

(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2018-513883
(P2018-513883A)

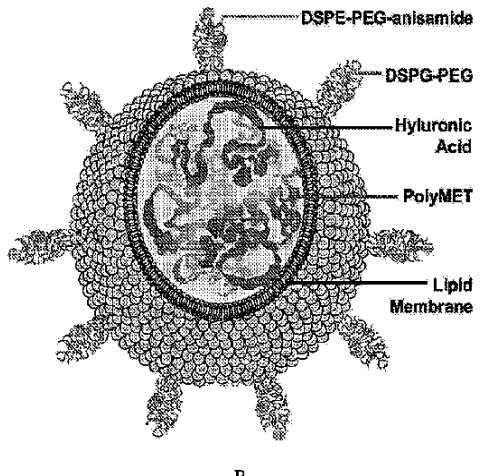
(43) 公表日 平成30年5月31日(2018.5.31)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C08G 73/04 (2006.01)	C08G 73/04	4 C076
A61K 31/785 (2006.01)	A61K 31/785	4 C084
A61K 45/00 (2006.01)	A61K 45/00	4 C086
A61K 31/7105 (2006.01)	A61K 31/7105	4 H006
A61K 31/711 (2006.01)	A61K 31/711	4 J043
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 76 頁)		最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2017-546793 (P2017-546793)	(71) 出願人 500093834 ザ・ユニヴァーシティ・オブ・ノース・カロライナ・アト・チャペル・ヒル アメリカ合衆国ノースカロライナ州27516, チャペル・ヒル, チャーチ・ストリート 109
(86) (22) 出願日	平成28年3月4日 (2016.3.4)	(74) 代理人 100099623 弁理士 奥山 尚一
(85) 翻訳文提出日	平成29年11月6日 (2017.11.6)	(74) 代理人 100096769 弁理士 有原 幸一
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/020921	(74) 代理人 100107319 弁理士 松島 鉄男
(87) 国際公開番号	W02016/144766	(74) 代理人 100125380 弁理士 中村 綾子
(87) 国際公開日	平成28年9月15日 (2016.9.15)	
(31) 優先権主張番号	62/129, 276	
(32) 優先日	平成27年3月6日 (2015.3.6)	
(33) 優先権主張国	米国 (US)	

(54) 【発明の名称】高分子メトホルミンならびに治療用薬剤としておよび送達媒体としてのその使用

(57) 【要約】

本明細書において、有用な治療用薬剤、送達媒体およびスクリオチドに対するトランスフェクション剤としてメトホルミン残基を含むポリマー(「PolyMet」)が提供される。本明細書において、対象の疾患または望ましくない状態の処置のための方法であって、疾患または状態と戦うための治療用薬剤としてPolyMetを投与するステップを含む方法も提供される。本明細書において、対象の疾患または望ましくない状態の処置のための方法であって、PolyMetを含む送達媒体中の治療用薬剤を投与するステップを含む方法も提供される。本明細書において、PolyMetを作製するための方法もさらに提供される。



B

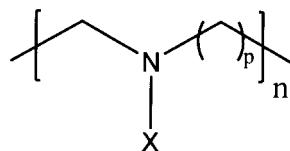
FIGURE 4B

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の化学式 I :

【化 1】



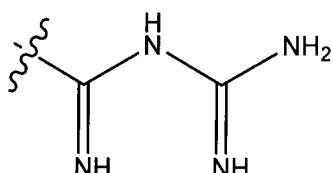
I

10

を有するポリマーであって、式中、p は 1 または 2 であり、n は 2 から 10, 000 の整数であり、

X は、水素または式 :

【化 2】



20

を有するメトホルミンの残基であり、

前記ポリマー中の X の少なくとも 5 % はメトホルミンの残基である、ポリマー。

【請求項 2】

X は、X の出現数のうちの少なくとも 50 % でメトホルミンの残基である、請求項 1 に記載のポリマー。

【請求項 3】

X は、X の出現数のうちの少なくとも 75 % でメトホルミンの残基である、請求項 1 に記載のポリマー。

30

【請求項 4】

X は、X の出現数のうちの少なくとも 95 % でメトホルミンの残基である、請求項 1 に記載のポリマー。

【請求項 5】

X は、X の出現数のうちの約 100 % でメトホルミンの残基である、請求項 1 に記載のポリマー。

【請求項 6】

n は、2 から 5, 000 の整数である、請求項 1 に記載のポリマー。

【請求項 7】

n は、2 から 4, 000 の整数である、請求項 1 に記載のポリマー。

40

【請求項 8】

n は、2 から 3, 000 の整数である、請求項 1 に記載のポリマー。

【請求項 9】

n は、2 から 2, 000 の整数である、請求項 1 に記載のポリマー。

【請求項 10】

n は、2 から 1, 000 の整数である、請求項 1 に記載のポリマー。

【請求項 11】

n は、2 から 500 の整数である、請求項 1 に記載のポリマー。

【請求項 12】

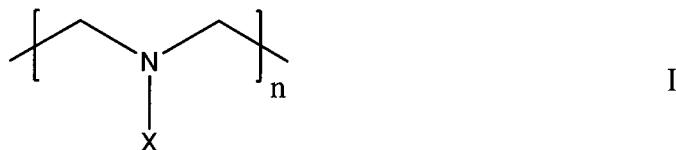
n は、2 から 250 の整数である、請求項 1 に記載のポリマー。

50

【請求項 1 3】

以下の化学式 I :

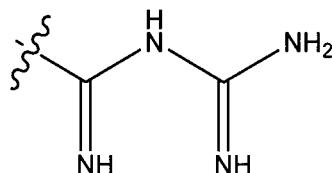
【化 3】



10

を有するポリマーであって、式中、nは2から10,000の整数であり、
Xは、水素、式：

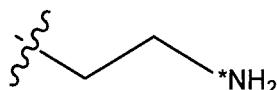
【化 4】



20

を有するメトホルミンの残基または以下の化学式：

【化 5】



を有するエチルアミンの残基であり、

それぞれの場合において、*N上の0個、1個または両方の水素が

a) それぞれの場合において、同じ様式でさらに置換されてもよいエチルアミンのさらなる残基、および/または

b) メトホルミンの残基

により置換され、

分岐PEIにもともと存在する第1級*Nの少なくとも5%がメトホルミンの残基により置換されている、ポリマー。

【請求項 1 4】

前記分岐PEIにもともと存在する前記第1級*Nのうちの少なくとも50%は、メトホルミンの残基により置換されている、請求項13に記載のポリマー。

【請求項 1 5】

前記分岐PEIにもともと存在する前記第1級*Nのうちの少なくとも75%は、メトホルミンの残基により置換されている、請求項13に記載のポリマー。

【請求項 1 6】

前記分岐PEIにもともと存在する前記第1級*Nのうちの少なくとも95%は、メトホルミンの残基により置換されている、請求項13に記載のポリマー。

【請求項 1 7】

前記分岐PEIにもともと存在する前記第1級*Nのうちの約100%は、メトホルミンの残基により置換されている、請求項13に記載のポリマー。

【請求項 1 8】

nは、2から5,000の整数である、請求項13に記載のポリマー。

【請求項 1 9】

30

40

50

nは、2から4,000の整数である、請求項13に記載のポリマー。

【請求項20】

nは、2から3,000の整数である、請求項13に記載のポリマー。

【請求項21】

nは、2から2,000の整数である、請求項13に記載のポリマー。

【請求項22】

nは、2から1,000の整数である、請求項13に記載のポリマー。

【請求項23】

nは、2から500の整数である、請求項13に記載のポリマー。

【請求項24】

i. 脂質外膜、および

ii. 前記脂質外膜によって包まれたPolyMelt
を含むナノ粒子。

【請求項25】

脂質外膜によって包まれたヒアルロン酸または核酸をさらに含むナノ粒子。

【請求項26】

前記PolyMeltと複合体を形成した積荷であって、治療用薬剤である積荷をさらに含む、請求項24に記載のナノ粒子。

【請求項27】

前記積荷は、生物製剤である、請求項26に記載のナノ粒子。

【請求項28】

前記積荷は、抗がん薬である、請求項27に記載のナノ粒子。

【請求項29】

前記積荷は、ヌクレオチドである、請求項27に記載のナノ粒子。

【請求項30】

前記積荷は、siRNAまたはpDNAである、請求項27に記載のナノ粒子。

【請求項31】

前記脂質外膜は、カチオン性脂質を含む、請求項24に記載のナノ粒子。

【請求項32】

前記脂質外膜は、DOTAPおよびコレステロールを含む、請求項24に記載のナノ粒子。

【請求項33】

前記脂質外膜は、標的化リガンドを含み、かつ/またはペグ化される、請求項24に記載のナノ粒子。

【請求項34】

約1,000nm未満である少なくとも1つの寸法を有する、請求項24に記載のナノ粒子。

【請求項35】

直径が約100nm未満の球の形状を有する、請求項24に記載のナノ粒子。

【請求項36】

PolyMeltまたはLPH-PolyMeltを対象に投与することによって疾患を処置する方法。

【請求項37】

前記疾患は、がんである、請求項36に記載の方法。

【請求項38】

前記疾患は、糖尿病である、請求項36に記載の方法。

【請求項39】

前記PolyMeltおよび前記LPH-PolyMeltは、積荷を含む、請求項36に記載の方法。

【請求項40】

10

20

30

40

50

前記積荷は、治療用薬剤である、請求項39に記載の方法。

【請求項41】

積荷を標的に送達する方法であって、PolyMetまたはLPH-PolyMetと会合した積荷を対象に投与するステップを含み、前記積荷が、前記PolyMetまたはLPH-PolyMetによって前記対象の体内の標的に送達される、方法。

【請求項42】

前記積荷は、治療用薬剤である、請求項41に記載の方法。

【請求項43】

細胞の遺伝物質を改変する方法であって、前記細胞を外来性の遺伝物質と複合体を形成したか、またはそれと会合したPolyMetまたはLPH-PolyMetと接觸させるステップを含み、前記細胞の遺伝物質が改変される、方法。

10

【請求項44】

前記細胞は、真核細胞、哺乳動物細胞、植物細胞、または原核細胞である、請求項43に記載の方法。

【請求項45】

前記外来性の遺伝物質は、核酸である、請求項43に記載の方法。

【請求項46】

PolyMetまたはLPH-PolyMetトランスフェクション試薬と、積荷を前記PolyMetまたはLPH-PolyMetトランスフェクション試薬と複合体を形成させるための少なくとも1つの溶媒とを含むキット。

20

【請求項47】

メトホルミンのポリマーを調製する方法であって、

a. 溶媒中において直鎖または分岐ポリエチレンイミンまたはポリプロピレンイミンをジシアミドと接觸させて、第1の混合物を調製するステップ、

b. 前記第1の混合物を酸と接觸させて、第2の混合物を調製するステップ、および

c. 前記第2の混合物をある期間加熱するステップ、

を含み、メトホルミンのポリマーが調製される、方法。

【請求項48】

前記溶媒は、水性溶媒である、請求項47に記載の方法。

【請求項49】

前記溶媒は、水である、請求項47に記載の方法。

30

【請求項50】

前記酸は、無機酸または有機酸である、請求項47に記載の方法。

【請求項51】

前記酸は、HClである、請求項47に記載の方法。

【請求項52】

前記期間は、約2から約6時間である、請求項47に記載の方法。

【請求項53】

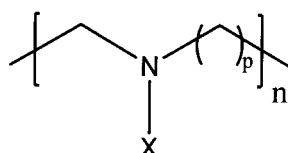
前記加熱するステップは、反応が少なくとも約100の温度に達するまで熱を加えることを含む、請求項47に記載の方法。

40

【請求項54】

以下の化学式I:

【化6】



I

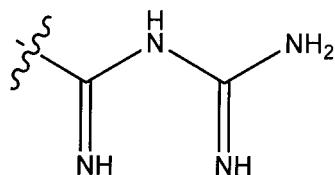
を有するポリマーであって、式中、pは1または2であり、nは2から10,000の整

50

数であり、

X は、水素または式：

【化 7】



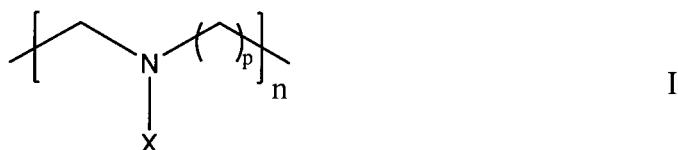
10

を有するメトホルミンの残基であり、前記ポリマー中のメトホルミン残基の w t % は少なくとも 0 . 0 0 1 % である、ポリマー。

【請求項 5 5】

以下の化学式 I :

【化 8】

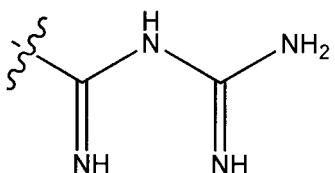


20

を有するポリマーであって、式中、p は 1 または 2 であり、n は 2 から 1 0 , 0 0 0 の整数であり、

X は、水素、式：

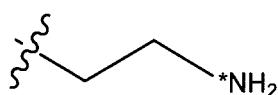
【化 9】



30

を有するメトホルミンの残基または以下の化学式：

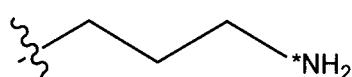
【化 1 0】



40

を有するエチルアミンの残基または以下の化学式：

【化 1 1】



を有するプロピルアミンであり、それぞれの場合において、* N 上の 0 個、1 個または両方の水素が

a) それぞれの場合において、同じ様式でさらに置換されてもよいエチルアミンもしくはプロピルアミンのさらなる残基（複数可）、および / または

50

b) メトホルミンの残基

により置換され、

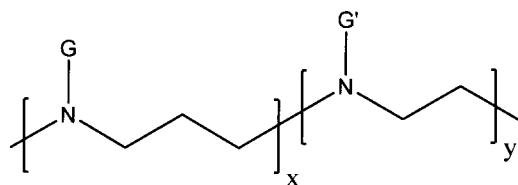
前記ポリマー中のメトホルミン残基の w t % は少なくとも 0.001 % である、ポリマー

。

【請求項 5 6】

式：

【化 1 2】



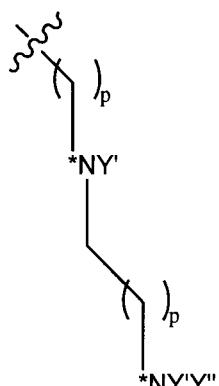
10

を有するブロックコポリマーであって、

式中、x は約 0.1 から約 0.9 であり、y は約 0.1 から約 0.9 であり、x および y は前記ポリマー中の各単位のモル分率を表し、x および y の合計は 1 であり、G および G' はともに、同じであっても、または異なってもよく、それぞれの場合において、

【化 1 3】

20



30

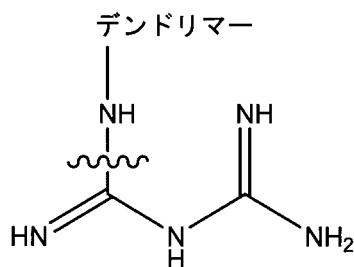
から成る群から選択され、式中 p は、それぞれの場合において、1 または 2 であり、* N はメトホルミンの残基またはエチルアミンもしくはプロピルアミンにより誘導体化されてもよい窒素であり、それらのいずれもそれら自体が * N を含み、Y' および Y'' は独立して水素、メトホルミンの残基、またはエチルアミンもしくはプロピルアミンであり、それらのいずれもそれら自体が * N を含み、前記ブロックコポリマーは、共有結合したメトホルミンの残基の % w t が 0.001 % w t / w t から 90 % w t / w t 超である、ブロックコポリマー。

【請求項 5 7】

40

構造：

【化 1 4】



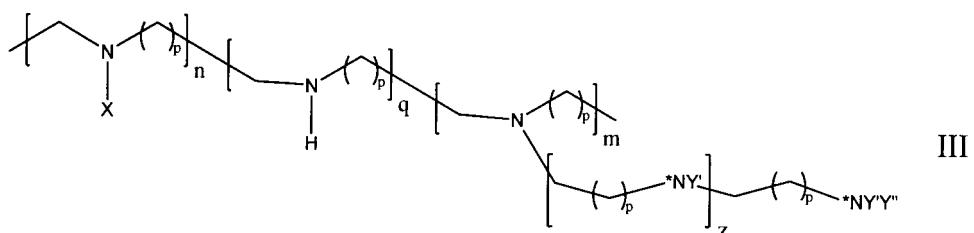
10

を有するデンドリマーであって、前記デンドリマーの第1級窒素の出現数のうちの少なくとも0.0001は、少なくとも1つのメトホルミンの残基との共有結合によって誘導体化されている、デンドリマー。

【請求項 5 8】

以下の化学式 I I I :

【化 1 5 】



20

を有するポリマーであって、式中、各 p は独立して 1 または 2 であり、 n は 0 . 1 から 1 . 0 であり、 q は 0 . 1 から 1 . 0 であり、 m は 0 . 1 から 1 . 0 であり、 n 、 q および m は前記ポリマー中の各単位のモル分率を表し、 n 、 q および m の合計は 1 であり、 z は 0 から 1 , 0 0 0 の整数であり、 *N はメトホルミンの残基またはエチルアミンもしくはプロピルアミンにより誘導体化されてもよい窒素であり、それらのいずれもそれら自体が *N を含み、 X は水素またはメトホルミンの残基であり、 Y' および Y'' は独立して水素、メトホルミンの残基、またはエチルアミンもしくはプロピルアミンであり、それらのいずれもそれら自体が *N を含む、ポリマー。

30

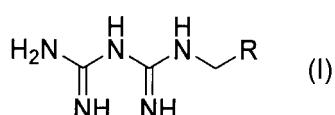
【請求項 5 9】

分子量は、約200から約6,000,000である、請求項5.8に記載のポリマー。

【請求項 60】

式 I :

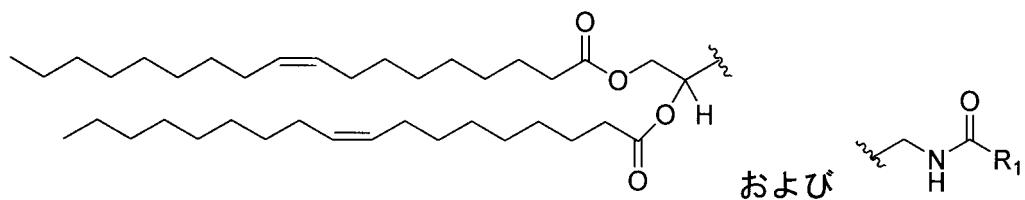
【化 1 6】



40

の化合物であって、式中、Rは、

【化17】



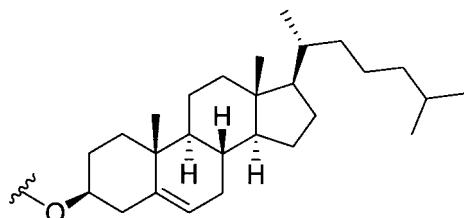
から成る群から選択され、R₁ はステロールである、化合物。

10

【請求項 6 1】

R₁ は、

【化18】



20

である、請求項 6 0 に記載の化合物。

【請求項 6 2】

脂質外膜および請求項 6 1 に記載の化合物を含むナノ粒子。

【請求項 6 3】

D O P E をさらに含む、請求項 6 2 に記載のナノ粒子。

【請求項 6 4】

前記脂質外膜によって包まれたヒアルロン酸または核酸をさらに含む、請求項 6 3 に記載のナノ粒子。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

政府支援の陳述

本発明は、米国国立衛生研究所によって授与された助成金第 C A 1 5 1 6 5 2 号、第 C A 1 4 9 3 6 3 号および第 D K 1 0 0 6 6 4 号のもと政府支援を受けてなされた。政府は、本発明に一定の権利を有する。

【0 0 0 2】

本発明は、本明細書においてポリ - メトホルミン (P o l y M e t) と呼ぶ共有結合したメトホルミン残基を含むポリマーおよび巨大分子に関し、これは、それ自体が治療用薬剤の特性を有し、その他の治療用薬剤のための送達媒体として、およびトランスフェクション剤としても使用することができる。

40

【背景技術】

【0 0 0 3】

メトホルミンは、2型糖尿病の処置に経口で有効である。メトホルミンは、糖尿病の治療的処置用に米国食品医薬品局によって認可されている。メトホルミンの化学名は、N,N-ジメチルイミドジカルボンイミド酸ジアミドである。これは、その塩酸塩の形態、1,1-ジメチルビグアニド塩酸塩として現在米国において販売されている血糖降下剤ビグアニドである。

【0 0 0 4】

メトホルミンは、細胞レベルでインスリンの作用を向上させるが、インスリン分泌には

50

影響を及ぼさないことが知られている。メトホルミンは、体重増加を助長せず、いくつかの心血管リスク因子に対して有益な効果を有する。したがって、メトホルミンは、2型糖尿病の大半の患者に対し選択される薬物と一般に考えられている。

【0005】

糖尿病の薬物としてのメトホルミンの有効性にもかかわらず、メトホルミンには、それでもなおいくつかの欠点がある。メトホルミンが糖尿病のための第一選択の治療法であるが、血漿からのその急速なクリアランスにより、有効な血漿中濃度を継続させるためには複数回の高用量が必要となる。特に、メトホルミンは小腸において効果的に吸収されるが、結腸ではあまりよく吸収されない(Marathé, Br. J. Clin., Pharmacol., 50, 325-332 (2000))。結果として、メトホルミンの効果的な血漿中濃度に対する時間ウィンドウが制限される。この狭い吸収ウィンドウのため、メトホルミンは一般に1日に約2~3回服用するように処方される。

10

【0006】

この理由およびその他の理由のため、メトホルミンには完全に活用されていない潜在的な用途がある。本開示は、こうした弱点の多くに対処する。

【発明の概要】

【0007】

本明細書においてメトホルミン残基を含むポリマー(「PolyMet」)が提供される。PolyMetは、有用な治療用薬剤、送達媒体および核酸などの遺伝物質のためのトランスフェクション剤である。

20

【0008】

本明細書において、対象の疾患または望ましくない状態の処置のための方法であって、疾患または状態と戦うための治療用薬剤としてPolyMetを投与するステップを含む方法も提供される。

【0009】

本明細書において、対象の疾患または望ましくない状態の処置のための方法であって、PolyMetを含むナノ粒子などの送達媒体中の治療用薬剤を投与するステップを含む方法も提供される。

【0010】

本明細書において、PolyMetを作製するための方法もさらに提供される。

30

【0011】

これらの態様およびその他の態様は、下の完全な詳細において開示される。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1A】220から300 nmの範囲のメトホルミン、PEIおよびPolyMetのUVスペクトルを示すグラフである。PolyMetおよびメトホルミンはともにおよそ230 nmの最大吸光度を有し、このことは、これらがともに類似の機能的構造を有するが、PEIは有さなかつたことを示唆する。

【図1B】メトホルミン、PEIおよびPolyMetの細胞毒性を示すグラフである。H460細胞の可用性は、メトホルミン、PolyMetおよびPEI溶液への曝露の24時間後にMTTアッセイを使用して判定した。データは平均±S.D.である(n=8)。

40

【図1C】PEIおよびPolyMetの最大耐用量(MTD)を示す表である。CD-1マウスに0.9%NaCl溶液中のさまざまな濃度のポリマーをIV注射した。IV注射の24時間以内の*MTDは、任意の致死量より0.5 mg/kg低い。各用量において少なくとも3匹のマウスを試験した。

【図2】PEIおよびPolyMetのMALDI-TOF質量スペクトルを示すグラフである。ジトラノール(THF中20 mg/ml、NaTFA 1 mg/ml)をサンプルと混合し、サンプル調製のために-シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸を使用した。PEIに関して30%を超える強度のシグナルが515.4から1244.1(m/z)の

50

間の範囲の広範囲にわたって見出された。PolyMetのスペクトルの30%を超える強度のシグナルが670.5から3820.2(m/z)に現れた。PEIのスペクトルのピークの位置と比較して、PolyMetのスペクトル分解のスペクトルのピークはより高い質量範囲の方にシフトした。そのようなシフトは、PolyMetの分子量がPEIよりも大きいことを示し、このことは、PEIのジシアンジアミドによる修飾が成功したことを示唆した。

【図3】複合体の製剤化の最適化を示すグラフである。複合体の粒子サイズ(青)およびゼータ電位(赤)に関するPEI-HA(A)およびPolyMet-HA(B)のN/P比の影響。

【図4A】PolyMet/HA複合体の略図である。

【図4B】LPH-PolyMetの略図である。

【図4C】PolyMet/HA複合体の代表的な透過型電子顕微鏡(TEM)画像である。

【図4D】LPH-PolyMetの代表的な透過型電子顕微鏡(TEM)画像である。

【図4E】ナノ粒子の動的光散乱(DLS)測定値を示す表である。

【図5A】全血の血液学的試験を示す表である。データは平均±S.D.である(各群あたりn=5)。

【図5B】血清の血液生化学的試験を示すグラフである。データは平均±S.D.である(各群あたりn=5)。

【図5C】PBS、メトホルミン、LPH-PEIおよびLPH-PolyMetの注射後に採取した主要な臓器のH&E染色を示す図である。

【図6】図6Aは、メトホルミンおよびPolyMetがH460腫瘍増大を抑制することを示す図である。PBS、メトホルミン、LPH-PEIおよびLPH-PolyMetを1日おきに静脈内投与し、最後の注射の24時間後にマウスを屠殺した。図6Aでは、毎日、腫瘍体積を測定した。図6Bは、最後の注射の翌日に腫瘍重量を測定し、腫瘍量の百分率を求めるために体重と比較した図である。図6Cは、最終時点における各処置群のH460腫瘍サイズの視覚的な観察結果を示す図である(各群あたりn=5)。

【図7】図7Aは、AMPKの活性化、mTOR経路の阻害による腫瘍増大のメトホルミンおよびPolyMetの抑制を示し、図7Bは、オートファジーおよびアポトーシスメカニズムの誘導を示す図である。H460腫瘍があるマウスに1日おきにIV注射をし、2回目の注射の24時間後に腫瘍タンパク質の分析の準備をした。オートファジーを受けた細胞を、LC3b抗体(赤)によって着色し、細胞のアポトーシスはTUNELアッセイによって示した(緑)。核は青に着色される。パーセンテージは、それぞれLC3b陽性細胞(赤)の平均パーセンテージおよびTUNEL陽性細胞(緑)のパーセンテージを指す。ランダムに選択された5つの顕微鏡視野をImageJにより定量的に解析した。データは平均±S.D.である(各群あたりn=5)。

【図8】さまざまなLPHナノ粒子のin vitroおよびin vivoにおける遺伝子サイレンシング効果を示す図である。in vitro試験に関しては、図8Aに示したとおり、H460/Luc細胞をさまざまな用量のsiRNAを用いたさまざまなLPH製剤とともに37℃で4時間インキュベートした。インキュベーションの終わりに、細胞をPBSで洗浄し、siRNAを含まない培地でさらに24時間培養した。細胞のルシフェラーゼ活性を分析し、タンパク質によって正規化した。^{*}p<0.05、^{**}p<0.01、^{***}p<0.001。データは平均±S.D.である(各群あたりn=8)。in vivo試験に関しては、PolyMetから構成されるLPHナノ粒子は、抗アポトーシス性BCL2 siRNAを腫瘍部位に全身的に送達し、腫瘍増大を抑制することができる。H460腫瘍をもつマウスに1日おきに静脈注射をした。図8Bは、ウエスタンプロット分析によって測定した、2回の注射後の腫瘍のBCL2タンパク質レベルを示す。図8Cは、毎日測定した腫瘍体積を示す。図8Dは、in vivoにおけるさまざまな製剤中のsiRNAによる処置後のH460腫瘍細胞におけるTUNEL染色を示す。パーセンテージは、TUNEL陽性細胞(緑)の平均パーセンテージを指す。ラ

10

20

30

40

50

ンダムに選択された5つの顕微鏡視野をImageJにより定量的に解析した。データは平均±S.D.である(各群あたりn=5)。対照に対して*P<0.05、**P<0.01。

【図9】PolyMetから構成されるLPHナノ粒子は、抗アポトーシス性VEGF siRNAを腫瘍部位に全身的に送達し、腫瘍増大を抑制したことを言及する図である。H460腫瘍をもつマウスに1日おきに静脈注射をした。図9Aは、ウエスタンプロット分析によって測定した2回の注射後の腫瘍VEGFタンパク質レベルを示す。図9Bは、毎日測定した腫瘍体積を示す。図9Cは、in vivoにおけるさまざまな製剤中のsiRNAによる処置後のH460腫瘍細胞におけるTUNEL染色を示す。パーセンテージは、TUNEL陽性細胞(緑)の平均パーセンテージを指す。ランダムに選択された5つの顕微鏡視野をImageJにより定量的に解析した。データは平均±S.D.である(各群あたりn=5)。対照に対して*P<0.05、**P<0.01。図9Dは、マウスにおけるLPH-PolyMet-siVEGFサイレンシングを示す。

【図10】示したN/P比の(A)L-PEIおよびL-PolyMetならびに(B)B-PEIおよびB-PolyMetのトランスフェクション効率を示すグラフである。ルシフェラーゼpDNA濃度は、96ウェルプレートにおいて0.5μg/ウェルであった。データは平均±S.D.である(各群あたりn=6)。

【図11】遺伝子送達特性の図である。

【図12】LPH-PolyMetを使用したsiRNA送達の図である。

【図13】LPH-PolyMetを使用したpDNA送達の図である。

【図14】H460細胞におけるルシフェラーゼプラスミド活性を示すデータである。

【図15】H460細胞におけるRFPプラスミド活性を示すデータである。

【図16】H460異種移植片におけるさまざまなLPHナノ粒子のin vivoでの遺伝子サイレンシング効果を示すデータである。図16Aでは、H460腫瘍をもつマウスに1日おきに静脈注射をし、毎日、腫瘍体積を測定した。図16Bは、最終時点における各処置群のH460腫瘍を示す。図16Cでは、8回の注射後のH460腫瘍VEGFタンパク質レベルをウエスタンプロット分析によって測定した。図16Cの棒グラフは、ImageJを使用した正規化されたVEGFバンド強度の定量分析を表す。データは、チュークーの補正を伴う二元配置ANOVAによって分析された平均±SEM(各群あたりn=5)である。データは、3つの独立した実験を組み合わせたもの(A)またはその代表的なもの(BおよびC)からされる。n.s.=有意でない、*P<0.05、**P<0.01、***P<0.005。

【図17】H460腫瘍をもつマウスに、1日おきにメトホルミンおよびPolyMetまたはPEIから構成されるLPHナノ粒子の静脈注射をした。毎日、腫瘍体積を測定した。データは、チュークーの補正を伴う二元配置ANOVAによって分析された平均±SEMである。データは、3つの独立した実験を組み合わせたものである。各実験の1群あたり5匹のマウス、n.s.=有意でない、*P<0.05、**P<0.01、***P<0.005。

【図18】異なる分子量のPEIおよびPolyMet-LPHナノ粒子の腫瘍増大に対する効果を示すグラフである。H460腫瘍をもつマウスに1日おきに静脈注射をし、毎日、腫瘍体積を測定した。各実験の1群あたり5匹のマウス、n.s.=有意でない、*P<0.05、**P<0.01、***P<0.005。

【図19】H460異種移植片における異なる分子量のPEIおよびPolyMet-LPHのin vivoでの遺伝子サイレンシング効果を示すグラフである。H460腫瘍をもつマウスに1日おきに静脈注射をし、毎日、腫瘍体積を測定した。各実験の1群あたり5匹のマウス、n.s.=有意でない、*P<0.05、**P<0.01、***P<0.005。

【図20A】コレステリルクロロホルメートの¹H NMR(1)および¹³C NMR(2)スペクトルの図である。

【図20B】コレステリルエチレンジアミンの¹H NMR(1)および¹³C NMR

10

20

30

40

50

(2)スペクトルの図である。

【図20C】コレステリルビグアニド(コレステリルメトホルミン)の¹H NMR(1)および¹³C NMR(2)スペクトルの図である。

【図21A】MET-Chol/DOPPEのリポソームのTEM形態を示す図である。

【図21B】EDA-Chol/DOPPEのリポソームのTEM形態を示す図である。

【図22】異なるプロタミン/HA/siRNAのN/Pモル比におけるPHのsiRNAと結合する能力のゲル遅延度アッセイを示す図である。

【図23】プロタミン/(HA+siRNA)比のPHコアのサイズおよび封入効率に対する影響を示すグラフである。

【図24】さまざまな製剤の特徴を示す表である。

【図25】(図25A)PHコアおよびEDA-Chol/DOPPE(図25B)およびMET-Chol/DOPPE(図25C)からの対象のLPH-NPのTEM形態を示す図である。本明細書中で使用される場合、PHはプロタミン+ヒアルロン酸複合体を指す。LPH-NPは、脂質・ポリカチオン・ヒアルロン酸ナノ粒子を指す。EDA-Cholは、エチレンジアミンコレステロールを指す。MET-Cholは、メトホルミン修飾コレステロールを指す。DOPPEは、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミンを指す。

【図26A】さまざまな製剤による処置後のH460異種移植片を有するマウスモデルの腫瘍増大の抑制を示すグラフである。

【図26B】最後の注射後の日に腫瘍重量を測定し、腫瘍量の百分率を求めるために体重と比較したグラフである。

【図27A】さまざまなsiRNA製剤による処置後のH460異種移植片を有するマウスモデルの腫瘍増大の抑制を示すグラフである。

【図27B】最後の注射後の日に腫瘍重量を測定し、腫瘍量の百分率を求めるために体重と比較したグラフである。

【図28A】最後の注射の24時間後に分析した腫瘍におけるp-AMPKおよびp-mTORタンパク質の発現を示す図である。

【図28B】最後の注射の24時間後に分析した腫瘍におけるVEGFタンパク質の発現を示す図である。

【図29】さまざまな製剤によって誘導されたアポトーシスのTUNELアッセイを示す図である。

【図30】さまざまなsiRNA製剤によって誘導されたアポトーシスのTUNELアッセイを示す図である。

【図31】さまざまな製剤の処置後の主要な臓器のH&E染色を示す図である。

【図32】マウスにおけるCy-3標識siRNAを含むさまざまな製剤の体内分布を示す図である。

【図33】H460異種移植片モデルの腫瘍におけるCy-3標識siRNAを含むさまざまな製剤の分布を示す図である。

【図34】合成がスキーム3に記載されているDOB-PのNMRスペクトルを示す図である。

【図35】さまざまな製剤の特徴的なパラメーターを示す表である(DLS)。Lipo-DOTAPは、プロタミン/ヒアルロン酸コアとDOTA/コレステロール脂質コーティングから構成される。Lipo-DOB-Pは、プロタミン/ヒアルロン酸コアとDOB-P/コレステロール脂質コーティングから構成される。

【図36】in vitroにおける空のリポソームの抗腫瘍活性を示すグラフである(MTT)。空のリポソームとは、DNAを装填していないLPH-DOTAPおよびLPH-DOB-Pを指す。

【図37】空のリポソーム(5mg/kgのメトホルミン)のin vivoにおける抗腫瘍活性を示す図である。

【図38】さまざまなLPHナノ粒子のアポトーシス(TUNELアッセイ)を示す図で

10

20

30

40

50

ある。

【図39】さまざまなLPHナノ粒子の血清の血液生化学的試験を示すグラフである。

【図40】さまざまなLPHナノ粒子の処置後のH&E染色した臓器切片を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0013】

次に本開示の主題が、以降さらに十分に記載される。ただし、前述の説明において提示されている教示の利益を有する、本明細書中に記載されている本開示の主題の多くの改変形態および他の実施形態が、本開示の主題が属する分野の当業者には思い浮かぶであろう。したがって、本開示の主題は開示されている特定の実施形態に限定されるものではなく、改変形態および他の実施形態は添付の特許請求の範囲内に含まれることが意図されると解釈されるべきである。

【0014】

2型糖尿病を処置するために使用される最も有効な薬物の1つであるメトホルミン(N',N'-ジメチルビグアニド)は、さまざまなタイプのがんに対する治療用薬剤としての可能性も有する。(Morales, D. R. & Morris, A. D. Metformin in Cancer Treatment and Prevention. Annual review of medicine (2014))。この化合物およびその調製については、例えば、米国特許第3,174,901号に開示されている。メトホルミン塩酸塩も商業的に購入することができる。

【0015】

薬物送達のための薬理学的活性を有する新規の材料を使用することは、治療有効性を相乗的に向上させる可能性があるであろう。本明細書において、まとめてPolyMetと呼ぶポリマーメトホルミン、すなわち、メトホルミンの残基を含むポリマーの設計および合成が開示される。実施形態において、ポリマーは非活性炭素骨格を介してコンジュゲートするため、生物活性のグアニジン部分がメトホルミンとして本質的に利用可能であり、PolyMetはがんの処置に対する新しい機会をもたらす。さらに、PolyMetは、遺伝子送達を向上させることができる。グアニジウム基を含むポリマーは、そのアミンを含む対応物よりも高い遺伝子送達効率を有する(Zhang, R., Zheng, N., Song, Z., Yin, L. & Cheng, J. The effect of side-chain functionality and hydrophobicity on the gene delivery capabilities of cationic helical polypeptides. Biomaterials 35, 3443-3454 (2014). Nimesh, S. & Chandra, R. Guanidinium-grafted polyethyleneimine: an efficient transfecting agent for mammalian cells. European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e. V 68, 647-655 (2008)).

【0016】

PolyMetは、それ自体が薬理学的活性および治療的活性を有する薬物送達媒体である。したがって、PolyMetは、治療有効性を相乗的に向上させることができる。PolyMetは、in vitroおよびin vivoにおけるPEIの細胞毒性を劇的に低下させた。そのポリカチオン活性があれば、PolyMetはまた、LPH(リポソーム・ポリカチオン・ヒアルロン酸)ナノ粒子(「LPH-PolyMet」)に製剤化することもできる。本明細書中で示されるとおり、メトホルミンおよびLPH-PolyMetナノ粒子はともに、がんの発症を著しく抑制する。これは、AMP活性化プロテインキナーゼ(AMPK)の活性化、mTOR経路の阻害、ならびに/またはオートフ

10

20

30

40

50

アジーおよびアポトーシスの誘導に起因する可能性もある。LPH-PolyMetナノ粒子はまた、siRNA分子のための送達媒体として使用することもできるため、遺伝子送達を容易にする。したがって、PolyMetは、がんの治療において多くの用途を有する。さらに、PolyMet自体、プラスミドDNAなどの遺伝物質の細胞へのトランスフェクションを促進することができる。したがって、PolyMetは、それ自体が薬物であり、他の薬物を送達するための薬物担体およびトランスフェクション剤である。

【0017】

PolyMetによって他の利点も提供される。特に、PolyMetは、PEIと比較して劇的に低い細胞毒性(図1C)および高い最大耐用量(MTD、図1D)を有し、このことは、メトホルミンの残基を含むPolyMetが第2級アミンを含むその対応物よりも毒性が低いことを示す。

10

【0018】

本明細書に十分に記載されるとおり、PolyMetは、少なくとも以下を提供する。

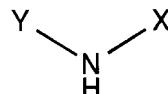
1. 抗糖尿病薬および抗腫瘍薬としての治療特性、
2. 特に、抗がん薬およびsiRNA、pDNA、mRNAなどのヌクレオチド化合物などの治療用薬剤送達特性、および
3. 特に、抗がん薬および巨大分子、例えば、ペプチド、タンパク質などの治療用薬剤送達特性。

【0019】

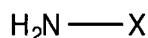
本明細書中で使用される場合、「PolyMet」という用語は、メトホルミンのポリマー、すなわち、メトホルミンの残基を含むポリマーまたは巨大分子を指し、その構造は本明細書中の別の場所に記載されている。このポリマーは、広い範囲の分子量を有することができる。PolyMetのこの態様および他の態様は、以下に十分に記載される。PolyMetは、

20

【化1】



または



30

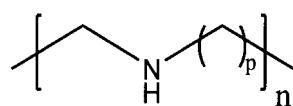
などの利用可能な第1級および/または第2級アミンを有する炭素鎖から調製することができ、式中、X、Yはn個の炭素を含有する直鎖または分岐のいずれかの炭化水素であり、nは、2から50,000、2から40,000、2から30,000、2から20,000、2から10,000、2から5,000、2から4,000、2から3,000、2から2,000、2から1,000、2から500、2から200、2から100、または2から50の整数である。本明細書に記載されるとおり、ポリ-メトホルミン(PolyMet)は、直鎖または分岐ポリエチレンイミン(PEI)、ポリプロピレンイミン(PPI)、任意の既知のポリマー、デンドリマーおよびジシアソジアミドの反応によってメトホルミンの残基を含むよう合成することができる。

40

【0020】

本明細書中で使用される場合、「PEI」はポリエチレンイミンを指し、「PPI」はポリプロピレンイミンを指す。以下の式は、pが1である場合のPEI、およびpが2である場合のPPIを表す。

【化2】

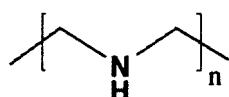


【0021】

P E I は、 P o l y M e t の調製のための有用な出発材料である。 P E I は、直鎖または分岐であってもよい。直鎖 P E I は、以下の化学構造：

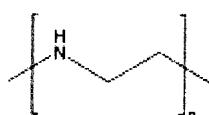
10

【化3】



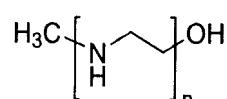
を有し、これは、当該技術分野において：

【化4】



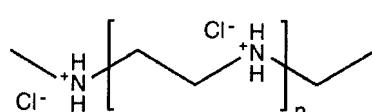
20

または

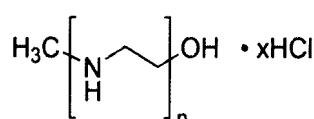


または

30



または



40

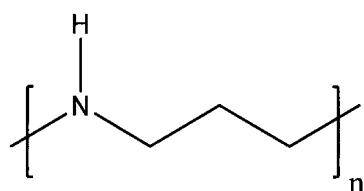
としても知られている。

上記構造において、nは、2から10, 000以上の整数である。

【0022】

本明細書中で使用される場合、「P P I」はポリプロピレンイミンを指す。これは、P o l y M e t の調製のための有用な出発材料である。P P I は、直鎖または分岐であってもよい。直鎖 P P I は、以下の化学構造：

【化5】



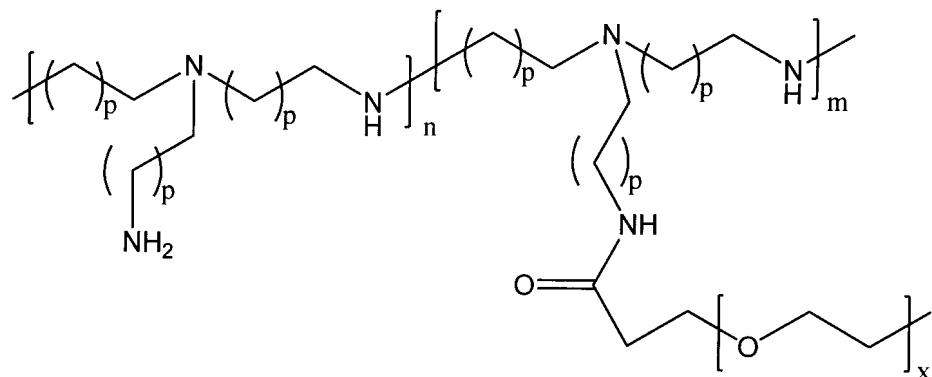
を有し、式中、 n は、2から10,000の整数である。

【0023】

10

ペグ化PEIまたはPPI誘導体の例は、構造：

【化6】



20

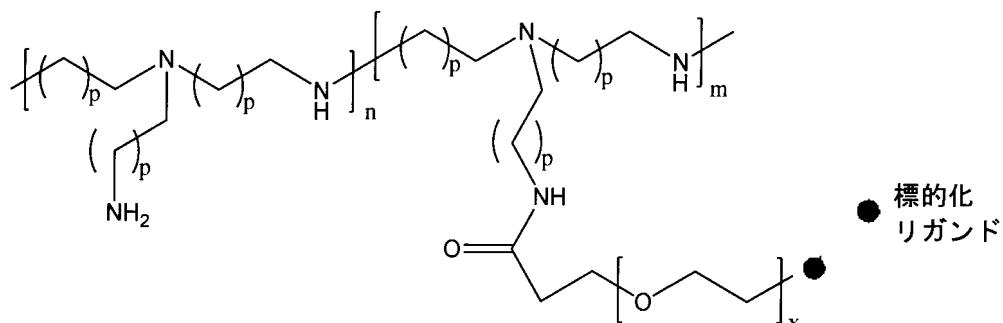
を有し、式中、 m は約0.1から約0.9であり、 n は約0.1から約0.9であり、 m および n はポリマー中の各単位のモル分率を表し、 m および n の合計は1であり、 p は1または2であり、 x は1から約500の整数である。PEIポリマーでは、 p は1である。PPIポリマーでは、 p は2である。

【0024】

30

標的化修飾を有するペグ化PEIまたはPPI誘導体の例は、構造：

【化7】



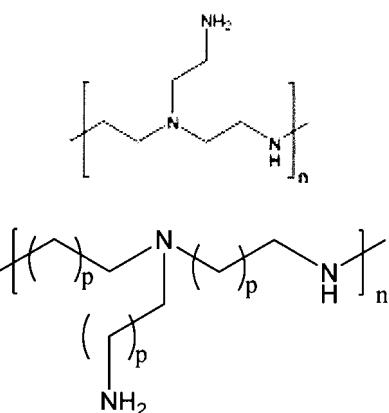
40

を有し、式中、 m 、 n 、 p および x は、上記のとおりである。

【0025】

分岐PEIまたはPPIは、骨格PEI/PPIに対するペンドントエチルアミン単位もしくはPEI部分またはペンドントプロピルアミン単位もしくはPPI部分をさらに含むPEIあるいはPPIモノマー単位を指す。非限定例は、

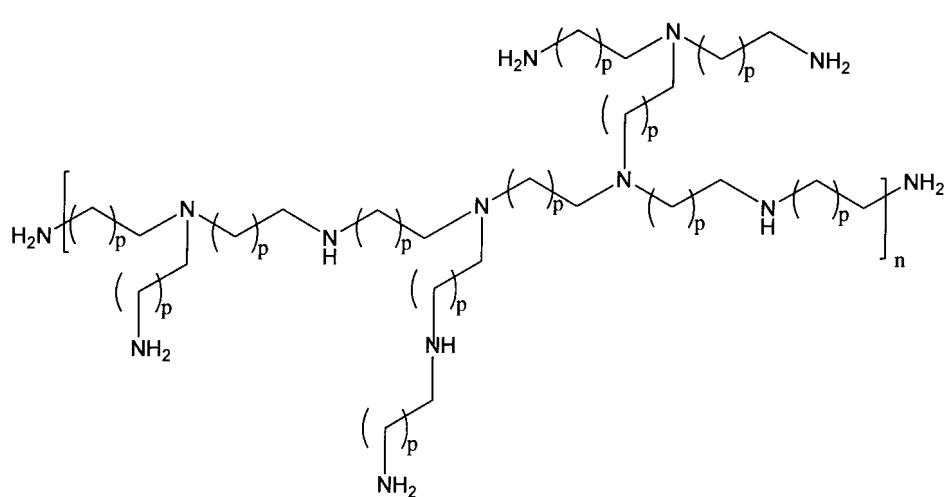
【化 8】



10

であり、式中、PEIポリマーでは、pは1であり、PPIポリマーでは、pは2であり

【化 9】



20

30

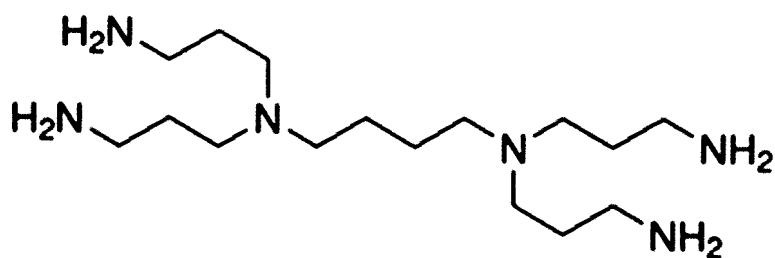
式中、nは、pは1である分岐PEI構造またはpが2であるPPI構造中の繰り返し単位の数である。nの有用な値は、2から約1,000,000、2から約500,000、2から約100,000、2から約50,000、2から約25,000、2から約10,000、2から約5,000、2から約1,000以下である。分岐PEIまたはPPIは、利用可能な任意の窒素と共有結合したさらなるエチルアミン単位もしくはPEI部分またはさらなるプロピルアミン単位もしくはPPI部分を含んでもよい。そのような直鎖または分岐PEI/PPIは、商業的に入手可能であるか、または既知の方法を使用して容易に得られる。それぞれの場合において、PEIのサイズまたは分子量(MW)は、整数「n」によって示すことができ、本明細書中の別の場所に記載されている。上記の構造において、任意の水素がメトホルミンの残基によって置換されてもよい。

40

【0026】

ポリプロピレンイミン(PPI)の具体的な例としては、PPI世代1：

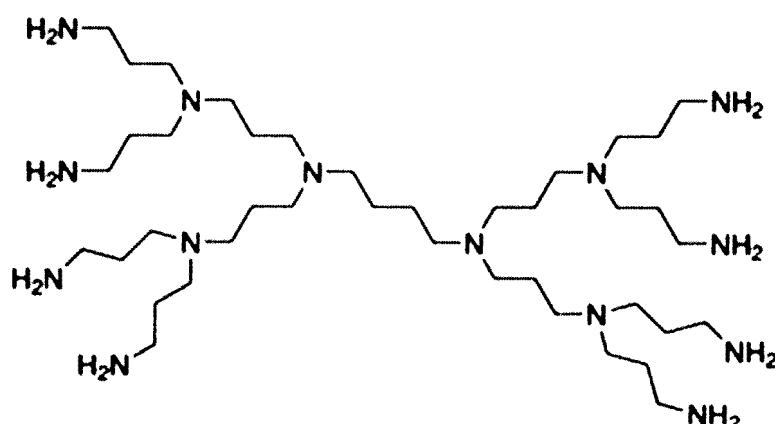
【化10】



10

ポリプロピレンイミン(PPI)、世代2:

【化11】



20

が挙げられ、これらはこの分野で知られ、本明細書中の別の場所で述べられており、さらなる世代が調製されてもよく、それによりそれぞれの後に続く世代において、最も外側の第1級窒素がさらに分岐してデンドリマーを形成し、それは下で述べられる。

【0027】

デンドリマーは、多くの反応基を有する密集した分岐構造を有するポリマーであり、この反応基は本開示においては第1級および第2級窒素を指す。樹状ポリマーは、繰り返し単位のいくつかの層または世代を含み、このすべてが1つ以上の分岐点を含む。樹状超分岐ポリマーを含むデンドリマーは、少なくとも2つの反応基を有するモノマー単位の縮合反応によって調製される。デンドリマーは、一般に末端表面基、2つ以上の分岐官能基を有する内部分岐連結点、および近くの分岐した連結点に共有結合した二価の連結部から成る。

【0028】

デンジマーおよびデンドロンの例、ならびにそれらを合成する方法は、米国特許第4,507,466号、同第4,558,120号、同第4,568,737号、同第4,587,329号、同第4,631,337号、同第4,694,064号、同第4,713,975号、同第4,737,550号、同第4,871,779号および同第4,857,599号に記載されている。超分岐ポリマーの例およびそれを調製する方法は、例えば、米国特許第5,418,301号に記載されている。PolyMelt巨大分子を調製するための誘導体化に適したデンドリマーの非限定例は、ポリプロピレンイミンデンドリマー、ポリアミドアミン(PAMAM)デンドリマー、ポリアリールエーテルデンドリマー、ポリリジンデンドリマー、ポリエステルデンドリマー、ポリアミドデンドリマー、樹状ポリグリセロール、およびトリアジンデンドリマーである。デンドリマーは、デンドリマーを構成するポリマーによって、デンドリマーに存在する化学的部分および/またはデンドリマーの分子量によって定義することができる。本明細書において提供されるとおり、デンドリマーのサイズおよび表面官能基は、アミンのパーセント誘導体化に影響を及

30

40

50

ぼす可能性がある。

【0029】

デンドリマーは、収束的合成または分岐的合成によって調製することができる。デンドリマーの分岐的合成は、規則正しい配置を作り出すために、放射状に外側に向かう、連続的な一連の幾何学的に進行する段階的な、分枝への分枝の付加により行われる分子の成長プロセスを含む。したがって、それぞれの樹状巨大分子は、セルのそれぞれが1つの分岐連結点を含む、コアセル、内部セルの1つ以上の層、および表面セルの外層を含むといってよい。このセルは、化学構造および分岐官能基が同じであってもよく、または異なってもよい。表面分岐セルは、化学的に反応性の官能基または不活性の官能基のいずれかを含んでもよく、化学的に反応性の表面基は、樹状成長のさらなる延長のため、または樹状分子表面の修飾のために使用することができる。樹状表面を物理的修飾のため、例えば、親水性末端に対する疎水性末端の割合を調節し、かつ/または特定の溶媒に対する樹状ポリマーの溶解度を向上させるために化学的に不活性な基が使用されてもよい。

10

【0030】

デンドリマーの収束的合成は、デンドロンまたはデンドリマーの表面になるものから開始し、焦点またはコアに向かって放射状に進行する成長プロセスを含む。樹状ポリマーは、理想的なものである場合もあり、または非理想的、すなわち、不完全なものもしくは欠陥があるものである場合もある。不完全状態は、通常、不完全な化学反応または不可避の競合する副反応のいずれかの結果である。実際には、実際の樹状ポリマーは、一般に非理想的、すなわち、一定量の構造的不完全状態を含む。

20

【0031】

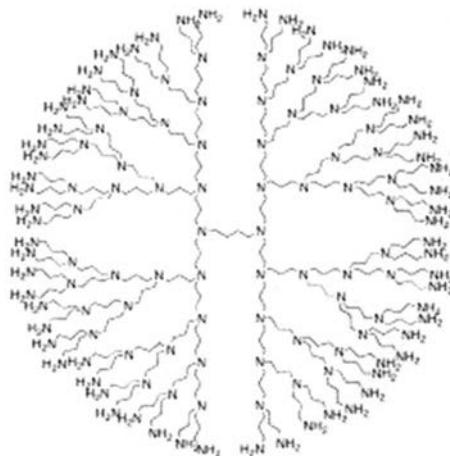
超分岐樹状ネットワークとは、非理想的で不規則な分岐を高いレベルで含む樹状ポリマーのクラスを指す。具体的には、超分岐ポリマーは、すべての繰り返し単位が分岐連結点を含む訳ではない比較的多い数の不規則な分岐領域を含む。デンドリマー、デンドロン、超分岐ランダムポリマー、制御された超分岐ポリマー、およびデンドリグラフトの調製および特徴づけについてはよく知られている。

【0032】

上記のとおり、デンドリマーは、繰り返して分岐した巨大分子である。デンドリマーは、一般に対称的な巨大分子である。本明細書中で使用される場合、デンドリマーは、外部または表面第1級アミノ基を含む。デンドリマーの非限定例は、以下のものである。

30

【化12】

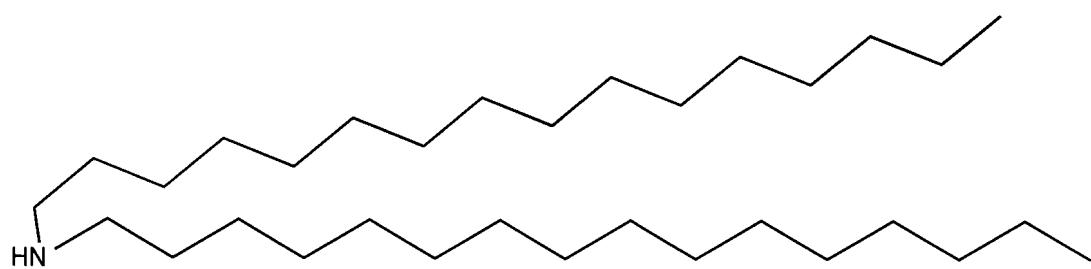


40

【0033】

さらに別の実施形態において、構造（遊離塩基）：

【化13】



10

を有するジヘキサデシルアミン（H C 1）、これは、誘導体化されてもよく、この場合、窒素上の水素が置換され、窒素がメトホルミンの残基と共有結合して、ビグアニド頭部基を有する二本鎖の両親媒性物質になる。

【0034】

本明細書中で使用される場合、「メトホルミンの残基」は、ポリマー骨格中または巨大分子足場中の窒素がメトホルミンの残基と一緒に本明細書に記載されるとおりポリマー鎖として共有結合したメトホルミン分子を形成することを意味する。ポリマー鎖中のそれぞれのメトホルミンは、任意の他の付近のメトホルミンと炭素を共有する場合がある。メトホルミンの残基の化学構造を以下に示す。

20

【0035】

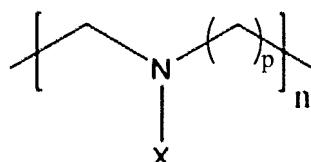
Poly Met の特有の特性を考慮して、本主題は、Poly Met の有用性を活用する以下の実施形態を対象とする。

【0036】

メトホルミンのポリマー

一実施形態において、本主題は、以下の化学式 I :

【化14】

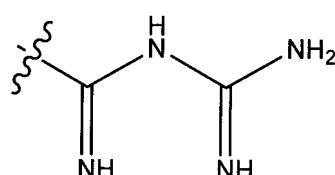


I

30

を有するメトホルミンのポリマー、Poly - MET を対象とし、式中、n は、2 から 100,000 または特に 2 から 10,000 以下の整数であり、p は 1 または 2 であり、X は、水素または式 :

【化15】



40

を有するメトホルミンの残基であり、Poly Met 中の X のうちの少なくとも 5 % はメトホルミンの残基である。ただし、有用な Poly Met は、X が、X の出現数のうちの少なくとも 0.0001、0.001、0.01、0.1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、

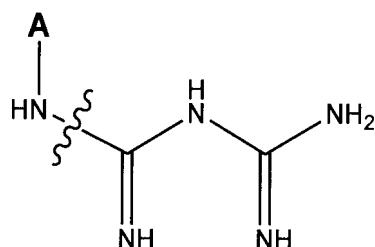
50

85、90、95または100%でメトホルミンの残基である。

【0037】

メトホルミンの残基がポリマーまたはデンドリマー上の第1級および第2級アミンと結合している場合、A上の窒素とともにこの残基はモノメチルビグアニドであってもよく、以下の一般構造：

【化16】



10

を有し、式中、Aは、ポリマー、特定の実施形態においては、デンドリマーを表す。

【0038】

上記PolyMetは、PolyMet中のメトホルミン残基の%wtが0.001%wt/wtから90%wt/wt超であってもよい。

【0039】

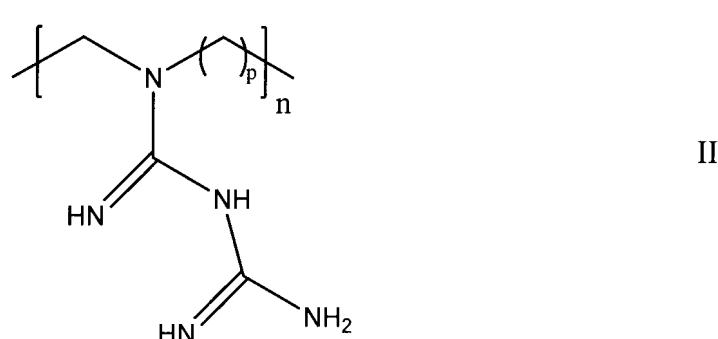
nの有用な値としては、2から約10,000、2から約5,000、2から約4,000、2から約3,000、2から約2,000、2から約1,000、2から約500、2から約250、50から約10,000、100から約9,000、500から約8,000、1,000から約7,000、1,500から約6,000、2,000から約5,000、および2,500から約4,500が挙げられる。

20

【0040】

一実施形態において、本主題は、以下の化学式II

【化17】



30

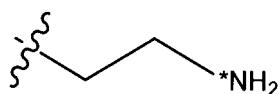
を有するメトホルミンのポリマー、Poly-METを対象とし、式中、pは1または2であり、nは2から100,000、特に2から10,000の整数である。

40

【0041】

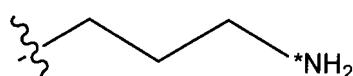
一実施形態において、本主題は、上記のとおりの化学式Iを有するメトホルミンの分岐ポリマー、Poly-METを対象とし、式中、Xは、水素、メトホルミンの残基、以下の化学式：

【化 1 8】



を有するエチルアミンの残基、または以下の化学式：

【化 1 9】



10

を有するプロピルアミンの残基であり、それぞれの場合において、^{*}N上の0個、1個または両方の水素は、a)エチルアミンもしくはプロピルアミンのさらなる残基(複数可)により置換され、それは、それぞれの場合において、同じ様式でさらに置換されてもよく、それにより(樹状である場合もある)ますます分岐した構造を形成し、かつ/またはb)メトホルミンの残基により置換されてもよく、その場合、分岐P E I / P P I 中の第1級^{*}Nの少なくとも5%がメトホルミンの残基により置換されている。特に有用なP o l y M e tは、分岐した骨格を有するP o l y M e tであって、^{*}Nが、^{*}Nの出現数のうちの少なくとも約0.0001、0.001、0.01、0.1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95または約100%でメトホルミンの残基と共有結合している、P o l y M e tである。

20

【 0 0 4 2 】

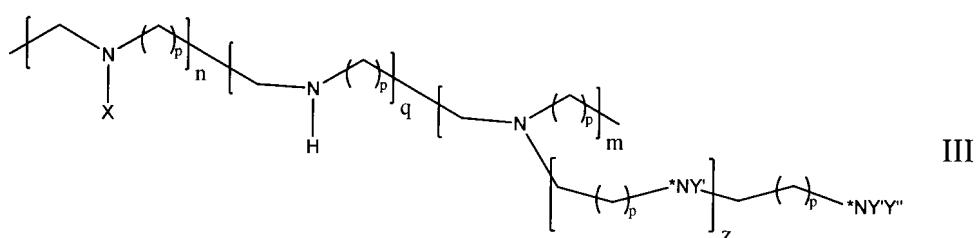
分岐 PolyMet は、分岐 PolyMet 中のメトホルミン残基の % wt が 0.001 % wt / wt から約 90 % wt / wt であってもよい。

【 0 0 4 3 】

分岐 PolyMet は、一般式 I I I :

【化 2 0】

30



のものを含み、式中、各 p は独立して 1 または 2 であり、 n は 0 . 1 から 1 . 0 であり、 q は 0 . 1 から 1 . 0 であり、 m は 0 . 1 から 1 . 0 であり、 n 、 q および m はポリマー中の各単位のモル分率を表し、 n 、 q および m の合計は 1 であり、 z は 0 から 1 , 0 0 0 の整数であり、 *N はメトホルミンの残基またはエチルアミンもしくはプロピルアミンにより誘導体化されてもよい窒素であり、それらのいずれもそれら自体が *N を含み、 X は水素またはメトホルミンの残基であり、 Y' および Y'' は独立して水素、メトホルミンの残基、またはエチルアミンもしくはプロピルアミンであり、それらのいずれもそれら自体が *N を含む。

40

【 0 0 4 4 】

式 I I I のポリマーおよびデンドリマーは、約 1 0 0 から約 6 , 0 0 0 , 0 0 0 、約 1 0 0 から約 5 0 0 , 0 0 0 、約 2 0 0 から約 2 5 0 , 0 0 0 、約 2 0 0 から約 2 0 0 , 0 0 0 、約 2 0 0 から約 1 0 0 , 0 0 0 、約 2 0 0 から約 5 0 , 0 0 0 、約 2 0 0 から約 1

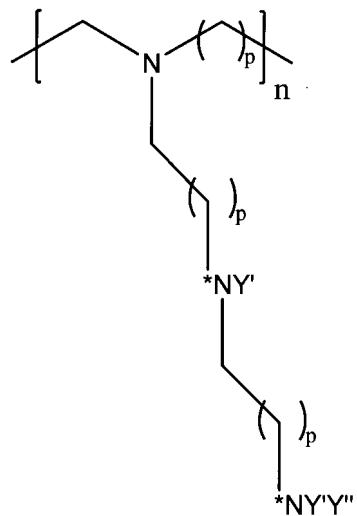
50

0, 000、約200から約5, 000、約200から約1, 000、約200から約800、約200から約700、約200から約600、および約200から約500の分子量を有してもよい。

【0045】

分岐PolyMetの非限定例としては、以下のものが挙げられ、

【化21】

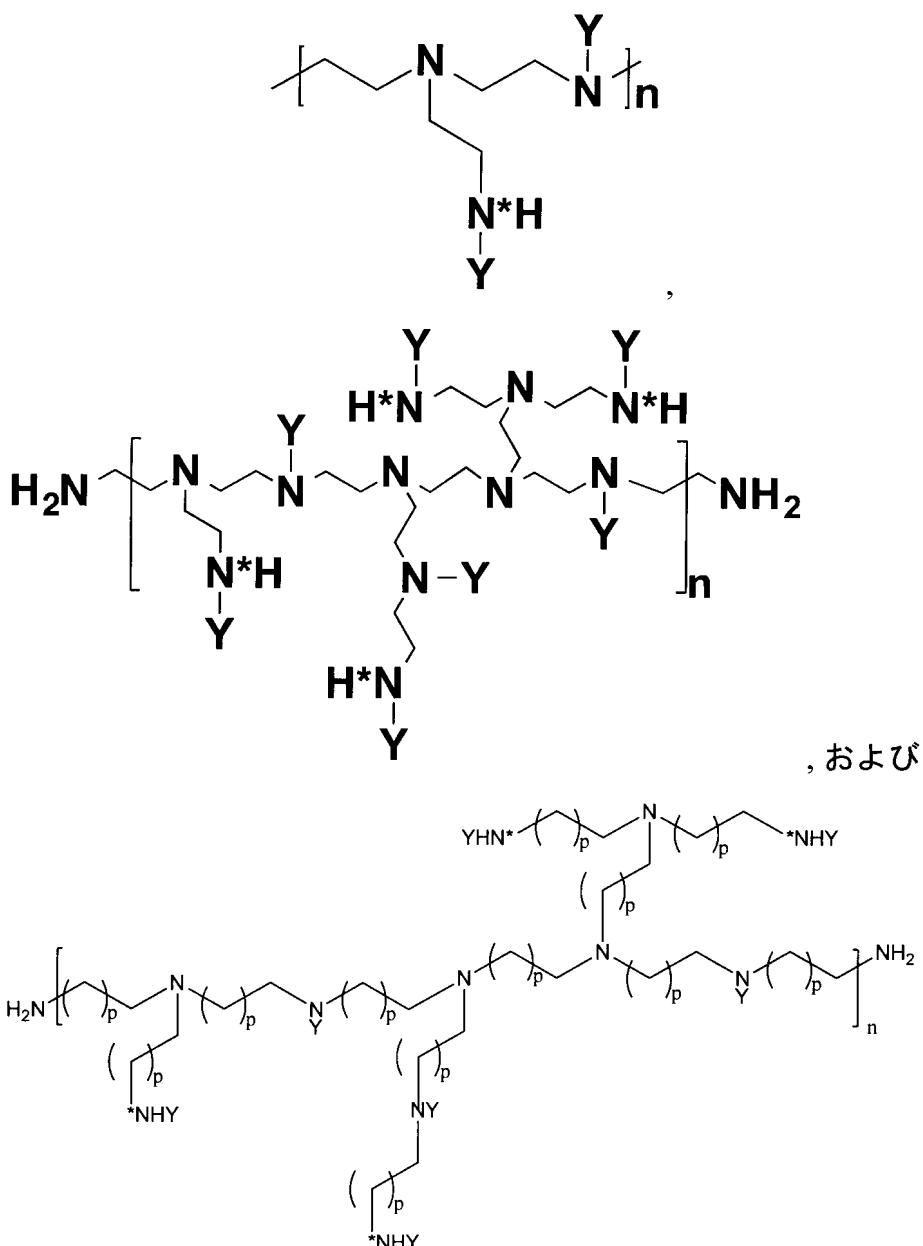


10

20

式中、pは1または2であり、

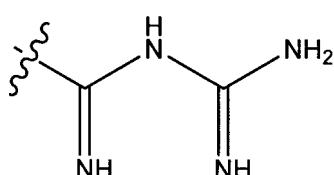
【化 2 2】



式中、 p は 1 または 2 であり、それぞれの場合において、 n は本明細書中の別の場所で記載されているとおりの整数であってもよく、 Y は、式：

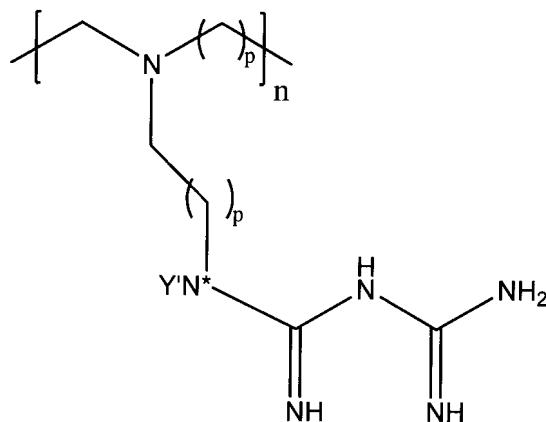
【化 2 3】

40



を有するメトホルミンの残基であり、ここでは、1 つの *N において、 Y はエチルアミンの残基またはプロピルアミンとして示されており、これは、さらに置換されてもよく、

【化24】



10

20

30

40

ここでは、1つの^{*} Nにおいて、Y"はメトホルミンの残基として示されている。

【0046】

^{*} Nのそれぞれの出現は、他のいかなる^{*} Nの出現とも無関係である。

【0047】

たいてい、それはメトホルミン部分に誘導体化されることになる分岐P E I中に初めに存在する第1級^{*} Nであり、これは、モノメチルビグアニドを含むことが意図される。また、分岐鎖P E Iは主に表面第1級アミンを含み、第2級および第3級アミンは内部であるため、P o l y M e tは主に表面モノメチルビグアニド基を含むことができる。したがって、直鎖および分岐鎖P o l y M e tの物理的および化学的特性は、P E I、P P I、ポリマーまたはデンドリマーに対して利用可能な化学反応を利用して調整することができる。

【0048】

したがって、ポリマー中に存在するメトホルミン残基の量は、骨格炭素を除外して、ポリマー全体の重量に対するメトホルミンの% w tとして示すこともできる。P o l y M e t中のメトホルミンの% w tは、0.0001% w t / w tから90% w t / w t超、少なくとも0.1% w t / w t、少なくとも0.5% w t / w t、少なくとも1% w t / w t、少なくとも2% w t / w t、少なくとも3% w t / w t、少なくとも4% w t / w t、少なくとも5% w t / w t、少なくとも10% w t / w t、少なくとも15% w t / w t、少なくとも20% w t / w t、少なくとも25% w t / w t、少なくとも30% w t / w t、少なくとも35% w t / w t、少なくとも40% w t / w t、少なくとも45% w t / w t、少なくとも50% w t / w t、少なくとも55% w t / w t、少なくとも60% w t / w t、少なくとも65% w t / w t、少なくとも70% w t / w t、少なくとも75% w t / w t、少なくとも80% w t / w t、および少なくとも85% w t / w tであってもよい。

【0049】

実施形態において、P o l y M e tは、ブロックコポリマー、例えば、P E I - P P I、およびペグ化ブロックコポリマーを含む。

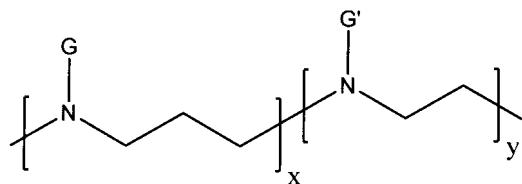
【0050】

実施形態において、このブロックコポリマーは、一般式：

【化25】

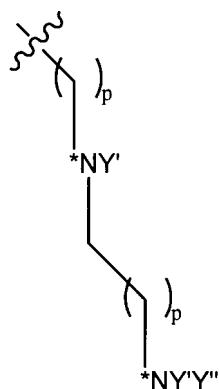
【化26】

【化 2 5】



を有し、式中、 x は約 0.1 から約 0.9 であり、 y は約 0.1 から約 0.9 であり、 x および y は、ポリマー中の各単位のモル分率を表し、 x および y の合計は 1 であり、 G および G' はともに、同じであっても、または異なってもよく、それぞれの場合において、
【化 2 6】

10



20

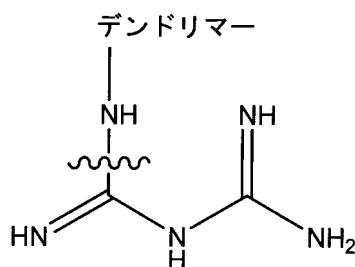
から成る群から選択され、式中、 p 、 $*N$ 、 Y' および Y'' は上で示されるとおりであり、水素、残基またはメトホルミン、エチルアミンもしくはプロピルアミンの残基のそれぞれはエチルもしくはプロピルアミンによりさらに置換されてもよく、それは、さらに置換されてもよく、メトホルミンの残基を含んでもよく、ブロックコポリマーは、共有結合したメトホルミンの残基の %wt が 0.001%wt / wt から 90%wt / wt 超、0.01%wt / wt から約 80%wt / wt、1.0%wt / wt から約 70%wt / wt、2.0%wt / wt から約 60%wt / wt、3.0%wt / wt から約 50%wt / wt、4.0%wt / wt から約 40%wt / wt、5.0%wt / wt から約 30%wt / wt、または 0.001% を超えるが約 60%、50%、40%、30%、20%、10% もしくは 5%wt / wt 未満の量である。
【0051】

30

実施形態において、PolyMet は、誘導体化デンドリマーである。デンドリマーの表面に第 1 級アミノ基がある。これらの第 1 級アミノ基、および場合によっては第 2 級アミノ基も、PolyMet のあるタイプを調製するための上記のとおりのメトホルミンの残基によるデンドリマーの誘導体化の部位である。実施形態において、本明細書に記載されている主題は、メトホルミンの残基と共有結合したデンドリマーに窒素を含む PolyMet を対象とする。誘導体化デンドリマーは、以下の構造：

40

【化27】



10

を有し、デンドリマーの第1級窒素の出現数の少なくとも0.0001、0.001、0.01、0.1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95または約100%で、メトホルミンの少なくとも1残基との共有結合によって誘導体化されている。上記の構造では、実施形態において、デンドリマー上のいくつかまたはすべての利用可能な第2級窒素（複数可）もメトホルミンの残基により誘導体化されてもよい。

【0052】

一部の実施形態において、本開示の主題は、外部または表面第1級アミンを含むポリプロピレンイミン（PPI）デンドリマーを提供する。これらの表面第1級アミン、およびある程度、外部の任意の第2級アミンおよび内部または表面下の任意の第1級および第2級アミンは、メトホルミン残基に誘導体化されてもよい。

20

【0053】

本明細書に記載されているいづれのPolyMetもペグ化されてよく、標的化リガンドを含んでもよい。パーセントペグ化は、PolyMetの約0.001%から約50%wt/wtであってもよい。

【0054】

PolyMetの特徴を試験するために、3つの製剤化を実施することができる。第1は、ジオレオイルホスファチジルセリン（DOPS）などの負に帯電した脂質を使用して（脂質・ポリカチオン・DNA）L PDを調製することである。L PDは、過剰な正電荷を有する、すなわち、PolyMetからの電荷がDNAまたはヒアルロン酸を超える高分子電解質コア複合体から調製されることになる。コアの周囲を包むためにDOPSリポソームがその後、添加されることになる。ただし、分岐鎖PolyMetは、さまざまな化学的性質を提供することができる。第2の製剤は、1,2-ジパルミトイル3-トリメチル-アンモニウムプロパン（DPTAP）などの正に帯電した脂質を使用して（リポソーム・ポリカチオン・ヒアルロン酸）L PHを調製することである。L PHは、過剰な負電荷を有する、すなわち、DNA/siRNAまたはヒアルロン酸からの電荷がPolyMetを超える高分子電解質コア複合体の最初の形成によって調製されることになる。コアの周囲を包むためにDOTAPリポソームがその後、添加されることになる。第3の製剤、いかなる脂質コーティングもない分岐鎖PolyMet/pDNA複合体が調製され、ポリプレックスのトランスフェクション能力を判定するために試験されてもよい。これは、分岐鎖PolyMetのプロトンスポンジ作用がエンドソームを溶解させ、DNAを細胞質に送達するのに十分であるかどうかを判定することができる。

30

【0055】

PolyMetに対する有用な分子量としては、約200から約6,000,000が挙げられる。PolyMetのサイズは、ポリマーを調製するために使用されるポリマー、PEI、PPIなどの分子量によって特定することができる。例えば、4kのMWまたは繰り返し単位n=93を有するPEIが「PolyMet₉₃」を調製するために使用され、これは、12KのMWを有する。有用なPolyMetは、約100(0.1k)から約6,000,000(1000k)の間のMWを有する。これらはまた、約0.1kから約500k、約0.1kから約300k、約1kから約250k、約1kから約2

40

50

0 0 k、約 5 0 k から約 1 5 0 k、約 1 k から約 1 2 0 k、約 1 k から約 1 0 0 k、約 1 k から約 8 0 k、約 1 k から約 6 0 k、約 1 k から約 5 0 k、約 1 k から約 4 0 k、約 1 k から約 3 0 k、約 1 k から約 2 0 k 約 1 k から約 1 0 k、または約 1 k から約 5 k の特定の MW を含む。ポリマーの長さは、ポリマー、P E I、P P I などの出発材料のサイズを操作することによって、本明細書に記載される方法を使用して容易に調整することができる。出発材料としてさまざまな MW (4 k から 1 0 0 k) の P E I を使用することによって、さまざまな MW の P o l y M e t を系統的に合成した。

【 0 0 5 6 】

P o l y M e t の長さは、P o l y M e t が薬物、薬物担体 (例えは、積荷送達媒体 (cargo delivery vehicle)) またはその両方の所望の特性を有するかどうかに対する決定要因である可能性がある。所望の用途が積荷送達媒体としてである場合、P o l y M e t の長さは積荷の任意の特定のタイプに適合させることができる。例えは、積荷が p D N A である場合、P o l y M e t のサイズをそれに応じて調整することができる。p D N A トランスフェクションに関するさまざまな P o l y M e t の能力は、ルシフェラーゼプラスミドを使用してアッセイされる。

10

【 0 0 5 7 】

実施形態において、本明細書中で開示されている主題は、共有結合したメトホルミンの残基を有するコレステロール類似体を対象とする。

【 0 0 5 8 】

ナノ粒子

20

上述のとおり、メトホルミンは、糖尿病のための第一選択の治療法である。しかしながら、その強い親水性カチオン特性が血漿からの急速なクリアランスの原因となり、有効な血漿中濃度を継続させるためには複数回の高用量が必要となる。さらに、本明細書に記載されている P o l y M e t ナノ粒子は、メトホルミンと比較した場合に比較的長期間、体の中を循環することができ、それにより長期間にわたって複数用量を投与する不都合を低減する。

【 0 0 5 9 】

しかしながら、ポリカチオン複合体は血液循環中で安定でないことが知られている (C hono , S . , Li , S . D . , Conwell , C . C . & Huang , L . An efficient and low immunostimulatory nano particle formulation for systemic siRNA delivery to the tumor . Journal of Control led Release 131 , 64 - 69 (2008))。本明細書中の別の場所に記載されているとおり、ポリ複合体の安定性を向上させるためにリポソーム外層を含む L P H ナノ粒子を調製した。

30

【 0 0 6 0 】

ナノ粒子は、受動的および能動的標的化の両方により、正常な細胞における毒性を防ぎながらがん細胞における薬物の細胞内濃度を高めることができる。表面がペグ化されたナノ粒子は、核酸、化学療法薬およびタンパク質を固形腫瘍および転移部位に効率的に送達することができる。ナノ粒子の表面がペグ化された実施形態において、これは、循環中におけるコロイド安定性を高め、単核食細胞系 (M P S) による非特異的取り込みを低減することができる。一部の実施形態において、これらのナノ粒子はまた、細胞取り込みを容易にするために腫瘍細胞において過剰発現するシグマ受容体を標的とするようアニスアミド (A A) により官能化される。これらのナノ粒子の i n v i t r o および i n v i v o における性能は、生物活性化合物の腫瘍標的送達に関して特徴づけることができる。さらに、これらのナノ粒子の安全性を立証するために全身毒性を調べることができる。

40

【 0 0 6 1 】

一実施形態において、P o l y M e t は、凝集ナノ粒子として形成される。凝集ナノ粒子のサイズは、1 , 0 0 0 n m 未満、5 0 0 n m 未満、約 5 0 n m から約 2 0 0 n m 、または約 1 0 0 n m である。P o l y M e t 凝集ナノ粒子は、治療用薬剤または生物学的薬

50

剤などの積荷と複合体を形成することができる。特に有用な Poly Met ナノ粒子は、Poly Met / ヌクレオチド複合体、例えば、Poly Met / pDNA 複合体を含む。

【0062】

一実施形態において、Poly Met は、リポソーム・ポリカチオン・ヒアルロン酸 (LPH) ナノ粒子の一部である。これらのナノ粒子は、本明細書では「LPH - Poly Met」と呼ぶ。この実施形態において、本明細書に記載されている主題は、
i. 脂質外膜、および
ii. 脂質外膜によって包まれた Poly Met
を含むナノ粒子を対象とする。

10

【0063】

Poly Met は、治療用薬剤または生物学的薬剤などの積荷と複合体を形成するか、またはそれと会合することができる。本明細書中で使用される場合、「複合体を形成する」または「会合する」という用語は、積荷と Poly Met が互いに密接に接触することを意味する。

【0064】

Poly Met と複合体を形成するか、またはそれと会合する特定の積荷としては、抗がん薬および生物製剤などの治療用薬剤、生物活性化合物ならびに同種のものが挙げられる。治療用薬剤としては、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ポリサッカライド、有機小分子および無機小分子などの生物活性化合物が挙げられる。「生物活性化合物」という用語は、天然に生じる生物活性化合物および合成の生物活性化合物の両方を包含する。「生物活性化合物」という用語は、生体分子と相互作用して、特定の生理的または病理学的事象を反映する検出可能な表示をもたらす検出または診断用薬剤を指すことができる。治療用薬剤としては、化学療法剤が挙げられる。他の実施形態において、治療用薬剤は、サイレンシング因子（例えば、siRNA）などの目的とするポリヌクレオチドまたは目的とするポリペプチドである。

20

【0065】

治療用薬剤が薬物である場合、以下に限定されるものではないが、抗菌剤、抗生物質、抗ミコバクテリア剤、抗真菌剤、抗ウイルス剤、新生物剤、免疫応答に影響を及ぼす薬剤、血中カルシウム調節因子、グルコース調節に有用な薬剤、抗凝固剤、抗血栓剤、抗高脂血症薬、心臓病の薬物、甲状腺ホルモン薬、抗甲状腺薬、アドレナリン作用薬、降圧薬、コリン作動薬、抗コリン薬、鎮痙薬、抗潰瘍薬、骨格筋および平滑筋弛緩剤、プロスタグランジン、アレルギー反応の一般的阻害剤、抗ヒスタミン剤、局所麻酔薬、鎮静剤、麻薬拮抗剤、鎮咳剤、催眠鎮静剤、抗痙攣薬、抗精神病薬、抗不安剤、抗うつ剤、食欲抑制剤、非ステロイド系抗炎症剤、ステロイド系抗炎症剤、酸化防止剤、血管作用薬、骨活性剤、抗関節炎剤、ならびに診断用薬剤が挙げられる。好ましい抗ウイルス薬としては、テノホビル、アデホビル、アシクロビルモノホスフェートおよびL-チミジンモノホスフェートが挙げられる。好適な実施形態において、生物活性化合物は、抗がん剤である。

30

【0066】

抗がん剤または「化学療法剤」は、がんの処置において有用な化学的化合物である。化学療法剤の例としては、アルキル化剤、例えば、チオテバおよびシクロホスファミド (CYTOXAN (登録商標))；スルホン酸アルキル、例えば、ブスルファン、イソプロスルファン、およびピボスルファン；アジリジン、例えば、ベンゾドーパ、カルボコン、メツレドーパ、およびウレドーパ；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド (triethylenephosphoramide)、トリエチレンチオホスホルアミドおよびトリメチロロメラミンを含むエチレンイミンおよびメチルアメラミン；アセトゲニン（とりわけ、プラタシンおよびプラタシノン）；デルタ-9-テトラヒドロカンナビノール（ドロナビノール、MARIOL (登録商標)）；ベータ-ラバコン；ラバコール；コルヒチン；ベツリシン酸；カンプトテシン（合成類似体トポテカン (HYCAMTIN (登録商標))、CPT-11 (イリノテカン、CAMPTOSAR (登録商標))、アセチ

40

50

ルカンプトセシン、スコポレクチン、および 9 - アミノカンプトテシンを含む) ; ブリオスタチン ; ペメトレキセド ; カリスタチン ; C C - 1 0 6 5 (そのアドゼレシン、カルゼレシンおよびビゼレシン合成類似体を含む) ; ポドフィロトキシン ; ポドフィリン酸 ; テニポシド ; クリプトフィシン (特に、クリプトフィシン 1 およびクリプトフィシン 8) ; ドラスタチン ; デュオカルマイシン (合成類似体、K W - 2 1 8 9 および C B 1 - T M 1 を含む) ; エリュテロビン ; パンクラチスタチン ; T L K - 2 8 6 ; C D P 3 2 3 、経口アルファ - 4 インテグリン阻害剤 ; サルコジクチイン ; スポンギスタチン ; ナイトロジェンマスターード、例えば、クロラムブシリ、クロルナファジン、コロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、塩酸メクロレタミンオキシド、メルファラン、ノブエンビキン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスターード ; ニトロスレアス、例えば、カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチンおよびラニムヌスチン ; 抗生物質、例えば、エンジイン抗生物質 (例えば、カリケアミシン、特にカリケアミシンガンマ 1 I およびカリケアミシンオメガ I I (例えば、N i c o l a o u e t a l . , A n g e w . C h e m I n t l . E d . E n g l . , 3 3 : 1 8 3 - 1 8 6 (1994) を参照) ; ジネミシン A を含むジネミシン ; エスペラマイシン ; ならびにネオカルジノスタチンクロモホアおよび関連クロモタンパク質エンジイン抗生物質クロモホア) 、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アウトラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシニス、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイシン、ドキソルビシン (A D R I A M Y C I N (登録商標)) 、モルホリノ - ドキソルビシン、シアノモルホリノ - ドキソルビシン、2 - ピロリノ - ドキソルビシン、ドキソルビシン H C 1 リポソーム注射 (D O X I L (登録商標)) およびデオキシドキソルビシンを含む) 、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、例えば、マイトマイシン C 、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、クエラマイシン、ロドルビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾトシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン ; 代謝拮抗剤、例えば、メトレキサート、ゲムシタビン (G E M Z A R (登録商標)) 、テガフル (U F T O R A L (登録商標)) 、カペシタビン (X E L O D A (登録商標)) 、エポチロン、および 5 - フルオロウラシル (5 - F U) ; 葉酸類似体、例えば、デノブテリン、メトレキサート、ブテロブテリン、トリメトレキサート ; ブリン類似体、例えば、フルダラビン、6 - メルカプトブリン、チアミブリン、チオグアニン ; ピリミジン類似体、例えば、アンシタビン、アザシチジン、6 - アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、およびフロクスウリジン ; 抗副腎薬、例えば、アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン ; 葉酸補充薬、例えば、フロリニック酸 ; アセグラトン ; アルドホスファミドグリコシド ; アミノレブリン酸 ; エニルウラシル ; アムサクリン ; ベストラブシリ ; ビサントレン ; エダトラキセート ; デホファミン ; デメコルチニ ; ジアジクオン ; エルホルニチニ ; エリブチニウムアセテート ; エトグルシド ; 硝酸ガリウム ; ヒドロキシ尿素 ; レンチナン ; ロニダイニン ; メイタンシノイド、例えば、メイタンシンおよびアンサミトシン ; ミトグアゾン ; ミトキサントロン ; モピダモール ; ニトラエリン ; ペントスタチン ; フェナメット ; ピラルビシン ; ロソキサントロン ; 2 - エチルヒドラジド ; プロカルバジン ; P S K (登録商標) 多糖複合体 (J H S N a t u r a l P r o d u c t s 、ユージーン、オレゴン州) ; ラゾキサン ; リゾキシン ; シゾフィラン ; スピロゲルマニウム ; テヌアゾン酸 ; トリアジコン ; 2 , 2 ' , 2 ' ' - トリクロロトリエチルアミン ; トリコテシン (特に T - 2 トキシン、ベラクリン A 、ロリジン A およびアングイジン) ; ウレタン ; ビンデシン (E L D I S I N E (登録商標)) 、F I L D E S I N (登録商標)) ; ダカルバジン ; マンノムスチン ; ミトプロニトール ; ミトラクトール ; ピボプロマン ; ガシトシン ; アラビノシド (「A r a - C 」) ; チオテバ ; タキソイド、例えば、パクリタキセル (T A X O L (登録商標)) 、パクリタキセルのアルブミン操作ナノ粒子製剤 (アブラキサン (商標)) 、およびドキセ

10

20

30

40

50

タキセル (TAXOTERE (登録商標)) ; クロランプシル ; 6 - チオグアニン ; メルカブトプリン ; メトトレキサート ; プラチナ類似体、例えば、シスプラチンおよびカルボプラチン ; ビンプラスチン (VELBAN (登録商標)) ; プラチナ ; エトポシド (VP-16) ; イホスファミド ; ミトキサントロン ; ビンクリスチン (ONCOVIN (登録商標)) ; オキサリプラチン ; ロイコボヴィン ; ビノレルビン (NAVELBINE (登録商標)) ; ノバントロン ; エダトレキセート ; ダウノマイシン ; アミノブテリン ; イバンドロネート ; トポイソメラーゼ阻害剤 RFS-2000 ; ジフルオロメトルヒルオルニチン (DMFO) ; レチノイド、例えば、レチノイン酸；上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体；ならびにシクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、およびプレドニゾロンの併用療法の略語であるCHOP、および、5-FUおよびロイコボヴィンと併用したオキサリプラチン (ELOXATIN (商標)) による処置計画の略語であるFOLFOXなどの上記の2つ以上の組み合わせが挙げられる。

【0067】

化学療法剤のさらなる例としては、がんの増大を助長する可能性のあるホルモンの影響を調節、低減、阻止または阻害するよう働く抗ホルモン剤が挙げられ、全身的処置または全身処置の形態である場合が多い。それら自体がホルモンである場合もある。例としては、例えば、タモキシフェン (NOLVADEX (登録商標) タモキシフェンを含む)、ラロキシフェン (EVISTA (登録商標))、ドロロキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY117018、オナプリストン、およびトレミフェン (FARESTON (登録商標)) を含む抗エストロゲン剤および選択的エストロゲン受容体モジュレーター (SERM)；抗プロゲステロン；エストロゲン受容体ダウンレギュレーター (ERD)；エストロゲン受容体アンタゴニスト、例えば、フルベストラント (FASLODEX (登録商標))；卵巣を抑制または機能停止させるよう働く薬剤、例えば、黄体形成ホルモン放出ホルモン (LHRH) アゴニスト、例えば、ロイプロリドアセテート (LUPRON (登録商標) およびELIGARD (登録商標))、酢酸ゴセレリン、酢酸ブセレリンおよびトリプテレリン；抗アンドロゲン、例えば、フルタミド、ニルタミドおよびビカルタミド；および副腎におけるエストロゲン産生を調節する酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼ阻害剤、例えば、4(5)-イミダゾール、アミノグルテチミド、酢酸メゲストロール (MEGASE (登録商標))、エキセメスタン (AROMASIN (登録商標))、ホルメスタンニエ、ファドロゾール、ボロゾール (RIVISOR (登録商標))、レトロゾール (FEMARA (登録商標))、およびアナストロゾール (ARIMIDEX (登録商標)) が挙げられる。さらに、化学療法剤のそのような定義としては、ビスホスホネート、例えば、クロドロネート (例えば、BONEFOS (登録商標) もしくはOSTAC (登録商標))、エチドロネート (DIDROCAL (登録商標))、NE-58095、ゾレドロン酸 / ゾレドロネート (ZOMETA (登録商標))、アレンドロネート (FOSAMAX (登録商標))、パミドロネート (AREDIA (登録商標))、チルドロネート (SKELID (登録商標))、またはリセドロネート (ACTONE (登録商標))；ならびにトロキサシタビン (1,3-ジオキソランヌクレオシドシトシン類似体)；アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に、粘着細胞増殖に関わるシグナル伝達経路における遺伝子の発現を阻害するもの、例えば、PKC-アルファ、Raf、H-Ras、および上皮増殖因子受容体 (EGFR)；ワクチン、例えば、THERATOP (登録商標) ワクチンおよび遺伝子治療ワクチン、例えば、ALLOVECTIN (登録商標) ワクチン、LEUVECTIN (登録商標) ワクチン、およびVAXID (登録商標) ワクチン；トポイソメラーゼ1阻害剤 (例えば、LURTOTECAN (登録商標))；抗エストロゲン、例えば、フルベストラント；EGFR阻害剤、例えば、エルロチニブもしくはセツキシマブ；抗VEGF阻害剤、例えば、ベバシズマブ；アリノテカン；rmRH (例えば、ABARELIX (登録商標))；17AAG (熱ショックタンパク質 (Hsp) 90毒であるゲルダナマイシン誘導体)、および上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体が挙げられる。

【0068】

10

20

30

40

50

特定の抗がん剤としては、ラパマイシン、シスプラチンおよびその類似体、エトポシドモノホスフェート、アレンドロネート、パミドロネート、およびゲムシタビンモノホスフェートならびにそれらの塩、エステル、配座異性体およびプロドラッグが挙げられる。

【0069】

本ナノ粒子は、リポソーム中に包まれたヒアルロン酸および/または核酸をさらに含んでもよく、任意にその中のPolyMeltと複合体を形成する。

【0070】

「脂質外膜」は、脂質、特に、カチオン性脂質を含むほとんど連続的な層である。脂質外膜は、標的化リガンドおよび/またはポリエチレンギリコール(PEG)をさらに含んでもよい。

10

【0071】

本明細書中で使用される場合、「脂質」という用語は、親油性または両親媒性の特性を有する有機化合物のグループのメンバーを指し、脂肪、脂肪油、精油、ワックス、ステロイド、ステロール、リン脂質、糖脂質、硫脂質、アミノ脂質、色素脂質(リボクローム)、および脂肪酸を含むが、それらに限定されるものではない。「脂質」という用語は、天然に生じる脂質および合成的に生成される脂質の両方を包含する。特定の脂質としては、DOTAP、DOPSおよびコレステロールが挙げられる。

【0072】

脂質としては、カチオン性脂質を挙げることができる。本明細書中で使用される場合、「カチオン性脂質」という用語は、生理的なpHにおいて正味の正電荷をもつ多くの任意の脂質化学種を包含し、これは、当業者に既知の任意の方法を使用して判定することができる。そのような脂質としては、2009年5月1日に出願され、その全体を参照によって本明細書に組み込んだものとする「Methods and Compositions Comprising Novel Cationic Lipids」という名称の国際出願第PCT/US2009/042476号に開示されている式(I)のカチオン性脂質が挙げられるが、これらに限定されるものではない。これらとしては、N-メチル-N-(2-(アルギノイルアミノ)エチル)-N,N-ジオクタデシルアミニウムクロリドまたはジステアロイルアルギニルアンモニウムクロリド](DOTAA)、N,N-ジミリストイル-N-メチル-N-2[N'--(N⁶-グアニジノ-L-リジニル)]アミノエチルアンモニウムクロリド(DMGLA)、N,N-ジ-ミリストイル-N-メチル-N-2[N²-グアニジノ-L-リジニル]アミノエチルアンモニウムクロリド、N,N-ジミリストイル-N-メチル-N-2[N'--(N₂,N₆-ジ-グアニジノ-L-リジニル)]アミノエチルアンモニウムクロリド、およびN,N-ジ-ステアロイル-N-メチル-N-2[N'--(N₆-グアニジノ-L-リジニル)]アミノエチルアンモニウムクロリド(DSGLA)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。存

20

在してもよいカチオン性脂質のその他の非限定例としては、N,N-ジオレイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロリド(「DODAC」)；N-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(「DOTAP」)；N-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(「DOTMA」)またはその他のN-(N,N-1-ジアルコキシ)-アルキル-N,N,N-三置換アンモニウム界面活性剤；N,N-ジステアリル-N,N-ジメチルアンモニウムプロミド(「DDAB」)；3-(N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル)コレステロール(「DC-Chol」)およびN-(1,2-ジミリストイルオキシプロパ-3-イル)-N,N-ジメチル-N-ヒドロキシエチルアンモニウムプロミド(「DMRIE」)；1,3-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン、N-(1-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル)-N-(2-(スペルミンカルボキサミド)エチル)-N,N-ジメチルアンモニウムトリフルオロアセテート(DOSPA)；GAP-DLRIE；DMDHP；3-[⁴N-(¹N,⁸N-ジグアニジノスペルミジン)-カルバモイル]コレステロール(BGSC)；3-[N,N-ジグアニジノエチル-アミノエタン)-カルバモイル]コレステロール(BGTC)；

30

40

50

N, N¹, N², N³ テトラ - メチルテトラパルミチルスペルミン (c e l l f e c t i n) ; N - t - ブチル - N' - テトラデシル - 3 - テトラデシル - アミノプロピオン - アミジン (C L O N f e c t i n) ; ジメチルジオクタデシルアンモニウムプロミド (D D A B) ; 1, 3 - ジオレオイルオキシ - 2 - (6 - カルボキシスペルミル) - プロピルアミド (D O S P E R) ; 4 - (2, 3 - ビス - パルミトイロオキシ - プロピル) - 1 - メチル - 1 H - イミダゾール (D P I M) N, N, N', N' - テトラメチル - N, N' - ビス (2 - ヒドロキシエチル) - 2, 3 ジオレオイルオキシ - 1, 4 - ブタンジアンモニウムヨージド (T f x - 5 0) ; トリメチルアンモニウム基がブタノールスペーサーアームを介して二本鎖 (D O T B に関して) またはコレステリル基 (C h O T B に関して) のいずれかに連結される 1, 2 ジオレオイル - 3 - (4' - トリメチルアンモニオ) ブタノール - s n - グリセロール (D O B T) またはコレステリル (4' トリメチルアンモニア) ブタノエート (C h O T B) ; その全体を参照によって本明細書に組み込んだものとする国際出願公開第 W O 9 3 / 0 3 7 0 9 号に開示されている D L - 1, 2 - ジオレオイル - 3 - ジメチルアミノプロピル - - ヒドロキシエチルアンモニウム (D O R I) もしくは D L - 1, 2 - O - ジオレオイル - 3 - ジメチルアミノプロピル - - ヒドロキシエチルアンモニウム (D O R I E) またはその類似体 ; 1, 2 - ジオレオイル - 3 - スクシニル - s n - グリセロールコリンエステル (D O S C) ; コレステリルヘミスクシネットエステル (C h O S C) ; リポポリアミン、例えば、ジオクタデシルアミドグリシルスペルミン (D O G S) およびジパルミトイロホスファチジルエタノールアミルスペルミン (D P P E S) またはその全体を参照によって本明細書に組み込んだものとする米国特許第 5, 2 8 3, 1 8 5 号に開示されているカチオン性脂質；コレステリル - 3 - カルボキシル - アミド - エチレントリメチルアンモニウムヨージド ; 1 - ジメチルアミノ - 3 - トリメチルアンモニオ - D L - 2 - プロピル - コレステリルカルボキシレートヨージド ; コレステリル - 3 - - カルボキシアミドエチレンアミン ; コレステリル - 3 - - オキシスクシンアミド - エチレントリメチルアンモニウムヨージド ; 1 - ジメチルアミノ - 3 - トリメチルアンモニオ - D L - 2 - プロピル - コレステリル - 3 - - オキシスクシネットヨージド ; 2 - (2 - トリメチルアンモニオ) - エチルメチルアミノエチル - コレステリル - 3 - - オキシスクシネットヨージド ; および 3 - - N - (ポリエチレンイミン) - カルバモイルコレステロールが挙げられる。

【 0 0 7 3 】

脂質は、負に帯電した、または中性の共脂質を含んでもよい。本明細書で使用される場合、「共脂質」とは、中性脂質（荷電していない）またはアニオン性脂質を含む非カチオン性脂質を指す。「中性脂質」という用語は、生理的な pH において無荷電、または中性の双性イオンのいずれかの形態で存在する多くの脂質化学種のうちのいずれかを指す。

「アニオン性脂質」という用語は、生理的な pH において正味の負電荷をもつ多くの脂質化学種のいずれかを包含する。共脂質としては、ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、セラミド、スフィンゴミエリン、セファリン、コレステロール、セレブロシドおよびジアシルグリセロール、リン脂質関連材料、例えば、レシチン、ホスファチジルエタノールアミン、リゾレシチン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、カルジオリビン、ホスファチジン酸、ジセチルホスフェート、ジステアロイルホスファチジルコリン (D S P C) 、ジオレオイルホスファチジルコリン (D O P C) 、ジパルミトイロホスファチジルコリン (D P P C) 、ジオレオイルホスファチジルグリセロール (D O P G) 、パルミトイロレイオルホスファチジルグリセロール (P O P G) 、ジパルミトイロホスファチジルグリセロール (D P P G) 、ジオレオイル - ホスファチジルエタノールアミン (D O P E) 、パルミトイロオレオイルホスファチジルコリン (P O P C) 、パルミトイロオレオイル - ホスファチジルエタノールアミン (P O P E) 、ジオレオイル - ホスファチジルエタノールアミン 4 - (N - マレイミドメチル) - シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート (D O P E - m a l) 、ジオレオイルホスファチジン酸 (D O P A) 、ステアリルアミン、ドデシルアミン、ヘキサデシルアミン、アセチルパルミテート、グリセロールリシノレエ

10

20

30

40

50

ート、ヘキサデシルステレエート、イソプロピルミリストート、両性アクリル系ポリマー、トリエタノールアミン・ラウリルスルフェート、アルキル・アリールスルフェートポリエチルオキシル化脂肪酸アミド、リゾホスファチジルコリン、およびジオクタデシルジメチルアンモニウムプロミドならびに同種のものを挙げることができるが、これらに限定されるものではない。共脂質としては、その全体を参照によって本明細書に組み込んだものとする米国特許第5,820,873号に記載されているとおりのリン脂質またはセラミドとコンジュゲートしたPEG2000、PEG5000およびポリエチレングリコールなどのポリエチレングリコールベースのポリマーも挙げができる。

【0074】

遊離型リン酸基を有する両親媒性脂質は、ジオレオイルホスファチジン酸(DOPA)であることが好ましい。

【0075】

ナノ粒子の表面は、ペグ化されてもよい。「ポリマー・PEGコンジュゲート」という用語はまた、これらのポリマー・PEG・標的化リガンドコンジュゲートおよびポリマー・PEG・標的化リガンドコンジュゲートを含むナノ粒子も指す。ペグ化は、細網内皮系(RES)によるナノ粒子のクリアランスを低減することによって循環半減期を長くする。

【0076】

こうした実施形態のいくつかにおいて、表面は、表面の約4mol%から約15mol%の濃度でポリマー・PEGコンジュゲートを含み、約4mol%、約5mol%、約6mol%、約7mol%、8mol%、約9mol%、約10mol%、約11mol%、約12mol%、約13mol%、約14mol%、および約15mol%のPEGを含むが、それらに限定されるものではない。PEGのさらに高いパーセンテージ値(mol%で表される)も有用なことがわかった。有用なmol%値としては、約12mol%から約50mol%のmol%値が挙げられる。この値は、約15mol%から約40mol%であるのが好ましい。約15mol%から約35mol%の値も好ましい。最も好ましい値は、約20mol%から約25mol%、例えば、23mol%である。

【0077】

脂質・PEGコンジュゲートのポリエチレングリコール部分は、以下に限定されるものではないが約100g/mol、約200g/mol、約300g/mol、約400g/mol、約500g/mol、約600g/mol、約700g/mol、約800g/mol、約900g/mol、約1000g/mol、約5000g/mol、約10,000g/mol、約15,000g/mol、および約20,000g/molを含む約100から約20,000g/molの範囲の分子量を有してもよい。一部の実施形態において、脂質・PEGコンジュゲートは、約2000g/molの分子量を有するPEG分子を含む。特定の実施形態において、脂質・PEGコンジュゲートは、DSP-E-PEG₂₀₀₀を含む。

【0078】

一部の実施形態において、表面は、標的化リガンドを含み、それにより標的化ナノ粒子を形成する。「標的化リガンド」とは、標的とする細胞または組織と物理的に会合した分子または複合体を標的とする分子を意図とする。本明細書中で使用される場合、「物理的に会合した」という用語は、2つの分子間の共有結合性、または非共有結合性相互作用のいずれかを指す。

【0079】

標的化リガンドとしては、小分子、ペプチド、脂質、砂糖、オリゴヌクレオチド、ホルモン、ビタミン、抗原、抗体またはそのフラグメント、特定の膜受容体リガンド、抗リガンドと反応することができるリガンド、融合ペプチド、核局在ペプチド、またはそのような化合物の組み合わせを挙げることができるが、これらに限定されるものではない。標的化リガンドの非限定例としては、アシアロ糖タンパク質、インスリン、低密度リポタンパク質(LDL)、葉酸、ベンズアミド誘導体、アルギニン・グリシン・アスパルテート(

10

20

30

40

50

R G D) 配列を含むペプチド、および細胞表面分子に対するモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体が挙げられる。一部の実施形態において、小分子は、ベンズアミド誘導体を含む。これらの実施形態のいくつかにおいて、ベンズアミド誘導体は、アニスアミドを含む。

【 0 0 8 0 】

一部の標的化リガンドは、表面と標的化リガンドとの間に介在分子を含み、これは、表面および標的化リガンドの両方に共有結合する。これらの実施形態のいくつかにおいて、介在分子は、ポリエチレングリコール (P E G) である。

【 0 0 8 1 】

「標的とする細胞」とは、標的化リガンドが物理的に会合した分子または複合体をリクルートする細胞が意図される。標的化リガンドは、標的細胞の 1 つ以上の成分と相互作用することができる。標的とする細胞は、さまざまな表現型を示すいかなる細胞タイプまたはいかなる発生段階であってもよく、さまざまな病理学的状態 (すなわち、異常な状態および正常な状態) であってもよい。例えば、標的化リガンドは、微生物 (すなわち、原核細胞 (細菌) 、ウイルス、真菌、原虫もしくは寄生生物) 上または真核細胞 (例えば、上皮細胞、筋細胞、神経細胞、知覚細胞、がん細胞、分泌細胞、悪性細胞、赤血球細胞、リンパ様細胞、幹細胞) 上の正常な成分、異常な成分、および / または固有の成分と会合することができる。したがって、標的化リガンドは、例えば、腫瘍関連抗原および自己免疫疾患関連抗原を含む疾患関連抗原である標的細胞上の成分と会合することができる。そのような疾患関連抗原としては、例えば、増殖因子受容体、細胞周期制御因子、血管新生因子、およびシグナル伝達因子が挙げられる。

10

20

30

40

【 0 0 8 2 】

一部の実施形態において、標的化リガンドは、標的とする細胞上の細胞表面タンパク質と相互作用する。これらの実施形態のいくつかにおいて、標的化リガンドと結合することができる細胞表面タンパク質の発現レベルは、他の細胞と比較して標的とする細胞においてより高い。例えば、がん細胞は、H E R 2 受容体 (乳がん) またはシグマ受容体などの特定の細胞表面分子を過剰発現する。標的化リガンドがアニスアミドなどのベンズアミド誘導体を含む特定の実施形態において、標的化リガンドは、会合したナノ粒子をシグマ受容体過剰発現細胞へと標的化する。シグマ受容体過剰発現細胞としては、これらに限定されるものではないが、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、腎癌、結腸癌、肉腫、乳がん、メラノーマ、膠芽腫、神経芽腫、および前立腺がんなどのがん細胞を挙げることができる (Aydar , Palmer , and Djamgoz (2004) Cancer Res . 64 : 5029 - 5035) 。

【 0 0 8 3 】

L P H - P o l y M e t ナノ粒子は、積荷を細胞 (例えば、in vitro 、 in vivo において) 、生理的部位、または組織に送達することができる限り、いかなるサイズであってもよい。本明細書中で使用される場合、「ナノ粒子」という用語は、約 1 0 0 0 n m 未満の少なくとも 1 つの寸法を有する任意の形状の粒子を指す。一部の実施形態において、ナノ粒子は、1 n m から 1 0 0 0 n m の間の任意の整数値を含む (約 1 、 2 、 5 、 1 0 、 2 0 、 3 0 、 4 0 、 5 0 、 6 0 、 7 0 、 8 0 、 9 0 、 1 0 0 、 2 0 0 、 5 0 0 、および 1 0 0 0 を含む) 約 1 n m から約 1 0 0 0 n m の範囲の少なくとも 1 つの寸法を有する。特定の実施形態において、ナノ粒子は、約 1 5 0 n m の少なくとも 1 つの寸法を有する。球状ナノ粒子は、以下に限定されるものではないが、約 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、 1 0 、 1 1 、 1 2 、 1 3 、 1 4 、 1 5 、 1 6 、 1 7 、 1 8 、 1 9 、 2 0 、 2 1 、 2 2 、 2 3 、 2 4 、 2 5 、 2 6 、 2 7 、 2 8 、 2 9 、 3 0 、 3 1 、 3 2 、 3 3 、 3 4 、 3 5 、 3 6 、 3 7 、 3 8 、 3 9 、 4 0 、 4 5 、 5 0 、 5 5 、 6 0 、 6 5 、 7 0 、 7 5 、 8 0 、 8 5 、 9 0 、 9 5 、および 1 0 0 n m を含む約 1 0 0 n m 未満の直径を有してもよい。特定の実施形態において、ナノ粒子は、約 5 0 n m 未満の直径を有する。特定の実施形態において、ナノ粒子は、約 4 0 n m から約 5 0 n m の間の直径を有する。

【 0 0 8 4 】

50

特に、ナノ粒子の直径が100nm未満である一部の実施形態において、ナノ粒子は、血液脳関門（BBB）を越えて中枢神経系へ、または胎盤関門を越えて生物活性化合物を送達するために使用することができる。BBBを標的とするために使用することができる標的化リガンドの非限定例としては、運搬およびラクトフェリンが挙げられる（Huang et al. (2008) Biomaterials 29 (2) : 238 - 246、その全体を参照によって本明細書に組み込んだものとする）。さらに、ナノ粒子は、血管内皮を越えて骨格筋細胞および心筋細胞の両方へ経細胞輸送することができる。例えば、デュシェンヌ型筋ジストロフィーを処置するためにエクソン・スキッピングオリゴヌクレオチドを送達することができる（Moulton et al. (2009) Ann NY Acad Sci 1175 : 55 - 60、その全体を参照によって本明細書に組み込んだものとする）。

10

【0085】

粒子サイズは、以下に限定されるものではないが、沈降場流動分画法、光子相關分光法、ディスク型遠心分離、および動的光散乱（例えば、サンタバーバラ、カリフォルニア州のAutodilutePAT Model 370からのNICONMP粒度分布測定システムなどのサブミクロン粒子寸法測定器を使用する）を含む当該技術分野において既知の任意の方法を使用して測定することができる。

【0086】

特定の実施形態において、本明細書に記載されているナノ粒子は、約-20mVから+20mVのゼータ電位を有してもよい。一部の実施形態において、ナノ粒子は、-10mV未満のゼータ電位を有し、特定の実施形態において、ゼータ電位は、以下に限定されるものではないが、約+14mV、約+15mV、約+16mV、約+17mV、約+18mV、約+19mV、および約+20mVを含む約+10mVから約+20mVである。

20

【0087】

本明細書に記載されているナノ粒子は、自己集合性、実質的に球状ベシクルであってもよい。ナノ粒子は、PolyMetに加えて1つ以上の異なるポリマーをさらに含んでもよい。有用なポリマーとしては、生体適合性の既知のポリマーが挙げられる。「生体適合性の」という用語は、本明細書中では当該技術分野において製薬的用途に適切であるポリマーを述べるために使用されるとおりに使用される。生体適合性ポリマーは、分解し、時間とともに体に吸収される生体吸収性ポリマーであってもよい。

30

【0088】

ポリマーとは、重合によって形成される化学的化合物または化合物の混合物を指し、本質的に繰り返しの構造単位から成る。有用なポリマーは、ナノ粒子を形成することができるin vivoまたはin vitroにおいて使用される合成材料であってもよく、生物系と相互作用することが意図される。これらには、（参照によって本明細書に組み込んだものとする）米国特許第5,514,378号において教示されているものが含まれるが、それらに限定されるものではない。生分解性コポリマーも記載されており、脂肪族ポリエステル、ポリオルトエステル、ポリ酸無水物、ポリアルファ-アミノ酸、ポリホスファゲン、およびポリアルキルシアノアクリレートを含む。脂肪族ポリエステルの中で、ポリラクチド（PLA）、ポリグリコリド（PGA）およびポリラクチドグリコリド（PLGA）。生分解性ポリマーとしては、ポリ（L-乳酸）（PLLA）、ポリ（DL-乳酸）（PLA）、およびポリ（DL-乳酸-co-グリコール酸）（PLGA）などの乳酸ポリマーが挙げられる。ポリ（DL-乳酸-co-グリコール酸）のコモノマー（ラクチド：グリコリド）比は、好ましくは100:0から50:50の間である。コモノマー比は、85:15（PLGA 85:15）から50:50（PLGA 50:50）の間が最も好ましい。好ましくは、PLGA 85:15およびPLGA 50:50のPLLAのPLGAとのブレンドが使用されてもよい。特に有用なポリマーは、ポリ（乳酸-co-グリコール酸）（PLGA）である。

40

【0089】

メトホルミンは、抗腫瘍有効性を有する（Morales; Kissfalvi, K.,

50

Moro, A., Sinnott-Smith, J., Eibl, G. & Rozengurt, E. Metformin inhibits the growth of human pancreatic cancer xenografts. *Pancreas* 42, 781-785 (2013)). PolyMetを含むLPHナノ粒子(LPH-PolyMet)は、腫瘍増大を相乗的に抑制することができる。本明細書において、H460異種移植片におけるLPH-PolyMetおよびさまざまなナノ粒子の効果の研究が提示される。

【0090】

図6に示されるとおり、メトホルミンまたはLPH-PolyMetによる処置は、PBS群およびLPH-PEI群と比較してがん進行の大幅な抑制につながった。これは、主に遊離型またはポリマー型のいずれかのメトホルミンの抗腫瘍有効性によるものであった。重要なことに、IV注射のためのメトホルミンおよびPolyMetの用量は0.4mg/kg体重であり、これはIV投与経路により使用された以前の研究よりも実質的に少ない(Shi, W. Y. et al. Therapeutic metformin/AMPK activation blocked lymphoma cell growth via inhibition of mTOR pathway and induction of autophagy. *Cell Death Dis* 3 (2012))。しかしながら、以前の報告は、低用量メトホルミンが腫瘍増大を十分に抑制することができることを示した(Hu, T. et al. Reprogramming ovarian and breast cancer cells into non-cancerous cells by low-dose metformin or SN-38 through FOXO3 activation. *Scientific reports* 4 (2014); Gou, S. M. et al. Low Concentrations of Metformin Selectively Inhibit CD133(+) Cell Proliferation in Pancreatic Cancer and Have Anticancer Action. *PLoS one* 8 (2013))。LPH-PEIとLPH-PolyMetの間で腫瘍増大抑制の顕著な差が観察され(図6)、このことは、PolyMetが抗腫瘍活性を高めるのに重要な役割を果たすことを示唆する。最後の処置後、LPH-PolyMetで処置された異種移植片の腫瘍サイズは全体重の1%未満であり、これは、LPH-PEI群(4%)およびPBS(6%)群よりも大幅に小さかった(図6B)。

【0091】

血液学、血清化学または主な組織(図5)において毒性は観察されなかった。メトホルミンの阻害が、AMP活性化プロテインキナーゼ(AMPK)を活性化することおよび哺乳類ラバマイシン標的タンパク質(mTOR)経路を阻害することによってがん生存能力に影響をもたらすことが以前に報告された(Dowling, R. J., Zakikhani, M., Fantus, I. G., Pollak, M. & Sonenberg, N. Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells. *Cancer research* 67, 10804-10812 (2007); Yue, W., Yang, C. S., Di Paola, R. S. & Tan, X. L. Repurposing of metformin and aspirin by targeting AMPK-mTOR and inflammation for pancreatic cancer prevention and treatment. *Cancer prevention research* 7, 388-397 (2014))。PolyMetは、がん抑制に対して同じメカニズムを有する可能性がある。AMPKは、グルコースおよび脂質代謝を制御する代謝性腫瘍抑制因子として働く(Lerioith, D. Insulin-like growth factors and cancer: from bas

ic biology to therapeutics. Humana Press, New York; 2012)。多くの場合、AMPKのリン酸化のレベルが低いことが、処置後の不良な予後と相関関係にある (Zulato, E. et al. Prognostic significance of AMPK activation in advanced stage colorectal cancer treated with chemotherapy plus bevacizumab. British journal of cancer 111, 25-32 (2014))。

【0092】

メトホルミンおよびLPH-PolyMetによる処置後、AMPKのリン酸化レベルがそれぞれPBS群よりも約9倍および12倍持続的に向上したことが観察され、これは、AMPK活性の刺激を示す(図7A)。しかしながら、LPH-PEI群ではAMPKの活性化が起らなかった。これは、ナノ粒子中のPolyMetが重要な因子であり、AMPK経路を活性化する可能性があることを示唆する。mTORは、AMPKの下流エフェクターである (Kimura, N. et al. A possible linkage between AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling pathway. Genes Cells 8, 65-79 (2003))。AMPK活性化は、mTORおよびその下流エフェクターキナーゼを阻害する (Bolster, D. R., Crozier, S. J., Kimball, S. R. & Jefferson, L. S. AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. J Biol Chem 277, 23977-23980 (2002))。

10

20

30

40

50

【0093】

mTORのリン酸化は、がん細胞の増殖および生存において中心的な役割を果たす (Matsubara, S. et al. mTOR plays critical roles in pancreatic cancer stem cells through specific and stemness-related functions. Scientific reports 3, 3230 (2013))。ゆえに、mTORの活性に対するメトホルミンおよびLPH-PolyMetの効果(図7A)を評価した。メトホルミンおよびLPH-PolyMet処置は、それぞれPBSおよびLPH-PEIと比較してp-mTOR/mTORレベルの2.3倍および2.9倍の低下によって示されたmTOR活性の大幅な阻害につながった。

【0094】

がん増大の抑制をもたらすメトホルミンの潜在的毒性メカニズムとしてオートファジーが認識される (Tomic, T. et al. Metformin inhibits melanoma development through autophagy and apoptosis mechanisms. Cell Death Dis 2 (2011); Feng, Y. et al. Metformin promotes autophagy and apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma by downregulating Stat3 signaling. Cell Death Dis 5 (2014))。ゆえに、本発明者らは、PolyMetの処置後にオートファジーも観察することができるかどうかを評価した。微小管結合タンパク質軽鎖3b (LC3b)は、オートファジー開始に特異的なマーカーである (Mizushima, N., Yoshimori, T. & Levine, B. Methods in mammalian autophagy research. Cell 140, 313-326 (2010))。図7Bに示されるとおり、メトホルミンおよびLPH-PolyMet処置された腫瘍は、その他

の群よりも高い、L C 3 b に付随する赤い蛍光を示し、このことは、メトホルミンおよびL P H - P o l y M e t が、肺異種移植片においてオートファジーを誘導する可能性があることを示す。

【0095】

次に、処置後の抗腫瘍効果のメカニズムをT U N E L アッセイによりアッセイした(図7B)。メトホルミンおよびL P H - P o l y M e t 処置後のアポトーシス細胞のパーセントは、それぞれ18.8%および32.3%であった一方で、その他の群では顕著なアポトーシス誘導は観察されなかった。これは、遊離型またはポリマー型のメトホルミンが、細胞のアポトーシスを誘導する可能性があり、がん細胞生存を制御する際に重要な役割を果たすことを示唆する。要約すると、H 4 6 0 肺がん発症のメトホルミンおよびP o l y M e t の両方の抑制には、オートファジーおよびアポトーシスメカニズムの両方が関係していた。

【0096】

処置の方法

一実施形態において、本主題は、P o l y M e t またはL P H - P o l y M e t を対象に投与することによって疾患を処置する方法を対象とする。これらの実施形態において、本方法は、所望の処置効果を達成するために処置を必要とする対象に有効量のP o l y M e t またはL P H - P o l y M e t を投与するステップを含んでもよい。

【0097】

処置される疾患または望ましくない状態は、治療的に処置され得るあらゆるタイプの状態または疾患を包含することができる。特に、これらの実施形態において、処置される疾患は、代謝障害、遺伝障害および/またはがんであってもよい。一部の実施形態において、処置される疾患または望ましくない状態は糖尿病である。一部の実施形態において、処置される疾患または望ましくない状態はがんである。

【0098】

本明細書中の別の場所に記載されているとおり、「がん」という用語は、あらゆるタイプの未制御の細胞増殖を包含し、がんのすべての形態を含む。一部の実施形態において、処置されるがんは転移性がんである。特に、がんは、既知の療法に耐性のあるものであってもよい。がんの増大または進行の抑制を検出するための方法は当該技術分野において知られており、サイズの縮小を検出するための原発性腫瘍のサイズ、二次腫瘍の出現の遅延、二次腫瘍のゆっくりとした成長、二次腫瘍の生成の低減、および疾患の二次的影響の重症度の遅延または低減を測定することが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0099】

したがって、一部の実施形態において、P o l y M e t またはL P H - P o l y M e t は、がん細胞を標的としている。「がん」または「がん性の」という用語は、未制御の細胞増殖によって一般に特徴づけられる哺乳動物における生理的状態を指すか、またはそれを述べる。がん性の細胞は、局所浸潤および/または非隣接部位への転移の可能性がある場合がある。「がん」という用語は、すべてタイプのがんを包含し、すべての形態の癌、メラノーマ、肉腫、リンパ腫および白血病を含むが、それらに限定されるものではなく、膀胱癌、脳腫瘍、乳がん、子宮頸がん、結腸直腸がん、食道がん、子宮内膜がん、肝細胞癌、喉頭がん、肺がん、骨肉腫、卵巣がん、膵がん、前立腺がん、腎癌、甲状腺がん、急性リンパ性白血病、急性骨髓性白血病、上衣腫、ユーイング肉腫、膠芽腫、髄芽腫、神経芽腫、骨肉腫、横紋筋肉腫、ラブドイドがん、および腎芽腫(ウィルムス腫瘍)を含むが、それらに限定されるものではない。

【0100】

任意にさらなる治療用薬剤を含むP o l y M e t またはL P H - P o l y M e t は、対象の疾患または望ましくない状態の処置に使用することができ、その生物活性化合物は、発現されるか、または細胞に導入されると疾患または望ましくない状態に対して治療活性を有する。生物活性化合物は、対象に治療有効量で投与される。生物活性化合物がポリヌ

10

20

30

40

50

クレオチドを含むそれらの実施形態において、目的とするポリヌクレオチドが対象に治療有効量で投与されると、目的とするポリヌクレオチドまたはそれによってコードされるポリペプチドは、疾患または望ましくない状態を処置することができる。

【0101】

当業者に Poly Met または LPH-Poly Met は、単独で、または外科的療法、放射線療法、もしくは薬物などのあらゆるタイプの治療用薬剤による処置を含むが、それらに限定されるものではないその他の治療的様式と併せて使用することができるが理解されるであろう。対象ががんに苦しめられているそれらの実施形態において、Poly Met または LPH-Poly Met は、当該技術分野において周知の任意の化学療法剤と組み合わせて送達されてもよい。

10

【0102】

生物活性化合物を言及する場合の「治療活性」とは、分子が、それを必要とする対象に投与されたとき、所望の薬理学的または生理的効果を引き出すことができるが意図される。

【0103】

本明細書中で使用される場合、「処置」または「予防」という用語は、所望の薬理学的および/または生理学的効果を得ることを指す。その効果は、特定の感染症もしくは疾患またはその徴候もしくは症状を完全にまたは部分的に予防することに関して予防的であってもよく、かつ/あるいは感染症もしくは疾患および/または感染症もしくは疾患に起因する有害な影響の部分的または完全な回復に関して治療的であってもよい。それに応じて、本方法は、本発明の組成物を与えられる対象の疾患または障害の不利益な影響を「予防する」(すなわち、遅延させる、もしくは阻害する)かつ/または「低減する」(すなわち、減少させる、遅らせる、もしくは回復させる)。

20

【0104】

本明細書中で使用される場合、「対象」は、任意の動物であってよく、ヒトなどの哺乳動物を含み、以下に限定されるものではないが、ネコ科もしくはイヌ科対象などの飼育動物、以下に限定されないウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、およびブタ対象などの家畜、(野生の状態であろうが動物園においてであろうが)野生動物、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、イヌ、ネコなど研究動物、ニワトリ、シチメンチョウ、鳴禽などの鳥類、すなわち、獣医学的医療用途のものを含む。疾患または望ましくない状態に対して処置を必要とする対象は、そのような疾患または状態の症状を示すヒト、疾患または状態と診断された対象、その寛解にある対象、またはそれを発症するリスクが高い対象(例えば、遺伝的素因、特定の食物または環境への曝露)であってもよい。

30

【0105】

「有効量」は、特定の障害の測定可能な改善または予防をもたらすために必要とされる少なくとも最小濃度である。本明細書において有効量は、疾患状態、患者の年齢、性別、および体重、ならびに対象において所望の応答を生じさせる抗体の能力などの要因により変化することもある。したがって、対象に投与される投与量は、投与の方法および部位、患者の年齢、体重および状態を含む多くの他の要因により決まることがある。当業者は、所与のタイプの投与のため、所与の患者および所与の治療的適用のための投与量を容易に調節することができる。

40

【0106】

有効量はまた、治療的に有益な効果が処置のあらゆる毒作用または不利益な影響より勝っている量である。予防的使用に有益な結果または所望の結果としては、疾患の生化学的、組織学的および/または行動学的症状、その合併症および疾患の発症中に示す中間の病理学的表現型を含む疾患の発症のリスクを排除もしくは低減すること、重症度を減じること、または遅延させることなどの結果が挙げられる。治療的使用に有益な結果または所望の結果としては、疾患の進行を標的とすること、遅延させること、および/または生存期間を延長することなどにより、疾患の結果として生じる1つ以上の症状を低減すること、疾患に悩まされている個体の生活の質を高めること、疾患を処置するために必要とされる

50

他の薬物の用量を低減すること、別の薬物の効果を向上させることなどの臨床的結果が挙げられる。がんまたは腫瘍の場合、有効量の薬物は、がん細胞の数を低減すること、腫瘍サイズを低減すること、末梢器官へのがん細胞の浸潤を抑制する（すなわち、ある程度遅らせるか、または望ましくは止める）こと、腫瘍転移を抑制する（すなわち、ある程度遅らせ、望ましくは止める）こと、腫瘍増大をある程度抑制すること、および／または障害に関連する1つ以上の症状をある程度軽減することに効果を有してもよい。有効量は、1回以上の投与で投与されてもよい。薬物、化合物、または医薬組成物の有効量は、直接的または間接的のいずれかで予防的処置、または治療的処置を成し遂げるのに十分な量である。臨床的状況において理解されるとおり、薬物、化合物、または医薬組成物の有効量は、別の薬物、化合物、または医薬組成物と併せて達成されてもよく、またはそうでなくともよい。したがって、「有効量」は、1つ以上の他の薬剤と併せて、望ましい結果が達成される可能性があるか、または達成される場合、1つ以上の治療用薬剤を投与することと関連して考慮されてもよく、単剤が有効量で投与されることが考慮されてもよい。

10

20

30

40

50

【0107】

一部の実施形態において、PolyMetまたはLPH-PolyMetは、以下に限定されるものではないが約0.001μg/kg、0.01μg/kg、0.05μg/kg、0.1μg/kg、0.5μg/kg、1μg/kg、10μg/kg、25μg/kg、50μg/kg、100μg/kg、250μg/kg、500μg/kg；5mg/kg、10mg/kg、25mg/kg、50mg/kg、100mg/kg、および200mg/kg、または約0.01mg/kgから10mg/kg、0.05mg/kgから5mg/kg、0.07mg/kgから2mg/kg、0.1mg/kgから0.9mg/kg、0.2mg/kgから0.7mg/kg、0.3mg/kgから0.5mg/kgを含む約0.001μg/kgから約1000mg/kgの間の用量で対象に投与される。

【0108】

PolyMetまたはLPH-PolyMetが生物製剤の積荷を有する実施形態のいくつかにおいて、これらは、約0.01mg/kgから約1000mg/kgの間の用量で対象に投与されてもよく、以下に限定されるものではないが、約0.01mg/kg、0.05mg/kg、0.1mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg、10mg/kg、11mg/kg、12mg/kg、13mg/kg、14mg/kg、15mg/kg、16mg/kg、17mg/kg、18mg/kg、19mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、50mg/kg、100mg/kg、および250mg/kg、または約0.01mg/kgから10mg/kg、0.05mg/kgから5mg/kg、0.07mg/kgから2mg/kg、0.1mg/kgから0.9mg/kg、0.2mg/kgから0.7mg/kg、および0.3mg/kgから0.5mg/kgを含む。

【0109】

一実施形態において、本明細書に記載されている主題は、積荷を対象の体内の標的に送達する方法を対象とする。本方法は、PolyMetまたはLPH-PolyMetと会合した積荷を対象に投与するステップを含み、積荷は、PolyMetまたはLPH-PolyMetによって対象の体内の標的に送達される。積荷は、本明細書中の別の場所に記載されているとおりの治療用薬剤であってもよい。この実施形態において、本方法は、積荷と複合体を形成した、またはそれと会合したPolyMetまたはLPH-PolyMetを対象に投与するステップを含み、PolyMetまたはLPH-PolyMetは、対象の体内の標的に積荷を提供する。

【0110】

トランスフェクションのための方法およびキット

本明細書に記載されているPolyMetおよびLPH-PolyMetは、細胞の遺伝物質を改变するためのトランスフェクション剤として使用することができる。遺伝物質

を細胞に送達し、それにより、細胞の遺伝物質を改変することができるように、外来性の遺伝物質を PolyMet および LPH-PolyMet と複合体を形成させるか、またはそれと会合させてもよい。それゆえに、本明細書に記載されている PolyMet および LPH-PolyMet は、細胞にトランスフェクションするために有用である。

【0111】

一実施形態において、本明細書に記載されている主題は、細胞の遺伝物質を改変する方法であって、細胞を外来性の遺伝物質と複合体を形成したか、またはそれと会合した PolyMet または LPH-PolyMet と接触させるステップを含み、細胞の遺伝物質が改変される、方法を対象とする。「外来性の遺伝物質」という用語は、細胞の外から送達されるあらゆる遺伝物質を指す。

10

【0112】

この実施形態において、細胞は、真核細胞、哺乳動物細胞、植物細胞または原核細胞であってもよい。特定の細胞としては、初代細胞培養物、継代細胞培養物または細胞株、ヒト細胞株、動物細胞株、および線維芽細胞が挙げられる。

【0113】

遺伝物質は、核酸であってもよい。本発明は、真核細胞、特に、高等真核細胞に核酸をトランスフェクションするための組成物および方法を提供する。DNA および RNA の両方の核酸は、それらの生物学的機能を保持するように細胞に導入される。本発明の方法によってトランスフェクションすることができる核酸は、天然ベースまたは非天然ベースを含む任意の供給源からの任意のサイズの DNA および RNA を含み、細胞において治療タンパク質または別の有用なタンパク質をコードし、発現させることができるもの、細胞における核酸の望ましくない発現を阻害するもの、望ましくない酵素活性を阻害するか、または所望の酵素を活性化するもの、反応を触媒するもの（リボザイム）、および診断用アッセイにおいて機能するもの（例えば、診断用核酸）が挙げられる。治療効果のある核酸としては、治療上有用なタンパク質、ペプチドもしくはポリペプチドをコードするか、または細胞においてそれらを発現することができる核酸、細胞において核酸の望ましくない発現を阻害するもの、および細胞において望ましくない酵素活性を阻害するか、または所望の酵素を活性化するものが挙げられる。

20

【0114】

LPH 製剤における siRNA の遺伝子サイレンシング効果を判定した。H460/Luc 細胞は、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を安定にトランスフェクションされた細胞である。LPH-PEI-siLuc 製剤および LPH-PolyMet-siLuc 製剤として製剤化された siRNA は、同様の粒子サイズ（およそ 80 nm）およびゼータ電位（およそ +20 mV）を有していた。図 8 に示したとおり、リポフェクタミンと同様に、LPH-PolyMet-siLuc は、60 nM と少ない siRNA でサイレンシングされた遺伝子発現が 50 % に達したが、LPH-PEI-siLuc は約 10 % のサイレンスにしか達しなかった。in vitro における PolyMet ナノ粒子を用いたそのような効率的な siRNA サイレンシングは極めて望ましい。

30

【0115】

in vivo において遺伝子物質を送達する PolyMet の性能を判定した。PolyMet は、場合によっては多くの siRNA を送達することができるが、この試験では BCL-2 siRNA を例示的遺伝子の 1 つとして選択した。抗アポトーシス性タンパク質である BCL-2 は細胞の生存を助長するため、BCL-2 の阻害は標準的な療法に対するがん細胞の感受性を高める（Tabuchi, Y. et al. Resistance to paclitaxel therapy is related with Bcl-2 expression through an estrogen receptor mediated pathway in breast cancer. Int J Oncol 34, 313-319 (2009)）。処置後の BCL-2 の生物学的活性のレベルを、ウエスタンプロットによって検出した（図 8B）。LPH-PolyEMT-siBCL2 では、すべての他の群と比較して増強された BCL-

40

50

2 レベルのダウンレギュレーションが起き、腫瘍増大の確固とした持続的抑制をもたらした(図 8 C)。TUNEL アッセイは、腫瘍においてアポトーシス細胞の誘導をさらに確認した。LPH-PolyMet-siBCL2 処置後の TUNEL-陽性アポトーシス細胞の数は約 70% であり、これは、他のすべての群よりも著しく高かった(図 8 D)。これは、BCL2 発現のダウンレギュレーション後にアポトーシスが増大することを示す。

【0116】

重要なことに、LPH-PolyMet-siCtrl は、PBS または LPH-PEI-siCtrl と比較して著しく高い腫瘍抑制を示したことも確認され、これは、LPH-PolyMet ナノ粒子で観察された結果を確認するものであった(図 6)。

10

【0117】

血管形成を引き起こす助けをする血管内皮増殖因子(VEGF)の産生を抑制するよう設計した siRNA も調査した。LPH-PolyMet-siVEGF 処置時に腫瘍増大が著しく弱められ、VEGF のレベルが劇的に低下した(図 9)。

【0118】

pDNA トランスフェクションに関するさまざまな PolyMet の能力を、ルシフェラーゼプラスミドを使用してアッセイし、図 10 は、さまざまな N/P 比のポリプレックスのトランスフェクション効率および細胞毒性を示す。0.5 から 15 の N/P 範囲において、PolyMet の相対発光単位(RLU) 値は、8 の最適な N/P 比で一般的なベル状の外形を示した。この比では、PolyMet_{100k}/pDNA 複合体が、他のすべての薬剤と比較して最も高いトランスフェクション能力を有し、従来のトランスフェクション剤であるリポフェクタミンよりも 1.5 倍も高かった。本発明者らの以前の研究では、siRNA および pDNA のための薬物担体としてプロタミンを使用している。しかしながら、図 10 に示されるとおり、プロタミンは、トランスフェクションの有効性を促進しなかった。

20

【0119】

本明細書中の別の場所に記載されているとおり、トランスフェクション剤およびトランスフェクション促進剤は、治療用途のためのさまざまな医薬組成物および剤形として提供することができる。一般に、医薬組成物は、核酸が標的細胞または標的組織で所望の治療効果を有するよう十分に高いレベルの核酸を標的細胞または標的組織に導入するために十分なトランスフェクション剤および任意の促進剤を含むべきである。治療効果があるであろう標的細胞または組織における核酸のレベルは、阻害の効率またはその他の生物学的機能、および核酸が影響を及ぼさなければならない部位の数により決まることになる。

30

【0120】

in vitro において細胞と接触させられる、または in vivo において対象に投与されるトランスフェクション剤の投与量は、投与の方法および部位、患者の年齢、体重および状態を含む多くの他の要因により決まることになる。当業者は、所与のタイプの投与のため、所与の患者および所与の治療的適用のための投与量を容易に調整することができる。

40

【0121】

トランスフェクション組成物の構成成分は、試薬キットとして提供されてもよい。一般に、本キットは、トランスフェクション試薬として PolyMet または LPH-PolyMet を含む。遺伝物質は、キットとともに供給されてもよく、またはエンドユーザーが遺伝物質を PolyMet または LPH-PolyMet に加えてもよい。キット構成成分は、適した培地または溶媒を含んでもよい。

【0122】

コレステロールの新規のカチオン誘導体、コレステロール-メトホルミンも、遺伝子治療のためのリポソームを調製するために合成および使用した(スキーム 2)。ビグアニン群は、処置細胞および臓器に対して低毒性であることが示されたと同時に in vitro および in vivo における効率的な核酸トランスフェクションを促進することがで

50

きる。

【0123】

なお、「ステロール」という用語は、A環の3位にヒドロキシル基があるステロイドのサブグループである化学物質のグループを指す。これらは、特定の4つの環状骨格を有し、これは、特定のステロールにより原子の立体化学および置換基が変化する。一般に、ステロールは、約27から約30個の炭素原子を含み、ときには1つの二重結合を含む。ステロールの例としては、コレステロール、カンペステロール、シトステロール、スチグマステロール、エルゴステロール、ニカステロール、ラノステロール、オキシステロール、デスマステロール、ゴルゴステロール、およびジノステロールが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

10

【0124】

合成方法

一実施形態において、本明細書に記載されている主題は、酸の存在下においてPEIをジアンジアミドと接触させるステップを含むPolyMetを調製する方法を対象とする。酸は、任意の無機酸または有機酸であってもよい。特に有用な酸としては、HClが挙げられる。

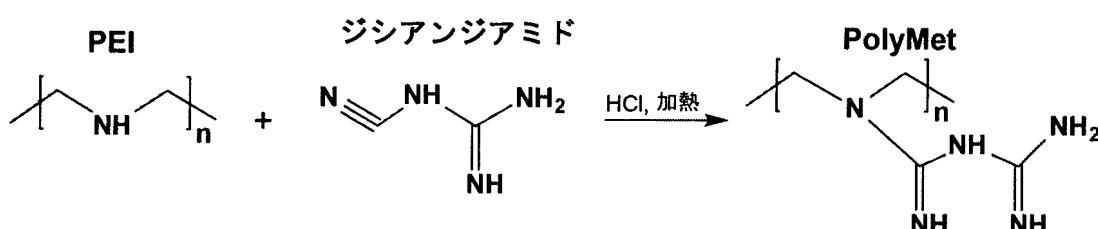
【0125】

PolyMetは、直鎖または分岐PEIの存在下におけるHClなどの酸によるジアンジアミドプロトン化時に合成される。スキーム1を参照。いかなる理論に縛られるものではないが、分子内水素結合が遮断されて、それがPEIの中心の窒素に位置する非共有電子対の求核攻撃を可能にすると考えられる。PolyMetをMALDI-TOFを使用して特徴づけした。これは、ジアンジアミドによるPEIの修飾が達成されたことを示していた(図2)。

20

スキーム1. ポリ-メトホルミン(PolyMet)を調製するための合成経路。

【化28】



30

【0126】

この実施形態において、本明細書に記載されている主題は、メトホルミンのポリマーを調製する方法であって、

a. 溶媒中において直鎖または分岐ポリエチレンイミンをジアンジアミドと接触させて、第1の混合物を調製するステップ、

b. 第1の混合物を酸と接触させて、第2の混合物を調製するステップ、および

c. 第2の混合物をある期間加熱するステップ

を含み、メトホルミンのポリマーが調製される方法を対象とする。

40

【0127】

有用な溶媒としては、水、メタノール、エタノール、DMF、クロロホルム、THF、DMSOなどを含む水性溶媒が挙げられる。

【0128】

有用な酸としては、HCl、硫酸、硝酸、ホウ酸を含む有機酸および無機酸が挙げられる。

【0129】

50

有用な触媒としては、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Al^{3+} 、 Si^{4+} 、 Ti^{4+} などを含む金属イオン触媒作用、または静電的触媒作用が挙げられる。

【0130】

有用な期間としては、数分から数時間まで、数日間まで、例えば、5分以上から2~6時間またはさらに1~6日間もしくは1週間が挙げられる。

【0131】

第2の混合物を加熱するステップは、選択した特定の溶媒により決まることもある所望の温度または温度の範囲に反応が達するまで熱を加えることを含む。有効な温度としては、約30から約200、約50から約150、約75から約125が挙げられる。

10

【0132】

ステップが実施される順序は、特に重要でない場合もあり、そのような場合には、ステップの順序を変更することができる。

【0133】

本方法は、精製ステップをさらに含んでもよい。そのような精製は、サイズまたは他の特性に基づく場合がある。ポリマーを精製するための方法は、当該技術分野において知られている。

【0134】

別の実施形態において、本明細書に記載されている主題は、積荷を有するLPH-PolyMetを調製する方法を対象とする。この実施形態において、本方法は、積荷を、PolyMetを含むLPHナノ粒子（「LPH-PolyMet」）中に装填するステップを含む。

20

【0135】

LPH-PolyMetナノ粒子を調製するために、最初にPolyMet/HA複合体のN/P比（核酸またはヒアルロン酸のリン酸基のモル比に対するカチオン性ポリマーのアミン基のモル比）を調節し、ナノ粒子のサイズ、多分散性および-電位を比較した。N/P比およそ0.9において大きな凝集体が観察され、この場合、中性の複合体が形成された。より小さな粒子を形成するために、複合体が比較的小さなサイズ（約100nm）で負に帯電（約-20mV）したままであったため、約0.6の比を利用し、この比においては、PEI-HA複合体はPolyMet-HA複合体と類似した電荷およびサイズを有した（図3）。

30

【0136】

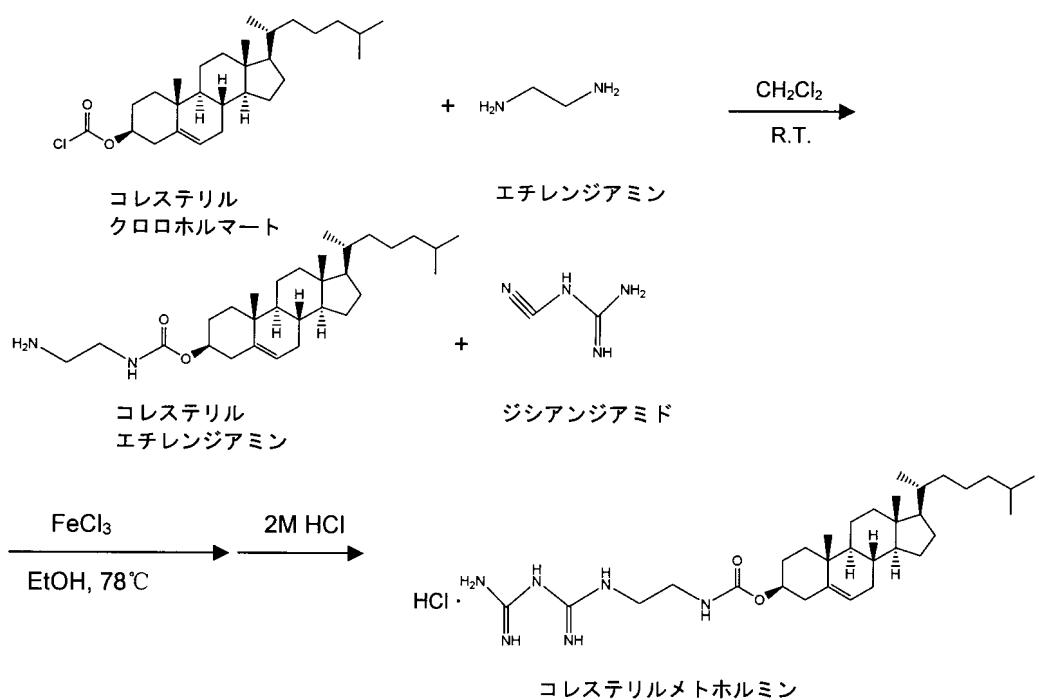
次に、DOTAP/コレステロール（1:1mol/mol）カチオン性リポソームを複合体に添加して、電荷-電荷相互作用により脂質コーティングを形成した。DSPE-PAGEおよびDSPE-PAGE-アニスアミドを、その後、リポソーム中にポストインサーション法により添加した。H460ではシグマ受容体が過剰発現するという事実のため（Miao, L. G., S.; Zhang, J.; Kim, W.; Huang, L. Nanoparticles with Precise Ratiometric Co-Loading and Co-Delivery of Gemcitabine Monophosphate and Cisplatin for Treatment of Bladder Cancer. Advanced Functional Materials 24, 6601-6611 (2014)）、ナノ粒子を腫瘍に特異的に送達するための標的化リガンドとしてアニスアミドが利用される。最終的なナノ粒子は70~80nmでおよそ20mVの正電荷を有する（図4）。

40

【0137】

【化29】

スキーム2



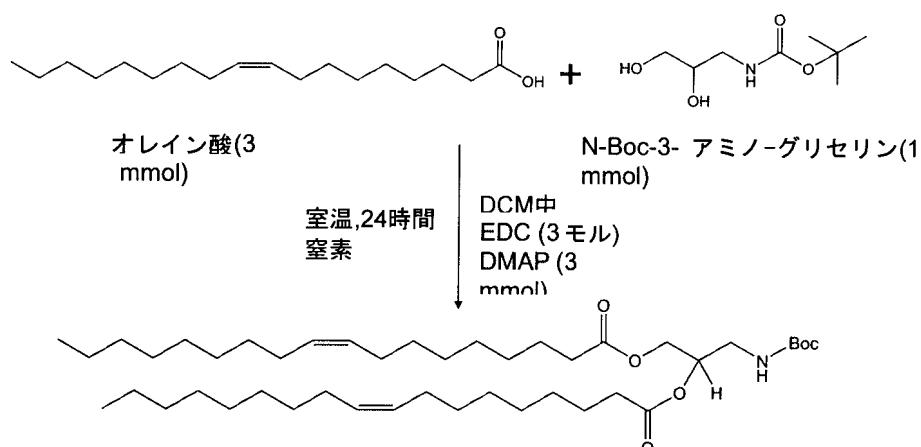
スキーム2は、コレステリル-メトホルミンの合成を示す。

【0138】

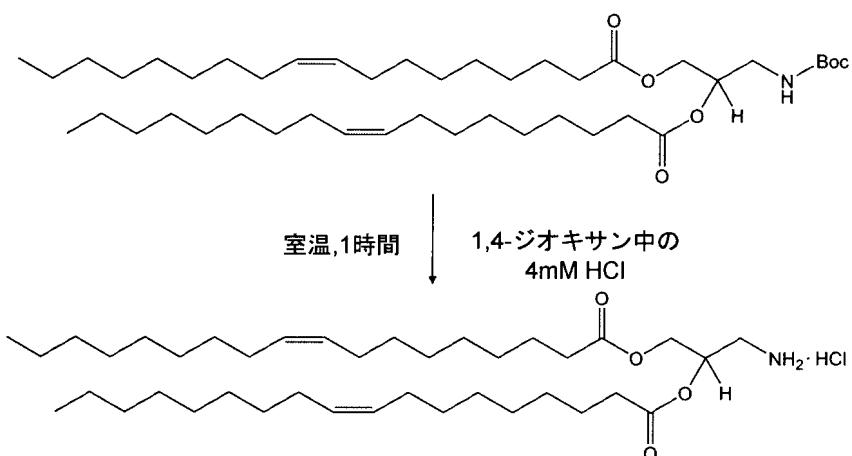
【化30】

スキーム3

ステップ1:

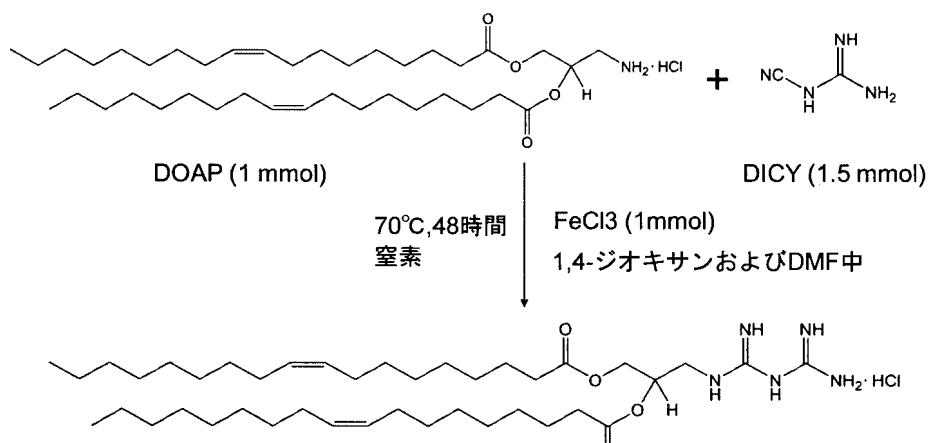


ステップ2:



1,2-ジ-(9Z-オクタデセノイル)-3-アミノ-プロパン(DOAP)

ステップ3:

1,2-ジ-(9Z-オクタデセノイル)-3-ビグアニド-プロパン
(DOBp)

スキーム3は、メトホルミン修飾DOTAP(DOBP)カチオン性脂質の合成を示す

。

【0139】

医薬製剤

本明細書中で使用される場合、「送達する」という用語は、物質または分子（例えば、ポリヌクレオチド、生物活性化合物、もしくは薬物）の生理的部位、組織、または細胞への運搬を指す。これは、細胞の細胞内部分または細胞外空間への送達を包含する。本明細書中で使用される場合、「細胞内の」または「細胞内に」という用語は、当該技術分野において理解されるとおりのその通常の意味を有する。一般に、膜によって取り囲まれている細胞の内部の空間が、「細胞内」空間と定義される。同様に、本明細書中で使用される場合、「細胞外の」または「細胞外に」という用語は、当該技術分野において理解されるとおりのその通常の意味を有する。一般に、細胞膜の外側の空間が、「細胞外」空間と定義される。

10

【0140】

本明細書において開示される方法は、治療用薬剤またはその薬剤の誘導体もしくは類似体を送達することを可能にする。用語「誘導体」または「類似体」とは、化学的に修飾された治療用薬剤を意味する。例えば、当該技術分野において既知の方法によってその疎水性を増加または低下させることによって、治療用薬剤の溶解度が変更される場合もある。

【0141】

本明細書に記載されているナノ粒子は、動物試験において、哺乳動物の組織培養系においておよび治療のために有用である。治療活性を有する生物活性化合物を含むナノ粒子は、発現されるか、または細胞中に導入される場合、治療用途に使用することができる。本ナノ粒子は、治療目的で投与することができるか、またはさらなる薬学的担体とともにナノ粒子を含む医薬組成物を、送達用に、すなわち、以下に限定されるものではないが、非経口（例えば、静脈内）、皮内、皮下、経口、経鼻、気管支、目、経皮（局所的）、経粘膜、直腸、および経膣経路を含む任意の利用可能な経路によって対象へ投与するために製剤化することができる。一部の実施形態において、送達の経路は、静脈内、非経口、経粘膜、経鼻、気管支、経膣、および経口である。

20

【0142】

本明細書中で使用される場合、「薬学的に許容される担体」という用語は、薬学的な投与に適合した溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤、抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤、ならびに同種のものを含む。追加の活性化合物も組成物中に組み込まれてよい。

30

【0143】

当業者が認識するであろうように、本開示の医薬組成物は、その意図される投与経路と適合するよう製剤化される。非経口（例えば、静脈内）、筋肉内、皮内、または皮下適用のために使用される溶液または懸濁液としては、以下の構成成分、滅菌した希釈剤、例えば、注射用水、生理食塩水、不揮発性油、ポリエチレンギリコール、グリセリン、プロピレンギリコールまたはその他の合成溶媒；抗菌剤、例えば、ベンジルアルコールまたはメチルパラベン；酸化防止剤、例えば、アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウム；キレート剤、例えば、エチレンジアミン四酢酸；緩衝剤、例えば、アセテート、シトаратまたはホスフェート；および浸透圧の調節のための薬剤、例えば、塩化ナトリウムまたはデキストロースを挙げることができる。pHは、酸または塩基、例えば、塩酸もしくは水酸化ナトリウムを用いて調節することができる。非経口調製物は、ガラスもしくはプラスチック製のアンプル、使い捨てシリンジまたは複数用量バイアルに封入することができる。

40

【0144】

注入可能な使用に適した医薬組成物は、一般に本明細書中の別の場所に記載されているものなどの滅菌水溶液または分散液および無菌性の注射可能な溶液もしくは分散液の即席の調製のための滅菌された粉末を含む。静脈内投与に適した担体としては、生理的食塩水、静菌水、またはリン酸緩衝食塩水（P B S）が挙げられる。本組成物は、無菌性でなければならず、容易な注射針通過性がある程度に流体でなければならない。一部の実施形態において、本医薬組成物は、製造および保管の条件下において安定であり、細菌および真菌などの微生物の汚染作用から保護されなければならない。一般に、関連した担体は、例

50

えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエティレングリコールなど）、ならびに適したそれらの混合物を含む溶媒または分散媒であってもよい。微生物の作用の防止は、さまざまな抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサール、および同種のものによって達成することができる。一部の実施形態において、等張化剤、例えば、糖、マンニトールもしくはソルビトールなどのポリアルコール、または塩化ナトリウムが製剤に含まれる。注入可能な製剤の長期の吸収は、製剤中に吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを含むことによってもたらすことができる。

【0145】

10

無菌性の注射可能な溶液は、本明細書中の別の場所に記載されているとおり、ろ過滅菌によって調製することができる。特定の実施形態において、注射用溶液は、エンドトキシンがないものである。一般に、分散液は、ベースの分散媒および上に挙げられているものからの必要とされるその他の成分を含む無菌性ビヒクルにナノ粒子を組み込むことによって調製される。滅菌された粉末が無菌性の注射可能な溶液の調製に使用される実施形態において、溶液は、活性成分および予め滅菌ろ過したその溶液に由来する任意のさらなる所望の成分の粉末を生ずる真空乾燥およびフリーズドライによって調製することができる。

【0146】

20

経口用組成物は、不活性希釈剤または可食性担体を一般に含む。経口用組成物は、口内洗浄剤として使用するための流体担体を使用して調製することができる。組成物の一部として薬学的に適合した結合剤、および／または補助材料が含まれてもよい。経口用組成物は、甘味剤、例えば、スクロースもしくはサッカリン、または香料、例えば、ペパーミント、メチルサリチレート、もしくはオレンジ香料を含んでもよい。

【0147】

吸入による投与のための、本開示の組成物は、適した噴射剤、例えば、二酸化炭素などの気体を含む加圧された容器またはディスペンサーからのエアロゾルスプレー、またはネプライザーの形態で送達することができる。液体エアゾル、乾燥粉末、および同種のものも使用することができる。

【0148】

30

本開示の組成物の全身投与も、経粘膜または経皮手段によってであってもよい。経粘膜または経皮投与のために、通過させる閑門に適切な浸透剤が製剤に使用される。そのような浸透剤は、当該技術分野において一般に知られており、例えば、経粘膜投与のための、界面活性剤、胆汁酸塩、およびフシジン酸誘導体が挙げられる。経粘膜投与は、鼻腔スプレーまたは座剤の使用により成し遂げることができる。経皮投与のために、活性化合物は、当該技術分野において一般に知られている軟膏、膏薬、ゲルまたはクリームに製剤化される。

【0149】

40

投与の容易さおよび投与量の均一性のために経口または非経口組成物を単位剤形に製剤化することが有利である。本明細書中で使用される場合、単位剤形とは、処置される対象に対する単位用量として適切な物理的に個別の単位を指す。それぞれの単位は、必要とされる医薬または化粧用担体と関連して所望の治療効果をもたらすよう算出された所定量の活性化合物を含む。本発明の単位剤形の仕様は、(a)活性化合物の固有の特徴および達成される特定の治療効果、ならびに(b)個体の処置のためのそのような活性化合物を調合する技術分野に固有の制限によって決定され、それらに直接左右される。投薬に関する指針は、本明細書中の別の場所で提供される。

【0150】

50

一実施形態において、本主題は、本明細書に記載されているナノ粒子を提供する製造品も含む。本製造品は、任意の担体とともに本方法に適した乾燥形態、もしくは液体形態のいずれかの組成物が入っているバイアルまたはその他の容器を含んでもよい。本製造品は、本発明の方法を行うための容器上のラベルの形態の指示書および／または容器を包装し

ている箱に入れられた挿入物の形態の指示書をさらに含む。指示書は、バイアルを包装している箱の上に印刷されてもよい。指示書はまた、対象または当該分野の従事者が医薬組成物を投与することができるよう十分な投与量および投与情報をなどの情報を含む。当該分野の従事者は、組成物を投与する可能性があるであろうあらゆる医師、看護師、技術者、配偶者、またはその他の介護者を包含することが予想される。本医薬組成物はまた、対象によって自己投与されてもよい。

【0151】

生物活性化合物の細胞への送達は、生物活性化合物の細胞中への送達が対象の外で起こる *in vitro* アプローチ、*ex vivo* アプローチ（トランスフェクションした細胞をその後、対象中に移植することができる）、および送達が対象自体の内部で起こる *in vivo* アプローチを含む場合がある。

10

【0152】

治療有効量のナノ粒子の送達は、治療有効用量の生物活性化合物またはナノ粒子を含む医薬組成物の投与により行われてもよい。「治療有効量」または「用量」とは、所望の治療効果を引き出すのに十分なそこに含まれる送達系または生物活性化合物の濃度を意味する。有効量は、1回以上投与されてもよい。

【0153】

有効性および投与量を判定するための方法は、当業者に知られている。参照によって本明細書に組み込んだものとする、例えば、Isselbacher et al. (1996) *Harrison's Principles of Internal Medicine* 13 ed., 1814-1882 を参照のこと。当然のことながら、化合物の適切な用量はその効力に依存し、特定の受け手に対して、例えば、予め選択された所望の応答が達成されるまで用量を増加させる投与により任意に調整できることが理解される。当然のことながら、任意の特定の動物対象に対する特定の用量レベルは、利用される特定の化合物の活性、対象の年齢、体重、全身の健康状態、性別、および食餌、投与の時間、投与経路、排出の速度、あらゆる薬物併用、ならびに調節される発現または活性の程度を含むさまざまな要因によって決まる場合があることが理解される。

20

【0154】

そのような化合物の毒性および治療有効性は、例えば、 LD_{50} （集団の 50 % に対して致死的な用量）および ED_{50} （集団の 50 % で治療効果のある用量）を求めるための細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手順によって判定することができる。毒性（例えば、免疫毒性）作用と治療効果との間の用量比は治療指数であり、比 LD_{50} / ED_{50} と表すことができる。高い治療指数を示す化合物が好ましい。毒性副作用を示す化合物が使用されてもよいが、そのような化合物を冒された組織の部位へと標的化して、感染していない細胞に対する損傷の可能性を最小限にし、それにより副作用を低減する送達系を設計するよう配慮すべきである。

30

【0155】

細胞培養アッセイおよび動物試験から得たデータは、ヒトに使用するための投与量の範囲を定式化する際に使用することができる。そのような化合物の投与量は、好ましくは、毒性がわずかか、またはなく、 ED_{50} を含む循環中濃度の範囲にある。投与量は、利用される剤形および利用される投与経路によりこの範囲内で変化してもよい。本開示の方法に使用されている任意の化合物に関する治療有効用量は、まず細胞培養アッセイから推定することができる。用量は、動物モデルにおいて、細胞培養において求められた IC_{50} （すなわち、症状の最大の阻害の半分を達成する試験化合物の濃度）を含む循環血漿中濃度範囲を達成するよう定式化されてもよい。そのような情報を使用して、ヒトで有用な用量をさらに正確に決定することができる。血漿中のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって測定することができる。

40

【0156】

本医薬製剤は、必要に応じて、例えば、1日に複数回、毎日、1日おき、約1から10週間の間、2から8週間の間、約3から7週間の間、約4、5、または6週間の間の週1

50

回などさまざまな間隔で、異なる期間にわたって投与することができる。当業者は、以下に限定されるものではないが、疾患、障害、もしくは望ましくない状態の重症度、以前の処置、全身の健康状態および／または対象の年齢、および存在している他の疾患もしくは望ましくない状態を含む特定の要因が、対象を効果的に処置するために必要とされる投与量およびタイミングに影響を与える可能性があることを認識するであろう。一般に、対象の処置は、1つの処置を含んでもよく、または、多くの場合、一連の処置を含んでもよい。さらに、対象の処置は、1つの美容のための適用を含んでもよく、または一部の実施形態において、一連の美容のための適用を含んでもよい。

【0157】

本発明は、本明細書に記載されているナノ粒子を提供する製造品も含む。本製造品は、任意の担体とともに本方法に適した乾燥形態、もしくは液体形態のいずれかの組成物を入れたバイアルまたはその他の容器を含んでもよい。本製造品は、本発明の方法を行うための容器上のラベルの形態の指示書および／または容器を包装している箱に入れられた挿入物の形態の指示書をさらに含む。指示書は、バイアルを包装している箱の上に印刷されてもよい。指示書は、対象または当該分野の従事者が医薬組成物を投与することができるよう十分な投与量および投与情報をなどの情報を含む。当該分野の従事者は、組成物を投与する可能性があるであろうあらゆる医師、看護師、技術者、配偶者、またはその他の介護者を包含することが予想される。本医薬組成物はまた、対象によって自己投与されてもよい。

10

【0158】

当業者は、本開示の主題の検査時に本開示のPolyMethyl化合物、そのナノ粒子および医薬組成物が、細胞、細胞培養物、細胞培養培地、組織、組織培養物、組織培養培地、および同種のものへ直接投与することができることを認識するであろう。本発明の送達系を言及する場合、「投与すること」という用語およびその派生物は、化合物を細胞と接触させる任意の方法を含む。本開示の化合物またはその医薬組成物は、*in vitro*または*ex vivo*において細胞または組織に投与され（またはそれと接触させられ）てもよい。本開示のPolyMethyl化合物、そのナノ粒子および医薬組成物はまた、本明細書中の別の場所に記載されているとおり、*in vivo*において細胞または組織に個々の対象、例えば、患者への投与、例えば、全身投与（例えば、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、もしくは頭蓋内投与）または局所適用により投与され（またはそれと接触させられ）てもよい。

20

30

【0159】

以下の実施例は、説明のために提供され、限定の意図はない。

【実施例】

【0160】

材料および方法

化学薬品

1, 2 - デオレオイル - 3 - トリメチルアンモニウム - プロパン塩化物塩 (DOTAP) および 1, 2 - デステアロリル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ(ポリエチレングリコール - 2000)アンモニウム塩 (DSPE - PEG 2000) を Avanti Polar Lipids, Inc. (アラバスター、アラバマ州) から購入した。DSPE - PEG - アニスアミド (AA) を以前に記載されたとおりに本発明者らの研究室で合成した (Banerjee, R., Tyagi, P., Li, S. & Huang, L. Anisamide-targeted stealth liposomes: a potent carrier for targeting doxorubicin to human prostate cancer cells. International journal of cancer. Journal international du cancer 112, 693 - 700 (2004))。Dead End Fluorometric TUNEL アッセイキットおよび Luciferase Assay System アッセイ基質を Promega

40

50

(マディソン、ウィスコンシン州)から入手した。その他の化学薬品は、Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州)から入手した。BCL2 siRNA (標的配列: 5' - AAC AUC GCC CUG UGG AUG ACU - 3')、VEGF siRNA (標的配列: 5' - ACC UCA CCA AGG CCA GCA C - 3') および対照 siRNA (標的配列: 5' - AAU UCU CCG AAC GUG UCA CGU - 3') は、Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州)によって合成された。

【0161】

細胞培養

H460、H460/LucヒトNSCLC細胞、B16F10、およびB16F10/Lucマウスマテローマがん細胞を初めはAmerican Type Culture Collection (ATCC) から入手し、10%ウシ胎仔血清 (Life Technologies、カールズバッド、カリフォルニア州)、100U/mL ペニシリン、および100μg/mL ストレプトマイシン (Invitrogen) を加えたDMEM培地 (Invitrogen、カールズバッド、カリフォルニア州)において培養した。細胞を、加湿したインキュベーター中ににおいて37 および5%CO₂で培養した。

【0162】

実験用マウス

6~8週齢の雌ヌード雌マウスおよび雌CD1マウスを研究に使用した。雌ヌードマウスはNational Cancer Institute (ベセスタ、メリーランド州)から購入し、チャペルヒルにあるノースカロライナ大学のDivision of Laboratory Animal Medicine (DLAM) が繁殖させた。CD1マウスをCharles River Laboratories (モリスビル、ノースカロライナ州)から購入した。異種移植モデルを確立するために、100μLのPBS中の5×10⁶細胞をマウスの右脇腹に皮下注射した。

【0163】

実施例1: PolyMetの調製

PolyMetを調製するために、0.2gの直鎖PEIおよび2gのジシアンジアミドを10mLの水中で混合した。その後、2mLのHClを溶液に添加した。その化合物を、その後、100 で約4時間反応させた。その後、PolyMetを3000Daのカットオフの限外ろ過チューブにより精製し、凍結乾燥した。PolyMetの溶液を、実験のために1mg/mL、1mLアリコートに維持した。

【0164】

実施例2: LPHナノ粒子の調製

DOTAP (20mM、1mL) およびコレステロール (20mM、1mL) をクロロホルム中に溶解 (1:1 mol/mol) させ、減圧下で溶媒を除去した。脂質膜を2mLの蒸留水で一晩水和して、カチオン性リポソーム (10mM) を形成し、これを、ポリカーボネート膜 (200nm×20回、100nm×20回および50nm×20回) (Millipore、ビルリカ、マサチューセッツ州) を通して連続的に押し出した。

【0165】

異なる比率を有するいくつかの異なる複合体を調製した。PolyMet-HA複合体またはPEI-HA複合体を調製するために、200μLのHA (25μgのHA、蒸留水中) および200μLのPEI溶液 (蒸留水中に2~3.9μgのPEIを含む) または200μLのPolyMet溶液 (蒸留水中に5.8~11.6μgのPolyMetを含む) を1.5mLのチューブ中で混合した。ピペットを10回上下させることによって複合体を混合し、サイズおよびゼータ電位の分析の前に室温で10分間そのままにした。複合体の比率は、Malvern Zetasizer Nanoシリーズ (ウェストバラ、マサチューセッツ州) を使用して動的光散乱 (DLS) によって測定した粒子サイズおよびゼータ電位の結果によって求めた。

10

20

30

40

50

【0166】

複合体の所望の比率を選択した後、複合体を 60 μL のカチオン性 D O T A P / コレステロールリポソーム (10 mM) と混合し、脂質コーティングのためにさらに 10 分間インキュベートした。脂質コーティングされたナノ粒子を、45 μL の D S P E - P E G および D S P E - P E G - A A (10 mg / mL 1 : 1 v / v) を添加し、ナノ粒子を 50 ℃ で 15 分間インキュベートすることによってポストインサーションアプローチを使用してペグ化した。得られた L P H ナノ粒子を、以下の実験に 20 分以内に使用した。

【0167】

s i R N A 試験のために、200 μL の H A (25 μg の H A、蒸留水中) 溶液を使用する代わりに、200 μL の H A / s i R N A (12.5 μg の H A、12.5 μg の s i R N A、蒸留水中) 溶液を使用し、1.5 mL のチューブ中でさまざまな量の P o l y M e t 溶液または P E I 溶液を混合した後、所望の比率の製剤を選択した。

10

【0168】

実施例 3 : L P H N P の特徴づけ

L P H の透過型電子顕微鏡 (T E M) 画像を J E O L 100 C X I I T E M (東京、日本) を使用することにより得た。手短に説明すると、新たに調製した L P H ナノ粒子 (5 μL) を注意深く 300 メッシュの炭素コーティング銅グリッド (T e d P e l l a , I n c . 、レディング、カリフォルニア州) 上に滴下し、室温で 5 分間そのままにした。グリッドを、その後、1% 酢酸ウラニル (5 μL) で着色し、短時間 (10 秒間) インキュベートし、急速に乾燥した。すべての画像は 100 k V の加速電圧で得た。

20

【0169】

実施例 4 : 動物腫瘍モデルおよび抗腫瘍活性

ヒト N S C L C 細胞異種移植片を前に記載したとおりに使用した。H 4 6 0 ヒト肺がん細胞 (5.0 × 10⁶) を雌の胸腺欠損 n u / n u マウスの右脇腹に皮下注射した。腫瘍が約 0.1 cm³ のサイズに達したとき (移植の 10 ~ 15 日後) 、H 4 6 0 腫瘍をもつマウスに製剤の尾部静脈内 (I V) 注射を隔日で与えた。動物の体重および腫瘍体積を 1 日おきに測定した。腫瘍の長さ (L) および幅 (W) を使用して、方程式 : V = 1 / 2 × L × W² によって体積 (V) を算出した。

【0170】

実施例 5 : ウエスタンプロット分析

30

H 4 6 0 腫瘍をもつマウスに隔日で I V 注射を与え、3 回目の注射の 24 時間後にマウスを屠殺した。4% ~ 12% S D S - P A G E 電気泳動 (I n v i t r o g e n) によってレーン毎にタンパク質を分離した後、ポリフッ化ビニリデン (P V D F) 膜 (B i o - R a d) に転写した。その膜を 5% 脱脂粉乳 (B i o - R a d) により室温で 1 時間プロッキングした後、抗体とともに一晩、4 ℃ でインキュベートした。その膜を 3 回洗浄した後、二次抗体 (1 : 4, 000 希釀、C e l l s i g n a l I n c .) とともに室温で 1 時間インキュベートした。最後に、その膜を 4 回洗浄し、製造業者 (T h e r m o S c i e n t i f i c) の説明書に従って増強化学発光システムを使用して現像した。

【0171】

実施例 6 : 免疫染色

40

全身投与後の i n v i v o における腫瘍細胞のアポトーシスを、T d T - m e d i a t e d d U T P N i c k - E n d L a b e l i n g (T U N E L) アッセイによって測定した。H 4 6 0 腫瘍をもつマウスに隔日で合計 3 回、製剤の I V 注射を与えた。最後の注射の 24 時間後、マウスを屠殺し、腫瘍を 10% ホルマリン中で 24 時間固定した後、パラフィンに包埋し、5 μm の厚さの切片を作った。

【0172】

製造業者 (P r o m e g a) が推奨するように T U N E L 染色を行った。D A P I 封入剤 (V e c t o r L a b o r a t o r i e s , I n c . 、バーリングーム、カリフォルニア州) を核染色のために切片に滴下した。T U N E L 染色腫瘍切片の画像を蛍光顕微鏡 (株式会社ニコン、東京、日本) により取り込んだ。各顕微鏡視野のアポトーシス細胞の

50

数を全細胞の数 (D A P I によって染色された青い核、図示せず) で割ることによってアポトーシス細胞のパーセンテージを得た。10個の代表的な顕微鏡視野を、この分析のために各処置群 (n = 3) においてランダムに選択した。

【 0 1 7 3 】

実施例 7 : 血清生化学値分析および血液学的アッセイ

3回の注射後、全血を採取し、4,000 r p m で5分間遠心分離して血清を得た。腎機能および肝機能の指標として血中尿素窒素 (B U N) 、クレアチニン (C r e a) 、血清アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (A S T) およびアラニンアミノトランスフェラーゼ (A L T) レベルをアッセイした。3回の反復処置後に健康なヌードマウスから全血を採取した。赤血球 (R B C) 、白血球細胞 (W B C) 、プレートレット (P L T) 、ヘモグロビン (H G B) およびヘマトクリット (H C T) を骨髄抑制の検出のためにカウントした。臓器 (心臓、肝臓、脾臓、肺、および腎臓) を固定し、H & E 染色のために切片を作り、臓器特異的毒性を評価した。

10

【 0 1 7 4 】

実施例 8 : in vitro におけるルシフェラーゼ遺伝子サイレンシング試験

H 4 6 0 / L u c 細胞 (1 × 1 0 4 細胞 / 0.2 m L / ウエル) を実験の1日前に96ウェルプレート (Corning Inc. 、コーニング、ニューヨーク州) に播いた。100 μ L の無血清 o p t i - M E M 培地中において 6 、 6 0 、または 1 5 0 n M のルシフェラーゼ - s i R N A を含むさまざまな製剤により、37 で4時間、細胞を処理した。細胞を、その後、P B S で3回洗浄した後、100 μ L の完全D M E M 培地とともにさらに24時間インキュベートした。その後、細胞をP B S で洗浄し、60 μ L の溶解バッファー (0.05 % の T r i t o n X - 1 0 0 および 0.1 M の T r i s - H C l 中の 2 m M の E D T A) とともに30分間インキュベートした。その後、40 μ L のライセートを新しい白い96プレートに移し、100 μ L の基質 (L u c i f e r a s e A s s a y S y s t e m 、 P r o m e g a C o . 、 マディソン、ウィスコンシン州) と混合し、発光強度をプレートリーダー (P l a t e C h a m e l e o n M u l t i l a b e l D e t e c t i o n P l a t f o r m 、 B i o s c a n I n c . 、 ワシントン D C) によって測定した。タンパク質濃度をタンパク質アッセイキット (B C A タンパク質アッセイキット、 T h e r m o S c i e n c e) を使用することによって測定した。各サンプルのルシフェラーゼ活性をタンパク質レベルで正規化した。

20

【 0 1 7 5 】

実施例 9 : コレスティリルメトホルミンの合成

固体コレスティリルクロロホルメート (1 . 0 g 、 2 . 2 m m o l) を 1 0 m L のジクロロメタン (D C M) に溶解させた。別個のフラスコにおいて 0 . 2 2 m o l のエチレンジアミン (1 3 . 2 g) を 1 0 m L の D C M で希釈した。攪拌しながら、コレスティリルクロロホルメート溶液をエチレンジアミン溶液に30分の時間をかけて室温 (R . T .) で滴加した。一晩 R . T . で攪拌した後、残されるサンプル体積が最小になるまで有機溶媒を蒸発させた。およそ 2 0 m L のアセトニトリルを添加して粗生成物を沈殿させた。その後、その固体を回収し、アセトニトリルで数回すすいだ後、空気乾燥した。収率は 9 2 % であった。等モルのコレステロールエチレンジアミン (1 . 0 m m o l) 、ジシアンジアミド (1 . 0 m m o l) および塩化第二鉄 (1 . 0 m m o l) を 1 0 m L のエタノールに溶解させた。その混合物を 7 8 まで加温し、3時間攪拌した。エタノールの蒸発後、5 m L の希塩酸 (2 m o l / L) を添加して、第二鉄イオンを置き換えた。その後、その生成物を単離し、数回アセトニトリルですすいだ後、空気乾燥した。収率は 7 1 % であった。

40

【 0 1 7 6 】

統計分析 : 各処置群間の差を群の組に関してはスチュードント t 検定および複数の群に関しては一元配置分散分析 (A N O V A) を使用することによって分析した。0 . 0 5 未満の p 値は統計学的に有意と見なされる。すべての統計分析は、G r a p h P a d P r i s m ソフトウェア (バージョン 5 . 0 、 G r a p P a d S o f t w a r e 、 サンディエゴ、カリフォルニア州) を使用して行った。

50

【0177】

本明細書において使用されるすべての技術および科学用語は、同じ意味を有する。使用される数（例えば、量、温度など）に対して確実に正確になるよう努力したが、いくつかの実験的誤差およびそれを考慮すべきである。

【0178】

「1つの（aまたはan）」要素という用語は、1つ以上のその要素を指し、例えば、「1つのナノ粒子（a nanoparticle）」は1つ以上のナノ粒子を表すと理解されることに留意されたい。したがって、「1つの（aまたはan）」、「1つ以上の」、および「少なくとも1つ」という用語は、本明細書において同義に使用することができる。

10

【0179】

本明細書および特許請求の範囲全体をとおして、単語「含む（comprise）」、「含む（comprises）」および「含むこと（comprising）」は、文脈が別のことと要求する場合を除いて非排他的な意味で使用される。

【0180】

本明細書中で使用される場合、値を言及するときの「約」という用語は、明記されている量から一部の実施形態においては±20%、一部の実施形態においては±10%、一部の実施形態においては±5%、一部の実施形態においては±1%、一部の実施形態においては±0.5%、および一部の実施形態においては±0.1%の変動を包含することを意味し、したがってそのような変動は開示される本方法を実施するまたは開示される組成物を利用するのに適切である。

20

【0181】

さらに、量、濃度、またはその他の値もしくはパラメーターが範囲、好ましい範囲、または好ましい上限値および好ましい下限値の一覧のいずれかとして示される場合、これは、範囲が別々に開示されているかどうかにかかわらず、任意の範囲上限または好ましい値および任意の範囲下限または好ましい値の任意の組から形成されるすべての範囲が具体的に開示されていると理解されるべきである。本明細書において数値の範囲が列挙されている場合、別に明記されない限り、この範囲は、その端点、ならびに範囲内のすべての整数および小数部を含むことが意図される。本開示の主題の範囲が、範囲を定義するときに列挙された具体的な値に限定されることは意図しない。

30

【0182】

本明細書において言及されるすべての刊行物および特許出願は、本発明が属する分野の当業者のレベルを示す。すべての刊行物および特許出願は、個々の刊行物または特許出願のそれぞれが参照により組み込まれることを明確におよび個別に示されたのと同じ程度まで参照によって本明細書に組み込まれる。

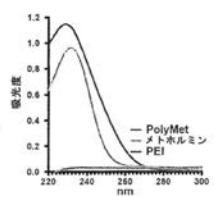
【0183】

本明細書中に記載されている本発明の多くの改変形態および他の実施形態が、これらの発明が属する分野の当業者には、前述の説明および関連する図において提示されている教示の利益により、思い浮かぶであろう。したがって、本発明は、開示されている特定の実施形態に限定されるものではなく、改変形態および他の実施形態が実施形態の前述の一覧および添付の特許請求の範囲の範囲内に含まれることが意図されると理解されるべきである。本明細書において特定の用語が利用されるが、それらは、一般的および説明的な意味でのみ使用され、限定の目的で使用されるものではない。

40

【図1A】

A



【図1B】

B

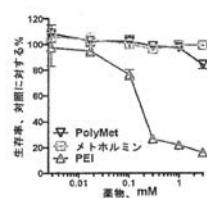


FIGURE 1A

FIGURE 1B

【図1C】

C

ポリマー	MTD,* mg/kg
PEI	2.5
PolyMet	11.5

【図2A】

A

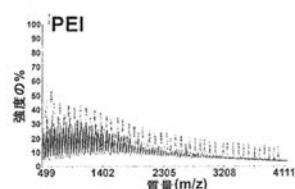


FIGURE 1C

FIGURE 2A

【図 2 B】

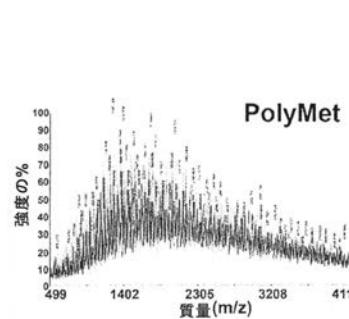


FIGURE 2B

【図 3 A】

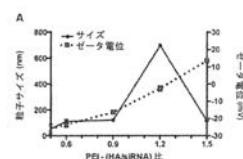


FIGURE 3A

【図 3 B】

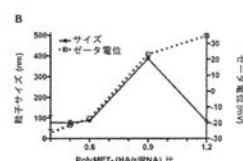


FIGURE 3B

【図 4 A】



FIGURE 4A

【図 4 C】

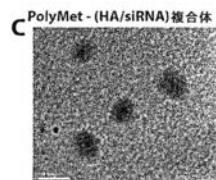


FIGURE 4C

【図 4 B】

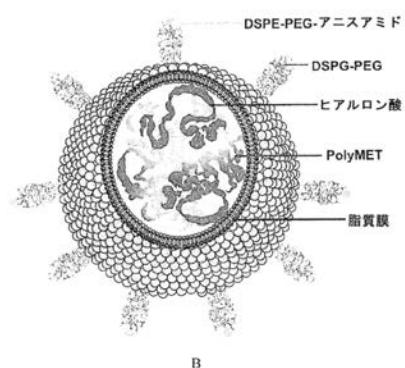


FIGURE 4B

【図 4 D】

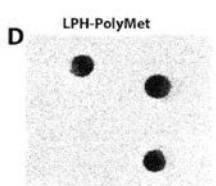


FIGURE 4D

【図 4 E】

ナノ粒子	サイズ(nm)	PDI	ζ -電位
PEI-HA 複合体	110.7 ± 0.5	0.325	-25.2 ± 0.3
PolyMet-HA 複合体	103.1 ± 0.4	0.296	-24.1 ± 0.2
LPH-PEI	81.6 ± 0.2	0.281	21.3 ± 0.5
LPH-PolyMet	74.2 ± 0.3	0.215	20.5 ± 0.3

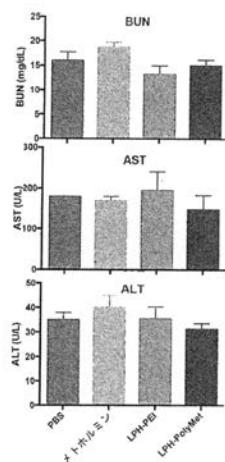
【図 5 A】

	PBS	メトホルミン	LPH-PEI	LPH-PolyMet
WBC	2.2 ± 1.3	2.4 ± 0.8	2.4 ± 0.7	2.4 ± 0.6
リンパ球	1.9 ± 0.8	1.5 ± 0.3	1.2 ± 0.6	1.6 ± 0.2
顆粒球	2.7 ± 0.6	1.4 ± 0.3	1.2 ± 0.3	1.3 ± 0.3
単球	0.6 ± 0.3	0.8 ± 0.3	0.2 ± 0.1	0.4 ± 0.2

FIGURE 4E

FIGURE 5A

【図 5 B】



【図 5 C】

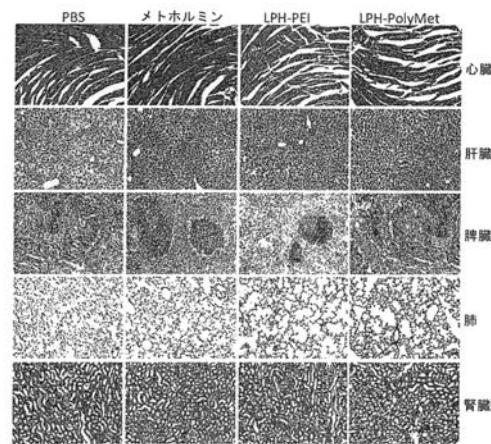
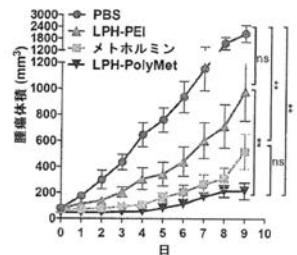


FIGURE 5B

FIGURE 5C

【図 6 A】



【図 6 B】

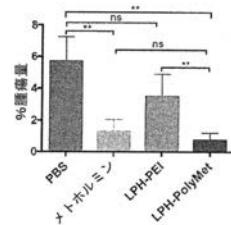


FIGURE 6A

FIGURE 6B

【図 6 C】

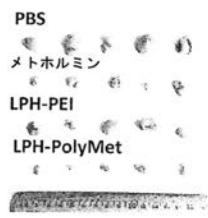


FIGURE 6C

【図 7 A】

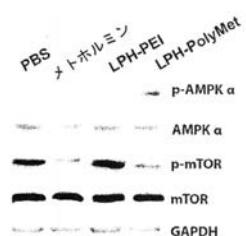


FIGURE 7A

【図 7 B】

	PBS	メトホルミン	LPH-PEI	LPH-PolyMet
LC3b	$0.6 \pm 0.1\%$	$31.4 \pm 0.3\%$	$15.3 \pm 0.2\%$	$39.8 \pm 0.4\%$
TUNEL	$1.2 \pm 0.3\%$	$18.8 \pm 0.6\%$	$5.7 \pm 0.5\%$	$22.3 \pm 0.4\%$

【図 8 A】

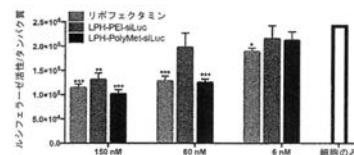


FIGURE 8A

FIGURE 7B

【図 8 B】



【図 8 C】

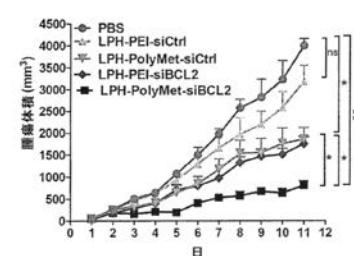


FIGURE 8B

FIGURE 8C

【図 8 D】

D

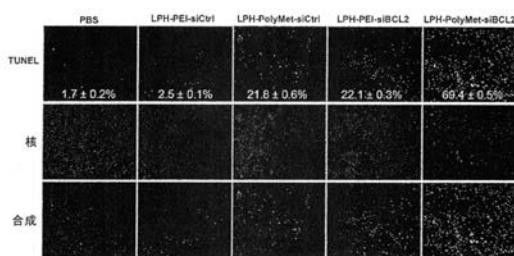


FIGURE 8D

【図 9 A】

A

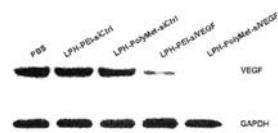


FIGURE 9A

【図 9 B】

B

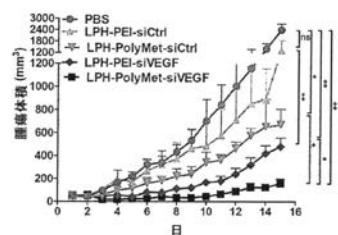


FIGURE 9B

【図 9 C】

C

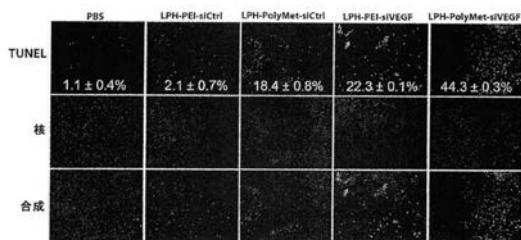


FIGURE 9C

【図 9D】

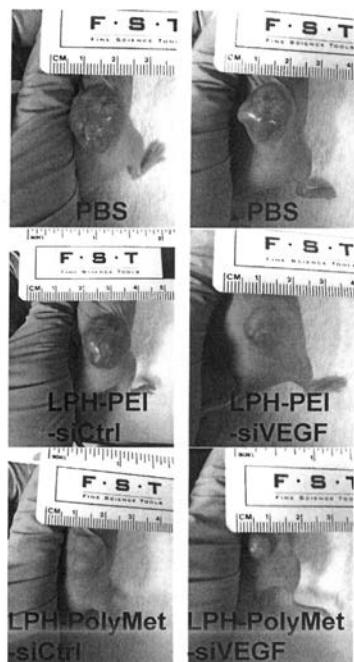


FIGURE 9D

【図 10A】

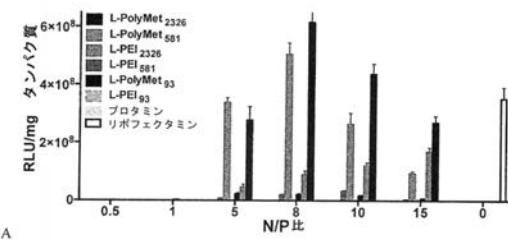


FIGURE 10A

【図 10B】

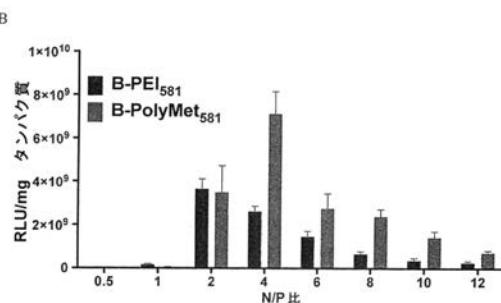


FIGURE 10B

【図 11】

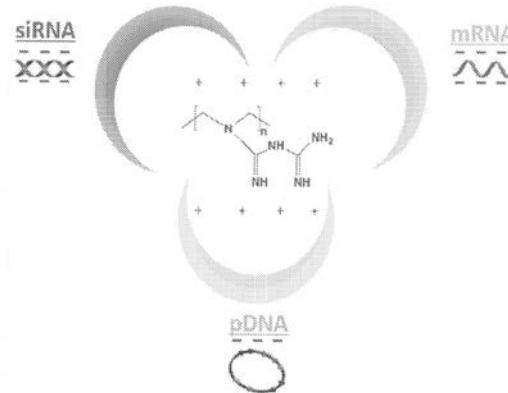
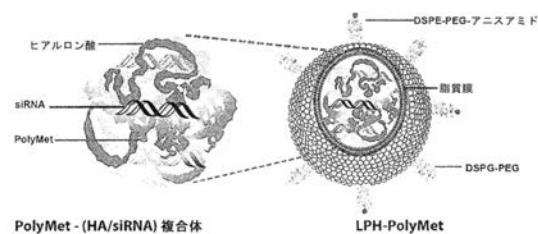


FIGURE 11

【図12】



【図13】

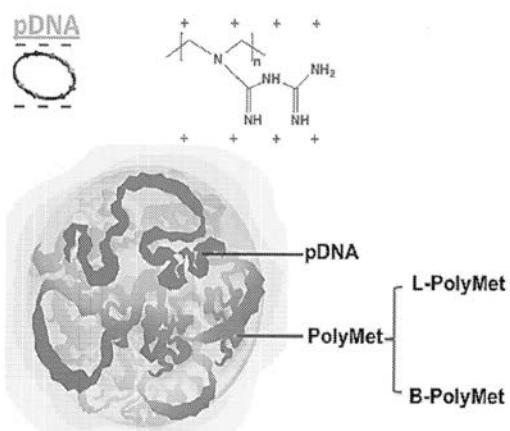


FIGURE 12

FIGURE 13

【図14】

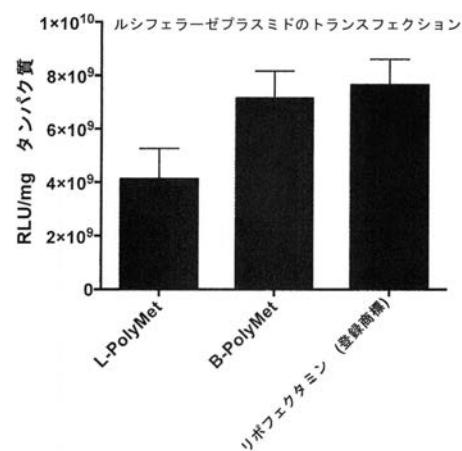


FIGURE 14

【図15】

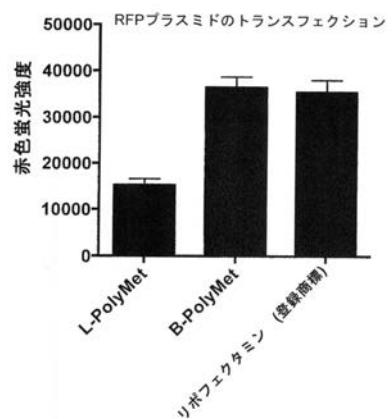


FIGURE 15

【図 16 A】

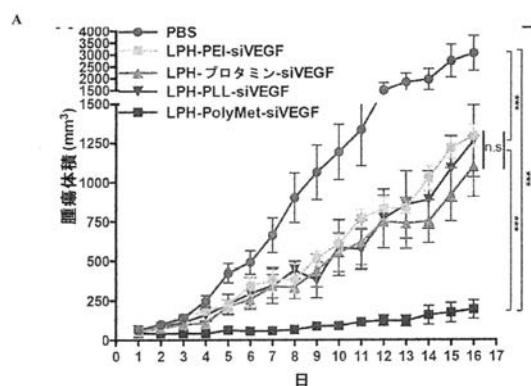


FIGURE 16A

【図 16 B】

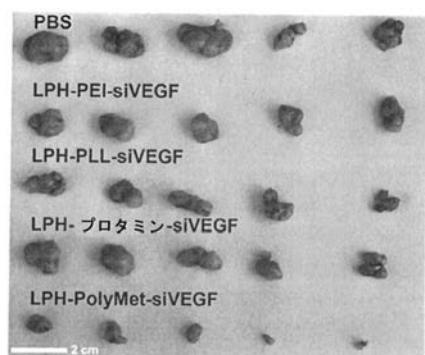


FIGURE 16B

【図 16 C】

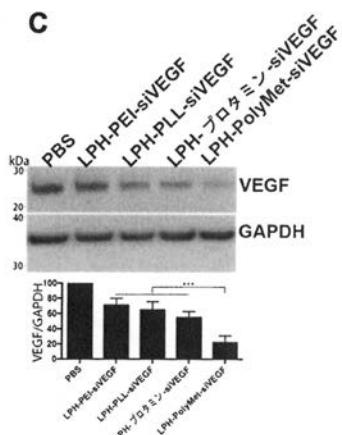


FIGURE 16C

【図 17】

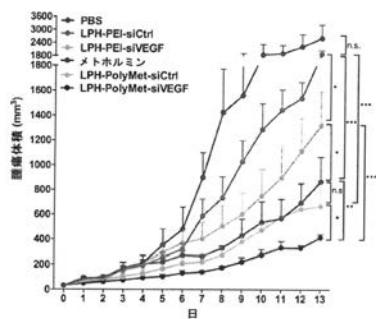


FIGURE 17

【図18】

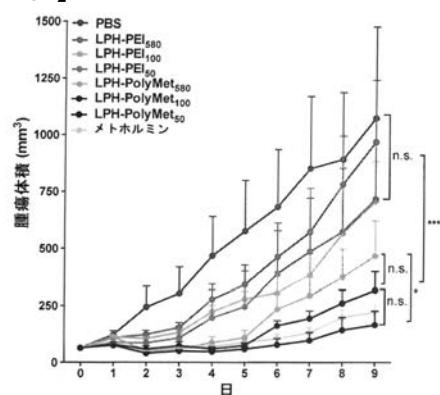


FIGURE 18

【図19】

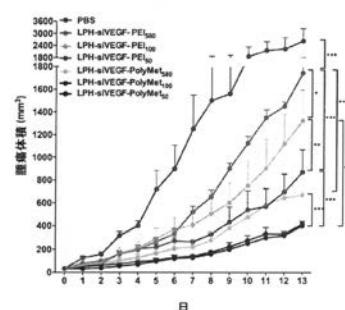


FIGURE 19

【図20A】

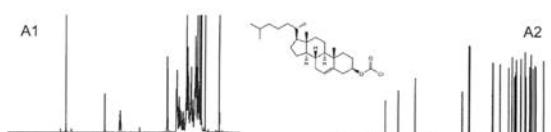


FIGURE20A

【図20B】



FIGURE20B

【図21A】

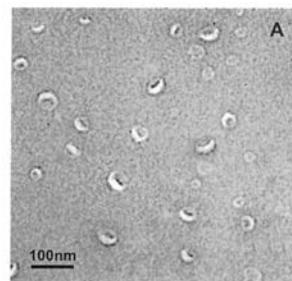


FIGURE 21A

【図20C】

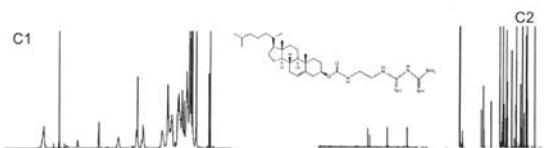


FIGURE 20C

【図21B】

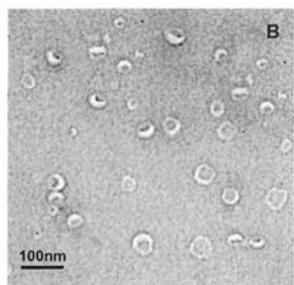


FIGURE 21B

【図22】

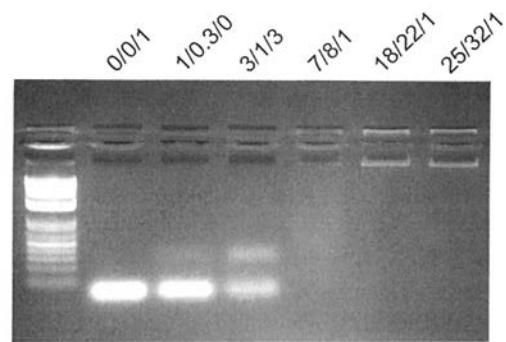


FIGURE 22

【図23A】

A

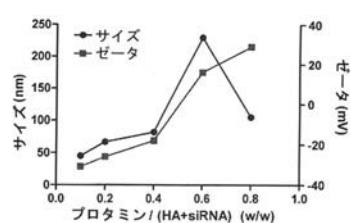


FIGURE 23A

【図23B】

B

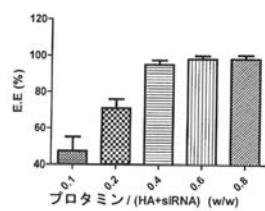


FIGURE 23B

【図24】

サンプル	流体力学的直径 (D_H , nm)	多分散性指数 (PDI)	ゼータ電位 (ζ , mV)
PHコア	89.2 ± 3.5	0.21 ± 0.03	-29.3 ± 4.2
空の LipoMET	57.3 ± 1.4	0.16 ± 0.02	$+49.1 \pm 2.5$
空の LipoEDA	65.6 ± 2.0	0.26 ± 0.06	$+15.2 \pm 1.9$
LipoMET-PH	102.5 ± 2.6	0.18 ± 0.04	$+22.5 \pm 3.6$
LipoEDA-PH	115.8 ± 3.9	0.32 ± 0.08	$+7.5 \pm 2.1$

FIGURE 24

【図25A】

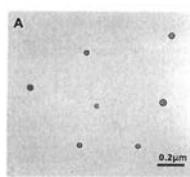


FIGURE 25A

【図25B】

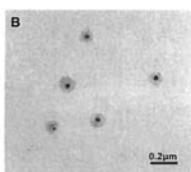


FIGURE 25B

【図25C】

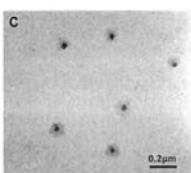


FIGURE 25C

【図26A】

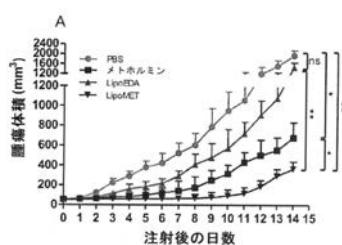


FIGURE 26A

【図26B】

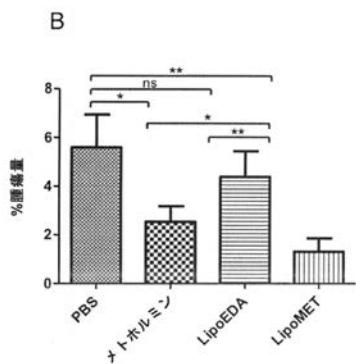


FIGURE 26B

【図27B】

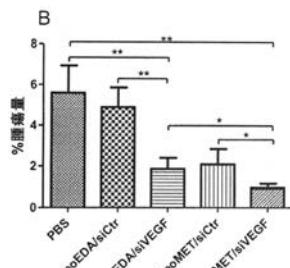


FIGURE 27B

【図27A】

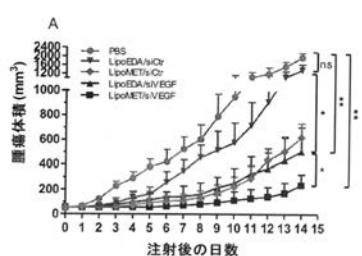


FIGURE 27A

【図28A】

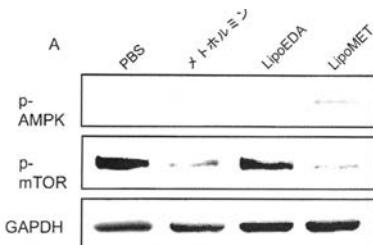


FIGURE 28A

【図 28B】

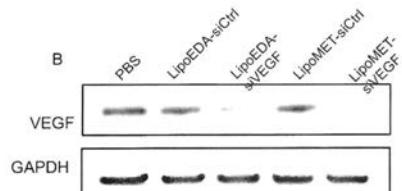


FIGURE 28B

【図 29】

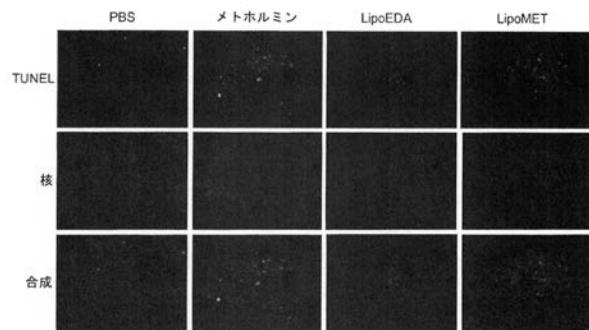


FIGURE 29

【図 30】

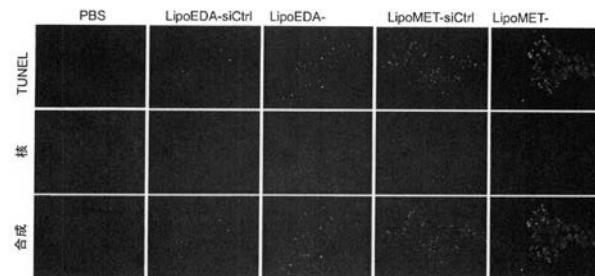


FIGURE 30

【図 31】

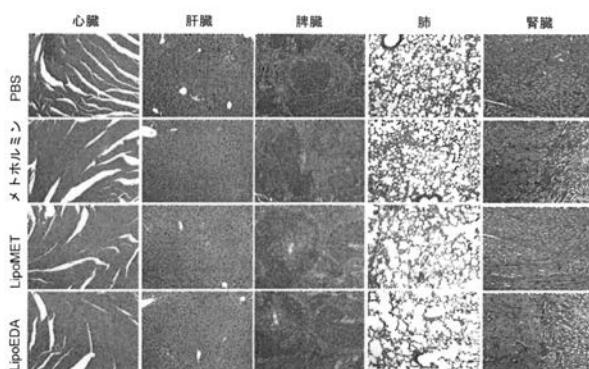


FIGURE 31

【図 32】

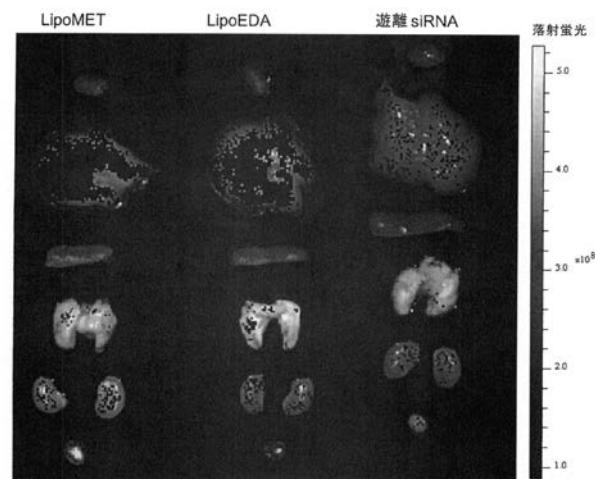


FIGURE 32

【図33】

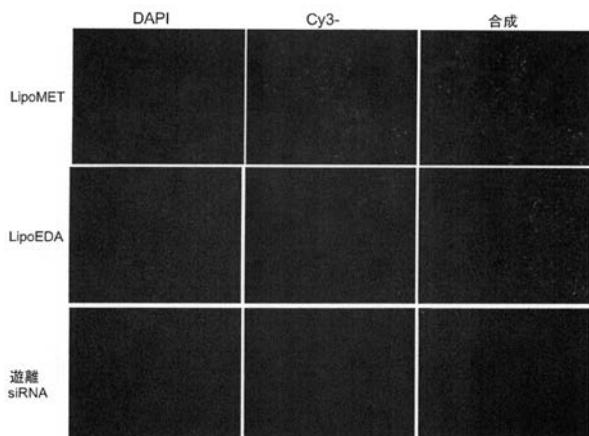


FIGURE 33

【図34】

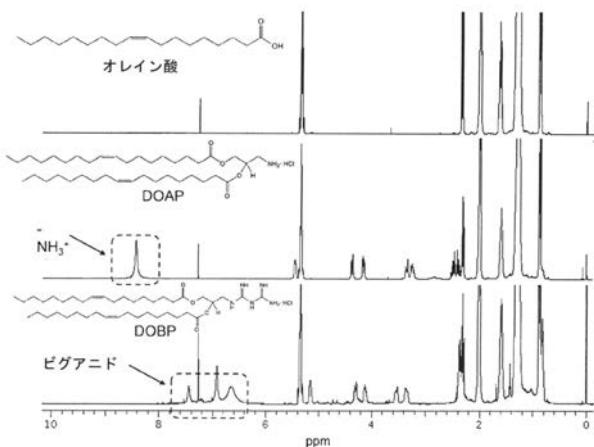


FIGURE 34

【図35】

	サイズ (nm)	PDI	ゼータ (mv)
Lipo-DOBp	130.5±0.3	0.16	52.9±0.6
Lipo-DOTAP	123.6±0.5	0.17	47.0±1.2
プロタミン/DNA	122.3±0.4	0.15	-28.4±1.3
DOBp-LPD	145.3±0.6	0.15	36.8±0.2
DOTAP-LPD	148.8±1.0	0.14	37.4±0.0

FIGURE 35

【図36】

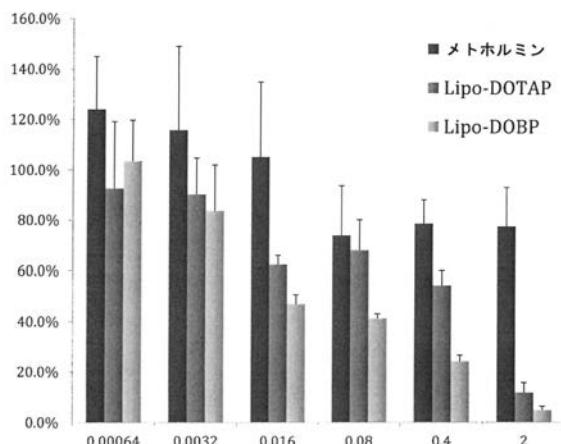


FIGURE 36

【図37】

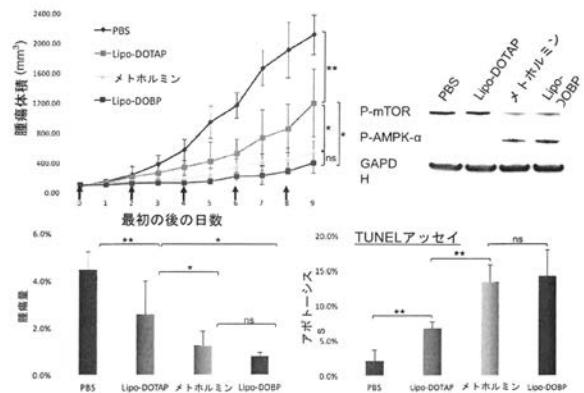


FIGURE 37

【図38】

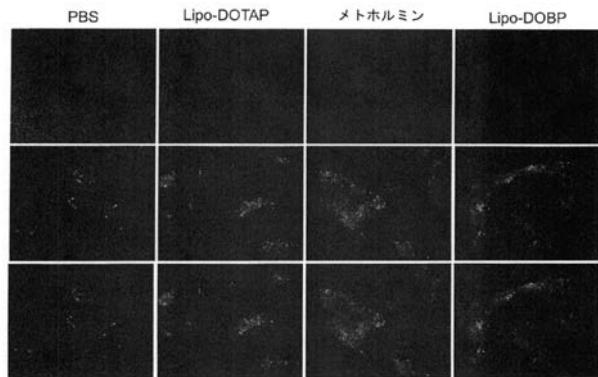


FIGURE 38

【図39】

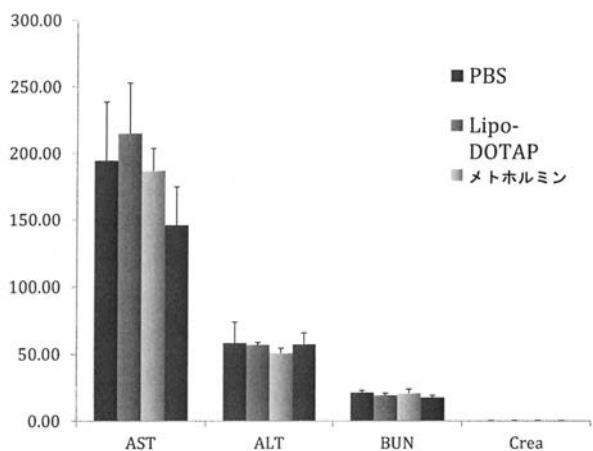


FIGURE 39

【図40】

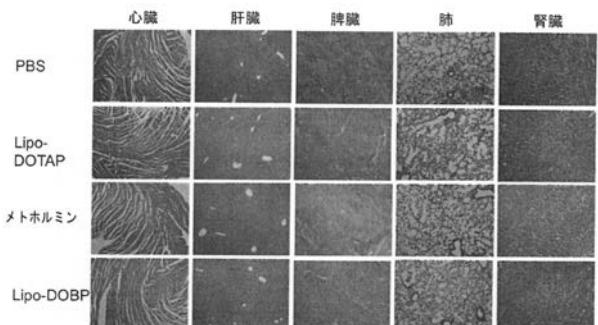


FIGURE 40

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2016/020921
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C08G 73/02(2006.01)i, A61K 47/48(2006.01)i, A61K 9/133(2006.01)i, A61K 31/155(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i, C12N 15/85(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C08G 73/02; C07C 279/26; C07C 277/02; A61K 31/155; A61K 31/343; A61K 47/48; A61K 9/133; A61K 48/00; C12N 15/85		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal), STN (Registry, Caplus), Google & Keywords: Polymetformin, PolyMet, LPH-PolyMet, Metformin, polyethylenimine, polypropylenimine, therapeutic agent, transfection agent		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2013-188452 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 19 December 2013 See abstract; claim 1.	1-23, 54-55
A	WO 2014-041566 A2 (LAURUS LABS PRIVATE LIMITED) 20 March 2014 See claims 1-5; pages 3-4.	1-23, 54-55
A	COLLIN, F. et al., "Liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric identification of the oxidation end-products of metformin in aqueous solutions", J. Mass Spectrom., 03 August 2004, Vol. 39, No. 8, pp. 890-902. See the whole document.	1-23, 54-55
A	KHOURI, H. et al., "Radical-induced oxidation of metformin", Eur. J. Biochem., 2004, Vol. 271, pp. 4745-4752. See abstract; figure 1.	1-23, 54-55
A	WO 2013-103384 A1 (ELCELYX THERAPEUTICS, INC.) 11 July 2013 See abstract; claims 1, 3.	1-23, 54-55
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
<p>* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 10 August 2016 (10.08.2016)	Date of mailing of the international search report 10 August 2016 (10.08.2016)	
Name and mailing address of the ISA/KR International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Authorized officer KIM, Dong Seok Telephone No. +82-42-481-5405 	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2016/020921

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

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

1. Claims Nos.: 36-45
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 36-45 pertain to methods for treatment of the human body by surgery or therapy, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search (PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv)).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

Invention Group I (claims 1-23, 54-55) relates to a polymer having the formula I.
Invention Group II (claims 24-35) relates to a nanoparticle comprising PolyMet.
Invention Group III (claim 46) relates to a kit comprising a PolyMet or LPH-PolyMet transfection reagent and at least one solvent.
Invention Group IV (claims 47-53) relates to a method of preparing a polymer of metformin.
Invention Group V (claim 56) relates to a block copolymer having the formula in the claim.
Invention Group VI (claim 57) relates to a dendrimer having the structure in the claim.
Invention Group VII (claims 58-59) relates to a polymer having the chemical formula III.
Invention Group VIII (claims 60-64) relates to a compound of Formula I, and a nanoparticle comprising the compound.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-23 and 54-55

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US2016/020921

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013-188452 A1	19/12/2013	CA 2913736 A1 US 2015-0158832 A1	19/12/2013 11/06/2015
WO 2014-041566 A2	20/03/2014	WO 2014-041566 A3	08/05/2014
WO 2013-103384 A1	11/07/2013	AU 2012-363873 A1 AU 2013-207329 A1 CA 2815024 A1 CA 2815025 A1 CA 2823397 A1 CA 2860669 A1 CA 2862533 A1 CA 2878625 A1 CN 103402358 A CN 103597071 A CN 104220875 A CN 104254325 A CN 104349773 A CN 104780915 A EA 201491335 A1 EP 2629609 A2 EP 2629617 A2 EP 2629773 A2 EP 2629774 A2 EP 2630491 A2 EP 2661266 A2 EP 2800561 A1 EP 2800562 A2 EP 2872127 A1 HK 1203829 A1 IL 233506 D0 JP 2013-540156 A JP 2014-501787 A JP 2014-503473 A JP 2014-505011 A JP 2015-503582 A JP 2015-503591 A JP 2015-522080 A KR 10-2014-0035331 A KR 10-2014-0108595 A KR 10-2014-0108727 A KR 10-2014-0114736 A MX 2014008190 A SG 11201403839 A US 2012-0177730 A1 US 2013-0095140 A1 US 2013-0177604 A1 US 2013-0281387 A1 US 2013-0281394 A1	17/07/2014 17/07/2014 26/04/2012 26/04/2012 12/07/2012 11/07/2013 11/07/2013 16/01/2014 20/11/2013 19/02/2014 17/12/2014 31/12/2014 11/02/2015 15/07/2015 30/04/2015 28/08/2013 28/08/2013 28/08/2013 28/08/2013 13/11/2013 12/11/2014 12/11/2014 20/05/2015 06/11/2015 31/08/2014 31/10/2013 23/01/2014 13/02/2014 27/02/2014 02/02/2015 02/02/2015 03/08/2015 21/03/2014 11/09/2014 12/09/2014 29/09/2014 04/02/2015 28/08/2014 12/07/2012 18/04/2013 11/07/2013 24/10/2013 24/10/2013

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US2016/020921

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
	US 2013-0303466 A1	14/11/2013	
	US 2013-0338095 A1	19/12/2013	
	US 2014-0030332 A1	30/01/2014	
	US 2015-0064223 A1	05/03/2015	
	US 2015-0065578 A1	05/03/2015	
	US 2015-0196509 A1	16/07/2015	
	US 8796338 B2	05/08/2014	
	US 9050292 B2	09/06/2015	
	US 9211263 B2	15/12/2015	
	WO 2012-054523 A2	26/04/2012	
	WO 2012-054523 A3	04/10/2012	
	WO 2012-054526 A2	26/04/2012	
	WO 2012-054526 A3	10/01/2013	
	WO 2012-054526 A8	04/07/2013	
	WO 2012-054527 A2	26/04/2012	
	WO 2012-054527 A3	10/04/2014	
	WO 2012-054528 A2	26/04/2012	
	WO 2012-054528 A3	02/08/2012	
	WO 2012-054530 A2	26/04/2012	
	WO 2012-054530 A3	31/10/2013	
	WO 2012-094636 A2	12/07/2012	
	WO 2012-094636 A3	04/10/2012	
	WO 2013-103919 A2	11/07/2013	
	WO 2013-103919 A3	14/11/2013	
	WO 2013-103919 A8	24/07/2014	
	WO 2014-011926 A1	16/01/2014	

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/34	(2017.01)	A 6 1 K 47/34
A 6 1 K 47/36	(2006.01)	A 6 1 K 47/36
A 6 1 K 47/28	(2006.01)	A 6 1 K 47/28
A 6 1 K 47/18	(2006.01)	A 6 1 K 47/18
A 6 1 P 3/10	(2006.01)	A 6 1 P 3/10
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
B 8 2 Y 5/00	(2011.01)	B 8 2 Y 5/00
C 0 7 C 279/26	(2006.01)	C 0 7 C 279/26 C S P

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

(74)代理人	100142996 弁理士 森本 聰二
(74)代理人	100166268 弁理士 田中 祐
(74)代理人	100170379 弁理士 徳本 浩一
(74)代理人	100180231 弁理士 水島 亜希子
(72)発明者	ファン, リーフ アメリカ合衆国ノースカロライナ州 27705, ダーラム, ブランチウッド・ドライブ 4201
(72)発明者	チャオ, イー アメリカ合衆国ノースカロライナ州 27514, チャペル・ヒル, ベイティ・ヒル・ドライブ 2000, アパートメント 219
(72)発明者	グオ, シュータオ アメリカ合衆国マサチューセッツ州 02130, ジャマイカ・プレイン, パーキンス・スクウェア 10, アパートメント 6
(72)発明者	シー, カイ アメリカ合衆国ノースカロライナ州 27516, チャペル・ヒル, ウエスト・ノースカロライナ・ハイウェイ・54・バイパス 1100, アパートメント 26D
F ターム(参考)	4C076 AA95 CC27 DD49 DD70 EE13 EE37 4C084 AA17 AA19 ZB261 ZB262 4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 FA03 FA06 MA01 MA02 MA04 MA05 NA13 NA14 ZB26 ZC35 4H006 AA01 AA03 AB27 AB28 4J043 QA04 QA05 RA08 YB31