

(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2011-509311
(P2011-509311A)

(43) 公表日 平成23年3月24日(2011.3.24)

(51) Int.Cl.

A61K 47/34 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

F 1

A 61 K 47/34
A 61 K 37/02

テーマコード(参考)

4 C 076
4 C 084

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 39 頁)

(21) 出願番号 特願2010-542394 (P2010-542394)
 (86) (22) 出願日 平成21年1月9日 (2009.1.9)
 (85) 翻訳文提出日 平成22年7月26日 (2010.7.26)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2009/030678
 (87) 國際公開番号 WO2009/089506
 (87) 國際公開日 平成21年7月16日 (2009.7.16)
 (31) 優先権主張番号 11/971,482
 (32) 優先日 平成20年1月9日 (2008.1.9)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 510189606
 ファーマイン コーポレイション
 アメリカ合衆国 ワシントン 98122
 , シアトル, ブロードウェイ 720
 , スイート 511
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 カスティロ, ジェラルド エム.
 アメリカ合衆国 ワシントン 98021
 , ボーセル, 37ティーエイチ アベ
 ニュー エスイー 20716
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】治療薬送達のための可溶性疎水性コア担体組成物、およびその製造・使用方法

(57) 【要約】

本発明は、(i)直鎖高分子主鎖、(ii)直鎖高分子主鎖に共役的に結合し吊り下がった複数の親水性高分子保護鎖、および(iii)直鎖高分子主鎖に共役結合し吊り下がった少なくとも1つの疎水性部分を有する、可溶性の疎水性コア担体組成物に関する。特定の実施例では、担体中の疎水性部分に対する親水性保護鎖の重量比は少なくとも15:1である。他の実施例では、高分子主鎖残基の少なくとも90%が親水性高分子保護鎖または疎水性部分に結合している。他の実施例では、組成物はさらに(iv)担体の疎水性部分に解離結合した疎水性負荷分子を有する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

可溶性の疎水性コア担体組成物であって：

- (i) 直鎖高分子主鎖、
- (ii) 約400～約20,000ダルトンの間の分子量を有し、前記高分子主鎖に共役結合し、吊り下がっている複数の親水性高分子保護側鎖、および
- (iii) 前記高分子主鎖に共役結合し吊り下がっている少なくとも1つの疎水性部分を有し、

前記親水性高分子保護側鎖と前記疎水性部分の重量比は、前記組成物が水に溶解するよう10
に選択される組成物。

【請求項 2】

前記親水性高分子保護側鎖と前記疎水性部分の重量比が少なくとも15:1、少なくとも17:1、少なくとも20:1、少なくとも50:1、または少なくとも100:1である、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3】

前記高分子主鎖の残基の少なくとも90%が親水性保護鎖または疎水性部分で誘導体化されている、請求項1に記載の組成物。

【請求項 4】

前記保護側鎖がポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリエチレングリコール共重合体、ポリプロピレングリコール共重合体、多糖類、またはそのアルコキシ誘導体を含有する、請求項1に記載の組成物。20

【請求項 5】

前記アルコキシ誘導体がメトキシポリエチレングリコール、メトキシポリプロピレングリコール、メトキシリ化共重合体ポリエチレングリコールおよびポリプロピレングリコール、またはエトキシ化多糖体である、請求項4に記載の組成物。

【請求項 6】

前記直鎖高分子主鎖がポリリシン、ポリアスパラギン酸、ポリグルタミン酸、ポリセリン、ポリトレオニン、ポリシステイン、ポリグリセロール、天然サッカリド、アミノ化多糖類、アミノ化オリゴ糖、ポリアミドアミン、ポリアクリル酸、ポリアルコール、スルホン化多糖類、スルホン化オリゴ糖、カルボキシリ化多糖類、カルボキシリ化オリゴ糖、アミノカルボキシリ化多糖類、アミノカルボキシリ化オリゴ糖、カルボキシメチル化多糖類、およびカルボキシメチル化オリゴ糖から成るグループから選択される、請求項1に記載の組成物。30

【請求項 7】

さらに以下を含有する請求項1に記載の組成物：

- (iv) 前記主鎖の前記疎水性部分に解離結合した負荷分子。

【請求項 8】

前記親水性保護側鎖がメトキシポリエチレングリコールを含む、請求項7に記載の組成物。
。

【請求項 9】

前記高分子主鎖がポリリシンを含む、請求項8に記載の組成物。40

【請求項 10】

前記疎水性部分が脂肪酸を含む、請求項9に記載の組成物。

【請求項 11】

前記負荷分子が治療薬である、請求項10に記載の組成物。

【請求項 12】

前記治療薬が疎水性ペプチド、疎水性タンパク質、または疎水性薬物である、請求項11に記載の組成物。

【請求項 13】

前記治療薬がGLP-1である、請求項11に記載の組成物。50

【請求項 1 4】

前記治療薬がGLP-2、レプチニン、胰島アミロイドポリペプチドおよび血管作動性腸管ペプチドから選択される、請求項11に記載の組成物。

【請求項 1 5】

前記直鎖高分子主鎖がポリリシンである、請求項7に記載の組成物。

【請求項 1 6】

前記疎水性部分が、6炭素脂肪酸から36炭素脂肪酸の範囲から選択された脂肪酸を含む、請求項7に記載の組成物。

【請求項 1 7】

前記疎水性部分が少なくとも1つの二重結合を持つ脂肪酸を含む、請求項7に記載の組成物

。

【請求項 1 8】

複数の脂肪酸を含む部分を有する、請求項7に記載の組成物。

【請求項 1 9】

前記疎水性部分が芳香環を含む部分を有する、請求項7に記載の組成物。

【請求項 2 0】

前記治療薬が疎水性ペプチド、疎水性タンパク質、および疎水性薬物である、請求項7に記載の組成物。

【請求項 2 1】

前記治療薬がGLP-1、GLP-2、レプチニン、胰島アミロイドポリペプチドおよび血管作動性腸管ペプチドから選択される、請求項7に記載の組成物。

【請求項 2 2】

前記保護側鎖に共有結合した標的分子をさらに含む、請求項7に記載の組成物。

【請求項 2 3】

前記標的分子が、抗体、抗体断片、キメラ抗体、レクチン、受容体リガンド、タンパク質、酵素、ペプチド、サッカリド、酵素の擬似基質、細胞表面結合化合物、および細胞外基質結合化合物から成るグループから選択される、請求項22に記載の組成物。

【請求項 2 4】

前記疎水性部分に共有結合した第二の一連の保護鎖をさらに含む、請求項7に記載の組成物。

【請求項 2 5】

前記負荷分子が治療薬である、請求項7～24に記載の任意の1つの組成物を含む医薬組成物。

【請求項 2 6】

組成物製造方法であって：

(a) pH 7～8の水性緩衝液中の遊離アミノ基を含有する残基を含む高分子主鎖を溶解して溶液Aを取得し、

(b) pH 3～7の酸性緩衝液中、カルボジイミド試薬と混合することにより、保護鎖カルボキシル基またはアルキルカルボキシル基を活性化して溶液Bを取得し、

(c) 溶液Bを溶液Aに加えて、共有結合した保護鎖を持つ高分子主鎖を含み、pHが7以上である溶液Cを得るステップを有する方法。

【請求項 2 7】

組成物製造方法であって：

(a) 保護鎖に共有結合した高分子主鎖を含有する成分を第三アミンを含む非水溶媒に溶解し、ここで高分子主鎖は遊離アミノ基を含む残基を含むが、これにより溶液Eを取得し、

(b) 遊離カルボキシル基を含む疎水性分子を非水溶媒に溶解し、カルボジイミド試薬を加えてカルボキシル基を活性化して溶液Fを取得し、

(c) 溶液Fを溶液Eに加えて溶液Gを得て、活性化カルボキシル基と遊離アミン基との間に共有結合を形成するが、ここで、少なくとも90%の残基が保護鎖または疎水性基に結

10

20

30

40

50

合するまで、溶液Eを溶液Gに加えるステップを有する方法。

【請求項 28】

組成物製造方法であって：

(a) 保護鎖に共有結合した高分子主鎖を含む成分をpH 7~9の部分的水性溶媒に溶解し、ここで高分子主鎖は遊離アミノ基を含有する残基を含むが、これにより溶液Eを取得し、

(b) 遊離カルボキシル基を含有する疎水性分子をpH 3~7の部分的水性溶媒に溶解し、カルボジイミド試薬を加えてカルボキシル基を活性化して溶液Fを取得し、

(c) 混合物のpHを7~8に保ちながら、溶液Fを溶液Eに加えて溶液Gを取得し、活性化カルボキシル基と遊離アミン基との間に共有結合を形成するが、ここで、少なくとも90%の残基が保護鎖または疎水性基に結合するまで、溶液Eを溶液Gに加えるステップを有する方法。 10

【請求項 29】

組成物負荷方法であって：

(a) 以下を含む可溶性の疎水性コア担体組成物を、水性または部分的水性溶媒Aに溶解するステップを有する方法：(i) 直鎖高分子主鎖、(ii) 分子量は約400~約20,000ダルトンの間であり、高分子主鎖に共役結合し吊り下がっている複数の親水性高分子保護鎖、(iii) 親水性高分子保護側鎖と疎水性部分の重量比は、組成物が水に溶解するように選択され、これによって溶液Aが得られる高分子主鎖に共役結合し吊り下がっている少なくとも1つの疎水性部分。 20

(b) 負荷分子を水性または部分的水性溶媒に溶解して、溶液Bを取得し、

(c) 溶液Aを溶液Bに混合して溶液Cを取得し、溶液Cを30分以上インキュベートして凍結乾燥または溶媒蒸発し、適切な溶媒に溶解することができる負荷担体を取得するステップを有する方法。 30

【請求項 30】

被験者に治療用分子を投与する方法であって：

以下を含む組成物を被験者に投与する方法：

(i) 直鎖高分子主鎖、

(ii) 分子量は約400~約20,000ダルトンの間であり、高分子主鎖に共役結合し、吊り下がっている複数の親水性高分子保護側鎖、 30

(iii) 高分子主鎖に共役結合し吊り下がっている少なくとも1つの疎水性部分、

(iv) 主鎖の疎水性部分に解離結合した治療用分子、

ここで、親水性高分子保護側鎖と疎水性部分の重量比は、組成物が水に溶解するように選択される。 40

【請求項 31】

前記組成物が皮下または筋肉内投与される、請求項30に記載の方法。

【請求項 32】

医薬品組成物であって：

(a) 以下を含む組成物：

(i) 直鎖高分子主鎖、

(ii) 分子量は約400~約20,000ダルトンの間であり、高分子主鎖に共役結合し、吊り下がっている複数の親水性高分子保護側鎖、 40

(iii) 高分子主鎖に共役結合し、吊り下がっている少なくとも1つの疎水性部分、

(iv) 主鎖の疎水性部分に解離結合した治療用分子、

ここで、親水性高分子保護側鎖と疎水性部分の重量比は、組成物が水に溶解するように選択される組成物と、

(b) 薬学的に許容される担体、

とを有し、組成物は単位用量形態である組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】**相互参照**

本出願は米国特許出願第11/971,482号（2008年1月9日出願）の利益を主張し、その出願は参照により本書に組み込まれる。

【0002】**政府認可権**

本書に記載された研究は一部、国立糖尿病・消化器病・腎臓病研究所（National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases、NIDDK）から授与された政府支援5 R43 DK069727により行なわれた。米国政府は本書に記載された表題の件について一定の権利を持つ場合がある。10

【背景技術】**【0003】****発明の背景**

生理的に活性なペプチドおよびタンパク質の投与のための新薬、製剤および他のシステム、および他の疎水性薬剤または治療薬の開発は、望ましい生理的効果の達成ニーズによって推進される。ペプチドおよびタンパク質は血液中および胃腸管内で不安定であることが観察されており、そのため送達前に安定化または保護し、胃腸管または循環器系内でも引き続き保護する必要がある場合がある。活性医薬品が一旦、体循環に入ると、低分子量のものは腎臓を経て体循環から効率的に排除されるために、生物学的半減期が短い傾向がある。さらに、単球／マクロファージによる認識により、または補体成分によるオプソニン化の結果として、それらの一部分も網内系吸収を介して排除され得る。それらはまた、プロテアーゼまたは他の酵素により生体内で活性を失い得る。20

【0004】

既存の薬物送達システムは、ある程度これらの望ましくない効果を回避し、生体内でのペプチドおよびタンパク質送達に有用であり得るが、記載のように一定の欠点がある。まず、ポンプによる薬物の連続的体内注入が利用できる。この戦略は、臨床診療において効率的であることが証明されているが、高い移動レベルを必要とする外来患者にとっては実用的でない場合があり、生活の質および静脈（I.V.）ラインの感染の可能性という不利益を伴う。

【0005】

次に、ペプチドおよびタンパク質は、例えば望ましい放出速度で薬物を拡散させる膜を持つカプセルから成る埋め込み型ポンプに含めることができる。これらのカプセルの容量は限られているため、ペプチドおよびタンパク質はしばしば濃縮製剤として使用され、このため凝集による溶解性の喪失および特定活性の喪失の可能性が生じる。ほとんどの場合、薬物は通常、細胞外空間に放出されリンパ管に分布する。ペプチドまたはタンパク質の全体的濃度は、局所リンパ節活性および埋め込み部位のリンパ節廃液効果の影響を受ける場合がある。また、カプセル材料への宿主反応の可能性もあるが、一般的にこの副作用はそれほど頻繁ではない。30

【0006】

第三に、この薬物送達システムは、例えば高分子基質、粒子または膜小胞（リポソーム）などの生分解性薬物送達媒体または担体へのカプセル化または包含により、生分解性にすることができる。これらの送達システムは通常、埋め込み可能か注入可能である。埋め込み可能な薬物送達システムは、周囲細胞の生物活性によって（すなわち、これらのインプラントを結び付けている化学結合を分解する酵素の放出によって）システムの成分が通常ゆっくりと分解する部位の皮下にしばしば配置される。40

【0007】

ポリリシンおよび他のポリアミノ酸は、過去にリン脂質基の付加により変化を起こされ、DNAトランスフェクションに使用されている（非特許文献1および非特許文献2）。ポリリシンはまた、ポリエチレングリコールなどの親水性基、保護基（非特許文献3）、およびさまざまな糖類（非特許文献4および非特許文献5）の付加によっても変化を引き起50

こしているが、明確な疎水部分はない。さらに、さまざまな薬物（非特許文献6）およびトランスフェリンなどの標的残基（非特許文献7）、アシアロ糖タンパク質（非特許文献8）およびモノクローナル抗体（非特許文献9）がポリリシンと抱合されている。

【0008】

Bogdanovらの特許文献1では、高分子担体、高分子担体に結合した保護鎖、担体または担体と保護鎖に結合したレポーター基、および可逆的に結合したPt(II)化合物を含む、診断用の生体適合性グラフト共重合体付加物を開示している。

【0009】

Bolotinの特許文献2では、両側に2つの金属結合分子が並ぶ金属架橋を含む生体適合性グラフト共重合体を開示しており、ここで金属結合分子の1つは、治療薬の一部となっているか、またはこれに共有結合している。架橋は、担体と結合可能な治療薬を結合する。

10

【0010】

Uchegbuの特許文献3では、MPEG、脂肪酸およびコレステロールでグラフト化されたポリリシンを含むポリアミノ酸小胞を開示している。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【特許文献1】米国特許第5,871,710号明細書

20

【特許文献2】米国特許第7,138,105号明細書

【特許文献3】米国特許第6,576,254号明細書

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】Zhou, X H et al (1991) Biochem. Biophys. Acta 1065: 8-14

20

【非特許文献2】Zhou, X h, Huang L (1994) Biochem. Biophys. Acta 1189: 195-203

30

【非特許文献3】Dash P R, et al (1997) J. Contr. Rel. 48: 269-276

【非特許文献4】Kollen W J W, et al, (1996) Human Gene Ther. 13: 1577-1586

30

【非特許文献5】Erbacher P, et al (1997) Biochimica Biophysica Acta 1324: 27-36

【非特許文献6】Hudecz F. et al (1993) Bioconjugate chemistry 4: 25-33

【非特許文献7】Wagner, E (1994) Adv. Drug Delivery Rev. 14: 113-135

【非特許文献8】Chowdhury, N R et al (1993) J. Biol. Chem. 268: 11265-11271

【非特許文献9】Chen, J B et al (1994) Febs Lett 338: 167-169

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0013】

40

発明の概要

本発明は、新規薬物送達システムおよびその製造・使用方法に向けたものである。本発明は、持続放出能力があり、安全で、生体適合性があり、既知の化学および化合物から容易に作成され、その放出速度を単純なメカニズムにより容易に調整でき、ペプチド、タンパク質および他の疎水性薬物などさまざまな治療薬に適している治療薬用送達システムを提供することを目的としている。本発明は、反復ユニット（残基と呼ばれる）でできた直線状高分子主鎖（骨格）を持つ新しい保護グラフト高分子担体を提供し、残基は好ましくは30～500の間で、修飾可能な官能基（アミノ、カルボキシ基、水酸基、硫黄、およびリン酸塩など）を持ち、少なくとも1つの疎水性部分と高分子主鎖から吊り下がった複数の親水性保護基を、組成物が水中で溶解する重量比および皮下送達ができるサイズで含むよ

50

うに修飾される。多数の保護基は、負荷分子が解離による放出の前に担体表面にさらされないように保護するための盾の役割を果たす。

【0014】

本発明は、患者の体内の疎水性ペプチド、疎水性タンパク質および疎水性薬物を、小胞を使用せずに制御された方法で送達する手段を提供する。制御された方法とは、循環中の活性治療用分子のレベルが、望ましい期間、毒性レベルを超えた治癒効果のあるレベルを下回ったりしないことを意味する(図7参照)。循環中の遊離負荷分子のレベルが治癒効果レベルを下回った時に、本発明の担体が遊離して活性な治癒薬、またはさらに広い意味では「負荷分子」を放出する能力は容易に調整することができる。本発明の担体は、アルキル鎖がより一般的に使用される疎水性部分の長さ、数および密度を制御することにより、高負荷能力を持ちかつ放出速度が調整可能なように作成し得る。放出速度は、担体のサイズによっても制御できる。本発明の担体は、担体の免疫原性のより高いコアを遮る複数の非免疫原性保護鎖が存在するため、安全で非免疫原性である。

10

【0015】

一態様では、この発明は可溶性の疎水性コア担体組成物を提供し、以下を含む：(i)直鎖高分子主鎖、(ii)各保護側鎖は約400～約20,000ダルトンの間の分子量を有し、高分子主鎖に共役結合し、吊り下がっている複数の親水性高分子保護鎖、(iii)高分子主鎖に共役結合し吊り下がっている少なくとも1つの疎水性部分であって、親水性高分子保護側鎖と疎水性部分の重量比は、組成物が水に溶解するように選択される。1つの実施例では、親水性高分子保護側鎖と疎水性部分の重量比は少なくとも15:1、少なくとも17:1、少なくとも20:1、少なくとも50:1、または少なくとも100:1である(表2参照)。別の実施例では、高分子主鎖の残基の少なくとも90%が、親水性保護鎖または疎水性部分のいずれかで誘導体化されている。別の実施例では、保護側鎖は、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリエチレングリコール共重合体、ポリプロピレングリコール共重合体、多糖類、またはそのアルコキシ誘導体を有する。別の実施例では、アルコキシ誘導体は、メトキシポリエチレングリコール、メトキシポリプロピレングリコール、メトキシル化共重合体ポリエチレングリコールおよびポリプロピレングリコール、またはエトキシ化多糖体である。別の実施例では、直鎖高分子主鎖は、ポリリシン、ポリアスパラギン酸、ポリグルタミン酸、ポリセリン、ポリトレオニン、ポリシステイン、ポリグリセロール、天然サッカリド、アミノ化多糖類、アミノ化オリゴ糖、ポリアミドアミン、ポリアクリル酸、ポリアルコール、スルホン化多糖類、スルホン化オリゴ糖、カルボキシル化多糖類、カルボキシル化オリゴ糖、アミノカルボキシル化多糖類、アミノカルボキシル化オリゴ糖、カルボキシメチル化多糖類、およびカルボキシメチル化オリゴ糖から成るグループから選択される。

20

【0016】

別の態様において、この発明は前述の可溶性の疎水性コア担体組成物を提供し、さらに主鎖の疎水性部分に解離結合した負荷分子を含む。1つの実施例では、親水性保護側鎖はメトキシポリエチレングリコールを含有する。1つの実施例では、親水性保護側鎖はメトキシポリエチレングリコールを含有し、高分子主鎖はポリリシンを含有する。別の実施例では、親水性保護側鎖はメトキシポリエチレングリコールを含有し、高分子主鎖はポリリシンを含有し、疎水性部分は脂肪酸を含有する。別の実施例では、親水性保護側鎖はメトキシポリエチレングリコールを含有し、高分子主鎖はポリリシンを含有し、疎水性部分は脂肪酸を含有し、負荷分子は治癒薬である。1つの実施例では、治癒薬は疎水性ペプチド、疎水性タンパク質、または疎水性薬物である。別の実施例では、治癒薬はGLP-1である。別の実施例では、治癒薬はGLP-2、レプチン、膵島アミロイドポリペプチドおよび血管作動性腸管ペプチドから選択される。

30

【0017】

別の態様において、この発明は、前述の可溶性の疎水性コア担体組成物を提供し、直鎖高分子主鎖がポリリシンであるところの主鎖の疎水性部分に解離結合している負荷分子を含む。1つの実施例では、疎水性部分は、炭素数6～36の脂肪酸から選択された脂肪酸を

40

50

含有する。別の実施例では、疎水性部分は、少なくとも1つの二重結合を持つ脂肪酸を含有する。別の実施例では、疎水性部分は、複数の脂肪酸を含む部分を有する。別の実施例では、疎水性部分は、芳香環を含む部分を有する。

【0018】

一部の実施例では、溶解性を促進し、または親水性保護鎖と疎水性部分の重量比が15:1を上回るようにし、それによって小胞形成および析出が回避されるように、担体は、疎水性部分に共有結合する第二の保護鎖を任意に含む。

【0019】

さまざまな実施例では、負荷分子は治療薬または造影剤である場合がある。1つの実施例では、治療薬は疎水性ペプチド、疎水性タンパク質、または疎水性薬物である。別の実施例では、治療薬は、治療薬はGLP-2、レプチン、膵島アミロイドポリペプチド(IAPP、アミリンとしても知られる)および血管作動性腸管ペプチド(VIP)であり得る。1つの実施例では、治療薬は疎水性ポリヌクレオチド、疎水性ペプチド、疎水性タンパク質、または疎水性薬物である場合がある。疎水性ペプチド/タンパク質は、ペプチドアプタマー、グルカゴン様ペプチド、グルカゴン様ペプチド誘導体、エクセナチド、レプチン、レプチン断片、ペプチドYY、-メラノサイト刺激ホルモン、アジポネクチン、オベスタチン、胃抑制ポリペプチド(GIP)、上皮成長因子(EGF)受容体リガンド、EGF、形質転換成長因子-(TGF-)、ベタセルリン、ガストリン/コレシストキニン受容体リガンド、ガストリン、コレシストキニン、インターフェロン、インターフェロン、インターフェロン、インターフェロン、インターフェロン、インターロイキン-1、インターロイキン-2、インターロイキン-4、インターロイキン-6、インターロイキン-8、インターロイキン-10、インターロイキン-12、腫瘍壞死因子、腫瘍壞死因子、腫瘍壞死因子、インスリン、インスリン様成長因子、成長ホルモン、神経成長因子、脳由来神経栄養因子、酵素、エンドスタチン、アンジオスタチン、トロンボスponジン、ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、血液凝固因子VII、血液凝固因子VIII、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、トロンボポエチン、カルシトニン、副甲状腺ホルモン(PTH)およびその断片、エリスロポエチン、心房性ナトリウム利尿因子、モノクローナル抗体、モノクローナル抗体断片、ソマトスタチン、プロテアーゼ阻害剤、副腎皮質刺激ホルモン、ゴナドトロピン放出ホルモン、オキシトシン、黄体形成ホルモン放出ホルモン、卵胞刺激ホルモン、グルコセレブロシダーゼ、トロンボポエチン、フィルグラスチン、テリプレシン、および血管作動性腸管ペプチド(VIP)である場合がある。

【0020】

さらなる実施例では、本発明は、保護基の遠位端に共有結合した標的部分をさらに含む前述の組成物すべてに関連する。標的部分は、抗体、抗体の断片、キメラ抗体、レクチン、受容体リガンド、タンパク質、酵素、ペプチド、サッカリド、酵素の擬似基質、細胞表面結合化合物、および細胞外基質結合化合物である場合がある。

【0021】

別の態様では、この発明は、負荷分子が治療薬であって、上記の組成物から選択された任意の1つの組成物を含む医薬組成物を提供する。

【0022】

別の態様では、この発明は組成物の製造方法を提供し、以下の方法を含む：(a) pH 7~8の水性緩衝液に遊離アミノ基から成る残基を含む高分子主鎖を溶解して溶液Aを得て、(b) pH 3~7の酸性緩衝液中、カルボジイミド試薬と混合することにより、保護鎖のカルボキシル基またはアルキルカルボキシル基を活性化して溶液Bを得て、(c) 溶液Bを溶液Aに加えて、そのpHが7以上で、共有結合した保護鎖を持つ高分子主鎖を含む溶液Cを得る。

【0023】

別の態様では、この発明は組成物の製造方法を提供し、以下の方法を含む：(a) 保護鎖に共有結合した高分子主鎖を有する成分を、第三アミンを含む非水溶媒に溶解し、ここで高分子主鎖は遊離アミノ基から成る残基を有するが、これにより溶液Eを得て、(b) 非

10

20

30

40

50

水溶媒に、遊離カルボキシル基を含む疎水性分子を溶解して、カルボジイミド試薬を添加することによりカルボキシル基を活性化して溶液Fを得て、(c) 溶液Fを溶液Eに加えて溶液Gを得て、活性化されたカルボキシル基と遊離アミン基の間に共役結合を形成するが、ここで溶液Eは、少なくとも残基の90%が保護鎖または疎水性基に結合されるまで溶液Gに加えられる。

【0024】

別の態様では、この発明は組成物の製造方法を提供し、以下の方法を含む：(a) 保護鎖に共有結合した高分子主鎖を有する成分をpH 7~9の部分的水性溶媒に溶解し、ここで高分子主鎖は遊離アミノ基から成る残基を有するが、これにより溶液Eを得て、(b) pH 3~7の部分的水性溶媒に、遊離カルボキシル基を含む疎水性分子を溶解して、カルボジイミド試薬を添加することによりカルボキシル基を活性化して溶液Fを得て、(c) 混合物のpHを7~8に保ちながら溶液Fを溶液Eに加えて溶液Gを得て、活性化されたカルボキシル基と遊離アミン基の間に共役結合を形成するが、ここで溶液Eは、少なくとも90%の残基が保護鎖または疎水性基に結合されるまで溶液Gに加えられる。

10

【0025】

別の態様では、この発明は組成物の負荷方法を提供し、以下の方法を含む：(a) 以下から成る可溶性の疎水性コア担体組成物を、水性または部分的水性溶媒Aに溶解する：(i) 直鎖高分子主鎖、(ii) 各保護側鎖は約400~約20,000ダルトンの間の分子量を有し、高分子主鎖に共有結合し、吊り下がっている複数の親水性高分子保護鎖、(iii) 高分子主鎖に共有結合し吊り下がっている少なくとも1つの疎水性部分、ここで親水性高分子保護側鎖と疎水性部分の重量比は、組成物が水に溶解するように選択されるが、これにより溶液Aを調製する。(b) 負荷分子を水性または部分的水性溶媒に溶解して溶液Bを調製し、(c) 溶液Aと溶液Bを混合して溶液Cを調製し、溶液Cを30分間以上インキュベートしてその後凍結乾燥または溶媒蒸発して、適切な溶媒に溶解する準備のできている負荷担体を得る。

20

【0026】

別の態様では、この発明は、被験者に治療分子を投与する方法を提供するが、これは以下から成る組成物を被験者に投与することを含む：(i) 直鎖高分子主鎖、(ii) 各保護側鎖は約400~約20,000ダルトンの間の分子量を有し、高分子主鎖に共役結合し吊り下がっている親水性高分子保護鎖、(iii) 高分子主鎖に共役結合し吊り下がっている少なくとも1つの疎水性部分、(iv) 親水性高分子保護側鎖と疎水性部分の重量比は、組成物が水に溶解するように選択され、主鎖の疎水性部分に解離結合した治療分子。1つの実施例では、組成物は皮下または筋肉内投与される。

30

【0027】

別の態様では、この発明は医薬組成物を提供し、組成物は以下を含む：(a) 以下を含む組成物：(i) 直鎖高分子主鎖、(ii) 各保護側鎖は約400~約20,000ダルトンの間の分子量を有し、高分子主鎖に共役結合し、吊り下がっている親水性高分子保護鎖、(iii) 高分子主鎖に共役結合し吊り下がっている少なくとも1つの疎水性部分、(iv) 親水性高分子保護側鎖と疎水性部分の重量比は、組成物が水に溶解するように選択され、主鎖の疎水性部分に解離結合した治療分子、(b) 組成物は単位用量形態である薬学的に許容される担体。

40

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1】図1は、本発明の疎水性コア組成物の1つの実施例の略図を示す：直鎖高分子主鎖、高分子主鎖に共有結合した保護側鎖、高分子コアに共有結合した疎水性部分、および直径3nmの疎水性負荷分子。担体の大きさも、これは4nm糸球体ろ過カットオフよりも大きいが、担体および疎水性負荷分子は一緒にこのカットオフを下回ることを強調するために示されている。以下はタンパク質およびその直径の例である：siRNA（直径 < 3nm）、水和アルブミン（直径 = 7.2nm）、水和成長ホルモン（直径 = 3nm）、糸球体ろ過直径 < 4nm、-2マクログロブリン（直径 = 3.2nm）、ミオグロビン（直径 = 3.9nm）

50

)、ヘモグロビン(直径 = 6.5nm)、グロブリン(直径 = 11.1nm)、およびベンス・ジョンズタンパク質(直径 = 5.5nm)。

【図2】図2は、本発明の組成物を作るために有用なアミド結合を作るためのさまざまな化学反応の略図を示す。R₁は疎水性分子であり得、R₂はポリリシンまたはポリリシンPEGであり得る。または、R₁はPEGカルボキシルであり得、R₂はポリリシン、疎水性分子ポリリシンであり得る。また、R₁はポリグルタミン酸またはポリアスパラギン酸であり得、R₂はPEGアミン、疎水性分子(C6~C36のアルキルアミンなど)であり得る。R₁はポリグルタミン酸PEGまたはポリアスパラギン酸PEGであり得、R₂はアルキルアミンであり得る。EDCはDCCの水溶性バージョンで、両方とも反応を行うために使用することができる。

【図3】図3は、イソチオシアネート、サクシニイミジルエステル、またはスルホニルクロリドなどの官能基を含む担体(R¹)に疎水性アミン(R²)を結合するさまざまな化学反応の略図を示す。担体R¹は任意の主鎖ポリマーでよい。ポリマーR¹は、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、ポリグルタミン酸PEGまたはポリアスパラギン酸PEGであり得る。

【図4】図4は、PEG保護基、その類似体または誘導体を、アミノ基を含む高分子主鎖に付加するために使用できる化学反応の一部を示す。

【図5】図5は、アルデヒドPEG誘導体を、アミノ基を含む高分子主鎖に付加するために使用できる化学反応の一部を示す。これらは2段階の縮合還元反応である(aとb)。

【図6】図6は、PEG保護基、その類似体または誘導体を、水酸基を含む高分子主鎖に付加するために使用できる化学反応の一部を示す。

【図7】図7は、自然半減期が20分の血中の仮想遊離疎水性負荷分子(ペプチド、タンパク質または疎水性薬物)である。担体がないと、疎水性負荷分子の濃度に著しい変動がある。担体があると、疎水性負荷分子は治療濃度に維持される。担体のnM濃度は、半減期20時間で減少する。A)本発明の担体なしで1日3回5mg/kgを注射した時の疎水性負荷分子レベル、この負荷分子の血中半減期は20分である、B)負荷分子を持つ担体の半減期は20時間である、C)担体によって維持される遊離負荷分子の治療レベル。

【図8】図8は、PLPEG(ポリリシン・ポリエチレングリコール共重合体)のアミノ基/mgの量とポリリシンの%アミノ基飽和との間の理論上および実際の関係を示すグラフである。これはPLPEGの組成物の二次的確認として非常に有用である。このポリエチレングリコール化プロセスは完全に再生可能で、TNBSアミノ基分析を反応中のフィードバックガイドとして使用して、望ましい%のポリエチレングリコール化が達成されるまで反応を継続することによって合成中に調整可能である。収率は出発物質の約50~80%(5~8gr)である。理論的予想は以下の式を用いて計算された:X=[100x(C-Y)]/5YC+C]、ここでXは飽和%、YはTNBSで決定されたPLPEGグラム当たりのmmol NH₂、CはTNBSで決定されたPL(ポリリシン)のグラム当たりのNH₂のmmolである。式中の5YC中の5は、使用されたPEGのサイズ(このケースでは5 kDa)を表し、従って5YCである。10 kDa PEGが使用された場合、これは10 YCとなる。一旦PLPEG生成物が生成されると、ポリリシンのアミノ基の飽和パーセントは、最終生成物の単一TNBS分析によってさらに確認されて、Yが決定され、それからXを計算できるため、これは有用である。

【図9】図9 これらは100 kDa MWCO膜(Amersham Biosciences、マサチューセッツ州ニーダム)を通した、浄化前後の反応生成物のゲルろ過クロマトグラムで、すべての未反応PEGが除去されていることを示す。使用されたカラムはUltrahydrogel Linear(0.78 x 30cm, Waters)で、流速0.6ml/分で15%アセトニトリルを含んだPBSで溶出された。物質は屈折率検出器を用いて検出した。パネルAは、未反応の5 kDa PEGの浄化前の20PLPE G555(20 kDaポリリシン、アミノ基の55%は分子量5 kDaのコハク酸PEGと反応した)である。パネルBは5 kDa PEGのみである。パネルCは、浄化後の20PLPEG555である。

【図10】図10 これらは既知のストークス半径のタンパク質を持つさまざまな担体のストークス半径である。これらは、Ultrahydrogel Linearカラム(直径0.78cm x 長さ30cm)で、移動相に15%アセトニトリルを含むPBSを使って流速0.6ml/分で分析された。20PL-PEG555(20 kDaポリリシンでアミノ基の55%は分子量5 kDaのコハク酸PEGと反応した)、40PL-PEG530(40 kDaポリリシンで、アミノ基の30%は分子量5 kDaのコハク酸PEG

10

20

30

40

50

と反応した)、40PL-PEG551(40 kDaポリリシンで、アミノ基の51%は分子量5 kDaのコハク酸PEGと反応した)、および40PL-PEG527(40 kDaポリリシンで、アミノ基の27%は分子量5 kDaのコハク酸PEGと反応した)は、直径が4nm(40オングストローム)(または半径20オングストローム)を上回る糸球体ろ過カットオフより大きい。チログロブリン(669 kDa、ストークス半径85.5オングストローム)、カタラーゼ(248 kDa、ストークス半径52.2オングストローム)、およびBSA(67 kDa、ストークス半径35.5オングストローム)を含む、既知のストークス半径を持つタンパク質が参照として使用された。

【図11】図11 20 kDaポリリシン主鎖を有する担体へのドキソルビシンHC1の結合について、アミノ残基の55%は5 kDaコハク酸MPEGに共有結合されており、残りはステアリン酸で飽和されていた。担体の10mg/ml(30uM)にさまざまな濃度のドキソルビシンを負荷する。この特定の担体はドキソルビシンと結合するが、結合の親和性は強くなかった。スキヤッチャードプロットを使用した場合、見かけ上のKdは315uMである。本発明の目的で強いとみなすにはKdは100uM未満でなければならないので、これは強い結合とは見なされない。ドキソルビシンの相対的親水性は、他の試験負荷分子と比較した逆相HPLCカラムの保持時間(以下表3)から明らかである。10

【図12】図12 20 kDaポリリシン主鎖を有する担体へのノシセプチンの結合について、アミノ残基の55%は5 kDaコハク酸MPEGに共有結合されており、残りはステアリン酸で飽和されていた。担体の10mg/ml(30uM)に0.2mg/ml(111uM)のノシセプチンを負荷する。この特定の担体はノシセプチンと結合するが、結合の親和性は強くなかった。その親水性および、同一の逆相HPLCカラム(SynergiMaxRP 4×20mm、Phenomenex)でのGLP-1の保持時間(2.5分、下記表3参照)と比較したHPLCの早い保持時間(1.43分、下記表3参照)と一致する結合はほとんど見られない。カラムは流速1.5ml/分で、溶媒AからBへのグラジエント(1~5分でBを25~50%)を使用して溶出された。ここで、Aは0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)/5 %アセトニトリルを含む水であり、溶媒Bは0.1% TFAを含むアセトニトリルである。20

【図13】図13 20 kDaポリリシン主鎖を有する担体への胰島アミロイドポリペプチドまたはIAPPの結合について、アミノ残基の55%は5 kDaコハク酸MPEGに共有結合されており、残りはステアリン酸で飽和されていた。担体の10mg/ml(30uM)にさまざまな量のIAPPを負荷する(方法については例9を参照)。この担体は強い親和性でIAPPと結合し、担体と共に投与された時の、IAPPまたはその誘導体の血液循環半減期を延長させるのに有用である。スキヤッチャードプロットで分析すると、結合は900nMのKdを持つ。逆相HPLCの保持時間に基づいたIAPPの相対的疎水性を以下の表3に示す。30

【図14】図14 20 kDaポリリシン主鎖を有する担体へのテルリプレシンの結合について、アミノ残基の55%は5 kDaコハク酸MPEGに共有結合されており、残りはステアリン酸で飽和されていた。担体の10mg/ml(30uM)にさまざまな量のテルリプレシンを負荷する(方法については例9参照)。この担体のテルリプレシンとの結合親和性は強くない。逆相HPLCの保持時間に基づいたテルリプレシンの相対的疎水性を以下の表3に示す。

【図15】図15 20 kDaポリリシン主鎖を有する担体への血管作動性腸管ペプチド(VIP)の結合について、アミノ残基の55%は5 kDaコハク酸MPEGに共有結合されており、残りはステアリン酸で飽和されていた。担体の10mg/ml(30uM)にさまざまな量のVIPを負荷する(方法については例9を参照)。この担体は強い親和性でVIPと結合し、担体と共に投与された時の、VIPの血液循環半減期を延長させるのに有用である。以下の表3に示されるように、逆相HPLCの保持時間に基づいたVIPの相対的疎水性はヒト成長ホルモンよりも大きくない。成長ホルモンが強い親和性で担体と結合しなかったのに対し、疎水性のより低いVIPが強い親和性で結合したことは驚きである。さらなる調査によると、脂質(またはおそらく本発明の担体)の存在下、中性pHでは、VIPは疎水性ヘリックス構造をより多くとる。このようなポリペプチドは、酸性HPLC条件では、この一般的の傾向に従わないので、予測性を向上するには中性の非変性HPLC条件で分析する必要がある。

【図16】図16 20 kDaポリリシン主鎖を有する担体への組み換えヒト成長ホルモン(hGH)の結合について、アミノ残基の55%は5 kDaコハク酸MPEGに共有結合されており、残40

10

20

30

40

50

りはステアリン酸で飽和されていた。担体の10mg/ml (30uM) にさまざまな量のhGHを負荷する（方法については例9参照）。この担体のhGHとの結合親和性は強くない。

【図17】図17 20 kDaポリリシン主鎖を有する担体へのレプチンの結合について、アミノ残基の55%は5 kDaコハク酸PEGに共有結合されており、残りはステアリン酸で飽和されていた。担体の33mg/ml (10uM) にさまざまな量のレプチンを負荷する（方法については例9を参照）。担体はレプチンと強い親和性で結合し、スキヤッチャードプロットで分析した時、結合のKdは700nMである。この担体は、担体と共に投与された時のレプチンの血液循環半減期を延長するのに有用である。

【図18】図18 PEGタブシン酸生成物および開始アミノPEGの薄層クロマトグラフィー分析。TLC移動相は、5:1ジクロロメタン/メタノールである。固定相はアルミニウムシート上のシリカゲル60 F254である。TLCはプロモクレゾールブルーおよびニンヒドリンで染色した。プロモクレゾールブルーはPEGを持つ物質を青く染色する。5KアミノPEG (s.m.) のRf = 0.76、生成物タブシン酸・アミノPEG共役体（脂肪PEG、生成物）= 0.63。開始物質および生成物は両方ともプロモクレゾールブルーで染色され、5KアミノPEGはニンヒドリンで陽性染色されるが、生成物は染色されない。

【図19】図19 不溶性担体は皮膚壊死を生じるが、可溶性担体は生じない。不溶性担体(A)にPEGを脂肪酸重量比10未満で加えたもの、および可溶性担体(B)にPEGを脂肪酸重量比10以上で加えたものを皮下注射した後3週間のラットの皮膚の写真を示す。Aの矢印は、皮下注射された米国特許第6,576,254号の不溶性組成物15mgは3週間後に壊死を起こす(矢印A)ことを示すが、本発明の可溶性担体の類似量を投与された動物では壊死は見られない(矢印B)。

【図20】図20 処方VIP (VIPを2重量%含む20PLPEG555C18) 皮下投与後の血中総VIP。処方に使用された20PLPEG555C18は20 kDaポリリシンで、アミノ基の55%は5 kDa分子量のコハク酸PEGと反応し、残りのアミノ基はステアリン酸またはC18と反応した。単独投与されたVIPの排出半減期はわずか数分であるのに対し(グラフでは見えない)、処方VIPの半減期は20時間を超える。オスのウィスター系ラットに、リン酸緩衝生理食塩水中、1mg VIPのみまたは20PLPEG555C18処方(N=7)で1mg VIPを皮下注射した。所定時間に尾から採血し、プロテアーゼ阻害剤カクテルを添加した(Calbiochem、カタログ番号539131、カリフォルニア州ラホーヤ)。総VIP(20PLPEG555C18結合および非結合)をPeninsula社(カリフォルニア州サンカルロス)のElisaキットで測定し、ラット血清のバックグラウンド信号をすべてのデータ点から差し引いた。

【発明を実施するための形態】

【0029】

発明の詳細な説明

定義

便宜上、本発明をさらに説明する前に、明細書、例および添付の請求項に使用される特定の用語をここに収集する。これらの定義は、本開示の残りを踏まえて読まれるべきであり、当業者により理解されるべきである。別に定義されない限り、本書に使用される技術的・科学的用語はすべて、当業者によって一般的に理解されている意味と同じ意味を持つ。

【0030】

「a」および「an」という冠詞は、記事の文法的目的語の1つまたは複数(すなわち、少なくとも1つ)を指すために使用される。例としては、「a protective chain(保護鎖)」は、1つの保護鎖または複数の保護鎖を意味する。

【0031】

「アプタマー」という用語は、特定の折り畳みを通して特定の標的分子に結合するオリゴ核酸またはペプチド分子を意味する。本発明の実施例の1つは、疎水性部分を持つ担体を提供して、疎水性ペプチドアプタマーを送達するものである。アプタマーは通常、大きなランダム配列から選択することにより作成されるが、天然アプタマーもリボスイッチに存在する。アプタマーは、基礎研究と臨床目的の両方で高分子薬物として使用され得る。

10

20

30

40

50

アブタマーは、リボザイムと組み合わせて、その標的分子の存在下、自己開裂させることができる。これらの化合物分子には、追加的な研究、産業および臨床的用途がある。アブタマーは、一般的に使用されている生体分子つまり抗体に匹敵する分子認識特性を示すため、バイオテクノロジーおよび治療用途の利用が可能である。これは、認識部位を作る特定の折り畳みを通して可能となる。この折り畳みは、担体への結合によって妨げらる可能性があるが、担体から一旦離れると再折り畳みが起こり、生物学的または治療的に活性な正しい折り畳みを持つアブタマーを提供する。その判別認識に加えて、アブタマーは試験管内で完全に設計でき、化学合成で容易に製造され、好ましい保存特性を持ち、治療用途において免疫原性をほとんどまたは全く生じないため、抗体よりも利点がある。アブタマーは、その本質的に低い分子量の結果、主に分解と腎臓による体内からのクリアランスによって数分から数時間の半減期で血流中から迅速に排除される。ペプチドアブタマーは、細胞内の他のタンパク質相互作用を妨げるために設計されたタンパク質である。それらは、タンパク質主鎖の両端に付属したさまざまなペプチドループから成る。この二重構造の制約は、ペプチドアブタマーの結合親和性を、抗体に匹敵するレベル（ナノモルの範囲）まで大きく増加させる。可変ループ長は、一般に10~20のアミノ酸を含み、主鎖は良好な溶解性（本発明の目的では、好ましくは疎水性）およびコンパクトな特性を持つ任意のタンパク質であってよい。これらのペプチドアブタマーは、疎水性相互作用によって本発明に負荷できるよう疎水性を増加させるため、脂肪酸を含むように作ることができる。アブタマーは、本発明の担体に負荷される時、保護鎖シールドの高い密度によって分解から保護される。

10

20

30

40

【0032】

本書では「誘導体」または「類似体」という用語は、そのコア構造が、親化合物のコア構造と同様または非常に類似しているが、異なる基または付加的基など、化学的または物理的变化があるものを指す。この用語はまた、親ペプチドと少なくとも50%の配列同位性（すなわちアミノ酸代用物は50%未満）があるものも含む。この用語はまた、親ペプチドと比べて、元の親ペプチドの質量を超えない脂肪酸および/またはアミノ酸などの付加的基が結合されたペプチドも含む。この用語はまた、保護基の場合ではアルコシキ基など、親ポリマーと比べて、追加的な基が結合しているポリマーも含む。この用語はまた、親化合物の保護鎖と比べて、付加的メトキシまたはエトキシ基がそれに結合しているメトキシ化またはエトキシ化された保護鎖も含む。

【0033】

本書では「疎水性部分」という用語は、非極性で、周りの水環境を避けるために負荷分子が相互作用する疎水性環境を提供する主鎖に結合した分子または分子部分を指す。疎水性部分は、正または負の電荷を持たず、疎水性相互作用により分子に結合できる脂肪族炭化水素鎖および/または環状化合物である場合がある。疎水性部分は、一般に水素と炭素およびわずかな酸素と窒素から成る分子の部分である。疎水性部分は、相互結合した6個以上の炭素を持つ1つの分子の連続的な単一部分である場合があり、この部分に結合した窒素と酸素の合計数は炭素原子数の3分の1以下である。また、当然ながら疎水性部分は、高分子主鎖とは別のものとして見なされ、例えば、高分子主鎖がポリアミノ酸である場合、本発明ではポリアミノ酸上の天然R基は疎水部分としては見なされない。例えば、疎水性部分は、アミン基からのアミド生成でポリリシン主鎖に付加される場合がある。

【0034】

本書では「負荷分子」という用語は、担体に高い親和性で結合する任意の分子（親和定数（ K_a ）が0.01百万/モルより大きいか、または解離定数（ K_d ）が100マイクロモルより小さいもの）で、担体に負荷できるものを含む。親和定数または解離定数は、当業者なら容易に確認できる。本発明の目的では、これらの負荷分子には、疎水性ペプチド（50以下のアミノ酸）、疎水性タンパク質（50を超えるアミノ酸）、疎水性部分を追加したまたは負電荷のポリリン酸主鎖を中性化する薬剤を追加したポリヌクレオチド（RNA、DNAまたはその類似体）、および他の疎水性分子が含まれる。

【0035】

50

本書では「非タンパク性ポリアミノ酸」という用語は、ヒトによる遺伝子組み換えで作られない限り、生物によって自然には作られないポリアミノ酸を指す。これらの非限定的例は、ポリ-(Lおよび/またはD)-リシン、ポリ-(Lおよび/またはD)-グルタミン酸、ポリ-(Lおよび/またはD)-グルタミン酸、ポリ-(Lおよび/またはD)-アスパラギン酸、ポリ-(Lおよび/またはD)-セリン、ポリ-(Lおよび/またはD)-トレオニン、ポリ-(Lおよび/またはD)-チロシン、およびポリ-(Lおよび/またはD)-アルギニンである。また非タンパク性ポリアミノ酸には、天然にはないが、保護基および/またはオリゴヌクレオチドの結合用の修飾可能な反復官能基(30~1000の官能基)を提供できる、カルボキシル、アミノ、水酸基またはチオール基を含む、R基を持ったポリアミノ酸も含まれる。非タンパク性ポリアミノ酸は、本発明の可能性のある主鎖成分に含まれる。

10

【0036】

本書では「親水性保護側鎖」という用語は、この鎖への水の過剰な連結または結合による他の高分子との接触から担体コアと負荷分子を保護する分子を指す。水分子とのこの過剰な結合のため、保護鎖も組成物の水への溶解度を増加させる。保護基は著しい電荷を持たないが、水溶性である。一般的に、この基は非免疫原性である。これはまた、保護鎖が組成物に親水性特性を提供することも意味する。「保護側鎖」という用語は、「保護基」および「保護鎖」という用語と同じ意味で使用される。本組成物の保護鎖は、ポリオキシエチレングリコール(ポリエチレングリコールとも呼ばれる)およびその誘導体を含む。本組成物の保護鎖はまた、非荷電ポリサッカリド、およびエトキシ化またはメトキシ化ポリサッカリドなど、その誘導体も含む。この文脈では、非荷電とは鎖の本体が正または負の電荷を持たないことを意味する。

20

【0037】

「標的部分」「標的分子」または「標的基」という用語は、特定の標的領域を局在化させ、標的細胞に入り、および/または標的受容体に結合する上で、組成物の構築を支援する任意の分子構造を指す。例えば、脂質(疎水性、中性、およびステロイド性脂質を含む)、抗体、抗体断片、キメラ抗体、レクチン、リガンド、受容体リガンド、糖、サッカリド、ステロイド、ホルモン、栄養素、ペプチド、タンパク質、酵素、酵素の擬似基質、細胞表面結合化合物、および細胞外基質結合化合物は、標的部分の役割を果たす場合がある。標的部分は、好ましくは、担体の保護鎖の遠位端に結合している。

30

【0038】

本書では「治療薬」という用語は、生物学的、生理的、または薬理学的に活性で、被験者内で局所的または全身的に作用する任意の化学物質を指す。本発明の目的では、担体に負荷される治療薬は、疎水性ペプチドおよびタンパク質などのように疎水性であるか、または脂肪酸または芳香環などの疎水性部分修飾を持つと理解される。著しい疎水性部分を持つか、または脂肪酸に共有結合することにより著しい疎水性部分を持つように改善され得る治療薬(「薬物」とも呼ばれる)の例には、グルカゴン様ペプチド、グルカゴン様ペプチド誘導体、エクセナチド、グルカゴン様ペプチド-1、グルカゴン様ペプチド-2、レブチン断片、胃抑制ポリペプチド(GIP)、上皮成長因子(EGF)受容体リガンド、EGF、形質転換成長因子-(TGF-)、ベタセルリン、ガストリン/コレシストキニン受容体リガンド、ガストリン、コレシストキニン、リソスタフィン、インターフェロン、インターフェロン、インターフェロン、インターフェロン、インターロイキン-1、インターロイキン-2、インターロイキン-4、インターロイキン-6、インターロイキン-8、インターロイキン-10、インターロイキン-12、アウリストチチン、ニシン、インスリン、インスリン様成長因子1、成長ホルモン、成長ホルモン放出ホルモン(GHRH)、神経成長因子、脳由来神経栄養因子、酵素、エンドスタチン、アンジオスタチン、トロンボスポンジン、ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、血液凝固因子VII、血液凝固因子VIII、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、トロンボエチン、カルシトニン、副甲状腺ホルモン(PTH)およびその断片、エリスロポエチン、心房性ナトリウム利尿因子、モノクローナル抗体、モノクローナル抗体断片、ソマトスタン、プロテアーゼ阻害剤、副腎皮質刺激ホルモン、ゴナドトロピン放出ホルモン、オ

40

50

キシトシン、黄体形成ホルモン放出ホルモン、卵胞刺激ホルモン、グルコセレブロシダーゼ、トロンボポエチン、フィルグラスチン、プロスタグランジン、エポプロステノール、プロスタサイクリン、シクロスボリン、バゾプレシン、テリプレシン、デスマプレシン、クロモリンナトリウム（クロモグリク酸ナトリウムまたはクロモグリク酸二ナトリウム）および血管作動性腸管ペプチド（VIP）が含まれる。任意の疎水性分子を上述の治療薬に結合させて、負荷を促進または担体への親和性を向上させることができる場合がある。治療薬に結合した疎水性部分は任意の脂肪酸または他の類似物であり得る。治療薬は、非免疫原性であるが、担体の保護なしでは分解および排出の影響を受けやすい天然の疎水性ペプチドである場合がある。

【0039】

10

本書では「治療効果のある量」という用語は、患者に治療上の利益を提供する組成物の量を指す。特定の実施例では、この用語は、本発明の疎水性コア担体組成物に負荷され、患者に投与された時、任意の薬物療法に適切な妥当な利益／リスク比で、いくらかの好ましい効果を生む治療薬の量を指す。効果のある量は、治療している疾患または状態、投与されている特定の構造、被験者のサイズおよび／または疾患または状態の重症度によって異なる場合がある。当業者であれば、過度の実験をすることなく、特定の化合物の治療効果のある量を経験的に決定することがある。特定の実施例では、この用語は本書に記載された表題組成物の使用に必要な量または十分な量を指す。肥満の治療では、治療効果のある量は、レブチンなど（これに限定されない）食欲および／または体重を減少させる対応する負荷分子を持つ本発明の組成物の量である。肥満の治療では、治療効果のある量は、PYYなど（これに限定されない）食欲および／または体重を減少させる対応する負荷分子を持つ本発明の組成物の量である。インスリンが不十分な糖尿病の治療では、治療効果のある量は、患者のグルコースの恒常性を改善するか、または血糖値を正常化する、および／または膵臓の - 脇島細胞を再生する対応する負荷分子を持つ本発明の組成物の量である。 - 脇島細胞の再生は、血中の血糖値、ヘモグロビンA1cレベル、Cペプチドレベル、またはインスリンレベルをモニターすることにより間接的に測定できる。

20

【0040】

本発明の成分の説明

30

この発明は、親水性側鎖を持つ直鎖高分子主鎖または担体およびそれに付加された疎水性側鎖を有する可溶性組成物を提供する。このような組成物は、とりわけ、治療分子などの疎水性分子の担体として有用である。疎水性分子は疎水性側鎖に親和結合している。被験者への投与に際して、組成物は可溶性で、結合力学および局所濃度の関数として疎水性負荷分子を放出する。本発明の組成物は、組成物が水に溶解するような親水性側鎖と疎水性側鎖の重量比を持っており、つまり組成物は50mg/mlの濃度で水に可溶性であり、析出したり溶液が混濁することはない。一般的に、親水性側鎖の疎水性側鎖に対する重量比は少なくとも15:1である。さまざまな実施例において、重量比は17:1より大きい、20:1より大きい、25:1より大きい、50:1より大きい、または100:1より大きい。他の実施例では、重量比は15:1～60:1、20:1～45:1または25:1～40:1である。

【0041】

40

例8は、さまざまな長さのポリリシンおよび異なるMPEG：脂肪酸比の組成物の溶解度を示す。MPEG：脂肪酸比が14:1より大きい場合、組成物は50mg/mlの濃度で可溶性である。10.5:1～13.7:1の比では、組成物は「部分的に可溶性」である。

【0042】

特定の実施例では、本発明の組成物は、少なくとも4つの成分で構成されている：a) 直鎖高分子主鎖、b) 高分子主鎖および／または疎水性部分に共有結合した数個の親水性保護鎖、c) 直鎖高分子主鎖に共有結合し吊り下がっている（主鎖の横に結合した）数個の疎水性部分、d) 疎水性ペプチド（アミノ酸50個以下）、疎水性タンパク質（アミノ酸が50を超える）、または疎水性部分に解離結合した疎水性薬物。好ましい疎水性ペプチド、タンパク質および疎水性分子は、その立体構造状態の1つにおいて、以下のHPLC条件下で、保持時間が2分より長い：A逆相HPLCカラム（SynergiMaxRP； 2.5um、4x20mm； Phenomene

50

x) を流速1.5mI / 分で溶媒AからBへのグラジエントを使用して溶出する(1~5分でBを25~50%)。ここでAは0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)/5%アセトニトリルで、溶媒Bは0.1%TFAを含むアセトニトリルである。この条件でのGLP-1の保持時間は2.56分で、VIPは1.63分であるが、構造の少量は2.56分で、レプチンは4.9分である。VIPは、担体にさらされた時、疎水性構造をより多くとると考えられ、予想されたより多くの結合が生じた(以下の表2参照)。高度に疎水性でない他のペプチドおよびタンパク質は、脂肪酸を結合させることにより疎水性にすることができる、このような修飾プロセスは当技術分野ではよく知られている。本発明の保護鎖は、酵素および細胞による分解から負荷分子を守るために重要である。

【0043】

10

高分子主鎖

高分子主鎖は、反復アミノ基またはカルボキシル基を持つ非タンパク性ホモまたはヘテロポリマーであり、天然または合成品であり得る。好ましくは、高分子主鎖は、DまたはLキラリティーのどちらかまたは両方を持つポリアミノ酸であり、より好ましくは直鎖のホモポリマーである。好ましい直鎖ホモポリマーには、ポリリシンとポリオルニチン、ポリアルギニン、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、ポリセリン、ポリトレオニン、ポリチロシンまたはアミノ酸から作られた任意のアミド結合ヘモロポリマーを含む。直鎖ポリエチレンイミンも高分子主鎖として使用し得る。高分子主鎖がポリアミノ酸、非タンパク性であることが好ましく、これは活性に関連する三次元構造を持つ、生物によって作られたタンパク質でないことを意味する。高分子主鎖の分子量は、約600~1,000,000、好ましくは3,000~100,000であり得る。また、30~1000の修飾可能な官能基を持つことが好ましい。反復するチオール基、リン酸基、および水酸基を持つものなど、他の反復する修飾可能な官能基を持つ高分子主鎖も使用し得る。炭水化物ポリマーおよび他の合成ポリマーでモノマーが非生物学的なものも、高分子主鎖として使用し得る。高分子主鎖は、疎水性鎖と親水性保護鎖が結合できる複数の部位を提供する。特定の実施例では、高分子主鎖の残基の少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%が、親水性または疎水性側鎖で誘導化される。

20

【0044】

30

疎水性部分

疎水性部分は、疎水性アルキル基を有することがあり、これは一般式[C_xH_yO_z] (xは6~36、yは2~71、zは1~4)で表される。z = 1であることが好ましく、これは高分子主鎖のアミノ基とのアミド結合形成のために最低限必要である。しかし開始分子(高分子主鎖への結合前)では、アミド結合形成前にzが1より大きい場合がある。疎水性部分はまた、一般式が[-OC(CH₂)_xC0-]または[-OC(CH₂)_xCN-] (xは6~36)の2つの末端疎水性アルキル基(一端が高分子主鎖に結合)を有する場合があり、さらに、疎水性部分の第一の末端に共有結合した保護基を持ち、第二の末端は高分子主鎖に共有結合していることがある。

40

【0045】

1つの実施例では、疎水性部分の高分子主鎖への化学結合はアミド結合を含む。別の実施例では、疎水性部分の高分子主鎖への化学結合はエーテル結合を含む。別の実施例では、疎水性部分の高分子主鎖への化学結合はエステル結合を含む。別の実施例では、疎水性部分の高分子主鎖への化学結合はジスルフィド結合を含む。1つの実施例では、高分子主鎖に結合した疎水性部分は、脂肪酸から得られるアルキルアシル、または芳香族アルキル酸から得られる芳香族アルキルアシルを含み、これは一般式[C_xH_yO_z] (xは6~36、yは2~71、zは1~4)で表される。z = 1であることが好ましいが、高分子主鎖との結合生成前は、開始分子のzは1より大きい場合がある。

【0046】

50

親水性保護基または保護鎖

好ましくは「親水性保護基」または「保護鎖」は非イオン性で、分子量が約2000~20,000、好ましくは5,000~10,000である。組成物の保護鎖は好ましくは、エチレンオキシド(またはポリオキシエチレングリコールとも呼ばれるポリエチレングリコール)、すなわ

ちPEGまたはポリエチレングリコールのモノメトキシエーテル（すなわちMPEG）である。以下の理由から保護鎖は有用である：1) 高い薬物総重量を維持しながら組成物の溶解性を確実にする、2) 負荷分子（疎水性ペプチド、疎水性タンパク質および他の疎水性治療薬）が体内の他の高分子、酵素（ヌクレアーゼおよびプロテアーゼ）および細胞と結合または相互作用するのを防ぐステアリン酸バリアの形成を保護鎖が支援する、3) 保護鎖は負荷分子（疎水性ペプチド、疎水性タンパク質および疎水性薬物）の循環時間または生体内での生物学的半減期を長くし（例えば、腎臓の糸球体ろ過を減少させ、腎臓と肝臓の再吸収を減少させ、マクロファージ再吸収を低下させて）循環貯蔵庫を作る、4) 保護鎖は、担体または疎水性ペプチド、疎水性タンパク質および疎水性薬物などの負荷分子の好ましくない免疫原性を減少させる、5) 保護鎖は担体のサイズを増加させて、腫瘍血管の異常透過性を利用し、腫瘍または炎症部位での負荷分子を持つ担体の蓄積を助け、負荷分子または抗腫瘍化合物を腫瘍に送達するが、これは腫瘍および体内の高度血管新生領域の治療に対して特に有用である。

10

【0047】

疎水性コア担体組成物の保護鎖は、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、メトキシポリエチレングリコール、メトキシポリプロピレングリコール、ポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールの共重合体、またはそのアルコキシ誘導体であり得る。保護鎖は、メトキシポリエチレングリコール、メトキシポリプロピレングリコール、またはメトキシポリエチレングリコールとメトキシポリプロピレングリコールの共重合体の中の1つであることが好ましい。保護鎖はまた、ポリエチレングリコールモノアミン、メトキシポリエチレングリコールモノアミン、メトキシポリエチレングリコールヒドラジン、メトキシポリエチレングリコールイミダゾリドまたはポリエチレングリコール二酸でもよい。保護鎖は、高分子主鎖および／または高分子主鎖から吊り下がっている疎水性部分に、好ましくは単結合で結合している。アルコキシリ化は免疫原性を低減または排除し、従って改良された保護基として働くため、メトキシ化またはエトキシ化ポリサッカリドも、本発明の保護鎖として使用できる。

20

【0048】

疎水性負荷分子

疎水性負荷分子は、好ましくは疎水性ペプチドとタンパク質、脂質、および疎水性薬物である。これらの中には、疎水性造影剤および疎水性治療薬が含まれる。疎水性ペプチドとタンパク質には、サイトカイン、リンフォカイン、ホルモン、および酵素が含まれる。

30

【0049】

本発明の負荷分子はまた、疎水性部分を含むように誘導体化され、治療薬または天然の疎水性治療薬を含む。これらには、siRNA、アンチセンスDNA、アンチセンスRNA、グルカゴン様ペプチド、グルカゴン様ペプチド誘導体、エクセナチド、グルカゴン様ペプチド1、グルカゴン様ペプチド2、レプチン、レプチン断片、胃抑制ポリペプチド(GIP)、上皮成長因子(EGF)受容体リガンド、EGF、形質転換成長因子(TGF- β)、ベタセルリン、ガストリン／コレシストキニン受容体リガンド、ガストリン、コレシストキニン、リソスタフィン、インターフェロン、インターフェロン、インターフェロン、インターフェロン、インターフェロン、インターロイキン-1、インターロイキン-2、インターロイキン-4、インターロイキン-6、インターロイキン-8、インターロイキン-10、インターロイキン-12、腫瘍壊死因子、腫瘍壊死因子、腫瘍壊死因子、アウリスタチン、ニシン、インスリン、インスリン様成長因子、成長ホルモン、成長ホルモン放出ホルモン(GHRH)、神経成長因子、脳由来神経栄養因子、酵素、エンドスタチン、アンジオスタチン、トロンボスポンジン、ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、血液凝固因子VII、血液凝固因子VIII、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、トロンボポエチン、カルシトニン、副甲状腺ホルモン(PTH)およびその断片、エリスロポエチン、心房性ナトリウム利尿因子、モノクローナル抗体、モノクローナル抗体断片、ソマトスタチン、プロテアーゼ阻害剤、副腎皮質刺激ホルモン、ゴナドトロピン放出ホルモン、オキシトシン、黄体形成ホルモン放出ホルモン、卵胞刺激ホルモン、グルコセレブロシダーゼ、

40

50

トロンボポエチン、フィルグラスチン、プロスタグランジン、エポプロステノール、プロスタサイクリン、シクロスボリン、バゾプレシン、テリプレシン、デスマプレシン、クロモリンナトリウム（クロモグリク酸ナトリウムまたはクロモグリク酸二ナトリウム）、血管作動性腸管ペプチド（VIP）、バンコマイシン、抗生物質、ポリミキシンb、抗真菌剤、抗ウイルス剤、エンフェュービルタيد、ドキソルビシン、エトポシド、フェンタニル、ケタミン、およびビタミン類を含む。疎水性を増加させるために、治療ペプチドおよびタンパク質に結合する好ましい疎水性部分は、炭素数6～36の脂肪酸であり、形成中に担体への負荷を促進するという意図がある。

【0050】

各成分からの担体の化学的組み立て

10

高分子主鎖のアミノ基への保護鎖の結合：本発明は、保護鎖および疎水性部分をさらに有する高分子主鎖に関連する。アミノ基を含む高分子主鎖の修飾は、メトキシポリエチレングリコールを含む保護鎖のアミド共有結合である。高分子主鎖のアミノ基修飾の非限定的例は、アシルメトキシポリオキシエチレングリコール（MPEG）を有する保護鎖の結合である。疎水性鎖が付いている、または付いていない保護鎖の例は（本発明の範囲を限定することを意図しない）、アシルPEG、次の式で表されるその類似体または誘導体である： $-CO(CH_2)_nCOOCH_2CH_2-A-OR_3$ または $-COCH_2-A-OR_3$ 、ここでnは2～22（疎水性部分を表す）、A（保護鎖を表す）は $[OCH_2CH_2]_x$ または $[OCH_2CH_2]_x$ または $[OCHCH_3CH_2]_x$ 、ここでxは17～500、または $[OCH_2CH_2]$ 、 $[OCH_2CH_2]$ および / または $[OCHCH_3CH_2]$ のさまざまな組み合わせで合計ユニットは17～500、R₃はH、 $(CH_2)_pCH_3$ または $(CH_2)_pCOOH$ で、pは0～7である。

20

【0051】

本発明の別の目的は、アミノ基を含む高分子主鎖への保護鎖の結合方法を提供することである。修飾はアミド結合形成によって行うことができる。例としては（本発明の範囲を限定することを意図しない）、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミドまたはジシクロヘキシリカルボジイミドなどのカルボジイミドを含む試薬を使用して、カルボキシルを含む保護鎖を高分子主鎖のアミノ基に結合することができる（図2参照）。カルボジイミド試薬は、式N=C=Nから成る官能基を含む。結合反応のプロセス中、N-ヒドロキシスクシンイミドを使ってN-ヒドロキシスクシンイミドエステルを形成することにより、活性化されたカルボキシル基（O-アシルイソウレア中間体）を安定化できる。この比較的安定な中間体は、ポリリシンまたはチトサンなどの担体のアミノ基と反応してアミノ・アシル結合またはアミド結合を形成することができる。アルデヒドを含む保護基を担体のアミノ基と反応させることにより、類似の結果を達成することもできる。このアルデヒドは、ポリリシンまたはチトサンなどの担体のアミノ基と反応してアミノ・アシル結合またはアミド結合を形成することができる。

30

【0052】

高分子主鎖のカルボキシル基への保護鎖の結合：本発明は、保護鎖および疎水性部分をさらに有する高分子主鎖に関連する。カルボキシル基を含む高分子主鎖の修飾は、アミノ・メトキシポリオキシエチレングリコール（MPEG）を有する保護鎖を含むアミノ基のアミド共有結合である。例としては（本発明の範囲を限定することを意図しない）、疎水性部分を持つ、または持たない保護鎖はアミノPEGである場合があり、これは次の式で表される： $-NH(CH_2)_nNHCOCH_2-A-OR_3$ 、 $-NH(CH_2)_nNHCO(CH_2)_nCOOCH_2CH_2-A-OR_3$ 、ここでnは2～22（疎水性部分を表す）、A（保護基を表す）は $[OCH_2CH_2]_x$ または $[OCH_2CH_2]_x$ または $[OCHCH_3CH_2]_x$ 、ここでxは17～500、または $[OCH_2CH_2]$ 、 $[OCH_2CH_2]$ および / または $[OCHCH_3CH_2]$ のさまざまな組み合わせで、合計17～500ユニット、R₃はH、 $(CH_2)_pCH_3$ または $(CH_2)_pCOOH$ で、pは0～7である。

40

【0053】

本発明の別の目的は、高分子主鎖への保護鎖の結合方法を提供することである。これらの修飾はアミド結合形成によって行うことができる。例としては（本発明の範囲を限定することを意図しない）、高分子主鎖のカルボキシル基を活性化して、保護鎖のアミノ官能基と反応させることができる（図2参照）。活性化は1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロ

50

ピル)-カルボジイミドまたはジシクロヘキシリカルボジイミドなどの試薬を含むカルボジイミドを使って達成し得る。カルボジイミド試薬は、式 $N=C=N$ から成る官能基を含む。活性化のプロセス中、カルボキシ基は、N-ヒドロキシスクシンイミドにより安定化され得るO-アシルイソウレア中間体を形成して、N-ヒドロキシスクシンイミドエステルを形成する。この比較的安定な中間体は、保護分子のアミノ基と反応できる。担体に導入する必要のある保護基または分子がアミノ基を持たない場合、この分子に非常に簡単にアミノ基を導入することができ、このプロセスは当業者には良く知られている。

【0054】

高分子主鎖の水酸基への保護鎖の結合：本発明は、保護鎖および疎水性部分をさらに有する高分子主鎖に関連する。水酸基を含む高分子主鎖の修飾は、メトキシポリエチレングリコールを有する保護鎖とのエステルまたはエーテル結合形成である。高分子主鎖の水酸基の修飾は、アシルメトキシポリエチレングリコールを有する保護基とのエステル結合形成による。例としては（本発明の範囲を限定することを意図しない）、保護基は-COで表されるアシルまたはカルボニルを持つPEGである場合があり、担体の水酸基のOに結合してエステルを形成する。疎水性基を持つ、または持たないアシルPEGまたはその誘導体は次の式で表される： $-CO(CH_2)_nNHCOC_2-A-OR_3$ 、 $-COCH_2CH_2-A-OR_3$ 、または $-COCH_2-A-OR_3$ 、ここでnは2~22（疎水性部分を表す）、A（保護鎖を表す）は $[OCH_2CH_2]_x$ または $[OCH_2CH_2]_x$ または $[OCHCH_3CH_2]_x$ 、ここでxは17~500、または $[OCH_2CH_2]$ 、 $[OCH_2CH_2]$ および/または $[OCHCH_3CH_2]$ のさまざまな組み合わせで合計ユニットは17~500、R₃はH、 $(CH_2)_pCH_3$ または $(CH_2)_pCOOH$ で、pは0~7である。

10

20

30

40

【0055】

水酸基の修飾は、保護鎖のアシルハロゲン化物の合成によって促進できる。アシルハロゲン化物の合成は、保護鎖のカルボン酸部分とジクロロスルホキシド（SOC_{1,2}）または当業者に知られている他の試薬との反応によって行うことができる。結果得られるアシルハロゲン化物は、セリン、トレオニン、およびポリアミノ酸のチロシン残基を含むアルコールと反応する。反応によりエステル結合形成が起こり、基本的に保護基または分子を担体に結合する。PEGエボキシド、PEGイソシアネート、PEG-PNC（PEG-ニトロフェニルカルボキシエステル）は、水酸基を修飾してエーテル、エステルおよびウレタン結合をそれぞれ保護基と担体の間に形成するために使用され得るPEG類似体である。

【0056】

高分子主鎖のアミノ基への疎水性部分の結合：本発明は、保護鎖および疎水性部分をさらに有する高分子主鎖に関連する。一旦、高分子主鎖が保護鎖を含むと、疎水性分子（脂肪酸など）内のカルボキシル基を活性化することにより疎水性部分を結合して、高分子主鎖の残りのアミノ酸と反応させることができる（図3参照）。本発明の別の目的は、長さに沿ったアミノ基を持つ高分子主鎖に疎水性部分を結合する方法を提供することである。例として（本発明の範囲を限定することを意図しない）、修飾は、無水脂肪酸とのアミド結合形成によっても行うことができる。別 の方法は、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミドまたはジシクロヘキシリカルボジイミドなどのカルボジイミドを含む試薬を使用して、カルボキシル基を含む疎水性分子を活性化する方法である。カルボジイミド試薬は、式 $N=C=N$ から成る官能基を含む。結合反応のプロセス中、N-ヒドロキシスクシンイミドを使ってN-ヒドロキシスクシンイミドエステルを形成することにより、活性化されたカルボキシル基（O-アシルイソウレア中間体）を随意に安定化できる。この比較的安定な中間体は、高分子主鎖のアミノ基と反応してアミノ・アシル結合またはアミド結合を形成することができる。代替的に、疎水性部分は、脂肪酸アシルハロゲン化物を使用してアミノ基を含む高分子主鎖に導入できる。アシルハロゲン化物の合成は、カルボン酸部分とジクロロスルホキシド（SOC_{1,2}）または当業者に知られている他の試薬との反応によって行うことができる。結果得られるアシルハロゲン化物は、高分子主鎖に存在するアミノ官能基と反応する。反応によってアミド結合形成が生じ、疎水性部分または分子を高分子主鎖に結合する。

【0057】

50

高分子主鎖のカルボキシル基への疎水性部分の結合：本発明は、保護鎖および疎水性部分を含むように誘導体化された、反復するカルボキシル基を持つ高分子主鎖に関連する。一旦、高分子主鎖が保護鎖を含むと（上記参照）、カルボキシル基を活性化して、アルキルアミンを含む6~36炭素ユニットまたはその誘導体など、アミノを含む疎水性分子と反応させることにより、疎水性部分を結合することができる。代替的に、活性化された高分子主鎖は、ホスファチジルアミンまたはホスファチジルエタノールアミンなどのジアルキル疎水性分子と反応することができる。本発明の別の目的は、長さにそってカルボキシル基を持つ高分子主鎖に疎水性部分を結合する方法を提供することである。例として（本発明の範囲を限定することを意図しない）、修飾は、疎水性分子とのアミド結合形成によって行うことができる。1-エチル--3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミドまたはジシクロヘキシルカルボジイミドなどのカルボジイミドを含む試薬を使用して、カルボキシルを含む高分子主鎖を疎水性部分のアミノ基に結合することができる。カルボジイミド試薬は、式N=C=Nから成る官能基を含む。結合反応のプロセス中、N-ヒドロキシスクシンイミドを使ってN-ヒドロキシスクシンイミドエステルを形成することにより、活性化されたカルボキシル基（O-アシルイソウレア中間体）を随意に安定化できる。この比較的安定な中間体は、疎水性分子のアミノ基と反応してアミノ・アシル結合またはアミド結合を形成することができる。

10

【0058】

高分子主鎖の水酸基への疎水性部分の結合：本発明は、保護鎖および疎水性部分をさらに有する高分子主鎖に関連する。一旦、高分子主鎖が保護鎖を含むと（上記参照）、高分子主鎖の残りの水酸基をカルボキシルを含む基にまず修飾して、無水コハク酸または他の無水物を含む分子と反応させることにより（これに限定されない）、疎水性部分を結合することができる。一旦、水酸基がカルボキシル基に変換されると、カルボキシル基を活性化して、6~36の炭素ユニットを含むアルキルアミンまたはその誘導体などの、アミノ基を含む疎水性分子と反応させることができる。代替的に、活性化された高分子主鎖は、ホスファチジルアミンまたはホスファチジルエタノールアミンなどのジアルキル疎水性分子と反応することができる。本発明の別の目的は、長さにそって水酸基を持つ高分子主鎖に疎水性部分を結合する方法を提供することである。例として（本発明の範囲を限定することを意図しない）、修飾は、環状無水物分子とのエステル結合形成の後、疎水性分子とのアミド結合形成によって行うことができる。水酸基のカルボキシル基への修飾の後、1-エチル--3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミドまたはジシクロヘキシルカルボジイミドなどのカルボジイミドを含む試薬を使用して、この新しいカルボキシル高分子主鎖を疎水性部分のアミノ基に結合することができる。カルボジイミド試薬は、式N=C=Nから成る官能基を含む。結合反応のプロセス中、N-ヒドロキシスクシンイミドを使ってN-ヒドロキシスクシンイミドエステルを形成することにより、活性化されたカルボキシル基（O-アシルイソウレア中間体）を随意に安定化できる。この比較的安定な中間体は、疎水性部分のアミノ基と反応してアミノ・アシル結合またはアミド結合を形成することができる。

20

【0059】

保護基を含む疎水性分子の高分子主鎖への結合：本発明は、主鎖から吊り下がっている保護鎖、主鎖から吊り下がっている疎水性部分、および疎水性部分に共有結合している第二の保護鎖をさらに有する高分子主鎖に関連する。タブシン酸などの2つの末端を持つ疎水性分子は、アミノ基を含む保護鎖に簡単に結合できる。ほとんどの分子が1つずつ活性化されるように、タブシン酸に対して活性化の制限を行うことができる。これは、タブシン酸と比較して、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミドまたはジシクロヘキシルカルボジイミドなどの、カルボジイミドを含む試薬の0.5モル当量（タブシン酸と比較して）を使用することにより行うことができる。カルボジイミド試薬は、式N=C=Nから成る官能基を含む。結合反応のプロセス中、N-ヒドロキシスクシンイミド（タブシン酸に対して1モル当量）を使ってN-ヒドロキシスクシンイミドエステルを形成することにより、活性化されたカルボキシル基（O-アシルイソウレア中間体）を随意に安定化でき

30

40

50

る。一旦活性化されると、タブシン酸はほぼ1つずつ活性化された末端を持ち、これは次にアミノを含む保護鎖と反応させることができる。保護鎖または分子がアミノ基を持たない場合、この分子に非常に簡単にアミノ基を導入することができ、この化学は当業者には良く知られている。さまざまな実施例の組成物の合成の更なる詳細はまた、米国特許出願第11/613,183号にも見られ、これは参照により本書に組み込まれ、これに対してこの出願は優先権を主張する。

【0060】

疎水性部分および保護基の結合に使用される化学結合のタイプは、複合体および複合体と関係する治療薬の望ましい生物学的半減期に依存する。長い半減期が望まれる場合は、アミド結合が好ましいが、短い半減期、または生体液や組織中での安定性が必要な担体に対しては、エステル結合が使用される。特定の治療薬を送達するために望ましい安定性を達成するために、両方の化学結合の混合物を使用することができる。その治療的および診断的目的に対して利益のある担体の望ましい特性を達成するために、S-S結合を使用し得る。

10

【0061】

本発明のこれらの実施例、他の実施例、ならびにその機能および特徴は、以下の説明、図、請求項から明らかとなる。

【実施例】

【0062】

例証

20

合成方法の概要

本発明の疎水性コア担体は、中心の高分子主鎖、疎水性部分、保護基、および随意に疎水性部分および/または標的基を含む。各基は相互に共有結合しており、疎水性部分基は、疎水性ペプチド/タンパク質、疎水性薬物およびその誘導体などの疎水性負荷分子（治療薬または診断薬）と可逆的結合（疎水性相互作用）を形成することができる。担体と負荷分子の間の可逆的結合には、疎水性負荷分子と担体の疎水性部分との間の疎水性相互作用を含む。

【0063】

アミノ基、カルボキシル基、水酸基、またはチオール基を含む高分子主鎖からの疎水性コア担体の合成は、一般に3つの合成ステップを伴う：1) 保護鎖での主鎖の共有的修飾、2) 疎水性部分でのステップ1の生成物の修飾、3) ステップ2の生成物と例えばレブチンなどの負荷分子をインキュベートし、小胞を形成することなく疎水性コア担体レブチン複合体の形成を達成する。

30

【0064】

例1

MPEG-ポリ-L-リシン（5000、40,000、27%、40PLPEG527）の合成：試薬、MPEG-スクシンイミジル-コハク酸およびポリリシンは市販されており、その合成は当技術分野ではよく知られている。ポリ-L-リシン（200mg、ポリリシン臭化水素酸塩、Sigma chemical Co.、DPvis:264、MWvis: 55,200、DPmalls:190、MWmalls:39,800、0.7mmolesアミノ基（TNB S分析による）、Sparado et al. Anal Biochem 96: 317, 1979）を200mlの0.1M炭酸塩緩衝液pH 8.35に溶解し、1150mgのMPEG-スクシンイミジル-コハク酸（事前活性化5kDa PEG、NOF、東京）を加えて、ボルテックスし、室温で一晩インキュベーションした。翌日、一定分量を取り、トリニトロベンゼンスルホン酸を使って残りのアミノ基を定量した（Sparado et al. Anal Biochem 96:317, 1979）。結果は73%のアミノ基が残っていることを示した。溶液（200ml）を100 kDaカットオフ膜（UFP-100-E-3A、GE-Amersham Biosciences Corp、マサチューセッツ州ウェストボロー）を通して、10回水を換えて超ろ過洗浄した。結果得られたPLPEG複合体を凍結乾燥して秤量したところ、収量は860mgであった。結果得られた生成物の予測分子量は310 kDaであり、これはMPEGによって誘導体化されたアミノ基の数に基づく。最終生成物のmg当たりの遊離アミノ基の数は0.43umole/mgである（図9）。

40

50

【0065】

例2

MPEG-ポリ-L-リシン(5kDa PEG、40kDa PL、アミノ基の飽和55%、40PLPEG555)の合成：試薬、MPEG-スクシンイミジル-コハク酸およびポリリシンは市販されており、その合成は当技術分野ではよく知られている。40PLの1g(ポリリシン臭化水素酸塩、Sigma chemical Co.、DPvis: 264、MWvis: 55,200、DPmalls:190、MWmalls:39,800、1gに3.0mmolのアミノ基を含む)を190mlの200mM HEPESに溶解した。5g(1mmol)のMPEG-スクシニルイミジル-コハク酸(事前活性化5kDa PEG、NOF、東京)を40PL溶液に加え、反応させた。2時間後、さらに5gのMPEG-スクシニルイミジル-コハク酸を上記のように添加し、週末の間反応させた。アミノ基の含量をTNBSで測定したところ(Sparado et al. Anal Biochem 96:317, 1979)、合計1.4mmolで、アミノ基の飽和が53%であることを示していた。溶液(200ml)を100 kDaカットオフ膜(UFP-100-E-5A、GE-Amersham Biosciences Corp、マサチューセッツ州ウェストボロー)を通して、10回水を換えてろ過洗浄した。結果得られたPLPEG複合体を凍結乾燥して秤量したところ、収量は8.6gであった。結果得られた生成物の予測分子量は570 kDaであり、これはMPEGによって誘導体化されたアミノ基の数に基づく。最終生成物のmg当たりの遊離アミノ基の数は0.20umole/mgである(図9)。

10

【0066】

例3

MPEG-ポリ-L-リシン(5kDa PEG、40kDa PL、アミノ基の飽和22%、40PLPEG522)の合成：試薬、MPEG-スクシンイミジル-コハク酸およびポリリシンは市販されており、その合成は当技術分野ではよく知られている。ポリ-L-リシン(200mg、ポリリシン臭化水素酸塩、Sigma chemical Co.、DPvis:264、MWvis:55,200、DPmalls:190、MWmalls: 39,800、0.7mmolesアミノ基(TNBS分析による)、Sparado et al. Anal Biochem 96:317, 1979)を10mlの0.2M HEPES緩衝液pH 7.35に溶解し、500mgのMPEG-スクシンイミジル-コハク酸(事前活性化5kDa PEG、NOF、東京)を加えて、ボルテックスし、これを繰り返して(さらに500mg)室温で一晩インキュベーションした。翌日、一定分量を取り、トリニトロベンゼンスルホン酸を使って残りのアミノ基の量を定量した(Sparado et al. Anal Biochem 96: 317, 1979)。結果は、22%のアミノ基がMPEGに共役したことを示した。溶液を100 kDaカットオフ膜(UFP-100-E-3A、GE-Amersham Biosciences Corp、マサチューセッツ州ウェストボロー)を通して、10回水を換えて超ろ過洗浄した。結果得られたPLPEG複合体を凍結乾燥して秤量したところ、収量は820mgであった。結果得られた生成物の予測分子量は260 kDaであり、これはMPEGによって誘導体化されたアミノ基の数に基づく。最終生成物のmg当たりの遊離アミノ基の数は0.40umole/mgである(図9)。

20

【0067】

例4

20PLPEG555 DA(5kDa MPEGカルボキシル、20kDa PL、アミノ基の飽和55%、20PLPEG555DA)の合成。この合成に使用されたMPEGは、エステル結合を持たないカルボキシルMPEGで、MPEGとコハク酸塩との間の結合がエステル結合である上記のコハク酸エステルMPEGとは異なるエステル結合を持たない高分子主鎖への直接アミド(DA)結合を生じる。1gの20PL(P7890 Sigmaロット番号065K5101、1gに2.4mmolのアミノ基を含む)を50mlの200mM HEPESに溶解した。15mlの10mM MES pH=4.7中の5g(1mmol)のMPEGカルボキシル(事前活性化したが活性の一部を失った、NOF、東京)を、250mgのNHSS(mw=217.14、1.15mmol)に続いて500mgのEDC(mw=191.71、2.6mmol)を加えることにより、再活性化した。活性化は20分間継続させる。活性化されたMPEGカルボキシルを20PL溶液に加えて反応させた。2時間後、さらに5gのMPEGカルボキシルを活性化して上記のように添加し、週末の間反応させた。アミノ基の含量をTNBSで測定したところ(Sparado et al. Anal Biochem 96:317, 1979)、合計1.05mmolで、アミノ基の飽和が56%であることを示していた。これは、TosohG4000WXLを使用したサイズ排除クロマトグラフィーで保持時間が12.35分(17nm)であったことにより確認された。溶液を100 kDaカットオフ膜(UFP-100-E-5A、GE-Ame

30

40

50

rsham Biosciences Corp、マサチューセッツ州ウェストボロー)を通して、超ろ過洗浄し、凍結乾燥した(9.9g)。動物における担体Cmax(血中最高濃度)とTmax(血中最高濃度の時間)の測定のために1gをFITCで飽和し、エタノール、水で洗浄し、凍結乾燥した(960mg)。残りの8.9gの20PLPEG555DAを2つに分け(それぞれ53m1のDCM中)、1つを活性化C22(2:1のDMF:DCMの30m1中2.5mmol)で飽和し、もう一方は以下のC18(2:1のDMF:DCMの30m1中2.5mmol)で飽和した。

【0068】

例5

20PLPEG555DAC18および20PLPEG555DAC22の合成。20PLPEG555DAの残り8.9gを2つに分け(それぞれ53m1 DCM中)、1つを活性化ベヘン酸で飽和し、もう一方は活性化ステアリン酸で飽和した。ベヘン酸またはC22(2:1 DMF:DCMの30m1中に0.851gまたは2.5mmol)に、290mgのNHS(Mw=115、2.5mmol)と1m1のDCC(Mw=206、1m1=1.3g=6.3mmol)を加えて、1時間インキュベートして、活性化した。尿素沈殿物を遠心分離で除去し、上清を200u1 TEAと共に20PLPEG555DA溶液に加えて反応させた。これを2回繰り返し、一晩反応させた。生成物を37°Cで回転蒸発させ、80%エタノールに溶解して沈殿を遠心分離で除去した。上清(200m1)は3リットルの80%エタノール洗浄の後、1リットルの水で洗浄した。これを、200nmフィルターを使ってろ過滅菌して凍結乾燥し、2.9gを得た。不溶性組成物は次のろ過滅菌を通り抜けないことに注意されたい:PEG/脂肪酸の重量比が14未満の組成物(表2参照)および小胞を形成するもの。組成物の直径は19.8nmで、G4000PWXLカラム(0.78x30cm、TSK Gel、Tosoh Biosep、ペンシルベニア州モンゴメリービル)を使用して15%アセトニトリルを含むPBSで流速0.6m1/分で流出させたゲル浸透クロマトグラフィーでの保持時間は12分である。アミノ基の含量は18nmol/mgである(非常に少ない)。組成物は100mg/mlで水溶性であり、濁りのない黄色真溶液を形成する。組成物は、コレステロールをえた時に小胞を形成しない。

10

20

20

30

40

50

【0069】

ステアリン酸またはC18(2:1 DMF:DCMの30m1中に0.7gまたは2.5mmol)に、290mgのNHS(Mw=115、2.5mmol)と1m1のDCC(Mw=206、1m1=1.3g=6.3mmol)を加えて、1時間インキュベートして、活性化した。尿素沈殿物を遠心分離で除去し、上清を200u1 TEAと共に20PLPEG555DA溶液に加えて反応させた。これを2回繰り返し、一晩反応させた。生成物を37°Cで回転蒸発させ、80%エタノールに溶解して沈殿物を遠心分離で除去した。上清は2リットルの80%エタノール洗浄の後、水で洗浄した。これを、200nmフィルターを使ってろ過滅菌して凍結乾燥し、3.35gを得た。不溶性組成物、特に小胞を形成するものはこのろ過滅菌を通り抜けないことに注意されたい。直径は19.4nmで保持時間は12.05分である。アミノ基の含量は6nmol/mgである(非常に少ない)。組成物は100mg/mlで水溶性であり、濁りのない黄色真溶液を形成する。組成物は、コレステロールをえた時に小胞を形成しない。

【0070】

例6

20PLPEG555C18合成の再現性:20 kDaポリリシン(Sigma Chemical Co.製、多分散性の程度は1.2)でできている担体20PLPEG555C18を製造した。ここで、TNBS反応性アミノ基の55%が5 kDa MPEG-エステル-コハク酸と反応し、残りの44~45%のTNBS反応性アミノ基はステアリン酸と共に役した。これを作るために、1gの20PL(P7890 Sigmaロット番号065K5101、1gmに2.4mmol NH2を含む)を50m1の200mM HEPESに溶解した。250mgのNHSS(mw=217.14、1.15mmol)に続いて500mg EDC(mw=191.71、2.6mmol)を加えて、15m1の10mM MES pH=4.7中の5gのMPEG-コハク酸(1mmol)を活性化した。活性化は20分間継続される。活性化されたMPEGコハク酸を20PL溶液に加えて反応させた。2時間後、さらに5gのMPEGコハク酸を活性化して上記のように添加し、週末の間反応させた。アミノ基を測定したところ1.017mmolであり、アミノ基の飽和が57%であることを示した。これは、TosohG4000WXL(流速0.6m1/分、15%アセトニトリルを含むPBS)を使ったサイズ排除クロマトグラフィーで保持時間が12.9分(14nm)であることにより確認され、また合計添加PEGの組み込

みは90%であることを示した。20PLPEG555を含む反応混合物を凍結乾燥して50mL DCMに溶解し、沈殿物を遠心分離で除去した。沈殿物をDCMで洗浄し、集めた上清（合計200mL）に400uL TEAを加えた後、活性化C18で飽和させた。これを行うために、ステアリン酸（C18、1:2 DMF:DCMの30mL中に0.7gまたは2.5mmol）に、290mgのNHS（Mw=115、2.5mmol）と0.5mLのDCC（Mw=206、0.5mL=0.65g=3.2mmol）を加えて、1時間インキュベートして活性化した。尿素沈殿物をろ過で除去し、活性化脂肪酸を20PLPEG555溶液に加えて反応させた。これを2回繰り返して一晩反応させた後、反応混合物を回転蒸発させて50%のエタノール水に溶解し、遠心分離で沈殿物と一番上の脂肪酸層を除去した。沈殿物を50%エタノールで2回洗浄し、上清すべてを集めて80%エタノールにし、溶液を透明化して超ろ過した。集められた上清は、超ろ過装置（100,000 MWCO Ultra-filtration cartridge、UFP-100-E-5A、GE-Amersham）を用いて200mLに濃縮し、同じ超ろ過装置内で10倍容量の80%エタノールで洗浄後、10倍容量の水で洗浄し、150mLに濃縮して収集した。カートリッジ内の残りの物質を水2 x 50mLで洗浄し、サンプルと一緒に集めた。サンプル（20PLPEG555C18）を、0.2μmフィルター（ポリスルホン膜、Nalgene）を用いてろ過し、凍結乾燥した（合計8.9g）。不溶性物質および0.2μmより大きな物質はこのフィルターを通過しないことに注意すべきである。担体の分子直径は、TosohG4000WXL（流速0.6mL/分、15%アセトニトリルを含むPBS）を使用したサイズ排除クロマトグラフィーで測定したところ、保持時間は12分であり、球状タンパク標準を使った19nmに相当した。1mg/mLの20PLPEG555C18をTNBSで分析したところ、6 +/- 5μM NH₂または6nmol/mgが含まれており、飽和は90%より大きいことが示された。

10

20

【0071】

上記の合成をさらに2回繰り返して、再現性を測定した。結果得られた担体は水溶性であり、直径は19nmで、親和性によって負荷分子を保持している。酸消化およびアミノ酸分析では、組成物の全体的リシン含量は重量で4.8~5%であることが示された。使用された酸消化は、タンパク質で行われた分析と類似であり、当業者には知られている。以下の表は、担体の3重合成の結果を示し、合成の再現性を示している。

【0072】

【表1】

表1

20PLPEG555C18 ロット番号	A	B	C
ポリリシンの重合化度 (多分散性 Mn/Mw)	115 (1.2)	115 (1.2)	115 (1.2)
飽和 PEG%	54%	54%	55%
脂肪酸添加前の保持時間 (分)	12.9	12.9	12.9
PLPEG のサイズ直径	14nm	14nm	14nm
脂肪酸添加後の担体保持時間 (分)	12.16	12.22	12.03
担体直径	19nm	18nm	19nm
収率 (開始 PEG とポリリシンの重量を 100% とする)	79%	81%	81%
量	8.9g	9.2g	4.5g
担体内に残った NH2 (3umol/mg PL で開始、% +/- STD)	6nmol/mg (4+/-2%)	8nmol/mg (5.2+/-2%)	10nmol/mg (6.6 +/- 2%)
GLP1 負荷試験 (負荷% +/- STD、 10mg/ml の担体に担体重量の 2% の GLP1 が負荷された時)	95.8 +/- 0.05	96.1 +/- 0.43	95.9 +/- 0.09
酸消化完了後のリシン含量 (重量)	4.96%	4.87%	4.82%

例7

以下の実験は、ポリリシン / 脂肪酸 / MPEG共役体のさまざまな組成物の溶解特性を測定するために行われた。50mg/mlで水溶性になる移行は、MPEG:脂肪酸の重量比が約12:1 ~ 14:1になったとき起こり始めた。MPEG:脂肪酸の重量比が少なくとも14:1のすべての組成物は、水溶性である。これは、水性溶媒または部分的水性溶媒と混合したとき、コレステロール不在で可溶性であり、コレステロールが存在する場合でも小胞を形成しない組成物を提供する。表2に示されている以下の組成物の合成方法は、例6に示す通りである。組成物中のMPEGのパーセントを変化させるために、合成でのMPEG量を比例して変化させ、望ましいアミノ基飽和が達成されるまで、アミノ基測定の合間に少量ずつ加えた。C8とC12を除いて、脂肪酸はNHSとDCCで活性化された。C8、C12、C16については、カプリル酸、ラウリル酸、パルミチン酸を活性化する代わりに、無水カプリル、無水ラウリル、無水パルミチン試薬を使用した。各組成物では、溶解度を50mg/mlで記録し、そのデータを表2に示す。

【0073】

10

20

30

【表2】

表2 ポリリシン／脂肪酸／MPEG 共役体のさまざまな組成物の溶解特性を示す

MPEGに結合したポリリシン中のアミノ基の% (kDaでのサイズ)	脂肪酸に結合したポリリシン中のアミノ基の% (タイプ ^o)	MPEG:脂肪酸の重量比	50mg/mlでの水溶性
55 (5kDa)	44 (C8)	43	溶解
35 (5kDa)	64 (C4)	31	溶解
55 (5kDa)	44 (C16)	24	溶解
55 (5kDa)	44 (C18)	22	溶解
37 (5kDa)	62 (C8)	20	溶解
35 (5kDa)	64 (C8)	19	溶解
55 (5kDa)	44 (C22)	18	溶解
55 (5kDa)	44 (C24)	17	溶解
37 (5kDa)	62 (C12)	15	溶解
35 (5kDa)	64 (C12)	13.7	部分的に溶解
26 (10kDa)	73 (C18)	12.5	部分的に溶解
37 (5kDa)	62 (C16)	11.6	部分的に溶解
37 (5kDa)	62 (C18)	10.5	不溶性ゲル
27 (5kDa)	72 (C16)	7.3	不溶性ゲル
27 (5kDa)	72 (C18)	6.6	不溶性ゲル
27 (5kDa)	72 (C24)	5.0	不溶性ゲル
9 (5kDa)	90 (16)	1.95	不溶性ゲル
9	90 (C18)	1.76	不溶性ゲル

例8

MPEG-タブシン酸の合成：5 kDa MPEG-タブシン酸を作るために、タブシン酸 (1.15g、4mmol、Sigma-Aldrich、ミズーリ州セントルイス) を50mLのジメチルホルムアミド (DMF、Sigma-Aldrich) に、1.4mLのトリエチルアミン (TEA、10mmol、Fisher、マサチューセツ州ウォルサム) と1.65gのN,N'-ジシクロヘキシリカルボジイミド (DCC、8mmol、Pierce、イリノイ州ロックフォード) と共に溶解した。溶液を15分間攪拌し、N-ヒドロキシクシンイミド (NHS、920mg、8mmol、Fisher) を加えてさらに15分間攪拌した。MPEGアミン (5g、1mmolの5 kDa、Sunbio、韓国) をわずかに加熱して45mLのDMFに溶解し、活性化タブシン酸溶液に15分間かけてゆっくりと加え、一晩攪拌した。反応が完了したかどうかを判定するために、250uLの一定量を採取し、MPEGを5mLのジエチルエーテルで沈殿させ、1mLの1N NaOHに溶解してHCLで酸性化し、ジクロロメタン (~2mL) で抽出して下層を回収して空気流で濃縮し、ジエチルエーテル (5mL) に加えて沈殿させた。沈殿物を回収し、1mLのジクロロメタンに溶解して、薄層クロマトグラフィー (TLC) で分析した。TLC移動相は、5:1ジクロロメタン / メタノールである。固定相はアルミニウムシート上のシリカゲル60 F254である。以下のTLCスポットをプロモクレゾールブルーおよびニンヒドリンで可視化した。プロモクレゾールブルーはPEGを持つ物質を青く染色する。5KアミノPEG

10

20

30

40

50

(s.m.) の Rf は 0.76 で、生成物タブシン酸-アミノPEG共役体（脂肪PEG、生成物）は 0.63 であった。開始物質および生成物は両方ともプロモクレゾールブルーで染色され、5KアミノPEGはニンヒドリンで陽性に染色されるが、生成物はされない（図18参照）。反応が完了したら、MPEG-タブシン酸をエーテルで沈殿させ（攪拌棒付き1Lビーカーに800mL）、真空ろ過（Q8、ろ紙、Fisherbrand）で回収し、ろ紙上の沈殿物をさらにジエチルエーテル（50mL）で洗浄した。粗製MPEG-タブシン酸を1N NaOH（20mL）に溶解して過剰の活性化カルボン酸を除去し、HClを用いてpHを酸性に戻し、50mLの水で希釈して、MPEG-タブシン酸をジクロロメタン（100mL）で3回抽出した。合わせたジクロロメタン溶液を硫酸マグネシウム（50g）で乾燥して、ガラスフィルター漏斗（中間フリット）でろ過し、減圧下、回転蒸発して濃縮した（浴温～50°C）。攪拌中のジエチルエーテル（攪拌棒付き1Lビーカーに800mL）に残渣を加え、MPEG-タブシン酸固体をろ紙（Q8、定性、Fisherbrand、エーテルで予備洗浄）を付けたブフナー漏斗で減圧ろ過した。MPEG-タブシン酸生成物をエタノール（50mL）に溶解し、3K MWCU超ろ過カートリッジ（GE-Amersham、UFP-3-E-3MA、バッチ番号3-1067）を使用して超ろ過することにより10倍容量の80%エタノールで洗浄し、その後10倍容量の水で洗浄した。0.2μmポリスルホンフィルター（Nalgene、ニューヨーク州ロチェスター）を使用して生成物をろ過滅菌して凍結乾燥し、3.5gの物質を得た。

【0074】

例9

20PLC16PEGFの合成：この担体は20 kDaポリリシン（多分散性度1.2）でできており、90～99%のTNBS反応性アミノ基が5 kDa MPEG-タブシン酸と反応した（例8参照）。25mgのポリリシン（Mw = 20 kDa、アミノ基含量 = 3.1mmol/g、TNBS分析による。カタログ番号P7890、DPVIS=115、バッチ番号017k5101、Sigma）を50mLの200mM HEPESに溶解し、40～50°Cのオイル温浴内で攪拌して、暖かいポリリシン攪拌溶液を調製した。別に、MPEG-タブシン酸（320mg、0.060mmol）、N-ヒドロキシスルホスクシンイミドのナトリウム塩（NHSS、26.4mg、0.12mmol、Fluka）とN-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミド（EDC、23.2mg、0.12mmol）を8mLの10mM MES中に入れた。混合物をボルテックスして20分間インキュベートした。活性化MPEG-タブシン酸をポリリシン溶液に加え、60分間攪拌した。類似量のMPEG-タブシン酸の活性化およびポリリシン溶液への添加を、約60分間隔でさらに4回繰り返し、混合物を一晩攪拌した。反応混合物は、100k MWCU超ろ過カートリッジ（GE-Amersham、UFP-100-E-3MA）付き超ろ過装置を用いて、10倍容量の80%エタノールで洗浄後、10倍容量の水で洗浄した。洗浄した生成物は滅菌ろ過し（0.2ミクロン、115mL、Nalgene）、凍結乾燥して400～500mgの20PLC16PEGFを得た。最終物質のTNS分析（1mg/mL）では、アミン含量が7～10nmol/mg（TNBS分析）であり、ポリリシンにはアミノ基はほとんど残されていないことが示された。TosohG4000WXLを使って、15%CANを含むPBSで流速0.6mL/分で溶出させたGPC分析では、保持時間が11.9分であり、直径21nmの構造を示唆した。プロセスの再現性を判断するために、この合成を3回繰り返した。以下の表は、担体の3重合成の結果を示し、合成の再現性を示している。

【0075】

10

20

30

【表3】

表3

20PLC16PEGF、ロット番号	A	B	C
ポリリシンの重合化度	115	115	115
最終担体の保持時間 (分)	11.92	11.92	11.89
対応する担体直径 (nm)	20.6	20.6	20.6
PL+PEG-タブシン酸%に基づいた収率 (量)	26% (430mg)	26% (420mg)	28% (450mg)
担体内に残った NH2 (3umol/mg PL で開始)	7.1nmol/mg	10.3nmol/mg	10.5nmol/mg

例10

これらの担体に負荷できる負荷分子のタイプを完全に特徴付けるために、酸性条件 (0.1% TFA) での相対的疎水性を反映する逆相HPLCカラムでのさまざまな分子の相対保持時間を表に示す。結果は一般的なガイドラインであり、VIPで見られるのと同等に絶対であると解釈されるべきではない。ほとんどの治療薬は、合成後（または生合成）の精製中または分析目的のどちらかで、逆相HPLCカラムで分析された。従って、HPLCカラムでの保持時間を測定するこのプロセスは、本出願に開示された発明を可能にするための不当な実験ではない。実証目的で、負荷分子候補は、逆相HPLCカラム (SynergiMaxRP 4x20mm、Phenomenex、カリフォルニア州トーランス) から流速1.5 ml/分で、溶液AとBのグラジエント (1 ~ 5分でBを25 ~ 50%) を使用して溶出された。ここで、Aは0.1%トリフルオロ酢酸 (TFA) / 5%アセトアニリドを含む水であり、溶媒Bは0.1% TFAを含むアセトアニリドである。図11 ~ 17の結合研究に基づくと、上記のHPLC条件で保持時間が2.5分を超えるものは、下記（表4）の疎水性コア担体に対して高い結合親和性を示す可能性が高い。

【0076】

【表4】

表4 上記のクロマトグラフィー条件でのさまざまな負荷分子の保持時間および
20PLPRG555C18に対するその相当Kd。

負荷分子	保持時間 (分)	解離定数 (Kd)
ドキソルビシン	1.63	> 100uM
ノシセプチン	1.42	> 100uM
テルリプレシン	1.45	> 100uM
グルカゴン様ペプチド1 (GLP-1、3 kDa)	3.2	< 500nM*
グルカゴン様ペプチド2 (GLP-2、3 kDa)	2.46	< 500nM*
膵島アミロイドポリペプチド (IAPP または アミリン、3.6 kDa)	2.36	< 900uM*
血管作動性腸管ペプチド	1.64	< 10uM*
ヒト成長ホルモン (26kDa)	1.82	> 100uM
レブチン (16kDa)	4.90	< 800nM*
インスリン (5 kDa)	1.79	未決定

*Kdが太字のものは、結合の親和性が高いか、またはKdが100uM未満である。

この条件で保持時間が2分を超える負荷分子は、ほとんどの場合担体に対して高い親和性 (Kdが100uM未満)を持ち、これらの分子の循環半減期を延長する上で担体が十分に役立つと推定することは、ある程度合理的だと認められる。担体への親和性を予測するためにHPLCを使うルールの1つの例外は、血管作動性腸管ペプチドである。このペプチドは、その保持時間が1.64分であるからもわかるように、酸性条件 (0.1% TFA) でかなり親水性である。しかし、脂質の存在下の中性pHでは、疎水性脂質環境とより相溶性のあるヘリックス構造をとることが知られている。担体 (20PLPEG555C18) に対しての高い親和性は、より疎水性のヘリックスの形成による可能性がある。本発明の疎水性コア担体に結合する負荷分子の能力をより良く予測するために、HPLCを中性pHで行うことはできるが、この条件では逆相HPLCのピークが幅広くなるため、これは若干困難である。しかし、これはかなり適正で、それでも正確な予想が可能である。逆相HPLCは当技術分野では標準的で普遍的な実務であるので、このプロセスは不当な実験ではない。HPLCに加えて、本組成物に対する担体の結合の分析は、図11～17の例に示されるように、当業者によって容易に実施され得る。

【0077】

例11

20PLPEG555C18への負荷分子の結合：ポリプロピレンミクロ遠心管を3部用意した。一定分量 (25uL) の担体ストック (20PLPEG555C18; 100mg/mLまたは33mg/mL) をポリエチレンミクロ遠心管に入れ、対応する kontroールに25 uLの水を入れた。負荷分子の相当重量が担体重量の2～30%の間になるように、さまざまな濃度の負荷分子を遠心管に加えた。各遠心管に25uLの10 x リン酸緩衝生理食塩水を加えて、溶液の合計容量を250uLにした。溶液を2時間インキュベートして、再生セルロース製の100 kDa分子量カットオフフィルター (Microcon Ultracell YM-100、Millipore、マサチューセッツ州ベッドフォード) でろ過した。上記の条件を使用した逆相HPLCでろ液中の遊離の未結合負荷分子を分析して表3を作成した。負荷された負荷分子の合計量または kontroールは、担体のない溶液のろ液によって表される。担体に結合した負荷分子量は、担体のないろ液と担体のある

10

20

30

40

50

る液の間の負荷分子量の差で表される。この分析前に、バックグラウンドのフィルター結合が測定され、著しいフィルター結合が見られた場合はいつもこれが考慮された。図11~17はこのように作成された。

【0078】

前述の発明は、理解を明確にする目的での説明および例によって詳細に説明されているが、当業者であれば、添付の請求項の精神と範囲を逸脱することなく特定の変更と修正を実施できることを容易に理解する。

【0079】

参照による組み込み

本書に引用されたすべての特許および出版物は、ここに参照して組み込まれる。

10

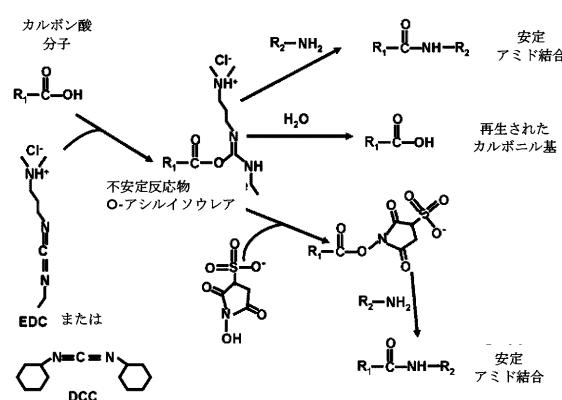
【0080】

同等物

当業者であれば、通常の実験以上のものを用いずに、本書に記載された本発明の特定の実施例との多くの同等物を認識、または突き止めることができる。このような同等物は、以下の請求項によって包含されるものとする。

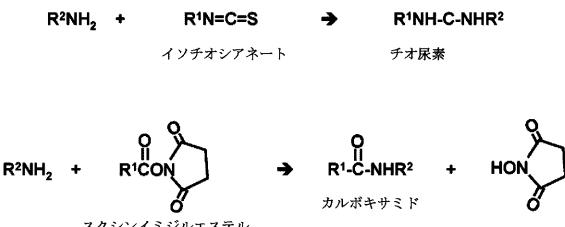
【図2】

図2



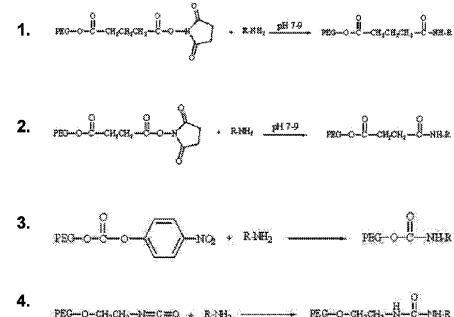
【図3】

図3



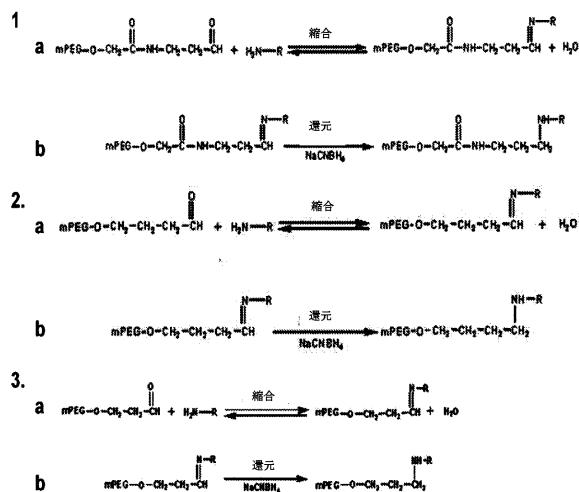
【図4】

Figure 4



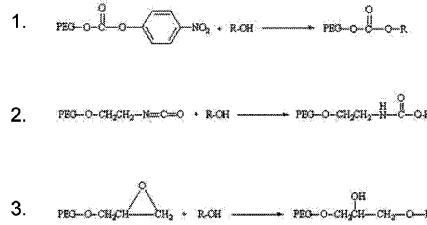
【図5】

図5



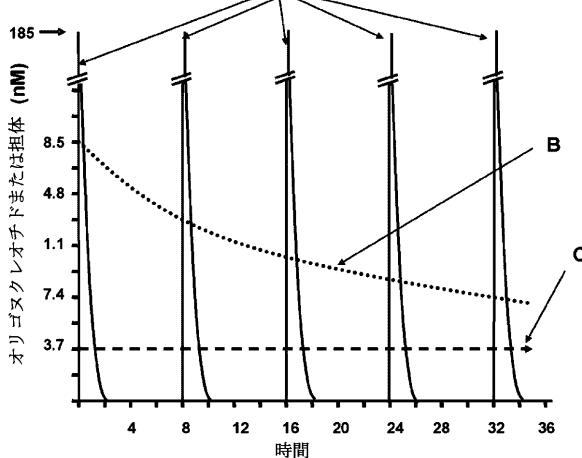
【図6】

Figure 6



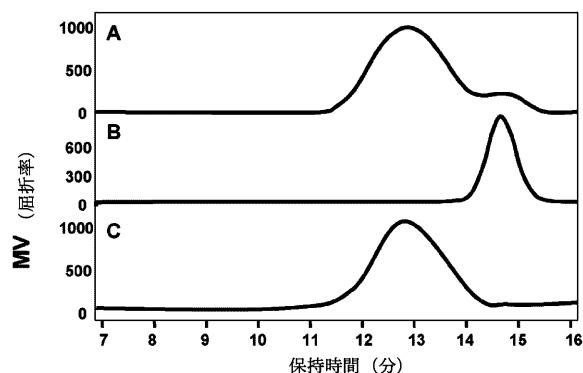
【図7】

図7



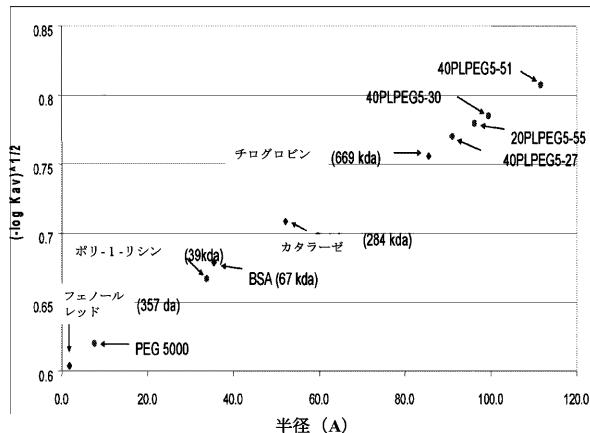
【図9】

図9



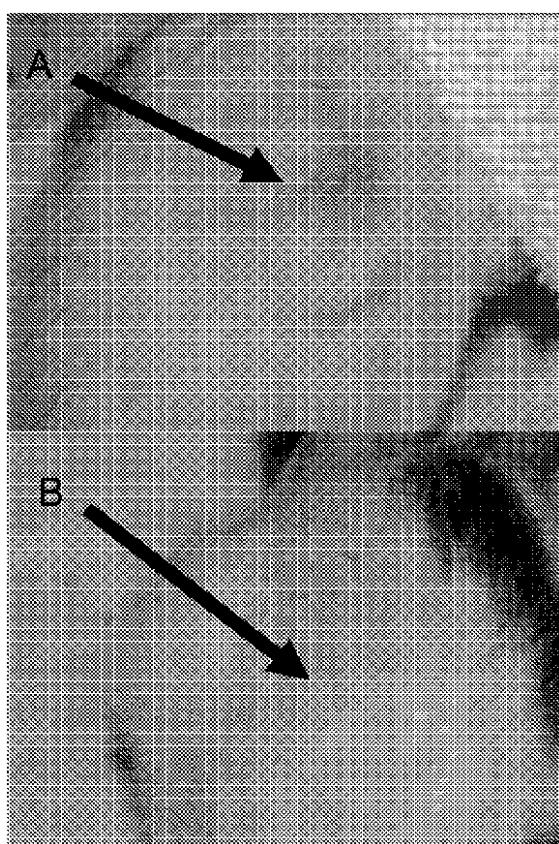
【図10】

図10



【図 19】

Figure 19

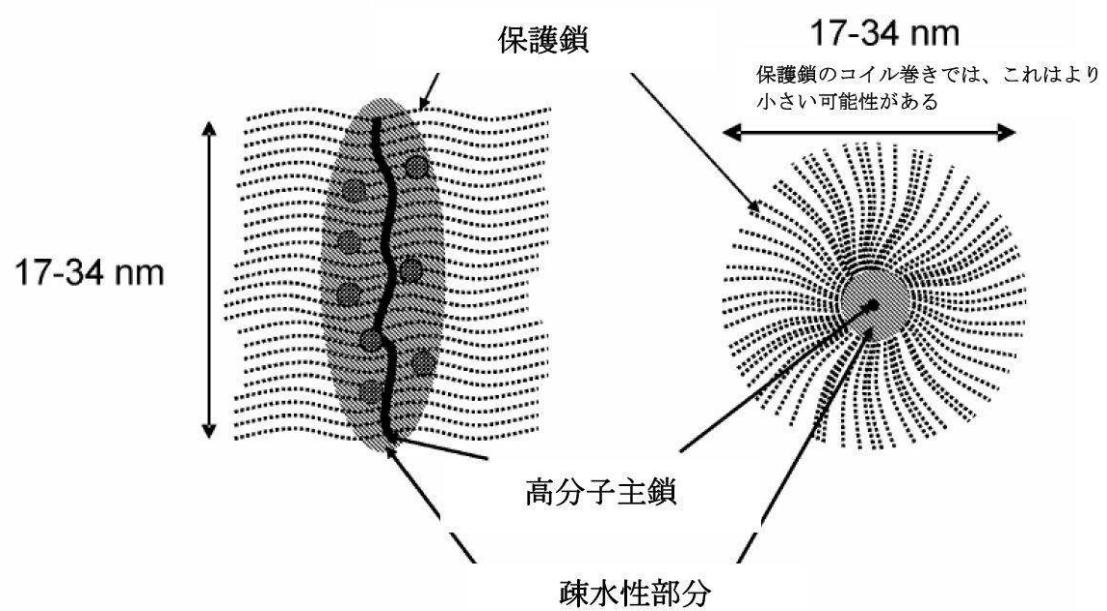
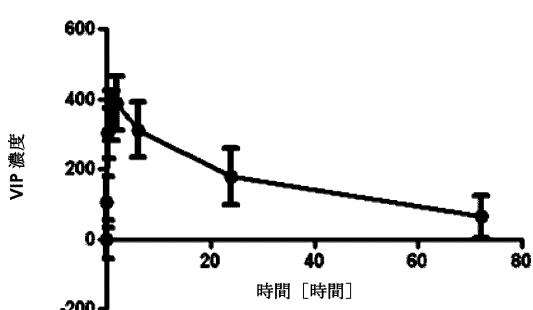


【図 1】

図 1

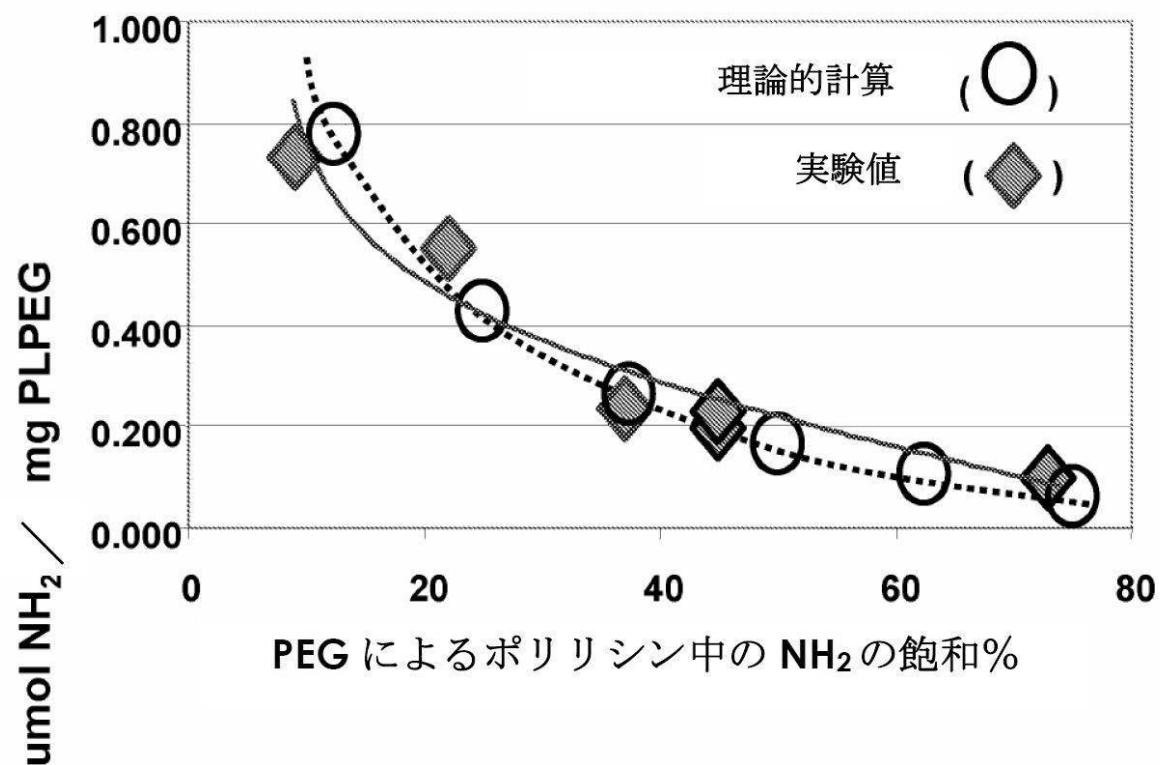
【図 20】

図 20



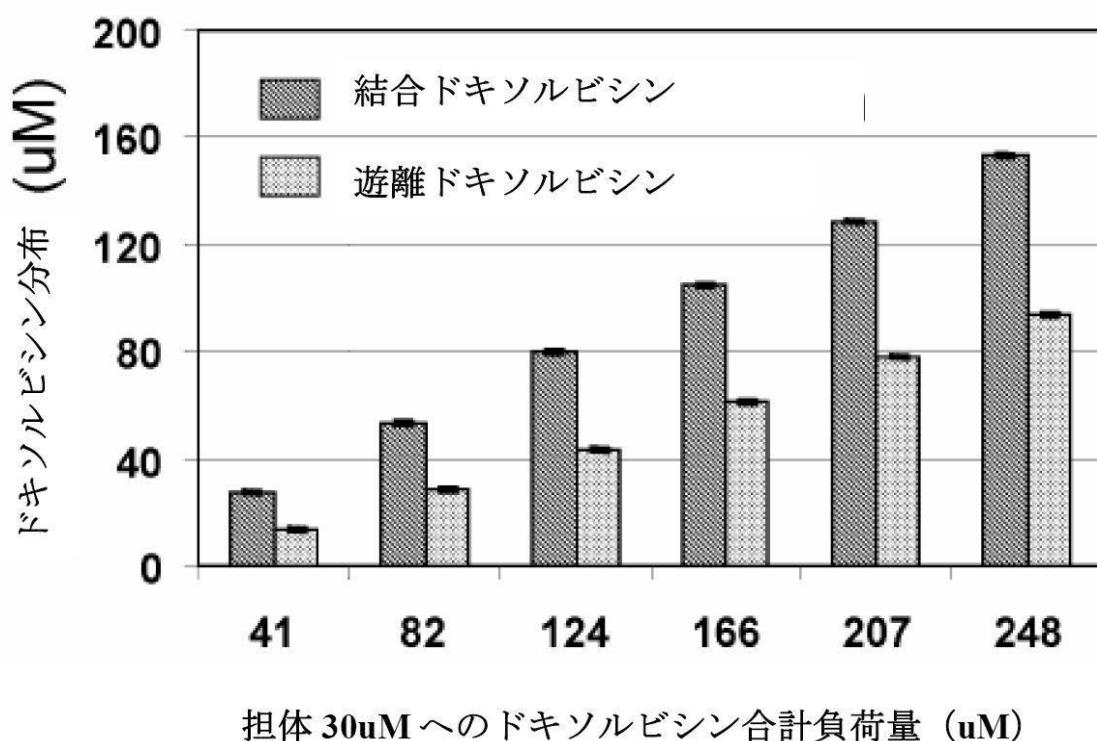
【図 8】

図 8



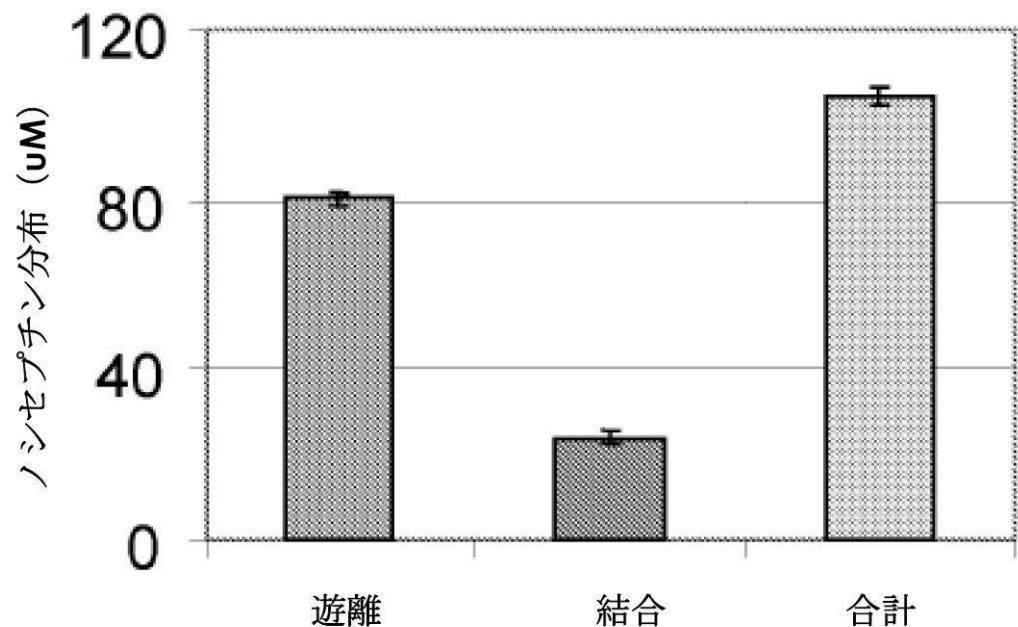
【図 11】

図 11



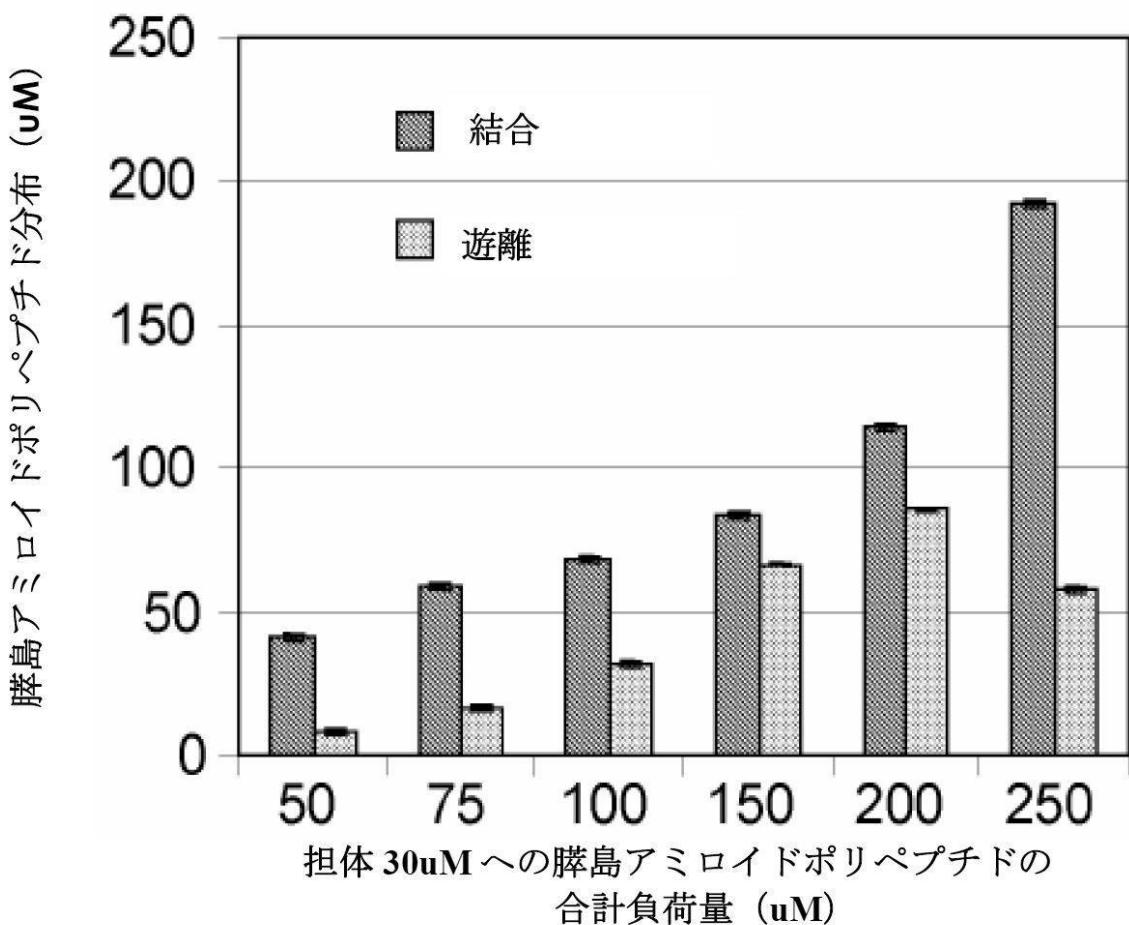
【図 12】

図 12

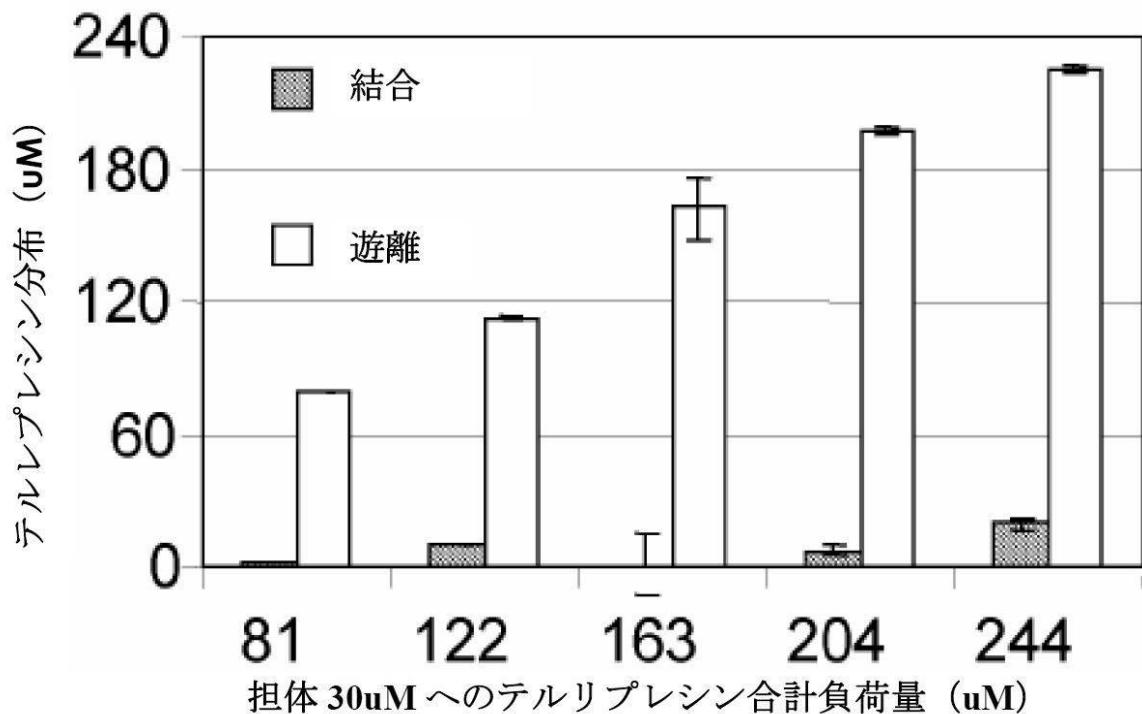


【図 13】

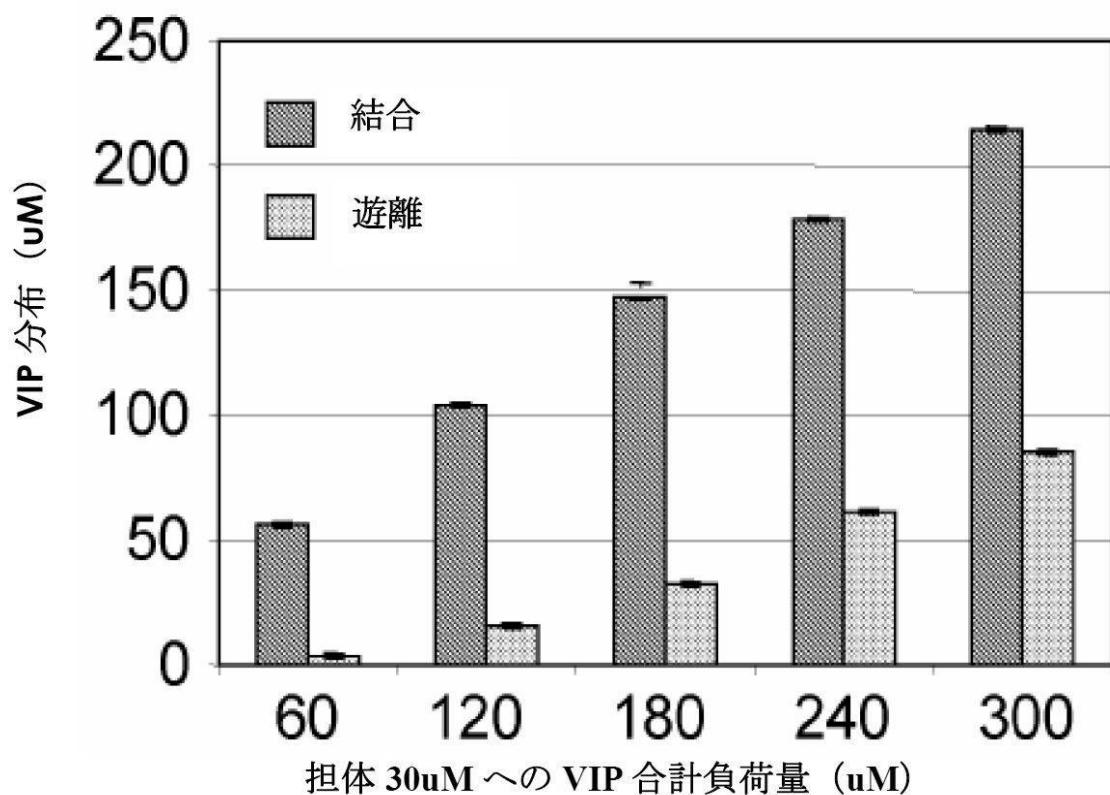
図 13



【図14】
図14

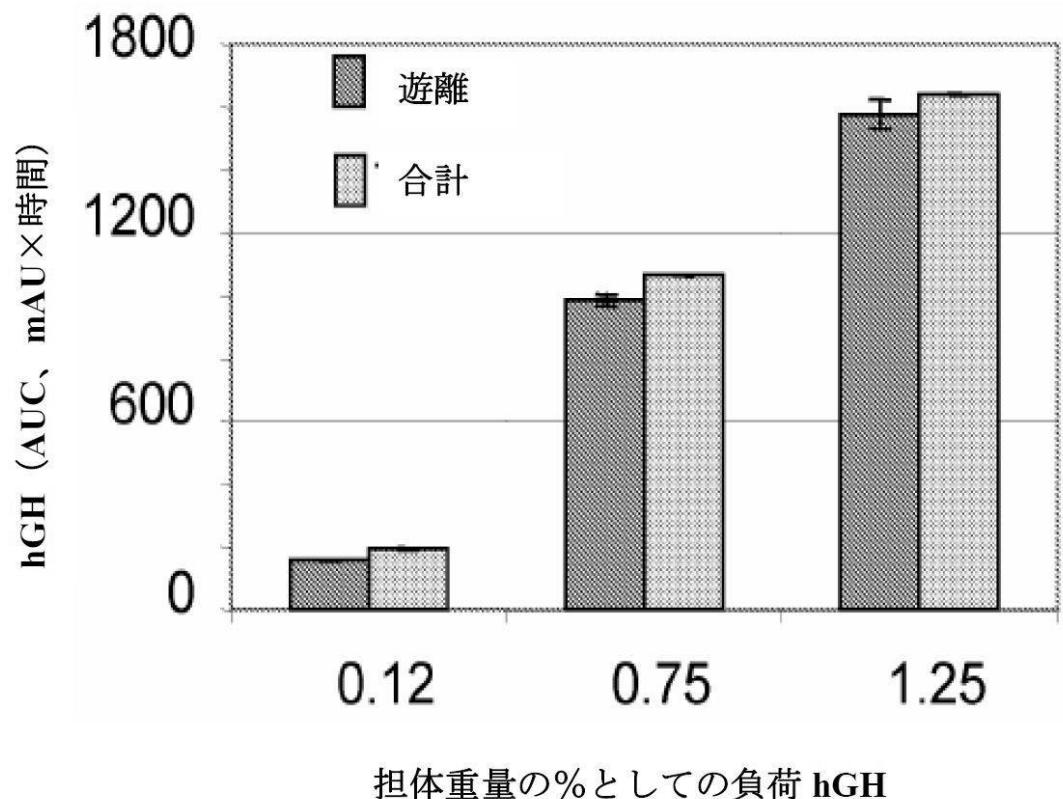


【図15】
図15



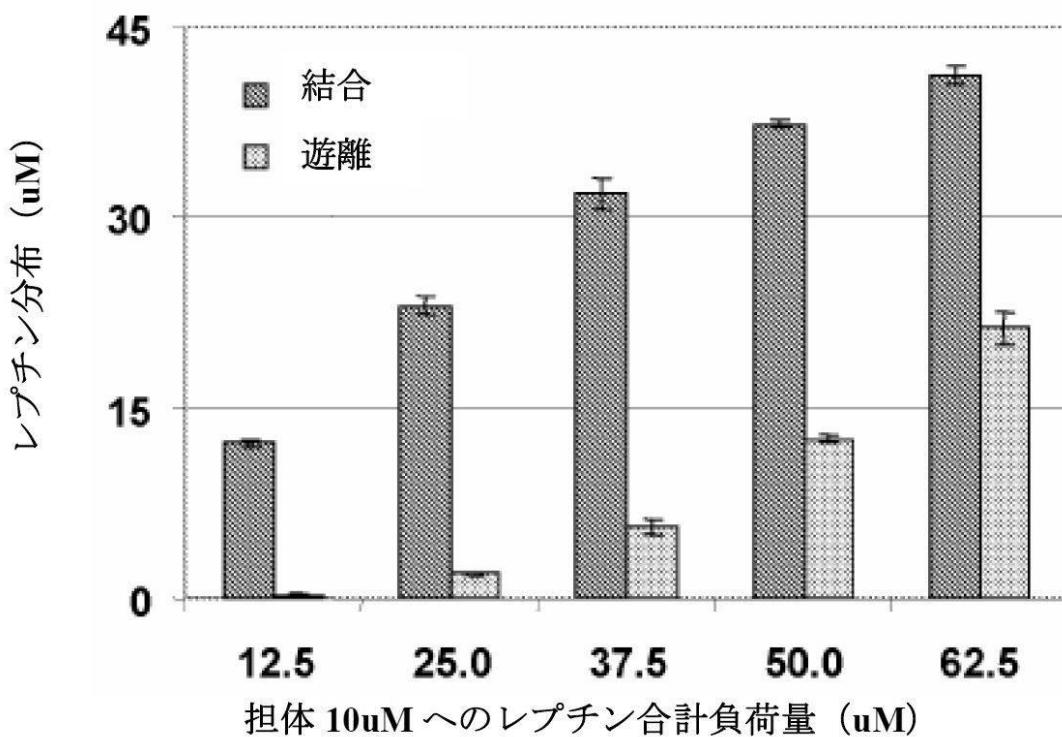
【図 16】

図 16



【図 17】

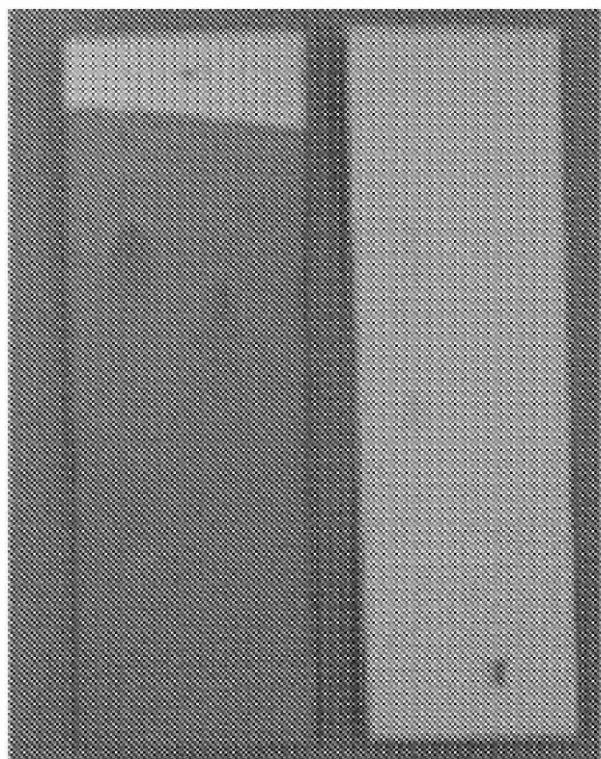
図 17



【図 18】

図 18

5:1 DCM / MeOH

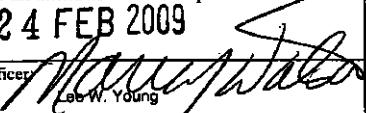


5K mPEG
アミン RXN

5K mPEG
アミン RXN

プロモクレゾール／ニンヒドリン

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 09/30678												
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 9/20 (2009.01) USPC - 424/464 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) USPC: 424/464														
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 424/482, 497; 514/12; 525/165 (see search terms below)														
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(USPT,PGPB,EPAB,JPAB); DialogPRO-Chemical Engineering and Biotechnology Abstracts, INSPEC, NTIS (National Technical Information Service), PASCAL, Current Contents Search, MEDLINE Search Terms: carrier, hydrophobic core, linear backbone, polylysine, fatty acid, carbodiimide														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Category*</th> <th style="text-align: left;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>US 2007/0141145 A1 (Castillo et al.) 21 June 2007 (21.06.2007) para [0016]-[0017], [0020]-[0021], [0023], [0025]-[0027], [0085]-[0086], [0087], [0101], [0104]-[0105], [0109], [0114], [0120], [0140], [0143], [0150], [0152], [0164], [0168], [0175], [0177], [0180], [0184], [0208], [0358], [0366], [0375], [0403], [0409]-[0410], [0418], [0425], [0427]</td> <td>27 1-26, 28-32</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2007/038964 A1 (Berland et al.) 12 April 2007 (12.04.2007) pg 27, para 2, In 5-7</td> <td>1-25, 29-32</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>GILLES et al. Stability of water-soluble carbodiimides in aqueous solution. Anal Biochem, 1990, Vol 184, No 2, pg 244-8, abstract only</td> <td>26, 28</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	US 2007/0141145 A1 (Castillo et al.) 21 June 2007 (21.06.2007) para [0016]-[0017], [0020]-[0021], [0023], [0025]-[0027], [0085]-[0086], [0087], [0101], [0104]-[0105], [0109], [0114], [0120], [0140], [0143], [0150], [0152], [0164], [0168], [0175], [0177], [0180], [0184], [0208], [0358], [0366], [0375], [0403], [0409]-[0410], [0418], [0425], [0427]	27 1-26, 28-32	Y	WO 2007/038964 A1 (Berland et al.) 12 April 2007 (12.04.2007) pg 27, para 2, In 5-7	1-25, 29-32	Y	GILLES et al. Stability of water-soluble carbodiimides in aqueous solution. Anal Biochem, 1990, Vol 184, No 2, pg 244-8, abstract only	26, 28
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
X	US 2007/0141145 A1 (Castillo et al.) 21 June 2007 (21.06.2007) para [0016]-[0017], [0020]-[0021], [0023], [0025]-[0027], [0085]-[0086], [0087], [0101], [0104]-[0105], [0109], [0114], [0120], [0140], [0143], [0150], [0152], [0164], [0168], [0175], [0177], [0180], [0184], [0208], [0358], [0366], [0375], [0403], [0409]-[0410], [0418], [0425], [0427]	27 1-26, 28-32												
Y	WO 2007/038964 A1 (Berland et al.) 12 April 2007 (12.04.2007) pg 27, para 2, In 5-7	1-25, 29-32												
Y	GILLES et al. Stability of water-soluble carbodiimides in aqueous solution. Anal Biochem, 1990, Vol 184, No 2, pg 244-8, abstract only	26, 28												
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>														
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" 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 13 February 2009 (13.02.2009)	Date of mailing of the international search report 24 FEB 2009													
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer  Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774													

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(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,SE,SI,S,K,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,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,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,K,E,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,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ボロティン, エリジャー エム.

アメリカ合衆国 ワシントン 98011, ボーセル, 102エヌディー アベニュー エヌ
イー 14914

F ターム(参考) 4C076 AA95 EE23A EE26A EE48A EE50A FF31

4C084 AA03 BA03 MA05 MA66 NA13