

(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2017-524714

(P2017-524714A)

(43) 公表日 平成29年8月31日(2017.8.31)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/59 (2017.01)	A 6 1 K 47/59	4 B 0 6 5
A 6 1 K 49/12 (2006.01)	A 6 1 K 49/12	4 C 0 7 6
A 6 1 K 49/04 (2006.01)	A 6 1 K 49/04	4 C 0 8 4
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 H 0 4 5
審査請求 有 予備審査請求 未請求		(全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-507395 (P2017-507395)	(71) 出願人	398076227
(86) (22) 出願日	平成27年8月13日 (2015. 8. 13)		ザ・ジョンズ・ホプキンス・ユニバーシテ
(85) 翻訳文提出日	平成29年3月29日 (2017. 3. 29)		ィー
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/045104		アメリカ合衆国、メリーランド州 2 1 2
(87) 国際公開番号	W02016/025741		1 8、ボルチモア、ノース・チャールズ・
(87) 国際公開日	平成28年2月18日 (2016. 2. 18)		ストリート 3 4 0 0
(31) 優先権主張番号	62/036, 675	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成26年8月13日 (2014. 8. 13)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	62/036, 839		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成26年8月13日 (2014. 8. 13)	(74) 代理人	100181674
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 飯田 貴敏
(31) 優先権主張番号	62/059, 240	(74) 代理人	100181641
(32) 優先日	平成26年10月3日 (2014. 10. 3)		弁理士 石川 大輔
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 脳腫瘍への選択的デンドリマー送達

(57) 【要約】

脳腫瘍の1つまたは複数の症状を処置または軽減するための少なくとも1つの治療薬剤、予防薬剤、または診断薬剤に共有結合的に連結している、ポリ(アミドアミン)(PAMAM)ヒドロキシル末端デンドリマーを含む組成物が開発されている。本デンドリマーは、1つまたは複数の、エチレンジアミンコアのポリ(アミドアミン)(PAMAM)ヒドロキシル末端世代4、5、6、7、8、9、または10の、最も好ましくは世代6の(G4-10-OH)デンドリマーを含む。G6デンドリマーは、予想外に高い脳内への取込みを提示している。本デンドリマーは、化学治療薬剤、免疫治療薬剤、および緩和薬剤の血液脳関門(「BBB」)を通過する選択的送達のための手段を提供する。本デンドリマーはまた、1つまたは複数の作用機序を有する2つの異なるクラスの化合物をデンドリマーに結合させて、同時の送達を提供することができるという利点を有する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験体の増殖性疾患を処置するための方法であって、少なくとも 1 つの治療薬剤、予防薬剤、または診断薬剤と共有結合的に連結しているかまたは複合体形成しているポリ(アミドアミン)(PAMAM)ヒドロキシル末端 dendrimer を含む組成物を、前記被験体の前記増殖性疾患の 1 つもしくは複数の症状を抑制もしくは阻害するか、または前記増殖性疾患をイメージングするのに有効な量で前記被験体に全身投与することを含む、方法。

【請求項 2】

前記 dendrimer が、少なくとも 1 つの治療薬剤に共有結合的に連結している、世代 4 ~ 10 のポリ(アミドアミン)(PAMAM)ヒドロキシル末端 dendrimer である、請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 3】

前記 PAMAM dendrimer が、世代 6 の PAMAM dendrimer である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 dendrimer が、第 1 の治療薬剤と、治療薬剤、予防薬剤、および診断薬剤からなる群より選択される第 2 の薬剤とに conjugate している、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

前記 dendrimer が、2 つの治療薬剤に conjugate している、請求項 4 に記載の方法。 20

【請求項 6】

前記 dendrimer が、化学治療薬剤および抗炎症薬剤および/または抗興奮毒性薬剤に conjugate している、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

dendrimer 複合体が、ミクログリアおよび星状膠細胞に局在し、これらを標的化するための治療的に活性な薬剤を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

前記増殖性疾患が、前記被験体の脳にある、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

治療薬剤に conjugate している前記 dendrimer が、増殖性障害を軽減するのに有効な量の単位投薬量にある、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の方法。 30

【請求項 10】

前記薬剤が、ペプチド、タンパク質、炭水化物、ヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド、小分子、およびそれらの組合せからなる群より選択される、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

前記薬剤が、アルキル化薬剤、血管新生阻害剤、腫瘍免疫応答の調節剤、アロマターゼ阻害剤、代謝拮抗物質、アントラサイクリン、抗腫瘍抗生物質、白金化合物、トポイソメラーゼ阻害剤、放射性同位体、放射線増感薬剤、チェックポイント阻害剤、PD1 阻害剤、APR キナーゼ阻害剤、植物アルカロイド、糖分解阻害剤、およびそれらのプロドラッグからなる化学治療薬剤の群より選択される、請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の方法。 40

【請求項 12】

前記薬剤が、タキソール、例えば、パクリタキセル、BCNU、カンプトテシン、ドキシサイクリン、シスプラチン、ならびにそれらの誘導体、類似体およびプロドラッグからなる化学治療薬剤の群より選択される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記 dendrimer と複合体形成しているかまたは前記 dendrimer に conjugate している少なくとも 1 つの薬剤が、腫瘍の 1 つまたは複数の症状を軽減し、抗炎症薬剤、抗興奮毒性薬剤、免疫抑制薬剤、抗血管新生薬剤、および抗感染薬剤からなる群より選択さ 50

れる薬剤である、請求項 1 ~ 12 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

前記抗炎症薬剤が、ステロイド系抗炎症剤、非ステロイド系抗炎症薬剤、金化合物抗炎症薬剤、免疫抑制薬剤、サリチル酸系抗炎症薬剤、ラニビズマブ、ミノサイクリン、およびラパマイシンからなる群より選択される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記腫瘍の 1 つまたは複数の症状を軽減する前記薬剤が、抗興奮毒性薬剤としての活性を有する薬剤であり、バルプロ酸、D - アミノホスホノバレレート、D - アミノホスホノヘプタノエート、グルタメート形成 / 放出の阻害剤、NMDA 受容体アンタゴニストからなる群より選択され、投与することもできる、請求項 14 に記載の方法。

10

【請求項 16】

常磁性分子、蛍光化合物、磁性分子、放射性核種、x 線イメージング剤、造影剤、蛍光色素、近赤外色素、SPECT イメージング剤、PET イメージング剤、および放射性同位体からなる群より選択される診断薬剤を含み、前記組成物を個体に投与して、前記個体の前記増殖性障害に関する情報を診断する、請求項 1 ~ 15 のいずれかに記載の方法。

【請求項 17】

前記色素が、カルボシアニン、インドカルボシアニン、オキサカルボシアニン、ツイカルボシアニンおよびメロシアニン、ポリメチン、クマリン、ローダミン、キサンテン、フルオレセイン、ホウ素 - ジピロメタン (BODIPY)、Cy5、Cy5.5、Cy7、VivoTag - 680、VivoTag - S680、VivoTag - S750、AlexaFluor660、AlexaFluor680、AlexaFluor700、AlexaFluor750、AlexaFluor790、Dy677、Dy676、Dy682、Dy752、Dy780、DyLight547、DyLight647、HiLyte Fluor647、HiLyte Fluor680、HiLyte Fluor750、IRDye800CW、IRDye800RS、IRDye700DX、ADS780WS、ADS830WS、およびADS832WSからなる群より選択される、請求項 16 に記載の方法。

20

【請求項 18】

前記SPECTイメージング剤または前記PETイメージング剤が、ジエチレントリアミンペンタ酢酸(DTPA)、1,4,7,10-テトラ-アザシクロドデカン-1,4,7,10-テトラ酢酸(DOTA)、ジアミンジチオール、活性化メルカプトアセチル-グリシル-グリシル-グリシン(MAG3)、およびヒドラジノニコチンアミド(HYNIC)を含むキレート剤である、請求項 16 に記載の方法。

30

【請求項 19】

前記放射性同位体が、Tc-94m、Tc-99m、In-111、Ga-67、Ga-68、Gd³⁺、Y-86、Y-90、Lu-177、Re-186、Re-188、Cu-64、Cu-67、Co-55、Co-57、F-18、Sc-47、Ac-225、Bi-213、Bi-212、Pb-212、Sm-153、Ho-166、およびDy-166からなる群より選択される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 20】

前記 dendrimer が、標的化部分と複合体形成しているかまたは標的化部分にコンジュゲートしている、請求項 1 ~ 19 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 21】

放射線照射治療を受けている被験体の増殖性疾患を処置するための請求項 1 ~ 20 のいずれかに記載の方法であって、前記被験体の前記増殖性疾患においてDDX3の活性を抑制または阻害するのに有効な量で、少なくとも 1 つの放射線増感薬剤に共有結合的に連結している dendrimer を、前記被験体に全身投与することを含む、方法。

【請求項 22】

前記放射線増感薬剤を 2 回またはそれを超える用量で投与し、続いて、電離放射線を前記被験体のがんの位置に近接して前記被験体に投与し、任意選択で、前記放射線増感薬剤

50

、続いて前記電離放射線の投与を2つまたはそれを超えるサイクルにわたり繰り返す、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

前記電離放射線の線量が、0.1 Gyから約30 Gyの範囲に、好ましくは5 Gyから約25 Gyの範囲にある、請求項21から22のいずれかに記載の方法。

【請求項24】

前記放射線が、定位焼灼的放射線治療(SABR)または体幹部定位放射線治療(SBRT)である、請求項21から23のいずれかに記載の方法。

【請求項25】

前記放射線増感薬剤がRX-33である、請求項21から24のいずれかに記載の方法

10

【請求項26】

前記増殖性疾患が固形がんである、請求項1～25のいずれかに記載の方法。

【請求項27】

前記がんが、胞巣状横紋筋肉腫、骨がん、脳がん、乳がん、肛門、肛門管または肛門直腸のがん、眼のがん、肝内胆管のがん、関節のがん、頸部、胆嚢または胸膜のがん、鼻、鼻腔または中耳のがん、口腔のがん、外陰部のがん、結腸がん、食道がん、子宮頸がん、消化管カルチノイド、ホジキンリンパ腫、下咽頭がん、腎臓がん、喉頭がん、肝がん、肺がん、悪性中皮腫、メラノーマ、多発性骨髄腫、上咽頭がん、非ホジキンリンパ腫、卵巣がん、膵がん、腹膜、網、および腸間膜のがん、咽頭がん、前立腺がん、直腸がん、腎がん(例えば腎細胞癌(RCC))、小腸がん、軟組織がん、胃がん、精巣がん、甲状腺がん、尿管がん、および膀胱がんとして生じる、請求項26に記載の方法。

20

【請求項28】

前記増殖性疾患が、神経膠腫、神経膠芽腫、星状細胞腫、乏突起神経膠腫、上衣腫、髄膜腫、髄芽腫、神経節腫、シュワン腫、頭蓋咽頭腫、脊索腫および下垂体腫瘍を含む、中枢神経系の新形成、過形成およびがんからなる群より選択される脳がんである、請求項26に記載の方法。

【請求項29】

前記がんが神経膠腫である、請求項28に記載の方法。

【請求項30】

デンドリマー組成物が、リポソーム、粒子、懸濁剤、溶体、または乳濁液を用いて製剤化される、請求項1～29のいずれかに記載の方法。

30

【請求項31】

前記組成物が、毎日、毎週、隔週、毎月、および隔月からなる群より選択される期間で、前記被験体に投与される、請求項1～30のいずれかに記載の方法。

【請求項32】

請求項1～31のいずれかに記載の方法における使用のための製剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

40

関連出願への相互参照

この出願は、2014年8月13日に出願された米国仮特許出願第62/036,675号、2014年8月13日に出願された同第62/036,839号および2015年10月3日に出願された同第62/059,240号(これらは、参考として援用される)への優先権を主張する。

【0002】

本発明は、概して、脳腫瘍および関連症状を処置するための化学治療薬物、免疫治療薬物、および緩和薬物の脳への送達に関する分野に含まれる。

【背景技術】

【0003】

50

脳腫瘍は、正しい脳機能を破綻させうる、脳または中心脊椎の組織の異常な成長である。医師は、どこで腫瘍細胞が生じたのか、そしてそれらががん性（悪性）であるか否（良性）かに基づいて、腫瘍について言及する。脳腫瘍の最も侵襲性の低いタイプは、多くの場合、良性の脳腫瘍と呼ばれる。それらは、脳の内部または周囲の細胞から生じ、がん細胞を含有せず、ゆっくりと成長し、そして典型的には、他の組織内への広がりがない明確な境界を有する。悪性の脳腫瘍は、がん細胞を含有し、多くの場合、明確な境界を持たない。それらは、速やかに成長し、周囲の脳組織を侵すことから、生命を脅かすものと考えられている。脳の細胞で開始する腫瘍は、原発性脳腫瘍と呼ばれる。原発性脳腫瘍は、脳の他の部分または脊椎に広がる可能性があるが、他の器官に広がることは稀である。転移性または二次性の脳腫瘍は、身体別の部分で始まり、次いで、脳へと広がる。これらの腫瘍は、原発性脳腫瘍よりも一般的であり、それらの始まる場所によって命名される。

10

【0004】

脳および中枢神経系の腫瘍は、120を超えるタイプがある。脳および脊髄の腫瘍は、各人で異なる。それらは、異なる領域に形成し、異なる細胞のタイプから発達し、異なる処置の選択肢があると思われる。多くの場合、低いグレードの腫瘍（グレードIおよびII）、すなわち侵襲性の高くないものは、注意深いモニタリングまたは手術のみで処置される。全ての腫瘍が、走査を繰り返してモニタリングされるが、グレードIIIの腫瘍は、手術後にさらに入念に、かつ時間をかけて注視されて、再発がないことを確認される。高グレードの腫瘍（グレードIIIおよびIV）、すなわち悪性であり急速に成長しうるものは、除去がさらに難しく、手術より先の追加の処置、例えば放射線照射または化学治療などを必要とする。微視的な腫瘍細胞が、手術後に残る可能性があり、最終的に元通りに成長することになる。全ての処置は、それゆえ、生命をできる限り長く延長し向上させることを意図するものである。

20

【0005】

低グレードの脳腫瘍については、手術は、腫瘍の全てを除去することが可能である場合に、特に必要な唯一の処置であると思われる。目に見える腫瘍が手術後に残っている場合には、放射線照射および化学治療が使用されることがある。高グレードの腫瘍については、処置は通常、手術に始まり、その後放射線照射治療および化学治療が続く。高グレードの腫瘍に用いる追加の処置の選択肢としては、腫瘍細胞を破壊するかまたは腫瘍の成長を遅延させるためのX線および他の形態の放射線照射；分裂している細胞を速やかに死滅させるための化学治療；細胞の特異的な構成要素、例えば細胞の成長に必要とされる分子または経路に、それらを標的として使用するように焦点を合わせた標的化治療；および異なる方向でその使用領域にわたる交互になった「波様の」電界を作り出すことによって、がん細胞の示す速やかな細胞分裂を破綻させるための電界を生成する、局所的または領域的に送達される処置、が挙げられる。

30

【0006】

首尾良く脳腫瘍を処置することは難題となりうる。身体の血液-脳関門は、正常には脳および脊髄を、血流を通じてこれらの構造に入り込む有害な化学物質から保護する。しかし、この関門はまた、多くのタイプの化学治療を閉め出す。腫瘍が脳または脊髄の繊細な部分に近い場合には、手術が難しいことがある。外科医が元の腫瘍を完全に除去することができた時でさえ、手術中に目にするかまたは除去するには小さすぎる腫瘍の一部が残る場合がある。放射線照射治療は、健康な組織を損傷させることがある。

40

【0007】

脳腫瘍およびその処置は、多くの場合に、副作用を引き起こす。腫瘍を遅らせる、停止させる、または排除するための処置に加えて、ケアの重要な部分とは、人の症状と副作用を和らげることである。このアプローチは、緩和ケアまたは支持ケアと呼ばれ、物理的、感情的、および社会的な要求のある患者を支持することを含む。疼痛薬物療法は、脳腫瘍の一般的な症状である頭痛に由来する痛みを管理する助けとなる。多くの場合、コルチコステロイドが、脳の腫脹を小さくするために使用され、このことによって、処方箋による疼痛薬物療法を必要とすることなく腫脹由来の痛みを少なくすることができる。抗発作（a

50

ntiseizure)の薬物療法は、発作を制御する助けとするために使用される。

【0008】

手術は、脳腫瘍の全てまたは一部を除去するために一般に使用される。時には、腫瘍が外科医の到達することのできない場所に位置するか、または重要な構造の近くにあるために、手術を実施することができない。これらの腫瘍は、手術不能であると呼ばれる。

【0009】

化学治療の目標は、手術後に残っているがん細胞を破壊し、腫瘍の成長を遅らせ、症状を低減することであり得る。化学治療レジメンは、通常、ある一期間にわたって施される特有の回数サイクルからなる。患者は、一度に1つの薬物を受けてもよいし、異なる薬物の組合せを同時に受けてもよい。化学治療を施すための一般的な方法としては、飲み込まれる(経口的に)丸剤もしくはカプセルまたは静脈内による(IV)ものである。薬物によっては、血液-脳関門を通り抜けるのに優れており、これらの薬物は、この能力ゆえに、多くの場合、脳腫瘍に使用される。グリアデル・ウエハー(Gliadel wafer)は、薬物カルムスチンを与えるための1つの方法であり、この方法は、手術中に腫瘍が除去された領域にウエハーを配置することを含む。神経膠芽腫に罹っている人にとって、最新のケアの標準は、放射線照射治療を毎日の低用量のテモゾロミド(テモダール)と共に行い、続いて、6か月から1年間、毎月のテモゾロミドの投薬を放射線治療後に行うというものである。ロムスチン(CeeNU)、プロカルバジン(マチュレーン(Matulan))、およびビンクリスチン(ピンカサル(Vincasar))の3つの薬物の組合せは、放射線照射治療と併せて使用されている。このアプローチは、放射線照射治療の前または直後のどちらかに与えた際に、1p19qの共欠失を伴うグレードIIの乏突起神経膠腫に罹っている患者の命を延ばす助けとなっている。それはまた、手術で完全に除去することのできなかつた低グレードの腫瘍に対し放射線照射治療後に与えた際に、患者の命を延ばすことを示している。化学治療の副作用は、個体と使用された用量とに依存するが、疲労、感染のリスク、吐き気および嘔吐、脱毛、食欲喪失、および下痢を含むことがある。これらの副作用は、通常はひとたび治療が終了すると消える。稀に、ある種の薬物は、多少の難聴の原因となることがある。腎臓の損傷を引き起こすことがあるものもある。患者には、その腎臓を保護するために、IVによって余分の流体を与えることがある。がん薬物の完全な一覧は、NCIのウェブサイト上で見ることができる。

【0010】

抗血管新生は、新しい血管を作る過程である血管新生の停止に、焦点が合わせられる。腫瘍は、成長および拡大のために、血管によって送達される栄養分を必要とすることから、抗血管新生治療の目標は、腫瘍を「飢えさせる」ことである。ベバシズマブ(アバスタン)は、事前の処置が機能しなかった際に、多形神経膠芽腫を処置するために使用される抗血管新生治療である。

【0011】

寛解は、腫瘍を体内に検出することができない時である。寛解は、一時的でも永続的でもあり得る。大半の原発性脳腫瘍については、イメージング試験が、腫瘍の成長が制御されるかまたは目に見える腫瘍の徴候がないことを示すにも関わらず、脳腫瘍が再発するのが一般的である。

【0012】

神経膠腫では、腫瘍随伴ミクログリア/マクロファージ(TAM)は、腫瘍の成長、腫瘍の侵入、血管新生、および免疫系の回避に関与することが示されている。TAMは、腫瘍微小環境中で再プログラミングに付され、交互になった免疫抑制性の腫瘍形成性M2表現型につながる(da Fonseca AC、Badie B、Clin Dev Immunol、2013年、264124頁)。種々のミクログリア/マクロファージ調節分子は、前臨床試験において、TAMの表現型を切り替え、神経膠腫の進行を低下させ、生存を増加させることを示している(El Andaloussi Aら、Glia、2006年、54巻、526~35頁; Hussain SFら、Cancer Res、2007年、67巻、9630~6頁; Gabrusiewicz Kら、PLoS

10

20

30

40

50

One、2011年、6巻、e23902頁；Markovic DSら、Brain Behav Immun、2011年、25巻、624～8頁）。免疫調節分子のTAMへの標的送達は、副作用を低減した有効性の向上を提供するものと思われる。

【0013】

悪性の神経腫瘍は、最も一般的で最も侵襲性の高い原発性脳腫瘍であり、処置の進歩にもかかわらず、生存の中央値は、依然として16.4か月である。有効な治療の開発に際して直面している鍵となる難題は、(a)全身に送達される化学治療薬剤が、損なわれた血液脳腫瘍関門(BBTB)を貫通して、固形腫瘍全体にわたる均一な網羅を提供する能力、および(b)特異的な細胞を標的化する能力に関連する。小分子ベースの治療剤は、腫瘍組織内に有効に分布することができるものの、速やかな腫瘍クリアランスと、有害作用につながる可能性があるオフターゲット血管外遊出とによって制限される。最近のナノ技術の進歩によって、選択的な腫瘍蓄積が可能となっている。しかし、多くのナノ粒子のサイズが、血管外遊出および腫瘍貫通を制限し、それゆえ均一な固形腫瘍の網羅を制限する。皮下腫瘍中のナノ粒子の分布プロファイルを増強するため、粒子サイズと表面電荷とを入念に調節することが試みられている。残念ながら、同所性の脳腫瘍の均一な網羅を達成することは、さらに大きな難題であることが証明されている。これは、皮下腫瘍での血液-腫瘍関門(BTB)に比べてBBTBの浸透性が低いこと、脈管間の空間が不均一であること、および脳腫瘍中の間質の圧力が高いことに起因するものと考えられる。いくつかの戦略では、BBTBを通じて吸収性の取込みを介したナノ粒子送達を試みられているものの、漏出性のBBTB穿孔を通じた受動拡散が、20nm未満の分子を用いて示されているにすぎず、BBTBを通じた妨げのない拡散は、7nmの分子を用いて達成されており、それゆえほとんどのナノ粒子ベース治療剤の全身投与は制限されている。

10

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0014】

【非特許文献1】da Fonseca AC、Badie B.、Clin Dev Immunol (2013年)264124頁

【非特許文献2】El Andaloussi Aら、Glia (2006年)54巻、526～35頁

【非特許文献3】Hussain SFら、Cancer Res (2007年)67巻、9630～6頁

30

【非特許文献4】Gabrusiewicz Kら、PLoS One (2011年)6巻、e23902頁

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

それゆえ、本発明の目的は、脳腫瘍を処置するための薬物を送達するための、改良された方法および試薬を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0016】

脳腫瘍の1つまたは複数の症状を処置または軽減するための少なくとも1種の治療薬剤、予防薬剤、または診断薬剤と共有結合的に連結または複合体形成している、ポリ(アミドアミン)(PAMAM)ヒドロキシル末端 dendrimer を含む組成物を開発した。本組成物は、1つまたは複数のエチレンジアミンコアのポリ(アミドアミン)(PAMAM)ヒドロキシル末端の世代4、5、6、7、8、9、または10(G4-10-OH)の dendrimer を含有する。G6 dendrimer は、予想外に高い取込みと脳腫瘍全体への均一な分布とを実証している。本 dendrimer は、化学治療薬剤、免疫治療薬剤、および緩和薬剤の血液脳関門(「BBB」)を通じた選択的な送達のための手段をもたらす。本 dendrimer はまた、同じ dendrimer を用いて多種の治療薬剤、予防薬剤、および/または診断薬剤を送達することができるという利点を有する。一実施形態では、本 dendrimer

40

50

は、2つの異なるクラスの化合物と複合体形成またはコンジュゲートし、同時の送達をもたらす。本 dendriマ-は、静脈内注射によって単独で、または放射線照射および/もしくは手術を伴う多面的治療の一部として、投与されてもよい。一実施形態では、本 dendriマ-は、増殖性疾患において DDX3 の活性を抑制または阻害するのに有効な量で、少なくとも1つの放射線増感薬剤に共有結合的に連結している。別の実施形態では、本 dendriマ-は、被験体で腫瘍を検出するのに有効な量で、少なくとも1つの検出可能な部分に共有結合的に連結している。別の実施形態では、本 dendriマ-組成物は、化学治療薬剤、免疫治療薬剤、抗発作薬剤、腫脹を減少させるためのステロイド、抗生物質、抗血管新生性 (antio-genic) 薬剤、および/または診断薬剤など、多種の薬剤を有し、これらは、dendriマ-と複合体形成またはコンジュゲートしている。

10

【0017】

本 dendriマ-組成物は、好ましくは全身に、最も好ましくは静脈内注射を介して投与される。本組成物は、手術、放射線照射、もしくはその両方の前またはその後直ちに、投与されてもよい。本組成物は、神経膠腫など特異的な型の腫瘍を処置するために、またはマイクログリア/マクロファージ (TAM) に随伴する腫瘍を標的化することを通じて、設計されてもよい。

【0018】

実施例は、ヒドロキシル末端 PAMAM dendriマ-が、全身投与後に、固有の好ましい薬物動態の特徴を神経膠芽腫腫瘍モデルで提示することを実証している。dendriマ-は、速やかに蓄積して、選択的に腫瘍組織に保持される。これは、少なくとも部分的には、サイズが小型であること、および表面電荷が中性に近く、固形腫瘍全体にわたって dendriマ-が均一に分布するのを可能にすることに起因する。dendriマ-は、細胞外マトリックスを通して均一に分布し、腫瘍全体および腫瘍周囲の領域に行き届く。dendriマ-は、本質的には神経炎症を標的化し、腫瘍随伴マイクログリア/マクロファージ (TAM) に蓄積する。dendriマ-の世代を4から6までに増やすことによって、その均一な分布と TAM の標的化に影響を及ぼすことなく、腫瘍での dendriマ-の蓄積を有意に増加させることができる。世代4および6のヒドロキシル末端 PAMAM dendriマ-は、全身投与後、血液脳腫瘍関門を通して漏出し、腫瘍周囲の領域ではなく、選択的に神経膠芽腫に蓄積することができる。しかし、dendriマ-はまた、腫瘍周囲の領域に蓄積し、それによって、神経膠芽腫の遊走先端 (migrating front) に影響を及ぼす。これらの dendriマ-は、本質的に腫瘍随伴マイクログリア/マクロファージを標的化して、これらの細胞に少なくとも48時間にわたって保持される。血管腔に dendriマ-が残っている対側半球 (「健康な」) には、有意な dendriマ-の蓄積はない。

20

30

【0019】

世代4 (G4) の dendriマ-は、循環から速やかにクリアランスされるものの、速やかにかつ選択的に蓄積し、腫瘍組織に保持される。蛍光定量および高分解能蛍光顕微鏡に基づけば、dendriマ-は、最初の8時間にわたって蓄積し、48時間では依然として腫瘍に保持される。dendriマ-の世代を4から6まで増やすことによって、その均一な分布と TAM の標的化に影響を及ぼすことなく、腫瘍での dendriマ-の蓄積、AUC および保持を約100倍、大幅に増やすことができる。

40

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】図1A~1Cは、ヒドロキシル末端 G4 dendriマ-に、小分子である BLZ-945 をコンジュゲートするための合成スキームを示す。

【0021】

【図2】図2Aおよび2Bは、げっ歯類 9L 神経膠肉腫モデルの脳 (腫瘍、腫瘍周囲領域、および対側半球) での D-Cy5 の薬物動態を図説するグラフである。図1Aは、全身投与後15分、1時間、4時間、8時間、24時間、および48時間の脳領域での D-Cy5 濃度のグラフである。蓄積は、組織 g 当たりの D-Cy5 の μg として表される。図1Bは、D-Cy5 の曲線下面積 (「AUC」) のグラフである。48時間での AUC は

50

、腫瘍と対側半球との間で、 dendriマーの曝露に大きな差を示している。

【0022】

【図3】図3Aは、脳の定量データの線形カーブフィッティングのグラフである。対側、腫瘍周囲、および腫瘍の R^2 は、それぞれ0.98、0.99および0.96である。図3Bは、脳薬物動態データ、組織(t)/血清(t)(mL/g)対AUC血清t/血清(t)(時間)に基づく、腫瘍、腫瘍周囲の領域、および対側半球での浸透定数(K_{in})および分布の初期体積(V_i)の計算を示す。

【0023】

【図4】図4Aおよび4Bは、Imarisソフトウェアを使用した、9L神経膠肉腫を接種したげっ歯類の脳のミクログリア細胞の特徴付け(集団および活性化)を図示する。図4Aは、腫瘍、同側半球および対側半球での mm^2 面積当たりのIba1+ミクログリア/マクロファージ集団の画像ベースの細胞カウントのグラフである。図4Bは、健康な脳、腫瘍接種脳の対側半球および同側半球、ならびに腫瘍組織でのミクログリア/マクロファージの活性化および貪食活性の指標としての、ミクログリア細胞の体積に対する表面積の比率の画像ベースの測定のグラフである。1+細胞のD-Cy5とIba1+TAMとの共局在、およびD-Cy5とDAPI+細胞との共局在である。結果を、総DAPI+細胞集団のパーセントとして表す。ミクログリア取込みと細胞取込みとの間に、統計学的有意性はない。統計 $* p < 0.05$; $** p < 0.001$ 統計解析は、3~5枚の異なる切片に基づく。

10

【0024】

【図5】図5は、投与から24時間後のD-Cy5の細胞局在性解析のグラフであり、Iba-1+細胞のD-Cy5のIba1+TAMとの共局在、およびD-Cy5のDAPI+細胞との共局在の、画像ベースの測定を使用した。結果を、総DAPI+細胞集団のパーセントとして表す。ミクログリア取込みと細胞取込みとの間に、統計学的有意性はない。

20

【0025】

【図6】図6A~6Cは、D-Cy5投与の24時間後の9L神経膠肉腫のげっ歯類モデルの主要器官(脳、肝臓、肺、脾臓、心臓、および腎臓)、血清および尿中の、D-Cy5の蛍光ベースの定量に基づくグラフである。図6Aは、体内分布を、器官当たりの注射用量:腎臓、尿、および他の器官中のD-Cy5の蓄積、のパーセントで表す。図6Bは、脾臓、肝臓、腎臓および血清中のD-Cy5の時間依存的な濃度のグラフである。濃度を、組織g当たりの注射用量のパーセントで表す。図6Cは、D-Cy5の血漿中薬物動態の蛍光ベースの定量のグラフである。

30

【0026】

【図7】図7A~7Cは、腫瘍を担持した脳でのG6とG4 dendriマーとの間の蓄積(dendriマー μg /脳組織g)を時間の関数として比較した(図7A)グラフである。腫瘍/腫瘍周囲のG4 dendriマーの蓄積は、注射後8時間頃にピークとなり、徐々に減少し、一方、腫瘍/腫瘍周囲のG6 dendriマーの濃度は、継続して増加した。48時間で、G6の濃度は、腫瘍中のG4 dendriマー濃度のほぼ100倍であった。そして、G6 dendriマーを示す曲線下面積(AUC)プロット(図7B)は、48時間以内に、G4 dendriマーのほぼ100倍の脳腫瘍曝露を有する。脳のdendriマー濃度を血清中のdendriマー濃度によって正規化した際に、血清に対する脳の比は、脳標的化能力の指標である。G6 dendriマーは、全ての時点で、G4 dendriマーよりも高い腫瘍標的化能力を示した(図7C)。

40

【0027】

【図8】図8Aおよび8Bは、血清および主要器官:腎臓、肝臓、脾臓中のG4およびG6 dendriマーの濃度を時間の関数として示すグラフである。図8Aは、G6 dendriマーがG4 dendriマーよりも高い血清中濃度と、延長された血清中半減期とを示し、これらは、G6 dendriマーの腫瘍へのより高い蓄積と標的化に寄与することを示す。dendriマー濃度は、血清ミリリットル当たりの総注射用量の百分率として提示された。図8B

50

は、G4デンドリマーについて、腎臓が、最も多くのデンドリマー蓄積（20%～30%）を有し、各種時点で肝臓および脾臓中のデンドリマー蓄積（約0.3%）よりも有意に高かったことを示した。G6デンドリマーについては、サイズの増加によって、腎濾過および腎臓への蓄積が大きく減少した。G6デンドリマーの腎臓中濃度は、G4デンドリマー（約1%）の1/10未満であり、48時間から開始される腎臓からのクリアランスを示し始めた。G6デンドリマーの肝臓への蓄積は、G4デンドリマーと同様であったが、一方で、脾臓は、約5倍高い蓄積を示し、これは単球による取込みが増加したことに起因する可能性がある。

【発明を実施するための形態】

【0028】

10

I. 定義

用語「治療薬剤」は、疾患または障害の1つまたは複数の症状を防止または処置するために投与することのできる薬剤を指す。例としては、以下に限定されないが、核酸、核酸類似体、小分子、ペプチド模倣剤（peptidomimetic）、タンパク質、ペプチド、炭水化物、もしくは糖、脂質、もしくは界面活性剤、またはそれらの組合せが挙げられる。

【0029】

用語「処置する」は、疾患、障害、または状態の1つまたは複数の症状を防止または軽減することを指す。疾患または状態を処置することは、このような薬剤が痛みの原因を処置しなくても鎮痛薬剤の投与によって被験体の痛みを処置することなど、根底にある病態生理が影響を受けないとしても、特定の疾患または状態の少なくとも1つの症状を改善することを含む。

20

【0030】

「薬学的に許容される」という語句は、健全な医療上の判断の範囲内で、合理的な利益/リスクの比に見合う過度の毒性、刺激、アレルギー応答、または他の問題もしくは合併症を伴うことなく、人間および動物の組織に接触させる際の使用に適した、組成物、ポリマー、および他の材料ならびに/または剤形を指す。「薬学的に許容される担体」という語句は、薬学的に許容される材料、組成物、またはビヒクル、例えば液体または固体の充填剤、希釈剤、溶媒、または一器官もしくは身体の一部から別の器官もしくは身体の一部までの任意の対象組成物の運搬もしくは輸送に関する被包装材料を指す。各担体は、対象組成物の他の成分と適合性があり、かつ患者に害にならないという意味で、「許容される」でなければならない。

30

【0031】

「治療有効量」という語句は、任意の医学的処置に適用可能な合理的な利益/リスクの比で、いくらかの所望の効果をもたらす治療薬剤の量を指す。有効量は、処置されている疾患もしくは状態、投与されている特定の標的化構築物、被験体のサイズ、または疾患もしくは状態の重症度などの要因に応じて、様々であることがある。当業者は、過度な実験を必要とすることなく、特定の化合物の有効量を経験的に決定してもよい。

【0032】

40

II. 製剤

A. デンドリマー

本明細書に使用されるとき用語「デンドリマー」としては、以下に限定されないが、内部コアと、この起点コアに規則的に付着している繰り返し単位の内部層（または「世代」と、最も外側の世代に付着している末端基の外部表面とを有する、分子構造物が挙げられる。デンドリマーの例としては、以下に限定されないが、PAMAM、ポリエステル、ポリリジン、およびPPIが挙げられる。PAMAMデンドリマーは、カルボキシル、アミン、およびヒドロキシル末端を有することができ、任意の世代のデンドリマーとすることができるが、そのようなものとしては、以下に限定されないが、世代1のPAMAMデンドリマー、世代2のPAMAMデンドリマー、世代3のPAMAMデンドリマー、世代4のPAMAMデンドリマー、世代5のPAMAMデンドリマー、世代6のPAMAM

50

デンドリマー、世代7のPAMAMデンドリマー、世代8のPAMAMデンドリマー、世代9のPAMAMデンドリマー、または世代10のPAMAMデンドリマーが挙げられる。使用に適したデンドリマーとしては、以下に限定されないが、ポリアミドアミン(PAMAM)、ポリプロピルアミン(POPAM)、ポリエチレンイミン(polyethyleneimine)、ポリリジン、ポリエステル、イブチセン、脂肪族ポリ(エーテル)、および/または芳香族ポリエーテルのデンドリマーが挙げられる。デンドリマー複合体の各デンドリマーは、他のデンドリマーと同様のまたは異なる化学的性質を有していてもよい(例えば、第1のデンドリマーは、PAMAMデンドリマーを含んでもよく、一方で、第2のデンドリマーは、POPAMデンドリマーを含んでもよい)。一部の実施形態では、第1または第2のデンドリマーは、追加の薬剤をさらに含んでもよい。多重腕のPEGポリマーとしては、スルフヒドリルまたはチオピリジン末端基を保有する少なくとも2つの分枝を有するポリエチレングリコールが挙げられる。しかし、本明細書に開示される実施形態は、このクラスに限定されず、他の末端基、例えばスクシンイミジルまたはマレイミド末端などを保有するPEGポリマーを、使用することができる。分子量10kDaから80kDaのPEGポリマーを使用することができる。

10

20

30

40

50

【0033】

デンドリマー複合体は、多種のデンドリマーを含む。例えば、本デンドリマー複合体は、第3のデンドリマーを含むことができる。ここで、第3のデンドリマーは、少なくとも1つの他のデンドリマーと複合体形成している。さらに、第3の薬剤は、第3のデンドリマーと複合体形成することができる。別の実施形態では、第1および第2のデンドリマーは、それぞれ第3のデンドリマーと複合体形成し、ここで、第1および第2のデンドリマーは、PAMAMデンドリマーであり、第3のデンドリマーは、POPAMデンドリマーである。本発明の趣旨を逸脱することなく、追加のデンドリマーを組み入れることができる。多種のデンドリマーを利用する際には、多種の薬剤も組み入れることができ、互いに複合体形成するデンドリマーの数によって限定されない。

【0034】

本明細書に使用されるとき、用語「PAMAMデンドリマー」は、ポリ(アミドアミン)デンドリマーを意味し、それは、アミドアミン基本要素を含む異なるコアを含有することがある。それらを作製するための方法は、当業者によって公知であり、概して、中心の起点コアの周りにある樹状のアラニン単位の同心の殻(世代)を生成する、2ステップの反復する反応シーケンスを含む。このPAMAMコア殻構造物は、追加される殻(世代)の関数として、線状に直径を成長させる。その間に、表面基が、樹状-分枝形成の数学に従って、各世代で指数関数的に増幅する。それらは、5種の異なるコアタイプと10個の表面官能基を有する世代G0~10で利用可能である。デンドリマー分枝型ポリマーは、ポリアミドアミン(PAMAM)、ポリエステル、ポリエーテル、ポリリジン、またはポリエチレングリコール(PEG)、ポリペプチドのデンドリマーからなってもよい。

【0035】

一部の実施形態に従って、使用されるPAMAMデンドリマーは、世代4のデンドリマーまたはそれを超えるものとしてでき、それらは、その表面官能基に付着したヒドロキシル基を有する。多重腕のPEGポリマーは、スルフヒドリルまたはチオピリジン末端基を保有する2つまたはそれを超える分枝を有する、ポリエチレングリコールを含む。しかし、実施形態は、このクラスに限定されず、スクシンイミジルまたはマレイミド末端など、他の末端基を保有するPEGポリマーを使用することができる。分子量10kDaから80kDaのPEGポリマーを使用することができる。

【0036】

一部の実施形態では、本デンドリマーは、ナノ粒子の形態であり、国際特許公報WO2009/046446に詳細に記載されている。

【0037】

PAMAM-BLZ-945の調製

非限定的な例として、以下は、酢酸、2-(2-シクロオクチン-1-イルオキシ)酸、および2-アジド酢酸をリンカーとして使用して、第4世代のヒドロキシル末端PAMAM dendrimer (PAMAM-OH)に、小分子であるBLZ-945をコンジュゲートするための合成スキームである。図1A~1Cを参照されたい。

【0038】

初めに、2-(2-シクロオクチン-1-イルオキシ)酸を使用して、第4世代のヒドロキシル末端PAMAM dendrimer (PAMAM-OH)を、表面上に9つのクリック可能な(clickable)基を有するクリック可能な二機能性 dendrimer (中間体1)へと官能化する(functionalize)(図1A)。BLZ-945を2-アジド酢酸と反応させて、エステル結合を介したアジド官能化中間体を形成する(図1B) 10。2-アジドアセチルリンカー上に結果として得られるアジドを、さらに二機能性 dendrimer のクリック可能な基と反応させて、 dendrimer-BLZ-945 コンジュゲートを得る(図1C)。およそ9分子のBLZ-945が1分子の dendrimer にコンジュゲートされたものがある。

【0039】

上記に記載のスキームは、BLZ-945に限定されない。他の小分子、例えばWP1066などのシグナル伝達性転写因子(Signal Transducer and Activator of Transcription)(STAT)タンパク質の小分子阻害剤、ならびにミノサイクリンおよびシクロスポリンAなどの他の小分子を、TAM標的化療法のための免疫調節分子として、本 dendrimer にコンジュゲートすることができる。 20

【0040】

B. カップリング剤およびスペーサー

dendrimer 複合体は、 dendrimer または多重腕のPEGにコンジュゲートまたは付着している治療的に活性な薬剤または化合物(以降「薬剤」とする)から形成され得る。付加は、薬剤と dendrimer との間にジスルフィド架橋を提供する適切なスペーサーを介して起こりうる。本 dendrimer 複合体は、体内に見出される還元条件下で、in vivo でチオール交換反応によって、薬剤を速やかに放出することが可能である。

【0041】

本明細書に使用されるとき用語「スペーサー」は、治療的に活性な薬剤を dendrimer に連結するために使用される組成物を含むことが意図される。スペーサーは、一緒に連結されてポリマーと治療薬剤またはイメージング剤とを架橋する、単一の化学実体かまたは2つもしくはそれを超える化学実体のどちらかとしてすることができる。スペーサーとしては、スルフヒドリル、チオピリジン、スクシンイミジル、マレイミド、ビニルスルホン、およびカーボネート末端を有する、任意の小さな化学実体、ペプチド、またはポリマーを挙げることができる。 30

【0042】

スペーサーは、スルフヒドリル、チオピリジン、スクシンイミジル、マレイミド、ビニルスルホン、およびカーボネート基で終結する化合物のクラスの中から選択することができる。スペーサーは、チオピリジン末端化合物、例えばジチオジピリジン、N-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)-プロピオネート(SPDP)、スクシンイミジル6-(3-[2-ピリジルジチオ]-プロピオンアミド)ヘキサノエートLC-SPDP、またはスルホ-LC-SPDPを含むことができる。また、スペーサーとしては、ペプチドを挙げることができ、ここで、ペプチドは、線状または環状であり、本質的にはスルフヒドリル基、例えばグルタチオン、ホモシステイン、システイン、およびその誘導体、arg-gly-asp-cys(RGDC)(配列番号1)、シクロ(Arg-Gly-Asp-d-Phe-Cys)(c(RGDFC))(配列番号2)、シクロ(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Cys)(配列番号3)、シクロ(Arg-Ala-Asp-d-Tyr-Cys)(配列番号4)を有する。スペーサーは、メルカプト酸誘導体、例えば3メルカプトプロピオン酸、メルカプト酢酸、4メルカプト酪酸、チオラン- 40 50

2 - オン、6メルカプトヘキサ酸、5メルカプト吉草酸など、および他のメルカプト誘導体、例えば2メルカプトエタノール、および2メルカプトエチルアミンとすることができる。スパーサーは、チオサリチル酸およびその誘導体、(4 - スクシンイミジルオキシカルボニル - メチル - アルファ - 2 - ピリジチオ)トルエン、(3 - [2 - ピリジチオ(pyridithio)])プロピオニルヒドラジドとすることができる。スパーサーは、マレイミド末端を有することができる。ここで、スパーサーは、ポリマーまたは小さな化学実体、例えばビス - マレイミドジエチレングリコールおよびビス - マレイミドトリエチレングリコール、ビス - マレイミドエタン、ビスマレイミドヘキサ酸を含む。スパーサーは、1, 6 - ヘキサ - ビス - ビニルスルホンなどのビニルスルホンを含むことができる。スパーサーは、チオグルコースなどのチオグリコシドを含むことができる。スパーサーは、還元タンパク質、例えばウシ血清アルブミンおよびヒト血清アルブミン、ジスルフィド結合を形成することが可能な任意のチオール末端化合物とすることができる。スパーサーとしては、マレイミド、スクシンイミジルおよびチオール末端を有するポリエチレングリコールを挙げることができる。

10

20

30

40

50

【0043】

治療的に活性な薬剤、イメージング剤、および/または標的化部分は、共有結合的に付着しているか、または分子内に分散もしくは被包されているかのどちらかとすることができる。デンドリマーは、好ましくは、カルボキシル、ヒドロキシル、またはアミン末端を有する、世代10までのPAMAMデンドリマーである。PEGポリマーは、2本またはそれを超える腕および10kDaから80kDaの分子量を有する、星型ポリマーである。PEGポリマーは、スルフヒドリル、チオピリジン、スクシンイミジル、またはマレイミド末端を有する。デンドリマーは、ジスルフィド、エステル、またはアミド結合で終わるスパーサーを介して、標的化部分、イメージング剤、および/または治療薬剤に連結される。

【0044】

C . 治療薬剤、予防薬剤、および診断薬剤

本明細書に使用されるとき用語「デンドリマー複合体」は、1つまたは複数の治療薬剤、予防薬剤、または診断薬剤とコンジュゲートまたは複合体形成しているデンドリマーを指す。本デンドリマー複合体は、i . v . 注射によって投与された際に、正常条件下ではなく病的条件下でのみ血液脳関門(BBB)を優先的に横断することができる。好ましくは、薬剤(複数可)は、PAMAMデンドリマーまたは多重腕のPEGに付着またはコンジュゲートしており、それらは、in vivoに見出される還元条件下で薬物を細胞内に優先的に放出することが可能である。薬剤に連結された本デンドリマー複合体は、標的化、病的部位での局在化、薬物の放出、およびイメージングの目的を含む、いくつかの機能を実施するために使用することができる。本デンドリマー複合体は、標的化部分を用いるかまたは用いずにタグ付けすることができ、その結果、本デンドリマーと薬剤またはイメージング剤との間のジスルフィド結合が、スパーサーまたはリンカー分子を介して形成される。

【0045】

代表的な治療薬剤(プロドラッグを含めて)、予防薬剤または診断薬剤は、ペプチド、タンパク質、炭水化物、ヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチド、小分子、またはそれらの組合せとすることができる。代表的なオリゴヌクレオチドとしては、siRNA、マイクロRNA、DNA、およびRNAが挙げられる。

【0046】

用語「化学治療薬剤」は、概して、がん細胞でのDNA合成または機能に干渉することによって働く、医薬的または治療的に活性な化合物を含む。それらの細胞レベルでの化学的作用に基づいて、化学治療薬剤は、細胞周期に特異的な薬剤(細胞周期のある種の期間に有効である)と、細胞周期に非特異的な薬剤(細胞周期の全ての期間に有効である)とに分類することができる。化学治療薬剤の例としては、アルキル化薬剤、血管新生阻害剤、腫瘍免疫応答の調節剤、アロマターゼ阻害剤、代謝拮抗物質、アントラサイクリ

ン、抗腫瘍抗生物質、白金化合物、トポイソメラーゼ阻害剤、放射性同位体、放射線増感薬剤、チェックポイント阻害剤、PD-1阻害剤、APR kinase阻害剤、植物アルカロイド、糖分解阻害剤、およびそれらのプロドラッグが挙げられる。

【0047】

脳腫瘍を処置する際に一般に使用される代表的な化学治療剤としては、バクリタキセルなどのタキソール、BCNU、カンプトテシン、ドキシサイクリン、シスプラチン、ならびにそれらの誘導体、類似体およびプロドラッグが挙げられる。

【0048】

PD-1阻害剤の例としては、例えば、遺伝学的に操作され、かつヒトPD-1に特異的な完全ヒト型イムノグロブリンG4 (IgG4)モノクローナル抗体である、MDX-1106、および米国FDAによって最近承認されたペンプロリズマブが挙げられる。

10

【0049】

治療薬剤としては、放射線照射など、異なる治療の効果を増強する薬剤を挙げることができる。本明細書に使用されるとき、用語「放射線照射線量増感剤」は、細胞、細胞の集団または組織に接触した際に、その細胞、細胞の集団、または組織の電離放射線に対する感受性を増加させる、任意の薬剤を意味する。一部の実施形態では、放射線増感剤は、DDX3阻害剤、例えば化合物RK-33、またはその塩、溶媒化合物、立体異性体、もしくは誘導体である。

【0050】

治療薬剤としては、脳腫瘍の1つまたは複数の症状を軽減する薬剤が挙げられる。例えば、腫瘍に関連がある腫脹を低減する薬剤が、デンドリマーを介して送達されてもよい。例としては、ステロイドなどの抗炎症薬剤、例えばメチルプレドニゾン、デキサメタゾン、およびフルオシノロンアセトニド、COX-2阻害剤などの非ステロイド系抗炎症薬剤、金化合物抗炎症薬剤、免疫抑制薬剤、サリチル酸系抗炎症薬剤、ラニズマブ、ミノサイクリン、ならびにラパマイシンが挙げられる。他の抗炎症薬物としては、インドメタシン、アスピリン、アセトアミノフェン、ジクロフェナクナトリウムおよびイブプロフェンなどの非ステロイド系薬物が挙げられる。

20

【0051】

ペプチド薬物は、TAMまたはがん細胞に対して活性な任意の配列とすることができる。例としては、Lys3Gly3Serリンカーを有するペプチド [配列YEQDPWGVKWWY (配列番号5) を有するM2pep、および配列WEDYQWPVYKGW (配列番号6) を有するscM2pep] が挙げられ、C末端のピオチンタグは、ElimBioPharmaceuticalsから>95%の純度で購入された。KLA材料は、以下のように合成し、>95%の純度で精製された：M2pepKLA [YEQDPWGVKWWYGGGS-D [KLAKLAK]2 (配列番号7)]、scM2pepKLA [WEDYQWPVYKGWSGGS-D [KLAKLAK]2 (配列番号8)] およびKLA (D [KLAKLAK]2 (配列番号9))。

30

【0052】

TAMを標的化する免疫治療薬剤のための例としては、コロニー刺激因子-1 (CSF-1) 受容体阻害剤、例えばBLZ-945およびPLX3397、MAPキナーゼ阻害剤、例えばPD98059、STATの小分子阻害剤 (例えばWP1066)、ミノサイクリン、およびシクロスポリンAを挙げることができる。

40

【0053】

他の例示的な治療薬剤としては、血管拡張剤および抗感染薬剤が挙げられる。抗生物質としては、ベータ-ラクタム類、例えば、ペニシリンおよびアンピシリン、セファロsporin類、例えば、セフトキシム、セファクロル、セファレキシン、セファドロキシル (cephydroxyl)、セフポドキシム (cefodoxime) およびプロキセチル、テトラサイクリン抗生物質類、例えば、ドキシサイクリンおよびミノサイクリン、マクロライド抗生物質類、例えば、アジスロマイシン、エリスロマイシン、ラパマイシンおよびクラリスロマイシン、フルオロキノロン類、例えば、シプロフロキサシン、エンロフ

50

ロキサシン(enrofloxacin)、オフロキサシン、ガチフロキサシン、レボフロキサシンおよびノルフロキサシン、トブラマイシン、コリスチン、またはアズトレオナム、ならびにエリスロマイシン、アジスロマイシン、またはクラリスロマイシンなどの抗炎症活性を有することが公知である抗生物質が挙げられる。抗興奮毒性薬剤として、例えばバルプロ酸、D-アミノホスホノバレレート、D-アミノホスホノヘプタノエート、バクロフェンなどのグルタメートの形成/放出の阻害剤、およびNMDA受容体アンタゴニストなどとしての活性を有する他の化合物もまた、投与することができる。

【0054】

一部の実施形態では、分子としては、抗体、例えばダクリズマブ、ベバシズマブ[AVASTIN(登録商標)]、ラニズマブ[LUCENTIS(登録商標)]、バシリキシマブ、ラニズマブ、およびペガブタニブナトリウム、またはSN50のようなペプチド、およびNFのアンタゴニストを挙げることができる。

10

【0055】

例示的な診断薬剤としては、常磁性分子、蛍光化合物、磁性分子、ならびに放射性核種、x線イメージング剤、および造影剤が挙げられる。これらはまた、上述のものを用いて標識されているリガンドまたは抗体であってもよいし、または当業者に公知の方法によって検出可能な標識化リガンドもしくは抗体に結合してもよい。

【0056】

例示的な診断薬剤としては、色素、蛍光色素、近赤外色素、SPECTイメージング剤、PETイメージング剤、および放射性同位体が挙げられる。代表的な色素としては、カルボシアニン、インドカルボシアニン、オキサカルボシアニン、ツイカルボシアニン(thuicarbo-cyanine)およびメロシアニン、ポリメチン、クマリン、ローダミン、キサンテン、フルオレセイン、ホウ素-ジピロメタン(BODIPY)、Cy5、Cy5.5、Cy7、VivoTag-680、VivoTag-S680、VivoTag-S750、AlexaFluor660、AlexaFluor680、AlexaFluor700、AlexaFluor750、AlexaFluor790、Dy677、Dy676、Dy682、Dy752、Dy780、DyLight547、DyLight647、HiLyteFluor647、HiLyteFluor680、HiLyteFluor750、IRDye800CW、IRDye800RS、IRDye700DX、ADS780WS、ADS830WS、およびADS832WSが挙げられる。

20

30

【0057】

代表的なSPECTまたはPETイメージング剤としては、ジエチレントリアミンペンタ酢酸(DTPA)、1,4,7,10-テトラ-アザシクロドデカン-1,4,7,10-テトラ酢酸(DOTA)、ジアミンジチオール、活性化メルカプトアセチル-グリシル-グリシル-グリシン(glycine)(MAG3)、およびヒドラジニコチンアミド(hydrazidonicotinamide)(HYNIC)などのキレート剤が挙げられる。

【0058】

代表的な同位体としては、Tc-94m、Tc-99m、In-111、Ga-67、Ga-68、Gd³⁺、Y-86、Y-90、Lu-177、Re-186、Re-188、Cu-64、Cu-67、Co-55、Co-57、F-18、Sc-47、Ac-225、Bi-213、Bi-212、Pb-212、Sm-153、Ho-166、およびDy-166が挙げられる。

40

【0059】

標的化部分としては、葉酸、線状または環状のどちらかのRGDペプチド、TATペプチド、LHRH、およびBH3が挙げられる。

【0060】

D. デバイスおよび製剤

本デンドリマーは、硬膜下、静脈内、羊膜内(intra-amniotic)、腹腔

50

内、または皮下の経路によって、非経口的に投与することができる。

【0061】

本明細書で使用される担体または希釈剤は、固形製剤のための固形担体もしくは希釈剤、液体製剤のための液体担体もしくは希釈剤、またはそれらの混合物であってもよい。

【0062】

液体製剤のために、薬学的に許容される担体は、例えば、水性または非水性の溶液、懸濁物、乳濁液、または油であってもよい。非経口的なビヒクル（皮下、静脈内、動脈内、または組織内注射のための）としては、例えば、塩化ナトリウム溶液、リンゲル・デキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸加リンゲル液、ならびに不揮発性油が挙げられる。非水性の溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、および注射可能な有機エステル、例えばオレイン酸エチルである。水性担体としては、例えば、水、アルコール性/水性溶液、シクロデキストリン、乳濁液または懸濁物が挙げられ、食塩水および緩衝化媒体を含む。

10

【0063】

本デンドリマーはまた、乳濁液で、例えば油中水で投与することができる。油の例は、石油、動物、植物、または合成由来のもの、例えばピーナツ油、ダイズ油、鉱油、オリーブ油、ヒマワリ油、魚肝油、ゴマ油、綿実油、コーン油、オリーブ、ペトローラム、および鉱物である。非経口的な製剤での使用に適した脂肪酸としては、例えばオレイン酸、ステアリン酸、およびイソステアリン酸が挙げられる。オレイン酸エチルおよびミリスチン酸イソプロピルは、適した脂肪酸エステルの例である。

20

【0064】

非経口投与に適した製剤は、抗酸化剤、緩衝液、静菌剤、ならびに目的のレシピエントの血液と製剤を等張にする溶質、ならびに懸濁剤を含むことのできる水性および非水性の滅菌懸濁物、可溶化剤、増粘剤、安定化剤、ならびに保存剤を含み得る。静脈内ビヒクルとしては、流体および栄養補充剤、電解質補充剤、例えば、リンゲル・デキストロースをベースにするものなどを挙げることができる。概して、水、食塩水、水性デキストロース、および関連の糖溶液、およびプロピレングリコールまたはポリエチレングリコールなどのグリコールが、好適な液体担体であり、特に注射可能な溶液に好適である。

【0065】

注射可能な組成物に用いるための注射可能な医薬担体は、当業者に周知である [例えば *Pharmaceuticals and Pharmacy Practice*, J. B. Lippincott Company, フィラデルフィア、ペンシルバニア州、Banker および Chalmers 編、238 ~ 250 頁 (1982 年)、ならびに *ASHP Handbook on Injectable Drugs*, Trissel, 第 15 版、622 ~ 630 頁 (2009 年) を参照]。

30

【0066】

対流強化送達 (convection enhanced delivery) (「CED」) のための製剤は、小分子量の塩 (salts) および糖、例えばマンニトールなどの溶液を含む。

【0067】

III. 処置の方法

A. 処置される障害または疾患

1 つまたは複数の治療薬剤、予防薬剤、および / または診断薬剤に連結しているデンドリマーを含むデンドリマー複合体組成物は、ミクログリアおよび星状膠細胞を選択的に標的化することができる。有効な血液 - 脳腫瘍関門 (BBTB) 貫通および一様な固形腫瘍分布によって、脳腫瘍への治療薬剤の送達が大幅に増強される。ヒドロキシルにより官能化された世代 4 または 6 のポリ (アミドアミン) (PAMAM) デンドリマーは、小型のサイズと中性に近い表面電荷とを有し、神経炎症に関連のある細胞に選択的に局在化する。

40

【0068】

50

本明細書に使用されるとき、用語「増殖性疾患」は、がん、ならびに良性および悪性の新形成および過形成などの他の疾患を含む。用語のがんは、CNSおよび脳のがんを含み、そのようなものとしては、以下に限定されないが、神経膠腫、神経膠芽腫、神経膠肉腫、星状細胞腫、乏突起神経膠腫、上衣腫、髄膜腫、髄芽腫、神経節腫、シュワン腫、頭蓋咽頭腫、脊索腫(cordoma)および下垂体腫瘍が挙げられる。

【0069】

腫瘍はまた、脳とは異なる起源のものであってもよい。例えば、腫瘍は、胞巣状横紋筋肉腫、骨がん、乳がん、肛門、肛門管または肛門直腸(anorectum)のがん、眼のがん、肝内胆管のがん、関節のがん、頸部、胆嚢または胸膜のがん、鼻、鼻腔または中耳のがん、口腔のがん、外陰部のがん、結腸がん、食道がん、子宮頸がん、消化管カルチノイド、ホジキンリンパ腫、下咽頭がん、腎臓がん、喉頭がん、肝がん、肺がん、悪性中皮腫、メラノーマ、多発性骨髄腫、上咽頭がん、非ホジキンリンパ腫、卵巣がん、膵がん、腹膜、網および腸間膜のがん、咽頭がん、前立腺がん、直腸がん、腎がん(例えば腎細胞癌(RCC))、小腸がん、軟組織がん、胃がん、精巣がん、甲状腺がん、尿管がん、および膀胱がんとして生じてもよい。

10

【0070】

本 dendriマーは、腫瘍のサイズとタイプ、位置、および他の処置、ならびに送達される薬剤に応じた投薬量で投与される。典型的には、担当医は、種々の要因、例えば年齢、体重、全身の健康状態、食事、性別、投与される化合物、投与経路、および処置されている状態の重症度などを考慮して、各個体被験体を処置するのに用いる組成物の投薬量を決定することになる。概して、投与のタイミングおよび頻度は、所与の処置または診断スケジュールの有効性と、所与の送達系の副作用とのバランスを取るよう調整されることになる。例示的な投薬頻度としては、持続注入、単回および多回の投与、例えば毎時、毎日、毎週、毎月、または毎年投薬などが挙げられる。

20

【0071】

投薬レジメンは、脳腫瘍を処置してサイズ、転移、または成長速度を低減するか、または腫脹、痛み、もしくは発作など1つもしくは複数の症状を軽減するのに、十分な任意の量、および任意の長さの時間にわたるものとするができることが、当業者に理解されよう。医師は、投与する治療の長さおよび量を慣例的に決定する。

【0072】

B. 補助治療または併用治療

本 dendriマー複合体は、脳腫瘍またはそれに関連する症状を処置することが可能であることが公知である、1つまたは複数の追加的な治療的に活性な薬剤と組み合わせて投与することができる。

30

【0073】

例えば、静脈内投与を介してまたは手術中に、本 dendriマーを脳へ投与して、腫瘍の全てまたは一部を除去してもよい。本 dendriマーを使用して、化学治療薬剤、免疫治療薬剤、放射線照射治療を受けている被験体などの補助治療を増強する薬剤を送達してもよく、ここで、ポリ(アミドアミン)(PAMAM)ヒドロキシル末端 dendriマーは、脳の増殖性疾患のDDX3の活性を抑制または阻害するのに有効な量で、少なくとも1つの放射線増感薬剤に共有結合的に連結している。

40

【0074】

化学治療に加えて、外科的な介入および放射線照射治療もCNSのがんの処置に使用されることが、当業者によって理解されよう。放射線照射治療は、本明細書に使用されるとき、電離放射線を被験体中のがんの位置の近くで被験体に投与することを意味する。一部実施形態では、放射線増感薬剤は、2回またはそれを超える用量で投与され、その後、電離放射線が、被験体中のがんの位置の近くで被験体に投与される。さらなる実施形態では、放射線増感薬剤の投与とそれに続く電離放射線照射とを、2つまたはそれを超えるサイクルで繰り返すことができる。

【0075】

50

典型的には、電離放射線の線量は、腫瘍のサイズおよび位置によって様々であるが、線量は、0.1 Gy から約 30 Gy の範囲に、好ましくは 5 Gy から約 25 Gy の範囲にある。

【0076】

一部の実施形態では、電離放射線照射は、定位焼灼的放射線治療 (stereotactic ablative radiotherapy) (SABR) または体幹部定位放射線照射治療 (SBRT) の形態である。

【0077】

C. イメージングおよび診断

本 dendriマーはまた、被験体の増殖性疾患に関連する TAM をイメージングするための方法において有用である。本 dendriマーは、少なくとも 1 つの検出可能な部分に連結され、被験体の TAM を検出するために有効な量で被験体に静脈内で投与される。

10

【0078】

本 dendriマー組成物は、セラノスティクス (theranostic) の目的で製剤化することができる。言い換えれば、本 dendriマー組成物は、少なくとも 1 つの生物学的に活性な薬剤および少なくとも 1 つの検出可能な部分を含む、多種の組成物を含むことができる。場合によっては、その少なくとも 1 つの生物学的に活性な薬剤および少なくとも 1 つの検出可能な部分は、同じ分子実体とすることができる。そのため、dendriマー組成物を使用して、被験体の体内の増殖性疾患または腫瘍を検出し、同時に、生物学的に

20

【0079】

本発明は、以下の非制限的な例を参照することにより、さらに理解されよう。

【実施例】

【0080】

(実施例 1 : ラットにおける神経膠腫への蛍光標識 dendriマーの投与)

材料および方法

以下の薬剤を購入した。ヒドロキシル末端エチレンジアミノコア PAMAM dendriマー (特段に指定のない限り、通して dendriマーと称する) (Dendritech、ミッドランド、ミシガン州)、メタノール (HPLC グレード)、DMF (HPLC グレード)、ステンレス鋼ビーズ (Fisher Scientific、ウォルサム、マサチューセッツ州)、およびシアニン 5 (Cy5) (GE Healthcare Life Science、ピッツバーグ、ペンシルバニア州)。共焦点顕微鏡用 : 核対比染色、4', 6'-ジアミジノ-2-フェニルインドール、ジヒドロクロライド (DAPI)、Alexa Fluor (登録商標) 594 ヤギ抗ウサギ IgG (H+L) 抗体 (Molecular Probes、ユージーン、オレゴン州); 蛍光封入剤 (Dako、サンタクララ、カリフォルニア州); ウサギ抗 Iba1 (Wako、大阪、日本); Bandeiraea simplicifolia 由来 レクチン (BSI-B4) (Sigma-Aldrich、セントルイス、ミズーリ州); 抗 GFAP 488 (eBioscience、サンディエゴ、カリフォルニア州); フルオレセインイソチオシアネート-デキストラン (FITC-デキストラン)、平均分子量 70,000 (Sigma Aldrich、セントルイス、ミズーリ州)。

30

40

【0081】

dendriマー Cy5 (D-Cy5) コンジュゲートの合成

Mol Pharmaceutics、10 巻、4560 頁 (2013 年) の方法に準じて、2 つのステップを経て D-Cy5 を調製した。簡単に述べれば、アミン基を用いて、ヒドロキシル末端 PAMAM dendriマーを表面修飾して、二機能性 dendriマーを製した。6-(Fmoc-アミノ) カプロン酸を使用して、Fmoc 保護された二機能性 dendriマー中間体を生成し、それをピペリジン/DMF 混合物中に再溶解することによって最後には脱保護した。N-ヒドロキシスクシンイミドモノエステルを有する Cy5 色素を、二機能性 dendriマーの表面上のアミン基と反応した。「粗」生成物を、透析によ

50

ってさらに広範囲に精製した。最終的なD - Cy 5 コンジュゲートを、¹H NMR、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、およびゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) を使用して特徴付けた。コンジュゲートを固体粉末として - 20 で保存し、投与日に、0.9%滅菌NaClを用いて10mg/mLに再構成した。

【0082】

腫瘍の接種

各125~175gの重さの雌のFischer 344ラット (Harlan Bioproducts、インディアナ、インディアナ州) を、標準施設に収容し、食餌および水に自由にアクセスさせた。Neurosurgery、2010年、66巻、530~7頁; J. Neurosurg.、2010年、113巻、210~7頁に記載されているように、頭蓋内への9L神経膠肉腫の移植を実施した。簡単に述べれば、9L神経膠肉腫 (脳腫瘍研究センター、UCSF、サンフランシスコ、カリフォルニア州から入手) を、F344の側腹で維持した。腫瘍を担体動物の側腹から外科的に摘出し、1mm³片に切断し、頭蓋内移植のために氷上の0.9%滅菌NaCl中に置いた。ラットを麻酔して、正中線の頭皮切開を行い、矢状縫合および冠状縫合を特定した。頭蓋穿孔を、矢状縫合から3mm横方向かつ冠状縫合から5mm後方に行った。硬膜を切開し、外科用顕微鏡と穏やかな吸引とを使用して、小さな皮質領域を切除した。腫瘍片を切除窩に置き、外科用ステープラーを使用して皮膚を閉じた。全ての動物を、Johns Hopkins University Animal Care and Use Committeeのポリシーおよびガイドラインに従って処置した。

10

20

【0083】

定量および免疫蛍光のためのD - Cy 5 投与

尾静脈注射のために、動物を固定し、その尾を加温して血管拡張を誘発した。3mg/300μLの dendri mer - Cy 5 溶液を、動物1頭当りに投与した。Dendri mer およびデキストランの分布をイメージングするために、2mgのD - Cy 5 および2mgのデキストラン - FITCの300μL中0.9%NaCl溶液を用いて、3頭の動物を共注射した。

【0084】

腫瘍脳での dendri mer の蓄積の動力学を検討するため、腫瘍を接種した27頭のラット内に、平均腫瘍サイズが直径6mmになった際に、D - Cy 5 を注射し、次いで、定時点 (15分、1時間、4時間、8時間、24時間、および48時間) で動物を屠殺した。磁気共鳴イメージングを使用して、頭蓋内の腫瘍サイズを測定した。心臓穿刺を通じて血液を抜き取り、直ちに遠心分離して血漿を収集した。脳を採取し、蛍光分光分析ベースの定量のためにドライアイス上で急速冷凍するか、または免疫蛍光のために4%ホルマリン溶液中に置いた。

30

【0085】

Dendri mer の細胞取込みを検討するため、腫瘍を接種した3頭のラットおよび正常な3頭のラットに、D - Cy 5 注射を実施し、注射から24時間後に動物を屠殺した。脳を採取し、免疫蛍光研究のために4%ホルマリン中に置いた。

【0086】

血漿および全身の器官での dendri mer の薬物動態および生体内分布を検討するため、尿収集用の代謝ケージに置いた15頭の腫瘍接種ラットに、D - Cy 5 を注射し、続いて、定時点 (15分、1時間、4時間、8時間、24時間、および48時間) で動物を安楽死させた。器官を採取し、蛍光分光分析ベースの定量のためにドライアイス上で急速冷凍するか、または免疫蛍光のために4%ホルマリン中に置いた。

40

【0087】

蛍光分光分析

D - Cy 5 コンジュゲートの蛍光ベースの定量は、Lesniak、Mol Pharm.、2013年12月2日、10巻 (12号) : 4560~71頁のプロトコールに準じた。簡単に述べれば、ホモジナイザー (Tissue Lysers LT、Giagen

50

)を使用して、2 mLのDNA LoBindエッペンドルフチューブ中で、100~150 mgの凍結組織を1 mLのメタノール中でホモジナイズし、続いて超音波破碎した。懸濁物を100 mg/mLに希釈して、15,000 rpm、4 で15分間、遠心分離した。得られた上清を蛍光分光分析に供した。重要なことに、以前の研究では、D-Cy5が血漿中で安定であり、コンジュゲートされたCy5を認めうるほど放出することなく、無傷の組織から回収することができたことが示されていた。

【0088】

脳組織については、腫瘍の正確な解剖を実施し、腫瘍周囲の領域を、腫瘍の解剖平面から最長1 mmまで離れたものと規定した。対側半球では、周囲の白質領域と共に100 mgの尾状核/被殻を解剖して、解析に使用した。血漿および尿の試料については、100 μ Lの血漿および尿の試料を900 μ Lのリン酸緩衝液(0.1 M)と混合して、蛍光分光分析によって解析した。

10

【0089】

D-Cy5コンジュゲートおよび組織抽出物から得たものの蛍光スペクトルを、Shimadzu RF-5301分光蛍光光度計(京都、日本)を使用して記録した。D-Cy5の較正曲線を各実験後に構築し、この構築では、異なるスリット幅の下で、645 nmの励起波長を用いて650 nmから720 nmまでのスペクトルを記録した後、662 nmの最大発光波長を使用した。D-Cy5の濃度をメタノールまたはリン酸緩衝液(0.1 M)中、1 ng/mLから100 μ g/mLまでの範囲の溶液で測定した。異なる試料セットの観察された蛍光レベルに基づき、スリット幅を選択した。低レベルのD-Cy5を有する生体試料(すなわち脳、肺、心臓)には、励起および発光スリット幅を10に設定し、高レベルのD-Cy5を有する生体試料(すなわち尿および腎臓)には、励起および発光スリット幅を3に設定した。残りの生体試料には、励起スリット幅5および発光スリット幅10を使用した。全ての較正曲線が、 R^2 約0.99を伴う直線性を示した。組織の自己蛍光の原因を説明するために、D-Cy5を注射しない健康なラットおよび腫瘍を接種したラットの組織により記録された蛍光を、D-Cy5を注射した組織の試料により観察された値から差し引いた。

20

【0090】

脳でのD-Cy5コンジュゲートの濃度を、組織g当たりの μ gで表した。他の器官でのD-Cy5コンジュゲートの濃度を、組織g当たりの注射用量の百分率(%)で、または器官に対する注射用量の%で表した。尿および血液中のD-Cy5コンジュゲートの濃度を、mL当たりの注射用量の%、または尿もしくは血漿の総量中の注射用量の%で表した。総血漿濃度を、動物の重さに基づいて計算した(J. Nucl. Med., 1985年、26巻、72~6頁)。脳および血漿の定量データを解析して、曲線下面積(AUC)と、血清に対する脳の比率とを計算した。

30

【0091】

脳腫瘍での浸透定数(K_{in})および分布の初期体積(V_i)を計算した(Nanomedicine(Lond)、2013年、9巻、111~21頁; J. Cereb. Blood Flow Metab., 1983年、3巻、8~32頁)。血清に対する脳の比率と、血清濃度(血清(t))に対する血清の曲線下面積($AUC_{(血清)}(t)$)とを、各時点について計算し、以下の式に基づいて K_{in} および V_i を得るために線形回帰分析を実施した。

40

【化1】

$$\frac{\text{脳}(t)}{\text{血清}(t)} = K_{in} \frac{AUC_{\text{血清}}(t)}{\text{血清}(t)} + V_i$$

【0092】

脳の3つ全ての領域について、多時点回帰分析(multiple time-point regression analysis)は、それぞれ対側半球、腫瘍周囲、および腫瘍領域に関して0.98、0.99、および0.96に等しい R^2 を有した、良好

50

な直線性を示した(図3A)。

【0093】

免疫蛍光

新鮮に採取した組織を、4%ホルマリンで24時間固定した後、凍結切削の前にスクロース溶液の勾配に供した。次いで、Leica CM1905クライオスタットを使用して、組織を横方向に30 μ m厚の切片とした。DAPI(核)、ミクログリア/マクrophageに対するウサギ抗Iba1抗体、およびヤギ抗-ウサギ595二次抗体を用いて、切片を染色した。いくつかの切片は、内皮細胞染色用のイソレクチンで染色した。次いで、共焦点LSM710顕微鏡(Carl Zeiss;ハートフォードシャー、イギリス)を使用して、5x、20x、40x、および63xの倍率下で切片をイメージングした。腫瘍を接種した脳の各切片については、画像を腫瘍、腫瘍境界、および対側半球について取得した。対照(非腫瘍)脳については、1~3枚の代表的な画像を取得した。注射されていない対照ラット脳に基づき、バックグラウンドの蛍光を避けるように、設定を最適化した。レーザー出力、ピンホール、ゲイン、オフセット、およびデジタルゲインを、各倍率について別々に選択し、全ての試験を通じて一定に保った。

10

【0094】

ソフトウェア

画像処理にはZenソフトウェアを使用し、明るさおよびコントラストのあらゆる補正を、同じ拡大画像を通じて一定に保った。Cy5チャンネル上では、補正を行わなかった。細胞の計数、共同在、およびミクログリアの体積に対する表面の比率の測定には、Imarisソフトウェアを使用した。Microsoft Excel 2010およびKaleidaGraph 4.0を、薬物動態試験に関連する全ての計算、曲線フィッティング、および図のプロットに使用した。

20

【0095】

細胞の計数および共同在

ミクログリア/マクrophageの細胞の計数のため、20x、13x13タイルの走査画像を解析し、領域当たり3~5枚の切片を解析した。機能「spots」を使用して、Iba1+ミクログリア/マクrophageを特定した。4.15 μ mの直径の閾値を設定して、ミクログリア細胞よりも小さな物体を排除し、「Quality」解析に基づく26.801の強度の閾値を設定して、バックグラウンドのシグナルを排除した。

30

【0096】

共同在を検討するため、40x、4x4タイルの走査画像を使用し、領域当たり3~5枚のスライドを解析した。機能「spots」を使用して、DAPI+核、Iba1+ミクログリア/マクrophage、およびD-Cy5+細胞を特定した。D-Cy5取込みのある細胞については、D-Cy5およびDAPIを有したスポットの共同在を計数し、D-Cy5取込みのあるミクログリア細胞については、DAPI、抗Iba1およびD-Cy5の共同在を有したスポットを計数した。推定された直径を適用して、細胞よりも小さなサイズのスポットを排除し、「Quality」解析に基づきシグナルの閾値を適用した。D-Cy5シグナルおよび細胞シグナルが、互いに隣り合って10 μ m以内にあるスポットを計数することによって、機能co-localize spotsを使用した。

40

【0097】

ミクログリア細胞の体積に対する表面積の比率の解析のために、ミクログリアの形態の3D表現を、共焦点顕微鏡で40xの倍率を使用し、3x3タイルの走査を用いて、zスタックにてz方向に10 μ m延伸させて取得した。機能「surfaces」を使用して、個々のIba1+ミクログリア/マクrophageを、各細胞の表面および体積について解析した。腫瘍領域、同側(非腫瘍領域)、対側領域、および非腫瘍脳を解析し、およそ150個の細胞を各領域に含めた。閾値の設定は、細胞の直径に基づいた(Nat. Neurosci., 2009年、12巻、872~8頁)。

【0098】

統計解析

50

データの統計解析は、スチューデントの t 検定および一元配置 ANOVA の後、必要に応じて SPSS 18.0 (IBM, Inc.) を用いた Games-Howell 検定によって行った。差は $p < 0.05$ で統計学的に有意であるとみなした。

【0099】

結果

全身に送達された D - Cy 5 の頭蓋内脳腫瘍での薬物動態

図 2 A および 2 B は、腫瘍を保有するげっ歯類の脳の各種領域、すなわち腫瘍、腫瘍周囲、および対側半球における D - Cy 5 の薬物動態解析を示す。48 時間での AUC を別途に列挙し、腫瘍と対側半球との間に大きな差があることを示した。蛍光共焦点顕微鏡に基づくと、デンドリマーは、全身投与後 15 分もの早さで、5 mm の腫瘍全体に速やかに蓄積した。

10

【0100】

これに対して、D - Cy 5 の全身投与後、腫瘍を接種したげっ歯類の脳の共焦点顕微鏡画像を使用すると、「健康な」対側半球ではデンドリマーが血管を縁取りし、実質には観察されなかった。画像は、腫瘍内での D - Cy 5 の均一な分布および血管腔内でのデンドリマーの制限を示す。全身投与の 15 分後、デンドリマーは、頭蓋内腫瘍実質の全体を通じて分散した。この分布は、腫瘍実質の不均一性による影響を受けなかった。この時点で、認めうるほどの細胞取込みはなかった。全身へのデンドリマー投与後 4 時間で、腫瘍領域での細胞外の分布が減少したが、これは、Iba1 + 炎症性細胞による取込みの増加に伴うものだった。対側半球は、全ての時点で比較的最小限の D - Cy 5 蛍光を示した。

20

【0101】

脳でのデンドリマーの蓄積の動態を評価するために、最近開発された D - Cy 5 用の蛍光ベースの準定量的な方法を使用した。近 IR の Cy 5 の波長を使用することで、組織の自己蛍光の問題が克服される。この方法の高い感度 ($0.1 \text{ ng} / \text{組織 g}$) によって、特異的な解剖学的位置でのデンドリマーの蓄積を検出することが可能になる。共焦点顕微鏡の結果に従えば、デンドリマーは、腫瘍および腫瘍周囲の領域に速やかに蓄積し、8 時間でピーク濃度を生じた。図 3 A を参照されたい。デンドリマーは、最初の全身注射から 48 時間後に、腫瘍から約 $0.01 \mu\text{g} / \text{g} / \text{時間}$ の速さで、および腫瘍周囲の領域から約 $0.007 \mu\text{g} / \text{g} / \text{時間}$ の速さで、徐々に取り除かれ、 $0.2 \mu\text{g} / \text{組織 g}$ の濃度に達した。対側半球では、また、デンドリマーの蓄積が 8 時間で、腫瘍領域で見出されたものの約 $1/8$ の濃度でピークに達した。24 時間では、痕跡量のデンドリマー ($0.03 \mu\text{g} / \text{g}$) を対側半球に検出され得、腫瘍では約 14 倍高い蓄積が観察された。48 時間では、AUC が、対側半球に比べて腫瘍領域で 10 倍高く、このことは、腫瘍に対するデンドリマーの曝露全体が有意に ($p < 0.05$) 高かったことを示す。腫瘍および腫瘍周囲の領域でデンドリマーが高くかつ選択的に保持されたことは、デンドリマーの投与の 24 時間後に星状膠細胞について染色した低倍率の腫瘍の画像で可視化された。

30

【0102】

脈管構造および BBTB の破綻の量は、腫瘍コアと、薬物の蓄積に重要な役割を担うことがある腫瘍境界との間で、大きく異なることが実証されている。そのため、腫瘍と腫瘍周囲の領域との間での脈管構造の違いと、したがってそれらの間での灌流を調べるために、血管内皮細胞を染色した。予想通り、腫瘍周囲の領域および腫瘍境界は、腫瘍コアよりも劇的に稠密な脈管構造を示した。しかし、デンドリマーの分布は、腫瘍において一様であるようであった。

40

【0103】

腫瘍でのデンドリマーの貫通の動態をさらに理解するために、腫瘍、腫瘍周囲の領域、および対側半球における浸透定数 (K_{in}) および分布の初期体積 (V_i) を計算した。図 3 B を参照されたい。 K_{in} は、血液から脳へのデンドリマーの流入を表し、腫瘍および腫瘍周囲の領域では、対側半球に比べて 10 倍高く、このことは、デンドリマーの貫通の増加、および腫瘍組織の浸透性と灌流の増加を示している。 V_i は、血漿との急速平衡における脳コンパートメントの体積を示し、腫瘍と腫瘍周囲の領域との間で有意に異なっ

50

ていたが、このことは、腫瘍コアにおいてさらに大きな体積での急速平衡があることを示す。腫瘍異種移植片では、低酸素の腫瘍コアは、腫瘍境界に比べて血管の浸透性を増加し、神経膠芽腫で特異的に、腫瘍コアと腫瘍周囲の領域との間でBBTBの形態の明白な差異が示されており、これらは、腫瘍周囲の領域とは対照的に、腫瘍コアで速やかな分布に寄与し得る。

【0104】

D - Cy 5 の生体内分布：頭蓋内脳腫瘍のイメージングベースの試験

腫瘍および腫瘍周囲の領域での dendrimer の分布を検討するために、D - Cy 5 を、dendrimer のおよそ 2 倍のサイズを有する直鎖デキストラン - FITC (70 kDa、半径約 6.5 nm) と共注射した。DAPI 陽性の核の密度の増加に基づき、腫瘍を明確に特定した。図 4 A および 4 B を参照されたい。各時点で、腫瘍領域全体を通じて均一に分布された dendrimer と、シグナルの著しい減少とが、注射の 24 時間後に観察された。図 5 を参照されたい。それに対し、FITC チャンネルでのバックグラウンドシグナルを見るために、レーザー出力およびゲイン設定を増加させた時でさえ、デキストラン - FITC 由来のシグナルは、腫瘍境界の周囲に観察されたにすぎず、腫瘍コアにはなかった。さらに高い倍率の画像では、dendrimer が速やかに分布し、細胞外マトリックス (ECM) を描出することが示され、分布の細網パターンと細胞での緩やかな蓄積とを生じた。一方、デキストランは、細胞外マトリックスにわたって制限された分布を示したが、注射の 15 分後に血管腔に高いシグナルが見ることができた。のちの時点で、制限された量のデキストランが組織で保持されたが、これは、おそらくは細胞取込みが低いことに起因する。

10

20

【0105】

腫瘍に関連するミクログリア / マクロファージおよび細胞の dendrimer 取込みの特徴付け

神経膠腫は、ミクログリア / マクロファージの動員および増殖を促進する化学誘引物質および成長因子を生成する。ヒト神経膠芽腫では、細胞の 30% までが、腫瘍に関連するマクロファージである可能性がある。9L 腫瘍モデルの各種の解剖学的位置におけるミクログリアの分布を決定したが、これにより、この腫瘍モデル中の TAM の濃度が、ヒトの神経膠芽腫に見られるものと同等であることが示唆された。mm² 当たりのミクログリア集団は、対側半球に比べて腫瘍内で 9 倍高く、対側半球に比べて同側半球の健康な脳組織で 2.5 倍高かった。

30

【0106】

TAM は、腫瘍微小環境中で再プログラミングされ、交互になった免疫抑制性の M2 表現型を導く。しかし、多くの研究が、神経膠腫で TAM の貪食活性が持続されることを示唆している。TAM の貪食活性は、ナノ粒子の取込みに鍵となる役割を果たすことが示唆されている。ミクログリア / マクロファージが休止期から活性化形態へと変化する際に、それらの形態は、分枝状から、貪食活性の増加を表すアメーバ状へと改変される。9L 腫瘍モデルにおける TAM の形態を評価するために、各種の解剖学的位置における免疫細胞集団 (Iba1+) の体積に対する表面積の比率を特徴付けた。体積に対する表面積の比率 (S 対 V 比) を、ミクログリアの活性化の「尺度」と考える。結果は、腫瘍内および腫瘍の周囲のミクログリア / マクロファージが、対側半球および健康な脳の免疫細胞に比較して、有意に ($p < 0.001$) 低い S 対 V 比を有したことを示す。腫瘍に関連するミクログリアについての平均 S 対 V 比は、1 よりも低く、これはそれらのアメーバ状態および貪食活性を示す。腫瘍、同側半球および対側半球における mm² 面積当たりの Iba1+ ミクログリア / マクロファージ集団の画像ベースの細胞の計数値。健康な脳、腫瘍を接種した脳の対側半球および同側半球、ならびに腫瘍組織におけるミクログリア / マクロファージの活性化および貪食活性の指標としての、ミクログリア細胞の体積に対する表面積の比率の画像ベースの測定。1+ 細胞の D - Cy 5 と Iba1+ TAM との共局在、および D - Cy 5 と DAPI+ 細胞との共局在。結果を、総 DAPI+ 細胞集団のパーセントとして表す。ミクログリア取込みと細胞取込みとの間に、統計学的有意性はなかった。統計

40

50

* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$ 統計解析は、3～5枚の異なる切片に基づく。図4 Aおよび4 Bを参照されたい。

【0107】

Iba1 + ミクログリア / マクロファージ細胞におけるD - Cy5の局在を、次いで計算した。全身投与後24時間で、 dendritin は、Iba1 + TAMに局在した。Iba1 + ミクログリア / マクロファージを計算すると、総腫瘍細胞集団の38%を構成していた(図5)。共同在によって、TAM集団のおよそ半分が、 dendritin を取り込んだこと、および dendritin 陽性細胞の総集団が、 dendritin 陽性Iba1 + ミクログリア / マクロファージの集団とは定量的に差がなかったことが示された。したがって、 dendritin は、腫瘍に関連するマクロファージによってほぼ排他的に、腫瘍組織内に取り込まれたのに対して、腫瘍領域内の他の細胞は、測定可能な dendritin の取込みがなかった。腫瘍境界(DAPI染色に基づき腫瘍端から1mm)では、 dendritin 陽性のミクログリア / マクロファージが、実質的に低減し、このことは、腫瘍コアと腫瘍境界との間の生物学的な過程の差を反映している。 dendritin は、同側の非腫瘍領域にも対側半球にも存在しなかった。

10

【0108】

投与後24時間のD - Cy5の細胞局在解析を、Iba1 + 細胞のD - Cy5とIba1 + TAMとの共同在、およびD - Cy5とDAPI + 細胞との共同在の画像ベースの測定を使用して実施した。結果を、総DAPI + 細胞集団のパーセントとして表す。ミクログリア取込みと細胞取込みとの間に、統計学的有意性はない。9L神経膠肉腫を接種した脳の各種の解剖学的位置の高倍率(40x)の蛍光共焦点イメージング。

20

【0109】

D - Cy5の全身生体内分布

24時間の全身投与後、抽出したD - Cy5の蛍光定量では、 dendritin の56%が尿を通じて排出されたのに対し、32%が腎臓に残ったことが示唆された。これは、これと同じ時点で血清レベルが低いこと(0.66%、図6A)とよく相関する。24時間の全身投与後、 dendritin の2.5%のみが、他の主要器官に蓄積された。これらの dendritin の1.5%が肝臓および脾臓に保持され、このことは、細網内皮系(RES)による排除を表す。痕跡量が、脳、肺、および心臓に蓄積した。

30

【0110】

より良く動態を理解するために、血清および主要器官の dendritin 濃度を、時間をわたり測定した(図6B)。腎臓は、24時間まで、選択した全ての時点で蓄積の増加を示した。全身投与から48時間後、腎臓の dendritin の量は、減少し始めた。 dendritin の血清中レベルは、速やかに減少し、全身注射の15分後に注射用量の4%のみが観察された(図8A)。

【0111】

図6Aは、D - Cy5投与の24時間後の9L神経膠肉腫のげっ歯類モデルの主要器官(脳、肝臓、肺、脾臓、心臓、および腎臓)、血清および尿中の、D - Cy5の蛍光ベースの定量を示す。生体内分布を、器官当たりの注射用量のパーセントで表す(挿入されたパネル): 腎臓、尿、および他の器官でのD - Cy5の蓄積。(6B)脾臓、肝臓、腎臓および血清中のD - Cy5の時間依存的な濃度。濃度を、組織g当たりの注射用量のパーセントで表す。(57C)D - Cy5の血漿中薬物動態の蛍光ベースの定量。

40

【0112】

腎の蓄積および分布

腎系で dendritin が高濃度であったため、蓄積部位を評価するために、腎臓での分布の試験を行った。蛍光顕微鏡に基づけば、 dendritin は腎皮質に蓄積した。 dendritin は、管周囲の線維芽細胞を染色する抗GFAP抗体と共同在した。糸球体では、 dendritin の存在が観察されなかった。健康なまたは腫瘍を保有したラットの間で、腎臓を通じたクリアランスについて有意差はなかった。

【0113】

50

まとめおよび結論

悪性の神経膠腫は、最も一般的な原発性脳腫瘍であり、他のどの腫瘍よりも多くの年数の寿命を失わせる原因となる。前臨床および臨床試験中にある多数の従来型の小分子の化学治療薬物が、全身投与後のその低い蓄積と、腫瘍からの速やかなクリアランスのために、疾患の自然歴に強力な影響を与えることができない。

【0114】

48時間で、脳腫瘍での dendritic 蓄積は、対側半球よりも1.1倍高い。この比率は、他の非標的化型のナノ粒子と比べて突出しており、能動的に標的化された磁性ナノ粒子に匹敵する。重要なことに、腫瘍周囲の領域にも高い保持が観察された。神経膠芽腫細胞は、高度に浸潤性であり、無傷の血液脳関門を含む解剖学的な位置に見出すことが可能であった。そのため、腫瘍周囲の領域で高い保持を達成することは、有効な治療ビヒクルの設計のために際立って重要である。短い循環半減期と組み合わせて腫瘍および腫瘍周囲の領域で dendritic を選択的に保持することは、オフターゲット効果を制限しつつ化学治療剤の特異的な送達を可能にする。

10

【0115】

(実施例2：神経膠芽腫を処置するための治療ビヒクルとしての、世代6のヒドロキシル末端 PAMAM dendritic)

材料および方法

材料および方法は、世代4および6の両方のヒドロキシル末端 PAMAM dendritic を利用したことを除いて、実施例1に記載された通りである。

20

【0116】

腫瘍脳での dendritic の蓄積の動力学を検討するため、腫瘍を接種したラット内に、平均腫瘍サイズが直径6mmになった際に、dendritic を注射し、次いで、各種の時点で動物を屠殺した。

【0117】

結果

化学治療剤の有効性は、腫瘍での蓄積量に直接的に関連する。世代4から世代6まで dendritic サイズを増やすことによって、そのζ-電位に有意に影響を与えることなく、その流体力学的径は、約4.3nmから約6.7nmに増えた(表1)。PBS中、pH7.4、室温で動的光散乱法を使用して、流体力学的径(サイズ)および表面電荷(ζ-電位)を測定した。分子量は、供給業者によって提供されたものである。

30

【表1】

表1: 世代4(G4-OH)および世代6(G6-OH)のヒドロキシル末端 dendritic の生理学的特性

dendritic MW(kDa) サイズ+SEM(nm) ζ-電位+SEM(mV)

G4-OH	14.1	4.3 ± 0.2	+4.5 ± 0.1
G6-OH	58.0	6.7 ± 0.1	0.25 ± 0.4

【0118】

実施例1は、G4 dendritic が、9L神経膠肉腫を接種したラットへD-Cy5投与の24時間後に全身投与された際に、選択的にTAMに蓄積することを示す。しかし、サイズの増加によって、G6 dendritic は、腎濾過に起因する速やかなクリアランスを回避し、血中でさらに長く循環することが可能となり、このことで、さらに良好な局在と保持とが可能になった。G6 dendritic は、G4 dendritic よりも高い血清濃度と延長された血清中半減期とを示し、これらは、G6 dendritic の腫瘍へのさらに高い蓄積と標的化に寄与した。

40

【0119】

図7A~7Cは、腫瘍を保有した脳でのG6とG4 dendritic との間の蓄積(dendritic μg / 脳組織g)を時間の関数として比較した(図7A)グラフである。腫瘍/腫

50

瘍周囲の G 4 デンドリマーの蓄積は、注射後 8 時間頃にピークとなり、徐々に減少し、一方、腫瘍 / 腫瘍周囲の G 6 デンドリマーの濃度は、継続して増加した。48 時間で、G 6 の濃度は、腫瘍中の G 4 デンドリマー濃度のほぼ 100 倍になった。G 6 デンドリマーを示す曲線下面積 (AUC) プロット (図 7 B) は、48 時間以内に、G 6 デンドリマーのほぼ 100 倍の脳腫瘍曝露を有する。

【0120】

脳のデンドリマー濃度を血清中のデンドリマー濃度によって正規化した際に、血清に対する脳の比率は、脳標的化能力の指標である。G 6 デンドリマーは、全ての時点で、G 4 デンドリマーよりも高い腫瘍標的化能力を示した (図 6 C)。デンドリマー濃度を、血清ミリリットル当たりの総注射用量の百分率として示した。G 4 デンドリマーでは、腎臓は、最も多くのデンドリマーの蓄積 (20% ~ 30%) を有し、各種時点で肝臓および脾臓でのデンドリマーの蓄積 (約 0.3%) よりも有意に高かった。G 6 デンドリマーでは、サイズの増加によって、腎濾過および腎臓への蓄積が大きく減少した。G 6 デンドリマーの腎臓濃度は、G 4 デンドリマーの 1/10 未満であり (約 1%)、48 時間から開始する腎臓からのクリアランスの証拠を示し始めた。G 6 デンドリマーの肝臓への蓄積は、G 4 デンドリマーと同様であったが、一方で、脾臓は、約 5 倍高い蓄積を示し、これは単球による取込みが増加したことに起因する可能性がある。この高い血清中濃度は、G 6 デンドリマーが血液 - 脳腫瘍関門を横断して拡散し、G 4 デンドリマーに比べて 100 倍高い濃度と AUC で腫瘍に蓄積 (48 時間で) (図 7 B) しながら、より良好に腫瘍を標的化する推進力をもたらす。

10

20

【0121】

高頻度での神経膠芽腫の再発は、侵襲性の高い処置を生き残る個々の細胞から生じる。この理由から、どんな治療ビヒクルでもあらゆる腫瘍細胞に行き届くことを可能にすることが重要である。最近のナノ技術分野の研究は、有効性のための必要条件として、腫瘍組織全体にわたりナノ粒子が効率よく分布されることの重要性を示している。これらの研究の多くは、10 ~ 50 nm の間のサイズ域を有するナノ粒子が、腫瘍内へ投与された際に、固形腫瘍を通じて一様に分布することができたことを明らかにした。100 nm 未満のサイズを有する大きなナノ粒子であるほど、腫瘍ベッド (tumor bed) 全体に均一に分布する可能性が低くなるが、これは、線維性組織には、血管が存在せず、がん細胞巢の間で中に織り混ざって、分子の均一な分布に対する拡散障壁を形成するからである。しかし、ナノ粒子が均一に分布するには、それらが何ら妨害されることなく脈管構造から一様に血管外遊出することも必要とされる。頭蓋腫瘍の穿孔および孔のサイズが皮下腫瘍に比較してさらに小さいことを考慮すると、神経膠芽腫の場合、この要件によって、サイズのカットオフの上限が 10 nm にさらに減少する。BBTB を通じた妨害のない拡散は、7 nm の分子を用いて達成されている。

30

40

【0122】

電荷密度はまた、ナノ粒子の貫通にも影響を与える。ナノ粒子は、静電的に派生した結合部位の障壁効果を防止するために、強力な陽イオン性ではなく、中性または僅かに正の電荷を維持することが重要である。その結果、4.3 nm の流体力学的径と中性の表面電荷を有した G 4 の OH の PAMAM デンドリマーは、15 分で脈管間の空間を通じて速やかに分布し、5 mm の腫瘍全体を均一に網羅することができる。世代を G 6 に増加させることは、デンドリマーが脳腫瘍で均一に分布する能力を保持するだけではなく、デンドリマーが腫瘍実質から速やかに取り除かれるのを防止する。

【0123】

G 4 および G 6 デンドリマーを、腫瘍保有ラット内に、尾静脈を通じて静脈内共注射した。脳を固定化し、軸方向に凍結切削した。図 8 A および 8 B を参照されたい。図 8 A および 8 B は、血清および主要器官：腎臓、肝臓、脾臓中の G 4 および G 6 デンドリマーの濃度を時間の関数として示すグラフである。図 8 A は、G 6 デンドリマーが G 4 デンドリマーよりも高い血清中濃度と、延長された血清中半減期とを示し、これらが G 6 デンドリマーの腫瘍へのさらに高い蓄積と標的化に寄与したことを示す。デンドリマー濃度は、血

50

清ミリリットル当たりの総注射用量の百分率として提示された。G 6 デンドリマーの肝臓への蓄積は、G 4 デンドリマーと同様であったが、一方で、脾臓は、約 5 倍高い蓄積を示し、これは単球による取込みが増加したことに起因する可能性がある。

【0124】

G 4 デンドリマーは、G 6 デンドリマーよりも早い排出速度を有していた。図 8 B は、G 4 デンドリマーでは、腎臓が、最も多くのデンドリマー蓄積（20%～30%）を有し、各種時点で肝臓および脾臓中のデンドリマーの蓄積（約 0.3%）よりも有意に高かったことを示した。G 6 デンドリマーでは、サイズの増加によって、腎濾過および腎臓への蓄積が大きく減少した。G 6 デンドリマーの腎臓中濃度は、G 4 デンドリマー（約 1%）の 1/10 未満であり、48 時間から開始される腎臓からのクリアランスを示し始めた。G 4 デンドリマーでは、血管から腫瘍組織への排出は、i.v. 注射後直ちに（約 15 分）開始し、続いて 8 時間後に腫瘍からのクリアランスがあった。注射の 24 時間後、G 4 デンドリマーは、細胞に保持された。G 6 デンドリマーでは、腫瘍組織でのデンドリマーの存在は、投与後直ちには観察されなかった。G 6 デンドリマーの濃度は、観察期間全体で徐々に増加した。投与後 48 時間で、G 6 デンドリマーは、腫瘍および腫瘍周囲の領域で最も高い濃度を示した。腫瘍細胞の遊走先端を含む神経膠芽腫でそれらが均一に分布すること、および腫瘍で少なくとも 48 時間にわたってそれらが保持されることから、本デンドリマーは治療剤を効率よく送達する場合に望ましいことが確認された。

10

【0125】

全身投与時の腫瘍ベッド中にわたる均一な分布に加えて、デンドリマーはまた、正常神経組織への神経膠腫細胞の脈管周囲および神経周囲侵入が深くかつ活動的に生じている腫瘍周囲の領域に、蓄積することができる。様々な技術が、腫瘍周囲の領域の標的化のために適用されている（例えば、GFAP 特異的なモノクローナル抗体を使用してナノ粒子の表面特性を改変すること、および磁界を使用して磁性ナノ粒子の蓄積を誘導すること）。デンドリマーについては、何ら改変または標的化リガンドの追加を行うことなく、腫瘍周囲の領域の曲線下面積（AUC）は、腫瘍領域のその 60% に達し、このことは、デンドリマーが本質的に腫瘍周囲の領域を標的化する能力を示している。

20

【0126】

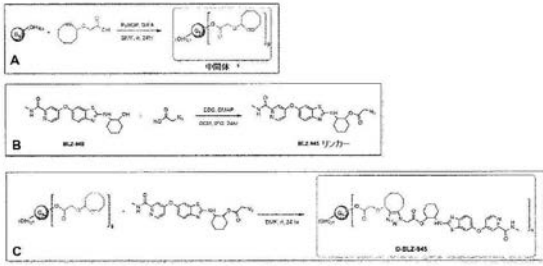
最後に、デンドリマーは、神経炎症性細胞を標的化し、大部分がかつ排他的に TAM に局在し、一方、非腫瘍領域の休止期の分枝状ミクログリアは、デンドリマーを取り込まない。デンドリマーが細網内皮系で低い蓄積量で TAM に特異的に蓄積すること、および循環から速やかにクリアランスされることは、TAM を標的化する抗神経膠腫治療の送達について固有の利点をもたらす。

30

【0127】

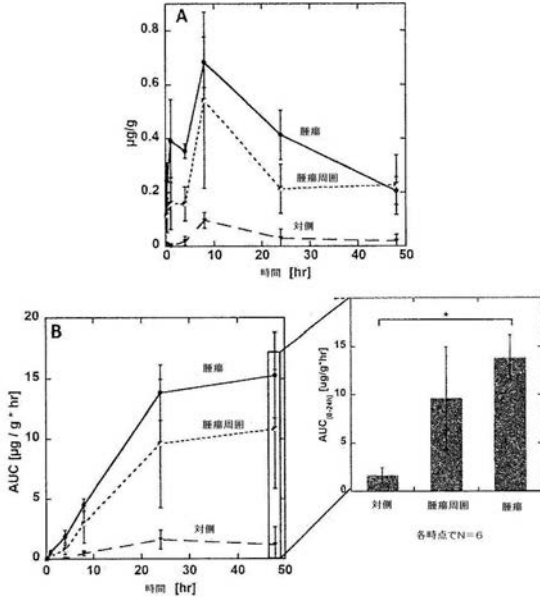
本明細書に記載の方法および材料の改変および変形は、当業者に明らかになるものであり、特許請求の範囲によって包含されることを意図するものである。

【 図 1 】



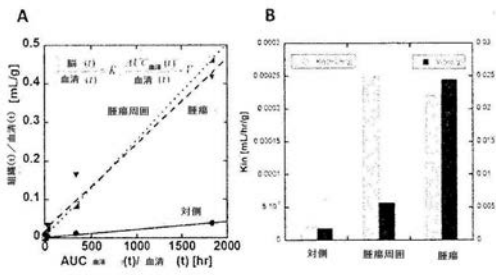
FIGs. 1A-1C

【 図 2 】



FIGs. 2A-2B

【 図 3 】



FIGs. 3A-3B

【 図 4 】

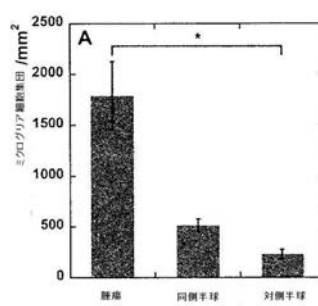


FIG. 4A

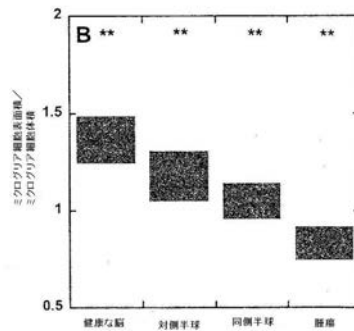


FIG. 4B

【 図 5 】

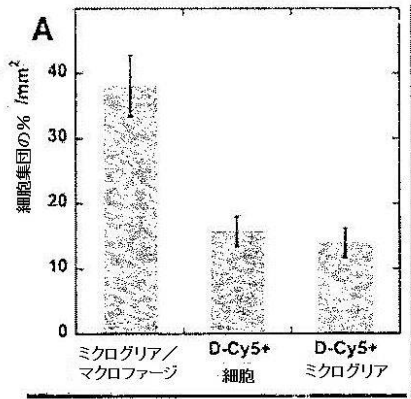
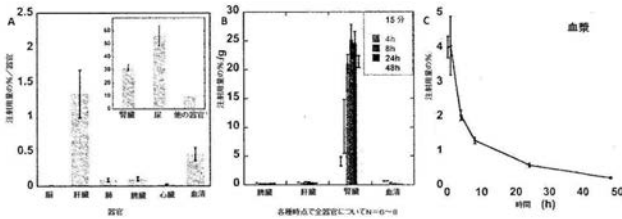


FIG. 5

【 図 6 】



FIGs. 6A-6C

【 図 7 】

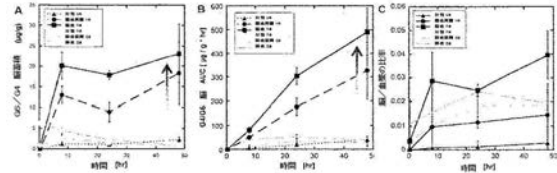
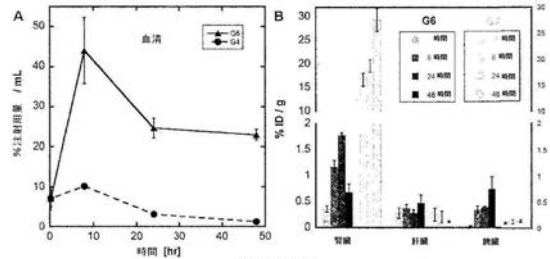


FIG. 7A-7C

【 図 8 】



FIGs. 8A-8B

【 配 列 表 】

2017524714000001.app

【 手 続 補 正 書 】

【 提 出 日 】 平 成 29 年 3 月 29 日 (2017.3.29)

【 手 続 補 正 1 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 特 許 請 求 の 範 囲

【 補 正 対 象 項 目 名 】 全 文

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 特 許 請 求 の 範 囲 】

【 請 求 項 1 】

被験体の増殖性疾患を処置するための、少なくとも1つの治療薬剤、予防薬剤、または診断薬剤と共有結合的に連結しているかまたは複合体形成しているポリ(アミドアミン)(PAMAM)ヒドロキシル末端 dendrimer を含む組成物であって、前記被験体の前記増殖性疾患の1つもしくは複数の症状を抑制もしくは阻害するか、または前記増殖性疾患をイメージングするのに有効な量で、前記組成物が前記被験体に全身投与されることを特徴とする、組成物。

【 請 求 項 2 】

前記 dendrimer が、少なくとも1つの治療薬剤に共有結合的に連結している、世代4~10のポリ(アミドアミン)(PAMAM)ヒドロキシル末端 dendrimer である、請求項1に記載の組成物。

【 請 求 項 3 】

前記 PAMAM dendrimer が、世代6の PAMAM dendrimer である、請求項1に記載の組成物。

【 請 求 項 4 】

前記 dendriマーが、第 1 の治療薬剤と、治療薬剤、予防薬剤、および診断薬剤からなる群より選択される第 2 の薬剤とにコンジュゲートしている、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 5】

前記 dendriマーが、2 つの治療薬剤にコンジュゲートしている、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記 dendriマーが、化学治療薬剤および抗炎症薬剤および / または抗興奮毒性薬剤にコンジュゲートしている、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 7】

dendriマー複合体が、ミクログリアおよび星状膠細胞に局在し、これらを標的化するための治療的に活性な薬剤を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 8】

前記増殖性疾患が、前記被験体の脳にある、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 9】

治療薬剤にコンジュゲートしている前記 dendriマーが、増殖性障害を軽減するのに有効な量の単位投薬量にある、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 10】

前記薬剤が、ペプチド、タンパク質、炭水化物、ヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド、小分子、およびそれらの組合せからなる群より選択される、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 11】

前記薬剤が、アルキル化薬剤、血管新生阻害剤、腫瘍免疫応答の調節剤、アロマトラーゼ阻害剤、代謝拮抗物質、アントラサイクリン、抗腫瘍抗生物質、白金化合物、トポイソメラーゼ阻害剤、放射性同位体、放射線増感薬剤、チェックポイント阻害剤、PD1 阻害剤、APR キナーゼ阻害剤、植物アルカロイド、糖分解阻害剤、およびそれらのプロドラッグからなる化学治療薬剤の群より選択される、請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 12】

前記薬剤が、タキソール、例えば、パクリタキセル、BCNU、カンプトテシン、ドキシサイクリン、シスプラチン、ならびにそれらの誘導体、類似体およびプロドラッグからなる化学治療薬剤の群より選択される、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記 dendriマーと複合体形成しているかまたは前記 dendriマーにコンジュゲートしている少なくとも 1 つの薬剤が、腫瘍の 1 つまたは複数の症状を軽減し、抗炎症薬剤、抗興奮毒性薬剤、免疫抑制薬剤、抗血管新生薬剤、および抗感染薬剤からなる群より選択される薬剤である、請求項 1 ~ 12 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 14】

前記抗炎症薬剤が、ステロイド系抗炎症剤、非ステロイド系抗炎症薬剤、金化合物抗炎症薬剤、免疫抑制薬剤、サリチル酸系抗炎症薬剤、ラニビズマブ、ミノサイクリン、およびラパマイシンからなる群より選択される、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 15】

前記腫瘍の 1 つまたは複数の症状を軽減する前記薬剤が、抗興奮毒性薬剤としての活性を有する薬剤であり、パルプロ酸、D - アミノホスホノバレレート、D - アミノホスホノヘプタノエート、グルタメート形成 / 放出の阻害剤、NMDA 受容体アンタゴニストからなる群より選択され、投与することもできる、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 16】

常磁性分子、蛍光化合物、磁性分子、放射性核種、x 線イメージング剤、造影剤、蛍光色素、近赤外色素、SPECT イメージング剤、PET イメージング剤、および放射性同位体からなる群より選択される診断薬剤を含み、前記組成物を個体に投与して、前記個体

の前記増殖性障害に関する情報を診断する、請求項 1 ~ 15 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 17】

前記色素が、カルボシアニン、インドカルボシアニン、オキサカルボシアニン、ツイカルボシアニンおよびメロシアニン、ポリメチン、クマリン、ローダミン、キサンテン、フルオレセイン、ホウ素 - ジピロメタン (BODIPY)、Cy5、Cy5.5、Cy7、VivoTag - 680、VivoTag - S680、VivoTag - S750、AlexaFluor660、AlexaFluor680、AlexaFluor700、AlexaFluor750、AlexaFluor790、Dy677、Dy676、Dy682、Dy752、Dy780、DyLight547、DyLight647、HiLyte Fluor647、HiLyte Fluor680、HiLyte Fluor750、IRDye800CW、IRDye800RS、IRDye700DX、ADS780WS、ADS830WS、およびADS832WSからなる群より選択される、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 18】

前記SPECTイメージング剤または前記PETイメージング剤が、ジエチレントリアミンペンタ酢酸(DTPA)、1,4,7,10-テトラ-アザシクロドデカン-1,4,7,10-テトラ酢酸(DOTA)、ジアミンジチオール、活性化メルカプトアセチル-グリシル-グリシル-グリシン(MAG3)、およびヒドラジノニコチンアミド(HYNIC)を含むキレート剤である、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 19】

前記放射性同位体が、Tc-94m、Tc-99m、In-111、Ga-67、Ga-68、Gd³⁺、Y-86、Y-90、Lu-177、Re-186、Re-188、Cu-64、Cu-67、Co-55、Co-57、F-18、Sc-47、Ac-225、Bi-213、Bi-212、Pb-212、Sm-153、Ho-166、およびDy-166からなる群より選択される、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 20】

前記 dendrimer が、標的化部分と複合体形成しているかまたは標的化部分にコンジュゲートしている、請求項 1 ~ 19 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 21】

放射線照射治療を受けている被験体の増殖性疾患を処置するための請求項 1 ~ 20 のいずれかに記載の組成物であって、前記組成物が少なくとも1つの放射線増感薬剤に共有結合的に連結している dendrimer を含み、前記被験体の前記増殖性疾患においてDDX3の活性を抑制または阻害するのに有効な量で、前記組成物が、前記被験体に全身投与されることを特徴とする、組成物。

【請求項 22】

前記放射線増感薬剤を含む前記組成物が2回またはそれを超える用量で投与され、続いて、電離放射線が前記被験体のがんの位置に近接して前記被験体に投与され、任意選択で、前記放射線増感薬剤を含む前記組成物、続いて前記電離放射線が、2つまたはそれを超えるサイクルにわたり繰り返し投与されることを特徴とする、請求項 21 に記載の組成物。

【請求項 23】

前記電離放射線の線量が、0.1 Gy から約 30 Gy の範囲に、好ましくは 5 Gy から約 25 Gy の範囲にある、請求項 21 から 22 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 24】

前記放射線が、定位焼灼的放射線治療(SABR)または体幹部定位放射線治療(SBR T)である、請求項 21 から 23 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 25】

前記放射線増感薬剤がRX-33である、請求項 21 から 24 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 26】

前記増殖性疾患が固形がんである、請求項 1 ~ 25 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 27】

前記がんが、胞巣状横紋筋肉腫、骨がん、脳がん、乳がん、肛門、肛門管または肛門直腸のがん、眼のがん、肝内胆管のがん、関節のがん、頸部、胆嚢または胸膜のがん、鼻、鼻腔または中耳のがん、口腔のがん、外陰部のがん、結腸がん、食道がん、子宮頸がん、消化管カルチノイド、ホジキンリンパ腫、下咽頭がん、腎臓がん、喉頭がん、肝がん、肺がん、悪性中皮腫、メラノーマ、多発性骨髄腫、上咽頭がん、非ホジキンリンパ腫、卵巣がん、膵がん、腹膜、網、および腸間膜のがん、咽頭がん、前立腺がん、直腸がん、腎がん（例えば腎細胞癌（RCC））、小腸がん、軟組織がん、胃がん、精巣がん、甲状腺がん、尿管がん、および膀胱がんとして生じる、請求項 26 に記載の組成物。

【請求項 28】

前記増殖性疾患が、神経膠腫、神経膠芽腫、星状細胞腫、乏突起神経膠腫、上衣腫、髄膜腫、髄芽腫、神経節腫、シュワン腫、頭蓋咽頭腫、脊索腫および下垂体腫瘍を含む、中枢神経系の新形成、過形成およびがんからなる群より選択される脳がんである、請求項 26 に記載の組成物。

【請求項 29】

前記がんが神経膠腫である、請求項 28 に記載の組成物。

【請求項 30】

デンドリマー組成物が、リポソーム、粒子、懸濁剤、溶体、または乳濁液を用いて製剤化される、請求項 1 ~ 29 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 31】

前記組成物が、毎日、毎週、隔週、毎月、および隔月からなる群より選択される期間で、前記被験体に投与されることを特徴とする、請求項 1 ~ 30 のいずれかに記載の組成物。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0019

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0019】

世代 4 (G4) のデンドリマーは、循環から速やかにクリアランスされるものの、速やかにかつ選択的に蓄積し、腫瘍組織に保持される。蛍光定量および高分解能蛍光顕微鏡に基づけば、デンドリマーは、最初の 8 時間にわたって蓄積し、48 時間では依然として腫瘍に保持される。デンドリマーの世代を 4 から 6 まで増やすことによって、その均一な分布と TAM の標的化に影響を及ぼすことなく、腫瘍でのデンドリマーの蓄積、AUC および保持を約 100 倍、大幅に増やすことができる。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目 1)

被験体の増殖性疾患を処置するための方法であって、少なくとも 1 つの治療薬剤、予防薬剤、または診断薬剤と共有結合的に連結しているかまたは複合体形成しているポリ(アミドアミン)(PAMAM)ヒドロキシル末端デンドリマーを含む組成物を、前記被験体の前記増殖性疾患の 1 つもしくは複数の症状を抑制もしくは阻害するか、または前記増殖性疾患をイメージングするのに有効な量で前記被験体に全身投与することを含む、方法。

(項目 2)

前記デンドリマーが、少なくとも 1 つの治療薬剤に共有結合的に連結している、世代 4 ~ 10 のポリ(アミドアミン)(PAMAM)ヒドロキシル末端デンドリマーである、項目 1 に記載の方法。

(項目 3)

前記 P A M A M デンドリマーが、世代 6 の P A M A M デンドリマーである、項目 1 に記載の方法。

(項目 4)

前記デンドリマーが、第 1 の治療薬剤と、治療薬剤、予防薬剤、および診断薬剤からなる群より選択される第 2 の薬剤とにコンジュゲートしている、項目 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

(項目 5)

前記デンドリマーが、2 つの治療薬剤にコンジュゲートしている、項目 4 に記載の方法。

(項目 6)

前記デンドリマーが、化学治療薬剤および抗炎症薬剤および / または抗興奮毒性薬剤にコンジュゲートしている、項目 5 に記載の方法。

(項目 7)

デンドリマー複合体が、ミクログリアおよび星状膠細胞に局在し、これらを標的化するための治療的に活性な薬剤を含む、項目 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

(項目 8)

前記増殖性疾患が、前記被験体の脳にある、項目 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

(項目 9)

治療薬剤にコンジュゲートしている前記デンドリマーが、増殖性障害を軽減するのに有効な量の単位投薬量にある、項目 1 ~ 8 のいずれかに記載の方法。

(項目 10)

前記薬剤が、ペプチド、タンパク質、炭水化物、ヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド、小分子、およびそれらの組合せからなる群より選択される、項目 1 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

(項目 11)

前記薬剤が、アルキル化薬剤、血管新生阻害剤、腫瘍免疫応答の調節剤、アロマトラーゼ阻害剤、代謝拮抗物質、アントラサイクリン、抗腫瘍抗生物質、白金化合物、トポイソメラーゼ阻害剤、放射性同位体、放射線増感薬剤、チェックポイント阻害剤、PD1 阻害剤、APR キナーゼ阻害剤、植物アルカロイド、糖分解阻害剤、およびそれらのプロドラッグからなる化学治療薬剤の群より選択される、項目 1 ~ 10 のいずれかに記載の方法。

(項目 12)

前記薬剤が、タキソール、例えば、パクリタキセル、BCNU、カンプトテシン、ドキシサイクリン、シスプラチン、ならびにそれらの誘導体、類似体およびプロドラッグからなる化学治療薬剤の群より選択される、項目 11 に記載の方法。

(項目 13)

前記デンドリマーと複合体形成しているかまたは前記デンドリマーにコンジュゲートしている少なくとも 1 つの薬剤が、腫瘍の 1 つまたは複数の症状を軽減し、抗炎症薬剤、抗興奮毒性薬剤、免疫抑制薬剤、抗血管新生薬剤、および抗感染薬剤からなる群より選択される薬剤である、項目 1 ~ 12 のいずれかに記載の方法。

(項目 14)

前記抗炎症薬剤が、ステロイド系抗炎症剤、非ステロイド系抗炎症薬剤、金化合物抗炎症薬剤、免疫抑制薬剤、サリチル酸系抗炎症薬剤、ラニビズマブ、ミノサイクリン、およびラパマイシンからなる群より選択される、項目 13 に記載の方法。

(項目 15)

前記腫瘍の 1 つまたは複数の症状を軽減する前記薬剤が、抗興奮毒性薬剤としての活性を有する薬剤であり、パルプロ酸、D - アミノホスホノバレレート、D - アミノホスホノヘプタノエート、グルタメート形成 / 放出の阻害剤、NMDA 受容体アンタゴニストからなる群より選択され、投与することもできる、項目 14 に記載の方法。

(項目 16)

常磁性分子、蛍光化合物、磁性分子、放射性核種、x 線イメージング剤、造影剤、蛍光

色素、近赤外色素、SPECTイメージング剤、PETイメージング剤、および放射性同位体からなる群より選択される診断薬剤を含み、前記組成物を個体に投与して、前記個体の前記増殖性障害に関する情報を診断する、項目1～15のいずれかに記載の方法。

(項目17)

前記色素が、カルボシアニン、インドカルボシアニン、オキサカルボシアニン、ツイカルボシアニンおよびメロシアニン、ポリメチン、クマリン、ローダミン、キサントン、フルオレセイン、ホウ素-ジピロメタン(BODIPY)、Cy5、Cy5.5、Cy7、VivoTag-680、VivoTag-S680、VivoTag-S750、AlexaFluor660、AlexaFluor680、AlexaFluor700、AlexaFluor750、AlexaFluor790、Dy677、Dy676、Dy682、Dy752、Dy780、DyLight547、DyLight647、HiLyteFluor647、HiLyteFluor680、HiLyteFluor750、IRDye800CW、IRDye800RS、IRDye700DX、ADS780WS、ADS830WS、およびADS832WSからなる群より選択される、項目16に記載の方法。

(項目18)

前記SPECTイメージング剤または前記PETイメージング剤が、ジエチレントリアミンペンタ酢酸(DTPA)、1,4,7,10-テトラ-アザシクロドデカン-1,4,7,10-テトラ酢酸(DOTA)、ジアミンジチオール、活性化メルカプトアセチル-グリシル-グリシル-グリシン(MAG3)、およびヒドラジノニコチンアミド(HYNIC)を含むキレート剤である、項目16に記載の方法。

(項目19)

前記放射性同位体が、Tc-94m、Tc-99m、In-111、Ga-67、Ga-68、Gd³⁺、Y-86、Y-90、Lu-177、Re-186、Re-188、Cu-64、Cu-67、Co-55、Co-57、F-18、Sc-47、Ac-225、Bi-213、Bi-212、Pb-212、Sm-153、Ho-166、およびDy-166からなる群より選択される、項目16に記載の方法。

(項目20)

前記 dendrimer が、標的化部分と複合体形成しているかまたは標的化部分にコンジュゲートしている、項目1～19のいずれかに記載の方法。

(項目21)

放射線照射治療を受けている被験体の増殖性疾患を処置するための項目1～20のいずれかに記載の方法であって、前記被験体の前記増殖性疾患においてDDX3の活性を抑制または阻害するのに有効な量で、少なくとも1つの放射線増感薬剤に共有結合的に連結している dendrimer を、前記被験体に全身投与することを含む、方法。

(項目22)

前記放射線増感薬剤を2回またはそれを超える用量で投与し、続いて、電離放射線を前記被験体のがんの位置に近接して前記被験体に投与し、任意選択で、前記放射線増感薬剤、続いて前記電離放射線の投与を2つまたはそれを超えるサイクルにわたり繰り返す、項目21に記載の方法。

(項目23)

前記電離放射線の線量が、0.1Gyから約30Gyの範囲に、好ましくは5Gyから約25Gyの範囲にある、項目21から22のいずれかに記載の方法。

(項目24)

前記放射線が、定位焼灼的放射線治療(SABR)または体幹部定位放射線治療(SBRRT)である、項目21から23のいずれかに記載の方法。

(項目25)

前記放射線増感薬剤がRX-33である、項目21から24のいずれかに記載の方法。

(項目26)

前記増殖性疾患が固形がんである、項目1～25のいずれかに記載の方法。

(項目27)

前記がんが、胞巣状横紋筋肉腫、骨がん、脳がん、乳がん、肛門、肛門管または肛門直腸のがん、眼のがん、肝内胆管のがん、関節のがん、頸部、胆嚢または胸膜のがん、鼻、鼻腔または中耳のがん、口腔のがん、外陰部のがん、結腸がん、食道がん、子宮頸がん、消化管カルチノイド、ホジキンリンパ腫、下咽頭がん、腎臓がん、喉頭がん、肝がん、肺がん、悪性中皮腫、メラノーマ、多発性骨髄腫、上咽頭がん、非ホジキンリンパ腫、卵巣がん、膵がん、腹膜、網、および腸間膜のがん、咽頭がん、前立腺がん、直腸がん、腎がん(例えば腎細胞癌(RCC))、小腸がん、軟組織がん、胃がん、精巣がん、甲状腺がん、尿管がん、および膀胱がんとして生じる、項目26に記載の方法。

(項目28)

前記増殖性疾患が、神経膠腫、神経膠芽腫、星状細胞腫、乏突起神経膠腫、上衣腫、髄膜腫、髄芽腫、神経節腫、シュワン腫、頭蓋咽頭腫、脊索腫および下垂体腫瘍を含む、中枢神経系の新形成、過形成およびがんからなる群より選択される脳がんである、項目26に記載の方法。

(項目29)

前記がんが神経膠腫である、項目28に記載の方法。

(項目30)

デンドリマー組成物が、リポソーム、粒子、懸濁剤、溶体、または乳濁液を用いて製剤化される、項目1~29のいずれかに記載の方法。

(項目31)

前記組成物が、毎日、毎週、隔週、毎月、および隔月からなる群より選択される期間で、前記被験体に投与される、項目1~30のいずれかに記載の方法。

(項目32)

項目1~31のいずれかに記載の方法における使用のための製剤。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2015/045104

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K47/48 A61K49/00 A61K31/4439 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, WPI Data, EMBASE, INSPEC, COMPENDEX, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/011384 A2 (UNIV MICHIGAN [US]; BAKER JR JAMES R [US]; ZHANG YUEHUA [US]; THOMAS T) 27 January 2011 (2011-01-27)	1-32
Y	page 8, line 33 page 11, lines 12-29 page 29, lines 29-30 page 30, line 11 page 31, lines 2,15-16 page 33, lines 27-29 page 34, lines 11-16 page 35, line 8 page 37, line 29 - page 38, line 2 examples claims figures 1,13,14 ----- -/--	1-32
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> 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 16 November 2015		Date of mailing of the international search report 04/12/2015
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 Villard, Anne-Laure

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2015/045104

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 2009/142754 A1 (GOVERNMENT OF THE UNITED STATES [US]; SARIN HEMANT [US]) 26 November 2009 (2009-11-26) page 26, line 6 - page 27, line 15 examples claims	1-32
Y	----- XIAO-MIN QIAN ET AL: "Synergistic inhibition of human glioma cell line by temozolomide and PAMAM-mediated miR-21i", JOURNAL OF APPLIED POLYMER SCIENCE, vol. 127, no. 1, 5 January 2013 (2013-01-05), pages 570-576, XP002750892, JOHN WILEY & SONS INC. USA ISSN: 0021-8995 the whole document	1-32
X	----- SK UGIR HOSSAIN ET AL: "Comparative study of microtubule inhibitors - Estramustine and natural podophyllotoxin conjugated PAMAM dendrimer on glioma cell prolifera", EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 68, October 2013 (2013-10), pages 47-57, XP028733687, ISSN: 0223-5234, DOI: 10.1016/J.EJMECH.2013.07.007 figure 1 page 56, left-hand column, last paragraph	1-11,20, 26,28-32
X,P	----- FAN ZHANG ET AL: "Uniform brain tumor distribution and tumor associated macrophage targeting of systemically administered dendrimers", BIOMATERIALS, vol. 52, June 2015 (2015-06), pages 507-516, XP002750890, ELSEVIER B.V. NETHERLANDS ISSN: 0142-9612 the whole document	1-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2015/045104

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011011384 A2	27-01-2011	US 2012177593 A1 WO 2011011384 A2	12-07-2012 27-01-2011
WO 2009142754 A1	26-11-2009	NONE	

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 45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
C 0 7 K 5/12 (2006.01)	C 0 7 K	5/12	Z N A
C 0 7 K 7/06 (2006.01)	C 0 7 K	7/06	
C 0 7 K 7/08 (2006.01)	C 0 7 K	7/08	
C 0 7 K 14/00 (2006.01)	C 0 7 K	14/00	
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	C 1 2 N	5/071	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, 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, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74) 代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72) 発明者 マングラヴィティ, アントネラ

アメリカ合衆国 メリーランド 2 1 2 3 1, ボルチモア, オーリンズ ストリート 1 5 5
0 シーアールビー-2 - 2エム4 5

(72) 発明者 マストラコス, パナギオティス

アメリカ合衆国 メリーランド 2 1 2 0 1, ボルチモア, チャールズ プラザ 8

(72) 発明者 ミシュラ, マノジ ケー.

アメリカ合衆国 メリーランド 2 1 0 4 2, エリコット シティ, パイン オーチャード
レーン 3 1 6 7, ナンバー 2 0 2

(72) 発明者 ランガラマヌジャム, カナン

アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 7 7 7, ハイランド, グリーン ホロー ウェイ 6 8
4 0

(72) 発明者 タイラー, ベティ エム.

アメリカ合衆国 メリーランド 2 1 2 3 1, ボルチモア, オーリンズ ストリート 1 5 5
0 シーアールビー-2, 2エム4

(72) 発明者 ザン, ファン

アメリカ合衆国 メリーランド 2 1 2 1 8, ボルチモア, ノース チャールズ ストリート
2 9 0 5, アpartment 1 0 8

F ターム(参考) 4B065 AA93X CA44

4C076 AA95 CC27 CC41 EE26 EE59 FF34

4C084 AA17 MA05 NA13 ZB262

4C085 HH03 HH05 HH07 HH11 KA27 KA28 KA29 KB76 LL18

4H045 AA30 BA13 BA14 BA15 BA16 BA17 EA20 FA20