

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017年8月3日(03.08.2017)



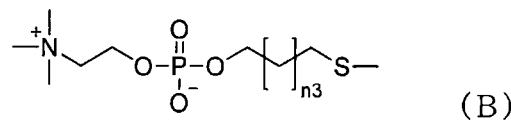
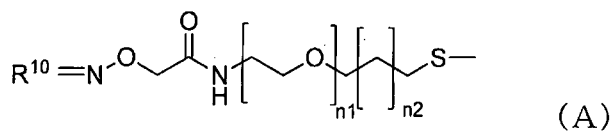
(10) 国際公開番号
WO 2017/131242 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 9/99 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61K 31/7004 (2006.01) *B82Y 5/00* (2011.01)
A61K 45/00 (2006.01) *B82Y 20/00* (2011.01)
A61K 47/24 (2006.01) *B82Y 25/00* (2011.01)
A61K 47/34 (2017.01) *B82Y 30/00* (2011.01)
A61K 47/50 (2017.01) *B82Y 40/00* (2011.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/003880
- (22) 国際出願日: 2017年1月27日(27.01.2017)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2016-015760 2016年1月29日(29.01.2016) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人北海道大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 Hokkaido (JP).
- (72) 発明者: 西村 紳一郎 (NISHIMURA, Shin-Ichiro); 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, 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, KH, KN, KP, KR, KW, 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, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: INTRACELLULAR SUBSTANCE TRANSPORT SYSTEM AND USE THEREOF

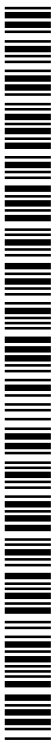
(54) 発明の名称: 細胞内物質移送システムおよびその利用



(57) Abstract: The present invention pertains to a complex including nanoparticles and, carried on the surface of the nanoparticles, a lysosomal enzyme inhibitor or kinase inhibitor shown by general formula (A) and a phospholipid mimetic substance shown by general formula (B). In general formula (A), n1 is an integer of 2-30, n2 is an integer of 2-30, the -S- terminal is a nanoparticle-carrying site, and R¹⁰ is a suicide substrate site or a kinase inhibition site. In general formula (B), n3 is an integer in the range of 2-30, and the -S- terminal is a nanoparticle-carrying site. The present invention provides a versatile system capable of efficiently delivering a drug to endolysosomes and allowing the drug to function at a low concentration on lysosomal enzymes, and an anticancer agent in which this system is used.

(57) 要約:

[続葉有]



WO 2017/131242 A1



添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

本発明は、ナノ粒子及び前記ナノ粒子の表面に担持された下記一般式 (A) で示されるリソソーム酵素阻害剤又はキナーゼ阻害剤及び下記一般式 (B) で示されるリン脂質疑似物質を含む複合体に関する。一般式 (A) 中、 n_1 は 2 ~ 30 の整数であり、 n_2 は 2 ~ 30 の整数であり、 $-S-$ 末端がナノ粒子担持部位であり、 R^{10} は自殺基質部位又はキナーゼ阻害部位である。一般式 (B) 中、 n_3 は 2 ~ 30 の範囲の整数であり、 $-S-$ 末端がナノ粒子担持部位である。本発明は、薬剤を効率良くエンドリソソームに運搬して、リソソーム酵素に低濃度で機能させることが可能な汎用性に富むシステム及びこのシステムを利用した抗ガン剤を提供する。

明 細 書

発明の名称：細胞内物質移送システムおよびその利用

技術分野

[0001] 本発明は、細胞内物質移送システムおよびその利用に関する。

関連出願の相互参照

本出願は、2016年1月29日出願の日本特願2016-15760号の優先権を主張し、その全記載は、ここに特に開示として援用される。

背景技術

[0002] 治療効果が期待される医薬品の多くの標的タンパク質は細胞内の核を含む特定のオルガネラあるいは細胞質に分布している。このため、作用すべき細胞内の空間に送達できなければ期待された治療効果は得られない。

[0003] そのための薬剤送達システムが種々考案され、特に、標的指向化を可能とする、EPR効果等を利用した、例えば、高分子のナノ粒子、ミセル化ナノ粒子、磁性ナノ粒子などを使った種々のシステムが知られている。（例えば、特許文献1～4参照）

[0004] 特許文献1：特表2009-534309号公報

特許文献2：特表2011-528275号公報

特許文献3：特表2015-520194号公報

特許文献4：特表2015-520197号公報

[0005] 非特許文献1：Shin-Ichiro Nishimura et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, 51, 3386-3390

非特許文献2：A. T. Ohyanagi, et. al., *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 12507-12517

非特許文献3：B. R. S. Tan, et. al., *ACS Chem. Biol.* 2015, 10, 2073-2086

特許文献1～4及び非特許文献1～3の全記載は、ここに特に開示として援用される。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] しかし、薬効を得るためには細胞内に薬効成分が取り込まれる必要があり(非特許文献1)、依然として低分子・高分子を問わず、薬剤を効率良く目的の細胞内スペースあるいは、エンドリソソームなどの特定のオルガネラに運搬して低濃度で機能させることが可能な汎用性に富むシステムは知られていない。新たな方法論の発見と新技術の開発がこの分野の最大の課題となっている。

[0007] そこで本発明が解決すべき課題は、薬剤を効率良くエンドリソソームに運搬して、リソソーム酵素に低濃度で機能させることが可能な汎用性に富むシステムを提供することであり、本発明は、このようなシステムを提供することを目的とする。

さらに本発明は、薬剤を効率良くエンドリソソームに運搬する上記システムを利用して、細胞膜内の酵素、例えば、キナーゼ等に対する活性物質(例えば、阻害剤)を送達するシステムを提供することを目的とする。

加えて本発明は、このようなシステムを利用した抗ガン剤を提供することも目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明では、癌に代表される分化・成長途上の段階にある多くの高活動状態の細胞は「エンドサイトシス」による高分子物質やナノ微粒子等の細胞内への取り込み速度が正常細胞に比して異常に高いことに着目して、広く低分子医薬品を細胞内へ効果的かつ特異的送達する方法を確立した。

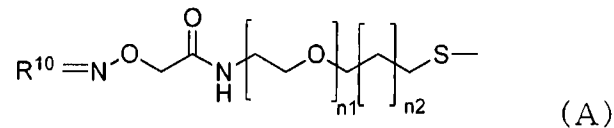
[0009] 尚、非特許文献2には、金属ナノ粒子表面にリン脂質とともにシアル酸残基等を有する糖鎖との複合体が記載されている。この文献においては、前記複合体をマウスの尾血管に投与し、複合体が当初は全身に行き渡り、その後、特定の臓器に集まることが示されている。しかしながら、この文献においては、この複合体の癌細胞などの高活動状態の細胞における取込みについては、検討されていない。

[0010] 本発明は以下のとおりである。

[1]

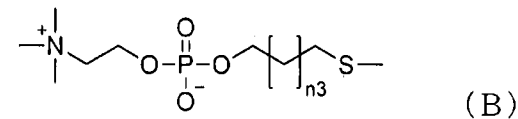
ナノ粒子及び前記ナノ粒子の表面に担持された下記一般式 (A) で示されるリソソーム酵素阻害剤又はキナーゼ阻害剤及び下記一般式 (B) で示されるリン脂質疑似物質を含む複合体。

[化1]



(一般式 (A) 中、 $n1$ は 2 ~ 30 の整数であり、 $n2$ は 2 ~ 30 の整数であり、 $-S-$ 末端がナノ粒子担持部位であり、 R^{10} は自殺基質部位又はキナーゼ阻害部位である。)

[化2]

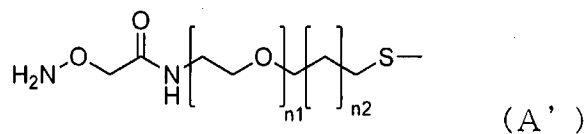


(一般式 (B) 中、 $n3$ は 2 ~ 30 の範囲の整数であり、 $-S-$ 末端がナノ粒子担持部位である。)

[2]

ナノ粒子の表面に下記一般式 (A') で示される物質がさらに担持された [1] に記載の複合体。

[化3]



(一般式 (A') 中、 $n1$ は 2 ~ 30 の整数であり、 $n2$ は 2 ~ 30 の整数であり、 $-S-$ 末端がナノ粒子担持部位である。)

[3]

一般式 (A)、(B) 及び (A') において、 $n1$ と $n2$ の合計は $n3$ 以上で

ある、[1]又は[2]に記載の複合体。

[4]

自殺基質部位は、リソソーム酵素の活性中心と反応性を有する基（以下、反応性基）を含む、[1]～[3]のいずれかに記載の複合体。

[5]

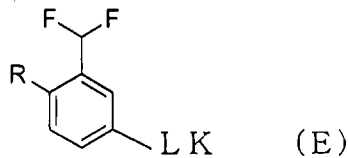
自殺基質部位は、

N-アセチル-D-グルコサミン残基、N-アセチル-D-ガラクトサミン残基、ガラクトース残基、グルコース残基、フコース残基、マンノース残基、及びシアル酸残基、から成る群から選ばれる少なくとも1種の糖残基、並びにジフルオメチルアリール基、及びトリフルオメチルアリール基から成る群から選ばれる少なくとも1種の反応性基を有する[4]に記載の複合体。

[6]

自殺基質部位は、下記官能基を含む[4]に記載の複合体。

[化4]

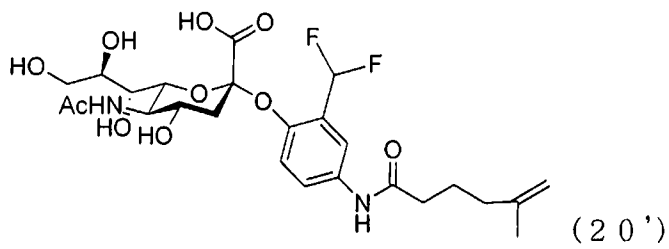
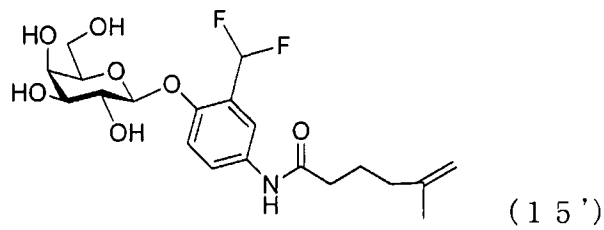
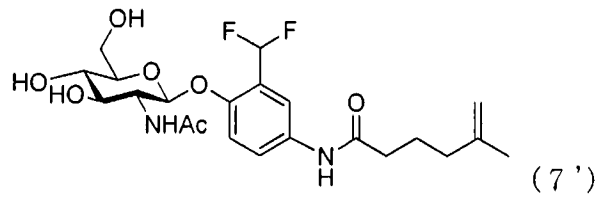


(式中、Rは、N-アセチル-D-グルコサミン残基、N-アセチル-D-ガラクトサミン残基、ガラクトース残基、グルコース残基、フコース残基、マンノース残基、及びシアル酸残基、から成る群から選ばれる少なくとも1種の糖残基であり、LKはリンカーである。)

[7]

自殺基質部位は、下記式で示されるいずれかの官能基を含む[4]～[6]のいずれかに記載の複合体。

[化5]



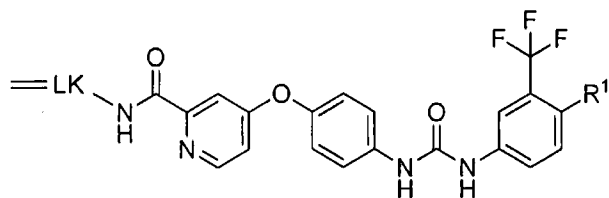
[8]

キナーゼ阻害部位は、キナーゼと反応性を有する基（以下、細胞膜キナーゼ反応性基）を含む、[1]～[3]のいずれかに記載の複合体。

[9]

キナーゼ阻害部位は、下記式で示されるいずれかの官能基を含む[8]に記載の複合体。

[化6]

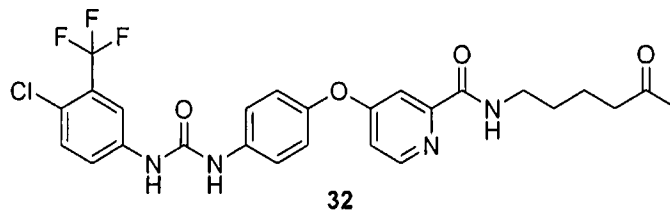


(式中、LKはリンカーを示し、R¹は電子吸引性基である。)

[10]

キナーゼ阻害部位は、下記式で示される官能基を含む [8] 又は [9] に記載の複合体。

[化7]



[11]

一般式 (A) で示されるリソソーム酵素阻害剤と一般式 (B) で示されるリン脂質疑似物質のモル比率が 1 : 100 ~ 10 : 1 の範囲である、[1] ~ [1]0 のいずれかに記載の複合体。

[12]

一般式 (A) で示されるリソソーム酵素阻害剤と一般式 (A') で示される物質のモル比率が 1 : 100 ~ 100 : 0 の範囲である、[2] ~ [1]1 のいずれかに記載の複合体。

[13]

前記ナノ粒子は、金属ナノ粒子又は半導体ナノ粒子である、[1] ~ [12] のいずれかに記載の複合体。

[14]

金属ナノ粒子は、金ナノ粒子、白金ナノ粒子、銀ナノ粒子、及び鉄磁性ナノ粒子から成る群から選ばれる少なくとも1種の粒子である [13] に記載の複合体。

[15]

半導体ナノ粒子は、量子ドットである [13] に記載の複合体。

[16]

前記ナノ粒子は、粒子径が 0.1 ~ 100 nm の範囲である [1] ~ [15] のいずれかに記載の複合体。

[17]

[1] ~ [16] のいずれかに記載の複合体を有効成分として含有する抗ガン剤。

[18]

前記抗ガン剤は、乳癌、前立腺癌、肝細胞癌、膵癌、大腸癌、卵巣癌、腎癌、肺癌、または脳腫瘍に対する抗ガン剤である [17] に記載の抗ガン剤。

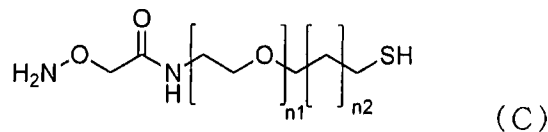
[19]

[1] ~ 16 のいずれかに記載の複合体の製造方法であって、
下記一般式 (C) で示される阻害剤架橋前駆体 X 及び下記一般式 (D) で示されるリン脂質疑似物質前駆体とコロイド状ナノ粒子とを混合して、ナノ粒子の表面に阻害剤架橋前駆体 X 及びリン脂質疑似物質を担持した表面修飾ナノ粒子を得る工程 (1)、

得られた表面修飾ナノ粒子にリソソーム酵素阻害剤前駆体 Y 又はキナーゼ阻害剤前駆体 Z を混合して、阻害剤架橋前駆体 X と連結させて下記一般式 (A) で示されるリソソーム酵素阻害剤又はキナーゼ阻害剤を形成する、
但し、リソソーム酵素阻害剤前駆体 Y は、リソソーム酵素の活性中心と反応性を有する基 (以下、反応性基) を含む自殺基質部位を含み、
キナーゼ阻害剤前駆体 Z はキナーゼと反応性を有する基を含むキナーゼ阻害部位を含む、

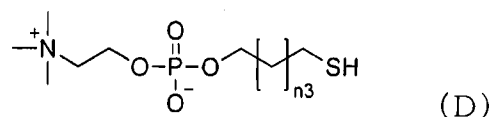
[1] ~ [16] のいずれかに記載の複合体を得る工程 (2)、
を含む前記方法。

[化8]

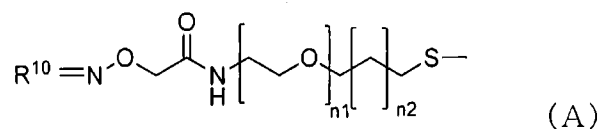


(一般式 (C) 中、n1 は 2 ~ 30 の整数であり、n2 は 2 ~ 30 の整数である。)

[化9]

(一般式 (D) 中、 n_3 は 2 ~ 30 の範囲の整数である。)

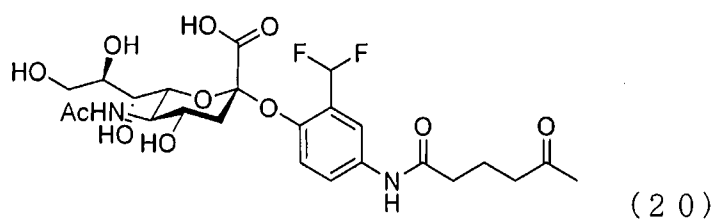
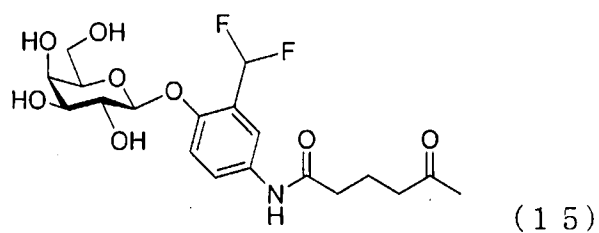
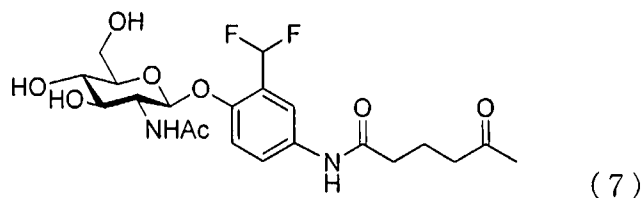
[化10]

(一般式 (A) 中、 n_1 は 2 ~ 30 の整数であり、 n_2 は 2 ~ 30 の整数であり、 $-S-$ 末端がナノ粒子担持部位であり、 R^{10} は自殺基質部位又はキナーゼ阻害部位である。)

[20]

リソソーム酵素阻害剤前駆体 Y が、下記式で示されるいずれかの化合物である [19] に記載の製造方法。

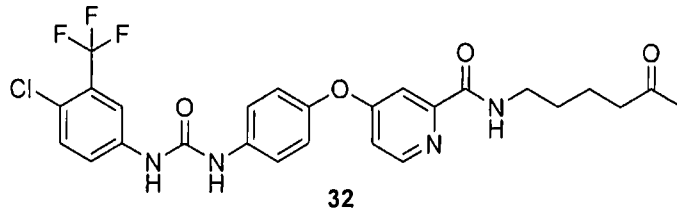
[化11]



[2 1]

キナーゼ阻害剤前駆体 Z が、下記式で示されるいずれかの化合物である [1 9] に記載の製造方法。

[化12]



発明の効果

[0011] 本発明によれば、例えば、細胞内リソソーム酵素又は細胞内キナーゼの特異的不活性化が可能となり、その結果、従来の抗腫瘍薬に比べて桁違いに低濃度で抗腫瘍効果を発揮する抗腫瘍剤を提供でき、極めて効果が高い抗腫瘍医薬品候補の創出が可能になる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]実施例1において、MALD-TOFMSによりナノ微粒子表面に化合物が提示されていることを確認した。

[図2a]化合物 7 を提示した蛍光性ナノ微粒子 (10 nM) の癌細胞内挙動を示す。： (a) 蛍光性ナノ微粒子の乳癌細胞 (MCF7) 培養開始後 (1~8時間) での細胞内動態 (Scale bar size = 50 μm)。

[図2b]化合物 7 を提示した蛍光性ナノ微粒子 (10 nM) の癌細胞内挙動を示す。(b) 培養開始後2時間 (上) と8時間 (下) のQD-anchored inhibitor 7 (化合物 7 を担持した蛍光性ナノ微粒子) の細胞内分布の様子 (Scale bar size = 50 μm)。拡大図 (左) と位相差画像 (右)

[図3a]化合物 7 を提示した蛍光性ナノ微粒子 (100 nM QD-anchored 7) の乳癌細胞殺傷作用の結果を示す。(a) 化合物 7 を提示した蛍光性ナノ微粒子および比較に用いた各種試験薬共存下で96時間培養後のMCF7細胞の生存率をMTA法により定量した。

[図3b]化合物7を提示した蛍光性ナノ微粒子 (100 nM QD-anchored 7) の乳癌細胞殺傷作用の結果を示す。(b)各試験薬との96時間共培養後の乳癌細胞の様子 (Scale bar size = 50 μ m)。リソソームと核はそれぞれ緑と青で染色、QDは赤い蛍光を示している。

[図3c]化合物7を提示した蛍光性ナノ微粒子 (100 nM QD-anchored 7) の乳癌細胞殺傷作用の結果を示す。(c)化合物7を提示した蛍光性ナノ微粒子 (10 nM) の癌細胞内挙動：蛍光性ナノ微粒子の乳癌細胞 (MCF7) 培養開始後8時間でのZ stackで見た細胞内分布の様子 (Scale bar size=50 μ m)。

[図3d]化合物7を提示した蛍光性ナノ微粒子 (100 nM QD-anchored 7) の乳癌細胞殺傷作用の結果を示す。(d) GFP発現細胞株を用いたライブセルイメージング：蛍光性ナノ微粒子の乳癌細胞 (MCF-7) 培養開始後8時間での細胞内動体 (Scale bar size=50 μ m)。

[図4]実施例2において、MALDI-TOFMSによりナノ微粒子表面に化合物が提示されていることを確認した。

[図5]化合物15を提示した蛍光性ナノ微粒子 (10 nM) の癌細胞内挙動 a 示す。蛍光性ナノ微粒子の乳癌細胞 (MCF-7) 培養開始後 (1~8時間) での細胞内動体 (Scale bar size=50 μ m)。

[図6]化合物15を提示した蛍光性ナノ微粒子 (100 nM QD-anchored 15) の乳癌細胞殺傷作用の結果を示す。(a) 化合物15を提示した蛍光性ナノ微粒子および比較に用いた各種試験薬共存下で96時間培養後のMCF-7細胞の生存率をMTTアッセイにより定量した。(b) 各試験薬との96時間培養後の乳癌細胞の様子 (Scale bar size=50 μ m)。リソソームと核はそれぞれ緑と青で染色、QDは赤い蛍光を示している。

[図7]実施例3において、MALDI-TOF MSによりナノ微粒子表面に化合物が提示されていることを確認した。

[図8]化合物20を提示した蛍光性ナノ微粒子 (10 nM) の癌細胞内挙動：蛍光性ナノ微粒子の乳癌細胞 (MCF-7) 培養開始後 (1~8時間) での細胞内動体 (Scale bar size=50 μ m)。

[図9]化合物20を提示した蛍光性ナノ微粒子 (100 nM QD-anchored 15) の乳癌細胞殺傷作用の結果を示す。化合物20を提示した蛍光性ナノ微粒子および比較に用いた各種試験薬共存下で96時間培養後のMCF-7細胞の生存率をMTTアッセイにより定量した。

[図10A]化合物7を担持した蛍光性ナノ微粒子 (10 nM) の癌細胞 (HepG2細胞) 内挙動：阻害剤を担持したリン脂質被覆蛍光性ナノ微粒子と肝臓癌細胞 (HepG2) の共培養開始後 (1~8時間) での細胞内挙動 (Scale bar size=50 nm) 。

[図10B]化合物15を担持した蛍光性ナノ微粒子 (10 nM) の癌細胞 (HepG2細胞) 内挙動：阻害剤を担持したリン脂質被覆蛍光性ナノ微粒子と肝臓癌細胞 (HepG2) の共培養開始後 (1~8時間) での細胞内挙動 (Scale bar size=50 nm) 。

[図10C]化合物20を担持した蛍光性ナノ微粒子 (10 nM) の癌細胞 (HepG2細胞) 内挙動：阻害剤を担持したリン脂質被覆蛍光性ナノ微粒子と肝臓癌細胞 (HepG2) の共培養開始後 (1~8時間) での細胞内挙動 (Scale bar size=50 nm) 。

[図11]阻害剤7 (A)、15 (B)、および20 (C) を担持した蛍光性ナノ微粒子 (100 nM) の肝臓癌細胞殺傷作用：それぞれの阻害剤を担持したリン脂質被覆蛍光性ナノ微粒子および比較に用いた各種試験薬の共存下で96時間培養後のHepG2細胞の生存率をCell viability assay (MTT法) により定量した。

[図12]化合物7を担持した蛍光性ナノ微粒子 (1~100 nM QD-anchored 7) の肝細胞癌殺傷作用：化合物7を担持した蛍光性ナノ微粒子および比較に用いた各種試験薬共存下で96時間培養後のHepG2細胞の生存率をCell viability assayにより定量した。

[図13]化合物32を担持したリン脂質被覆蛍光性ナノ微粒子のMALDI-TOFMS

[図14A]化合物32担持したリン脂質被覆蛍光性ナノ微粒子 (10 nM) の癌細胞内挙動：蛍光性ナノ微粒子と肝癌細胞 (HepG2) の共培養開始後0.5~24時間での細胞内挙動を示す。

[図14B]図14Aの一部の拡大図 (Scale bar size=50 nm) である。

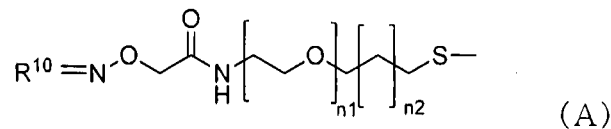
[図15]ソラフェニブ誘導体32を担持したリン脂質被覆蛍光性ナノ微粒子 (1~100 nm QD-anchored 32) と化合物32 (1~10⁶ nM) の肝癌細胞殺傷作用: 化合物32を担持した蛍光ナノ微粒子、化合物32単独およびナノ微粒子のみをそれぞれHepG2細胞と共に48時間培養後の癌細胞の生存率をMTT法により定量した。

発明を実施するための形態

[0013] <複合体>

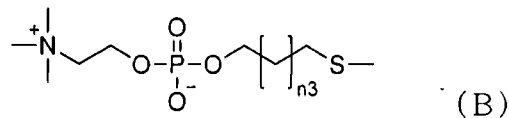
本発明は、ナノ粒子及び前記ナノ粒子の表面に担持された下記一般式 (A) で示されるリソソーム酵素阻害剤又はキナーゼ阻害剤及び下記一般式 (B) で示されるリン脂質疑似物質を含む複合体に関する。

[0014] [化13]



(一般式 (A) 中、n1は2~30の整数であり、n2は2~30の整数であり、-S-末端がナノ粒子担持部位であり、R¹⁰は自殺基質部位又はキナーゼ阻害部位である。)

[0015] [化14]



(一般式 (B) 中、n3は2~30の範囲の整数であり、-S-末端がナノ粒子担持部位である。)

[0016] リソソーム酵素阻害剤は、リソソーム酵素の活性中心と反応性を有する基 (反応性基) を含む自殺基質部位を含む。自殺基質部位は、リソソーム酵素に対する基質となり得る糖残基、および酵素不活性化のためのリソソーム酵素に対する反応性基を含む。

[0017] 糖残基は、不活性化させたいリソソーム酵素の基質特異性に応じて適宜選

択することができ、例えば、N-アセチル-D-グルコサミン残基、N-アセチル-D-ガラクトサミン残基、ガラクトース残基、グルコース残基、フコース残基、マンノース残基シアル酸残基、から成る群から選ばれる少なくとも1種の糖残基である。

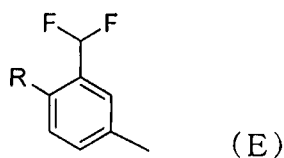
[0018] 糖残基としては、リソソーム酵素の基質特異性を考慮するとN-アセチル-D-グルコサミン残基、及び/又はガラクトース残基が好ましい。

[0019] 1個の複合体粒子に複数の糖残基を使用してもよく、その場合、1個の複合体粒子に単一又は複数種の糖残基が存在しても良い。また、1個の複合体粒子には単一又は複数種の糖残基が存在し、かつ共存する異なる複合体粒子において、同一又は異なる単一又は複数種の糖残基が存在することもできる。

[0020] 反応性基は、酵素の反応中心と反応性を有する反応性基であればよく、酵素の反応中心と反応性を有する反応性基としては、例えば、ジフルオメチルアリール基、及びトリフルオメチルアリール基から成る群から選ばれる少なくとも1種の反応性基であることができる。酵素の反応中心との反応性は、可逆的または非可逆的の何れであっても良い。

[0021] ジフルオメチルアリール基が、酵素の反応中心との反応性を有する反応性基であることは、Biochemistry, 2005, 44, 11669-11675を参照できる。前記反応性基がジフルオメチルアリール基である自殺基質は、例えば、下記一般式(E)で示される基であることができる。

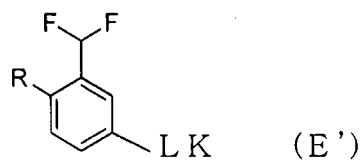
[化15]



式中、Rは、糖残基であり、Fはフッ素原子である。

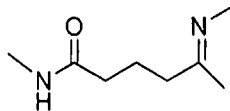
[0022] 一般式(E)はさらにリンカーLKを有する一般式(E')であることができる。

[化16]



式中、Rは、糖残基であり、Fはフッ素原子である。リンカーLKは糖残基を有するアリール基と鎖状部位との間を架橋できる基であれば、特に制限はない。例えば、下記で示されるアルキレン基を含むリンカーであることができる。この式においては、左端がアリール基との結合部位であり、右端は鎖状部位との結合部位であり、鎖状部位末端の窒素原子(=N)も表示されている。リンカーLKにおけるアルキレン基は、例えば、炭素数1~10の範囲であることができ、左端のアリール基との結合部位であるアミド基及び／又は右端の鎖状部位との結合部位であるイミノ基は、それぞれ他の連結基であることもできる。

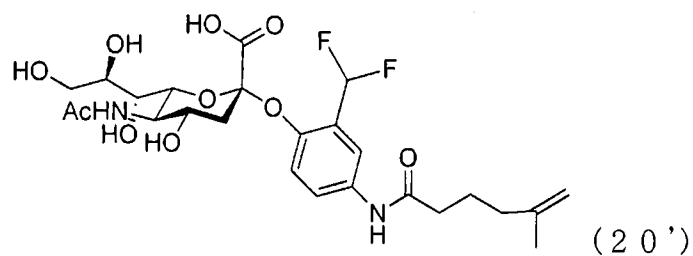
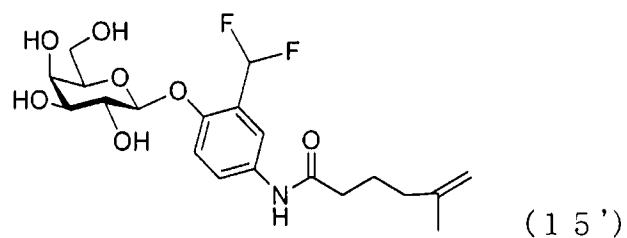
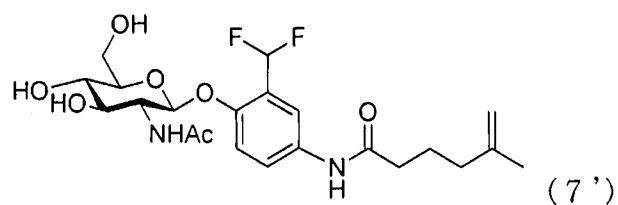
[0023] [化17]



[0024] トリフルオメチルアリール基が、酵素の反応中心との反応性を有する反応性基であることは、Bioorg. Med. Chem. Lett. 2001, 11, 1769-1773を参照できる。

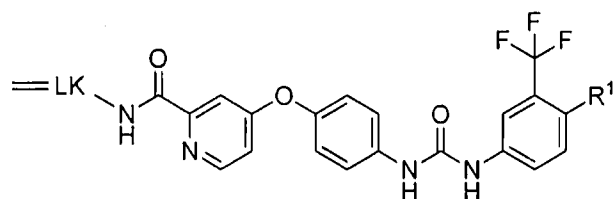
[0025] 自殺基質部位は、例えば、下記式で示されるいずれかの官能基を含む部位であることができる。

[化18]



[0026] キナーゼ阻害部位は、キナーゼと反応性を有する基、好ましくは細胞膜のキナーゼと反応性を有する基を含む。そのようなキナーゼ阻害部位は、例えば、下記式で示される部位であることができる。

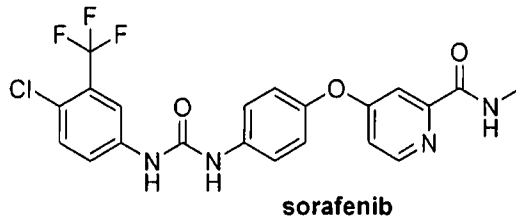
[化19]



式中、LKはリンカーを示し、R¹は電子吸引性基である。電子吸引性基としては、ハロゲン原子(フッ素、塩素、臭素又はヨウ素)、ニトロ基、シアノ基、トシル基、アシル基等を挙げることができる。

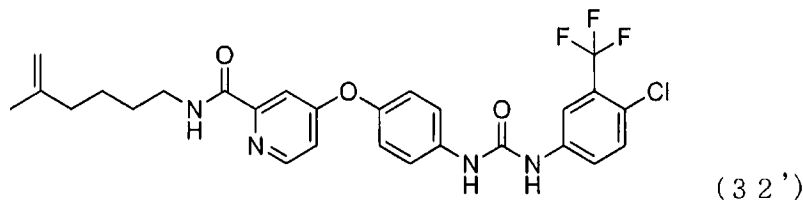
[0027] このキナーゼ阻害部位は、下記ソラフェニブを含む。

[化20]



[0028] さらに、ソラフェニブを含む部位の具体例としては下記の部位を挙げることができる。

[化21]



[0029] キナーゼは、タンパク質における特定の残基のリン酸化を触媒する酵素のファミリーである。一般的に、キナーゼは、3つのグループに分けられる。優先的にセリンおよび/またはスレオニン残基をリン酸化するもの、優先的にチロシン残基をリン酸化するもの、およびチロシンおよびセリン/スレオニン残基の両方をリン酸化するものである。キナーゼは、受容体におけるサイトカインの活性化を含む細胞外シグナルを核に伝達し、種々の生物学的な事象を引き起こすためのシグナル伝達経路における重要な要素とされる。例えば、チロシンキナーゼ活性に対する阻害剤としては、ゲフィチニブ、エルロチニブ、セツキシマブ、パニツムマブ等があげられる。ソラフェニブは、チロシンキナーゼの阻害、Rafキナーゼ（細胞増殖シグナルに深く関与するセリン/スレオニンキナーゼの一種）の阻害する薬物として知られている。

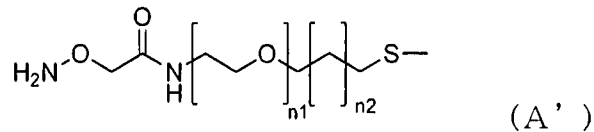
[0030] 本発明の複合体は、一般式(A)で示されるリソソーム酵素阻害剤が有する自殺基質部位又は一般式(A)で示されるキナーゼ阻害剤が有するキナーゼ阻害部位を、ナノ粒子の表面に固定化した物であり、自殺基質部位又はキナーゼ阻害部位をナノ粒子の表面に提示するものである。ここで、自殺基質部位又はキナーゼ阻害部位の「提示」とは、ナノ粒子の表面に自殺基質部位

又はキナーゼ阻害部位を固定化することを意味する。

- [0031] 一般式 (A) で示されるリソソーム酵素阻害剤又はキナーゼ阻害剤は、式中の n_1 及び n_2 を選択することで、リソソーム酵素阻害剤又はキナーゼ阻害剤とナノ粒子との間の距離を所望の範囲に保つことができ、その結果、細胞内でのリソソーム酵素不活性化作用又はキナーゼ阻害作用を調節することができる。 n_1 は 2～30、好ましくは 5～16、より好ましくは 4～15 の範囲の整数である。 n_2 は 2～30、好ましくは 5～20、より好ましくは 7～15 の範囲の整数である。
- [0032] 一般式 (B) で示されるリン脂質疑似物質は、ナノ粒子の表面を修飾し、本発明の複合体が、エンドサイトシスにより細胞内に取り込ませる機能を付与する。この観点から n_3 は 2～30、好ましくは 5～20、より好ましくは 7～15 の範囲の整数である。
- [0033] 1 個のナノ粒子に対する一般式 (A) で示されるリソソーム酵素阻害剤又はキナーゼ阻害剤及び一般式 (B) で示されるリン脂質疑似物質の担持量は、ナノ粒子の表面における金属元素 (反応点) の 80% 以上あることが好ましい。本発明の複合体同士の凝集抑制やエンドサイトシスにより細胞内に取り込ませる機能を考慮して適宜決定することができる。尚、前記担持量は、ナノ粒子の表面の全ての反応点を覆うことができる量であることがより好ましい。
- [0034] 本発明の複合体において、一般式 (A) で示されるリソソーム酵素阻害剤又はキナーゼ阻害剤と一般式 (B) で示されるリン脂質疑似物質との比率は、細胞内でのリソソーム酵素不活性化作用又はキナーゼ阻害作用とエンドサイトシスにより細胞内に取り込ませる機能のバランスを考慮して適宜選択することができる。例えば、モル比率が 1 : 100～10 : 1 の範囲であることができ、好ましくは 1 : 10～1 : 1 の範囲である。
- [0035] 本発明の複合体は、一般式 (A) で示されるリソソーム酵素阻害剤又はキナーゼ阻害剤と一般式 (B) で示されるリン脂質疑似物質に加えて、ナノ粒子の表面に下記一般式 (A') で示される物質がさらに担持されたものである

ことができる。一般式 (A') で示される物質は、後述する一般式 (A) で示される酵素阻害剤の架橋用の前駆体 X に由来する。

[化22]



(一般式 (A') 中、 n_1 は 2 ~ 30 の整数であり、 n_2 は 2 ~ 30 の整数であり、-S- 末端がナノ粒子担持部位である。)

[0036] 尚、一般式 (A') には、さらに、所望により糖鎖や抗体などの生理活性物質を担持させることもできる。

[0037] 一般式 (A) で示されるリソソーム酵素阻害剤又はキナーゼ阻害剤と一般式 (A') で示される物質のモル比率は、1 : 100 ~ 100 : 0 の範囲であることができ、10 : 100 ~ 100 : 10 の範囲であることができる。

[0038] ナノ粒子は、金属ナノ粒子又は半導体ナノ粒子であることができる。金属ナノ粒子の材質には、特に制限はないが、金、白金、銀、鉄磁性体であることができ、金属ナノ粒子は、金ナノ粒子、白金ナノ粒子、銀ナノ粒子は、鉄磁性体ナノ粒子であることができる。特に、金属ナノ粒子は、金ナノ粒子、白金ナノ粒子、銀ナノ粒子が、生体に対する安全性という観点から好ましい。

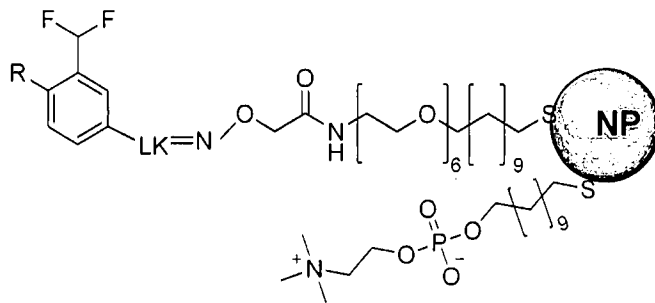
[0039] 半導体ナノ粒子の材質には、特に制限はない。半導体ナノ粒子は、量子ドットであることもできる。量子ドットとは半導体原子が数百個から数千個集まった 10 数 nm 程度の小さな塊であり、蛍光性ナノ粒子である。粒子径により発光する蛍光の波長 (色) が異なる。市販品を利用でき、本発明の複合体のナノ粒子に量子ドットを用いると、蛍光発光性の複合体とすることができ、生体内での動態をモニタリングすることも可能である。

[0040] ナノ粒子は、粒子径が 0.1 ~ 100 nm の範囲であることができ、好ましくは、1 ~ 50 nm の範囲、より好ましくは 5 ~ 20 nm の範囲、さらに好ましくは 5 ~ 15 nm の範囲である。

[0041] 本発明の複合体は、例えば、下記一般式 (10) で模式的に示すことがで

きる。式中のリンカーLKから末端側の置換フェニル基は、リソソーム酵素阻害剤の例であり、キナーゼ阻害剤の場合には、LKから末端側には、キナーゼ阻害部位の基が存在する（後述）。実際の複合体は、一般式（A）で示されるリソソーム酵素阻害剤又はキナーゼ阻害剤と一般式（B）で示されるリン脂質疑似物質とは、それぞれ少なくとも1個以上、ナノ粒子NPに担持されている。

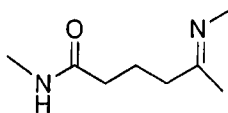
[0042] [化23]



(10)

[0043] 式中、一般式（A）で示されるリソソーム酵素阻害剤に相当する枝においては、Rは糖残基であり、Fはフッ素原子であり、NPはナノ粒子である。LKは、糖残基を有するアリール基とナノ粒子NPに連結する鎖状部位との間のリンカーである。リンカーLKは糖残基を有するアリール基と鎖状部位との間を架橋できる基であれば、特に制限はない。例えば、下記で示されるアルキレン基を含むリンカーであることができる。この式においては、左端がアリール基との結合部位であり、右端は鎖状部位との結合部位であり、鎖状部位末端の窒素原子（=N）も表示されている。リンカーLKにおけるアルキレン基は、例えば、炭素数1～10の範囲であることができ、左端のアリール基との結合部位であるアミド基及び／又は右端の鎖状部位との結合部位であるイミノ基は、それぞれ他の連結基であることもできる。

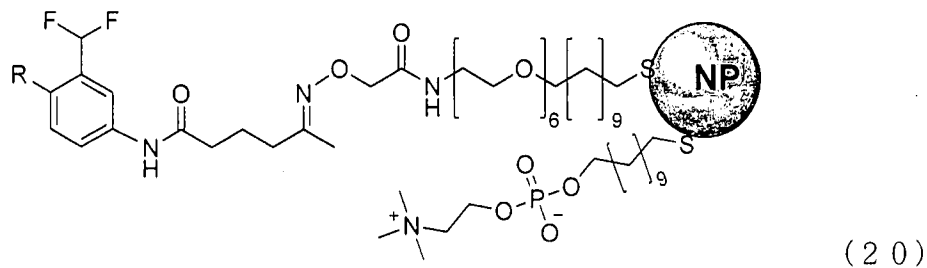
[0044] [化24]



[0045] 上記一般式（10）で模式的に示すことができる複合体は、LKを具体化

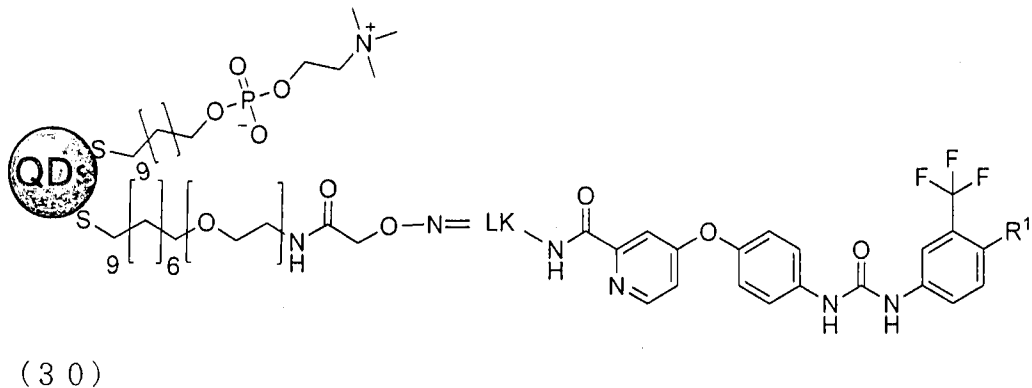
した下記一般式(20)で模式的に記載することができる。R、F、NPは、一般式(10)と同様である。一般式(20)で模式的に示される実際の複合体は、一般式(A)で示されるリソソーム酵素阻害剤と一般式(B)で示されるリン脂質疑似物質とは、それぞれ少なくとも1個以上、ナノ粒子NPに担持されている。

[0046] [化25]



[0047] 一般式(A)で示されるキナーゼ阻害剤を有する複合体は、下記一般式(30)で模式的に記載することができる。

[化26]

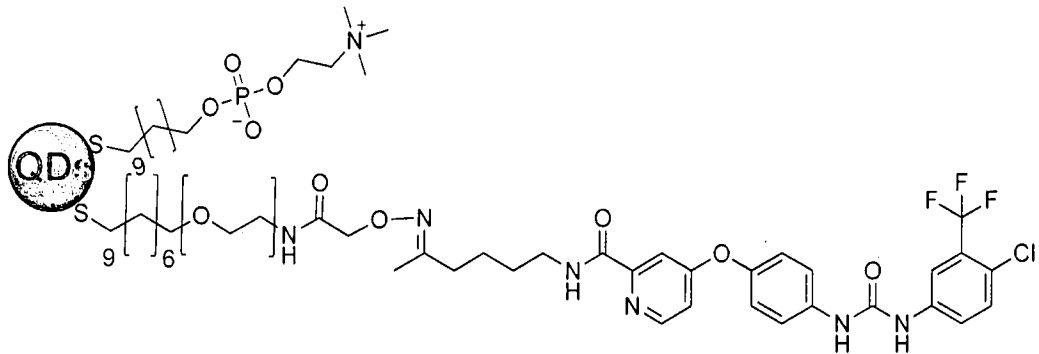


[0048] 式中、一般式(A)で示されるキナーゼ阻害剤に相当する枝においては、R¹は電子吸引性基であり、電子吸引性基としては、例えば、ハロゲン原子(例えば、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素)またはニトロ基、シアノ基、トシル基、アシル基等を挙げることができ、Fはフッ素原子であり、QDはナノ粒子の1種であるコロイド状の量子ドットである。LKは、アミド基側とQDに連結する鎖状部位との間のリンカーである。リンカーLKはアミド基側と鎖状部位との間を架橋できる基であれば、特に制限はない。例えば、アルキ

レン基を含むリンカーであることができる。

[0049] 上記一般式(30)で模式的に示すことができる複合体は、LK及びR'を具体化した下記式(40)で模式的に記載することができる。F、QDは、一般式(30)と同様である。式(40)で示される複合体は、実際には、一般式(A)で示されるキナーゼ阻害剤と一般式(B)で示されるリン脂質疑似物質とが、それぞれ少なくとも1個以上、ナノ粒子QDに担持されている。

[化27]



(40)

<複合体の製造方法>

本発明は、上記本発明の複合体の製造方法を包含する。この方法は、

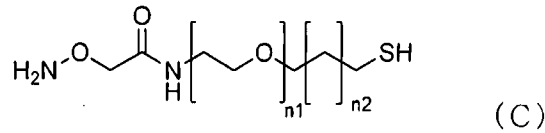
下記一般式(C)で示される阻害剤架橋前駆体X及び下記一般式(D)で示されるリン脂質疑似物質前駆体とコロイド状ナノ粒子とを混合して、ナノ粒子の表面に阻害剤架橋前駆体X及びリン脂質疑似物質を担持して表面修飾ナノ粒子を得る工程(1)、

得られた表面修飾ナノ粒子にリソソーム酵素阻害剤Y又はキナーゼ阻害剤前駆体Zを混合して、阻害剤架橋前駆体Xと連結させて下記一般式(A)で示されるリソソーム酵素阻害剤又はキナーゼ阻害剤を形成する、本発明の複合体を得る工程(2)、

を含む。

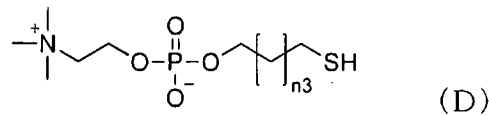
[0050]

[化28]



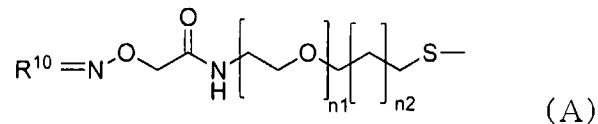
(一般式 (C) 中、 n_1 は 2 ~ 30 の整数であり、 n_2 は 2 ~ 30 の整数である。)

[化29]



(一般式 (D) 中、 n_3 は 2 ~ 30 の範囲の整数である。)

[化30]



(一般式 (A) 中、 n_1 は 2 ~ 30 の整数であり、 n_2 は 2 ~ 30 の整数であり、 ---S--- 末端がナノ粒子担持部位であり、 R^{10} は自殺基質部位又はキナーゼ阻害部位である。)

[0051] 工程 (1)

一般式 (C) で示される阻害剤架橋前駆体 X 及び一般式 (D) で示されるリン脂質疑似物質前駆体とコロイド状ナノ粒子とを混合して、ナノ粒子の表面に阻害剤架橋前駆体 X 及びリン脂質疑似物質を担持して表面修飾ナノ粒子を得る工程である。

[0052] 一般式 (C) は、自殺基質部位又はキナーゼ阻害部位を有さず、かつ末端が SH 基であること以外は一般式 (A) で示されるリソソーム酵素阻害剤又はキナーゼ阻害剤と同様である。一般式 (C) 中、 n_1 は 2 ~ 30、好ましくは 5 ~ 20、より好ましくは 7 ~ 15 の範囲の整数である。 n_2 は 2 ~ 30、好ましくは 5 ~ 20、より好ましくは 7 ~ 15 の範囲の整数である。一般式 (D) は、末端が SH 基であること以外は一般式 (B) で示されるリン

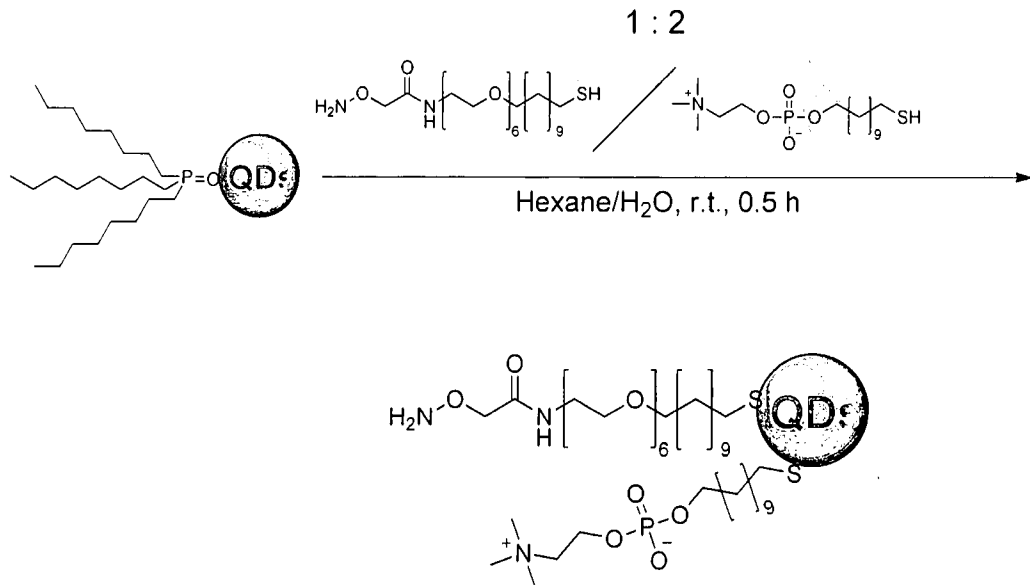
脂質疑似物質と同様である。一般式 (D) 中、 n_3 は 2~30、好ましくは 5~20、より好ましくは 7~15 の範囲の整数である。一般式 (C) で示される阻害剤架橋前駆体 X 及び一般式 (D) で示されるリン脂質疑似物質前駆体は、いずれも市販品を入手可能であり、また、参考文献(T. Ohyanagi, et al., J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 12507-12517)に記載の方法で調製することもできる。

[0053] 一般式 (C) で示される阻害剤架橋前駆体 X、一般式 (D) で示されるリン脂質疑似物質前駆体及びナノ粒子の混合比率は、一般式 (C) で示される阻害剤架橋前駆体 X 及び一般式 (D) で示されるリン脂質疑似物質前駆体のナノ粒子に対する所望の担持量を考慮して適宜決定することができる。

[0054] 下記に実施例 1 の工程 (1) を参考に示す。下記スキーム中に示す一般式 (C) で示される阻害剤架橋前駆体 X は n_1 が 6 であり、 n_2 が 9 であり、一般式 (D) で示されるリン脂質疑似物質前駆体の n_3 が 9 である。実施例 1 の反応スキームである下記スキームでは、アミノオキシリンカー(AO)とホスホリルコリンリンカー(PC)のモル比AO/PCが1/2である。AO/PCは、実施例 2 が1/2、実施例 3 が1/4、実施例 5 が1/16である。モル比AO/PCは、本発明の複合体における、一般式 (A) で示されるリソソーム酵素阻害剤又はキナーゼ阻害剤と一般式 (B) で示されるリン脂質疑似物質との比率が、前述のように、例えば、モル比率が 1 : 100 ~ 10 : 1 の範囲であることができ、好ましくは 1 : 10 ~ 1 : 1 の範囲であることから、これに準じた比であることができる。

[0055]

[化31]



[0056] ナノ粒子は、複合体において説明したものと同様である。上記スキームでは、金属ナノ粒子の原料としてコロイド状の量子ドット（QDs（Quantum Dot））を用いた。コロイド状量子ドットは、直径の範囲が、例えば、1～20nmの発光性の半導体ナノ粒子の表面に保護基を有する。上記スキームに示すコロイド状量子ドットは表面にトリアルキルリン酸基を有する。ナノ粒子が金属ナノ粒子の場合も、コロイド状の金属ナノ粒子を原料として用いることができる。コロイド状量子ドット及びコロイド状金属ナノ粒子は市販品を入手可能である。

[0057] 一般式（C）で示される阻害剤架橋前駆体X及び一般式（D）で示されるリン脂質疑似物質前駆体は、コロイド状ナノ粒子のナノ粒子表面に結合する官能基として、チオール（SH）基を有する。

[0058] コロイド状ナノ粒子と阻害剤架橋前駆体X及びリン脂質疑似物質前駆体とを、例えば、溶媒中で分散し、ナノ粒子の表面に2種類のリン脂質疑似物質を担持する。上記スキームでは溶媒としてヘキサンと水の混合溶媒を用い、室温（例えば、15～25℃）で行う。使用する溶媒は、コロイド状ナノ粒子の種類、阻害剤架橋前駆体X及びリン脂質疑似物質前駆体の種類に応じて

適宜決定することができる。コロイド状ナノ粒子、阻害剤架橋前駆体X及びリン脂質疑似物質前駆体の溶媒中の濃度や反応時間も、所望の表面修飾ナノ粒子に応じて適宜決定することができる。コロイド状ナノ粒子への担持方法の一般的な方法は、公知であり、例えば、以下の参考文献A、Bに記載の方法を参照して実施することができる。

参考文献

A. T. Ohyanagi, et. al., J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 12507-12517 (非特許文献2)

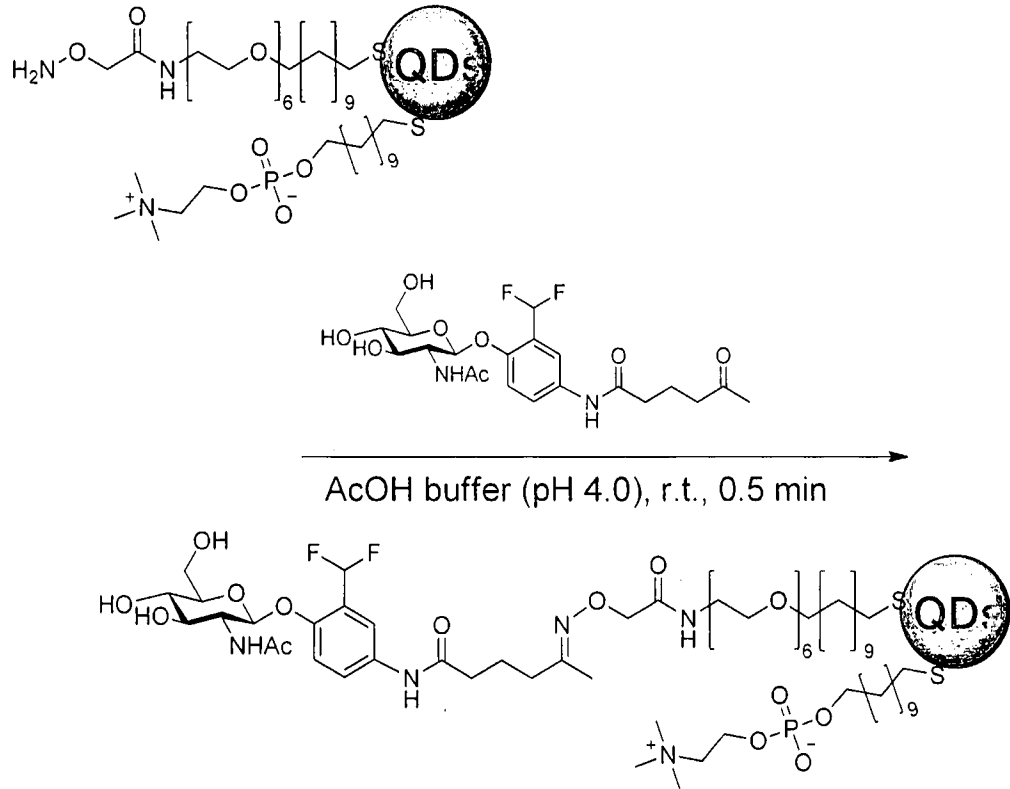
B. R. S.Tan, et. al., ACS Chem. Biol. 2015, 10, 2073-2086 (非特許文献3)

[0059] 工程(2)

工程(1)で得られた表面修飾ナノ粒子にリソソーム酵素阻害剤前駆体Y又はキナーゼ阻害剤前駆体Zを混合して、阻害剤架橋前駆体Xと連結させて一般式(A)で示されるリソソーム酵素阻害剤又はキナーゼ阻害剤を形成して、本発明の複合体を得る工程である。

[0060] 下記に実施例1の工程(2)を参考に示す。リソソーム酵素阻害剤前駆体Yとして実施例1で合成された化合物7が使用される。

[化32]

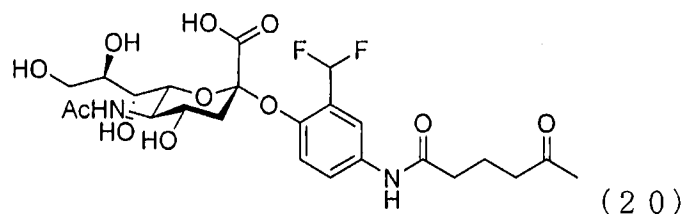
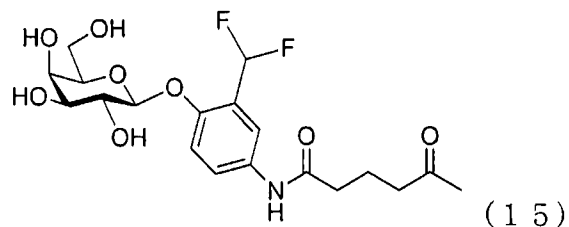
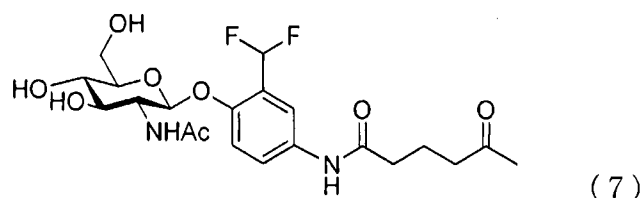


[0061] 工程（１）で得られた表面修飾ナノ粒子にリソソーム酵素阻害剤前駆体 Y を混合して、阻害剤架橋前駆体 X と連結させて一般式（A）で示されるリソソーム酵素阻害剤を形成して、本発明の複合体を得る。リソソーム酵素阻害剤前駆体 Y は、リソソーム酵素の活性中心と反応性を有する基（反応性基）を含む自殺基質部位を含む。自殺基質部位については前記複合体に関する説明を参照できる。

[0062] リソソーム酵素阻害剤前駆体 Y としては、例えば、下記式（7）、（15）、（20）で示される化合物を挙げることができる。但し、これらに限定される意図ではない。上記スキームではリソソーム酵素阻害剤前駆体 Y として化合物（7）が用いられており、表面修飾ナノ粒子表面上の一般式（C）で示されるリソソーム酵素阻害剤前駆体 X 由来のオキシアミノ基と反応して、一般式（A）で示されるリソソーム酵素阻害剤を形成する。

[0063]

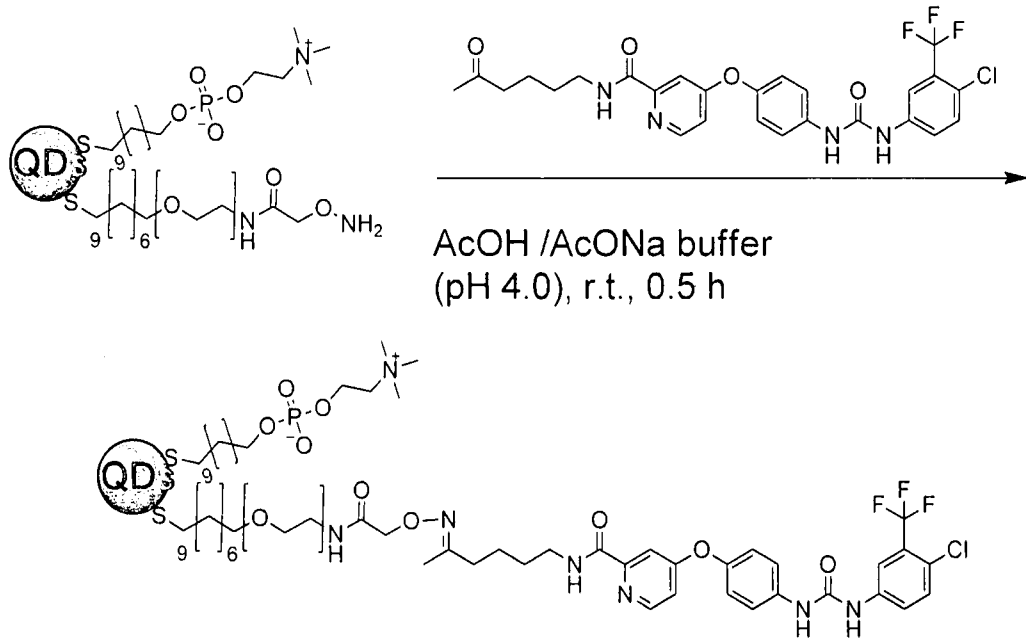
[化33]



[0064] 式(7)、(15)、(20)で示される化合物及びこれに類するリソソーム酵素阻害剤前駆体Yは、実施例1～3のスキーム1、3、5を参照して、公知の糖化合物及び公知の原料化合物から調製することができる。尚、糖化合物とアリール化合物の縮合方法及び縮合したアリール化合物への側鎖の連結方法は、A. T. Ohyanagi, et. al., J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 125 07-12517 (非特許文献2)に記載の方法を参照して実施することができる。反応生成物は、公知の方法で分離生成することができる。

[0065] 下記に実施例5のBに示す工程(2)の例を示す。キナーゼ阻害剤前駆体Zとして実施例5のAで合成された化合物32が使用される。

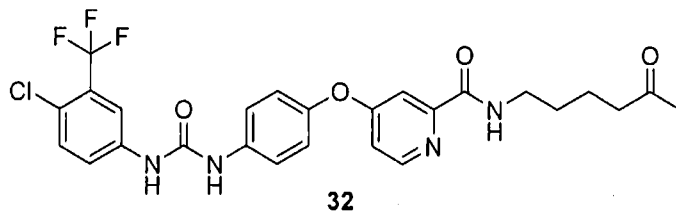
[化34]



[0066] 工程（１）で得られた表面修飾ナノ粒子にキナーゼ阻害剤前駆体Zを混合して、阻害剤架橋前駆体Xと連結させて一般式（A）で示されるキナーゼ阻害剤を形成して、本発明の複合体を得る。キナーゼ阻害剤前駆体Zは、キナーゼ阻害部位を含む。キナーゼ阻害部位については前記複合体に関する説明を参照できる。

[0067] キナーゼ阻害剤前駆体Zとしては、例えば、下記式（32）で示される化合物を挙げることができる。但し、これに限定される意図ではない。上記スキームではキナーゼ阻害剤前駆体Zとして化合物（32）が用いられており、表面修飾ナノ粒子表面上の一般式（C）で示される阻害剤架橋前駆体X由来のオキシアミノ基と反応して、一般式（A）で示されるキナーゼ阻害剤を形成する。

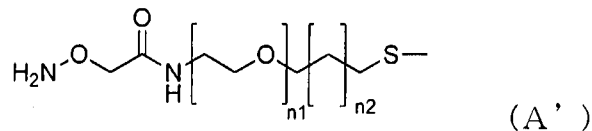
[化35]



[0068] 式(32)で示される化合物及びこれに類するキナーゼ阻害剤前駆体Zは、実施例5Aの合成スキームを参照して、公知の原料化合物から調製することができる。反応生成物は、公知の方法で分離生成することができる。

[0069] リソソーム酵素阻害剤前駆体Y又はキナーゼ阻害剤前駆体Zと反応しなかった物質は、一般式(A')で示される物質としてナノ粒子表面に担持されたままで複合体を形成する。リソソーム酵素阻害剤前駆体Yの種類や一般式(A)で示されるリソソーム酵素阻害剤の複合体における所望の担持量、反応条件等を考慮して、工程(2)におけるリソソーム酵素阻害剤前駆体Yの使用量等を適宜選択する。

[0070] [化36]



[0071] <抗ガン剤>

本発明は、前記の複合体を有効成分として含有する抗ガン剤を包含する。本発明の抗ガン剤は、前記複合体を有効成分として含有するガン(癌、悪性腫瘍)の予防又は/及び治療用の医薬組成物であり、任意で医薬的に許容される担体をさらに含むことができる。前記ガンとしては、本発明の複合体の取込み効率が、正常細胞より桁違いに高いガン細胞に起因する物であれば、制限はなく、例えば、乳癌、前立腺癌、肝細胞癌、膵癌、大腸癌、卵巣癌、腎癌、肺癌、及び脳腫瘍などを挙げることができる。好ましくは、乳癌、肝細胞癌、膵癌、及び脳腫瘍である。

[0072] 細胞内小器官のひとつであるリソソームには、数多くのリソソーム酵素が存在し、複合糖質や脂質などの細胞内基質を分解する役割を担っている。リソソーム酵素には、多数の糖鎖分解酵素が含まれる。癌細胞(腫瘍細胞)のような高活動状態の細胞は、本発明の複合体の取込み効率が、正常細胞より桁違いに高く、その結果、高活動状態の細胞に、リソソーム酵素阻害剤を有する複合体が、選択的に取り込まれ、リソソーム酵素(例えば、糖鎖分解酵

素)を不活性化する。リソソーム酵素の活性阻害は、細胞を死滅に導くので、本発明の複合体を有効成分とする薬剤は、抗ガン剤として有効である。

[0073] 細胞膜内及び膜上には様々な酵素が存在し、キナーゼはそのような酵素の典型例であり、様々な物質のリン酸化に寄与する。上記のように癌細胞(腫瘍細胞)のような高活動状態の細胞は、本発明の複合体の取込み効率が、正常細胞より桁違いに高く、その結果、高活動状態の細胞に、キナーゼ阻害剤を有する複合体が、選択的に取り込まれ、キナーゼを不活性化する。キナーゼの活性阻害は、細胞を死滅に導くので、本発明の複合体を有効成分とする薬剤は、抗ガン剤として有効である。

[0074] 本発明の抗ガン剤は、前記複合体を有効成分として、当業者に公知の方法で製剤化することが可能である。例えば、水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤などと適宜組み合わせ、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することが考えられる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

[0075] 注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート80(TM)、HCO-60と併用してもよい。

[0076] 油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン

酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。また、リポソームも細胞送達のために該薬剤をカプセル化するために使用可能である。

[0077] 投与は、経口又は非経口であり、好ましくは非経口投与であり、具体的には、注射剤型、経鼻投与剤型、経肺投与剤型、経皮投与型などが挙げられる。注射剤型の例としては、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などにより全身又は局部的に投与することができる。

[0078] 本発明の前記複合体の用量および投与方法は、患者の年齢、体重、性別、治療すべき症状の性質もしくは重篤度等により適宜選択することができる。本抗体を含有する医薬組成物の投与量としては、例えば、一回につき体重1 kgあたり0.0001mgから1,000mgの範囲で選ぶことが可能である。あるいは、患者あたり0.01~100,000mg/bodyの範囲で投与量を選ぶことができるが、これらの数値に必ずしも制限されるものではない。投与量、投与方法は、患者の年齢、体重、性別、症状などにより変動するが、当事者であれば適宜選択することが可能である。

実施例

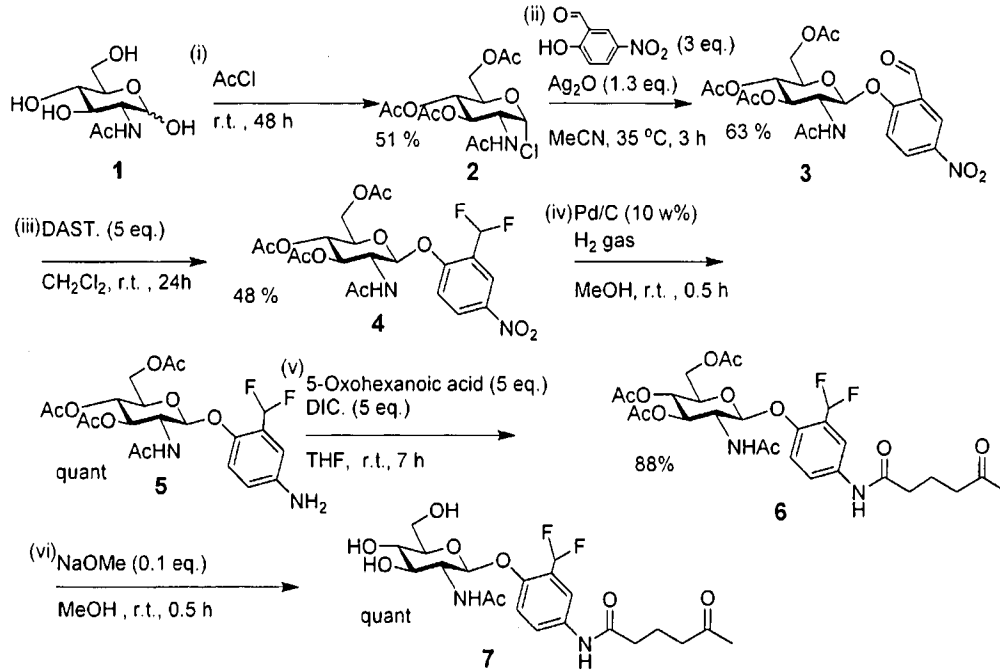
[0079] 以下、本発明を実施例に基づいて更に詳細に説明する。但し、実施例は本発明の例示であって、本発明は実施例に限定される意図ではない。

[0080] 実施例1 N-アセチルグルコサミナーゼ阻害剤担持ナノ微粒子

(1) 化合物7の合成法

[化37]

反応スキーム 1

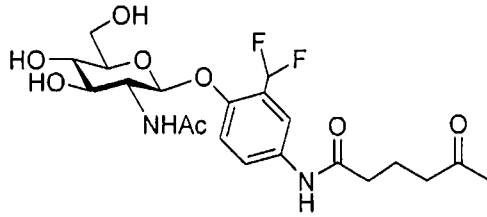


[0081] 化合物7の合成工程：(i) AcCl (20 eq.), r.t., 48 h, 68%, (ii) 5-Nitrosalicylaldehyde (3 eq.), Ag₂O (1.3 eq.), MeCN, 35°C, 53%, (iii) DAST (5 eq.), CH₂Cl₂, r.t., 24 h, 48%, (iv) Pd/C (10 w%), H₂ gas, r.t., 0.5 h, quant, (v) 5-oxohexanoic acid (5 eq.), DIC (5 eq.), THF, r.t., 7 h, 88%, (vi) NaOMe (0.1 eq.), MeOH, r.t., 0.5 h, quant.

[0082] 化合物7はN-Acetyl-D-glucosamineを出発物質として合成した。反応性糖供与体2と5-nitrosalicylaldehydeのグリコシル反応によって化合物3をβ選択的に得、その後、diethylamino sulfur trifluoride (DAST)により3のアルデヒド基のジフルオロメチル基への変換により化合物4とした。次いで、化合物4のニトロ基の還元により得られた5と5-oxohexanoic acidをN,N'-diisopropylcarbodiimide (DIC)の存在下で縮合して化合物6を誘導し、脱アセチル化により目的とする下記に示す化合物7を効率良く作製した。

[0083]

[化38]

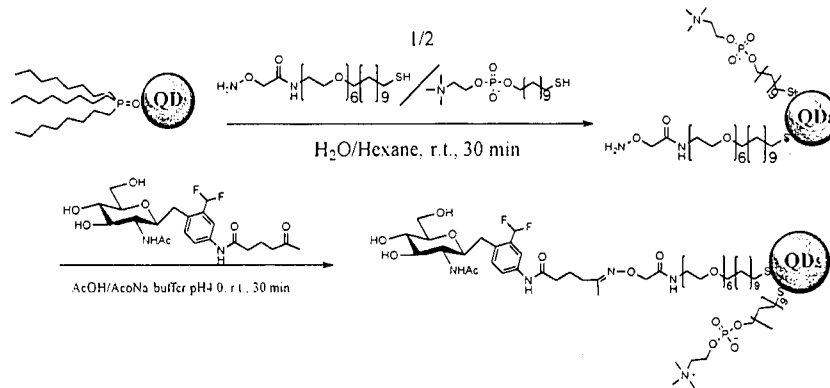


[0084] 化合物7の構造情報： $^1\text{H NMR}$ (500 Hz, D_2O) δ ppm 1.82 (m, 2 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C H}_2-$), 1.97 (s, 3H, $-\text{CO}-\text{CH}_3$), 2.1 (s, 3H, NHAc), 2.32 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{CH}_3$), 2.56 (t, 2H, $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-$), 3.47 (t, 1H, H-4), 3.56 (m, 2H, H-3, H-5), 3.71 (m, 1H, H-6), 3.9 (m, 2H, H-2, H-6), 5.04 (d, 1H, H-1), 6.79 (t, 1H, CHF_2), 7.18 (d, 1H, H-arom), 7.41 (d, 1H, H-arom), 7.52 (s, 1H, H-arom); ESI-MS 497.103 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

[0085] (2) 化合物7を提示した蛍光性ナノ微粒子の作成法

下記反応スキーム2に、化合物7を提示した蛍光性ナノ微粒子（量子ドット）の作製法を示す。

[化39]



[0086] 化合物7を参考文献2および3に記載の方法に従って蛍光性ナノ微粒子（量子ドット、Invitrogen Qdot^(R)655）に提示（固定化）した。

[0087] 反応性ナノ微粒子前駆体 AO/PC SAM-QDs (AO/PC=1/2)の作製：TOPO-QDs (1 μM , 50 μl /octane)に対しMeOH (50 μl)、*i*-PrOH (100 μl)を加えて遠心によりナノ微粒子を沈殿させ、溶媒を取り除き再びヘキサン(50 μl)を加えて分散

させた。その後予め脱保護により活性化済みのアミノオキシリンカー (10 mM, 10 μ l/MeOH)、ホスホリルコリンリンカー (100 mM, 4 μ l/MeOH), NaBH₄ (1 μ l, 12 wt % in 14 N NaOH), およびmilli Q (50 μ l) を加えて30分間攪拌し配位子交換して反応性ナノ微粒子前駆体 A0/PC SAM-QDs (A0/PC=1/2) とした。限外濾過 (YM 50) により精製した後、化合物7との反応に供した。

[0088] ナノ微粒子への化合物7の提示: A0/PC SAM-QDs (A0/PC=1/2) と化合物7 (30 mM, 10 μ l/milli Q)をAcOH/AcONa buffer (pH4, 100 μ l) に分散して30分室温で攪拌し、限外濾過 (YM 50) により精製することで目的物を得た。MALD-TOFMSによりナノ微粒子表面に自殺基質部位である化合物7が提示されていることを確認した (図1)。

[0089] (3) リソソーム酵素阻害剤(7)を提示した蛍光性ナノ微粒子の抗腫瘍効果 (1) (乳癌細胞増殖抑制効果)

細胞内イメージング: ヒト乳癌細胞 (MCF-7, P13, ATCCより入手) を5000 cell/200 μ l/wellで播種し、D-MEM High glucose, 10% fetal bovine serum (FBS)中、37°C, 5% CO₂の条件下で48時間インキュベートをした後に、化合物7を提示した蛍光性ナノ微粒子 [10 nMの化合物7担持型 A0/PC SAM-QDs (A0/PC=1/2)] および比較物質としてのA0/PC SAM-QDs (A0/PC=1/2)を添加してその後の8時間までの細胞生育過程を観察した。細胞は以下の方法で染色した後、蛍光顕微鏡にて観察した。培地を除去した後、細胞をOpti-MEMで3回洗浄後 LysoTracker R Green DND-26 (200 μ l, 5 nM/Opti-MEM) を加えて37°C, 5% CO₂の条件下で30分インキュベートしてリソソームを染色した。その後Hoechst (2 μ l, 0.1 ng/ μ l/Opti-MEM) を加えて37°C, 5% CO₂雰囲気下でさらに15分間インキュベートして核を染色した後にOpti-MEMで3回洗浄してイメージングを行った (図2)。

[0090] 化合物7を提示した蛍光性ナノ微粒子は乳癌細胞に速やかに取り込まれて1時間後にはリソソーム内に存在していたが (図2a-1 h)、2時間後には既にリソソームから脱出したナノ微粒子が観察されている (図2a-2 h)。4~8時間ではほとんどのナノ微粒子が細胞内に分散して存在している (図2a-4 h)

および8 h)。4～8時間後の時点ではLysoTracker R Green DND-26により染色される領域の減少が顕著であった。一方、比較に用いた化合物7を担持していない蛍光性ナノ微粒子(QD control)は8時間経過後もほぼ全てがリソソーム内にトラップされたままであった(図2a-8 h、最下部)。また、図2b(培養開始後2および8時間)で散見される浮遊した死細胞においてはリソソームがほとんど検出されていない。

[0091] (4) リソソーム酵素阻害剤(7)を提示した蛍光性ナノ微粒子の抗腫瘍効果(2)(乳癌細胞殺傷作用)

MTAアッセイ法による死細胞の定量：MCF7細胞($5 \times 10^3/100 \mu\text{l}/\text{well}$)を37°C、5% CO₂ 雰囲気下で24時間インキュベートした後にそれぞれ90 μl の培地に対してQD-anchored inhibitor 7 (1 μM , 10 $\mu\text{l}/\text{milli Q}$), QD control, (1 μM , 10 $\mu\text{l}/\text{milli Q}$), compound 7 (1 μM , 10 $\mu\text{l}/\text{milli Q}$), cisplatin (1 mM, 10 $\mu\text{l}/\text{milli Q}$)を加えて終濃度が100 nM(ただしシスプラチンは100 μM)となるように調整した。培養開始後96時間で培地成分により3回洗浄を行い、細胞培養液を10 μl 採取してCell Counting Kit-8 solution (Dojindo, Kumamoto, Japan)を加えて37°C、5% CO₂ 雰囲気下で1.5時間インキュベートし450 nmでの吸光度を測定することで細胞の生存率を定量した。

[0092] 図3に化合物7を提示した蛍光性ナノ微粒子(100 nM QD-anchored 7)の乳癌細胞殺傷作用の結果を示す。(a)化合物7を提示した蛍光性ナノ微粒子および比較に用いた各種試験薬共存下で96時間培養後のMCF7細胞の生存率をMTA法により定量した。(b)各試験薬との96時間共培養後の乳癌細胞の様子(Scale bar size = 50 μm)。リソソームと核はそれぞれ緑と青で染色、QDは赤い蛍光を示している。(c)化合物7を提示した蛍光性ナノ微粒子(10 nM)の癌細胞内挙動：蛍光性ナノ微粒子の乳癌細胞(MCF7)培養開始後8時間でのZ stackで見た細胞内分布の様子(Scale bar size=50 μm)。

[0093] 化合物7を提示した蛍光性ナノ微粒子(100 nM QD-anchored 7)は有意に乳癌細胞MCF7の生育を阻害し、共培養96時間後に生存率30%程度で100 μM cisplatin (100 nM QD-anchored 7の1000倍の投与量)を遥かに凌ぐ強い抗癌作用

を発現した (図3a)。また、形状が変化して浮遊した死細胞は100 nM QD-anchored 7と100 μ M cisplatinを播種した実験系でのみ観察された (図3b)。図3cでは、化合物7を提示した蛍光性ナノ微粒子が細胞内に取り込まれたことが分かる。

[0094] (4) リソソーム酵素阻害剤(7)を提示した蛍光性ナノ微粒子の抗腫瘍効果 (3)

GFP発現細胞を用いたイメージング：ヒト乳癌細胞 (MCF-7, P17, ATCCより入手) を5000 cell/200 μ l/wellで播種し、D-MEM High glucose, 10 % fetal bovine serum (FBS)中、37°C, 5% CO₂雰囲気化で24時間インキュベートをした後に、CellLight™ Lysosomes-GFP *BacMam 2.0* (1 μ l 5000 Cell/ μ l/medium)を添加してさらに24時間インキュベートしてリソソーム表面にGFPを発現させた。その後、化合物7を提示した蛍光性ナノ微粒子 [10 nM の化合物7担持型AO/PC SAM-QDs (AO/PC=1/2)]および比較物質としてのAO/PC SAM-QDs (AO/PC=1/2)を添加してその8時間後の細胞生育過程を観察した。細胞は以下の方法で染色した後に蛍光顕微鏡にて観察した。培地を除去した後、細胞をOpti-MEMで3回洗浄後Hoechest (200 μ l, 0.001 ng/ μ l/Opti-MEM)を加えて37°C, 5% CO₂雰囲気化で15分間インキュベートして核を染色した後にOpti-MEMで3回洗浄してイメージングを行った (図3d)。

[0095] 図3dの結果からNAG自殺基質を提示したナノ粒子はリソソーム内に存在するNAGと共有結合を作ることによってリソソーム膜を破壊、もしくは透過することでリソソームから抜け出していると推察される。

[0096] 参考文献

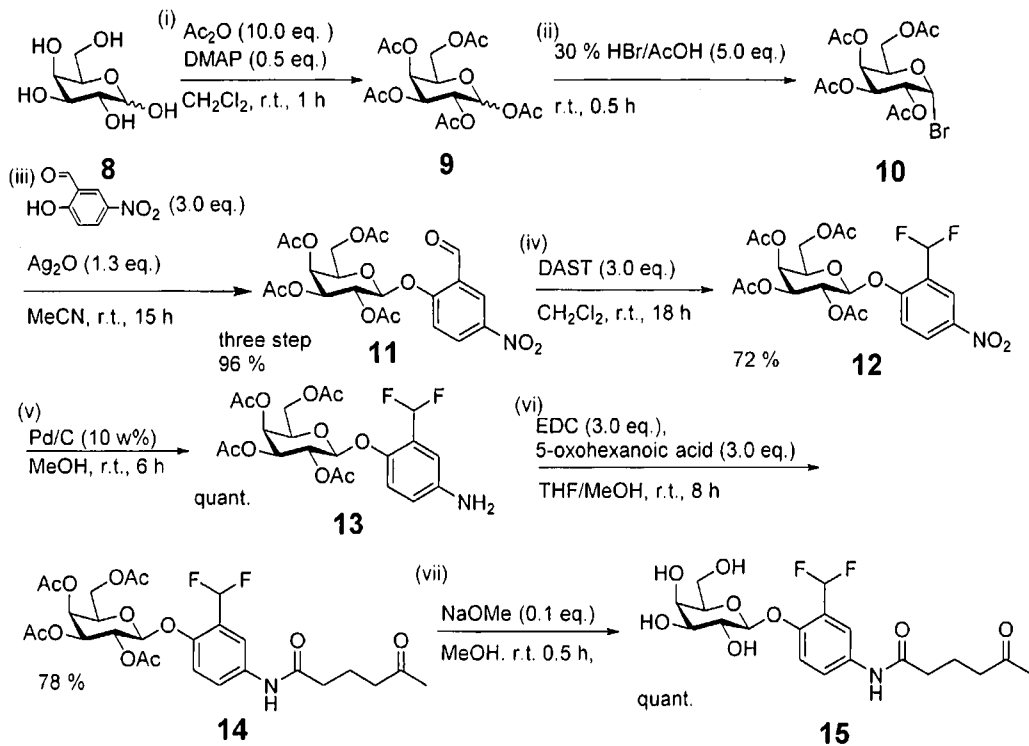
1. M. Ichikawa et al. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2001, 11, 1769-1773
2. T. Ohyanagi, et. al., J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 12507-12517
3. R. S.Tan, et. al., ACS Chem. Biol. 2015, 10, 2073-2086

[0097] 実施例2 ガラクトシダーゼ阻害剤担持ナノ微粒子

[0098] (1) 化合物15の合成法

反応スキーム3

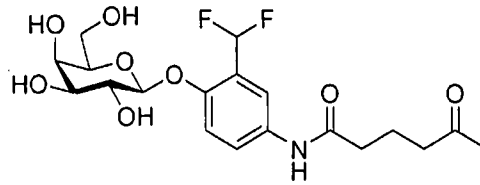
[化40]



[0099] 化合物15の合成工程: (i) Ac_2O (10 eq.), r.t., 48 h, (ii) 30 % HBr/AcOH (5.0 eq.), r.t., 0.5 h, (iii) 5-Nitrosalicylaldehyde (3 eq.), Ag_2O (1.3 eq.), MeCN, r.t., three step yield 96 %, (iv) DAST (3 eq.), CH_2Cl_2 , r.t., 18 h, 72 %, (v) Pd/C (10 w%), H_2 gas, r.t., 6 h, quant, (vi) 5-oxohexanoic acid (3 eq.), EDC (3 eq.), MeOH, r.t., 8 h, 78 %, (vii) NaOMe (0.1 eq.), MeOH, r.t., 0.5 h, quant.

[0100] 自殺基質部位の前駆体である化合物15はGalactoseを出発物質として文献1を参考に合成した。反応性糖供与体10と5-nitrosalicylaldehydeのグリコシル化反応によって化合物11を選択的に得、その後、diethylamino sulfer tri fluoride (DAST)により11のアルデヒド基のジフルオロメチル基への変換により化合物12とした。次いで、化合物12のニトロ基の還元により得られた13と5-oxohexanoic acidを1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide Hydrochloride (EDC)の存在下で縮合して化合物14を誘導し、脱アセチル化反応により目的とする下記に示す化合物15を効率よく作成した。

[0101] [化41]

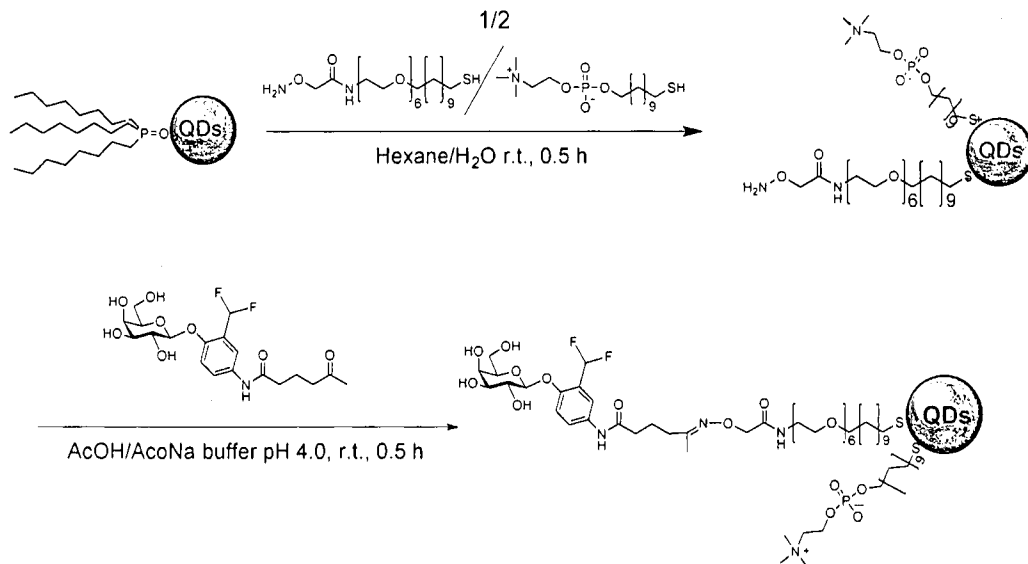


[0102] 化合物15の構造情報：¹H NMR (500 Hz, D₂O) δ ppm 1.81 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-), 2.09 (s, 3H, -CO-CH₃), 2.31 (t, 2H, -CH₂-CO-CH₃-), 2.55 (t, 2H, -NH-CO-CH₂-), 3.67 (m, 3H, H-3, H-5, H-6), 3.74 (m, 2H, H-2, H-6), 3.90 (d, 1H, H-4), 4.97 (d, 1H, H-1), 7.02 (t, 1H, CHF₂), 7.19 (d, 1H, H-*arom*), 7.4 (d, 1H, H-*arom*), 7.54 (s, 1H, H-*arom*); ESI-MS 456.130 [M+Na]⁺

[0103] (2) 化合物15を提示した蛍光性ナノ微粒子の作製法

下記反応スキーム4に化合物15を提示した蛍光性ナノ微粒子（量子ドット）の作製法を示す。

[化42]



[0104] 化合物15を参考文献2および3に記載の方法に従って蛍光性ナノ微粒子（量子ドット、Invitrogen Qdot^(R)655）に提示した。

[0105] 反応性ナノ微粒子前駆体A0/PC SAM-QDs (A0/PC=1/2)の作製：TOPO-QDs (1 μM, 50 μl/octane)に対しMeOH (50 μl)、i-PrOH (100 μl)を加えて遠心によ

リナノ微粒子を沈殿させ、溶媒を取り除き再びヘキサン(50 μ l)を加えて分散させた。その後予め脱保護により活性化済みのアミノオキシリンカー (10 mM, 10 μ l/MeOH)、ホスホリルコリンリンカー (100 mM, 4 μ l/MeOH)、NaBH₄ (1 μ l, 12 wt % in 14 N NaOH)、およびmilli Q (50 μ l)を加えて30分間攪拌し配位子交換をして反応性ナノ微粒子前駆体A0/PC SAM-QDs (A0/PC=1/2)とした。限外濾過(YM 50)により精製した後、化合物15との反応を行った。

[0106] ナノ微粒子への化合物15の提示：A0/PC SAM-QDs (A0/PC=1/2) と化合物15 (30 mM, 10 μ l/milli Q)をAcOH/AcONa buffer (pH4, 100 μ l) に分散して30分室温で攪拌し、限外濾過 (YM 50) により精製をすることで目的物を得た。MALDI-TOFMSによりナノ微粒子表面に自殺基質部位である化合物15が提示されていることを確認した (図4)。

[0107] (3) 化合物15を提示した蛍光性ナノ微粒子の抗腫瘍効果 (1) (乳癌細胞増殖抑制効果)

細胞内イメージング：ヒト乳癌細胞 (MCF-7, P17, ATCCより入手) を5000 cell/200 μ l/wellで播種し、D-MEM High glucose, 10 % fetal bovine serum (FBS)中、37°C, 5% CO₂雰囲気化で48時間インキュベートをした後に、化合物15を提示した蛍光性ナノ微粒子 [10 nM の化合物15担持型A0/PC SAM-QDs (A0/PC=1/2)]を添加してその後の8時間までの細胞生育過程を観察した。細胞は以下の方法で染色した後に蛍光顕微鏡にて観察した。培地を除去した後、細胞をOpti-MEMで3回洗浄後Lyso Tracker R Green DND-26 (200 μ l, 5 nM/Opti-MEM)を加えて37°C, 5% CO₂の条件下で30分インキュベートしてリソソームを染色した。その後Hoechst (2 μ l, 0.1 ng/ μ l/Opti-MEM)を加えて37°C, 5% CO₂雰囲気化でさらに15分間インキュベートして核を染色した後にOpti-MEMで3回洗浄してイメージングを行った (図5)。図5 化合物15を提示した蛍光性ナノ微粒子 (10 nM) の癌細胞内挙動：蛍光性ナノ微粒子の乳癌細胞 (MCF-7) 培養開始後 (1~8時間) での細胞内動体 (Scale bar size=50 μ m)。図5から、化合物15を提示した蛍光性ナノ微粒子が細胞内に取り込まれることが分かる。

[0108] (4) 化合物15を提示した蛍光性ナノ微粒子の抗腫瘍効果 (2) (乳癌細胞殺傷作用)

MTTアッセイ法による死細胞の定量: MCF-7細胞 (5×10^4 /100 ml/well) を37°C、5% CO₂雰囲気化で24時間インキュベートした後にそれぞれ90 mlの培地に対してQD-anchored inhibitor 15 (1 μM, 10 μl/milli Q)を加えて終濃度が100 nM (ただしシスプラチンは100 μM) となるように調整した。培養開始後96時間で培地成分により3回洗浄を行い、細胞培養液に対し10 μlのCell Counting Kit-8 (Dojindo, Kumamoto, Japan) を加えて37°C、5% CO₂雰囲気化で1.5時間インキュベートし450 nmでの吸光度を測定することで細胞の生存率を定量した。

[0109] 図6に化合物15を提示した蛍光性ナノ微粒子 (100 nM QD-anchored 15) の乳癌細胞殺傷作用の結果を示す。(a) 化合物15を提示した蛍光性ナノ微粒子および比較に用いた各種試験薬共存下で96時間培養後のMCF-7細胞の生存率をMTTアッセイにより定量した。(b) 各試験薬との96時間培養後の乳癌細胞の様子 (Scale bar size=50 μm)。リソソームと核はそれぞれ緑と青で染色、QDは赤い蛍光を示している。

[0110] 化合物15を提示した蛍光性ナノ微粒子 (100 nM QD-anchored 15) は有意に乳癌細胞MCF-7の生育を阻害し、培養後96時間後に生存率20%程度で100nM cisplatin (100 nM QD-anchored 15の1000倍の投与量)を遥かに凌ぐ強い抗癌作用を発現した (図6a)。また、形状が変化して浮遊した死細胞は100 nM QD-anchored 15と100 μM cisplatin を播種した実験系でのみ観察された (図6b)。

[0111] 参考文献

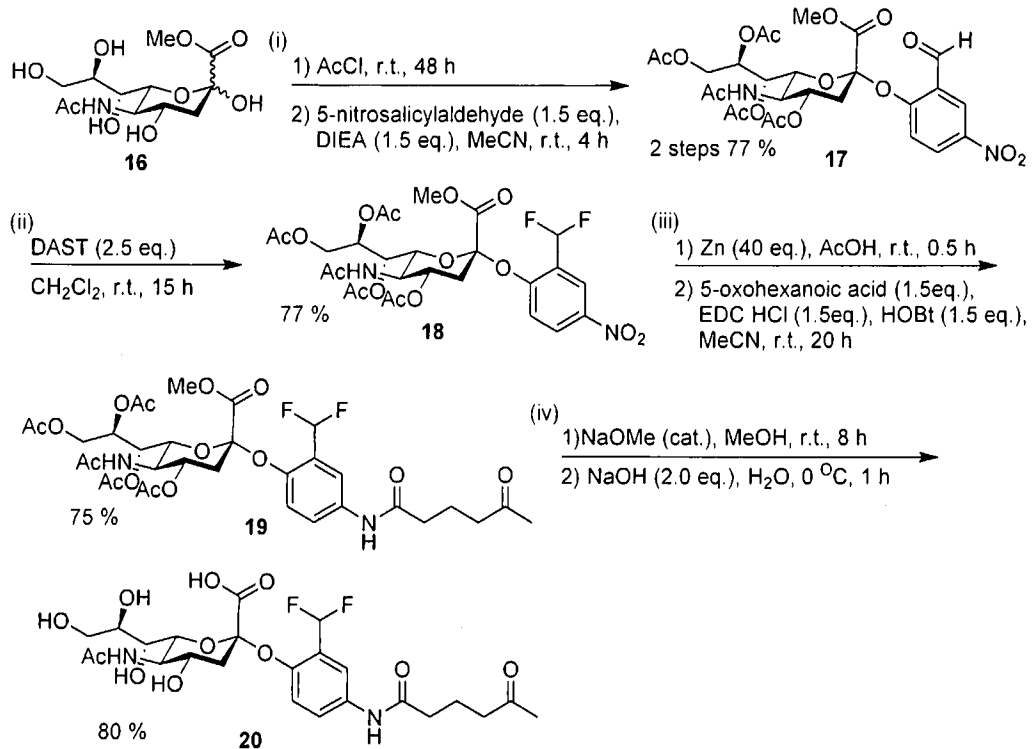
1. M. Kuroguchi, et al., J. Biol. Chem. 2004, 279, 44704-44712
2. T. Ohyanagi, et al., J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 12057-12517
3. R. S. Tan, et al., ACS Chem. Biol. 2015, 10, 2073-2086

[0112] 実施例3 シアリダーゼ阻害剤担持ナノ微粒子

(1) 化合物20の合成法

反応スキーム 5

[化43]

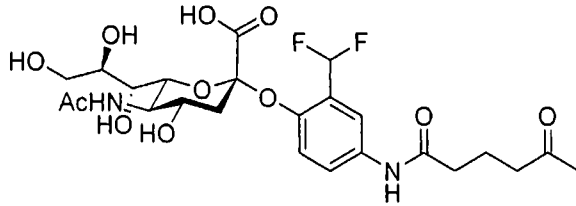


[0113] 化合物20の合成工程: (i) 1) AcCl, r.t., 48 h, 2) 5-Nitrosalicylaldehyde (1.5 eq.), DIEA (1.5 eq.), MeCN, r.t., tow step yield 77 %, (ii) DAST (2.5 eq.), CH₂Cl₂, r.t., 15 h, 77 %, (iii) 1) Zn (40 eq.), AcOH, r.t., 0.5 h, 2) 5-oxohexanoic acid (1.5 eq.), EDC (1.5 eq.), HOBt (1.5 eq.), MeCN, r.t., 20 h, 75 %, (iv) 1) NaOMe (cat.), MeOH, r.t., 8 h, 2) NaOH (2.0 eq.), H₂O, 0 °C, 1h

[0114] 化合物20はSialic acidを出発物質として合成した。化合物16をハロゲン化することで糖反応供与体とし5-nitrosalicylaldehydeとのグリコシル化反応によって化合物17を選択的に得、その後、diethylamino sulfer trifluoride (DAST)により17のアルデヒド基のジフルオロメチル基への変換により化合物18とした。次いで、化合物18のニトロ基を還元した後5-oxohexanoic acidを1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide Hydrochloride (EDC) の存在下で縮合して化合物19を誘導し、脱アセチル化反応と脱メチル化反応に

より目的とする下記に示す化合物20を効率よく作成した。

[0115] [化44]

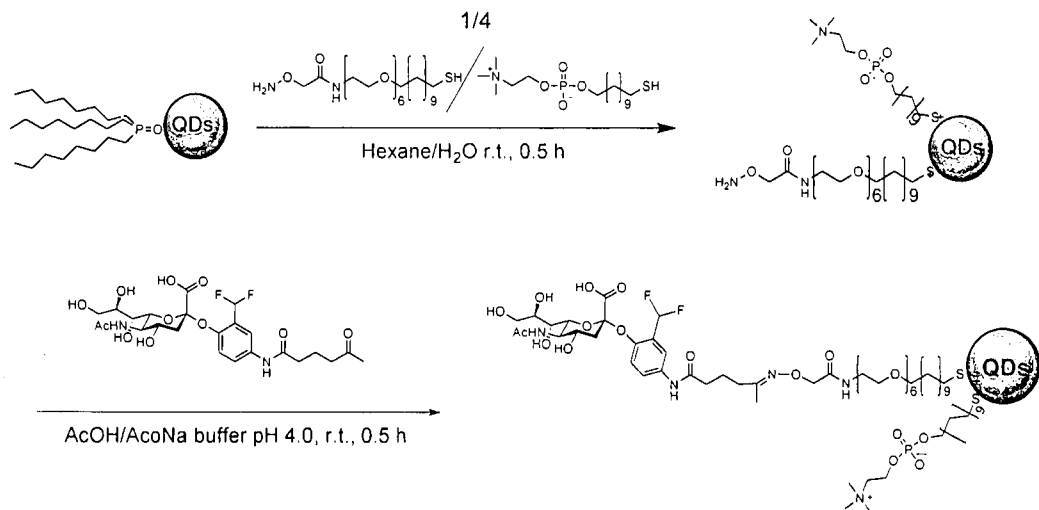


化合物20の構造情報：¹H NMR (500 Hz, D₂O) δ ppm 7.56 (d, 1H), 7.33 (dd, 1H), 7.25 (d, 1H), 6.98 (t, 1H), 3.82-3.71 (m, 4H), 3.65 (ddd, 1H), 3.53-3.48 (m, 2H), 3.09 (q, 6H), 2.79 (dd, 1H), 2.53 (t, 2H), 2.29 (t, 2H), 2.08 (s, 3H), 1.92 (s, 3H), 1.86-1.77 (m, 3H), 1.17 (t, 8H) ; ESI-MS 561.1901 [M+H]⁺

[0116] (2) 化合物20を提示した蛍光性ナノ微粒子の作製法

下記反応スキーム6に、化合物20を提示した蛍光性ナノ微粒子（量子ドット）の作製法を示す。

[化45]



[0117] 化合物20を参考文献1および2に記載の方法に従って蛍光性ナノ微粒子（量子ドット、Invitrogen QdotR655）に提示した。反応性ナノ微粒子前駆体A0/PC SAM-QDs (A0/PC=1/4)の作製：TOPO-QDs (1 μM, 50 μl/octane)に対しMeOH (50 μl)、i-PrOH (100 μl)を加えて遠心によりナノ微粒子を沈殿させ、溶媒

を取り除き再びヘキサン(50 μ l)を加えて分散させた。その後予め脱保護により活性化済みのアミノオキシリンカー (10 mM, 10 μ l/MeOH)、ホスホリルコリンリンカー (100 mM, 4 μ l/MeOH)、NaBH₄ (1 μ l, 12 wt % in 14 N NaOH)、およびmilli Q (50 μ l)を加えて30分間攪拌し配位子交換をして反応性ナノ微粒子前駆体A0/PC SAM-QDs (A0/PC=1/4)とした。限外濾過(YM 50)により精製した後、化合物20との反応を行った。

[0118] ナノ微粒子への化合物20の提示：A0/PC SAM-QDs (A0/PC=1/4) と化合物20 (30 mM, 10 μ l/milli Q)をAcOH/AcONa buffer (pH4, 100 μ l) に分散して30分室温で攪拌し、限外濾過 (YM 50) により精製をすることで目的物を得た。MALDI-TOF MSによりナノ微粒子表面に化合物20が提示されていることを確認した (図7)。

[0119] (3) 化合物20を提示した蛍光性ナノ微粒子の抗腫瘍効果(1) (乳癌細胞増殖抑制効果)

細胞内イメージング：ヒト乳癌細胞 (MCF-7, P16, ATCCより入手) を5000 cell/200 μ l/wellで播種し、D-MEM High glucose, 10 % fetal bovine serum (FBS)中、37°C, 5% CO₂雰囲気化で48時間インキュベートをした後に、化合物20を提示した蛍光性ナノ微粒子 [10 nM の化合物20担持型A0/PC SAM-QDs (A0/PC=1/2)]を添加してその後の8時間までの細胞生育過程を観察した。細胞は以下の方法で染色した後に蛍光顕微鏡にて観察した。培地を除去した後、細胞をOpti-MEMで3回洗浄後Lyso Tracker R Green DND-26 (200 μ l, 5 nM/Opti-MEM)を加えて37°C, 5% CO₂の条件下で30分インキュベートしてリソソームを染色した。その後Hoechst (2 μ l, 0.1 ng/ μ l/Opti-MEM)を加えて37°C, 5% CO₂雰囲気化でさらに15分間インキュベートして核を染色した後にOpti-MEMで3回洗浄してイメージングを行った (図8)。図8. 化合物20を提示した蛍光性ナノ微粒子 (10 nM) の癌細胞内挙動：蛍光性ナノ微粒子の乳癌細胞 (MCF-7) 培養開始後 (1~8時間) での細胞内動体 (Scale bar size=50 μ m)。図8から、化合物20を提示した蛍光性ナノ微粒子が細胞内に取り込まれることが分かる。

[0120] (4) 化合物20を提示した蛍光性ナノ微粒子の抗腫瘍効果(2) (乳癌細胞殺傷作用)

MTTアッセイ法による死細胞の定量：MCF-7細胞 (5×10^4 /100 ml/well) を37°C、5% CO₂雰囲気気化で24時間インキュベートした後にそれぞれ90 mlの培地に対してQD-anchored inhibitor 15 (1 μM, 10 μl/milli Q)を加えて終濃度が100 nM (ただしシスプラチンは100 μM) となるように調整した。培養開始後96時間で培地成分により3回洗浄を行い、細胞培養液に対し10 μlのCell Counting Kit-8 (Dojindo, Kumamoto, Japan) を加えて37°C、5% CO₂雰囲気気化で1.5時間インキュベートし450 nmでの吸光度を測定することで細胞の生存率を定量した。

[0121] 図9. 化合物20を提示した蛍光性ナノ微粒子 (100 nM QD-anchored 15) の乳癌細胞殺傷作用：化合物20を提示した蛍光性ナノ微粒子および比較に用いた各種試験薬共存下で96時間培養後のMCF-7細胞の生存率をMTTアッセイにより定量した。化合物20を提示した蛍光性ナノ微粒子 (100 nM QD-anchored 20) による乳癌細胞MCF-7の成長阻害に対する有意差は確認できなかった。化合物20は、この系では、弱いながらも自殺基質活性を示した。

[0122] 参考文献

1. T. Ohyanagi, et al., J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 12057-12517
2. R. S. Tan, et al., ACS Chem. Biol. 2015, 10, 2073-2086

[0123] 実施例4：リソソーム酵素阻害剤を担持したナノ微粒子の肝細胞癌に対する効果

A：リソソーム酵素阻害剤を担持した蛍光性ナノ微粒子の細胞内イメージング
ヒト肝臓癌細胞 (HepG2, P3, ATCCより入手) を5000 cell/200 ml/wellで播種し、D-MEM High glucose, 10 % fetal bovine serum (FBS)中、37°C、5% CO₂雰囲気気化で48時間インキュベートをした後に、化合物7、15、および20を担持したリン脂質被覆蛍光性ナノ微粒子溶液 [10 nM の阻害剤担持型AO/PC SAM-QDs (AO/PC=1/2)、既報 (T. Ohyanagi, et al., J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 12057-12517) に従い調製した。]をそれぞれ添加して、共培養後8時間

までの癌細胞生育過程を観察した。細胞は以下の方法で染色した後に蛍光顕微鏡によりイメージングした。以下にそのプロトコルの概要を示す。培地を除去した後、細胞をOpti-MEMで3回洗浄後Lyso Tracker R Green DND-26 (200 ml, 5 nM/Opti-MEM)を加えて37°C、5% CO₂の条件下で30分インキュベートしてリソソームを染色した。その後Hoechest (2 ml, 0.1 ng/ml/Opti-MEM)を加えて37°C、5% CO₂雰囲気化でさらに15分間インキュベートして核を染色した後にOpti-MEMで3回洗浄して蛍光顕微鏡によりそれぞれを観察・イメージングした (図10)。

[0124] 図10A-Cに示すとおり、いずれの場合もリン脂質被覆蛍光性ナノ微粒子 (赤色) は癌細胞と共培養開始後1時間で既にリソソームから一部が脱出している。8時間後にはほぼ大部分がリソソームには局在せず、細胞質内を自由に移動しているように見える。阻害剤を担持していないリン脂質被覆ナノ微粒子は癌細胞の種類を問わず細胞質内を移動すること無く、リソソーム内に局在し続ける (R. S. Tan, et al., ACS Chem. Biol. 2015, 10, 2073-2086) ことが既に報告されている。化合物7、15、および20はそれぞれヘキソサミニダーゼ、ガラクトシダーゼ、およびシアリダーゼの非可逆的阻害剤であり、阻害反応に際して標的酵素の活性中心周辺でのコンホメーション変化を誘起することが予想される。一方、リソソームに分布するこれらの糖分解酵素はいずれもリソソーム膜の安定化に強く寄与していると考えられ、これらの酵素に対する阻害反応によりリソソーム膜の構造や物性に著しい変化 (膜の損傷) が生じた結果、ナノ微粒子が細胞質内へ漏出したものと思われる。

[0125] B: リソソーム酵素阻害剤を担持した蛍光性ナノ微粒子の抗腫瘍効果 (肝細胞癌殺傷作用)

HepG2細胞 (5×10⁴/100 ml/well) を37°C、5% CO₂雰囲気化で24時間インキュベートした後にそれぞれ90 mlの培地に対して化合物7、15、および20 (milli Qに溶解して1 mMとした溶液の10 ml)を加えて終濃度が 100 nMとなるように調整した。共培養開始後96時間で培地成分により3回洗浄を行い、細胞培養液に対し10 mlのCell Counting Kit-8 (Dojindo, Kumamoto, Japan) を加えて3

7°C、5% CO₂雰囲気下で1.5時間インキュベートし450 nmでの吸光度を測定することで細胞の生存率を定量した。対照薬として100 nM 5-fluorouracil溶液（5-FU）を用いた（図11）。

[0126] 図11A-Cに示すとおり、化合物7と15を担持した蛍光性ナノ微粒子（100 nM）は有意に肝臓癌細胞HepG2の生育を阻害しており、共培養後96時間の生細胞はそれぞれ15%および30%程度であった。いずれの実験においても対照薬として用いた5-FU（100 nM）には有意な抗腫瘍活性は観察されていないため、化合物7と15を担持した蛍光性ナノ微粒子（100 nM）は5-FU（100 nM）を遥かに凌ぐ強力な抗癌作用を発揮したと判断できる（図11AおよびB）。

[0127] 一方、化合物20を担持した蛍光性ナノ微粒子（100 nM）は同様の条件では上記2薬剤に比してかなり弱い抗腫瘍効果を発揮するに留まっていた。これは1) リソソーム内のシアリダーゼ発現量がガラクトシダーゼやヘキソサミニダーゼに比してかなり低いため、2) α -シアロシド結合が他のグリコシド結合より酸性条件下で不安定であるためリソソーム内である程度加水分解される可能性が高いため、また、3) シアル酸（Neu5Ac）は本来ヘキソサミン合成経路で鍵となるGlcNAcから誘導されるManNAcを中間体として（経由して）アルドール反応により合成されることからシアリダーゼによるシアル酸の再生はCMP-Neu5Acの供給経路としての貢献度が必ずしも高くないことにも起因すると考えられる。

C: リソソーム酵素阻害剤7および15を担持した蛍光性ナノ微粒子の抗腫瘍効果 (IC₅₀の決定)

[0128] 上記の実験結果（図11）をうけて、比較対照薬5-FUに比して有意な癌細胞成長阻害活性の確認できた阻害剤7および15を担持したリン脂質被覆蛍光性ナノ微粒子の抗腫瘍効果についての投与量依存性を評価してIC₅₀値を決定することとした。HepG2細胞（5×10⁴/100 ml/well）を37°C、5% CO₂雰囲気化で24時間インキュベートした後にそれぞれ90 mlの培地に対してQD-anchored 7あるいはQD-anchored 15（1-0.05 mM, 10 ml/milliQ）、QD control（1-0.05 mM, 10 ml/milliQ）、5-FU（1-0.01 mM, 10 ml/milliQ）をそれぞれ加えて終濃

度が100、50、25、10、および5 nMとなるように調整した。共培養開始後96時間で培地成分により3回洗浄を行い、細胞培養液に対し10 mlのCell Counting Kit-8 (Dojindo, Kumamoto, Japan) を加えて37°C、5% CO₂雰囲気化で1.5時間インキュベートしたのちに上清の吸光度 (450 nm) を測定することで癌細胞の生存率を定量した。

[0129] 図12A-Dに示すとおり、化合物7と15を担持した蛍光性ナノ微粒子(QD-anchored 7 and 15)はいずれも濃度依存的に肝臓癌細胞HepG2の生育を阻害し、共培養から96時間後において比較対照薬とした5-FU (IC₅₀>100 nM) を遥かに凌ぐ強い抗腫瘍作用を発現した (QD-anchored 7 : IC₅₀=10.7 nM、QD-anchored 15 : IC₅₀=59.3 nM)。本来、化合物7、15および20のin vitroにおける各グルコシダーゼに対するIC₅₀はいずれもmMオーダーであることから (参考文献1~3)、図12に示した結果は「ナノ微粒子に担持したことによる低分子非可逆的阻害剤のリソソーム内への特異的 (局所的) 濃縮効果」が極めて有効であることを証明している。

[0130] 参考文献

化合物 (非可逆的反応機構による糖分解酵素阻害剤) の合成法に関連する文献

1. M. Ichikawa, et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2001, 11, 1769-1773.
2. M. Kuroguchi, et al., *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 44704-44712.
3. H. Hinou, et al. *Biochemistry* 2005, 44, 11669-11675.

リン脂質単分子膜被覆量子ドット (生体膜模倣蛍光性ナノ微粒子) の作製法と性質に関連する文献

4. T. Ohyanagi, et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 12057-12517.
5. R. S. Tan, et al., *ACS Chem. Biol.* 2015, 10, 2073-2086.

[0131] 実施例5 : キナーゼ阻害剤 (新規ソラフェニブ誘導体) を担持したリン脂質単分子膜被覆蛍光性ナノ微粒子の合成および肝細胞癌HepG2に対する抗腫瘍効果

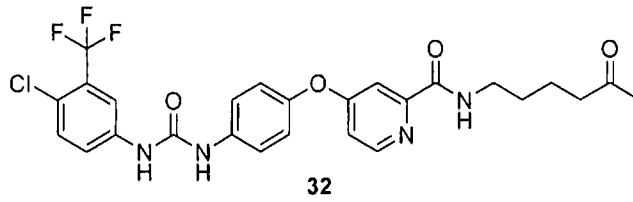
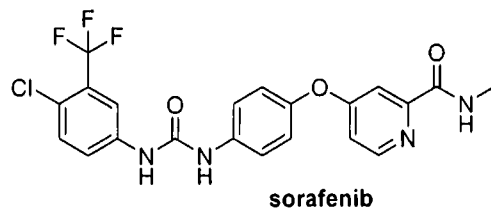
A : 新規ソラフェニブ誘導体 (32) の合成

肝細胞癌および腎細胞癌の治療薬であるソラフェニブは疎水性構造が原因で癌患者の血液中ではそのほとんどが血清アルブミンや α 1-酸性タンパク質と非特異的に吸着するため、癌組織（癌細胞）への取り込み効率が著しく低いことが明らかとなっている。このため標的キナーゼ群を発現する培養癌細胞による実験で見られたような $IC_{50}=4.5$ mMレベルの有意な抗腫瘍活性が、実際には疾患モデル動物や患者に対する *in vivo* の実験系においては充分発揮できていない可能性が高いことが最近指摘されている (Smith, M. A. and Houghton, P. Clin. Cancer Res. 2013, 19, 2828-2833)。

[0132] ソラフェニブ (BAY 43-9006) の活性構造による優れたキナーゼ阻害剤としての *in vitro* での基本性能 (例えばリコンビナント Raf-1、BRAF および VEGFR2 に対する K_i (IC_{50}) = 6.0, 22.0, および 90 nM、Wilhelm, S. M. et al., Cancer Res. 2004, 64, 7099-7109) を失うことなくリン脂質被覆ナノ微粒子に固定化できれば、本薬剤の難溶性を大幅に向上すると同時に、癌細胞の活発なエンドサイトシスによる細胞質内への効果的な取り込みを実現できる可能性が高い。ソラフェニブとキナーゼ (VEGFR2) の共結晶の3次元構造情報 (Kania, R. S., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2012, 109, 18281-18289) によるとソラフェニブのピリジン環の2-メチルカルバモイル基は VEGFR2 の活性サイト中心部から一部が露出して比較的自由度が大きい状態で結合していることが判明している。この結果より、Picolinic acid 領域での化学修飾は本来のキナーゼ阻害活性には影響しないと判断し、この位置でのソラフェニブの反応性リンカーでの化学修飾による化合物32の合成を計画した (下記合成スキーム参照)。化合物32はリン脂質単分子膜被覆ナノ微粒子への担持が可能な新規ソラフェニブ誘導体である。

[0133]

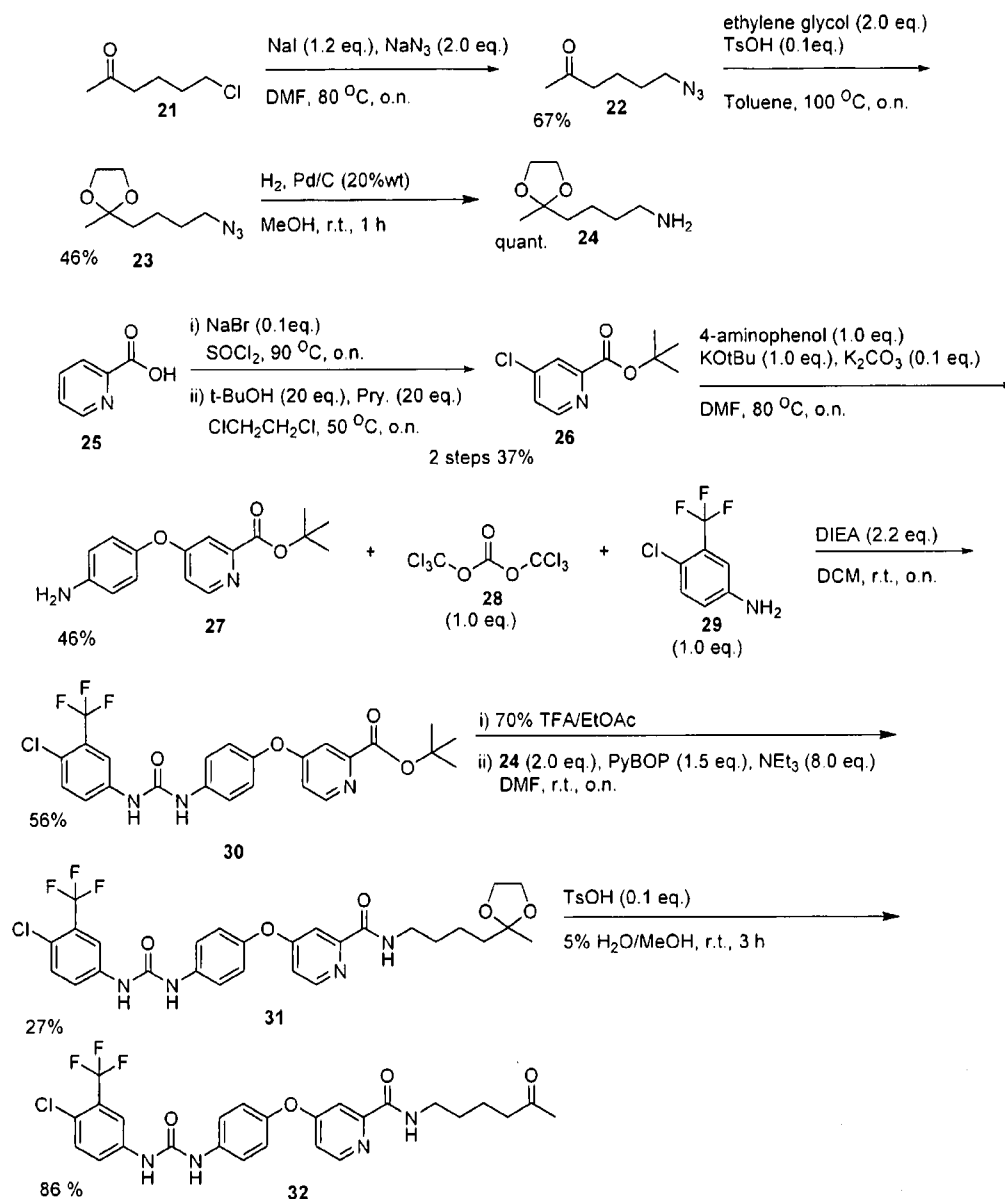
[化46]



[0134]

[化47]

新規ソラフェニブ誘導体 32 の合成スキーム



[0135] 化合物32のソラフェニブ基本構造30は既報 (Hammock, B. D. et al., Bioorganic & Med. Chem. Lett. 2013, 23, 3732-3737) を参考にして、Picolinic acid 25のメタ位のクロロ化後、カルボン酸の保護により化合物26を、さらに4-aminophenolとの縮合反応により化合物27として、bis(trichloromethyl) carbonate 28の存在下、化合物29との縮合により調製した。一方、ソラフェニブのPicolinic acid領域での修飾を目的として、購入可能な出発物質21が

ら誘導した機能性リンカー前駆体24を合成した。前述のソラフェニブ誘導体30と化合物24を1H-Benzotriazole-1-yloxytris(pyrrolidine-1-yl)phosphonium・hexafluorophosphate (PyBOP) の存在下で縮合して化合物31を誘導し、最終的にイソプロピリデンケタール基を脱保護することで目的とする化合物32を効率良く合成した。

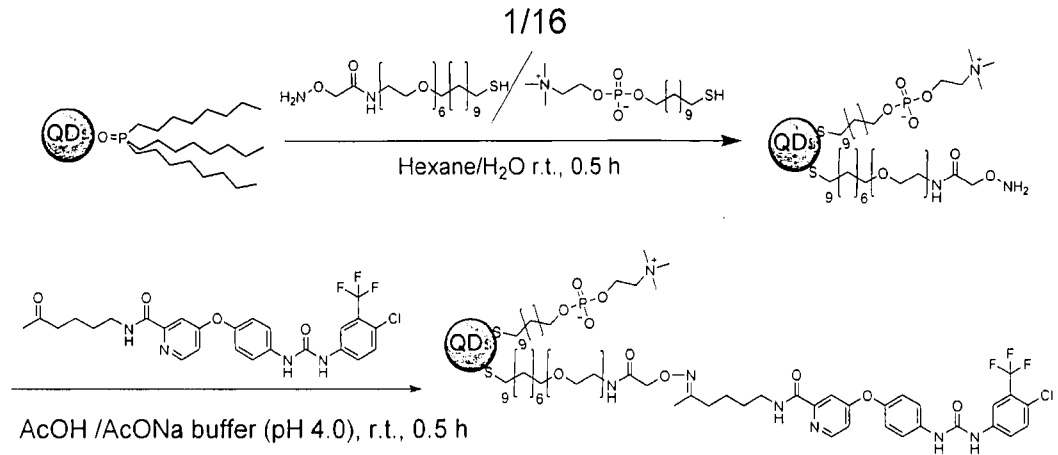
[0136] 化合物32の構造情報：¹H NMR (500 Hz, DMSO) δ ppm 9.22 (s, 1H), 9.00 (s, 1H), 8.78 (t, 1H), 8.51 (d, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.65 (d, 2H), 7.59 (m, 2H), 7.16 (d, 2H), 3.24 (t, 2H), 2.43 (t, 2H), 2.05 (s, 3H), 1.45 (m, 4H) ; ESI-MS 571.0406 [M+Na]⁺

[0137] B：新規ソラフェニブ誘導体 (32) を担持するリン脂質被覆蛍光性ナノ微粒子の合成

既報 (T. Ohyanagi, et al., J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 12057-12517) に従い、TOPO-QDs (1 mM, 50 ml/octane) に対しMeOH (50 ml)、i-PrOH (100 ml)を加えて遠心によりナノ微粒子を沈殿させ、溶媒を取り除き再びヘキサン(50 ml)を加えて分散させた。その後予め脱保護により活性化済みのアミノオキシリンカー (10 mM, 5 ml/MeOH)、ホスホリルコリンリンカー (100 mM, 8 ml/MeOH)、NaBH₄ (1 ml, 12 wt % in 14 N NaOH)、およびmilli Q (50ml)を加えて30分間攪拌し配位子交換をして反応性ナノ微粒子前駆体A0/PC SAM-QDs (A0/PC=1/16)とした。限外濾過(YM 50)により精製した後、化合物32とのカップリングに供した (下記スキーム参照)。図13のMALDI-TOFMSに示すとおり、反応はスムーズに進行し全てのアミノオキシ基の化合物32との置換反応が確認できた。

[0138] 化合物32を担持したリン脂質被覆蛍光性ナノ微粒子の作製法

[化48]



[0139] C : ソラフェニブ誘導体32を担持した蛍光性ナノ微粒子の癌細胞内イメージング

ヒト肝癌細胞 (HepG2, P8, ATCCより入手) を5000 cell/200 ml/wellで播種し、D-MEM High glucose, 10 % fetal bovine serum (FBS)中、37°C, 5% CO₂ 雰囲気化で48時間インキュベートをした後に、10 nM蛍光性ナノ微粒子 [化合物32担持型A0/PC SAM-QDs (A0/PC=1/16)]を添加、共培養してその後の24時間までの癌細胞生育過程を観察した。細胞は以下の方法で染色した後に蛍光顕微鏡にて観察した。培地を除去した後、細胞をOpti-MEMで3回洗浄後Lyso Tracker R Green DND-26 (200 ml, 5 nM/Opti-MEM)を加えて37°C、5% CO₂の条件下で30分インキュベートしてリソソームを染色した。その後Hoechst (2 ml, 0.1 ng/ml/Opti-MEM)を加えて37°C、5% CO₂雰囲気下でさらに15分間インキュベートして核を染色した後にOpti-MEMで3回洗浄してイメージングを行った (図14)。

[0140] 図14-AおよびB (拡大図) から明らかなように、ソラフェニブ誘導体32を担持したリン脂質被覆蛍光性ナノ微粒子 (赤色) はHepG2細胞との共培養開始から24時間後においてもリソソーム内に留まっていることが示された。この結果はソラフェニブが標的とするキナーゼ群はリソソーム内には分布せず、癌細胞質内に非局在化していることが予想されるため、エンドリソソームが

ら活性本体（ソラフェニブ誘導体）がナノ微粒子にリンカーによって固定化された状態で留まっているとすれば抗癌剤としてのソラフェニブの効果の向上は期待できないことを示唆している。しかし、ソラフェニブとナノ微粒子を連結するリンカー部に位置するオキシム結合はリソソーム内の酸性環境下（pH4~5）では比較的容易に加水分解されることも予想されるため、本薬剤のHepG2細胞に対する生育阻害効果（抗腫瘍活性）を低分子ソラフェニブ誘導体32と比較して評価することとした。

[0141] 2-D：ソラフェニブ誘導体32を担持した蛍光性ナノ微粒子の抗腫瘍効果（肝細胞癌殺傷作用）

Cell viability assayによる死細胞の定量：HepG2細胞（ 5×10^4 /100 ml/well）を37°C、5% CO₂雰囲気酸化で24時間インキュベートした後にそれぞれ90 mlの培地に対してQD（1000~10 nM, 10 ml/milli Q）、QD-anchored 32（1000~10 nM, 10 ml/milli Q）、およびソラフェニブ誘導体32（ 10×10^7 ~10 nM, 10 ml/DMSO）を加えて終濃度が100~1 nM（ただし、化合物32はIC₅₀値がmMレベルであることが推察されたので 1×10^6 ~1 nM）となるように調整した。共培養開始後48時間で培地成分により3回洗浄を行い、細胞培養液に対し10 mlのCell Counting Kit-8（Dojindo, Kumamoto, Japan）を加えて37°C、5% CO₂雰囲気酸化で1.5時間インキュベートし450 nmでの吸光度を測定することで癌細胞の生存率を定量した（図15）。

[0142] 驚くべきことに、ソラフェニブ誘導体32を担持したリン脂質被覆ナノ微粒子（QD-anchored 32）は図15に示す通り、強力に肝癌細胞HepG2の生育を阻害することが判明した（IC₅₀=33.5 nM）。一方、ナノ微粒子に担持していない低分子化合物32のみを癌細胞と共に培養した場合の抗腫瘍活性（IC₅₀=2.1 mM）はソラフェニブのHepG2細胞に対する抗腫瘍効果（IC₅₀=4.5 mM、Lin, L. et al., Cancer Res. 2006, 66, 11851-11858）とほぼ一致している。この実験結果はリン脂質被覆ナノ微粒子に担持することでソラフェニブの抗腫瘍活性は100倍以上増強できる（換言すると、患者への投与量を1/100程度に抑えることが可能である）ことを証明している。

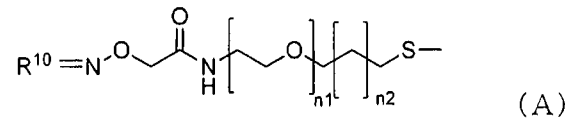
産業上の利用可能性

[0143] 本発明は、抗ガン剤に関連する分野において有用である。

請求の範囲

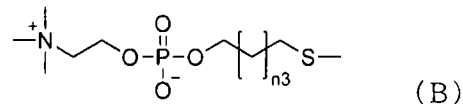
[請求項1] ナノ粒子及び前記ナノ粒子の表面に担持された下記一般式（A）で示されるリソソーム酵素阻害剤又はキナーゼ阻害剤及び下記一般式（B）で示されるリン脂質疑似物質を含む複合体。

[化1]



（一般式（A）中、 $n1$ は2～30の整数であり、 $n2$ は2～30の整数であり、 $-S-$ 末端がナノ粒子担持部位であり、 R^{10} は自殺基質部位又はキナーゼ阻害部位である。）

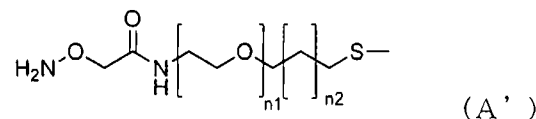
[化2]



（一般式（B）中、 $n3$ は2～30の範囲の整数であり、 $-S-$ 末端がナノ粒子担持部位である。）

[請求項2] ナノ粒子の表面に下記一般式（A'）で示される物質がさらに担持された請求項1に記載の複合体。

[化3]



（一般式（A'）中、 $n1$ は2～30の整数であり、 $n2$ は2～30の整数であり、 $-S-$ 末端がナノ粒子担持部位である。）

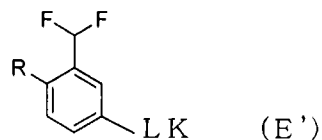
[請求項3] 一般式（A）、（B）及び（A'）において、 $n1$ と $n2$ の合計は3以上である、請求項1又は2に記載の複合体。

[請求項4] 自殺基質部位は、リソソーム酵素の活性中心と反応性を有する基（以下、反応性基）を含む、請求項1～3のいずれかに記載の複合体。

[請求項5] 自殺基質部位は、
N-アセチル-D-グルコサミン残基、N-アセチル-D-グガラクトサミン残基、ガラクトース残基、グルコース残基、フコース残基、マンノース残基、及びシアル酸残基、から成る群から選ばれる少なくとも1種の糖残基、並びにジフルオメチルアリール基、及びトリフルオメチルアリール基から成る群から選ばれる少なくとも1種の反応性基を有する請求項4に記載の複合体。

[請求項6] 自殺基質部位は、下記官能基を含む請求項4に記載の複合体。

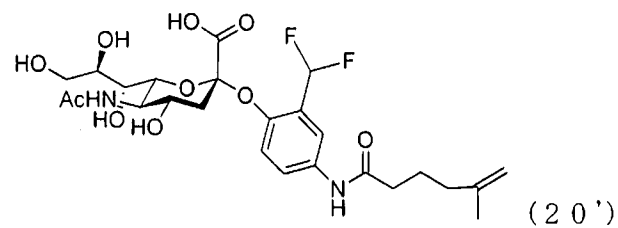
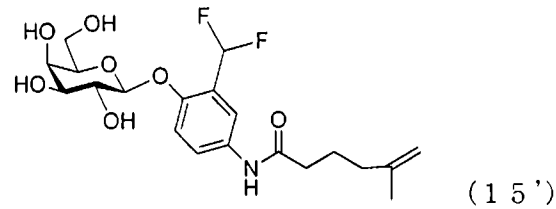
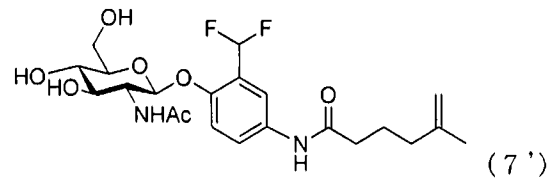
[化4]



(式中、Rは、N-アセチル-D-グルコサミン残基、N-アセチル-D-グガラクトサミン残基、ガラクトース残基、グルコース残基、フコース残基、マンノース残基、及びシアル酸残基、から成る群から選ばれる少なくとも1種の糖残基であり、LKはリンカーである。)

[請求項7] 自殺基質部位は、下記式で示されるいずれかの官能基を含む請求項4～6のいずれかに記載の複合体。

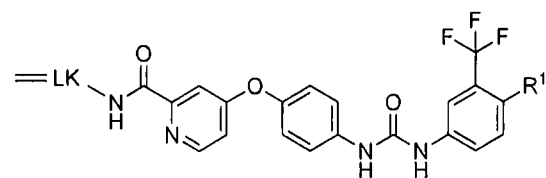
[化5]



[請求項8] キナーゼ阻害部位は、キナーゼと反応性を有する基（以下、細胞膜キナーゼ反応性基）を含む、請求項1～3のいずれかに記載の複合体。

[請求項9] キナーゼ阻害部位は、下記式で示されるいずれかの官能基を含む請求項8に記載の複合体。

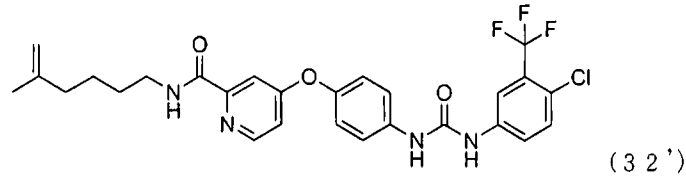
[化6]



(式中、LKはリンカーを示し、R¹は電子吸引性基である。)

[請求項10] キナーゼ阻害部位は、下記式で示される官能基を含む請求項8又は9に記載の複合体。

[化7]



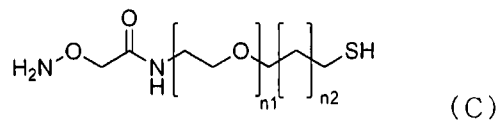
- [請求項11] 一般式 (A) で示されるリソソーム酵素阻害剤と一般式 (B) で示されるリン脂質疑似物質のモル比率が 1 : 100 ~ 10 : 1 の範囲である、請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の複合体。
- [請求項12] 一般式 (A) で示されるリソソーム酵素阻害剤と一般式 (A') で示される物質のモル比率が 1 : 100 ~ 100 : 0 の範囲である、請求項 2 ~ 11 のいずれかに記載の複合体。
- [請求項13] 前記ナノ粒子は、金属ナノ粒子又は半導体ナノ粒子である、請求項 1 ~ 12 のいずれかに記載の複合体。
- [請求項14] 金属ナノ粒子は、金ナノ粒子、白金ナノ粒子、銀ナノ粒子、及び鉄磁性ナノ粒子から成る群から選ばれる少なくとも1種の粒子である請求項 13 に記載の複合体。
- [請求項15] 半導体ナノ粒子は、量子ドットである請求項 13 に記載の複合体。
- [請求項16] 前記ナノ粒子は、粒子径が 0.1 ~ 100 nm の範囲である請求項 1 ~ 15 のいずれかに記載の複合体。
- [請求項17] 請求項 1 ~ 16 のいずれかに記載の複合体を有効成分として含有する抗ガン剤。
- [請求項18] 前記抗ガン剤は、乳癌、前立腺癌、肝細胞癌、膵癌、大腸癌、卵巣癌、腎癌、肺癌、または脳腫瘍に対する抗ガン剤である請求項 17 に記載の抗ガン剤。
- [請求項19] 請求項 1 ~ 16 のいずれかに記載の複合体の製造方法であって、下記一般式 (C) で示される阻害剤架橋前駆体 X 及び下記一般式 (D) で示されるリン脂質疑似物質前駆体とコロイド状ナノ粒子とを混合して、ナノ粒子の表面に阻害剤架橋前駆体 X 及びリン脂質疑似物質を

担持した表面修飾ナノ粒子を得る工程（１）、
得られた表面修飾ナノ粒子にリソソーム酵素阻害剤前駆体Ｙ又はキナーゼ阻害剤前駆体Ｚを混合して、阻害剤架橋前駆体Ｘと連結させて下記一般式（Ａ）で示されるリソソーム酵素阻害剤又はキナーゼ阻害剤を形成する、

但し、リソソーム酵素阻害剤前駆体Ｙは、リソソーム酵素の活性中心と反応性を有する基（以下、反応性基）を含む自殺基質部位を含み、キナーゼ阻害剤前駆体Ｚはキナーゼと反応性を有する基を含むキナーゼ阻害部位を含む、

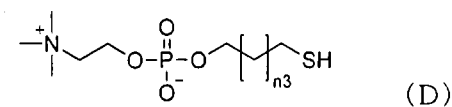
請求項１～１６のいずれかに記載の複合体を得る工程（２）、
を含む前記方法。

[化８]



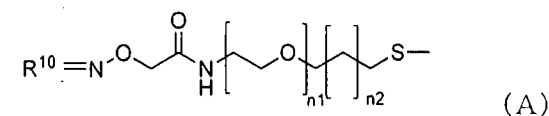
（一般式（Ｃ）中、 n_1 は２～３０の整数であり、 n_2 は２～３０の整数である。）

[化９]



（一般式（Ｄ）中、 n_3 は２～３０の範囲の整数である。）

[化１０]

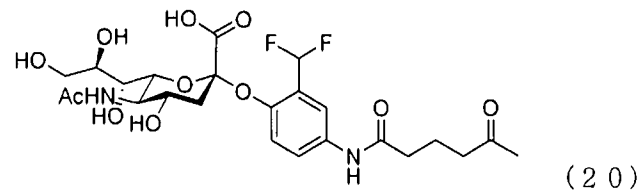
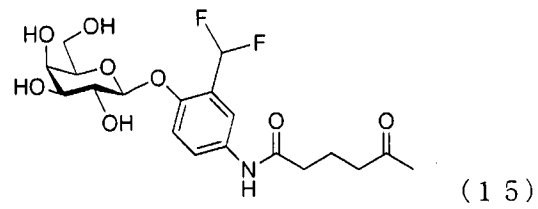
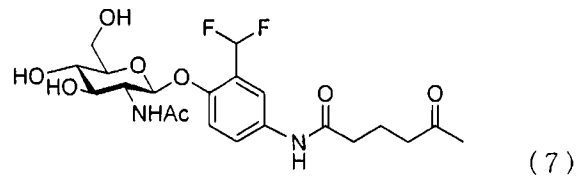


（一般式（Ａ）中、 n_1 は２～３０の整数であり、 n_2 は２～３０の整数であり、 ---S--- 末端がナノ粒子担持部位であり、 R^{10} は自殺基質部位又はキナーゼ阻害部位である。）

[請求項２０] リソソーム酵素阻害剤前駆体Ｙが、下記式で示されるいずれかの化合

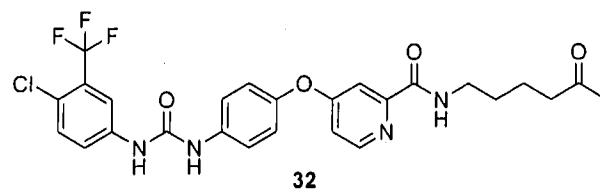
物である請求項 19 に記載の製造方法。

[化11]

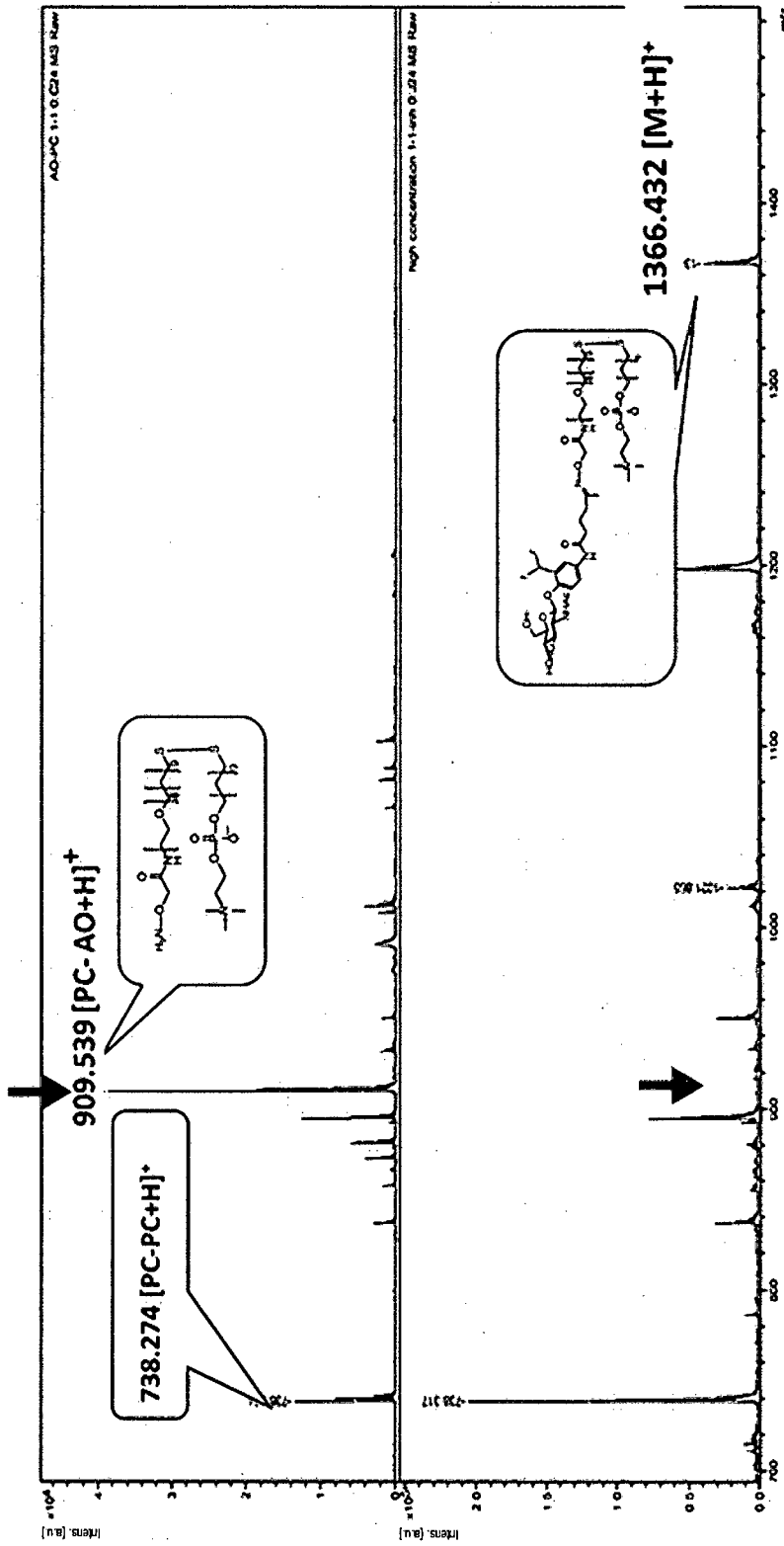


[請求項21] キナーゼ阻害剤前駆体 Z が、下記式で示される化合物 (32) である
請求項 19 に記載の製造方法。

[化12]



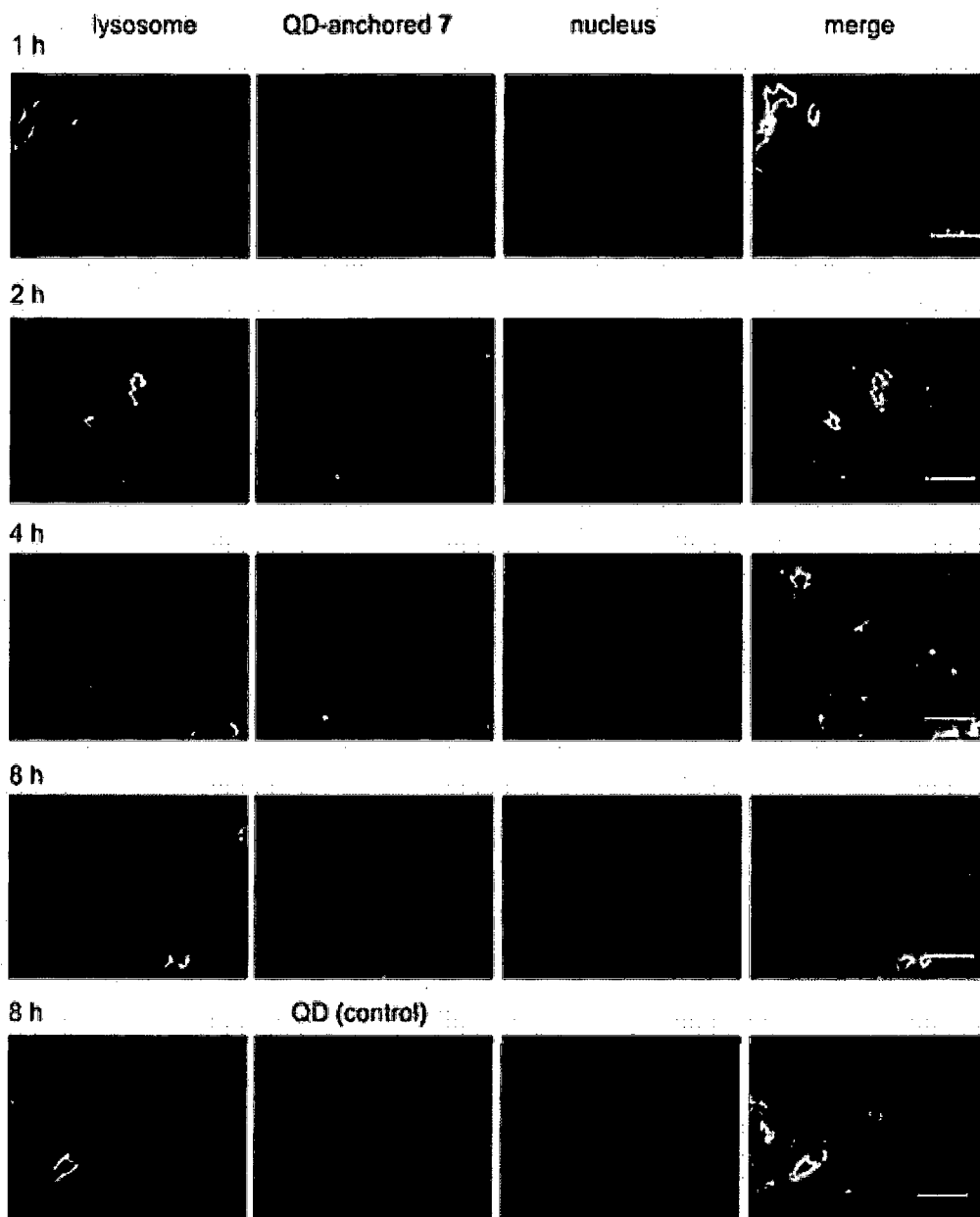
[1]




フリーの AO/PC のピークが消えたことから反応が完全に進行したと判断した

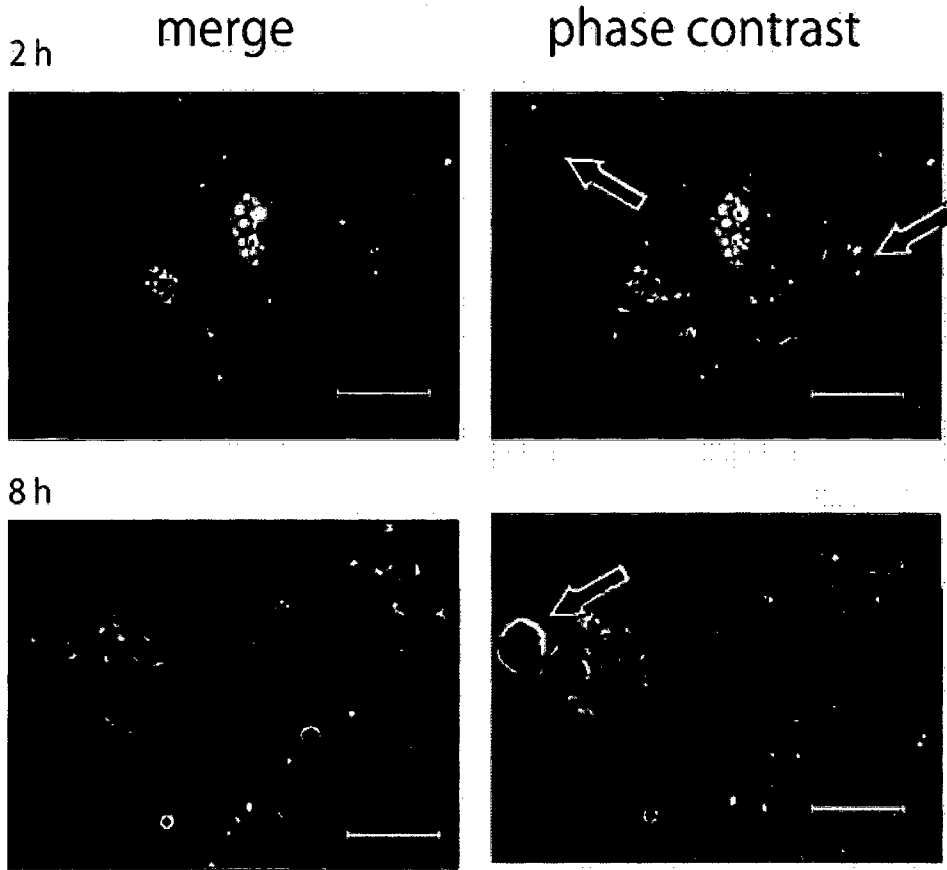
[] 2a


a



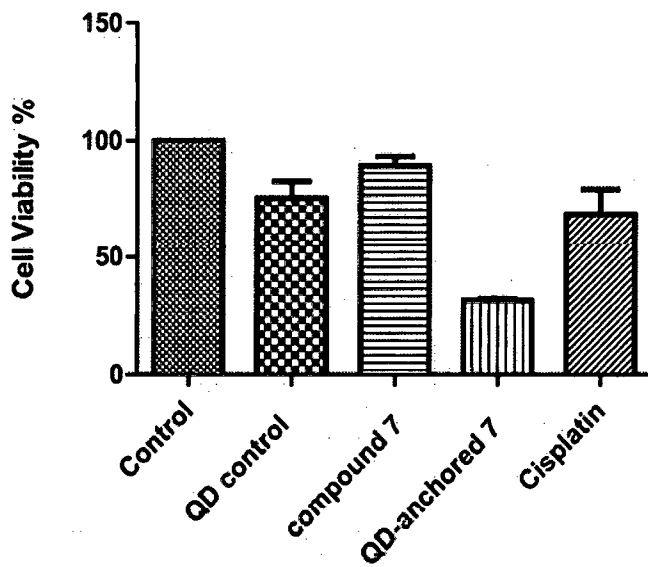
[ 2b]

b



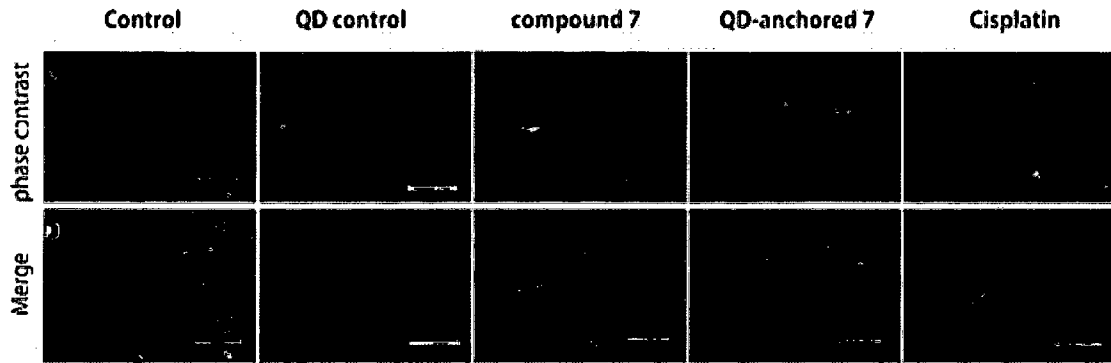
[ 3a]

a



[3b]

b

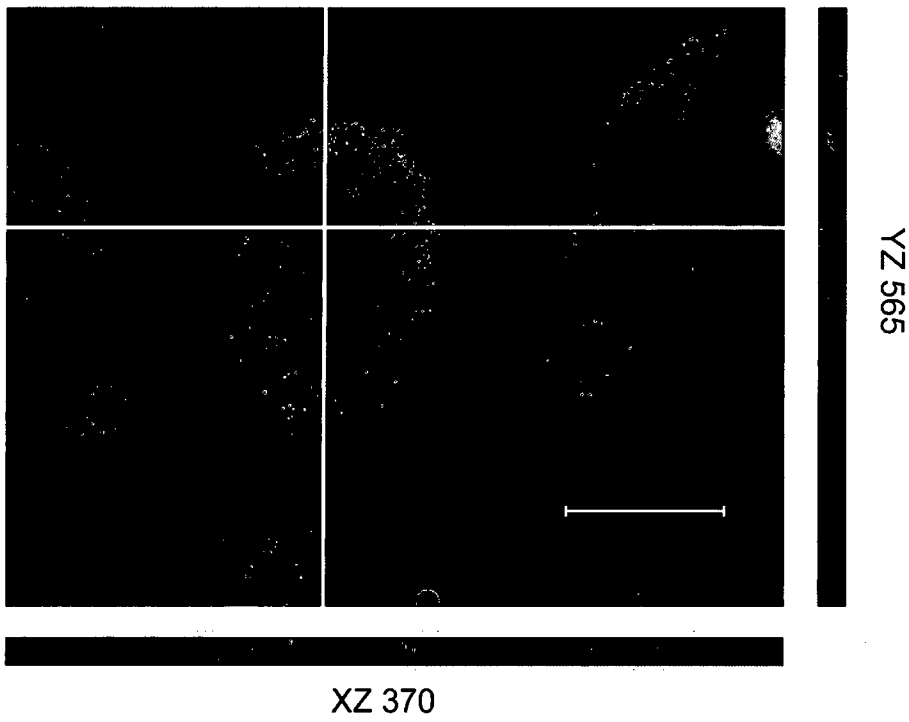


[3c]

C

8 h

QD-anchored 7



[] 3d

d

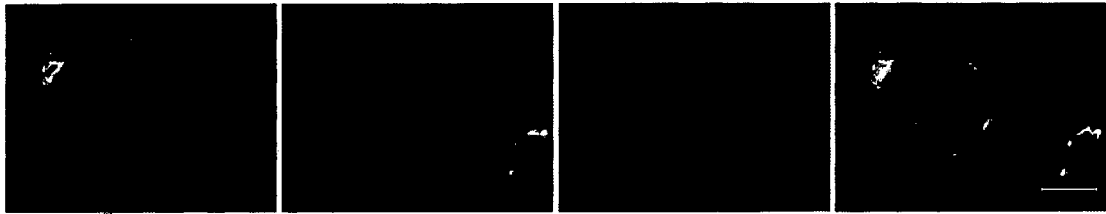
lysosome

QD

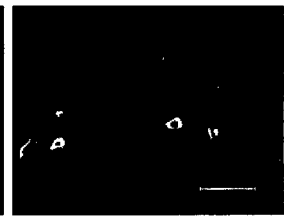
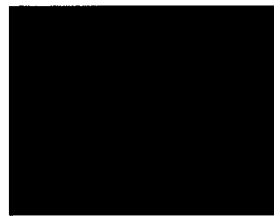
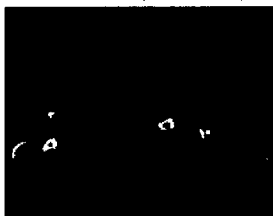
nucleus

marge

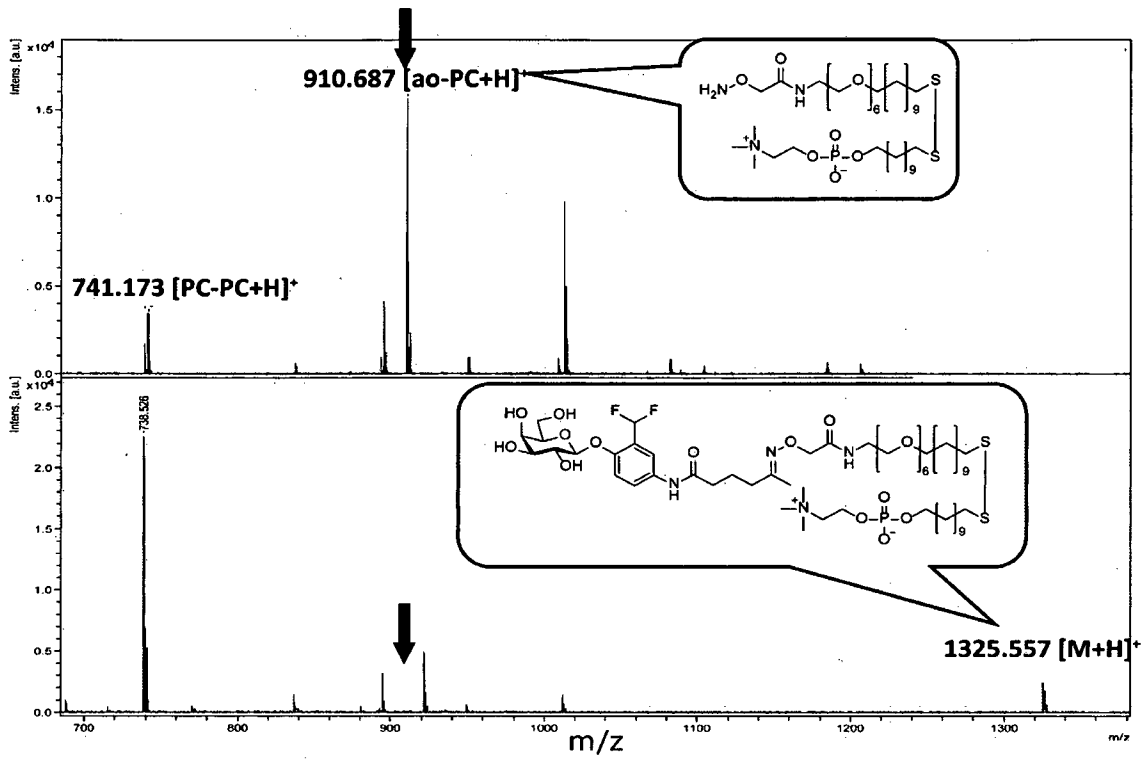
QD-anchored 7



QD (control)

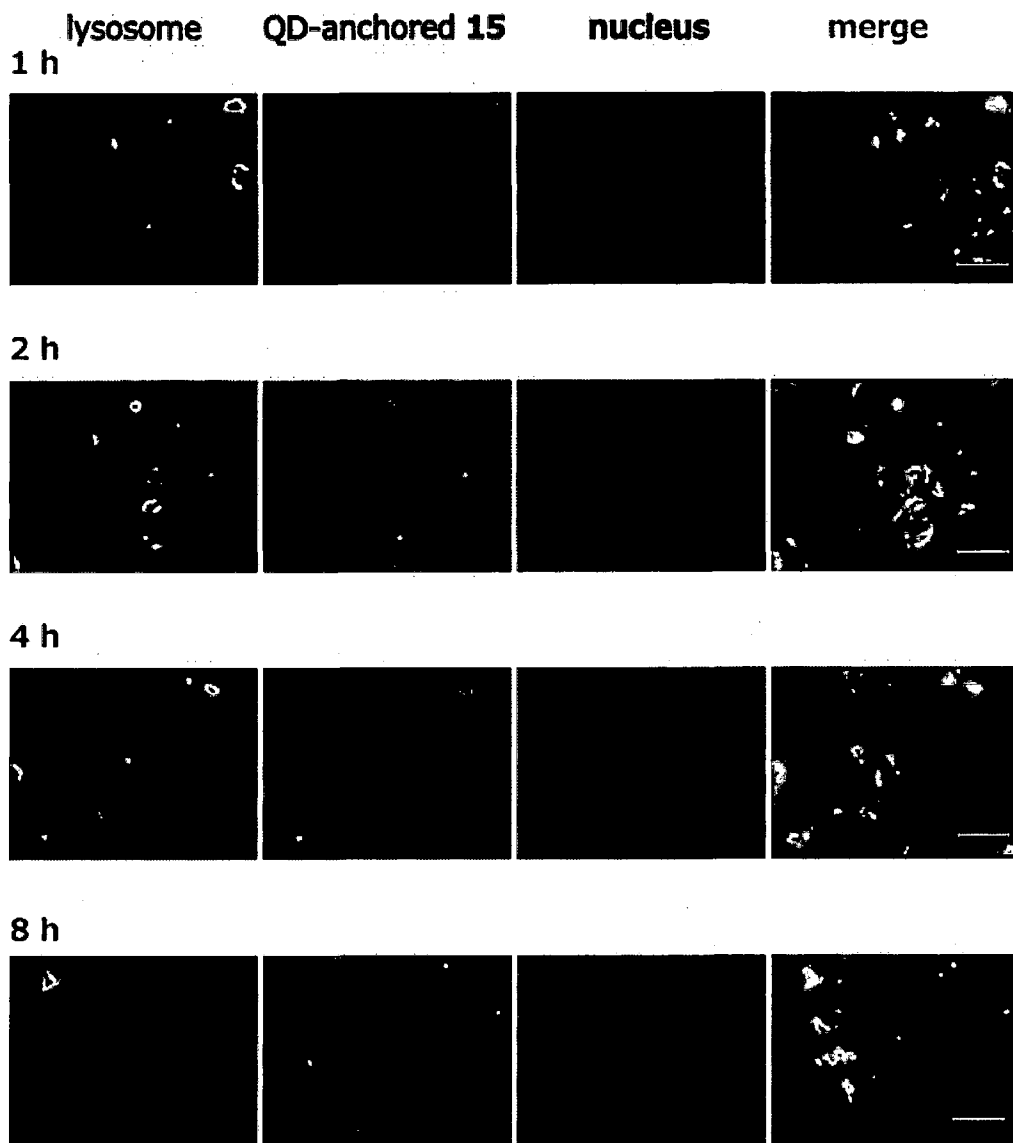


[図 4]



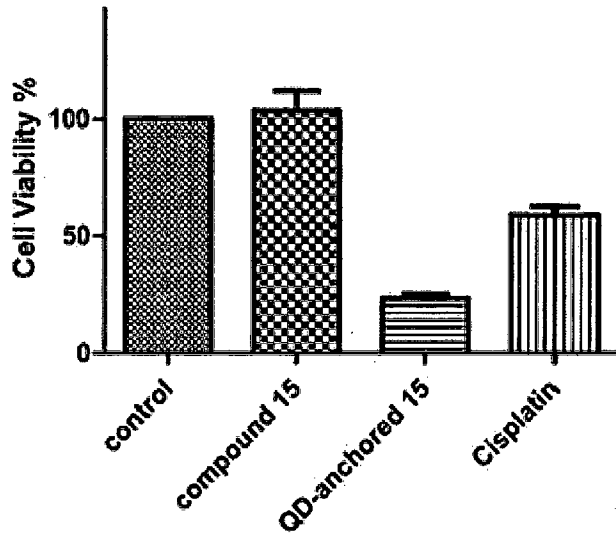
フリーの AO/PC のピークが消えたことから反応が完全に進行したと判断した

[] 5]

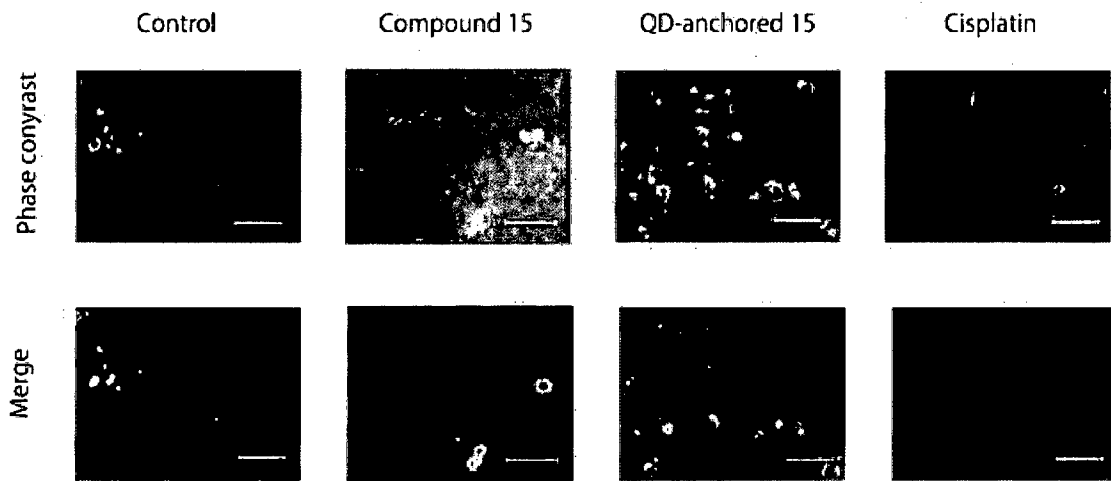


[Fig 6]

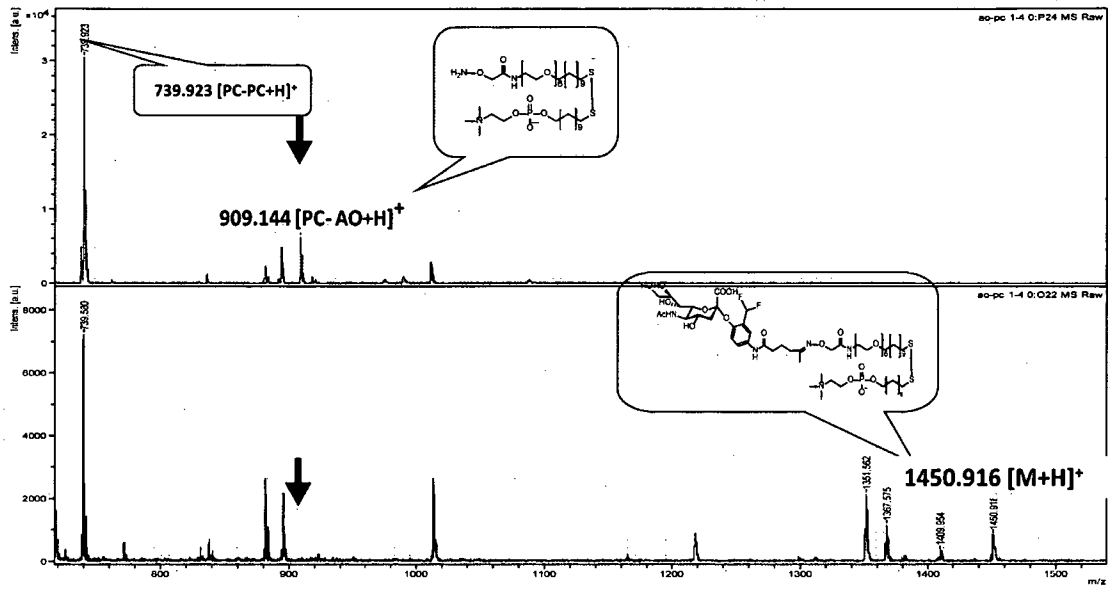
a



b

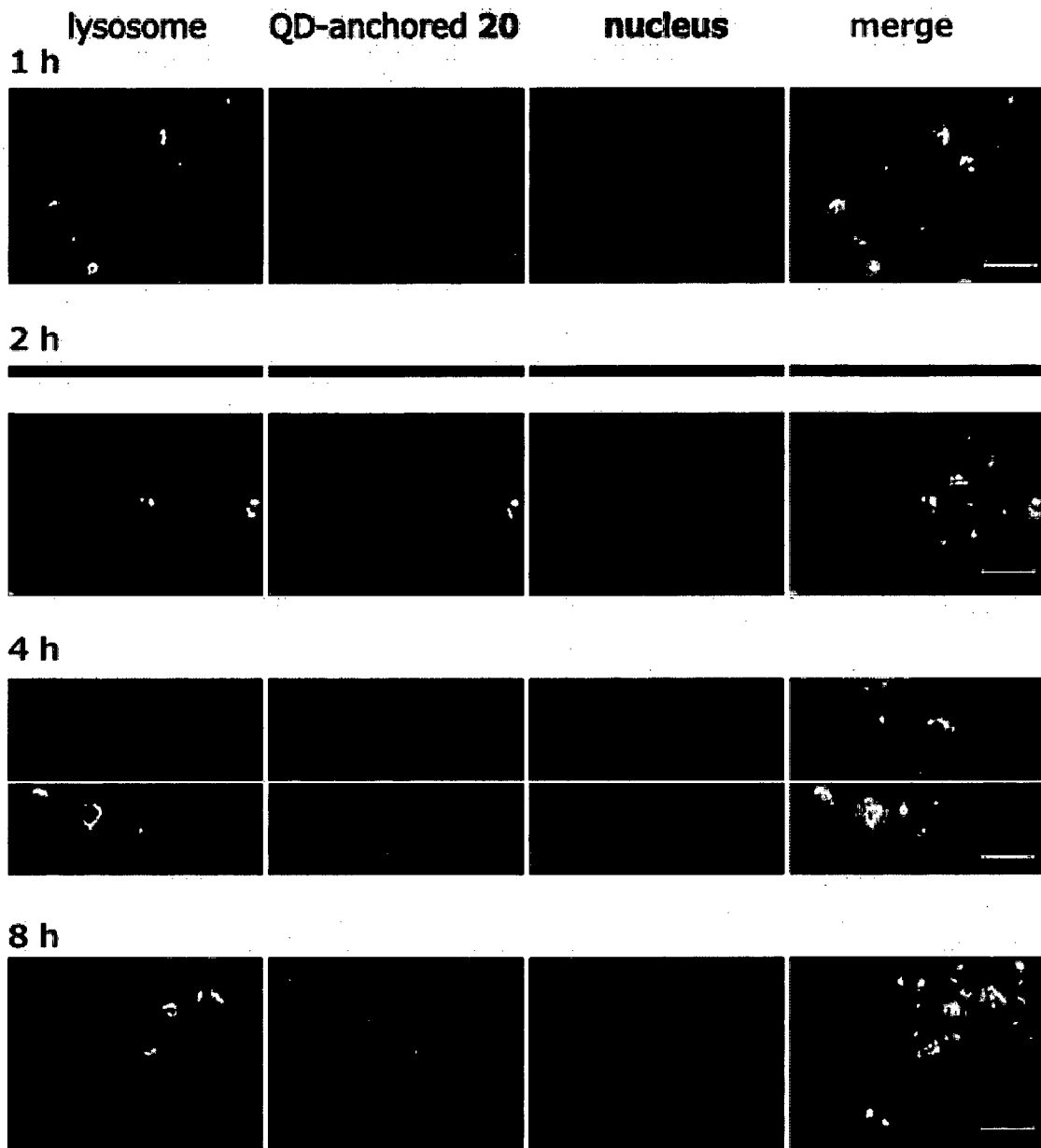


[7]

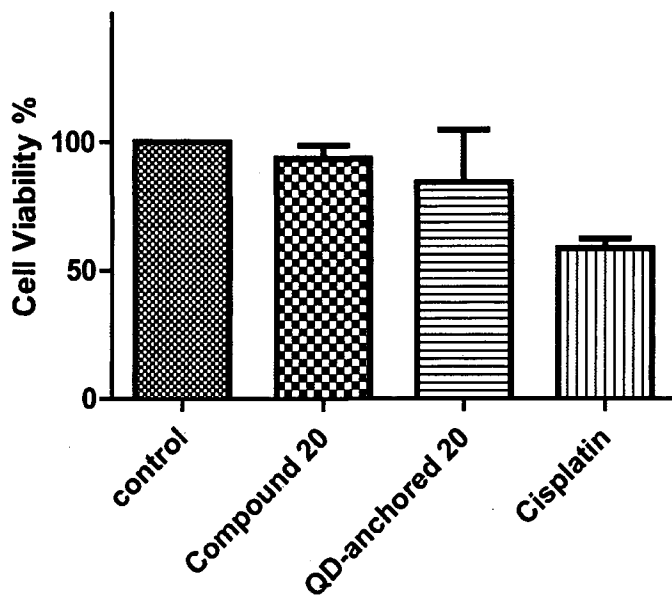


フリーの AO/PC のピークが消えたことから反応が完全に進行したと判断した

[] 8

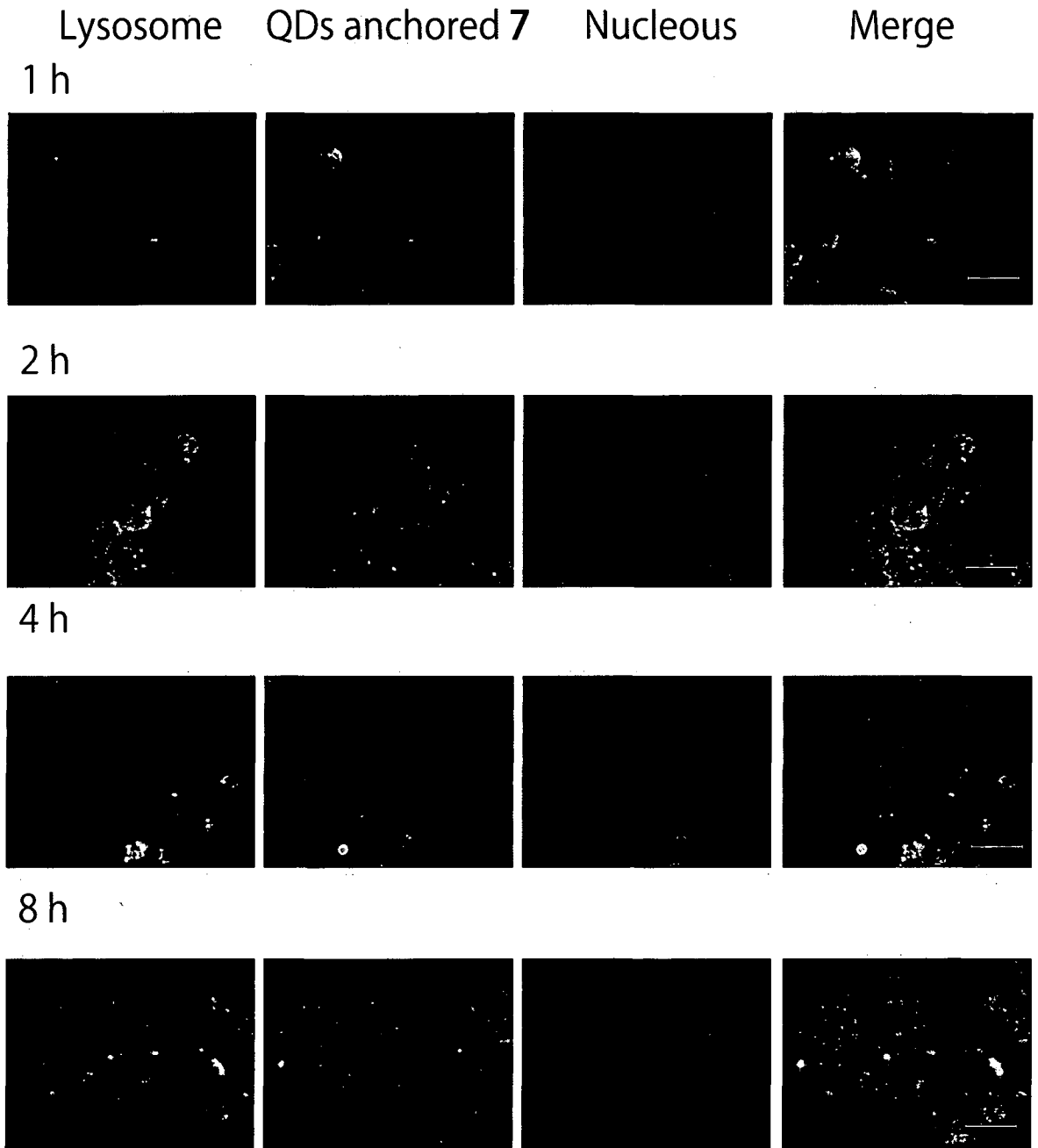


[9]



[10A]

A

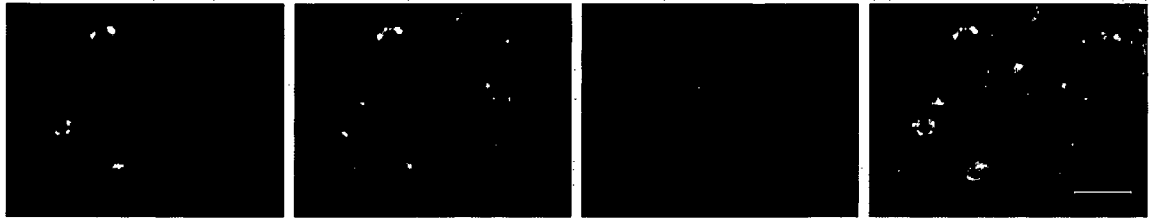


[10B]

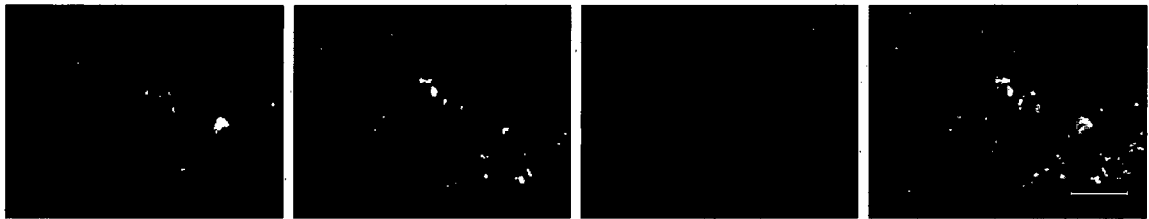
B

Lysosome QD anchored 15 Nucleous Merge

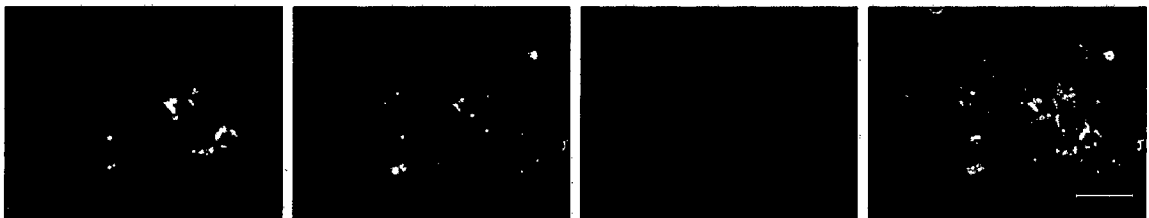
1 h



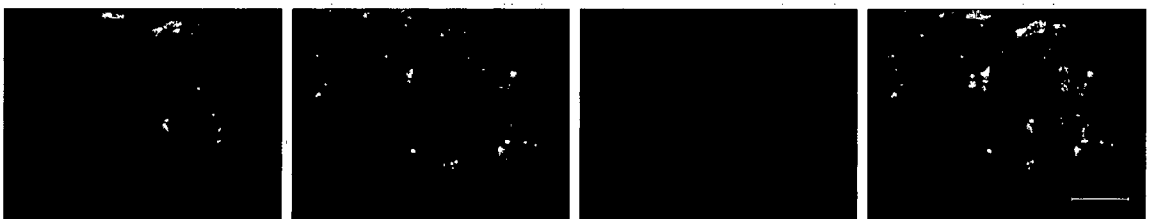
2 h



4 h



8 h

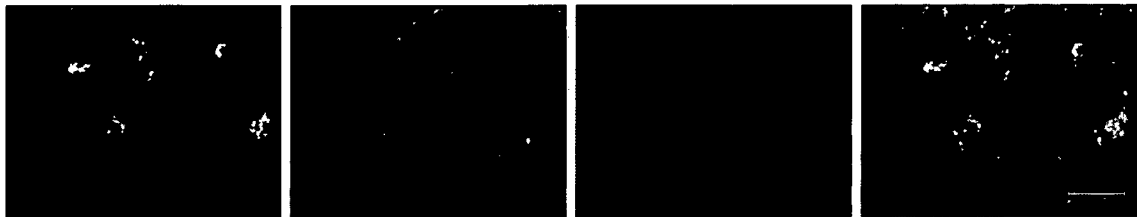


[] 10C

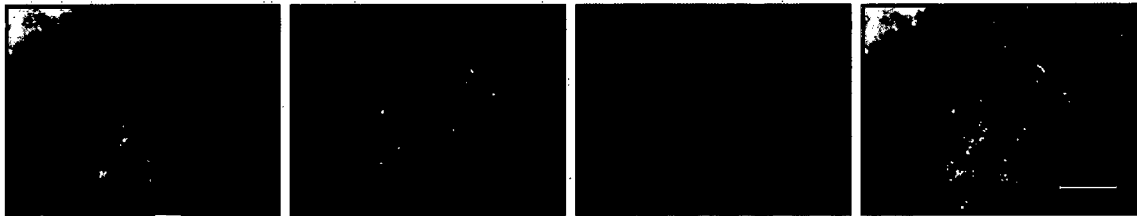
C

Lysosome QDs anchored 20 Nucleous Merge

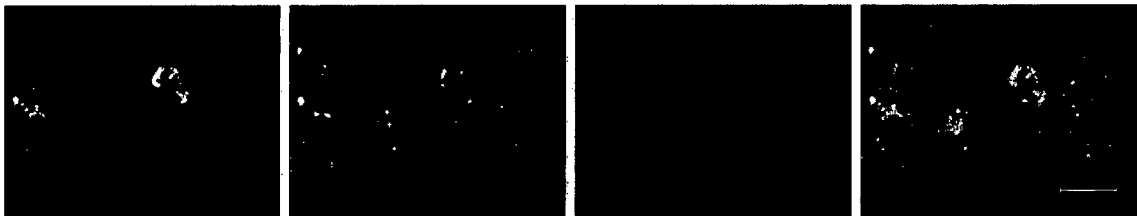
1 h



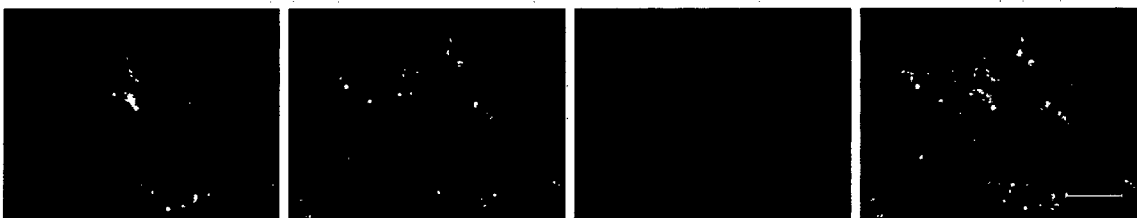
2 h



4 h

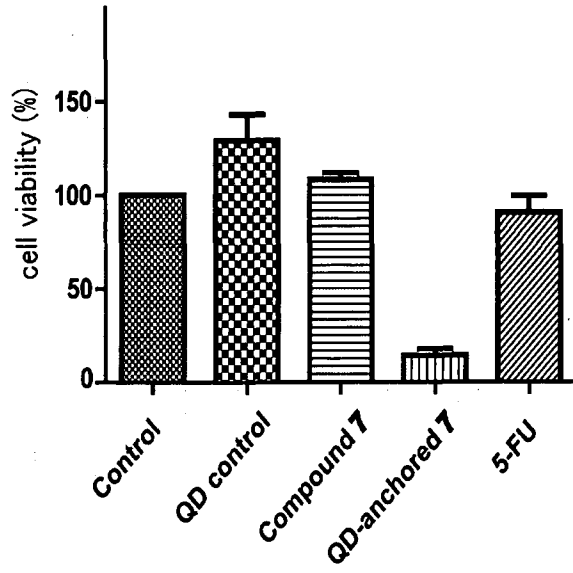


8 h

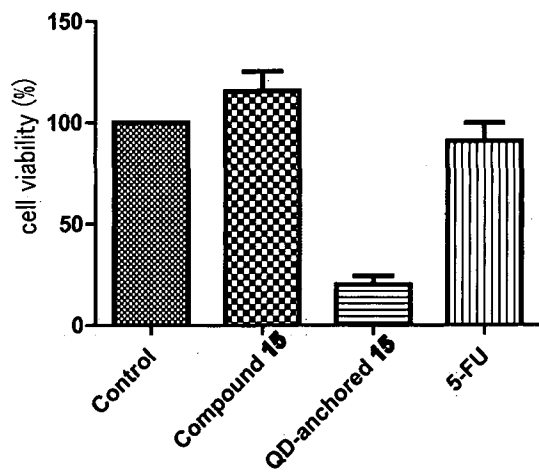


[11]

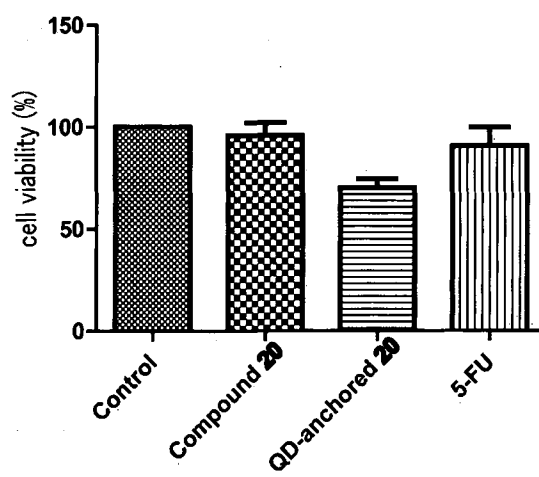
A



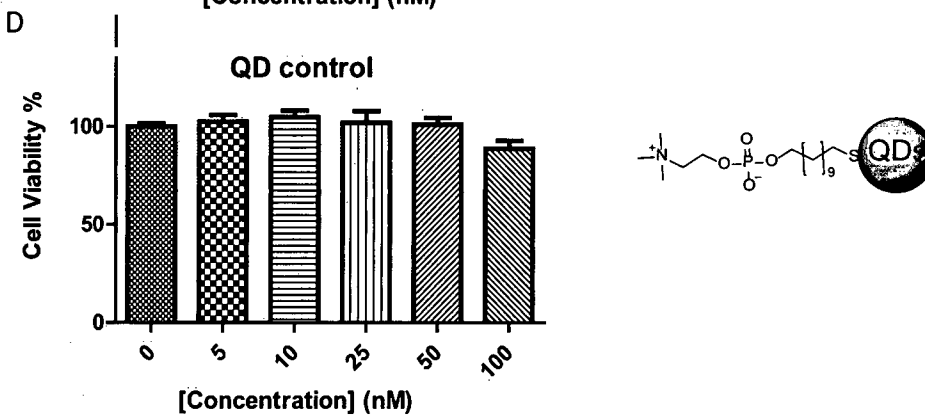
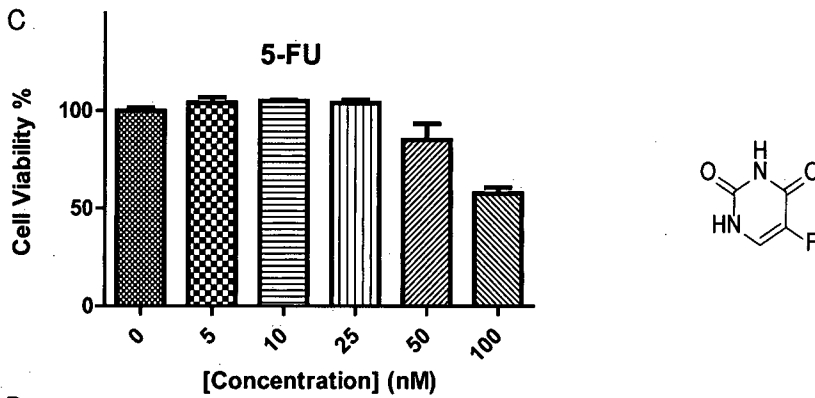
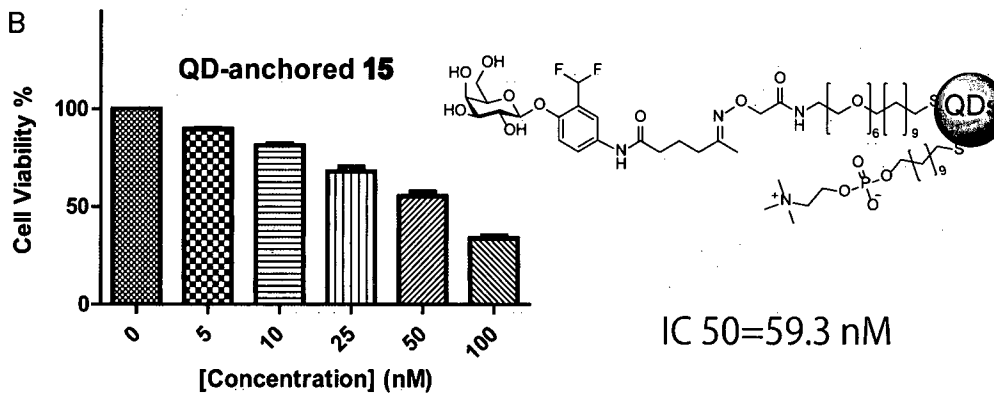
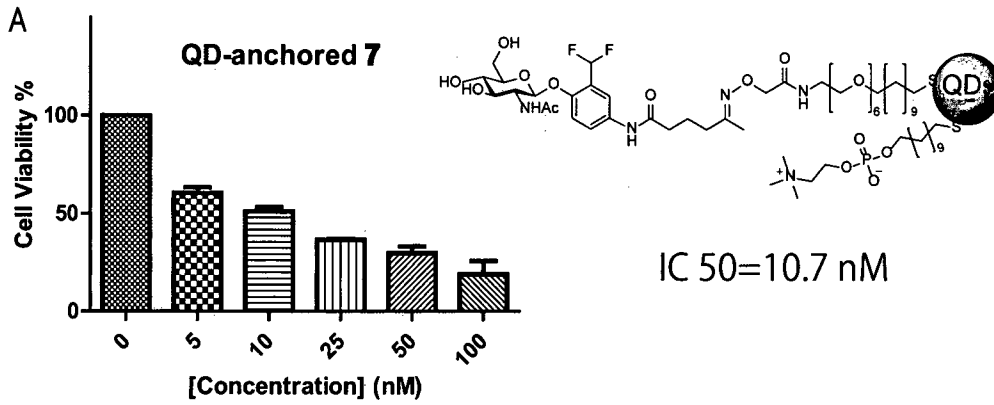
B



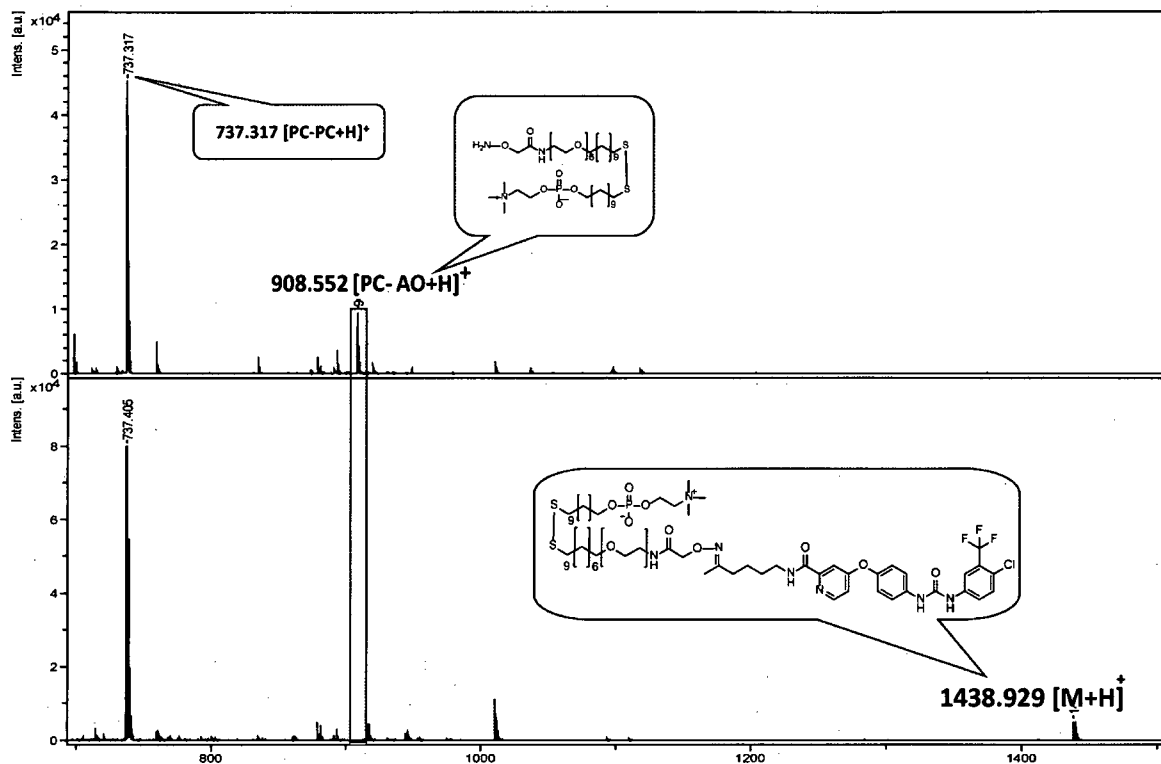
C



[12]



[13]



[14A]

A

Lysosome QD-anchored **32** Nucleus Merge

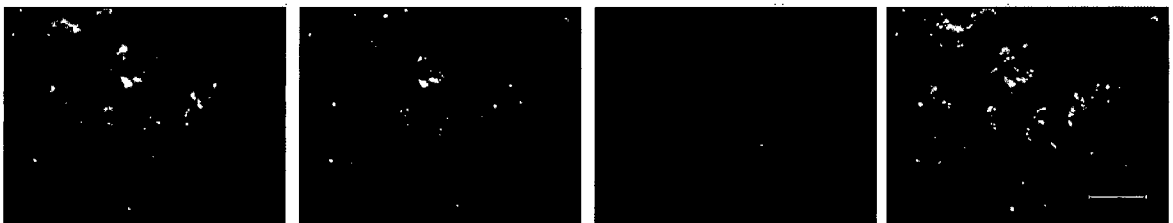
0.5 h



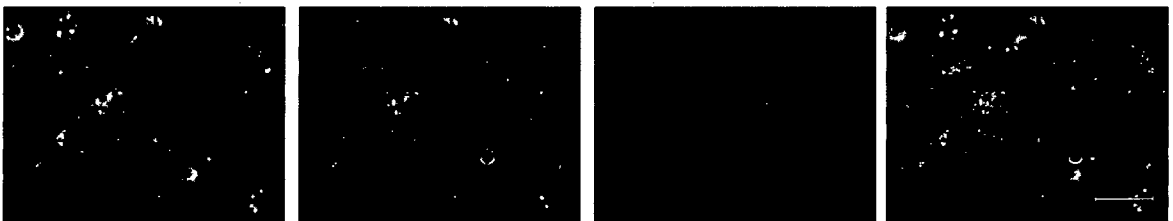
2 h



4 h



8 h



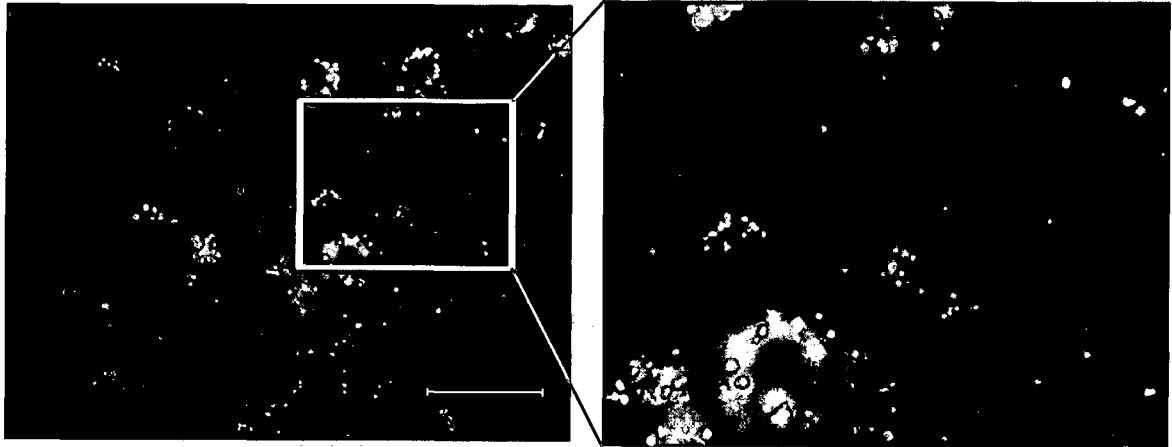
24 h



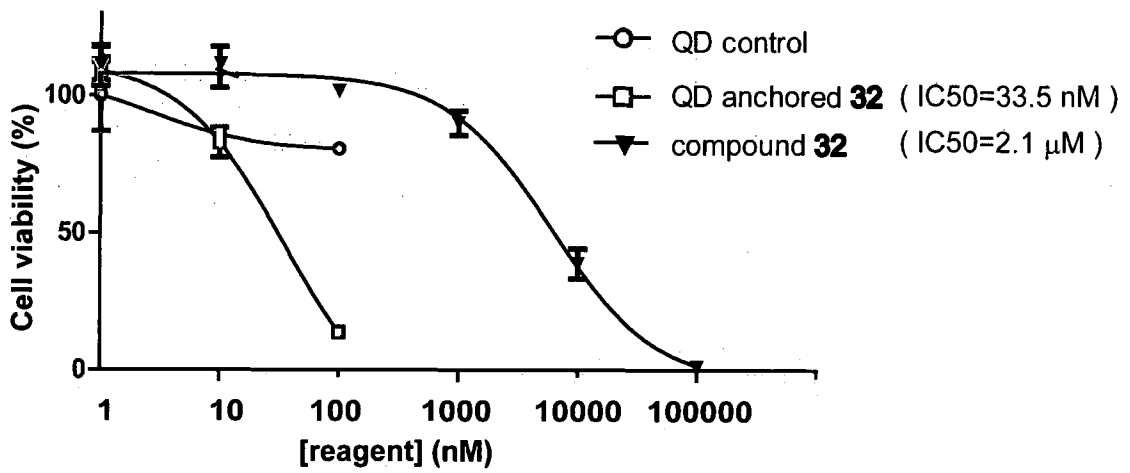
[14B]

B

QD-anchored **32**



[15]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2017/003880

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
See extra sheet.

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)
C12N9/99, A61K9/14, A61K31/7004, A61K45/00, A61K47/24, A61K47/34, A61K47/50, A61P35/00, A61P43/00, B82Y5/00, B82Y20/00, B82Y25/00, B82Y30/00, B82Y40/00

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus (JDreamIII),
CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TAN, Roger S., Rapid Endolysosomal Escape and Controlled Intracellular Trafficking of Cell Surface Mimetic Quantum-Dots-Anchored Peptides and Glycopeptides, ACS Chem. Biol., 2015.06.24, Vol.10, 2073-2086	1-21
A	JP 2007-254452 A (Kyushu University), 04 October 2007 (04.10.2007), & US 2009/0136579 A1 & WO 2007/119601 A2 & CA 2550702 A & KR 10-2007-0096729 A & BR PI0602338 A & AR 60042 A & CL 7812007 A & MX PA06007070 A & PE 13372007 A & TW 200815053 A & CA 2550702 A1	1-21

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 03 April 2017 (03.04.17)	Date of mailing of the international search report 18 April 2017 (18.04.17)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/003880

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2014/197937 A1 (UNIVERSITY OF SOUTH AUSTRALIA), 18 December 2014 (18.12.2014), & JP 2016-527483 A & US 2016/0130661 A & EP 3008210 A & AU 2014280846 A & CN 105658810 A	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/003880

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

*C12N9/99(2006.01)i, A61K9/14(2006.01)i, A61K31/7004(2006.01)i,
A61K45/00(2006.01)i, A61K47/24(2006.01)i, A61K47/34(2017.01)i,
A61K47/50(2017.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i,
B82Y5/00(2011.01)i, B82Y20/00(2011.01)i, B82Y25/00(2011.01)i,
B82Y30/00(2011.01)i, B82Y40/00(2011.01)i*

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

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. 特別ページ参照		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C12N9/99, A61K9/14, A61K31/7004, A61K45/00, A61K47/24, A61K47/34, A61K47/50, A61P35/00, A61P43/00, B82Y5/00, B82Y20/00, B82Y25/00, B82Y30/00, B82Y40/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2017年 日本国実用新案登録公報 1996-2017年 日本国登録実用新案公報 1994-2017年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus (JDreamIII) Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	TAN, Roger S., Rapid Endolysosomal Escape and Controlled Intracellular Trafficking of Cell Surface Mimetic Quantum-Dots-Anchored Peptides and Glycopeptides, ACS Chem. Biol., 2015.06.24, Vol.10, 2073-2086	1-21
A	JP 2007-254452 A (国立大学法人九州大学) 2007.10.04, & US 2009/0136579 A1 & WO 2007/119601 A2 & CA 2550702 A & KR 10-2007-0096729 A & BR PI0602338 A & AR 60042 A & CL 7812007 A & MX PA06007070 A & PE 13372007 A	1-21
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 03.04.2017	国際調査報告の発送日 18.04.2017	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/J P） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 川口 裕美子 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4N 9829

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	& TW 200815053 A & CA 2550702 A1 WO 2014/197937 A1 (UNIVERSITY OF SOUTH AUSTRALIA) 2014. 12. 18, & JP 2016-527483 A & US 2016/0130661 A & EP 3008210 A & AU 2014280846 A & CN 105658810 A	1-21

発明の属する分野の分類

C12N9/99(2006.01)i, A61K9/14(2006.01)i, A61K31/7004(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61K47/24(2006.01)i, A61K47/34(2017.01)i, A61K47/50(2017.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, B82Y5/00(2011.01)i, B82Y20/00(2011.01)i, B82Y25/00(2011.01)i, B82Y30/00(2011.01)i, B82Y40/00(2011.01)i