(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2016-501260
(P2016-501260A)
(43)公表日　平成28年1月18日(2016.1.18)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A61K 47/48	***(2006.01)***	A61K	47/48	4C076
A61K 31/785	***(2006.01)***	A61K	31/785	4C086
A61K 47/26	***(2006.01)***	A61K	47/26	
A61P 35/02	***(2006.01)***	A61P	35/02	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 20 頁）

(21)出願番号　特願2015-546418 (P2015-546418)
(86)(22)出願日　平成25年12月3日 (2013.12.3)
(85)翻訳文提出日　平成27年8月5日 (2015.8.5)
(86)国際出願番号　PCT/PL2013/000154
(87)国際公開番号　WO2014/088434
(87)国際公開日　平成26年6月12日 (2014.6.12)
(31)優先権主張番号　P.401934
(32)優先日　平成24年12月6日 (2012.12.6)
(33)優先権主張国　ポーランド(PL)

(71)出願人　515155019
ウニヴェルシテット・ウズキ
Ｕｎｉｗｅｒｓｙｔｅｔ　Ｌｏｄｚｋｉ
ポーランド、ペエル－９０－１３１ウッジ、ウーリツァ・ナルトヴィチャ６５番
(74)代理人　100100158
弁理士　鮫島　睦
(74)代理人　100068526
弁理士　田村　恭生
(74)代理人　100150500
弁理士　森本　靖

最終頁に続く

(54)【発明の名称】マルトトリオースで被覆された第四世代ポリプロピレンイミンデンドリマーＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩの使用

(57)【要約】
本発明は、腫瘍性増殖疾患、特に、慢性リンパ性白血病の治療剤を調製するためのマルトリオースで被覆された第四世代ポリプロピレンイミドデンドリマーの使用を提供する。

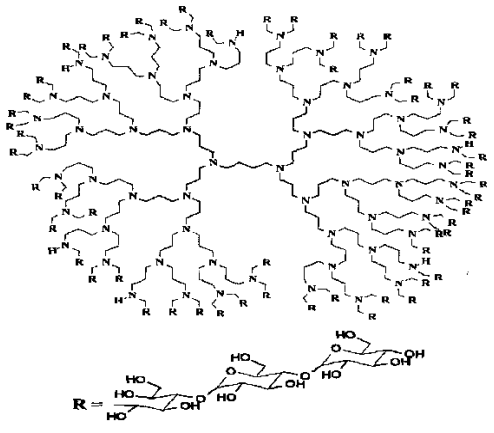
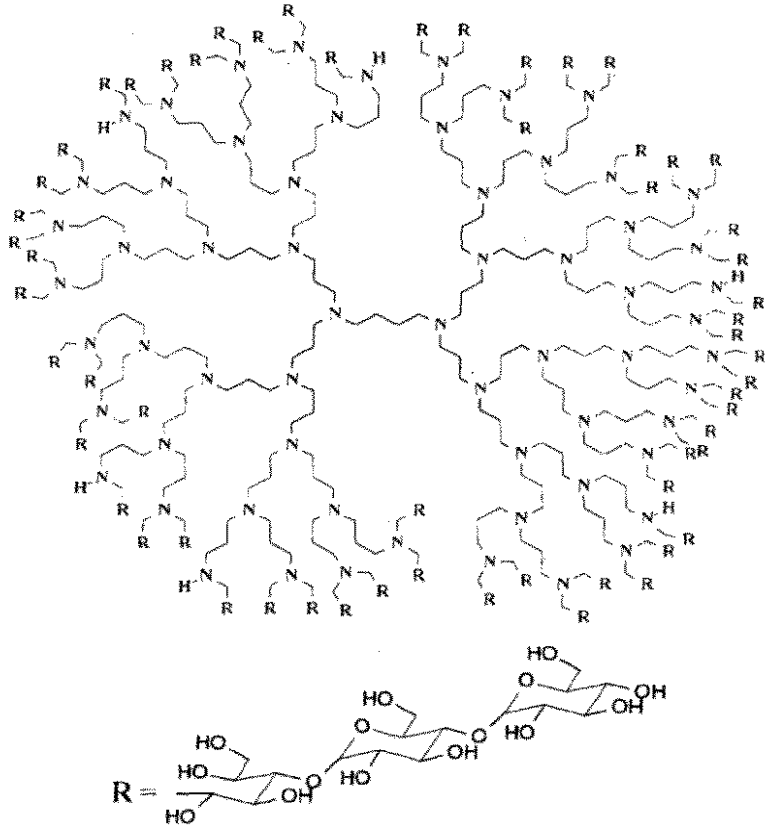


Fig. 1
Pattern of PPI-G4-DS-Mal-III dendrimer particle

【特許請求の範囲】
【請求項１】
腫瘍性増殖性疾患、特に、慢性リンパ性白血病の治療薬を製造するための、マルトトリオースで被覆された第四世代ポリプロピレンイミンデンドリマーＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩ（ここで、前記デンドリマーは、パターン１で定義され、そのＲ成分は、マルトトリオース粒子を意味する）の使用。
【化１】



パターン１

【請求項２】
ＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマーが、第四世代ポリプロピレンイミンデンドリマー粒子ＰＰＩ－Ｇ４のアミノ基に対して、８０～９５％、より好ましくは、９０％のマルトトリオース粒子（Ｍａｌ－ＩＩＩ）を含有し、ＰＰ１－Ｇ４デンドリマーの高密度コートＤＳ（高密度シェル）を形成することを特徴とする、請求項１に記載の使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、マルトトリオースで被覆された第四世代ポリプロピレンイミンデンドリマーＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩの使用に関するものであり、そのＲ成分（マルトトリオース粒子（３つのα－グルコース残基からなる三糖）を意味する）と共にパターン１で定義され、ＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩ（ここで、ＰＰＩ－Ｇ４は、ポリプロピレンイミンデンドリマーの第四世代を意味し、ＤＳ（高密度シェル（dense shell））は、オープン高密度コート（open dense coat）を意味し、およびＭａｌ－ＩＩＩは、マルトトリオースを意味する）と略称される。
【背景技術】
【０００２】

血液悪性腫瘍を治療するための新しい有効な薬を探索するために、長年にわたり広範囲の研究が行われてきた。何年にもわたり、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）の標準治療は、第一選択薬であるナイトロジェンマスタード、シクロホスファミドまたはクロラムブシルなどのアルキル化薬物の使用に基づくものであった。１９８０年代において、いわゆるプリン類似体（ＡＮＰ）群に属する最初の化合物が合成された。それらのうち２つ、すなわち、クラドリビン（２－クロロデオキシアデノシン，２－ＣｄＡ）およびフルダラビン（ＦＡ）は、他の骨髄およびリンパ増殖性疾患と同様に、通常、ＣＬＬの治療で用いられる。近年、数種類のモノクローナル抗体およびイムノトキシンがＣＬＬの治療に導入されている。ＡＮＰと組み合わせて投与されるモノクローナル抗体（例えば、リツキシマブ）はＣＬＬ治療の有効性を高める。

【０００３】

このように多くの種類の抗白血病薬が存在するにもかかわらず、ＣＬＬはいまだ治療不可の病気である。それゆえ、この疾患を抑えうる新規な治療薬への研究が進められ、その治療の有効性において飛躍的な進歩が大いに期待されている。

【０００４】

腫瘍性疾患において、増殖メカニズム（すなわち、細胞を増殖する生体の能力）は、腫瘍細胞の場合、傷害のある細胞の無制限かつ制御不能な増殖であり、結果として、その生物内で腫瘍形成過程を生じる。特に、白血病リンパ球は、比較的短時間に生物中のリンパ球数の増加を生じる増殖メカニズムの亢進を示し、血液循環中の有害なＢリンパ球の蓄積（リンパ球増加症）および腫瘍性疾患の急速な発症を引き起こすものとされる。慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）について一般的に知られている事実（パラダイム）は、プログラム化された細胞死、すなわち、ヒトに存在する白血病リンパ球のアポトーシスの自然過程の欠如（傷害）を生じることである。

【０００５】

腫瘍性疾患の世界規模での発症の増加により、我々は、ヒトにとって非常に危険である腫瘍性疾患（慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）を含む）を排除する新しい有効な薬または薬成分を開発する必要に迫られている。よって、白血病リンパ球においてアポトーシスを誘導する能力を示し、それらの増殖（無制限な増殖）を阻害し、同時に他の健常な血液細胞に対して毒性を示さないＣＬＬに対する薬成分／薬を一刻も早く研究開発することが求められている。

【０００６】

２１世紀において、ナノテクノロジーは急速に発展している研究分野である。それゆえ、腫瘍に対して有効でありうる物質の研究は、この特定分野において行われている。最近知られてきている生物学的に適用されるナノ粒子は、デンドリマーの名が付されている分岐構造を有する化学ポリマー化合物である。これらは、抱合またはカプセル化による抗癌薬の担体として用いられる。

【０００７】

Omidi Y, Hollins A.I, Drayton RM, Akhtar S. J Drug Target (2005), 13 : 43 1-443の文献では、（肺および皮膚の腫瘍を生じる）腫瘍形成株における遺伝子（公知配列のＤＮＡ断片）のトランスフェクション（細胞への導入）に用いられる第二および第三世代のポリプロピレンイミンデンドリマー（ＰＰＩ）が発表された。腫瘍細胞に導入された遺伝子により、アポトーシス関連遺伝子においても内在性の遺伝子発現（細胞中に予め存在しているもの）の変化が研究された。これは、治療結果（遺伝子治療）について非常に有利な影響を与え、腫瘍形成細胞の死を引き起こす。また、腫瘍細胞に導入されたＰＰＩベクターがアポトーシスのメカニズムを誘導する遺伝子を活性化することが観察されている。

【０００８】

D. Appelhans, U. Oertel, R. Mazzeo, H. omber, J. Hoffmann, S. Weidner, B. Brutschy, B. Voit and M. F. Ottaviani, Dense shell glycodendrimers: UV/Vis and electronic paramagnetic resonance study of metal ion complexation. Proc R Soc A 2010

; 466: 1489-1513の文献では、ほぼ全体がマルトトリオースで修飾された表面を有するＰＰＩ－Ｇ４デンドリマー（ＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩ）の使用が、ＰＰＩで修飾された様々な世代（３～５）のデンドリマーを有する銅イオン錯体研究（ＣｕＩＩ）において初めて発表された。

【０００９】

特定の病期における薬物適用の研究において、それらが投与されるか否かを決定するための重要な判断基準は、ヒト細胞に対するそれらの毒性レベルである。ＰＰＩ－Ｇ４ポリプロピレンイミンデンドリマーは非常に高い毒性を示す。よって、生物医学研究および医学的な治療の両方で有用であるような低い毒性のデンドリマーを合成する試みがなされている。

【発明の概要】

【００１０】

デンドリマーなどのナノ粒子の将来の発展および利用可能性を考慮して、本発明者らは、白血病細胞においてアポトーシスのメカニズムを誘導することによって作用でき、同時に、血液の他の構成成分に対して低い毒性を示しうる低分子量化合物を発明するために広範囲にわたる研究を行った。

【図面の簡単な説明】

【００１１】

【図１】マルトトリオースの高密度コートを有するＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩと略称される第四世代ポリプロピレンイミンデンドリマーの粒子を示す。

【図２】デンドリマーで処理していないコントロール白血病Ｂリンパ球、およびＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマーで処理し、試験した白血病Ｂリンパ球の２種類の「ドットプロット」型ヒストグラムを示す。ＣＬＬの白血病リンパ球を用いた二重染色法（ヨウ化プロピジウムおよびアネキシンＶ）において、プログラム化細胞死の様々な段階（初期アポトーシス、後期アポトーシス、ネクローシス）にある細胞が観察される。

【図３】デンドリマーで処理していない健常なコントロール白血病Ｂリンパ球、およびＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマーで処理し、試験した健常な白血病Ｂリンパ球の２種類の「ドットプロット」型ヒストグラムを示す。ＣＬＬの白血病リンパ球を用いた二重染色法（ヨウ化プロピジウムおよびアネキシンＶ）において、プログラム化細胞死の様々な段階（初期アポトーシス、後期アポトーシス、ネクローシス）にある細胞が観察される。

【発明を実施するための形態】

【００１２】

本発明の特定事項は、増殖性腫瘍性疾患、特に、慢性リンパ性白血病の治療薬を製造するためのマルトトリオースで被覆された第四世代のポリプロピレンイミンデンドリマーの使用であって、そのＲ成分（マルトトリオース粒子を意味する）と共にパターン１で定義され、ＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩ（ここで、ＰＰＩ－Ｇ４は、ポリプロピレンイミンデンドリマーの第四世代を意味し、ＤＳ（高密度シェル）は、高密度コートを意味し、およびＭａｌ－ＩＩＩは、マルトトリオース（３つのα－グルコース残基からなる三糖）を意味する）と略称される。

【００１３】

ＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマーは、第四世代のポリプロピレンイミンデンドリマー粒子ＰＰＩ－Ｇ４のアミノ基に対して、８０～９５％、より好ましくは、９０％のマルトトリオース粒子－Ｍａｌ－ＩＩＩを含有し、ＰＰ１－Ｇ４デンドリマーの高密度コート（高密度シェル）を形成するものであることが好ましい。

【００１４】

このようなマルトトリオースで被覆された第四世代のポリプロピレンイミンデンドリマーであるＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩは、アポトーシスのメカニズムに障害のある増殖性腫瘍性疾患（慢性リンパ性白血病を含む）の治療薬を製造するために本発明に用いられ、アポトーシス（すなわち、白血病Ｂリンパ球の死）を引き起こす活性物質として

驚くべき有効性を示す。白血病Ｂリンパ球が死滅するアポトーシスのメカニズムを引き金とし、続いて生体から障害のある白血病細胞として除去され、それゆえＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩｌデンドリマーを用いた治療が有効な効果を生じるものである。

【００１５】

さらに、ＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマーは、血液の他の構成成分について毒性を示さず、血中のより有効な生体内分布を示す。

【００１６】

単独で用いられるＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマーについてのIC_{50}は、１０ｍｇ／ｍｌであり、これは、その弱まった抗アポトーシス作用を示す。デンドリマー表面上のマルトトリオース基が多ければ、ナノ粒子の毒性も低くなる。Ｍａｌ－ＩＩで９０％被覆されたデンドリマーは、白血病細胞においてアポトーシス経路を開始させるために多くの時間を必要とし；その明確な効果はインキュベーション４８時間後に見られる。さらに、ミトコンドリア電位の低下は、ＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマーの影響下での白血病リンパ球において低くなる。必ずしも全ての患者が強力で速効性のある薬に適応できる生物であるわけではない。ある生物は、長期の適応時間、例えば、２４時間を要し、このような時間が経った後にのみ、薬物の作用が効き始める。そして、このような場合において、増殖性腫瘍性疾患（慢性リンパ性白血病を含む）のＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマー関連治療が強く推奨される。

【００１７】

ＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩ（マルトトリオースで被覆された第四世代のポリプロピレンイミンデンドリマー）は、本発明で用いられ、デンドリマー表面構造中にマルトトリオース粒子（Ｍａｌ－ＩＩＩ）を含有し、Appelhans D, Oertel U, Mazzeo R et al, Proc R Soc A 2010; 466: 1489- 1513（その合成と特性の記載を含む）による文献で開示され、一方で、Chem Eur J (2008), 14: 7030-7041 Klajnert B, Appelhans D, Komber H et al.では、^{1}ＨＮＭＲ分光分析法（水素原子（^{1}Ｈ）について５００．１３ＭＨｚの周波数を読み取った）を用いて磁気共鳴法で決定されたＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマーのモル質量（ＭＭ）が開示された。図１および表１に示されるように、ＰＰＩ－Ｇ４デンドリマーの表面アミノ基は、（５８）～９０％の範囲においてマルトトリオースで飽和されて（Ｍａｌ－ＩＩＩ）、ＤＳと表記される高密度デンドリマーコート（高密度シェルを有するＤＳ）を形成する。マルトトリオースによるデンドリマーの被覆は、ドイツのライブニッツ・ポリマー研究所ドレスデンで行う。該製品は販売されていない。しかしながら、第四世代ＰＰＩデンドリマー（ＰＰＩ－Ｇ４）は、オランダ、アイントホーベンのＳｙｍｏ－Ｃｈｅｍから販売されている。

表１．市販のＰＰＩ－Ｇ４および合成したＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩの分子量（MM^{a}）；表面マルトトリオース基の数および割合。

【００１８】

【表１】

デンドリマー	$MM_{理論}$ (g/mol)	$MM_{実測}$ (g/mol)	表面Mal-III基$_{理論}$の数 (割合)	表面Mal-III基$_{実測}$の数 (割合)
PPI-G4	3514	3514	–	–
PPI-G4-DS-Mal-III	34774	31000	64 (100%)	58 (90%)

【００１９】

本発明で用いられるＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマーは、毒性指標であるIC_{50}（ＭＮＣの５０％の細胞毒性を生じたデンドリマー濃度として規定）の試験にかけた。単独で用いたＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマーについてのIC_{50}は、４８時間培養で１０ｍｇ／ｍｌであった。IC_{50}の算出は、アポトーシスメカニズムに障害のある増殖性腫瘍性疾患（慢性リンパ性白血病の場合）の治療時の抗腫瘍治療に必要な薬物中のＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマーの用量を調整し

、一般的で公知の方法による様々な医薬形態で薬剤を製造することを可能にする。
【００２０】
本発明は、下記の実施例で説明される。本発明の特定事項は図で示されるものであって：
図１は、マルトトリオースの高密度コートを有するＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩと略称される第四世代ポリプロピレンイミンデンドリマーの粒子を示し、
図２は、デンドリマーで処理していないコントロール白血病Ｂリンパ球、およびＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマーで処理し、試験した白血病Ｂリンパ球の２種類の「ドットプロット」型ヒストグラムを示す。ＣＬＬの白血病リンパ球を用いた二重染色法（ヨウ化プロピジウムおよびアネキシンＶ）において、プログラム化細胞死の様々な段階（初期アポトーシス、後期アポトーシス、ネクローシス）にある細胞が観察され、
図３は、デンドリマーで処理していない健常なコントロール白血病Ｂリンパ球、およびＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマーで処理し、試験した健常な白血病Ｂリンパ球の２種類の「ドットプロット」型ヒストグラムを示す。ＣＬＬの白血病リンパ球を用いた二重染色法（ヨウ化プロピジウムおよびアネキシンＶ）において、プログラム化細胞死の様々な段階（初期アポトーシス、後期アポトーシス、ネクローシス）にある細胞が観察され、
示された実施例からの実験結果は表に記載され、
表２は、４種類の試験濃度のＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマーの影響下でアポトーシスまたはネクローシスを誘導したインビトロ培養における白血病リンパ球の平均割合の結果を示し；さらに、この結果は、各平均値に対する標準偏差および統計学的解析を提供する。
表３は、４種類の試験濃度のＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマーの影響下でアポトーシスまたはネクローシスを誘導したインビトロ培養における健常なリンパ球の平均割合の結果を示し；さらに、この結果は、各平均値に対する標準偏差および統計学的解析を提供する。
表４は、３種類の試験濃度のＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマーの影響およびＣＬＬ治療でよく用いられる２つの薬物、すなわち、フルダラビン（プリン類似体）およびリツキシマブ（モノクローナル抗体）の影響下でのインビトロ培養におけるミトコンドリア電位の低下した白血病リンパ球の平均割合の結果を示す。
【実施例１】
【００２１】
実施例１
マルトトリオースで被覆された第四世代ポリプロピレンイミンデンドリマー（マルトトリオースを９０％含有）であるＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩを用いて、白血病リンパ球においてアポトーシス過程を誘導する能力および前記細胞におけるこのデンドリマーの細胞毒性をインビトロ実験で検証した。
【００２２】
ａ）インビトロでのＭＮＣ単核細胞（白血病リンパ球）の単離および培養
実験材料は、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）について初期に治療されておらず、ポーランドのウッチ医科大学の外来診療および血液内科の患者として登録された１５人の患者（３９－８５歳の８人の女性（Ｋ）および７人の男性（Ｍ）（平均年齢は６３．８であった））から採取した末梢血を使用した。ポーランドのウッチ医科大学の倫理委員会は、この研究を認可した（ＲＮＮ／７５／１０／ＫＥ）。研究に関わる全ての患者からインフォームドコンセントを取得した。
【００２３】
単核細胞（ＭＮＣ）の大半（約９０％）は、白血病Ｂリンパ球であり、抗凝固薬としてのジナトリウムベネセネート－ＥＤＴＡ上に採取した末梢血から単離した。続いて、血液を試験管内のＨｉｓｔｏｐａｑｕｅ　１０７７（Ｓｉｇｍａ，セントルイス，米国）上で層にし、２００ｇの加速度（ここで、「ｇ」は、重力加速度を意味する）で２０分間の密

度濃度にて遠心分離した。層の境界から得られたＭＮＣの環を単離し、ＲＰＭＩ－１６４０培地（ＰＡＡ，独国）で２回洗浄した。得られたＭＮＣを、１ｘ１０^{6}細胞／ｍｌの濃度のＲＰＭＩ－１６４０培地中で懸濁し；続いて下記を加えた：２０％の不活性化されたウシ胎仔血清（ＦＢＳ）および抗生物質、例えば、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン（５００ｍｌの培地あたり５ｍｌの抗生物質の混合物）（ＰＡＡ，独国）、および試験した所定濃度（濃度を下記に記載）のＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマー（９０％のマルトトリオースを含有）。ＲＰＭＩ－１６４０培地で１ｍｌの最終体積で培養を行った。ＭＮＣの培養物を生物インキュベータ内（９８％の湿度において３７℃で５％ＣＯ$_{2}$の流入下）で２４時間インキュベートした。インキュベーション工程後、ＭＮＣのアポトーシスおよび細胞毒性の定量および定性評価を行った。

【００２４】

前記アッセイを用いて、リンパ球ＭＮＣを下記の体積で３５％含有するＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマーと共に培養して試験した：

－４ｍｇ／ｍｌの培地、
－６ｍｇ／ｍｌの培地、
－８ｍｇ／ｍｌの培地、
－１０ｍｇ／ｍｌの培地。

【００２５】

さらに、リンパ球ＭＮＣの培養物についての試験を４８時間のインキュベーション時間で行った。

【００２６】

９０％のマルトトリオースを含有するＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマーを含まない同一条件で行った培養物をコントロールとした。

【００２７】

ｂ）アポトーシスおよび細胞毒性の評価－アネキシンＶおよびヨウ化プロピジウム試験

インキュベーション後、ＭＮＣ白血病リンパ球を、冷やした緩衝食塩溶液（ＰＢＳ－塩化ナトリウムおよびリン酸ナトリウムを含有する生理食塩水溶液）で２回洗浄し、続いて、該細胞を、５μｌのアネキシンＶ（Ａｎｎ－Ｖ）と抱合させたＦＩＴＣ（フルオレセインイソチオシアネート色素）および１０μｇ／ｍｌのヨウ化プロピジウム（ＩＰ）を含有する結合緩衝液中で懸濁させた。続いて、該試料を室温にて暗室で１５分間インキュベートし、それらの蛍光を、フローサイトメーター（ＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒ Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）（波長は、ＦＬ１ ４９０”±２０ｎｍおよびＦＬ３ ５３０”±２０ｎｍ）を用いてすぐに評価した。

【００２８】

ヨウ化プロピジウム（ＩＰ）は、細胞膜の統合性を保ちつつ、健常な細胞によって積極的に排除される自己蛍光を示す陽イオン性溶液である（ＩＰ細胞－陰性，ＩＰ－）。アネキシンＶは、細胞膜の統合性を変化させて、ホスファチジルセリンを細胞膜の外部単層へ配置させる。前記化合物の細胞毒性は、環境へのＩＰ放出の異常により示される（ＩＰ－陽性細胞，ＩＰ＋）。

【００２９】

アポトーシス指標（ＡＩ）を算出するために、アネキシンＶで染色された細胞（ＡｎｎＶ＋ＩＰ－およびＡｎｎＶ＋／ＩＰ＋）を評価した。３５％のマルトトリオースデンドリマーを含有するＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩの細胞毒性は、ＩＰで染色された白血病リンパ球ＭＮＣの生存率を測定することによって評価した。

【００３０】

ｃ）ミトコンドリアの膜電位の評価（アポトーシスの初期マーカー）

ミトコンドリアの膜電位は、アポトーシスの初期の指標である。ＣＭＸＲｏｓ、すなわち、クロロメチル－Ｘ－ロサミン（米国、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓによる試薬名Ｍｉｔｏ Ｔｒａｃｋｅｒ Ｒｅｄ ＣＭＸＲｏｓ）、およびＦＩＴＣと抱合させたグリコホリンＡに対するモノクローナル抗体（デンマークのＤａｋｏによる抗グリコホリン

Ａ　ＦＩＴＣの試薬名）をこの評価に用いた。ＣＭＸＲｏｓは、ミトコンドリア膜の内部表面上に電気陰性負荷が存在する場合に生存細胞中のミトコンドリアのマトリックスに蓄積する脂溶性カチオン性色素である。内部ミトコンドリア膜に沿ったプロトンのこの非対称局在は、生存細胞において高いミトコンドリア膜電位（ΔΨｍ）を生じる。低下したミトコンドリア電位ΔΨｍは、アポトーシス誘導過程中の最初の症状の１つであり、ミトコンドリアのＣＭＸＲｏｓの取り込みが低下する。

【００３１】

ストックのＣＭＸＲｏｓ溶液は、９４μｌのＤＭＳＯ（ジメチルスルホキシド）中に製造業者によって供給される物質を希釈することによって調製し、２０℃で保存した。続いて、ワーキング溶液は、ＤＭＳＯ（１：１０）を用いて調製し、４℃で保存した。１ｘ１０^{6}ＭＮＣ／ｍｌ濃度での単核細胞（すなわち、白血病リンパ球）を、ＣＭＸＲｏｓ（５００μｌのＲＰＭＩ１６４０培地中で２．５μｌのワーキング溶液）と３７℃で３０分間インキュベートした。正確に１５分後、５μｌのＦＩＴＣを抱合させたグリコホリンＡに対するモノクローナル抗体を加えて、低いミトコンドリア電位のために擬陽性となりうる試料中の付随する赤血球を取り除いた。続いて、該試料を、フローサイトメトリーを用いて測定した。低いミトコンドリア電位を伴う抗グリコホリンＡ－ＦＩＴＣに結合しなかった細胞（ΔΨｍ^{low}／ＧＩｙ－Ａ$^{-}$細胞）を算出した。

【００３２】

全ての蛍光測定は、アルゴンレーザー４８８ｎｍおよびコンピュータプログラムＣｅｌｌＱｕｅｓｔＰｒｏ（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ，米国）を搭載したフローサイトメーターＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒ（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ，米国）によって行った。各回１００００細胞を評価した。該蛍光は、標準的な発光フィルター：緑色－ＦＬ１（波長λ＝５３０±２０ｎｍ）および赤色－ＦＬ３（λ＞６００ｎｍ）を用いて測定した。

【００３３】

ｄ）統計学的解析

白血病リンパ球（ＭＮＣ）の培養で得た結果（ＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマー（９０％のマルトトリオースを含有）を本発明およびコントロールの培養のように加えた場合、このようなＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマーを加えない場合）の間の統計学的な有意な差は、イルコクソンの順位検定を用いて、統計学的に有意な差を、有意なレベルがｐ＜０．０５であるものと推定して比較した。

【００３４】

ＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマーのＩＣ$_{50}$毒性指標は、白血病リンパ球（ＭＮＣ）の５０％の細胞毒性を引き起こしたデンドリマーの濃度として定義した。ＩＣ$_{50}$を算出することにより、抗腫瘍療法に必要とされるＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマーを含有する薬物用量を調整することができる。薬物の単一用量が、対象とする細胞の１００％を破壊する程度の毒性を必要とする場合、このような薬物の用量において、ＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマー濃度は、５０％の白血病細胞の死滅を引き起こす濃度の２倍である。これは、迅速な治療効果が推奨されるであろう進行性疾患に罹っている患者についての薬物用量（短期間で付与するより少ない錠剤）に適用する。弱っている患者（例えば、高齢患者）の場合、ＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマーを含有する薬物の用量は、白血病リンパ球を破壊するための半分量まで減らした濃度に設定されるべきである。治療は時間をかけるべきであり、細胞の崩壊過程に対する応答としていくつかの有害な効果が存在するが；最終的な治療効果が達成されるべきである（患者により長い時間をかけて多くの錠剤を摂取させれば、治療効果が達成される）。

【００３５】

ｅ）得られた結果

２４時間および４８時間のインキュベーション後に各濃度でのＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマーによって誘導されるアポトーシスＭＮＣの割合は、自然のアポ

トーシス白血病細胞の割合より有意に高かった（ｐ＜０．０１）（表２）。アポトーシスを起こすＣＬＬ細胞のサイトメトリー解析を図２に示す。アポトーシスを起こす細胞のより高い割合は、２４時間と比較して４８時間のインキュベーション時間で観察された。後期アポトーシス細胞（Ａｎｎ－Ｖ$^{+}$ＩＰ$^{+}$）についての最も大きな相違は、８ｍｇ／ｍｌのデンドリマー濃度（ｐ＝０．０２）で４８時間のインキュベーション後に示されたが、２４時間のインキュベーション後では、コントロール間の相違もまた顕著であった（ｐ＝０．００７）（表２）。

【００３６】

ＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマーは、３種類の濃度、すなわち、４ｍｇ／ｍｌ、６ｍｇ／ｍｌおよび８ｍｇ／ｍｌ（各々、ｐ＝０，０４；ｐ＝０．００５；ｐ＝０．００５）での２４時間のインキュベーション後、ならびに前記に記載の濃度（各々、ｐ＝０，０４；ｐ＝０，０２；ｐ＝０，００７）での４８時間後において、ＣＬＬ細胞の初期アポトーシス（Ａｎｎ－Ｖ$^{+}$ＩＰ$^{-}$）を著しく誘導した。ＣＬＬネクローシス細胞の割合については、２４時間培養または４８時間培養のいずれのコントロール培養と比較しても統計学的に有意な差は見られなかった。このことは、試験したデンドリマーがアポトーシスのメカニズムを誘導することによりＣＬＬ細胞の死を引き起こし、統合性を妨げることにより細胞膜に直接的に作用するものではないことを示す。単独で用いたＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマーについてのＩＣ$_{50}$は、１０ｍｇ／ｍｌであった。

【００３７】

ＣＬＬ細胞におけるアポトーシスのメカニズムを介するＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマーの活性を確認する別の方法は、ミトコンドリアの電位の評価である。デンドリマーの３種類の濃度（すなわち、４ｍｇ／ｍｌ、６ｍｇ／ｍｌ、８ｍｇ／ｍｌ）での２４時間の培養において、アポトーシス細胞数は、対象培養物における細胞数より著しく増加した。アポトーシス細胞の割合は、デンドリマー濃度の上昇に比例して増加した。プリン類似体（ＦＡ，フルダラビン）を１．６μＭの濃度でインキュベートした後のアポトーシス細胞率は、８ｍｇ／ｍｌのＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマー濃度についてのアポトーシス細胞の割合に相当する。１０μｇ／ｍｌの濃度でのモノクローナル抗体である抗ＣＤ２０（Ｒｉｔ，リツキシマブ）により、（コントロール試料において）自然アポトーシスの順序でアポトーシス誘導作用が示された。デンドリマーとの細胞培養４８時間後に、細胞ΔΨｍ^{ｌｏｗ}／ＧＩｙ－Ａ$^{-}$の割合は、コントロール培養における細胞の割合（２８．３％）より極めて高かった（６７．１－９１．９％）。結果を表４に示す。

【実施例２】

【００３８】

実施例２

マルトトリオースで被覆された第四世代ポリプロピレンイミンデンドリマー（９０％のマルトトリオースを９０％含有）ＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩを用いて、健常な血液細胞におけるアポトーシス過程を誘導する能力および前記細胞におけるこのデンドリマーの細胞毒性をインビトロ実験で検証した。

【００３９】

ａ）健常なボランティアからのＭＮＣにおけるＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマーのアポトーシス誘導および細胞毒性の評価

実験材料は、２５～６５歳（平均年齢は３８．００±１０．８０であった）の５人の健常なボランティア（３人の女性および２人の男性）から採取した末梢血であった。単核細胞（ＭＮＣ）の単離、細胞培養、またはアポトーシスおよび細胞毒性の評価は、実施例１と同一の方法を用いて行った。

【００４０】

健常な単核細胞におけるＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマーの効果は無視できるが；コントロール培養物と、デンドリマーとの培養物との間の相違は、統計学的

な差を示す。６ｍｇ／ｍｌおよび８ｍｇ／ｍｌ（ｐ＝０．０３）のＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマー濃度について高い割合でアポトーシス細胞が観察されたのが４８時間後のみであった。２４時間のインキュベーション後にＩＰ染色された死滅細胞の割合は、８ｍｇ／ｍｌのＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマー濃度について１２．９％と同等であり、デンドリマーで処理していない細胞については１２．３８％であった。これらの結果により示されるように、ＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマーは、健常なリンパ球に対して毒性を示さない（表３、図３）。

【００４１】

ｂ）ＭＮＣリンパ球増殖の阻害または誘導におけるＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－ＭａＩＩＩデンドリマーの影響

ＭＮＣは、健常なボランティアの血液からの密度勾配法（実施例１で示されるような）を用いて単離した。ＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマーによるリンパ球の増殖の阻害または誘導を評価するために、細胞は、試験試料またはコントロール試料であるかどうかに応じて、前記デンドリマーの存在または非存在下で、フィトヘマグルチニン（ＰＨＡ－Ｍ）の存在または非存在下でインキュベートした。７２時間のインキュベーション後、試料は、ＭＴＴ（３－（４，５－ジメチル－２－チアゾリル）－２，５－ジフェニル－２Ｈ－テトラゾリウムブロミド）を用いて質量分析法で分析した。ＰＨＡ－Ｍの最終濃度は１０μｌ／ｍｌであり、ＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩｌデンドリマーは、０．２、０．０４、および０．００８ｍｇ／ｍｌの濃度で使用した。ＭＮＣ懸濁物（培地中で１０μｌ／ｍｌ濃度のＰＨＡ－Ｍ溶液を含有）を陽性（増殖コントロール）とし、ＭＮＣ懸濁物（ＰＢＳ緩衝液中）を陰性（非増殖コントロール）とした。

【００４２】

ＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマーは、健常なリンパ球の細胞増殖をわずかに抑制した。この効果は生物学的観点からあまり重要なものではない。

【００４３】

ｃ）赤血球溶血におけるＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマーの影響

試験にかけた試料において、溶血レベルを、３７℃のインキュベーション前、２、４、１６、および２４時間後に、１０００ｇで５分間の遠心分離で上澄み液に放出されたヘモグロビン（ＨＧＢ）に基づいて調べた。コントロール（１００％溶血）については、赤血球を蒸留水で処理した。ＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマーは、修飾していないデンドリマー（ＰＰＩ－Ｇ４）と比較して赤血球の溶血を生じなかった。上記結果から、ＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマー（９０％のマルトトリオースを含有）は赤血球に対して安全であり；それらの細胞膜を破壊しないことが明らかである。

【００４４】

ｄ）血小板（ＰＬＴ）凝集におけるＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－ＭａＩ－ＩＩＩデンドリマーの影響

健常なドナーからの血液は、ＣＰＤＡ－１抗凝血剤（１００ｍＭ　グルコース；５５ｍＭ　マンニトール；２５．８ｍＭ　K_2HPO_4；１４．７ｍＭ　KH_2PO_4；１７，９ｍＭ　クエン酸カリウム）；（ｍＭ－モル量）において収集した。血漿を３６０ｇ（ｇ－重力加速度）で５分間遠心分離した。ＰＬＴペレット（遠心分離後に上澄みを除いた細胞の塊）をＴｒｉｓ（ＴＲＩＳ－ＥＤＴＡ（０．１２Ｍ　ＮａＣｌ，０．０１５４Ｍ　ＫＣ１，０．００６ｇ　グルコース，０．００１５Ｍ　Na_2EDTA，０．０１３３Ｍ　Ｔｒｉｓ；ｐＨ６．５）（Ｍ－Ｍｏｌ）を含有するｔｒｉｓ（ヒドロキシメチル）アミノメタン緩衝液）中に懸濁した。該懸濁物を３６０ｇで５分間遠心分離した。該ペレットを、前記緩衝液に２．０ｘ１０^{9}細胞／ｍｌ（ＴＲＩＳ緩衝液）の濃度で再懸濁した。ＰＬＴの凝集は、自動血小板凝集計ＡＰ２１１０を用いて調べた。１μｇ／ｍｌの濃度でトリプシンをＰＬＴに陽性コントロールとして加えた。

【００４５】

ＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマーは、いずれの試験濃度においてもＰＬＴ凝集を生じなかった。

【００４６】
上記に記載されるように、ＣＬＬリンパ球へのＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマーの添加は、これらの細胞においてアポトーシスのメカニズムを著しく誘導し、それらの増殖および生存を著しく減少させた。このことにより、ＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマーを薬物として用いて、増殖性腫瘍性疾患、特に、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）を治療する有益な治療効果が予想されうることが証明された。同時に、本発明で提示される方法で適用されるＰＰＩ－Ｇ４－ＤＳ－Ｍａｌ－ＩＩＩデンドリマーは、他の構成成分（赤血球、血小板）に非毒性であることが示され、ヒトの使用に安全であることが確認された。
－１５頁－表２
－１５頁－表３
－１７頁－表４
【００４７】

【００４８】

表２

インビトロ培養でのCLL細胞のアポトーシスおよび生存におけるPPI-G4-DS-Mal-IIIデンドリマーの影響

【表２】

	コントロール			PPI-g4-DS-Mal-III 4 mg/ml			PPI-g4-DS-Mal-III 6 mg/ml			PPI-g4-DS-Mal-III 8 mg/ml			PPI-g4-DS-Mal-III 10 mg/ml			統計学的解析 (P 値)
24h																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	13
	Ann+ IP-	Ann+ IP+	Ann- IP+	Ann+ IP-	Ann+ IP+	Ann- IP+	Ann+ IP-	Ann+ IP+	Ann- IP+	Ann+ IP-	Ann+ IP+	Ann- IP+	Ann+ IP-	Ann+ IP+	Ann- IP+	**1 v 4= 0.04 2 v 7= 0.005 2 v 10= 0.005 4 v 7= 0.009 4 v 10= 0.009 2 v 5= 0.02 2 v 8= 0.01 2 v 11 = 0.007**
n	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	
X	**9.46**	**7.57**	**4.25**	**15.95**	**14.62**	**3.75**	**20.88**	**15.92**	**2.64**	**24.77**	**17.25**	**3.94**	**27.97**	**18.90**	**6.73**	
SD	**9.83**	**6.72**	**2.63**	**15.36**	**15.07**	**3.47**	**16.79**	**14.67**	**3.37**	**15.17**	**14.30**	**5.82**	**19.04**	**15.45**	**7.16**	
48h																
n	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	**1 v 4= 0.04 1 v 7= 0.02 1 v 10= 0.007 2 v 5= 0.05 2 v 8= 0.01 2 v 11=0.007**
X	**1 1.70**	**15.30**	**11.95**	**18.10**	**24.66**	**5.42**	**21.55**	**27.66**	**7.22**	**22.96**	**32.96**	**8.15**	**22.91**	**40.71**	**9.77**	
SD	**8.75**	**11.77**	**13.61**	**14.17**	**17.34**	**4.81**	**18.47**	**19.32**	**7.40**	**15.54**	**18.67**	**8.77**	**15.37**	**18.58**	**5.60**	

n - 試料数 ; X - アポトーシスまたはネクローシス細胞の平均割合; SD - 標準偏差;

初期アポトーシス – Ann^+IP^-; 後期アポトーシス - Ann^+IP^+; ネクローシス – Ann^-IP^+; Ann - アネキシン-V; IP - ヨウ化プロピジウム

【表３】

表３

インビトロ培養での健常な細胞のアポトーシスおよび生存におけるPPI-G4-DS-Mal-III デンドリマーの影響

24h																			
	コントロール			PPI-g4-DS-Mal-III 4 mg/ml			PPI-g4-DS-Mal-III 6 mg/ml			PPI-g4-DS-Mal-III 8 mg/ml			PPI-g4-DS-Mal-III 10 mg/ml			統計学的解析 (P 値)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	13	
	Ann+ IP-	Ann+ IP+	Ann- IP+	Ann+ IP-	Ann+ IP+	Ann- IP+	Ann+ IP-	Ann+ IP+	Ann- IP+	Ann+ IP-	Ann+ IP+	Ann- IP+	Ann+ IP-	Ann+ IP+	Ann- IP+	1 v 7= 0.04 1 v 7= 0.04 1 v 7= 0.05 2 v 5 =0.04 2 v 8 = 0.04 2 v 11 = 0.04 2 v 14 = 0.05	
n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		
X	11.0	4.11	8 27	15.42	5.99	6.80	16.66	6.28	5.41	17.43	6.56	6.34	21.13	8.62	6.12		
SD	1.97	0.76	1.22	1.61	0.65	1.09	1.05	0.88	1.72	1.72	1.38	3.32	2.79	1.18	3.08		
48h																	
n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	1 v 7 = 0.03 1 v 10 = 0.03 1 v 13 = 0.03	
X	18.05	13.02	10.56	18.56	14.09	10.20	22.88	13.59	10.18	26.40	17.26	7.93	33.93	22.84	7.37		
SD	4.71	1.22	3.41	4.74	1.66	2.15	6.14	2.56	3.59	5.94	4.29	2.17	8.50	4.25	1.33		

n - 試料数 ; X - アポトーシスまたはネクローシス細胞の平均割合; SD - 標準偏差;
初期アポトーシス – Ann^+IP^-; 後期アポトーシス - Ann^+IP^+; ネクローシス – Ann^-IP^+; Ann - アネキシン-V; IP - ヨウ化プロピジウム

【００４９】

表４

インビトロ培養でのCLL細胞のミトコンドリア膜電位におけるPPI-G4-DS-Mal-III デンドリマーの影響。プリン類似体 (フルダラビン; FA)とモノクローナル抗体 (リツキシマブ; Rit)との比較。

24h						
	コントロール	PPI-G4-DS-Mal-III 4 mg/ml	PPI-G4-DS-Mal-III 6 mg/ml	PPI-G4-DS-Mal-III 8 mg/ml	FA 1.6 µM	Rit 10 µg/ml
n	10	10	10	10	10	10
X	37,91	46,52	49,75	58,53	52,05	44,92
SD	16,23	14,56	13,09	13,33	17,81	16,70
48h						
n	10	10	10	10	10	10
X	42,04	60,75	67,60	76,54	74,49	60,58
SD	14,26	12,24	17,14	15,26	17,47	19,99

n - 試料数; X - ミトコンドリア膜電位の低い細胞の平均割合 ($\Delta\Psi m^{low}$/Gly-A$^-$ [%]); SD -標準偏差; FA - フルダラビン; Rit - リツキシマブ

40 30 20 10

【図１】

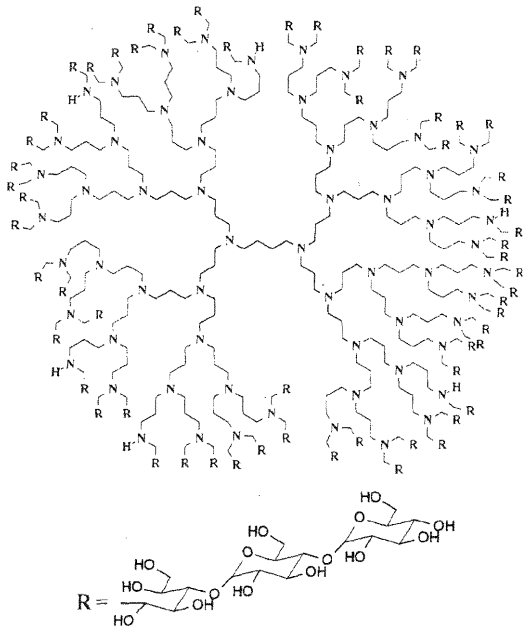
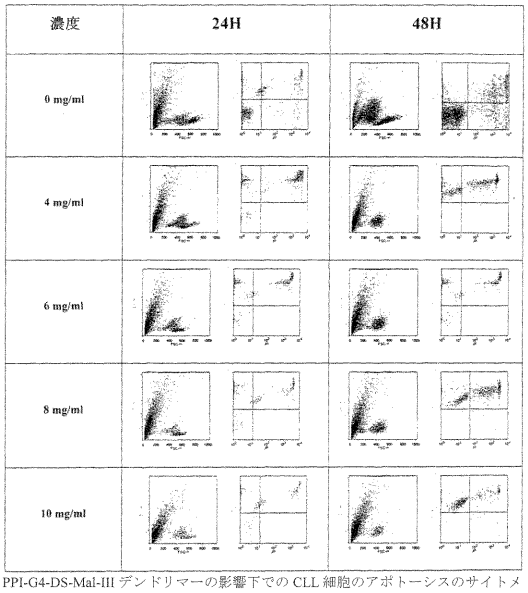


図１

PPI-G4-DS-Mal-III デンドリマー粒子のパターン

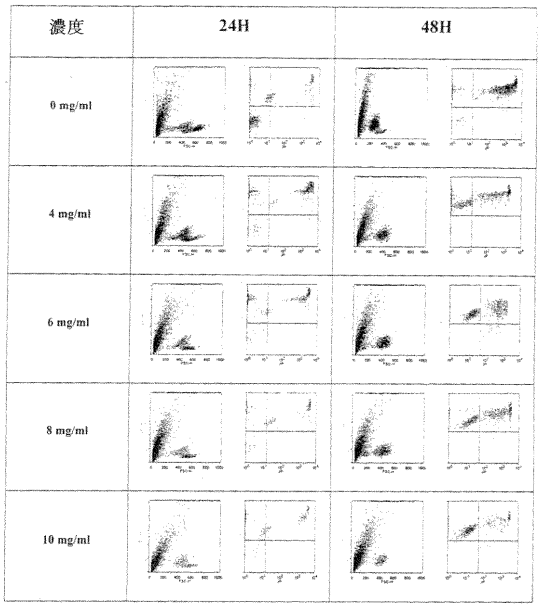
【図２】



PPI-G4-DS-Mal-III デンドリマーの影響下での CLL 細胞のアポトーシスのサイトメトリー分析

図２

【図３】



PPI-G4-DS-Mal-III デンドリマーの影響下での健常なリンパ球におけるアポトーシスのサイトメトリー分析

図３

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/PL2013/000154

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K31/785 A61K47/48 A61P35/00
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, CHEM ABS Data, 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	BARBARA ZIEMBA ET AL: "Influence of fourth generation poly(propyleneimine) dendrimers on blood cells", JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH PART A, vol. 100A, no. 11, 24 November 2012 (2012-11-24), pages 2870-2880, XP055107843, ISSN: 1549-3296, DOI: 10.1002/jbm.a.34222 abstract; figure 1; table I ----- -/--	1,2

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] 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	Date of mailing of the international search report
17 March 2014	25/03/2014

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Madalinska, K

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/PL2013/000154

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BARBARA ZIEMBA ET AL: "Genotoxicity of poly(propylene imine) dendrimers", BIOPOLYMERS, vol. 97, no. 8, 17 August 2012 (2012-08-17), pages 642-648, XP055107840, ISSN: 0006-3525, DOI: 10.1002/bip.22056 abstract; figure 1; table I	1,2
X	FRANIAK-PIETRYGA IDA; ZIOLKOWSKA EWELINA; ZIEMBA BARBARA; APPELHANS DIETMAR; VOIT BRIGITTE; GORA-TYBOR JOANNA; ROBAK TADEUSZ; KLAJ: "Nanoparticles - a Novel Approach to Chronic Lymphocytic Leukemia Treatment?", BLOOD, vol. 120, no. 21, 16 November 2012 (2012-11-16), page 4601, XP055107869, 54th Annual Meeting and Exposition of the American-Society-of-Hematology (ASH); Atlanta, GA, USA; December 08 -11, 2012 ISSN: 0006-4971 abstract	1,2
A	ALEKSANDRA SZULC ET AL: "Characteristics of complexes between poly(propylene imine) dendrimers and nucleotides", NEW JOURNAL OF CHEMISTRY, vol. 36, no. 8, 1 January 2012 (2012-01-01), page 1610, XP055107855, ISSN: 1144-0546, DOI: 10.1039/c2nj40165g abstract; figure 3	1,2
A	WO 2009/156446 A1 (CONDUCTA ENDRESS & HAUSER [DE]; LEIBNITZ INST FUER POLYMERFORS [DE]; T) 30 December 2009 (2009-12-30) abstract; claim 18; figure 2b	1,2
A	PRASHANT KESHARWANI ET AL: "Cancer targeting potential of some ligand-anchored poly(propylene imine) dendrimers: a comparison", NANOMEDICINE: NANOTECHNOLOGY, BIOLOGY AND MEDICINE, ELSEVIER, NL, vol. 7, no. 3, 27 October 2010 (2010-10-27), pages 295-304, XP028219877, ISSN: 1549-9634, DOI: 10.1016/J.NANO.2010.10.010 [retrieved on 2010-11-09] abstract	1,2

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/PL2013/000154

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2009/208580 A1 (SHI XIANGYANG [US] ET AL) 20 August 2009 (2009-08-20) abstract; claims 1,10-14 paragraph [0231]	1,2
X,P	IDA FRANIAK-PIETRYGA ET AL: "The Influence of Maltotriose-Modified Poly(propylene imine) Dendrimers on the Chronic Lymphocytic Leukemia Cells in Vitro : Dense Shell G4 PPI", MOLECULAR PHARMACEUTICS, vol. 10, no. 6, 3 June 2013 (2013-06-03), pages 2490-2501, XP55107668, ISSN: 1543-8384, DOI: 10.1021/mp400142p abstract	1,2
T	BARBARA ZIEMBA ET AL: "Toxicity and proapoptotic activity of poly(propylene imine) glycodendrimers in vitro: Considering their contrary potential as biocompatible entity and drug molecule in cancer", INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, vol. 461, no. 1-2, 1 January 2014 (2014-01-01), pages 391-402, XP055107830, ISSN: 0378-5173, DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.12.011 the whole document	1,2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/PL2013/000154

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009156446 A1	30-12-2009	DE 112009001284 A5	30-06-2011
		US 2011177602 A1	21-07-2011
		WO 2009156446 A1	30-12-2009
US 2009208580 A1	20-08-2009	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(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,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,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,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(72)発明者 イダ・フラニアクーピエトリガ
ポーランド、ペエルー９０－３２６ウッジ、ウーリツァ・ポモルスカ１４１／１４３番、ウニヴェルシテット・ウズキ・ヴィジャウ・ビオロギー・イ・オフロニー・シュロドヴィスカ
(72)発明者 マリア・ブリシェフスカ
ポーランド、ペエルー９０－３２６ウッジ、ウーリツァ・ポモルスカ１４１／１４３番、ウニヴェルシテット・ウズキ・ヴィジャウ・ビオロギー・イ・オフロニー・シュロドヴィスカ
(72)発明者 ディートマー・アッペルハンス
ドイツ０１０６９ドレスデン、ホーエ・シュトラーセ６番、ライプニッツ・インスティテュート・オブ・ポリマー・リサーチ・ドレスデン
(72)発明者 バルバラ・クライネルト
ポーランド、ペエルー９０－３２６ウッジ、ウーリツァ・ポモルスカ１４１／１４３番、ウニヴェルシテット・ウズキ・ヴィジャウ・ビオロギー・イ・オフロニー・シュロドヴィスカ

Ｆターム(参考) 4C076 CC27 DD67
4C086 AA01 AA02 FA03 MA01 MA04 NA06 NA14 ZB26 ZB27