

(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2014-527071

(P2014-527071A)

(43) 公表日 平成26年10月9日 (2014. 10. 9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 F 9/40 (2006.01)	C 0 7 F 9/40 C S P E	4 C 0 7 6
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	4 C 0 8 5
A 6 1 K 9/127 (2006.01)	A 6 1 K 9/127	4 C 0 8 6
A 6 1 K 47/34 (2006.01)	A 6 1 K 47/34	4 C 2 0 6
A 6 1 K 47/32 (2006.01)	A 6 1 K 47/32	4 H 0 5 0
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 64 頁) 最終頁に続く		

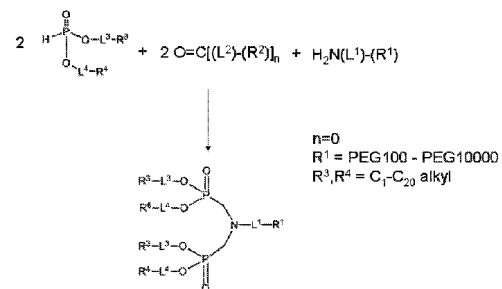
(21) 出願番号 特願2014-528610 (P2014-528610)
 (86) (22) 出願日 平成24年8月30日 (2012. 8. 30)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年4月24日 (2014. 4. 24)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/053197
 (87) 国際公開番号 W02013/033438
 (87) 国際公開日 平成25年3月7日 (2013. 3. 7)
 (31) 優先権主張番号 61/529, 694
 (32) 優先日 平成23年8月31日 (2011. 8. 31)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 595181003
 マリンクロッド エルエルシー
 アメリカ合衆国 ミズーリ 63042,
 セント ルイス, マクドネル ブール
 バード 675
 (74) 代理人 100107489
 弁理士 大塩 竹志
 (72) 発明者 ロジャーズ, トーマス イー.
 アメリカ合衆国 ミズーリ 63021,
 ボールウィン, トラゴ クリーク ド
 ライブ 755
 Fターム (参考) 4C076 AA19 AA95 CC27 CC41 DD63
 DD70 EE06 EE23 EE30
 4C085 HH03 HH05 HH07 HH11 JJ05
 KB60 KB74 KB79 KB92 LL18
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 H-ホスホネートによるナノ粒子PEGの改変

(57) 【要約】

本発明は、例えば、ナノ粒子の表面を改変して、*in vivo* 循環時間および標的化送達性能を増大させるための改善された方法および化合物をもたらすために、ホスホン酸コンジュゲートおよび該ホスホン酸コンジュゲートを調製する方法を提供する。本発明は、例えば、ナノ粒子の表面を改変して、*in vivo* 循環時間および標的化送達性能を増大させるための改善された方法および化合物を可能にするために、ホスホン酸コンジュゲートおよび該ホスホン酸コンジュゲートを調製する方法を提供する。

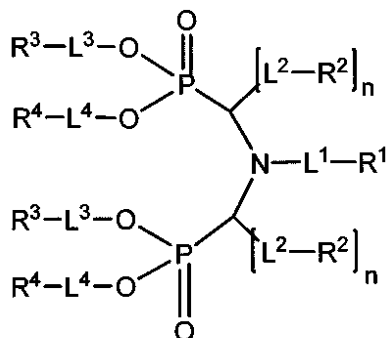


【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式：

【化 4 5】



10

(式中、

L¹、L²、L³およびL⁴はそれぞれ、独立して、結合および連結基からなる群より選択され；

R¹は、ナノ粒子、結合成分、標的化剤、診断剤、ステルス剤および四脚型提示成分からなる群より選択され；

R²はそれぞれ、独立して、ステルス剤、C₁ - C₁₀ アルキル、カルボン酸またはカルボン酸エステル、ホスホン酸またはホスホン酸エステル、スルホン酸またはスルホン酸エステル、およびヒドロキシからなる群より選択され；

20

R³およびR⁴はそれぞれ、独立して、H、ナノ粒子、結合成分、標的化剤、診断剤およびステルス剤からなる群より選択され、ここで、R³またはR⁴の少なくとも1つは、H以外であり；

nは、0 ~ 2の整数である)の化合物。

【請求項 2】

L¹、L²、L³およびL⁴の少なくとも1つが、親水性非免疫原性水溶性連結基である、請求項 1 に記載の化合物。

30

【請求項 3】

前記親水性非免疫原性水溶性連結基が、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリカルボキシラート、多糖およびデキストランからなる群より選択される、請求項 2 に記載の化合物。

【請求項 4】

前記標的化剤がアプタマーである、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 5】

前記診断剤が、放射性作用物質、蛍光剤または造影剤である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 6】

前記ステルス剤が、デンドリマー、ポリアルキレンオキシド、ポリビニルアルコール、ポリカルボキシラート、多糖およびヒドロキシアルキルデンプンからなる群より選択される、請求項 1 に記載の化合物。

40

【請求項 7】

前記ステルス剤がポリアルキレンオキシドである、請求項 6 に記載の化合物。

【請求項 8】

前記ポリアルキレンオキシドが、PEG₁₀₀ ~ PEG₁₀₀₀₀の範囲のポリエチレングリコール(PEG)である、請求項 7 に記載の化合物。

【請求項 9】

前記ポリアルキレンオキシドが、PEG₁₀₀、PEG₅₀₀、PEG₁₀₀₀、PEG₂₀₀₀、PEG₅₀₀₀およびPEG₁₀₀₀₀からなる群より選択されるポリエチレングリコール(PEG)である、請求項 6 に記載の化合物。

50

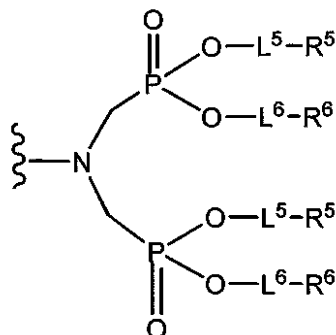
【請求項 10】

前記ステルス剤が、連結基で互いに連結された少なくとも2つのPEG分子を含む、請求項1に記載の化合物。

【請求項 11】

R¹ が、式：

【化 46】



10

(式中、

L⁵ および L⁶ はそれぞれ、独立して、結合および連結基からなる群より選択され；

R⁵ および R⁶ はそれぞれ、独立して、標的化剤、診断剤およびステルス剤からなる群より選択される)を有する四脚型提示成分である、請求項1に記載の化合物。

20

【請求項 12】

R³ および R⁴ がそれぞれ、独立して、脂質およびコレステロールからなる群より選択される、請求項1に記載の化合物。

【請求項 13】

R¹ がステルス剤であり；R³ および R⁴ がそれぞれ結合成分であり、独立して、脂質およびコレステロールからなる群より選択され、ここで、該結合成分がナノ粒子に結合している、請求項1に記載の化合物。

【請求項 14】

前記脂質が、飽和 C₁₀ - C₂₂ アルキルまたは不飽和 C₁₀ - C₂₂ アルキルである、請求項13に記載の化合物。

30

【請求項 15】

n が0である、請求項14に記載の化合物。

【請求項 16】

R¹ が結合成分であり；R³ および R⁴ が、独立して、標的化剤、診断剤およびステルス剤からなる群より選択される、請求項1に記載の化合物。

【請求項 17】

R¹ が、PEG₁₀₀₀、PEG₅₀₀₀、PEG₁₀₀₀₀、PEG₂₀₀₀₀、PEG₅₀₀₀₀ および PEG₁₀₀₀₀₀ からなる群より選択されるステルス剤である、請求項1に記載の化合物。

40

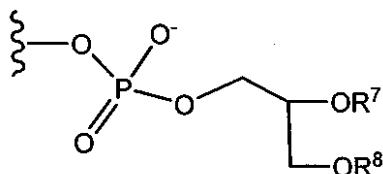
【請求項 18】

R¹ が結合成分であり、該結合成分がリン脂質である、請求項1に記載の化合物。

【請求項 19】

前記リン脂質が、式：

【化 47】



50

(式中、 R^7 および R^8 はそれぞれ、独立して、飽和 $C_{10} - C_{24}$ アルキル基もしくは不飽和 $C_{10} - C_{24}$ アルキル基または飽和 $C_{10} - C_{24}$ アルカノイル基もしくは不飽和 $C_{10} - C_{24}$ アルカノイル基、および置換飽和 $C_{10} - C_{24}$ アルキル基もしくは置換不飽和 $C_{10} - C_{24}$ アルキル基または置換飽和 $C_{10} - C_{24}$ アルカノイル基もしくは置換不飽和 $C_{10} - C_{24}$ アルカノイル基からなる群より選択される)を有する、請求項 18 に記載の化合物。

【請求項 20】

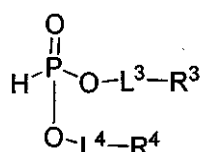
R^1 および R^2 がそれぞれステルス剤であり； R^3 および R^4 がそれぞれ、脂質およびコレステロールからなる群より独立して選択される結合成分であり； n が 1 である、請求項 1 に記載の化合物。

10

【請求項 21】

ホスホン酸コンジュゲートを調製する方法であって、式： $H_2N(L^1) - (R^1)$ を有する第一アミン化合物、式： $O = C[(L^2) - (R^2)]_n$ を有するカルボニル化合物、および式：

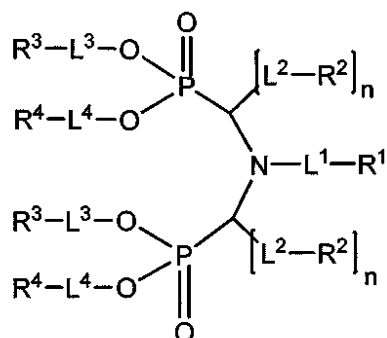
【化 48】



20

を有する H - ホスホン酸化合物を、式：

【化 49】



30

(式中、 L^1 、 L^2 、 L^3 および L^4 はそれぞれ、独立して、結合および連結基からなる群より選択され；

R^1 は、ナノ粒子、結合成分、標的化剤、診断剤、ステルス剤および四脚型提示成分からなる群より選択され；

R^2 はそれぞれ、独立して、ステルス剤、 $C_1 - C_{10}$ アルキル、カルボン酸またはカルボン酸エステル、ホスホン酸またはホスホン酸エステル、スルホン酸またはスルホン酸エステル、およびヒドロキシからなる群より選択され；

40

R^3 および R^4 はそれぞれ、独立して、H、結合成分、標的化剤、診断剤およびステルス剤からなる群より選択され、ここで、 R^3 または R^4 の少なくとも 1 つは、H 以外であり；

n は、0 ~ 2 の整数であり、 n が 0 または 1 である場合、該カルボニル化合物はアルデヒドである)を有するホスホン酸コンジュゲートを形成するのに十分な条件下で結合させる工程を含む、方法。

【請求項 22】

前記第一アミン化合物、前記カルボニル化合物および前記 H - ホスホン酸化合物を、それぞれ 1 : 2 : 2 のモル比で結合させる、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

50

前記第一アミン化合物および前記カルボニル化合物を結合させてから、前記 H - ホスホン酸化合物と結合させる、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記 H - ホスホン酸化合物および前記カルボニル化合物を結合させてから、前記第一アミン化合物と結合させる、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 5】

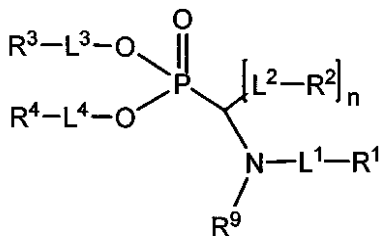
2 つの前記 H - ホスホン酸化合物を隣接させてリボソームの二重層に結合させてから、前記第一アミン化合物および前記カルボニル化合物と結合させる、請求項 2 1 に記載の方法であって、ここで、 R^3 および R^4 がそれぞれ、独立して、脂質およびコレステロールからなる群より選択される、方法。

10

【請求項 2 6】

式：

【化 5 0】



20

(式中、

L^1 、 L^2 、 L^3 および L^4 はそれぞれ、独立して、結合および連結基からなる群より選択され；

R^1 は、ナノ粒子、結合成分、標的化剤、診断剤およびステルス剤からなる群より選択され；

R^2 は、独立して、ステルス剤、 $C_{10} - C_{100}$ アルキル、カルボン酸またはカルボン酸エステル、ホスホン酸またはホスホン酸エステル、スルホン酸またはスルホン酸エステル、およびヒドロキシからなる群より選択され；

R^3 および R^4 はそれぞれ、独立して、H、ナノ粒子、結合成分、標的化剤、診断剤およびステルス剤からなる群より選択され、ここで、 R^3 または R^4 の少なくとも 1 つは、H 以外であり；

30

R^9 は、 $C_{10} - C_{100}$ アルキル基であり；

n は、0 ~ 2 の整数である) の化合物。

【請求項 2 7】

R^3 および R^4 がそれぞれ、独立して、脂質およびコレステロールからなる群より選択され； L^3 および L^4 がそれぞれ結合である、請求項 2 6 に記載の化合物。

【請求項 2 8】

前記脂質が、飽和 $C_{10} - C_{22}$ アルキルまたは不飽和 $C_{10} - C_{22}$ アルキルである、請求項 2 7 に記載の化合物。

40

【請求項 2 9】

R^1 がステルス剤である、請求項 2 6 に記載の化合物。

【請求項 3 0】

前記ステルス剤が、PEG₁₀₀、PEG₅₀₀、PEG₁₀₀₀、PEG₂₀₀₀、PEG₅₀₀₀ および PEG₁₀₀₀₀ からなる群より選択される、請求項 2 9 に記載の化合物。

【請求項 3 1】

R^9 が $C_{10} - C_{60}$ アルキルであり、 L^1 が結合である、請求項 2 6 に記載の化合物。

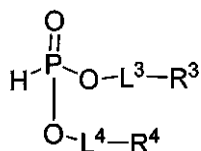
【請求項 3 2】

ホスホン酸コンジュゲートを調製する方法であって、式： $HN[(L^1) - (R^1)]($

50

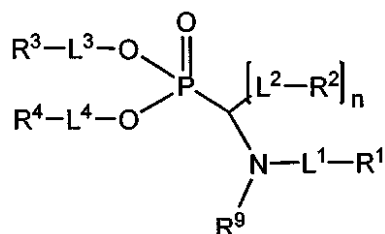
R⁵)を有する第二アミン化合物、式： $O = C [(L ^ { 2 }) - (R ^ { 2 })] _n$ を有するカルボニル化合物、および式：

【化 5 1】



を有する H - ホスホン酸化合物を、式：

【化 5 2】



(式中、

L^1 、 L^2 、 L^3 および L^4 はそれぞれ、独立して、結合および連結基からなる群より選
 択され；

R¹ は、ナノ粒子、結合成分、標的化剤、診断剤およびステルス剤からなる群より選択され；

R² は、独立して、ステルス剤、C₁ - C₁₀ アルキル、カルボン酸またはカルボン酸エステル、ホスホン酸またはホスホン酸エステル、スルホン酸またはスルホン酸エステル、およびヒドロキシからなる群より選択され；

R³ および R⁴ はそれぞれ、独立して、H、結合成分、標的化剤、診断剤およびステルス剤からなる群より選択され、ここで、R³ または R⁴ の少なくとも 1 つは、H 以外であり、

R⁹ は、C₁ - C₁₀ アルキル基からなる群より選択され；

n は、0 ~ 2 の整数であり、n が 0 である場合、該カルボニル化合物はホルムアルデヒドである) を有するホスホン酸コンジュゲートを形成するのに十分な条件下で結合させる工程を含む、方法。

【請求項 33】

請求項 1 または 26 に記載の化合物を含む標的化送達組成物であって、 R^3 および R^4 がそれぞれ、ナノ粒子に結合した結合成分であり、 R^1 が、標的化剤、診断剤およびステルス剤からなる群より選択される、標的化送達組成物。

【請求項 3 4】

前記ナノ粒子がリポソームであり、 R^3 および R^4 がそれぞれ該リポソームの二重層に結合しており、独立して、脂質およびコレステロールからなる群より選択される、請求項 3 に記載の標的化送達組成物。

【請求項 35】

請求項 1 または 26 に記載の化合物を含む標的化送達組成物であって、 R^1 がナノ粒子またはナノ粒子に結合した結合成分であり、 R^3 および R^4 がそれぞれ、独立して、標的化剤、診断剤およびステルス剤より選択される、標的化送達組成物。

【請求項 36】

前記ナノ粒子がリポソームであり、 R^{1} が該リポソームの二重層に結合しており、独立して、脂質およびコレステロールからなる群より選択される、請求項 35 に記載の標的化送達組成物。

【請求項 37】

被験体におけるがん状態を処置または診断するための方法であって、請求項 33 または 35 に記載の標的化送達組成物であって、該状態を処置または診断するのに十分な治療剤または診断剤を含み、 R^1 、 R^3 および R^4 の少なくとも 1 つが標的化剤である標的化送達組成物を該被験体に投与する工程を含む、方法。

【請求項 38】

前記ナノ粒子がリポソームであり、前記治療剤が該リポソームに封入されているか、該リポソームに包埋されているか、または該リポソームに係留されている、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記治療剤が、ドキソルビシン、シスプラチン、オキサリプラチン、カルボプラチン、5-フルオロウラシル、ゲムシタビン (gemcitabine) およびタキサンからなる群より選択される抗がん剤である、請求項 38 に記載の方法。

10

【請求項 40】

標的化治療処置についての被験体の適性を判定する方法であって、請求項 33 または 35 に記載の標的化送達組成物であって、 R^1 、 R^3 および R^4 の少なくとも 1 つが標的化剤であり、前記ナノ粒子が診断剤を含む、標的化送達組成物を該被験体に投与する工程、および該被験体をイメージングして該診断剤を検出する工程を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

関連出願への相互参照

本願は、米国仮特許出願第 61/529,694 号への優先権の利益を主張し、この米国仮特許出願の全体の内容は、本明細書中に参考として援用される。

【0002】

政府支援の研究開発下でなされた発明に対する権利に関する陳述
適用なし。

【0003】

コンパクトディスクで提出した「配列表」、表、またはコンピュータプログラムを列挙している付録への参照

該当なし。

30

【背景技術】

【0004】

発明の背景

現在のところ、大部分の治療剤および診断剤は、患者に全身投与される。残念なことに、現在の送達方法はいくつかの不利な点を有することがあり、例えば、薬物が患者の非標的部位で活性化することによる治療薬の有効性の低下および副作用が挙げられる。これらの欠点のいくつかに対処しようとして、診断剤および治療剤に結合したナノ粒子の標的化送達は、有望かつ新たな薬物送達様式を提示する。

【0005】

しかしながら、ある特定の状況下では、ナノ粒子は患者の免疫系によって拒絶され、ナノ粒子が薬物送達の標的に到達し得る前に処理され得る。これらの問題に対処するために、ナノ粒子の表面を改変することができる。例えば、リポソームなどのナノ粒子は、一般的には、ポリエチレングリコール (PEG) 基をそれらの表面に取り込んで in vivo 性能を高めるように改変される。一般に、リポソームの PEG 改変を達成するのに用いられる一般的なアプローチは 2 つある。あるアプローチは、脂質-PEG 分子を組み合わせ、機械的手段 (例えば、押し出し) でリポソーム製剤を形成することを含む。別のアプローチでは、リポソームをプリアセンブルし、続いて、脂質がリポソーム二重層に入ることができる条件下で、適切な配置の PEG-脂質で処理することにより、リポソーム表面に結合した PEG を有するリポソームを形成することができる。

40

【0006】

50

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

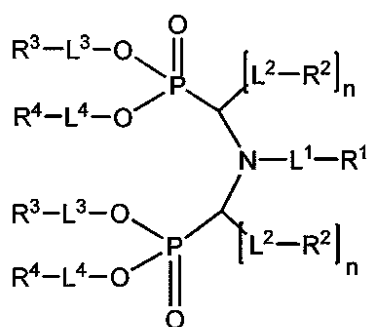
【 0 0 0 7 】

発明の簡単な概要

【 0 0 0 8 】

本発明の一態様では、本発明のホスホン酸コンジュゲートは、式：

【化 1】

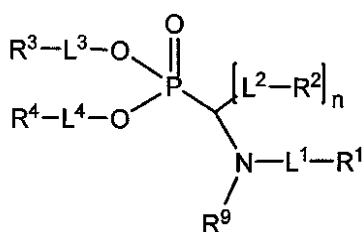


(式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 L^1 、 L^2 、 L^3 および L^4 はそれぞれ、以下により詳細に記載される)の化合物を含むことができる。

【 0 0 0 9 】

別の態様では、本発明は、式：

【化 2】

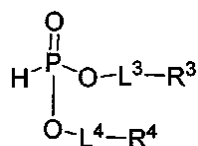


(式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^9 、 L^1 、 L^2 、 L^3 および L^4 は、以下により詳細に記載される)の化合物を含む。

【 0 0 1 0 】

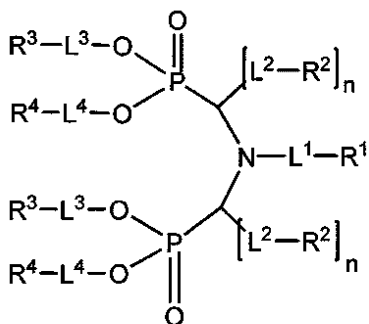
さらに別の態様では、本発明は、ホスホン酸コンジュゲートを調製する方法であって、式： $H_2N(L^1)-(R^1)$ を有する第一アミン化合物、式： $O=C[(L^2)-(R^2)]_n$ を有するカルボニル化合物、および式：

【化 3】



を有する H - ホスホン酸化合物 (p h o s p h o n a t e c o m p o u n d) を、式：

【化 4】



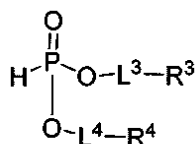
10

を有するホスホン酸コンジュゲートを形成するのに十分な条件下で結合させる (combine) 工程を含む方法を含み、該ホスホン酸コンジュゲート、第一アミン化合物、カルボニル化合物および H - ホスホン酸化合物は、以下により詳細に記載される。

【0011】

さらに別の態様では、本発明は、ホスホン酸コンジュゲートを調製する方法であって、式： $\text{HN}[(\text{L}^1) - (\text{R}^1)](\text{R}^9)$ を有する第二アミン化合物、式： $\text{O} = \text{C}[(\text{L}^2) - (\text{R}^2)]_n$ を有するカルボニル化合物、および式：

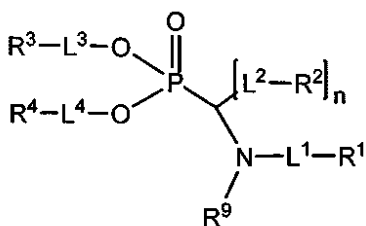
【化 5】



20

を有する H - ホスホン酸化合物を、式：

【化 6】



30

を有するホスホン酸コンジュゲートを形成するのに十分な条件下で結合させる工程を含む方法を含み、該ホスホン酸コンジュゲート、第二アミン化合物、カルボニル化合物および H - ホスホン酸化合物は、以下により詳細に記載される。

【0012】

本発明のホスホン酸コンジュゲートおよびそれらの作製方法は、多数の独自の態様を薬物送達および画像診断の領域に提供する。例えば、本発明は、ナノ粒子が、標的化薬物送達に使用され得るステルスナノ粒子へと変換されるのを容易にすることができる化合物を作製するための口バストかつ簡便な方法を提供する。ある特定の場合では、ホスホン酸コンジュゲートは、ナノ粒子表面のステルス剤の密度を増大させる独自の能力を提供するので、より低い密度で有効ではない場合がある様々なステルス剤の使用について、さらなる柔軟性を可能にすることができる。加えて、ホスホン酸コンジュゲートは、ナノ粒子表面の問題のステルス剤または他の成分、例えば標的化剤にさらなる安定性を提供する様式で生成することができる。他の利点の中では、ホスホン酸コンジュゲートは、正荷電基および/または負荷電基を取り込んで、ナノ粒子の表面特性の改変を容易にすることができる。改変ナノ粒子を作製する際の柔軟性はまた、特定の治療用途および/または診断用途に適合するようにされたナノ粒子であって、患者への投与後に長期の *in vivo* 半減期を有することができるナノ粒子にすることができる。

40

50

【 0 0 1 3 】

本明細書および図面の他の部分を参照することによって、本発明の本質および利点についてのさらなる理解を実現することができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 4 】

【図 1】図 1 は、本発明のホスホン酸コンジュゲートを生成するための合成方法の例を示す。

【 0 0 1 5 】

【図 2】図 2 は、本発明のホスホン酸コンジュゲートを生成するための合成方法の例を示す。

【 0 0 1 6 】

【図 3】図 3 は、本発明のホスホン酸コンジュゲートを作製するための合成方法の例を示す。

【 0 0 1 7 】

【図 4】図 4 は、本発明のホスホン酸コンジュゲートをリボソーム表面に作製するための合成方法の例を示す。

【 0 0 1 8 】

【図 5】図 5 は、本発明のホスホン酸コンジュゲートをリボソーム表面に作製するための合成方法の例を示す。

【 0 0 1 9 】

【図 6】図 6 は、本発明の例示的な実施形態にしたがって、亜リン酸ジフェニルを 1 - アルカノールと混合してホスホン酸水素ジアルキルを形成するための一般的な反応スキームを示す。

【 0 0 2 0 】

【図 7】図 7 は、本発明の例示的な実施形態にしたがって、コンジュゲートを調製するための一般的な反応スキームを示す。

【 0 0 2 1 】

【図 8】図 8 は、本発明の例示的な実施形態にしたがって、コンジュゲートを調製するための別の一般的な反応スキームを示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 2 】

発明の詳細な説明

I . 定義

本明細書において使用される場合、記号

【化 7】

「—」

は単結合を意味し、

【化 8】

「＝」

は二重結合を意味し、

【化 9】

「≡」

は三重結合を意味し、

【化 10】

「＝」

は単結合または二重結合を意味する。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 3 】

本明細書において使用される場合、用語「アルキル」は、それ自体でまたは別の置換基の一部として、特に明記しない限り、指定された数の炭素原子（すなわち、 C_{10-24} は、10個～24個の炭素を意味する）を有する直鎖状または分岐鎖状の炭化水素ラジカルを意味する。いくつかの実施形態では、アルキル基は、1個～36個の炭素の範囲であり得る。ある特定の実施形態では、アルキル基は、1個～10個の炭素または1個～20個の炭素の範囲であり得る。いくつかの実施形態では、アルキル基は、飽和しているものでもよいし不飽和のものでもよく、ならびに、置換されているものでもよいし非置換のものでもよい。

【 0 0 2 4 】

本明細書において使用される場合、用語「置換された」は、親分子または基に結合している基を指す。例えば、シアノ置換基を有するアルキル基は、シアノ置換アルキル基である。適切な置換基としては、限定されないが、ハロ、シアノ、アルキル、アミノ、ヒドロキシ、アルコキシ、およびアミドが挙げられる。

【 0 0 2 5 】

本明細書において使用される場合、用語「H - ホスホン酸化合物」は、 $H - P(O)(OL^3 - R^3)(OL^4 - R^4)$ の一般式を有する化合物を指し、本明細書においてさらに記載される。

【 0 0 2 6 】

本明細書において使用される場合、用語「第一アミン化合物」は、一般に、 $H_2N(L^1) - (R^1)$ の一般式を有する化合物を指し、本明細書においてさらに記載される。

【 0 0 2 7 】

本明細書において使用される場合、用語「第二アミン化合物」は、一般に、 $HN[(L^1) - (R^1)](R^9)$ の一般式を有する化合物を指し、本明細書においてさらに記載される。

【 0 0 2 8 】

本明細書において使用される場合、用語「カルボニル化合物」は、一般に、 $O = C[(L^2) - (R^2)]_n$ の一般式を有する化合物を指し、本明細書においてさらに記載される。

【 0 0 2 9 】

本明細書において使用される場合、用語「標的化送達組成物」は、本発明のホスホン酸コンジュゲートに結合したナノ粒子の組成物を指し、これの詳細は、本明細書においてさらに記載される。本発明の組成物は、治療組成物として、診断組成物として、または治療組成物および診断組成物の両方として使用することができる。ある特定の実施形態では、上記組成物は、本明細書においてさらに記載されるように、被験体または試験試料における特定の標的に標的化することができる。

【 0 0 3 0 】

本明細書において使用される場合、用語「ナノ粒子」は、様々なサイズ、形状、種類、および用途の粒子を指し、これらは、本明細書においてさらに記載される。当業者によって認識されるように、ナノ粒子の特性、例えば、サイズは、ナノ粒子の種類および/または用途、ならびに当技術分野において一般に周知の他の要因に依存し得る。一般に、ナノ粒子は、約1 nm～約1000 nmのサイズの範囲であり得る。他の実施形態では、ナノ粒子は、約10 nm～約200 nmのサイズの範囲であり得る。さらに他の実施形態では、ナノ粒子は、約50 nm～約150 nmのサイズの範囲であり得る。ある特定の実施形態では、ナノ粒子は、腎排泄限界よりサイズが大きく、例えば、直径が約6 nmより大きい。他の実施形態では、ナノ粒子は、肝臓による血流からのクリアランスを回避するのに十分小さく、例えば、直径が1000 nmより小さい。ナノ粒子としては、球体、円錐体、スフェロイド、および当技術分野において一般に公知の他の形状を挙げることができる。ナノ粒子は、中空（例えば、コアの外側が中実(solid)で、コアの内側が中空)でもよいし中実でもよく、中空層と中実層または様々な中実層とで多層化されていてもよ

10

20

30

40

50

い。例えば、ナノ粒子は、中実コア領域および中実外側封入領域を含むことができ、これらの両方を架橋することができる。ナノ粒子は、脂質、ポリマー、磁性材料、またはシリカ、金、および酸化鉄などの金属材料などを含む様々な物質の中の1つの物質または任意の組み合わせから構成され得る。脂質としては、脂肪、ワックス、ステロール、コレステロール、脂溶性ビタミン、モノグリセリド、ジグリセリド、リン脂質、スフィンゴ脂質、糖脂質、カチオン性脂質またはアニオン性脂質、誘導体化脂質、およびカルジオリピンなどを挙げることができる。ポリマーとしては、一般にブロックコポリマー、ポリ(乳酸)、ポリ(乳酸-co-グリコール酸)、ポリエチレングリコール、アクリル酸ポリマー、カチオン性ポリマー、ならびにナノ粒子を作製するのに使用するための当技術分野において公知の他のポリマーを挙げることができる。いくつかの実施形態では、ポリマーは、生分解性および/または生体適合性であり得る。ナノ粒子としては、リポソーム、ミセル、リポタンパク質、脂質コーティングバブル、ブロックコポリマーミセル、ポリマーソーム、ニオソーム、量子ドット、酸化鉄粒子、金粒子、デンドリマー、またはシリカ粒子を挙げることができる。ある特定の実施形態では、脂質単層または脂質二重層は、脂質によってコーティングされ得る材料から構成されるナノ粒子、例えば、ポリマーナノ粒子を完全または部分的にコーティングすることができる。いくつかの実施形態では、リポソームとしては、多層ベシクル(MLV)、大単層ベシクル(LUV)、および小単層ベシクル(SUV)を挙げることができる。

10

【0031】

本明細書において使用される場合、用語「治療剤」は、有効量で存在する場合、それを必要とする被験体に所望の治療効果を生じさせる化合物または分子を指す。本発明は、本明細書においてさらに記載されるように、広い範囲の治療剤、ならびにナノ粒子およびホスホン酸コンジュゲートと併せたこれらの使用を意図する。

20

【0032】

本明細書において使用される場合、用語「診断剤」は、被験体または試験試料に検出することができる成分を指し、本明細書においてさらに記載される。

【0033】

本明細書において使用される場合、用語「連結基」は、コンジュゲートの一部分を連結するホスホン酸コンジュゲートの一部を指す。例えば、連結基 L^3 は、 R^3 (例えば、結合成分)を、ホスホン酸コンジュゲートのリンに結合した酸素に連結することができる。調製されるホスホン酸コンジュゲート、および化合物に所望される特性に応じて、容易に入手可能なモノマー成分から連結基をアセンブルして、標的化剤と、例えばナノ粒子に結合され得るホスホン酸コンジュゲートの他の部分との適切な分離を実現することができる。

30

【0034】

本明細書において使用される場合、用語「標的化剤」は、標的に対して特異的である分子を指す。ある特定の実施形態では、標的化剤としては、標的リガンドの低分子模倣体(例えば、ペプチド模倣リガンド)、標的リガンド(例えば、RGDペプチド含有ペプチド、もしくは葉酸アミド)、または特定の標的に特異的な抗体もしくは抗体断片を挙げることができる。標的化剤は、疾患の特定の発症段階と関連し得る器官、組織、細胞、細胞外マトリックス成分、および/または細胞内コンパートメントにおける標的を含む多種多様な標的に結合することができる。いくつかの実施形態では、標的としては、がん細胞、特にがん幹細胞を挙げることができる。標的としては、細胞表面の抗原、またはがん細胞に存在するかもしれない正常組織と比較してがん細胞ではより優勢な抗原である腫瘍マーカーをさらに挙げることができる。ある特定の実施形態では、標的化剤としては、葉酸誘導体、B-12誘導体、インテグリンRGDペプチド、RGD模倣体(Temming, Kら、Drug Resistance Updates 8:381-402(2005); Liu, S., Mol. Pharm. 3(5):472-87(2006))、NGR誘導体、ソマトスタチン受容体に結合するソマトスタチン誘導体またはペプチド、例えば、オクトレオチドおよびオクトレオテートなどをさらに挙げることができる。いくつかの

40

50

実施形態では、標的化剤は、核酸（例えば、DNAまたはRNA）またはペプチドから構成され、特定の標的に結合するアプタマーであり得る。標的化剤は、受容体標的、特に、腫瘍に関連して発現される受容体標的に特異的または非特異的に結合するように設計することができる。受容体標的の例としては、限定されないが、MUC-1、EGFR、クロードイン4、MUC-4、CXCR4、CCR7、FOL1R、ソマトスタチン受容体4、ErB-B2（赤芽球性白血病発がん遺伝子相同体2）受容体、CD44受容体、およびVEGF受容体-2キナーゼが挙げられる。

【0035】

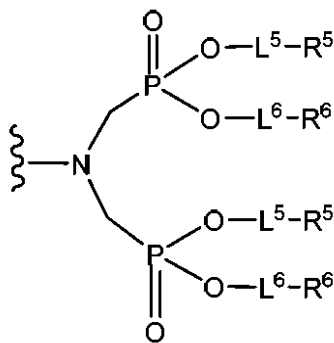
本明細書において使用される場合、用語「ステルス剤」は、ナノ粒子の表面特性を改変することができる分子を指し、本明細書においてさらに記載される。

10

【0036】

本明細書において使用される場合、用語「四脚型提示成分（tetrapodal presentation component）」は、一般式：

【化11】



20

（式中、 L^5 、 L^6 、 R^5 および R^6 は、本明細書においてさらに記載される）を有する分子を指す。いくつかの実施形態では、 L^5 および L^6 はそれぞれ、独立して、結合および連結基からなる群より選択され； R^5 および R^6 はそれぞれ、独立して、 $C_1 - C_{36}$ アルキル、標的化剤、診断剤およびステルス剤からなる群より選択される。いくつかの実施形態では、 R^5 および/または R^6 は、水素であり得る。

【0037】

30

本明細書において使用される場合、用語「に包埋された」は、ナノ粒子の表面の、またはその表面の近傍の薬剤の位置を指す。ナノ粒子に包埋された薬剤は、例えば、リボソームの二重層膜内に位置してもよいし、ナノ粒子の外側ポリマーシェル内に、そのシェル内に含まれるように位置してもよい。

【0038】

本明細書において使用される場合、用語「に封入された」は、ナノ粒子の内側に囲い込まれているかまたは完全に含まれている薬剤の位置を指す。リボソームの場合、例えば、治療剤および/または診断剤を、リボソームの水性内部に存在するように封入することができる。次いで、リボソームを不安定化するか、または封入された薬剤の放出を他の方法で生じさせることを目的とするある特定の条件によって、このような封入された薬剤の放出を誘発することができる。

40

【0039】

本明細書において使用される場合、用語「に係留された」は、成分の1つまたは複数が空間内で自由に動き回ることができるような、ある成分の別の成分への結合を指す。ある特定の例示的な実施形態では、結合成分を、ナノ粒子周囲の溶液中で自由に動き回るようにナノ粒子に係留することができる。いくつかの実施形態では、結合成分は、ナノ粒子の表面に係留され、表面から離れて伸長することができる。

【0040】

本明細書において使用される場合、用語「脂質」は脂質分子を指し、脂肪、ワックス、ステロール、コレステロール、コレステロール誘導体、脂溶性ビタミン、モノグリセリド

50

、ジグリセリド、 $C_8 - C_{36}$ アルキル、リン脂質、スフィンゴ脂質、糖脂質、カチオン性脂質またはアニオン性脂質、および誘導体化脂質などを挙げることができる。脂質は、ミセル、単層、および二重層膜を形成することができる。ある特定の実施形態では、脂質は、リポソームに自己組織化することができる。他の実施形態では、脂質は、単層または二重層としてナノ粒子の表面を覆うことができる。

【0041】

本明細書において使用される場合、用語「アプタマー」は、特定の標的に特異的に結合する天然に存在しないオリゴヌクレオチド（典型的には、20～200ヌクレオチド）を指す。「天然に存在しない」は、天然のヌクレオチド（A、T、C、G、U）の天然に存在しない配列、ならびに天然に存在しないヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドを包含する。例えば、「Spiegelmers（登録商標）」は、鏡像核酸を有するアプタマー、すなわち、天然に存在するD立体配置の代わりにLキラル立体配置にあるアプタマーである。アプタマーは、分子内相互作用を介して、固有の三次元構造を形成し、かつ/または例えば、一次構造もしくは二次構造からの誘導適合機構を介して標的に結合すると構造を変化させることができる。標的へのアプタマーの結合は、従来の相補的核酸ハイブリダイゼーション、例えば、二重らせん形成または三重らせん形成によって媒介されないが、アプタマーの一部は、このようなハイブリダイゼーションに参与することができる。例えば、アプタマーは一般に、分子内ヘアピン構造および他の三次元構造を形成する。アプタマーは、任意の方法または方法の組み合わせによって選択することができる。指数関数的富化によるリガンドの系統的進化（SELEX（商標））またはその変法は、この分野において一般に使用されている。基本のSELEX（商標）法は、例えば、米国特許第5,567,588号明細書に記載されている。基本方法に対する多数の変法、例えば、米国特許出願公開第2010015041号明細書に記載されているin vivo SELEX（商標）も使用することができる。MONOLEX（商標）は、例えば、Nitsch et al., (2007) BMC Biotechnology 7:48、および国際公開第02/29093号パンフレットに記載されている別の選択法である。腫瘍細胞内に注入される核酸ライブラリを使用するin vivo選択も可能である（例えば、Mira et al., (2010) Nat. Chem. Biol. 1:22を参照のこと）。本発明に使用するためのアプタマーは、限定されないが、MUC-1、EGFR、クローディン4、MUC-4、CXCR4、CCR7、FOL1R、ソマトスタチン受容体4、ErbB-2（赤芽球性白血病発がん遺伝子相同体2）受容体、CD44受容体、VEGF受容体-2キナーゼ、およびヌクレオリンを含む様々な標的に結合するように設計することができる。

【0042】

本明細書において使用される場合、用語「被験体」は、寿命の任意の段階にある任意の哺乳動物、特にヒトを指す。

【0043】

本明細書において使用される場合、用語「投与する」、「投与された」、または「投与すること」は、本発明の標的化送達組成物を投与する方法を指す。本発明の標的化送達組成物は、局所投与、非経口投与、静脈内投与、皮内投与、筋肉内投与、結腸投与、直腸投与、または腹腔内投与を含む様々な方法で投与することができる。非経口投与および静脈内投与は、好ましい投与方法である。標的化送達組成物は、組成物または製剤の一部として投与することもできる。

【0044】

本明細書において使用される場合、状態、疾患、障害、または症候を「処置する」または状態、疾患、障害、または症候の「処置」という用語は、(i) 疾患、障害、または症候を阻害すること、すなわち、その発達を停止すること；および(ii) 疾患、障害、または症候を軽減すること、すなわち、疾患、障害、または症候の後退を引き起こすことを包含する。当技術分野において公知であるように、全身送達対局所送達、年齢、体重、全体的な健康、性別、食事、投与時間、薬物相互作用、および状態の重症度についての調整

が必要であり得、当業者による通常の実験によって確認することができる。

【 0 0 4 5 】

本明細書において使用される場合、用語「製剤」は、被験体に投与するための成分の混合物を指す。例えば、関節内（関節内）経路、静脈内経路、筋肉内経路、腫瘍内経路、皮内経路、腹腔内経路、ならびに皮下経路などによる非経口投与に適切な製剤は、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、および製剤を意図されたレシピエントの血液と等張性にする溶質を含有することができる水性および非水性の等張性滅菌注射液剤、ならびに懸濁化剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤、および保存剤を含むことができる水性滅菌懸濁剤および非水性滅菌懸濁剤を含む。注射液剤および懸濁剤は、滅菌粉末、顆粒、および錠剤からも調製することができる。標的化送達組成物の製剤は、単位用量または複数回用量の密閉容器、例えば、10 アンプルおよびバイアルで提供することができる。標的化送達組成物は、単独でまたは他の適切な成分と組み合わせて、口または鼻部を通じた吸入を介して投与されるエアロゾル製剤（すなわち、これらは、「噴霧する」ことができる）にすることができる。エアロゾル製剤は、加圧された許容され得る噴霧剤、例えば、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、および窒素などの中に入れることができる。直腸投与に適切な製剤としては、例えば、坐剤基剤とともに有効量の標的化送達組成物を含む坐剤が挙げられる。適切な坐剤基剤としては、天然または合成のトリグリセリドまたはパラフィン炭化水素が挙げられる。加えて、標的化送達組成物と、基剤（例えば、液体トリグリセリド、ポリエチレングリコール、およびパラフィン炭化水素が挙げられる）との組み合わせを含有するゼラチン直腸カプセルを使用することも可能である。ある特定の実施形態では、製剤は、局所投与する20 こともできるし、点眼剤の形態で投与することもできる。

本発明の実施形態

I I . 概要

【 0 0 4 6 】

本発明のホスホン酸コンジュゲートおよびそれらの作製方法は、多数の独自の態様を薬物送達および画像診断の領域に提供する。例えば、本発明は、ナノ粒子が、標的化薬物送達10 に使用され得るステルスナノ粒子へと変換されるのを容易にすることができる化合物を作製するための口バストかつ簡便な方法を提供する。ある特定の 경우에는、ホスホン酸コンジュゲートは、ナノ粒子表面のステルス剤の密度を増大させる独自の能力を提供するので、より低い密度で有効ではない場合がある様々なステルス剤の使用について、さらなる柔軟性を可能にすることができる。加えて、ホスホン酸コンジュゲートは、ナノ粒子表面の問題のステルス剤または他の成分、例えば標的化剤にさらなる安定性を提供する様式で生成することができる。

【 0 0 4 7 】

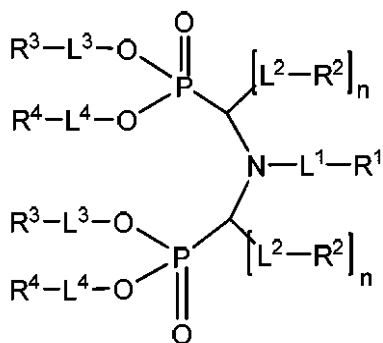
さらに、ホスホン酸化合物は、様々な方法によってナノ粒子に組み入れることができる。例えば、本明細書において記載される方法を使用して H - ホスホン酸化合物を生成して、次いで、H - ホスホン酸化合物がナノ粒子表面に存在するように、ナノ粒子と組み合わせることができる。例えば、H - ホスホン酸化合物を組み込むことによって H - ホスホン酸化合物をナノ粒子と組み合わせ、ナノ粒子を作製することができる。他の場合には、ナノ粒子を生成し、そして H - ホスホン酸化合物をナノ粒子表面に結合させることにより、40 ナノ粒子表面を改変することができる。改変ナノ粒子を作製する際の柔軟性は、例えば、特定の治療用途および / または診断用途に適合するようにされたナノ粒子であって、患者への投与後に長期の *in vivo* 半減期を有することもできるナノ粒子にすることができる。

I I I . ホスホン酸コンジュゲート

【 0 0 4 8 】

一態様では、本発明の化合物は、式：

【化 1 2】



10

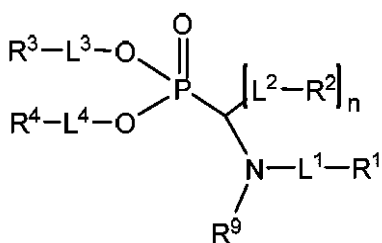
(式中、 L^1 、 L^2 、 L^3 および L^4 はそれぞれ、独立して、結合および連結基からなる群より選択され； R^1 は、ナノ粒子、結合成分、標的化剤、診断剤、ステルス剤および四脚型提示成分からなる群より選択され； R^2 はそれぞれ、独立して、ステルス剤、 $C_1 - C_{10}$ アルキル、カルボン酸またはカルボン酸エステル、ホスホン酸またはホスホン酸エステル、スルホン酸またはスルホン酸エステル、およびヒドロキシからなる群より選択され； R^3 および R^4 はそれぞれ、独立して、H、ナノ粒子、結合成分、標的化剤、診断剤およびステルス剤からなる群より選択され、 R^3 または R^4 の少なくとも1つは、H以外であり； n は、0 ~ 2 の整数である) の化合物を含むことができる。

20

【0049】

別の態様では、本発明の化合物は、式：

【化 1 3】



30

(式中、 L^1 、 L^2 、 L^3 および L^4 はそれぞれ、独立して、結合および連結基からなる群より選択され； R^1 は、ナノ粒子、結合成分、標的化剤、診断剤およびステルス剤からなる群より選択され； R^2 は、独立して、ステルス剤、 $C_1 - C_{10}$ アルキル、カルボン酸またはカルボン酸エステル、ホスホン酸またはホスホン酸エステル、スルホン酸またはスルホン酸エステル、およびヒドロキシからなる群より選択され； R^3 および R^4 はそれぞれ、独立して、H、ナノ粒子、結合成分、標的化剤、診断剤およびステルス剤からなる群より選択され、 R^3 または R^4 の少なくとも1つは、H以外であり； R^9 は、 $C_1 - C_{10}$ アルキル基であり； n は、0 ~ 2 の整数である) の化合物を含むことができる。

ナノ粒子

【0050】

多種多様なナノ粒子を、本発明に使用することができる。当業者によって認識されるように、ナノ粒子の特性、例えば、サイズは、ナノ粒子の種類および/または用途、ならびに当技術分野において一般に周知の他の要因に依存し得る。適切な粒子は、球体、スフェロイド、平型、板形状、管、立方体、立方形、長円形、楕円、円柱、円錐体または角錐であり得る。適切なナノ粒子は、最大寸法(例えば、直径)のサイズが約1 nm ~ 約1000 nm、約10 nm ~ 約200 nm、および約50 nm ~ 約150 nmの範囲であり得る。

40

【0051】

適切なナノ粒子は、当技術分野において一般に公知の様々な材料で作製することができる。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、脂質、ポリマー、またはシリカ、金、および酸化鉄などの金属材料などを含む1つの物質または様々な物質の任意の組み合わせを含む

50

ことができる。ナノ粒子の例としては、限定されないが、リボソーム、ミセル、リボタンパク質、脂質コーティングバブル、ブロックコポリマーミセル、ポリマーソーム、ニオソーム、酸化鉄粒子、金粒子、シリカ粒子、デンドリマー、または量子ドットを挙げることができる。

【 0 0 5 2 】

いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、飽和脂質または不飽和脂質から部分的または完全に構成されるリボソームである。適切な脂質としては、限定されないが、脂肪、ワックス、ステロール、コレステロール、コレステロール誘導体、脂溶性ビタミン、モノグリセリド、ジグリセリド、リン脂質、スフィンゴ脂質、糖脂質、および誘導体化脂質などを挙げることができる。いくつかの実施形態では、適切な脂質としては、両親媒性脂質、中性脂質、非カチオン性脂質、アニオン性脂質、カチオン性脂質、または疎水性脂質を挙げることができる。ある特定の実施形態では、脂質としては、細胞膜に典型的に存在する脂質、例えばリン脂質および/またはスフィンゴ脂質を挙げることができる。適切なリン脂質としては、限定されないが、ホスファチジルコリン (P C)、ホスファチジン酸 (P A)、ホスファチジルエタノールアミン (P E)、ホスファチジルグリセロール (P G)、ホスファチジルセリン (P S)、およびホスファチジイルノシトール (P I) が挙げられる。適切なスフィンゴ脂質としては、限定されないが、スフィンゴシン、セラミド、スフィンゴミエリン、セラブロシド、スルファチド、ガングリオシド、およびフィトスフィンゴシンが挙げられる。他の適切な脂質としては、脂質抽出物、例えば、卵 P C、心臓抽出物、脳抽出物、肝臓抽出物、およびダイズ P C を挙げることができる。いくつかの実施形態では、ダイズ P C としては、ヒドロダイズ P C (H y d r o S o y P C) (H S P C) を挙げることができる。カチオン性脂質としては、限定されないが、N, N - ジオレオイル - N, N - ジメチルアンモニウムクロリド (D O D A C)、N, N - ジステアシル - N, N - ジメチルアンモニウムブロミド (D D A B)、N - (1 - (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 (D O T A P)、N - (1 - (2, 3 - ジオレイルオキシ) プロピル) - N, N, N - トリメチルアンモニウムクロリド (D O T M A)、および N, N - ジメチル - 2, 3 - ジオレイルオキシ) プロピルアミン (D O D M A) が挙げられる。非カチオン性脂質としては、限定されないが、ジミリスティルホスファチジルコリン (D M P C)、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)、ジパルミトイルホスファチジルコリン (D P P C)、ジミリスティルホスファチジルグリセロール (D M P G)、ジステアロイルホスファチジルグリセロール (D S P G)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール (D O P G)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール (D P P G)、ジミリスティルホスファチジルセリン (D M P S)、ジステアロイルホスファチジルセリン (D S P S)、ジオレオイルホスファチジルセリン (D O P S)、ジパルミトイルホスファチジルセリン (D P P S)、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)、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン (P O P C)、パルミトイルオレオイル - ホスファチジルエタノールアミン (P O P E)、およびジオレオイル - 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 - カルボキシラート (D O P E - m a l)、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (D P P E)、ジミリスティルホスホエタノールアミン (D M P E)、ジステアロイル - ホスファチジル - エタノールアミン (D S P E)、16 - O - モノメチル P E、16 - O - ジメチル P E、18 - 1 - トランス P E、1 - ステアロイル - 2 - オレオイル - ホスファチジルエタノールアミン (p h o s p h a t i d y e t h a n o l a m i n e) (S O P E)、1, 2 - ジエライドイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (p h o p h o e t h a n o l a m i n e) (トランス D O P E)、およびカルジオリピンが挙げられる。ある特定の実施形態では、脂質としては、P E G 化脂質などの誘導体化脂質を挙げることができる。誘導体化脂質としては、例えば、D S P E - P E G ₂₀₀₀、コレステロール - P E G ₂₀₀₀、D S P E - ポリグリセロール、または当技術分野において一般に周知の他の誘導体を挙げることができる。

10

20

30

40

50

【0053】

脂質の任意の組み合わせを、リボソームなどのナノ粒子を構築するのに使用することができる。ある特定の実施形態では、リボソームの脂質組成は、リボソームの特性、例えば、漏出速度、安定性、粒子サイズ、ゼータ電位、タンパク質結合性、*in vivo* 循環、および/または腫瘍、肝臓、および脾臓などの組織への蓄積に影響を与えるように調整することができる。例えば、DSPCおよび/またはコレステロールを使用して、リボソームからの漏出を減少させることができる。DSPGおよび/またはDOTAPなどの負または正に荷電した脂質は、リボソームの表面電荷に影響を与えるように含めることができる。いくつかの実施形態では、リボソームは、約10種類以下の脂質、または約5種類以下の脂質、または約3種類以下の脂質を含むことができる。いくつかの実施形態では、存在する特定の種類の脂質のモル百分率(mol%)は、典型的には、リボソームなどのナノ粒子中に存在する総脂質の約0%~約10%、約10%~約30%、約30%~約50%、約50%~約70%、約70%~約90%、約90%~100%を含む。本明細書において記載される脂質はリボソームに含めることもできるし、または該脂質は、ポリマーナノ粒子などの本発明のナノ粒子をコーティングするのに使用することもできる。コーティングは、ナノ粒子を部分的または完全に囲むものでもよく、単層および/または二重層を含むことができる。

10

【0054】

他の実施形態では、ナノ粒子の一部または全部は、ポリマー、例えば、ブロックコポリマー、またはナノ粒子を作製するための技術分野で公知の他のポリマーを含むことができる。いくつかの実施形態では、ポリマーは、生分解性および/または生体適合性であり得る。適切なポリマーとしては、限定されないが、ポリエチレン、ポリカーボネート、ポリ酸無水物、ポリヒドロキシ酸、ポリプロピルフルメレート(polypropylfumerate)、ポリカプロラクトン、ポリアミド、ポリアセタール、ポリエーテル、ポリエステル、ポリ(オルトエステル)、ポリシアノアクリレート、ポリビニルアルコール、ポリウレタン、ポリホスファゼン、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリシアノアクリレート、ポリ尿素、ポリスチレン、ポリアミン、およびこれらの組み合わせを挙げることができる。いくつかの実施形態では、例示的な粒子としては、シェル架橋クネデル(shell cross-linked knedel)を挙げることができ、これは、以下の参考文献: Beckerら、米国特許出願第11/250830号明細書; Thurmond, K. Bら、J. Am. Chem. Soc., 119(28):6656(1997); Woolley, K. L., Chem. Eur. J., 3(9):1397-1399(1997); Woolley, K. L., J. Poly. Sci.: Part A: Polymer Chem., 38:1397-1407(2000)にさらに記載されている。他の実施形態では、適切な粒子としては、ポリ(乳酸co-グリコール酸)(PLGA)を挙げることができる(Fu, Kら、Pharm Res., 27:100-106(2000))。

20

30

【0055】

さらに他の実施形態では、ナノ粒子は、シリカ、金、および酸化鉄などの本質的に金属である材料から部分的または完全に構成され得る。いくつかの実施形態では、シリカ粒子は、中空、多孔質、および/またはメソポーラスであり得る(Slowing, I. Iら、Adv. Drug Deliv. Rev., 60(11):1278-1288(2008))。金粒子は、以下の例示的な参考文献によって示されているように、当技術分野において一般に公知である:Bhattacharya, R. & Mukherjee, P., Adv. Drug Deliv. Rev., 60(11):1289-1306(2008)。酸化鉄粒子または量子ドットも使用することができ、当技術分野において周知である(van Vlerken, L. E. & Amiji, M. M., Expert Opin. Drug Deliv., 3(2):205-216(2006))。ナノ粒子としては、限定されないが、ウイルス粒子およびセラミック粒子も挙げられる。

40

ナノ粒子との結合

50

【0056】

ある特定の実施形態では、結合成分は、ナノ粒子に存在する反応基に結合成分を共有結合させるのに使用され得る官能基を含むことができる。官能基は、例えば、アルキレン部分またはヘテロアルキレン部分の末端位置などの結合成分のどこにでも位置することができる。多種多様な官能基が当技術分野において一般に公知であり、いくつかのクラスの反応、例えば、限定されないが、求核置換（例えば、アミンおよびアルコールのハロゲン化アシルまたは活性エステルとの反応）、求電子置換（例えば、エナミン反応）、ならびに炭素-炭素および炭素-ヘテロ原子多重結合への付加（例えば、マイケル反応またはディールス-アルダー付加）の下で反応することができる。これらのおよび他の有用な反応は、例えば March, Advanced Organic Chemistry, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, 1985; および Hermanson, Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego, 1996 で考察されている。適切な官能基としては、例えば、(a) 限定されないが、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、N-ヒドロキシベンズトリアゾールエステル、酸ハロゲン化物、アシルイミダゾール、チオエステル、p-ニトロフェニルエステル、アルキル、アルケニル、アルキニル、および芳香族エステルを含むカルボキシル基およびこれらの種々の誘導体；(b) エステル、エーテル、アルデヒドなどに変換することができるヒドロキシル基 (c) ハロアルキル基であって、ハロゲン化物を、求核基、例えば、アミン、カルボキシラートアニオン、チオールアニオン、カルボアニオン、またはアルコキシドイオンなどで、後に置き換えることができ、それにより、ハロゲン原子の部位において新しい基の共有結合をもたらすハロアルキル基；(d) 例えば、マレイミド基などの、ディールス-アルダー反応に関与することができるジエノフィル基；(e) 例えば、イミン、ヒドラゾン、セミカルバゾン、もしくはオキシムなどのカルボニル誘導体の形成を介して、またはグリニャール付加もしくはアルキルリチウム付加などの反応を介して後続の誘導体化が可能であるようなアルデヒド基またはケトン基；(f) 例えば、スルホンアミドを形成するためのアミンとの後続の反応のためのハロゲン化スルホニル基；(g) ジスルフィドに変換することができるか、またはハロゲン化アシルと反応することができるチオール基；(h) 例えば、アシル化、アルキル化、または酸化され得るアミン基またはスルフヒドリル基；(i) 例えば、付加環化、アシル化、マイケル付加などを起こすことができるアルケン；ならびに (j) 例えば、アミンおよびヒドロキシル化合物と反応することができるエポキシドを挙げることができる。いくつかの実施形態では、クリック化学ベースのプラットフォームを用いて、ナノ粒子に結合成分を結合させることができる (Kolb, H. C., M. G. Finn and K. B. Sharpless, Angew. Chem. Int'l. Ed. 40 (11): 2004 (2001))。いくつかの実施形態では、結合成分は、1つの官能基、またはナノ粒子との複数の共有結合をもたらす複数の官能基を含むことができる。

【0057】

表1は、本発明に使用され得る官能基のさらなる非限定的かつ代表的なリストを提供する。

表1. 共役化学反応についての例示的な官能基のペア

10

20

30

40

【表 1】

官能基:	反応相手:
ケトン基およびアルデヒド基	アミノ、ヒドラジドおよびアミノオキシ
イミド	アミノ、ヒドラジドおよびアミノオキシ
シアノ	ヒドロキシ
アルキル化剤(ハロアルキル基およびマレイミド誘導体など)	チオール、アミノ、ヒドラジド、アミノオキシ
カルボキシル基(活性化カルボキシル基を含む)	アミノ、ヒドロキシル、ヒドラジド、アミノオキシ
活性化スルホニル基(スルホニルクロリドなど)	アミノ、ヒドロキシル、ヒドラジド、アミノオキシ
スルフヒドリル	スルフヒドリル、マレイミド
His-タグ(6-Hisタグ付きペプチドまたはタンパク質など)	ニッケルニトリロ酢酸

10

20

【0058】

他の実施形態では、結合成分は、非共有結合性の相互作用によってナノ粒子に結合させることができ、これらとしては、限定されないが、親和性相互作用、金属配位、物理的吸着、疎水性相互作用、ファンデルワールス相互作用、水素結合相互作用、磁気相互作用、静電相互作用、双極子-双極子相互作用、抗体結合相互作用、および相補性DNA同士間のハイブリダイゼーション相互作用などを挙げることができる。いくつかの実施形態では、結合成分は、例えば、ナノ粒子に組み込まれる脂質またはリン脂質であり得る。ある特定の実施形態では、脂質またはリン脂質は、ナノ粒子の脂質二重層部分に存在してもよく、この場合、ある特定の実施形態では、ナノ粒子はリボソームである。例えば、結合成分は、脂質二重層の疎水性領域および/または親水性領域と部分的または完全に相互作用する脂質またはリン脂質(例えば、飽和しているものでもよいし不飽和のものでもよいC₈-C₃₆アルキル)であり得る。いくつかの実施形態では、結合成分は、ナノ粒子との非共有結合性相互作用を可能にする1つの基を含むことができるが、複数の基も意図される。例えば、複数のイオン電荷を使用することによって、結合成分とナノ粒子との間の十分な非共有結合性相互作用を生じさせることができる。代替の実施形態では、結合成分は、複数の脂質が、リボソームの二重層膜、またはナノ粒子上にコーティングされた二重層もしくは単層と相互作用するように、複数の脂質を含むことができる。ある特定の実施形態では、周囲の溶液の条件を改変して非共有結合性相互作用を破壊し、それにより、ナノ粒子から結合成分を解離させることができる。

30

40

【0059】

本明細書においてさらに記載されるように、本発明の化合物のいくつかは、結合成分としてR¹、R²、R³、R⁴、R⁵および/またはR⁶を含むことができる。いくつかの実施形態では、結合成分は、フェニル基、コレステロール、または脂質、例えば飽和C₁₀-C₂₄アルキル基もしくは不飽和C₁₀-C₂₄アルキル基、または置換飽和C₁₀-C₂₄アルキル基もしくは置換不飽和C₁₀-C₂₄アルキル基を含むことができる。ある特定の例示的な実施形態では、結合成分は、結合成分と脂質二重層との会合を容易にするように選択することができる。例えば、二重結合の長さ、部位および幾何的配置なら

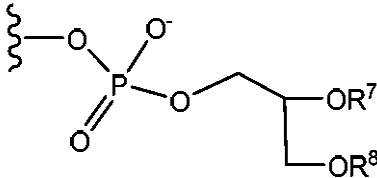
50

びに／またはアルキル基の置換を選択して、脂質二重層での所望レベルの組み込みを提供して、例えば、標的化剤および／またはステルス剤などの他の成分をディスプレイすることによるリポソームの表面特性の改変を可能にすることができる。

【0060】

いくつかの実施形態では、ホスホン酸コンジュゲートは、連結基 L^1 、 L^2 、 L^3 、 L^4 、 L^5 および／または L^6 によってナノ粒子に直接結合させることができる。これらの実施形態では、 R^1 、 R^3 、 R^4 、および／または R^6 は、ナノ粒子であり得る。他の実施形態では、 R^1 は結合成分であり、該結合成分はリン脂質である。 R^1 がリン脂質である実施形態のいくつかでは、リン脂質は、式：

【化14】



(式中、 R^7 および R^8 はそれぞれ、独立して、飽和 $C_{10} - C_{24}$ アルキル基もしくは不飽和 $C_{10} - C_{24}$ アルキル基または飽和 $C_{10} - C_{24}$ アルカノイル基もしくは不飽和 $C_{10} - C_{24}$ アルカノイル基、および置換飽和 $C_{10} - C_{24}$ アルキル基もしくは置換不飽和 $C_{10} - C_{24}$ アルキル基または置換飽和 $C_{10} - C_{24}$ アルカノイル基もしくは置換不飽和 $C_{10} - C_{24}$ アルカノイル基から選択される)を有する。ある特定の実施形態では、 R^7 および R^8 はそれぞれ、独立して、飽和 $C_{10} - C_{18}$ アルキル基もしくは不飽和 $C_{10} - C_{18}$ アルキル基または飽和 $C_{10} - C_{18}$ アルカノイル基もしくは不飽和 $C_{10} - C_{18}$ アルカノイル基、および置換飽和 $C_{10} - C_{18}$ アルキル基もしくは置換不飽和 $C_{10} - C_{18}$ アルキル基または置換飽和 $C_{10} - C_{18}$ アルカノイル基もしくは置換不飽和 $C_{10} - C_{18}$ アルカノイル基から選択される。適切なアルカノイル基としては、限定されないが、デカノイル、ウンデカノイル、ラウロイル、トリデカノイル、ミリストイル、ペンタデカノイル、パルミトイル、ヘプタデカノイル、ステアロイル、ノナデカノイル、およびアラキドイルなどが挙げられる。当技術分野において一般に公知の、および本明細書において記載される他のリン脂質も使用することができる。

【0061】

いくつかの実施形態では、ホスホン酸コンジュゲートは、ナノ粒子の表面特性(例えば、親水性特性または疎水性特性)を改変するように調製することができる。例えば、正荷電基および負荷電基をコンジュゲートに含め、ナノ粒子とさらに組み合わせることができる。ある特定の実施形態では、酸性基をコンジュゲートに含めて、リポソーム表面に負電荷を取り込ませることができる。本明細書において提供されるように、本発明のコンジュゲートは、表面特性を改変するのに使用され得る $[L^2 - R^2]_n$ 基を含むことができる。 n は、0、1または2の整数であり得る。いくつかの実施形態では、 L^2 は、結合または連結基であり得る。 R^2 としては、限定されないが、ステルス剤、 $C_1 - C_{10}$ アルキル、カルボン酸もしくはカルボン酸エステル、ホスホン酸もしくはホスホン酸エステル、スルホン酸もしくはスルホン酸エステル、またはヒドロキシを挙げることができる。

連結基

【0062】

連結基は、本発明のホスホン酸コンジュゲートの別の特徴である。当業者であれば、様々な連結基が当技術分野において公知であり、例えば、以下の参考文献：Hermanson, G. T., Bioconjugate Techniques, 2nd Ed., Academic Press, Inc. (2008)に見出し得ることを認識することができる。本発明の連結基を使用して、化合物の異なる部分間に間隔(spacing)を提供するなど、さらなる特性を化合物に提供することができる。この間隔を使用して、例えば、ナノ粒子から離れて位置する標的化剤が標的に結合することができる場合に、例え

ば、ナノ粒子によって引き起こされる立体障害問題を克服することができる。いくつかの実施形態では、連結基を使用して、化合物の物理的特性を変化させることができる。

【0063】

いくつかの実施形態では、本発明のホスホン酸コンジュゲートは、それぞれが独立して連結基または結合であり得る L^1 、 L^2 、 L^3 、 L^4 、 L^5 および L^6 を含む。ある特定の実施形態では、 L^1 、 L^2 、 L^3 、 L^4 、 L^5 および L^6 はそれぞれ、独立して、親水性非免疫原性水溶性連結基であるように選択することができる。本発明の親水性非免疫原性水溶性連結基としては、限定されないが、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリカルボキシラート、多糖、およびデキストランを挙げることができる。当業者であれば、上で考察した間隔の検討事項などのある特定の用途のために、連結基の長さおよび/または化学特性を選択することができることを認識する。

10

【0064】

他の実施形態では、連結基は、例えば、 C_{1-30} アルキレン連結基または類似のヘテロアルキレン連結基（炭素鎖が、O、NおよびSから選択される1個～10個のヘテロ原子が途中に挿入されているアルキレン連結基）であり得る。あるいは、いくつかの実施形態では、連結基としては、フェニレン環またはヘテロアリアルカウンターパートなどのアリアル部分を挙げることができる。さらに他の実施形態では、連結基としては、アミド基、アミノ基、ケト基、およびヒドロキシル基で置換されたアルキレン連結基またはヘテロアルキレン連結基を挙げることができる。

20

ステルス剤

【0065】

いくつかの実施形態では、ホスホン酸コンジュゲートは、少なくとも1つのステルス剤を含むことができる。例えば、ある特定の実施形態では、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 および R^6 は、独立して、ステルス剤であるように選択することができる。ステルス剤は、ナノ粒子が互いにおよび血液細胞または血管壁に粘着するのを防ぐことができる。ある特定の実施形態では、ステルスナノ粒子、例えばステルスリポソームは、ナノ粒子が被験体に投与される場合に、免疫原性および/または反応性を減少させることができる。ステルス剤はまた、被験体内でのナノ粒子の血液循環時間を増加させることができる。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、例えば、ナノ粒子がステルス剤から部分的もしくは完全に構成されるか、またはナノ粒子がステルス剤でコーティングされるように、ステルス剤を含むことができる。本発明に使用するためのステルス剤としては、当技術分野において一般に周知のものを挙げることができる。適切なステルス剤としては、限定されないが、デンドリマー、ポリアルキレンオキシド、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリカルボキシラート、多糖、および/またはヒドロキシアルキルデンブンを挙げることができる。結合成分に関して上に記載したように、ステルス剤は、共有結合および/または非共有結合を介して、本発明のホスホン酸コンジュゲートに結合させることができる。

30

【0066】

ある特定の実施形態では、ステルス剤としては、ポリアルキレンオキシド、例えば「ポリエチレングリコール」を挙げることができるが、これは当技術分野において周知であり、一般に、エチレンオキシドのオリゴマーまたはポリマーを指す。ポリエチレングリコール（PEG）は直鎖状でもよいし分岐状でもよく、分岐状のPEG分子は、中心コアから出るさらなるPEG分子を有することができる。かつ/または複数のPEG分子は、ポリマー骨格にグラフトすることができる。当技術分野において理解されているように、ポリエチレングリコールはある分子量分布で生成することができ、その分布を使用してPEGの種類を特定することができる。例えば、PEG₅₀₀₀は、当技術分野において一般に公知の方法によって測定した場合に約500 g/molの平均分子量を有するPEG分子の分布によって特定される。あるいは、PEGは、以下の式： $H-[O-(CH_2)_2]_m-OH$ （式中、mは、このポリマーに存在するモノマーの数である（例えば、mは、1～2

40

50

00の範囲であり得る))によって表すことができる。例えば、PEG₁₀₀の分布では、mが2に等しいPEGポリマーを挙げることができる。別の例では、PEG₁₀₀₀としては、mが23に等しいPEG分子を挙げることができる。あるいは、PEG₅₀₀₀としては、mが114に等しいPEG分子を挙げることができる。

【0067】

ある特定の実施形態では、PEGとしては、低分子量または高分子量のPEG、例えばPEG₁₀₀、PEG₅₀₀、PEG₂₀₀₀、PEG₃₄₀₀、PEG₅₀₀₀、PEG₁₀₀₀₀、またはPEG₂₀₀₀₀を挙げることができる。いくつかの実施形態では、PEGは、PEG₁₀₀~PEG₁₀₀₀₀、またはPEG₁₀₀₀~PEG₁₀₀₀₀、またはPEG₁₀₀₀~PEG₅₀₀₀の範囲であり得る。ある特定の実施形態では、ステルス剤は、PEG₅₀₀、PEG₁₀₀₀、PEG₂₀₀₀、またはPEG₅₀₀₀であり得る。ある特定の実施形態では、PEGは、メチルエーテル、アルコール、またはカルボン酸を末端に有することができる。ある特定の実施形態では、ステルス剤としては、それぞれが連結基で互いに連結された少なくとも2つのPEG分子を挙げることができる。連結基としては、上記のもの、例えばアミド結合(amide linkage)を挙げることができる。いくつかの実施形態では、PEG化脂質は、ナノ粒子、例えばリポソームの二重層に、ナノ粒子を「ステルス」にするのに十分な量で存在し、ここで、ステルスナノ粒子は、減少した免疫原性を示す。

治療剤

【0068】

いくつかの実施形態では、本発明の化合物は、治療剤、診断剤、またはこれらの組み合わせを含むことができる。ある特定の実施形態では、治療剤および/または診断剤は、本発明のホスホン酸コンジュゲートと直接結合させることができる。例えば、治療剤および/または診断剤は、ホスホン酸コンジュゲートに共有結合させることができる。他の実施形態では、治療剤および/または診断剤は、本発明のホスホン酸コンジュゲートと結合したナノ粒子内、該ナノ粒子上、または該ナノ粒子周囲のどこにでも存在することができる。いくつかの実施形態では、治療剤および/または診断剤は、ナノ粒子に包埋するか、ナノ粒子に封入するか、またはナノ粒子に係留することができる。ある特定の実施形態では、ナノ粒子はリポソームであり、診断剤および/または治療剤は、該リポソームに封入されている。

【0069】

本発明に使用される治療剤は、被験体における状態を処置するように向けられた任意の薬剤を含むことができる。一般に、限定されないが、United States Pharmacopeia (U.S.P.), Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th Ed., McGraw Hill, 2001; Katzung, Ed., Basic and Clinical Pharmacology, McGraw-Hill/Appleton & Lange, 8th ed., September 21, 2000; Physician's Desk Reference (Thomson Publishing; および/または The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 18th ed., 2006, Beers and Berkow, Eds., Merck Publishing Group; または、動物の場合には、The Merck Veterinary Manual, 9th ed., Kahn Ed., Merck Publishing Group, 2005 (これらの文献はすべて、参照により本明細書に組み込まれる)に列挙されている薬剤を含む当技術分野において公知の任意の治療剤を使用することができる。

【0070】

治療剤は、処置されることが所望される疾患の種類に応じて選択することができる。例えば、ある特定の種類のがんまたは腫瘍、例えば、癌、肉腫、白血病、リンパ腫、骨髄腫、および中枢神経系がん、ならびに固形腫瘍および混合腫瘍は、同じまたは場合により異

なる治療剤の投与を伴い得る。ある特定の実施形態では、被験体におけるがん状態を処置するかまたは該がん状態に影響を与えるように治療剤を送達することができ、治療剤としては、化学療法剤、例えば、アルキル化剤、代謝拮抗剤、アントラサイクリン、アルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤、および他の抗がん剤を挙げることができる。いくつかの実施形態では、上記薬剤としては、アンチセンス剤、マイクロRNA剤、siRNA剤および/またはshRNA剤を挙げることができる。

【0071】

いくつかの実施形態では、治療剤としては、限定されないが、アバスチン、ドキシソルビシン、シスプラチン、オキサリプラチン、カルボプラチン、5-フルオロウラシル、ゲムシタビン (gemcitabine)、またはタキサン、例えば、パクリタキセルおよびドセタキセルを含む抗がん剤または細胞傷害剤を挙げることができる。さらなる抗がん剤としては、限定されないが、20-epi-1, 25ジヒドロキシビタミンD3, 4-イボメアノール、5-エチニルウラシル、9-ジヒドロタキソール、アビラテロン、アシピシン、アクラルビン、アコダゾール塩酸塩、アクロニン、アシルフルベン、アデシペノール、アドゼレシン、アルデスロイキン、全ての-tkアンタゴニスト、アルトレタミン、アンバムスチン、アンボマイシン、酢酸アメタントロン、アミドックス (amidox)、アミホスチン、アミノグルテチミド、アミノレプリン酸、アムルビン、アムサクリン、アナグレリド、アナストロゾール、アンドログラホリド、新脈管形成阻害剤、アンタゴニストD、アンタゴニストG、アンタレリクス (antarelix)、アントラマイシン、; 抗背側形態形成タンパク質-1 (anti-dorsalizing morphogenetic protein-1)、抗エストロゲン剤、アンチネオブラストン、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アフィディコリングリシネート、アポトーシス遺伝子モジュレーター、アポトーシス制御因子、アプリン酸、ARA-CDP-DL-PTBA、アルギニンデアミナーゼ、アスパラギナーゼ、アスペルリン、アスラクリン、アタメスタン、アトリムスチン、アキシナスタチン1、アキシナスタチン2、アキシナスタチン3、アザシチジン、アザセトロン、アザトキシン、アザチロシン、アゼテバ、アゾトマイシン、バッカチンIII誘導体、パラノール、パチマスタット、ベンゾクロリン、ベンゾデバ、ベンゾイルスタウロスポリン、ベータラクタム誘導体、-アレチン、ベタクラマイシンB、ベツリン酸、BFGF阻害剤、ピカルタミド、ピサントレン、ピサントレン塩酸塩、ビスアジリジニルスペルミン、ビスナフィド、ジメシル酸ビスナフィド、ピストラテンA、ビゼレシン、ブレオマイシン、硫酸ブレオマイシン、BRC/ABLアンタゴニスト、プレフレート、プレキナルナトリウム、プロピリミン、ブドチタン、ブスルファン、ブチオニンスルホキシイミン、カクチノマイシン、カルシボトリオール、カルホスチンC、カルステロン、カンプトテシン誘導体、カナリアボックスIL-2、カペシタビン、カラセミド、カルベチマー、カルボプラチン、カルボキサミド-アミノ-トリアゾール、カルボキシアミドトリアゾール、カレストM3、カルムスチン、cam700、軟骨由来阻害因子、カルビン塩酸塩、カルゼレシン、カゼインキナーゼ阻害剤、カスタノスペルミン、セクロピンB、セデフィンゴール、セトロレリクス、クロラムブシル、クロリン、クロロキノキサリンスルホンアミド、シカプロスト、シロレマイシン、シスプラチン、cis-ポルフィリン、クラドリピン、クロミフェン類似体、クロトリマゾール、コリスマイシンA、コリスマイシンB、コンプレタスタチンA4、コンプレタスタチン類似体、コナゲニン、クランベシジン816 (crambescidin 816)、クリスナトール、メシル酸クリスナトール、クリプトフィシン8、クリプトフィシンA誘導体、キュラシンA、シクロペンタアントラキノ、シクロホスファミド、シクロプラタム、シペマイシン、シタラビン、シタラビンオクホスフェート、細胞溶解因子、シトスタチン、ダカルバジン、ダクリキシマブ、ダクチノマイシン、ダウノルビン塩酸塩、デシタビン、デヒドロジデムニンB、デスロレリン、デキシホスファミド、デキシソルマブラチン、デクスラゾキサン、デクスベラパミル、デザグアニン、メシル酸デザグアニン、ジアジコン、ジデムニンB、ジドックス、ジエチルノルスペルミン、ジヒドロ-5-アザシチジン、ジオキサマイシン、ジフェニルスピロムスチン、ドセタキセル、ドコサノール、ドラセトロン、

ドキシフルリジン、ドキシソルピシン、ドキシソルピシン塩酸塩、ドロロキシフェン、クエン酸ドロロキシフェン、プロピオン酸ドロモスタノロン、ドロナビノール、ズアゾマイシン (duazomycin)、デュオカルマイシンSA、エブセレン、エコムスチン、エダトレキサート、エデルホシン、エドレコロマブ、エフロミチン、塩酸エフロミチン、エレメン、エルサミトルシン、エミテフル、エンロブラチン、エンプロメート、エピプロピジン、エピルピシン、エピルピシン塩酸塩、エプリステリド、エルプロゾール、赤血球遺伝子療法ベクターシステム、塩酸エソルピシン、エストラムスチン、エストラムスチン類似体、リン酸エストラムスチンナトリウム、エストロゲンアゴニスト、エストロゲンアンタゴニスト、エタニダゾール、エトポシド、リン酸エトポシド、エトプリン、エキセメスタン、ファドロゾール、塩酸ファドロゾール、ファザラビン、フェンレチニド、フィルグラスチム、フィナステリド、フラボピリドール、フレゼラスチン、フロクスウリジン、フルアステロン、フルダラビン、リン酸フルダラビン、塩酸フルオロダウノルニシン、フルオロウラシル、フルオロシタピン、ホルフェニメクス、フォルメスタン、ホスキドン、ホストリエシン、ホストリエシンナトリウム、ホテムスチン、ガドリニウムテキサフィリン、硝酸ガリウム、ガロシタピン、ガニレリクス、ゼラチナーゼ阻害剤、ゲムシタピン、塩酸ゲムシタピン、グルタチオン阻害剤、ヘプスルファム、ヘレグリン、ヘキサメチレンビスアセトアミド、ヒドロキシウレア、ヒペリシン、イバンドロン酸、イダルピシン、塩酸イダルピシン、イドキシフェン、イドラマントン、イホスファミド、イルモホシン、イロマスタット、イミダゾアクリドン、イミキモド、免疫賦活ペプチド、インスリン様増殖因子-1受容体阻害剤、インターフェロンアゴニスト、インターフェロンアルファ-2A、
 インターフェロンアルファ-2B、インターフェロンアルファ-N1、インターフェロンアルファ-N3、インターフェロンベータ-I A、インターフェロンガンマ-I B、インターフェロン、インターロイキン、イオベンゲアン、ヨードドキシソルピシン、イプロブラチン、イリノテカン、塩酸イリノテカン、イロブラクト、イルソグラジン、イソベンガゾール、イソホモハリコンドリノB、イタセトロン、ジャスブラキノリド、カハラリドF、ラメラリン-Nトリアセテート、ランレオチド、酢酸ランレオチド、レイナマイシン、レノグラスチム、硫酸レンチナン、レプトルスタチン、レトロゾール、白血球抑制因子、白血球アルファインターフェロン、酢酸ロイプロリド、ロイプロリド/エストロゲン/プロゲステロン、リュープロレリン、レバミゾール、リアロゾール、塩酸リアロゾール、直鎖ポリアミン類似体、親油性二糖ペプチド、親油性白金化合物、リッソクリナミド7 (lissoclinamide 7)、ロバブラチン、ロンブリシン (lombricine)、ロメトレキソール、ロメトレキソールナトリウム、ロムスチン、ロニダミン、ロソキサントロン、塩酸ロソキサントロン、ロバスタチン、ロキソリビン、ルルトテカン (lurtotecan)、ルテチウムテキサフィリン、リソフィリン、溶解性ペプチド、メイタンシン (maitansine)、マンノスタチンA、マリマスタット、マソプロコール、マスピン、マトリライシン阻害剤、マトリックスメタロプロテイナーゼ阻害剤、メイタンシン、塩酸メクロレタミン、酢酸メゲストロール、酢酸メレンゲストロール、メルファラン、メノガリル、メルパロン、メルカプトプリン、メテレリン、メチオニナーゼ、メトトレキサート、メトトレキサートナトリウム、メトクロブラミド、メトプリン、メツレデバ、微細藻類プロテインキナーゼC阻害剤、MIF阻害剤、ミフェプリストン、ミルテホシン、ミリモスチム、ミスマツチ二本鎖RNA、ミチンドミド、ミトカルシン、ミトクロミン、ミトギリン、ミトグアゾン、ミトラクトール、ミトマルシン、マイトマイシン、マイトマイシン類似体、ミトナフィド、ミトスベル、ミトタン、マイトトキシン線維芽細胞増殖因子-サポリン、ミトキサントロン、塩酸ミトキサントロン、モファロテン、モルグラモスチム、モノクローナル抗体、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、モノホスホリル脂質a / ミオバクテリウム細胞壁SK、モビダモール、多剤耐性遺伝子阻害剤、多発性腫瘍抑制因子1に基づく療法、マスタード抗がん剤、ミカペルオキシドB、マイコバクテリア細胞壁抽出物、ミコフェノール酸、ミリアボロン、n-アセチルジナリン、ナファレリン、ナグレスチブ、ナロキソン/ペンタゾシン、ナパビン、ナフテルピン、ナルトグラスチム、ネダブラチン、ネモルピシン、ネリドロン酸、中性エンドペプチダーゼ、ニルタミド、ニ

サマイシン、一酸化窒素モジュレーター、窒素酸化物抗酸化剤、ニトルリン、ノコダゾール、ノガラマイシン、n - 置換ベンズアミド、06 - ベンジルグアニン、オクトレオチド、オキセノン、オリゴヌクレオチド、オナプリストン、オンドанセトロン、オラシン、経口サイトカイン誘導物質、オルマブラチン、オサテロン、オキサリプラチン、オキサウノマイシン、オキシスラン、バクリタキセル、バクリタキセル類似体、バクリタキセル誘導体、パラウアミン、パルミトイルリゾキシシン、パミドロン酸、パナキシトリオール、パノミフェン、パラバクチン、パゼリブチン、ペグアスバラガーゼ、ベルデシン、ペリオマイシン、ペンタムスチン、ペントサンポリサルフェートナトリウム、ペントスタチン、ペントロゾール、硫酸ペプロマイシン、ペルフルブロン、ペルホスファミド、ペリリルアルコール、フェナジノマイシン、フェニルアセテート、ホスファターゼ阻害剤、ビシバニール、塩酸ピロカルピン、ピボプロマン、ピボスルファン、ピラルピシン、ピリトレキシム、塩酸ピロキサントロン、ブラセチンA、ブラセチンB、プラスミノーゲンアクチベーターインヒビター、白金錯体、白金化合物、白金 - トリアミン錯体、プリカマイシン、プロメスタン、ポルフィマーナトリウム、ポルフィロマイシン、ブレドニムスチン、塩酸プロカルバジン、プロピルビス - アクリドン、プロスタグランジンJ2、前立腺癌抗アンドロゲン剤、プロテアソーム阻害剤、プロテインAに基づく免疫モジュレーター、プロテインキナーゼC阻害剤、タンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ阻害剤、ピューロマイシン、塩酸ピューロマイシン、プルプリン、ピラゾフリン、ピラゾロアクリジン、ピリドキシル化ヘモグロビンポリオキシエチレンコンジュゲート、RAFアンタゴニスト、ラルチトレキセド、ラモセトロン、RASファルネシルタンパク質トランスフェラーゼ阻害剤、RAS阻害剤、RAS - GAP阻害剤、脱メチル化レテリブチン、レニウムRE186エチドロネート、リゾキシシン、リボプリン、リボザイム、RIIレチナミド、RNAi、ログレチミド、ロヒツキン、ロムルチド、ロキニメクス、ルビギノンB1、ルボキシル、サフィンゴール、塩酸サフィンゴール、サイントピン、sarcnu、サルコフィトールA、サルグラモスチム、SDI1模倣体、セムスチン、老化由来阻害因子1 (senescence derived inhibitor 1)、センスオリゴヌクレオチド、シグナル伝達阻害剤、シグナル伝達モジュレーター、シムトラゼン、単鎖抗原結合タンパク質、シゾフィラン (sizofuran)、ソブゾキサシン、ボロカブテイトナトリウム、フェニル酢酸ナトリウム、ソルベロール、ソマトメジン結合タンパク質、ソネルミン、スパルホス酸ナトリウム、スパルホス酸、スパルソマイシン、スピカマイシンD、塩酸スピロゲルマニウム、スピロムスチン、スピロブラチン、スプレノペンチン、スポンギスタチン1、スクアラミン、幹細胞阻害剤、幹細胞分裂阻害剤、スチピアミド、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ストロメライシン阻害剤、スルフィノシン、スロフェヌル、超活性血管作用性腸ペプチドアンタゴニスト、スラジスタ、スラミン、スワインソニン、合成グリコサミノグリカン、タリソマイシン、タリムスチン、タモキシフェンメチオジド、タウロムスチン、タザロテン、テコガランナトリウム、テガフル、テルラピリウム、テロメラゼ阻害剤、塩酸テロキサントロン、テモボルフィン、テモゾロミド、テニボシド、テロキシロン、テストラクトン、テトラクロロデカオキシド、テトラゾミン、タリブラスチン、サリドマイド、チアミプリン、チオコラリン、チオグアニン、チオテパ、トロンボポエチン、トロンボポエチン模倣体、チマルファシン、サイモポエチン受容体アゴニスト、チモトリナン、甲状腺刺激ホルモン、チアゾフリン、スズエチルエチオブルプリン、チラバザミン、二塩化チタノセン、塩酸トボテカン、トブセンチン、トレミフェン、クエン酸トレミフェン、全能性幹細胞因子、翻訳阻害剤、酢酸トレストロン、トレチノイン、トリアセチルウリジン、トリシリピン、リン酸トリシリピン、トリメトレキセート、グルクロン酸トリメトレキセート、トリプトレリン、トロピセトロン、塩酸ツプロゾール、ツロステリド、チロシンキナーゼ阻害剤、チロホスチン (tyrphostin)、UBC阻害剤、ウベニメクス、ウラシルマスタード、ウレデパ、尿生殖洞由来増殖阻害因子、ウロキナーゼ受容体アンタゴニスト、バブレオチド、バ

リオリンB、ベラレソール、ベラミン、ベルジン、ベルテボルフィン、硫酸ピンブラスチン、硫酸ピンクリスチン、ビンデシン、硫酸ビンデシン、硫酸ビネピジン、硫酸ピングリシネート、硫酸ビンロイロシン、ビノレルビン、酒石酸ビノレルビン、硫酸ビンロシジン、ビンキサリチン、硫酸ビンゾリジン、ピタキシチン、ボロゾール、ザノテロン、ゼニプラチン、ジラスコルブ、ジノスタチン、ジノスタチンスチマラマー、またはゾルピシン塩酸塩を挙げることができる。

【0072】

いくつかの実施形態では、治療剤は、2つ以上の治療剤の投与を含む薬剤カクテルの一部であり得る。例えば、シスプラチンおよびオキサリプラチンの両方を有するリポソームを投与することができる。加えて、治療剤は、免疫刺激アジュバント、例えば、アルミニウムゲルもしくはアルミニウム塩のアジュバント（例えば、リン酸アルミニウム（*aluminum phosphate*）または水酸化アルミニウム）、リン酸カルシウム、エンドトキシン、およびトール様受容体アジュバントなどの前、それらの後、またはそれらとともに送達することができる。

10

【0073】

本発明の治療剤は、治療用途に使用するための放射性核種も含むことができる。例えば、 ^{111}In などのオージェ電子のエミッターを、ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）または1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 4, 7, 10-四酢酸（DOTA）などのキレートと結合させて、処置に使用するべき標的化送達組成物、例えばリポソームに含めることができる。他の適切な放射性核種および/または放射性核種-キレートの結合としては、限定されないが、ベータ放射性核種（ ^{177}Lu 、 ^{153}Sm 、 $^{88/90}\text{Y}$ ）とDOTA、 ^{64}Cu -TETA、 $^{188/186}\text{Re}(\text{CO})_3$ -IDA； $^{188/186}\text{Re}(\text{CO})$ トリアミン（環状または直鎖状）、 $^{188/186}\text{Re}(\text{CO})_3$ -Enpy 2、および $^{188/186}\text{Re}(\text{CO})_3$ -DTPAを挙げることができる。

20

【0074】

上記のように、本発明に使用される治療剤は、ナノ粒子に包埋するか、ナノ粒子に封入するか、またはナノ粒子に係留するなどの様々な方法でナノ粒子に結合させることができる。治療剤の充填は、例えば、以下の参考文献：*de Villiers, M. Mら、Eds., Nanotechnology in Drug Delivery, Springer (2009)*；*Gregoriadis, G., Ed., Liposome Technology: Entrapment of drugs and other materials into liposomes, CRC Press (2006)*に開示されている当技術分野において公知の様々な方法によって行うことができる。一実施形態群では、1つまたは複数の治療剤をリポソームに充填することができる。リポソームの充填は、例えば、能動的または受動的に行うことができる。例えば、治療剤がリポソーム内に封入されるように、溶液中でのリポソームの自己組織化プロセスの間に治療剤を含めることができる。ある特定の実施形態では、治療剤は、リポソーム二重層に、または多重膜リポソームの複数の層内に包埋することもできる。代替の実施形態では、治療剤は、リポソームに能動的に充填することができる。例えば、治療剤を含有する溶液に対して二重層膜を透過性にするような条件（例えば、エレクトロポレーション）にリポソームを曝露し、それにより、治療剤がリポソームの内部体積に入ることができる。

30

40

診断剤

【0075】

本発明に使用される診断剤は、例えば、以下の参考文献：*Armstrongら、Diagnostic Imaging, 5th Ed., Blackwell Publishing (2004)*；*Torchilin, V. P., Ed., Targeted Delivery of Imaging Agents, CRC Press (1995)*；*Vallabhajosula, S., Molecular Imaging: Ra*

50

diopharmaceuticals for PET and SPECT, Springer (2009) に示されている当技術分野において公知の任意の診断剤を挙げることができる。ある特定の実施形態では、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 および R^6 は、独立して、診断剤であるように選択することができる。診断剤は、限定されないが、放射シグナル、放射性シグナル、エコー源性シグナル、光学シグナル、蛍光シグナル、吸収シグナル、磁気シグナル、または断層撮影シグナルを含む検出可能なシグナルを提供および/または増強する薬剤を含む様々な方法によって検出することができる。診断剤をイメージングするための技術としては、限定されないが、単光子放出コンピュータ断層撮影 (SPECT)、磁気共鳴イメージング (MRI)、光学的イメージング、ポジトロン放出断層撮影 (PET)、コンピュータ断層撮影 (CT)、X線イメージング、および 線イメージングなどを挙げることができる。

10

【0076】

いくつかの実施形態では、診断剤は、例えば、様々な画像診断技術に使用される金属イオンに結合するキレーターを含むことができる。例示的なキレーターとしては、限定されないが、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、[4-(1,4,8,11-テトラアザシクロデカ-1-イル)メチル]安息香酸 (CPTA)、シクロヘキサンジアミン四酢酸 (CDTA)、エチレンビス(オキシエチレンニトリロ)四酢酸 (EGTA)、ジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA)、クエン酸、ヒドロキシエチルエチレンジアミン三酢酸 (HEDTA)、イミノ二酢酸 (IDA)、トリエチレントetraアミン六酢酸 (TTHA)、1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-テトラ(メチレンホスホン酸) (DOTP)、1,4,8,11-テトラアザシクロドデカン-1,4,8,11-四酢酸 (TETA)、1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-四酢酸 (DOTA)、およびこれらの誘導体が挙げられる。

20

【0077】

放射性同位体は、本明細書において記載される診断剤のいくつかに組み込むことができ、放射性同位体としては、線、ポジトロン、粒子および 粒子、ならびにX線を放出する放射性核種を挙げることができる。適切な放射性核種としては、限定されないが、 ^{225}Ac 、 ^{211}As 、 ^{211}At 、 ^{11}B 、 ^{128}Ba 、 ^{212}Bi 、 ^{75}Br 、 ^{77}Br 、 ^{14}C 、 ^{109}Cd 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{18}F 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^3H 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{130}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 、 ^{177}Lu 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{212}Pb 、 ^{103}Pd 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{47}Sc 、 ^{153}Sm 、 ^{89}Sr 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{88}Y および ^{90}Y が挙げられる。ある特定の実施形態では、放射性作用物質としては、 ^{111}In -DTPA、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (CO) $_3$ -DTPA、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (CO) $_3$ -ENPy 2、 $^{62}/^{64}/^{67}\text{Cu}$ -TETA、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (CO) $_3$ -IDA、および $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (CO) $_3$ トリアミン (環状または直鎖状) を挙げることができる。他の実施形態では、作用物質としては、 ^{111}In 、 ^{177}Lu 、 ^{153}Sm 、 $^{88}/^{90}\text{Y}$ 、 $^{62}/^{64}/^{67}\text{Cu}$ 、または $^{67}/^{68}\text{Ga}$ を含む DOTA およびその種々の類似体を挙げることができる。いくつかの実施形態では、リポソームは、例えば、以下の参考文献: Phillips ら、Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, 1(1): 69-83 (2008); Torchilin, V. P. & Weissig, V., Eds. Liposomes 2nd Ed.: Oxford Univ. Press (2003); Elbayoumi, T. A. & Torchilin, V. P., Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 33: 1196- (2006); Mougin-Degraef, M ら、Int'l J. Pharmaceutics 344: 110-117 (2007) に示されているようなキレートに結合した脂質、例えば DTPA-脂質を組み込むことによって放射標識することができる。

30

40

【0078】

他の実施形態では、診断剤としては、光学剤、例えば、蛍光剤、リン光剤、および化学

50

発光剤などを挙げることができる。多数の剤（例えば、色素、プローブ、標識、または指示薬）が当技術分野において公知であり、本発明に使用することができる。（例えば、Invitrogen, The Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Tenth Edition (2005)を参照のこと）。蛍光剤としては、様々な有機および/もしくは無機の低分子、または様々な蛍光タンパク質、およびこれらの誘導体を挙げることができる。例えば、蛍光剤としては、限定されないが、シアニン、フタロシアニン、ポルフィリン、インドシアニン、ローダミン、フェノキサジン、フェニルキサンテン、フェノチアジン、フェノセレンナジン、フルオレセイン、ベンゾポルフィリン、スクアライン、ジピロロピリミドン、テトラセン、キノリン、ピラジン、コリン、クロコニウム、アクリドン、フェナントリジン、ローダミン、アクリジン、アントラキノ、カルコゲノピリリウム類似体、クロリン、ナフタロシアニン、メチン色素、インドレニウム色素、アゾ化合物、アズレン、アザアズレン、トリフェニルメタン色素、インドール、ベンゾインドール、インドカルボシアニン、ベンゾインドカルボシアニン、および4,4'-ジフルオロ-4'-ボラ-3a,4a'-ジアザ-s'-インダセンの一般構造を有するBODIPY（商標）誘導体、ならびに/またはこれらの任意のコンジュゲートおよび/もしくは誘導体を挙げることができる。使用され得る他の剤としては、限定されないが、例えば、フルオレセイン、フルオレセイン-ポリアスパラギン酸コンジュゲート、フルオレセイン-ポリグルタミン酸コンジュゲート、フルオレセイン-ポリアルギニンコンジュゲート、インドシアニングリーン、インドシアニン-ドデカアスパラギン酸コンジュゲート、インドシアニン-ポリアスパラギン酸コンジュゲート、イソスルファンブルー、インドールジスルホネート、ベンゾインドールジスルホネート、ビス（エチルカルボキシメチル）インドシアニン、ビス（ペンチルカルボキシメチル）インドシアニン、ポリヒドロキシインドールスルホネート、ポリヒドロキシベンゾインドールスルホネート、リジッドヘテロ原子インドールスルホネート（rigid heteroatomic indole sulfonate）、インドシアニンビスプロパン酸、インドシアニンビスヘキササン酸、3,6-ジシアノ-2,5-[（N,N,N',N'-テトラキス（カルボキシメチル）アミノ）ピラジン、3,6-[（N,N,N',N'-テトラキス（2-ヒドロキシエチル）アミノ）ピラジン-2,5-ジカルボン酸、3,6-ビス（N-アザテジノ）ピラジン-2,5-ジカルボン酸、3,6-ビス（N-モルホリノ）ピラジン-2,5-ジカルボン酸、3,6-ビス（N-ピペラジノ）ピラジン-2,5-ジカルボン酸、3,6-ビス（N-チオモルホリノ）ピラジン-2,5-ジカルボン酸、3,6-ビス（N-チオモルホリノ）ピラジン-2,5-ジカルボン酸S-オキシド、2,5-ジシアノ-3,6-ビス（N-チオモルホリノ）ピラジンS,S-ジオキシド、インドカルボシアニンテトラスルホネート、クロロインドカルボシアニン、および3,6-ジアミノピラジン-2,5-ジカルボン酸が挙げられる。

【0079】

当業者であれば、使用される特定の光学剤が、励起に使用される波長、皮膚組織下の深さ、当技術分野において一般に周知の他の要因に依存し得ることを認識する。例えば、光学剤についての最適な吸収極大または、励起極大は、使用される剤に応じて変化し得るが、一般に、本発明の光学剤は、電磁スペクトルの紫外（UV）、可視、または赤外（IR）範囲の光を吸収するか、またはこれらの光によって励起される。イメージングについては、近IRで吸収および放出する色素（約700～900nm、例えば、インドシアニン）が好ましい。内視鏡的方法を使用する局所視覚化については、可視範囲で吸収する任意の色素が適切である。

【0080】

いくつかの実施形態では、本発明のプロセスにおいて使用される非イオン化放射線は、約350nm～約1200nmの波長の範囲であり得る。例示的な一実施形態では、蛍光剤は、電磁スペクトルの可視部分の青色範囲の波長（約430nm～約500nm）を有する光によって励起することができ、電磁スペクトルの可視部分の緑色範囲の波長（約5

10

20

30

40

50

20 nm ~ 約 565 nm) で発光する。例えば、フルオレセイン色素は、約 488 nm の波長を有する光で励起することができ、約 520 nm の発光波長を有する。別の例として、3, 6 - ジアミノピラジン - 2, 5 - ジカルボン酸は、約 470 nm の波長を有する光で励起することができ、約 532 nm の波長で蛍光を発する。別の実施形態では、光学剤の励起波長および発光波長は、電磁スペクトルの近赤外範囲に入り得る。例えば、インドシアニングリーンなどのインドシアニン色素は、約 780 nm の波長を有する光で励起することができ、約 830 nm の発光波長を有する。

【0081】

さらに他の実施形態では、診断剤は、限定されないが、例えば、ヨウ素系 X 線造影剤、超常磁性酸化鉄 (SPIO)、およびガドリニウムまたはマンガンの錯体などを含む当技術分野において一般に周知の磁気共鳴 (MR) 造影剤および X 線造影剤を含むことができる。(例えば、Armstrongら、Diagnostic Imaging, 5th Ed., Blackwell Publishing (2004) を参照のこと)。いくつかの実施形態では、診断剤は、磁気共鳴 (MR) イメージング剤を含むことができる。例示的な磁気共鳴剤としては、限定されないが、常磁性剤、および超常磁性剤などが挙げられる。例示的な常磁性剤としては、限定されないが、ガドペンテト酸、ガドテル酸、ガドジアミド、ガドリニウム、ガドテリドール、マンガホジビル、ガドベルセタミド、クエン酸第二鉄アンモニウム、ガドペン酸、ガドブトロール、またはガドキセト酸を挙げることができる。超常磁性剤としては、限定されないが、超常磁性酸化鉄およびフェリステンを挙げることができる。ある特定の実施形態では、診断剤は、例えば、以下の参考文献：H. S. Thomsen, R. N. Muller and R. F. Mattrey, Eds., Trends in Contrast Media, (Berlin: Springer-Verlag, 1999); P. Dawson, D. Cosgrove and R. Grainger, Eds., Textbook of Contrast Media (ISIS Medical Media 1999); Torchilin, V. P., Curr. Pharm. Biotech. 1: 183 - 215 (2000); Bogdanov, A. A., Adv. Drug Del. Rev. 37: 279 - 293 (1999); Sachse, A., Investigative Radiology 32 (1): 44 - 50 (1997) に示されている X 線造影剤を挙げるができる。X 線造影剤の例としては、限定されないが、イオパミドール、イオメブロール、イオヘキソール、イオペントール、イオプロミド、イオシミド、イオベルソール、イオトロラン、イオタスル、イオジキサノール、イオデシモール、イオグルカミド、イオグルニド、イオグラミド、イオサルコール、イオキシラン、イオパミロン、メトリザミド、イオビトリドール、およびイオシメノールが挙げられる。ある特定の実施形態では、X 線造影剤としては、イオパミドール、イオメブロール、イオプロミド、イオヘキソール、イオペントール、イオベルソール、イオビトリドール、イオジキサノール、イオトロラン、およびイオシメノールを挙げることができる。

【0082】

上記治療剤と同様に、診断剤は、例えば、ナノ粒子に包埋され、ナノ粒子に封入され、またはナノ粒子に係留される工程を含む様々な方法でナノ粒子に結合させることができる。同様に、診断剤の充填は、例えば、以下の参考文献：de Villiers, M. M. 等、Eds., Nanotechnology in Drug Delivery, Springer (2009); Gregoriadis, G., Ed., Liposome Technology: Entrapment of drugs and other materials into liposomes, CRC Press (2006) に開示されている当技術分野において公知の様々な方法によって行うことができる。

標的化剤

【0083】

いくつかの実施形態では、本発明のホスホン酸コンジュゲートは、少なくとも 1 つの標

的化剤も含むことができる。例えば、ある特定の実施形態では、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 および R^6 は、独立して、標的化剤であるように選択することができる。一般に、本発明の標的化剤は、器官、組織、細胞、細胞外マトリックス、または細胞内領域に関連した標的などの、対象とする任意の標的に結合することができる。ある特定の実施形態では、標的は、がん状態などの特定の疾患状態に関連し得る。あるいは、標的化剤は、例えば、細胞、組織、および/または被験体の特定の疾患および/または特定の状態を示す標的を有することができる1つまたは複数の特定の種類の細胞を標的にすることができる。いくつかの実施形態では、標的化剤は、受容体などの唯一の標的に特異的であり得る。適切な標的としては、限定されないが、DNA、RNAなどの核酸、またはこれらの改変誘導体を挙げるることができる。適切な標的としては、限定されないが、タンパク質、例えば、細胞外タンパク質、受容体、細胞表面受容体、腫瘍マーカー、膜貫通タンパク質、酵素、または抗体も挙げるることができる。適切な標的としては、例えば、細胞表面に存在し得る単糖、二糖、または多糖などの炭水化物を挙げるることができる。ある特定の実施形態では、適切な標的としては、MUC-1およびMUC-4などのムチン、EGFRなどの増殖因子受容体、クローディン4、ヌクレオリンなどの核小体リンタンパク質、CCR7などのケモカイン受容体、ソマトスタチン受容体4、ErB-B2（赤芽球性白血病発がん遺伝子相同体2）受容体、CD44受容体、ならびにVEGF受容体-2キナーゼなどの受容体を挙げるることができる。

10

【0084】

ある特定の実施形態では、標的化剤としては、標的リガンドの低分子模倣体（例えば、ペプチド模倣リガンド）、標的リガンド（例えば、RGDペプチド含有ペプチド、もしくは葉酸アミド）、または特定の標的に特異的な抗体もしくは抗体断片を挙げるることができる。いくつかの実施形態では、標的化剤としては、葉酸誘導体、B-12誘導体、インテグリンRGDペプチド、NGR誘導体、およびソマトスタチン受容体に結合するソマトスタチン誘導体またはペプチド、例えば、オクトレオチドおよびオクトレオテートなどをさらに挙げるることができる。

20

【0085】

本発明の標的化剤としては、アプタマーも挙げるることができる。アプタマーは、対象とする標的に結合する（associate）または結合する（bind）ように設計することができる。アプタマーは、例えば、DNA、RNA、および/またはペプチドから構成され得、アプタマーの特定の側面は、当技術分野において周知である。（例えば、Klusman, S., Ed., The Aptamer Handbook, Wiley-VCH (2006); Nissenbaum, E.T., Trends in Biotech. 26 (8): 442-449 (2008)を参照のこと）。本発明では、適切なアプタマーは、直鎖状であっても、環化されていてもよく、約150塩基未満（すなわち、約150mer未満）を有するオリゴヌクレオチドを含むことができる。アプタマーは、約100塩基～約150塩基または約80塩基～約120塩基の長さの範囲であり得る。ある特定の実施形態では、アプタマーは、約12塩基～約40塩基、約12塩基～約25塩基、約18塩基～約30塩基、または約15塩基～約50塩基の範囲であり得る。アプタマーは、適切な標的（これは疾患状態で存在または発現しており、限定されないが、本明細書において言及される標的部位を含む）とともに使用するために開発することができる。

30

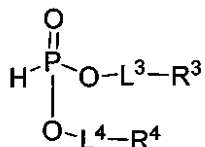
40

IV. ホスホン酸コンジュゲートおよび結合成分を調製する方法

【0086】

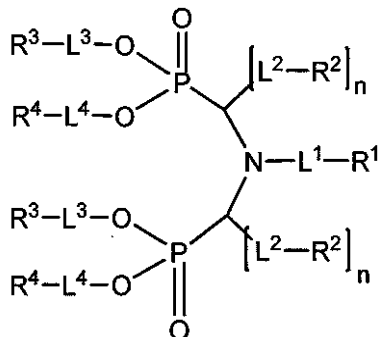
ホスホン酸コンジュゲートは、様々な方法で生成することができる。一態様では、本発明は、ホスホン酸コンジュゲートを調製する方法であって、式： $H_2N(L^1)-(R^1)$ を有する第一アミン化合物、式： $O=C[(L^2)-(R^2)]_n$ を有するカルボニル化合物、および式：

【化 1 5】



を有する H - ホスホン酸化合物を、式：

【化 1 6】



10

(式中、 L^1 、 L^2 、 L^3 および L^4 はそれぞれ、独立して、結合および連結基からなる群より選択され； R^1 は、ナノ粒子、結合成分、標的化剤、診断剤、ステルス剤および四脚型提示成分からなる群より選択され； R^2 はそれぞれ、独立して、ステルス剤、 $\text{C}_1 - \text{C}_{10}$ アルキル、カルボン酸またはカルボン酸エステル、ホスホン酸またはホスホン酸エステル、スルホン酸またはスルホン酸エステル、およびヒドロキシからなる群より選択され； R^3 および R^4 はそれぞれ、独立して、H、結合成分、標的化剤、診断剤およびステルス剤からなる群より選択され、ここで、 R^3 または R^4 の少なくとも1つは、H以外であり； n は、0 ~ 2 の整数であり、 n が0または1である場合、該カルボニル化合物はアルデヒドである)を有するホスホン酸コンジュゲートを形成するのに十分な条件下で結合させる工程を含む方法を含む。

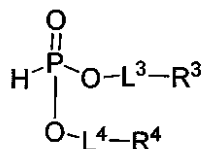
20

【0087】

別の態様では、本発明は、ホスホン酸コンジュゲートを調製する方法を含む。上記方法は、式： $\text{HN}[(\text{L}^1) - (\text{R}^1)](\text{R}^9)$ を有する第二アミン化合物、式： $\text{O} = \text{C}[(\text{L}^2) - (\text{R}^2)]_n$ を有するカルボニル化合物、および式：

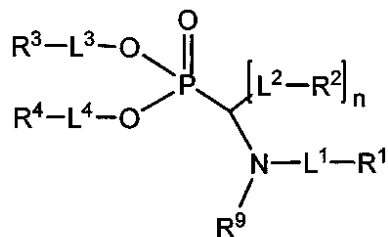
30

【化 1 7】



を有する H - ホスホン酸化合物を、式：

【化 1 8】



40

(式中、 L^1 、 L^2 、 L^3 および L^4 はそれぞれ、独立して、結合および連結基からなる群より選択され； R^1 は、ナノ粒子、結合成分、標的化剤、診断剤およびステルス剤からなる群より選択され； R^2 は、独立して、ステルス剤、 $\text{C}_1 - \text{C}_{10}$ アルキル、カルボン

50

酸またはカルボン酸エステル、ホスホン酸またはホスホン酸エステル、スルホン酸またはスルホン酸エステル、およびヒドロキシからなる群より選択され； R^3 および R^4 はそれぞれ、独立して、H、結合成分、標的化剤、診断剤およびステルス剤からなる群より選択され、ここで、 R^3 または R^4 の少なくとも1つは、H以外であり； R^9 は、 $C_1 - C_{10}$ アルキル基からなる群より選択され； n は、0～2の整数であり、 n が0である場合、該カルボニル化合物はホルムアルデヒドである）を有するホスホン酸コンジュゲートを形成するのに十分な条件下で結合させる工程を含む。

【0088】

一般に、ホスホン酸コンジュゲートを作製するのに使用される反応は、H - ホスホン酸化合物、カルボニル化合物、および第一アミン化合物または第二アミン化合物を含む。合成では、これらの化合物を任意の順序で結合させて、最終ホスホン酸コンジュゲートを得ることができる。例えば、いくつかの実施形態では、第一アミン化合物または第二アミン化合物およびカルボニル化合物を結合させて中間化合物を形成してから、H - ホスホン酸化合物と結合させて、最終ホスホン酸コンジュゲートを形成することができる。他の実施形態では、H - ホスホン酸化合物をカルボニル化合物と結合させて中間化合物を形成してから、第一アミン化合物または第二アミン化合物と結合させて、最終ホスホン酸コンジュゲートを形成することができる。ある特定の実施形態では、必要な化合物を1回の反応で一緒に結合させて、最終ホスホン酸コンジュゲートを生成することができる。ある特定のコンジュゲートの場合、H - ホスホン酸化合物、カルボニル化合物および第一アミン化合物の比は、2 : 2 : 1であり得る。他のコンジュゲートの場合、H - ホスホン酸化合物、カルボニル化合物および第二アミン化合物の比は、1 : 1 : 1であり得る。異なる化合物の比は、特定の反応条件および所望のホスホン酸コンジュゲートに依存する。

【0089】

本明細書において提供されるように、H - ホスホン酸化合物、第一アミン化合物または第二アミン化合物、およびカルボニル化合物を含む反応を使用して、結合成分、標的化剤、診断剤、治療剤、ステルス剤またはこれらの組み合わせを含むことができる多種多様な化合物を生成することができる。例えば、図1および図2に示されているように、H - ホスホン酸化合物、カルボニル化合物および第一アミン化合物を2 : 2 : 1の比で結合させて、本発明のホスホン酸コンジュゲートを形成することができる。図1に示されているように、ホスホン酸コンジュゲートは、 $PEG_{100} \sim PEG_{10000}$ の範囲のPEG基として R^1 を含むことができる。 R^3 および R^4 はまた、例えば、リボソームの二重層膜への結合を容易にするように、 $C_1 - C_{20}$ アルキル基から選択することができる。この特定の例では、 n は0であり、そしてこの場合にカルボニル化合物は、ホルムアルデヒドである。同様に、図2に示されているように、カルボニル化合物は、 n を1としておよび R^2 をメチル基として有することができ、これにより、図1においてホスホン酸コンジュゲートの構造を変化させる。当業者であれば、本明細書において開示されるホスホン酸コンジュゲートの範囲を生成するのに使用され得る様々な可能な組み合わせを認識する。

【0090】

いくつかの実施形態では、ホスホン酸コンジュゲートは、例えば、ナノ粒子表面から伸長することができる提示アセンブリ (presentation assembly) を提供するように生成することができる。図3に示されているように、脂質分子は、第一アミン、および R^7 および R^8 (これは、例えば $C_1 - C_{20}$ アルキル基であり得る) を含むことができる。この例では、 n は0であり、 L^3 および L^4 は、結合、または短いアルキレン基 (例えば、 $C_1 - C_6$)、または所望の間隔もしくは特定用途に望ましい他の特性を可能にする他の連結基であり得る。示されているように、脂質分子をH - ホスホン酸化合物およびホルムアルデヒドとそれぞれ1 : 2 : 2の比で結合させて、 R^3 および R^4 の四脚型アセンブリ (tetrapodal assembly) を表わすホスホン酸コンジュゲートを形成することができる。

【0091】

ある特定の実施形態では、これらの化合物を作製する方法は、ナノ粒子と組み合わせて

、出発材料の1つ（例えば、H - ホスホン酸化合物）をナノ粒子に結合させる一方で、ホスホン酸コンジュゲートの合成を可能にすることができる。図4の例に示されているように、脂質二重層膜における2つの隣接するH - ホスホン酸化合物を2当量のカルボニル化合物 $O = C [(L^2) - (R^2)]_n$ および1当量の第一アミン化合物 $H_2N (L^1) - (R^1)$ と結合させて、本発明のホスホン酸コンジュゲートをナノ粒子表面に生成することができる。例えば、図4に示されているように、 R^3 および R^4 は、リポソームの脂質二重層に包埋されている結合成分、例えば $C_1 - C_{20}$ アルキル基であり得る。次いで、H - ホスホン酸化合物を有する調製したリポソームを第一アミン化合物（これは、例えば、 $PEG_{100} \sim PEG_{10000}$ の範囲のPEGなどのステルス剤を含む）と結合させることができる。カルボニル化合物を含むヒドロホスホニル化反応の後、ステルス剤がリポソーム表面にディスプレイされることにより、リポソームをステルスリポソームに変換することができる。

10

20

30

40

50

【0092】

図5に示されているように、同様の方策を使用して、ナノ粒子表面から伸長する提示アセンブリを生成することができる。脂質分子としては、表面から伸長する第一アミンおよび、例えば脂質二重層に包埋される $C_1 - C_{20}$ アルキル基であり得る、 R^7 および R^8 を含むことができる。2当量のH - ホスホン酸化合物およびホルムアルデヒドを結合させる場合、ヒドロホスホニル化反応は、2つのH - ホスホン酸化合物間に橋架けを形成し、さらには R^5 および R^6 をリポソーム表面に提示することができる（この場合、 R^5 および R^6 は、 $PEG_{100} \sim PEG_{10000}$ の範囲のPEGなどのステルス剤であり得る）。上により詳細に記載したように、連結基 L^1 、 L^2 、および L^3 は、独立して、所望の間隔もしくは特定用途に望ましい他の特性を可能にするように、連結基または結合として選択することができる。当業者であれば、本発明のホスホン酸コンジュゲートをナノ粒子表面に生成するのに使用され得る様々な合成方法を認識する。

【0093】

当業者によって認識されるように、本明細書において記載される合成反応スキームの出発材料および中間体は、所望により、従来の技術（限定されないが、ろ過、蒸留、結晶化、およびクロマトグラフィーなどが挙げられる）を使用して単離および精製することができる。このような材料は、物理定数およびスペクトルデータを含む従来の手段を使用して特性決定することができる。特に反対の指示がない限り、本明細書において記載される反応は、約 - 78 °C ~ 約 150 °C または約 0 °C ~ 約 125 °C の反応温度範囲、いくつかの実施形態では約室温（または周囲温度）、例えば約 20 °C で、大気圧の不活性雰囲気下で行うことができる。本明細書において記載される反応は様々な溶媒中で行うことができ、これらは、本明細書において記載される中間生成物または最終生成物を生成するのに使用される特定の反応に依存し得る。いくつかの実施形態では、反応溶媒としては、非プロトン性溶媒（例えば、THFまたはエーテル）などの有機溶媒を挙げることができる。ある特定の実施形態では、反応溶媒は水性溶媒であり得、さらなる緩衝剤、塩、および添加物などを含むことができる。本明細書において記載されるある特定の反応は、例えば、本明細書において記載されるある特定の化合物を精製するための還流条件を含むことができる。

【0094】

ヒドロホスホニル化反応は、本発明のホスホン酸コンジュゲートをナノ粒子上に生成するのにいくつかの利点を提供するが、他の方法を使用して該化合物を作製することができる。例えば、H - ホスホン酸化合物、第一アミン化合物および第二アミン化合物、ならびにカルボニル化合物と一緒に反応させて、本発明のホスホン酸コンジュゲートを形成することができる。続いて、ホスホン酸コンジュゲートをナノ粒子に結合させることができる。いくつかの実施形態では、標準的な方法（例えば、押し出し）を使用して最初にリポソームを生成し、続いて、ホスホン酸コンジュゲートをリポソームに結合させることによって、ホスホン酸コンジュゲートをリポソームへと組み込むことができる。他の実施形態では、リポソームの形成中に、例えば、ホスホン酸コンジュゲートおよび脂質成分と一緒に乾燥し、次いで混合物を水溶液に再懸濁して、二重層に結合したホスホン酸コンジュゲ

トを有するリボソームを形成することによって、ホスホン酸コンジュゲートをリボソーム二重層へと組み込むことができる。

【0095】

他の合成手順を使用して、ホスホン酸コンジュゲートを生成することができることも意図される。例えば、図1に示されているように R^1 および L^1 を含む第一アミン化合物を、 R^3 および R^4 を含有しないH-ホスホネートと反応させることができる。このような実施形態では、 L^3 および L^4 は、 R^3 および/または R^4 （例えば、標的化剤、ステルス剤または診断剤を挙げることができる）への結合のための官能基を含む連結基であり得る。したがって、 R^3 および/または R^4 を L^3 および L^4 の官能基と反応させて、最終ホスホン酸コンジュゲートを生成することができる。当業者であれば、本発明のホスホン酸コンジュゲートを生成するための他の可能な合成順序がいくつかあることを認識する。例えば、 R^3 および R^4 は同じものでもよく、したがって例えば、 R^3 および R^4 がそれぞれ標的化剤である場合、 L^3 および L^4 はそれぞれ、標的化剤と反応して本発明のホスホン酸コンジュゲートを生成することができる官能基を含有することができる。

10

ナノ粒子

【0096】

本明細書において提供されるように、本発明は、当技術分野において一般に公知の様々な方法によって生成することができるナノ粒子の使用を含み、このようなナノ粒子を作製する方法は、所望される特定のナノ粒子に依存し得る。当技術分野において利用可能な任意の測定技術を使用して、標的化送達組成物およびナノ粒子の特性を決定することができる。例えば、動的光散乱、X線光電子顕微鏡法、粉末X線回折、走査電子顕微鏡法（SEM）、透過型電子顕微鏡法（TEM）、および原子間力顕微鏡法（AFM）などの技術を使用して、ナノ粒子および/または標的化送達組成物の平均サイズおよび分散度を決定することができる。

20

【0097】

本発明に使用されるリボソームは、当技術分野において一般に周知の様々な技術を使用して作製することができる。（例えば、Williams, A. P., *Liposomes: A Practical Approach*, 2nd Edition, Oxford Univ. Press (2003); Lasic, D. D., *Liposomes in Gene Delivery*, CRC Press LLC (1997)を参照のこと）。例えば、リボソームは、限定されないが、例えば、押し出し、攪拌、超音波処理、逆相蒸発、水溶液中の自己組織化、電極ベースの形成技術、およびマイクロフルイディック指向型形成技術（microfluidic directed formation techniques）などの技術によって生成することができる。ある特定の実施形態では、大単層ベシクル（LUV）および/または小単層ベシクル（SUV）を含むことができる、多層および/または単層であるリボソームを生成するための方法を使用することができる。溶液中のリボソームの自己組織化と同様に、ミセルは、両親媒性分子が、ミセルを形成するのに十分な溶液条件下で溶解される場合にミセルを形成するように、当技術分野において一般に周知の技術を使用して生成することができる。脂質コーティングバブルおよびリボタンパク質も、当技術分野において公知の方法を使用して構築することができる（例えば、Farook, U., J. R. Soc. Interface, 6(32): 271-277 (2009); Lackoら、Lipoprotein Nanoparticles as Delivery Vehicles for Anti-Cancer Agents in Nanotechnology for Cancer Therapy, CRC Press (2007)を参照のこと）。

30

40

【0098】

本発明に使用され得るポリマーナノ粒子を作製する方法は、当技術分野において一般に周知である（例えば、Sigmund, Wら、Eds., *Particulate Systems in Nano- and Biotechnologies*, CRC Press LLC (2009); Karnikら、Nano Lett., 8(9): 29

50

06-2912(2008)を参照のこと)。例えば、ブロックコポリマーが溶液中で自己組織化してポリマーソームおよび/またはブロックコポリマーミセルを形成することができるように、当技術分野において公知の合成方法を使用して、ブロックコポリマーを作製することができる。ニオソームは、当技術分野において公知であり、様々な技術および組成物を使用して作製することができる(Baillie A. Jら、J. Pharm. Pharmacol., 38:502-505(1988))。磁性粒子および/または金属粒子は、当技術分野において公知の任意の方法、例えば、共沈、熱分解、およびマイクロエマルジョンを使用して構築することができる。(Nagarajan, R. & Hattton, T. A., Eds., Nanoparticles Synthesis, Stabilization, Passivation, and Functionalization, Oxford Univ. Press(2008)も参照のこと)。金粒子およびこれらの誘導体は、当技術分野において一般に公知の様々な技術、例えば、Turkevich法、Brust法、Perraut法、またはソノリシスを使用して作製することができる(Grzelczakら、Chem. Soc. Rev., 37:1783-1791(2008)も参照のこと)。いくつかの実施形態では、結合成分は、硫黄-金係留化学反応によって結合させることができる。量子ドットまたは半導体ナノ結晶は、コロイド合成技術などの当技術分野において公知の任意の方法を使用して合成することができる。一般に、量子ドットは、セレン化カドミウム、硫化カドミウム、ヒ化インジウム、およびリン化インジウムなどを含む半導体材料などの様々な材料から構成され得る。

他の結合成分

【0099】

本明細書において記載されるように、本発明のホスホン酸コンジュゲートは、標的化剤、ステルス剤、診断剤、治療剤および結合成分などの成分を含むことができる。当業者であれば、ホスホン酸コンジュゲートに含まれる種々の成分の組み合わせを生成するのに使用され得る一般に周知の標準的な技術を認識する。例えば、結合成分に関して上に記載したように、標的化剤、ステルス剤、診断剤、治療剤は、共有結合および/または非共有結合を介して、本発明のホスホン酸コンジュゲートに結合させることができる。

【0100】

標的化剤に関して、ある特定の実施形態では、標的化剤は、アプタマーを含むことができる。特定の標的用のアプタマーを、当技術分野において公知の技術、例えば、限定されないが、SELEX(商標)(指数関数的富化によるリガンドの系統的進化)もしくはMonoLex(商標)技術(AptaRes AGの1ラウンドのアプタマー単離手順)などのin vitro選択法、in vivo選択法、またはこれらの組み合わせを使用して同定することができる。(例えば、Ellington, A. D. & Szostak, J. W., Nature 346(6287):818-22; Bockら、Nature 355(6360):564-6(1992)を参照のこと)。いくつかの実施形態では、本明細書において開示されるように、上記方法を使用して、対象とする特定の標的部位に結合させるのに使用され得る特定のDNA配列またはRNA配列を同定することができる。特定のアプタマーの配列が一旦同定されたら、ホスホロアミダイト合成などの当技術分野において公知の様々な方法でアプタマーを構築することができる。ペプチドアプタマーについては、様々な同定技術および製造技術を使用することができる(例えば、Colas, P., J. Biol. 7:2(2008); Woodman, Rら、J. Mol. Biol. 352(5):1118-33(2005)を参照のこと)。

【0101】

様々な方法によって、アプタマーをH-ホスホン酸化合物、第一アミン化合物および第二アミン化合物、ならびにカルボニル化合物に結合させることができる。例えば、H-ホスホン酸化合物および/または第一アミン化合物もしくは第二アミン化合物における連結基をアプタマーの3'末端または5'末端と反応させることができる。代替の実施形態では、1つの核酸をH-ホスホン酸化合物および第一アミン化合物もしくは第二アミン化合物における連結基に同時に付加することによって、アプタマーを連続合成することができ

る。当業者であれば、アプタマーを本発明のホスホン酸コンジュゲートに含めるのに使用され得る周知の技術を認識する。

V. 標的化送達組成物を投与する方法

【0102】

本発明はまた、ホスホン酸コンジュゲートを含む標的化送達組成物を含む。一態様では、本発明は、本明細書において記載されるホスホン酸コンジュゲートを含む標的化送達組成物であって、 R^3 および R^4 がそれぞれ、ナノ粒子に結合した結合成分であり、 R^1 が標的化剤、診断剤およびステルス剤から選択される標的化送達組成物を含む。上により詳細に記載したように、結合成分は、いくつかの方法でナノ粒子に結合することができ、例えば、結合成分は、リポソームの二重層と結合する脂質であり得る。ある特定の実施形態では、標的化送達組成物はリポソームを含むことができ、 R^3 および R^4 はそれぞれリポソームの二重層に結合され得、独立して、脂質またはコレステロールであり得る。他の実施形態では、ホスホン酸コンジュゲートの R^1 は、ナノ粒子、またはナノ粒子に結合した結合成分であり得、 R^3 および R^4 はそれぞれ、標的化剤、診断剤またはステルス剤であり得る。

10

【0103】

本発明の標的化送達組成物および方法は、被験体に関連する任意の疾患、障害、および/または状態を処置および/または診断するのに使用することができる。一実施形態では、本発明の方法は、被験体におけるがん状態を処置または診断するための方法であって、ナノ粒子に結合した本発明のホスホン酸コンジュゲートを含む標的化送達組成物であって、該状態を処置または診断するのに十分な治療剤または診断剤も含み、 R^1 、 R^3 および R^4 の少なくとも1つが標的化剤である標的化送達組成物を該被験体に投与する工程を含む方法を含む。ある特定の実施形態では、がん状態としては、本発明の標的化送達組成物の標的化剤が標的とする受容体を十分に発現する（例えば、細胞表面に、または血管系に）がんを挙げることができる。

20

【0104】

別の実施形態では、本発明の方法は、標的化治療処置についての被験体の適性を判定する方法であって、本明細書において記載されるナノ粒子およびホスホン酸コンジュゲートを含む標的化送達組成物であって、該ホスホン酸コンジュゲートまたはナノ粒子が診断剤を含む標的化送達組成物を該被験体に投与する工程、および該被験体をイメージングして該診断剤を検出する工程を含み、 R^1 、 R^3 および R^4 の少なくとも1つが標的化剤である方法を含む。

30

投与

【0105】

いくつかの実施形態では、本発明は、標的化送達組成物および生理学的に（すなわち、薬学的に）許容され得るキャリアを含むことができる。本明細書において使用される場合、用語「キャリア」は、治療剤などの薬物のための希釈剤またはビヒクルとして使用される典型的には不活性の物質を指す。この用語は、組成物に粘着性の品質を付与する典型的には不活性の物質も包含する。典型的には、生理学的に許容され得るキャリアは、液体形態で存在する。液体キャリアの例としては、生理食塩水、リン酸塩緩衝液、通常の緩衝食塩水（135～150 mMのNaCl）、水、緩衝水、0.4%食塩水、0.3%グリシン、および安定性を増強するための糖タンパク質（例えば、アルブミン、リボタンパク質、グロブリンなど）などが挙げられる。生理学的に許容され得るキャリアは、投与される特定の組成物によって、ならびに組成物を投与するのに使用される特定の方法によって部分的には決定されるので、本発明の医薬組成物の多種多様な適切な製剤が存在する（例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st edition, 2005を参照のこと）。

40

【0106】

本発明の組成物は、慣例的な周知の滅菌技術によって滅菌してもよいし、滅菌条件下で生成してもよい。水溶液は、使用のためにパッケージされ得るか、または無菌条件下でろ

50

過し、凍結乾燥することができ、その凍結乾燥調製物は、投与前に滅菌水溶液と合わされる。組成物は、生理的条件に近づけるために、必要に応じて薬学的に許容され得る補助物質、例えば、pH調整剤および緩衝剤、張度調整剤、および湿潤剤など、例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、モノラウリン酸ソルビタン、およびオレイン酸トリエタノールアミンを含有することができる。糖（例えば、凍結乾燥標的化送達組成物のための安定剤）も、組成物を安定化させるために含めることができる。

【0107】

選択された標的化送達組成物は、単独でまたは他の適切な成分と組み合わせて、吸入を介して投与されるエアロゾル製剤（すなわち、これらは、「噴霧する」ことができる）にすることができる。エアロゾル製剤は、加圧された許容され得る噴霧剤、例えば、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、および窒素などの中に入れることができる。

10

【0108】

直腸投与に適切な製剤としては、例えば、坐剤基剤とともに有効量のパッケージされた標的化送達組成物を含む坐剤が挙げられる。適切な坐剤基剤としては、天然または合成のトリグリセリドまたはパラフィン炭化水素が挙げられる。加えて、選択された標的化送達組成物と、例えば、液体トリグリセリド、ポリエチレングリコール、およびパラフィン炭化水素を含む基剤との組み合わせを含有するゼラチン直腸カプセルを使用することも可能である。

【0109】

例えば、関節内（関節内）経路、静脈内経路、筋肉内経路、腫瘍内経路、皮内経路、腹腔内経路、ならびに皮下経路などによる非経口投与に適切な製剤は、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、および製剤を意図されたレシipientの血液と等張性にする溶質を含有することができる水性および非水性の等張性滅菌注射液剤、ならびに懸濁化剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤、および保存剤を含むことができる水性および非水性滅菌懸濁液を包含する。注射液剤および懸濁剤は、滅菌粉末、顆粒、および錠剤からも調製することができる。本発明の実施において、組成物は、例えば、静脈内注入によって、局所に、腹腔内に、嚢内に、または髄腔内に投与することができる。非経口投与および静脈内投与は、好ましい投与方法である。標的化送達組成物の製剤は、単位用量または複数回用量の密閉容器、例えば、アンプルおよびバイアルで提供することができる。

20

30

【0110】

医薬調製物は、好ましくは、単位剤形である。このような形態では、調製物は、適切な量の活性成分、例えば、標的化送達組成物を含有する単位用量にさらに小分けされる。単位剤形は、パッケージされた調製物とすることができ、パッケージは、別々の量の調製物を含有する。組成物は、所望により、他の適合した治療剤も含有することができる。

【0111】

がんを処置するための治療用途において、本発明の医薬組成物に用いられる治療剤および/または診断剤を含む標的化送達組成物は、毎日約0.001mg/kg～約1000mg/kgの初期投与量で投与することができる。約0.01mg/kg～約500mg/kg、または約0.1mg/kg～約200mg/kg、または約1mg/kg～約100mg/kg、または約10mg/kg～約50mg/kgの1日量範囲を使用することができる。しかしながら、投与量は、患者の要求事項、処置される状態の重症度、および使用される標的化送達組成物に応じて変更することができる。例えば、投与量は、特定の患者において診断されたがんの種類および病期を考慮して経験的に決定することができる。患者に投与される用量は、本発明との関連において、経時的に患者における有益な治療応答に影響を与えるのに十分であるべきである。用量のサイズはまた、特定の患者における特定の標的化送達組成物の投与に付随する、あらゆる有害な副作用の存在、性質、および程度によって決定される。特定の状況に適切な投与量を決定することは、従事者の技量の範囲内である。一般に、処置は、標的化送達組成物の最適用量未満であるより少ない投与量で開始する。その後、投与量は、状況下で最適の効果に到達するまで、少しずつ増

40

50

加させる。便宜上、所望により、総1日投与量を分割して、1日の間に一部ずつ投与することができる。

【0112】

いくつかの実施形態では、本発明の標的化送達組成物は、疾患、障害、および/または状態を診断するのに使用することができる。いくつかの実施形態では、標的化送達組成物は、被験体におけるがん状態、例えば、肺がん、乳がん、膵がん、前立腺がん、子宮頸がん、卵巣がん、結腸がん、肝がん、および食道がんなどを診断するのに使用することができる。いくつかの実施形態では、疾患状態を診断する方法は、標的化送達組成物を使用して、被験体の体内の腫瘍を物理的に検出および/または位置決定する工程を含むことができる。例えば、腫瘍は、本発明の標的化送達組成物の標的化剤が標的とする受容体を十分に発現する(例えば、細胞表面に、または血管系に)がんに関するものであり得る。いくつかの実施形態では、標的化送達組成物は、がん以外の疾患、例えば、増殖性疾患、心血管疾患、胃腸疾患、尿生殖器疾患、神経疾患、筋骨格疾患、血液系疾患、炎症疾患、自己免疫疾患、および関節リウマチなどを診断するのに使用することができる。

10

20

30

40

50

【0113】

本明細書において開示されるように、本発明の標的化送達組成物は、本質的に検出可能な特性を有する診断剤を含むことができる。被験体における診断剤の検出において、標的化送達組成物、または標的化送達組成物である部分を有する粒子の集団を、被験体に投与することができる。次いで、診断剤をイメージングするための技術、例えば、単光子放出コンピュータ断層撮影(SPECT)、磁気共鳴イメージング(MRI)、光学的イメージング、ポジトロン放出断層撮影(PET)、コンピュータ断層撮影(CT)、X線イメージング、およびγ線イメージングなどを使用して被験体をイメージングすることができる。本明細書において記載されるイメージング技術はいずれも、他のイメージング技術を組み合わせて使用することができる。いくつかの実施形態では、イメージングのための放射性同位体を粒子に組み込むことにより、被験体において標的化送達組成物をin vivoで追跡することが可能になる。例えば、標的化送達組成物の生体分布および/または排出を測定し、必要に応じて患者の処置を変更するのに使用することができる。例えば、患者の処置および/または診断を最適化するのに、より多くのまたはより少ない標的化送達組成物が必要となる場合がある。

標的化送達

【0114】

ある特定の実施形態では、本発明の標的化送達組成物は、治療剤または診断剤を標的化様式で放出するように被験体に送達することができる。例えば、標的化送達組成物が被験体における標的に送達され得ると、次いで、ナノ粒子などの標的化送達組成物に包埋されたか、該標的化送達組成物に封入されたか、または該標的化送達組成物に係留された治療剤が、標的近傍の溶液条件に基づいて送達され得る。例えば、pH、および塩濃度などの溶液条件は、治療剤が標的近傍の領域に短期間または長期間にわたる放出を誘発することができる。あるいは、酵素は、標的化送達組成物から治療剤または診断剤を切断することによって、放出を開始することができる。いくつかの実施形態では、標的化送達組成物は、エンドサイトーシスによって細胞の内部領域に送達され、場合によりその後リソソームなどの細胞の内部コンパートメント内で分解され得る。当業者であれば、治療剤または診断剤の標的化送達が、当技術分野において一般に公知の様々な方法を使用して行うことができることを認識する。

キット

【0115】

本発明はまた、疾患状態を処置および/または診断するために、被験体に標的化送達組成物を投与するためのキットを提供する。このようなキットは、典型的には、がん状態などの疾患状態を処置および/または診断するのに必要な2つ以上の構成要素を含む。構成要素としては、本発明の標的化送達組成物、試薬、容器、および/または器材(equipment)を挙げることができる。いくつかの実施形態では、キットにおける容器は、

使用前に放射標識される放射性薬品を含む標的化送達組成物を含有することができる。キットは、標的化送達組成物を投与するのに必要な反応構成要素 (reaction component) またはバッファのいずれかをさらに含むことができる。さらに、標的化送達組成物を凍結乾燥形態にして、次いで投与前に再構成することができる。

【0116】

ある特定の実施形態では、本発明のキットは、患者の疾患状態を処置および/または診断するのに使用される1つまたは複数の構成要素を含むことができるパッケージングアセンブリを含むことができる。例えば、パッケージングアセンブリは、本明細書において記載される標的化送達組成物の少なくとも1つを収容する容器を含むことができる。個別の容器は、患者への投与前に標的化送達組成物と混合することができる他の賦形剤または剤を含むことができる。いくつかの実施形態では、医師は、特定の患者に必要な処置または診断に応じて、ある特定の構成要素および/またはパッケージングアセンブリを選択および適合させることができる。

10

【0117】

本明細書において記載される実施形態は、例示目的のためのものにすぎず、当業者であれば、それらを踏まえて種々の改変または変更が示唆されるであろうし、該改変または変更は、本出願の精神および範囲、ならびに添付の特許請求の範囲内に含まれると理解されよう。本明細書において引用されるすべての刊行物、特許、および特許出願は、あらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0118】

当業者が本発明をより明確に理解し実施することができるように、以下の調製物および実施例を示す。それらは、本発明の範囲を限定するものとみなすべきではなく、その例示的かつ代表的なものにすぎないとみなすべきである。

【実施例】

【0119】

VI. 実施例

これらの化合物を調製するのに使用される出発材料および試薬は、一般に、Aldrich Chemical Co.などの商業供給業者から入手可能であるか、または科学文献および特許文献および参考文献、例えばFieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis; Wiley & Sons: New York, 1991, Volumes 1-15; Rodd's Chemistry of Carbon Compounds, Elsevier Science Publishers, 1989, Volumes 1-5 and Supplementals; およびOrganic Reactions, Wiley & Sons: New York, 1991, Volumes 1-40に記載されている手順にしたがって当業者に一般に公知の方法によって調製される。以下の合成反応スキームは、本発明の化合物を合成することができるいくつかの方法の例示的なものにすぎず、これらの合成反応スキームに対する種々の改変を行うことができ、当業者であれば、本出願に含まれる開示を参照して該改変が示唆されるであろう。

30

【0120】

合成反応スキームの出発材料および中間体は、所望により、従来の技術(限定されないが、ろ過、蒸留、結晶化、およびクロマトグラフィーなどが挙げられる)を使用して単離および精製することができる。このような物質は、物理定数およびスペクトルデータを含む従来の手段を使用して特性決定することができる。

40

実施例 1

ホスホン酸水素ジアルキルの調製

【0121】

一般的な合成手順を使用してホスホン酸水素ジアルキルを生成し、さらに反応させて本発明の化合物のいくつかを形成することができた。図6に示されているように、一般的な反応スキームは、亜リン酸ジフェニルを1-アルカノールと結合させて、ホスホン酸水素

50

ジアルキルを形成することであった。以下のホスホン酸水素ジアルキルを以下のように調製した：

【表 2】

n	1-アルカノール	1-アルカノールの分子量(MW)	ホスホン酸ジアルキル	生成物の分子量(MW)
11	C ₁₂ H ₂₆ O	1-ドデカノール 186.33	C ₂₄ H ₅₁ O ₃ P	418.63
13	C ₁₄ H ₃₀ O	1-テトラデカノール 214.39	C ₂₈ H ₅₉ O ₃ P	474.74
15	C ₁₆ H ₃₄ O	1-ヘキサデカノール 242.44	C ₃₂ H ₆₇ O ₃ P	530.85
17	C ₁₈ H ₃₈ O	1-オクタデカノール 270.49	C ₃₆ H ₇₅ O ₃ P	586.95
21	C ₂₂ H ₄₆ O	1-ドコサノール 326.60	C ₄₄ H ₉₁ O ₃ P	699.17

10

20

【0122】

2～5 mL マイクロウェーブバイアル中に、3～6 mmol の亜リン酸ジフェニルおよび2.1当量の1-アルカノールを添加した。2当量（容量による）の無水ピリジンをバイアルに注入し、蓋を圧着することによってバイアルを密閉した。Biotage（商標）Initiator Reactor を使用して、反応混合物をマイクロ波放射に100℃で30分間曝露した。³¹P NMR によって、CDCl₃ 中の反応混合物を完了について検査した。

【0123】

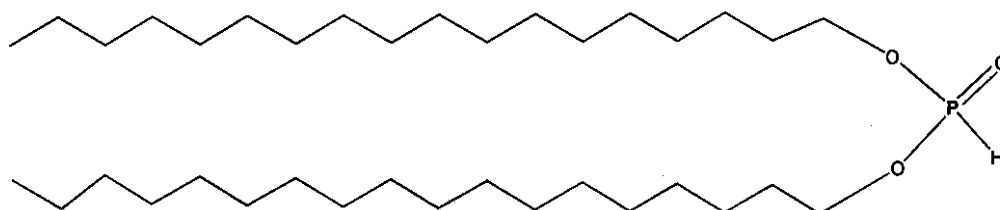
反応混合物を100 mL 丸底フラスコに移し、70℃で回転蒸発させて、溶媒を除去した。ヘキサン/酢酸エチル勾配を使用する順相シリカゲルフラッシュクロマトグラフィー（C₁₂生成物）、またはアセトン沈殿（C₁₄～C₂₂生成物）によって、粗生成物の残留物を精製した。各場合において、MSおよびNMRのデータは、所望の生成物と一致していた。

30

実施例 2

ホスホン酸水素ジオクタデシルの調製

【化19】



40

【0124】

機械的攪拌器および熱電対を備える125 mL 丸底フラスコ（RBF）に、1-オクタデカノール（25.41 g、0.0939 mol（mole）、2.2当量）、亜リン酸ジフェニル（10.0 g、0.0427 mol、1.0当量）、およびピリジン（4.053 g、0.5124 mol、1.2当量）を添加し、混合物を75℃に加熱した。2.5時間後、³¹P NMR（CDCl₃）によって、反応の完了を検査した：7.8 ppmにお

50

ける生成物、4.2 ppmにおける中間体ホスホン酸フェニルモノ - オクタデシル、0.35 ppmにおけるリン酸ジフェニル。反応は、約94% (積分による) の生成物、1.5%の中間体および4.6%の5.5 ppmピークを示した。混合物を40~50 に冷却し、約50 mLのジクロロメタンをゆっくりと添加して、材料が固化して攪拌器に固着するのを防いだ。混合物を150 mLのジクロロメタンでさらに希釈し、分液漏斗に移した。混合物を50 mLの水で洗浄し、75 mLの3 N塩酸で3回抽出し、各75 mLの水および食塩水でさらに洗浄した。有機層を無水Na₂SO₄で乾燥させ、ロータリーエバポレーター (rotovap) で濃縮して透明な液体を得、これを静置するとゆっくりと固化した。

【0125】

機械的攪拌器を備える清浄な250 mL RBFに、100 mLのアセトンを添加した。プラスチックピペットによって、濃縮生成物を攪拌アセトンに周囲温度で添加した；液体からふわふわした白色の固体が沈殿した。混合物を1時間攪拌してから、一層のSharkskin (商標) ペーパーで覆ったWhatman (商標) #4のろ紙でろ過して、ふわふわした白色のウェットケーキを得た。ウェットケーキを真空下、周囲温度で一晩乾燥させた。収量：19.11 g (76.3%)。HRMS：[M+H]⁺ 計算値587.5525、実測値587.5525；[M+Na]⁺ 計算値609.5346、実測値609.5339。HPLC-MS：587.25 [M+H]⁺、604.17 [M+NH₄]⁺、609.58 [M+Na]⁺、³¹P NMR (500 MHz, CDCl₃) = 7.734 ppm。¹Hおよび¹³C NMRは、所望の構造と一致していた。

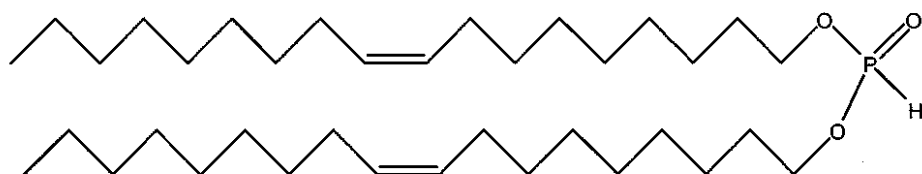
【0126】

あるいは、最初の反応が完了したと判断した後に、250 mL 蒸留フラスコ中の粗反応混合物をクーゲルロール蒸留装置内に入れて、フラスコを高真空下に置き、クーゲルロールオープン約1.5時間にわたって60 から120 まで10 の増分で徐々に加温し、120 に3時間保持することによって、揮発物質を除去した。ドライアイス/アセトン浴中で、留出物受器を冷却した。蒸留が完了した後、250 mL 蒸留フラスコ中の液化した高温の生成物を、タールを塗った125 mL ガラス保存瓶に注ぎ、冷却するとその中で生成物が固化した。これにより、生成物を白色のろう状固体として得た。³¹P NMR分光法によって、一定分量のこの固体をCDCl₃中の溶液として調べたところ、約7.72の単一ピークが示された。¹Hおよび¹³C NMRによって観測可能な唯一の生成物中の不純物は、最初の1 - オクタデカノールであり、単離した生成物の約15 mol %を占めていた。

実施例 3

ホスホン酸水素ジオレイルの調製

【化20】



【0127】

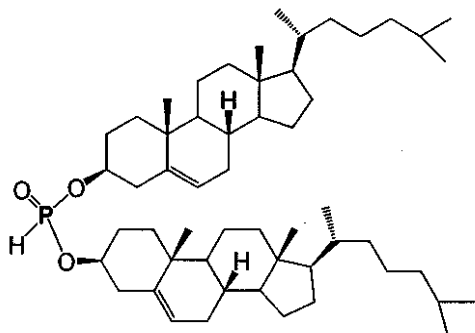
機械的攪拌器および熱電対を備える125 mL RBFに、オレイルアルコール (30.85 g、0.115 mol、2.2当量)、亜リン酸ジフェニル (12.23 g、0.0522 mol、1当量)、およびピリジン (4.96 g、0.0627 mol、1.2当量) を添加した。混合物を3時間にわたって65 に加熱した。³¹P NMR (CDCl₃、7.76 ppm) によって、反応の完了を検査した。混合物を<50 に冷却し、50 mLのジクロロメタンを添加した。混合物を150 mLのジクロロメタンでさらに希釈し、分液漏斗に移した。混合物を50 mLの水で洗浄し、75 mLの3 N塩酸で3回抽出し、各75 mLの水および食塩水でさらに洗浄した。有機層を無水Na₂SO₄で乾

燥させ、濃縮して無色の油を得た。このニートオイルを250 mL分液漏斗に移し、50 mLのアセトニトリル(ACN)で6回洗浄した。収量：19.86 g(65.2%)。高分解能質量分析(HRMS)： $[M+Na]^+$ 計算値605.5033、実測値605.5015； $^3\text{ }^1\text{P}$ NMR(500 MHz, CDCl_3) = 7.734 ppm。 ^1H および ^{13}C NMRは、所望の構造と一致している。

実施例 4

ホスホン酸水素ジコレステリルの調製

【化 2 1】



10

【0128】

機械的攪拌器および熱電対を備える250 mL RBFに、コレステロール(44.42 g、0.1149 mol)、亜リン酸ジフェニル(12.23、0.0522 mol)、およびピリジン(4.957、0.0627 mol)を添加した。混合物を85~90℃に加熱したところ、この温度で固体から攪拌可能な流体(fluid mass)になった。一晩加熱した後、 $^3\text{ }^1\text{P}$ NMR(CDCl_3)によって反応の完了を検査したところ、主要ピークは4.31 ppmであり、これが所望の生成物であることをHRMSによって確認した。混合物を<50℃に冷却し、100 mLのクロロホルムを添加して、固体を溶解させた。混合物を150 mLのクロロホルムでさらに希釈し、分液漏斗に移した。混合物を50 mLの水で洗浄し、50 mLの3 N塩酸で3回抽出し、各50 mLの水および食塩水でさらに洗浄した。有機層を無水 Na_2SO_4 で乾燥させ、ロータリーエバポレーターで濃縮してオレンジ色の粘性油を得た(これを静置するとゆっくりと固化した)。

20

30

【0129】

機械的攪拌器を備える清浄な500 mL RBFに、200 mLのアセトンを添加した。プラスチックピペットによって、濃縮生成物を攪拌アセトンに周囲温度で添加した；液体からふわふわした白色の固体が沈殿した。混合物を一晩攪拌してから、Whatman(商標) #4およびSharkskin(商標)ペーパーでろ過して、ふわふわしたオフホワイトの粉末を得た。このウェットケーキを真空下、周囲温度で一晩乾燥させた。収量は、29.69 g(69.4%)であった。HRMS： $[M+Na]^+$ 計算値841.6598、実測値841.6599； $^3\text{ }^1\text{P}$ NMR(CDCl_3) 4.31 ppm； ^1H および ^{13}C NMRは、所望の構造と一致していた。

40

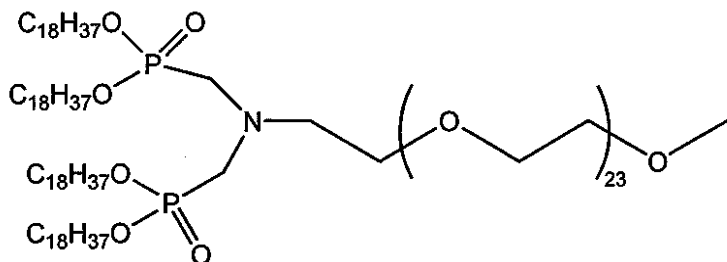
実施例 5

四脚型 C_{18} -PEG₁₀₀₀-OMeの調製

【0130】

テトラキス(オクタデシル)((2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62, 65, 68, 71-テトラコサオキサトリヘプタコンタン-73-イル)アザンジイル)ビス(メチレン)ビス(ホスホネート)(本明細書において、四脚型 C_{18} -PEG₁₀₀₀-OMeと称される)

【化 2 2】



【0131】

10

図7は、四脚型C₁₈-PEG₁₀₀₀-OMeを調製するための一般的な反応スキームを示しており、上記実施例2に記載したように、最初に、ホスホン酸水素ジオクタデシルを作製することによってこれを調製した。次に、四脚型C₁₈-PEG₁₀₀₀-OMeを以下のように生成した：三角形の撹拌羽根を備える10mL Kontes microflexバイアルを、ホスホン酸水素ジオクタデシル(1.0g、1.704mmol、2当量)、パラホルムアルデヒド(76.7mg、2.56mmol、3当量)、および単分散PEG₁₀₀₀(Quanta Biodesign、0.927g、0.852mmol、1当量)で満たした。蓋をしっかりと締め、バイアルを75℃に加熱し、24~72時間撹拌した。蒸発光散乱検出器(ELSD)を備える逆相(C4、300Å)HPLCを使用する分析のために、反応物を定期的にサンプリングした。反応が不完全であると判断した場合、所望の生成物へのさらなる変換を助けるために、さらなるパラホルムアルデヒドを添加してもよい。反応物が生成物への十分な変換に達した場合、反応物を冷却し、得られたろう状固体を精製した。

20

【0132】

超音波処理およびわずかな加熱を使用して、粗反応物をイソプロピルアルコールに溶解させた。流量30mL/分によるWatersカラム(C4、300Å、5μm、19×150mm)の逆相クロマトグラフィーによって、粗溶液(典型的には、10~15mg/mL)を精製した。使用した溶媒は、アセトニトリル(0.05%TFA)および水(0.05%TFA)であった。以下は、使用した勾配法である；

30

【表 3】

時間	ACN (0.05% TFA)	水 (0.05% TFA)
0	80	20
4	100	0
15	100	0
15.1	80	20
20	80	20

【0133】

40

所望の生成物を含有する画分を真空下で還元し、凍結乾燥して固体にする(単離収量：0.334g、理論収量：1.40g、収率：23.8%)。LC/MS：[M+H]⁺=2287.7m/z。蒸発光散乱検出を使用するHPLC分析：99面積パーセント。³¹P NMRは、所望の構造と一致していた。

実施例 6

四脚型C₁₈-PEG₂₀₀₀-OMeの調製

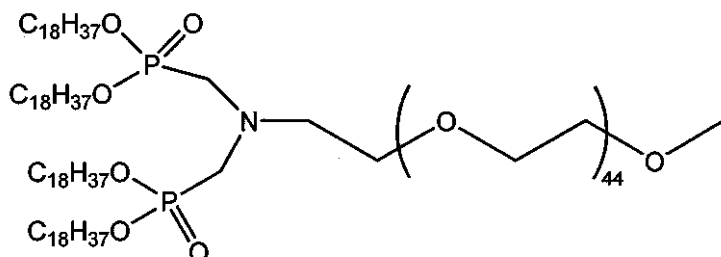
【0134】

テトラキス(オクタデシル)-(2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62, 65, 68, 71, 74, 77, 80, 83, 86, 89, 92, 95, 98, 101, 104,

50

107, 110, 113, 116, 119, 122, 125, 128, 131, 134 -
 ペンタテトラコンタオキサヘキサトリアコンタヘクタン - 136 - イルアザンジイル) ピ
 ス(メチレン)ビス(ホスホネート)(本明細書において、四脚型 $C_{18} - PEG_{200}$
 $_0 - OMe$ と称される)

【化23】



10

【0135】

四脚型 $C_{18} - PEG_{2000} - OMe$ を生成するための合成工程は、上記実施例5で
 開示したものと類似していた。最初に、実施例2で開示した同じ方法によって、ホスホン
 酸水素ジオクタデシルを調製した。次に、四脚型 $C_{18} - PEG_{2000} - OMe$ を以下
 のように生成した：三角形の攪拌羽根を備える10mL Kontes microfleece
 バイアルを、ホスホン酸水素ジオクタデシル(0.587g、1.0mmol、2当
 量)、パラホルムアルデヒド(90.1mg、3.0mmol、6当量)、および多分散
 PEG_{2000} (NANOCSS)(1.0g、0.50mmol、1当量)で満たした。
 蓋をしっかりと締め、バイアルを75℃に加熱し、24~72時間攪拌した。少しの試料
 を定期的に回収し、イソプロパノール(IPA)/水に溶解させ、ELSD検出器を備え
 る逆相(C4、300Å)高速液体クロマトグラフ(HPLC)を使用して分析した。反
 応が不完全であると判断した場合、所望の生成物へのさらなる変換を助けるために、さら
 なるパラホルムアルデヒドを添加してもよい。反応が生成物への十分な変換に達した場合
 、反応物を冷却し、得られたろう状固体を精製した。

20

【0136】

超音波処理およびわずかな加熱を使用して、粗反応物をIPA/水(約3~5%の水)
 に溶解させた。粗溶液は、典型的には、15~25mg/mLであった。C4シリカパッ
 キング(5μm、300Å)を含有するカラムでの逆相クロマトグラフィーによって、所
 望の生成物を得た。使用した溶媒は、ACN(0.05%トリフルオロ酢酸(TFA))
 および水(0.05%TFA)であった。以下は、流量30mL/分によるWaters
 (商標)カラム(C4、5μm、19x150mm)とともに使用した勾配法である：

30

【表4】

時間	ACN (0.05% TFA)	水(0.05% TFA)
0	80	20
4	100	0
15	100	0
15.1	80	20
20	80	20

40

【0137】

所望の生成物を含有する画分を真空下で還元し、凍結乾燥によって単離する。単離収量
 (精製物質)：0.335g(20.8%)。高分解能質量分析(High Res. MS)：擬似マ
 ススペクトル $[M + 2Na]^+ = 1628.1472$ ；検出マ
 ススペクトル $[M + 2Na]^+ = 1628.1491$ 。HPLC(ELSD)：単一ピーク：保
 持時間(約7.88分) = > 98面積パーセント。LC/MS： $[M + Na]^+ = 16$

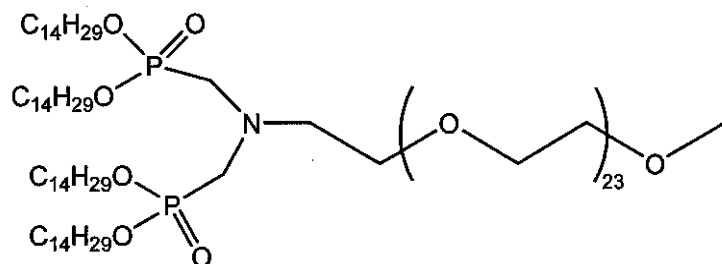
50

16.9 m/z。 ^{31}P NMRは、所望の構造と一致していた。

実施例 7

四脚型 C_{14} -PEG₁₀₀₀-OMeの調製

【化24】



10

【0138】

テトラキス(テトラデシル)((2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62, 65, 68, 71-テトラコサオキサトリヘプタコンタン-73-イル)アザンジイル)ビス(メチレン)ビス(ホスホネート)(本明細書において、四脚型 C_{14} -PEG₁₀₀₀-OMeと称される)

【0139】

ホスホン酸水素ジオクタデシルに代えてホスホン酸水素ジテトラデシルを用い、以下の量を使用したことを除いて、手順は、実施例5の四脚型 C_{18} -PEG₁₀₀₀-OMeについてのもと同じであった：ホスホン酸水素ジテトラデシル(0.404 g、0.852 mmol、2当量)、パラホルムアルデヒド(0.077 g、2.56 mmol、6当量)、および単分散PEG₁₀₀₀(Quanta Biodesign(商標))(0.464 g、0.426 mmol、1当量)。Waters(商標)カラム(C4、300 Å、5 μm、19 x 150 mm)の逆相クロマトグラフィーの後、所望の生成物を含む画分を合わせ、真空下で還元し、凍結乾燥して半固体にした；単離収量0.496 g(56.5%)。ELSD検出を使用するHPLC分析：>99%(面積による)。 ^{31}P NMRは、所望の構造と一致していた。

20

実施例 8

他の四脚型アルキル-PEGホスホン酸コンジュゲートの調製

【0140】

他の四脚型アルキル-PEGホスホン酸コンジュゲートも調製することができる。実施例1の一般的なスキームに記載したように、ホスホン酸水素ジアルキル(例えば、 C_{12} 、 C_{16} 、および C_{22})を調製することができる。次いで、実質的には実施例6に記載した手順を使用して、 C_{12} -、 C_{16} -、および C_{22} -PEG₁₀₀₀-OMeホスホン酸コンジュゲートを調製することができる。しかしながら、 C_{12} -、 C_{16} -、および C_{22} -PEG₁₀₀₀-OMeコンジュゲート(これらはそれぞれ以下に示す)の場合、反応は、1-オクタデカノールを使用することに代えて、それぞれ1-ドデカノール、1-ヘキサデカノールおよび1-ドコサノールを含むことができる。HRMSおよび/またはLRMSならびに ^{31}P NMRは、これらの誘導体それぞれの所望の構造と一致していた。

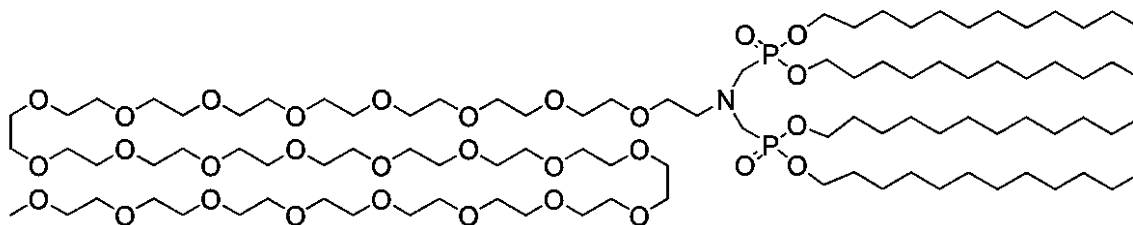
30

40

【0141】

テトラキス(ドデシル)((2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62, 65, 68, 71-テトラコサオキサトリヘプタコンタン-73-イル)アザンジイル)ビス(メチレン)ビス(ホスホネート)(C_{12} /単分散PEG₁₀₀₀)。化学式： $\text{C}_{99}\text{H}_{203}\text{NO}_3\text{P}_2$ 、分子量：1949.61 g/mol。

【化 2 5】

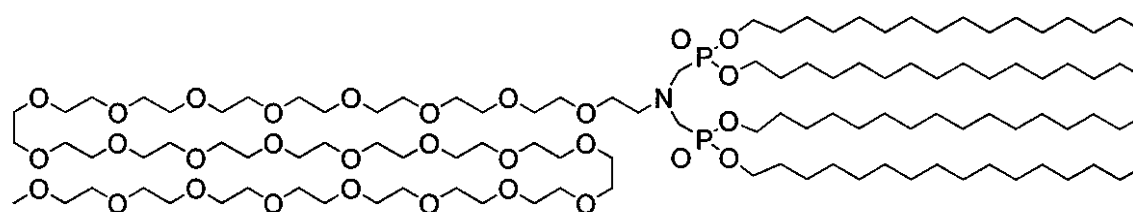


【 0 1 4 2】

テトラキス(ヘキサデシル)((2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62, 65, 68, 71 - テトラコサオキサトリヘプタコンタン - 73 - イル)アザンジイル)ビス(メチレン))ビス(ホスホネート)(C_{16} / 単分散 PEG₁₀₀₀)。 化学式： $C_{115}H_{235}NO_{30}P_2$ 、分子量：2174.03 g/mol。

10

【化 2 6】



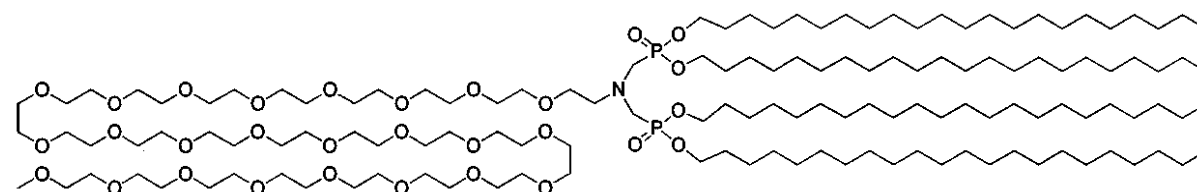
20

【 0 1 4 3】

テトラキス(ドコシル)((2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62, 65, 68, 71 - テトラコサオキサトリヘプタコンタン - 73 - イル)アザンジイル)ビス(メチレン))ビス(ホスホネート)(C_{22} / 単分散 PEG₁₀₀₀)。 化学式： $C_{139}H_{283}NO_{30}P_2$ 、分子量：2510.67 g/mol。

【化 2 7】

30



【 0 1 4 4】

同様に、上記工程のいくつかにしたがって、様々な長さの PEG 分子 (例えば、PEG₁₀₀₀ ~ PEG₁₀₀₀₀ またはより高分子量 (MW) の PEG) を有するコンジュゲートを調製することができる。例えば、四脚型 C_{18} ホスホノ - メチルアミノ - PEG₅₀₀₀ - OMe コンジュゲートは、PEG₁₀₀₀ に代えて多分散 PEG₅₀₀₀ を使用することを除いて、実施例 6 の工程にしたがって調製することができる。四脚型 C_{18} ホスホノ - メチルアミノ - PEG₅₀₀₀ - OMe コンジュゲートの化学構造は、以下のとおりである：

40

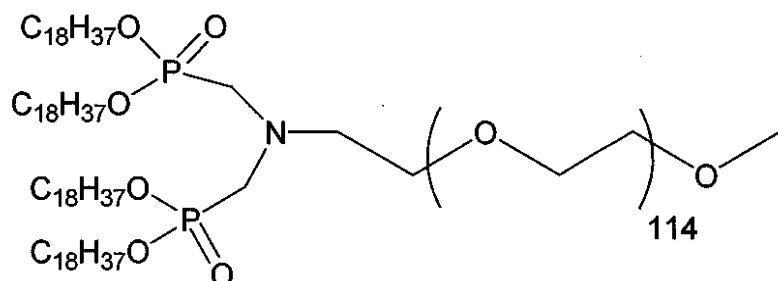
【 0 1 4 5】

テトラキス(オクタデシル) - (2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62, 65, 68, 71, 74, 77, 80, 83, 86, 89, 92, 95, 98, 101, 104, 107, 110, 113, 116, 119, 122, 125, 128, 131, 134, 137, 140, 143, 146, 149, 152, 155, 158, 161, 164, 167, 170, 173, 176, 179, 182, 185, 188, 191, 194,

50

197, 200, 203, 206, 209, 212, 215, 218, 221, 224, 227, 230, 233, 236, 239, 242, 245, 248, 251, 254, 257, 260, 263, 266, 269, 272, 275, 278, 281, 284, 287, 290, 293, 296, 299, 302, 305, 308, 311, 314, 317, 320, 323, 326, 329, 332, 335, 338, 341, 344, 347 - ヘキサデカヘクタオキサペンタコンタトリクタン - 349 - イル) アザンジール) ビス(メチレン)ビス(ホスホネート)、化学式: $C_{305}H_{615}NO_{121}P_2$ 、精密質量: 6291.15、分子量: 6295.03 g/mol。

【化28】



10

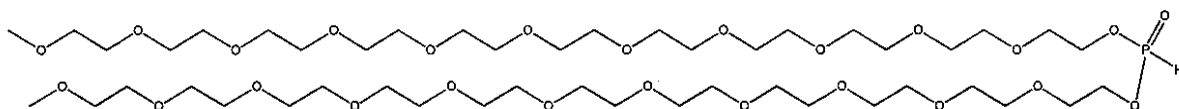
実施例9

20

【0146】

ジ(2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32 - ウンデカオキサテトラトリアコンタン - 34 - イル) ホスホネート

【化29】



30

【0147】

丸底フラスコ中で、2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32 - ウンデカオキサテトラトリアコンタン - 34 - オール(2.00 g、3.87 mmol)をトルエンに溶解させた。共沸蒸留によって、この溶液を乾燥させた。次いで、残ったトルエンをストリップして除去した。次いで、ピリジン(0.092 g、1.16 mmol)および亜リン酸ジフェニル(0.45 g、1.94 mmol)を添加した。混合物を65℃で16時間加熱した。反応混合物を室温に冷却し、15 mLのジクロロメタンに溶解させ、3.0 gのDowex WBA樹脂と一緒に30分間攪拌した。ジクロロメタン溶液を樹脂ビーズからろ過し、揮発物質を蒸発させて黄色の油にした。この油を1, 2, 4 - トリメチルベンゼンに溶解させ、揮発物質を減圧下で除去し、フェノール副生成物を共沸除去した。所望の生成物(1.34 g)を油として得た。HRMS: 計算値: $(M + 2Na) / 2 = 562.2842$ 、 $(M + Na) = 1101.5792$ 、測定値: $(M + 2Na) / 2 = 562.2818$ 、 $(M + Na) = 1101.5751$ 。 ^{31}P NMR: 9.22 ppm。 1H NMR、 ^{13}C NMR、および ^{13}C APT NMRは、構造と一致している。化学式: $C_{46}H_{95}NO_{25}P$ 、分子量: 1078.59 g/mol。

40

実施例10

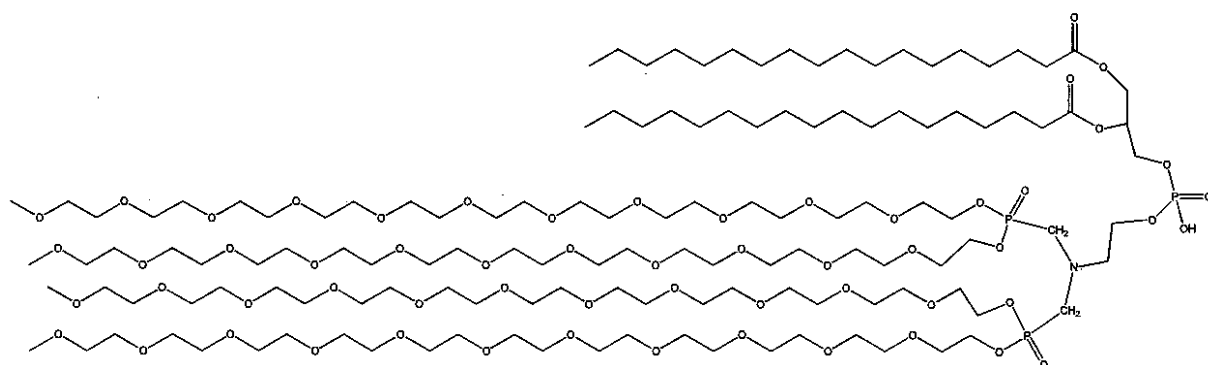
【0148】

3 - ((2 - (ビス((ジ(2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32 - ウンデカオキサテトラトリアコンタン - 34 - イル) ホスホリル) メチル) アミノ) エトキシ) (ヒドロキシ) ホスホリル) オキシ) プロパン - 1, 2 - ジイルジステ

50

アラート

【化 3 0】



10

【 0 1 4 9】

DSPE (1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン、0.45 g、0.60 mmol)、実施例 9 で調製したジ (2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32 - ウンデカオキサテトラトリアコンタン - 34 - イル) ホスホネート (1.34 g、1.24 mmol)、パラホルムアルデヒド (0.054 g、1.81 mmol のホルムアルデヒド)、およびジメチルホルムアミド (2.0 mL) をシンチレーションバイアルに添加した。バイアルに蓋をして、75 で 24 時間加熱した。反応混合物をストリップし、メタノールに溶解させ、Dowex WBA 樹脂 (1.0 g) で処理した。このメタノール溶液を樹脂ビーズからろ過し、ストリップして黄色の油にした。この油を 15 mL の 80 / 20 水 / イソプロピルアルコールに溶解させ、Grace Vydac Protein C - 4 逆相パッキングを充填したカラムに通し、水 / イソプロピルアルコール溶離液を使用するクロマトグラフィーを行った。所望の画分を冷凍し、凍結乾燥して、0.337 g の目的化合物を白色の粉末として得た。LRMS 測定値: $(M + 2H) / 2 = 1465$ 、 $(M + 2Na) / 2 = 1487$ 、 $(M + 3H) / 3 = 977$ 。HRMS: 計算値: $(M - H) 2927.7505$ 、測定値: $(M - H) 2927.7570$ 。 ^{31}P NMR 測定値 25.96 ppm および -0.21 ppm。 1H NMR、 ^{13}C NMR、および ^{13}C APT NMR は、構造と一致している。HPLC 分析 (ELSD) により、所望の生成物のピークについて、99.8 面積% であることが分かった。化学式: $C_{135}H_{272}NO_{58}P_3$ 、分子量: 2928.76 g/mol。

20

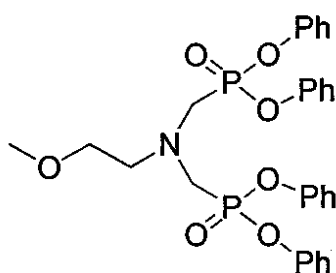
30

実施例 11

【 0 1 5 0】

テトラフェニル - (2 - メトキシエチルアザンジール) ビス (メチレン) ジホスホネート。化学式: $C_{29}H_{31}NO_7P_2$ 、精密質量: 567.16、分子量 567.51 g/mol。

【化 3 1】



40

【 0 1 5 1】

以下の手順を使用して、この化合物を調製した。2 - メトキシエチルアミン (3 g、40 mmol; 3.44 mL) をホルムアルデヒド (2.4 g; 320 mmol、6.5 mL の 37% H_2O 溶液) およびジメチルホルムアミド (DMF) (30 mL) と合わせた

50

。亜リン酸ジフェニル（DPP）（20.6 g、88 mmol；2.2当量）を混合物にゆっくりと添加した。短い初期発熱反応の後、混合物を室温で12時間撹拌した。HPLCにより反応の完了が示された後、DMFを蒸発させた。残留物を酢酸エチル（EA）（200 mL）に溶解させ、飽和KHSO₄および食塩水で洗浄した。層を分離し、有機層をNa₂SO₄で乾燥させ、ろ過し、揮発物質を真空下、ロータリーエバポレーターで除去した。残った油をEA/ヘキサン混合液（1：4）に溶解させ、シリカプラグに通してろ過した。次いで、EA/ヘキサン混合液（1：1）を用いて、生成物をシリカから溶出させた。溶媒を蒸発させて、15.6 g（27 mmol；69%）を透明の油として得た。LC/MS：MH⁺ = 568.2¹Hおよび³¹P NMRは、構造と一致している。

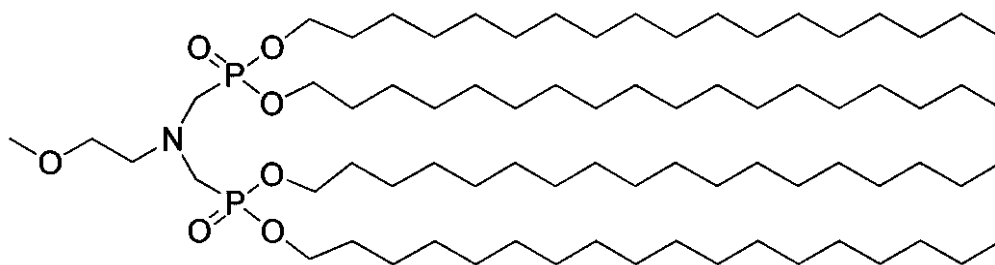
実施例 12

10

【0152】

テトラオクタデシル - (2 - メトキシエチルアザンジル) ビス (メチレン) ジホスホネート。化学式：C₇₇H₁₅₉NO₇P₂、精密質量：1272.16、分子量：1273.04 g/mol。

【化32】



20

【0153】

実質的には実施例 11 の手順を使用してこの分子を調製したが、亜リン酸ジフェニル（DPP）に代えてホスホン酸水素ジテトラデシルを用い、そして、反応は、実施例 5 のようにDMF溶媒を用いず（すなわち、溶媒なし）、反応バイアル（10 mL）およびテフロン（登録商標）コーティングした回転羽根を使用して行い、実施例 5 に記載したように作製および単離した。

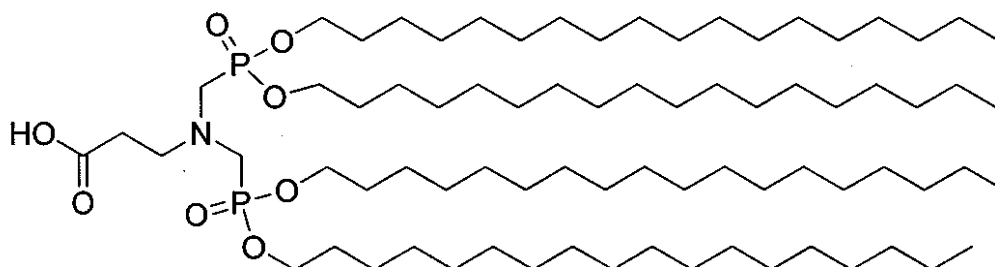
実施例 13

30

【0154】

3 - (ビス((ビス(オクタデシルオキシ)ホスホリル)メチル)アミノ)プロパン酸。化学式：C₇₇H₁₅₇NO₈P₂、精密質量：1286.14、分子量1287.02 g/mol。

【化33】



40

【0155】

この化合物を以下のように調製した：耐圧瓶中で、DMF溶液（20 mL）中、撹拌しながら、ホスホン酸ジオクタデシル（5.87 g、10 mmol）を - アラニン（0.45 g、5 mmol）およびホルムアルデヒド（6 mLの37%水溶液）と80℃で2日間反応させた。反応混合物を取り出し、揮発物質を慎重に蒸発させ、残留物をCHCl₃（200 mL）に溶解させた。有機層を10%KHSO₄および食塩水（各50 mL）で洗浄した。有機相をMgSO₄で乾燥させ、ろ過し、蒸発させて油にした。数時間撹拌し

50

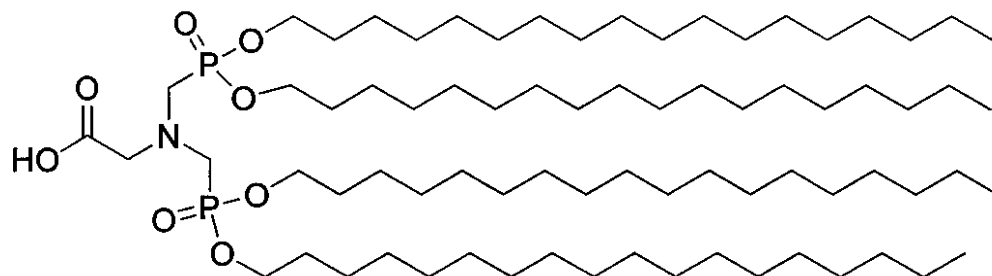
た後、残った油を約 100 mL のアセトンと混合し、細かい白色の沈殿物をろ別した。収量：粗製物として 5.4 g (4.2 mmol : 84%)。 ^3P NMR 24.503 ppm。HRMS：計算値 MH^+ 1287.1384；実測値 MH^+ = 1287.1477。

実施例 14

【0156】

2 - (ビス((ビス(オクタデシルオキシ)ホスホリル)メチル)アミノ)酢酸。化学式： $\text{C}_{76}\text{H}_{155}\text{NO}_8\text{P}_2$ 、精密質量：1272.12、分子量：1272.99 g/mol。

【化34】



10

【0157】

実施例 13 と同様に、DMF 中、ホスホン酸ジオクタデシルをグリシンおよびホルムアルデヒドと反応させることによって、この化合物を調製した。実施例 13 に示したのと同様の方法で、生成物を単離した。 ^3P NMR および HRMS によって、構造を確認した。

20

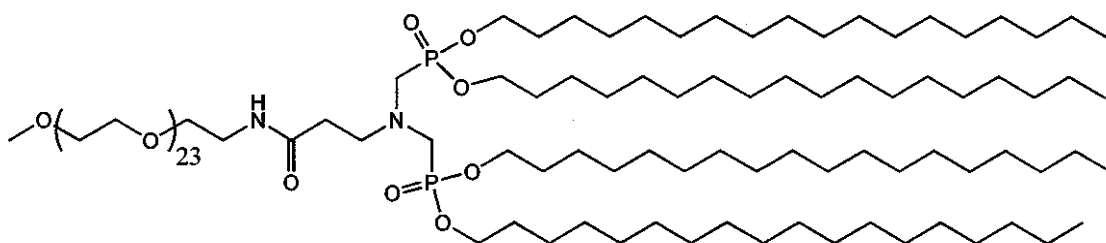
実施例 15

【0158】

テトラオクタデシル(78 - メチル - 75 - オキソ - 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62, 65, 68, 71 - テトラコサオキサ - 74, 78 - ジアザノナヘプタコンタン - 79 - イル)ビス(メチレン)ジホスホネート。化学式： $\text{C}_{126}\text{H}_{256}\text{N}_2\text{O}_3\text{P}_2$ 、分子量：2357.32 g/mol。

30

【化35】



40

【0159】

DCM 溶液 (20 mL) 中、TBTU (O - (ベンゾトリアゾール - 1 - イル) - N, N, N' - テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート) (48 mg、0.15 mmol) および DIPEA (N, N - ジイソプロピルエチルアミン) (0.175 mL) の存在下で、3 - (ビス((ビス(オクタデシルオキシ)ホスホリル)メチル)アミノ)プロパン酸 (128 mg、0.1 mmol) を m - dPEG₂₄ - アミン (108 mg、0.1 mmol) とカップリングさせた。(図 8 を参照のこと)。室温で 12 時間攪拌した後、混合物をジクロロメタン (DCM) (100 mL) で希釈し、10% KHSO_4 および食塩水で洗浄した。DCM 溶液を Na_2SO_4 で乾燥させ、ろ過し、溶媒を蒸発させて、220 mg の透明の油を (粗物質として) 得、これを C4、300 A r p h p

50

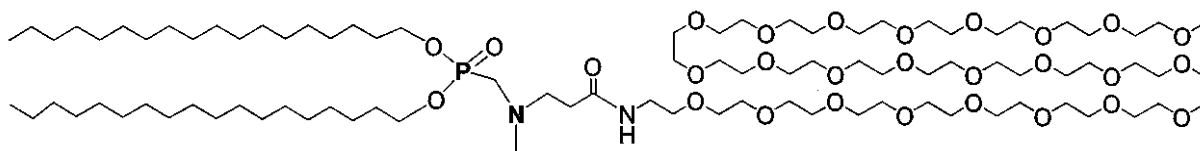
1 c によって精製し、凍結乾燥して、所望の生成物を得ることができた。MS : $M + Na^+ = 2,379.73$ および 31P NMR は構造と一致している。

実施例 16

【0160】

ジオクタデシル (78 - メチル - 75 - オキソ - 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62, 65, 68, 71 - テトラコサオキサ - 74, 78 - ジアザノナヘプタコンタン - 79 - イル) ホスホネート (C_{18} / N - メチル - アラニン / PEG₁₀₀₀)。化学式 : $C_{90}H_{183}N_2O_{28}P$ 、精密質量 : 1771.27、分子量 : 1772.39 g/mol。

【化36】



10

【0161】

実質的には実施例 15 に概説した同じ反応条件および精製手順を使用して、TBTU の存在下で、実施例 13 で形成した 3 - (ビス((ビス(オクタデシルオキシ)ホスホリル)メチル)アミノ)プロパン酸を m - dPEG₂₄ - アミンと反応させることによって、この化合物を合成することができる。

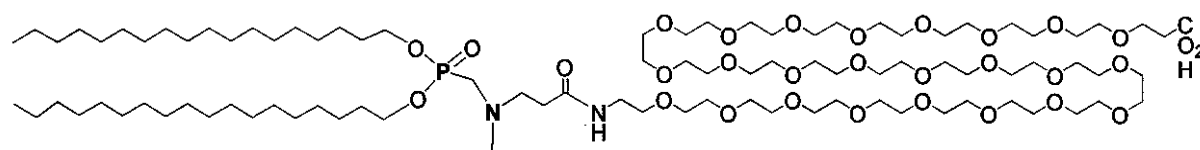
20

実施例 17

【0162】

ジオクタデシル (78 - カルボキシ - 75 - オキソ - 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62, 65, 68, 71 - テトラコサオキサ - 74, 78 - ジアザノナヘプタコンタン - 79 - イル) ホスホネート (C_{18} / N - メチル - アラニン / PEG₁₀₀₀ カルボキシレート)。化学式 : $C_{92}H_{185}N_2O_{30}P$ 、精密質量 : 1829.27、分子量 : 1830.42 g/mol。

【化37】



30

【0163】

実質的には実施例 15 に概説した同じ反応条件および精製手順を使用して、TBTU の存在下で、実施例 13 で形成した 3 - (ビス((ビス(オクタデシルオキシ)ホスホリル)メチル)アミノ)プロパン酸をアミノ - PEG₂₄ - カルボン酸エステル (carboxylate ester) と反応させてこのエステルを得ることによって、この化合物を合成することができる。このエステルの酸への加水分解を塩基性または酸性条件下で達成し、C4 逆相 HPLC によって生成物のカルボキシレートを単離し、同様の画分を合わせ、凍結乾燥して、実質的に純粋な生成物を得ることができる。

40

実施例 18

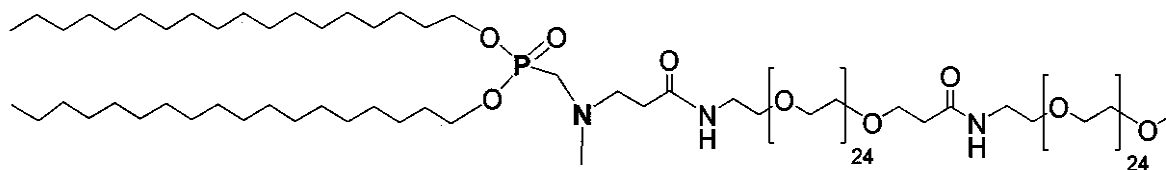
【0164】

ジオクタデシル 158 - メチル - 77, 155 - ジオキソ - 2, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 73, 80, 82, 85, 88, 91, 94, 97, 100, 103, 106, 109, 112, 115, 118, 121, 124, 127

50

、130、133、136、139、142、145、148、151 - ペンタコンタオキサ - 76、154、158 - トリアザノナペンタコンタヘクタン - 159 - イルホスホネート (C₁₈ / N - メチル - アラニン / PEG₁₀₀₀ アミド連結 PEG₁₀₀₀)

【化38】



10

【0165】

実質的には実施例15のカップリング手順および精製スキームを使用して、実施例15の生成物を取得し、それをアミノ - PEG OMe (分子量 (MW) 1000) と反応させることによって、この化合物を調製することができる。

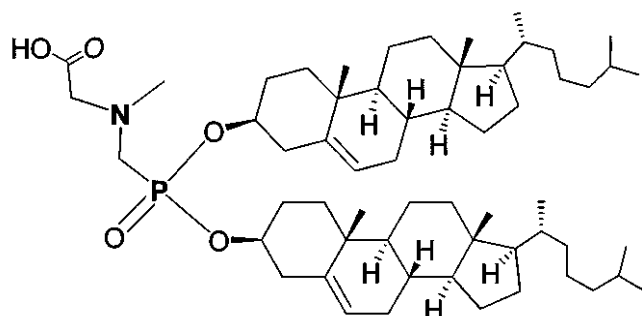
実施例19

【0166】

2 - (((ビス ((3S, 8S, 9S, 10R, 13R, 14S, 17R) - 10, 13 - ジメチル - 17 - ((R) - 6 - メチルヘプタン - 2 - イル) - 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 - テトラデカヒドロ - 1H - シクロペンタ [a] フェナントレン - 3 - イルオキシ) ホスホリル) メチル) (メチル) アミノ) 酢酸 (ジコレステロール / サルコシン)。化学式: C₅₈H₉₈NO₅P、精密質量: 919.72、分子量: 920.38 g/mol。

20

【化39】



30

【0167】

この化合物を以下のように調製した: DMF中、ホスホン酸水素ジコレステリル (5.0 g、0.006 mol) をサルコシン (0.54 g、0.006 mol) およびホルムアルデヒド (2.2 g、0.03 mol) と、不均質な混合物として、75 で反応させた。75 で4時間後、所望のジコレステロールホスホニルメチルサルコシンへの9%の変換が得られた。さらに一部のホルムアルデヒド (2.2 g、0.03 mol) を添加し、反応温度を85 に上昇させた。85 で16時間後、所望の2 - (((ビス ((3S, 8S, 10R, 13R, 17R) - 10, 13 - ジメチル - 17 - ((R) - 6 - メチルヘプタン - 2 - イル) - テトラデカヒドロ - 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 1H - シクロペンタ [a] フェナントレン - 3 - イルオキシ) ホスホリル) メチル) (メチル) アミノ) 酢酸への55%の変換が得られ、冷却すると反応混合物から黄色の固体が沈殿した。ろ過 (黄色の固体) によって生成物を単離し、³¹P NMR (22.5 ppm) によって特性 (identity) を確認した。95%クロロホルム / 5% MeOHを使用してシリカゲル (15 g) で、粗製二脚型コレステロールサルコシン (700 mg) を精製した。

40

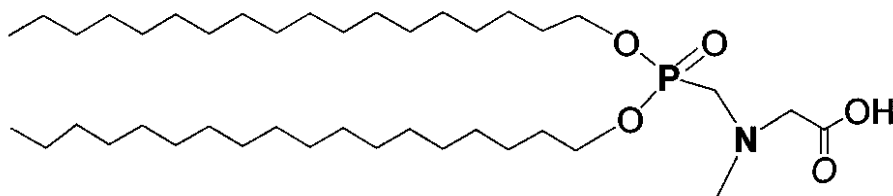
実施例20

【0168】

50

2 - (((ビス(オクタデシルオキシ)ホスホリル)メチル)(メチル)アミノ)酢酸 (C₁₈/サルコシン)。化学式: C₄₀H₈₂NO₅P、精密質量: 687.59、分子量: 688.06 g/mol。

【化40】



10

【0169】

この化合物を以下のように調製した: 機械的攪拌器および熱電対を備えるRBF(250 mL)に、N,N-ジメチルホルムアミド(50 mL)中のホスホン酸水素ジオクタデシル(1.98 g、0.003 mol)、サルコシン(0.30 g、0.003 mol)およびホルムアルデヒド(1.1 g、0.013 mol)を、75 °Cで添加した。2時間後、³¹P NMR(24.4 ppm)によって、2-((bis(オクタデシルオキシ)ホスホリル)(メチル)アミノ)酢酸への76%の変換が観察された。反応を75 °Cでさらに4時間継続すると、88.5%の変換がもたらされた。この時点で、反応混合物を周囲温度に冷却し、薄オレンジ色のスラリーを得た。水(50 mL)を添加し、混合物を周囲温度でさらに30分間攪拌した。ろ過によって、生成物を薄オレンジ色の固体として単離した。この固体を30~40 °Cのオーブン中で一晩乾燥させた(2.0 g)。単離した固体について、³¹P NMR(24.3 ppm)によって、最終純度81.3%の二脚型C18サルコシンであることを確認した。HPLC-MS(689.6 M+H⁺)。¹³Cおよび¹H NMRは、指定の構造と一致していた。

20

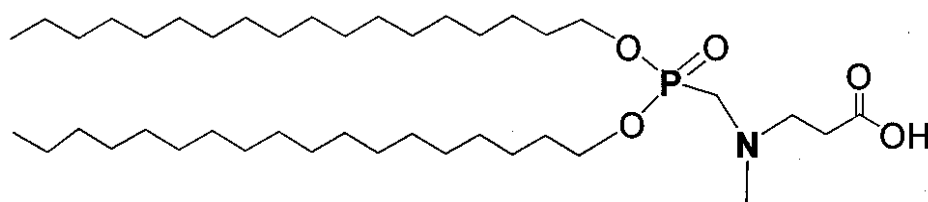
実施例21

【0170】

3-((bis(オクタデシルオキシ)ホスホリル)メチル)(メチル)アミノ)プロパン酸(C₁₈/N-メチル-アラニン)。化学式: C₄₁H₈₄NO₅P、精密質量: 701.61、分子量: 702.08 g/mol。

30

【化41】



【0171】

実質的には実施例20と同じ手順を使用してこの化合物を調製したが、サルコシンをN-メチル-アラニンに替えた。C4逆相HPLCでの精製および単離の後、予想したMSおよび³¹P NMRが得られた。

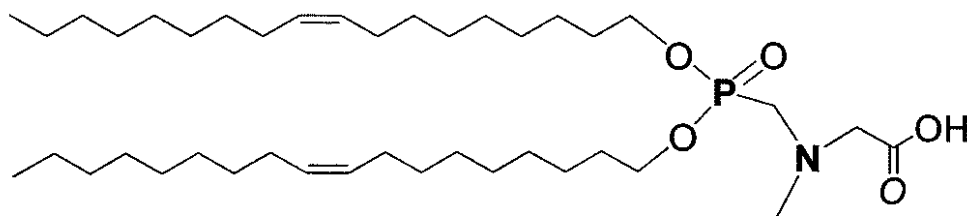
40

実施例22

【0172】

2-((bis((Z)-オクタデカ-9-エニルオキシ)ホスホリル)メチル)(メチル)アミノ)酢酸(C₁₈オレイル/サルコシン)。化学式: C₄₀H₇₈NO₅P、精密質量: 683.56、分子量: 684.02 g/mol。

【化 4 2】



【0173】

この化合物を以下のように調製した：機械的攪拌器および熱電対を備える R B F (2 5 0 m L) に、N , N - ジメチルホルムアミド (5 0 m L) 中のホスホン酸水素ジオレイル (1 . 9 6 g 、 0 . 0 0 3 m o l) 、サルコシン (0 . 3 0 g 、 0 . 0 0 3 m o l) およびホルムアルデヒド (1 . 1 g 、 0 . 0 1 3 m o l) を、7 5 で添加した。反応を 7 5 で 4 時間行った。³¹P NMR (約 2 4 p p m) によって、所望の 2 - ((ビス ((Z) - オクタデカ - 9 - エニルオキシ) ホスホリル) (メチル) アミノ) 酢酸への約 8 9 % の変換が観察された。反応混合物を周囲温度に一晩冷却し、次いで蒸発させて油にした。¹³C および ¹H NMR ならびに L C M S によって、生成物を確認した。

10

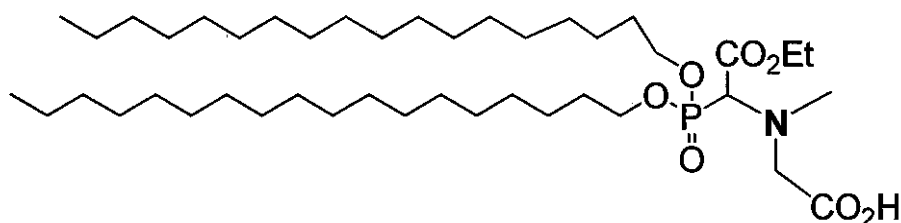
実施例 2 3

【0174】

2 - ((1 - (ビス (オクタデシルオキシ) ホスホリル) - 3 - エトキシ - 3 - オキソエチル) (メチル) アミノ) 酢酸。化学式：C₄₃H₈₆NO₇P、精密質量：759.61419、分子量：760.12 g / m o l 。

20

【化 4 3】



30

【0175】

2 5 m L 丸底フラスコ中で、4 m L トルエンおよび 4 m L ジメチルスルホキシド中のサルコシン (0 . 2 1 g 、 2 . 3 m m o l) 、ホスホン酸水素ジオクタデシル (0 . 6 9 g 、 1 . 2 m m o l) 、1 - オクタデカノール (0 . 6 3 g 、 2 . 3 m m o l) およびグリオキシル酸エチル (0 . 3 6 g 、 1 . 8 m m o l) を、アルゴン下、1 0 0 で 1 6 時間攪拌した。³¹P NMR によって、C D C l₃ 中の反応混合物を検査したところ、有意な所望の生成物 (2 4 . 8 p p m) の存在が示された。5 % 水酸化アンモニウムを含有するクロロホルム / イソプロパノール勾配を使用して、順相フラッシュクロマトグラフィーによって反応混合物を精製し、所望の 2 - ((1 - (ビス (オクタデシルオキシ) ホスホリル) - 3 - エトキシ - 3 - オキソエチル) (メチル) アミノ) 酢酸を得た。

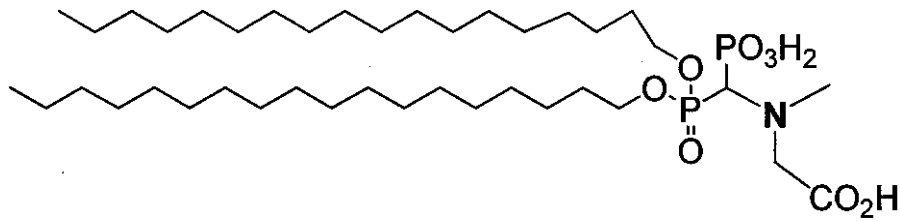
40

実施例 2 4

【0176】

2 - (((ビス (オクタデシルオキシ) ホスホリル) (ホスホノ) メチル) (メチル) アミノ) 酢酸。化学式：C₄₀H₈₃NO₈P₂、分子量：768.04 g / m o l 。

【化 4 4】



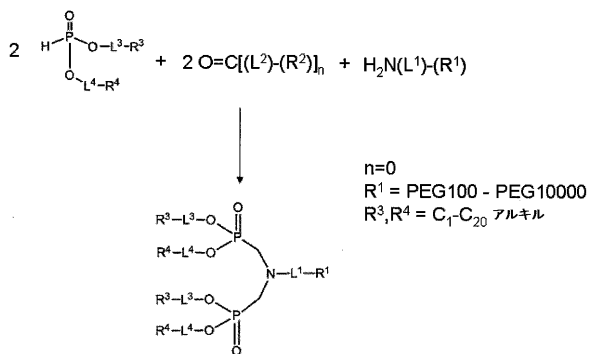
10

【 0 1 7 7】

実質的には実施例 23 の手順に従うことによって標題化合物を調製することができるが、グリオキシル酸エチルを同様の割合でホルミルホスホン酸 (Wagenknecht, J. H., Journal of the Electrochemical Society (1976), 123 (5), 620-4、米国特許第 4568432 号明細書および国際公開第 9850391 号) に替える。

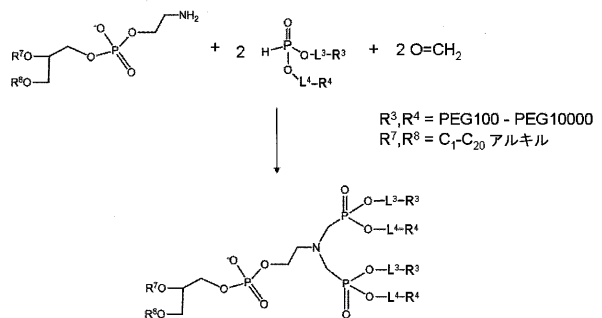
【 図 1】

FIGURE 1



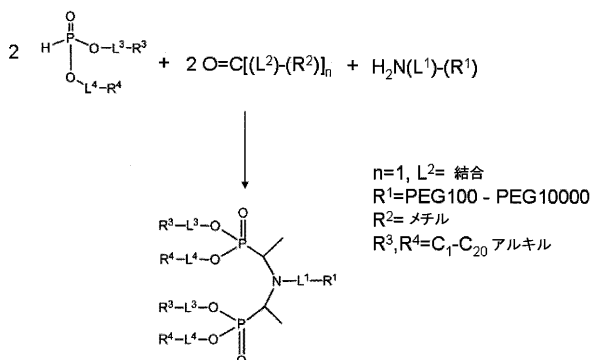
【 図 3】

FIGURE 3



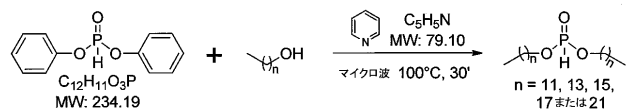
【 図 2】

FIGURE 2

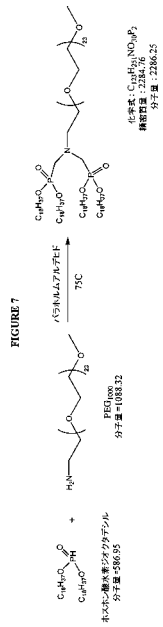


【 図 6】

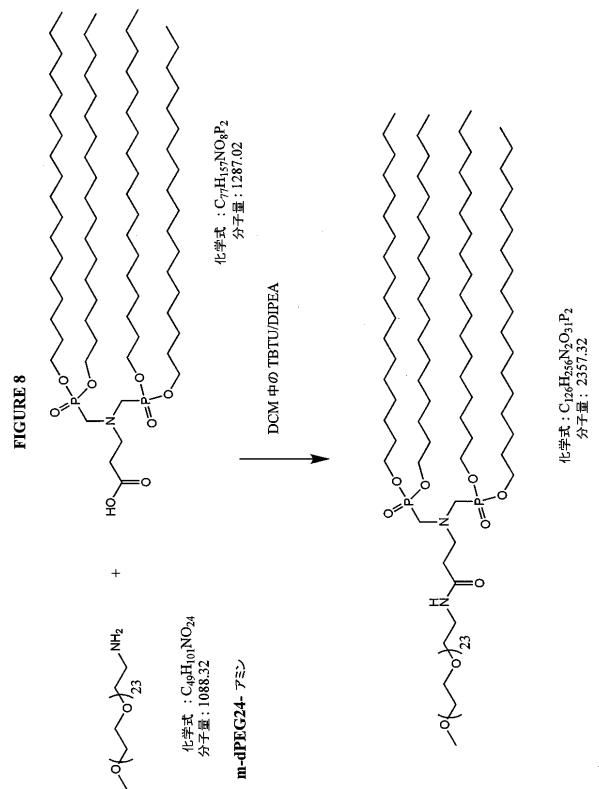
FIGURE 6



【図 7】

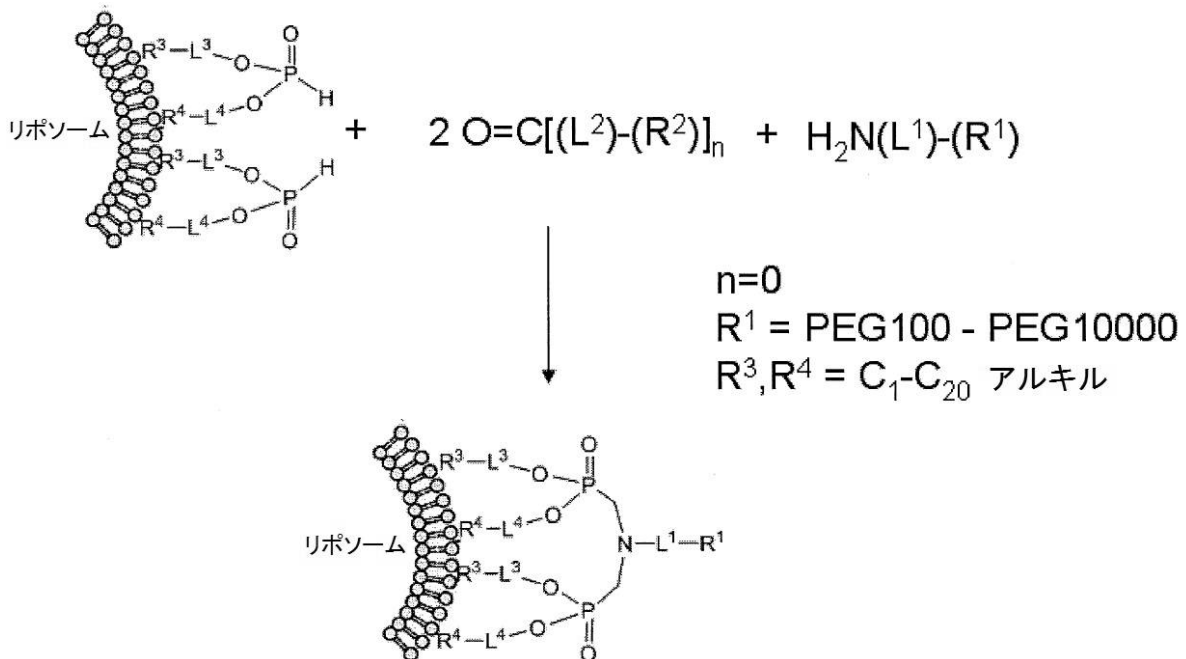


【図 8】



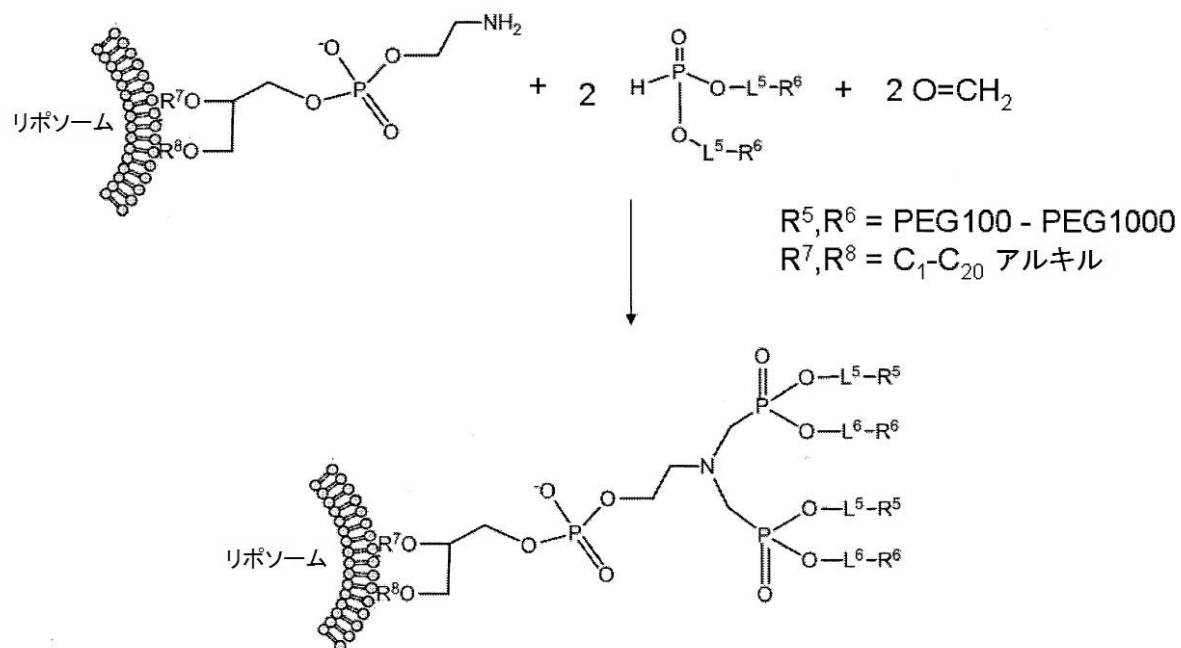
【図 4】

FIGURE 4



【 図 5 】

FIGURE 5



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2012/053197

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K47/48
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BAROUDA E. ET AL.: "BARIUM SULFATE CRYSTALLIZATION IN THE PRESENCE OF VARIABLE CHAIN LENGTH AMINOMETHYLENETETRAPHOSPHONATES AND CATIONS (NA+ OR ZN+)", CRYSTAL GROWTH AND DESIGN, vol. 7, no. 2, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 321-327, XP002686095,	1,11
Y	Abstract, Scheme 1, page 322 Figure 1 -----	1-25
X	GB 2 113 861 A (AGFA GEVAERT AG) 10 August 1983 (1983-08-10)	1,11
Y	Compound 2 page 2; pages 2-4 compounds 1-11 -----	1-25
X	EP 2 221 372 A1 (UNIV TOKYO [JP]) 25 August 2010 (2010-08-25)	1-3,6,7, 11
Y	Claims 2 par. 25 and 49; figure 2. -----	1-25
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 October 2012

Date of mailing of the international search report

27/02/2013

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bettio, Andrea

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/053197

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2011/097563 A1 (UNIV NEBRASKA [US]; WANG DONG [US]; LIU XIN-MING [US]) 11 August 2011 (2011-08-11) Claims 1-6; Page 5, lines 1-5; Page 2 lines 2-6; Page 7, compound III. -----	1-25
Y	CHOI ET AL: "Design of surface-modified poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles for targeted drug delivery to bone", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 122, no. 1, 22 August 2007 (2007-08-22), pages 24-30, XP022208572, ISSN: 0168-3659, DOI: 10.1016/J.JCONREL.2007.06.003 Abstract, page 26, figure 1; page 25 paragraphs 2.3-2.5 -----	1-25
Y	WO 2005/070952 A1 (MCS MICRO CARRIER SYSTEMS GMBH [DE]; GREB WOLFGANG [DE]; SHYHSKOV OLEG) 4 August 2005 (2005-08-04) Claims 1-6; page 7. paragraphs 4-6; page 8 second paragraph; page 12-13. -----	1-25
X,P	WO 2011/137135 A1 (GLAXOSMITHKLINE LLC [US]; AQUINO CHRISTOPHER JOSEPH [US]; COLLINS JON) 3 November 2011 (2011-11-03) page 117 examples 60 and 61. -----	1,11
A	BALARAMAN E ET AL: "Hydrophosphonylation of activated alkenes and alkynes via fluoride ion activation in ionic liquid medium", TETRAHEDRON, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 65, no. 36, 5 September 2009 (2009-09-05), pages 7603-7610, XP026437279, ISSN: 0040-4020, DOI: 10.1016/J.TET.2009.06.096 [retrieved on 2009-07-01] the whole document -----	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/053197

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB 2113861	A	10-08-1983	DE 3202127 A1	28-07-1983
			GB 2113861 A	10-08-1983
			JP 58129429 A	02-08-1983
			US 4474854 A	02-10-1984

EP 2221372	A1	25-08-2010	EP 2221372 A1	25-08-2010
			US 2012059147 A1	08-03-2012
			WO 2009066513 A1	28-05-2009

WO 2011097563	A1	11-08-2011	AU 2011213631 A1	30-08-2012
			CN 102811707 A	05-12-2012
			EP 2533764 A1	19-12-2012
			US 2013004425 A1	03-01-2013
			WO 2011097563 A1	11-08-2011

WO 2005070952	A1	04-08-2005	AT 527277 T	15-10-2011
			DE 102004032781 A1	11-08-2005
			DK 1706415 T3	20-02-2012
			EP 1706415 A1	04-10-2006
			ES 2375060 T3	24-02-2012
			JP 4851946 B2	11-01-2012
			JP 2007518746 A	12-07-2007
			US 2007154537 A1	05-07-2007
			WO 2005070952 A1	04-08-2005

WO 2011137135	A1	03-11-2011	AR 081337 A1	08-08-2012
			CA 2795543 A1	03-11-2011
			CN 102858159 A	02-01-2013
			EP 2563122 A1	06-03-2013
			SG 184812 A1	29-11-2012
			US 2013029938 A1	31-01-2013
			UY 33353 A	01-12-2011
			WO 2011137135 A1	03-11-2011

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2012/053197**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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

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:

see additional sheet

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 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.:

see Annex

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 Application No. PCT/ US2012/ 053197

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-25

Compounds according to the formula of present claim 1 and methods for their preparation.

2. claims: 26-40

Compounds according to the formula of present claim 26 and methods for their preparation

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 47/36 (2006.01)		A 6 1 K 47/36		4 J 0 0 5
A 6 1 K 47/28 (2006.01)		A 6 1 K 47/28		
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00		
A 6 1 K 31/704 (2006.01)		A 6 1 K 31/704		
A 6 1 K 31/282 (2006.01)		A 6 1 K 31/282		
A 6 1 K 31/513 (2006.01)		A 6 1 K 31/513		
A 6 1 K 31/7068 (2006.01)		A 6 1 K 31/7068		
A 6 1 K 49/00 (2006.01)		A 6 1 K 49/00	A	
A 6 1 K 51/00 (2006.01)		A 6 1 K 49/02	A	
A 6 1 K 31/337 (2006.01)		A 6 1 K 31/337		
C 0 8 G 65/335 (2006.01)		C 0 7 F 9/40	C	
		C 0 8 G 65/335		

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

Fターム(参考) 4C086 AA01 AA02 BA02 BC43 EA10 EA17 MA03 MA05 MA24 NA13
 ZB26
 4C206 AA01 AA02 JB15 JB17 MA03 MA05 MA44 NA13 ZB26
 4H050 AA01 AA02 AA03 AB20 AC50 WA12 WA26
 4J005 AA04 BD05 BD07