(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117460698 A
(43)申请公布日 2024.01.26

(21)申请号 202280040669.6
(22)申请日 2022.06.09
(30)优先权数据
2021-098083 2021.06.11 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.12.06
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2022/023332 2022.06.09
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/260136 JA 2022.12.15
(71)申请人 国立大学法人京都大学
地址 日本京都府
申请人 株式会社大赛璐
(72)发明人 西川正浩 小松直树
(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
专利代理师 杨薇
(51)Int.Cl.
C01B 32/28(2017.01)
B82Y 30/00(2011.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61K 47/59(2017.01)
A61K 41/00(2020.01)
A61K 33/22(2006.01)

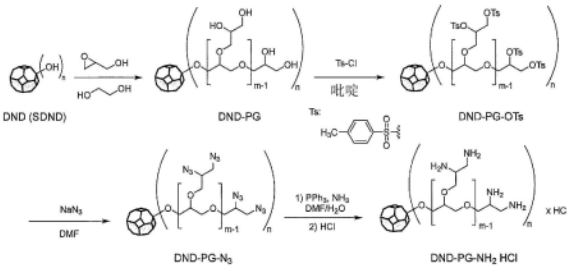
权利要求书2页 说明书23页 附图10页

(54)发明名称

表面修饰纳米粒子

(57)摘要

本发明提供能容易地制造,能将硼原子选择性地运送至癌细胞内此外维持该硼原子的表面修饰纳米粒子及其制造方法。本公开的表面修饰纳米粒子具备纳米碳材料和所述纳米碳材料的表面修饰基团,所述表面修饰纳米粒子具有包含硼原子的基团作为所述表面修饰基团。



CN 117460698 A

1.一种表面修饰纳米粒子,其具备:

纳米碳材料和所述纳米碳材料的表面修饰基团,

所述表面修饰纳米粒子具有包含硼原子的基团作为所述表面修饰基团。

2.根据权利要求1所述的表面修饰纳米粒子,其中,

所述纳米碳材料为纳米金刚石粒子。

3.根据权利要求1或2所述的表面修饰纳米粒子,其中,

所述表面修饰纳米粒子具有亲水性基团和包含硼原子的基团作为所述表面修饰基团。

4.根据权利要求1或2所述的表面修饰纳米粒子,其中,

所述亲水性基团为包含亲水性聚合物链的基团。

5.根据权利要求1或2所述的表面修饰纳米粒子,其中,

所述表面修饰纳米粒子具有包含硼原子和亲水性聚合物链的基团作为所述表面修饰基团。

6.根据权利要求1或2所述的表面修饰纳米粒子,其中,

所述亲水性聚合物链为聚甘油链。

7.根据权利要求6所述的表面修饰纳米粒子,其中,

所述聚甘油链为羟基的一部分或全部被氨基取代而成的聚甘油链。

8.根据权利要求7所述的表面修饰纳米粒子,其中,

所述氨基的至少一部分被具有酸性官能团的化合物保护。

9.根据权利要求5所述的表面修饰纳米粒子,其中,

所述硼原子经由芳香环与所述亲水性聚合物链键合。

10.根据权利要求9所述的表面修饰纳米粒子,其中,

所述硼原子直接键合于所述芳香环。

11.根据权利要求9所述的表面修饰纳米粒子,其中,

所述芳香环经由键合于构成所述芳香环的碳原子的亚烷基氧基或亚烷基氨基与所述亲水性聚合物链键合。

12.根据权利要求11所述的表面修饰纳米粒子,其中,

所述硼原子和所述亚烷基氧基或所述亚烷基氨基分别键合于构成所述芳香环的碳原子中彼此邻接的碳原子。

13.根据权利要求12所述的表面修饰纳米粒子,其中,

所述芳香环经由键合于构成所述芳香环的碳原子的亚烷基氨基与所述亲水性聚合物链键合,所述亚烷基氨基中的氨基为叔氨基。

14.根据权利要求9所述的表面修饰纳米粒子,其中,

所述芳香环为苯环或吡啶环。

15.根据权利要求9所述的表面修饰纳米粒子,其中,

所述芳香环具有吸电子基团作为取代基。

16.根据权利要求15所述的表面修饰纳米粒子,其中,

所述吸电子基团为氟原子。

17.根据权利要求1或2所述的表面修饰纳米粒子,其中,

所述硼原子以硼酸的形式被包含。

18.根据权利要求1或2所述的表面修饰纳米粒子,其中,

所述硼原子浓缩为^{10}B。

19.根据权利要求1或2所述的表面修饰纳米粒子,其中,

将0.5质量份的所述表面修饰纳米粒子配合于99.5质量份的、以v/v计为45/55的PBS/FBS溶液中,在25℃下保存时,通过目视判定,在10分钟以内实质上不产生凝聚体,所述PBS为pH7.4。

20.一种组合物,其是用于包含如权利要求1或2所述的表面修饰纳米粒子的硼中子俘获疗法的组合物。

表面修饰纳米粒子

技术领域

[0001] 本公开的发明涉及表面修饰纳米粒子。本申请主张2021年6月11日在日本申请的日本特愿2021-098083号的优先权,将其内容援引于此。

背景技术

[0002] 硼中子俘获疗法(BNCT:boron neutron capture therapy)是通过由硼(^{10}B)与中子的核反应而释放的α线(^{4}He原子核)和锂核(^{7}Li原子核)破坏癌细胞的、高等的癌症治疗方法之一。由核反应产生的α线和^{7}Li原子核的能移动的距离为几微米左右,与细胞尺寸几乎相同,因此,只要能选择性地且将充分的硼(硼化合物)蓄积于癌组织、癌细胞,就能选择性地杀伤癌细胞。

[0003] 目前,作为用于BNCT的硼药剂,临床上使用了对硼基苯基丙氨酸(BPA)(专利文献1)。已知BPA经由在癌细胞表面表达的L-氨基酸转运蛋白(LAT-1)进入癌细胞,但由于基于LAT-1的BPA的细胞膜渗透(细胞内进入和排出)是可逆的、是低分子化合物,因此代谢(排出)迅速,因此为了在中子的照射中维持癌细胞内的BPA浓度,需要提高细胞外的BPA浓度。即,在BNCT中,需要连续地投给高浓度的BPA。

[0004] 为了克服BPA中的上述问题,研究了能将硼原子选择性地运送至癌细胞内并且维持该硼原子的纳米粒子基体的药剂(纳米药品),至今为止,研究了各种含硼的纳米粒子(非专利文献1)。

[0005] 现有技术文献

[0006] 专利文献

[0007] 专利文献1:日本特开2009-51766号公报

[0008] 非专利文献

[0009] 非专利文献1:T.Nomoto.et.al.,Sci.Adv.2020,6,eaaz1722

发明内容

[0010] 发明要解决的问题

[0011] 这些药剂中虽然存在示出有前景的结果的药剂,但由于难以大量生产、无法得到再现性,因此从品质的观点考虑存在问题。此外,也要求提高生理学的条件下的稳定性。

[0012] 因此,本公开的目的在于,提供能容易地制造,能将硼原子选择性地运送至癌细胞内此外维持该硼原子的表面修饰纳米粒子及其制造方法。

[0013] 技术方案

[0014] 本公开的发明人等为了实现所述目的而进行了深入研究,结果发现,如下表面修饰纳米粒子能容易地制造,生理学的条件下的稳定性优异,所述表面修饰纳米粒子具备纳米碳材料和所述纳米碳材料的表面修饰基团,所述表面修饰纳米粒子具有包含亲水性聚合物链的基团和包含硼原子的基团作为所述表面修饰基团。本公开的发明是基于这些见解而完成的。

[0015] 即,本公开涉及一种表面修饰纳米粒子,其具备:纳米碳材料和所述纳米碳材料的表面修饰基团,所述表面修饰纳米粒子具有包含硼原子的基团作为所述表面修饰基团。

[0016] 优选的是,所述纳米碳材料为纳米金刚石粒子。

[0017] 优选的是,具有亲水性基团和包含硼原子的基团作为所述表面修饰基团。

[0018] 优选的是,所述亲水性基团为包含亲水性聚合物链的基团。

[0019] 优选的是,具有包含硼原子和亲水性聚合物链的基团作为所述表面修饰基团。

[0020] 优选的是,所述亲水性聚合物链为聚甘油链。

[0021] 优选的是,所述聚甘油链为羟基的一部分或全部被氨基取代而成的聚甘油链。

[0022] 优选的是,所述氨基的至少一部分被具有酸性官能团的化合物保护。

[0023] 优选的是,所述硼原子经由芳香环与所述亲水性聚合物链键合。

[0024] 优选的是,所述硼原子直接键合于芳香环。

[0025] 优选的是,所述芳香环经由键合于构成所述芳香环的碳原子的亚烷基氧基或亚烷基氨基与所述亲水性聚合物链键合。

[0026] 优选的是,所述硼原子和所述亚烷基氧基或所述亚烷基氨基分别键合于构成所述芳香环的碳原子中彼此邻接的碳原子。

[0027] 优选的是,所述芳香环经由键合于构成所述芳香环的碳原子的亚烷基氨基与所述亲水性聚合物链键合,所述亚烷基氨基中的氨基为叔氨基。

[0028] 优选的是,所述芳香环为苯环或吡啶环。

[0029] 优选的是,所述芳香环具有吸电子基团作为取代基。

[0030] 优选的是,所述吸电子基团为氟原子。

[0031] 优选的是,所述硼原子以硼酸的形式被包含。

[0032] 优选的是,所述硼原子浓缩为^{10}B。

[0033] 优选的是,就所述表面修饰纳米粒子而言,将0.5质量份的所述表面修饰纳米粒子配合于99.5质量份的PBS(pH7.4)/FBS(45/55(v/v))溶液中,在25℃下保存时,通过目视判定,在10分钟以内实质上不产生凝聚体。

[0034] 需要说明的是,在本公开中也对如下组合物进行了说明,其是用于包含所述表面修饰纳米粒子的硼中子俘获疗法的组合物。

[0035] 有益效果

[0036] 本公开的表面修饰纳米粒子能容易地制造,能将硼原子选择性地运送至癌细胞内并且维持癌细胞内的硼原子的浓度。此外,在本公开的表面修饰纳米粒子还具有亲水性基团作为表面修饰基团的情况下,起到生理学的条件下的稳定性提高这样的效果。因此,本公开的表面修饰纳米粒子能使充分的量的硼原子蓄积于癌组织、癌细胞,因此能通过硼中子俘获疗法(BNCT)有效地杀伤癌组织、癌细胞。

附图说明

[0037] 图1是表示DND-PG的FT-IR光谱的图。

[0038] 图2是表示DND-PG的^{1}H-NMR光谱的图。

[0039] 图3是表示DND-PG-OTs的FT-IR光谱的图。

[0040] 图4是表示DND-PG-OTs的^{1}H-NMR光谱的图。

[0041] 图5是表示DND-PG-N_3的FT-IR光谱的图。

[0042] 图6是表示DND-PG-N_3的^{1}H-NMR光谱的图。

[0043] 图7是表示DND-PG-NH_2·HCl的FT-IR光谱的图。

[0044] 图8是表示DND-PG-NH_2·HCl的^{1}H-NMR光谱的图。

[0045] 图9是表示DND-PG-PBA的FT-IR光谱的图。

[0046] 图10是表示DND-PG-PBA的^{1}H-NMR光谱的图。

[0047] 图11是表示DND-PG-PBA-Suc的FT-IR光谱的图。

[0048] 图12是表示DND-PG-PBA-Suc的^{1}H-NMR光谱的图。

[0049] 图13是表示DND-PG-PBA-SucMe的FT-IR光谱的图。

[0050] 图14是表示DND-PG-PBA-SucMe的^{1}H-NMR光谱的图。

[0051] 图15是关于对DND-PG-PBA-Suc、DND-PG-PBA-SucMe、以及DND-PG-FPBA-SucMe的细胞毒性进行评价的图。

[0052] 图16是关于DND-PG-PBA-SucMe的药代动力学的图。

[0053] 图17是关于肿瘤和血液中的^{10}B浓度以及它们的比率(T/B比)的图。

[0054] 图18是关于基于DLS的DND-PG-NH_2等各物质的流体力学的尺寸的图。

[0055] 图19是表示对BALB/c小鼠注射DND-PG-PBA-SucMe,在照射了中子后的29天对肿瘤的大小进行了监控的结果的图。

[0056] 图20是表示对BALB/c小鼠注射DND-PG-PBA-SucMe,在照射了中子后的29天对肿瘤的大小进行了监控的结果的图。

[0057] 图21是表示对BALB/c小鼠注射DND-PG-PBA-SucMe,在照射了中子后的29天对体重进行了监控的结果的图。

[0058] 图22是表示从DND到DND-PG-NH_2·HCl的合成方案的图。

[0059] 图23是表示从DND-PG-NH_2·HCl到DND-PG-PBA-SucMe的合成方案的图。

具体实施方式

[0060] [表面修饰纳米粒子]

[0061] 本公开的表面修饰纳米粒子具备纳米碳材料和对所述纳米碳材料的表面进行修饰的表面修饰基团。所述表面修饰纳米粒子至少具有包含硼原子的基团作为所述表面修饰基团。此外,从生理学的条件下的稳定性的观点考虑,优选还具有亲水性基团作为所述表面修饰基团。即,所述表面修饰纳米粒子优选具有亲水性基团和包含硼原子的基团作为所述表面修饰基团。

[0062] 所述纳米碳材料没有特别限定,例如可列举出:纳米金刚石、纳米石墨烯、石墨烯纳米带、富勒烯、氧化石墨烯、纳米石墨、碳纳米管、碳纳米丝、洋葱碳、类金刚石碳、无定形碳、碳黑、碳纳米角、碳纳米线圈。其中,在能使硼原子充分地蓄积于癌组织、癌细胞的方面考虑,优选为纳米金刚石。此外,作为纳米金刚石,优选为粒子状的纳米金刚石(纳米金刚石粒子)。以后,有时将纳米金刚石称为“ND”。

[0063] 所述纳米金刚石(粒子)没有特别限定,例如,可以使用爆轰法ND、高温高压法ND、化学气相生长法ND(利用CVD法将金刚石薄膜粉碎而成的ND)等。其中,在分散介质中的分散性更优异的方面考虑,此外,在一次粒子的粒径为一位数的纳米的方面考虑,优选为爆轰法

ND。所述纳米金刚石中,也可以在其金刚石晶体结构中存在氮-缺陷中心(NV中心)、硅-缺陷中心(SiV中心)等具有荧光特性、磁特性的缺陷。

[0064] 所述亲水性基团没有特别限定,例如可列举出:羟基、羧基、磺酸基、氨基、以及包含亲水性聚合物链的基团等。其中,从生理学的条件下的稳定性进一步提高的观点考虑,优选为包含亲水性聚合物链的基团。即,所述表面修饰纳米粒子优选具有包含亲水性聚合物链的基团和包含硼原子的基团作为所述表面修饰基团。

[0065] 在所述表面修饰纳米粒子具有包含亲水性聚合物链的基团和包含硼原子的基团作为所述表面修饰基团的情况下,这些基团可以为同一的表面修饰基团,也可以为不同的表面修饰基团。即,所述亲水性聚合物链和所述硼原子可以存在于一个表面修饰基团中,也可以存在于不同的表面修饰基团中。作为所述亲水性聚合物链和所述硼原子存在于一个表面修饰基团中的方案,可列举出包含硼原子和亲水性聚合物链的基团。需要说明的是,本公开的表面修饰纳米粒子可以仅具有一种所述表面修饰基团,也可以具有两种以上所述表面修饰基团。

[0066] 构成表面修饰纳米粒子的ND粒子优选包含纳米金刚石的一次粒子。此外,也可以包含所述一次粒子凝聚(聚集)多个而成的二次粒子。而且,在表面修饰纳米粒子的表面(ND粒子的表面),也可以具有一种或两种以上除了亲水性基团和包含硼的基团以外的官能团。作为这样的官能团,例如可列举出:氨基、羟基、以及羧基。

[0067] 作为所述亲水性聚合物链,可列举出包含源自具有亲水性基团的单体的结构单元的聚合物链,例如,可列举出:聚醚链(聚氧乙烯、聚氧丙烯、以及它们的共聚物等)、聚甘油链($C_3H_6O(CH_2CH(OH)CH_2O)n-H$等)。其中,从生理学的条件下的稳定性的观点考虑,优选为聚甘油链。即,所述亲水性聚合物链优选包含聚甘油链。

[0068] 所述聚甘油链优选为下述式(1)所示的聚甘油链。

[0069] $-(X^1C_3H_5)-(OC_3H_5)p-(X^2R^1)q$ (1)

[0070] [式(1)中,p表示1以上的整数,q表示满足q=p+2的整数。X^1表示二价基团,$[X^1C_3H_5]$中的从X^1向左伸出的键合键与纳米碳材料键合。$[X^2R^1]$表示聚甘油链的末端,X^2表示单键或二价基团,R^1表示氢原子或一价有机基团。]

[0071] 所述式(1)中的$[X^1C_3H_5]$由$[-X^1-CH_2-C(-)H-CH_2-]$表示。所述$[X^1C_3H_5]$中的X^1与纳米碳材料键合,两个C各自与$[OC_3H_5]$中的O或$[X^2R^1]$中的X^2键合。所述$[X^1C_3H_5]$中的X^1表示二价基团。需要说明的是,一个以上R^1为一价有机基团,R^1中的一个以上一价有机基团优选包含硼原子。

[0072] 作为X^1中的所述二价基团,例如可列举出:氨基($-NR^a-$)、酰胺基($-NR^a-C(=O)-$)、醚键(-O-)、酯键(-O-C(=O)-)、次膦酸基(-PH(=O)O-)、膦酸基(-P(-OH)(=O)O-)、磷酸酯(-O-P(=O)(OH)-O-)、硫醚键(-S-)、羰基(-C(=O)-)、氨基甲酸酯键($-R^aN-C(=O)-O-$)、酰亚胺键($-C(=O)-NR^a-C(=O)-$)、硫羰基(-C(=S)-)、硅氧烷键(-Si-O-)、硫酸酯基($-O-S(=O)_2-O-$)、磺酰基($-S(=O)_2-O-$)、磺酸基($-S(=O)_2-$)、亚砜(-S(=O)-)、它们中的两个以上键合而成的基团等。在不对称的二价基团中,二价基团相对于纳米碳材料侧和R侧的方向没有特别限制。此外,所述R^a表示氢原子或一价有机基团。作为所述二价基团,其中,优选为$-NR^a-$、-O-、-C(=O)O-、$-NR^a-C(=O)-$、-PH(=O)O-、-S-,更优选为$-NR^a-$、-O-、$-NR^a-C(=O)-$、或-C(=O)O-。

[0073] 作为R^1中的所述一价有机基团,例如,可列举出取代或未取代的烃基(一价烃基,特别是一价脂肪族或芳香族烃基)、取代或未取代的杂环式基团(一价杂环式基团)、所述一价烃基和/或所述一价杂环式基团键合两个以上而成的基团等。所述键合而成的基团可以直接键合,也可以经由连接基团键合。作为所述连接基团,例如可列举出:氨基、醚键、酯键、次膦酸基、硫醚键、羰基、有机基团取代酰胺基、有机基团取代氨基甲酸酯键、有机基团取代酰亚胺键、硫羰基、硅氧烷键、它们中的两个以上键合而成的基团等。

[0074] 所述式(1)中的带p的$[OC_3H_5]$为源自$[-O-CH_2-C(-)H-CH_2-]$所示的甘油的结构,与$[X^1C_3H_5]$一起形成聚甘油链。p表示$[OC_3H_5]$的重复单元,为1以上的整数,优选为3~2000,更优选为5~500,进一步优选为10~200。p在所述多个包含聚甘油链的基团中可以相同也可以不同。

[0075] 所述式(1)中,$[X^2R^1]$表示聚甘油链的末端,与$[X^1C_3H_5]$中的C或$[OC_3H_5]$中的C键合。R^1表示氢原子或一价有机基团。

[0076] 所述$[X^2R^1]$中的X^2表示单键或二价基团。作为所述二价基团,可列举出作为上述的$[X^1C_3H_5]$中的X^1而举例示出并说明的二价基团。此外,X^2中的R^a与R^1也可以键合而形成环。其中,X^2优选为$-NR^a-$、$-NR^aC(=O)-$、$-O-$、$-C(=O)O-$、$-O-C(=O)-$、$-PH(=O)O-$、$-O-P(=O)(OH)-O-$、$-S-$、$-O-S(=O)_2-O-$、$-O-S(=O)_2-$,更优选为$-NR^a-$或$-O-$。所述$[X^1C_3H_5]$中的X^1与所述$[X^2R^1]$中的X^2可以相同也可以不同。所述多个$[X^2R^1]$可以相同也可以不同。此外,所述$[X^2R^1]$中的X^2在所述多个包含聚甘油链的基团中可以相同也可以不同。q表示3以上的整数,其值依赖于p的值,满足$q=p+2$。q在上述多个包含聚甘油链的基团中可以相同也可以不同。

[0077] 在所述R^1为一价有机基团的情况下,所述式(1)中的多个R^1可以相同也可以不同。作为所述一价有机基团,可列举出作为所述R^a中的一价有机基团而举例示出并说明的基团。其中,可列举出:取代或未取代的烃基(一价烃基);取代或未取代的杂环式基团(一价杂环式基团);以及它们中的两个以上键合而成的基团等。此外,所述一价有机基团也可以具有离子的形态。

[0078] 所述键合而成的基团可以直接键合,也可以经由连接基团键合。所述取代或未取代的烃基中的烃基优选为烷基,更优选为碳原子数1~18的烷基,进一步优选为碳原子数1~6的烷基,特别优选为乙基、丙基、丁基、或己基。

[0079] 作为$[X^2R^1]$的具体例子,可列举出:OH、NH_2、CH_3、烷氧基、酰基、单或二烷基氨基、单或二烯基氨基、烷基酰胺基、烯基酰胺基、季铵取代烷氧基、氯代烷氧基、聚环氧烷基、环状酰亚胺基、羧基取代烷基氨基、羧基取代烷基氧基、包含硼原子的基团等。两个以上所述$[X^2R^1]$也可以经由R^1而形成环。其中,从表面修饰纳米粒子的水分散性更优异的观点、以及硼原子的引入容易的观点考虑,优选为环状酰亚胺基、羧基取代烷基氨基、包含硼原子的基团。

[0080] 所述聚甘油链中的甘油的数均聚合度为3~2000,更优选为5~500,进一步优选为10~200。若所述数均聚合度大,则纳米金刚石粒子等纳米碳材料间相互的回弹力充分发挥作用,能使纳米碳材料的分散性更进一步提高。若所述数均聚合度为5000以下,则能抑制在纳米金刚石粒子等纳米碳材料间聚甘油链彼此缠结,使水中的纳米碳材料的分散性进一步提高。需要说明的是,所述数均聚合度由与一个作为原料的纳米金刚石等纳米碳材料的表面官能团键合的基团中的构成聚甘油链的缩水甘油单元的数量来定义,所述表面官能团数

量可以通过所述原料的元素分析值测定或酸值的测定、或组合这两者进行测定来求出。

[0081] 作为所述聚甘油链,优选为所述聚甘油链中的羟基的一部分或全部被氨基取代而成的聚甘油链(以下,称为“氮取代聚甘油链”)。作为所述氮取代聚甘油链,可列举出所述式(1)所示的聚甘油链中的至少一部分的X^2为氨基的聚甘油链。

[0082] 所述氮取代聚甘油链中的所述氨基以表面修饰纳米粒子在血中的分散性提高(在血中不易凝聚)为目的,其至少一部分也可以被具有酸性官能团的化合物保护。作为这样的聚甘油链,可列举出在所述式(1)所示的聚甘油链中,至少一部分的X^2为氨基(-NR^a-)且至少一部分的R^a为保护基团的聚甘油链。作为所述酸性官能团,可列举出羧基、磺酰基等。作为包含所述酸性官能团的化合物,具体而言,可列举出:草酸、丙二酸、琥珀酸、戊二酸、以及己二酸等二羧酸;草酸酐、琥珀酸酐、马来酸酐、苯二甲酸酐、以及苯甲酸酐等酸酐;硫酸等具有磺酰基的化合物。其中,从形成酰胺键并且在末端具有羧基,表面修饰纳米粒子在血中的分散性更进一步提高的观点考虑,优选为酸酐。作为其他保护基团,可列举出:甲基、乙基、丙基等烷基;苄基、苯基等环烷基。

[0083] 所述表面修饰纳米粒子优选具有包含硼原子和亲水性聚合物链的基团作为表面修饰基团。在该情况下,所述硼原子优选经由所述亲水性聚合物链与纳米碳材料键合。此外,所述硼原子更优选经由芳香环与所述亲水性聚合物链键合。所述硼原子可以直接键合于所述芳香环,也可以经由其他连接基团键合,但优选直接键合,特别优选键合于构成所述芳香环的碳原子。所述芳香环可以仅具有一种,也可以具有两种以上。

[0084] 作为所述芳香环,可列举出芳香族烃环和芳香族杂环。作为所述烃环,可列举出苯环、萘环等C_{6-14}烃环(特别是C_{6-10}烃环)等。作为所述芳香族杂环,可列举出:在构成环的原子中具有碳原子和至少一种杂原子(例如氧原子、硫原子、氮原子等)的环、它们的稠环等。

[0085] 所述芳香环优选为4~10元环,更优选为6元环。作为6元环的芳香环,例如可列举出苯环、吡啶环等。

[0086] 所述芳香环可以具有取代基,也可以不具有取代基。作为所述取代基,例如可列举出:氟原子、氯原子、溴原子、碘原子等卤素原子;羟基;巯基;羧基;氨基;氧代基等。其中,作为所述取代基,优选具有氟原子等吸电子基团。所述吸电子基团在所述芳香环中,优选在相对于硼原子的键合位置的间位具有。需要说明的是,所述取代基相当于后述的式(2)中的R^3。

[0087] 所述芳香环优选经由键合于构成所述芳香环的碳原子的亚烷基氧基或亚烷基氨基与所述亲水性聚合物链键合。即,优选经由键合于构成所述芳香环的碳原子的亚烷基氧基或键合于构成所述芳香环的碳原子的亚烷基氨基与所述亲水性聚合物链键合。在该情况下,ND的分散性提高,因此存在生理学的条件下的稳定性优异的倾向。此外,所述亚烷基氧基中的氧原子利用所述聚甘油链中的氧原子,所述亚烷基氨基中的氮原子利用所述氮取代聚甘油链中的氮原子,能容易地制作所述表面修饰纳米粒子。

[0088] 作为所述亚烷基氧基和所述亚烷基氨基中的亚烷基,例如可列举出:亚甲基、亚乙基、亚丙基、以及三亚甲基等。从表面修饰纳米粒子的分散性提高的观点考虑,所述亚烷基优选为碳原子数1~6的亚烷基,更优选为碳原子数1~3的亚烷基,进一步优选为亚甲基。

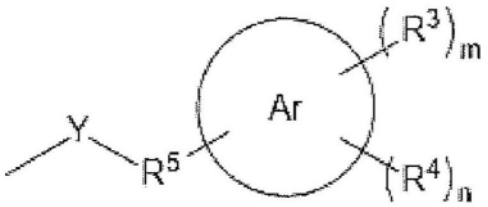
[0089] 所述亚烷基氨基中的氨基可以为仲氨基,也可以为叔氨基。在所述氨基为叔氨基的情况下,在所述氨基中的氮原子上具有所述亚烷基、所述亲水性聚合物链以及一价有机

基团。作为所述一价有机基团,可列举出烃基,其中,优选为烷基,更优选为碳原子数1～6的烷基,进一步优选为碳原子数1～3的烷基,特别优选为甲基。需要说明的是,所述一价有机基团相当于后述的式(2)中的R^5。

[0090] 所述硼原子和所述亚烷基氧基或所述亚烷基氨基优选分别键合于构成所述芳香环的碳原子中彼此邻接的碳原子。即,在所述芳香环中,所述亚烷基氧基或所述亚烷基氨基优选在相对于所述硼原子的键合位置的邻位具有。此外,在该情况下,所述吸电子基团优选在相对于所述硼原子的键合位置的、具有所述亚烷基氧基或所述亚烷基氨基一侧的间位具有。

[0091] 所述硼原子直接键合于构成所述芳香环的碳原子,使用下述式(2)所示的基团对所述芳香环经由键合于构成所述芳香环的碳原子的亚烷基氧基或亚烷基氨基与所述亲水性聚合物链键合的方案进行说明。

[0092] [化学式1]

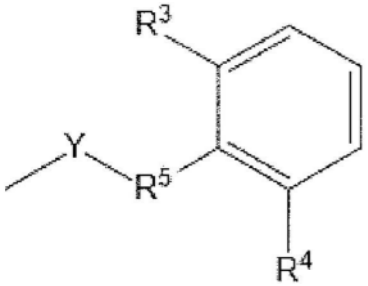
[0093] 

(2)

[0094] 式(2)中,Ar表示芳香环,R^3为所述芳香环所任选地具有的取代基,例如,优选为吸电子基团。m为0以上的整数。R^4为包含硼原子的基团,所述硼原子直接键合于构成所述芳香环的碳原子。n为1以上的整数。R^5表示亚烷基,所述亚烷基氧基和所述亚烷基氨基中的亚烷基为相同的基团。Y为氧原子、NH、或NR^6。R^6为一价有机基团。从Y向左伸出的键合键与亲水性聚合物链(优选为聚甘油链)键合。

[0095] 所述式(2)所示的基团特别优选为下述式(3)所示的基团。

[0096] [化学式2]

[0097] 

(3)

[0098] 式(3)中,R^3、R^4、R^5以及Y与式(2)中说明的含义相同。在式(3)中,示出了R^4的硼原子和亚烷基氧基或亚烷基氨基分别键合于构成芳香环的碳原子中彼此邻接的碳原子的方案。

[0099] 在所述包含硼原子的基团中,硼原子可以键合有氢原子、羟基、氨基、磺酸基、或一价有机基团、其他取代基。作为所述包含硼原子的基团,例如可列举出下述式(4)所示的基团。

[0100] $-B(-R^7)_2$ (4)

[0101] 式(4)中,R^7各自相同或不同,表示氢原子、羟基、氨基、磺酸基、或一价有机基团。此外,两个R^7任选地彼此键合而形成环(含烃环)。在两个R^7彼此键合而形成环的情况下,所

述环任选地经由氧原子而形成环。此外,构成所述环的碳任选地与相邻的碳原子形成双键。需要说明的是,构成所述环的碳原子数没有特别限定,例如,优选为4～12,更优选为4～10,进一步优选为4～6。

[0102] 作为所述一价有机基团,可列举出烃基,其中,优选为烷基,更优选为碳原子数1～6的烷基,进一步优选为碳原子数1～3的烷基,特别优选为甲基。

[0103] 作为所述式(3)所示的基团,具体而言,可列举出硼酸(-$B(OH)_2$)、硼烷(-BH_2)等R^7为氢原子或羟基的基团,特别优选为R^7为羟基的硼酸。即,在本公开的表面修饰纳米粒子中,硼原子优选以硼酸的形式被包含。

[0104] 本公开的表面修饰纳米粒子中的硼原子的含量没有特别限定,例如优选为0.1质量%以上,更优选为0.5质量%以上,进一步优选为1.0质量%以上,特别优选为1.5质量%以上。通过硼原子的含量在所述范围内,存在如下倾向:生理学的条件下的稳定性优异,能将硼原子选择性地送达至癌细胞内并且保持该硼原子。所述硼原子的含量例如为10.0质量%以下。

[0105] 所述硼原子也可以为^{10}B、^{11}B等任意种同位素,没有特别限定。其中,所述硼优选浓缩为^{10}B。

[0106] 本公开的表面修饰纳米粒子中的、ND与表面修饰基团的质量比[ND/本公开的表面修饰基团]没有特别限定,优选为0.2～1.5,更优选为0.2～1.0。若所述质量比为0.2以上,则不易损害作为纳米金刚石材料的特性。若所述质量比为1.5以下(特别是1.0以下),则表面修饰基团的修饰度变得充分,生理的条件下的分散性更优异。所述质量比基于通过硼取代基引入前的样品的热重分析测定的重量减少率,通过残存的ND的重量与如下值之比求出,该值是将减少的重量作为硼取代基引入前的含聚甘油链的表面修饰基团的质量,加上引入其中的硼取代基的重量而得到的。

[0107] 本公开的表面修饰纳米粒子的体积平均粒径(MV)例如为200nm以下,优选为100nm以下,更优选为60nm以下。表面修饰纳米粒子的平均粒径(MV)的下限例如为5nm。表面修饰纳米粒子的平均粒径可以通过动态光散射法来测定。

[0108] 本公开的表面修饰纳米粒子能用于肿瘤疾病的硼中子俘获疗法。

[0109] 作为本说明书中的“肿瘤疾病”,可列举出:恶性黑色素瘤(Melanoma)、肾癌、前列腺癌、乳腺癌、肺癌、胰腺癌、大肠癌、肝细胞癌、胆道癌、胃癌、卵巢癌、食道癌、尿路上皮癌、结肠癌、骨癌、皮肤癌(例如恶性皮肤癌)、头颈癌、直肠癌、肛门癌、睾丸癌、子宫癌、卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、小儿实体癌、膀胱癌、恶性胸膜间皮瘤、脑肿瘤(例如恶性脑肿瘤)、中枢神经系肿瘤等。

[0110] 使用所述表面修饰纳米粒子的硼中子俘获疗法例如通过如下方式进行:通过以化合物蓄积于目标部位的方式的任意适当的投给路径,对患有肿瘤疾病的哺乳动物(例如人)投给包含所述表面修饰纳米粒子的药剂。所述表面修饰纳米粒子优选选择性地蓄积于肿瘤。包含化合物的制剂可以一次性投给,或也可以依次投给。可以根据需要反复进行制剂的投给。

[0111] 所述表面修饰纳米粒子到达肿瘤内后,对该部位照射有效量的热中子束或超热中子束这样的低能量中子束。可以通过皮肤对其部位照射,或可以在照射前将该部位完全或

部分暴露来照射。可以根据需要反复进行所述表面修饰纳米粒子的投给和之后继续的热中子束或超热中子束的照射。

[0112] 所述表面修饰纳米粒子的投给路径优选为静脉内投给、动脉内投给、肌肉内投给、皮下投给、皮内投给、脊髓内投给、腹腔内投给。

[0113] 所述表面修饰纳米粒子可以在热中子束或超热中子束的照射前的72小时以内(优选为5分钟～48小时前,更优选为30分钟～30小时前)投给至患有肿瘤疾病的哺乳动物。此外,根据需要,也可以在热中子束或超热中子束的照射中投给。所述表面修饰纳米粒子的代表性的用量优选相对于每一次热中子束或超热中子束的照射为0.01mg～5000mg/体重kg的范围内。以硼-10(^{10}B)换算,优选相对于每一次热中子束或超热中子束的照射为0.005mg～1000mg/体重kg的范围内。一次热中子束或超热中子束的照射时间优选为1分钟～5小时,更优选为10分钟～2小时。热中子束或超热中子束的照射量没有特别限定,通常只要为在中子补捉疗法中使用的照射量即可。

[0114] 使用所述表面修饰纳米粒子的硼中子俘获疗法可以作为单独的治疗而应用,或也可以与以往的手术或化学疗法一起应用。若有期望,则也可以将肿瘤以外科上能去除的程度去除后,通过使用所述表面修饰纳米粒子的硼中子俘获疗法破坏剩余的肿瘤。

[0115] 包含所述表面修饰纳米粒子的组合物能用于硼中子俘获疗法。所述组合物可以保持该状态使用所述表面修饰纳米粒子作为有效成分,也可以加入医药上能允许的添加剂等进行制剂化。此外,如上所述,也可以包含如BPA、BSH这样的其他硼化合物。

[0116] 作为所述添加剂,没有特别限定,例如可列举出:纯化水、食盐水、磷酸缓冲液、D-葡萄糖(dextrose)、甘油、乙醇等医药上能允许的有机溶剂;动植物油、葡萄糖(glucose)、甘露糖、果糖、半乳糖、山梨糖醇、甘露糖醇、晶体纤维素、羟丙基纤维素、淀粉、玉米淀粉、硅酸酐、硅酸铝镁、胶原蛋白、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、羧基乙烯基聚合物、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸钠、海藻酸钠、水溶性右旋糖酐、羧甲基淀粉钠、果胶、甲基纤维素、乙基纤维素、黄原胶、阿拉伯树胶、黄蓍胶、酪蛋白、琼脂、聚乙二醇、二甘油、甘油、丙二醇、凡士林、石蜡、肉豆蔻酸辛基十二烷基酯、肉豆蔻酸异丙酯、高级醇、硬脂醇、硬脂酸、以及人血清血蛋白等。

[0117] 所述表面修饰纳米粒子可以与药学上允许的溶剂、赋形剂、结合剂、稳定化剂、分散剂等药学上允许的载体一起制剂化为注射用溶液、悬浮液、乳剂、膏剂、软膏剂、吸入剂、栓剂等非经口剂形。所述表面修饰纳米粒子优选制剂化为注射用溶液。

[0118] 注射用溶液可以在药学上能接受的溶剂中,以所述表面修饰纳米粒子的溶液的形式制造。它们的溶液此外也可以包含稳定化成分和/或缓冲化成分。此外,注射用溶液也可以为使用前加入适当的溶剂而使用的干燥制剂。

[0119] [表面修饰纳米粒子的制造方法]

[0120] 本公开的表面修饰纳米粒子可以通过使纳米碳材料(例如ND粒子)、亲水性聚合物以及含硼的化合物反应来制造。亲水性聚合物和含硼的化合物与纳米碳材料的反应可以同时进行也可以分别进行。例如,可以使纳米碳材料与亲水性聚合物反应后,使所得到的反应产物与含硼的化合物反应,也可以使纳米碳材料与含硼的化合物反应后,使所得到的反应产物与亲水性聚合物反应。此外,也可以使纳米碳材料、亲水性聚合物、以及含硼的化合物一次性反应。其中,从能容易得到作为目标的表面修饰纳米粒子的观点考虑,优选使纳米碳

材料与亲水性聚合物反应后,使所得到的反应产物与含硼的化合物反应。

[0121] 作为所述含硼的化合物没有特别限定,例如,根据引入硼原子的方案来适当选择,例如可列举出与所述式(4)所示的基团对应的化合物,具体而言,下述式(5)所示的化合物。

[0122] R^8-B(-R^7)$_2$(5)

[0123] 式(5)中,R^7与式(4)所示的基团相同。R^8表示氢原子或一价有机基团。

[0124] 作为所述一价有机基团,可列举出上述的基团。其中,优选具有芳香环。从制造的容易性和生理学的条件下的稳定性的观点考虑,所述含硼的化合物优选为2-甲酰基苯硼酸(邻硼苯甲醛)。

[0125] 所述亲水性聚合物只要是包含源自具有亲水性基团的单体的结构单元的聚合物就没有特别限定,例如可列举出:聚醚(聚氧乙烯、聚氧丙烯、它们的共聚物等)、聚甘油($C_3H_6O(CH_2CH(OH)CH_2O)n$-H等)等。需要说明的是,所述聚甘油可以为羟基的一部分或全部被氨基取代而成的聚甘油。

[0126] 亲水性聚合物和含硼的化合物分别可以仅使用一种,也可以使用两种以上。

[0127] 纳米碳材料与亲水性聚合物的反应没有特别限定,可以通过公知惯用的方法来实施。以将聚甘油用作亲水性聚合物的情况为例子,以下具体地进行说明。

[0128] 利用聚甘油的纳米碳材料的表面修饰方法没有特别限定,例如,可以通过使缩水甘油与纳米碳材料进行开环聚合来得到。当以ND粒子作为纳米碳材料为例子进行说明时,ND粒子在其制造过程中天生在粒子表面具有羧基、羟基等,因此通过使这些官能团与缩水甘油反应,能利用聚甘油链修饰ND粒子表面。

[0129] ND粒子与缩水甘油的反应(开环聚合)例如可以通过在惰性气体气氛下向ND粒子中添加缩水甘油和溶剂,加热到50℃～150℃来进行。作为溶剂,例如可以使用碳原子数2～4的脂肪族醇溶剂。作为所述碳原子数2～4的脂肪族醇溶剂,可以使用国际公开号WO2021/039521A1中记载的溶剂。

[0130] 反应也可以使用催化剂。作为催化剂,可以使用酸性催化剂也可以使用碱性催化剂。作为酸性催化剂,可列举出:三氟化硼乙醚、乙酸、磷酸等。作为碱性催化剂,可列举出:三乙胺、吡啶、二甲基氨基吡啶、三苯基膦等。

[0131] 关于缩水甘油的开环聚合条件,可以适当参照S.R.Sandler等的J.Polym.Sci.,Polym.Chem.Ed.,Vol.4,1253(1966)、E.J.Vanderberg的J.Polym.Sci.,Polym.Chem.Ed.,vol.23,915(1985),此外G.R.Newcome等的Dendritic Macromolecules:Concepts,Syntheses,Perspectives,VCH,Weinheim(1996)等。

[0132] 此外,由聚甘油链进行了表面修饰的ND粒子也可以通过使缩水甘油与表面引入了包含活性氢的官能团的ND粒子开环聚合而得到。作为包含活性氢的官能团没有特别限定,例如可列举出:氨基、羟基、羧基、巯基(硫醇基)、次膦酸基等。作为向ND粒子引入所述包含活性氢的官能团的方法,可以参照日本特开2012-82103号公报、日本特开2010-248023号公报等。缩水甘油与所述表面引入了包含活性氢的官能团的ND粒子的开环聚合可以与上述的缩水甘油与ND粒子的开环聚合同样地进行。

[0133] 纳米碳材料与含硼的化合物的反应没有特别限定,可以通过公知惯用的方法来实施。当以ND粒子作为纳米碳材料为例子进行说明时,与使作为亲水性聚合物的聚甘油与ND粒子反应的情况同样地,可以通过使在ND粒子的表面存在的羧基、羟基等官能团与含硼的

化合物反应来引入包含硼原子的基团。

[0134] 在本公开的表面修饰纳米粒子通过使ND粒子与亲水性聚合物反应后,使所得到的反应产物与含硼的化合物反应而得到的方法来制造的情况下,含硼的化合物可以与所述反应产物中的亲水性聚合物链反应,也可以与在ND粒子的表面存在的官能团反应。在前者的反应的情况下,本公开的表面修饰纳米粒子具有经由亲水性聚合物链键合有硼原子的表面修饰基团,在后者的反应的情况下,本公开的表面修饰纳米粒子在ND粒子表面上具有包含硼原子的基团作为表面修饰基团。

[0135] 关于使ND粒子与亲水性聚合物反应后,使所得到的反应产物与含硼的化合物反应而得到的方法,以将聚甘油用作亲水性聚合物的情况为例子在以下进行说明。

[0136] 关于利用聚甘油进行的ND粒子的表面修饰方法如上所述。在所得到的ND粒子与含硼的化合物的反应中,以其反应性提高为目的,也可以使聚甘油链的末端氧原子取代为氮原子。此外,为了避免本公开的表面修饰纳米粒子的凝聚,也可以在与含硼的化合物的反应后用保护基团保护所述氮原子。作为所述保护基团,例如可列举出源自上述的具有酸性官能团的化合物的基团,具体而言,可列举出:甲基、琥珀酰基、硫酸基、磷酸基等。

[0137] 需要说明的是,作为表面修饰前的ND粒子,对其制造法没有特别限定,例如,可以使用爆轰法ND(即,通过爆轰法生成的ND,有时称为“DND”)、高温高压法ND(即,通过高温高压法生成的ND)、化学气相生长法ND(利用CVD法将金刚石薄膜粉碎而成的ND)等。其中,在分散介质中的分散性更优异的方面考虑,即,在一次粒子的粒径为一位数的纳米的方面考虑,优选为爆轰法ND。

[0138] 表面修饰前的ND粒子的平均粒径没有特别限定,例如为100nm以下,优选为50nm以下,更优选为30nm以下,特别优选为10nm以下。表面修饰前的ND粒子的平均粒径的下限例如为0.1nm。表面修饰纳米粒子的平均粒径可以通过动态光散射法来测定。

[0139] 本说明书所公开的各种方案可以与本说明书所公开的其他任何特征组合。各实施方式中的各构成及其组合等是一个例子,可以在不脱离本公开的主旨的范围内适当进行构成的附加、省略、置换以及其他变更。此外,本公开的各发明不由实施方式、以下实施例限定,仅由专利权利要求限定。

[0140] 实施例

[0141] 以下,基于实施例对本公开更详细地进行说明,本公开并不受实施例限定。

[0142] 经过下述工序制造出表面修饰ND。

[0143] (爆轰法ND,“DND”的制作)

[0144] 将成型后的炸药装接有电雷管而成的物体设置于爆轰用的耐压性容器的内部,将容器密闭。容器为铁制,容器的容积为15m^3。作为炸药,使用了TNT与RDX的混合物0.50kg。该炸药中的TNT与RDX的质量比(TNT/RDX)为50/50。接着,使电雷管起爆,在容器内使炸药爆轰(基于爆轰法的ND、DND的生成)。接着,通过在室温下放置24小时,使容器及其内部降温。在该放冷之后,进行用刮刀刮取附着于容器的内壁的DND粗产物(包含DND粒子的聚集体和煤)的作业,回收了DND粗产物。

[0145] 对通过多次进行上述的工序而得到的DND粗产物进行了酸处理工序。具体而言,向DND粗产物200g中加入6L的10质量%盐酸而得到浆料,对该浆料在常压条件下的回流下进行了1小时的加热处理。该酸处理中的加热温度为85℃~100℃。接着,冷却后,通过倾析进

行了固体成分(包含DND聚集体和煤)的水洗。反复进行了基于倾析的所述固体成分的水洗,直到沉淀液的pH从低pH侧到2为止。

[0146] 接着,进行了氧化处理工序。具体而言,向经过酸处理后的倾析而得到的沉淀液(包含DND聚集体)中加入6L的98质量%硫酸和1L的69质量%硝酸而制成浆料后,对该浆料在常压条件下的回流下进行了48小时的加热处理。该氧化处理中的加热温度为140℃~160℃。接着,冷却后,通过倾析,进行了固体成分(包含DND聚集体)的水洗。水洗最初的上清液被着色,但反复进行了基于倾析的所述固体成分的水洗,直到上清液通过目视观察变得透明。

[0147] 接着,对经过上述的水洗处理而得到的沉淀液(含有DND聚集体的液体)进行干燥工序,得到了干燥粉体(DND聚集体)。作为干燥工序中的干燥处理的方法,采用了使用蒸发器进行的蒸干。

[0148] 接着,关于经过上述的干燥工序而得到的干燥粉体(DND聚集体)4.5g,静置于气氛炉(商品名“气氛管式炉KTF045N1”,Koyo ThermoSystem株式会社制)的炉心管内,在炉心管内以流速1L/分钟持续流通30分钟氮气后,将流通气体从氮气向氧气与氮气的混合气体切换,在炉心管内以流速1L/分钟持续流通所述混合气体。混合气体中的氧气浓度为4体积%。在向混合气体切换之后,使炉内升温到加热设定温度即400℃。关于升温速度,从比加热设定温度低20℃到380℃设为10℃/分钟,之后的380℃到400℃设为1℃/分钟。然后,将炉内的温度条件维持为400℃,并且对炉内的DND粉体进行了氧气氧化处理。处理时间设为3小时。

[0149] 接着,继续使用上述的气氛炉进行了氢化工序。具体而言,在内部配置有经过氧气氧化工序的DND粉体的气氛炉中以流速1L/分钟持续流通30分钟氮气后,将流通气体从氮气向氢气与氮气的混合气体切换,在炉心管内以流速1L/分钟持续流通所述混合气体。混合气体中的氢气浓度为2体积%。向混合气体切换后,使炉内升温到加热设定温度600℃。升温速度设为10℃/分钟。然后,将炉内的温度条件维持为600℃,并且对炉内的DND粉体进行了氢化处理。处理时间设为5小时。如上所述,得到了经过氢化处理的DND粉体。

[0150] 接着,进行了破碎工序。具体而言,首先,将经过上述的氢化工序的DND粉体0.9g和纯水29.1ml加入50ml的样品瓶中并混合,得到了浆料约30ml。使用1当量的盐酸将pH调整为4后,对所述浆料实施了超声波处理。在超声波处理中,使用超声波照射器(商品名“超声波清洗机AS-3”,ASONE公司制),对所述浆料进行了2小时的超声波照射。然后,使用珠磨装置(商品名“并联四筒式砂磨机LSG-4U-2L型”,IMEX株式会社制)进行了珠磨。具体而言,向100ml的作为研磨容器的容器瓶(IMEX株式会社制)中投入超声波照射后的浆料30ml和直径30μm的氧化锆珠并封入,驱动装置而执行了珠磨。在该珠磨中,氧化锆珠的投入量相对于研磨容器的容积例如为33体积%,研磨容器的旋转速度为2570rpm,研磨时间为2小时。

[0151] 接着,对经过了如上所述的破碎工序的浆料使用离心分离装置进行了离心分离处理(分级操作)。该离心分离处理中的离心力设为20000×g,离心时间设为10分钟。接着,回收了经过所述离心分离处理的含DND的溶液的上清液10ml。如此,得到了纳米碳材料分散于纯水中的DND分散液。关于该纳米碳材料分散液,固体成分浓度为2.1质量%,pH为5.40。如上所述得到的DND分散液的中位径(粒径D50)为35.8nm。

[0152] (由聚甘油进行了表面修饰而成的DND,“DND-PG”的制作)

[0153] 对于经过上述的破碎工序而得到的DND粒子水分散液,使用蒸发器将DND的水性分

散液浓缩为固体残留物,在105℃下干燥2小时。使所得到的DND粉末(1.0g)悬浮于乙二醇(15.0g)中,花费105分钟滴加缩水甘油(45.1g,0.61mol),将温度维持为95℃～102℃的范围。将所得到的黑色的分散液在相同温度下搅拌4小时,接着在室温下搅拌一晚。慢慢加入水(40mL),将未反应的缩水甘油分解,之后用水将分散液稀释为400mL。之后,用超滤膜(Ultracel membrane,30kDa)浓缩为20mL。将浓缩物稀释,再次浓缩,反复进行该操作五次由此进行清洗,以黑色水分散液的形式得到了纯化后的DND-PG。产量为100.1g(DND-PG的含量为5.08质量%,5.08g)。使分散液的一部分在加热后的PTFE片上干燥,得到了分析用的样品。以下示出各分析结果。

[0154] FT-IR(扩散反射法,cm^{-1}):3332,2918,2875,1458,1118,1078(C-O)。

[0155] ^{1}H-NMR(500MHz,D_2O):δppm3.42,3.50,3.58,3.75,3.88(C3单元)。

[0156] 元素分析:C;55.72%,H;7.06%,N;0.57%,O;36.86%。

[0157] TGA(空气气氛下,20℃/分钟,%重量损失):383-541℃;75.4%,541-790℃;18.6%(比率(PG/DND)推定为4.1)。

[0158] 所得到的DND-PG分别如图1和图2所示,利用FT-IR和溶液中的^{1}H-NMR确认了其结构。在FT-IR光谱中,观察到3333cm^{-1}处的基于O-H的伸缩的吸收,2918cm^{-1}和2876cm^{-1}处的C-H不对称和对称伸缩,1118cm^{-1}和1078cm^{-1}处的PG链的C-O-C不对称和C-O伸缩。在^{1}H-NMR中,3ppm～4ppm的信号表示PG链上的全部氢原子处于与羟基、醚键等氧官能团邻接的碳上。

[0159] (DND-PG-OTs的制作)

[0160] 使DND-PG的水分散液39.4g(DND-PG的含量为5.08质量%,2.0g)蒸干。使残留物溶解于吡啶(20mL)中,蒸干,通过共沸蒸馏去除残留的水分。反复进行一次该操作后,将残留物溶解于吡啶(30mL)中,进行了冰冷。向该溶液中加入对甲苯磺酰氯(Ts-Cl,3.9g,202mmol)和N,N-二甲基氨基吡啶(DMAP,0.10g,0.84mmol)。将反应混合物在室温下搅拌24小时。加入水(30mL),通过以30000g进行10分钟的离心分离,分离出沉淀物。用包含少量四氢呋喃(THF)的水对沉淀物进行两次清洗,进行了离心分离。通过相同的方法用THF-甲苯进行了两次清洗。在40℃下对沉淀物进行真空干燥,得到了黑色的固体。产量为3.91g。以下示出各分析结果。

[0161] FT-IR(扩散反射法,cm^{-1}):3342,2920,2878,1597,1362,1177(SO2),929,815,667,553。

[0162] ^{1}H-NMR(500MHz,$CDCl_3$):δppm3.39-4.61(C3单元),2.31(-OT的CH_3),7.24,7.67(-OT的芳香环)。

[0163] 元素分析:C;55.88%,H:5.30%,N;0.32%,O;27.20%,S;10.50%。

[0164] 在所得到的DND-PG-OTs中,在FT-IR中确认到基于磺酸酯的SO_2的不对称和对称伸缩振动的、1362cm^{-1}和1177cm^{-1}的峰(图3)。在^{1}H-NMR中,观察到7.67ppm和7.24ppm的苯环以及2.31ppm的甲基的信号(图4)。(DND-PG-NH_2·HCl的制作)

[0165] 接着,用叠氮基取代甲苯磺酰基,将所得到的DND-PG-N_3通过利用三苯基膦(PPh_3)的施陶丁格反应(Staudinger reaction)还原为氨基,得到了DND-PG-NH_2·HCl。通过FT-IR(图5和图7)、^{1}H-NMR(图6和图8)、以及元素分析确认了DND-PG-N_3和DND-PG-NH_2·HCl各自的结构和各官能团的引入量。以下对具体的操作进行说明。

[0166] 将叠氮化钠(NaN_3,0.66g,10.2mmol)加入DMF(20mL)中的DND-PG-OTs(2.0g)的溶

液中。将反应物在60℃下搅拌3小时,接着在90℃下搅拌19小时。加入水(20mL),通过以30000g进行10分钟的离心分离,分离出沉淀物。用包含少量THF的水对沉淀物进行两次清洗,进行了离心分离。通过相同的方法用THF-甲苯进行了两次清洗。在40℃下对沉淀物进行真空干燥,得到了黑色的固体。产量为0.67g。以下示出各分析结果。

[0167] FTIR(扩散反射法,cm^{-1}):3338,2916,2872,2102(叠氮基),1276,1120。

[0168] ^{1}H—NMR(DMSO-d6):δppm3.54(C3单元)。

[0169] 元素分析:C;53.59%,H:5.04%,N;19.40%,O;21.68%。

[0170] TGA(空气气氛,20℃/分钟,%重量损失):230-587℃;71.2%,587-794℃;25.9%。

[0171] 接着,将DND-PG-N_3(257mg)溶解于DMF(12mL)中,进行了15分钟超声波处理。向分散液中加入水(1.0mL)、三苯基膦(PPh_3,798mg,3.00mmol)以及浓氨水(0.50mL),在60℃下搅拌24小时。将反应混合物浓缩为一半体积。加入水(10mL)和6M HCl(1.0mL)后,用乙酸乙酯(AcOEt,20mL)萃取三苯基氧化膦。水相进一步用AcOEt进行两次清洗,接着用水稀释为400mL,用超滤膜(Ultracel膜,30kDa)浓缩为小于10mL。将浓缩物再次稀释和浓缩,反复进行该操作两次,以黑至暗褐色的水分散液的形式到了经纯化的DND-PG-NH_2 HCl。为了进行分析,使分散液的一部分在加热后的PTFE片上干燥。产量为265mg。以下示出各分析结果。

[0172] FT-IR(使用KBr的漂移,cm^{-1}):3018,2922,1601,1506(-NH_2),1101。

[0173] ^{1}H-NMR(0.1M DCl):δppm3.07,3.30,3.60(C3单元)。

[0174] 元素分析:C;49.16%,H;6.69%,N;6.55%,Cl;13.49%。

[0175] TGA(空气气氛,20℃/分钟,%重量损失):90-568℃;72.1%,568-800℃;26.7%。

[0176] (DND-PG-PBA的制作)

[0177] DND-PG-PBA通过2-甲酰基苯硼酸-^{10}B(邻硼苯甲醛-^{10}B)对DND-PG-NH_2的还原性氨基化而引入。

[0178] •硼酸三异丙酯-^{10}B的制作

[0179] 将硼酸-^{10}B(1.0g,16.4mmol)加入2-丙醇(10mL)与环已烷(30mL)的混合物中,搅拌30分钟,接着进行了10分钟加热回流。装配Dean-Stark装置(预先将环已烷填充于接受器中),一边通过共沸蒸馏去除水和2-丙醇,一边回流6小时直到蒸气温度到达80℃。去除溶剂,不将残留物(3.46g)进一步纯化而用于接下来的反应。

[0180] •2-甲酰基苯硼酸-^{10}B的制作

[0181] 在氮气氛下将2-(2-溴苯基)-1,3-二氧戊环(1.30g,5.7mmol)溶解于无水二乙基醚(10mL)中,冷却到-78℃。慢慢加入正丁基锂的正已烷溶液(1.6M,3.9mL,6.24mmol),在-78℃下搅拌1小时。向-78℃的锂盐的悬浮液中添加硼酸三异丙酯-^{10}B(粗产物1.69g,由硼酸-^{10}B 8.2mmol制备),在-60℃以下搅拌3小时,接着在室温下彻夜搅拌。添加水(20mL)、甲基叔丁基醚(MTBE,20mL)以及2.5M(10质量%)NaOH(5.0mL),进行了分液。用MTBE对水相进行了两次清洗后,用6M HCl(5.0mL)进行酸性化,用MTBE萃取析出的油状物三次,用无水$MgSO_4$干燥合并后的有机相。滤出$MgSO_4$后,进行了减压浓缩。将粗产物从MTBE和正已烷再结晶化,得到了外白色的结晶性粉末。产量为0.50g(59质量%)。以下示出各分析结果。

[0182] FT-IR(扩散反射法,cm^{-1}):3346,3072,1670,1490,1463,1427,1384(^{10}B-O),1195,858,765,748,648。

[0183] ^{1}H-NMR(甲醇-d4):6.00~7.42~7.47~7.59~7.67~7.92~9.96(两种互变异生

体的混合物)。

[0184] ESI-MS(负,m/z):Anal.148.08818(M-H⁻);Calc.$C_7H_6BO_3$ 148.0441。

[0185] 使DND-PG-NH_2和2-甲酰基苯硼酸-^{10}B在甲醇中反应,形成对应的亚胺,接着进行用$NaBH_4$还原的一锅法反应。具有浓缩为^{10}B的硼酸基的2-甲酰基苯硼酸-^{10}B能从市售的^{10}B硼酸经由它的三异丙酯容易地合成。所得到的产物(DND-PG-PBA)中的PBA结构的存在通过FT-IR光谱中的与1,2-二取代苯环的BO伸缩和面外弯曲对应的1352cm^{-1}和754cm^{-1}的吸收进行了确认(图9)。在^{1}H-NMR中,观察到7.50ppm和7.20ppm的源自苯环的信号、4.05ppm的源自PBA的苄基位质子的信号(图10)。(DND-PG-PBA的制作)

[0186] 将DND-PG-NH_2 HCl的水分散液(净重108mg)在减压下蒸干。使残留物分散于甲醇中后,加入乙醇,使其蒸干。向残留物中加入甲醇(10mL),进行了30分钟超声波处理。加入2-甲酰基苯硼酸-^{10}B(50.4mg,0.34mmol)、三乙胺(145mg,1.43mmol)以及无水硫酸镁($MgSO_4$,254mg),在60℃下搅拌19小时。将反应混合物在冰浴中冷却到0℃,用2小时分两次加入氢化硼钠($NaBH_4$,119mg,3.20mmol),接着在60℃下搅拌6小时。将反应混合物浓缩,去除甲醇,加入水(10mL)和6M HCl(5.0mL)。通过以30000g进行20分钟的离心分离,分离沉淀物,然后再次溶解于水(8mL)中。加入6M HCl(2.0mL)后,将混合物在100℃下搅拌2.5小时。通过超滤(AmiconUltra,10kDa,3300rpm,30分钟)浓缩反应混合物,通过稀释,用水对膜上的材料进行清洗,接着进行了四次进行超滤的操作。用水将过滤器上的浓缩物稀释后(稀释后6.0g),将pH调整为7.4。之后进一步进行四次基于超滤的清洗。为了制备分析样品,将所得到的分散液冻结干燥,以灰白色的粉末的形式得到了DND-PG-PBA。产量为104mg(净重)。以下示出各分析结果。

[0187] FT-IR(扩散反射法,cm^{-1}):3224,2910,2873,1448(B-N),1352(B-O),1107,754(1,2-2取代苯)。

[0188] ^{1}H-NMR(0.1M DCl):δppm7.50,7.20(PBA的芳香环),4.05,3.41(PBA和C3单元的苄基位)。

[0189] 元素分析:C;60.11%,H:6.14%,N;5.51%。

[0190] 根据元素分析的结果计算出,由DND-PG-NH_2·HCl(NH_2基含量:4.22mmol/g)与2-甲酰基苯硼酸-^{10}B(相对于DND-PG-NH_2·HCl 1g为3.15mmol)的反应而得到的DND-PG-PBA中的、PBA基的引入量为2.24mmol/g(表1)。

[0191] [表1]

[0192] 基于氮含量变化的PBA量

[0193]

	DND-PG-NH_2·HCl	DND-PG-PBA
基于 EA[a] 的碳含量(wt%)	49.10	60.11
基于 EA 的氮含量(wt%)	6.55	5.51
源自 DND-PG-NH_2·HCl 的碳(wt%)	49.10	41.30[b]
源自 PBA 部分的碳(wt%)		18.81
PBA 的量(mmol/g)		2.24
PBA 的量(g/g)		0.300
氨基含量(mmol/g)	4.22	3.55
未反应氨基(mmol/g)		1.31

[0194] [a]元素分析

[0195] [b]按照“DND-PG-NH_2·HCl中的C”/“DND-PG-NH_2·HCl中的N”×“DND-PG-PBA中的N”计算

[0196] DND-PG-PBA在磷酸缓冲生理盐水(PBS)中以50mg/mL示出分散性。这样的高分散性可认为由邻位的氨基甲基的氮原子与硼酸部分的硼原子配位而提供五元环的“Wulff型PBA”引起。即,可认为苯硼酸和氨基甲基获得满足Wulff模式的各种五元环结构,因此pKa变小(即,与水的亲和性上升),分散性变高。

[0197] (DND-PG-PBA-Suc、DND-PG-PBA-SucMe的制作)

[0198] 分别通过琥珀酰基化和甲基化将氨基转换为酰胺和甲基氨基。一部分仲氨基为了能制成Wulff型配位而有目的性地不进行琥珀酰基化,之后进行了甲基化。相对于1g的DND-PG-PBA使用了约2mmol的琥珀酸酐。然后,其余的仲氨基通过利用甲醛的还原性氨基化进行了甲基化。

[0199] ·DND-PG-PBA-Suc的制作

[0200] 向DND-PG-PBA的水分散液21g(DND-PG-PBA的含量180mg,pH3.59)中,将琥珀酸酐(39.1mg,0.390mmol)一边使用1M NaOH将pH调整为8.0~9.5,一边用2小时分多次添加。之后,将反应混合物在pH8.4下,在室温下搅拌一晚。进行五次将反应混合物的一部分(24.0g中的6.0g)用水稀释,进行超滤的操作,由此进行清洗,得到了部分琥珀酰基化的物质。产量为45.1mg。作为反应液整体为180mg。以下示出各分析结果。

[0201] FT-IR(扩散反射法,cm^{-1}):3275,2916,2874,1654(酰胺C=O),1570,1448,1394,1363,1112,754。

[0202] ^{1}H-NMR(0.1M DCl):δppm7.57,7.25(PBA的芳香环),4.08,3.34(PBA和C3单元的苄基位),2.35(琥珀酰基)。

[0203] 元素分析:C;57.62%,H:6.27%,N;5.77%。

[0204] ·DND-PG-PBA-SucMe的制作

[0205] 对DND-PG-PBA-Suc的反应混合物的一部分(24.0g中的18.0g,包含135mg的DND-PG-PBASuc)进行了冰冷。加入甲醛溶液(HCHO,36%,0.80mL)和$NaBH_4$(136.3mg,3.67mmol)后,将反应混合物在室温下搅拌一晚。一边注意发泡一边加入6M HCl(3.0mL),之后将混合物在80℃下搅拌2小时。用水稀释,通过超滤进行了清洗后,用1M NaOH将pH调整为约7.0。将少量的琥珀酸酐(合计7.6mg)分多次加入,确认到在pH为6.9以上能分散。将pH调整为7.4,将所得到的溶液通过超滤(Ultracelmembrane,30kDa和AmiconUltra,10kDa)进行多次清洗。产量为135mg。以下示出各分析结果。

[0206] FT-IR(扩散反射法,cm^{-1}):3280,2926,2878,1653,1568,1446,1394,1362,1109,756。

[0207] ^{1}H-NMR(0.1M DCl):δppm7.56,7.25(PBA),4.08,3.34(PBA和C3单元的苄基位),2.67(N-CH_3),2.33(琥珀酰基(-CH_2CH_2-))。

[0208] 元素分析:C;56.60%,H;6.36%,N;5.83%。硼含量(ICP-AES):1.85%。

[0209] (DND-PG-FPBA、DND-PG-FPBA-Suc以及DND-PG-FPBA-SucMe的制作)

[0210] 使用FPBA代替PBA,除此以外,与DND-PG-PBA等的制作方法同样地制作出DND-PG-FPBA、DND-PG-FPBA-Suc、以及DND-PG-FPBA-SucMe。对于生物实验用的样品,通过超滤将溶

液浓缩,根据需要用水稀释,通过0.45μm的膜进行了过滤。接着,追加10xPBS(-)或PBS(-),制作出目标浓度和等渗压性。

[0211] (2-甲酰基-3-氟苯硼酸-^{10}B,"FPBA"的制作)

[0212] 将2-溴-6-氟苯甲醛(0.93g,4.6mmol)溶解于甲醇(10mL)中,加入原甲酸三甲酯(1.56g,14.7mmol)、对甲苯磺酸一水合物(23.7mg,0.12mmol),进行了2小时加热回流。减压馏去甲醇,向残渣加入甲苯和饱和$NaHCO_3$水溶液,进行了分液。用饱和盐水对有机层进行了清洗后,用无水$MgSO_4$干燥。过滤去除干燥剂,将滤液减压浓缩。所得到的无色的液体(1.18g)不进行进一步纯化而用于接下来的操作。将所述2-溴-6-氟苯甲醛二甲基缩醛(1.18g)在氮气氛下溶解于无水二乙基醚(10mL)中,冷却到-78℃。慢慢加入正丁基锂的正己烷溶液(1.6M,3.75mL,6.0mmol),在-78℃下搅拌1小时。向-78℃的锂盐的悬浮液中添加硼酸三异丙酯-^{10}B(粗产物1.69g,由硼酸-^{10}B 8.2mmol制备),在-60℃以下搅拌1小时,接着在室温下搅拌4小时。添加水(20mL)、甲基叔丁基醚(MTBE,20mL)以及2.5M(10质量%)NaOH(5.0mL),进行了分液。用MTBE对水相进行了两次清洗后,用6M HCl(5.0mL)进行酸性化,用MTBE萃取析出的油状物三次,用无水$MgSO_4$干燥合并后的有机相。滤出$MgSO_4$后,进行了减压浓缩。向残渣(0.73g)加入THF(5mL)、水(5mL)、对甲苯磺酸一水合物(45.2mg,0.24mmol),在室温下彻夜搅拌。减压馏去THF,向残渣加入MTBE,进行了分液。将有机层用饱和盐水清洗两次,用无水$MgSO_4$进行了干燥。滤出$MgSO_4$后,进行了减压浓缩。将粗产物从MTBE和正己烷再结晶化,得到了外白色的结晶性粉末。产量为0.29g(38%)。以下示出各分析结果。

[0213] ^{1}H-NMR($CDCl_3$):6.96(2H,B-(OH)2),7.70(1H),7.99(1H),7.28(1H),10.46(1H,CHO)。

[0214] ESI-MS(负,m/z):Anal.166.07884(M-H-);Calc.$C_7H_5BFO_3$ 167.04。

[0215] 从DND到DND-PG-PBA-SucMe的反应方案如图22和图23所示。

[0216] 在DND-PG-PBA-Suc的FT-IR(图11)中,分别在1653cm^{-1}和1568cm^{-1}观察到酰胺和羧酸酯(-COO-)的C=O伸缩振动的峰。在^{1}H NMR光谱(图12)中,2.34ppm的信号归属于琥珀酰基部分(-CH_2CH_2-)的氢。图13和图14是甲基化后的DND-PG-PBA-SucMe的FT-IR和^{1}H NMR。在DND-PG-PBA-SucMe中,在^{1}H NMR的与甲基对应的2.67ppm处出现新的信号。琥珀酰基和甲基的担载量根据^{1}H NMR的积分值推定出。DND-PG-PBA-Suc的琥珀酰基为1.20mmol/g,DND-PG-PBA-SucMe的琥珀酰基和甲基分别为1.17mmol/g和1.20mmol/g。基于ICP-AES的DND-PG-PBA-SucMe的硼含量为1.85质量%。需要说明的是,根据PBA基的含量而确定的硼含量为2.06质量%。表2总结了各物质中的各官能团的量。

[0217] [表2]

[0218] DND-PG衍生物中的官能团含量

[0219]

	官能团含量(mmol/g)						硼含量[a]
	OTs	N_3	NH_2	PBA	琥珀酰基	甲基	(%)
DND-PG-OTs	3.28						
DND-PG-N_3		4.45					
DND-PG-NH_2 · HCl			4.22				
DND－PG－PBA			1.31	2.24			2.42
DND-PG-PBA-Suc				1.97	1.20		2.13
DND-PG-PBA-SucMe				1.91	1.17	1.20	2.06 (1.85[b])

[a]计算值来自 PBA 部分的摩尔比

[b]结果来自 ICP-AES.

[0220] [细胞毒性评价]

[0221] 对DND-PG-PBA-Suc、DND-PG-PBA-SucMe、以及DND-PG-FPBA-SucMe的细胞毒性进行了评价(图15)。肿瘤模型使用了CT26小鼠结肠肿瘤细胞。无论哪个表面修饰DND粒子,即使为较高浓度(500μg/mL)都没有示出毒性。需要说明的是,具体的操作如以下所述。

[0222] 将使CT26小鼠结肠肿瘤细胞悬浮于RPMI 1640培养基(包含10体积%FBS(牛胎儿血清)和1体积%的100x青霉素-链霉素-两性霉素B溶液)而成的物质以各孔4×10^3细胞(160μL)播种于96孔微孔板。在CO_2培育箱内,在37℃下培养了24小时后,更换一次培养基,向其中添加纳米粒子的PBS或PBS溶液(4、20、100、500μg/mL各40μL)。培育了24小时后,更换培养基,进一步培育48小时。用PBS对细胞进行清洗后,加入培养液中的CCK-8(2-(2-甲氧基-4-硝基苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2,4-二磺基苯基)-2H-四氮唑单钠盐(WST-8)与1-甲氧基-5-甲基酚嗪硫酸甲酯盐(1-methoxy PMS)的混合溶液,同人化学(株),向各孔中加入10μL的CCK-8和100μL的培养基)。1.5小时后,使用酶标仪(microplate reader)测定出各孔的450nm下的吸光度。

[0223] [药代动力学评价]

[0224] 为了确定中子照射前的药物注射的时刻,进行了药代动力学评价。样品注射时没有观察到小鼠的急性症状。将药代动力学的结果示于图16。具体的操作如以下所述。

[0225] 饲养了BALB/c小鼠(雌,6周龄)。在样品注射的一周前,将CT26肿瘤细胞移植到BALB/c小鼠(雌,6周龄)的右大腿部的皮下(各小鼠1×10^6个细胞)。对小鼠静脉内注射PBS中的DND-PG-PBA-SucMe-^{10}B溶液(4.0质量%,各小鼠200μL)。0.5、3、6、14、24、以及48小时后,使小鼠牺牲,提取肿瘤、血液、肝脏、脾脏、以及肾脏,放入各PTFE管中。各试样中的^{10}B浓度通过使用了装备于京都大学研究炉(KUR)的装置的中子感生瞬发γ射线分析(PGA)测定出。

[0226] 肝脏和脾脏的^{10}B浓度在从注射后3小时起到48小时期间高于血液、肿瘤、肾脏的浓度,示出存在DND-PG-PBA-SucMe蓄积于这些脏器的倾向。若将肝脏和脾脏的平均重量分别设为0.96g和0.08g,则计算出注入的表面修饰DND粒子的一半以上蓄积于这些脏器。虽然报告了PG避免蓄积于肝脏和脾脏(隐身效果(stealth effect)),但存在PBA和/或SucMe部分降低效率的可能性。另一方面,肾脏的^{10}B浓度低,基于DLS的流体力学的直径大于20nm,因此意味着DND-PG-PBA-SucMe未从肾脏排泄(图18)。

[0227] 为了确定BNCT条件,将肿瘤和血液中的^{10}B浓度以及它们的比率(T/B比)示于图17。除了以高BNCT效果为目标的药剂以高浓度蓄积于肿瘤以外,用于避免副作用的安全性也需要考虑。除了所述的体外(in vitro)实验中评价的表面修饰ND的毒性以外,T/B比也为重要

的指标。肿瘤的^{10}B浓度在14小时和48小时分别为17.1ppm和14.3ppm,高于其他时间点。血中的^{10}B浓度在半衰期约为3小时,从3小时的32.8ppm减少,T/B比也在14小时和48小时分别为11.1和6.7,高于其他时间点。用于BNCT的安全性的T/B比超过3,因此设为在DND-PG-PBA-SucMe的注入后约14小时和48小时照射中子。

[0228] [BNCT试验]

[0229] 通过与药代动力学实验相同的方法,对BALB/c小鼠注射DND-PG-PBA-SucMe的PBS分散液,在16小时后和48小时后照射中子。具体的操作如以下所述。

[0230] 饲养了BALB/c小鼠(雌,6周龄)。在中子照射的1周前,将CT26肿瘤细胞移植到BALB/c小鼠的右大腿部的皮下(各小鼠1×10^6个细胞)。对小鼠在中子照射的16小时前和48小时前静脉内注射PBS中的DND-PG-PBA-SucMe-^{10}B样品溶液(4.0质量%,各小鼠200μL)(每组5只小鼠)。也准备了注射对照组(有样品注入且无照射)、热对照组(有照射且无样品注入)以及冷对照组(无处理)的小鼠。在中子照射时,将小鼠麻醉,以仅肿瘤的部分能暴露于中子的方式,在使存在肿瘤的大腿部和腿伸出的状态下,单独地保持丙烯酸管支架。将管支架放射状地固定于丙烯酸板(一张板12只小鼠),将肿瘤的部分配置于中央。为了防止中子暴露,小鼠的其他部分用屏蔽板覆盖。对肿瘤照射中子10分钟。中子的注量(fluence)为3.99×10^{12}或3.55×10^{12}中子/cm^2中的任意者(小鼠分为两个照射批次)。将照射后的小鼠在放射线管理区域中饲养指定的期间。定期监控肿瘤的大小和体重的变化。关于肿瘤的大小,用游标卡尺测定出椭圆形的肿瘤的两个轴的尺寸。肿瘤体积计算为“体积=(长轴×短轴^2)/2”,在此,长轴为(从外部观察为椭圆形的)肿瘤的长的一侧的尺寸,短轴为短的一侧的尺寸。

[0231] 将中子照射后29天,对肿瘤的大小和体重进行了监控的结果示于图19~21。表面修饰ND本身不对肿瘤的成长造成影响(图20的注射对照)。即使在未注入表面修饰ND的情况下,通过进行中子照射,也示出一定程度的肿瘤成长抑制(图20的热对照)。与热对照组相比,基于DND-PG-PBA-SucMe的BNCT组在中子照射后第17、21以及26天示出统计上显著的BNCT效果(图19的BNCT 48h)。关于体重,热对照组与BNCT组之间未观察到显著差异,表示表面修饰ND没有急性或亚急性毒性(图21)。此外,也确认了与使用了少数小鼠(n=2、3)的实验的再现性,得出如下结论:DND-PG-PBA-SucMe是BNCT的有前景的表面修饰ND。

[0232] 需要说明的是,就DND-PG-PBA而言,在FBS(牛胎儿血清)的PBS混合物中观察到一些凝聚,但在DND-PG-PBA-Suc和DND-PG-PBA-SucMe中未观察到凝聚。凝聚的具体的判定方法如以下所述。

[0233] 将0.5质量份的所述表面修饰纳米金刚石配合于99.5质量份的PBS(pH7.4)/FBS(45/55(v/v))溶液中,在25℃下保存时,通过目视判定是否在10分钟以内实质上产生凝聚体。需要说明的是,使用的FBS(牛胎儿血清)为Biosera Inc.(法国)制,PBS为D-PBS(-)(富士胶片和光纯药公司制)。

[0234] 需要说明的是,各样品的^1H-NMR分析使用ECX500 NMR spectrometer(JEOL)进行。此外,FT-IR分析使用在傅里叶变换红外分光光度计“IRTracer”(株式会社岛津制作所制)装配有加热真空搅拌反射“Heat Chamber Type-1000℃”(株式会社ST Japan制)而成的装置来进行。

[0235] 作为以上的总结,以下附记本公开的构成及其变化。

[0236] [1]

[0237] 一种表面修饰纳米粒子,其具备:纳米碳材料和所述纳米碳材料的表面修饰基团,所述表面修饰纳米粒子具有包含硼原子的基团作为所述表面修饰基团。

[0238] [2]

[0239] 根据[1]所述的表面修饰纳米粒子,其中,所述纳米碳材料为选自由纳米金刚石、富勒烯、氧化石墨烯、纳米石墨、碳纳米管、碳纳米丝、洋葱碳、类金刚石碳、无定形碳、碳黑、碳纳米角、以及碳纳米线圈构成的组中的至少一个。

[0240] [3]

[0241] 根据[1]或[2]所述的表面修饰纳米粒子,其中,所述纳米碳材料为纳米金刚石粒子。

[0242] [4]

[0243] 根据[1]~[3]中任一项所述的表面修饰纳米粒子,其中,所述表面修饰纳米粒子具有亲水性基团和包含硼原子的基团作为所述表面修饰基团。

[0244] [5]

[0245] 根据[1]~[4]中任一项所述的表面修饰纳米粒子,其中,所述亲水性基团为羟基、羧基、磺酸基、氨基、以及包含亲水性聚合物链的基团。

[0246] [6]

[0247] 根据[1]~[5]中任一项所述的表面修饰纳米粒子,其中,所述表面修饰纳米粒子具有包含硼原子和亲水性聚合物链的基团作为所述表面修饰基团。

[0248] [7]

[0249] 根据[5]或[6]所述的表面修饰纳米粒子,其中,所述亲水性聚合物链包含聚醚链和/或聚甘油链。

[0250] [8]

[0251] 根据[5]~[7]中任一项所述的表面修饰纳米粒子,其中,所述亲水性聚合物链包含聚甘油链。

[0252] [9]

[0253] 根据[7]或[8]所述的表面修饰纳米粒子,其中,所述聚甘油链为下述式(1)所示的聚甘油链。

[0254] $-(X^1C_3H_5)-(OC_3H_5)p-(X^2R^1)q$ (1)

[0255] [式(1)中,p表示1以上的整数,q表示满足q=p+2的整数。X^1表示二价基团,$[X^1C_3H_5]$中的从X^1向左伸出的键合键与纳米碳材料键合。$[X^2R^1]$表示聚甘油链的末端,X^2表示单键或二价基团,R^1表示氢原子或一价有机基团。]

[0256] [10]

[0257] 根据[9]所述的表面修饰纳米粒子,其中,所述$[X^2R^1]$相同或不同,为OH、NH_2、CH_3、烷氧基、酰基、单或二烷基氨基、单或二烯基氨基、烷基酰胺基、烯基酰胺基、季铵取代烷氧基、氯代烷氧基、聚环氧烷基、环状酰亚胺基、羧基取代烷基氨基、羧基取代烷基氧基、或包含硼原子的基团。

[0258] [11]

[0259] 根据[7]~[10]中任一项所述的表面修饰纳米粒子,其中,所述聚甘油链为羟基的

一部分或全部被氨基取代而成的聚甘油链。

[0260] [12]

[0261] 根据[11]所述的表面修饰纳米粒子,其中,所述氨基的至少一部分被具有酸性官能团的化合物保护。

[0262] [13]

[0263] 根据[5]~[12]中任一项所述的表面修饰纳米粒子,其中,所述硼原子经由芳香环与所述亲水性聚合物链键合。

[0264] [14]

[0265] 根据[13]所述的表面修饰纳米粒子,其中,所述硼原子直接键合于所述芳香环。

[0266] [15]

[0267] 根据[13]或[14]所述的表面修饰纳米粒子,其中,所述芳香环经由键合于构成所述芳香环的碳原子的亚烷基氧基或亚烷基氨基与所述亲水性聚合物链键合。

[0268] [16]

[0269] 根据[15]所述的表面修饰纳米粒子,其中,经由键合于构成所述芳香环的碳原子的亚烷基氧基或亚烷基氨基与所述亲水性聚合物链键合的方案在式(2)所示的基团中示出[式中,Ar表示芳香环,R^3为所述芳香环所任选地具有的取代基(例如氟原子、氯原子、溴原子、碘原子等卤素原子;羟基;巯基;羧基;氨基;氧代基等),例如优选为吸电子基团。m为0以上的整数。R^4为包含硼原子的基团,所述硼原子直接键合于构成所述芳香环的碳原子。n为1以上的整数。R^5表示亚烷基,所述亚烷基氧基和所述亚烷基氨基中的亚烷基为相同的基团。Y为氧原子、NH、或NR^6。R^6为一价有机基团。从Y向左伸出的键合键与亲水性聚合物链(优选为聚甘油链)键合]。

[0270] [17]

[0271] 根据[16]所述的表面修饰纳米粒子,其中,所述硼原子和所述亚烷基氧基或所述亚烷基氨基分别键合于构成所述芳香环的碳原子中彼此邻接的碳原子。

[0272] [18]

[0273] 根据[17]所述的表面修饰纳米粒子,其中,所述硼原子和所述亚烷基氧基或所述亚烷基氨基分别键合于构成所述芳香环的碳原子中彼此邻接的碳原子的方案在式(3)所示的基团中示出[式中,R^3、R^4、R^5以及Y与式(2)中说明的含义相同]。

[0274] [19]

[0275] 根据[16]~[18]中任一项所述的表面修饰纳米粒子,其中,R^4中的所述包含硼原子的基团为下述式(4)所示的基团。

[0276] $-B(-R^7)_2$ (4)

[0277] [式(4)中,R^7各自相同或不同,表示氢原子、羟基、氨基、磺酸基、或一价有机基团。此外,两个R^7任选地彼此键合而形成环(含烃环)。在两个R^7彼此键合而形成环的情况下,所述环任选地经由氧原子而形成环。此外,构成所述环的碳任选地与相邻的碳原子形成双键。需要说明的是,构成所述环的碳原子数没有特别限定,例如,优选为4~12,更优选为4~10,进一步优选为4~6]

[0278] [20]

[0279] 根据[13]~[19]中任一项所述的表面修饰纳米粒子,其中,所述芳香环经由键合

于构成所述芳香环的碳原子的亚烷基氨基与所述亲水性聚合物链键合,所述亚烷基氨基中的氨基为叔氨基。

[0280] [21]

[0281] 根据[13]~[20]中任一项所述的表面修饰纳米粒子,其中,所述芳香环为芳香族烃环或芳香族杂环。

[0282] [22]

[0283] 根据[21]所述的表面修饰纳米粒子,其中,所述芳香环中的所述烃环为苯环、萘环等C_{6-14}烃环(特别是C_{6-10}烃环),所述芳香族杂环为在构成环的原子中具有碳原子和至少一种杂原子(例如氧原子、硫原子、氮原子等)的环、它们的稠环。

[0284] [23]

[0285] 根据[13]~[22]中任一项所述的表面修饰纳米粒子,其中,所述芳香环为苯环或吡啶环。

[0286] [24]

[0287] 根据[13]~[23]中任一项所述的表面修饰纳米粒子,其中,所述芳香环具有吸电子基团作为取代基。

[0288] [25]

[0289] 根据[24]所述的表面修饰纳米粒子,其中,所述吸电子基团为氟原子。

[0290] [26]

[0291] 根据[1]~[25]中任一项所述的表面修饰纳米粒子,其中,所述硼原子以硼酸的形式被包含。

[0292] [27]

[0293] 根据[1]~[26]中任一项所述的表面修饰纳米粒子,其中,所述硼原子浓缩为^{10}B。

[0294] [28]

[0295] 根据[1]~[27]中任一项所述的表面修饰纳米粒子,其中,将0.5质量份的表面修饰纳米粒子配合于99.5质量份的PBS(pH7.4)/FBS(45/55(v/v))溶液中,在25℃下保存时,通过目视判定,在10分钟以内实质上不产生凝聚体。

[0296] [29]

[0297] 根据[1]~[28]中任一项所述的表面修饰纳米粒子,其中,所述硼原子的含量为0.1质量%以上、0.5质量%以上、1.0质量%以上、或1.5质量%以上。

[0298] [30]

[0299] 根据[1]~[29]中任一项所述的表面修饰纳米粒子,其中,ND与表面修饰基团的质量比[ND/本公开的表面修饰基团]为0.2~1.5、0.2~1.0。

[0300] [31]

[0301] 根据[1]~[30]中任一项所述的表面修饰纳米粒子,其中,体积平均粒径(MV)为200nm以下、100nm以下、或60nm以下。

[0302] [32]

[0303] 一种组合物,其是用于包含如[1]~[31]中任一项所述的表面修饰纳米粒子的硼中子俘获疗法的组合物。

[0304] 工业上的可利用性

[0305] 本公开的表面修饰纳米粒子能容易地制造,能将硼原子选择性地运送至癌细胞内并且维持癌细胞内的硼原子的浓度。因此,本公开的表面修饰纳米粒子能使充分的量的硼原子蓄积于癌组织、癌细胞,因此能通过硼中子俘获疗法(BNCT)有效地杀伤癌组织、癌细胞。

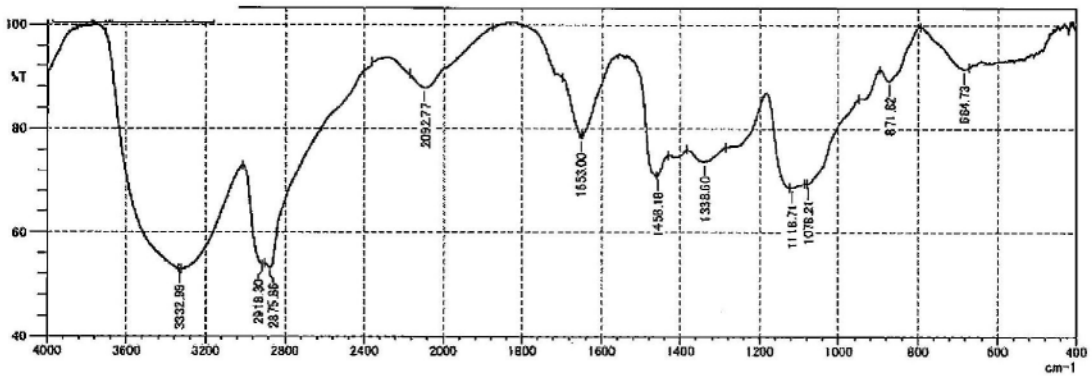

%T
cm-1
3332.86
2918.90
2875.66
2092.77
1653.00
1458.18
1338.60
1118.71
1078.21
871.82
664.73

图1

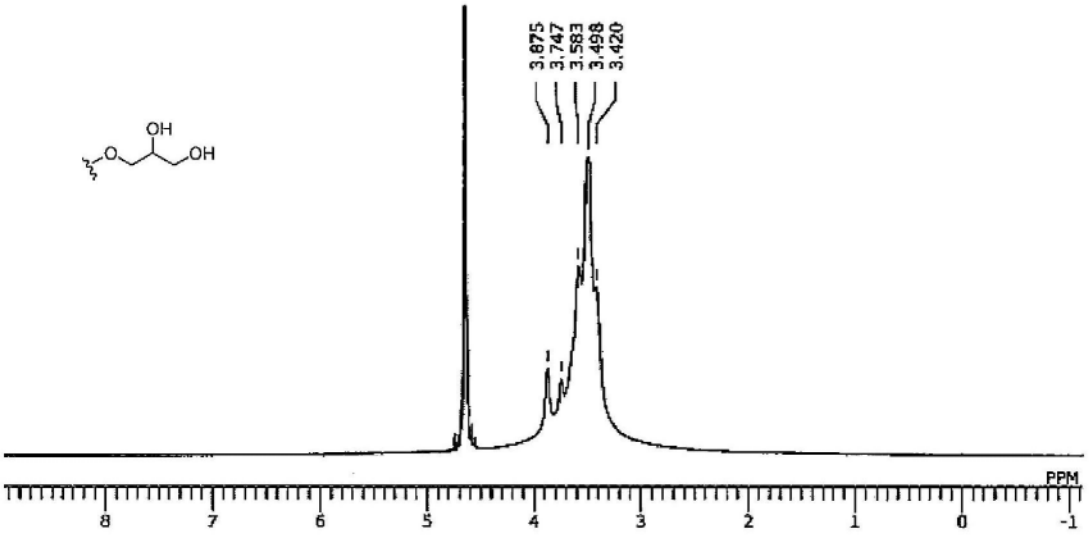

3.875
3.747
3.583
3.498
3.420
OH
O
OH
PPM

图2

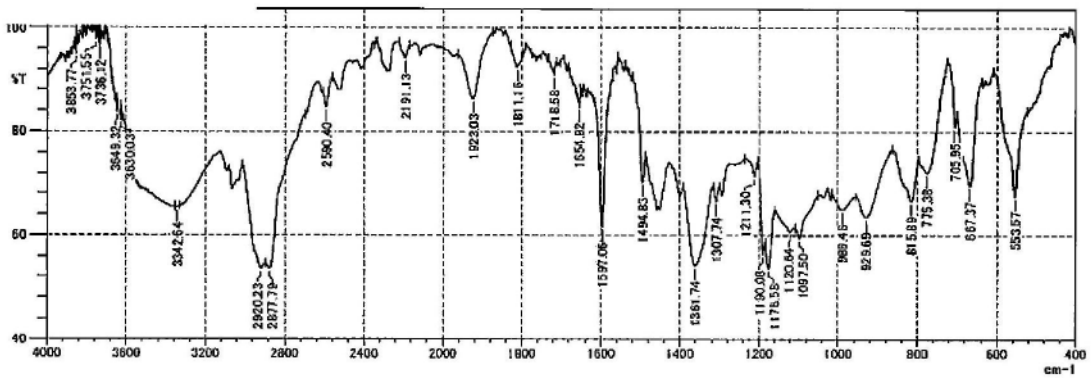

%T
cm-1
3853.77
3751.55
3736.12
3648.32
3630.03
3342.64
2920.23
2877.79
2590.40
2191.13
1923.03
1811.16
1716.58
1654.82
1597.06
1494.83
1361.74
1307.74
1211.30
1190.08
1176.58
1120.64
1097.50
969.46
929.69
815.89
775.38
705.95
667.37
553.67

图3

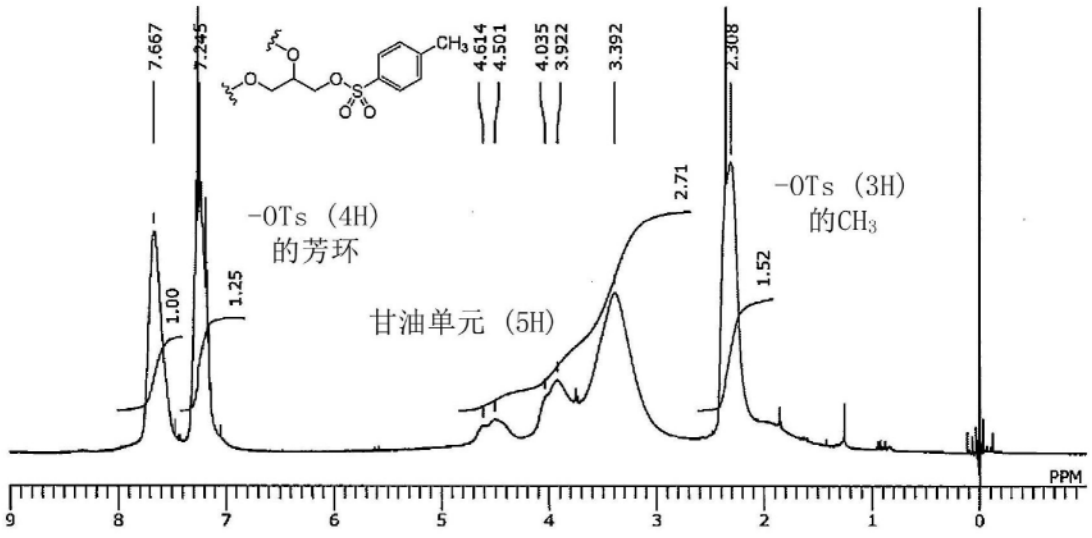

7.667
7.245
4.614
4.501
4.035
3.922
3.392
2.308
2.71
1.52
1.25
1.00
-OTs (4H)
的芳环
甘油单元 (5H)
-OTs (3H)
的CH3
PPM
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0

图4

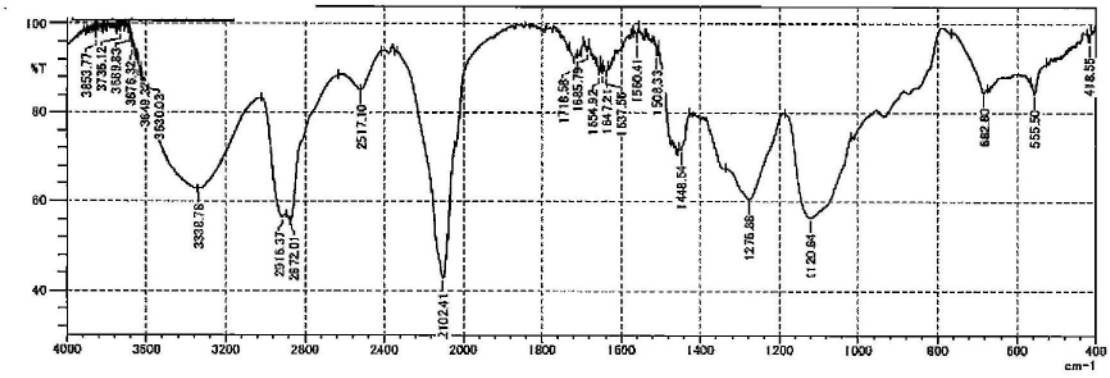

%T
100
80
60
40
3338.76
2916.37
2517.10
2102.41
1718.58
1685.79
1654.92
1537.56
1448.54
1276.88
1120.64
682.80
555.50
4000
3500
3200
2800
2400
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
cm-1

图5

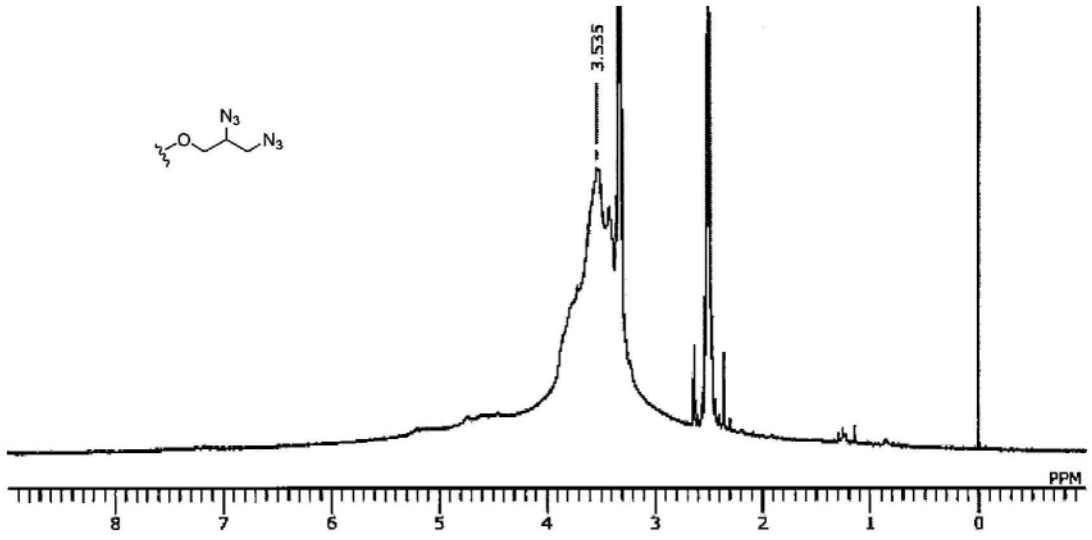

N3
O
N3
3.535
PPM
8
7
6
5
4
3
2
1
0

图6

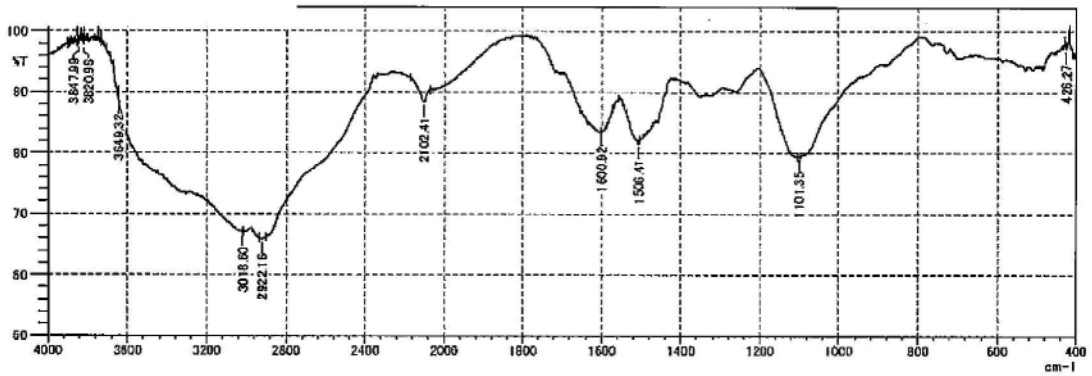

%T
100
90
80
70
60
50
4000
3800
3600
3400
3200
3000
2800
2600
2400
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
cm-1
3847.99
3820.98
3649.30
3018.80
2922.16
2102.41
1600.92
1506.41
1101.35
426.27

图7

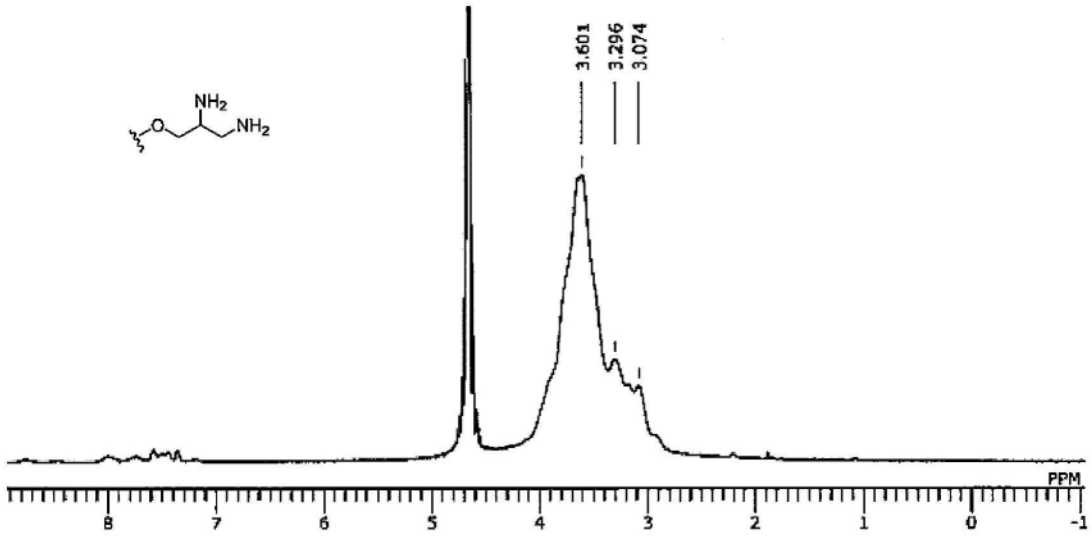

NH2
NH2
O
3.601
3.296
3.074
PPM
8
7
6
5
4
3
2
1
0
-1

图8

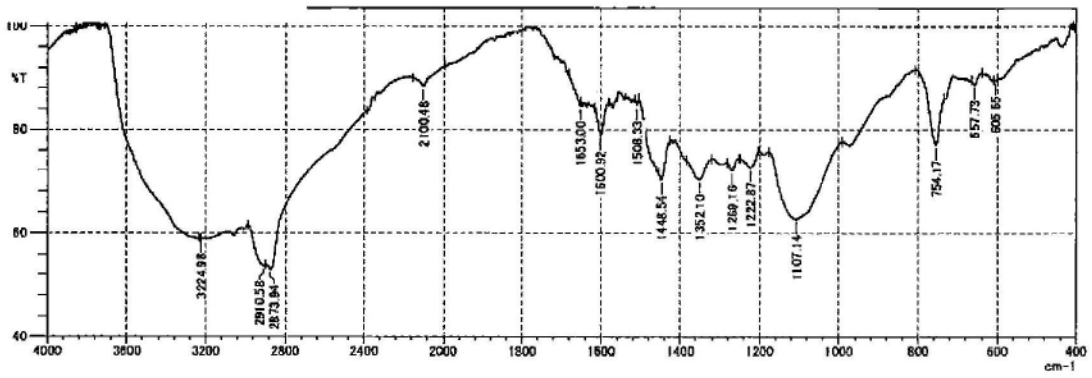

%T
100
80
60
40
3224.98
2910.58
2873.84
2100.46
1653.00
1600.92
1508.33
1448.54
1352.10
1259.16
1222.87
1107.14
754.17
657.73
605.65
4000
3600
3200
2800
2400
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
cm-1

图9

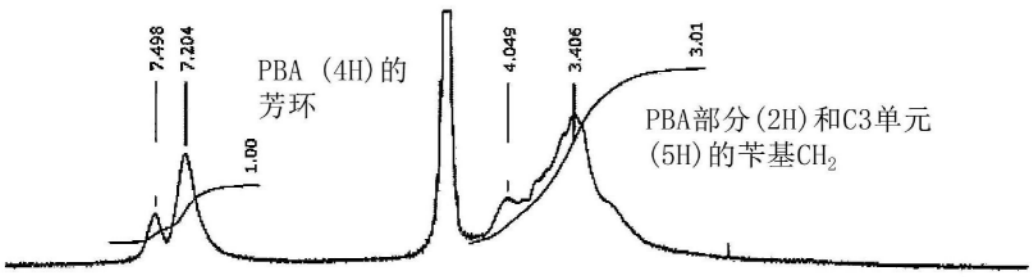

7.498
7.204
1.00
PBA (4H)的
芳环
4.049
3.406
3.01
PBA部分(2H)和C3单元
(5H)的苄基CH2

图10

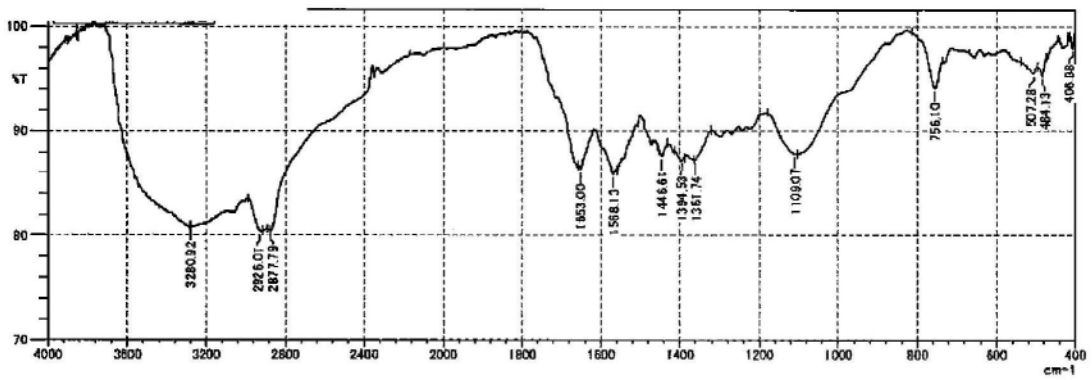

%T
cm-1
3280.32
2926.01
2857.79
1653.00
1568.13
1446.61
1394.59
1361.74
1110.01
756.10
607.28
484.13
406.08

图11

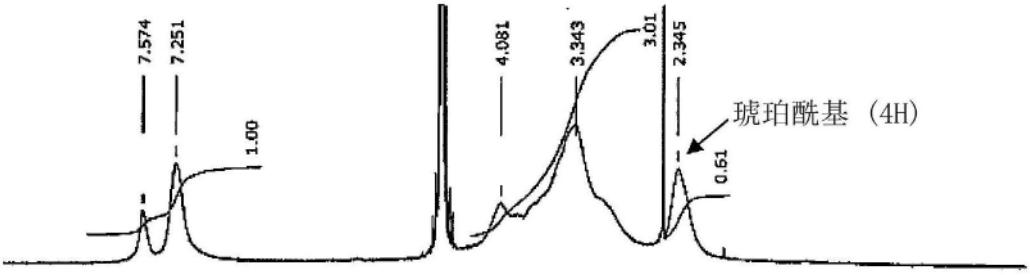

7.574
7.251
1.00
4.081
3.343
3.01
2.345
0.61
琥珀酰基（4H）

图12

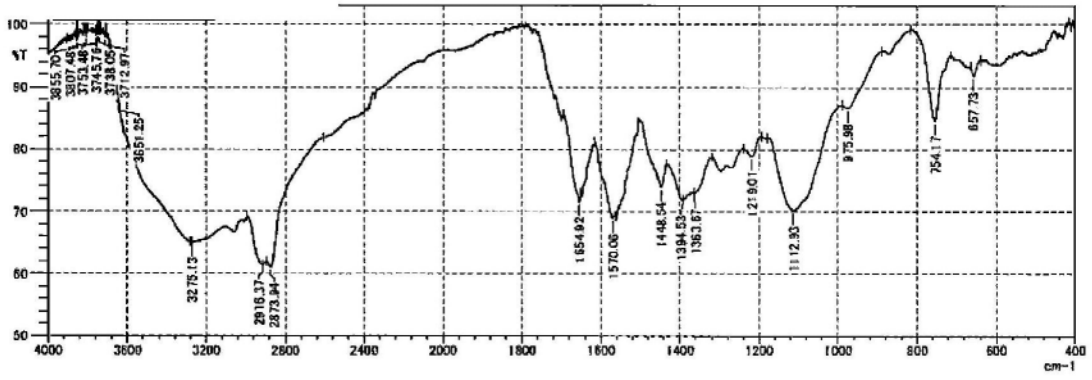

%T
cm-1
3855.70
3807.48
3753.48
3745.76
3738.05
3712.97
3651.25
3275.13
2916.37
2873.94
1654.92
1570.06
1448.54
1394.53
1363.67
1219.01
1112.93
975.98
754.17
657.73

图13

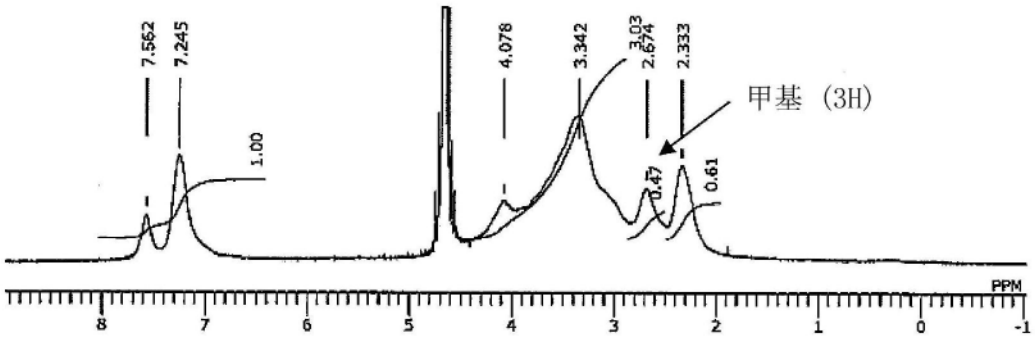

7.562
7.245
1.00
4.078
3.342
3.03
2.674
2.333
甲基 (3H)
0.47
0.61
PPM
8
7
6
5
4
3
2
1
0
-1

图14

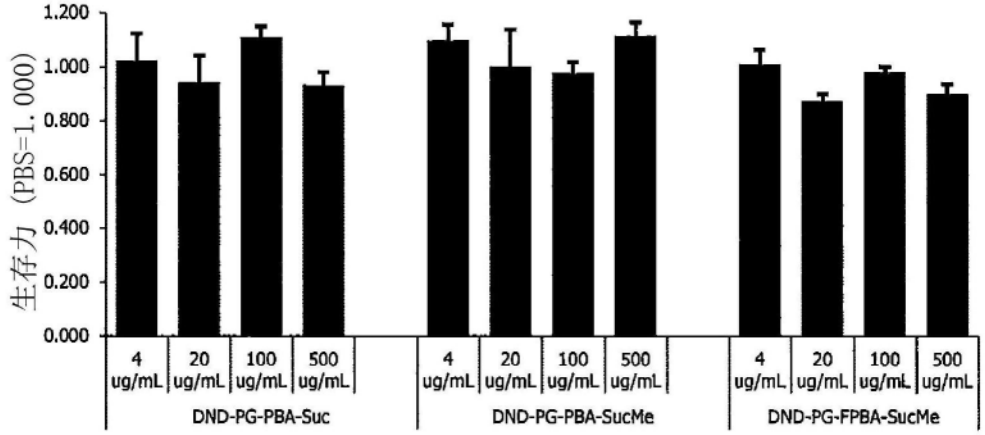

生存力 (PBS=1.000)
1.200
1.000
0.800
0.600
0.400
0.200
0.000
4 ug/mL
20 ug/mL
100 ug/mL
500 ug/mL
DND-PG-PBA-Suc
DND-PG-PBA-SucMe
DND-PG-FPBA-SucMe

图15

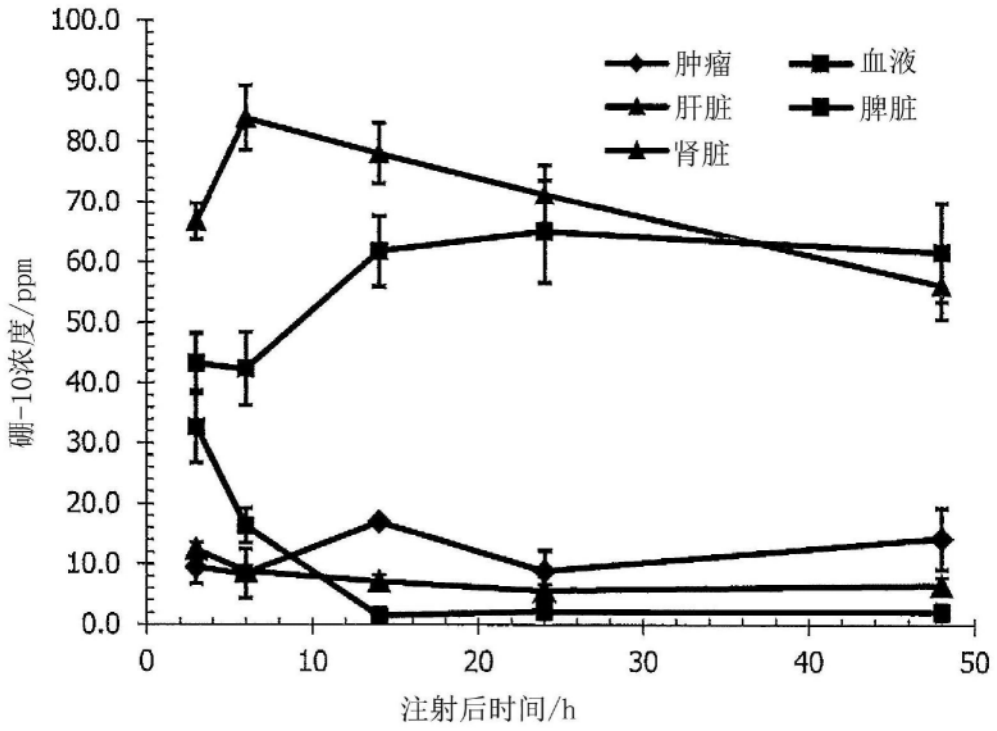

100.0
90.0
80.0
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
硼-10浓度/ppm
0
10
20
30
40
50
注射后时间/h
肿瘤
血液
肝脏
脾脏
肾脏

图16

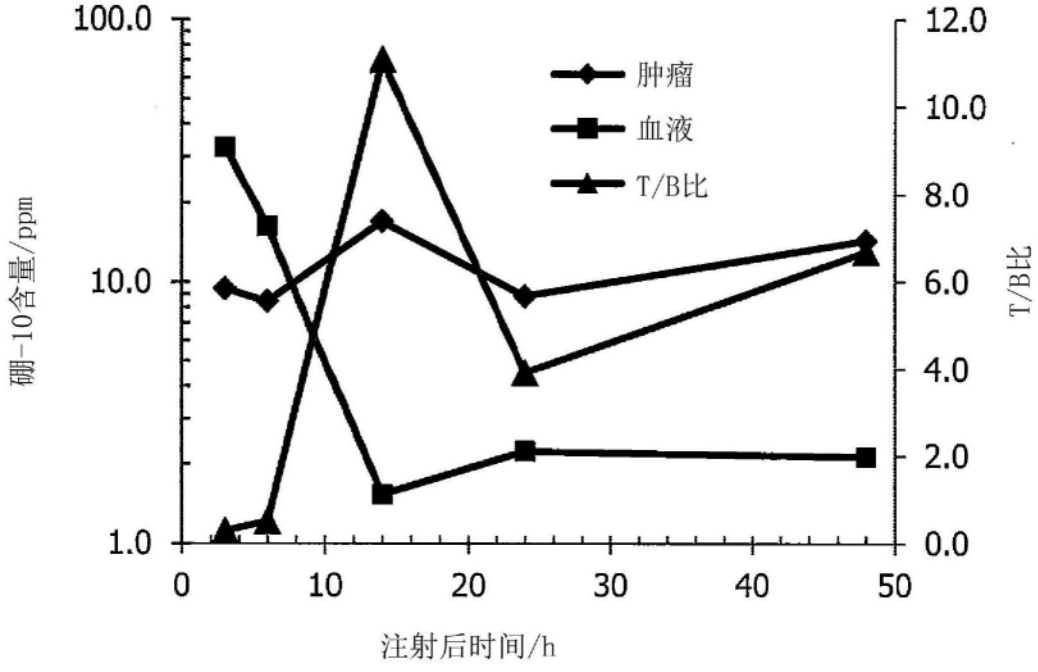

100.0
10.0
1.0
硼-10含量/ppm
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
T/B比
0
10
20
30
40
50
注射后时间/h
肿瘤
血液
T/B比

图17

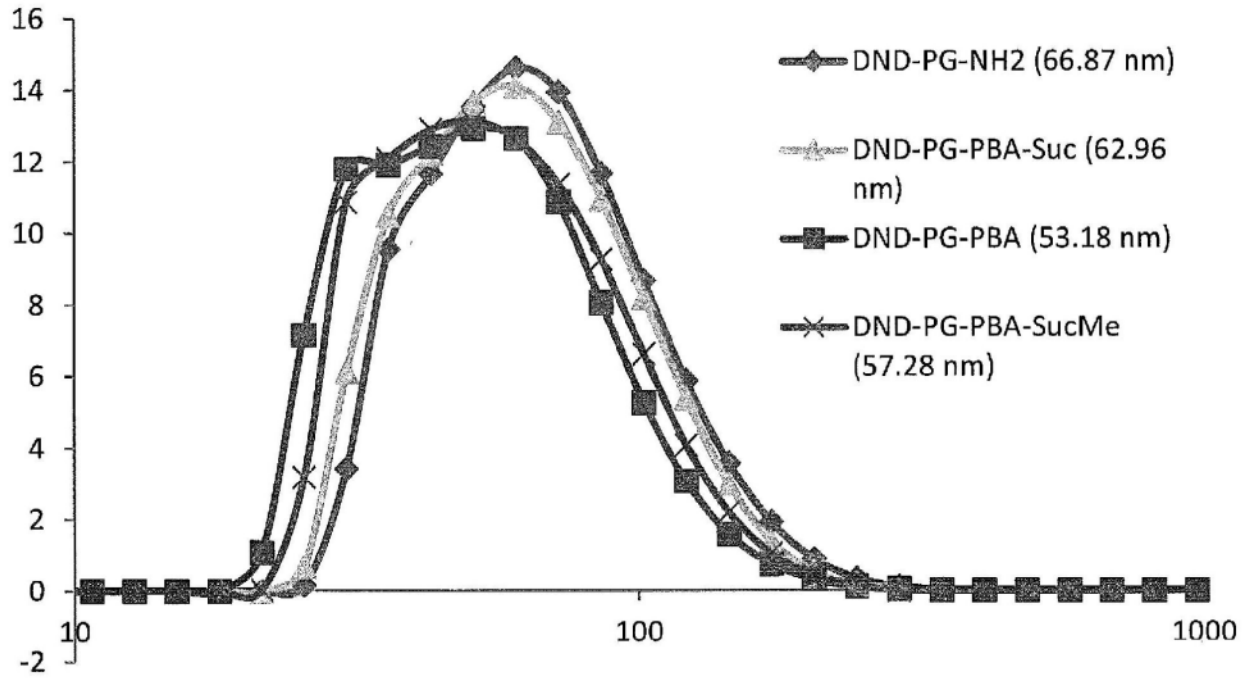

16
14
12
10
8
6
4
2
0
-2
10
100
1000
DND-PG-NH2 (66.87 nm)
DND-PG-PBA-Suc (62.96 nm)
DND-PG-PBA (53.18 nm)
DND-PG-PBA-SucMe (57.28 nm)

图18

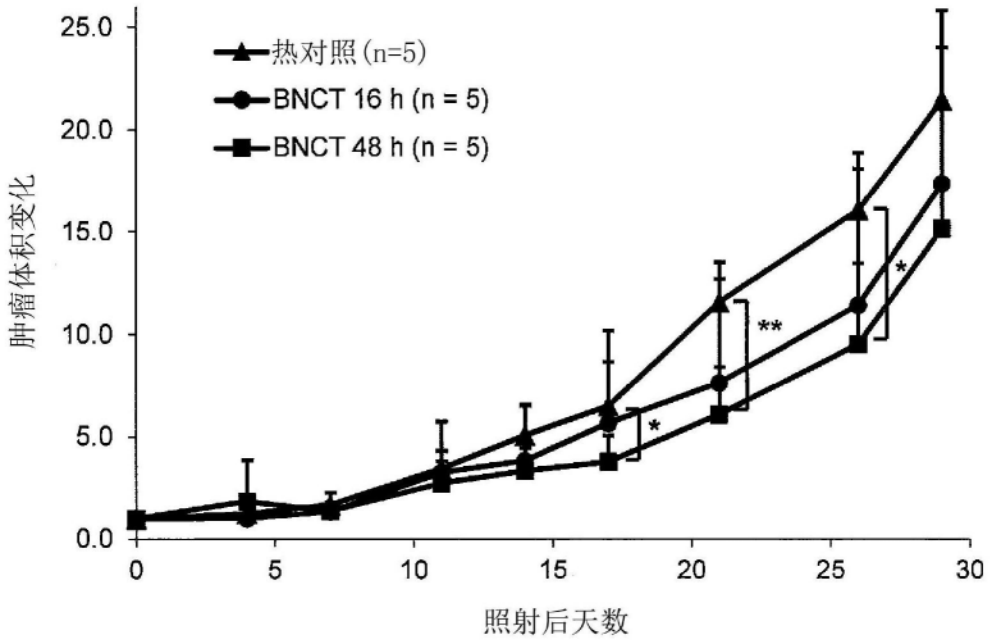

25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
0
5
10
15
20
25
30
肿瘤体积变化
照射后天数
热对照 (n=5)
BNCT 16 h (n = 5)
BNCT 48 h (n = 5)
*
**
*

图19

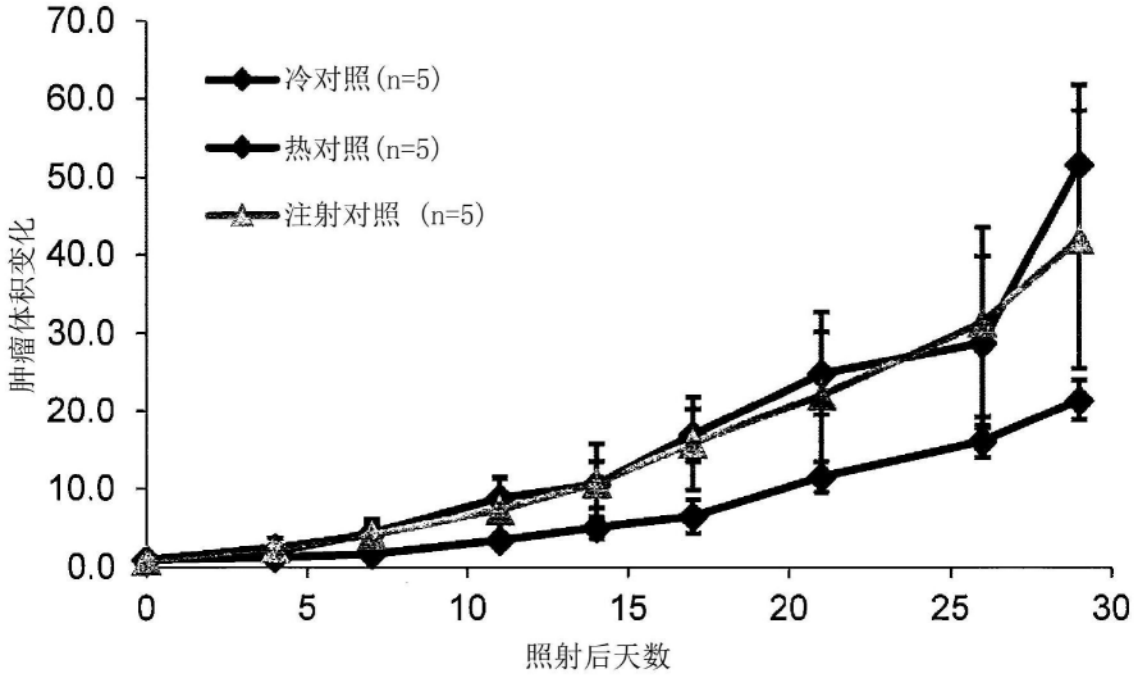

70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
肿瘤体积变化
冷对照(n=5)
热对照(n=5)
注射对照 (n=5)
0
5
10
15
20
25
30
照射后天数

图20

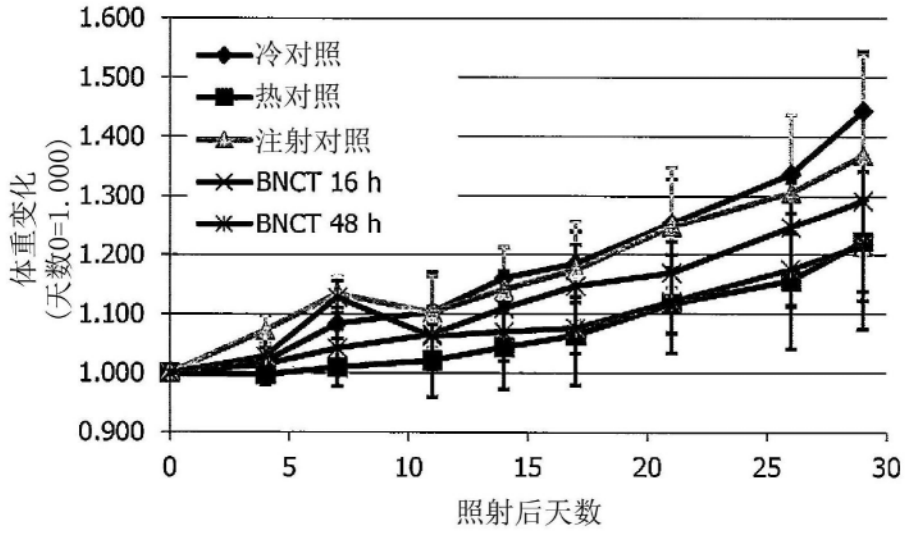

1.600
1.500
1.400
1.300
1.200
1.100
1.000
0.900
体重变化
(天数0=1.000)
冷对照
热对照
注射对照
BNCT 16 h
BNCT 48 h
0
5
10
15
20
25
30
照射后天数

图21

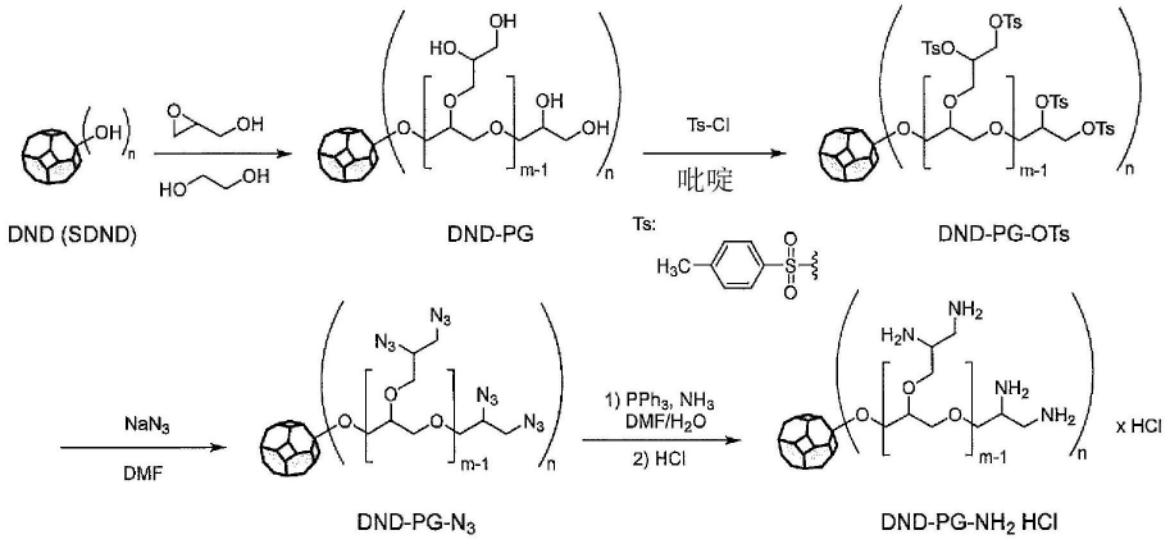

DND (SDND)
DND-PG
Ts-Cl
吡啶
DND-PG-OTs
Ts:
NaN3
DMF
DND-PG-N3
1) PPh3, NH3
DMF/H2O
2) HCl
x HCl
DND-PG-NH2 HCl

图22

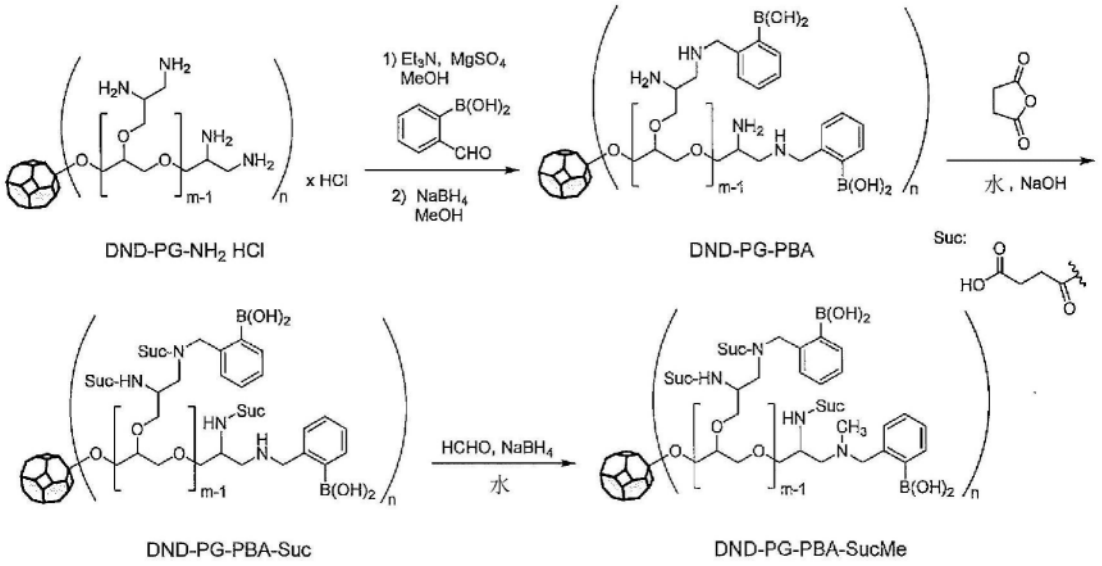

DND-PG-NH2 HCl
x HCl
1) Et3N, MgSO4
MeOH
2) NaBH4
MeOH
DND-PG-PBA
水，NaOH
Suc:
DND-PG-PBA-Suc
HCHO, NaBH4
水
DND-PG-PBA-SucMe

图23