

(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2004-528294

(P2004-528294A)

(43) 公表日 平成16年9月16日(2004.9.16)

(51) Int.Cl.⁷

A 6 1 K 31/122

A 6 1 K 31/136

A 6 1 K 31/222

A 6 1 P 17/00

A 6 1 P 31/04

F I

A 6 1 K 31/122

A 6 1 K 31/136

A 6 1 K 31/222

A 6 1 P 17/00

A 6 1 P 31/04

テーマコード (参考)

4 C 2 0 6

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 75 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-560674 (P2002-560674)

(86) (22) 出願日 平成14年1月29日 (2002.1.29)

(85) 翻訳文提出日 平成15年7月29日 (2003.7.29)

(86) 国際出願番号 PCT/IB2002/000269

(87) 国際公開番号 W02002/060483

(87) 国際公開日 平成14年8月8日 (2002.8.8)

(31) 優先権主張番号 09/771,555

(32) 優先日 平成13年1月30日 (2001.1.30)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 503271730

ガヴァナース・オブ・ザ・ユニヴァーシテ
ィ・オブ・アルバータカナダ国アルバータ、エドモントン、スト
リート8625-112、キャンパスタワ
ー222、ユニヴァーシティ・オブ・アル
バータ

(74) 代理人 100091731

弁理士 高木 千嘉

(74) 代理人 100080355

弁理士 西村 公佑

(74) 代理人 100105290

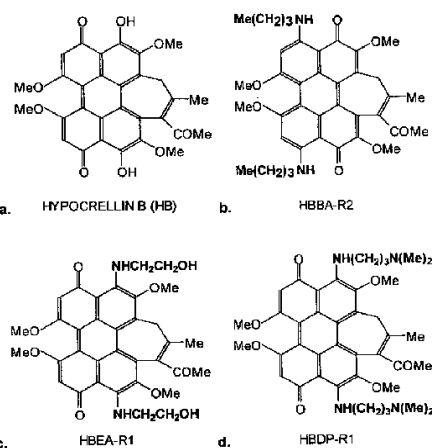
弁理士 三輪 昭次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 光増感剤および音増感剤として使用するためのペリレンキノン

(57) 【要約】

本発明は、音増感剤および光増感剤のペリレンキノン、
並びにその治療的使用である。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ペリレンキノン誘導体を含む組成物を投与し、そして該ペリレンキノン在所定の周波数の音に曝すことによって該誘導体を活性化することを含む治療法。

【請求項 2】

ペリレンキノンがヒポクレリン、セルコスポリン、フレイクロム、エルシノクロム、クラドクロム、エリスロアフインおよびカルホスチンを含む群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

ペリレンキノンに官能基を賦与する、請求項 2 に記載の方法。

10

【請求項 4】

ペリレンキノンが、不活性状態では高濃度で無毒であり、活性状態では低濃度で有毒である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

ペリレンキノンがヒポクレリン誘導体である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

ヒポクレリン誘導体に官能基を賦与する、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

ヒポクレリン誘導体がブチルアミノ化ヒポクレリン B、2 - (N, N - ジメチルアミノ) - プロピルアミン - ヒポクレリン B、エタノールアミン化ヒポクレリン B、および 1, 12 - ビス [2 - (アセチルオキシ) プロピル] - 2, 4, 6, 7, 9, 11 - ヘキサメトキシ - 3, 10 - ペリレンジオンからなる群から選択される、請求項 5 に記載の方法。

20

【請求項 8】

ヒポクレリン誘導体が、不活性状態では高濃度で無毒であり、活性状態では低濃度で有毒である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

組成物が標的成分をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

組成物が、疾患、障害、疾病または病状に対する標的部分を含む、請求項 9 に記載の方法。

30

【請求項 11】

治療法が、皮膚症状、癌、ウイルス性疾患、レトロ・ウイルス性疾患、細菌性疾患および真菌性疾患を治療することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

誘導体を活性化することが誘導体を音に曝すことを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

誘導体を光に曝すことをさらに含む、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

誘導体を音に曝すことが誘導体を超音波に曝すことを含む、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

誘導体を音に曝すことが、誘導体を約 50 kHz と約 12 MHz の間の周波数に曝すことを含む、請求項 14 に記載の方法。

40

【請求項 16】

誘導体を音に曝すことが、誘導体を約 1 MHz と約 3 MHz の間の周波数に曝すことを含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

誘導体を活性化することが、誘導体を音および光に曝すことを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

組成物を投与することが、組成物を身体全体中に分布させることをさらに含む、請求項 1

50

に記載の方法。

【請求項 19】

組成物を活性化する前に、正常細胞から組成物を排除することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 20】

組成物を身体全体中に分布させることが、急速に増殖する細胞によって組成物を選択的に保持させることをさらに含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 21】

急速に増殖する細胞によって組成物を選択的に保持させることをさらに含む、請求項 19 に記載の方法。

10

【請求項 22】

腫瘍細胞を不活性化するための方法であって、適切な量の少なくとも 1 つのヒポクレリン誘導体を投与し、そして音の周波数を使用してヒポクレリン誘導体を活性化することを含む方法。

【請求項 23】

ヒポクレリン誘導体を活性化することが、ヒポクレリン誘導体を約 50 kHz ~ 約 12 MHz の音の周波数に曝すことを含む、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

光を使用してヒポクレリン誘導体を活性化することをさらに含む、請求項 22 に記載の方法。

20

【請求項 25】

所定の疾患または病状を治療するための方法であって、ペリレンキノン誘導体を含む組成物を治療量投与すること、ペリレンキノン誘導体を身体の一部に分布させること、および光および/または音を使用してペリレンキノン誘導体を活性化することを含む方法。

【請求項 26】

ペリレンキノンを経験する身体の一部に局在化させる、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

身体の一部が過剰増殖性細胞を含む、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

投与ステップが、送達成分に結合したペリレンキノン誘導体を投与することを含む、請求項 27 に記載の方法。

30

【請求項 29】

疾患または病状を治療するための方法であって、音増感剤ヒポクレリン誘導体、ならびに pKa 調節剤、緩衝剤、塩、塩基、酸、生理食塩水およびアジュバントの少なくとも 1 つを含む組成物を投与することを含む方法。

【請求項 30】

無毒の音増感剤を含む、疾患、障害、または病状の治療用の組成物であって、該音増感剤がペリレンキノンを含む組成物。

【請求項 31】

ペリレンキノンが、ヒポクレリン、セルコスポリン、フレイクロム、エルシノクロム、クラドクロム、エリスロアフィンおよびカルホスチンを含む群から選択される、請求項 30 に記載の組成物。

40

【請求項 32】

ペリレンキノンに官能基を賦与する、請求項 31 に記載の組成物。

【請求項 33】

ペリレンキノンが、不活性状態では高濃度で無毒であり、活性状態では低濃度で有毒である、請求項 30 に記載の組成物。

【請求項 34】

音増感剤および光増感剤であるペリレンキノンを経験する身体の一部に局在化させる、請求項 30 に記載の組成物。

50

【請求項 35】

ペリレンキノンがヒポクレリン誘導体である、請求項 30 に記載の組成物。

【請求項 36】

ペリレンキノンがヒポクレリン誘導体である、請求項 31 に記載の組成物。

【請求項 37】

ヒポクレリン誘導体に官能基を賦与する、請求項 30 に記載の組成物。

【請求項 38】

ヒポクレリン誘導体が、ブチルアミノ化ヒポクレリン B、2 - (N,N - ジメチルアミノ) - プロピルアミン - ヒポクレリン B、エタノールアミン化ヒポクレリン B、および 1,12 - ビス[2 - (アセチルオキシ)プロピル] - 2,4,6,7,9,11 - ヘキサメトキシ - 3,10 - ペリレンジオンからなる群から選択される、請求項 37 に記載の組成物。 10

【請求項 39】

ヒポクレリン誘導体が、不活性状態では高濃度で無毒であり、活性状態では低濃度で有毒である、請求項 36 に記載の組成物。

【請求項 40】

組成物が標的成分をさらに含む、請求項 30 に記載の組成物。

【請求項 41】

組成物が、疾患、障害、疾病、または病状に対する標的成分を含む、請求項 40 に記載の組成物。

【請求項 42】

皮膚症状、癌、ウイルス性疾患、レトロ・ウイルス性疾患、細菌性疾患および真菌性疾患を治療するための音増感剤を含む、請求項 30 に記載の組成物。 20

【請求項 43】

ペリレンキノン誘導体を含む組成物を投与すること、ならびに該ペリレンキノン所定の波長の光および所定の周波数の音に曝すことによって該誘導体を活性化することを含む治療法。

【請求項 44】

ペリレンキノンがヒポクレリン誘導体である、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 45】

ペリレンキノンを含む、疾患、障害、または病状の治療用の組成物であって、該ペリレンキノンが光増感剤および音増感剤である組成物。 30

【請求項 46】

ペリレンキノンがヒポクレリン誘導体である、請求項 45 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、光増感剤および音増感剤である化合物を投与することによって疾患などを治療するための、組成物および方法に関する。

【背景技術】

【0002】

伝統的に、癌の治療には 3 つの主要な戦略：手術、化学療法、および放射線療法が含まれている。これらの分野では相当な進歩が遂げられてきているが、さらに有効で安全な代替的な治療の探索が続いている。Lipson 他は、1966 年に Mayo Clinic で光力学的療法 (PDT) を使用した、最初の人物であった [Proc. IX Internat. Cancer Congress, page 393 (1966)]。 40

【0003】

PDT の出現以来、長期の皮膚の光過敏症、組成物が分子凝集する傾向がある (光増強作用の付随的な損失を伴う) 親油性分子のオリゴマー混合物であること、複雑な薬物動態、「治療域」(600 nm ~ 850 nm、すなわち可視赤線) の吸収および光活性が乏しいことを含めた問題が、光増感剤の使用と結びついている。さらに、臨床組成物においてさえも 50

、バッチ再現性が悪くなっている。

【0004】

生物系での、ヒポクレリンなどのペリレンキノノイド色素 (PQP) の光増感性の性質は、過去20年間の間に認識されてきている。Diwu他、J. Photochem. Photobiol. A: Chem.、64: 273 (1992) ; Zhang他、(1989) ; およびWan他、「Hypocrellin A, a new drug for photochemotherapy, 「Kexue Tongbao」 (英語版) 26: 1040 (1981)」を参照のこと。

【0005】

ペリレンキノンは非常に多種多様な群の天然色素を含み、これらはいくつか特有の化学的および生物学的性質を有する。今日までに同定されている天然のペリレンキノノイド色素 (PQP) には、ヒポクレリン、セルコスポリン、フレイクロム、クラドクロム、エルシノクロム、エリスロアフィン、およびカルホスチンがある。これらの大部分は、さまざまなカビによって生成される。これらの一般的な化学的性質に関しては、[Weiss他、Prog. Chem. Org. Nat. Prod.、52: 1 (1987) およびDiwu他、Photochem and Photobiol.、52: 609~616 (1990) を参照のこと。] PQPの一般的な光物理的および光化学的性質は、Diwu他、Pharmac. Ther.、63: 1 (1994) 中に概説されている。ヒポクレリンはペリレンキノノイド色素の一般的なクラスに属しており、ヒポクレリンA (HA) およびヒポクレリンB (HB) を含む。

10

【0006】

作用部位において十分な活性化された光増感剤を集めることが困難であるために、治療剤として広く使用されている、以前から知られている光増感剤は存在していない。

20

【0007】

音響化学療法 (SDT) の重要性は、根本的には簡潔な、有効な腫瘍治療であるPDTとその類似性にあり、その成功は光と薬剤、すなわち、どちらもそれ自体に毒性効果がない2つの治療要素を、組み合わせて使用することによるものである (Marcus、1992)。PDTには穏かな副作用があり、健康な組織を壊すことはほとんどなく、良い治療係数および改善された臨床的性質を有する新しい光増感剤が開発されている。SDTの開発に関する主な刺激は、PDTの線量測定の欠点を改善することである。現在PDTは、表面的な腫瘍に関して使用することに制限されている。身体中深くの腫瘍に対するPDTの使用には、隙間を照射することが必要であり、これによって治療の複雑性が増大し、その非侵襲性の性質が害される。SDTは、このような腫瘍に到達するための手段を与える。なぜなら、超音波は数センチメートルの組織中に容易に伝わり、光と同様に、腫瘍体に主に集まることができ、そこで音増感化合物を活性化するからである。標的化SDTは、標的組織に対する影響をさらに制限することによって、この療法の耐性を改善する可能性を与える。

30

【0008】

これらの発見は著しい進展を表すものであるが、実験的SDTの開発には、2つの重大な欠陥が依然として存在する。1つの重大な問題は、好ましい臨床的性質を有する音響化学物質が存在しないことである。ポルフィリンは著しい皮膚の光過敏症を引き起こすことが知られており (Estey他、1996)、ドキソルピシンは心臓毒性であり (Myers他、1976)、かつDMSO、DMFおよびMMFは肝毒性である (MisikおよびRiesz、1996)。副作用があまり無く即座に取り除かれる、優れた音響化学的性質を有する新しい増感剤は、SDTの臨床的な適用例を大幅に改善すると思われる。他の問題は、音響化学物質を評価するために使用される条件が標準化されていないことである。

40

【0009】

可能性のある音響化学物質は、 $0.25 \text{ W cm}^2 / \sim 40 \text{ W cm}^2$ の範囲の超音波強度、および $500 \text{ MHz} \sim 1 \text{ MHz}$ の周波数への曝露にしたがって試験されてきている (Harrison他、1991 ; Sasaki他、1998)。in vivoでの使用は、超音波エネルギーのほぼ等方性の散逸のために大きなエネルギーを必要とすると思われるが、in vitroでの実験条件とin vivoでのそれを比較するための努力はほとんどされていなかった。1つのグル

50

ープが音響化学効果の証拠を発見する場合、異なる研究者達は明らかに類似の条件下でそれを発見することはない。臨床用途に適合性がある標準的な超音波処理およびアッセイ・システムの開発によって、現在および将来の音増感剤の音響化学効果をさらに厳密に評価することができるであろう。

【 0 0 1 0 】

増感剤の音響化学的活性化は、有用であることが見出されている。なぜなら超音波は、エネルギーを適度に小さな体積に集束させる能力を保ちながら、介在組織を貫通して所望の治療体積に達するための適切な組織減衰係数を有しているからである。診断用超音波は、先進国の世界で広く使用されている充分容認された非侵襲性の処置であり、胎児画像化に関してさえも安全であるとみなされている。診断用超音波の周波数範囲は100 kHzと10 2 MHzの間にあるが、50 kHzの音によって、ミクロ領域のキャビテーションによる細胞破壊を行うのに十分なエネルギーが与えられる。

10

【 0 0 1 1 】

音響化学療法は、可視光線の組織貫通が制限されるために、標準的な光力学的療法では利用できない治療戦略を与える。一例は、微小転移性病態の局所的および部分的な広がり依然として臨床的に検出不能である、新たに診断される乳癌の治療であると思われる。免疫複合体（抗乳癌Mab、音増感剤ハイブリッド体）を使用して、正常な組織を損傷することなく、微小転移を選択的に根絶することが理論上可能であると思われる。

【 0 0 1 2 】

他の波と共有のこれらの基本的性質以外に、水中を伝播するとき、超音波は特有の性質を示す。ある閾値強度を超えると、水中の超音波の波の伝播によって、「キャビテーション」と呼ばれる効果が誘導される（Rayleigh、1917；Connolly and Fox、1954）。キャビテーションは、波サイクルの半分の希薄化中の水中での小さな気泡すなわち「空洞」の形成、次にサイクルの半分の圧縮中のこれらの気泡の崩壊を含む（Putterman、1995）。空洞は、投射される超音波放射体のエネルギーを数倍に集束させる（Hiller他、1992）。その結果、水中の空洞の領域は、温度および圧力が非常に高い部位である。空洞の崩壊の際に生じる温度の推定値は、5000 K ~ 10⁶ Kの範囲である（Suslick他、1986；Flint and Suslick、1991；MisikおよびRiesz、1995；Kaiser、1995）。

20

【 0 0 1 3 】

超音波に曝露することの生物学的効果は、その物理的および化学的効果の結果である。超音波治療の最も明らかな生物学的効果は、超音波が通過する媒体を加熱することに由来する。このような加熱は、傷ついた組織を癒すことを手助けするための物理療法中に利用され（Lehmann他、1967；Patrick、1966）、腫瘍を治療するための可能性のある物理療法として研究されてきている。このことは、組織の温度が42℃より高い状態である高体温に対する、多くの腫瘍の感受性によるものである（Doss and McCabe、1976；Marmor他、1979；Sculier and Klastersky、1981；Bleehen、1982；Hynynen and Lulu、1990）。超音波は、放射線治療単独と比べたin vivoの治療応答性を改善するために、放射線治療と組み合わせても使用されている（Clarke他、1970；Repacholi他、1971；Misumori他、1996）。治療目的での超音波の使用における主な危険は、わん曲半径が小さい骨領域の近くの領域の構造上の障害および超音波エネルギーの優先的な吸収のために、「ホット・スポット」が形成されることである（Lehmann他、1967；Linke他、1973）。これらのホット・スポットは、近くの組織に重大な損傷を引き起こす可能性がある（Hill、1986；Bruno他、1998）。

30

40

【 0 0 1 4 】

ヘマトポルフィリン誘導体の場合と同様に、組織の深さが3 ~ 5 mmを超えて増大すると、天然のPQPそれ自体は600 nmより長い吸収能、活性化能力の低下を本質的に予想する特性を示さない。このことは、天然のPQPが光力学的療法に関して充分強力ではないことを意味し、このことが、それらの光力学的療法に関する適用を制限している。

【 発明の開示 】

【 発明が解決しようとする課題 】

50

【0015】

光力学的療法に関する現在のポルフィンおよびPQP光増感剤の欠陥は、赤の波長範囲での光吸収、純度、薬物動態、および低下した皮膚の光過敏性に関して改善された性質を有している、一連の第2世代化合物の開発を刺激している。これらの欠陥は、他の形の増感剤の活性化、たとえば音を使用する活性化の研究にもつながっている。

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明に従って、光増感剂的性質と音増感剂的性質の両方を有するペリレンキノン色素(PQP)の誘導体を使用して、疾患および他の病状を治療する。さらに、本発明のPQP誘導体を送達成分に結合させて、PQP誘導体が*in vitro*または*in vivo*で所定の細胞または構造を標的化する能力を高めることができる。

【0017】

光および/または音によって活性化される本発明の方法および組成物は、赤の波長領域または超音波の治療用周波数での著しい吸収を示し、高収率で一重項酸素を生成し、純粋なモノマー形態で生成させることができ、誘導体化して赤色光線吸収、超音波活性化、組織の生物学的分布、および毒性の各性質を最適化することができ、皮膚の残余光過敏性を低下させ、かつ即座に排出される。本発明の組成物は、ステープル・レクソトロピン(stapled lexotropins)などのDNA副溝結合剤への共有結合によって核標的化を可能にして、光毒性を高める。これらは遺伝毒性ではない。この特性は、治療関連の二次的悪性の状況では重要である。トランスフェリンとの結合によって、卵巣癌および乳癌を含めた、さまざまな疾患の治療に関して特異性が与えられる。ビスホスホネートとの結合によって、骨基質、たとえば乳癌および前立腺癌の骨転移、または骨粗しょう症に関する任意の疾患または病状を含めた、さまざまな疾患の治療に関して特異性が与えられる。腫瘍結合ペプチドとの結合によって、特定の細胞表面の糖鎖抗原に関する治療を含めた、さまざまな疾患の治療に関して特異性が与えられる。

【0018】

多くのPQPの性質は、Diwu他、J. Photochem. Photobiol. a: Chem.、64: 273 (1992)中に要約されている。いくつかのペリレンキノン、いくつかのウイルス、特にヒト免疫不全ウイルス(HIV)の強力な阻害剤でもあり、酵素プロテインキナーゼC(PKC)でもある。いくつかのPQPの抗HIVおよび抗PKC活性の両方は光依存性であり、癌の光力学的療法に関する現象である[Diwu他、Biochem. Pharmacol. 47: 373~389 (1994)]。Diwu他の論文は、HBのタンパク質への首尾良い結合を開示している。

【0019】

本発明の光増感剤および音増感剤化合物は、全身に投与すると、身体全体中に分布する。数時間から数日間の範囲の短期間で、化合物は正常な組織から排除されるが、急速に増殖する細胞(たとえば癌細胞または乾癬病巣)によって数日間まで選択的に保持される。本発明のPQPは、活性化されるまで、たとえば特定の波長範囲の光または特定の周波数範囲の音に曝されるまでは、不活性かつ無毒である。

【0020】

2つの異なる活性化プロトコルを使用して活性化することができる化合物を使用することは、治療上有益である。約5mm~約7mmの表面の深さに浸透することができる光は、光源からある程度の距離内の表面病巣またはこれらの標的細胞を治療するための、化合物を活性化することができる。他方で超音波は身体内深くに浸透して、光源が到達しにくい腫瘍体などの深在性細胞を治療することができる。

【0021】

本発明の化合物は、その二重選択性のために治療上有益でもある。本発明の化合物は、癌細胞などの所定の標的の部位に薬剤を優先的に局在化させるその能力において選択的であり、特定の領域に制限することができる光および/または音の正確な送達において選択的である。

【0022】

本発明の方法および組成物は、*in vivo*、静脈内などに投与されると、身体全体中に分布する。その後数時間、時には数日中に、少なくとも1つのペリレンキノン誘導体を含む組成物が正常な組織から除去され始めるが、癌細胞などの過剰増殖性細胞によって数日間までは選択的に保持される。ペリレンキノン誘導体は、それが活性化されるまでは、不活性かつ無毒のままである。本発明に従って、ペリレンキノン誘導体を光によって、音によって、あるいは光と音によって活性化することができる。ここでペリレンキノン誘導体を含んでいるかそれと接している過剰増殖性細胞を活性化源、たとえば適切な波長の光または適切な周波数の音、またはこの両方に曝すことができる。過剰増殖性細胞を含む部位を活性化源に曝すことによって、保持されているペリレンキノン誘導体の選択的な活性化が可能であり、次いでこれによって、細胞死をもたらす過剰増殖性細胞組織中の局所的なネクロシスまたはアポトーシスが引き起こされる。

10

【0023】

本発明の送達系と組み合わせて、本発明の組成物および方法は、標的細胞の部位にペリレンキノン誘導体を優先的に局在化させることによって選択性を高めることができ、活性化源を特定の領域に制限することによって、たとえば別個の領域に制限された光および/または音を制限することによって、選択性を高めることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0024】

本発明は、光学的物質および音響化学的物質としてのペリレンキノン(PQP)誘導体の使用、および治療物質としての本発明の誘導体の使用を含む。

20

【0025】

本発明は組成物、および所定の疾患または病状を治療するための方法であって、ペリレンキノン誘導体を含む組成物を治療量投与すること、ペリレンキノン誘導体を身体の一部、好ましくは身体中に分布させること、および過剰増殖性細胞を含む領域でペリレンキノン誘導体を活性化することを含む方法を含む。本発明の好ましい実施形態では、投与ステップは、トランスフェリン、ビスホスホネート化合物、および腫瘍結合ペプチドだけには限られないが、これらを含む送達成分に結合した、ペリレンキノン誘導体を投与することを含む。本発明の好ましい実施形態では、活性化ステップは、光によって、音によって、あるいは光と音の両方によって、ペリレンキノン誘導体を活性化することを含む。

【0026】

本発明は方法、およびトランスフェリンまたはその一部分に結合したPQPを含む組成物、所定の部位に活性剤を送達するための送達系としてのトランスフェリンの使用、および結合体の活性化を含む。本発明の好ましい実施形態では、光、超音波、またはこれらの組み合わせによって、結合体を活性化することができる。本発明の好ましい実施形態では、小さな細胞である肺癌または他の過剰増殖性細胞の治療において、結合体が有用である可能性がある。

30

【0027】

本発明は組成物、および本発明の組成物を局所的に施すこと、組成物中の活性剤を活性化することを含む方法も含む。本発明の好ましい実施形態では、活性剤は、にきびおよび抜け毛だけには限られないがこれらを含めた、皮膚症状を治療するのに適したものである。本発明の好ましい実施形態では、光活性化、音活性化、またはこれらの組み合わせによって、結合体を活性化することができる。

40

【0028】

本発明は組成物、および歯科用途における抗菌剤として本発明の組成物を使用することを含む方法も含む。本発明のこれらの実施形態では、活性剤をうがい薬などの液体調合物に調合し、1本または複数本の歯と組成物を接触させ、組成物中の活性剤を活性化する。本発明のこの実施形態では、組成物はう蝕症(cariotosis)などを治療する際に有用である。本発明の好ましい実施形態では、光活性化、音活性化、またはこれらの組み合わせによって、結合体を活性化することができる。

【0029】

50

本発明は、治療上十分な量の少なくとも1つのPQP誘導体を投与すること、光活性化および音活性化の両方を使用して誘導体を活性化することによって、疾患を治療する方法も含む。典型的にはPQP誘導体は、所定の波長の光および所定の音の周波数に誘導体を曝すことによって、活性化することができる。

【0030】

本発明は、開裂性連結基をさらに含む光感受性および音感受性化合物であって、前記連結基が*in vivo*で開裂性である化合物も含む。本発明に従って、開裂性連結基を選択して、溶解性、安定性、吸収性などだけには限られないがこれらを含めた、化合物の1つまたは複数の性質を変えることができる。開裂性連結基にはポリアミドおよび糖があるが、これらだけには限られない。

10

【0031】

本明細書で使用するように、「ペリレンキノン誘導体」または「誘導体」とは、元のあるいは天然のペリレンキノン(PQP)から誘導され、所定の波長の光によって、かつ/あるいは所定の周波数の音によって、活性化することができる、すべての化合物のことである。本発明の好ましい実施形態では、誘導体は、天然に存在するキノン化合物から誘導される化合物である。本発明の誘導体は、化学療法剤またはアルキル化剤だけには限られないがこれらを含めた、他の活性試薬と複合体形成させることができるか、あるいはこれらを含むこともできる。例示的なPQPは、ヒポクレリン、セルコスポリン、フレイクロム、クラドクロム、エルシノクロム、エリスロアフイン、およびカルホスチンだけには限られないが、これらを含む。以下でより詳細に記載するように、PQP活性剤を含む組成物は、たとえば1種または複数種の気体、気体状前駆物質、液体、油、安定化物質、診断剤、光活性剤、生物活性剤および/または標的リガンドを含めた、非常にさまざまな追加的成分を含むことができる。

20

【0032】

本発明の好ましい実施形態では、PQPはヒポクレリンBのアミノ酸誘導体である。現在、最も好ましい免疫複合体はヒポクレリンBを使用し、これは酸、酸臭化物、ヒドラジン、チオール、または第一級アミン抗体結合部位を含む。

【0033】

本発明の化合物は、精製されているかあるいは実質的に精製された化合物、または光力学的物質または音響化学的物質として有用である化合物をもたらし、任意の方法によって生成することができる。本発明の化合物は、化合物のカクテル、たとえば2つ以上の化合物を含む組成物を形成することもできる。これらの方法は当分野、たとえばLiu他、「Synthetic studies in novel hypocrellin B derivatives、」Tetrahedron、49: 10785 (1993)、Diwu他、Anti-Cancer Drug Design、8: 129~143 (1993)でよく知られている。

30

【0034】

本発明に従って、PQP誘導体に官能基を賦与することができる、たとえば酸、ヒドロキシル、酸ハロゲン化物(好ましくは臭化物)、ヒドラジン、チオール、または第一級アミンだけには限られないがこれらを含めた、反応基を含ませることができる。結合試薬は、システイン、リシン、アスパラギン酸、グルタミン酸などのアミノ酸、他のジカルボン酸アミノ酸、および他の三官能性または多官能性アミノ酸誘導体だけには限られないがこれらを含めた、反応基を含むことができる。

40

【0035】

本発明のペリレンキノン誘導体は、治療用途に非常に適している。なぜならこれらは、光線療法(約560nm~約700nm)で吸収性および光毒性活性を示し、約1MHz~約3MHzの周波数範囲で優れた音響化学的活性を示し、分子量が小さく(典型的には約550ダルトン~約880ダルトン)、純粋なモノマー形で入手可能であり、急速な血清および皮膚浄化を示し、*in vitro*および*in vivo*において無視できる程度の細胞毒性を有しており、優れた光増強作用(たとえば2倍)を有しており、したがって使用における安全域が優れており、光毒性が従来型のII型反応およびI型反応によって仲介され(低酸素腫瘍細胞に関する有用性が示される)、プロテインキナーゼの強力な阻害剤であり、i

50

*n vitro*および*in vivo*においてアポトーシスによる細胞死をもたらす、遺伝毒性を示さず、優れた腫瘍制御を示し、標的送達用に分子的に形を合わせることができ、不明確な領域を標的化して音/光毒性をさらに増大させることができ、親ヒポクレリンは部位特異的な改変を受けやすく、したがって多くの誘導体、さまざまな度合いの光感受性および/または音感受性特性を有する誘導体が形成される可能性があるからである。

【0036】

本発明に従って、開裂性連結基は少なくとも2つの官能基、活性化合物に結合するための第1の官能基、タンパク質または炭水化物などの標的成分に結合するための第2の官能基をさらに含むことができる。

【0037】

本明細書で使用するように、「疾患」とは、光力学的治療によって治療することができる任意の哺乳動物（ヒトを含む）の疾患、障害、疾病、または病状の、管理、診断、および/または一時的緩和のことである。「疾患」は、癌およびその転移、皮膚癌、増殖体または腫瘍、およびそれらの転移など、腫瘍および腫瘍細胞、固形腫瘍、血液系腫瘍を含めた肉腫および癌腫など、および鼻腔通路、膀胱、食道、または気管支を含めた肺中に見られる腫瘍、レトロ・ウイルスを含めたウイルス、細菌性疾患、真菌性疾患、皮膚の症状または障害、たとえば、外陰の病巣、ケロイド、白斑、乾癬、良性腫瘍、子宮内膜症、バレット食道炎、頭部白癬および苔癬アミロイドーシスなどを含むが、これらだけには限られない。

【0038】

本明細書で使用するように、「投与」および「送達」とは、1つまたは2つ以上のPQP誘導体を所定の細胞、細胞群、または組織、典型的には哺乳動物に曝すあるいは接触させる、任意の行為のことである。本明細書で使用するように、投与または送達は、*in vivo*、*in vitro*、または*ex vivo*で行うことができる。たとえば組成物は、注射によって、あるいは内視鏡を介して投与することができる。投与は、細胞に本発明の組成物を直接施すことも含む。たとえば、手術の行程中に、腫瘍細胞を露出させることができる。本発明の好ましい実施形態に従って、これらの露出させた細胞（または腫瘍）を、たとえば手術部位および/または細胞を洗浄または灌注することによって、本発明の組成物に直接曝すことができる。

【0039】

本明細書で使用するように、活性化、活性化する、または類似の語は、光および/または音の周波数を使用して、化合物または化合物の一部をより反応的にすることを指す。光源および/または音源をペリレンキノン誘導体に施すための任意の方法、たとえば、二、三挙げてみると、直接的な施用、超音波機器、集束超音波、高密度集束超音波、および内視鏡の照明などを、本発明に従って使用することができる。

【0040】

適切な光または音を施すことによって、増感剤を化学的に（たとえば酸化、還元などによって）、周囲の組織に対して毒性がある形に変えることができる。たとえば、光増感剤または音増感剤を長期の励起三重項状態に励起させた後、反応性が高い一重項酸素種によって（II型機構）、かつ/あるいは量子エネルギーの移動によって生じるフリーラジカル産物によって（I型機構）、標的腫瘍を破壊する。一重項酸素種および/またはフリーラジカル産物の主な生物学的標的分子には、核酸、酵素および細胞膜がある。本発明の方法の二次的な治療効果には、プロスタグランジン、トロンボキサンおよびロイコトリエンなどの病態生理学的産物の、活性化した光増感剤の影響を受けた組織による放出がある。したがって、光活性物質または音活性物質の慎重な標的化が、毒血症を誘導せず治療効果を得るために最も重要であることは、当業者には明らかであろう。

【0041】

本発明の実施態様に従って、光を使用する増感剤の活性化、および音を使用する増感剤の活性化を、一緒に使用することができる。なぜなら、それぞれの個々の手順が相補的だからである。すなわち、ペリレンキノン誘導体を活性化するのに適した赤い可視光線は約5

10

20

30

40

50

mm～約7mmの組織中あるいは身体中に浸透することができ、ペリレンキノン誘導体を活性化するのに適した音は、組織中あるいは身体中に完全に浸透することができる。

【0042】

本明細書で使用するように、「光増強作用の要因」とは、化合物がその固有の不活性状態の毒性を超える光または音仲介の毒性を発揮する性質のことである。本発明の好ましい実施形態では、活性化なしで処理した細胞のLD₅₀と活性化化合物で処理した細胞のLD₅₀の比（活性化薬剤のLD₅₀で割った薬剤のLD₅₀）として、活性化の要因を計算することができる。「LD₅₀」という語を前述のように使用する場合、「IC₅₀」という語を代用して、致死の終点、繁殖能力の損失、またはクローン形成細胞の死ではなく、代謝活性に関するバイオ・アッセイに取り組むことができる。化合物の相対的な光活性化効率も、当業者によく知られているアッセイであるクローン形成アッセイを使用して決定することができる。

10

【0043】

本発明に従うと、望ましいPQP誘導体は、活性化されていない、すなわち光なし（「暗所」とも呼ばれる）、かつ／あるいは音なしで、高い薬剤濃度において無毒であり（あるいは毒性が低い）、適切な波長の光、または適切な周波数の音を施すときは、低濃度で毒性である誘導体である。当業者によって理解されるように、最も望ましい化合物は、不活性状態で広範囲の無毒用量を与える化合物である。なぜならこの特性によって、患者に関する増大した安全要因がもたらされるからである。

【0044】

本明細書で使用するように、生理学的に許容される流体とは、PQP誘導体を含む組成物と組み合わせるのに適した、任意の流体または添加剤のことである。典型的にはこれらの流体は、希釈剤または担体として使用される。例示的な生理学的に許容される流体には、保存溶液、生理食塩水溶液、等張（約0.9%）生理食塩水溶液、または約5%アルブミン溶液または懸濁液があるが、これらだけには限られない。使用する製薬上許容される流体のタイプによって、本発明が制限されないことが企図される。組成物は、製薬上許容される担体も含むことができる。製薬上許容される担体には、生理食塩水、滅菌水、リン酸緩衝生理食塩水などがあるが、これらだけには限られない。患者に送達するのに適した他の緩衝剤、分散剤、および不活性である無毒物質が、本発明の組成物中に含まれてよい。組成物は投与するのに適した溶液、懸濁液、または任意の適切な製剤であってよく、典型的には滅菌されており、望ましくない粒子状物質は含まない。組成物は、従来の滅菌技法によって滅菌することができる。

20

30

【0045】

本発明の方法に従うと、結合剤は所定の結合部位または受容体に結合することができなければならない、任意の免疫学的に適切な経路によって患者に投与することができる。たとえば結合剤は、静脈内、皮下、腹膜内、クモ膜下、膀胱内、皮内、筋肉内、またはリンパ内経路によって、患者に導入することができる。組成物は溶液、錠剤、エアロゾル、または多相製剤であってよい。リポソーム、長期循環性リポソーム、イムノリポソーム、生分解性ミクロスフェア、ミセルなども、担体、媒体、または送達系として使用することができる。さらに、当分野で知られているex vivoの手順を使用して、患者からの血液または血清を患者から除去することができ、場合によっては、患者の血液中の抗原を精製することが望ましい可能性があり、次いで血液または血清を、本発明の結合剤を含む組成物と混合させることができ、処理した血液または血清を患者に戻す。本発明は、結合剤を患者に導入する任意の個々の方法に制限されるべきではない。

40

【0046】

本発明の化合物は、精製されているかあるいは実質的に精製された化合物、または光力学的物質として有用である化合物をもたらす、任意の方法によって生成することができる。本発明の化合物は、化合物のカクテル、たとえば2つ以上の化合物を含む組成物を形成することもできる。これらの方法は当分野、たとえばLiu他、「Synthetic studies in novel hypocrellin B derivatives、」Tetrahedron、49：10785（1993）、Diwu他、Anti - Can

50

cer Drug Design、8:129~143(1993)でよく知られている。細胞内の取り込みは急速(たとえば約2時間以内)であってよく、あるいは取り込みは、さらに時間を必要とする可能性がある(たとえば約20時間以上)。ある程度の選択的な腫瘍の取り込みは、増感剤の pK_a の改変によって達成されると思われる。なぜなら、いくつかの腫瘍の内部環境は、正常な組織のそれよりも酸性であるからである。本発明は、比較クローン形成アッセイによる化合物の毒性が正常細胞に関してよりも癌細胞に関して高い場合に、化合物を同定するための方法を含む。

【0047】

本発明のPQP誘導体は、いくつかの他の化合物、シグナル剤、エンハンサー、および/または標的剤と共に使用することもでき、これらに結合させることもできる。たとえば、本発明のヒポクレリン誘導体は、抗体、好ましくはモノクローナル抗体に結合させることができる。本発明に従うと、結合剤は、好ましくは細胞核を標的化することによって毒性を高めるために、レクソトロピンまたはネトロプシンなどの任意のDNA副溝標的化剤を含む。適切なエンハンサーには、 pK_a 調節剤、低酸素細胞放射線増感剤、および生体内還元によって活性化される抗腫瘍剤、マイトマイシンC(低酸素細胞または微生物中の化合物の毒性に、影響を与えるかあるいはそれを増強することが好ましい)があるが、これらだけには限られない。適切なシグナル剤には、アポトーシス細胞死またはネクローシス細胞死のマーカー、または細胞周期の制御または遅延に対する内生的な制御分子があるが、これらだけには限られず、これらはアポトーシス細胞死またはネクローシス細胞死を誘導することによって、あるいは任意の形の致死または潜在性致死損傷(PLD)の修復を阻害することによって、化合物の光毒性または音毒性を増強することが好ましい。

【0048】

前述のように、本発明の一実施形態は、結合剤-PQP結合体(または免疫複合体)、およびこれらの結合体の治療的使用を含む。本発明に従って、結合剤とPQPを連結させる任意の方法を使用することができる。たとえば、抗体または抗体断片を光増感剤に連結させる方法はよく知られている。たとえば、Goff他、British journal of Cancer、74:1194~1198(1996)は、大部分の卵巣癌と関連があるCA125抗原に特異的に結合する抗体であるモノクローナル抗体OC125と共に、光増感剤を培養することによる、免疫複合体の生成を開示している。この例示的な免疫複合体では、ポリグルタミン酸がモノエチレンジアミンモノアミド誘導体に結合することができ、次いでこれが、抗原結合部位から離れたモノクローナル抗体のヒンジ領域で炭水化物部分に共有結合する。他の例示的な連結は、いずれも参照により本明細書に組み込まれている、米国特許第4,722,906号および3,959,078号中に開示されている。簡単に言えばこれらの特許は、選択基、または特異的な結合対の他のメンバーである潜在性反応基、たとえば抗体に共有結合する反応基を有する、光増感剤を提供することを開示している。

【0049】

本発明に従って、PQP誘導体に官能基を賦与することができる、たとえば酸、ヒドロキシル、酸ハロゲン化物(好ましくは臭化物)、ヒドラジン、チオール、または第一級アミンだけには限られないがこれらを含めた、反応基を含ませることができる。結合試薬は、システイン、リシン、アスパラギン酸、グルタミン酸などのアミノ酸、他のジカルボン酸アミノ酸、および他の三官能性または多官能性アミノ酸誘導体だけには限られないがこれらを含めた、反応基を含むことができる。

【0050】

当業者によって理解されるように、誘導体または誘導体を含む結合体の有効量は、疾患の重度および患者の免疫系の状態に、部分的には依存するであろう。当業者は、さまざまな用量を使用することができ、それらがさまざまなよく知られている要因に依存することを理解するであろう。一般に組成物は、身体重量1キログラム当たり約0.1 μ g~約2mg以上の結合剤、より一般的には身体重量1キログラム当たり約200 μ gの用量を含むであろう。濃度は通常は、少なくとも約0.5%であろう。選択した投与の形式に従い、主に体液量、粘度、抗原性などに基づいて、任意の量を選択することができる。

【 0 0 5 1 】

結合体または誘導体の投与は2回以上であってよく、好ましくは長期にわたって3回であってよい。本発明の組成物は重度、すなわち生命を脅かすかあるいは生命を脅かす可能性がある病状の患者に使用することができるので、望むならば、過剰な結合剤を投与することができる。本発明の組成物を注射するための希釈技法を含めた、医薬組成物を投与するための実際の方法およびプロトコルはよく知られており、すなわち当業者には明らかであろう。これらの方法およびプロトコルのいくつかは、RemingtonのPharmaceutical Science、Mack Publishing Co. (1982) 中に記載されている。

【 0 0 5 2 】

本発明の他の実施形態に従って、本発明の組成物を単独で、他の組成物と組み合わせて、あるいは他のPDT組成物と共に順に投与することができる。これらの特徴により、一連の増感剤の投与（光線治療に従う）によって光力学的治療係数が増大する可能性が与えられる。これらの条件下では、多数の細胞小器官を標的化することができる。

10

【 0 0 5 3 】

本発明のこの実施形態では、PDT法は、好ましくは緩慢な取り込み率を有する第1の光力学的物質を投与すること、好ましくは第1の物質のそれよりも急速な取り込み率を有する第2の光力学的物質を投与することを含む。次いで第1および第2の光力学的物質の両方を、前に記載したように、患者および/または物質を適切な周波数の光に曝すことによって活性化することができる。

【 0 0 5 4 】

ヒボクレリンおよび誘導体の優れた蛍光性によって、共焦点レーザー走査顕微鏡(CLSM)によって細胞内の取り込みおよび分布動態を調べるための、有益な手段が与えられる。それぞれの薬剤には、取り込み及び分布の特有の性質がある(Miller他、1995 a、b)。ヒト中、*in vitro*および*in vivo*で細胞が薬剤を取り込む割合は、Liu他、1995およびMiller他、1995 a、b)と類似のプロトコルを使用して決定することができる。*in vivo*では、薬剤の静脈内注射または投与と光投与の間の理想的な時間は、光力学的物質の腫瘍濃度が正常な組織に関して最適であるとき、典型的には約24時間まで、ただし48時間以上が好ましい(表2)。

20

【 0 0 5 5 】

本発明のいくつかの実施態様は、酸素の存在を伴うかあるいは伴わない機能化という追加的な利点も有する。したがって、本発明のいくつかの実施態様は、充分酸素添加されているかあるいは部分的または完全に低酸素状態である固体腫瘍の治療において有効である。

30

【 0 0 5 6 】

光および/または音活性剤は、溶媒を浸透させる局所施用のために、あるいは充分な量の光増感剤化合物を含むローション、クリーム、軟膏またはゲルの形に処方して、PDT治療に有効なものにすることができる。このような局所用製剤は、光増感剤と溶媒を組み合わせ、ゲル化剤をそこに加えることによって、ゲルの形に調製することができる。適切なゲル化剤にはカルボキシメチルセルロース(B. F. Goodrich of Brecksville, Ohio U.S.AからのCarbopol. TM. 934P)および乾式シリカ(CAB-0-SIL. RTM. Cabot Corp.、Tuscola, Ill)がある。一般にゲル化剤は、約5~10重量%の量で使用して、所望の粘度を有するゲルを得る。多少のゲル化剤を含むゲルが、若干高いかあるいは低い粘度を有することは、明らかであろう。当業者は、ゲル化剤の濃度を調整することによって、所望のゲル粘度を容易に得ることができる。

40

【 0 0 5 7 】

共溶媒、界面活性剤および/または生体接着剤などの添加剤は、ゲルの性質をしばしば改善し、これらは望むように加えることができる。適切な共溶媒および/または界面活性剤には、プロピレングリコールおよびグリセリンがある。適切な生体接着剤には、カルボキシメチルセルロース、ポリアクリルポリマー、キトサンおよびアルギン酸ナトリウム、ポリアクリルポリマーを用いて変性させた澱粉、eudispert hvヒドロゲルまたはキセロゲル、ヒアルロン酸ナトリウム、およびポリエチレングリセロール、ヒドロキシプロピルセル

50

ロース、またはカルボキシビニルのポリマーがある。添加剤を溶媒とゲル化剤の混合物中に機械的に混合することによって、添加剤をゲル中に取り込ませることができる。

【0058】

他の添加剤を使用して、化学的安定性および生理学的適性を高めるかあるいは維持することができる。その例は抗酸化剤、キレート剤、不活性ガス、緩衝剤および等張化剤である。抗酸化剤および典型的な濃度範囲の例には、アセトン亜硫酸水素ナトリウム（0.1～0.8%）、アスコルビン酸（0.05～1.0%）、モノチオグリセロール（0.1～1.0%）、メタ重硫酸カリウム（0.05～0.1%）、没食子酸プロピル（0.02%）、亜硫酸水素ナトリウム（0.01～1.0%）、ナトリウムホルムアルデヒドスルホキレート（0.03～0.1%）、メタ重硫酸ナトリウム（0.02～0.25%）、亜硫酸ナトリウム（0.01～1.0%）、チオグリコール酸ナトリウム（0.05～0.1%）がある。

10

【0059】

キレート剤／錯化剤および典型的な濃度範囲の例には、エデト酸ナトリウム（0.005～0.1%）、エデト酸カルシウム二ナトリウム（0.005～0.01%）、ゲンチジン酸エタノラミド（1.0～2.0%）、ナイアシンアミド（1.0～2.5%）、クエン酸ナトリウム（0.01～2.5%）、クエン酸（0.001～1.0%）がある。

【0060】

pHが相当に変化する場合に起こる可能性がある化学的分解に対して、処方物を安定化させるために、緩衝剤が主に使用される。使用される緩衝系は通常、注射したときに身体の緩衝系を著しく害さないために、可能な限り小さな緩衝容量を有している。緩衝範囲および緩衝剤の活性に対する影響を、評価しなければならない。標的悪性組織または病巣領域へのpH依存性の分配に関する最適条件を与えるために、適切な調整は有用である。このような緩衝系の例には以下の酸：酢酸、アジピン酸、アスコルビン酸、安息香酸、クエン酸、グリシン、乳酸、酒石酸、塩酸、リン酸、硫酸、炭酸および重炭酸；およびカリウム、ナトリウム、マグネシウム、カルシウムおよびジエタノールアミン塩などのこれらに対応する塩がある。

20

【0061】

溶液が多容量の容器から分配されるであろうときは、静菌性または静真菌性濃度の抗菌剤を、細菌または真菌からの保護をもたらすのに有効な量加える。最も頻繁に使用される化合物および濃度の中には、酸フェニル水銀（0.002～0.01%）、チメロサル（0.01%）、塩化ベンゼトニウム（0.01%）、塩化ベンザルコニウム（0.01%）、フェノールまたはクレゾール（0.5%）、クロルブタノール（0.5%）、ベンジルアルコール（2.0%）、p-ヒドロキシ安息香酸メチル（0.18%）、プロピル、p-安息香酸（0.02%）、およびエチレンジアミン四酢酸（EDTA）がある。

30

【0062】

適切な浸透溶媒は、ポルフィセン化合物の経皮的な浸透を高めるであろう、ポルフィセン化合物用の溶媒である。この性質を有する溶媒には、プロパラカイン、ジメチルスルホキシド、ジメチルアセトアミド、ジメチルホルムアミド、1-メチル-2-ピロリドン、アジピン酸ジイソプロピル、ジエチルトリアミドおよび低い程度でプロピレングリコールがある。他の溶媒には、1-ドデシルアザシクロヘプタン-2-オン（AZONE）、および参照により本明細書に組み込まれる米国特許第3,989,816号中に記載されたような他のアザシクロアルカン-2-オンなどの、シクロアルキル基中に5～7個の炭素を有する置換アザシクロアルカン-2-オンがある。米国特許第3,989,815号（参照により本明細書に組み込まれる）中に記載されたN-ビス-アザシクロペンタン-2-オニルアルカン、米国特許第3,991,203号（参照により本明細書に組み込まれる）中に記載された1-置換アザシクロペンタン-2-オン、および米国特許第4,411,893号（参照によりここに組み込んである）中に記載された水溶性第三級アミンオキシドも含まれる。

40

【0063】

50

局所用処方物は、PDT治療に有効な充分な量の光増感性化合物を含む。一般に、0.001～25重量%、好ましくは約1～5重量%の範囲の濃度を使用することができる。

【0064】

光増感性物質は、光増感性物質の化学的性質に適した溶媒およびアジュバントと共に使用して、調合物の粘度を調整することができる。このグループ中で最も重要な溶媒は液体系のエタノール、ポリエチレングリコール、およびプロピレングリコールである。より包括的な項目にはアセトン、ジメチルアセトアミド、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、エタノール、グリセリン、ポリエチレングリコール300および400、プロピレングリコール、ソルビトール、ラウリン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、およびオレイン酸、ポリオキシエチル植物油などのポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ソルビタンモノパルミテート、2-ピロリドン、n-メチル-2-ピロリジン、n-エチル-1-ピロリジン、テトラヒドロフルフリルアルコール、tween80およびジメチルイソソルビドがある。ジメチルイソソルビド(ARLASOLVE.RTM.DMI、ICI Specialty Chemicals)には、水溶性かつ油溶性であるという利点がある。さらにジメチルイソソルビドをゲル化剤によって容易にゲル化して、ゲル処方物、たとえば4%KLUCEL.RTM.(Hercules)を生成することができる。

10

【0065】

選択した光増感剤に使用することができる他の局所用処方物は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第3,592,930号および4,017,615号中に開示されている。

20

【実施例1】

【0066】

レーザー光の波長および線量

薬剤の濃度および光の線量は両方共に、腫瘍の治療にとって重要である。EMT6/Ed腫瘍、および50μmol/身体重量1kgのHBEA-R1を有するBalb/cマウスに、さまざまな光線量を与えた。630nmの光100ジュールを(約10分間の間)与えたマウスでは約90%の腫瘍が治療され、630nmの光50ジュールを与えたマウスではわずか40%の治療率が得られ、その治療率は少ない光線量では著しく低かった(図7および8)。

【0067】

本発明は、400nmと850nmの間の光波長の存在下で向上する、癌を治療するための方法を提供する(図3、および個々の化合物の最適波長に関する表1を参照のこと)。多くの化合物の吸光スペクトルは図3に含まれ、それぞれの化合物の主要な吸光ピークは表1に含まれる。多くのこれらの化合物は、630nm付近(600～700nm範囲)に有意な吸光度を有する(表1)。最適波長はそれぞれの化合物に関して異なる(表1)。少なくとも630nmと688nmの間のHBEA-R1およびHBBA-R2の波長に関しては、細胞を殺傷することができる。深部の腫瘍または大きな腫瘍に関しては、より長い波長が好ましい。表面の腫瘍に関しては、波長が短いレーザー波長、または緑スペクトル中の波長が、使用するのにより適していると思われる(Nseyo他、1993)。なぜなら、光がそれほど浸透しないからである。これらの化合物が大きな波長で光増強作用を示す能力によって、PDTによって治療することができる組織の大きさが増大し、PDTを使用して治療を与えることができる深さが増大する。光ファイバー・プローブを使用して、レーザー光を向けることができる。適切な光源およびシールドを使用して、光を選択した領域に送達することもできる。

30

40

膀胱を治療するための方法は、Nseyoおよび同僚(1993)によって記載されており、表1または図2に記載した化合物、および記載した薬剤用量、および本明細書に記載した波長を使用して、この方法を施すことができる。

【0068】

薬剤の局所領域への、あるいは識別可能な標的抗原を用いた施用に関しては、送達系が薬剤-リボソーム処方物、モノクローナル抗体-リボソームなどの薬剤-モノクローナル抗

50

体送達系から構成される送達に適した、あるいは標準的な親油性皮膚クリームを使用して露出した表面に施される、いくつかの方法が存在する。薬剤は局所的に施用することができ、薬剤の送達の経路または薬剤および送達系は、静脈内、腹膜内、クモ膜下、膀胱内、腫瘍内注射によるもの、あるいは経口摂取によるものであり得る。

【実施例 2】

【0069】

EMT6 / Ed 細胞中の HB の薬力学的性質を、 ^{14}C 標識および共焦点レーザー走査顕微鏡によって観察した。その結果を図 2 に示す。細胞内の取り込みは投与 15 分以内に平衡状態に達し、細胞内結合部位の飽和が示された。薬剤の取り込みの程度および分布は、薬剤の存在下での少なくとも 72 時間の連続的な培養に関しては安定したままであり、この薬剤は使用した条件下では細胞毒性ではなかった。

10

【実施例 3】

【0070】

HB に関して使用したのと同じ条件下での、HBEA - R1 の取り込みの CLSM による決定値。その結果を図 3 に示す。取り込みは最初の 2 時間以内に終了し、細胞内の濃度は次の 70 時間中に徐々に低下する。

【実施例 4】

【0071】

HBEA - R1 で処理した EMT6 / Ed 細胞中の、アポトーシス核のヨウ化プロピジウムを用いた決定値。その結果を図 4 に示す。アポトーシス形態を有する細胞の背景周波数は、未処理の対照によって表す。増感剤の光増感性濃度がアポトーシスを誘導することはないが、しかしながら HBEA - R1 の PDT によって、処理の 48 時間以内に 50 % のアポトーシス形態がもたらされる。

20

【実施例 5】

【0072】

HBEA - R1 の光毒性の酸素依存性。その結果を図 5 に示す。光毒性は、PDT 治療用の細胞懸濁液の気体相中の pO_2 が減少すると、周囲 $\sim 0.0\%$ に低下する。酸素増感比 (O.E.R) は、 D_0 で 4.0 である。1 型仲介光毒性の証拠は、酸素の完全な不在で観察される。

【実施例 6】

【0073】

一方の脇腹に EMT6 / Ed 腫瘍を有する Balb / c マウス中の、 ^{14}C - HB の薬物動態。その結果を図 6 に示す。血液から HB が急速に除去されることが示される。皮膚に関しては、腫瘍に関する最適な治療係数は、薬剤投与 2 時間後に現れる。

30

【実施例 7】

【0074】

経皮的に施したさまざまな線量の 630 nm の光による、Balb / c マウス中の EMT6 / Ed 腫瘍の制御。その結果を図 7 に示す。HBEA - R1 は一定用量投与した。真の対照は、光増感剤もレーザー光も与えていない動物を表す。動物は約 7 日間治療し、その後腫瘍移植し、腫瘍が 4 倍の治療体積に達したときに安楽死させた。

40

【実施例 8】

【0075】

1 mM の陽性対照、ヘマトポルフィリンに対する、*in vitro* でのヒト前骨髄球白血球細胞中の 2 つのペリレンキノン誘導体の音響化学的毒性。その結果を図 8 に示す。その構造が示される 2 つの化合物は、用量依存性の細胞殺傷、および優れた音増感効率を示す。

【実施例 9】

【0076】

【表 1】

表 1. ヒポクレリンに関する物理的および化学的性質

化合物の名称	化学式	F.W.	赤色スベクトル領域の吸収ピーク (nm)	A_{max} / 溶媒	A_{530}	吸光係数 ($\times 10^{-3}$) (630 nm)	$^1\text{O}_2$ 収率	暗所の LD_{50} (μM)	明所の LD_{50} (μM)	光増強係数
HA	ヒポクレリンA	$\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{O}_{10}$	546	658*	0.093/DMF	0.086	0.84	15	3-5	3-5
HB	ヒポクレリンB	$\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{O}_9$	528	658*	0.118/DMF	0.100	0.74	20	1.5-2	10-13
HA-Mg ⁺⁺	HA-Mg ⁺⁺ (Ac) ₂	$\text{C}_{34}\text{H}_{28}\text{O}_{12}\text{Mg}$	652	616	0.958/EtOH	0.447	0.71	>25	>5	ND
HB-Mg ⁺⁺	HB-Mg ⁺⁺	$\text{C}_{34}\text{H}_{26}\text{O}_{11}\text{Mg}$	634	622	0.604/EtOH	0.527	0.53	10	1	10
DAHA	脱アセチル化-HA	$\text{C}_{32}\text{H}_{24}\text{O}_{10}\text{Mg}$	592	622	0.651/EtOH	0.570	0.51	>25	>5	ND
HBAC-R1	シスタミン-HB	$\text{C}_{32}\text{H}_{27}\text{O}_8\text{Mg}$	585	646	0.417/ CHCl_3	0.388	0.40	12.5	1	12.5
HBAC-R2	シスタミン-HB	$\text{C}_{32}\text{H}_{27}\text{O}_8\text{Mg}$	585	600	0.337/DMSO	0.244	0.31	12.5	5	2.5
HBBA-R2	n-ブチルアミノ化HB	$\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{N}_4\text{O}_7$	780	616*	0.628/ CHCl_3	0.619	0.32	>100	0.2-0.6	167-500
HBAM-R1	2-モルホリノ-エチルアミノ化-HB	$\text{C}_{42}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_9$	752	658			0.70	>25	4	>6.25
HBDD-R2	2-(N,N-ジエチルアミノ)エチルアミン-HB	$\text{C}_{42}\text{H}_{52}\text{N}_4\text{O}_7$	696	646*	0.508/ CHCl_3	0.055	0.36	>25	7.5	>3.3

10

20

30

40

【 0 0 7 7 】

【 表 2 】

表 1 続き

化合物の名称	化学式	F.W.	赤色スペクトル領域の吸収ピーク (nm)	A_{\max} /溶媒	A_{630}	吸収係数 ($\times 10^{-3}$) (630 nm)	1O_2 収率	暗所の LD_{50} (μM)	明所の LD_{50} (μM)	光増強係数
HBDP-R1	2-(N,N-ジメチル-アミノ)プロピルアミン-HB	724	640*	0.463/CHCl ₃	0.480	4.80	0.42	>25	0.5 - 1.5	>16.6-
HBEA-R1	エタノールアミン-HB	614	696*	0.625/DMSO	0.623	6.23	0.60	15-25	0.15	100-167
HBEA-R2	エタノールアミン-HB	614	634*	0.162/DMSO	0.127	1.27	0.70	25	7.5	3.3
HBED-R2	エチレンジアミン-HB	696	614*	1.449/DMSO	1.239	12.39	0.50	>25	3-5	5-8.3
HBMA-IV	メチルアミン-HB	696	640	0.246/CHCl ₃	0.246	2.46	0.80	8.5	1	8.5
DBHB	5,8-ジブプロモ-HB	531	ND	ND	ND	ND	0.62	10	3	3.3
DMHB	ジメチル化HB	686	648*	0.469/EtOH	4.77	4.77	0.42	>25	3-5	>5-8.3
JL-1-1		578	594	0.478/CHCl ₃	0.062	0.62	0.72	>70	2-4	>18.5

HBBA-R2、HBDP-R1、HBEA-R1およびJL-1-1は、平均または平均より低い毒性、および優れた増強作用を示す。この研究の目的のために、 LD_{50} の光線量は固定しなかった。試験した化合物に関しては、この線量は630nmの光で0.75~1.0 J/cm²である。ND=実施せず。*: 630nmでの有意な吸光度。F.W.=式重量。

表 2

組織の ^{14}C -ヒポクレリンBの取り込み(dpm/g)

組織	0 時間	2 時間	24 時間	48 時間
心臓	113,920 \pm 3,365	5,135 \pm 910	7,835 \pm 1,810	2,325 \pm 245
肺	651,100 \pm 42,668	8,580 \pm 655	3870 \pm 525	2,975 \pm 360
脂肪	20,550 \pm 715	38,570 \pm 5,610	19,550 \pm 2,210	19,335 \pm 2,335
肝臓	394,190 \pm 7,540	24,620 \pm 4,885	22,495 \pm 4,440	9,215 \pm 720
脾臓	151,870 \pm 9,395	58,900 \pm 4,205	14,970 \pm 3,215	26,700 \pm 11,105
胃	28,280 \pm 145	21,630 \pm 3,345	34,385 \pm 8,795	12,460 \pm 975
膵臓	32,010 \pm 2,165	13,185 \pm 12,055	32,390 \pm 11,840	16,915 \pm 3,845
回腸	45,400 \pm 3,600	20,280 \pm 2,850	5,800 \pm 645	2,840 \pm 595
腎臓	67,344 \pm 950	20,855 \pm 3,955	12,050 \pm 1,845	4,535 \pm 765
皮膚	14,970 \pm 74	3,130 \pm 221	2,700 \pm 170	1,590 \pm 250
骨	19,825 \pm 2,300	3,955 \pm 2,070	660 \pm 215	1,125 \pm 310
脳	17,560 \pm 560	3,855 \pm 170	2,840 \pm 275	845 \pm 90
筋肉	13,665 \pm 600	4,050 \pm 940	2,875 \pm 560	1,015 \pm 205
腫瘍	7,885 \pm 270	3,775 \pm 400	2,950 \pm 80	2,165 \pm 470
血清	69,975 \pm 1,925	1,655 \pm 170	1,020 \pm 160	700 \pm 240

10

20

30

40

【実施例 10】

【0079】

識別可能な音毒性効果を有する第1の化合物は、いくつかの既存の化学療法剤であった（Umamura他、1990）。低レベルの超音波による化学療法的な細胞殺傷の増強作用の調査で、Harrison他は、ドキシルピシンおよびジアジコンのトーン・バーストおよびパルス超音波との相乗効果を見出した。Harrison他は、彼らが使用した3つの細胞株の2つで*in vitro*での薬剤の細胞毒性の、著しい超音波誘導型の増大を観察した。*in vivo*でのこれらの薬剤の音響化学的活性を試験することによって、シリアン・ハムスターの子宮頸部の扁平上皮細胞癌の体積の減少によって測定される、著しい抗腫瘍効果が示された

50

(Harrison他、1991)。分子ベースのドキソルビシンの音響化学的效果も、Umemura他によって調べられ、彼らは超音波誘導型の細胞損傷とTMPoneを用いたニトロキシド生成は密接に関連があり、この両方の効果がヒスチジンを加えることによって阻害されることを見出した。これらの結果は、活性酸素種の超音波誘導型の生成と関連があり、Hpに関して観察されるものと類似の音響化学的機構と一致する(Umemura他、1997)。

【0080】

化合物の音響化学的效果はドキソルビシンと構造的に関連しており、フッ素含有アントラサイクリン誘導体FAD104(3'-デアミノ-2'-フルオロ-3'-ヒドロキシドキソルビシン-14-ピメラート)は、Yumita他によって*in vitro*で調べられた。FAD104の存在下および不在下で超音波処理した肉腫180細胞の研究によって、細胞損傷の割合が80μMのFAD104の存在下で2倍になり、一方FAD104単独では細胞損傷は観察されないことが実証された。ドキソルビシンおよびHpと同様に、超音波とFAD104の間の相乗作用はヒスチジンによって著しく阻害され、ここでも音毒性機構が反応性酸素種の生成と関連していることが示唆される(Yumita他、1998)。フェオホルバイドA(Ph-A)にも、超音波と組み合わせると相乗的な細胞毒性効果があることが示されている。Umemura他は、肉腫180細胞に対する*in vitro*および*in vivo*でのPh-Aの音響化学的效果を調べた。80μMのPh-Aが存在することによって、超音波誘導型の細胞損傷の割合が2倍になることが見出された。これはヒスチジンによって著しく阻害され、この効果も音響化学的に生成された酸素種によって仲介されていることが示唆された。超音波処理の前に56mg/kgのPh-Aを投与したマウスの研究によって、超音波のみでは抗腫瘍効果をほとんど示さなかった強度において、超音波処理が腫瘍の増殖を完全に阻害したことが示された(Umemura他、1996: Sonodynamically Enhanced Effect of Pheophorbide A)。

10

20

【0081】

有望な新しい音増感剤は、ヒ素-ポルフィリン複合体、ATX-70(2,4-ビス(1-デシロキシエチル)-Ga(III)-1,3,5,8-テトラメチルポルフィリン-6,7-ジプロピオニルジアスパラギン酸)である。ATX-70による*in vitro*での超音波誘導型の細胞損傷の増大は、Umemura他によって調べられた。80μMのHpが肉腫180細胞に対する超音波誘導型の損傷の割合を2倍にすることが見出された場合、同じ濃度のATX-70は、損傷の割合を4倍を超えて増大させた。ヒスチジンの添加が音響化学的效果を阻害することは見出されたが、マンニトールの添加は効果がなかった。これによって一重項分子酸素が、観察された音響化学的毒性の主な仲介物質である可能性があることが示される。ATX-70の超音波処理した溶液のEPR研究によって、TMPoneと活性酸素種の反応によって、Hpを含む溶液によって生じるレベルの、2.5倍を超えるレベルのニトロキシドが生じたことが示された。イミダゾールの存在下でのN,N-ジメチル-4-ニトロソアニリンの漂白によって、一重項酸素の生成が確認された。ニトロキシド生成の違いと同様に、超音波誘導型の漂白はATX-70の存在下では、同じ濃度のHpの存在下での3倍であった(Umemura他、1993)。

30

【実施例11】

【0082】

HL-60細胞をペリレンキノン増感剤で処理し、前に記載したように超音波処理した。生存画分を、増感剤濃度に対してプロットした。約30μMの濃度で、CPMG(Ac₂)によって、1000μMのHp対照のそれを超える音毒性が示され、前の20の増感剤濃度で異常に生じた生存数が減少した。DBHBおよびDMHBは100μMまでで無視できる程度の音毒性を示し、観察した音毒性効果の大部分は100μM~1000μMにおいて10を超えて生じ、最大の効果はHp対照のそれに匹敵するものであった(図8)。HBMg(Ac₂)は、10μMまで音毒性効果を示さなかった。細胞の生存数は、次の20の増感剤濃度で異常に減少した。

40

【0083】

例示および実施例によって、ある程度詳細に本発明を記載してきたが、本発明はさまざま

50

な変更形態および代替形態が可能であり、言及した特定の実施形態に制限されないことを理解すべきである。これらの特定の実施形態は本発明を制限することを意図するものではなく、反対に本発明は、本発明の精神および範囲内のあらゆる変更形態、均等物、および代替形態を網羅することを理解すべきである。

【図面の簡単な説明】

【0084】

【図1】天然に存在するヒポクレリン(a)、および例示的な合成誘導体、HBBA-R2(b)、HBEA-R1(c)、およびHBDP-R1(d)に関する構造を示す図である。

【図2】 ^{14}C 標識および共焦点レーザー走査顕微鏡(CLSM)によって観察した、EMT6/Ed細胞中のHBの薬力学的性質を示す図である。 10

【図3】HBに関して使用したのと同じ条件下での、HBEA-R1の取り込みのCLSによる決定値を示す図である。

【図4】HBEA-R1で処理したEMT6/Ed細胞中の、アポトーシス核のヨウ化プロピジウムを用いた決定値を示す図である。

【図5】HBEA-R1の光毒性の酸素依存性を示す図である。

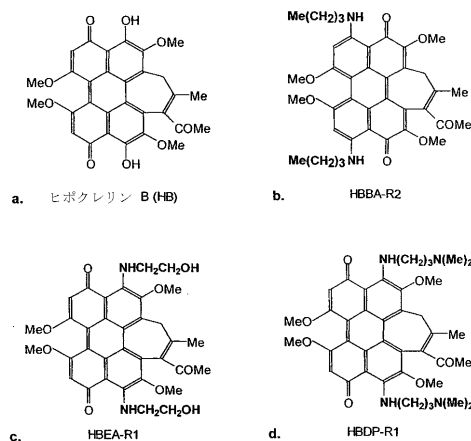
【図6】一方の脇腹にEMT6/Ed腫瘍を有するBalb/cマウス中の、 ^{14}C -HBの薬物動態を示す図である。

【図7】経皮的に施したさまざまな線量の630nmでの光による、Balb/cマウス中のEMT6/Ed腫瘍の制御を示す図である。 20

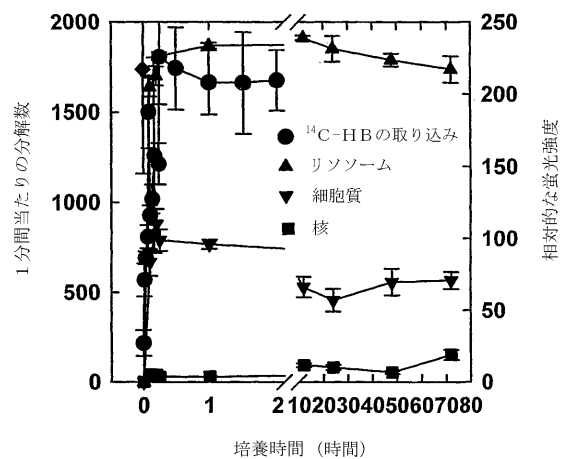
【図8】陽性対照のヘマトポルフィリン1 μM に対する、*in vitro*でのヒト前骨髄球性白血病細胞中での2つのペリレンキノン誘導体の音響化学的毒性を示す図である。

【図9】ペリレンキノン $\text{C}_{33}\text{H}_{28}\text{O}_{11}\text{Mg}$ を使用した、ヒト白血病細胞の音響化学的殺傷の証拠を示す図である。

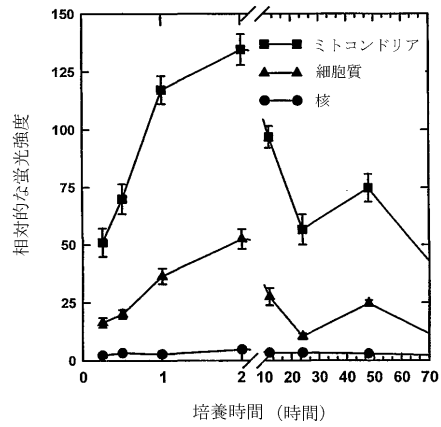
【図1】



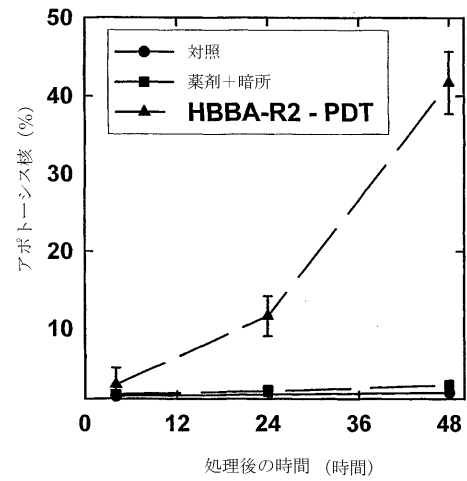
【図2】



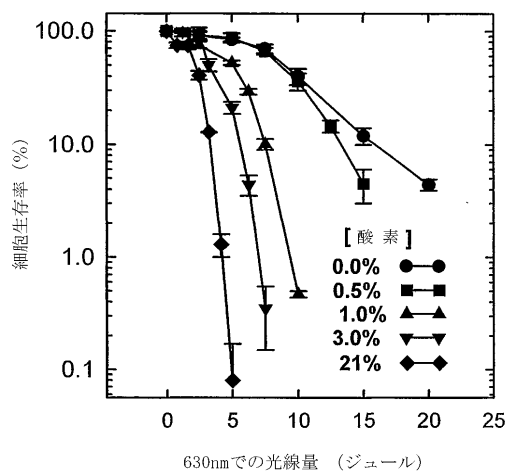
【図 3】



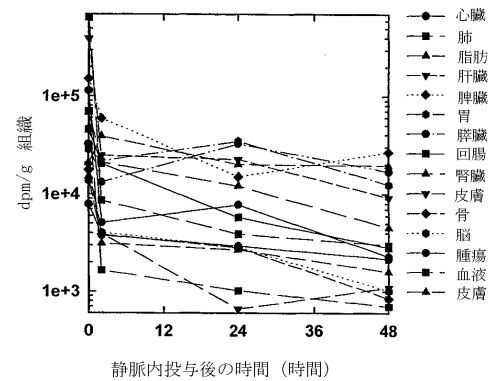
【図 4】



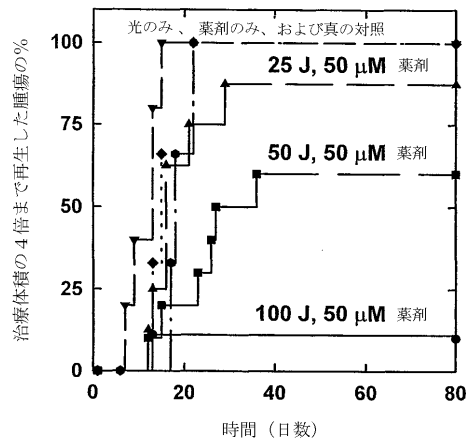
【図 5】



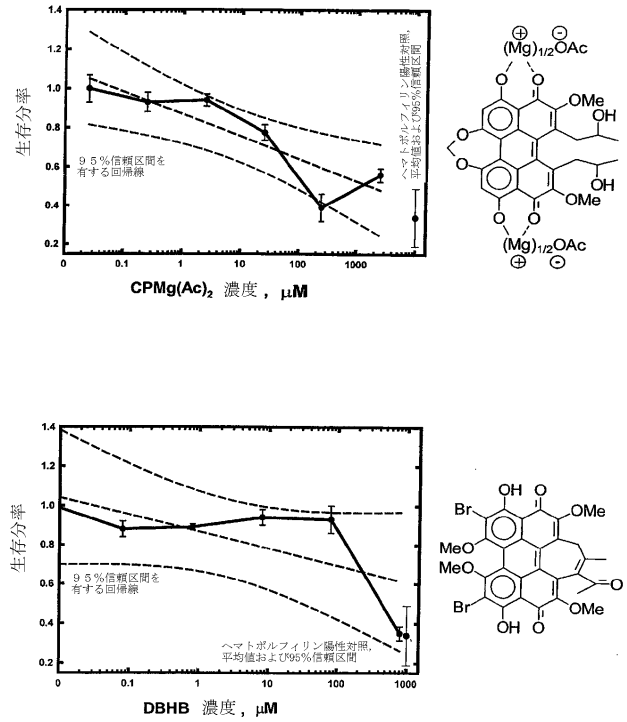
【図 6】



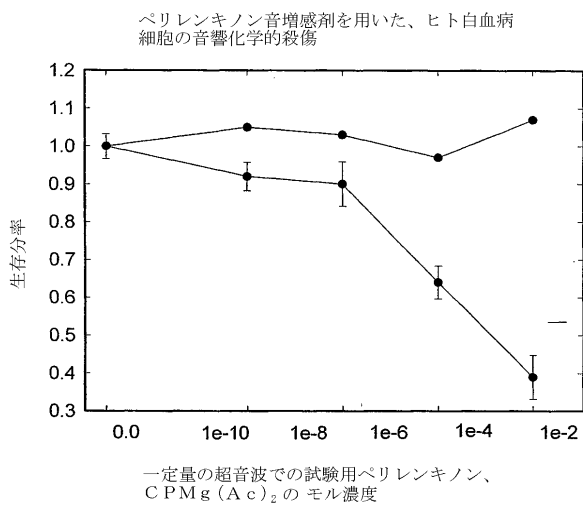
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
8 August 2002 (08.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/060483 A2

(51) International Patent Classification: A61K 41/00

(21) International Application Number: PCT/IB02/00269

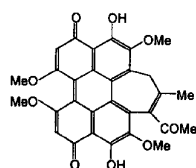
(22) International Filing Date: 29 January 2002 (29.01.2002)

(25) Filing Language: English

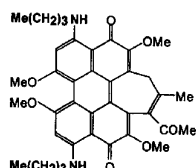
(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
09/771,555 30 January 2001 (30.01.2001) US(71) Applicant (for all designated States except US): GOVERNORS OF THE UNIVERSITY OF ALBERTA
[CA/CA]; University of Alberta, 222 Campus Tower,
8625-112 Street, Edmonton, Alberta T6G 2E1 (CA).G. [CA/CA]; 4, 5401-4 Range Road 275, Spruce Grove, Alberta T5S 1G2 (CA). LOWE, J. William [CA/CA]; 4704
- 117 A Street, Edmonton, Alberta T6H 3S1 (CA).(74) Agent: COTÉ, France; Ogilvy Renault, Suite 1600, 1981
McGill College Avenue, Montréal, Québec H3A 2Y3
(CA).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HN, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
[Continued on next page]

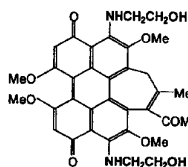
(54) Title: PERYLENEQUINONES FOR USE AS PHOTSENSITIZERS AND SONOSENSITIZERS



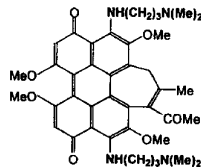
a HYPOCRELLIN B (HB)



b HBBA-R2



c HBEA-R1



d HBDP-R1

(57) Abstract: The invention is
perylenequinones that are both
sonosensitizers and photosensitiz-
ers, and their therapeutic use.

WO 02/060483 A2

WO 02/060483 A2



European patent (AI, BI, CH, CY, DL, DK, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IL, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

Declaration under Rule 4.17:

— of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

1

**PERYLENEQUINONES FOR USE AS PHOTSENSITIZERS AND
SONOSENSITIZERS**

Technical Field of the Invention

6 The invention involves compositions and methods for treating diseases and the like by administering compounds that are both photosensitizers and sonosensitizers.

Background of the Invention

11 Treatment for cancer has traditionally encompassed three main strategies: surgery, chemotherapy, and radiotherapy. Although considerable progress in these areas has been attained, the search for more effective and safe alternative treatments continues. Lipson, et al. were the first to use photodynamic therapy (PDT), in 1966 at the Mayo Clinic [*Proc. IX Internat. Cancer Congress*, page 393 (1966)].

16 Since the advent of PDT, problems have been associated with photosensitizer use, including prolonged cutaneous phototoxicity; the compositions are oligomeric mixtures of lipophilic molecules prone to molecular aggregation (with concomitant loss of photopotential); complicated
21 pharmacokinetics; poor absorption and photoactivation in the "therapeutic window" (600 nm to 850 nm, i.e., visible red light). Furthermore, batch reproducibility, even in the clinical compositions, has been poor.

The photosensitizing properties of perylenequinonoid pigments (PQPs), such as hypocrellins, in biological systems have been recognized during the past
26 two decades. See Diwu, et al., *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **64**:273 (1992); Zhang et al., (1989); and Wan, et al., "Hypocrellin A, a new drug for photochemotherapy," *Kexue Tongbao* (English edition) 26:1040 (1981).

Perylenequinones comprise a growing and highly diverse group of natural pigments, and they possess some unique chemical and biological properties. The
31 natural perylenequinonoid pigments (PQP) identified to date include hypocrellins,

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

1 cercosporin, phleiochrome, cladochrome, elsinochromes, erythroaphins, and
calphostins. Most of them are produced by a wide variety of molds. For their
general chemical properties [see Weiss, et al., *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.*, **52**:1
(1987) and Diwu, et al., *Photochem & Photobiol.*, **52**:609-616 (1990)]. PQP's
general photophysical and photochemical properties have been reviewed in Diwu,
6 et al., *Pharmac. Ther.*, **63**:1 (1994). Hypocrellins belong to the general class of
perylenequinonoid pigments, and include hypocrellin A (HA) and hypocrellin B
(HB).

Because of the difficulty of collecting sufficient activated photosensitizer at
the site of action, none of the previously known photosensitizers have gained
11 widespread use as therapeutics.

The importance of sonodynamic therapy (SDT) lies ultimately in its
similarity to PDT, an elegant and effective tumor treatment whose success is due
to the use of light and drug in combination, i.e., two treatment elements, neither of
which has toxic effects by itself (Marcus, 1992). PDT has mild side effects,
16 destroys relatively little healthy tissue, and new photosensitizers with better
therapeutic indices and improved clinical properties are being developed. The
principal impetus for the development of SDT has been improvement upon PDT's
dosimetric shortcomings. PDT is currently restricted to use with superficial
tumors. Its use on tumors deep within the body requires interstitial irradiation that
21 increases the complexity of the treatment and compromises its noninvasive
nature. SDT provides a means to reach such tumors, since ultrasound
propagates easily through several centimeters of tissue, and like light, can be
focused principally on the tumor mass where it activates the sonosensitizing
compound. Targeted SDT offers the possibility of improving the tolerance of this
26 therapy by further restricting its effects to the target tissue.

While these discoveries represent significant advances, two serious
deficiencies remain in the development of experimental SDT. A substantial
problem is the lack of sonodynamic agents with favorable clinical properties.
Porphyrins are known to cause significant cutaneous photosensitivity (Estey et al.,
31 1996), doxorubicin is cardiotoxic (Myers et al., 1976), and DMSO, DMF and MMF

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

- 1 are hepatotoxic (Misik and Riesz, 1996). New sensitizers with better
sonodynamic properties, which have milder side effects and which are rapidly
cleared, would greatly improve the clinical application of SDT. A further problem
is the lack of standardization in the conditions used for evaluating sonodynamic
agents.
- 6 Potential sonodynamic agents have been tested following exposure to
ultrasound intensities ranging from 0.25W/cm² to 40W/cm², and frequencies from
500MHz to 1MHz (Harrison et al., 1991; Sasaki et al., 1998). Though *in vivo* use
would seem to require greater energies due to roughly isotropic dissipation of the
ultrasonic energy, little effort has been made to compare experimental conditions
11 *in vitro* with those *in vivo*. Where one group will find evidence of sonodynamic
effect, different investigators do not under apparently similar conditions.
Development of standard insonation and assay systems compatible with clinical
use will permit a more rigorous assessment of the sonodynamic effects of current
and future sonosensitizers.
- 16 Sonodynamic activation of sensitizers has been found to be useful since
ultrasound has the appropriate tissue attenuation coefficient for penetrating
intervening tissues to reach desired treatment volumes, while retaining the ability
to focus energy on reasonably small volumes. Diagnostic ultrasound is a well
accepted, non-invasive procedure widely used in the developed world, and is
21 considered safe even for fetal imaging. The frequency range of diagnostic
ultrasound lies between 100 kHz -12 MHz, while 50 kHz sound provides enough
energy to effect cellular destruction through microregional cavitation.
- Sonodynamic therapy provides treatment strategies unavailable in
standard photodynamic therapy, due to the limited tissue penetration of visible
26 light. One example would be the treatment of newly diagnosed breast cancer,
where local and regional spread of micrometastatic disease remains clinically
undetectable. Using immunoconjugates (anti-breast cancer Mab - sonosensitizer
hybrids), it would be theoretically possible to selectively eradicate
micrometastases in the absence of normal tissue damage.
- 31 Beyond these basic properties shared with other waves, ultrasound

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

- 1 exhibits unique properties when propagating through water. Above a certain
threshold intensity, propagation of ultrasound waves through water elicits an
effect termed 'cavitation' (Rayleigh, 1917; Connolly and Fox, 1954). Cavitation
involves the formation of small bubbles or 'cavities' in the water during the
rarefaction half of the wave cycle, followed by the collapse of these bubbles
6 during the compression half of the cycle (Putterman, 1995). Cavities focus the
energy of the incident ultrasonic radiation by many orders of magnitude (Hiller et
al., 1992). The consequence is that regions of cavitation in water are sites of
extremely high temperature and pressure. Estimates of the temperatures
generated in a collapsing cavity range from 5000K to 10⁹K (Suslick et al. 1986;
11 Flint and Suslick, 1991; Misik and Riesz, 1995; Kaiser, 1995).

- The biological effects of exposure to ultrasound are the result of its
physical and chemical effects. The most obvious biological effects of ultrasound
treatment stem from heating of the medium through which it passes. Such
heating is exploited during physiotherapy to help heal injured tissues. (Lehmann
16 et al., 1967; Patrick, 1966), and has been investigated as a possible modality for
tumor treatment. This is due to the sensitivity of many tumours to hyperthermia, a
state in which tissue temperatures are elevated above 42°C (Doss and McCabe,
1976; Marmor et al., 1979; Sculier and Klastersky, 1981; Bleeheh, 1982; Hynynen
and Lulu, 1990). Ultrasound has also been used in combination with radiation
21 therapy to improve treatment response *in vivo* compared to radiotherapy alone
(Clarke et al., 1970; Repacholi et al., 1971; Mitsumori et al., 1996). A principal
danger in the use of ultrasound for therapeutic purposes is the formation of
'hotspots' due to regions of constructive interference and preferential absorption
of ultrasonic energy by bone regions with low curvature radii (Lehmann et al.,
26 1967; Linke et al., 1973). These hotspots can cause serious damage to nearby
tissues (Hill, 1968; Bruno et al., 1998).

- As is the case of hematoporphyrin derivatives, natural PQPs do not
themselves exhibit absorptivity longer than 600 nm, a characteristic that inherently
predicts a decreased capability of activation as tissue depth increases beyond 3-
31 5mm. This means that the natural PQPs are not sufficiently strong for

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

1 photodynamic therapy, and this limits their photodynamic therapy applications.

Deficiencies of current porphyrin and PQP photosensitizers for photodynamic therapy have stimulated the development of a series of second generation compounds which have improved properties with respect to light absorption in the red spectral range, purity, pharmacokinetics, and reduced cutaneous photosensitivity. These deficiencies also lead to investigating other forms of activating the sensitizer, e.g., activation using sound waves.

Summary of the Invention

11 In accordance with the present invention, derivatives of perylenequinone pigments (PQPs) having both photosensitizing properties and sonosensitizing properties are used to treat diseases and other conditions. Moreover, the PQP derivatives of the present invention may be conjugated to a delivery moiety to enhance the ability of the PQP derivative to target pre determined cells or structures *in vitro* or *in vivo*.

The methods and compositions of the present invention, activated by light and/or sound, exhibit substantial absorption in the red spectral region or therapeutic frequencies of ultrasound; produce high singlet oxygen yield; can be produced in pure, monomeric form; may be derivatized to optimize properties of red light absorption, ultrasound activation, tissue biodistribution, and toxicity; have reduced residual cutaneous photosensitivity; and are rapidly excreted. They afford nuclear targeting by covalent attachment to DNA minor-groove binding agents, such as stapled lexotropins, to enhance phototoxicity. They are not genotoxic. This trait is important in the context of treatment-related secondary malignancies. Conjugation with transferrin affords specificity with respect to the treatment of a variety of diseases, including ovarian cancer and breast cancer. Conjugation with a bisphosphonate affords specificity with respect to the treatment of a variety of diseases, including any disease or condition that involves the bone matrix, e.g., bone metastases of breast and prostate cancer, or osteoporosis. Conjugation with a tumor binding peptide affords specificity with

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

1 respect to the treatment of a variety of diseases, including those that involve
specific cell surface carbohydrate antigens.

Many PQP properties are summarized in Diwu, et al., *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **64**:273 (1992). Some perylenequinones are also potent inhibitors of certain viruses, particularly human immunodeficiency virus (HIV), and
6 also the enzyme protein kinase C (PKC). Both anti-HIV and anti-PKC activities of certain PQPs are light-dependent, a phenomenon implicated in the photodynamic therapy of cancers [Diwu, et al., *Biochem. Pharmacol.*, **47**:373-389 (1994)]. The Diwu et al paper also discloses the successful conjugation of HB to a protein.

The photosensitizing and sonosensitizing compounds of the present
11 invention, when administered systemically, distribute throughout the body. Over a short period, ranging from hours to days, the compounds clear from normal tissues, but are selectively retained by rapidly proliferating cells (e.g., cancer cells or psoriasis lesions) for up to several days. The PQPs of the present invention are inactive and non-toxic until activated, e.g., exposed to light in a specific
16 wavelength range or to sound in a specific frequency range.

The use of compounds that can be activated using two different activation protocols is therapeutically beneficial. Light, which can penetrate to a surface depth of about 5mm to about 7 mm, can activate compounds for treating surface lesions or those target cells within a certain distance from a light source.

21 Ultrasound, on the other hand, can penetrate deep within the body to treat deeply seated cells, such as tumor masses inaccessible to a source of light.

The compounds of the present invention are also beneficial therapeutically due to their dual selectivity. The compounds of the present invention are selective in their ability to preferentially localize the drug at the site of a
26 predetermined target, such as a cancer cell, and they are selective in that precise delivery of light and/or sound can be confined to a specific area.

The methods and compositions of the present invention, when administered *in vivo*, such as intravenously, distribute throughout the body. In subsequent hours, and sometimes days, the compositions containing at least one
31 perylenequinone derivative begin to clear from normal tissues, but are selectively

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

- 1 retained for up to several days by hyperproliferating cells, such as cancer cells.
The perylenequinone derivative remains inactive and non-toxic until it is activated.
In accordance with the present invention, the perylenequinone derivative may be
activated by light, by sound, or by light and sound. The hyperproliferating cells,
now containing or contacted with a perylenequinone derivative, may be exposed
6 to an activation source, e.g., light of an appropriate wavelength or sound of an
appropriate frequency, or both. Exposing the site containing the
hyperproliferating cells with the activation source permits selective activation of
the retained perylenequinone derivative, which in turn initiates local necrosis or
apoptosis in the hyperproliferating cell tissue leading to cell death.
- 11 In combination with the delivery system according to the present invention,
the compositions and methods of the present invention permit increased
selectivity by preferential localization of the perylenequinone derivative at the site
of the targeted cells, and permit increased selectivity by confining the activation
source to a specific area, e.g., light and/or sound confined to a discrete area.

16

Brief Description of the Drawings

- Figure 1 shows the structures for naturally occurring hypocrellin (Fig. 1A),
and exemplary synthetic derivatives, HBBA-R2 (Fig. 1B), HBEA-R1 (Fig. 1C), and
HBDP-R1 (Fig. 1D).
- 21 Figure 2 shows the pharmacodynamics of HB in EMT6/Ed cells observed
by ¹⁴C-labeling and confocal laser scanning microscopy (CLSM).
- Figure 3 shows the CLSM determination of uptake of HBEA-R1 under the
same conditions employed for HB.
- Figure 4 shows propidium iodide determination of apoptotic nuclei in
26 EMT6/Ed cells treated with HBEA-R1.
- Figure 5 shows the oxygen dependency of phototoxicity of HBEA-R1.
- Figure 6 shows the pharmacokinetics of ¹⁴C-HB in Balb/c mice bearing the
EMT6/Ed tumor in one flank.
- Figure 7 shows EMT6/Ed tumor control in Balb/c mice following various
31 doses of 630 nm light applied transcutaneously.

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

1 Figure 8 shows the sonodynamic toxicity of two perylenequinone derivatives in human promyelocytic leukemia cells *in vitro*, with respect to a positive control, hematoporphyrin at 1 μ M.

Figure 9 shows evidence of sonodynamic killing of human leukemia cells using perylenequinone C₃₃H₂₈O₁₁Mg.

6

Modes For Carrying Out the Invention

The present invention comprises the use of perylenequinone (PQP) derivatives as photodynamic and sonodynamic agents, and the use of the derivatives according to the invention as therapeutics.

11 The present invention includes a composition and method for treating a pre-determined disease or condition comprising administering a therapeutic amount of a composition comprising a perylenequinone derivative, allowing the perylenequinone derivative to distribute to a portion of the body, preferably throughout the body, and activating the perylenequinone derivative in an area
16 containing hyperproliferating cells. In preferred embodiments of the invention, the administering step includes administering a perylenequinone derivative conjugated to a delivery moiety, including but not limited to transferrin, a bisphosphonate compound, and a tumor binding peptide. In preferred
21 embodiments of the invention, the activating step includes activating the perylenequinone derivative with light, with sound, or with both light and sound.

The present invention also includes methods and compositions that involve a PQP conjugated to transferrin or a portion thereof, the use of transferrin as a delivery system for delivering an active agent to a pre-determined site, and activating the conjugate. In preferred embodiments of the invention, the
26 conjugate may be activated by light, ultrasound, or combinations thereof. In preferred embodiments of the invention, the conjugate may be useful in treating small cell lung cancer or other hyperproliferating cells.

The present invention also includes methods and compositions that involve the topical application of a composition according to the invention, and activating
31 the active agent in the composition. In preferred embodiments of the invention,

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

1 the active agent is suitable for treating dermatological conditions, including but not limited to acne and hair removal. In preferred embodiments of the invention, the conjugate may be activated by photoactivation, sonoactivation, or combinations thereof.

The present invention also includes methods and compositions that involve
6 the use of a composition according to the invention as an anti-bacterial agent in dental applications. In these embodiments of the invention, the active agent is formulated into a liquid composition, such as a mouthwash, contacting a tooth or teeth with the composition, and activating the active agent in the composition. In this embodiment of the invention, the composition is useful in treating cariotosis and the like. In preferred embodiments of the invention, the conjugate may be
11 activated by photoactivation, sonoactivation, or combinations thereof.

The invention also comprises a method of treating a disease by administering a therapeutically sufficient amount of at least one PQP derivative, and activating the derivative(s) using both photoactivation and sonoactivation.
16 Typically, the PQP derivative may be activated by exposing the derivative to a pre-determined wavelength of light and a pre-determined sound frequency.

The invention also includes photosensitive and sonosensitive compounds that further comprise a cleavable linker, said linker being cleavable *in vivo*. In accordance with the present invention, the cleavable linker may be chosen to
21 alter one or more properties of the compound, including but not limited to solubility, stability, absorption, and the like. Cleavable linkers include, but are not limited to, polyamides and sugars.

As used herein, "perylenequinone derivative" or "derivative" refers to all compounds derived from native or natural perylenequinones (PQPs) and which
26 can be activated by light of a pre-determined wavelength and/or by sound of a predetermined frequency. In a preferred embodiment of the invention, the derivative is a compound derived from naturally occurring quinone compounds. A derivative according to the invention may also be complexed with or include other active reagents, including but not limited to chemotherapeutic agents or alkylating
31 agents. Exemplary PQPs include, but are not limited to hypocrellins,

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

1 cercosporin, phleiochrome, cladochrome, elsinochromes, erythroaphins, and
calphostins. As noted in more detail below, the composition containing a PQP
active agent may include a wide variety of additional components, including, for
example, one or more of gases, gaseous precursors, liquids, oils, stabilizing
materials, diagnostic agents, photoactive agents, bioactive agents and/or
6 targeting ligands.

In a preferred embodiment of the invention, the PQP is an amino acid
derivative of hypocrellin B. At the present time, the most preferred
immunoconjugates use hypocrellin B which include an acid, acid bromide,
hydrazine, thiol, or primary amine antibody binding site.

11 The compounds of the present invention may be produced by any method
that results in a purified or substantially purified compound, or in a compound that
is useful as a photodynamic or sonodynamic agent. The compounds of the
present invention may also form a composition comprising a cocktail of
compounds, e.g., more than one compound. These methods are well known in
16 the art, e.g., Liu, et al., "Synthetic studies in novel hypocrellin B derivatives,"
Tetrahedron, 49:10785 (1993); and Diwu, et al., **Anti-Cancer Drug Design**,
8:129-143 (1993).

In accordance with the present invention, the PQP derivatives may be
functionalized, e.g., include reactive groups including but not limited to an acid,
21 hydroxyl, an acid halide (preferably bromide), a hydrazine, a thiol, or a primary
amine. The binding reagent may include reactive groups including but not limited
to amino acids, such as cysteine, lysine, aspartic acid, glutamic acid and other
dicarboxylic acid amino acids, and other tri- or poly-functional amino acid
derivatives.

26 The perylenequinone derivatives of the present invention are particularly
suited for therapeutic use because they exhibit absorption and phototoxic activity
in the phototherapeutic window (about 560nm to about 700 nm); exhibit excellent
sonodynamic activity in a frequency range from about 1MHz to about 3 MHz; are
low molecular weight, typically from about 550 daltons to about 880 daltons); are
31 available in pure monomeric form; exhibit rapid serum and skin clearance; have

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

1 negligible cytotoxicity *in vitro* and *in vivo*; have excellent photopotentialization (e.g.,
two orders of magnitude), so the safety margin in use is excellent; phototoxicity is
mediated through conventional type II reactions and Type I reactions (indicating
utility for hypoxic tumor cells); are potent inhibitors of protein kinases; confer
apoptotic cell death *in vitro* and *in vivo*; exhibit no genotoxicity; exhibit excellent
6 tumor control; may be molecularly configured for targeted delivery; may be
targeted to nuclear regions to further augment sono/phototoxicity; and the parent
hypocrellins are amenable to site-specific modification, so that many derivatives
may be formed, derivatives with varying degrees of photosensitizing and/or
sonosensitizing characteristics.

11 In accordance with the present invention, the cleavable linker may further
comprise at least two functional groups, a first functional group for binding an
active compound, and a second functional group for binding a targeting moiety,
such as a protein or a carbohydrate.

As used herein, "disease" refers to the management, diagnosis, and/or
16 palliation of any mammalian (including human) disease, disorder, malady, or
condition that can be treated by photodynamic therapy. "Disease" includes but is
not limited to cancer and its metastases, such as skin cancer; growths or tumors,
and their metastases; tumors and tumor cells, such as sarcomas and carcinomas,
including solid tumors, blood-borne tumors, and tumors found in nasal passages,
21 the bladder, the esophagus, or lung, including the bronchi; viruses, including
retroviruses; bacterial diseases; fungal diseases; and dermatological conditions or
disorders, such as lesions of the vulva, keloid, vitiligo, psoriasis, benign tumors,
endometriosis, Barrett's esophagus, *Tinea capitis*, and lichen amyloidosis.

As used herein, "administering" and "delivering" refers to any action that
26 results in exposing or contacting one or more PQP derivatives with a
predetermined cell, cells, or tissue, typically mammalian. As used herein,
administering or delivering may be conducted *in vivo*, *in vitro*, or *ex vivo*. For
example, a composition may be administered by injection or through an
endoscope. Administering also includes the direct application to cells of a
31 composition according to the present invention. For example, during the course

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

1 of surgery, tumor cells may be exposed. In accordance with an embodiment of
the invention, these exposed cells (or tumors) may be exposed directly to a
composition of the present invention, e.g., by washing or irrigating the surgical site
and/or the cells.

As used herein, activation, activating, or similar terms refers to the use of
6 light waves and/or sound frequency to make a compound or portion of a
compound more reactive. Any method for applying a light source and/or a sound
source to a perylenequinone derivative may be used in accordance with the
present invention, e.g., direct application, an ultrasound machine, focused
ultrasound, high-intensity focused ultrasound, and illuminating endoscopy, to
11 name a few.

Upon application of the appropriate light or sound, the sensitizers can
chemically (e.g., through oxidation, reduction and the like) change into a form that
is toxic to the surrounding tissue. For example, following excitation of a
photosensitizer or a sonosensitizer to a long-lived excited triplet state, a targeted
16 tumor is destroyed either by the highly reactive singlet oxygen species (a Type II
mechanism) and/or by free radical products (a Type I mechanism) generated by
quantum energy transfer. Major biological target molecules of the singlet oxygen
species and/or free radical products include nucleic acids, enzymes and cell
membranes. A secondary therapeutic effect of the present methods involves the
21 release of pathophysiologic products, such as prostaglandins, thromboxanes and
leukotrienes, by tissue exposed to the effects of activated photosensitizers. Thus,
it will be apparent to one skilled in the art that careful targeting of the photoactive
or sonoactive agents is of paramount importance to achieve therapeutic effects
without eliciting toxemias.

In accordance with an embodiment of the present invention, activating a
sensitizer using light and activating a sensitizer using sound may be used
together since each of the individual procedures are complementary. That is, red,
visible light suitable for activating a perylenequinone derivative is capable of
penetrating into tissue or into a body from about 5 mm to about 7 mm, and sound
31 suitable for activating a perylenequinone derivative is capable of fully penetrating

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

1 into tissue or into a body.

As used herein, "photopotential factor" refers to the property of the compound(s) to exert light- or sound-mediated toxicity in excess of its (their) inherent unactivated toxicity. In a preferred embodiment of the invention, the activation factor may be calculated as the ratio of the LD₅₀ of cells treated without
6 activation to the LD₅₀ of the cells treated with an activated compound (drug LD₅₀ divided by activated drug LD₅₀). Where the term "LD₅₀" has been used above, the term "IC₅₀" may be substituted, to address the bioassays that concern metabolic activity rather than the endpoint of lethality, loss of reproductive capability, or clonogenic death. The relative photoactivation efficiency of a compound may
11 also be determined using a clonogenic assay, an assay that is well known to those skilled in the art.

In accordance with the present invention, a desirable PQP derivative is one that is non-toxic (or of low toxicity) at high drug concentrations without activation, i.e., without light (also referred to as "dark"), and/or without sound, and is toxic at
16 low concentrations when light of the appropriate wavelength, or sound of the appropriate frequency, is applied. As is recognized by those skilled in the art, the most desirable compounds are those that provide a wide range of non-toxic doses in an unactivated state, as this characteristic provides an increased safety factor for the patient.

21 As used herein, physiologically acceptable fluid refers to any fluid or additive suitable for combination with a composition containing a PQP derivative. Typically these fluids are used as a diluent or carrier. Exemplary physiologically acceptable fluids include but are not limited to preservative solutions, saline solution, an isotonic (about 0.9%) saline solution, or about a 5% albumin solution
26 or suspension. It is intended that the present invention is not to be limited by the type of physiologically acceptable fluid used. The composition may also include pharmaceutically acceptable carriers. Pharmaceutically accepted carriers include but are not limited to saline, sterile water, phosphate buffered saline, and the like. Other buffering agents, dispersing agents, and inert non-toxic substances suitable
31 for delivery to a patient may be included in the compositions of the present

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

1 invention. The compositions may be solutions, suspensions or any appropriate
formulation suitable for administration, and are typically sterile and free of
undesirable particulate matter. The compositions may be sterilized by
conventional sterilization techniques.

In accordance with a method of the invention, the binding agent must be
6 capable of binding a predetermined binding site or receptor, and may be
administered to the patient by any immunologically suitable route. For example,
the binding agent may be introduced into the patient by intravenous,
subcutaneous, intraperitoneal, intrathecal, intravesical, intradermal, intramuscular,
or intralymphatic routes. The composition may be in solution, tablet, aerosol, or
11 multi-phase formulation forms. Liposomes, long-circulating liposomes,
immunoliposomes, biodegradable microspheres, micelles, or the like may also be
used as a carrier, vehicle, or delivery system. Furthermore, using *ex vivo*
procedures well known in the art, blood or serum from the patient may be
removed from the patient; optionally, it may be desirable to purify the antigen in
16 the patient's blood; the blood or serum may then be mixed with a composition that
includes a binding agent according to the invention; and the treated blood or
serum is returned to the patient. The invention should not be limited to any
particular method of introducing the binding agent into the patient.

The compounds of the present invention may be produced by any method
21 that results in a purified or substantially purified compound, or in a compound that
is useful as a photodynamic agent. The compounds of the present invention may
also form a composition comprising a cocktail of compounds, e.g., more than one
compound. These methods are well known in the art, e.g., Liu, et al., "Synthetic
studies in novel hypocrellin B derivatives," **Tetrahedron**, 49:10785 (1993); and
26 Diwu, et al., **Anti-Cancer Drug Design**, 8:129-143 (1993). Intracellular uptake
may be rapid (e.g., within about 2 hours), or uptake may require more time (e.g.,
about 20 hours or more). Some degree of selective tumor uptake might be
achieved by modification of the pKa of the sensitizer, since the interstitial milieu of
some tumors is more acidic than that of normal tissues. This invention includes a
31 method for identifying compounds where the toxicity of the compounds is higher

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

1 for cancer cells than for normal cells, via comparative clonogenic assays.

The PQP derivatives of the present invention may also be used in conjunction with and conjugated to a number of other compounds, signaling agents, enhancers, and/or targeting agents. For example, a hypocrellin derivative of the present invention may be conjugated to an antibody, preferably a
6 monoclonal antibody. In accordance with the present invention, the binding agent includes any DNA minor-groove targeting agent, such as lexotropsin or netropsin, preferably to enhance the toxicity through targeting the cell nucleus. Suitable enhancers include but are not limited to pKa modifiers, hypoxic cell radiosensitizers, and bioreductively activated anti-neoplastic agents, such as
11 mitomycin C (preferably to effect or potentiate the toxicity of the compound in hypoxic cells or microorganisms). Suitable signaling agents include but are not limited to markers of apoptotic cell death or necrotic cell death, or regulatory molecules endogenous to cell cycle control or delay, preferably to potentiate the phototoxicity or sonotoxicity of the compound(s) by induction of apoptotic or
16 necrotic cell death, or by inhibition of the repair of any form of lethal or potentially lethal damage (PLD).

As noted above, an embodiment of the invention includes binding agent-PQP conjugates (or immunoconjugates) and the therapeutic use of these conjugates. In accordance with the present invention, any method of linking a
21 binding agent to a PQP may be used. For example, it is well known how to link an antibody or an antibody fragment to a photosensitizer. For example, Goff, et al., *British Journal of Cancer*, 74:1194-1198 (1996) discloses the production of an immunoconjugate by incubating a photosensitizer with monoclonal antibody OC125, an antibody that specifically binds to the CA125 antigen associated with
26 most ovarian cancers. In this exemplary immunoconjugate, polyglutamic acid may be bound to a monoethyldiamine monoamide derivative, which is then covalently linked to the carbohydrate moiety at the hinge region of the monoclonal antibody away from the antigen binding sites. Other exemplary linkages are disclosed in U.S. Patent 4,722,906 and 3,959,078, both incorporated herein by
31 reference. Briefly, these patents disclose providing a photosensitizer with a

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

1 selector group, or a latent reactive group, that is the other member of a specific binding pair, e.g., a reactive group that covalently bonds to an antibody.

In accordance with the present invention, the PQP derivatives may be functionalized, e.g., include reactive groups including but not limited to an acid, hydroxyl, an acid halide (preferably bromide), a hydrazine, a thiol, or a primary amine. The binding reagent may include reactive groups including but not limited to amino acids, such as cysteine, lysine, aspartic acid, glutamic acid and other dicarboxylic acid amino acids, and other tri- or poly-functional amino acid derivatives.

As is recognized by one skilled in the art, an effective dose of the derivative or a conjugate that includes the derivative will depend in part on the severity of the disease and the status of the patient's immune system. One skilled in the art will recognize that a variety of doses may be used, and are dependent on a variety of well-known factors. Generally, the composition will include about 0.1 µg to about 2 mg or more of binding agent per kilogram of body weight, more commonly dosages of about 200 µg per kilogram of body weight. The concentration usually will be at least about 0.5%. Any amount may be selected primarily based on fluid volume, viscosity, antigenicity, etc., in accordance with the chosen mode of administration.

Administration of the conjugate or the derivative may be more than once, preferably three times over a prolonged period. As the compositions of this invention may be used for patients in a serious disease state, i.e., life-threatening or potentially life-threatening, excesses of the binding agent may be administered if desirable. Actual methods and protocols for administering pharmaceutical compositions, including dilution techniques for injections of the present compositions, are well known or will be apparent to one skilled in the art. Some of these methods and protocols are described in *Remington's Pharmaceutical Science*, Mack Publishing Co. (1982).

In accordance with another embodiment of the invention, a composition of the present invention may be administered alone, in combination with other compositions, or in sequence with other PDT compositions. These features

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

1 afford potential augmentation of the photodynamic therapeutic ratio through
sequential sensitizer administration (followed by light treatment). Under these
conditions, a larger number of organelles can be targeted.

In this embodiment of the invention, a PDT method comprises
administering a first photodynamic agent, preferably having a slow uptake, and
6 administering a second photodynamic agent, preferably having a more rapid
uptake than that of the first agent. Both first and second photodynamic agents
may then be activated by exposing the patient and/or the agent to light of suitable
frequency, as described above.

The excellent fluorescence properties of the hypocrellins and derivatives
11 provide a valuable tool to monitor intracellular uptake and distribution kinetics by
confocal laser scanning microscopy (CLSM). Each drug has unique properties of
uptake and distribution (Miller et al 1995 a,b). The rate cells take up drug in
humans *in vitro* and *in vivo* can be determined using similar protocols as Liu et al
1995 and Miller et al., 1995 a or b). *In vivo*, the ideal time between i.v. injection or
16 administration of the drug and light administration is preferably when tumor
concentration of the photodynamic agent is optimal with respect to normal
tissues, typically up to about 24 hours, but as long as 48 hours or more (Table 2).

Some of the embodiments of the present invention also have the added
benefit of functioning with or without the presence of oxygen. Therefore, some
21 embodiments of the present invention are effective in the treatment of solid
tumors which are either well oxygenated or either partially or fully hypoxic.

The photo- and/or sono-activating agents may be formulated for topical
application in penetrating solvents or in the form of a lotion, cream, ointment or
gel containing a sufficient amount of the photosensitizing agent compound to be
26 effective for PDT therapy. Such topical formulations may be prepared in gel form
by combining the photosensitizing agent with a solvent and adding a gelling agent
thereto. Suitable gelling agents include carboxymethyl cellulose (Carbopol.TM.
934P from B. F. Goodrich of Brecksville, Ohio U.S.A.) and fumed silica
(CAB-O-SIL.RTM., Cabot Corp., Tuscola, Ill.). The gelling agent is generally used
31 in amounts of about 5-10 wt % to obtain a gel with the desired viscosity.

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

1 Obviously, gels containing more or less gelling agent will have slightly higher or lower viscosity. One skilled in the art can readily obtain the desired gel viscosity by adjusting the concentration of gelling agent.

Additives, such as cosolvents, surfactants and/or bioadhesives frequently improve the gel properties and may be added as desired. Suitable
 6 cosolvents/surfactants include propylene glycol and glycerine. Suitable bioadhesives include carboxymethylcellulose, polyacrylic polymers, chitosan and sodium alginate, modified starch with polyacrylic polymers, eudispert
 hv hydrogels or xerogels, sodium hyaluronate, and polymers of polyethylene glycol, hydroxypropylcellulose, or carboxyvinyl. The additives may be incorporated
 11 into the gel by mechanically mixing the additives into a mixture of solvent and gelling agent.

Other additives may be used to enhance or maintain chemical stability and physiological suitability. Examples are antioxidants, chelating agents, inert gases, buffers and isotonicifiers. Examples of antioxidants and typical concentration
 16 ranges include acetone sodium bisulfite (0.1-0.8%), ascorbic acid (0.05-1.0%), monothioglycerol (0.1-1.0%), potassium metabisulfite (0.05-0.1%), propyl gallate (0.02%), sodium bisulfite (0.01-1.0%), sodium formaldehyde sulfoxylate (0.03-0.1%), sodium metabisulfite (0.02-0.25%), sodium sulfite (0.01-0.1%), sodium thioglycolate (0.05-0.1%).

21 Examples of chelating/complexing agents and typical concentration ranges include edetate sodium (0.005-0.1%), edetate calcium disodium (0.005%-0.01%), gentisic acid ethanolamide (1.0%-2.0%), niacinamide (1.0%-2.5%), sodium citrate (0.01%-2.5%), citric acid (0.001%-1.0%).

26 Buffers are used primarily to stabilize a formulation against the chemical degradation that might occur if the pH changed appreciably. Buffer systems employed normally have as low a buffer capacity as feasible in order to not disturb significantly the body buffer systems when injected. The buffer range and effect of the buffer on activity must be evaluated. Appropriate adjustment is useful to provide the optimum conditions for pH dependent
 31 partition into the target malignant tissues or lesion area. Examples of such buffer

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

1 systems include the following acids: acetic, adipic, ascorbic, benzoic, citric, glycine, lactic, tartaric, hydrochloric, phosphoric, sulfuric, carbonic and bicarbonic; and their corresponding salts such as: potassium, sodium, magnesium, calcium and diethanolamine salts.

When the solution will be dispensed from multiple dose containers,
 6 antimicrobial agents in bacteriostatic or fungistatic concentrations are added in amounts effective to provide protection from bacteria or fungi. Among the compounds and concentrations most frequently employed are phenylmercuric acid (0.002-0.01%), thimerosal (0.01%), benzethonium chloride (0.01%), benzalkonium chloride (0.01%), phenol or cresol (0.5%),
 11 chlorbutanol (0.5%), benzyl alcohol (2.0%), methyl p-hydroxybenzoate (0.18%), propyl, p-hydroxybenzoate (0.02%), and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA).

Suitable penetrating solvents are solvents for the porphycene compound which will enhance percutaneous penetration of the porphycene compound. Solvents which have this property include proparacaine, dimethyl sulfoxide,
 16 dimethyl acetamide, dimethylformamide, 1-methyl-2-pyrrolidone, diisopropyladipate, diethyltoluamide and to a lesser extent propylene glycol. Additional solvents include substituted azacycloalkan-2-ones having from 5 to 7 carbons in the cycloalkyl group such as 1-dodecylazacycloheptan-2-one (AZONE) and other azacycloalkan-2-ones such as described in U.S. Pat. No. 3,989,816
 21 incorporated herein by reference. Also included are N-bis-azocyclopentan-2-onyl alkanes described in U.S. Pat. No. 3,989,815 (hereby incorporated by reference), 1-substituted azacyclopentan-2-ones described in U.S. Pat. No. 3,991,203 (hereby incorporated by reference) and water-soluble tertiary amine oxides described in U.S. Pat. No. 4,411,893 (hereby incorporated by reference).

26 The topical formulations contain a sufficient amount of the photosensitizing compound to be effective in PDT therapy. Generally, concentrations in the range of 0.001 to 25 wt. %, preferably from about 1 to 5 wt. %, may be used.

The photosensitizing agents can be used with solvents and adjuvants appropriate to the photosensitizing agent chemistry to adjust the viscosity of the
 31 formulation. The most important solvents in this group are ethanol, polyethylene

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

- glycols of the liquid series and propylene glycol. A more comprehensive listing includes acetone, dimethyl acetamide, dimethyl formamide, dimethyl sulfoxide ethanol, glycerin, polyethylene glycol 300, and 400, propylene glycol, sorbitol, polyoxyethylene sorbitan fatty acid esters such as laureate, palmitate, stearate, and oleate, polyoxyethylated vegetable oil, sorbitan monopalmitate, 2-pyrrolidone; n-methyl-2-pyrrolidine; n-ethyl- 1 -pyrrolidine; tetrahydrofurfuryl alcohol, tween 80 and dimethyl isosorbide. Dimethyl isosorbide (ARLASOLVE.RTM. DMI, ICI Specialty Chemicals) has the advantage of being both water- and oil-soluble. Additionally, dimethyl isosorbide may be readily gelled with a gelling agent to produce gel formulations with, for example, 4% KLUCEL.RTM. (Hercules).

Additional topical formulations which may be used for the chosen photosensitizing agent are disclosed in U.S. Pat. Nos. 3,592,930 and 4,017,815 which are hereby incorporated by reference.

16 Examples

Example 1. Laser Light Wavelength and Dosage

Both the concentration of drug and the dosage of light are important for treatment of tumors. Balb/c mice with EMT6/Ed tumors with 50 $\mu\text{mol/kg}$ body weight of

- HBEA-R1 received various light dosages. The mice that received 100 Joules of 630 nm light (duration approximately 10 minutes) experienced approximately 90% tumor cure, mice that received 50 Joules of 630 nm of light experienced only a 40% cure rate and the cure rates were significantly lower at the lower light dosages (Figures 7 and 8).

- This invention provides a method for treating cancer which is enhanced in the presence of light wavelengths between 400 and 850 nm (see Figure 3 and Table 1 for optimal wavelengths for individual compounds). The absorption spectra for many compounds are included in Figure 3 and the main absorption peak for each compounds is included in Table 1. Many of these compounds have significant absorbance around the 630 nm (600 to 700 nm range) (Table 1). The

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

1 optimal wavelength is different for each compound (Table 1). For HBEA-R1 and
HBBA-R2 wavelengths between at least 630 and 688 nm are capable of killing
cells. For deeper or larger tumors the longer wavelengths are preferred. For
superficial tumors, laser wavelengths with lower wavelengths or wavelengths in
the green spectrum would be more suitable to use (Nseyo et al., 1993) since the
6 light does not penetrate as far. The ability of these compounds to be
photopotentialated at higher wavelengths increases the size of tissue that can be
treated with PDT and increases the depth at which treatment can be provided
using PDT. Fiber optic probes can be utilized to direct the laser light. Light may
also be delivered to a selected area, using an appropriate light source and
11 shielding.

A method for treating bladder is described by Nseyo and associates (1993)
this method can be applied using the compounds described in Table 1 or Figure 2
and drug doses described and wavelengths described herein.

For applications of drug to a localized region or with identifiable target
16 antigens there are several methods that are suitable for delivery, the delivery
system are comprised of drug- liposome formulations, drug -monoclonal antibody
delivery systems such as monoclonal antibody -liposome, or applied to exposed
surfaces using a standard lipophilic skin cream. The drug can be applied topically
or the route of delivery of the drug or drug and delivery system could be
21 intravenous, intraperitoneally, intrathecally, intravesically, by intratumoral injection
or by oral ingestion.

Example 2.

The pharmacodynamics of HB in EMT6/Ed cells were observed by ¹⁴C-
26 labeling and confocal laser scanning microscopy. The results are shown in Figure
2. Cellular uptake reached equilibrium within 15 minutes of administration,
implying saturation of intracellular binding sites. The extent and distribution of
drug uptake remains stable for at least 72 hours of continuous incubation in the
presence of drug, which under conditions employed was not cytotoxic.

31

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

1 Example 3.

CLSM determination of uptake of HBEA-R1 under the same conditions employed for HB. The results are shown in Figure 3. Uptake is complete within the first 2 hours, and intracellular concentrations diminish gradually during the following 70 hours.

6

Example 4.

Propidium iodide determination of apoptotic nuclei in EMT6/Ed cells treated with HBEA-R1. The results are shown in Figure 4. The background frequency of cells with apoptotic morphology is represented by the untreated

11 control. Photosensitizing concentrations of the sensitizer do not induce apoptosis, however HBEA-R1 PDT results in 50% apoptotic morphology within 48 hours of treatment.

Example 5.

16 Oxygen dependency of phototoxicity of HBEA-R1. The results are shown in Figure 5. Phototoxicity diminishes as the pO_2 in the gas phase of the cell suspension is reduced for PDT treatment, from ambient to 0.0%. The oxygen enhancement ratio (O.E.R.) is 4.0 at the D_0 . Evidence of type 1 - mediated phototoxicity is observed in the total absence of oxygen.

21

Example 6.

Pharmacokinetics of ^{14}C -HB in Balb/c mice bearing the EMT6/Ed tumor in one flank. The results are shown in Figure 6. Note rapid clearance of HB from blood. With respect to skin, the optimal therapeutic ratio for tumor occurs 2 hours following drug administration.

26

Example 7.

EMT6/Ed tumor control in Balb/c mice following various doses of 630 nm light applied transcutaneously. The results are shown in Figure 7. HBEA-R1 was administered at a fixed dose. True control represents animals given neither

31

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

- 1 photosensitizer nor laser light. The animals were treated approximately 7 days following tumor implantation, and euthanized when tumors reached four times treatment volume.

Example 8.

- 6 Sonodynamic toxicity of two perylenequinone derivatives in human promyelocytic leukemia cells *in vitro*, with respect to a positive control, hematoporphyrin at 1mM. The results are shown in Figure 8. The two compounds, for which the structures are shown, exhibit dose-dependent cell killing, and an excellent sonosensitizing efficiency.

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

Example 9. Table 1. Physical and Chemical Properties for Hypocrellins

Name of Compound	Chemical Formula	F.W.	Abs. Peak in red Spectral region (nm)	A _{max} /solvent	A ₄₃₀	Extinction Coefficient (x 10 ⁻³) (630 nm)	O ₂ Yield	LD ₅₀ Dark (μM)	LD ₅₀ Light (μM)	Photo-potenti-ation Factor
HA	C ₃₀ H ₃₈ O ₁₀	546	658*	0.093/DMF	0.068	0.86	0.84	15	3-5	3-5
HB	C ₃₀ H ₃₈ O ₉	528	658*	0.118/DMF	0.100	1.00	0.74	20	1.5-2	10-13
HA-Mg ⁺⁺	C ₃₀ H ₃₈ O ₁₀ Mg	652	616	0.958/EtOH	0.447	4.47	0.71	>25	>6	ND
HB-Mg ⁺⁺	C ₃₀ H ₃₈ O ₁₁ Mg	634	622	0.604/EtOH	0.527	5.27	0.53	10	1	10
DAHA	Deacetylated-HA	592	622	0.651/EtOH	0.570	5.70	0.51	>25	>5	ND
HBAC-R1	Cystamine-HB	585	646	0.417/CHCl ₃	0.388	3.88	0.40	12.5	1	12.5
HBAC-R2	Cystamine-HB	585	600	0.337/DMSO	0.244	2.44	0.31	12.5	5	2.5
HBBA-R2	n-butylaminated HB	780	616*	0.628/CHCl ₃	0.619	6.19	0.32	>100	0.2-0.6	167-500
HBAM-R1	2-morpholino-ethyl-aminated-HB	752	658				0.70	>25	4	>6.25
HBDD-R2	2-(N,N-diethyl-amino) ethylamine-HB	696	646*	0.508/CHCl ₃	0.065	0.65	0.36	>25	7.5	>3.3

1

6

24

11

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

Name of Compound	Chemical Formula	F.W.	Abs. Peak in red Spectral region (nm)	A _{max} /solvent	Extinction Coefficient (x 10 ⁻³) (630 nm)	¹ O ₂ Yield	LD ₅₀ Dark (μM)	LD ₅₀ Light (μM)	Photo-potential Factor
HBDR-1	2-(N,N-dimethylamino) propylamine-HB	C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O ₇	724	0.453/CHCl ₃	0.480	0.42	>25	0.5-1.5	>16.6-50
HBEA-R1	Ethanolamine-HB	C ₃ H ₉ N ₂ O ₆	614	0.625/DMSO	0.623	0.60	15-25	0.15	100-167
HBEA-R2	Ethanolamine-HB	C ₃ H ₉ N ₂ O ₆	614	0.162/DMSO	0.127	0.70	25	7.5	3.3
HBED-R2	Ethylenediamine-HB	C ₃ H ₁₀ N ₂ O ₆	696	1.449/DMSO	1.239	0.50	>25	3-5	5-8.3
HBMA-IV	Methylamine-HB	C ₃ H ₁₀ N ₂ O ₆	696	0.246/CHCl ₃	0.246	0.80	8.5	1	8.5
DBHB	5,8-dibromo-HB	C ₃ H ₁₂ O ₆ Br ₂	531	ND	ND	0.62	10	3	3.3
DMHB	demethylated HB	C ₃ H ₁₀ O ₆	696	0.469/EtOH	4.77	0.42	>25	3-5	>6-8.3
JL-1-1		C ₃ H ₁₀ O ₆	576	0.478/CHCl ₃	0.062	0.72	>70	2-4	>18.5

HBBA-R2, HBDR-1, HBEA-R1, and JL-1-1 demonstrate average or lower than average toxicity, with excellent potentiation. For the purposes of this study, the LD₅₀ light dose was not fixed. For the compounds tested, this dose is 0.75 - 1.0 J/cm² of 630 nm light.

ND = not done. * Significant light absorption at 630 nm. F.W. = formula weight.

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

1

Table 2.Tissue Uptake of ^{14}C -Hypocrellin B (dpm/g)

6

11

16

Tissue	0 Hours	2 Hours	24 Hours	48 Hours
Heart	113,920 \pm 3,365	5,135 \pm 910	7,835 \pm 1,810	2,325 \pm 245
Lung	651,100 \pm 42,668	8,580 \pm 655	3870 \pm 525	2,975 \pm 360
Fat	20,550 \pm 715	38,570 \pm 5,610	19,550 \pm 2,210	19,335 \pm 2,335
Liver	394,190 \pm 7,540	24,620 \pm 4,885	22,495 \pm 4,440	9,215 \pm 720
Spleen	151,870 \pm 9,395	58,900 \pm 4,205	14,970 \pm 3,215	26,700 \pm 11,105
Stomach	28,280 \pm 145	21,630 \pm 3,345	34,385 \pm 8,795	12,460 \pm 975
Pancreas	32,010 \pm 2,165	13,185 \pm 12,055	32,390 \pm 11,840	16,915 \pm 3,845
Ileum	45,400 \pm 3,600	20,280 \pm 2,850	5,800 \pm 645	2,840 \pm 595
Kidney	67,344 \pm 950	20,855 \pm 3,955	12,050 \pm 1,845	4,535 \pm 765
Skin	14,970 \pm 74	3,130 \pm 221	2,700 \pm 170	1,590 \pm 250
Bone	19,825 \pm 2,300	3,955 \pm 2,070	660 \pm 215	1,125 \pm 310
Brain	17,560 \pm 560	3,855 \pm 170	2,840 \pm 275	845 \pm 90
Muscle	13,665 \pm 600	4,050 \pm 940	2,875 \pm 560	1,015 \pm 205
Tumor	7,885 \pm 270	3,775 \pm 400	2,950 \pm 80	2,165 \pm 470
Serum	69,975 \pm 1,925	1,655 \pm 170	1,020 \pm 160	700 \pm 240

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

1 Example 10.

The first compounds to have identifiable sonotoxic effects were certain existing chemotherapeutic agents (Umemura et al., 1990). In their investigation of potentiation of chemotherapeutic cell killing by low-level ultrasound, Harrison et al. found synergistic effects of doxorubicin and diaziquone with tone-burst and pulsed ultrasound. They observed significant ultrasound-induced increases in drug cytotoxicity *in vitro* in two of the three cell lines they used. Testing of the sonodynamic activity of these drugs *in vivo* showed significant antitumour effect as measured by volume reduction in uterine cervical squamous cell carcinomas in Syrian hamsters (Harrison et al., 1991). The molecular basis of the sonodynamic effect of doxorubicin was also examined by Umemura et al., who found that ultrasound-induced cell damage and nitroxide production with TMPone were closely related, and that both effects were inhibited by the addition of histidine. These results are consistent with a sonodynamic mechanism that is related to the ultrasound-induced production of active oxygen species and similar to that observed for Hp (Umemura et al., 1997).

The sonodynamic effect of a compound structurally related to doxorubicin, the fluorine-containing anthracycline derivative FAD104 (3'-deamino-2'-fluoro-3'-hydroxydoxorubicin-14-pimelate) was investigated *in vitro* by Yumita et al. Studies of sarcoma 180 cells insonated in the presence and absence of FAD104 demonstrated that the rate of cell damage doubled in the presence of 80µM FAD 104, while no cell damage was observed with FAD 104 alone. As with doxorubicin and Hp, the synergy between ultrasound and FAD 104 was significantly inhibited by histidine, again suggesting a sonotoxic mechanism related to the production of reactive oxygen species (Yumita et al., 1998).

Pheophorbide A(Ph-A) has also been noted to possess synergistic cytotoxic effects in combination with ultrasound. Umemura et al. investigated the sonodynamic effect of Ph-A *in vitro* and *in vivo* on sarcoma 180 cells. The presence of 80µM Ph-A was found to double the rate of ultrasound-induced cell damage. This was significantly inhibited by histidine, which suggests that this effect too was mediated by sonodynamically generated oxygen species. Studies

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

- 1 in mice where 56mg/kg Ph-A was administered before insonation, showed that
ultrasound treatment completely inhibited tumor growth at an intensity at which
ultrasound alone showed little antitumor effect (Umemura et al., 1996:
Sonodynamically Enhanced Effect of Pheophorbide A).
- 6 A promising new sonosensitizer is a gallium-porphyrin complex, ATX-70
(2,4-bis(1-decyloxyethyl)-Ga(III)-1,3,5,8 - tetramethylporphyrin -6,7-dipropionyl
diaspartic acid). Enhancement of ultrasound-induced cell damage *in vitro* by
ATX-70 was investigated by Umemura et al. Where 80μM Hp was found to
double the rate of ultrasound-induced damage to sarcoma 180 cells, ATX-70 at
the same concentration increased the rate of damage in excess of four times.
- 11 Addition of histidine was found to inhibit the sonodynamic effect, while addition of
mannitol had no effect. This indicates that singlet molecular oxygen may be the
principal mediator of the observed sonodynamic toxicity. EPR studies of
insonated solutions of ATX-70 showed that the reaction of TMPone with active
oxygen species produced levels of nitroxide 2.5 times greater than those
- 16 produced by solutions containing Hp. Singlet oxygen production was confirmed
by the bleaching of N,N-dimethyl-4-nitrosoaniline in the presence of imidazole.
Comparable to the difference in nitroxide production, ultrasound induced
bleaching was three times as great in the presence of ATX-70 as in the presence
of Hp at the same concentration (Umemura et al., 1993).

21

Example 11.

- HL-60 cells were treated with perylenequinone sensitizers and insonated
as described above. The surviving fractions were plotted against sensitizer
concentration. At a concentration of approximately 30μM, CPMg(Ac₂) showed
- 26 sonotoxicity exceeding that of the 1000μM Hp control, with the decrease in
survival occurring steeply over the preceding two decades of sensitizer
concentration. DBHB and DMHB showed negligible sonotoxicity up to 100μM;
the bulk of the observed sonotoxic effect occurred over the decade from 100μM
to 1000μM, and the maximum effect was comparable to that of the Hp control
- 31 (Figure 8). HBMg(Ac₂) showed no sonotoxic effect until 10μM. Cell survival

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

- 1 decreased steeply over the next two decades of sensitizer concentration.
- While the invention has been described in some detail by way of illustration and example, it should be understood that the invention is susceptible to various modifications and alternative forms, and is not restricted to the specific embodiments set forth. It should be understood that these specific embodiments
- 6 are not intended to limit the invention but, on the contrary, the intention is to cover all modifications, equivalents, and alternatives falling within the spirit and scope of the invention.

PCT/IB02/00269

1

6

- 11

- 16

- 21

- 26

- 31

- 30-

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

- 1 9. The method of claim 1 wherein the composition further comprises a targeting moiety.
10. The method of claim 9 wherein the composition includes a targeting moiety for a disease, disorder, malady, or condition.
- 6 11. The method of claim 1 wherein the method of treatment comprises treating skin conditions, cancer, viral diseases, retroviral diseases, bacterial diseases, and fungal diseases.
- 11 12. The method of claim 1 wherein activating the derivative comprises exposing the derivative to sound.
13. The method of claim 12 further comprising exposing the derivative to light.
- 16 14. The method of claim 12 wherein exposing the derivative to sound comprises exposing the derivative to ultrasound.
15. The method of claim 14 wherein exposing the derivative to sound comprises exposing the derivative to a frequency between about 50 kHz and about 12 MHz.
- 21 16. The method of claim 15 wherein exposing the derivative to sound comprises exposing the derivative to a frequency between about 1 MHz and about 3 MHz.
- 26 17. The method of claim 1 wherein activating the derivative comprises exposing the derivative to sound and light.
18. The method of claim 1 wherein administering the composition further comprises allowing the composition to distribute throughout the body.
- 31

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

- 1
19. The method of claim 1 further comprising the composition to clear from
normal cells prior to activating the composition.
20. The method of claim 18 wherein allowing the composition to distribute
6 throughout the body further includes permitting the composition to be
selectively retained by rapidly proliferating cells.
21. The method of claim 19 further comprising permitting the composition to be
selectively retained by rapidly proliferating cells.
- 11
22. A method for inactivating tumor cells comprising administering a suitable
amount of at least one hypocrellin derivative, and activating the hypocrellin
derivative using a sound frequency.
- 16
23. The method of claim 22 wherein activating the hypocrellin derivative
comprises exposing the hypocrellin derivative to a sound frequency from
about 50 kHz and about 12 MHz.
24. The method of claim 22 further comprising activating the hypocrellin
21 derivative using light.
25. A method for treating a pre-determined disease or condition comprising
administering a therapeutic amount of a composition comprising a
perylenequinone derivative, allowing the perylenequinone derivative to
26 distribute to a portion of the body, and activating the perylenequinone
derivative using light and/or sound.
- 26
26. The method of claim 25 wherein the perylenequinone is localized to a
predetermined portion of the body.
- 31

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

- 1 27. The method of claim 26 wherein the predetermined portion of the body
contains hyperproliferating cells.
28. The method of claim 27 wherein the administering step includes
administering a perylenequinone derivative conjugated to a delivery
6 moiety.
29. A method for treating a disease or condition comprising administering a
composition comprising a sonosensitizer hypocrellin derivative and at least
one of a pKa modifier, a buffer, a salt, a base, an acid, saline, and an
11 adjuvant.
30. A composition for the treatment of a disease, disorder, or condition
comprising a non-toxic sonosensitizer, said sonosensitizer comprising a
16 perylenequinone.
31. The composition of claim 30 wherein the perylenequinone is selected from
the group comprising hypocrellins, cercosporins, phleischromes,
elsinochromes, cladochromes, erythroaphins, and calphostins.
- 21 32. The composition of claim 31 wherein the perylenequinone is functionalized.
33. The composition of claim 30 wherein the perylenequinone is non-toxic at
high concentrations in its non-activated state and toxic at low
concentrations in its activated state.
- 26 34. The composition of claim 30 further comprising a perylenequinone that is a
sonosensitizer and a photosensitizer.
- 31 35. The composition of claim 30 wherein the perylenequinone is a hypocrellin
derivative.

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

- 1
36. The composition of claim 31 wherein the perylenequinone is a hypocrellin derivative.
- 6
37. The composition of claim 30 wherein the hypocrellin derivative is functionalized.
- 11
38. The composition of claim 37 wherein the hypocrellin derivative is selected from the group consisting of butylaminated hypocrellin B; 2-(N,N-dimethylamino)-propylamine-hypocrellin B; ethanolaminated hypocrellin B; and 1,12-Bis[2-(acetyloxy)propyl]-2,4,6,7,9,11-hexamethoxy-3,10-perylenedione.
- 16
39. The composition of claim 36 wherein the hypocrellin derivative is non-toxic at high concentrations in its non-activated state and toxic at low concentrations in its activated state.
- 21
40. The composition of claim 30 wherein the composition further comprises a targeting moiety.
- 26
41. The composition of claim 40 wherein the composition includes a targeting moiety for a disease, disorder, malady, or condition.
- 31
42. The composition of claim 30 wherein the comprises a sonosensitizer for treating skin conditions, cancer, viral diseases, retroviral diseases, bacterial diseases, and fungal diseases.
43. A method of treatment comprising administering a composition containing a perylenequinone derivative, and activating the derivative by exposing the perylenequinone to light of a predetermined wavelength and sound of a pre-determined frequency.

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

1

44. The method of claim 43 wherein the perylenequinone is a hypocrellin derivative.

6

45. A composition for the treatment of a disease, disorder, or condition comprising a perylenequinone, said perylenequinone being both a photosensitizer and a sonosensitizer.

11

46. The composition of claim 45 wherein the perylenequinone is a hypocrellin derivative.

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

1/9

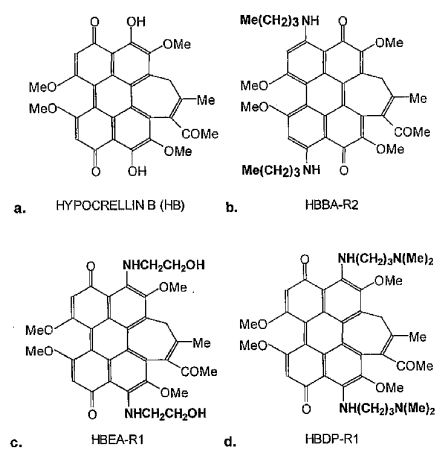


Figure 1

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

2/9

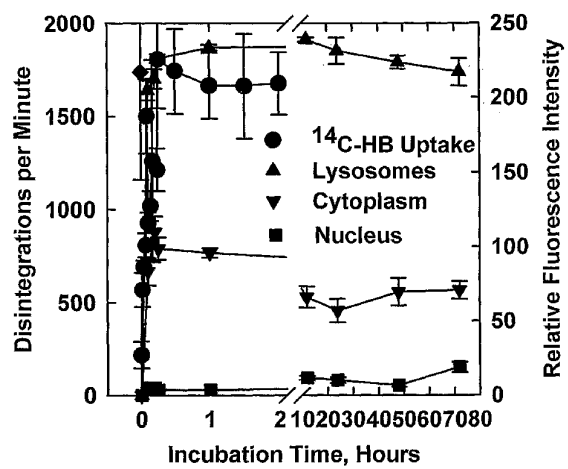


Figure 2

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

3/9

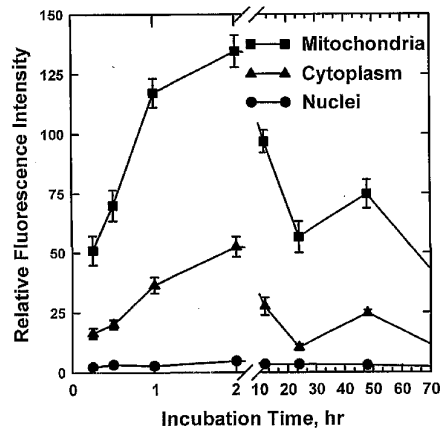


Figure 3

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

4/9

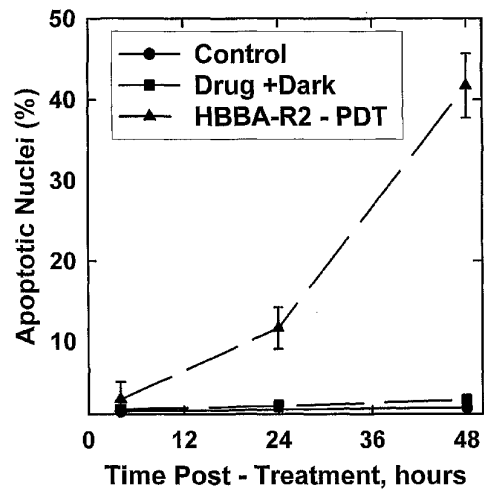


Figure 4

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

5/9

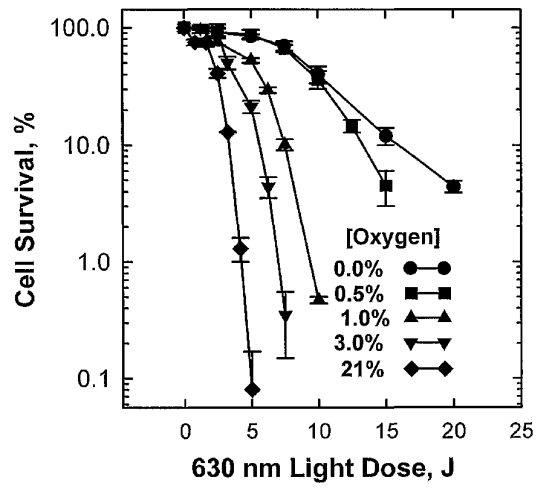


Figure 5

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

6/9

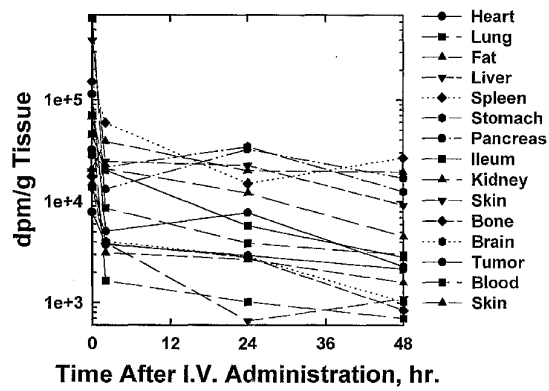


Figure 6

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

7/9

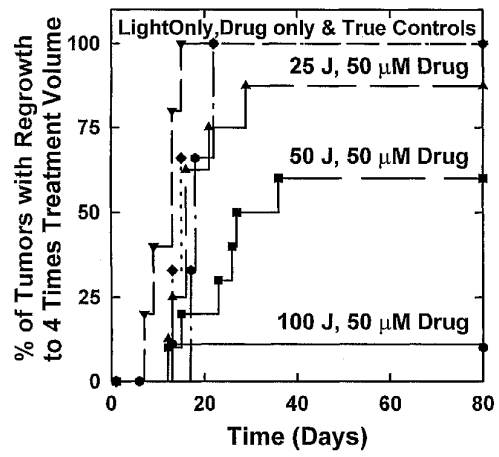
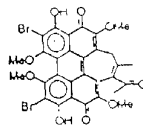
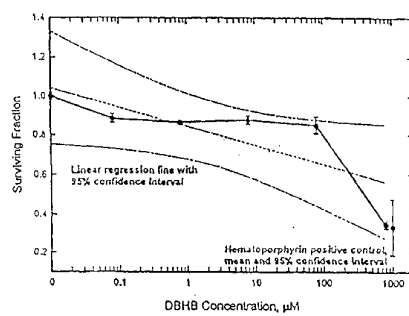
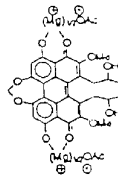


Figure 7

PCT/IB02/00269

Figure 1 is a log-linear plot showing the relationship between the stacking fraction (Y-axis, linear scale from 0.2 to 1.4) and the ratio of the mean and 95% confidence interval (X-axis, logarithmic scale from 0 to 1000). The plot includes three data series: Hematophagous positive control (solid line with circles), Hematophagous negative control (dashed line with triangles), and Hematophagous positive control (dotted line with squares). A linear regression line with a 95% confidence interval is shown for the Hematophagous positive control data.



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/060483

PCT/IB02/00269

9/9

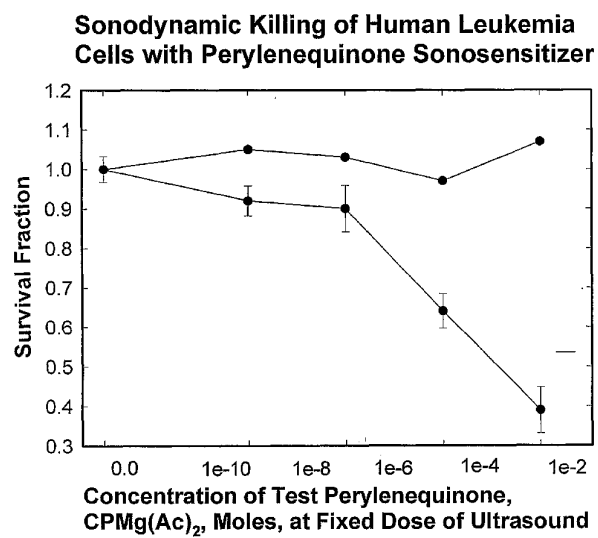


Figure 9

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

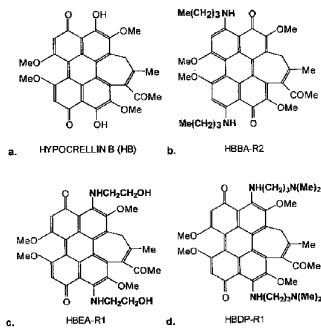
(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
8 August 2002 (08.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/060483 A3

- (51) International Patent Classification: A61K 41/00, A61P 35/00, 31/18
- (21) International Application Number: PCT/IB02/00269
- (22) International Filing Date: 29 January 2002 (29.01.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/771,555 30 January 2001 (30.01.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): GOVERNORS OF THE UNIVERSITY OF ALBERTA [CA/CA]; University of Alberta, 222 Campus Tower, 8625-112 Street, Edmonton, Alberta T6G 2E1 (CA).
- (72) Inventors: and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): MILLER, Gerald, G. [CA/CA]; 4, 54014 Range Road 275, Spruce Grove, Alberta T7X 3V4 (CA). LOWE, J. William [CA/CA]; 4704 - 117 A Street, Edmonton, Alberta T6H 3S1 (CA).
- (74) Agent: COTÉ, France; Ogilvy Renault, Suite 1600, 1981 McGill College Avenue, Montréal, Québec H3A 2Y3 (CA).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PI, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KR, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Declaration under Rule 4.17:
— of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only
- Published:
— with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 24 December 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: PERYLENEQUINONES FOR USE AS PHOTSENSITIZERS AND SONOSENSITIZERS



(57) Abstract: The invention is perylenequinones that are both sonosensitizers and photosensitizers, and their therapeutic use.

WO 02/060483 A3

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/IB 02/00269
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K41/00 A61P35/00 A61P31/18		
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) IPC 7 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
CHEM ABS Data, EMBASE, BIOSIS, EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 52609 A (ALFHEIM JAN ALAN ;JOHANNESSEN EDVIN WILHELM (NO); NYCOMED IMAGING A) 26 November 1998 (1998-11-26) page 19, line 9; claims	1-46
X	WO 00 01413 A (PHARMACYCLICS INC ;KESSEL DAVID (US); WOODBURN KATHRYN W (US)) 13 January 2000 (2000-01-13) claims	1
	--- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document 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 *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
6 November 2002		13/11/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentstrasse 2 NL - 2280 EV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Berte, M

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/IB 02/00269
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DIWU Z: "NOVEL THERAPEUTIC AND DIAGNOSTIC APPLICATIONS OF HYPOCRELLINS AND HYPERICINS" PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY, OXFORD, GB, vol. 61, no. 6, 1995, pages 529-539, XP000915971 ISSN: 0031-8655 cited in the application abstract -----	1
X	WO 98 52610 A (TECHNION RES & DEV FOUNDATION ; IGER YONI (IL)) 26 November 1998 (1998-11-26) page 7, line 7 - line 9; claims 1,3,7 -----	1
E	WO 02 060482 A (ALTACHEM PHARMA LTD ; LEVEUGLE BEATRICE (CA)) 8 August 2002 (2002-08-08) claims -----	1-46

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB 02/00269

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 1-29, 43-44 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

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

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

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International application No PCT/IB 02/00269	
Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9852609	A	26-11-1998	AU 7443898 A		11-12-1998
			EP 0979104 A1		16-02-2000
			WO 9852609 A1		26-11-1998
			JP 2001525845 T		11-12-2001
WO 0001413	A	13-01-2000	AU 4859699 A		24-01-2000
			CA 2335808 A1		13-01-2000
			EP 1096956 A1		09-05-2001
			WO 0001413 A1		13-01-2000
WO 9852610	A	26-11-1998	AU 7447598 A		11-12-1998
			EP 0983090 A1		08-03-2000
			WO 9852610 A1		26-11-1998
WO 02060482	A	08-08-2002	WO 02060482 A2		08-08-2002

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 31/10	A 6 1 P 31/10	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ジェラルド・ジー・ミラー

カナダ国アルバータ T 7 X 3 V 4 . スプルースグローヴ . 5 4 0 1 4 レインジロード 2 7 5 4

(72)発明者 ジェイ・ウィリアム・ラウン

カナダ国アルバータ T 6 H 3 S 1 . エドモントン . ストリート 4 7 0 4 - 1 1 7 A

F ターム(参考) 4C206 AA01 AA02 CB28 DB04 DB49 FA31 KA04 MA01 MA04 NA05
NA14 ZA89 ZB26 ZB32 ZB33 ZB35