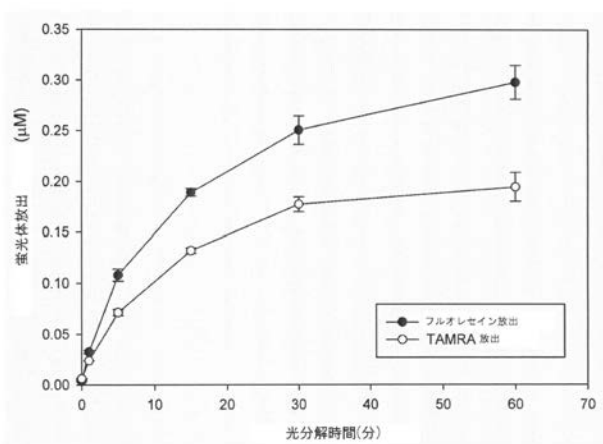
【図 6 2】



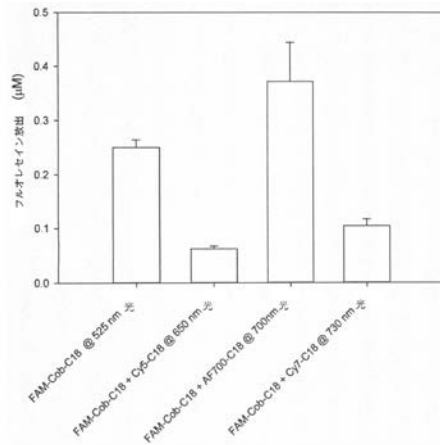
【図 6 5】



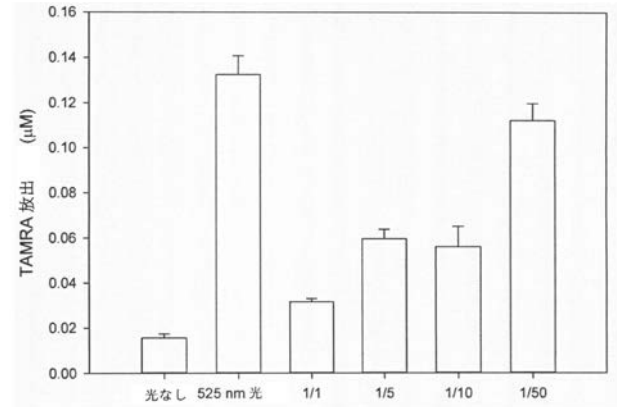
【図 7 1】



【図 7 2】

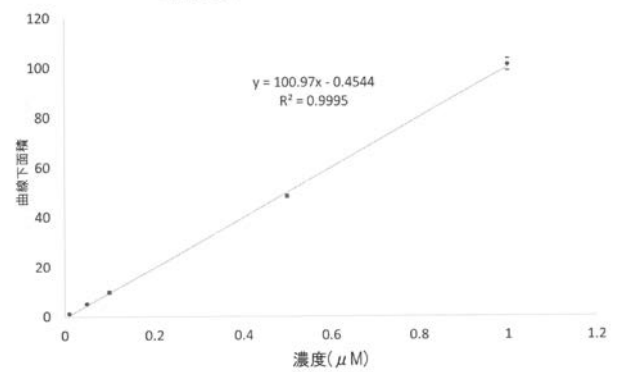


【図 7 3】

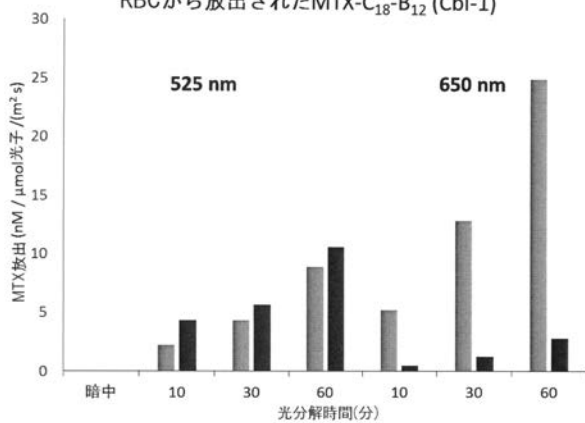


【図 7 4】

MTX 標準曲線

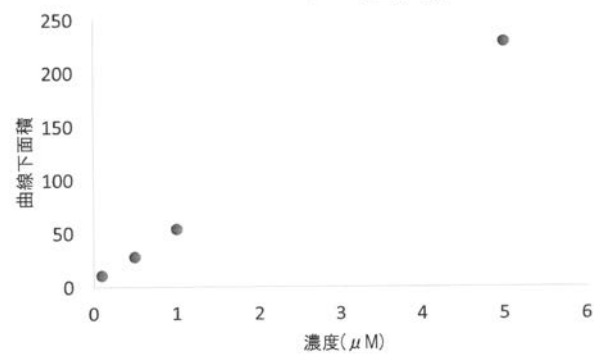


【図 7 5】

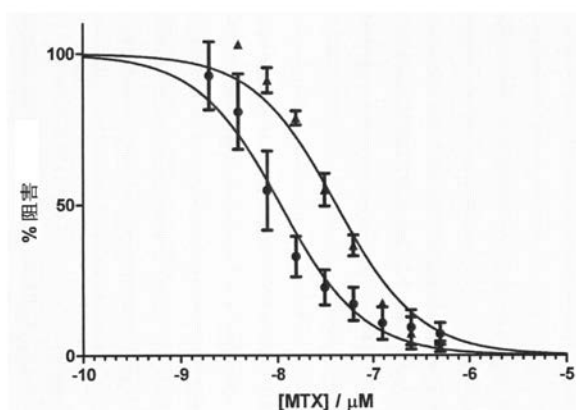
RBCから放出されたMTX-C₁₈-B₁₂ (Cbl-1)

【図 7 7】

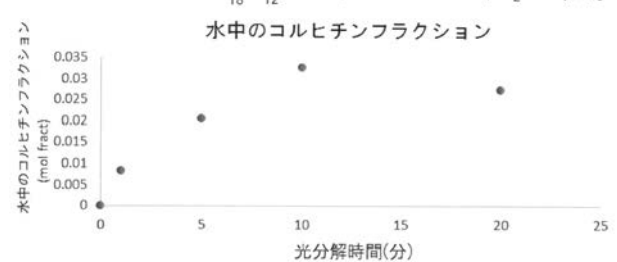
コルヒチン標準曲線



【図 7 6】

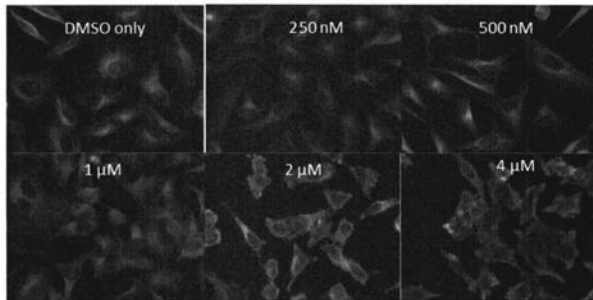


【図 7 8】

コルヒチン-C₁₈-B₁₂ (Cbl-3) オクタノール/H₂Oの移動

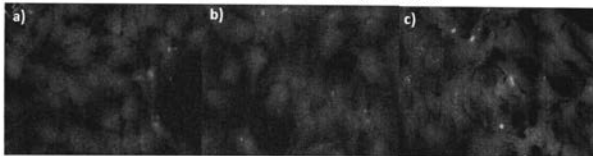
【図 7 9】

HeLa細胞に対するコルヒチンの効果

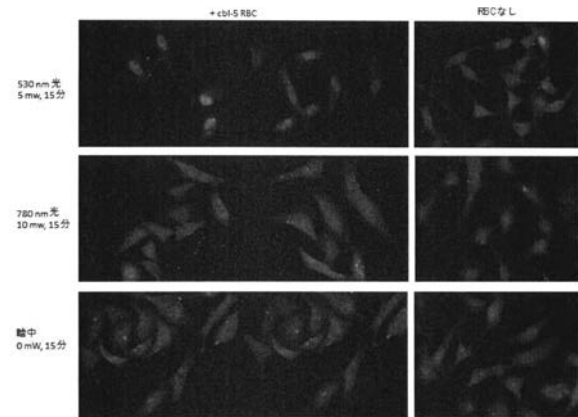


【図 8 3】

デキサメタゾン-RBC漏れ試験

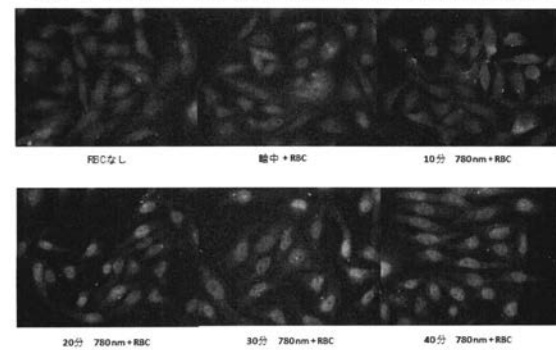


【図 8 4】



530および780 nmで照射したCbl-5を積んだRBCに曝露したHeLa細胞

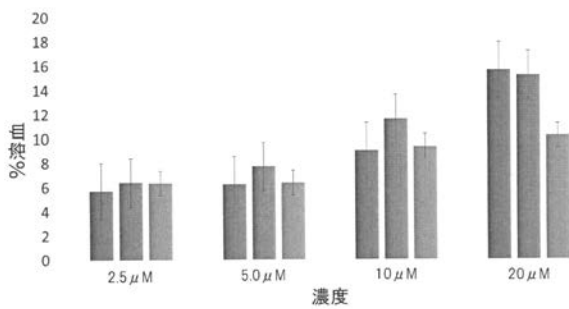
【図 8 5】

C₁₈-デキサメタゾン-B₁₂/Dylight 800 RBCの780 nmにおける放出

【図 8 6】

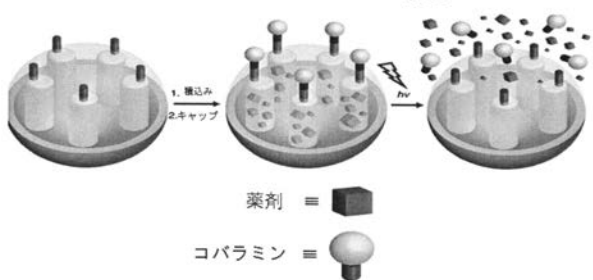
溶血試験

■ MTX ■ コルヒチン ■ デキサメタゾン



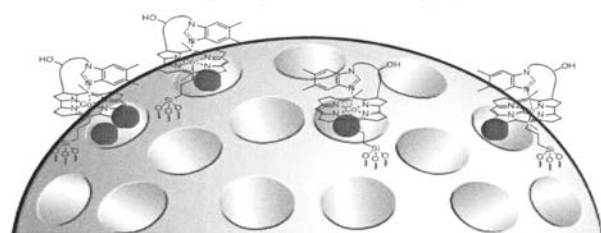
【図 8 7】

メソ多孔性シリカナノ粒子



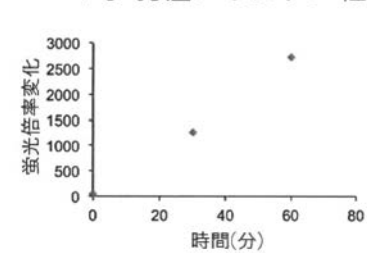
【図 8 8】

メソ多孔性シリカナノ粒子



【図 8 9】

メソ多孔性シリカナノ粒子



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2014/033337

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.: 17-34, 43
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 17-34, 43 pertain to a method for treatment of the human by therapy, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv), to search.
2. ☒ Claims Nos.: 5-8, 11-12, 18-33
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:
Claims 5-8, 11-12, 18-33 are regarded to be unclear since they refer to claims which are not drafted in accordance with PCT Rule 6.4(a).
3. ☒ Claims Nos.: 4, 9-10, 13-17, 34
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 fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2014/033337

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
A61K 31/714(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 31/714; C12Q 1/48; C07K 14/435; A61K 48/00; C12Q 1/68; C12N 15/88; A61K 39/395		
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: photolabile, cobalamin, fluorophore, red blood cell, lipid, drug delivery		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2004-0166553 A1 (NGUYEN, QUAN et al.) 26 August 2004 See abstract, claims 158-159, 162-163, 167-168, 177-179.	1
Y		2-3
A		35-42
Y	US 2002-0115595 A1 (GRISSOM, CHARLES B. et al.) 22 August 2002 See paragraphs [0021], [0040], [0091], claims 1, 5, 14.	2-3
X	US 2005-282203 A1 (NGUYEN, QUAN et al.) 22 December 2005 See abstract, paragraphs [0014], [0073], claims 1, 23, 25, 30.	1
A	US 2006-0240088 A1 (LAWRENCE, DAVID S. et al.) 26 October 2006 See abstract, claims 1-7, 11.	1-3, 35-42
A	LEE, SANG-MIN et al., 'Polymer-Caged Liposomes: A pH-Responsive Delivery System with High Stability', Journal of The American Chemical Society, 2007, Vol. 129, pp. 15096-15097 See the whole document.	1-3, 35-42
<input checked="" 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 another 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 18 August 2014 (18.08.2014)		Date of mailing of the international search report 19 August 2014 (19.08.2014)
Name and mailing address of the ISA/KR  International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-472-7140		Authorized officer CHOI, Sung Hee  Telephone No. +82-42-481-8740

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US2014/033337

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	NGUYEN, LUONG T. et al., 'Lipid Pools As Photolabile "Protecting Groups": Design of Light-Activatable Bioagents', <i>Angewandte Chemie</i> , 31 July 2013 (E-pub.), Vol. 125, pp. 10120-10123 See the whole document.	35,38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2014/033337

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2004-0166553 A1	26/08/2004	AT 459725 T	15/03/2010
		AU 2004-295617 A1	15/06/2004
		AU 2004-295683 A1	15/06/2004
		AU 295683 B2	29/11/2007
		CA 2505603 A1	03/06/2004
		CA 2505721 A1	03/06/2004
		DE 60331580 D1	15/04/2010
		EP 1565578 A2	24/08/2005
		EP 1565578 A4	07/11/2007
		EP 1567662 A2	31/08/2005
		EP 1567662 A4	17/10/2007
		EP 1567662 B1	03/03/2010
		US 2005-0059028 A1	17/03/2005
		US 7541193 B2	02/06/2009
		WO 2004-045547 A2	03/06/2004
		WO 2004-045547 A3	31/03/2005
		WO 2004-046339 A2	03/06/2004
		WO 2004-046339 A3	28/10/2004
US 2002-0115595 A1	22/08/2002	AT 298344 T	15/07/2005
		AU 1997-41482 B2	20/09/2001
		AU 1998-48297 A	19/03/1998
		AU 4148297 A	19/03/1998
		AU 738431 B2	20/09/2001
		CA 2264592 A1	05/03/1998
		CA 2264592 C	21/02/2012
		DE 69733618 D1	28/07/2005
		DE 69733618 T2	11/05/2006
		EP 1007533 A1	14/06/2000
		EP 1007533 A4	07/08/2002
		EP 1007533 B1	22/06/2005
		ES 2244006 T3	01/12/2005
		JP 2001-501596 A	06/02/2001
		NZ 334870 A	22/12/2000
		PT 1007533 E	30/09/2005
		US 2002-0049154 A1	25/04/2002
		US 2002-0111294 A1	15/08/2002
		US 6315978 B1	13/11/2001
US 2005-0282203 A1	22/12/2005	US 6776976 B2	17/08/2004
		US 6777237 B2	17/08/2004
		US 6790827 B2	14/09/2004
		WO 98-08859 A1	05/03/1998
		AU 2004-291104 A1	15/06/2004
		EP 1565714 A2	24/08/2005
		EP 1565714 A4	03/06/2009
		US 2005-0051706 A1	10/03/2005
		US 2008-0030713 A1	07/02/2008
		US 7271886 B2	18/09/2007

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2014/033337

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2006-0240088 A1	26/10/2006	US 7551271 B2	23/06/2009
		WO 2004-046691 A2	03/06/2004
		WO 2004-046691 A3	02/09/2004
		AU 2003-284316 A1	13/05/2004
		US 8076318 B2	13/12/2011
		WO 2004-037983 A2	06/05/2004
		WO 2004-037983 A3	09/12/2004

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 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 0 1	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 K 47/26 (2006.01)	A 6 1 K 47/26	

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

(71) 出願人 515252307
 ユニバーシティ オブ ノースキャロライナ アット チャペル ヒル
 UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL
 アメリカ合衆国、ノースキャロライナ 27599-4105、チャペル ヒル、イースト キャ
 メロン アベニュー 222、パイナム ホール 308、シーピー #4105
 222 E. Cameron Avenue, 308 Bynum Hall, CB #4
 105, Chapel Hill, North Carolina 27599-4105
 U.S.A.

(74) 代理人 100065248
 弁理士 野河 信太郎

(74) 代理人 100159385
 弁理士 甲斐 伸二

(74) 代理人 100163407
 弁理士 金子 裕輔

(74) 代理人 100166936
 弁理士 稲本 潔

(74) 代理人 100174883
 弁理士 富田 雅己

(72) 発明者 ローレンス, デヴィッド エル.
 アメリカ合衆国、ノースキャロライナ 27516-0336、チャペル ヒル ウッド クリー
 ク コート 91

(72) 発明者 シェル, トーマス
 アメリカ合衆国、ノースキャロライナ 27514-7057、チャペル ヒル、コナー ドライ
 ブ 210、アパートメント #14

F ターム (参考) 4C076 AA95 CC05 DD65 DD66 EE57 EE59
 4C084 AA11 AA17 AA20 DC01 MA05 MA52 MA55 MA56 MA58 MA59
 MA60 MA63 MA65 MA66 NA10 NA13 ZB082 ZB152 ZB262 ZB332
 ZB352 ZC352
 4C086 AA01 AA02 DA39 MA02 MA03 MA05 NA10 NA13 ZB15 ZB26
 ZC35