(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2010-523656
(P2010-523656A)
(43)公表日　平成22年7月15日(2010.7.15)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 47/34	(2006.01)	A61K	47/34	ZNA	4B024
C12N 15/113	(2010.01)	C12N	15/00	ZBPG	4C076
C07K 14/475	(2006.01)	C07K	14/475		4C084
C07K 14/505	(2006.01)	C07K	14/505		4C086
C07K 14/52	(2006.01)	C07K	14/52		4H045

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 98 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2010-503004 (P2010-503004)
(86)(22)出願日　平成20年3月12日 (2008.3.12)
(85)翻訳文提出日　平成21年12月3日 (2009.12.3)
(86)国際出願番号　PCT/US2008/003422
(87)国際公開番号　WO2008/127532
(87)国際公開日　平成20年10月23日 (2008.10.23)
(31)優先権主張番号　60/923,136
(32)優先日　平成19年4月12日 (2007.4.12)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　598038968
エモリー・ユニバーシティ
アメリカ合衆国ジョージア州３０３２２，アトランタ，ノース・ディケーター・ロード　１７８４，スイート　１３０
(71)出願人　505477235
ジョージア　テック　リサーチ　コーポレイション
アメリカ合衆国　ジョージア　３０３３２－０４１５，　アトランタ，　エヌ．ダブリュー．，　テンス　ストリート　５０５
(74)代理人　100107489
弁理士　大塩　竹志

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ミセルおよび粒子を用いた、活性物質の送達のための新規の戦略

(57)【要約】
本発明は、被験体に送達するための活性物質をカプセル化するために用いられ得る生分解性の粒子（例えば、三次元粒子）およびミセルを提供する。本発明はさらに、このような粒子およびミセルを生成および送達するための方法を提供する。さらに、本発明は、これらの新規の粒子およびミセルの使用を含むワクチン接種の戦略を提供する。具体的には、本発明は、重合体の骨格内にケタール基を含む新規の型の疎水性重合体に関する。ここで、上記ケタール基は、両方の酸素原子が上記重合体の骨格内に位置する様式で、配置されている。

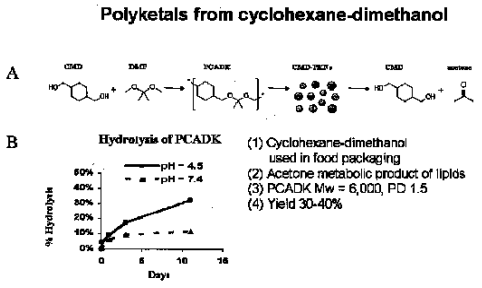


FIG. 19

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＰＫ１、ＰＫ２、ＰＫ３、ＰＫ４、ＰＫ５またはＰＫ６である、ポリケタール重合体。
【請求項２】
請求項１に記載のポリケタール重合体を含む生分解性粒子。
【請求項３】
１つ以上の活性物質をさらに含む、請求項２に記載の粒子。
【請求項４】
（ａ）１つ以上のＰＫ１、ＰＫ２、ＰＫ３、ＰＫ４、ＰＫ５またはＰＫ６、および
（ｂ）活性物質、
を含む、生分解性粒子。
【請求項５】
ナノ粒子またはマイクロ粒子である、請求項２または４に記載の粒子。
【請求項６】
約５０ｎｍ～１０００μｍのサイズまたは約２００ｎｍ～６００μｍのサイズである、請求項２または４に記載の粒子。
【請求項７】
前記活性物質が、治療剤、予防剤または診断用薬剤である、請求項３または４に記載の粒子。
【請求項８】
前記治療剤が、免疫調節剤である、請求項７に記載の粒子。
【請求項９】
請求項８に記載の粒子であって、前記免疫調節剤が、
ａ．ＴＬＲ２、３、４、５、７、８、９、１０および１１のいずれかに対するリガンドまたはその組み合わせ、
ならびに
ｂ．樹状細胞、マクロファージまたは抗原提示細胞内の調節経路のインヒビター
ｃ．ＲＩＧ－１、ｄｅｃｔｉｎ－１およびＤＣ－ＳＩＧＮを含む任意のＣ型レクチン、またはキャタピラタンパク質に対するリガンド
からなる群から選択される、粒子。
【請求項１０】
請求項９に記載の粒子であって、前記インヒビターが、（ａ）ＥＲＫ、ｃ－Ｆｏｓ、Ｆｏｘｐ３、ＰＩ３キナーゼ、Ａｋｔ、ＪＮＫ、ｐ３８、ＮＦ－Ｋｂ、ＳＴＡＴ　１、ＳＴＡＴ２、ＩＲＦ３、ＩＲＦ７、ＩＦＮ－αのシグナリングのインヒビター；または（ｂ）ＳＯＣＳ　１、２、３、もしくは他のＳＯＣＳタンパク質のインヒビターからなる群から選択される、粒子。
【請求項１１】
前記活性物質が、タンパク質、ペプチド、炭水化物、核酸、低分子、イメージング剤、ワクチン抗原および／またはワクチンである、請求項３または４に記載の粒子。
【請求項１２】
前記タンパク質が、増殖因子、サイトカイン、抗酸化タンパク質（ａｎｔｏｘｉｄａｎｔ　ｐｒｏｔｅｉｎ）、抗体、エリスロポエチン（ＥＰＯ）、レセプターリガンドである、請求項１１に記載の粒子。
【請求項１３】
前記核酸が、ＤＮＡ、ＲＮＡ、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはｓｉＲＮＡである、請求項１１に記載の粒子。
【請求項１４】
前記低分子が、キナーゼインヒビター、ホスファターゼインヒビター、レセプターブロッカー、低分子抗酸化物質模倣物、細胞骨格再構成インヒビター、レセプターリガンドである、請求項１１に記載の粒子。

【請求項１５】
さらにリンカーを含む、請求項２または４に記載の粒子。
【請求項１６】
前記リンカーが、ストレプトアビジン、ＲＤＧ、ＧＳＴ、ｓｓＤＮＡ、ヘモグロビン、アミノ酸配列、抗体、ポリカルボン酸および／またはキレート剤である、請求項１５に記載の粒子。
【請求項１７】
前記キレート剤が、ニトリロ三酢酸（ＮＴＡ）リガンド、ビピラドールまたはＥＤＴＡである、請求項１６に記載の粒子。
【請求項１８】
前記リンカーが、タンパク質、ペプチドおよび／または炭水化物に結合する、請求項１５に記載の粒子。
【請求項１９】
前記タンパク質、ペプチドおよび／または炭水化物が、ヒスチジンタグを含む、請求項１８に記載の粒子。
【請求項２０】
前記ヒスチジンタグが、約２～８個のヒスチジンを含む、請求項１９に記載の粒子。
【請求項２１】
前記ヒスチジンタグが、約６個のヒスチジンを含む、請求項１９に記載の粒子。
【請求項２２】
前記タンパク質が、治療用タンパク質、予防用タンパク質または診断用タンパク質である、請求項１８に記載の粒子。
【請求項２３】
前記治療用タンパク質、予防用タンパク質または診断用タンパク質が、増殖因子、サイトカイン、抗酸化酵素または抗体、エリスロポエチン（ＥＰＯ）、レセプターリガンドである、請求項２２に記載の粒子。
【請求項２４】
請求項１に記載のポリケタール重合体を含む、薬学的組成物。
【請求項２５】
請求項３または４に記載の粒子を含む、薬学的組成物。
【請求項２６】
被験体に活性物質を送達するための方法であって、該被験体に請求項３または４に記載の粒子を投与する工程を含み、該粒子は、活性物質が、放出され、そして該被験体へ送達されるように該被験体内で分解される、方法。
【請求項２７】
請求項２６に記載の方法により、疾患または障害に影響し得る活性物質を送達することによって、該疾患または障害に罹患した被験体を処置する方法。
【請求項２８】
前記疾患または障害が、自己免疫疾患、アレルギー疾患、感染症、移植、糖尿病および癌に関連する障害または合併症からなる群より選択される、請求項２７に記載の方法。
【請求項２９】
前記感染症が、ＨＩＶ、マラリア、ＴＢ、ＳＡＲＳ、炭疽、エボラ、インフルエンザ、トリインフルエンザおよびＨＣＶからなる群より選択される、請求項２８に記載の方法。
【請求項３０】
前記自己免疫疾患が、狼瘡、慢性関節リウマチ、乾癬、喘息およびＣＯＰＤからなる群より選択される、請求項２８に記載の方法。
【請求項３１】
被験体にタンパク質、ペプチドおよび／または炭水化物を送達するための方法であって、該被験体に請求項１８に記載の粒子を投与する工程を含み、該粒子は、該タンパク質、ペプチドおよび／または炭水化物が放出され、そして該被験体に送達されるように該被験

体内で分解される、方法。
【請求項３２】
請求項３１に記載の方法により、疾患または障害に影響し得るタンパク質、ペプチドおよび／または炭水化物を送達することによって、該疾患または障害に罹患した被験体を処置する方法。
【請求項３３】
前記疾患または障害が、自己免疫疾患、アレルギー疾患、感染症、移植、糖尿病および癌に関連する障害または合併症からなる群より選択される、請求項３２に記載の方法。
【請求項３４】
前記感染症が、ＨＩＶ、マラリア、ＴＢ、ＳＡＲＳ、炭疽、エボラ、インフルエンザ、トリインフルエンザおよびＨＣＶからなる群より選択される、請求項３３に記載の方法。
【請求項３５】
前記自己免疫疾患が、狼瘡、慢性関節リウマチ、乾癬、喘息およびＣＯＰＤからなる群より選択される、請求項３３に記載の方法。
【請求項３６】
請求項３または４に記載の粒子を作製するための方法であって、該方法は、
ａ．ＰＫ１、ＰＫ２、ＰＫ３、ＰＫ４、ＰＫ５および／またはＰＫ６重合体を形成する工程；ならびに、
ｂ．１つ以上の活性物質の存在下で、１つ以上のａ）の重合体の粒子を形成する工程、
を包含し、それによって請求項３または４に記載の粒子を作製する、方法。
【請求項３７】
前記活性物質が、治療剤、予防剤または診断用薬剤である、請求項３６に記載の方法。
【請求項３８】
前記治療剤が、免疫調節剤である、請求項３７に記載の方法。
【請求項３９】
請求項３８に記載の方法であって、前記免疫調節剤が、
ａ．ＴＬＲ２、３、４、５、７、８、９、１０および１１のいずれかに対するリガンドまたはその組み合わせ、
ｂ．樹状細胞、マクロファージまたは抗原提示細胞内の調節経路のインヒビター、
ｃ．ＲＩＧ－１、ｄｅｃｔｉｎ－１およびＤＣ－ＳＩＧＮのような任意のＣ型レクチン、または任意のキャタピラタンパク質に対するリガンド
からなる群から選択される、方法。
【請求項４０】
請求項３９に記載の方法であって、前記インヒビターが、（ａ）ＥＲＫ、ｃ－Ｆｏｓ、Ｆｏｘｐ３、ＰＩ３キナーゼ、Ａｋｔ、ＪＮＫ、ｐ３８、ＮＦ－Ｋｂ、ＳＴＡＴ１、ＳＴＡＴ２、ＩＲＦ３、ＩＲＦ７、ＩＦＮ－αのシグナリングのインヒビター；または（ｂ）ＳＯＣＳ　１、２、３、もしくは他のＳＯＣＳタンパク質のインヒビターからなる群から選択される、方法。
【請求項４１】
前記活性物質が、タンパク質、ペプチド、炭水化物、核酸、低分子、イメージング剤、ワクチン抗原および／またはワクチンである、請求項３６に記載の方法。
【請求項４２】
前記タンパク質が、増殖因子、サイトカイン、抗酸化タンパク質（ａｎｔｏｘｉｄａｎｔ　ｐｒｏｔｅｉｎ）、抗体、エリスロポエチン（ＥＰＯ）またはレセプターリガンドである、請求項４１に記載の方法。
【請求項４３】
前記核酸が、ＤＮＡ、ＲＮＡ、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはｓｉＲＮＡである、請求項４１に記載の粒子。
【請求項４４】
前記低分子が、キナーゼインヒビター、ホスファターゼインヒビター、レセプターブロ

ッカー、低分子抗酸化物質模倣物、細胞骨格再構成インヒビターまたはレセプターリガンドである、請求項４１に記載の粒子。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本出願を通じて、様々な刊行物が引用されている。これらの刊行物の開示の全体は、本発明が属する最新技術をより十分に説明するために、本明細書により参考として本出願に援用されている。

【０００２】

本発明は、ＮＩＨ／ＮＩＡＩＤの助成金ＡＩ０４８６３８、ＡＩ０５６４４９９、ＡＩ０５６９４７、ＡＩ０５７１５７、ＡＩ０５７２６６０１、ＮＩＨ／ＮＩＤＤＫの助成金ＤＫ０５７６６５およびＥｍｔｅｃｈ　Ｂｉｏ　Ｇｒａｎｔ，ＮＩＨ　Ｒ０１適用の下の政府支援によって、行われた。政府は、本発明における一定の権利を有する。

【０００３】

（発明の分野）

本発明は、活性物質（例えば、（ｉ）ワクチン；（ｉｉ）免疫調節剤（生得免疫細胞（例えば、樹状細胞）の機能を調節するＴＬＲリガンドもしくは合成分子、または細胞（例えば、樹状細胞もしくは他の抗原提示細胞）内のシグナリングネットワークを調節する合成分子もしくはｓｉＲＮＡを含む）および／あるいは；（ｉｉｉ）生得免疫および獲得免疫を調節するように、治療用環境または予防用環境において、抗原提示細胞を標的化する薬物）を送達するための戦略に基づいた粒子およびミセルに関する。

【背景技術】

【０００４】

（発明の背景）

ポリエステルおよびポリ無水物に基づいた薬物送達媒体は、それらの優れた生物適合性プロフィールおよび遅い加水分解速度に起因して、治療薬の持続型放出のために広く用いられてきた（非特許文献１；非特許文献２；非特許文献３；非特許文献４）。しかしながら、多数の医学的適用（例えば、リソソームおよび腫瘍の酸性環境を標的化すること）は、迅速なｐＨ感受性の分解を受ける薬物送達システムを必要とする（非特許文献５；非特許文献６）。薬物送達のために用いられる分解性重合体の大部分は、生理学的ｐＨ値で塩基により触媒される加水分解によって分解するエステル結合から構成されているので、この必要条件を満たすことができない。エステルベースの物質（例えば、ポリ（乳酸グリコール酸）（ＰＬＧＡ）、ポリオルトエステル、およびポリ無水物）から作製される粒子は全て、分解する際に、多量の酸を生じる。このことは、タンパク質治療薬およびＤＮＡ治療薬の分解を引き起こし、この分解はまた、何週間から何ヶ月もかかる。成熟ＤＣの寿命は、約２日なので、これらの物質は、ワクチン開発にとって理想的ではない。最近、ポリ（オルトエステル）およびポリ（β－アミノエステル）に基づくｐＨ感受性疎水性マイクロ粒子が、細胞内薬物送達および腫瘍標的化のために首尾よく用いられてきており、従って、薬物送達のための酸感受性の生体材料の可能性を有することを示している（非特許文献７；非特許文献８；非特許文献９；非特許文献１０）。結果として、ｐＨ感受性生分解性重合体の合成のための新しい戦略を開発することにおける多大な関心が、存在する。

【０００５】

組換えタンパク質、ペプチド抗原、またはこのようなワクチン抗原をコードするＤＮＡワクチンに基づいたワクチンは、その抗原エピトープが規定されている感染症および腫瘍に対し、大いに治療の可能性を有する。このようなワクチンは、動物モデル、および現在開発中のこのようなワクチンに関する多数の臨床試験において、感染症に対する防御免疫を生じる能力を有していた（非特許文献１１；非特許文献１２；非特許文献１３；非特許文献１４）。しかしながら、それらの期待にも拘わらず、挑戦の多くは、有効な免疫反応を惹起するために、適切な型の抗原提示細胞を標的化するような、ペプチド、タンパク質、ＤＮＡワクチンおよびアジュバントの効率的な送達を懸念する。脂質結合体およびＰＬ

ＧＡマイクロ粒子から構成されるペプチドワクチンに関して、期待できる結果が得られてきたが、依然として、新規のペプチドワクチン送達媒体開発について多大な需要が、存在する（非特許文献１５；非特許文献１６）。

【０００６】

（ワクチン接種のために生得免疫を利用する）

免疫系の特徴は、質的に異なる型の免疫反応を惹起する能力である。従って、例えば、Ｔヘルパー１（すなわちＴｈ１）免疫反応は、ウイルス感染細胞または腫瘍を殺傷する細胞傷害性「キラー」Ｔ細胞を刺激する。反対に、Ｔヘルパー２（すなわち、Ｔｈ２）反応は、抗体産生（特に、細胞外の寄生虫もしくは細菌または毒素に対する保護を付与するＩｇＥ抗体の分泌）と関連している。さらに、Ｔ調節性反応は、強すぎる免疫反応を抑制し得、従って、アレルギー、自己免疫、移植片拒絶、またはセプシス様症状により引き起こされる免疫病理学症状を制限する。このような広範な型の免疫反応の存在、ならびにウイルス、腫瘍、細胞外の寄生虫および細菌に対する有効な保護を付与すること、ならびにアレルギー、自己免疫、移植およびセプシスにおける有害な免疫反応を調節することにおけるそれらの特異な役割を考慮に入れると、近代免疫学の「ロゼッタ石」は、様々な臨床上環境における有効な免疫反応を最適に誘導する方法を学ぶことである。

【０００７】

この意味において、免疫学における最近の進歩は、免疫反応の質と量との両者を制御することにおける生得免疫系の根本的な役割を明らかにした（非特許文献１７）。このように、免疫系は、可溶性の脱凝集した（ｄｅａｇｇｒｅｇａｔｅｄ）形態で注射されるほとんどの外来性のタンパク質に対して非反応性であるが、「アジュバント」と呼ばれる免疫刺激物質と一緒に注射される場合、これらの外来性のタンパク質は、強い免疫を誘導し得ることが、ずっと前から知られてきた。実際、アジュバントの本質は、その後の特定の型の免疫反応を決定するものであり、この特定の型の免疫反応は、細胞傷害性Ｔ細胞反応、抗体反応、または特定のクラスのＴヘルパー反応に対して偏し得ることが公知であった。（非特許文献１８；非特許文献１９；非特許文献１７）。アジュバントの重要性にも拘わらず、米国において臨床上の使用を許可されているアジュバントは、ミョウバン１つのみしか存在せず、そしてほとんどの他の実験的なアジュバントは、免疫細胞の強力な活性化を誘導するが、毒性をもまたもたらす、微生物または細菌の粗抽出物からなる。最近まで、このようなアジュバントの作用機構は、理解されていなかった。しかしながら、生得免疫における最近の進歩は、アジュバントがどのように作用するのかを理解することに関して概念的な枠組みを提供してきた。この問題の中核は、樹状細胞（ＤＣ）として公知の細胞の、希少であるが、広く分布したネットワークであり、これは、生得免疫系の必須構成成分を構成する。「天然のアジュバント」と呼ばれているＤＣは、微生物およびウイルスの構成成分を認識し得るレセプターを発現する。このようなレセプターとしては、微生物の刺激を「感知」し得、そしてＤＣおよび他の免疫細胞を活性化し得るＴｏｌｌ様レセプター（ＴＬＲ）、Ｃ型レクチン、およびキャタピラタンパク質（ＣＡＴＴＥＲＰＩＬＬＡＲ　ｐｒｏｔｅｉｎ）が挙げられる（非特許文献１８；非特許文献１９；非特許文献１７）。ＤＣが、免疫反応の質および量を調整することに必須の役割を果たすことは、今や明らかである。

【０００８】

現在、哺乳類に関して記載されている約１３個のＴＬＲが、存在する。ＤＣ上の異なるＴＬＲを活性化することは、質的に異なる型の免疫反応を誘導する（前出のＰｕｌｅｎｄｒａｎら，２００１年；前出のＤｉｌｌｏｎら，２００４年；非特許文献２０；非特許文献２１）。従って、殆どのＴＬＲを活性化することは、Ｔｈ１反応を誘導し得；ＴＬＲ３、７または９を活性化することは、ウイルス感染細胞および腫瘍を殺傷する細胞傷害性Ｔ細胞を誘導し得；そして得られる証拠は、ＴＬＲ２を活性化することが、（ウイルスまたは細胞外の細菌もしくは寄生虫に対する保護を提供する抗体反応に関連している）Ｔｈ２反応、または（強すぎる免疫反応を抑制し、従って、アレルギー、自己免疫、セプシス、および移植における制御できない免疫に対する保護を提供する）Ｔ調節性反応もしくは寛

容原性の反応までも誘導することを示唆する。このように、ＤＣならびにＴＬＲおよび他の認識レセプターは、ワクチン学者および薬物開発者にとって魅力的な免疫調節の標的を代表する。従って、生得免疫系（例えば、ＤＣおよびＴＬＲ）の基本的要素を開発する方法を学ぶことは、新規の薬物およびワクチンの開発において、最も重要である。

【０００９】

この概念から導出される重要な結論は、（最初に記録されたエドワード　ジェンナーのワクチン接種試験以来）過去２００年にわたり開発されてきたワクチンの大部分が、実験的に開発されてきたということである。従って、様々な災い（例えば、天然痘、ポリオ、ＴＢおよび黄熱病）を制御することにおけるワクチンの成功にも拘らず、我々は、これらのワクチンがどのようにこのような有効な免疫を刺激するのかに対する科学的な理由について、全く知識を有していない。例えば、黄熱病ワクチン１７Ｄ［ＹＦ－１７Ｄ］は、最も有効な公知のワクチンの１つである。６５年よりも前の黄熱病ワクチン１７Ｄの開発以来、このワクチンは、世界中の４億人を超える人々に投与されてきた。その成功にも拘らず、その作用機構は、知られていない。従って、上記のように、ここ６年ほどの間に起こった生得免疫における目を見張る進歩は、我々に、２１世紀の新興感染症および再興感染症に対する将来のワクチンを考案するために、このような知識を用いるという視点で、このような「黄金基準（ｇｏｌｄ　ｓｔａｎｄａｒｄ）」ワクチンの作用方法（ｍｏｄｕｓ　ｏｐｅｒａｎｄｉ）を理解するために用いる新しい見解を提供する。この意味において、我々の最近の知見は、非常に有効な黄熱病ワクチン（ＹＦ－１７Ｄ）が、ＤＣ、および多数のＴＬＲ（ＴＬＲ２、７、８および９を含む）の強力な刺激因子であることを示唆する（非特許文献２２）。異なるＴＬＲにより引き起こされる異なる型の免疫反応（前出のＰｕｌｅｎｄｒａｎら，２００１年；非特許文献２０；前出のＤｉｌｌｏｎら，２００４年；非特許文献２１）を考慮に入れた上で、多数のＴＬＲを活性化することにより、ＹＦ－１７Ｄが、広いスペクトルの免疫反応を誘導していることを推測することは、魅力的であった。実際、我々のデータは、ＹＦ－１７Ｄが、広いスペクトルの生得免疫反応および獲得免疫反応（Ｔｈ１細胞、Ｔｈ２細胞、細胞傷害性Ｔ細胞、中和抗体）を引き起こし、異なるＴＬＲが、異なる型のこの多価免疫を制御することを示唆する（非特許文献２２）。このような広いスペクトルの免疫反応を誘発することはまた、現在有効なワクチンが存在しない他の感染症（例えば、ＨＩＶ、ＨＣＶ、マラリア、ＴＢ、インフルエンザ、炭壊およびエボラ）に対する、または腫瘍に対するワクチンを設計するのに有利である可能性がある。従って、新興感染症または再興感染症に対する将来のワクチンを設計するための戦略は、多岐にわたる免疫反応を誘導するために、多数のＴＬＲリガンドおよび抗原、ならびに免疫調節剤を組み込むことから利益を得うる。従って、重要な挑戦は、インビボでこのような免疫調節剤を送達する能力を有する送達システムの開発である。

【００１０】

うっ血性心不全は、世界中の罹患率および死亡率の主要な原因であり、有効な処置選択肢が大いに必要とされている。心筋梗塞後の心機能不全は進行性の疾患であり、任意の成功裏の治療が、数日／数週間の経過にわたって必要とされる（非特許文献２３）。

【００１１】

急性心筋梗塞患者は、病院において、血液希釈剤および／または罹患した脈管を除去することを試みる血管形成術によって伝統的に処置される。この急性期の間に生じる局所的な細胞死は、増大した心室サイズおよび低減した収縮機能によって特徴付けられる慢性的な心不全をもたらす（非特許文献２３）。現在、心不全のための唯一の処置は移植手術であり、移植患者のうちの３０％未満が新しい心臓を受容して生存していると見積もられている（Ｒｏｓａｍｏｎｄら、Ｈｅａｒｔ　Ｄｉｓｅａｓｅ　ａｎｄ　Ｓｔｒｏｋｅ　Ｓｔａｔｉｓｔｉｃｓ-２００７　Ｕｐｄａｔｅ．　Ａ　Ｒｅｐｏｒｔ　Ｆｒｏｍ　ｔｈｅ　Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｈｅａｒｔ　Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ　Ｓｔａｔｉｓｔｉｃｓ　Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ　ａｎｄ　Ｓｔｒｏｋｅ　Ｓｔａｔｉｓｔｉｃｓ　Ｓｕｂｃｏｍｍｉｔｔｅｅ．　Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｏｎ，　２００６）。梗塞の直後に行われる多くの方法が、潜在的な治療アプローチの標的となっている。

【００１２】
心筋層の喪失は主に局部的であり、限局性の治療が最も有望であることを示唆する（非特許文献２３）。近年、心筋層の再形成のための種々の細胞型の形態で限局性の治療を送達する、多くの臨床研究が開始されている（Ａｓｓｍｕｓら、Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ ｏｆ Ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ Ｃｅｌｌｓ ａｎｄ Ｒｅｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ Ｅｎｈａｎｃｅｍｅｎｔ ｉｎ Ａｃｕｔｅ Ｍｙｏｃａｒｄｉａｌ Ｉｎｆａｒｃｔｉｏｎ（ＴＯＰＣＡＲＥ－ＡＭＩ）．Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｏｎ，２００２．１０６（２４）：３００９－１７、Ｋａｎｇら、Ｅｆｆｅｃｔｓ ｏｆ ｉｎｔｒａｃｏｒｏｎａｒｙ ｉｎｆｕｓｉｏｎ ｏｆ ｐｅｒｉｐｈｅｒａｌ ｂｌｏｏｄ ｓｔｅｍ－ｃｅｌｌｓ ｍｏｂｉｌｉｓｅｄ ｗｉｔｈ ｇｒａｎｕｌｏｃｙｔｅ－ｃｏｌｏｎｙ ｓｔｉｍｕｌａｔｉｎｇ ｆａｃｔｏｒ ｏｎ ｌｅｆｔ ｖｅｎｔｒｉｃｕｌａｒ ｓｙｓｔｏｌｉｃ ｆｕｎｃｔｉｏｎ ａｎｄ ｒｅｓｔｅｎｏｓｉｓ ａｆｔｅｒ ｃｏｒｏｎａｒｙ ｓｔｅｎｔｉｎｇ ｉｎ ｍｙｏｃａｒｄｉａｌ ｉｎｆａｒｃｔｉｏｎ：ｔｈｅ ＭＡＧＩＣ ｃｅｌｌ ｒａｎｄｏｍｉｓｅｄ ｃｌｉｎｉｃａｌ ｔｒｉａｌ．Ｌａｎｃｅｔ，２００４．３６３（９４１１）：７５１－６）。

【００１３】
直接的なタンパク質、ＲＮＡおよびＤＮＡの注射の複雑な性質に起因して、現在、心筋層へ治療薬を送達する生体材料を使用することに取り組みが集中している（Ｄａｖｉｓら、Ｃｕｓｔｏｍ ｄｅｓｉｇｎ ｏｆ ｔｈｅ ｃａｒｄｉａｃ ｍｉｃｒｏｅｎｖｉｒｏｎｍｅｎｔ ｗｉｔｈ ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ．Ｃｉｒｃ Ｒｅｓ，２００５．９７（１）：８－１５）。多くの研究が依然として静脈内注射または経口治療を利用しているが、作用の正確な機構は、比較的未知のままである。具体的には、どのようにして、これらの分子／タンパク質が、経口または静脈内に進入し、そして心臓にのみ有意な効果を発揮できるのかについて調べられていない。本発明者らの先の研究は、タンパク質および薬物を保持する生体材料の送達のために、直接的な心筋内注射を使用している（Ｄａｖｉｓら、Ｌｏｃａｌ ｍｙｏｃａｒｄｉａｌ ｉｎｓｕｌｉｎ－ｌｉｋｅ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ １（ＩＧＦ－１）ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｗｉｔｈ ｂｉｏｔｉｎｙｌａｔｅｄ ｐｅｐｔｉｄｅ ｎａｎｏｆｉｂｅｒｓ ｉｍｐｒｏｖｅｓ ｃｅｌｌ ｔｈｅｒａｐｙ ｆｏｒ ｍｙｏｃａｒｄｉａｌ ｉｎｆａｒｃｔｉｏｎ．Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ，２００６．１０３（２１）：８１５５－６０、Ｄａｖｉｓら、Ｉｎｊｅｃｔａｂｌｅ ｓｅｌｆ－ａｓｓｅｍｂｌｉｎｇ ｐｅｐｔｉｄｅ ｎａｎｏｆｉｂｅｒｓ ｃｒｅａｔｅ ｉｎｔｒａｍｙｏｃａｒｄｉａｌ ｍｉｃｒｏｅｎｖｉｒｏｎｍｅｎｔｓ ｆｏｒ ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ ｃｅｌｌｓ．Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｏｎ，２００５．１１１（４）：４４２－５０、Ｈｓｉｅｈら、Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ＰＤＧＦ－ＢＢ ｆｏｒ ｍｙｏｃａｒｄｉａｌ ｐｒｏｔｅｃｔｉｏｎ ｕｓｉｎｇ ｉｎｊｅｃｔａｂｌｅ ｓｅｌｆ－ａｓｓｅｍｂｌｉｎｇ ｐｅｐｔｉｄｅ ｎａｎｏｆｉｂｅｒｓ．Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ，２００６．１１６（１）：２３７－４８）。ある者は、これが有害であると考えるが、ヒトでの使用にますますより一般的になっている。なぜなら、いくつかの会社が、チャンバーの内部から心筋壁へ細胞および薬物を送達することが可能なカテーテルを開発しているからである。さらに、新規な技術を使用して、研究者は、閉胸手順（ｃｌｏｓｅ－ｃｈｅｓｔｅｄ ｐｒｏｃｅｄｕｒｅ）でマウスの心筋壁にマイクロスフェアを送達することができた（Ｓｐｒｉｎｇｅｒら、Ｃｌｏｓｅｄ－ｃｈｅｓｔ ｃｅｌｌ ｉｎｊｅｃｔｉｏｎｓ ｉｎｔｏ ｍｏｕｓｅ ｍｙｏｃａｒｄｉｕｍ ｇｕｉｄｅｄ ｂｙ ｈｉｇｈ－ｒｅｓｏｌｕｔｉｏｎ ｅｃｈｏｃａｒｄｉｏｇｒａｐｈｙ．Ａｍ Ｊ Ｐｈｙｓｉｏｌ Ｈｅａｒｔ Ｃｉｒｃ Ｐｈｙｓｉｏｌ，２００５．２８９（３）：Ｈ１３０７－１４）。したがって、心筋治療のために小さく、注射可能な粒子を開発することに大きな関心が存在する。

【００１４】
ｐ３８ ＭＡＰキナーゼ

特定の炎症性サイトカインは、梗塞後の心筋層において大幅に増加している（Bolli, R., Oxygen-derived free radicals and myocardial reperfusion injury: an overview. Cardiovasc Drugs Ther, 1991. 5 Suppl 2：249-68、Bolliら、Direct evidence that oxygen-derived free radicals contribute to postischemic myocardial dysfunction in the intact dog. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. 86（12）：4695-9、Torella, ら、Cardiac stem cell and myocyte aging, heart failure, and insulin-like growth factor-1 overexpression Circ Res, 2004. 94（4）：514-24）。これらのサイトカインは、成体の心筋細胞および局所的な幹細胞の集団の死を導く、特異的なシグナリング経路を活性化する。

【００１５】

３つの異なるマイトジェン活性化プロテインキナーゼ（ＭＡＰＫ）カスケードが同定され、細胞シグナリング経路として研究されている。ｐ３８ ＭＡＰＫカスケードは、ストレスおよび炎症応答において良く特徴付けられている（Laiら、The role of MAP kinases in trauma and ischemia-reperfusion. J Invest Surg, 2004. 17（1）：45-53、Lopez-NeblinaおよびToledo-Pereyra, Phosphoregulation of signal transduction pathways in ischemia and reperfusion J Surg Res, 2006. 134（2）：292-9）。また、トランスジェニックマウスモデルの使用および遺伝子治療研究によって、ｐ３８ ＭＡＰＫ経路は、成体の心筋細胞の死に関与している（Engelら、p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. Genes Dev, 2005. 19（10）：1175-87、Awadら、Obese diabetic mouse environment differentially affects primitive and monocytic endothelial cell progenitors. Stem Cells, 2005. 23（4）：575-83）。

【００１６】

ｐ３８の４つの異なるアイソフォームが存在し、ｐ３８αは、最も研究され、疾患の過程に関与している。数種のＭＡＰＫと同様に、ｐ３８は、種々の上流の機構を介して二重リン酸化（ホスフェートドナーとしてＡＴＰを使用する）によって活性化され、その機能は、数種の細胞型にわたり保存されている。マクロファージにおけるｐ３８の活性化は、スーパーオキシドの産生、および炎症促進性サイトカインの発現の増大をもたらす。線維芽細胞において、ｐ３８の活性化は、サイトカインの産生および線維症促進カスケード（pro-fibrotic cascade）の活性化をもたらす（Kumarら、p38 MAP kinases：key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. Nat Rev Drug Discov, 2003. 2（9）：717-26）。最後に、心筋細胞において、ｐ３８の活性化は、アポトーシスおよびサイトカインの放出をもたらす（Liら、Selective inhibition of p38alpha MAPK improves cardiac function and reduces myocardial apoptosis in rat model of myocardial injury. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. 291（4）：H1972-7、Renら、Role of p38alpha MAPK in cardi

ac apoptosis and remodeling after myocardial infarction J Mol Cell Cardiol, 2005. 38（4）：617－230）。これらの過程の3つ全てが、梗塞後の心機能不全の進行において重要な役割を果たす。図29は、上流のエフェクターの活性化および活性化の結果を含む、p38活性化の概略図を示す。

【0017】

p38のリン酸化は、カスパーゼおよび核性因子κB（NFκB）を含む、疾患の過程において2つの重要な経路の活性化を導く（ChenおよびTu, Apoptosis and heart failure：mechanisms and therapeutic implications. Am J Cardiovasc Drugs, 2002. 2（1）：43－57）。アポトーシスの間、p38のリン酸化は、Baxの活性化を誘導し、これは、最終的にミトコンドリアの透過性を導き、カスパーゼの開裂およびアポトーシスの誘導をもたらす。p38リン酸化後の代替的な経路において、阻害性タンパク質IκBがリン酸化され、NFκBを核に放出し、そこで炎症性サイトカインの活性化が開始し得る（Aggarwalら、TNF blockade：an inflammatory issue. Ernst Schering Res Found Workshop, 2006（56）：161－86）。これらの経路の両方は、関節炎、虚血／再灌流障害および気道の炎症を含む種々の炎症性疾患のために標的にされてきた（HerlaarおよびBrown, p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. Mol Med Today, 1999. 5（10）：439－47、Karin, M.、Inflammation－activated protein kinases as targets for drug development. Proc Am Thorac Soc, 2005. 2（4）：386－90；discussion 394－5、Leeら、Inhibition of p38 MAP kinase as a therapeutic strategy. Immunopharmacology, 2000. 47（2－3）：185－201、Peiferら、New approaches to the treatment of inflammatory disorders small molecule inhibitors of p38 MAP kinase. Curr Top Med Chem, 2006. 6（2）：113－49、Schieven, G. L.、The biology of p38 kinase：a central role in inflammation Curr Top Med Chem, 2005. 5（10）：921－8）。

【0018】

遺伝的ノックアウトモデル、遺伝子治療およびインヒビター投与によるp38活性化の抑制は、心筋梗塞後の収縮機能不全を防止することに有益な効果を有した（Engelら、p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. Genes Dev, 2005. 19（10）：1175－87、Minaminoら、MEKK1 suppresses oxidative stress－induced apoptosis of embryonic stem cell－derived cardiac myocytes. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96（26）：15127－32、Kaiserら、Inhibition of p38 reduces myocardial infarction injury in the mouse but not pig after ischemia－reperfusion. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. 289（6）：H2747－51、Kumarら、p38 MAP kinases：key signalling molecules as therapeutic targets for

inflammatory diseases. Nat Rev Drug Discov, 2003. 2(9):717-26、Kulikら、Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt Mol Cell Biol, 1997. 17(3):1595-606、Liuら、Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase protects the heart against cardiac remodeling in mice with heart failure resulting from myocardial infarction J Card Fail, 2005. 11(1):74-81、Seeら、p38 mitogen-activated protein kinase inhibition improves cardiac function and attenuates left ventricular remodeling following myocardial infarction in the rat. J Am Coll Cardiol, 2004. 44(8):1679-89)。このことは、アポトーシスの阻害、心筋細胞の増殖の誘導、酸化ストレスの低減および線維症促進遺伝子(pro-fibrotic gene)の発現の防止を含む種々の機構に起因するものと広く考えられている。マウスに送達した場合、p38インヒビターであるSB-282は、心傷害のラットモデルにおいて心機能を改善した(Liら、Selective inhibition of p38alpha MAPK improves cardiac function and reduces myocardial apoptosis in rat model of myocardial injury. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. 291(4):H1972-7)。L-NAME、塩およびアンジオテンシンII処置の後、数日間にわたってこの化合物を給餌したラットは、収縮機能および他の心臓のパラメーターにおいて有意な改善を示した。さらに、虚血/再灌流,のマウスモデルにおいて、虚血の直前に尾静脈を介して注入したSB239063は、p38のリン酸化を防止し、24時間後に梗塞のサイズを低減した。この研究において、この知見が、より大きな動物に移されなかったことが注目された。ブタに同様な手順を受けさせたが、再灌流の直後にp38阻害の利益は示されなかった。しかしながら、この研究において、研究者が、虚血-再灌流の前にブタを注射し、左心室の内腔にボーラス投与としてインヒビターを与えたことを理解することが重要である(Kaiserら、Inhibition of p38 reduces myocardial infarction injury in the mouse but not pig after ischemia-reperfusion Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. 289(6):H2747-51)。したがって、インヒビターの多くが、必要とされる時間枠において心筋層内に保持された可能性が低い。興味深いことに、p38インヒビターであるSB203580を使用して実行された最近の研究は、成体の心筋細胞が細胞周期に再び入る能力を調節することにおける、p38阻害の重要な役割を実証した。3日毎のp38インヒビターによる処置は、心筋梗塞後の心筋細胞の増殖マーカーの染色に有意な増大をもたらした(Engelら、p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. Genes Dev, 2005. 19(10):1175-87)。興味深いことだが、循環する(cycling)筋細胞の総量が1%未満しか上昇していないことと同様に、正確な利益は不明である。本発明者らの提案は、より大型のげっ歯類の心筋細胞のアポトーシスに対する、持続したp38阻害の影響を調べ、より大型の哺乳動物でのp38インヒビターの持続性放出を調べる手段を創出する。

【0019】

p38キナーゼインヒビターであるSB239063は、梗塞後にマウスにおいて心機

能不全を防止したが、この効果は、より大きな動物に移されなかった（Ｂｕｒｎｈａｍら、Ｉｎｃｒｅａｓｅｄ ｃｉｒｃｕｌａｔｉｎｇ ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ ｃｅｌｌｓ ａｒｅ ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｗｉｔｈ ｓｕｒｖｉｖａｌ ｉｎ ａｃｕｔｅ ｌｕｎｇ ｉｎｊｕｒｙ．Ａｍ Ｊ Ｒｅｓｐｉｒ Ｃｒｉｔ Ｃａｒｅ Ｍｅｄ，２００５．１７２（７）：８５４－６０）。このことは、このインヒビターの小さなサイズ、および注射部位からそれが迅速に拡散しやすいことに起因する可能性が最も高い。小分子インヒビターを使用して最も成功した治療上の結果は、機能を回復するために、より長い期間にわたる複数回の注射を必要とし、このことは、ヒトの介入には実行不能である。これらの理由のために、ほんの一回の投与／注射しか必要としない治療アプローチは、既存の処置選択肢に対して大いに有利である。

【００２０】

本明細書に記載されるように、ポリケタール（ＰＫ）粒子は、生理学的なｐＨ値で制御可能な様式で加水分解し、中性の化合物に分解する新規なクラスの生体材料である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【００２１】

【非特許文献１】Ａｎｄｅｒｓｏｎ，Ｊ．Ｍ．ら，Ａｄｖ．Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｒｅｖ．，１９９７年，２８，ｐ．５－２４
【非特許文献２】Ｊａｉｎ，Ｒ．Ａ．，Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ，２０００年，２１，ｐ．２４７５－２４９０
【非特許文献３】Ｍａｔｈｉｏｗｉｔｚ，Ｅ．ら，Ｊ．Ａｐｐｌ．Ｐｏｌｙｍ．ＳｃＬ，１９８８，３５，ｐ．７５５－７７４
【非特許文献４】Ｂｅｒｋｌａｎｄ，Ｃ．ら，Ｊ．Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ，２００４年，９４，ｐ．１２９－１４１
【非特許文献５】Ｓｔｕｂｂｓ，Ｍ．ら，Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．Ｔｏｄａｙ，２０００年，６，ｐ．１５－１９
【非特許文献６】Ｌｅｒｏｕｘ，Ｊ．－Ｃ．，Ａｄｖ．Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｒｅｖ．，２００４年，５６，ｐ．９２５－９２６
【非特許文献７】Ｈｅｌｌｅｒ，Ｊ．ら，Ｂｉｏｍａｃｒｏｍｏｌｅｃｕｌｅｓ，２００４年，５，ｐ．１６２５－１６３２
【非特許文献８】Ｈｅｌｌｅｒ，Ｊ．ら，Ａｄｖ．Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｒｅｖ．，２００２年，５４，ｐ．１０１５－１０３９
【非特許文献９】Ｂｅｒｒｙ，Ｄ．ら，Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ，２００４年，１１，ｐ．４８７－４９８
【非特許文献１０】Ｐｏｔｉｎｅｎｉ，Ａ．ら，Ｊ．Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ，２００３年，８６，ｐ．２２３－２３４
【非特許文献１１】ｖａｎ Ｅｎｄｅｒｔ，ＰＭ，Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ，２００１年，２９，ｐ．２８５－８
【非特許文献１２】Ｐｕｒｃｅｌｌ，ＡＷら，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ，２００３年，９，ｐ．２５５－８１
【非特許文献１３】Ｓｈｉｒａｉ，Ｍ．ら，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｖｉｒｏｌｏｇｙ，１９９４年，６８，ｐ．３３３４－４２
【非特許文献１４】Ｈｕｎｚｉｋｅｒ，ＩＰら，Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，２００２年，１４，ｐ．６１５－２６
【非特許文献１５】Ｅｒｔｌ，ＨＣＪら，Ｖａｃｃｉｎｅ，１９９６年，１４，ｐ．８７９－８５
【非特許文献１６】Ｊａｃｋｓｏｎ，ＤＣら，Ｖａｃｃｉｎｅ，１９９７年，１５，ｐ．１６９７－７０５
【非特許文献１７】Ｐｕｌｅｎｄｒａｎ ＆ Ａｈｍｅｄ，Ｃｅｌｌ，２００６年，１２４，ｐ．８４９－８６３

【非特許文献１８】Ｐｕｌｅｎｄｒａｎ，Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｖ．，２００４年，１９９，ｐ．２２７－２５０
【非特許文献１９】Ｐｕｌｅｎｄｒａｎ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，２００５年，１７５，ｐ．２４５７－２４６５
【非特許文献２０】Ａｇｒａｗａｌら，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，２００３年，１７１，ｐ．４９８４－４９８９
【非特許文献２１】Ｄｉｌｌｏｎら，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ，２００６年，１１６，ｐ．９１６－９２８
【非特許文献２２】Ｑｕｅｒｅｃら，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．，２００６年，２０３，ｐ．４１３－４２１
【非特許文献２３】Ａｎｖｅｒｓａ，Ｐ．，「Ｍｙｏｃｙｔｅ ｄｅａｔｈ ｉｎ ｔｈｅ ｐａｔｈｏｌｏｇｉｃａｌ ｈｅａｒｔ．」 Ｃｉｒｃ Ｒｅｓ，２０００年、８６（２）ｐ．１２１－４

【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【００２２】
（発明の要旨）
本発明は、被験体に送達するための活性物質をカプセル化するために用いられ得る生分解性の粒子（例えば、三次元粒子）およびミセルを提供する。本発明はさらに、このような粒子およびミセルを生成および送達するための方法を提供する。さらに、本発明は、これらの新規の粒子およびミセルの使用を含むワクチン接種の戦略を提供する。
【００２３】
（疎水性ポリケタール粒子）
本発明は、重合体の骨格内にケタール基を含む新規の型の疎水性重合体に向けられている。ここで、上記ケタール基は、両方の酸素原子が上記重合体の骨格内に位置する様式で、配置されている。
【００２４】
さらに、このケタール重合体は、ケタールとジオールとの間のケタール交換反応により形成され得る。本発明に従って、１つ以上の型のケタールおよび／またはジオールは、ホモ重合体または共重合体の形成のために用いられ得る。
【００２５】
また、本発明により含まれるのは、他の重合体（例えば、ＰＥＧ、ポリエステル、ポリアミド、多糖、ポリエーテル、またはポリ無水物）により連結されるポリケタール重合体である。その結果生じる重合体は、交互共重合体、ランダム共重合体、ブロック共重合体、またはグラフト共重合体であり得る。ポリチオ－アミンケタール、ポリチオ－ヒドロキシルケタールおよびポリヒドロキシル－アミンケタールが混合したポリチオケタール重合体もまた、本発明の範囲内である。
【００２６】
本発明のポリケタール重合体は、水溶液中で加水分解して、低分子量、水溶性のアルコールおよびケトンになる。骨格内のケタール結合の利点は、このケタール結合が、ファゴソームの酸性条件下、１～２日以内にｐＨ５．０で分解することである。従って、ポリケタールはまた、腫瘍、炎症およびファゴリソソームの酸性環境を標的化するために、用いられ得る。この分解は、酸性分解産物を生じない。従って、上記ケタール重合体は、生物学的使用に適する。
【００２７】
（ミセル）
本発明はさらに、多数の重合体を含む新規の生分解性の架橋されたミセルを提供する。ここで、上記重合体は例えば、外部（ｅｘｔｅｒｎａｌ）架橋剤（すなわち、重合体鎖内に導入されない薬剤）により架橋されている。外部薬剤を用いることの利点は、重合体内の架橋可能部分のみが用いられる反応と比較して、架橋反応がより速いことである。上記

外部架橋剤はまた、カプセル化されたタンパク質が破壊される機会を減少させる。

【図面の簡単な説明】

【００２８】

【図１】図１は、濾過されたＦＩＴＣ－Ｏｖａ含有ＰＫＮおよび濾過されていないＦＩＴＣ－Ｏｖａ含有ＰＫＮの蛍光強度を示す棒グラフである（励起　４９４ｎｍ、放射　５２０ｎｍ）。示されるデータは、２つの試料の平均である。ＦＩＴＣ－Ｏｖａカプセル化効率は６０％である（実施例３、下記）。

【図２】図２は、ケタール骨格の重合体（ポリケタール）の合成および分解を示す模式図である。（Ａ）ケタール中間体　１を生成するための１，４－ベンゼンジメタノールと２，２－ジメトキシプロパンとの間のケタール交換反応。（Ｂ）ポリケタール　２を生成するための１の段階的重合。副生成物のメタノールを蒸留することにより、反応工程ＡおよびＢを進める。（Ｃ）溶媒蒸発方法による薬物をロードした粒子の形成。粒子はｐＨ感受性を示して低分子の放出可能な化合物に分解する（実施例４、下記）。

【図３】図３（Ａ）は、ＴＨＦ中の（図２の）ポリケタール２のＧＰＣトレース（Ｓｈｉｍａｄｚｕ　ＳＣＬ－１０Ａ）を示すグラフである。ポリスチレン標準（Ｐｏｌｙｍｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．）に基づいてM_w＝４０００、M_W/M_n＝１．５４。Ｙ－軸は、２６２ｎｍでの相対吸光度を示す。図３（Ｂ）は、$CDCI_3$中での（図２の）ポリケタール２の^1H　ＮＭＲスペクトルを示す（Ｖａｒｉａｎ　Ｍｅｒｃｕｒｙ　Ｖｘ　４００）；繰り返し単位のピークは、７．３ｐｐｍ（４ｂ）、４．５ｐｐｍ（４ｃ）および１．５ｐｐｍ（６ａ）にある。２．５および１．０でのピークは、ケタールの加水分解を防止するために添加したトリエチルアミンに起因する（実施例４、下記）。

【図４】図４は、ｐＨ１．０、５．０および７．４での（図２の）ポリケタール２（微細に粉砕された粉末）の加水分解の速度論を示す線グラフである。指数関数的減衰の半減期は、１０２時間（ｐＨ７．４）および３５時間（ｐＨ５．０）である。ｐＨ１．０のコントロールのバッチは、最初の時点以前に完全に加水分解された（実施例４、下記）。

【図５】図５は、（図２の）ポリケタール２で作製された粒子のＳＥＭ画像を示す。（Ａ、Ｂ）ＰＶＡ対ポリケタール２が０．２：１の比を使用する粒子（粒径：０．５～３０μｍ）。（Ｃ）１：１のＰＶＡ：ポリケタール２を使用して作製された、デキサメタゾンをロードした粒子（粒径：２００～５００ｎｍ）。スケールバーは、（Ａ）８０μｍ、（Ｂ）３μｍ、そして（Ｃ）４μｍである（実施例５および６、下記）。

【図６】図６は、粒子形成を示す概略図である。Ａ．工程１：ポリケタールおよび薬物をクロロホルム中に溶解する；ポリビニル　アルコールを水中に溶解する。Ｂ．工程２：クロロホルム溶液を水に添加し、そして超音波処理し、ミクロンサイズの小滴を生成する。工程３：クロロホルムを蒸発させ、粒子を生成する（実施例６、下記）。

【図７】図７は、フルオレセインをロードしたポリケタール粒子が、肝臓に取り込まれることを示す写真である。静脈内注射後の、ＰＫＮからのフルオレセインの放出を示すマウス肝臓組織切片（実施例６、下記）。

【図８】図８は、ペプチド架橋されたミセルの設計および合成を示す概略図である。工程１：ＩＳＳ　ＤＮＡとＩとを混合して、ミセル（架橋されていないミセル）を形成する。工程２：次いで、これらのミセルを抗原性ペプチド（ＩＩ）で架橋して、免疫刺激分子とペプチド抗原との両者をカプセル化し得る送達システムを生成する。ＡＰＣによるファゴサイトーシスの後、ペプチド架橋されたミセルは、それらの構成成分を放出する（実施例６、下記）。

【図９－１】図９は、ＰＥＧ－ポリリジン　チオピリダールの合成および性質決定を示す。Ａは、ＰＥＧ－ポリリジン　チオピリダールの合成を示す化学的図式である。Ｂは、D_2O中でのＰＥＧ－ＰＬＬ－チオピリダールの^1H－ＮＭＲスペクトルである。Ｃ／Ｄは、架橋されていないＰＣＭ（Ｃ）およびペプチド架橋された（Ｄ）の動的光散乱解析を示すグラフである。Ｅは、ペプチド抗原ＩＩ（図８）におけるシステインの架橋反応を示すグラフである。Ｆは、ペプチド抗原ＩＩ（図８）とブロック共重合体ミセルとの間の架橋反応のＵＶ解析を示すグラフである（実施例６、下記）。

【図９－２】図９は、ＰＥＧ－ポリリジン　チオピリダールの合成および性質決定を示す。Ａは、ＰＥＧ－ポリリジン　チオピリダールの合成を示す化学的図式である。Ｂは、D_2O中でのＰＥＧ－ＰＬＬ－チオピリダールの^1H－ＮＭＲスペクトルである。Ｃ／Ｄは、架橋されていないＰＣＭ（Ｃ）およびペプチド架橋された（Ｄ）の動的光散乱解析を示すグラフである。Ｅは、ペプチド抗原ＩＩ（図８）におけるシステインの架橋反応を示すグラフである。Ｆは、ペプチド抗原ＩＩ（図８）とブロック共重合体ミセルとの間の架橋反応のＵＶ解析を示すグラフである（実施例６、下記）。

【図９－３】図９は、ＰＥＧ－ポリリジン　チオピリダールの合成および性質決定を示す。Ａは、ＰＥＧ－ポリリジン　チオピリダールの合成を示す化学的図式である。Ｂは、D_2O中でのＰＥＧ－ＰＬＬ－チオピリダールの^1H－ＮＭＲスペクトルである。Ｃ／Ｄは、架橋されていないＰＣＭ（Ｃ）およびペプチド架橋された（Ｄ）の動的光散乱解析を示すグラフである。Ｅは、ペプチド抗原ＩＩ（図８）におけるシステインの架橋反応を示すグラフである。Ｆは、ペプチド抗原ＩＩ（図８）とブロック共重合体ミセルとの間の架橋反応のＵＶ解析を示すグラフである（実施例６、下記）。

【図９－４】図９は、ＰＥＧ－ポリリジン　チオピリダールの合成および性質決定を示す。Ａは、ＰＥＧ－ポリリジン　チオピリダールの合成を示す化学的図式である。Ｂは、D_2O中でのＰＥＧ－ＰＬＬ－チオピリダールの^1H－ＮＭＲスペクトルである。Ｃ／Ｄは、架橋されていないＰＣＭ（Ｃ）およびペプチド架橋された（Ｄ）の動的光散乱解析を示すグラフである。Ｅは、ペプチド抗原ＩＩ（図８）におけるシステインの架橋反応を示すグラフである。Ｆは、ペプチド抗原ＩＩ（図８）とブロック共重合体ミセルとの間の架橋反応のＵＶ解析を示すグラフである（実施例６、下記）。

【図１０】図１０は、ペプチドおよびＤＮＡの放出におけるＧＳＨの影響を示す。Ａは、ＧＳＨ感受性のペプチド放出を示すグラフである。Ｂは、ＧＳＨ感受性のＤＮＡ放出を示すゲル電気泳動解析である。Ｃは、ＩＳＳ－ＤＮＡが、ＰＣＭ中の血清ヌクレアーゼから保護されることを示すゲル電気泳動解析である（実施例６、下記）。

【図１１－１】図１１は、ブロック共重合体ミセルを表す。Ａは、ＰＥＧ－ポリ（リジン－チオ－ピリジル）の化学構造を示す。Ｂは、ミセル形成を示す概略図である。Ｃは、ミセルの架橋を示す概略図である。Ｄは、架橋されたミセルの還元を示す概略図である（実施例６、下記）。

【図１１－２】図１１は、ブロック共重合体ミセルを表す。Ａは、ＰＥＧ－ポリ（リジン－チオ－ピリジル）の化学構造を示す。Ｂは、ミセル形成を示す概略図である。Ｃは、ミセルの架橋を示す概略図である。Ｄは、架橋されたミセルの還元を示す概略図である（実施例６、下記）。

【図１２Ａ】図１２は、ミセルの免疫学を示す。Ａ．ＤＣ由来のヒト単球によるＳＩＩＮＦＥＫＬ－ＣＦＳＥミセルの取り込みについての共焦点顕微鏡解析。Ｂ．ＤＣ由来のヒト単球による、ＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドをカプセル化されたミセルの取り込みについてのＦＡＣＳ解析。Ｃ．マウスのＤＣおよびマクロファージによる、ＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドをカプセル化されたミセルの取り込みについてのＦＡＣＳ解析（実施例６、下記）。

【図１２Ｂ】図１２は、ミセルの免疫学を示す。Ａ．ＤＣ由来のヒト単球によるＳＩＩＮＦＥＫＬ－ＣＦＳＥミセルの取り込みについての共焦点顕微鏡解析。Ｂ．ＤＣ由来のヒト単球による、ＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドをカプセル化されたミセルの取り込みについてのＦＡＣＳ解析。Ｃ．マウスのＤＣおよびマクロファージによる、ＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドをカプセル化されたミセルの取り込みについてのＦＡＣＳ解析（実施例６、下記）。

【図１２Ｃ】図１２は、ミセルの免疫学を示す。Ａ．ＤＣ由来のヒト単球によるＳＩＩＮＦＥＫＬ－ＣＦＳＥミセルの取り込みについての共焦点顕微鏡解析。Ｂ．ＤＣ由来のヒト単球による、ＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドをカプセル化されたミセルの取り込みについてのＦＡＣＳ解析。Ｃ．マウスのＤＣおよびマクロファージによる、ＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドをカプセル化されたミセルの取り込みについてのＦＡＣＳ解析（実施例６、下記）。

【図１３】図１３は、ＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドを処方されたミセルが、インビトロで強いＴ細胞反応を誘導することを示す棒グラフである（実施例６、下記）。

【図１４Ａ】図１４は、ミセルの免疫学を示す。Ａは、マウスのＤＣおよびマクロファージによる、ＯＶＡタンパク質をカプセル化されたミセルの効率的な取り込みについてのＦＡＣＳ解析を示す。Ｂは、ＯＶＡ／ＣｐＧをカプセル化されたミセルが、インビトロでＤＣを活性化することを示すグラフである（実施例６、下記）。
【図１４Ｂ】図１４は、ミセルの免疫学を示す。Ａは、マウスのＤＣおよびマクロファージによる、ＯＶＡタンパク質をカプセル化されたミセルの効率的な取り込みについてのＦＡＣＳ解析を示す。Ｂは、ＯＶＡ／ＣｐＧをカプセル化されたミセルが、インビトロでＤＣを活性化することを示すグラフである（実施例６、下記）。
【図１５】図１５は、ポリケタール粒子の免疫学を示すグラフである。インビトロでの、マウスのＤＣおよびマクロファージによる、Ｕ０１２６をカプセル化されたポリケタール粒子（ＰＫＮ）の取り込み（実施例６、下記）。
【図１６】図１６は、ＯＶＡ－ＯＴ／１トランスジェニックモデルを用いた、インビトロでのＴ細胞の刺激についての実験の概略を示す概略図である（実施例６、下記）。
【図１７Ａ】図１７は、ミセルの免疫学を示す。Ａ．左のパネルは、フローサイトメトリー解析であり、右のパネルは、抗原を処方されたミセルでパルスされた脾臓細胞が、インビトロで強い抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞反応を誘導することを示す概要である。Ｂ．左のパネルは、フローサイトメトリー解析であり、右のパネルは、抗原を処方されたミセルでパルスされたＤＣが、インビトロで強い抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞反応を誘導することを示す概要である。Ｃ．抗原を処方されたミセルが、インビボでＤＣを活性化することを示すフローサイトメトリー（実施例６、下記）。
【図１７Ｂ】図１７は、ミセルの免疫学を示す。Ａ．左のパネルは、フローサイトメトリー解析であり、右のパネルは、抗原を処方されたミセルでパルスされた脾臓細胞が、インビトロで強い抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞反応を誘導することを示す概要である。Ｂ．左のパネルは、フローサイトメトリー解析であり、右のパネルは、抗原を処方されたミセルでパルスされたＤＣが、インビトロで強い抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞反応を誘導することを示す概要である。Ｃ．抗原を処方されたミセルが、インビボでＤＣを活性化することを示すフローサイトメトリー（実施例６、下記）。
【図１７Ｃ】図１７は、ミセルの免疫学を示す。Ａ．左のパネルは、フローサイトメトリー解析であり、右のパネルは、抗原を処方されたミセルでパルスされた脾臓細胞が、インビトロで強い抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞反応を誘導することを示す概要である。Ｂ．左のパネルは、フローサイトメトリー解析であり、右のパネルは、抗原を処方されたミセルでパルスされたＤＣが、インビトロで強い抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞反応を誘導することを示す概要である。Ｃ．抗原を処方されたミセルが、インビボでＤＣを活性化することを示すフローサイトメトリー（実施例６、下記）。
【図１８Ａ】図１８は、ミセルおよびポリケタール粒子の免疫学を示す。Ａ．左のパネルは、フローサイトメトリー解析であり、右のパネルは、ワクチンを処方されたミセルが、インビボで強い抗原特異的ＣＤ８＋ＩＦＮ－γ＋Ｔ細胞反応を誘導することを示す概要である。Ｂ．左のパネルは、フローサイトメトリー解析であり、右のパネルは、ワクチンを処方されたミセルが、インビボで強い抗原特異的ＣＤ８$^{+}$ＴＮＦα^{+}Ｔ細胞反応を誘導することを示す概要である。Ｃ．ＯＶＡ／ＣｐＧワクチン接種後の特異的なＣＤ８$^{+}$／ＩＦＮγ^{+}Ｔ細胞の速度論を示す線グラフ。Ｄ．ＯＶＡ＋ＵＯｌ２６　ＰＫＮワクチン接種後の特異的なＣＤ８$^{+}$／ＩＦＮγ^{+}Ｔ細胞の速度論を示す線グラフ。Ｅ．ワクチンを処方されたミセルが、インビボで強い抗原特異的ＩｇＧ抗体反応を誘導することを示す棒グラフ。Ｆ．ワクチンを処方されたミセルは、インビボで抗原特異的なＩｇＥおよびＩｇＭの抗体反応を誘導することを示す棒グラフ（実施例６、下記）。
【図１８Ｂ】図１８は、ミセルおよびポリケタール粒子の免疫学を示す。Ａ．左のパネルは、フローサイトメトリー解析であり、右のパネルは、ワクチンを処方されたミセルが、インビボで強い抗原特異的ＣＤ８＋ＩＦＮ－γ＋Ｔ細胞反応を誘導することを示す概要である。Ｂ．左のパネルは、フローサイトメトリー解析であり、右のパネルは、ワクチンを処方されたミセルが、インビボで強い抗原特異的ＣＤ８$^{+}$ＴＮＦα^{+}Ｔ細胞反応を誘導す

ることを示す概要である。Ｃ．ＯＶＡ／ＣｐＧワクチン接種後の特異的なＣＤ８$^{+}$／ＩＦＮγ^{+}Ｔ細胞の速度論を示す線グラフ。Ｄ．ＯＶＡ＋ＵＯｌ２６　ＰＫＮワクチン接種後の特異的なＣＤ８$^{+}$／ＩＦＮγ^{+}Ｔ細胞の速度論を示す線グラフ。Ｅ．ワクチンを処方されたミセルが、インビボで強い抗原特異的ＩｇＧ抗体反応を誘導することを示す棒グラフ。Ｆ．ワクチンを処方されたミセルは、インビボで抗原特異的なＩｇＥおよびＩｇＭの抗体反応を誘導することを示す棒グラフ（実施例６、下記）。

【図１８Ｃ】図１８は、ミセルおよびポリケタール粒子の免疫学を示す。Ａ．左のパネルは、フローサイトメトリー解析であり、右のパネルは、ワクチンを処方されたミセルが、インビボで強い抗原特異的ＣＤ８＋ＩＦＮ－γ＋Ｔ細胞反応を誘導することを示す概要である。Ｂ．左のパネルは、フローサイトメトリー解析であり、右のパネルは、ワクチンを処方されたミセルが、インビボで強い抗原特異的ＣＤ８$^{+}$ＴＮＦα^{+}Ｔ細胞反応を誘導することを示す概要である。Ｃ．ＯＶＡ／ＣｐＧワクチン接種後の特異的なＣＤ８$^{+}$／ＩＦＮγ^{+}Ｔ細胞の速度論を示す線グラフ。Ｄ．ＯＶＡ＋ＵＯｌ２６　ＰＫＮワクチン接種後の特異的なＣＤ８$^{+}$／ＩＦＮγ^{+}Ｔ細胞の速度論を示す線グラフ。Ｅ．ワクチンを処方されたミセルが、インビボで強い抗原特異的ＩｇＧ抗体反応を誘導することを示す棒グラフ。Ｆ．ワクチンを処方されたミセルは、インビボで抗原特異的なＩｇＥおよびＩｇＭの抗体反応を誘導することを示す棒グラフ（実施例６、下記）。

【図１８Ｄ】図１８は、ミセルおよびポリケタール粒子の免疫学を示す。Ａ．左のパネルは、フローサイトメトリー解析であり、右のパネルは、ワクチンを処方されたミセルが、インビボで強い抗原特異的ＣＤ８＋ＩＦＮ－γ＋Ｔ細胞反応を誘導することを示す概要である。Ｂ．左のパネルは、フローサイトメトリー解析であり、右のパネルは、ワクチンを処方されたミセルが、インビボで強い抗原特異的ＣＤ８$^{+}$ＴＮＦα^{+}Ｔ細胞反応を誘導することを示す概要である。Ｃ．ＯＶＡ／ＣｐＧワクチン接種後の特異的なＣＤ８$^{+}$／ＩＦＮγ^{+}Ｔ細胞の速度論を示す線グラフ。Ｄ．ＯＶＡ＋ＵＯｌ２６　ＰＫＮワクチン接種後の特異的なＣＤ８$^{+}$／ＩＦＮγ^{+}Ｔ細胞の速度論を示す線グラフ。Ｅ．ワクチンを処方されたミセルが、インビボで強い抗原特異的ＩｇＧ抗体反応を誘導することを示す棒グラフ。Ｆ．ワクチンを処方されたミセルは、インビボで抗原特異的なＩｇＥおよびＩｇＭの抗体反応を誘導することを示す棒グラフ（実施例６、下記）。

【図１８Ｅ】図１８は、ミセルおよびポリケタール粒子の免疫学を示す。Ａ．左のパネルは、フローサイトメトリー解析であり、右のパネルは、ワクチンを処方されたミセルが、インビボで強い抗原特異的ＣＤ８＋ＩＦＮ－γ＋Ｔ細胞反応を誘導することを示す概要である。Ｂ．左のパネルは、フローサイトメトリー解析であり、右のパネルは、ワクチンを処方されたミセルが、インビボで強い抗原特異的ＣＤ８$^{+}$ＴＮＦα^{+}Ｔ細胞反応を誘導することを示す概要である。Ｃ．ＯＶＡ／ＣｐＧワクチン接種後の特異的なＣＤ８$^{+}$／ＩＦＮγ^{+}Ｔ細胞の速度論を示す線グラフ。Ｄ．ＯＶＡ＋ＵＯｌ２６　ＰＫＮワクチン接種後の特異的なＣＤ８$^{+}$／ＩＦＮγ^{+}Ｔ細胞の速度論を示す線グラフ。Ｅ．ワクチンを処方されたミセルが、インビボで強い抗原特異的ＩｇＧ抗体反応を誘導することを示す棒グラフ。Ｆ．ワクチンを処方されたミセルは、インビボで抗原特異的なＩｇＥおよびＩｇＭの抗体反応を誘導することを示す棒グラフ（実施例６、下記）。

【図１８Ｆ】図１８は、ミセルおよびポリケタール粒子の免疫学を示す。Ａ．左のパネルは、フローサイトメトリー解析であり、右のパネルは、ワクチンを処方されたミセルが、インビボで強い抗原特異的ＣＤ８＋ＩＦＮ－γ＋Ｔ細胞反応を誘導することを示す概要である。Ｂ．左のパネルは、フローサイトメトリー解析であり、右のパネルは、ワクチンを処方されたミセルが、インビボで強い抗原特異的ＣＤ８$^{+}$ＴＮＦα^{+}Ｔ細胞反応を誘導することを示す概要である。Ｃ．ＯＶＡ／ＣｐＧワクチン接種後の特異的なＣＤ８$^{+}$／ＩＦＮγ^{+}Ｔ細胞の速度論を示す線グラフ。Ｄ．ＯＶＡ＋ＵＯｌ２６　ＰＫＮワクチン接種後の特異的なＣＤ８$^{+}$／ＩＦＮγ^{+}Ｔ細胞の速度論を示す線グラフ。Ｅ．ワクチンを処方されたミセルが、インビボで強い抗原特異的ＩｇＧ抗体反応を誘導することを示す棒グラフ。Ｆ．ワクチンを処方されたミセルは、インビボで抗原特異的なＩｇＥおよびＩｇＭの抗体反応を誘導することを示す棒グラフ（実施例６、下記）。

【図１９】図１９は、シクロヘキサンジメタノール由来のポリケタール（本明細書中でＰＣＡＤＫと呼ばれ、ＩＵＰＡＣ名称　ポリ（シクロヘキサン－１，４－ジイル　アセトン　ジメチレン　ケタール）を有する）を示す。Ａ．シクロヘキサンジメタノール由来のポリケタールを示す化学的表記。Ｂ．酸感受性様式でＰＣＡＤＫが分解することを示す線グラフ（実施例６、下記）。
【図２０】図２０は、ＰＣＡＤＫ由来の粒子が、疎水性の化合物および薬物（例えば、ローダミンレッド（ｒｈｏｄｈａｍｉｎｅ　ｒｅｄ）およびエブセレン（ｅｂｓｅｌｅｎ））をカプセル化し得ることを示すＳＥＭ画像を示す（実施例６、下記）。
【図２１】図２１は、ＰＣＡＤＫ由来のローダミンレッドの放出が、ｐＨ感受性であることを示す線グラフを示す（実施例６、下記）。
【図２２】図２２は、ほとんどのいかなる脂肪族ジオールをも含むポリケタールが、作製され得ることを示す化学的表記である（実施例６、下記）。
【図２３】図２３は、ＦＩＴＣ標識されたポリケタールが、肝臓のマクロファージによりファゴサイトーシスされることを示す写真である（実施例６、下記）。
【図２４Ａ】図２４Ａは、ポリケタール粒子中にカタラーゼおよびスーパーオキシドジスムターゼをカプセル化するために用いられる二重エマルジョンの手順を示す概略図である。Ｂは、カタラーゼ含有粒子のＳＥＭ画像、およびカタラーゼ含有粒子の蛍光顕微鏡画像である。Ｃは、カタラーゼの粒子が酵素活性を有することを示すグラフである（実施例６、下記）。
【図２４Ｂ】図２４Ａは、ポリケタール粒子中にカタラーゼおよびスーパーオキシドジスムターゼをカプセル化するために用いられる二重エマルジョンの手順を示す概略図である。Ｂは、カタラーゼ含有粒子のＳＥＭ画像、およびカタラーゼ含有粒子の蛍光顕微鏡画像である。Ｃは、カタラーゼの粒子が酵素活性を有することを示すグラフである（実施例６、下記）。
【図２４Ｃ】図２４Ａは、ポリケタール粒子中にカタラーゼおよびスーパーオキシドジスムターゼをカプセル化するために用いられる二重エマルジョンの手順を示す概略図である。Ｂは、カタラーゼ含有粒子のＳＥＭ画像、およびカタラーゼ含有粒子の蛍光顕微鏡画像である。Ｃは、カタラーゼ粒子が酵素活性を有することを示すグラフである（実施例６、下記）。
【図２５】図２５は、非環式ジエン複分解（ＡＤＭＥＴ）により作製されるポリケタールを示す化学的表記である。
【図２６】図２６は、薬剤をロードした粒子の合成および酸分解についての概略図である。
【図２７】図２７は、ローダミン含有ＰＣＡＤＫ粒子を異なるものにするために用いられる条件を示す表である。
【図２８】図２８は、Ｈｉｓ－ＧＦＰが、少なくとも１５時間、ＮＴＡ－Ｎｉに安定して結合したことを示すグラフである（実施例９、下記）。
【図２９】図２９は、ｐ３８活性化の供給源および下流の影響を示す概略図である（実施例７、下記）。
【図３０】図３０は、ポリ（１，４－シクロヘキサン－アセトン　ジメチレン　ケタール）（ＰＣＡＤＫ）の合成の概略図である。ＰＣＡＤＫは、反応物として１，４－シクロヘキサンジメタノールおよび２，２　ジメトキシプロパンを用いるアセタール交換反応を使用して合成される。ＰＣＡＤＫは、１，４－シクロヘキサンジメタノールおよびアセトンに加水分解する（実施例７、下記）。
【図３１】図３１は、ＴＨＦ中のＰＣＡＤＫのＧＰＣトレースを示すグラフである。Ｙ－軸は、２６２ｎｍでの相対ＵＶ吸光度を示す。Ｍｗ＝６，２８２、多分散性指数（ＰＤＩ）＝１．５４（実施例７、下記）。
【図３２】図３２は、ＳＢ２３９０６３をロードした粒子（ＰＫ－ｐ３８$_{i}$）の代表的なＳＥＭ画像を示す写真である。これらの画像は、およそ３～１５μｍの粒径を反射する（ｒｅｔｕｒｎ）（実施例７、下記）。

【図３３】図３３は、粒径が容易に改変され得ることを示す写真である。Ａ）元のプロトコールで生成された粒子のＳＥＭ。Ｂ）低減された均質化速度から生成された粒子の、より高倍率のＳＥＭ。Ｃ）低減されたＰＶＡ濃度から生成された粒子の高倍率画像（実施例７、下記）。

【図３４】図３４は、代替的な多孔質粒子の代表的なＳＥＭ画像を示す写真である。最初の分散物へのＮ－ヘキサンの添加は、多孔質粒子の形成をもたらした。これらの粒子のおおよそのサイズは、１０～２５μｍである（実施例７、下記）。

【図３５】図３５は、ＳＯＤ－ＰＫＮのＳＥＭ画像を示す写真である。（Ａ）６０００×の倍率。（Ｂ）１０００×の倍率（実施例７、下記）。

【図３６】図３６は、ＰＫ－ＳＯＤで事前に処理し、ＬＰＳで刺激した、培養されたマクロファージからの群分けしたデータを示すチャートである。ＳＯＤをロードしたポリケタールでのマクロファージの前処理は、空のＰＫおよび遊離ＳＯＤと比較して、ＬＰＳに刺激されたスーパーオキシド放出において有意な低下をもたらした（実施例７、下記）。

【図３７】図３７は、培養したマクロファージとともにインキュベートした、ＦＩＴＣをロードしたポリケタールの代表的な蛍光画像を示す写真である。マクロファージを、ＰＫ－ＦＩＴＣとともに２時間インキュベートし、その後、徹底的な洗浄およびイメージングを行った。矢印は、ＦＩＴＣ色素を取り込んだ細胞を示す。空の粒子がマクロファージの表面に結合していることも見受けられ得る（実施例７、下記）。

【図３８】図３８は、示された時間（ＰＫ時間）、ポリケタールで事前に処理され、２０分間、１０ｎｇ／ｍＬ　ＴＮＦ－αで刺激されたマクロファージからの代表的なウェスタンブロット（頂部）および群分けした濃度データ（ｄｅｎｓｉｔｏｍｅｔｒｉｃ　ｄａｔａ）（底部）を示す。マクロファージを、空のＰＫまたはＰＫ－ｐ３８とともに２～６時間インキュベートし、その後、徹底的な洗浄およびＴＮＦ－α刺激を行った。空のＰＫでのより長い前処理では、ｐ３８のリン酸化に変化はなかったが、４時間および６時間のＰＫ－ｐ３８$_{i}$前処理によってｐ３８のリン酸化の有意な阻害が存在した（＊ｐ＜０．０５；Ｔｕｋｅｙ－Ｋｒａｍｅｒに従ったＡＮＯＶＡ；ｎ＝４）（実施例７、下記）。

【図３９】図３９は、６時間ポリケタールで事前に処理し、２０分間１０ｎｇ／ｍＬ　ＴＮＦ－αおよび２０分間ジヒドロエチジウムで刺激したマクロファージからの群分けしたデータを示すチャートである。ＴＮＦ－ａ処理による細胞外スーパーオキシド放出の有意な増大を示すＨＰＬＣデータ。この増大は、空のＰＫによって妨害されなかったが、ＰＫ－ｐ３８$_{i}$前処理によって完全に阻害された（＊ｐ＜０．０５　Ｔｕｋｅｙ－Ｋｒａｍｅｒに従ったＡＮＯＶＡ（実施例７、下記）。

【図４０】図４０は、ＤＨＥ－ＨＰＬＣによる梗塞後の細胞外スーパーオキシド産生の検出を示す。頂部のパネルは、偽（ｓｈａｍ）および梗塞（ＭＩ）試料からの代表的なトレースである。底部のパネルは、この方法によって検出される細胞外スーパーオキシド産生の増大を示す正規化したデータである。動物を、偽手術または冠状動脈結紮手術に供し、左心室の自由壁（ｆｒｅｅ　ｗａｌｌ）を、梗塞から３日後に回収した。断片を、外因性ＳＯＤの存在下および不在下でジヒドロエチジウムとともにインキュベートし、データを、ＳＯＤに阻害されたオキシ－エチジウム濃度として表現した（ｎ＝４）。これらのデータは、将来の実験において調べられ得る、梗塞後の損傷の潜在的な機構を表す（実施例７、下記）。

【図４１】図４１は、梗塞後３日の脚の筋肉の代表的なＨ＆Ｅ染色を示す写真である。左のパネルにおいて、注射されたＰＣＡＤＫは、境界外のわずかな細胞の染色をともなう、画定された注射領域を形成する。対照的に、ＰＬＧＡ（右）は、線維症および炎症性細胞の集団の証拠を示す（実施例７、下記）。

【図４２】図４２は、ポリケタールの注射がわずかな炎症を引き起こすことを示す写真である。左のパネルは、ＣＤ４５（一般的な炎症マーカー）についての、２つの代表的な免疫蛍光（ｉｍｍｕｎｏｆｌｕｏｒｅｓｅｎｃｅ）染色を示す。切片内にわずかな染色しか存在しなかった。対照的に、右側において、ＰＬＧＡ（一般的に使用される重合体）で注射された脚の筋肉は、ＣＤ４５染色によって測定される強固な炎症反応を生成する（実施

例７、下記）。
【図４３】図４３は、ＰＫ－ｐ３８$_i$処置が梗塞後のｐ３８のリン酸化を阻害することを示す。梗塞から３日後の梗塞ゾーンにおける、ホスホ－ｐ３８および総ｐ３８の両方についての代表的なウェスタンブロット。群分けしたデータ（平均＋ＳＥＭ）は、ＭＩ群およびＭＩ＋ＰＫ群においてｐ３８のリン酸化の有意な増大を実証する（＊偽およびＭＩ＋ＰＫ－ｐ３８$_i$に対してｐ＜０．０５；ｎ＝１３マウス総数）（実施例７、下記）。
【図４４】図４４は、ＰＫ－ｐ３８$_i$処置が梗塞後のＩＬ－５発現を阻害することを示す。梗塞から３日後の梗塞ゾーンにおける、ＩＬ－５およびβ－アクチンの両方についての代表的なウェスタンブロット。群分けしたデータは、ＭＩ群およびＭＩ＋ＰＫ群において正規化したＩＬ－５レベルの有意な増大を実証する（＊偽およびＭＩ＋ＰＫ－ｐ３８$_i$に対してｐ＜０．０５）。データを、平均＋ＳＥＭとして表す（ｎ＝１３マウス総数）（実施例７、下記）。
【図４５】図４５は、ポリケタールでカプセル化されたＳＢ２３９０６３が梗塞から３日後のＴＮＦ－α産生を阻害することを示すチャートである。ＰＫ－ｐ３８$_i$の単回注射が梗塞後のラット（ｎ＝１９ラット総数）においてＴＮＦ－αレベルをほとんど正常化することを実証する群分けしたデータ。データを、平均＋ＳＥＭとして表す（実施例７、下記）。
【図４６】図４６は、移植された細胞の死滅が持続した増殖因子の処置によって逆転したことを示すチャートである。新生仔心筋細胞を、注射前に緑色膜色素（ｇｒｅｅｎ ｍｅｍｂｒａｎｅ ｄｙｅ）で染色し、それから、注射から１４日後に開裂カスパーゼ－３について染色した。データは、群当りｎ≧４動物からの平均±ＳＥＭである（＊＊ペプチドのみまたは未係留ＩＧＦに対してｐ＜０．０１）（実施例７、下記）。
【図４７】図４７は、ＧＦＰおよびＨＡアデノウイルスを使用する細胞の追跡を示す。単離直後に、細胞を、１００ＭＯＩのＧＦＰまたは血球凝集素アデノウイルスとともに懸濁物中で２時間インキュベートした。細胞を２４時間平板培養し、フローサイトメトリーを実行した（実施例７、下記）。
【図４８】図４８は、偽手術または冠状動脈結紮手術から３日後の、群分けした心エコー検査データを示すチャートである。内径短縮率（ｆｒａｃｔｉｏｎａｌ ｓｈｏｒｔｅｎｉｎｇ）の測定は、虚血から３日後、Ｍ－モード、短軸の動画（ｓｈｏｒｔ ａｘｉｓ ｍｏｖｉｅｓ）からなされた。この手順を受けたラットにおいて、内径短縮率によって測定される心機能に有意な低減が存在した（＊ｐ＜０．０５；ｔ－検定）。これらのデータは、ラットにおいてこの手術を一貫して実行し、心機能不全を誘発する本発明者らの能力を実証する（実施例７、下記）。
【図４９】図４９は、心臓の幹細胞の単離を示す写真である。細胞を、記載されるように単離し、４％パラホルムアルデヒド中で固定し、示されるマーカー（ｍａｋｅｒ）に対する抗体、次に蛍光二次抗体で染色した（実施例７、下記）。
【図５０】図５０は、ＰＫ－３のＨ－ＮＭＲ分析を示す。Ｈ－ＮＭＲスペクトルを、溶媒としてＣＤＣｌ$_3$を使用し、Ｖａｒｉａｎ Ｍｅｒｃｕｒｙ ＶＸ ４００ＭＨｚ ＮＭＲ分光計（Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ，ＣＡ）を使用して取得した。１，５－ペンタンジオール対１，４－シクロヘキサンジメタノールのモル比を、それぞれピークａおよびピークｂ下の面積の比を取得することによって得た（実施例８、下記）。
【図５１】図５１は、１，４－シクロヘキサンジメタノール（第二のジオール）および２，２－ジメトキシプロパンからのポリケタール共重合体の合成を示す概略図である。ポリケタール共重合体の加水分解の速度論は、共重合によって制御され得る（実施例８、下記）。
【図５２】図５２は、ポリケタールの加水分解の速度論が共重合によって調整され得ることを示すグラフである。（Ａ）ｐＨ４．５の緩衝液中でのポリケタール共重合体ＰＫ１～ＰＫ６の加水分解プロフィール、および（Ｂ）ｐＨ７．４の緩衝液中でのＰＫ１～ＰＫ６の加水分解プロフィール。データを、平均±標準偏差として示す。全ての実験を、３７℃で三連で実施した（実施例８、下記）。

【図５３】図５３は、ＰＫ３で処方した粒子のＳＥＭ画像を示す写真である。二重エマルジョン手順によって処方された空の粒子のＳＥＭ画像（実施例８、下記）。
【図５４】図５４は、ニッケル（Ｎｉ）をロードした場合、ヒスチジンタグ付きタンパク質に結合する、ニトリロ三酢酸（ＮＴＡ）の概略図である（実施例９、下記）。
【図５５】図５５は、マイクロスフェアを形成するＮＴＡリンカーを含むポリケタールの概略図であり、ここで、活性物質は、このマイクロスフェアによってカプセル化され、Ｈｉｓ－タグ付きタンパク質は、このマイクロスフェアの表面に結合する。Ｂ．ＤＯＧＳ－ＮＴＡの図（実施例９、下記）。
【図５６】図５６は、１０％　ＮＴＡ　ＰＣＡＤＫマイクロ粒子のＳＥＭ顕微鏡写真を示す写真である（実施例９、下記）。
【図５７】図５７は、ローディング溶液（ｌｏａｄｉｎｇ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ）中でのＮｉの枯渇についての分光光度測定を示すチャートである。種々の濃度のＮＴＡ－リガンド（０％、１％、５％、１０％）を含むＰＣＡＤＫ粒子を、$NiCl_2$溶液にロードした。攪拌しながら一晩、粒子をインキュベートした後で、溶液を遠心分離し、上清を、Ｎｉ含量について分光光度的に分析した。ＮＴＡ－リガンドを含まない粒子の上清は、約５５０ｍＭの濃度のニッケルを有したが、１％、５％および１０％　ＮＴＡ粒子は、それらの上清に約５００ｍＭ　Ｎｉを有した。このデータは、粒子の表面が１％　ＮＴＡ－リガンド含有物で飽和されていることを示唆する。原子吸光分光を使用するさらなる定量的な試験が、現在進行中である（実施例９、下記）。
【図５８】図５８は、Ｈｉｓ－タグ付き緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）がＮｉ依存的であることを示す写真である。１０％　ＮＴＡ粒子をＮｉで満たし、徹底的に洗浄し、次にＨｉｓ－タグ付きＧＦＰの１００ｎＭ溶液中でインキュベートした。粒子をＰＢＳで徹底的に洗浄し、蛍光顕微鏡法を使用して画像化した。（ａ）ＰＣＡＤＫ－ＮＴＡ粒子を、$NiCl_2$の代わりにＰＢＳでロードした。ＧＦＰ由来の非常に微かな蛍光が見られる。（ｂ）$NiCl_2$をロードしたＰＣＡＤＫ－ＮＴＡ粒子は、ＧＦＰとのかなりの関連性を示す（実施例９、下記）。
【図５９】図５９は、１％　ＮＴＡ－ＰＣＡＤＫ粒子についての特異的結合曲線（Ｓｐｅｃｉｆｉｃ　Ｂｉｎｄｉｎｇ　ｃｕｒｖｅ）のグラフである（粒子上のＥＬＩＳＡ）。１％　ＮＴＡ－ＰＣＡＤＫ粒子をＮｉで満たし、種々の濃度のＨｉｓ－タグ付きＧＦＰをロードした。ＧＦＰローディングの後の徹底的な洗浄の後、ホースラディシュペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）結合体化ＧＦＰ抗体（α－ＧＦＰ　Ａｂ）を、粒子（１：５０００希釈物のα－ＧＦＰ　Ａｂおよび１％ヤギ血清を含むＰＢＳ－Ｔ　１ｍｌあたり、１ｍｇ粒子で懸濁した粒子）とともに２時間室温でインキュベートした。次に、粒子を３容量のＰＢＳ－Ｔで洗浄した。ＨＲＰ活性の比色測定を、１ウェルあたり種々の量の粒子を使用してプレートリーダー上で行った。１－ｓｔｅｐ　Ｓｌｏｗ　ＴＭＢ－ＥＬＩＳＡ基質（３，３’，５，５’－テトラメチルベンジデン、Ｐｉｅｒｃｅ）を基質として使用し、吸光度を３７０ｎｍで測定した。３分、６分および９分からの読み取り値を比較し、上記に示す。特異的結合曲線は、６０ｎｇ　ＧＦＰ／ｍｇ粒子でロードした場合、１％　ＮＴＡ粒子がＧＦＰで飽和することを示唆する（実施例９、下記）。
【図６０】図６０は、１０％　ＮＴＡ－ＰＣＡＤＫ粒子についての特異的結合曲線のグラフである（粒子上のＥＬＩＳＡ）。１０％　ＮＴＡ－ＰＣＡＤＫ粒子を、Ｎｉで満たし、種々の濃度のＨｉｓ－タグ付きＧＦＰをロードした。ＧＦＰローディングの後の徹底的な洗浄の後、ホースラディシュペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）結合体化ＧＦＰ抗体（α－ＧＦＰ　Ａｂ）を、粒子（１：５０００希釈物のα－ＧＦＰ　Ａｂおよび１％ヤギ血清を含むＰＢＳ－Ｔ　１ｍｌあたり、１ｍｇ粒子で懸濁した粒子）とともに２時間室温でインキュベートした。次に、粒子を３容量のＰＢＳ－Ｔで洗浄した。ＨＲＰ活性の比色測定を、１ウェルあたり種々の量の粒子を使用してプレートリーダー上で行った。１－ｓｔｅｐ　Ｓｌｏｗ　ＴＭＢ－ＥＬＩＳＡ基質（３，３’，５，５’－テトラメチルベンジデン、Ｐｉｅｒｃｅ）を基質として使用し、吸光度を３７０ｎｍで測定した。３分、６分および９分からの読み取り値を比較し、上記に示す。特異的結合曲線は、１２０ｎｇ　ＧＦＰ／ｍｇ

粒子でロードした場合、１０％　ＮＴＡ粒子がＧＦＰで飽和することを示唆する（実施例９、下記）。
【図６１】図６１は、ＧＦＰ結合が可逆的であることを示すグラフである。ＧＦＰをロードした粒子を、イミダゾール（２００ｍＭ最終濃度）（ＮＴＡ－Ｎｉ複合体への競合的結合リガンド）の添加（ｓｐｉｋｅ）に供し、上清の蛍光強度を、時間の関数として測定した。データは、ＧＦＰが、２００ｍＭイミダゾールの存在下、３０分で最も解離することを示唆する（実施例９、下記）。
【図６２】図６２は、ＧＦＰ結合が、ＮＴＡ－Ｎｉの量とともに増大することを示すチャートである（実施例９、下記）。
【発明を実施するための形態】
【００２９】
（発明の詳細な説明）
（定義）
本出願において用いられている全ての科学用語および専門用語は、そうでないことが記載されない限り、当該分野において一般的に用いられている意味を有する。本出願において用いられている、以下の語または句は、記載されている意味を有する。
【００３０】
本明細書中に用いられている、用語「ミセル」は、液体培地中における異なる性質と関連づけられる少なくとも２つの異なる部分を有する重合体分子のコロイド状凝集物を指す。これらの性質の違いは、異なる疎水性／親水性、極性、荷電もしくは電荷の分布、または分子の溶解性に影響を与える他のパラメータに起因して、起こり得る。本発明のミセルは、二層から構成されるリポソームと区別され、これを除外する。
【００３１】
本明細書中に用いられている、用語「重合体」は、単量体分子の共有結合された配置を指す。この配置は、直鎖または分岐された形態で実現され得る。上記重合体は、１つの型の単量体分子からのみ構成されるホモ重合体であっても、２つ以上の異なる型の単量体が同じ重合体の鎖内で結合されている共重合体であってもよい。上記２つの異なる単量体が、交互の様式で配置される場合、その重合体は、交互共重合体と呼ばれる。ランダム共重合体において、上記２つの異なる単量体は、任意の順序で配置され得る。ブロック共重合体において、各型の単量体は、一緒にまとめられている。ブロック共重合体は、それらの末端で一緒に結合されている２つ以上のホモ重合体とみなされ得る。１つの単量体から作製される重合体鎖が、別の単量体の重合体鎖にグラフトされる場合、グラフト共重合体が、形成される。
【００３２】
本明細書中に用いられている、用語「粒子」または「三次元粒子」は、例えば、ナノ粒子および／またはマイクロ粒子を指す。標準的な定義によると、上記用語「ナノ粒子」は、少なくとも１つの寸法が１００ｎｍよりも小さい粒子のみを含む。この必要条件を満たさないより大きい粒子は、「マイクロ粒子」と呼ばれる。本発明は、ナノメートル（ｎｍ）およびミクロン（μｍ）のスケールのサイズである三次元粒子を提供する。本発明の粒子は、約５０ｎｍ～１０００μｍまたは約２００ｎｍ～６００μｍのサイズの範囲であり得る。
【００３３】
本明細書中に用いられている用語「ケタール」および「ジオール」は、アルキル基、シクロアルキル基およびアリール基を含むケタールおよびジオールを包含する。本明細書中に用いられている「アルキル基」または「脂肪族基」は、直鎖または分岐鎖のアルキル基である。一実施形態において、直鎖アルキル基が、好ましい。上記アルキルの定義に含まれるのはまた、ヘテロ原子が窒素、酸素、リン、硫黄およびケイ素であり得るヘテロアルキル基である。
【００３４】
本明細書中に用いられている、用語「シクロアルキル基」または「脂環式基」は、環内

に少なくとも３つの炭素原子を含む環構造のアルキルを表す。一実施形態において、５個または６個の炭素を有するシクロアルキル基が、好ましい。シクロアルキル基はまた、ヘテロ原子が窒素、酸素、リン、硫黄およびケイ素であり得る複素環式環を含む。

【００３５】

本明細書中に用いられている「アリール基」または「芳香族基」は、芳香族アリール環（例えば、フェニル）、複素環式芳香族環（例えば、ピリジン、フラン、チオフェン、ピロール、インドールおよびプリン）、および窒素、酸素、硫黄またはリンを含む複素環式環である。アルキル基、シクロアルキル基およびアリール基の定義に含まれるのは、置換されたアルキル基、シクロアルキル基およびアリール基である。これらの基は、１つ以上の置換を保有し得る。適切な置換基としては、ハロゲン類、アミン類、ヒドロキシル基、カルボン酸類、ニトロ基、カルボニル基および他のアルキル基、シクロアルキル基およびアリール基が挙げられるが、これらに限定されない。

【００３６】

本明細書中に記載されている本発明がより十分に理解され得るために、以下の説明が、示されている。

【００３７】

（本発明の組成物）

本発明のポリケタール重合体

本発明は、各ケタール基が重合体骨格内に２つの酸素原子を有する多数のケタール基を含む、生分解性疎水性ポリケタール重合体を提供する。一実施形態において、本発明の生分解性疎水性ポリケタール重合体は、固体分子の形態である。

【００３８】

適切なケタール基の例としては、２，２－ジオキシプロピル基、２，２－ジオキシブチル基、１，１－ジオキシシクロヘキシル基またはジオキシアセトフェニル基が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の範囲内にはまた、１つ以上のヘテロ原子（例えば、窒素、硫黄、酸素およびハロゲン化物）を含む脂肪族ケタール、脂環式ケタールまたは芳香族ケタールを含むケタール重合体がある。

【００３９】

本発明の一実施形態において、上記重合体はさらに、アルキル基、アリール基、およびシクロアルキル基を含む化合物を含む。この実施形態において、上記化合物は、直接的に上記ケタール基に結合され得る。

【００４０】

適切なアルキル基の例としては、メチル基、エチル基およびブチル基が挙げられるが、これらに限定されない。適切なアリール基の例としては、置換されているかまたは非置換のベンジル基、フェニル基またはナフチル基（例えば、１，４－ジメチルベンゼン）が挙げられるが、これらに限定されない。適切なシクロアルキル基の例としては、置換されているかまたは非置換のシクロヘキシル基、シクロプロピル基、シクロペンチル基（例えば、１，４－ジメチルシクロヘキシル基）が挙げられるが、これらに限定されない。

【００４１】

好ましい実施形態において、上記重合体は、ポリ（１，４－フェニレン－アセトン　ジメチレンケタール）であり得る。この重合体は、２，２－ジメトキシプロパンおよび１，４－ベンゼン　ジメタノールで合成され得る。上記重合体はまた、２，２－ジメトキシプロパンおよび１，４－シクロヘキサン　ジメタノールで合成され得るポリ（１，４－シクロヘキサン－アセトン　ジメチレンケタール）であり得る。

【００４２】

本発明のさらなる実施形態において、上記のポリケタール重合体は、ＰＫ１、ＰＫ２、ＰＫ３、ＰＫ４、ＰＫ５およびＰＫ６共重合体のうちの任意の１つ以上であり得る。これらの６つのポリケタール共重合体は、異なるｐＨレベルでの種々の加水分解の速度論を示す。例えば、ｐＨ４．５において、ＰＫ４は、これらの６つの共重合体のうちで最も速く加水分解し、ＰＫ３は、二番目に速い加水分解速度を有する。同様に、ＰＫ３は、ＰＫ２

またはＰＫ５よりも速い加水分解の速度論を有し、一方で、ＰＫ２およびＰＫ５は、ＰＫ１またはＰＫ６よりも速い加水分解の速度論を有する。しかしながら、ｐＨ７．４において、ＰＫ３は、ＰＫ４よりも速く加水分解される。本発明のポリケタールの共重合体パーセンテージを変更することによって、活性物質の制御可能な放出についての加水分解の速度論は、細かく調整され得る。

【００４３】

一実施形態において、ＰＫ１は、表１に示される構造を有し（実施例８）、少なくとも２つの異なる単量体（すなわち、ランダムな繰り返し単位のような繰り返し単位）から構成される。ＰＫ１の一例において、単量体の１つの型は、約９８％のｘ値（すなわち、上記重合体に組み込まれる第一の単量体のパーセント成分）を有する１，４，－シクロヘキサンジメトキシであり、単量体の第二の型は、約２％のｙ値（すなわち、上記重合体に組み込まれる第二の単量体のパーセント成分）を有する１，５－ペンタンジオキシである。Ｎ値は、３であり得る。この実施形態において、ＰＫ１は、２つの型の出発化合物、すなわち、１，４－シクロヘキサンジメタノールおよび１，５－ペンタンジオールから合成される。ＰＫ１についてのＩＵＰＡＣ名称は、ポリ（シクロヘキサン－１，４－ジイル　アセトン　ジメチレン　ケタール－コ－１，５－ペンタン－アセトン　ジメチレン　ケタール）である。

【００４４】

一実施形態において、ＰＫ２は、表１に示される構造を有し（実施例８）、少なくとも２つの異なる単量体（すなわち、ランダムな繰り返し単位のような繰り返し単位）から構成される。ＰＫ２の一例において、単量体の１つの型は、約９２％のｘ値（すなわち、上記重合体に組み込まれる第一の単量体のパーセント成分）を有する１，４，－シクロヘキサンジメトキシであり、単量体の第二の型は、約８％のｙ値（すなわち、上記重合体に組み込まれる第二の単量体のパーセント成分）を有する１，５－ペンタンジオキシである。Ｎ値は、３であり得る。この実施形態において、ＰＫ２は、２つの型の出発化合物、すなわち、１，４－シクロヘキサンジメタノールおよび１，５－ペンタンジオールから合成される。ＰＫ２についてのＩＵＰＡＣ名称は、ポリ（シクロヘキサン－１，４－ジイル　アセトン　ジメチレン　ケタール－コ－１，５－ペンタン－アセトン　ジメチレン　ケタール）である。

【００４５】

一実施形態において、ＰＫ３は、表１に示される構造を有し（実施例８）、少なくとも２つの異なる単量体（すなわち、ランダムな繰り返し単位のような繰り返し単位）から構成される。ＰＫ３の一例において、単量体の１つの型は、約８７％のｘ値（すなわち、上記重合体に組み込まれる第一の単量体のパーセント成分）を有する１，４，－シクロヘキサンジメトキシであり、単量体の第二の型は、約１３％のｙ値（すなわち、上記重合体に組み込まれる第二の単量体のパーセント成分）を有する１，５－ペンタンジオキシである。Ｎ値は、３であり得る。この実施形態において、ＰＫ３は、２つの型の出発化合物、すなわち、１，４－シクロヘキサンジメタノールおよび１，５－ペンタンジオールから合成される。ＰＫ３についてのＩＵＰＡＣ名称は、ポリ（シクロヘキサン－１，４－ジイル　アセトン　ジメチレン　ケタール－コ－１，５－ペンタン－アセトン　ジメチレン　ケタール）である。

【００４６】

一実施形態において、ＰＫ４は、表１に示される構造を有し（実施例８）、少なくとも２つの異なる単量体（すなわち、ランダムな繰り返し単位のような繰り返し単位）から構成される。ＰＫ４の一例において、単量体の１つの型は、約９７％のｘ値（すなわち、上記重合体に組み込まれる第一の単量体のパーセント成分）を有する１，４，－シクロヘキサンジメトキシであり、単量体の第二の型は、約３％のｙ値（すなわち、上記重合体に組み込まれる第二の単量体のパーセント成分）を有する１，４－ブタンジオキシである。Ｎ値は、２であり得る。この実施形態において、ＰＫ４は、２つの型の出発化合物、すなわち、１，４－シクロヘキサンジメタノールおよび１，４－ブタンジオールから合成される

。ＰＫ４についてのＩＵＰＡＣ名称は、ポリ（シクロヘキサン－１，４－ジイル　アセトン　ジメチレン　ケタール－コ－１，４－ブタン－アセトン　ジメチレン　ケタール）である。

【００４７】

一実施形態において、ＰＫ５は、表１に示される構造を有し（実施例８）、少なくとも２つの異なる単量体（すなわち、ランダムな繰り返し単位のような繰り返し単位）から構成される。ＰＫ５の一例において、単量体の１つの型は、約８５％のｘ値（すなわち、上記重合体に組み込まれる第一の単量体のパーセント成分）を有する１，４，－シクロヘキサンジメトキシであり、単量体の第二の型は、約１５％のｙ値（すなわち、上記重合体に組み込まれる第二の単量体のパーセント成分）を有する１，６－ヘキサンジオキシである。Ｎ値は、４であり得る。この実施形態において、ＰＫ５は、２つの型の出発化合物、すなわち、１，４－シクロヘキサンジメタノールおよび１，６－ヘキサンジオールから合成される。ＰＫ５についてのＩＵＰＡＣ名称は、ポリ（シクロヘキサン－１，４－ジイル　アセトン　ジメチレン　ケタール－コ－１，６－ヘキサン－アセトン　ジメチレン　ケタール）である。

【００４８】

一実施形態において、ＰＫ６は、表１に示される構造を有し（実施例８）、少なくとも２つの異なる単量体（すなわち、ランダムな繰り返し単位のような繰り返し単位）から構成される。ＰＫ６の一例において、単量体の１つの型は、約８７％のｘ値（すなわち、上記重合体に組み込まれる第一の単量体のパーセント成分）を有する１，４，－シクロヘキサンジメトキシであり、単量体の第二の型は、約１３％のｙ値（すなわち、上記重合体に組み込まれる第二の単量体のパーセント成分）を有する１，８－オクタンジオキシである。Ｎ値は、６であり得る。この実施形態において、ＰＫ６は、２つの型の出発化合物、すなわち、１，４－シクロヘキサンジメタノールおよび１，８－オクタンジオールから合成される。ＰＫ６についてのＩＵＰＡＣ名称は、ポリ（シクロヘキサン－１，４－ジイル　アセトン　ジメチレン　ケタール－コ－１，８－オクタン－アセトン　ジメチレン　ケタール）である。

【００４９】

上記のＰＫ１～ＰＫ６共重合体は、１，４－シクロヘキサンジメタノールと、ブタンジオール、ペンタンジオール、ヘキサンジオールまたはオクタンジオールのいずれかとを共重合することによるアセタール交換反応を使用して合成され得る。下記の実施例８の表１に示されるように、ＰＫ１は、単量体Ａ（１，４－シクロヘキサンジメタノール）および単量体Ｂ（１，５－ペンタンジオール）を用いて合成した；ＰＫ２は、単量体Ａ（１，４－シクロヘキサンジメタノール）および単量体Ｂ（１，５－ペンタンジオール）を用いて合成した；ＰＫ３は、単量体Ａ（１，４－シクロヘキサンジメタノール）および単量体Ｂ（１，５－ペンタンジオール）を用いて合成した；ＰＫ４は、単量体Ａ（１，４－シクロヘキサンジメタノール）および単量体Ｂ（１，４－ブタンジオール）を用いて合成した；ＰＫ５は、単量体Ａ（１，４－シクロヘキサンジメタノール）および単量体Ｂ（１，６－ヘキサンジオール）を用いて合成した；ＰＫ６は、単量体Ａ（１，４－シクロヘキサンジメタノール）および単量体Ｂ（１，８－オクタンジオール）を用いて合成した。

【００５０】

本発明の別の実施形態において、本発明のＰＫ１、ＰＫ２、ＰＫ３、ＰＫ４、ＰＫ５およびＰＫ６共重合体は混ぜ合わせられ得、付着した活性物質の放出速度プロフィールを変更または細かく調整し得る。例えば、速い加水分解の速度論を有するポリケタール（例えば、ＰＫ４またはＰＫ３）は、より遅い加水分解の速度論を有するポリケタール（例えば、ＰＫ１またはＰＫ６）と混合され得、被験体に共投与（ｃｏ－ａｄｍｉｎｉｓｔｅｒ）され得る。ＰＫ４またはＰＫ３に加えられた活性物質は、被験体内で迅速に放出され、被験体に活性物質の即時放出（ＩＲ）用量を提供し、一方で、ＰＫ１またはＰＫ６に加えられた活性物質は、より遅い速度で放出され、被験体内において活性物質の漸進的な（ｇｒａｄｕａｌ）放出または延長放出（ＥＲ）を可能にする。

【００５１】
本発明の一実施形態において、上記の生分解性の疎水性ポリケタール重合体は、（１）複数のケタール基であって、各ケタール基は、該重合体骨格内に２つの酸素原子を有する、ケタール基、および（２）リンカー、を含む。このケタール基は、２，２－ジオキシプロピル基を含み得る。
【００５２】
本発明の生分解性ポリケタール粒子
本発明はさらに、本発明のポリケタール重合体を含む生分解性粒子を提供する。この粒子のサイズは変動し得る。例えば、生分解性粒子は、ナノメートル（ｎｍ）またはミクロン（μｍ）スケールで作製され得、例えば、ナノ粒子またはマイクロ粒子を形成し得る。本発明の粒子は、約５０ｎｍ～１０００μｍのサイズの範囲であり得る。一実施形態において、この粒子は、約２００ｎｍ～６００μｍのサイズの範囲である。別の実施形態において、この粒子は、約１μｍ～１０μｍ、１０μｍ～２０μｍ、２０μｍ～３０μｍ、３０μｍ～４０μｍまたは４０μｍ～５０μｍのサイズの範囲である。なお別の実施形態において、この粒子は、約１μｍ～５０μｍのサイズの範囲である。好ましい粒径は、約５０ｎｍと１０００ｎｍとの間であり、より好ましくは約２００ｎｍと６００ｎｍとの間である。別の好ましい粒径は、約３０μｍである。
【００５３】
生分解性粒子を形成するための適切なポリケタール重合体の好ましいサイズは、約０．５ｋＤａと約２ＭＤａとの間であり、より好ましいのは、１ｋＤａと約１５０ｋＤａとの間であり、最も好ましいのは、約４ｋＤａと約６ｋＤａとの間である。本発明に従って、上記重合体における単量体の数は、約２から約２０，０００まで、好ましくは約１０から約１，０００まで、より好ましくは約１０から約５０までの範囲であり得る。
【００５４】
本発明のポリケタール重合体は、水溶液中で加水分解して、低分子量、水溶性のアルコールおよびケトンになる。例えば、ポリ（アルキル－アセトン　ジメチレンケタール）の分解は、酸感受性であり、ｐＨ　７．４で１０２．０時間およびｐＨ　５．０で３５．０時間の半減期を有する。骨格内のケタール結合の利点は、このケタール結合が、ファゴソームの酸性条件下、１～２日以内にｐＨ５．０で分解することである。従って、ポリケタールはまた、腫瘍、炎症およびファゴリソソームの酸性環境を標的化するために、用いられ得る。この分解は、酸性分解産物を生じない。従って、上記ケタール重合体は、生物学的使用に適する。
【００５５】
本発明の実施に従って、上記ポリケタール重合体粒子はさらに、１つ以上の活性物質を含み得る。
【００５６】
本発明の一実施形態において、本発明の生分解性粒子は、（ａ）複数のケタール基を含む生分解性の疎水性ポリケタール重合体であって、各ケタール基は、該重合体骨格内に２つの酸素原子を有する、生分解性の疎水性ポリケタール重合体、およびおよび（ｂ）リンカーを含む。本発明の粒子を形成するのに適切な重合体としては、ＰＣＡＤＫおよびＰＫ１～ＰＫ６が挙げられる。
【００５７】
本発明の一実施形態において、上記のポリケタール重合体粒子はさらに、活性物質に結合し得る１つ以上のリンカーを含み得る。同一または異なる型の複数のリンカーは重合体粒子に付着され得る。これらのリンカーは、粒子の表面に付着される。すなわち、これらのリンカーは、粒子の周りの溶媒または水溶液に曝露される。
【００５８】
一実施形態において、本発明の生分解性粒子は、（ａ）１つ以上のＰＫ１、ＰＫ２、ＰＫ３、ＰＫ４、ＰＫ５またはＰＫ６（これは、必要に応じてリンカーを含み得る）、および（ｂ）活性物質を含む。本発明の別の実施形態において、本発明の生分解性粒子は、（

ａ）ＰＣＡＤＫ（これは、必要に応じてリンカーを含み得る）、および（ｂ）活性物質を含む。

【００５９】

本発明の実施にしたがって、上記粒子は、ポリケタールの単一の集団または混合した集団を含み得る。

【００６０】

本発明の活性物質

本明細書中に用いられている、用語「活性物質」は、タンパク質、ペプチド、核酸（ＤＮＡもしくはＲＮＡ）または有機分子、および他の合成核酸分子、ｓｉＲＮＡ分子、またはアンチセンス分子を指す。上記活性物質は、治療剤、予防剤または診断用薬剤であり得る。この治療剤は、免疫調節剤（例えば、ＲＩＧ－１またはＴＬＲ、またはＣ型レクチン（例えば、ｄｅｃｔｉｎ－１およびＤＣ－ＳＩＧＮ）またはキャタピラタンパク質に対する特異的リガンド、あるいは特異的ＴＬＲリガンドの組み合わせ、あるいはＤＣおよびマクロファージによる調節性シグナリングネットワークを阻害する合成分子またはｓｉＲＮＡ）であり得る。上記活性物質はさらに、タンパク質（例えば、組換えタンパク質）、ペプチド、炭水化物、核酸、低分子（例えば、キナーゼインヒビター、ホスファターゼインヒビター、サイトカインインヒビター、低分子抗酸化物質模倣物、レセプターブロッカー、細胞骨格再構成インヒビター、低分子レセプター活性化剤）、イメージング剤、ワクチン抗原、ＤＮＡワクチン、またはワクチン自体（例えば、インフルエンザワクチン）を含み得る。最終的に、活性物質は、ＤＣのサブセット（ランゲルハンス細胞、皮膚のＤＣ、骨髄のＤＣ、腸管のＤＣ、形質細胞様ＤＣを含む）、または単球およびマクロファージのサブセットを標的化するか、刺激するか、調節するかまたは阻害する抗体を含み得る。従って、これらの粒子の表面は、標的群（例えば、樹状細胞のサブセットに対する抗体、または樹状細胞もしくはマクロファージのサブセットを刺激するタンパク質（例えば、ＣＤ４０Ｌ、ＤＥＣ－２０５、ＣＤ１１ｃ、ｌａｎｇｅｒｉｎ、ＭＡＲＣＯ、３３Ｄ１など）など）を含むように改変され得る。

【００６１】

適切な活性物質の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：（１）ＴＬＲ（例えば、ＴＬＲ－２、ＴＬＲ－３、ＴＬＲ－４、ＴＬＲ－５、ＴＬＲ－７、ＴＬＲ－８、ＴＬＲ－９、ＴＬＲ－１０、およびＴＬＲ－１１）のアゴニストおよびアンタゴニスト、（２）住血吸虫の卵の抗原（ＳＥＡ）により活性化されるレセプターのアゴニストおよびアンタゴニスト、（３）これらの型のレセプターのいずれかの活性化により生じるシグナルを伝達する細胞内シグナリング経路の構成要素の発現または活性を刺激または阻害する分子、（４）１つ以上のこれらのシグナリング経路により誘導または安定化される転写因子を刺激または阻害する物質、ならびに（５）樹状細胞、マクロファージまたは抗原提示細胞内の調節経路のインヒビター。

【００６２】

アゴニストの例としては、ペプチドグリカン（Ｏ．Ｔａｋｅｕｃｈｉら，１９９９　Ｉｍｍｕｎｉｔｙ　１１：４４３－４５１）またはザイモサン（Ｄｉｌｌｏｎら，２００６　Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．１１６（４）：９１６－２８　Ａ．Ｏｚｉｎｓｋｙら，２０００　Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９７：１３７６６－１３７７１）が挙げられるが、これらに限定されない。アゴニストとしてはまた、細菌性リポペプチド（例えば、ジアシル化およびトリアシル化されたリポペプチド）、リポテイコ酸、リポアラビノマンナン、フェノール溶解性モジュリン（ｍｏｄｕｌｉｎ）、グリコイノシトールホスホリピッド、糖脂質、ポーリン、Ｌｅｐｔｏｓｐｉｒａ　ｉｎｔｅｒｒｏｇｎｓもしくはＰｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ　ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓ由来の非定型のＬＰＳ、またはＨＳＰ７０も挙げられる（概説については、Ｋ　Ｔａｋｅｄａら，２００３　Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２１：３３５－３７６を参照のこと）。上記アゴニストは、単離および／または高度精製された分子であり得る。上記アゴニストは、分子全体またはそのフラグメント、あるいは天然に存在するアゴニストもしくは合成アゴニストを包

含する。例としては、コレラ毒素の非毒性形態（Ｂｒａｕｎら，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８９：５４１－５５２，１９９９）、Ｃａｎｄｉｄａ　ａｌｂｉｃａｎｓの特定の形態（ｄ’Ｏｓｔｉａｎｉら，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１９１：１６６１－１６７４，２０００），またはＰ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓ　ＬＰＳ（Ｐｕｌｅｎｄｒａｎら，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ　１６７：５０６７－５０７６，２００１）が挙げられるが、これらに限定されない。

【００６３】

細菌性リポペプチドの例としては、Ｎ末端システインの脂肪酸鎖が異なる細菌細胞壁リポペプチド（例えば、ジアシル化およびトリアシル化されたリポペプチド）が挙げられる。例えば、ジアシル化されたリポペプチドとしては、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ　ｆｅｒｍｅｎｔａｎｓ由来のマクロファージ活性化リポペプチド　２キロダルトンもしくはそのフラグメントまたは合成アナログ（例えば、ＭＡＬＰ２、Ｐａｍ２ＣＳＫ４、Ｐａｍ２ＣＧＮＮＤＥＳＮＩＳＦＫＥＫ、およびＰａｍ２ＣＧＮＮＤＥＳＮＩＳＦＫＥＫ－ＳＫ４）が挙げられる。トリアシル化されたリポペプチドとしては、Ｐａｍ３ｃｙｓ｛Ｓ－［２，３－ビス（パルミトイルオキシ）－（２－ＲＳ）－プロピル］－Ｎ－パルミトイル－Ｒ－Ｃｙｓ－Ｓ－Ｓｅｒ－Ｌｙｓ４－ＯＨ）｝（Ｔａｋｅｕｃｈｉら，２００１　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　１３：９３３－９４０）が挙げられる。

【００６４】

ある実施形態において、上記アゴニストは、特異的に、ＴＬＲ－２またはＳＥＡにより結合されるレセプター（ＳＥＡに関して、ＭａｃＤｏｎａｌｄら，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６７：１９８２－１９８８，２００１を参照のこと）に作用する。ここでもまた、上記アゴニストは、天然のリガンド、その生物学的に活性なフラグメント、または低分子もしくは合成の分子であり得るが、これらに限定されない。他の有用なアゴニストとしては、コレラ毒素の非毒性形態（Ｂｒａｕｎら，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８９：５４１－５５２，１９９９）、Ｃａｎｄｉｄａ　ａｌｂｉｃａｎｓの特定の形態（ｄ’Ｏｓｔｉａｎｉら，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１９１：１６６１－１６７４，２０００）、またはＰｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ　ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓ　ＬＰＳ（Ｐｕｌｅｎｄｒａｎら，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６７：５０６７－５０７６．２００１）が挙げられ得る。これらの物質は、ＩＬ－１２（ｐ７０）を誘導できず、Ｔｈ２－様反応を刺激できない。

【００６５】

上記アゴニストは、（Ｔｈ反応（例えば、ＴＨ１）に対して免疫反応を偏向させる）ＴＬＲ－４のアゴニストであり得、タキソール、ラウス肉腫ウイルス由来の融合タンパク質、ＭＭＴＶ由来のエンベロープタンパク質、Ｃｈｌａｍｙｄｉａ　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ由来のＨｓｐ６０または宿主由来のＨｓｐ６０もしくはＨｓｐ７０が挙げられる。ＴＬＲ－３を作動する他の宿主因子は、フィブロネクチンのＩＩＩ型リピートエキストラドメイン（ｅｘｔｒａ　ｄｏｍａｉｎ）Ａ、ヒアルロン酸のオリゴ糖、硫酸ヘパリンの多糖フラグメント、およびフィブリノーゲンを含む。多数の合成化合物（例えば、イミダゾキノリン（イミキモドおよびＲ－８４８）、ロキソリビン、ブロピリミン、および核酸と構造的に関係する他の化合物）は、ＴＬＲ－７のアゴニストとして作用する。

【００６６】

適切な活性物質のさらなる例としては、ＥＲＫ、ｃ－Ｆｏｓ、Ｆｏｘｐ３、ＰＩ３キナーゼ、Ａｋｔ、ＪＮＫ、ｐ３８、ＮＦ－Ｋｂ、ＳＴＡＴ　１、ＳＴＡＴ２、ＩＲＦ３、ＩＲＦ７、ＩＦＮ－αのシグナリングのインヒビターまたはその組み合わせが挙げられる。適切な活性物質としてはさらに、ＳＯＣＳ　１～７タンパク質のインヒビターが挙げられ得る。このようなインヒビターは、低分子、またはペプチド、タンパク質または核酸（例えば、ｓｉＲＮＡもしくはアンチセンス）であり得る。

【００６７】

上記アゴニストは、内因性リガンドでも外因性リガンドでもよく、それらの多くは、当該分野において公知である。下記の新規のスクリーニング方法（特に、ＴＬＲの結合または活性化を検出することを特色にする方法）は、他のリガンド（天然に存在する分子、そのフラグメントもしくは誘導体、抗体、他のペプチドもしくはタンパク質を含む複合体、

または合成のリガンドのいずれであってもよい）を同定するために用いられ得る。例えば、ＴＬＲ－２の外因性リガンドとしては、ＬＰＳ（リポ多糖；グラム陰性細菌の外膜の構成成分）、酵母の粒子であるザイモサン、細菌のペプチドグリカン、細菌およびマイコバクテリアに由来するリポタンパク質、およびＴｒｙｐａｎｏｓｏｍａ　ｃｒｕｚｉ由来のＧＰＩアンカーが挙げられ；内在性リガンドとしては、熱ショック（または「ストレス」）タンパク質（例として、例えば、細菌病原体またはマイコプラズマ病原体に由来するＨｓｐ６０）およびサーファクタントタンパク質Ａが挙げられる。ＴＬＲ－３の外因性リガンドとしては、ポリ（Ｉ：Ｃ）（ウイルスｄｓＮＲＡ）が挙げられ；ＴＬＲ－４の外因性リガンドとしては、ＬＰＳ、およびＲＳウイルスが挙げられる（内因性リガンドとしては、ストレスタンパク質（例えば、Ｈｓｐ６０またはＨｓｐ７０）、飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸、ヒアルロン酸およびそのフラグメント、ならびにサーファクタントタンパク質Ａが挙げられる）。フラゲリンは、ＴＬＲ－５の外因性リガンドである。ＣｐＧ（シトシン－グアニン　リピート）ＤＮＡおよびｄｓＤＮＡは、各々、ＴＬＲ－９の外因性リガンドおよび内因性リガンドである。Ｚｕａｎｙ－Ａｍｏｒｉｍら，Ｎａｔｕｒｅ　Ｒｅｖｉｅｗｓ　１：７９７－８０７，２００２，およびＴａｋｅｄａら，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２１：３５５－３７６，２００３を参照のこと。

【００６８】

適切な活性物質のさらなる例としては、（ａ）樹状細胞内のＡＰ－１転写因子の発現または活性を阻害する物質、（ｂ）ＡＰ－１転写因子の発現または活性を阻害する物質を含む培養物中で処理された樹状細胞、あるいは（ｃ）（ｂ）に記載されている通り処理された樹状細胞を含む培養物中で刺激された同系のＴ細胞が挙げられる。上記転写因子としては、ｃ－ｆｏｓ、ｆｏｓ－Ｂ、Ｆｏｘｐ３、またはｃ－ｊｕｎが挙げられ得、（上記転写因子または本明細書中に記載されている経路の任意の構成成分（これらの構成成分は当該分野において公知である）の）発現を阻害する物質は、ｃ－ｆｏｓ、ｆｏｓ－Ｂ、Ｆｏｘｐ３、もしくはｃ－ｊｕｎの発現（またはキナーゼ、ホスファターゼ、もしくは上記シグナリング経路の他の構成成分の発現）を特異的に阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドあるいはＲＮＡｉ分子であり得る。本発明の生分解性粒子に関連して議論されている阻害性活性物質はまた、抗体（またはその改変体（例えば、単鎖抗体もしくはヒト化抗体）であり得；好ましくは上記抗体は、モノクローナル抗体である）。

【００６９】

別の実施形態において、上記活性物質は、ＴＬＲ２のシグナリングまたは活性化を弱める細胞内経路のアンタゴニスト（例えば、インヒビターまたはサプレッサ）である。上記アンタゴニストとしては、グラム陰性ＬＰＳ、タキソール、ＲＳＶの融合タンパク質、ＭＭＴＶのエンベロープタンパク質、ＨＳＰ６０、ＨＳＰ７０、フィブロネクチンのＩＩＩ型リピートエキストラドメインＡ、ヒアルロン酸のオリゴ糖、硫酸ヘパリンのオリゴ糖フラグメント、フィブリノーゲンおよびフラゲリンが挙げられる（例えば、概説については、Ｋ　Ｔａｋｅｄａら，２００３　Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２１：３３５－３７６を参照のこと）。

【００７０】

さらなる実施形態において、上記活性物質は、ＳＥＡのシグナリングまたは活性化を弱める細胞内経路のアンタゴニストである。１つの他の実施形態において、その分子は、ＪＮＫ　１／２経路のアンタゴニストである。別の実施形態において、上記分子は、ｐ３８およびＥＲＫを活性化するＣｐＧ　ＤＮＡである（Ａ－Ｋ　Ｙｉら，２００２　Ｔｈｅ　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　１６８：４７１１－４７２０）。

【００７１】

別の実施形態において、上記活性物質は、樹状細胞の成熟を阻害し得、従って、ＩＬ１２およびＴｈ１反応を増大させ得るＥＲＫ　１／２のインヒビターである。上記分子の例としては、ＰＤ９８０５９およびＵ０１２６（Ａ．Ｐｕｉｇ－Ｋｒｏｇｅｒら，２００１　Ｂｌｏｏｄ　９８：２１７５－２１８２）が挙げられるが、これらに限定されない。

【００７２】

別の実施形態において、上記活性物質は、ｃ－ｆｏｓのシグナリングを阻害し、従って、ＩＬ１２およびＴｈ１反応を増大させる。このような分子としては、ｃ－ｆｏｓのＤＥＦドメイン変異体またはＤＥＦドメイン変異を有する任意のポリペプチドが挙げられ（Ｌ．Ｏ．Ｍｕｒｐｈｙら，２００２ Ｎａｔｕｒｅ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ ４：５５６－５６４および補遺情報１～３頁）、これらとしては、ラットのＦｒａ－１、およびＦｒａ－２；マウスのＦｏｓＢ、ＪｕｎＤ、ｃ－Ｊｕｎ、ｃ－Ｍｙｃ、およびＥｇｒ－１；ならびにヒトのＪｕｎＢ、Ｎ－Ｍｙｃ、およびｍＰｅｒｌが挙げられる。

【００７３】

活性物質は、ＤＮＡ、ＲＮＡ、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはｓｉＲＮＡのような核酸を含み得る。ＤＮＡの適切な例は、治療用遺伝子を含む。治療用遺伝子の例としては、自殺遺伝子が挙げられる。これらは、遺伝子配列であり、その発現により、腫瘍細胞増殖または腫瘍細胞死を阻害するタンパク質または作用物質が生成される。自殺遺伝子としては、酵素をコードする遺伝子、癌遺伝子、腫瘍抑制遺伝子、毒素をコードする遺伝子、サイトカインをコードする遺伝子、またはオンコスタチンをコードする遺伝子が挙げられる。上記治療用遺伝子の目的は、癌細胞の増殖を阻害するか、または癌細胞を殺傷するか、あるいは直接的もしくは間接的に癌細胞の増殖を阻害するかまたは癌細胞を殺傷するサイトカインまたは他の細胞傷害性物質を産生することである。

【００７４】

適切な癌遺伝子および腫瘍抑制遺伝子としては、ｎｅｕ、ＥＧＦ、ｒａｓ（Ｈ、Ｋ、およびＮ ｒａｓが挙げられる）、ｐ５３、網膜芽細胞腫腫瘍抑制遺伝子（Ｒｂ）、ウィルムス腫瘍遺伝子産物、ホスホチロシンホスファターゼ（ＰＴＰａｓｅ）、ならびにｎｍ２３が挙げられる。適切な毒素としては、シュードモナス属の外毒素Ａおよび外毒素Ｓ；ジフテリア毒素（ＤＴ）；Ｅ．ｃｏｌｉのＬＴ毒素、志賀毒素、志賀類似毒素（ＳＬＴ－１、－２）、リシン、アブリン、ｓｕｐｐｏｒｉｎ、およびゲロニン（ｇｅｌｏｎｉｎ）が挙げられる。

【００７５】

活性物質は、酵素を含み得る。適切な酵素としては、チミジンキナーゼ（ＴＫ）、Ｅ．ｃｏｌｉ由来のキサンチン－グアニン ホスホリボシルトランスフェラーゼ（ＧＰＴ）遺伝子もしくはＥ．ｃｏｌｉのシトシンデアミナーゼ（ＣＤ）、またはヒポキサンチン ホスホリボシル トランスフェラーゼ（ＨＰＲＴ）が挙げられる。

【００７６】

活性物質は、サイトカインを含み得る。適切なサイトカインとしては、インターフェロン、ＧＭ－ＣＳＦ、インターロイキン、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）が挙げられる（Ｗｏｎｇ Ｇら，Ｓｃｉｅｎｃｅ １９８５；２２８：８１０）；ＷＯ９３２３０３４（１９９３）；Ｈｏｒｉｓｂｅｒｇｅｒ Ｍ．Ａ．ら，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｖｉｒｏｌｏｇｙ，１９９０年5月，６４（３）：１１７１－８１；Ｌｉ ＹＰら，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，１９９２年2月1日，１４８（３）：７８８－９４；Ｐｉｚａｒｒｏ Ｔ．Ｔ．ら，Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ，１９９３年8月，５６（２）：３９９－４０４）；（Ｂｒｅｖｉａｒｉｏ Ｆ．ら，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１９９２年１１月5日，２６７（３１）：２２１９０－７；Ｅｓｐｉｎｏｚａ－Ｄｅｌｇａｄｏ Ｉ．ら，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，１９９２年１１月1日，１４９（９）：２９６１－８；Ａｌｇａｔｅ Ｐ．Ａ．ら，Ｂｌｏｏｄ，１９９４年5月1日，８３（９）：２４５９－６８；Ｃｌｕｉｔｍａｎｓ Ｆ．Ｈ．ら，Ａｎｎａｌｓ ｏｆ Ｈｅｍａｔｏｌｏｇｙ，１９９４年6月，６８（６）：２９３－８；Ｍａｒｔｉｎｅｚ Ｏ．Ｍ．ら，Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ，１９９３年5月，５５（５）：１１５９－６６。

【００７７】

活性物質は、増殖因子を含み得る。増殖因子としては、トランスホーミング増殖因子α（ＴＧＦ－α）およびβ（ＴＧＦ－β）、サイトカインコロニー刺激因子が挙げられる（Ｓｈｉｍａｎｅ Ｍ．ら，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ ａｎｄ Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａｌ

Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｆｅｂ．２８，１９９４，１９９（１）：２６－３２；Ｋａｙ Ａ．Ｂ．ら，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，Ｍａｒ．１，１９９１，１７３（３）：７７５－８；ｄｅ Ｗｉｔ Ｈら，１９９４ Ｆｅｂ．，８６（２）：２５９－６４；Ｓｐｒｅｃｈｅｒ Ｅ．ら，Ａｒｃｈｉｖｅｓ ｏｆ Ｖｉｒｏｌｏｇｙ，１９９２，１２６（ｌ－４）：２５３－６９）。

【００７８】

さらに、活性物質としては、タンパク質であるカタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、一酸化窒素シンターゼが挙げられ得る。

【００７９】

本発明の活性物質は、天然に存在しているか、合成であるか、または組換えにより生成され得、この活性物質としては、任意の微生物もしくはウイルスの構成成分またはその誘導体（微生物細胞またはウイルスの構造の一部分であるか、またはこれらにより生成される任意の構成成分（細胞壁、被膜タンパク質、細胞外タンパク質、細胞内タンパク質、任意の毒性化合物もしくは非毒性化合物、炭水化物、タンパク質－炭水化物複合体、または微生物細胞もしくはウイルスの任意の他の構成成分が挙げられるが、これらに限定されない））が挙げられるが、これらに限定されない。上記微生物細胞またはウイルスは、病原性であり得る。

【００８０】

本発明のリンカー

本発明のポリケタール（例えば、粒子の実施形態において）はさらに、１つ以上のリンカーを含み得る。このリンカーは、同一の型であっても、ポリケタール重合体に付着される種々の型の混合物を含んでもよい。このリンカーは、ポリケタール重合体の表面に付着され得る。例えば、このリンカーは、この粒子の周りの溶媒または水溶液に曝露され得る。

【００８１】

上記リンカーは、１～１０００ｎｍまたは１００～２００，０００Ｄａのサイズの範囲であり得る。本発明の一実施形態において、このリンカーは、１～１０ｎｍ、１０～５０ｎｍ、５０～１００ｎｍ、１００～２００ｎｍ、２００～３００ｎｍ、３００～４００ｎｍ、４００～５００ｎｍ、５００～６００ｎｍ、６００～７００ｎｍ、７００～８００ｎｍ、８００～９００ｎｍおよび９００～１０００ｎｍのサイズの範囲であり得る。本発明の別の実施形態において、このリンカーは、１００～１０，０００Ｄａ、１０，０００～５０，０００Ｄａ、５０，０００～１００，０００Ｄａ、１００，０００～１５０，０００Ｄａおよび１５０，０００～２００，０００Ｄａのサイズの範囲であり得る。本発明のなお別の実施形態において、このリンカーは、約２００～３００Ｄａ、１０，０００Ｄａ、４０，０００Ｄａ、６４，０００Ｄａまたは１５０，０００Ｄａのサイズであり得る。

【００８２】

上記のリンカーは、タンパク質、ポリペプチド、核酸または化合物であり得る。タンパク質リンカーまたはポリペプチドリンカーの例としては、アルギニン－アスパラギン酸－グリシン（ＲＤＧ）のようなアミノ酸配列、ヘモグロビン、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、ストレプトアビジンまたは抗体が挙げられるが、これらに限定されない。核酸リンカーの例としては、ＲＮＡ、ＤＮＡ（例えば、ポリＡまたはポリＴ配列の４～５０核酸長の索（ｔｒａｃｔ）のようなｓｓＤＮＡ）または合成アナログが挙げられるが、これらに限定されない。リンカーとして使用され得る化合物の例としては、ポリカルボン酸（例えば、ポリアクリル酸）またはニトリロ三酢酸（ＮＴＡ）リガンド、ビピラドール（ｂｉｐｙｒａｄｏｌ）およびＥＤＴＡのようなキレート剤が挙げられるが、これらに限定されない。キレート剤は、金属イオン（例えば、ニッケル、亜鉛、銅など）に結合し、今度は、この金属イオンが、リンカーへの活性物質の結合を促進する。このリンカーは、本発明のポリケタールへ（例えば、非共有結合を介して）活性物質を係留または組み合わせる。

【００８３】
上記リンカーは、タンパク質、ペプチド、核酸および／または炭水化物が挙げられるが、これらに限定されない活性物質に結合し得る。一実施形態において、このタンパク質、ペプチドおよび／または炭水化物はさらに、ヒスチジンタグを含む。このヒスチジンタグは、約２～８個のヒスチジンを含み得る。例えば、一実施形態において、このヒスチジンタグは、約６個のヒスチジンを含む。そのようにしてこのリンカーに結合するタンパク質は、治療用タンパク質、予防用タンパク質または診断用タンパク質であり得る。
【００８４】
本発明の実施にしたがって、上記治療用タンパク質は、免疫調節性タンパク質であり得る。例えば、この免疫調節性タンパク質としては、以下が挙げられ得るが、これらに限定されない：（ａ）ＴＬＲ２、３、４、５、７、８、９、１０および１１のうちのいずれかに対するリガンドまたはこれらの組み合わせ、（ｂ）樹状細胞、マクロファージもしくは抗原提示細胞内の調節経路のインヒビター、ならびに（ｃ）ＲＩＧ－１、任意のＣ型レクチン（ｄｅｃｔｉｎ－１およびＤＣ－ＳＩＧＮを含む）もしくはキャタピラタンパク質に対するリガンド。調節経路のインヒビターとしては、（ａ）ＥＲＫ、ｃ－Ｆｏｓ、Ｆｏｘｐ３、ＰＩ３キナーゼ、Ａｋｔ、ＪＮＫ、ｐ３８、ＮＦ－Ｋｂ、ＳＴＡＴ１、ＳＴＡＴ２、ＩＲＦ３、ＩＲＦ７、ＩＦＮ－αのシグナリング；または（ｂ）ＳＯＣＳ１、２、３または他のＳＯＣＳタンパク質のインヒビターが挙げられ得る。
【００８５】
リンカーに結合するタンパク質のさらに適切な例としては、増殖因子、サイトカイン、抗酸化酵素、抗体、エリスロポエチン（ＥＰＯ）、レセプターリガンドが挙げられる。
【００８６】
一実施形態において、本発明のポリケタール（例えば、ＰＣＡＤＫまたはＰＫ１～ＰＫ６のいずれか）は、ＮＴＡリンカーを含む。このＮＴＡリンカーは、ニッケルイオンをロードされ得、ヒスチジンタグ付きタンパク質に結合するＮＴＡ－Ｎｉリンカーを生成し得る。
【００８７】
（本発明のミセル）
本発明はさらに、本発明の多数の重合体を含む生分解性の架橋されたミセルを提供する。上記重合体は、外部架橋剤により架橋され得る。本明細書中に用いられている外部架橋剤は、上記重合体鎖に導入されない薬剤である。外部薬剤を用いることの利点は、重合体内の架橋可能部分のみが用いられる反応と比較して、架橋反応がより速いことである。上記外部架橋剤はまた、カプセル化されたタンパク質が破壊される機会を減少させる。
【００８８】
本発明の一局面において、適切な架橋剤は、少なくとも２つのチオール基を含む化合物である。適切な架橋剤の例としては、エチレングリコールジチオール、脂肪族ジチオール類、ケタール結合により連結されるジチオール類、およびジアミン含有分子が挙げられるが、これらに限定されない。チオール基の利点は、還元条件に対する感受性であり、従って、上記ミセルの容易な分解を可能にすることである。他の架橋戦略としては、アミン、エステル、カーボネート、チオエステル、シッフ塩基、ビシナルジオール、アルケンおよびアルキン、ケタール、ケタール　オルトエステル、チオ－ケタール、チオ－オルトエステル、ｓｉｌｙ－ケタール、フェニル　ボロン酸－ジオール複合体、炭素－炭素結合、スルホン、ホスファートを含む官能基、アジド、酵素で切断可能な結合、およびウレタンにより架橋することが挙げられるが、これらに限定されない。シッフ塩基、チオールおよびケトンが、本出願の一実施形態において好ましい（Ｏ’Ｒｅｉｌｌｙら，２００５　Ｃｈｅｍ．Ｍａｔｅｒ．，１７（２４）：５９７６－５９８８；Ｈａｎｋｅｒら，２００５　Ｓｃｉｅｎｃｅ　３０９（５７３８）：１２００－０５；Ｌｅ，Ｚ．ら，２００５　Ｌａｎｇｍｕｉｒ　２１（２５）：１１９９９－１２００６；実施例１，図９）。
【００８９】
本発明の別の局面において、上記外部架橋剤は、抗原を含む。適切な抗原の例としては

、タンパク質またはペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。上記抗原は、天然に存在し得るか、化学的に合成され得るかまたは組換えにより作製され得る。適切なタンパク質抗原またはペプチド抗原の特定の例としては、ＨＩＶ抗原（例えば、ｇｐｌ２０タンパク質（またはそのフラグメント））、ＴＡＴタンパク質（またはそのフラグメント）、ＮＥＦタンパク質（またはそのフラグメント）、ＨＣＶタンパク質（またはそのフラグメント）、およびｅｎｖタンパク質（またはそのフラグメント）が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい抗原としては、そこにさらなるジスルフィド結合を作製するため、４つのさらなるシステイン残基を含むように化学的に合成および改変されたｇｐｌ２０ペプチド抗原が挙げられる。架橋可能な基を有する任意の抗原が、用いられ得る。架橋可能な基を有しないかまたはほとんど有しない抗原が、架橋可能なチオール基、アジド、アルキン、アミン、マレイミド、ビニルスルホン、ケトン、ヒドラジンおよびチオエステルを含むように改変され得る（例えば、化学的に改変され得る）。

【００９０】

ミセル形成のために用いられる重合体は、ホモ重合体または共重合体（例えば、ブロック共重合体またはグラフト重合体）であり得る。適切な重合体の例としては、ＰＥＧが開始剤として作用する原子転移重合化により合成された、ＰＥＧブロック共重合体（例えば、ＰＥＧ－ポリアミノ酸（例えば、ＰＥＧ－ポリリジン、ＰＥＧ－ポリグルタミン酸、ＰＥＧ－ポリアスパラギン酸またはＰＥＧ－ポリアルギニン）；ＰＥＧ－ポリエステル、ＰＥＧ－ポリウレタン、ＰＥＧ－ＰＰＯ、改変されたまたは改変されていない、ＰＥＧ－ポリアクリラートまたはＰＥＧ－ポリメタクリラート）が挙げられるが、これらに限定されない。重合体の架橋を促進するために、上記重合体は、化学基（アミン、エステル、カーボネート、チオエステル、シッフ塩基、ビシナルジオール、アルケンおよびアルキン、ケタール、ケタール　オルトエステル、チオ－ケタール、チオ－オルトエステル、ｓｉｌｙ－ケタール、フェニル　ボロン酸－ジオール複合体、炭素－炭素結合、スルホン、ホスファート含有官能基、アジド、酵素で切断可能な結合、およびウレタンが挙げられるが、これらに限定されず、シッフ塩基、チオールおよびケトンが、本発明の一実施形態において好ましい）を含むように改変され得る。これらの基は、当該分野において公知の化学反応（例えば、とりわけ、Ｍｉｃｈａｅｌ付加またはアシル化）によって導入され得る（実施例１、図９）。１つの好ましい実施形態において、上記改変された重合体は、ＰＥＧ－ポリリジン　チオピリダール（ｔｈｉｏｐｙｒｉｄａｌ）（図９）である。

【００９１】

上記ポリメタクリラートブロックまたはポリアクリラートブロックは、ワクチン構成成分および架橋を用いた組立てを可能にするための改変を含み得る。例えば、ポリアクリラートブロックは、ポリジメチルアミノ－アクリラート－ポリ－グリシジル　アクリラートからなるブロック共重合体であり得る。ワクチン構成成分を用いてミセルを形成する能力を有する様々なアクリラート単量体またはメタクリラート単量体から構成されるランダム共重合体のホモ重合体もまた、本発明の範囲内にある。

【００９２】

本発明の別の局面において、上記ミセルはさらに、１つ以上の活性物質を含み得る。適切な活性物質の例は、本明細書中に、上記される。

【００９３】

本発明の実施に従って、上記ミセルと上記活性物質との間の相互作用は、静電性または疎水性であり得るかあるいは重合体および物質の型に依存して、水素結合形成または分子認識に起因して生じ得る。このミセルの表面は、標的化群（例えば、樹状細胞に対する抗体、または樹状細胞もしくはマクロファージのサブセットを刺激するタンパク質（例えば、ＣＤ４０Ｌ、ＤＥＣ－２０５、ＣＤ１１ｃ、ｌａｎｇｅｒｉｎ、ＭＡＲＣＯ、３３Ｄ１など））を含むように改変され得る。

【００９４】

一実施形態において、上記ミセルは、ペプチド抗原および免疫調節性分子を抗原提示細胞（ＡＰＣ）に送達するように設計される。この実施形態において、上記ミセルは、免疫

調節性分子、ペプチド抗原および共重合体を含む。上記ペプチド抗原は、このペプチド抗原が効率的にカプセル化されてそのペプチド架橋されたミセル（ＰＣＭ）となることを可能にし、また血清構成成分による分解に対してこれらのＰＣＭを安定化する架橋剤として作用する。

【００９５】

別の実施形態において、上記ミセルは、免疫調節剤（多数のＴＬＲリガンド、または分子（例えば、細胞（例えば、樹状細胞もしくは他の抗原提示細胞）内のシグナリングネットワークを調節する合成の化合物またはｓｉＲＮＡ）が挙げられる）を用いて、ペプチド抗原またはタンパク質抗原を一緒にカプセル化するために用いられ得る。樹状細胞およびマクロファージがファゴサイトーシスによりナノメートルのサイズの物質をしっかりと内在化するので、上記ミセルは、ナノメートルの寸法を有することによってこれらの細胞を標的化する。上記ミセルは、ジスルフィド結合を含む架橋剤により架橋され、この架橋剤は、これらのミセルを血清タンパク質により誘導される分解に対して安定化する。本発明のさらなる実施形態において、上記ミセルは、５～５０ミクロンのサイズを有する。

【００９６】

ファゴサイトーシス後、本発明の生分解性粒子およびミセルは、分解され、上記カプセル化された物質（例えば、ペプチドまたは抗原、および免疫刺激剤［例えば：ＩＳＳ　ＤＮＡ、ＴＬＲ　７／８、ＴＬＲ　３リガンド（例えば、ｓｓ　ＲＮＡ）、ＴＬＲ　２リガンド、および調節経路（例えば、ＥＲＫ、ｃ－ＦｏｓまたはＦｏｘｐ３の経路）のインヒビター］）は、樹状細胞またはマクロファージ内に放出され、上記免疫調節剤は、抗原提示細胞を誘導して、様々なサイトカインを分泌させる。このシグナルの組み合わせが、最適なＴ細胞の活性化、ならびに調節性Ｔ細胞および樹状細胞の阻害をもたらす。

【００９７】

本発明のミセルは、免疫調節剤［例えば：ＩＳＳ　ＤＮＡ、ＴＬＲ　７／８リガンド（例えば、ｓｓ　ＲＮＡ）、ＴＬＲ　２リガンド、および調節経路のインヒビター（例えば、ＥＲＫ、ｃ－ＦｏｓもしくはＦｏｘｐ３、ＰＩ３キナーゼ、Ａｋｔ、ＳＯＣＳ　１～７タンパク質のインヒビター）、またはｓｉＲＮＡ分子もしくはこのような調節経路を阻害するアンチセンス分子］と共に、活性物質（例えば、関係する病原体に由来する抗原から構成されたワクチン）を含み得る。

【００９８】

本発明はまた、タンパク質が上記ミセル中にカプセル化されるために適切な電荷を有するように、可逆的にこれらのタンパク質を改変するための方法を提供する。この戦略は、上記タンパク質のアミン基と化合物を反応させて、全てのアミン基についてさらなる負電荷を生成し、このタンパク質を負にすることに基づく。次いで、上記改変されたタンパク質は、上記ミセル中にカプセル化され、架橋され、次いで、上記タンパク質から（ｆｏｒｍ）その挿入された化合物を除去するために、ｐＨが、低下される。本発明の一実施形態において、上記化合物は、アミン基は、シス－アコニチル（ｃｉｓ－ａｃｏｎｉｔｙｌ）である。この基は、各アミン基に負電荷を付加し、ｐｈ　４．０で放出され得る。

【００９９】

標的化戦略のための例は、一端でのＤＮＡ結合ドメイン、およびタンパク質に結合され得るもう一端を有するヘテロ二官能性ＰＥＧを合成することを含む。次いで、このＰＥＧ鎖は、タンパク質に結合され、次いで、免疫刺激性ＤＮＡを含む予備形成されたミセルに組み立てられる。ＤＮＡ結合ドメインの例としては、アクリジンまたはポリアクリジンが挙げられる。標的化リガンドの例としては、ガラクトース、マンノースリン酸、マンノース、ペプチド、および抗体が挙げられる。

【０１００】

本発明の生分解性粒子およびミセルのさらなる改変

上記生分解性粒子またはミセルはさらに、（１）ＤＣもしくはマクロファージもしくは単球の特定のサブセット（ランゲルハンス細胞、皮膚のＤＣ、骨髄のＤＣ、形質細胞様ＤＣを含む）上の特異的なレセプター、または（２）抗原提示細胞上の特異的なレセプター

（例えば、ＤＥＣ２０５、Ｌａｎｇｅｒｉｎ、ＤＣ－ＳＩＧＮ、ｄｅｃｔｉｎ－１、３３Ｄ１、ＭＡＲＣＯ）を標的化する抗体または他の分子を組み込むように改変され得る。

【０１０１】

本発明の薬学的組成物

本発明は、本発明の重合体（これは、必要に応じてリンカーを含み得る）を含む薬学的組成物を提供する。一実施形態において、本発明は、本発明の粒子（これは、必要に応じてリンカーを含み得る）を含む薬学的組成物を提供する。別の実施形態において、本発明は、本発明のミセル（これは、必要に応じてリンカーを含み得る）を含む薬学的組成物を提供する。本発明の重合体はさらに、粒子の形態であろうとミセルの形態であろうと、活性物質を含み得る。例えば、一実施形態において、本発明は、活性物質に結合されるリンカーを有するＰＣＡＤＫ、ＰＫ１、ＰＫ２、ＰＫ３、ＰＫ４、ＰＫ５および／またはＰＫ６粒子を含む薬学的組成物を提供する。

【０１０２】

本発明の方法

本発明の粒子およびミセルを生成する方法

本発明は、本発明の粒子を生成するための方法を提供する。一実施形態において、上記方法は、ａ）ケタールおよびジオールまたは不飽和アルコールの疎水性重合体を形成する工程；ｂ）１つ以上の活性物質の存在下で、ａ）の重合体の重合体粒子を形成し、それによって、上記物質をカプセル化する工程を包含する。ケタールおよびジオールまたは不飽和アルコールの疎水性重合体を形成するための適切な化学の例としては、単一エマルジョンまたは二重エマルジョンおよび非環式ジエン複分解を用いたアセタール交換反応（Ｈｅｆｆｅｒｎａｎ ＭＪ および Ｍｕｒｔｈｙ Ｎ.，２００５ Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇ．Ｃｈｅｍ．１６（６）：１３４０－２；Ｊａｉｎ ＲＡ.，２０００ Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ．２１（２３）：２４７５－９０：Ｗａｇｅｎｅｒ Ｋ．Ｂ．および Ｇｏｍｅｚ Ｆ．Ｊ．，「ＡＤＭＥＴ Ｐｏｌｙｍｅｒｉｚａｔｉｏｎ」，Ｅｎｃｙｃｌｏｐｅｄｉａ ｏｆ Ｍａｔｅｒｉａｌｓ：Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，ＥＪ．Ｋｒａｍｅｒ および Ｃ． Ｈａｗｋｅｒ編集，Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，Ｏｘｆｏｒｄ，５，４８（２００２））が挙げられる。

【０１０３】

この方法のための適切なケタールの例としては、２，２－ジメトキシプロパン、２，２－ジメトキシブタン、１，１－ジメトキシシクロヘキサンまたはジメトキシアセトフェノール（ｄｉｍｅｔｈｏｘｙａｃｅｔｏｐｈｅｎｏｌｅ）が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の範囲内にあるのはまた、１つ以上のヘテロ原子（例えば、窒素、硫黄、酸素およびハロゲン化物）を含む脂肪族ケタール、脂環式ケタールまたは芳香族ケタールを含むケタール重合体である。

【０１０４】

本発明の実施に従って、上記ジオールは、アルキル ジオール、アリール ジオールおよびシクロアルキル ジオールのいずれかであり得る。

【０１０５】

ジオールの適切な例としては、１，４－ベンゼンジメタノール、１，４－シクロヘキサンジメタノール、１，５－ペンタン ジオール、１，４－ブタン ジオールまたは１，８－オクタン ジオールが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１０６】

一実施形態において、本発明は、本発明の粒子を生成するための方法を提供し、この方法は、（ａ）ＰＣＡＤＫ重合体を形成する工程、および（ｂ）１つ以上の活性物質の存在下でＰＣＡＤＫの粒子を形成し、それによって、本発明の粒子を生成する工程を包含する。このＰＣＡＤＫ重合体は、必要に応じてリンカーを含み得る。

【０１０７】

一実施形態において、本発明は、本発明の粒子を生成するための方法を提供し、この方法は、（ａ）ＰＫ１、ＰＫ２、ＰＫ３、ＰＫ４、ＰＫ５および／またはＰＫ６重合体を形

成する工程、ならびに（ｂ）１つ以上の活性物質の存在下でＰＫ１、ＰＫ２、ＰＫ３、ＰＫ４、ＰＫ５および／またはＰＫ６のうちの１つ以上の粒子を形成し、それによって本発明の粒子を形成する工程を包含する。ＰＫ１～ＰＫ６重合体は、必要に応じてリンカーを含み得る。

【０１０８】

本発明のミセルは、２工程のプロセスで生成され得る。最初に、目的の重合体を、ミセルを形成するのに適切な条件下で液体（使用される重合体に依存して極性液体または非極性液体）と接触させ得る。ミセルの形成後、このミセルは、外部の架橋剤で架橋され得、本発明の生分解性のミセルを生成し得る。

【０１０９】

（本発明の組成物を用いるための方法）

本発明はさらに、例えば、疾患または障害に罹患した被験体を処置する（例えば、この疾患に関連する症状を緩和する）ように、活性物質を送達するために、被験体に本発明の粒子または本発明のミセルを介して本発明の活性物質を送達するための方法を提供する。次に、この粒子（例えば、ＰＣＡＤＫ、ＰＫ１、ＰＫ２、ＰＫ３、ＰＫ４、ＰＫ５またはＰＫ６重合体から作製される）またはミセルは、被験体への送達のために活性物質を放出するように、被験体内で分解または溶解され得る。本発明の粒子またはミセルは、種々のｐＨ範囲で可変の分解速度を有し、所望のプロフィールにしたがって活性物質を放出するように設計され得る。例えば、ＰＫ３重合体から形成された粒子は、ＰＫ６重合体から形成された粒子よりも速く分解し、活性物質を放出する。

【０１１０】

本発明の一実施形態において、活性物質を送達するために使用される本発明の粒子またはミセルはさらにリンカーを含む。さらなる実施形態において、ＰＣＡＤＫ重合体から形成された粒子はさらに、被験体への活性物質の送達に使用される、活性物質に結合されるリンカー（例えば、ＮＴＡ）を含む。

【０１１１】

被験体が罹患する疾患または障害は、ＨＩＶ、マラリア、ＴＢ、ＳＡＲＳ、炭疽、エボラ、インフルエンザ、トリインフルエンザおよびＨＣＶのいずれかであり得る。さらなる疾患または障害は、感染症、自己免疫疾患、アレルギー疾患、移植、糖尿病および癌に関連する障害または合併症のいずれかであり得る。自己免疫疾患の例としては、狼瘡、慢性関節リウマチ、乾癬、喘息およびＣＯＰＤが挙げられる。

【０１１２】

上記活性物質は、本発明の粒子を介して、様々な投与手段（静脈内、皮下、筋肉内、経口および吸入の手段が挙げられるが、これらに限定されない）により送達される。本発明の組成物のための最も有効な投与様式および投薬レジメンは、処置される疾患または障害の正確な位置、この疾患または障害の重症度および経過、被験体の健康および処置に対する反応、ならびにその処置する医師の判断に依存する。従って、この分子の用量は、個々の被験体に合わせて調節されるべきである。

【０１１３】

ｍｇ／ｍ^2（表面積）に基づいた、様々なサイズおよび種の動物に対する用量とヒトに対する用量との相互関係は、Ｆｒｅｉｒｅｉｃｈ，Ｅ．Ｊ．ら，Ｃａｎｃｅｒ Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ．，Ｒｅｐ．５０（４）：２１９－２４４（１９６６）に記載されている。上記投薬レジメンにおける調整は、腫瘍細胞の増殖阻害反応および殺傷反応を最適化するために行われ得る（例えば、用量が、分割され得、１日ベースで投与され得るか、またはこの用量が、その状況に依存して比例して減少され得る（例えば、いくつかの分割された用量が、日ごとに投与され得るか、またはその特異的治療状況に依存して比例して減少され得る））。処置を達成するために必要とされる本発明の組成物の用量が、計画の最適化によってさらに減少され得ることは、明らかである。

【０１１４】

本明細書中に用いられている、用語「被験体」は、ヒト、任意の動物（例えば、ウマ、

ブタ、ウシ、マウス、イヌ、ネコ、および鳥類の被験体）、細胞または細胞組織を含み得る。本発明の実施に従って、上記活性物質は、上記被験体に（本発明の組成物を用いて）上記疾患もしくは障害の発症の前、後、またはその間に、送達または投与され得る。

【０１１５】

本発明は、本発明の粒子またはミセルを介して活性物質を投与することによって免疫反応を調節するための方法を提供する。本発明の一実施形態において、本発明の方法で使用される粒子またはミセルはさらに、リンカーを含む。例えば、本発明の方法において、免疫反応は、被験体に、所望の活性物質を含む本発明の粒子もしくはミセルを送達または投与することにより、ＴＬＲ依存的様式でＴｈ免疫反応へと偏し得る。一実施形態において、ＴＬＲを発現する細胞は、Ｔｈ免疫反応（例えば、Ｔｈ０、Ｔｈ２またはＴ調節性細胞免疫反応）に対する偏りをもたらす（本発明の粒子またはミセルにより送達される）物質と接触される。例えば、ＴＬＲ－２、ＥＲＫ　１／２、またはｃ－ｆｏｓを活性化する物質（例えば、天然のリガンド、その生物学的に活性のフラグメント、または低分子もしくは合成の分子）。

【０１１６】

上記のように、上記免疫反応は、レセプターの活性化からシグナリング経路の下流（例えば、ＴＬＲ結合から下流またはＴＬＲ活性化もしくは認識から下流）の時点において、調節（ｒｅｇｕｌａｔｅ）または調節（ｍｏｄｕｌａｔｅ）され得る（例えば、Ｔｈ免疫反応に対して偏向することを増大または縮小させる）。従って、患者はまた、下流のシグナリング経路の要素に対して細胞内で作用することにより免疫反応を偏向させる（本発明の組成物を用いて送達される）活性物質または活性物質の組み合わせを用いて、処置され得る。

【０１１７】

本発明は、本発明の組成物を用いて送達される所望の活性物質を用いて、ＭＡＰキナーゼ経路のいずれか（ＥＲＫ　１／２経路が挙げられる）の細胞シグナリング（例えば、活性化）を誘導することにより、Ｔｈ２免疫反応に対して偏向させるための方法を提供する。誘導されるＭＡＰキナーゼ経路は、ＭＡＰキナーゼ経路（ＥＲＫ　１／２が挙げられる）のリン酸化される構成成分の量の増加および／または期間の延長により特徴付けられ得る。

【０１１８】

本発明の方法の別の実施形態において、ＴＨ２免疫反応を調節する（ｒｅｇｕｌａｔｅ）ようにＥＲＫ　１／２　ＭＡＰキナーゼ経路を調節（ｍｏｄｕｌａｔｅ）する活性物質が、本発明の組成物を介して送達され得る。この実施形態において、例として、ＴＬＲ（例えば、ＴＬＲ－２）のアゴニストは、ＴＨ２免疫反応を増大させるようにＥＲＫ　１／２のリン酸化を誘導する。さらに本発明の方法の別の実施形態において、活性物質は、細胞内のｃ－ＦＯＳ経路を調節（ｍｏｄｕｌａｔｅ）して、それによってＴＨ２免疫反応を調節する（ｒｅｇｕｌａｔｅ）ように、本発明の組成物を介して送達され得る。この実施形態において、例として、ｃ－ｆｏｓ経路のアゴニストは、ＴＨ２免疫反応を増大させるように、ｃ－ｆｏｓの発現および／またはｃ－ｆｏｓのリン酸化を誘導する。さらに本発明の方法のさらなる実施形態において、活性物質は、ＴＬＲ２またはその下流のシグナリング経路の要素（例えば、ＥＲＫ　１／２　ＭＡＰキナーゼ経路およびｃ－ＦＯＳ経路）に作用することによりＴｈ２免疫反応を調節するように、本発明の組成物を介して送達され得る。例えば、本発明の組成物を介して送達される、上記活性物質は、ＩＬ－１０の産生または活性を調節する（例えば、ＩＬ－１０の産生を増加させるかまたはＩＬ－１０をアップレギュレーションする）ために用いられ得る。

【０１１９】

一実施形態において、Ｔｈ２免疫反応に対して偏向させるための方法は、本発明の組成物を介して送達される活性物質を投与することにより、ＩＬ１２の産生を媒介する（例えば、阻害する）ｐ３８および／もしくはＪＮＫ経路のシグナリングを弱めるかまたは阻害し、それによって、Ｔｈ１反応に対して偏向させることを含む。別の実施形態において、

Ｔｈ２免疫反応に対して偏向させるための方法は、所望の活性物質（もしくはその組み合わせ）を含む本発明のミセルまたは粒子を投与することにより、ＩＬ１２の産生を媒介し（例えば、阻害する）、それによってＴｈ１反応に対して偏向させる、ｐ３８および／またはＪＮＫのリン酸化された量を減少させるかまたは阻害すること、あるいは、ｐ３８および／またはＪＮＫのリン酸化の持続時間を短縮または阻害することを含む。

【０１２０】

本発明はまた、本発明の組成物を介して送達される活性物質を投与することによって、ＭＡＰキナーゼ経路のいずれか（ｐ３８および／またはＪＮＫ経路が挙げられる）の細胞シグナリング（例えば、活性化）を誘導することにより、Ｔｈ１免疫反応に対して偏向させるための方法を提供する。誘導されるｐ３８および／またはＪＮＫ経路は、ＭＡＰキナーゼ経路（ｐ３８、および／またはＪＮＫが挙げられる）のリン酸化された構成成分の量の増加および／または持続時間の延長により特徴付けられ得る。

【０１２１】

一実施形態において、Ｔｈ１免疫反応に対して偏向させるための方法は、本発明の組成物を介して送達される活性物質を投与することにより、ＥＲＫ　１／２および／またはｃ－ｆｏｓ経路のシグナリンを弱めるかまたは阻害することを含む。別の実施形態において、Ｔｈ１免疫反応に対して偏向させるための方法は、本発明の組成物を介して送達される活性物質を投与することにより、リン酸化されたＥＲＫ　１／２および／またはｃ－ｆｏｓの量を減少または阻害すること、あるいはＥＲＫ　１／２および／またはｃ－ｆｏｓのリン酸化の持続時間を短縮または阻害することを含む。

【０１２２】

さらに、本発明は、ＴＨ２免疫反応を調節するための方法を提供し、この方法は、Ｔ細胞（例えば、ナイーブＴ細胞）と、本発明の組成物を介して送達される、ＥＲＫ　１／２経路を活性化しならびに／またはｃ－ｆｏｓもしくはｃ－ｆｏｓ経路を活性化するＴＬＲアゴニスト（例えば、ＴＬＲ－２アゴニスト）を含む培養物中で処理されたＴＬＲ陽性細胞（例えば、ＤＣ）とを接触させる工程を包含する。

【０１２３】

さらに、本発明は、ＴＨ１免疫反応を調節するための方法を提供し、この方法は、Ｔ細胞（例えば、ナイーブＴ細胞）と、本発明の組成物を介して送達される、ｐ３８経路および／またはＪＮＫ経路を活性化するＴＬＲアゴニスト（例えば、ＴＬＲ－４アゴニスト）を含む培養物中で処理されたＴＬＲ陽性細胞とを接触させる工程を包含する。

【０１２４】

本発明は、免疫に関係する状態または疾患（例えば、アレルギー、自己免疫疾患、および他の免疫に関係する状態（癌が挙げられる））を有する被験体を処置するための方法を提供し、この方法は、Ｔｈ１、Ｔｈ２もしくはＴｈ０免疫反応に対してまたは反して偏向させるために、本発明の組成物を介して送達される、本発明の任意の物質を、この被験体に、有効量で投与する工程を包含する。上記被験体は、ウシ、ブタ、マウス、ウマ、イヌ、ネコ、サル、ヒト、ヒツジ、魚類または鳥類であり得る。

【０１２５】

一実施形態において、強いＴｈ２反応に関連する状態または疾患を有する被験体は、本発明の組成物を介して送達される、Ｔｈ１免疫反応に対して偏向させるようにこの被験体内の細胞シグナリングを活性化する、本発明の物質を用いて処置される。強いＴｈ２反応により特徴付けられる疾患としては、アレルギー、喘息、および慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ（例えば、気腫または慢性気管支炎））が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１２６】

別の実施形態において、強いＴｈ２反応と関連する状態または疾患を有する被験体は、本発明の組成物を介して送達される、Ｔｈ２免疫反応に対して偏向させることを阻害する分子を用いて処置される。

【０１２７】

一実施形態において、強いＴｈ１反応と関連する状態または疾患を有する被験体は、本

発明の組成物を介して送達される、Ｔｈ２免疫反応に対して偏向させるようにこの被験体内の細胞シグナリングを活性化する本発明の物質を用いて、処置される。強いＴｈ１反応により特徴付けられる疾患としては、糖尿病、慢性関節リウマチ、多発性硬化症、乾癬、および全身性エリテマトーデスが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１２８】

別の実施形態において、強いＴｈ１反応と関連する状態または疾患を有する被験体は、本発明の組成物を介して送達される、Ｔｈ１免疫反応に対して偏向させることを阻害する活性物質を用いて、処置される。

【０１２９】

本発明の利点

本発明のポリケタール粒子は、小さなインヒビターから大型のタンパク質まで、広範な範囲の活性物質を含むか、またはそれらをカプセル化でき、疾患または状態に罹患する被験体へ活性物質を送達するためにか、あるいは予防手段として使用され得る。

【０１３０】

一実施形態において、上記ポリケタールに加えられるか、またはそれによってカプセル化される活性物質は、被験体内で数週間活性を保持し得る。加えて、活性物質を含むポリケタールは、凍結乾燥され得、分解することなく数ヶ月間保存されることが可能である。このポリケタールは、種々のｐＨ範囲で制御可能な分解プロフィールを有し、必要な場合、活性物質の正確な放出のために細かく調整され得る。

【０１３１】

本発明のポリケタール重合体は、例えば、心筋細胞の周囲の領域に活性物質を投与することに付随する問題、すなわち、筋細胞の周囲の領域における増大した血液供給によって、活性物質が投与直後に運び去られる可能性が高くなることを克服するはずである。より大きな、ミクロンスケールの本発明のポリケタールは、この障害を克服するはずであり、活性物質を含むかもしくはカプセル化するポリケタールが、局所的な微小環境に残留することを可能にする。

【０１３２】

本発明のポリケタールは、それらを、障害もしくは疾患の処置（例えば、心筋の処置）のための活性物質の送達ビヒクルまたは予防手段として理想的にする、いくつかの固有な特性を有する：（１）本発明のポリケタールは、種々のｐＨ値で１～２日間から数週間まで容易に操作され得る、時間的尺度で分解し得る；（２）本発明のポリケタールは、中性の排出可能な化合物に加水分解し得、したがってポリエステルベースのマイクロ粒子よりも生じるタンパク質の分解および変性が少ない；（３）このポリケタールは、固体の粒子であり得、処方後延長された期間にわたって安定であり得る；ならびに（４）ポリケタールの特性は、粒径、形状および多孔度を変更するために容易に操作され得る。

【０１３３】

本発明の一実施形態において、上記ポリケタールの共重合体のパーセンテージを変更することは、ポリケタールに加えられるかもしくはそれによってカプセル化される活性物質の制御可能な放出を提供するために、このポリケタールの加水分解の速度論を変更または細かく調整し得る。例えば、単量体組成のＰＫ４は、ｐＨ４．５においてＰＫ３よりも速い加水分解の速度論を提供する。同様に、ＰＫ３は、ＰＫ２またはＰＫ５よりも速い加水分解の速度論を有するが、ＰＫ２およびＰＫ５は、ＰＫ１またはＰＫ６よりも速い加水分解の速度論を有する。したがって、ＰＫ４に加えられた活性物質は、ＰＫ３に加えられた活性物質よりも速く放出され；ＰＫ３に加えられた活性物質は、ＰＫ２またはＰＫ５に加えられた活性物質よりも速く放出され；そして、ＰＫ２またはＰＫ５に加えられた活性物質は、ＰＫ１またはＰＫ６に加えられた活性物質よりも速く放出される。

【０１３４】

本発明の別の実施形態において、本発明のポリケタールは、ポリケタールに加えられるかまたはそれによってカプセル化される活性物質の放出速度を変更または細かく調整するために混合され得る。例えば、速い加水分解の速度論を有するポリケタール（例えば、Ｐ

Ｋ４またはＰＫ３）は、より遅い加水分解の速度論を有するポリケタール（例えば、ＰＫ１またはＰＫ６）と混合され得、被験体に共投与され得る。ＰＫ４またはＰＫ３に加えられる活性成分は被験体内で迅速に放出され、被験体に活性物質の即時放出（ＩＲ）用量を提供する。一方で、ＰＫ１またはＰＫ６に加えられる活性物質は、より遅い速度で放出され、被験体において活性物質の漸進的な放出または延長放出（ＥＲ）を可能にする。

【０１３５】

本発明の別の利点は、一実施形態において、リンカーがポリケタール重合体に付着され得ることである。次に、このポリケタール重合体は、リンカーを有する粒子を形成するために使用され得る。リンカーを有する粒子は、被験体への１つ以上の活性物質の二重（すなわち、粒子による活性物質のカプセル化および活性物質～粒子～リンカーの付着を介する）の送達を可能にする。一実施形態において、活性物質の送達についてのこの二重様式は、活性物質に関して二重の放出時間を提供し、ここで、リンカーに結合した活性物質は、カプセル化された活性物質よりも速く放出される。

【０１３６】

以下の実施例は、本発明を説明するために、ならびに当業者が同じものを作製および使用することを援助するために示されている。実施例は、他に本発明の範囲を限定するようには決して意図されない。

【実施例】

【０１３７】

（実施例１）

抗原を含む架橋されたミセルの合成

タンパク質抗原のオボアルブミンおよび免疫刺激性ＤＮＡを含む架橋されたミセルを、２工程のプロセスで合成した。最初に、ミセルを、陽イオン性ブロック共重合体のＰＥＧ－ポリリジン－チオピリダールと負に荷電したＦＩＴＣ－オボアルブミン（ＦＩＴＣ－ＯＶＡ）および免疫刺激性ＤＮＡ（ＩＳＳ－ＤＮＡ）との間で形成した。これらのミセルは、濃度１０ｍｇ／ｍｌのＰＥＧ－ポリリジン－チオピリダール、濃度０．５ｍｇ／ｍｌのＦＩＴＣ－ＯＶＡおよび濃度０．５ｍｇ／ｍｌのＩＳＳ－ＤＮＡを含んでいた。上記ミセルを１時間形成させ、次いで、このミセルを０．４ｍｇ／ｍｌのジチオ－エチレン　グリコールで架橋した。上記架橋反応をＵ．Ｖ．活性（３４２ｎｍ）によりモニタリングしたところ、チオピリダール基が１時間後に室温で定量的に反応したことを示した。１００ｋＤ　ｓｐｉｎ－ｆｉｌｔｅｒ（ｃｅｎｔｒｉｃｏｎ）により上記ミセルを遠心分離し、回収した溶液をＦＩＴＣ蛍光（励起　４９４ｎｍ、放射　５１０ｎｍ）について解析することにより、上記ミセル中のＦＩＴＣ－ＯＶＡのカプセル化効率を決定した。このことは、ＦＩＴＣ－ＯＶＡの９５％より多くが、上記ミセル中にカプセル化されたことを示した。

【０１３８】

（実施例２）

ポリケタール粒子の合成（疎水性薬物の送達のための単一エマルジョン方法）

水中油型エマルジョン方法を用いて、粒子を、ポリ（１，４－フェニレン－アセトンジメチレン　ケタール）により合成した。簡単に言えば、１０ｍｇの２．１ｍｇのＥＲＫインヒビターＵＯ１２６および０．１ｇのクロロ－メチル　フルオレセイン　ジアセート（ＣＭＦＤＡ）を、０．５ｍＬのＣＨＣｌ$_3$（０．１％のトリエチルアミンを含む）中に溶解させた。次いで、この溶液を、２ｍｇ／ｍｌのポリビニル　アルコール（ＰＶＡ，３１～５０　ｋＤａ，Ａｌｄｒｉｃｈ）を含む５ｍＬのｐＨ　９緩衝液（１０ｍＭ　ＮａＨＣＯ$_3$）に添加した。この油－水混合物を、少しの間振とうし、次いで、２～３分間４０ワットで超音波処理して（Ｂｒａｎｓｏｎ　Ｓｏｎｉｆｉｅｒ　２５０）、微細な油／水エマルジョンを形成した。上記エマルジョンを、Ｎ$_2$流れ下で少なくとも３時間攪拌して、その溶媒を蒸発させ、そして粒子懸濁物を生成した。粒子サイズを、動的光散乱（ｄｙｎａｍｉｃ　ｌｉｇｈｔ　ｓｃａｔｔｅｒｉｎｇ）（ＤＬＳ）により解析したところ、その平均直径が２８２ｎｍであることを示した。

【０１３９】

（実施例３）
オボアルブミンをカプセル化するポリケタール粒子の合成（親水性薬物の合成のための二重エマルジョン方法）
ポリケタール粒子の合成
ＦＩＴＣ－オボアルブミンを含むポリケタール粒子（ＰＫＮ）を、二重エマルジョン方法を用いて作製した。最初に、５００μＬのクロロホルム中に溶解させた２０ｍｇのポリ（１，４－フェニレン　アセトン　ジメチレン　ケタール）（ＰＰＡＤＫ）を、１００μＬのＦＩＴＣ－Ｏｖａ溶液（約０．７ｍｇ）に添加した。この混合物を、４０ワットで１分間超音波処理して、一次エマルジョンを形成した。次に、５ｍＬの１０ｍＭ　ｐＨ９　リン酸ナトリウム緩衝液中の０．２％　ｗ／ｖ　ポリビニル　アルコール（ＰＶＡ，　Ａｌｄｒｉｃｈ）を添加し、そしてこの混合物を、４０ワットで少なくとも１分間超音波処理して、二次エマルジョンを形成した。上記エマルジョンを、窒素通気下で４時間混合し、その後、その容量を、緩衝液を用いて５ｍＬにした。２バッチのＦＩＴＣ－Ｏｖａ含有ＰＫＮを、２バッチの無添加（ｐｌａｉｎ）ＰＫＮ（ＦＩＴＣ－Ｏｖａを含まない）と同様の様式で調製した。上記ＰＫＮ懸濁物を、４℃で保管した。
【０１４０】
粒子のサイジングを、動的光散乱（ＤＬＳ）により決定した。２バッチの、ＦＩＴＣ－オボアルブミンをロードしたＰＫＮは、４２６ｎｍおよび４６２ｎｍの有効な直径を有し、空のＰＫＮバッチは、３２１ｎｍおよび３４７ｎｍであった。
【０１４１】
ＦＩＴＣ－Ｏｖａの標識
鶏卵アルブミン（オボアルブミン）を、次の通りに、フルオレセインを用いて標識した。オボアルブミンを、１０ｍｇ／ｍＬで２００ｍＭ　ｐＨ９　$NaHCO_3$緩衝液中に溶解した。イソチオシアン酸フルオレセイン（ＦＩＴＣ）を、１０ｍｇ／ｍＬでＤＭＳＯ中に溶解した。次に、２．５ｍＬのオボアルブミン溶液（２５ｍｇ、０．５６ｍｍｏｌ）を、５０μＬのＦＩＴＣ／ＤＭＳＯ（０．５ｍｇ、１．２８ｍｍｏｌ）と共に少なくとも１時間３０℃で混合した。この生成物を、Ｓｅｐｈａｄｅｘ　ＰＤ－１０カラム中で濾過し、遊離色素を除去した；このカラムに、２．５ｍＬの生成物をロードし、そして２．５ｍＬの水で溶出した。得られたオボアルブミンの濃度は、約７ｍｇ／ｍＬであった。４９７ｎｍでのＦＩＴＣの吸収を測定することにより、かつオボアルブミンの推定濃度を用いて、標識の程度を１．０９と算出した。
【０１４２】
ＰＫＮ中のＦＩＴＣ－Ｏｖａのカプセル化の決定
２つのＦＩＴＣ－Ｏｖａ　ＰＫＮバッチを、５倍の水により希釈し、そして希釈した試料各々の一部分を、０．１μｍ　Ｓｕｐｏｒ　ｓｙｒｉｎｇｅ　ｆｉｌｔｅｒ　（Ｐａｌｌ　Ａｃｒｏｄｉｓｃ）を通して濾過した。これらの濾過された試料および濾過されていない試料をさらに、１０倍のｐＨ９　リン酸ナトリウム緩衝液中に希釈し、そして蛍光を、４９４ｎｍの励起波長および５２０ｎｍの放射波長で測定した（図１）。
【０１４３】
上記カプセル化の効率を、上記濾過された試料および濾過されていない試料の蛍光強度を用いて、次の通りに、算出した：
【０１４４】
【化１】

$$\text{カプセル化の効率} = \left(1 - \frac{\text{濾過された}}{\text{濾過されていない}}\right) \times 100\% = \left(1 - \frac{189.5}{476.7}\right) \times 100\% = 60\%$$

（実施例４）　ケタール骨格の重合体（ポリケタール）の合成および分解
図２は、以下を示す：（Ａ）ケタール中間体　１を生成するための１，４－ベンゼンジメタノールと２，２－ジメトキシプロパンとの間のケタール交換反応。（Ｂ）ポリケタール　２を生成するための１の段階的重合。副生成物のメタノールを蒸留することにより、

反応工程ＡおよびＢを進める。（Ｃ）溶媒蒸発方法による薬物をロードした粒子の形成。粒子は、低分子量の排出可能な化合物へのｐＨ感受性の分解を表す。

【０１４５】

合成

上記ポリケタールを、ケタール交換反応（Ｌｏｒｅｔｔｅ，Ｎ．Ｂ．；Ｈｏｗａｒｄ，Ｗ．Ｌ．　Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．１９６０，２５，５２１－５２５）に基づいた新規の重合戦略により合成する。この反応は一般的に、低分子量のアルコールに保護基を導入するために用いられており、これまでは、重合体を合成するために用いられていなかった。しかしながら、本発明者らはここで、簡単に２，２－ジメトキシプロパン（ＤＭＰ）をジオールと反応させることにより、上記ケタール交換反応が、酸感受性の重合体を合成するために用いられ得ることを明らかにする。本発明者らは、上記重合が図２の反応機構により起こることを提唱する。上記ケタール交換反応は、ＤＭＰのプロトン化およびその後のアルコールによる求核攻撃を含む平衡反応である。副生成物のメタノールを蒸留して除くことにより、この平衡を、上記ケタール中間体　１の形成に対してシフトさせる。この反応が進むにつれて、１の分子は、段階的様式で結合して、ポリケタール２を形成する。

【０１４６】

ＤＭＰと１，４－ベンゼンジメタノール（ＢＤＭ）との代表的な重合により、４８％の収率でポリケタール　２を得た。上記重合を、短い経路の蒸留ヘッドに結合した２５ｍＬの二首フラスコ内で実行した。１０ｍＬの温かい酢酸エチル中に溶解したＢＤＭ（１．０ｇ、７．３ｍｍｏｌ、Ａｌｄｒｉｃｈ）を、１００℃で保たれた１０ｍＬの蒸留されたベンゼンに添加した。次いで、５５０μＬの酢酸エチル中に溶解した再結晶化されたｐ－トルエン　スルホン酸（５．５ｍｇ、０．０２９ｍｍｏｌ、Ａｌｄｒｉｃｈ）を、添加した。酢酸エチルを蒸留して除いた後、上記反応を開始するために、蒸留されたＤＭＰ（９００μＬ、７．４ｍｍｏｌ、Ａｌｄｒｉｃｈ）を添加した。ＤＭＰのさらなる容量（各容量は２ｍＬのベンゼンおよび３００～５００μＬのＤＭＰからなる）を、計量漏斗を介して添加した。各容量を、間に３０分の間期を含む３０～４０分の期間にわたって添加した。上記反応の全持続時間は、７時間であった。上記反応を、１００μＬのトリエチルアミンの添加により停止し、そして冷ヘキサン中に沈殿させた。この粗生成物を、真空濾過し、エーテルおよびヘキサンでリンスし、そして真空乾燥させて、６００ｍｇの白色固体生成物（収率４８％）を得た。この回収した重合体を、ＧＰＣおよび^{1}Ｈ　ＮＭＲにより解析した。

【０１４７】

図３Ａは、１つのバッチ由来のＧＰＣトレースを示す。このバッチにおいて、繰り返し単位２２．５個の重合の程度に対して、Ｍｗ＝４０００および１．５４の多分散度指数を得た。^{1}Ｈ　ＮＭＲスペクトル（図３Ｂ）は、２の繰り返し単位がジメチルケタール基（「６ａ」）を含むことを確認する。共に、ＧＰＣおよび^{1}Ｈ　ＮＭＲのデータは、成功したポリケタール　２の合成についての証拠を提供する。

【０１４８】

加水分解

２の加水分解の速度論を、リソソーム（ｐＨ　５．０）および血流（ｐＨ　７．４）に対するｐＨ値で測定した。ポリケタール　２を細かい粉末にひき、そしてこの粉末を、ｐＨ　７．４（ホスファート緩衝液）、ｐＨ　５．０（アセタート緩衝液）、およびｐＨ　１．０（ＤＣｌ）の重水素を入れた溶液に添加することにより、上記加水分解の速度を測定した。この懸濁物を３７℃で攪拌し、データの点を３時間、２４時間、４８時間、および７２時間でとった。各懸濁物を４分間、１８００ｇで遠心分離し、そしてその上清を^{1}Ｈ　ＮＭＲにより解析した。これらのスペクトルは、ＢＤＭについてのピーク（７．２４ｐｐｍおよび４．４７ｐｐｍ）ならびにアセトンについてのピーク（２．０５ｐｐｍ）を含んでいた。２つのＢＤＭピークの積分の平均を用いて、加水分解の相対的な程度を決定した。この加水分解のパーセントを、ｐＨ　７．４または５．０の試料のＢＤＭピークの平均をｐＨ　１．０　対コントロールバッチのＢＤＭピークの平均で除算することにより

算出した。

【０１４９】

指数崩壊半減期を、ｐＨ　７．４で１０２時間およびｐＨ　５．０で３５時間と算出した。これは、ｐＨ　７．４から５．０までの３倍の速度増加を表す（図４）。２のｐＨ感受性は、Ｋｗｏｎら，（Ｋｗｏｎ，Ｙ．Ｊ．；Ｓｔａｎｄｌｅｙ，Ｓ．Ｍ．；Ｇｏｏｄｗｉｎ，Ａ．Ｐ．；Ｇｉｌｌｉｅｓ，Ｅ．Ｒ．；Ｆｒｅｃｈｅｔ，Ｊ．Ｍ．　Ｊ．Ｍｏｌ．Ｐｈａｒｍ．２００５，２，８３－９１）により報告された水溶性ケタールに関するｐＨ感受性よりも有意に小さい。本発明者らは、２のより小さいｐＨ感受性がその水不溶性に起因すると仮定する。この水不溶性は、水の拡散を制限し、そしてｐＨに対して非感受性である別の速度制限工程をつくり出す。２から作製される物質内への水の拡散の速度論は、この粒子のサイズに依存し、そして本発明者らは、より小さい粒子が挽いた粒子よりも大きいｐＨ感受性を有することを予測する。

【０１５０】

（実施例５）

ミクロンサイズの粒子の合成

また、ポリケタール２（実施例４、上記からの）を、ミクロンサイズの粒子を合成するために用いた。水中油型エマルジョン方法（Ｐａｎｙａｍ，Ｊ．；Ｗｉｌｌｉａｍｓ，Ｄ．；Ｄａｓｈ，Ａ．；Ｌｅｓｌｉｅ－Ｐｅｌｅｃｋｙ，Ｄ．；Ｌａｂｈａｓｅｔｗａｒ，Ｖ．　Ｊ．Ｐｈａｒｍ．Ｓｃｉ．２００４，９３，１８０４－１８１４）を、上記粒子を形成するために用いた。簡単に言うと、１ｍＬの$CHCl_3$（０．１％　トリエチルアミンを含む）中に溶解させた５０ｍｇの２を、乳化剤として様々な量のポリビニル　アルコール（ＰＶＡ、３１～５０ｋＤａ、Ａｌｄｒｉｃｈ）を含む５ｍＬの１０ｍＭ　$NaHCO_3$　ｐＨ９緩衝液に添加した。この油－水混合物を、少しの間振とうし、次いで、２～３分間４０ワットで超音波処理して（Ｂｒａｎｓｏｎ　Ｓｏｎｉｆｉｅｒ　２５０）、微細な油／水エマルジョンを形成した。上記エマルジョンを、N_2フロー下で少なくとも３時間攪拌して、その溶媒を蒸発させ、そして粒子懸濁物を生成した。

【０１５１】

粒子のサイズを、動的光散乱（ＤＬＳ）およびＳＥＭにより解析した。１０ｍＬのｐＨ９緩衝液中に上記粒子懸濁物を希釈し、そしてより大きい粒子を安定させることにより、ＤＬＳの試料を調製した。次いで、各バイアルの液体部分に由来するアリコートを、ＤＬＳの粒子のサイジング（Ｂｒｏｏｋｈａｖｅｎ　９０Ｐｌｕｓ　パーティクルサイザー）のために希釈した。上記粒子懸濁物を１０分間（５０００ｇ、４℃）で遠心分離し、蒸留水で洗浄し、そしてその回収したペレットを凍結乾燥することにより、ＳＥＭの試料を、ＰＶＡ：ポリケタールの比率　０．２：１で作製した。

【０１５２】

予測した通り、上記粒子サイズは、ＰＶＡ対ポリケタールの比率に対して感受性であった。上記ＤＬＳの粒子の直径は、ＰＶＡ：ポリケタールの比率　０．２：１、０．８：１、および２：１の各々を含む試料について、５２０ｎｍ、２９０ｎｍ、および２８０ｎｍであった。上記０．２：１　バッチのＳＥＭ画像（図５Ａおよび５Ｂ）は、上記ポリケタールが、粒子サイズの分布が直径０．５～３０μｍの範囲にわたるミクロンサイズの粒子を形成することを確認する。

【０１５３】

（実施例６）

ミセルとポリケタール粒子の合成および性質決定

材料と方法

ポリケタール粒子中のデキサメタゾンのカプセル化

抗炎症薬デキサメタゾン（Ｄｅｘ，Ｓｉｇｍａ）を、上記のポリケタール２を用いて作製された粒子中にカプセル化した。油相が５ｍｇ／ｍｌの濃度のＤｅｘを含んでいたこと、およびＰＶＡ：ポリケタールの比率　１：１を用いたことを除いて上記の手順と同じ手順を用いて、Ｄｅｘをロードした粒子を処方した。これらの粒子のＳＥＭ画像は、これら

の粒子が直径２００～６００ｎｍであることを明らかにする（図５Ｃ）。ＤＬＳによる粒子のサイジングは、Ｄｅｘをロードした粒子のバッチについての有効な直径　２５０ｎｍを示した。上記Ｄｅｘのカプセル化効率は、４３～５３％の間の範囲にわたった。コントロールバッチを、ポリケタール／ＰＶＡのみおよびＤｅｘのみを用いて調製した。Ｄｅｘのカプセル化を測定するために、各粒子バッチをｐＨ　９緩衝液中に再懸濁し、次いで、アリコートをさらに希釈した。一部分を０．１μｍ　Ｓｕｐｏｒ　ｍｅｍｂｒａｎｅ　Ａｃｒｏｄｉｓｃ　ｓｙｒｉｎｇｅ　ｆｉｌｔｅｒ（Ｐａｌｌ　Ｃｏｒｐ．）を通して濾過し、そしてその濾液の２４２ｎｍでの吸光度を、Ｓｈｉｍａｄｚｕ　ＵＶ－　１７００　ｓｐｅｃｔｒｏｐｈｏｔｏｍｅｔｅｒにより記録した。上記カプセル化効率を、（$A_{Dex}-A_{DexPoly}$）／（$A_{Dex}-A_{Poly}$）として算出した。ここで、Ａは２４２ｎｍでの吸光度であり、下付き文字「Ｐｏｌｙ」、「Ｄｅｘ」、および「ＤｅｘＰｏｌｙ」は、「ポリケタールのみ」、「Ｄｅｘのみ」、および「Ｄｅｘ＋ポリケタール」の試料を各々指す。これらの算出により、様々な試料についてのＤｅｘカプセル化効率　４３％～５３％を得た。

【０１５４】

ミセルの形成

図８は、ペプチド架橋されたミセルの設計および合成を示す概略図である。工程１：ＩＳＳ　ＤＮＡとＩとを混合して、ミセル（架橋されていないミセル）を形成する。工程２：次いで、これらのミセルを抗原性ペプチド（ＩＩ）で架橋して、免疫刺激分子とペプチド抗原との両者をカプセル化し得る送達システムを生成する。ＡＰＣによるファゴサイトーシスの後、ペプチド架橋されたミセルは、それらの構成成分を放出する。

【０１５５】

ＨＩＶペプチドワクチンを、ペプチド　ＣＧＣＲＩＱＲＧＰＧＲＡＦＶＴＩＧＫＣＧＣＧ（ＩＩ）を用いたＰＣＭ戦略を用いて合成した。上記ペプチドＩＩは、ＧＰ－１２０タンパク質に由来し、クラスＩ抗原とクラスＩＩ抗原の両者である配列　ＲＩＱＲＧＰＧＲＡＦＶＴＩＧＫを含む。最初に、０．５ｍｌの５０ｍＭ　ＰＢＳ中で、０．５ｍｇのＩを０．１ｍｇのＩＳＳ　ＤＮＡ（５－ＴＣＣＡＴＧＡＣＧＴＴＣＣＴＧＡＣＧＴＴ－３）（電荷比率は１対１５（－／＋）であった）と混合することにより、ＩとＩＳＳ－ＤＮＡとの間でミセルを形成した。Ｃｕｍｕｌａｎｔｓ方法を用いた、これらのミセルの動的光散乱は、これらのミセルが５７．０ｎｍの平均直径を有することを示した。次いで、０．１ｍｇのＩＩを上記ミセルに添加すること（等モル比のＩＩにおけるシステイン対Ｉにおけるチオピリダール基）により、これらのミセルを架橋した。ジスルフィド交換反応により、上記ペプチドＩＩを上記ミセルに組み込んだ。

【０１５６】

図９は、ＰＥＧ－ポリリジン　チオピリダールの合成および性質決定を示す。Ａ．ＰＥＧ－ポリリジン　チオピリダール（Ｉ）の合成。４４マイクロモルのＰＥＧ－ポリ－ｌ－リジン（ＰＥＧ＝５ｋｄおよびポリ－ｌ－リジン＝５，０００を含む）を、攪拌棒の備わった５ｍｌの丸底フラスコ内で１ｍｌのＤＭＦ中に溶解した（完全に上記重合体を溶解させるために、室温での一晩中の攪拌を必要とした）。次いで、４１５マイクロモルのヒドロキシル－エチル　チオピリダール　アクリラートおよび５８μｌのトリエチルアミンを、上記ＰＥＧ－ポリ－ｌ－リジン溶液に添加し、そしてこの反応を室温で２４時間継続させた。上記反応溶液を１５ｍｌの氷冷したジエチルエーテル中に沈殿させることにより、この生成物を単離した。この収率は、８８．２％であった。Ｂ．D_2O中のＰＥＧ－ＰＬＬ－チオピリダールの^1H－ＮＭＲスペクトル。（Ａ）の生成物を、D_2Oにおける^1H　ＮＭＲにより解析した。ピリジンのプロトン（$-NC_5H_4$：δ＝７．１０１ｐｐｍ、７．６２９ｐｐｍ、８．１８７ｐｐｍ）対ポリ－ｌ－リジンのα、β、γ－メチレンのプロトン（$-CH_2CH_2CH_2$：δ＝１．１２２ｐｐｍ、１．２８５ｐｐｍ、１．５５３ｐｐｍ）のピーク強度の比率を比較することにより、アルキル化されたアミンのパーセンテージを決定した。これは、上記アミンの１００％が反応したことを示した。Ｃ．／Ｄ．架橋されていないＰＣＭ（Ｃ）およびペプチド架橋されたＰＣＭ（Ｄ）の動的光散乱解析

。０．０６ｍｇ／ｍｌのＰＥＧ－ポリリジン　チオピリダールおよび２０μｇ／ｍｌのＩＳＳ　ＤＮＡを含むｐＨ　７．４の５０ｍＭ　ＰＢＳ緩衝溶液を、調製し、そして２００ｎｍ　ｓｙｒｉｎｇｅ　ｆｉｌｔｅｒを通して濾過した。次いで、この溶液を、Ｃｕｍｕｌａｎｔ方法を用いて、動的光散乱（Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ　Ｎａｎｏ　ＺＳ，Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）により解析した（Ｃ）。次いで、０．１２ｍｇのペプチド抗原（ＩＩ）を添加することにより、この溶液を架橋し、反応の３時間後、この溶液を、上記の通りのＤＬＳにより解析した（架橋されたミセルのサイズおよびサイズの分布はＤに示されている）。Ｅ．ペプチド抗原（ＩＩ）におけるシステインの架橋反応。Ｆ．ペプチド抗原（ＩＩ）とブロック共重合体ミセルとの間の架橋反応についてのＵＶ解析。エッペンドルフチューブ内で、０．５ｍｌの５０ｍＭ　NaH_2PO_4緩衝液（ｐＨ　７．４）中、０．５ｍｇのＩを０．１ｍｇのＩＳＳ　ＤＮＡと混合することにより（アミン対ホスファートの比率１５／１を表す）、ブロック共重合体ミセルを、ＩとＩＳＳ　ＤＮＡとの間で形成した。室温で２時間のインキュベーションの後、０．１ｍｇのＩＩ（１：１のシステイン：チオピリダールの比率を表す）を上記ミセルに添加した。上記ミセル中のチオピリダール基を有するＩＩにおけるシステイン間の架橋反応を、３４２ｎｍでのＵＶ解析（放出されたチオピリドンを表す）により決定した。反応したシステイン基のパーセントを、以下の式により決定した：

【０１５７】

【化２】

$$\text{反応したペプチド}\,(\%)=\frac{ABS_1-ABS_2}{ABS_o}\times 100\%$$

ここで：ABS_1＝上記ペプチド架橋されたミセル反応についての３４２ｎｍでのＵＶ吸収（黒丸）；ABS_2＝ペプチドを含まない架橋されていないミセルについての３４２ｎｍでのＵＶ吸収（白四角）；ABS_0＝（ＤＴＴの添加により）全チオピリドン基が反応した場合の３４２ｎｍでのＵＶ吸収（白丸）。

【０１５８】

図１０は、ペプチドおよびＤＮＡの放出におけるＧＳＨの影響を示す。Ａ．ＧＳＨ感受性のペプチド放出。ファゴサイトーシス後にＰＣＭがペプチド抗原を放出するかどうかを決定するために、ＧＳＨの存在に起因するＰＣＭからのペプチドの刺激反応性放出を、調べた。ＰＣＭを、異なる濃度のＧＳＨと共に２４時間、５０ｍＭ　ｐＨ　７．４　ＰＢＳ緩衝液中でインキュベートし、次いで、ペプチドの放出を決定するためにＨＰＬＣにより解析した。この図は、ペプチドの放出がＧＳＨの存在により引き起こされることを明らかにする。１０ｍＭ　ＧＳＨ（細胞内レベル）と共に行うＰＣＭのインキュベーションはペプチドの７１％の放出を誘導するが、緩衝液のみとのＰＣＭのインキュベーションはペプチドの１０％の放出のみしか引き起こさない。Ｂ．ＧＳＨ感受性のＤＮＡ放出。ＰＣＭが血清ヌクレアーゼによる分解からカプセル化されたＩＳＳ－ＤＮＡを保護する能力を、調べた。ＰＣＭを、（上記の通りに）合成し、そして１０％の血清と共に１２時間インキュベートし、次いで、カプセル化されたＩＳＳ－ＤＮＡの安定性を決定するために、これらのＰＣＭをゲル電気泳動により調べた。コントロールとして、ＩＳＳ－ＤＮＡ自体を、血清と共にインキュベートした。この図は、ＩＳＳ－ＤＮＡ自体は、１０％の血清中で完全に加水分解され（レーン　２）、対照的に、ＰＣＭ中にカプセル化されたＩＳＳ－ＤＮＡは、おそらく、ヌクレアーゼが上記ミセルに入るのを防ぐに違いない架橋の効果に起因して（レーン　３）、血清ヌクレアーゼから保護されることを明らかにする。Ｃ．ＩＳＳ－ＤＮＡは、ＰＣＭ中の血清ヌクレアーゼから保護される。ＰＣＭ戦略の重要な利点は、架橋送達システムを生成することである。この架橋は、インビボでＰＣＭを安定化する。分解に対するＰＣＭの安定性を、負に荷電した重合体、ポリ（ビニル　サルフェート）（ＰＶＳ）をＰＣＭと混合することにより調べ、次いで、ＰＶＳにより置換されたＩＳＳ－ＤＮＡの量を決定するために、この混合物を、ゲル電気泳動により解析した。コントロールとして、ＰＶＳをまた、ＩＩおよびＩＳＳ－ＤＮＡからのみ構成された架橋されていない

ミセルと共にインキュベートした。図Ａ、レーン　４は、ＰＶＳがＩＳＳ－ＤＮＡおよびＩＩからのみ構成される架橋されていないミセルを破壊し得ることを明らかにする。対照的に、Ａ、レーン　５は、おそらく、ペプチド架橋が、ＰＶＳが上記ミセル中に分散しＩＳＳ－ＤＮＡを置き換えることを防ぐことに起因して、ＰＶＳが、ＰＣＭ由来のＩＳＳ－ＤＮＡを置換し得ないことを明らかにする。重要なことには、細胞内濃度のＧＳＨと共にＰＣＭのインキュベーションの後、ＰＣＭは、ＰＶＳの存在下で、カプセル化されたＩＳＳ－ＤＮＡを放出する。このことは、ファゴサイトーシス後に上記ミセルがそれらの中身を放出することを明らかにする（ｂのレーン　２および３））。ＩＳＳ－ＤＮＡ対Ｉの電荷比率は、１対１５（－／＋）である；１μｇのＤＮＡを、各レーンにロードした；カプセル化されたＩＳＳ－ＤＮＡの放出を誘導するために、ＧＳＨ（１００μＭ）をレーン３に添加した。全試料を、１０％の血清と共に、室温で１２時間インキュベートした。

【０１５９】

図１１は、ブロック共重合体ミセルを示す：Ａ．ＰＥＧ－ポリ（リジン－チオ－ピリジル）の化学構造。ＰＥＧ鎖は、上記ミセルに対する安定性を与え、そしてポリリジンセグメントを、タンパク質およびＤＮＡまたはＲＮＡとの静電相互作用のために用いる。チオピリダール基は、結果として生じるジスルフィド結合を介した架橋のためである。Ｂ．工程Ｉ：ＰＥＧ－ポリ（リジン－チオ－ピリダール）をＤＮＡおよびタンパク質と混合し、その外側にＰＥＧを有するミセルを形成する。Ｃ．工程ＩＩ：ミセルをジチオール含有分子（例えば、ジ－チオエチレン　グリコール）と架橋する。Ｄ．架橋されたミセルを、血中よりも細胞内で一層高い濃度を有するグルタチオンにより還元する。

【０１６０】

図１２は、ミセルの免疫学を示す。Ａ．ヒト単球由来のＤＣによるＳＩＩＮＦＥＫＬ－ＣＦＳＥミセルの取り込み。ヒトＰＢＭＣ由来のＤＣ（培養６日目）を、４時間３７℃で、濃度１０μｇ／ｍｌ、５×１０＊５細胞／ウェル、９６－Ｕウェル、ＲＰＭＩ／１０％　ＦＣＳで、ＳＩＩＮＦＥＫＬ／ＣＦＳＥ　ミセルを用いてパルスした。細胞を、洗浄し、この形態に固定し、そして共焦点顕微鏡イメージング用に調製した。Ｂ．ヒト単球由来のＤＣによる、ＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドをカプセル化されたミセルの効率的な取り込み。ヒトＰＢＭＣ由来のＤＣ（培養６日目）を、４時間３７℃で、濃度１０μｇ／ｍｌ、５×１０＊５細胞／ウェル、９６－Ｕウェル、ＲＰＭＩ／１０％　ＦＣＳで、単なる（ｐｌａｉｎ）ＳＩＩＮＦＥＫＬ／ＣＦＳＥ（１）またはＳＩＩＮＦＥＫＬ／ＣＦＳＥを処方されたミセル（２、３）を用いてパルスした。細胞を、洗浄し、ＣＤ１１ｃおよびＨＬＡＤＲについて染色した。細胞を、ＣＤ１１ｃ＋細胞、ＨＬＡＤＲ＋細胞に対してゲートし、そしてＣＦＳＥの蛍光について解析した。Ｃ．マウスのＤＣおよびマクロファージによる、ＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドをカプセル化されたミセルの効率的な取り込み。全マウスＣ５７Ｂ１／６Ｊ　ＦＬＴ３－Ｌ脾臓細胞を、３７℃で、濃度１×１０＊６細胞／ウェル、９６－Ｕウェル、ＲＰＭＩ／１０％　ＦＣＳで、１もしくは１０μｇ／ｍｌのＣＦＳＥで標識された単なるＳＩＩＮＦＥＫＬ（１）またはペプチド（２，３）を処方されたミセルを用いて４時間（青線）パルスするか、あるいは処理しないでおいた（赤線）。細胞を、ＣＤ１１ｃおよびＣＤ１１ｂについて染色し、そしてＣＦＳＥ陽性蛍光について解析した。

【０１６１】

図１３は、ＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドを処方されたミセルが、インビトロで強いＴ細胞反応を誘導することを示す棒グラフである。同系のＣ５７Ｂ１／６Ｊ　Ｈ－２ｂ　ＦＬＴ３－Ｌの処置されたマウスに由来する精製されたＣＤ１１ｃ＋を、４時間、示された濃度および組み合わせの単なるＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドまたはＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドを処方されたミセルでパルスした。細胞を、洗浄し、そして、２０時間（左のパネル）または９６時間（右のパネル）、全ＯＴ－１脾臓細胞と共に培養した。細胞を、ＣＤ８および細胞内ＩＦＮγについて染色し、フローサイトメーターで解析した。グラフは、ミセルＳＩＩＮＦＥＫＬ　２１３．３（黒のバー）、ミセル　ＳＩＩＮＦＥＫＬ　２１３．２（灰色のバー）、単なるＳＩＩＮＦＥＫＬ（白のバー）、培地（ドットのバー）がＣＤ１１

ｃ＋ＤＣを刺激したことを表す。

【０１６２】

図１４は、ミセルの免疫学を示す。Ａ．マウスのＤＣおよびマクロファージによる、ＯＶＡタンパク質をカプセル化されたミセルの効率的な取り込み。全マウスＣ５７Ｂ１／６Ｊ　ＦＬＴ３－Ｌ脾臓細胞を、３７℃、濃度１×１０＊６細胞／ウェル、９６－Ｕ　ウェル、ＲＰＭＩ／１０％　ＦＣＳで、１もしくは１０μｇ／ｍｌのＦＩＴＣで標識された、単なるオボアルブミン（１）またはタンパク質を処方されたミセル（２）を用いて１時間（黒線）、５時間（点線）パルスするか、あるいは処理しないでおいた（影つき）。細胞を、ＣＤ１１ｃおよびＣＤ１１ｂについて染色し、そしてＦＩＴＣ陽性蛍光について解析した。Ｂ．ＯＶＡ／ＣｐＧをカプセル化されたミセルは、インビトロでＤＣを活性化する。全マウスＣ５７Ｂ１／６Ｊ　ＦＬＴ３－Ｌ脾臓細胞を、１μｇ／ｍｌの単なるＯＶＡ（１）、単なるＯＶＡ＋ｌμｇのＣｐＧ（２）またはＯＶＡを処方されたミセル（３）またはミセル　ＯＶＡ＋ｌμｇのＣｐＧ（４）を用いて、２４時間パルスした。ＣＤ１１ｃ＋細胞を、ＣＤ８０マーカーまたはＣＤ８６マーカーについて解析した。データは、アイソタイプのコントロール（影つき）、処理されていない細胞（灰色の線）または刺激で処理された細胞（黒線）を表す。

【０１６３】

図１５は、ポリケタール粒子の免疫学を示すグラフである。インビトロでの、マウスのＤＣおよびマクロファージによる、Ｕ０１２６をカプセル化されたポリケタール粒子（ＰＫＮ）の取り込み。全マウスＣ５７Ｂ１／６Ｊ　ＦＬＴ３－Ｌ脾臓細胞を、５時間３７℃で、１×１０＊６細胞／ウェル、９６－Ｕ　ウェル、ＲＰＭＩ／１０％　ＦＣＳで、Ｕ０１２６　ＥＲＫインヒビターを保有する、１または１０μｇ／ｍｌのＣＭＦＤＡで標識されたポリケタール粒子を用いて、パルスした。細胞を、ＣＤ１１ｃおよびＣＤ１１ｂについて染色し、そしてＣＭＦＤＡ陽性蛍光について解析した。データは、培池で処理された細胞（影つき）または５時間の取り込み（黒線）を表す。

【０１６４】

図１６は、ＯＶＡ－ＯＴ／１トランスジェニックモデルを使用するインビトロでのＴ細胞刺激についての実験概要を示す概略図である。

【０１６５】

図１７は、ミセルの免疫学を示す。Ａ．抗原を処方されたミセルは、インビトロで強いＴ細胞反応を誘導する。同系のＣ５７Ｂ１／６Ｊ　Ｈ－２ｂマウス由来の精製されたＣＤ１１ｃ＋細胞を、４時間、示されている濃度およびオボアルブミンと単なるＣｐＧまたは処方されたミセルの組み合わせを用いてパルスした。細胞を洗浄し、１×１０＊５のＣＤ１１ｃ＋を、１×１０＊６の全ＯＴ－１（ＳＩＩＮＦＥＫＬ　特異的）脾臓細胞と共に、５日間培養した。５日後、細胞を、ＢＦＡ（５μｇ／ｍｌ）と共にＳＩＩＮＦＥＫＬ　ペプチド（ｌμｇ／ｍｌ）で６時間再刺激し、そしてＣＤ８および細胞内ＩＦＮγについて染色した。左のパネルは、フローサイトメーター解析を表し；右のパネルは、これらのデータの概要を示す。Ｂ．抗原を処方されたミセルは、ＣＤ４＋依存性のＣＤ８＋Ｔ細胞の誘導機構を克服する。同系のＣ５７Ｂ１／６Ｊ　Ｈ－２ｂマウス由来の精製されたＣＤ１１ｃ＋細胞を、示されている濃度およびオボアルブミンと単なるＣｐＧまたは処方されたミセルの組み合わせを用いて、４時間パルスした。細胞を洗浄し、１×１０＊５のＣＤ１１ｃを、５×１０＊５のＣＤ８＋　ＭＡＣＳ精製されたＯＴ－１脾臓細胞（約９０％の純度）と共に、５日間培養した。５日後、細胞を、ＢＦＡ（５μｇ／ｍｌ）と共にＳＩＩＮＦＥＫＬ　ペプチド（ｌμｇ／ｍｌ）で６時間再刺激し、そしてＣＤ８および細胞内ＩＦＮγについて染色した。左のパネルは、フローサイトメーター解析を表し；右のパネルは、これらのデータの概要を示す。Ｃ．抗原を処方されたミセルは、インビボでＤＣを活性化する。Ｃ５７Ｂ１／６Ｊマウス（２／群）に、５μｇ／マウスの単なるオボアルブミン／ＣｐＧまたは５００μｌ　ＰＢＳ中に処方されたミセルをｉ．ｖ．注射した。脾臓を、注射後４時間および２４時間後に摘出し、コラゲナーゼで処理し（３０分／３７℃）、ホモジナイズし、そして赤血球溶解緩衝液で処理した。ＣＤ１１ｃ＋細胞を、ＣＤ８０マー

カーまたはＣＤ８６マーカーについて染色し、そしてフローサイトメーターを用いて解析した。データは、アイソタイプのコントロール（影つき）、処置されていないマウス（灰色の線）または抗原を注射されたマウス（黒線）を表す。

【０１６６】

図１８は、ミセルおよびポリケタール粒子の免疫学を示す。Ａ．ワクチンを処方されたミセルは、インビボでの強いＴ細胞反応－ＣＤ８$^{+}$ＩＦＮγ^{+}を誘導する。４匹のＣ５７Ｂ１／６Ｊマウスのコホートに、５μｇ／マウスのＯＶＡ（１）またはＯＶＡ＋ＣｐＧ（２）、ミセル　ＯＶＡ（３）、ミセル　ＯＶＡ／ＣｐＧ（４）ミセルをｓ．ｃ．でワクチン接種した。同じ抗原処方物を用いて、動物に、３６日目（ブースト　１）および８４日目（ブースト　２）にブーストした。ブースト　２後６日目に血液を採取し、ＰＢＭＣを、Ｈｉｓｔｏｐａｑｕｅ　ｇｒａｄｉｅｎｔ方法を用いて単離し、ＳＩＩＮＦＥＫＬ　ペプチド（ｌμｇ／ｍｌ）およびＢＦＡ（５μｇ／ｍｌ）を用いて６時間再刺激し、そしてＣＤ８および細胞内ＩＦＮγについて染色した。左のパネルは、フローサイトメトリー解析および選択されたマウスに対するゲート戦略を表し；右のパネルは、全ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞のうちのＣＤ８$^{+}$ＩＦＮγ^{+}細胞の％として、これらのデータの概要を示す。Ｂ．ワクチンを処方されたミセルは、インビボで強いＴ細胞反応－ＣＤ８$^{+}$ＴＮＦα^{+}を誘導する。４匹のＣ５７Ｂ１／６Ｊマウスのコホートに、５μｇ／マウスのＯＶＡ（１）またはＯＶＡ＋ＣｐＧ（２）、ミセル　ＯＶＡ（３）、ミセル　ＯＶＡ／ＣｐＧ（４）を、ｓ．ｃ．でワクチン接種した。同じ抗原処方物を用いて、動物に、３６日目（ブースト　１）および８４日目（ブースト　２）にブーストした。ブースト　２後６日目に血液を採取し、ＰＢＭＣを、Ｈｉｓｔｏｐａｑｕｅ　ｇｒａｄｉｅｎｔ方法を用いて単離した。４匹のマウス由来のＰＢＭＣをプールし、ＳＩＩＮＦＥＫＬ　ペプチド（ｌμｇ／ｍｌ）およびＢＦＡ（５μｇ／ｍｌ）を用いて６時間再刺激し、そしてＣＤ８ならびに細胞内のＴＮＦαおよびＩＬ－１０について染色した。左のパネルは、フローサイトメトリー解析および選択されたマウスに対するゲート戦略を表し；右のパネルは、全ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞のうちのＣＤ８$^{+}$ＴＮＦα^{+}細胞の％として、これらのデータの概要を示す。Ｃ．ＯＶＡ／ＣｐＧワクチン接種後の特異的ＣＤ８＋／ＩＦＮγ＋Ｔ細胞の速度論。４匹のＣ５７Ｂ１／６Ｊマウスのコホートに、５μｇ／マウスのＯＶＡ＋ＣｐＧ（灰色の線）およびミセル　ＯＶＡ／ＣｐＧ（青の線）をｓ．ｃ．でワクチン接種した。同じ抗原処方物を用いて、動物に、０日目に初回免疫し、３６日目（ブースト　１）および８４日目（ブースト　２）にブーストした。初回免疫およびブーストの後の異なる日に血液を採取し、ＰＢＭＣを、Ｈｉｓｔｏｐａｑｕｅ　ｇｒａｄｉｅｎｔ方法を用いて単離した。４匹のマウス由来のＰＢＭＣを、ＳＩＩＮＦＥＫＬ　ペプチド（ｌμｇ／ｍｌ）およびＢＦＡ（５μｇ／ｍｌ）を用いて６時間再刺激し、そしてＣＤ８ならびに細胞内のＩＦＮγについて染色した。パネルは、全ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞のうちのＣＤ８$^{+}$ＩＦＮγ^{+}細胞の％（ＳＥＭエラーバーを含む）として、これらのデータの概要を表す。Ｄ．ＯＶＡ＋ＵＯ１２６　ＰＫＮワクチン接種後の特異的ＣＤ８＋／ＩＦＮγ＋Ｔ細胞の速度論。４匹のＣ５７Ｂ１／６Ｊマウスのコホートに、５μｇ／マウスのＯＶＡ＋ＣｐＧ（灰色の線）、ミセル　ＯＶＡ／ＣｐＧ（青の線）およびミセル　ＯＶＡ＋１０μｇ　ＵＯ１２６　ＰＫＮ（赤の線）をｓ．ｃ．でワクチン接種した。同じ抗原処方物を用いて、動物に、０日目に初回免疫し、３６日目（ブースト　１）および８４日目（ブースト　２）にブーストした。初回免疫およびブーストの後の異なる日に血液を採取し、ＰＢＭＣを、Ｈｉｓｔｏｐａｑｕｅ　ｇｒａｄｉｅｎｔ方法を用いて単離した。４匹のマウス由来のＰＢＭＣを、ＳＩＩＮＦＥＫＬ　ペプチド（ｌμｇ／ｍｌ）およびＢＦＡ（５μｇ／ｍｌ）を用いて６時間再刺激し、そしてＣＤ８ならびに細胞内のＩＦＮγについて染色した。パネルは、全ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞のうちのＣＤ８$^{+}$ＩＦＮγ^{+}細胞の％（ＳＥＭエラーバーを含む）として、これらのデータの概要を表す。Ｅ．ワクチンを処方されたミセルは、インビボで強い抗原特異的ＩｇＧ抗体反応を誘導する。４匹のＣ５７Ｂ１／６Ｊマウスのコホートに、５μｇ／マウスのＯＶＡ（１）またはＯＶＡ＋ＣｐＧ（２）、ミセル　ＯＶＡ（３）、ミセル　ＯＶＡ／ＣｐＧ（４）ミセル　ＯＶＡ＋１０μｇのＰＫＮ　Ｕ０１２６（５）またはミセル　ＯＶＡ／ＣｐＧ＋１０μｇのＰＫ

ＮＵ０１２６（６）をｓ．ｃ．でワクチン接種した。同じ抗原処方物を用いて、動物に、３６日目および８４日目にブーストした。初回免疫（初回）後４週目、１回目のブースト（ブースト１）後６週目および２回目のブースト（ブースト２）後７週目に、瀉血を行った。個々のマウス由来の血清を、プールし、そしてプレートＥＬＩＳＡを用いて、ＯＶＡ特異的な全ＩｇＧ抗体、ＩｇＧ１抗体、ＩｇＧ２ａ抗体およびＩｇＧ２ｂ抗体の反応性について試験した。抗体反応性を、血清の連続的希釈物についての４５０ｎｍ吸光度として測定した。データは、特異的抗ＯＶＡ抗体の逆数として表されている。Ｆ．ワクチンを処方されたミセルは、インビボで抗原特異的なＩｇＥ抗体反応およびＩｇＭ抗体反応を誘導する。４匹のＣ５７Ｂ１／６Ｊマウスのコホートに、５μｇ／マウスのＯＶＡ（１）またはＯＶＡ＋ＣｐＧ（２）、ミセルＯＶＡ（３）、ミセルＯＶＡ／ＣｐＧ（４）ミセルＯＶＡ＋１０μｇのＰＫＮＵ０１２６（５）またはミセルＯＶＡ／ＣｐＧ＋１０μｇのＰＫＮＵ０１２６（６）をｓ．ｃ．でワクチン接種した。同じ抗原処方物を用いて、動物に、３６日目および８４日目にブーストした。２回目のブースト後７週目に、瀉血を行った。個々のマウス由来の血清を、プールし、そしてプレートＥＬＩＳＡを用いて、ＯＶＡ特異的なＩｇＥ抗体およびＩｇＭ抗体の反応性について試験した。抗体反応性を、血清の連続的希釈物についての４５０ｎｍ吸光度として測定した。データは、特異的抗ＯＶＡ抗体の逆数として表されている。

【０１６７】

ポリケタールＰＣＡＤＫの性質決定

図１９は、シクロヘキサンジメタノール由来のポリケタールを示す。Ａ．シクロヘキサンジメタノール由来のポリケタール（ＰＣＡＤＫと呼ばれる）は、分解して、シクロヘキサンジメタノールおよびアセトンになり、どちらも、ヒトの使用のためのＦＤＡ承認を有する。Ｂ．ＰＣＡＤＫは酸感受性様式で分解する。ＰＣＡＤＫ内のケタール結合は、生理的ｐＨ条件下、週単位で加水分解する。ＰＣＡＤＫ内のケタール結合の加水分解を、４．５および７．４のｐＨでのＨ－ＮＭＲにより測定した。ファゴソームのｐＨ４．５で、ＰＣＡＤＫのケタール結合は、１０日後に約３０％が加水分解される。この結果に基づいて、本発明者らは、ＣＡＴ－ＰＫＮが、マクロファージによるファゴサイトーシス後４～５週間以内に、完全に加水分解されると予想する。

【０１６８】

図２０は、ＰＣＡＤＫ由来の粒子が、ローダミンレッドおよびエブセレンのような疎水性化合物および薬物をカプセル化し得ることを示すＳＥＭ画像を示す。

【０１６９】

図２１は、ＰＣＡＤＫからのローダミンレッドの放出がｐＨ感受性であることを示す線グラフを示す。

【０１７０】

ポリケタールおよびその粒子の合成および性質決定

図６は、粒子形成の工程を示す概略図である。Ａ．工程１：ポリケタールおよび薬物をクロロホルム中に溶解する；ポリビニルアルコールを水中に溶解する。Ｂ．工程２：クロロホルム溶液を水に添加し、そして超音波処理し、ミクロンサイズの小滴を生成する。工程３：クロロホルムを蒸発させ、粒子を生成する。

【０１７１】

図７は、フルオレセインをロードしたポリケタール粒子が、肝臓に取り込まれることを示す。静脈内注射後の、ＰＫＮからのフルオレセインの放出を示すマウス肝臓組織切片。

【０１７２】

図２２は、ほとんどのいかなる脂肪族ジオールをも含むポリケタールが、作製され得ることを示す化学的表記である。上記ポリケタールの疎水性は、その加水分解の速度論を決定する。

【０１７３】

図２３は、ＦＩＴＣ標識されたポリケタールが、肝臓のマクロファージによりファゴサイトーシスされることを示す写真である。インビボでのクップファー細胞によるＰＫＮの

ファゴサイトーシス。マウスに、ＦＩＴＣ－ＰＫＮまたは空のＰＫＮのいずれかを注射した。これらのマウスの肝臓を、組織学により解析した。左：点在する緑の蛍光により証明されるように、ＦＩＴＣ－ＰＫＮは、クップファー細胞内に豊富に存在する（倍率　１００×）。中央：空のＰＫＮは、バックグラウンドの緑の蛍光をほとんど生じない（倍率　１００×）。右：ＦＩＴＣ（赤）についての免疫組織化学（ＩＨＣ）は、クップファー細胞による取り込みを確認する（倍率　４００×）。

【０１７４】

図２４．Ａ．ポリケタール粒子中にカタラーゼおよびスーパーオキシドジスムターゼをカプセル化するために用いられる二重エマルジョンの手順。ホモジナイザーを用いて、カタラーゼ（１ｍｇ／ｍｌ）の水溶液５０μＬを、１ｍＬのジクロロメタン中に溶解した７５ｍｇのＰＣＡＤＫからなる有機相中に分散させ、油中水型（ｗ／ｏ）エマルジョンを生成した。次いで、このｗ／ｏエマルジョンを、２５ｍＬの４％　ＰＶＡ溶液中に滴下し、そしてこの溶液を、ホモジナイザーを用いて機械的に攪拌した。次いで、この結果生じたｗ／ｏ／ｗエマルジョンを、２２５ｍＬの４％　ＰＶＡ溶液に注ぎ、そして塩化メチレンが蒸発するまで数時間、機械的に攪拌した。この結果生じた粒子を、遠心分離により単離し、凍結乾燥し、そしてＳＥＭ（Ｂ）により調べた。このタンパク質のカプセル化効率は、３５％であった。これらのＣＡＴ－ＰＫＮは、約８ミクロンの平均直径を有する。Ｂ．カタラーゼ含有粒子のＳＥＭ画像、およびカタラーゼ含有粒子の蛍光顕微鏡画像。Ｃ．過酸化水素の２４０ｎｍでの吸光度を減少させる能力により証明されるように、カタラーゼ粒子は酵素活性を有する。

【０１７５】

実施例４～６についての参考文献：

Ａｈｓａｎ，Ｆ．；Ｒｉｖａｓ，Ｉ．Ｐ．；Ｋｈａｎ，Ｍ．Ａ．；Ｔｏｒｒｅｓ－Ｓｕａｒｅｚ，Ａ．Ｉ．Ｊ．Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ　Ｒｅｌｅａｓｅ　２００２，７９，２９－４０．

Ｐｒｉｏｒ，Ｓ．；Ｇａｎｄｅｒ，Ｂ．；Ｂｌａｒｅｒ，Ｎ．；Ｍｅｒｋｌｅ，Ｈ．Ｐ．；Ｓｕｂｉｒａ，Ｍ．Ｌ．；Ｉｒａｃｈｅ，Ｊ．Ｍ．；Ｇａｍａｚｏ，Ｃ．Ｅｕｒ．Ｊ．Ｐｈａｒｍ．Ｓｃｉ．２００２，１５，１９７－２０７．

Ｈａｈｎ，Ｓ．Ｋ．；Ｊｅｌａｃｉｃ，Ｓ．；Ｍａｉｅｒ，Ｒ．Ｖ．；Ｓｔａｙｔｏｎ，Ｐ．Ｓ．；Ｈｏｆｆｍａｎ，Ａ．Ｓ．Ｊ．Ｂｉｏｍａｔｅｒ．Ｓｃｉ．Ｐｏｌｙｍｅｒ　Ｅｄｎ．２００４，１５，１１１１－１１１９．

Ｗａｌｔｅｒ，Ｅ．；Ｄｒｅｈｅｒ，Ｄ．；Ｋｏｋ，Ｍ．；Ｔｈｉｅｌｅ，Ｌ．；Ｋｉａｍａ，Ｓ．Ｇ．；Ｇｅｈｒ，Ｐ．；Ｍｅｒｋｌｅ，Ｈ．Ｐ．Ｊ．Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ　Ｒｅｌｅａｓｅ　２００１，７６，１４９－１６８．

ｖａｎ　Ａｐｅｌｄｏｏｒｎ，Ａ．Ａ．；ｖａｎ　Ｍａｎｅｎ，Ｈ．－Ｊ．；Ｂｅｚｅｍｅｒ，Ｊ．Ｍ．；ｄｅ　Ｂｒｕｉｊｎ，Ｊ．Ｄ．；ｖａｎ　Ｂｌｉｔｔｅｒｓｗｉｊｋ，Ｃ．Ａ．；Ｏｔｔｏ，Ｃ．Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．２００４，１２６，１３２２６－１３２２７．

Ｆｕ，Ｋ．；Ｐａｃｋ，Ｄ．Ｗ．；Ｋｌｉｂａｎｏｖ，Ａ．Ｍ．；Ｌａｎｇｅｒ，Ｒ．Ｐｈａｒｍ．Ｒｅｓ．２０００，１７，１００－１０６．

Ｓｈｅｎｄｅｒｏｖａ，Ａ．；Ｂｕｒｋｅ，Ｔ．Ｇ．；Ｓｃｈｗｅｎｄｅｍａｎ，Ｓ．Ｐ．Ｐｈａｒｍ．Ｒｅｓ．１９９９，１６，２４１－２４８．

Ｆｉｆｅ，Ｔ．Ｈ．；Ｊａｏ，Ｌ．Ｋ．Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．１９６５，３０，１４９２－１４９５．

Ｋｗｏｎ，Ｙ．Ｊ．；Ｓｔａｎｄｌｅｙ，Ｓ．Ｍ．；Ｇｏｏｄｗｉｎ，Ａ．Ｐ．；Ｇｉｌｌｉｅｓ，Ｅ．Ｒ．；Ｆｒｅｃｈｅｔ，Ｊ．Ｍ．Ｊ．Ｍｏｌ　Ｐｈａｒｍ．２００５，２，８３－９１．

Ｍｕｒｔｈｙ，Ｎ．；Ｃａｍｐｂｅｌｌ，Ｊ．；Ｆａｕｓｔｏ，Ｎ．；Ｈｏｆｆｍａｎ，Ａ．Ｓ．；Ｓｔａｙｔｏｎ，Ｐ．Ｓ．Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｃｈｅｍ．２００３，１４，４１２－４１９．

Ｍｕｒｔｈｙ，Ｎ．；Ｘｕ，Ｍ．；Ｓｃｈｕｃｋ，Ｓ．；Ｋｕｎｉｓａｗａ，Ｊ．；Ｓｈａｓｔｒｉ，Ｎ．；Ｆｒｅｃｈｅｔ，Ｊ．Ｍ．Ｊ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．２００３，１００，４９９５－５０００．
Ｓｔａｎｄｌｅｙ，Ｓ．Ｍ．；Ｋｗｏｎ，Ｙ．Ｊ．；Ｍｕｒｔｈｙ，Ｎ．；Ｋｕｎｉｓａｗａ，Ｊ．；Ｓｈａｓｔｒｉ，Ｎ．；Ｇｕｉｌｌａｕｄｅｕ，Ｓ．Ｊ．；Ｌａｕ，Ｌ．；Ｆｒｅｃｈｅｔ，Ｊ．Ｍ．Ｊ．Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．２００４，７５，１２８１－１２８８．
Ｇｉｌｌｉｅｓ，Ｅ．Ｒ．；Ｇｏｏｄｗｉｎ，Ａ．Ｐ．；Ｆｒｅｃｈｅｔ，Ｊ．Ｍ．Ｊ．Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．２００４，１５，１２５４－１２６３．
Ｌｏｒｅｔｔｅ，Ｎ．Ｂ．；Ｈｏｗａｒｄ，Ｗ．Ｌ．Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．１９６０，２５，５２１－５２５．
Ｐａｎｙａｍ，Ｊ．；Ｗｉｌｌｉａｍｓ，Ｄ．；Ｄａｓｈ，Ａ．；Ｌｅｓｌｉｅ－Ｐｅｌｅｃｋｙ，Ｄ．；Ｌａｂｈａｓｅｔｗａｒ，Ｖ．Ｊ．Ｐｈａｒｍ．Ｓｃｉ．２００４，９３，１８０４－１８１４　。

【０１７６】

実施例７Ａ：心筋梗塞の処置のためのＰＫ粒子の合成および性質決定

この実施例において、心筋層への低分子インヒビターの送達にポリケタール（ＰＫ）粒子を使用することを記載する。ＰＫを、心臓に治療薬を送達し、急性心筋梗塞を処置するように設計する。ＰＫを、新規なクラスの重合体であるポリケタール（これは、その骨格内にケタール結合を含む）から処方する（図３０）。

【０１７７】

材料および方法

ポリ（シクロヘキサン－１，４－ジイル　アセトン　ジメチレン　ケタール）（ＰＣＡＤＫ）の合成

ＰＣＡＤＫを、短経路蒸留ヘッド（ｓｈｏｒｔ－ｐａｔｈ　ｄｉｓｔｉｌｌｉｎｇ　ｈｅａｄ）に接続した５０ｍＬの２ツ首フラスコ内で合成した。最初に、６．８２ｍＬの酢酸エチル中に溶解させた、５．５ｍｇの再結晶させたｐ－トルエンスルホン酸（０．０２９ｍｍｏｌ、Ａｌｄｒｉｃｈ）を、１，４－シクロヘキサンジメタノール（１２．９８ｇ、９０．０ｍｍｏｌ、Ａｌｄｒｉｃｈ）を含有する３０ｍＬのベンゼン溶液（１００℃に保持）に添加した。この酢酸エチルを蒸発させ、蒸留した２，２－ジメトキシプロパン（１０．９４ｍＬ、９０．０ｍｍｏｌ、Ａｌｄｒｉｃｈ）を、このベンゼン溶液に添加し、重合反応を開始した。次に、さらなる用量の２，２－ジメトキシプロパン（５ｍＬ）およびベンゼン（２５ｍＬ）を、６時間にわたって、１時間毎に計量漏斗を介して反応物に添加し、蒸留除去された２，２－ジメトキシプロパンおよびベンゼンを埋め合わせた。８時間後、反応を、５００μＬのトリエチルアミンを添加することによって停止させた。重合体を、冷ヘキサン（－２０℃で保存）での沈殿、その後の真空濾過によって単離した。ＰＣＡＤＫの分子量を、図３１に示されるＵＶ検出器を装備したゲル透過クロマトグラフィー（ＧＰＣ）（Ｓｈｉｍａｄｚｕ）によって決定した。ＴＨＦを、１ｍＬ／分の流速での移動相として使用した。Ｐｏｌｙｍｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（Ａｍｈｅｒｓｔ、ＭＡ）製のポリスチレン標準を、分子量較正曲線を確立するために使用した。この化合物を使用して、全ての続く実験においてＰＣＡＤＫ粒子を生成した。

【０１７８】

粒子を、ＰＣＡＤＫに加えられたＳＢ２３９０６３を使用して製造することができる

ＳＢ２３９０６３は、ｐ３８のインヒビターである。図２９は、上流のエフェクターの活性化および活性化の結果を含むｐ３８活性化の概略図である。

【０１７９】

実験プロトコールを、ＳＯＤをＰＬＧＡベースのマイクロ粒子に処方するために使用した手順に基づいて開発した（Ｈａｙａｓｈｉら、Ｅｎｔｒａｐｍｅｎｔ　ｏｆ　ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｉｎ　ｐｏｌｙ（Ｌ－ｌａｃｔｉｄｅ）　ｍｉｃｒｏｓｐｈｅｒｅｓ　ｕｓｉｎｇ　ｒｅｖｅｒｓｅｄ　ｍｉｃｅｌｌｅ　ｓｏｌｖｅｎｔ　ｅｖａｐｏｒａｔｉｏｎ

Ｐｈａｒｍ Ｒｅｓ，１９９４ １１（２）：３３７－４０）。簡潔に述べると、５００μＬ溶液のＳＢ２３９０６３（１ｍｇ／ｍＬ）を、７５ｍｇのＰＣＡＤＫを含有する１．０ｍＬの塩化メチレンに添加した。次に、この混合物を、５ｍＬの４％（ｗ／ｖ）ポリビニルアルコール（ＰＶＡ）水溶液に滴下し、６，０００ｒｐｍで１分間、ホモジナイザーを用いて攪拌した。生じたｗ／ｏエマルジョンを、次に、２５ｍＬのｐＨ７．４緩衝液に注ぎ、この混合物を数時間攪拌し、塩化メチレンを蒸発させた。生じた粒子を、遠心分離によって単離し、凍結乾燥させ、白色の固体粉末を生成した。ＳＢ２３９０６３のみについての標準曲線を使用して３２０ｎｍでのＵ．Ｖ．吸光度によって決定した、ＳＢ２９３０６３マイクロ粒子のタンパク質カプセル化効率は、２５～５０％であった。図３２に示されるＳＢ２３９０６３－ＰＣＡＤＫ粒子のＳＥＭ画像は、これらが、直径３～１５μｍであり、細胞内送達および細胞外送達の両方に適切であることを実証する。これらのデータは、ＳＢ２３９０６３が、ＰＫ粒子内に成功裏にロードされ得、カプセル化効率の測定のために粒子が加水分解され得ることを実証する。

【０１８０】

粒径は、容易に変更され得る

より大きな粒子を作製する実行可能性を実証するために、本発明者らは、元のプロトコール（上記）を使用して、低減された均質化速度を使用して、または低減されたＰＶＡパーセンテージを使用してエマルジョンを実行した。次に、本発明者らは、室温で４時間攪拌して、塩化メチレンを蒸発させ、数回洗浄した後、このポリケタールを凍結乾燥させ、それらのサイズについてＳＥＭを用いて調べた。図３３に示されるように、元のプロトコールによって、本発明者らは、＜１０μｍの範囲の粒子を得た。しかしながら、均質化速度（６０秒間、１５，０００ＲＰＭ）を低減することによってか、またはＰＶＡパーセンテージを低減（８％から４％へ）することによって、本発明者らは、２０μｍ以上の粒子を生成することができた。このデータは、より大きな粒子が、均質化の速度を低減するか、または水溶液のパーセンテージを低減することによって生成され得ることを示す。このことは、十分な心筋での保持が得られない場合、代替的なアプローチとしての、より大きな粒子を生成する実行可能性を示す。

【０１８１】

多孔質ＰＣＡＤＫマイクロ粒子を合成することができる

肺薬物送達に関して、最近、サイズが２０～３０ミクロンの多孔質マイクロ粒子が魅力的な関心をもたれている。なぜなら、依然としてそれらの大きなサイズは、マクロファージによってファゴサイトーシスされることを妨げるが、それらの低密度は、ｓｐｉｎｈａｌｅｒを介する、吸入されるべき空力的特性をそれらの多孔質マイクロ粒子に与えるからである。ＰＬＧＡを使用したＬａｎｇｅｒらによる研究は、２０～３０ミクロンのサイズの粒子が、肺の肺胞領域の細胞外空間へ治療薬を送達することに最適であることを示した（Ｃｈｅｎｇら、Ｆｏｒｍｕｌａｔｉｏｎ ｏｆ ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌｉｚｅｄ ＰＬＧＡ－ＰＥＧ ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ ｆｏｒ ｉｎ ｖｉｖｏ ｔａｒｇｅｔｅｄ ｄｒｕｇ ｄｅｌｉｖｅｒｙ．Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ（２００７）２８（５）：８６９－７６；Ｅｄｗａｒｄｓら、Ｌａｒｇｅ ｐｏｒｏｕｓ ｐａｒｔｉｃｌｅｓ ｆｏｒ ｐｕｌｍｏｎａｒｙ ｄｒｕｇ ｄｅｌｉｖｅｒｙ．Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９９７）２７６（５３２０）：１８６８－７１；Ｐｅｒｅｚら、Ｐｏｌｙ（ｌａｃｔｉｃ ａｃｉｄ）－ｐｏｌｙ（ｅｔｈｙｌｅｎｅ ｇｌｙｃｏｌ）ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ ａｓ ｎｅｗ ｃａｒｒｉｅｒｓ ｆｏｒ ｔｈｅ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ｐｌａｓｍｉｄ ＤＮＡ．Ｊ Ｃｏｎｔｒｏｌ Ｒｅｌｅａｓｅ（２００１）７５（１－２）：２１１－２４）。

【０１８２】

したがって、本発明者らは、タンパク質をロードした多孔質ＰＣＡＤＫマイクロ粒子を生成する実験プロトコールを開発した。このプロトコールを、Ｈｏｎｇらによる多孔質ポリラクチドマイクロスフェアを処方するために使用される手順から適合させた。簡潔に述べると、１００ｍｇのＰＣＡＤＫ重合体を２．５５ｍＬの塩化メチレンに溶解させた。次

に、０．４５ｍＬのｎ－ヘキサンを、この重合体／塩化メチレン溶液に添加し、２１，５００ｒｐｍで３０秒間均質化し、「油層」を生成した。次に、油中水エマルジョンを、２００μｌの水性のＦＩＴＣ標識ＯＶＡ溶液（２５ｍｇ／ｍｌ）をこの油層に添加し、２１，５００ｒｐｍで９０秒間の均質化を介して水層を油層に分散させることによって生成した。次に、濁ったｗ／ｏエマルジョンを、２０ｍＬの２％（ｗ／ｖ）ポリビニルアルコール水溶液に注ぎ、１７，０００ｒｐｍで６０秒間均質化し、最終的な水中油中水エマルジョンを生成した。次に、このｗ／ｏ／ｗエマルジョンを、１００ｍＬの２％　ＰＶＡ溶液にデカントし、油層中の塩化メチレンを蒸発させ、この重合体がカプセル化されたＯＶＡの周囲で硬化するように５００ｒｐｍで３時間、２５℃で攪拌した。その後、この硬化した粒子を、５００ｒｐｍで７２時間、４０℃で攪拌し、ヘキサンを粒子から除去し、細孔を、粒子の内部および粒子の表面に残した。ＯＶＡ－ＰＣＡＤＫのＳＥＭ画像を、多孔質粒子が合成されたことを実証する図３４に示す。これらのデータは、インビボでのＳＢ２３９０６３の放出に問題がある場合での、本発明者らの代替的な計画を支持する。

【０１８３】

放出の速度論は、共重合体の添加によって変更され得る

この研究において、ポリケタール共重合体の加水分解の速度論に対する疎水性の影響を調べた。２つのセットの共重合体を合成し、それらの加水分解速度を調べた。最初に、１，４－シクロヘキサンジメタノールおよび１，５－ペンタンジオールから構成される一連のポリケタール共重合体（これらは、種々の比の１，５－ペンタンジオールを含む）を合成した。これらの共重合体の親水性は、１，５－ペンタンジオールと１，４－シクロヘキサンジメタノールとの間の疎水性の大きな差（これらのそれぞれのＬｏｇ　Ｐ値は０．２７および１．７５である）に基づいて、それらの１，５－ペンタンジオール含量に対応する（ｓｃａｌｅ）。本発明者らは、１，５－ペンタンジオールが劇的に１，４－シクロヘキサンジメタノールベースのポリケタールの加水分解の速度論を加速することを実証する。例えば、ｐＨ４．５において、ＰＣＡＤＫは、２０日の加水分解半減期を有するが、２％ペンタンジオールを含む共重合体であるＰＫ１は、ｐＨ４．５において１２．５日の半減期を有し、そして１３％モルの１，５－ペンタンジオールを含む共重合体であるＰＫ３は、たった２日の加水分解半減期を有する。種々の親水性のジオールを含んだ、１，４－シクロヘキサンジメタノールに基づく第二のシリーズの共重合体も合成した。まとめると、表３のデータは、ポリケタールの加水分解の速度論が、それらの親水性を変化させることによって調整され得ることを実証し、ポリマーマトリクスへの水の拡散が、ケタールの加水分解を支配する律速工程（ｒａｔｅ　ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ　ｓｔｅｐ）であることを示唆する。ＰＣＡＤＫのこれらの共重合体を本発明者らの研究に使用する。なぜなら、これらが「調整可能な」加水分解速度を有し、数週間にわたってゆっくりと加水分解する粒子が心臓の再生に最適であるからである。

【０１８４】

【表１】

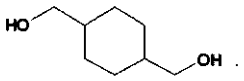
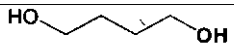
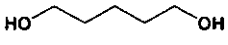
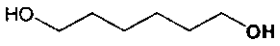
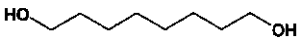
重合体組成				pH4．5での半減期	pH7．4での推定された半減期	ジオールBのLog P
ジオール A	%ジオールA	ジオール B	%ジオールB			
 1,4-シクロヘキサンジメタノール	97%	 1,4-ブタンジオール	3%	1.0 日	54 日	-0.83
	87%	 1,5-ペンタンジオール	13%	1.8 日	39 日	0.27
	85%	 1,6-ヘキサンジオール	15%	4.4 日	53 日	0.76
	87%	 1,8-オクタンジオール	13%	18.6 日	360 日	1.75

表3．pH4．5およびpH7．4での、選択された種々のジオールを含むポリケタール共重合体の加水分解半減期

タンパク質をロードしたポリケタールを生成することができる

実験プロトコールを、ＳＯＤをＰＬＧＡベースのマイクロ粒子に処方するために使用された手順に基づいて開発した。簡潔に述べると、１００μＬのＳＯＤ水溶液（４０ｍｇ／ｍＬ）を、均質化（２１，５００ｒｐｍ、３０秒間）によって１２５ｍｇのＰＣＡＤＫを含む１．０ｍＬの塩化メチレンに分散させ、油中水（ｗ／ｏ）エマルジョンを生成した。次に、このｗ／ｏエマルジョンを、５ｍＬの８％（ｗ／ｖ）ポリビニルアルコール（ＰＶＡ）水溶液に滴下し、ホモジナイザーを用いて６，０００ｒｐｍで５分間攪拌した。その後、生じたｗ／ｏ／ｗエマルジョンを、２５ｍＬのｐＨ７．４緩衝液に注ぎ、この混合物を数時間攪拌し、塩化メチレンを蒸発させた。生じた粒子を、遠心分離によって単離し、凍結乾燥させ、白色の固体粉末を生成した。ＳＯＤ－ＰＣＡＤＫマイクロ粒子のタンパク質カプセル化効率は、２８０ｎｍでのＵ．Ｖ．吸光度によって決定した場合に３６．７％であった。図３５に示される、ＳＯＤ－ＰＣＡＤＫマイクロ粒子のＳＥＭ画像は、これらが直径３～１５μｍであり、細胞内送達および細胞外送達の両方に適切であることを実証する。このことは、ＳＯＤ送達の場合に有益であり得る。なぜなら、スーパーオキシドは、炎症の間に細胞内毒性と細胞外組織損傷の両方を引き起こすからである。これらのデータは、本発明者らの代替的なアプローチに関して、低分子インヒビターに加え、より大きな、親水性のタンパク質をカプセル化するそれらの能力における、ポリケタールの多用途性を実証する。

【０１８５】

ＰＣＡＤＫは、マクロファージへのＳＯＤの送達を増強する

マクロファージからスーパーオキシドを除去するＳＯＤ－ＰＣＡＤＫマイクロ粒子の能力を、細胞培養物で調べた。ＴＩＢ－１８６マクロファージ（1×10^5細胞／ウェル、９６ウェルプレート）を、０．１ｍｇ／ｍＬ　ＳＯＤ－ＰＣＡＤＫマイクロ粒子、遊離ＳＯＤ（１．１４μｇ／ｍＬ　ＳＯＤ）、または空のＰＣＡＤＫマイクロ粒子のいずれかと２時間インキュベートし、次に０．２μｇ／ｍＬホルボールミリステートアセテート（ＰＭＡ）で３０分間刺激した。その後、これらのマクロファージからのスーパーオキシド産生を、２０ｎｍｏｌシトクロムｃ（５５０ｎｍでの吸光度）を使用して測定した。図３６は、遊離ＳＯＤ単独では、スーパーオキシド産生のほんのわずかな阻害しか生じなかったが、ＳＯＤ－ＰＣＡＤＫマイクロ粒子は、スーパーオキシド産生において６０％の低減を生じたことを実証する。空のマイクロ粒子はまた、マクロファージによるスーパーオキシド産生をおよそ２０％低減した。これらのデータは、酵素タンパク質が、細胞送達のためにカプセル化された場合にその活性を保持し得ることを示す。別の計画のために処方され

る一方で、これらのデータは、代替的な方法として、細胞へのタンパク質のポリケタール媒介送達の実行可能性を実証する。

【０１８６】

ポリケタールは、培養物中においてマクロファージによって保持される

一般的に、マクロファージは、ファゴサイトーシスを介して外来性の粒子を貪食するが、ＳＢ２３９０６３を含有する本発明者らのポリケタールは、ファゴサイトーシスを受けるには大きすぎる（＞５μｍ）可能性があり、放出の主要な方法は、マクロファージによる粒子の加水分解に続く小さな分子の取り込みである可能性がある。ポリケタールがマクロファージによって保持されるか否かを決定するために、本発明者らは、ＦＩＴＣをロードしたポリケタールとＲＡＷマクロファージとを２時間インキュベートし、ＰＢＳで３回洗浄し、蛍光顕微鏡法を使用して画像化した。図３７が示すように、ＦＩＴＣをロードしたポリケタール（そして、ロードされていないポリケタール）を、細胞の外側に見出すことができる。さらに、図３７は、ＦＩＴＣを取り込んだ細胞（矢印）を示す。これらのデータは、ポリケタールが培養されたマクロファージに「粘着」し、それらの内容物が取り込みのための加水分解に続いて放出され得ることを実証する。

【０１８７】

ＳＢ２３９０６３粒子は、ＴＮＦ－α刺激マクロファージにおいてｐ３８のリン酸化を阻害する

サイトカイン媒介性のｐ３８のリン酸化およびスーパーオキシド放出に対するＰＫ－ｐ３８$_{i}$の影響を決定するために、ＲＡＷマクロファージを、血清を含まない培地において集密度でプレートし、２０分間のＴＮＦ－α刺激の前に、２、４または６時間、空のＰＫまたはＰＫ－ｐ３８$_{i}$を含有する、血清を含まない培地に切り替えた。タンパク質を、試料緩衝液で回収し、２０μｇを、ウェスタン分析のために１２％ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル上で泳動（ｒｕｎ）した。タンパク質を、ＰＶＤＦメンブレンに移し、ホスホ特異的ｐ３８に対する抗体（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）でプローブした。ブロットを、Ｂｉｏ－Ｒａｄ製のＱｕａｎｔｉｔｙ　Ｏｎｅソフトウェアを使用してスキャンおよび定量化した。図３８が実証するように、ＰＫ－ｐ３８$_{i}$（０．１ｍｇ／ｍＬすなわち２μＭ）は、時間依存的な様式でＴＮＦ－αによるｐ３８のリン酸化を防止した。種々の時点において、空のＰＫによる影響はなかったが、ＰＫ－ｐ３８$_{i}$でのマクロファージの４または６時間の処理は、ＴＮＦ－αによるｐ３８のリン酸化を完全に防止した。これらのデータは、ＰＫ－ｐ３８$_{i}$が、マクロファージにおけるサイトカイン媒介性のｐ３８の活性化およびスーパーオキシド産生を防止し得ることを示唆した。

【０１８８】

ＳＢ２３９０６３粒子は、ＴＮＦ－α刺激されたマクロファージにおけるスーパーオキシド産生を阻害する

心筋梗塞後の増大したスーパーオキシド産生は、梗塞後の心臓のアポトーシスおよび機能不全において一定の役割を果たし得る。ＴＮＦ－α刺激は、マクロファージにおいて細胞外スーパーオキシド産生をもたらし得、この応答はｐ３８依存的であることが示されている。

【０１８９】

ＳＢ２３９０６３をロードしたポリケタールが細胞外スーパーオキシド産生を阻害し得るか否かを決定するために、本発明者らは、高速液体クロマトグラフィーを使用して、刺激された細胞の培地において酸化されたジヒドロエチジウムの蓄積を測定するための公開された方法を採用した（Ｆｅｒｎａｎｄｅｓら、Ａｎａｌｙｓｉｓ　ｏｆ　ｄｉｈｙｄｒｏｅｔｈｉｄｉｕｍ－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｏｘｉｄａｔｉｏｎ　ｐｒｏｄｕｃｔｓ　ｂｙ　ＨＰＬＣ　ｉｎ　ｔｈｅ　ａｓｓｅｓｓｍｅｎｔ　ｏｆ　ｓｕｐｅｒｏｘｉｄｅ　ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ　ａｎｄ　ＮＡＤＰＨ　ｏｘｉｄａｓｅ　ａｃｔｉｖｉｔｙ　ｉｎ　ｖａｓｃｕｌａｒ　ｓｙｓｔｅｍｓ．　Ａｍ　Ｊ　Ｐｈｙｓｉｏｌ　Ｃｅｌｌ　Ｐｈｙｓｉｏｌ（２００６）、Ｆｉｎｋら、Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　ｏｆ　ｉｎｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ　ｓｕｐｅｒｏｘｉｄｅ　ｆｏｒｍａｔｉｏｎ　ｉｎ　ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ　ｃｅ

ｌｌｓ ａｎｄ ｉｎｔａｃｔ ｔｉｓｓｕｅｓ ｕｓｉｎｇ ｄｉｈｙｄｒｏｅｔｈｉｄｉｕｍ ａｎｄ ａｎ ＨＰＬＣ－ｂａｓｅｄ ａｓｓａｙ．Ａｍ Ｊ Ｐｈｙｓｉｏｌ Ｃｅｌｌ Ｐｈｙｓｉｏｌ，（２００４）２８７（４）：Ｃ８９５－９０２）。注記すべき重要なことは、一度、ジヒドロエチジウムが酸化されると、それは、もはや細胞膜を横切ることができず、したがって、細胞外空間で形成されたあらゆるオキシ－エチジウムが測定のためにそこに残留するということである。オキシ－エチジウムは安定であり、値は吸光係数（ｅｘｔｉｎｃｔｉｏｎ ｃｏｅｆｆｉｃｉｅｎｔ）を使用して定量化され得、スーパーオキシドのモルは、オキシ－エチジウムのモルと同一であると推定される。なぜなら、それらは、１：１の比で反応するからである。マクロファージを、実験の前夜に、血清を含まない培地中に10^6細胞／ウェルでプレートした。次に、細胞を、６時間、緩衝剤、空のＰＫまたはＰＫ－ｐ３８$_i$を含む、血清を含まない培地に切り替え、ＴＮＦ－αでの刺激の前に徹底的に洗浄した。ＴＮＦ－α（１０ｎｇ／ｍＬ）を、１５分間、Ｋｒｅｂｓ－Ｈｅｐｅｓ緩衝液中の細胞に加え、その後、２０分間、ジヒドロエチジウム（２５μＭ）を加えた。１００μＬの培地を、蛍光検出器を備えたＨＰＬＣのために３００μＬのメタノールに集めた。図３９中のデータ（ｎ＝４）が実証するように、ＴＮＦ－αで刺激されたマクロファージにおいて細胞外スーパーオキシド産生の有意な増大が存在し、これは、ＰＫ－ｐ３８$_i$での前処理によって完全に阻害されたが、空のポリケタールには影響されなかった。外因的に添加されたスーパーオキシドジスムターゼ（５０Ｕ／ｍＬ）は、完全にこのシグナルをなくした。細胞外スーパーオキシド放出が、心筋梗塞に応答して大幅に増大する（図４０）ことを考慮すると、このことは、将来の研究において調査されるべき潜在的な機構を提示し得る。しかしながら、これらのデータは、ポリケタールが、細胞にＳＢ２３９０６３を送達し得、ＴＮＦ－αに誘導されたｐ３８のリン酸化だけでなく、下流の結果も同様に阻害し得ることを実証する。

【０１９０】

ポリケタールは、注射から３日間、筋肉中に保持される

ポリケタールが、数日後にインビボで検出され得るか否かを決定するために、本発明者らは、Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスの肢の筋肉に２５ｍｇ／ｍＬの空のポリケタールまたはポリ（乳酸－コ－グリコール酸）（ＰＬＧＡ）を注射した。注射から３日後、筋肉を単離し、４％パラホルムアルデヒド中に固定し、組織学のために包埋した。ヘマトトキシリン＆エオジン染色を、５μｍ切片上で実行し、光学顕微鏡法を使用して画像を取得した。図４１の代表的な画像が実証するように、粒子は、注射から３日後に検出可能であった。興味深いことに、異常に高い濃度の粒子（２５ｍｇ／ｍＬは、本発明者らが提唱する実験よりも２５倍～２５０倍高い）にもかかわらず、粒子の周囲にはほんのわずかな炎症しか存在しないようであった。対照的に、ＰＬＧＡ粒子で注射された肢の筋肉は、続く図によって観察されるように、激しい線維症と炎症細胞の浸潤の可能性を示した。注記、ＰＣＡＤＫ試料での暗色の染色は、ＤＡＰＩ染色によって確認されるように、大半は粒子のようであり、細胞ではない。これらのデータは、ＰＣＡＤＫ粒子の注射は光学顕微鏡法によって確認され得、激しい炎症反応をもたらさないようである点において原理の重要な証拠を実証する。

【０１９１】

ポリケタールの注射は炎症反応を誘発しない

炎症に対するポリケタールの注射の効果を決定するために、上記の肢の注射実験からの切片を、ＣＤ４５（一般的な炎症細胞のマーカー）に対する蛍光抗体で染色した。具体的には、パラフィン除去および再水和の後、切片を、抗原回復（ａｎｔｉｇｅｎ ｒｅｔｒｉｅｖａｌ）のためにプロテイナーゼＫとともにインキュベートした。回復の後、切片を１０％ウマ血清でブロックし、次に蛍光タグ付き抗マウスＣＤ４５抗体（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）とともにインキュベートした。徹底的な洗浄の後、切片を、ＤＡＰＩ（１μｇ／ｍＬ）とともにインキュベートし、カバースリップをかけた（ｃｏｖｅｒｓｌｉｐ）。適切なＦＩＴＣ結合体化アイソタイプをコントロールとして使用し、染色がないことが明らかだった。画像を、正確に同一の曝露時間で取得し、Ｍａｔｌａｂソフトウェアを使用

して組み合わせた。図４２の画像が実証するように、左側のポリケタール注射された筋肉と比較して、ＰＬＧＡ処置された筋肉の注射領域全体にわたって確固とした染色が存在した。本発明者らは、ＣＤ１４（炎症細胞の別のマーカー）についての染色を使用してこのデータを確認した。ＰＬＧＡ処置された筋肉において激しい細胞応答が存在したが、本発明者らは、ＰＣＡＤＫ処置された筋肉におけるＤＡＰＩ染色の大半が非特異的であると考える。高濃度のポリケタールの注射に対する炎症反応がわずかなことを実証する、これらのデータは、この提案に対して必須である。この実験で使用された濃度が本発明者らが提唱する注射よりも数桁大きい可能性があったにも関わらず、ＣＤ４５およびＣＤ１４染色によって測定される炎症細胞の応答はわずかだった。これらのデータは、ＰＫ－ｐ３８$_i$に関連して炎症において本発明者らが観察したあらゆる低下が、粒子自体によって引き起こされたあらゆる炎症を弱めたこと（ｏｆｆｓｅｔｔｉｎｇ）に起因しないという確信を提供する。

【０１９２】

ポリケタール内のＳＢ２３９０６３は梗塞ゾーン内のｐ３８のリン酸化を阻害する

ＳＢ２３９０６３をカプセル化するポリケタールがインビボにおいて活性であるか否かを決定するために、冠状動脈結紮を受け、梗塞直後のＣ５７ＢＬ／６マウスに、空のポリケタール（ＰＫ）またはＳＢ２３９０６３を含むポリケタール（ＰＫ－ｐ３８$_i$　０．１ｍｇ／ｍＬ）のいずれかを二重盲検様式（ｄｏｕｂｌｅ－ｂｌｉｎｄｅｄ　ｍａｎｎｅｒ）で心筋内に与えた。心臓を梗塞から３日後に切除し、左心室の自由壁の梗塞ゾーンを単離し、プロテアーゼおよびホスファターゼインヒビターを含むＴｒｉｔｏｎ－Ｘ緩衝液で均質化した。５００μｇのタンパク質を、ポリクローナルｐ３８抗体（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）で一晩インキュベートし、その後、プロテイン－Ａアガロースとともにインキュベートした。ビーズを洗浄し、そして試料緩衝液とともにインキュベートし、その後１２％ゲル上で泳動した。タンパク質をＰＶＤＦメンブレンに移し、ホスホ特異的ｐ３８抗体（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）を用いてプローブした。現像（ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ）後、メンブレンを、ストリッピングし、総ｐ３８抗体で再プローブ（ｒｅ－ｐｒｏｂｅ）した。ブロットを、スキャンし、Ｑｕａｎｔｉｔｙ　Ｏｎｅソフトウェアを使用して定量化し、データをホスホ－ｐ３８対総ｐ３８の比として表現し、ＡＮＯＶＡを使用して統計的に比較した。図４３のブロットおよびデータが実証するように、梗塞から３日後、左心室のホスホ－ｐ３８に有意な増大が存在した。この増大は、空のＰＫによって阻害されなかったが、ＰＫ－ｐ３８$_i$処置によって完全になくなった。これらのデータは、ポリケタール内にカプセル化されたＳＢ２３９０６３が、インビボで活性であり、急性心筋梗塞後の梗塞ゾーン内のｐ３８のリン酸化を有意に低減させることを実証する。

【０１９３】

ポリケタール内のＳＢ２３９０６３は、心筋梗塞後のＩＬ－５の増大を阻害する

上記の二重盲検実験からのタンパク質ホモジネート（５０μｇ）を、１２％ゲル上で泳動し、ウェスタン分析のためにＰＶＤＦメンブレンに移した。メンブレンを、インターロイキン－５（ＩＬ－５；ＡｂＣａｍ）（梗塞後心機能不全に関連する炎症促進性サイトカイン（Ｗｅｉら、Ｓｕｂａｃｕｔｅ　ａｎｄ　ｃｈｒｏｎｉｃ　ｅｆｆｅｃｔｓ　ｏｆ　ｑｕｉｎａｐｒｉｌ　ｏｎ　ｃａｒｄｉａｃ　ｃｙｔｏｋｉｎｅ　ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ，　ｒｅｍｏｄｅｌｉｎｇ，　ａｎｄ　ｆｕｎｃｔｉｏｎ　ａｆｔｅｒ　ｍｙｏｃａｒｄｉａｌ　ｉｎｆａｒｃｔｉｏｎ　ｉｎ　ｔｈｅ　ｒａｔ　Ｊ　Ｃａｒｄｉｏｖａｓｃ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌ，　２００２．　３９（６）：８４２－５０）に対する抗体とともにインキュベートした。その後、メンブレンをストリッピングし、正規化のためにβ－アクチンに対する抗体で再－再プローブした。図４４において代表的なブロットおよび群分けしたデータが示すように、梗塞から３日後に、ＩＬ－５発現に有意な増大が存在した。この増大は、空のＰＫ処置によって妨害されなかったが、ＰＫ－ｐ３８$_i$処置によって完全になくなった。これらのデータは、ポリケタール内のＳＢ２３９０６３が、急性心筋梗塞後の炎症促進性サイトカイン産生を阻害する可能性を実証する。

【０１９４】

ポリケタール内のＳＢ２３９０６３は、ラットにおいて心筋梗塞後のＴＮＦ－αの増大を阻害する

上記のデータの大半は、マウスモデルを使用して集めたが、本発明者らは、ラットにおける本発明者らの二重盲検研究からのデータを分析し始めた。ＴＮＦ－α放出を測定するために、成体の雄性Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットに偽手術または冠状動脈結紮手術を施し、５０μＬの０．５ｍｇ／ｍＬの空のＰＫ、ＰＫ－ｐ３８$_{i}$または遊離のＳＢ２３９０６３（１μＭ；０．５ｍｇ／ｍＬ　ＰＫ－ｐ３８$_{i}$に相当する）のいずれかを注射した。左心室の自由壁を、結紮から３日後に回収および均質化し、タンパク質レベルを、Ｂｒａｄｆｏｒｄアッセイ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）によって決定した。次に、試料を、市販のＥＬＩＳＡキット（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）を使用してＴＮＦ－α含量について分析した。データを、補正後にｐｇ／ｍｇタンパク質として表現した。図４５のデータが示すように、結紮から３日後に梗塞した動物において、ＴＮＦ－α産生に２倍の増大が存在した。数が少ないので（１群あたり、ｎ＝３～４）、統計的に有意ではないが、ＰＫ－ｐ３８$_{i}$による阻害の傾向（約３３％の低下）が存在した。また、空のポリケタール（ＰＫ）、または匹敵する量の遊離のＳＢ２３９０６３の注射に明らかな効果は存在しなかった。これらのデータは、マウスにおける本発明者らの最初の肯定的な知見を支持し、ポリケタール内でのＳＢ２３９０６３カプセル化が、ラットにおいて、心筋梗塞後の炎症促進性サイトカインの産生を阻害し得ることを示唆する。

【０１９５】

結果および考察

この実施例において、本発明者らは、粒子の合成および試験の両方、ならびにある程度の細胞および梗塞後の効果からなるデータを提示した。本発明者らのデータは、ｐ３８インヒビターであるＳＢ２３９０６３をカプセル化する粒子が、比較的単純な単一エマルジョンプロトコールから生成され得ることを示す。さらに、本発明者らのデータは、粒子の特性を容易に変更することができることを明らかに示す。具体的には、均質化速度または水溶液を変更することによって、粒径が増大され得、心筋での保持を確実にし得る。さらに、種々の共重合体を添加することによって、本発明者らは、加水分解の速度論を細かく調整し、梗塞後の治癒過程の必要性に適合し得る。最終的に、低分子インヒビターのカプセル化に加えて、本発明者らは、本発明者らの必要性がそれを要求する場合に、大型の酵素タンパク質もカプセル化することができる。

【０１９６】

これらの粒子が培養されたマクロファージに送達される場合に、それらは、細胞の外に保持されるのに十分大きいが、ポリケタール粒子の内容物は、明らかに細胞内に送達される。このことは、時間依存的な様式で生じる。なぜなら、マクロファージとＰＫ－ｐ３８$_{i}$とのインキュベーションは、ＴＮＦ－α刺激に応答したｐ３８のリン酸化を顕著に阻害するのに少なくとも４時間かかったからである。この阻害は、下流の影響に移された。なぜなら、ＰＫ－ｐ３８$_{i}$前処理が、ＴＮＦ－αに誘発された細胞外スーパーオキシド産生を阻害したからである。

【０１９７】

肢の筋肉に送達された場合、この粒子は、周囲の組織から容易に識別可能であり、注射から数日間保持された。酸性の産物に分解するＰＬＧＡ粒子と比較して、ＰＣＡＤＫは、ＣＤ４５およびＣＤ１４染色によって測定されるようにほんのわずかな炎症しか引き起こさなかった。心筋内に送達された場合に、ＰＫ－ｐ３８$_{i}$は、心筋梗塞に応答した左心室のｐ３８のリン酸化を低減した。さらに、ＰＫ－ｐ３８$_{i}$処置は、ＩＬ－５およびＴＮＦ－α（２つの炎症促進性サイトカイン）の左心室のレベルを低減させた。対照的に、空のＰＫ、または遊離のＳＢ２３９０６３でさえも効果はなかった。

【０１９８】

まとめると、この実施例は、単回の注射の後に、梗塞の領域内に化合物ＳＢ２３９０６３（ｐ３８インヒビター）を保持することが、より大型のげっ歯類において、内因性の心筋細胞の細胞死を阻害し、心筋梗塞後の心機能を回復させ、細胞治療を改善することを示

す。

【０１９９】

本明細書のデータは、ＳＢ２３９０６３をカプセル化する小さなミクロンスケールのポリケタール（ＰＫ）粒子、ならびに培養細胞におけるＴＮＦ－α誘発性ｐ３８活性化およびスーパーオキシド形成を生成する本発明者らの能力を実証した。本発明者らのデータはまた、これらの粒子が梗塞後の心筋層に送達され得、マウスの梗塞領域内のｐ３８のリン酸化を低減し得ることを示した。

【０２００】

実施例７Ｂ：将来の研究

ｐ３８インヒビターであるＳＢ２３９０６３を含むポリケタール（ＰＫ）は、培養細胞において、ｐ３８のリン酸化、炎症促進性サイトカインの産生およびアポトーシスを阻害し得る。

【０２０１】

ＰＫにカプセル化されたＳＢ２３９０６３は、数日間の過程にわたり用量依存的な様式で、ラット新生仔心筋細胞においてＴＮＦ－αに誘発されたｐ３８のリン酸化およびアポトーシスを阻害するために使用され得る。

【０２０２】

実験設計：ＰＫ－ｐ３８$_{i}$を、上記の方法セクションに記載されるように生成する。本発明者らは、上記の方法に記載されるようにラット新生仔心筋細胞を単離し、それらと０ｍｇ／ｍＬ、０．１ｍｇ／ｍＬ、０．５ｍｇ／ｍＬおよび１ｍｇ／ｍＬの空のＰＫまたはＰＫ－ｐ３８$_{i}$とを、図３８に示される時間経過に基づき６時間インキュベートする。ＰＫ－ｐ３８$_{i}$インキュベーションに続いて、ＴＮＦ－α（１０ｎｇ／ｍＬ）を、細胞に３０分間加え、タンパク質を、ＳＤＳ－試料緩衝液中に回収する。ＴＮＦ－αのこの用量は、大半の細胞型におけるｐ３８の活性化に十分であるはずである。試料を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル上で泳動し、リン酸化ｐ３８タンパク質または総ｐ３８タンパク質のいずれかを認識する抗体でプローブする。この実験を、ＰＫ－ｐ３８$_{i}$処理および洗浄から２４時間後、４８時間後および７２時間後に行うＴＮＦ－αの添加によって繰り返す。遊離のＳＢ２９３０６３は、阻害についての陽性コントロールとして使用する。デンシトメトリーを実行し、群をＡＮＯＶＡによって統計的に比較する。各実験は、統計のために少なくとも３回繰り返される。

【０２０３】

心筋細胞のアポトーシスに対する効果を測定するために、ラット新生仔心筋細胞を、０ｍｇ／ｍＬ、０．１ｍｇ／ｍＬ、０．５ｍｇ／ｍＬおよび１ｍｇ／ｍＬの空のＰＫまたはＰＫ－ｐ３８$_{i}$とともに６時間インキュベートする。ＰＫ－ｐ３８$_{i}$インキュベーションに続いて、ＴＮＦ－α（１０ｎｇ／ｍＬ）を、この細胞に１８時間加え、タンパク質をＳＤＳ－試料緩衝液中に回収する。本発明者らは、開裂カスパーゼ－３および開裂ＰＡＲＰ（２つの周知のアポトーシス経路のシグナリング分子）に対する抗体を使用するウェスタン分析によってアポトーシスを調べる。群を、デンシトメトリーを使用して定量化し、ＡＮＯＶＡを使用して比較する。上記の実験に加えて、細胞をまたトリプシンを用いて回収し、アネキシンＶ染色を実行し、その後フローサイトメトリーを行う。データを収集し、アポトーシスを生じている細胞のパーセンテージとして示し、ＡＮＯＶＡおよびＧｒａｐｈｐａｄ　Ｐｒｉｓｍソフトウェアを使用して統計的有意性に関して比較する。これらの実験を、ＰＫ－ｐ３８$_{i}$処理から２４時間後、４８時間後および７２時間後に行うＴＮＦ－αの添加によって繰り返し、空の粒子（陰性コントロール）およびＳＢ２３９０６３のカプセル化されていない形態（陽性コントロール）を、コントロールとして使用する。アポトーシス促進性（ｐｒｏ－ａｐｏｐｔｏｓｉｓ）マーカーを測定することに加えて、本発明者らは、ＴＵＮＥＬ染色、それに続いて蛍光イメージングを使用してアポトーシスに関して、ＴＮＦ－αで刺激された筋細胞も調べる。

【０２０４】

ＰＫにカプセル化されたＳＢ２３９０６３は、ＲＡＷおよび単離された初代マクロファ

ージの両方においてｐ３８のリン酸化および炎症性サイトカインの産生を阻害し得る。

【０２０５】

実験設計：方法セクションに記載されるようにＰＫ－ｐ３８$_i$を生成する。本発明者らは、０ｍｇ／ｍＬ、０．１ｍｇ／ｍＬ、０．５ｍｇ／ｍＬおよび１ｍｇ／ｍＬの空のＰＫまたはＰＫ－ｐ３８$_i$を用いての６時間のインキュベーションに続いて、ＴＮＦ－α（１０ｎｇ／ｍＬ）で刺激した培養ＲＡＷ細胞を使用して、これらの実験を実行する。実験の１つのセットにおいて、３０分間の刺激の後に総タンパク質を抽出し、リン酸化ｐ３８および総ｐ３８に関してウェスタン分析を実行する。さらに、転写因子ＮＦκＢのようなｐ３８の下流のエフェクターを、活性化に関して調べ得る。サイトカイン産生を測定するために、本発明者らは、６時間のＰＫインキュベーションに続いてＬＰＳおよびＴＮＦ－αで細胞を刺激する。培地を単離し、サイトカイン産生を、Ｂｉｏ－Ｒａｄ製のＢｉｏ－Ｐｌｅｘサイトカインアッセイを使用して測定する。測定されるべき選択されたサイトカインとしては、ＴＮＦ－α、インターロイキンファミリーのうちの数個のメンバー、インターフェロン－γ、および数種の他の周知の炎症性サイトカインが挙げられる。特に、ＩＬ－１、ＩＬ－５、ＩＬ－６およびＩＬ－８は、心筋梗塞後の心機能不全に関与している。したがって、上記のＢｉｏ－Ｐｌｅｘアッセイは、確認のためにウェスタン分析に引き続いて行われ得る。炎症促進性サイトカインの産生を測定することに加えて、培養および単離された細胞由来のｍＲＮＡを単離し、本発明者らは、同一のサイトカインについて、そしてコントロールとして１８Ｓまたはハウスキーピング遺伝子（β－チューブリン）のいずれかを使用して、リアルタイムＰＣＲを実行する。

【０２０６】

本発明者らは、ＰＫ－ｐ３８$_i$がＴＮＦ－αに誘発されたｐ３８のリン酸化を用量依存的な様式で阻害することを予測する。さらに、本発明者らは、ＴＮＦ－αの添加前、ＰＫ－ｐ３８$_i$を６時間インキュベートしようと２４時間インキュベートしようと４８時間インキュベートしようと７２時間インキュベートしようと、この阻害が明らかであることを予測する。比較において、空のＰＫはｐ３８のリン酸化に対し何の効果も有さないはずであり、遊離のＳＢ２９３０６３は、適切な陽性コントロールであるはずである。カプセル化が、一部のインヒビターをより活性の低いものにし得る可能性がある。この場合、本発明者らは、ＳＢ２９３０６３の出発量を増大させ得るか、または代用品のインヒビターを選択し得るかのいずれかを行い得る。本発明者らはまた、ＰＫ－ｐ３８$_i$処理がＴＮＦ－αによって誘発されたアポトーシスを低減することを予測する。多くの研究が、この経路と、さらなるアポトーシスシグナルが続く開裂カスパーゼ－３活性化との間の直接的な関連性を示している。本発明者らは、ＰＫ－ｐ３８$_i$がカスパーゼ－３およびＰＡＲＰの開裂を用量依存的に減少させ、そしてアネキシンＶの露出を防止することを予測する。何らかの困難が生じた場合、調べられ得るアポトーシスを検出する他のいくつかの方法（ＴＵＮＥＬ、ＤＮＡ断片化およびシトクロムｃ放出を含む）も存在する。広範な文献の体系的記述（ｈｉｓｔｏｒｙ）にもかかわらず、ｐ３８阻害が、ＴＮＦ－αによって誘発されるアポトーシスを防止するのに十分ではない可能性がある。この場合、本発明者らは、カプセル化手順に、ｃ－ｊｕｎ－Ｎ－末端キナーゼ（ＪＮＫ）およびストレス活性化プロテインキナーゼ（ＳＡＰＫ）経路のインヒビターのような他のインヒビターを加える可能性を調べ得る。このことは、本発明者らのインビボ研究を排除しない。なぜなら、ＴＮＦ－αは、梗塞後に産生される唯一のサイトカインではなく、他の研究室からの初期の研究は、インビボでのｐ３８についての強力な役割を示唆するからである。

【０２０７】

心筋細胞に対する効果に加えて、本発明者らは、ＰＫ－ｐ３８$_i$処理が、ＴＮＦ－αで刺激された、培養および単離されたマクロファージにおいてｐ３８のリン酸化および炎症性サイトカインの産生を用量依存的に阻害することを予測する。

【０２０８】

全てのウェスタン研究について、現像したフィルムを、スキャンし、Ｂｉｏ－Ｒａｄ製のＱｕａｎｔｉｔｙ　Ｏｎｅソフトウェアを使用して定量化する。全ての実験を、少なく

とも３回の別々に繰り返し、平均を、ＡＮＯＶＡ、その後適切な後検定（ｐｏｓｔ－ｔｅｓｔ）を使用して比較する。サイトカイン産生を、ｐｇ／ｍＬとして表現し、データを、ＡＮＯＶＡ、その後適切な後検定を使用して全ての群をわたって比較する。

【０２０９】

ｐ３８インヒビターであるＳＢ２３９０６３を含むＰＫは、ｐ３８のリン酸化、心筋細胞のアポトーシスを阻害し得、炎症マーカーの発現を防止し得、そして心筋梗塞後の心機能を改善し得る

ＰＫにカプセル化されたＳＢ２３９０６３は、ラットにおいて心筋梗塞後、最大７日間、梗塞ゾーン内のｐ３８のリン酸化およびアポトーシスを阻害し得、心機能を救済し得る

実験設計：ＰＫ－ｐ３８$_{i}$を、上記の方法セクションに記載されるように生成する。成体の雄性Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットに、上記方法に記載されるように偽手術または冠状動脈結紮を施し、空のＰＫ、ＰＫ－ｐ３８$_{i}$または遊離のＳＢ２９３０６３の投与で無作為化かつ盲検様式で注射する。手術から３日後および７日後、動物を、軽い麻酔下で訓練をつんだ技術者による心エコー検査およびＭＲＩに供し、心臓を、示された時点でタンパク質研究（ｎ≧５）または免疫組織学研究（ｎ≧５）のいずれかのために回収する。タンパク質研究のために、左心室の自由壁を切除し、洗剤緩衝液で均質化し、そしてタンパク質をＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル上で泳動し、ホスホレベルおよび総レベルのｐ３８の両方を認識する抗体でプローブする。この方法は、梗塞後にインビボでホスホ－タンパク質を確実に検出するために、本発明者らの研究室およびその他によって使用されている（Ｈｓｉｅｈら、Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ＰＤＧＦ－ＢＢ ｆｏｒ ｍｙｏｃａｒｄｉａｌ ｐｒｏｔｅｃｔｉｏｎ ｕｓｉｎｇ ｉｎｊｅｃｔａｂｌｅ ｓｅｌｆ－ａｓｓｅｍｂｌｉｎｇ ｐｅｐｔｉｄｅ ｎａｎｏｆｉｂｅｒｓ．Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ（２００６）１１６（１）：２３７－４８）。タンパク質試料もまた開裂カスパーゼ－３レベルについて調べ、アポトーシスのレベルを決定する。ホスホ－ｐ３８測定に加えて、ブロットもまた、ＴＮＦ－αおよびインターロイキンファミリーのうちの数種のメンバー（ＩＬ－１、ＩＬ－５、ＩＬ－６およびＩＬ－８が挙げられる）のような炎症促進性サイトカインに対する抗体でプローブする。デンシトメトリーを、Ｂｉｏ－Ｒａｄ製のＱｕａｎｔｉｔｙ Ｏｎｅソフトウェアを使用して実行し、データを、ＡＮＯＶＡ、その後の適切な後検定を使用して統計的に比較する。本発明者らの動物の数は、続く脊椎動物の切片において正当化されるが、本発明者らが発表した変動性を使用する検出力分析（ｐｏｗｅｒ ａｎａｌｙｓｉｓ）がこれらの数を決定している。

【０２１０】

免疫組織学的に、切片を、ホスホ－ｐ３８および信頼できる心筋細胞マーカー（トロポニンＩ、α－サルコメアアクチニン）の両方を認識する抗体でプローブする。本発明者らは、免疫組織化学についての本発明者らの標準的なプロトコールを使用して数報の論文を発表している。簡潔に述べると、組織を、４％パラホルムアルデヒドで固定し、脱水し、そして切片作製（ｓｅｃｔｉｏｎｉｎｇ）のためにパラフィンに包埋する。標準的なミクロトームを使用して、全ての研究に関して５μｍ切片を作製する。染色のために、再水和に続いて、抗原回復を、プロテイナーゼＫ（２０μｇ／ｍＬ）を使用して実行する。洗浄後、切片を、示される一次抗体および適切な蛍光タグつきの二次抗体でのインキュベーションの前に、１０％血清でブロックする。最終的に、切片を、核の視覚化のためにＤＡＰＩ（１μｇ／ｍＬ）でインキュベートする。ホスホ－ｐ３８染色の強度および二重陽性細胞の両方を、ＩｍａｇｅＰｒｏソフトウェアを使用して定量化する。単位面積あたりの強度および二重陽性細胞のパーセンテージを、ＡＮＯＶＡによって統計的に比較する。アポトーシスを測定するために、組織切片を、製造者のプロトコールにしたがってＴＵＮＥＬ染色に供し、アポトーシスを起こしている心筋細胞のパーセンテージを決定する。データをＩｍａｇｅＰｒｏソフトウェアを使用して分析し、アポトーシスの細胞のパーセンテージを、計数し、ＡＮＯＶＡ、その後の適切な後検定を使用して統計的に比較する。

【０２１１】

ＰＫにカプセル化されたＳＢ２３９０６３は、長期間の心機能不全および線維症の発症

を予防し得る

上記の実験に加えて、本発明者らはまた、無作為化かつ二重盲検様式での空のＰＫ、ＰＫ－ｐ３８$_i$または遊離のＳＢ２３９０６３の注射の前に、成体の雄性ラット（ｎ≧１０）を偽手術または冠状動脈結紮に供する。梗塞から２８日後および９０日後に、ラットに、軽い麻酔下で、訓練をつんだ技術者による心エコー検査およびＭＲＩを施し、回復が慢性期に明らかであるか否かを決定する。示された時点において、心臓を、免疫組織学的評価のためにパラホルムアルデヒド中に回収する。線維症を、ピクロシリウスレッド（ｐｉｃｒｏｓｉｒｉｕｓ　ｒｅｄ）染色、続いて、Ｍａｔｌａｂソフトウェアで書かれた特製プログラムを使用する染色の定量化によって決定する。このプログラムは、数個の領域をわたってピクセル強度を調べ、試料中のバックグラウンドを低減するように設計されている。群を、ＡＮＯＶＡ、その後の適切な後検定を使用して統計的に比較する。線維症の染色に加えて、免疫組織化学を、結合組織増殖因子およびトランスホーミング増殖因子を含む心臓線維症の一般的なマーカーについて実施する。

【０２１２】

心筋梗塞の後に、本発明者らは、リン酸化ｐ３８の増大を予測し、これは、ＰＫ－ｐ３８$_i$によって阻害されるが、空のＰＫによっても遊離のＳＢ２９３０６３によっても阻害されない。本発明者らは、両方の抽出されたタンパク質でこのことを、ならびに免疫組織化学を使用して心筋細胞特異的阻害およびマクロファージ特異的阻害の両方で観察することを予測する。ｐ３８阻害がＰＫ－ｐ３８$_i$投与後にインビボにおいて生じない可能性がある。本発明者らはまた、代替的なインヒビターのカプセル化またはＳＢ２３９０６３のローディングを増大させることも調べ得る。加えて、本発明者らは、必要とされる場合、粒子の多孔度および加水分解の速度論を変更し得、送達の速度論を改善し得る。上記に加えて、本発明者らはまた、ブースター（ｂｏｏｓｔｅｒ）として数週間後に第二の注射を考慮し得る。したがって、本発明者らは、第二の注射によって慢性的なｐ３８阻害を達成し得る。本発明者らは、心筋細胞のアポトーシスの有意な減少をもたらす、心筋梗塞後のｐ３８活性化のこの阻害を予測する。このことは、開裂カスパーゼ－３を含むアポトーシスマーカーについての染色およびＴＵＮＥＬ標識によって明らかである。本発明者らは、ＰＫ－ｐ３８$_i$の投与がまた、空のＰＫまたはＳＢ２３９０６３単独と比較して、梗塞領域において炎症促進性サイトカインの産生を低減することを予測する。このことは、ＴＮＦ－α、インターロイキンファミリーのうちの特定のメンバーおよびインターフェロン－γを含む特定のサイトカインについてのウェスタン分析によって明らかである。ウェスタン分析が、インビボにおいてこれらのマーカーの差を検出するのに十分には感度が良くない可能性があり得る。この場合、本発明者らは、Ｂｉｏ－Ｒａｄ製のＢｉｏ－Ｐｌｅｘサイトカインアッセイまたは示されるマーカーについてのリアルタイムＰＣＲを使用することができる。心筋梗塞の後に、ＰＫ－ｐ３８$_i$での処置がサイトカイン産生を阻害しない可能性もある。いずれかの場合において、これらのデータは、疾患の進行においてより包括的なシグナルへの局所的な梗塞後のシグナル変換の寄与について、価値のある情報を与える。

【０２１３】

本発明者らは、上記で概説したＰＫ－ｐ３８$_i$によるこれらの潜在的かつ有益な効果が、空のＰＫおよび遊離のＳＢ２３９０６３と比較して、心機能の改善をもたらすことを予測する。このことは、ＭＩのみ、空のＰＫまたは遊離のＳＢ２３９０６３とともにＭＩと比較して、ＰＫ－ｐ３８$_i$群における、短縮の部分的な面積（ｆｒａｃｔｉｏｎａｌ　ａｒｅａ）の有意な増大、ならびに拡張末期の（ｅｎｄ　ｄｉａｓｔｏｌｉｃ）心室の直径および容積の減少によって明らかとなるはずである。心エコー検査測定を、本発明者らの技術者によってＭモードの間、短軸画像から行い、容積測定を、盲検様式で長軸測定から行う。加えて、心臓のＭＲＩを、これらのデータを確認するために行う。炎症促進性サイトカインの産生およびアポトーシスの低減にもかかわらず、心機能に対する陽性の効果は、この初期の時点では明らかではない可能性がある。この理由のために、本発明者らは、より長い時点（２８日より後）でこの実験を再度実行することを提案している。

【０２１４】
最後に、線維症の予防に対する有益な効果は、明らかであり得る。なぜなら、数件の研究が、ｐ３８カスケードが心臓線維症の重要なメディエーターであることを示しているからである。したがって、将来において、本発明者らは、ＥＬＩＳＡによる炎症促進性サイトカインの放出またはリアルタイムＰＣＲによる炎症促進性遺伝子の発現のように、心臓線維症のマーカーを調べ得る。公表されたデータはまた、ｐ３８インヒビターの注入後の成体の心筋細胞の増殖における有意な増大を実証した（Ｅｎｇｅｌら、ｐ３８ ＭＡＰｋｉｎａｓｅ ｉｎｈｉｂｉｔｉｏｎ ｅｎａｂｌｅｓ ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ ａｄｕｌｔ ｍａｍｍａｌｉａｎ ｃａｒｄｉｏｍｙｏｃｙｔｅｓ． Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ，（２００５）１９（１０）：１１７５－８７）。ｐ３８インヒビターを用いてもその増殖の速度は極めて遅かったが、本発明者らは、Ｋｉ６７での染色または屠殺前にＢｒｄＵを注射することによってこのことを調べ得る。本発明者らの研究室およびその他は、傷害後の筋細胞の増殖を測定するために、ＢｒｄＵ注射についてのプロトコールを開発した（Ｈｓｉｅｈら、Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ＰＤＧＦ－ＢＢ ｆｏｒ ｍｙｏｃａｒｄｉａｌ ｐｒｏｔｅｃｔｉｏｎ ｕｓｉｎｇ ｉｎｊｅｃｔａｂｌｅ ｓｅｌｆ－ａｓｓｅｍｂｌｉｎｇ ｐｅｐｔｉｄｅ ｎａｎｏｆｉｂｅｒｓ． Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ，（２００６）１１６（１）：２３７－４８）。

【０２１５】
ｐ３８インヒビターであるＳＢ２３９０６３を含むＰＫは、心臓の幹細胞の生存および培養物およびインビボの両方での効能を改善し得る
ＰＫ－ｐ３８$_{i}$は、培養された心臓の幹細胞の生存および分化を改善し得る
実験設計：本発明者らは、このセクションの最後における方法に記載されるように、心臓の幹細胞を単離する。本発明者らの予備的な単離は、この方法に示されるように、高純度のｃ－ｋｉｔ$^{+}$の心臓の幹細胞を実証した。培養された心臓の幹細胞を、集密度で血清を含まない培地にプレートし、０ｍｇ／ｍＬ、０．１ｍｇ／ｍＬ、０．５ｍｇ／ｍＬおよび１ｍｇ／ｍＬの空のＰＫまたはＰＫ－ｐ３８$_{i}$とともに６時間インキュベートする。ＰＫインキュベーションに続いて、細胞を洗浄し、ＴＮＦ－αとともに３０分間インキュベートする。タンパク質を、試料緩衝液に回収し、ウェスタン分析をホスホ－ｐ３８および総－ｐ３８について実行する。加えて、細胞をＴＮＦ－αとともに１８時間インキュベートし、細胞を、アポトーシスの一般的なマーカー（開裂カスパーゼ－３および開裂ポリ（ＡＤＰ－リボース）ポリメラーゼ（ＰＡＲＰ）が挙げられる）について染色する。アポトーシスもまた、ＴＵＮＥＬおよびアネキシン－Ｖ染色を使用して測定する。全ての画像を、Ｍａｔｌａｂプログラムを使用して定量化し、％陽性として表現する。ウェスタンブロットをスキャンし、Ｂｉｏ－Ｒａｄ製のＱｕａｎｔｉｔｙ Ｏｎｅソフトウェアを使用して定量化する。全ての実験を、少なくとも３回繰り返し、その後、ＡＮＯＶＡ、続いて適切な後検定を使用して群間の統計的な比較を行う。

【０２１６】
改善された生存が分化を増強し得るか否かを決定するために、細胞を、１０％子ウシ血清および１０ｎＭデキサメタゾンで処理し、空のＰＫまたはＰＫ－ｐ３８$_{i}$の前処理の存在下および不在下で分化を誘導する。子ウシ血清とデキサメタゾンとのこの組み合わせは、Ｌｉｎｋｅら（Ｌｉｎｋｅら、Ｓｔｅｍ ｃｅｌｌｓ ｉｎ ｔｈｅ ｄｏｇ ｈｅａｒｔ ａｒｅ ｓｅｌｆ－ ｒｅｎｅｗｉｎｇ， ｃｌｏｎｏｇｅｎｉｃ， ａｎｄ ｍｕｌｔｉｐｏｔｅｎｔ ａｎｄ ｒｅｇｅｎｅｒａｔｅ ｉｎｆａｒｃｔｅｄ ｍｙｏｃａｒｄｉｕｍ， ｉｍｐｒｏｖｉｎｇ ｃａｒｄｉａｃ ｆｕｎｃｔｉｏｎ． Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ（２００５）１０２（２５）：８９６６－７１）によって以前に記載されるように、心臓の幹細胞に分化を誘導するのに十分であるはずである。同じ実験をＴＮＦ－ａ（１０ｎｇ／ｍＬ）の存在下で実行し、生存における改善が、分化に対して追加の利益を付与するか否かを決定する。子ウシ血清およびデキサメタゾンの処理に続いて、細胞を、透過化（ｐｅｒｍｅａｂｉｌｉｚａｔｉｏｎ）および転写因子Ｎｋｘ２．５、心ミオシン、α－サルコメアアクチニン、コネキシン－４３および

トロポニンＴを含む心臓特異的マーカーでのその後の染色のために８０％メタノールで固定する。これらは全て、本発明者らが先祖の集団（ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ ｐｏｐｕｌａｔｉｏｎ）において心臓の表現型を決定するために以前に使用した心臓の成熟のマーカーである。心臓マーカー特異的な染色に加え、本発明者らはまた、リアルタイムＰＣＲを使用する上記のタンパク質の測定のために、細胞のＲＮＡも回収する。

【０２１７】

ＰＫ－ｐ３８$_{i}$は、内因性の心臓の幹細胞の生存、成長および成熟を改善し得る

実験設計：ＰＫ－ｐ３８$_{i}$を、上記の方法に記載されるように生成する。成体の雄性Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットを、冠状動脈結紮、その直後に空のＰＫ、ＰＫ－ｐ３８$_{i}$またはＳＢ２３９０６３単独の注射に供する。冠状動脈結紮から１日後、７日後、１４日後および２８日後に、ラットを屠殺し、心臓を４％パラホルムアルデヒドで固定し、免疫組織学的評価のために包埋する（ｎ≧５）。梗塞ゾーンにおける、ｃ－Ｋｉｔ陽性細胞およびＳｃａ－１陽性細胞の存在およびサイズを、免疫蛍光検査およびイメージングソフトウェアを使用して分析し、盲検かつ無作為化様式で実行する。その上、心臓の幹細胞マーカーであるｃ－ＫｉｔまたはＳｃａ－１および生存因子（ｓｕｒｖｉｖａｌ ｆａｃｔｏｒ）ホスホ－Ａｋｔについての二重染色を、二重免疫蛍光検査を使用して調べる。さらに、ＴＵＮＥＬおよび開裂カスパーゼ－３染色もまた、ｃ－ＫｉｔおよびＳｃａ－１と共局在し、ＰＫ－ｐ３８$_{i}$送達が、これらの内因性幹細胞の生存を改善するか否かを決定する。成熟／分化を測定するために、本発明者らは、心臓マーカーであるα－サルコメアアクチニン、トロポニンＴの発現について、そしてサルコメアの存在について、これらの先祖細胞を調べる。最後に、複製を測定するために、本発明者らは、ＢｒｄＵ取り込みならびにｃ－ｋｉｔおよびｓｃａ－１陽性幹細胞のＫｉ６７染色を調べる。本発明者らの先の研究は、屠殺の２時間前の、ＢｒｄＵの単回のボーラス注射が、増殖する細胞を測定するために十分であることを実証する。上記の免疫組織学的評価のために、陽性細胞を、手動およびＭａｔｌａｂで書かれたプログラムで数え、％陽性として表現する。さらに、本発明者らは、Ｍａｔｌａｂでの、細胞のサイズを計数するためのプログラム（本発明者らが、移植した細胞のサイズを測定するために以前に使用した）を作製した（Ｄａｖｉｓら、Ｌｏｃａｌ ｍｙｏｃａｒｄｉａｌ ｉｎｓｕｌｉｎ－ｌｉｋｅ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ １（ＩＧＦ－１） ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｗｉｔｈ ｂｉｏｔｉｎｙｌａｔｅｄ ｐｅｐｔｉｄｅ ｎａｎｏｆｉｂｅｒｓ ｉｍｐｒｏｖｅｓ ｃｅｌｌ ｔｈｅｒａｐｙ ｆｏｒ ｍｙｏｃａｒｄｉａｌ ｉｎｆａｒｃｔｉｏｎ Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ（２００６）１０３（２１）：８１５５－６０）。本発明者らの発表した研究において、この方法は信頼でき、標準化アッセイにおいてわずかな変動性しか有さない。群を、ＡＮＯＶＡ比較（適切な後検定を使用する）を使用することによって統計的に比較する。全ての動物の数を、免疫組織化学染色、その後の細胞計数のための本発明者らの以前に発表した標準偏差を使用する検出力分析を実行することによって正当化した。

【０２１８】

ＰＫ－ｐ３８$_{i}$は、移植した心臓の幹細胞の生存、成長および成熟を改善し得る

実験設計：方法のセクションに記載されるように、心臓の幹細胞を単離し、培養する。使用する前に、細胞に、追跡のために、血球凝集素（ｈｅｍａｇｇｌｕｔａｎｉｎ）をコードするアデノウイルスで感染させる。無作為化かつ二重盲検の様式で、成体の雄性Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラット（群あたりｎ≧５）での冠状動脈結紮の直後に、細胞のみ、細胞と空のＰＫ、細胞と遊離のＳＢ２３９０６３または細胞とＰＫ－ｐ３８$_{i}$を、目視で検査するように梗塞ゾーンに注射する。全ての研究において、注射あたり５００，０００個の細胞を使用する。なぜなら、本発明者らは、以前にこの量の注射で成功しているからである（Ｄａｖｉｓら、Ｌｏｃａｌ ｍｙｏｃａｒｄｉａｌ ｉｎｓｕｌｉｎ－ｌｉｋｅ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ １（ＩＧＦ－１） ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｗｉｔｈ ｂｉｏｔｉｎｙｌａｔｅｄ ｐｅｐｔｉｄｅ ｎａｎｏｆｉｂｅｒｓ ｉｍｐｒｏｖｅｓ ｃｅｌｌ ｔｈｅｒａｐｙ ｆｏｒ ｍｙｏｃａｒｄｉａｌ ｉｎｆａｒｃｔｉｏｎ

．Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ（２００６）１０３（２１）：８１５５－６０）。心エコー検査および心臓のＭＲＩを、軽い麻酔下で、梗塞から３日後、１４日後および２８日後に、訓練をつんだ技術者によって二重盲検様式で実施する。心機能に加えて、心臓を、３日および２８日に回収し、４％パラホルムアルデヒドで固定し、免疫組織学的評価のために包埋する（時点あたり、群あたりｎ≧５）。切片を、血球凝集素（ｈｅｍａｇｇｌｕｔａｎｉｎ）、ならびにアポトーシスの評価のために開裂カスパーゼ－３およびＴＵＮＥＬについて共染色する。本発明者らは、細胞を追跡するために血球凝集素（ｈｅｍａｇｌｕｔａｎｎｉｎｇ）およびＧＦＰアデノウイルスを以前に使用し、細胞のうちの９５％超を染色することが可能である（図４７）。データを、これらのマーカーについて陽性の移植された幹細胞のパーセンテージとして表現する。アポトーシスマーカーの測定に加えて、本発明者らはまた、心臓の成熟マーカー（心ミオシン、α－サルコメアアクチニンおよびトロポニンＴが挙げられる）についても染色し、分化／成熟を決定する。最後に、切片を血球凝集素（ｈｅｍａｇｇｌｕｔａｎｉｎ）で染色し、サイズをＭａｔｌａｂで書かれたプログラムを使用して測定する。全てのデータを、ＡＮＯＶＡ、続いて適切な後検定を使用して統計的有意性について評価する。本発明者らは、空のＰＫと比較して、ＰＫ－ｐ３８$_{i}$がＴＮＦ－α処理された細胞における開裂カスパーゼ－３の活性化を有意に阻害するが、遊離のＳＢ２３９０６３が適切なコントロールであるはずであることを予測する。このことは、ＴＵＮＥＬおよびアネキシン－Ｖ染色を含む、アポトーシスについての他のマーカーにおいて明らかであるはずである。生存に対する影響に加えて、本発明者らはまた、この保護が、成熟心臓のマーカー染色によって測定される場合に、子ウシ血清／デキサメタゾンに誘導される分化の増大に移されることも予測する。

【０２１９】

培養細胞に対する効果に加えて、本発明者らは、ＰＫ－ｐ３８$_{i}$が、心筋梗塞後の内因性の幹細胞の生存を増強することを予測する。より成体と幹細胞を梗塞後に生存させることによって、本発明者らは、このことがまた、時間をわたっての特異的なマーカーについての染色によって測定される、幹細胞の成熟の増大をもたらすと考える。本発明者らは、ＰＫ－ｐ３８$_{i}$とともに移植された細胞を受容するラットが、細胞および空のＰＫまたは遊離のＳＢ２３９０６３と比較した場合、心エコー検査およびＭＲＩによって測定される、改善された心機能を示すことを予測する。

【０２２０】

本発明者らが上記の方法に記載した特異的な系統マーカーでの染色による細胞の性質決定に周到な注意が払われる。本発明者らが予備的な単離に使用した磁気ビーズ分離に加えて、蛍光活性化細胞選別法（ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ ａｃｔｉｖａｔｅｄ ｃｅｌｌ ｓｏｒｔｉｎｇ ｍｅｔｈｏｄ）が、ｃ－ｋｉｔ$^{+}$幹細胞の単離に関して公開されている。元の心臓の幹細胞を凍結し、培養物を慣例的に系統マーカーについてチェックし、適切な細胞型を確実にする。

【０２２１】

ポリケタール合成－ポリ（１，４－シクロヘキサン－アセトン ジメチレン ケタール）（ＰＣＡＤＫ）を、１，４－シクロヘキサンジメタノールと２，２－ジメトキシプロパンとを反応させることによって合成する。ＰＣＡＤＫから生成したＰＫはインビボで１，４－シクロヘキサンジメタノールおよびアセトンに分解するはずである。ＰＣＡＤＫを、短経路蒸留ヘッドに接続した２５ｍＬ ２ツ首フラスコ内で合成する。１０ｍＬの温かい酢酸エチル中に溶解させた１，４－シクロヘキサンジメタノール（１．０ｇ、Ａｌｄｒｉｃｈ）を、１００℃に保持した１０ｍＬの蒸留ベンゼンに加える。次に、５５０μＬの酢酸エチル中に溶解させた、再結晶させたｐ－トルエンスルホン酸（５．５ｍｇ、０．０２９ｍｍｏｌ、Ａｌｄｒｉｃｈ）を、このベンゼン溶液に加える。酢酸エチルを蒸留して除き、蒸留した２，２－ジメトキシプロパン（９００μＬ、７．４ｍｍｏｌ、Ａｌｄｒｉｃｈ）を加えて、反応を開始させる。追加の用量の２，２－ジメトキシプロパンを計量漏斗を介して添加し、蒸留除去された２，２ ジメトキシプロパンを埋め合わせる。この反応を、１００μＬ トリエチルアミンを添加することによって停止し、冷ヘキサンで沈殿さ

せる。この粗生成物を、真空濾過し、エーテルおよびヘキサンでリンスし、そして真空乾燥させて、ＰＣＡＤＫを生成する。回収された重合体を、ＧＰＣおよび^{1}Ｈ　ＮＭＲによって分析する。

【０２２２】

シクロヘキサン－ジメタノールおよびブタンジオールからなるポリケタールの共重合体もまた、ポリケタールマイクロ粒子の疎水性および加水分解の速度論を操作するために、先に記載した方法論を使用して合成する。３、５および１０モル％のブタンジオールを含む共重合体を合成し、本発明者らは、これらの重合体が、それらのより高い親水性に起因して、ｐＨ７．４においてＰＣＡＤＫよりも有意に速く、加水分解しＳＢ２３９０６３を放出することを予測する。

【０２２３】

ＳＢ２３９０６３のカプセル化－ＳＢ２３９０６３カプセル化実験を、油層としてジクロロメタンを、界面活性剤安定剤（ｓｕｒｆａｃｔａｎｔ　ｓｔａｂｉｌｉｚｅｒ）としてＰＶＡを使用する単一エマルジョン手順を使用して実行する。代表的な手順を、以下に記載する。５００μＬ溶液のＳＢ２３９０６３（１ｍｇ／ｍｌ）を、有機相（１ｍＬのジクロロメタンに溶解させた７５ｍｇのＰＣＡＤＫからなる）に分散させる。この溶液を、１分間にわたり、最低の設定で４％　ＰＶＡ中で均質化し、油中水（ｗ／ｏ）エマルジョンを生成する。次に、生じたｗ／ｏエマルジョンを、３０ｍＬの１％　ＰＶＡ溶液に注ぎ、有機溶媒が蒸発するまで、数時間にわたり機械的に攪拌する。生じた粒子を、遠心分離によって単離し、徹底的に洗浄し、そして凍結乾燥する。粒子を、コントロールとして空のポリケタールを使用して、Ａ３２０によってインヒビター含量についてアッセイし得る。本発明者らは、適用され得るＳＢ２３９０６３濃度についての標準曲線を生成した。生じたポリケタールもまた、乾燥させ、ＳＥＭで調べる。

【０２２４】

心筋注射／梗塞－２５０グラムの重量の成体の雄性Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットを、記載されるように心筋梗塞または注射手術に供する。簡潔に述べると、動物を、麻酔（１％～３％イソフルラン）し、気管内挿管に続いて、心臓を、肋骨の分離によって露出させる。心筋梗塞を、左冠状動脈の前室間動脈の結紮によって実行する。ＰＫ注射または細胞治療の研究のために、冠状動脈結紮の直後に、処置（５０～１００μＬ）を、３０ゲージの針を介して梗塞ゾーンへ注射するが、この間、心臓は鼓動している。注射後、胸部を閉じ、動物は、加熱パッド（ｈｅａｔｉｎｇ　ｐａｄ）上で回復する。心エコー図を、上記の実験設計に記載されるときに実行する。本発明者は、この動物モデルに経験を有し、本発明者らは、心エコー検査によって測定される再現可能な梗塞を得た。本発明者らは、ラットにおいて数回の実験を実行し、図４８は、偽手術または冠状動脈結紮手術を受けた１０匹の動物からの群分けしたデータのグラフを示す。Ｙ－軸は、３日後の％内径短縮率である（心エコー検査を使用する心機能の一般的な測定）。

【０２２５】

新生仔心筋細胞の単離－このプロトコールに従うことによって、本発明者らは、９５～９９％の純度で新生仔心筋細胞を回収することができた（Ｄａｖｉｓら、Ｌｏｃａｌ ｍｙｏｃａｒｄｉａｌ ｉｎｓｕｌｉｎ－ｌｉｋｅ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ １（ＩＧＦ－１） ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｗｉｔｈ ｂｉｏｔｉｎｙｌａｔｅｄ ｐｅｐｔｉｄｅ ｎａｎｏｆｉｂｅｒｓ ｉｍｐｒｏｖｅｓ ｃｅｌｌ ｔｈｅｒａｐｙ ｆｏｒ ｍｙｏｃａｒｄｉａｌ ｉｎｆａｒｃｔｉｏｎ. Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ（２００６）１０３（２１）：８１５５－６０；Ｄａｖｉｓら、Ｉｎｊｅｃｔａｂｌｅ ｓｅｌｆ－ａｓｓｅｍｂｌｉｎｇ ｐｅｐｔｉｄｅ ｎａｎｏｆｉｂｅｒｓ ｃｒｅａｔｅ ｉｎｔｒａｍｙｏｃａｒｄｉａｌ ｍｉｃｒｏｅｎｖｉｒｏｎｍｅｎｔｓ ｆｏｒ ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ ｃｅｌｌｓ. Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｏｎ（２００５）１１１（４）：４４２－５０；Ｎａｒｍｏｎｅｖａら、Ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ ｃｅｌｌｓ ｐｒｏｍｏｔｅ ｃａｒｄｉａｃ ｍｙｏｃｙｔｅ ｓｕｒｖｉｖａｌ ａｎｄ ｓｐａｔｉａｌ ｒｅｏｒｇａｎｉｚａｔｉｏｎ：ｉｍｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｆｏｒ

ｃａｒｄｉａｃ ｒｅｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｏｎ（２００４）１１０（８）：９６２－８）。Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラット（Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）の１日齢の仔を屠殺し、心臓を切除し、ハンクス緩衝化塩溶液中で洗浄し、切り刻んだ後、６時間、４℃でトリプシン（１ｍｇ／ｍＬ）中に置く。次に、生じたペレットを、１時間、３７℃でコラゲナーゼ２型（０．８ｍｇ／ｍＬ）中に溶解させる。軽く遠心分離した後、生じたペレットを、２０％ウシ胎児血清を含む培地１９９に再懸濁し、２時間平板培養する。非接着性の細胞を、実験のためにフィブロネクチンでコーティングされたデッシュ上にプレートするか、または収集して、α－サルコメアアクチンに対する抗体を使用するフローサイトメトリーによって分析し、筋細胞の組成を決定する。

【０２２６】

心臓の幹細胞の単離－成体のＳｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの心臓を単離し、切り刻み、そして１時間、３７℃でコラゲナーゼ２型（０．８ｍｇ／ｍｌ）とともにインキュベートする。上清を、遠心分離によって単離し、次に、磁気ビーズ（Ｄｙｎａｌ）に結合体化されたｃ－Ｋｉｔ抗体とともにインキュベートする。細胞が集密度に達した後、第二の選択工程を、Ｓｃａ－１に対する抗体を使用して行う。細胞の表現型を、ｃ－Ｋｉｔ、Ｓｃａ－１および系統マーカーに対するフローサイトメトリーを使用して決定する。使用される系統マーカーは、ＣＤ３４、ＣＤ４５、ＣＤ３１、コネキシン４３、心ミオシンおよびフォン・ビルブラント因子である。このプロセスを使用して、数人の研究者は、継続的に再生し、培養物中に保持され得る心臓の幹細胞の系統を維持することができた（Ｂｅｌｔｒａｍｉら、Ａｄｕｌｔ ｃａｒｄｉａｃ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌｓ ａｒｅ ｍｕｌｔｉｐｏｔｅｎｔ ａｎｄ ｓｕｐｐｏｒｔ ｍｙｏｃａｒｄｉａｌ ｒｅｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ． Ｃｅｌｌ（２００３）１１４（６）：７６３－７６）。加えて、図４９が実証するように、本発明者らの予備的な単離手順が始まり、それは極めて有効である。本発明者らは、ＣＤ４５を含む他の系統マーカーに関して染色されないｃ－ｋｉｔ$^{+}$幹細胞の系統を維持することができた。他のマーカーの不在および死促進刺激（ｐｒｏ－ｄｅａｔｈ ｓｔｉｍｕｌｉ）に対する感度を決定するための、さらなる研究が進行中である。

【０２２７】

ウェスタン分析およびリアルタイムＰＣＲ－培養細胞および梗塞領域から抽出されたタンパク質におけるウェスタン分析を、以前に記載されたように実行する（Ｈｓｉｅｈら、Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ＰＤＧＦ－ＢＢ ｆｏｒ ｍｙｏｃａｒｄｉａｌ ｐｒｏｔｅｃｔｉｏｎ ｕｓｉｎｇ ｉｎｊｅｃｔａｂｌｅ ｓｅｌｆ－ａｓｓｅｍｂｌｉｎｇ ｐｅｐｔｉｄｅ ｎａｎｏｆｉｂｅｒｓ． Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ，（２００６）１１６（１）：２３７－４８）。ＣＴＧＦ、ＴＧＦ－β、１型コラーゲンおよびＭＭＰ－２に対する抗体は市販されている。ＲＮＡを、Ｔｒｉ－Ｒｅａｇｅｎｔを使用し、製造者のプロトコールに従って梗塞ゾーンから抽出する。細胞ホモジネートまたは組織ホモジネートからウェスタン分析を実行する。細胞を、０．１％ Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘ、プロテアーゼインヒビターおよびホスファターゼインヒビターを含むＴｒｉｓ／ＥＤＴＡ緩衝液で回収する。組織ホモジネートを、（特定のプロトコールが異なる緩衝液を必要としない限り）同様な緩衝液を使用して作製し、鋸歯ジェネレータ（ｓａｗ－ｔｏｏｔｈ ｇｅｎｅｒａｔｏｒ）を備えるＰｏｗｅｒＧｅｎホモジナイザー（Ｆｉｓｈｅｒ）を使用して均質化する。

【０２２８】

免疫染色－心臓を、示された時点で単離し、６時間、室温で４％パラホルムアルデヒド中で固定する。脱水後、心臓をパラフィン内に包埋し、５μｍ切片を免疫組織化学のために作製する。パラフィンを、キシレン中での浸漬によって除去し、切片を、上記方法に記載されるように抗体でプローブする。心臓マーカー（トロポニンＴ、α－サルコメアーアクチン、心ミオシン）に対する抗体は市販されており、本発明者らの研究室で使用された。

【０２２９】

心エコー検査／ＭＲＩ－心エコー検査およびＭＲＩを、経験をつんだ技術者によって軽い麻酔下で実行する。全ての測定値を、二重盲検様式で取得し、そして分析する。左心室の収縮末期および拡張末期（ｅｎｄ　ｓｙｓｔｏｌｉｃ　ａｎｄ　ｄｉａｓｔｏｌｉｃ）の測定値を、Ｍモードの短軸画像から取得し、長軸像で確認する。

【０２３０】

（実施例８：ポリケタール共重合体の合成および粒子の形成）

この実施例において、ポリ（シクロヘキサン－１，４－ジイル　アセトン　ジメチレンケタール）（ＰＣＡＤＫ）の加水分解の速度論を、種々の親水性を有する他のジオールとの共重合を介して、その親水性を制御することによって操作するための戦略を提示する。ＰＣＡＤＫに基づく、６つのポリケタール共重合体ＰＫ１～ＰＫ６を合成した。

【０２３１】

材料および方法

ポリケタール共重合体を、短経路蒸留ヘッドに接続した２５ｍＬ　２ツ首フラスコ内で合成した。ジオールである１，４－シクロヘキサンジメタノール（１．０４ｇ、７．２５ｍｍｏｌ）と、１，４－ブタンジオール、１，５－ペンタンジオール、１，６－ヘキサンジオールまたは１，８－オクタンジオールのいずれかとを、２０ｍＬの蒸留ベンゼン中に溶解し、１００℃に保持した。５５０μＬの酢酸エチルに溶解させた、再結晶させたｐ－トルエンスルホン酸（５．５ｍｇ、０．０２９ｍｍｏｌ）を、このベンゼン溶液に添加した。酢酸エチルを蒸留して除去し、蒸留した２，２－ジメトキシプロパン（２つのジオールを合わせたモル量と等しい）を添加して反応を開始した。次に、さらなる用量の２，２－ジメトキシプロパン（５００μＬ）およびベンゼン（２ｍＬ）を、６時間にわたって、１時間毎に計量漏斗を介して反応物に添加し、蒸留除去された２，２－ジメトキシプロパンおよびベンゼンを埋め合わせた。２４時間後、反応を、１００μＬのトリエチルアミンを添加することによって停止させた。重合体を、冷ヘキサンへの沈殿によって単離し、^{1}Ｈ－ＮＭＲおよびＧＰＣによって分析した。一般的に、生じた重合体は、２０００～４０００Ｄａの間の数平均分子量を有した。表１は、合成したポリケタール共重合体の組成および分子量を列挙する。^{1}Ｈ　ＮＭＲスペクトルを、溶媒としてＣＤＣｌ$_{3}$を使用するＶａｒｉａｎ　Ｍｅｒｃｕｒｙ　ＶＸ　４００　ＭＨｚ　ＮＭＲ分光計（Ｐａｌｏ　Ａｌｔｏ、ＣＡ）を使用して取得した。これらのポリケタール共重合体のＨ－ＮＭＲスペクトルを、代表的な例として以下にまとめ、ＰＫ３の^{1}Ｈ－ＮＭＲを図５０に示す。１，５－ペンタンジオール対１，４－シクロヘキサンジメタノールのモル比を、ピークａおよびｂ下のそれぞれの面積の比を取得することによって取得した。

【０２３２】

【化３】

PK1. ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ = 3.4 – 3.18 (m, 4H), 1.66 (s, 1.9H), 1.85 – 0.93 (m, 8H), および 1.32 (s, 6H).

PK2. ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ = 3.4 – 3.18 (m, 4H), 1.66 (s, 1.8H), 1.85 – 0.93 (m. 8H), および 1.32 (s, 6H).

PK3. ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ = 3.4 – 3.18 (m, 4H), 1.64 (s, 1.7H), 1.85 – 0.93 (m, 8.2H), および 1.32 (s, 6H).

PK4. ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ = 3.4 – 3.18 (m, 4H), 1.68 (s, 2H), 1.85 – 0.93 (m, 8H), および 1.32 (s, 6H).

PK5. ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ = 3.4 – 3.18 (m, 4H), 1.67 (s, 1.8H), 1.85 – 0.93 (m, 8H), および 1.32 (s, 6H).

PK6. ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ = 3.4 – 3.18 (m, 4H), 1.68 (s, 1.8H), 1.85 – 0.93 (m, 8H), および 1.32 (s, 6H).

これらのポリケタール共重合体の分子量を、ＵＶ検出器を装備したＳｈｉｍａｄｚｕ ｓｙｓｔｅｍ（Ｋｙｏｔｏ、Ｊａｐａｎ）を使用してゲル透過クロマトグラフィー（ＧＰＣ）によって決定した。ＴＨＦを、１ｍＬ／分の流速での移動相として使用した。Ｐｏｌｙｍｅｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（Ａｍｈｅｒｓｔ、ＭＡ）製のポリスチレン標準（ピークＭｗ＝１０６０、２９７０および１０６８０）を、分子量較正曲線を確立するために使用した。

【０２３３】

これらのポリケタール共重合体の加水分解を、３７℃で１．０（．１Ｍ ＨＣＬ）、４．５（１００ｍＭ ＡｃＯＨ）および７．４（１００ｍＭ）のｐＨ値で緩衝化された水中で測定した。簡潔に述べると、２０ｍｇの重合体試料を、５ｍＬバイアルに置き、１ｍＬの緩衝液を、各バイアルに加え、磁気攪拌棒で混合した。特定の時点において、１ｍＬの$CDCl_3$を、各バイアルに加え、激しく振とうし、$CDCl_3$相を単離し、^{1}Ｈ ＮＭＲによって分析して、ポリケタール共重合体中のケタール結合の％加水分解を決定した。

【０２３４】

結果および考察

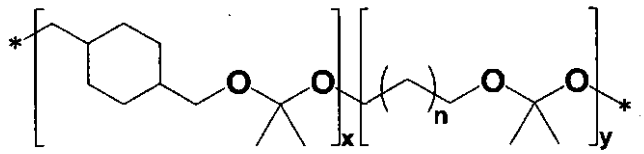
ＰＣＡＤＫに基づく６つのポリケタール共重合体ＰＫ１～ＰＫ６（表１、下記）を、アセタール交換反応を使用して合成した。ＰＣＡＤＫの共重合体を、１，４－シクロヘキサンジメタノールとブタンジオール、ペンタンジオール、ヘキサンジオールおよびオクタンジオールのいずれかとを共重合することによって合成した。これらのジオールの親水性は、それらの各々のｌｏｇＰ値（表２、下記）によって証明されるように、１，４－シクロヘキサンジメタノール（ｌｏｇＰ＝１．４６）の親水性とは異なる。図５１は、上記のポリケタールを作製するために使用したアセタール交換反応の合成スキーム、およびそれらの加水分解から生成された分解産物を示す。これら全てのポリケタール共重合体の合成は、一工程、多グラム（ｍｕｌｔｉ－ｇｒａｍ）のスケール、５０％～６０％の収率で達成した。一般的に、ＣＤＭではなくジオールの導入は、合成にいかなる複雑化も生じず、ＰＣＡＤＫの合成のために開発した手順は、共重合体の合成のために適していた。重要なことに、合成した全てのコポリケタール（ｃｏｐｏｌｙｋｅｔａｌ）は結晶性であり、した

がって、マイクロ粒子への処方の可能性を有する。

【０２３５】

【表２】

表1. 合成したポリケタール共重合体の組成および分子量



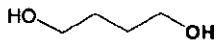
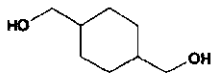
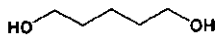
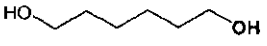
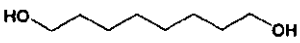
n = 2, 3, 4, および 6

重合体 ID	重合体組成		M_n	DPI
	単量体 A	単量体 B		
PK1	1,4-ｼｸﾛﾍｷｻﾝｼﾞﾒﾀﾉｰﾙ (x=98.03%)	1,5-ﾍﾟﾝﾀﾝｼﾞｵｰﾙ (y=1.93%)	2149	1.742
PK2	1,4-ｼｸﾛﾍｷｻﾝｼﾞﾒﾀﾉｰﾙ (cyclohexanedimathanol) (x=92.46%)	1,5-ﾍﾟﾝﾀﾝｼﾞｵｰﾙ (y=7.56%)	2530	1.629
PK3	1,4-ｼｸﾛﾍｷｻﾝｼﾞﾒﾀﾉｰﾙ (x=86.70%)	1,5-ﾍﾟﾝﾀﾝｼﾞｵｰﾙ (y=13.30%)	2596	1.432
PK4	1,4-ｼｸﾛﾍｷｻﾝｼﾞﾒﾀﾉｰﾙ (x=96.75%)	1,4-ﾌﾞﾀﾝｼﾞｵｰﾙ (y=3.25%)	2637	1.553
PK5	1,4-ｼｸﾛﾍｷｻﾝｼﾞﾒﾀﾉｰﾙ (x=85.32%)	1,6-ﾍｷｻﾝｼﾞｵｰﾙ (y=14.68%)	2122	1.538
PK6	1,4-ｼｸﾛﾍｷｻﾝｼﾞﾒﾀﾉｰﾙ (x=87.31%)	1,8-ｵｸﾀﾝｼﾞｵｰﾙ (y=12.69%)	2181	1.786

ＰＫ１～ＰＫ６の加水分解の速度論を、４．５および７．４のｐＨ値で測定し、ファゴソームの酸性環境中および血中でのそれらの挙動を決定した。図５２は、全てのポリケタール共重合体が、酸に触媒される加水分解を受け、それらの加水分解の速度論が、それらの疎水性と反比例（ｓｃａｌｅ　ｉｎｖｅｒｓｅｌｙ）することを実証する。ＰＫ１、ＰＫ２およびＰＫ３は、１，４－シクロヘキサンジメタノールおよび１，５－ペンタンジオールから合成された共重合体であった。それらの親水性は、１，５－ペンタンジオールと１，４－シクロヘキサンジメタノールとの間の疎水性（それらの各々のＬｏｇＰ値は、０．２７および１．４６である）の大きな差に起因して、それらの１，５－ペンタンジオール含量に比例する。図５２Ａは、１，５－ペンタンジオールが、１，４－シクロヘキサンジメタノールベースのポリケタールのｐＨ４．５での加水分解の速度論を劇的に加速することを実証する。例えば、ＰＫ１（２％ペンタンジオールを含む共重合体）のうちのほんの３０％が、ｐＨ４．５で１０日後、加水分解された。他方、同一のｐＨ条件で、ＰＫ２（７．５％ペンタンジオールを含む）は、７日後に７５％が加水分解され、ＰＫ３（１３％ペンタンジオールを含む）は、２日後に５０％が加水分解され、５日後に完全に加水分解された。３つ全てのポリケタールに関して、これらの重合体のうちの１５％未満が、実験の継続期間内にｐＨ７．４で加水分解された（図５２Ｂ）。

【０２３６】
【表３】

表2. pH4. 5およびpH7. 4、37℃でのポリケタール共重合体の加水分解半減期

PK ID	重合体組成				pH4. 5での半減期	pH7. 4での推定された半減期	ジオールBのLog P
	ジオールA	%ジオールA	ジオールB	%ジオールB			
PK4		96.75%	 1,4-ブタンジオール	3.25%	1.0 日	54 日	-0.83
PK3	 1,4-シクロヘキサンジメタノール	86.70	 1,5-ペンタンジオール	13.30%	1.8 日	39 日	0.27
PK5		85.32%	 1,6-ヘキサンジオール  1,8-オクタンジオール	14.68%	4.4 日	53 日	0.76
PK6		87.31%		12.69%	18.6 日	360 日	1.75

これが、ペンタンジオールの共重合体を超えて拡張する、より一般的な現象であるか否かを決定するために、ポリケタール共重合体ＰＫ４、ＰＫ５およびＰＫ６もまた、ペンタンジオールとは異なる疎水性を有するブタンジオール、ヘキサンジオールおよびオクタンジオールから合成し、それらの加水分解の速度論を調べた。表２は、このセットの共重合体がまた、疎水性と加水分解の速度論との間に逆の関連性を有することを実証する。例えば、ＰＫ４（１，４－シクロヘキサンジメタノールおよび１，４－ブタンジオールを使用して合成された共重合体）は、合成された全てのコポリケタールのうちでより速い加水分解の速度論を有し、かつｐＨ４．５において、１日の加水分解半減期を有し、このことは、その他のジオールと比較した、ブタンジオールの高い（ｈｉｇ）親水性に基づいて予測される。他方、１，４－シクロヘキサンジメタノールおよびより疎水性の単量体である１，８－オクタンジオールを使用して合成されたＰＫ６は、１８．６日のｐＨ４．５での加水分解半減期を有した。まとめると、これらのデータは、これらのポリケタールの加水分解の速度論が、それらの疎水性を変更することによって調整され得ることを実証し、これらのポリケタールへの水の拡散が、加水分解を支配する律速段階であることを示唆する。重要なことに、全てのポリケタール共重合体の加水分解の速度論は、ｐＨ感受性であり、一般的に、これらは、ｐＨ４．５においてｐＨ７．４よりも少なくとも１桁速く加水分解した。

【０２３７】

シクロヘキサン－ジメタノールおよびペンタンジオールからなる、合成した上記のポリケタール共重合体のうちの１つ（表１においてＰＫ３と呼ぶ）は、ｐＨ４．５において２日の加水分解半減期を有するが、ｐＨ７．４においては数週間の加水分解半減期を有する。このポリケタールは、被験体に治療薬を送達するのに有用であり得る。なぜなら、それは、ファゴサイトーシスの後、迅速に加水分解するはずであるが、生理学的なｐＨにおいては比較して安定であるからである。さらに、ＰＫ３は、その迅速な加水分解の速度論な

らびに１，５－ペンタンジオール、１，４－シクロヘキサンジメタノールおよびアセトンである生物適合性の分解産物のため、マイクロ粒子薬物送達に適切であり得る。

【０２３８】

薬物療法の送達のためにＰＫ３を使用するさらなる研究のために、マイクロ粒子を、溶媒蒸発手順を使用してＰＫ３から処方した。図５３は、マイクロ粒子がＰＫ３とともに形成され得、この粒子が、マクロファージによるファゴサイトーシスに適切である１～５ミクロンの間のサイズを有することを実証する。したがって、治療薬は、被験体への投与のために、（例えば、水／油／水二重エマルジョン手順または他の方法を使用することによって）ＰＫ３マイクロ粒子にカプセル化され得る。

【０２３９】

活性物質をロードしたマイクロ粒子は、改変された水／油／水エマルジョン方法（Ａｎｄｏら、Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（１９９９）８８，１２６－１３０）を使用して、ポリケタール共重合体から処方される。例えば、ＰＫ３（１００ｍｇ）を、１ｍＬのジクロロメタンに溶解させ、別のバイアルにおいて、４０ｍｇの活性物質を、４００μＬのＤ．Ｉ．水に溶解させる。この活性物質の水溶液を、ＰＫ３溶液と混合し、６０秒間超音波処理（Ｍｉｓｏｎｉｘ Ｉｎｃｏｒｐｏｒａｔｅｄ、Ｆａｒｍｉｇｄａｌｅ、ＮＹ）を行う。次に、超音波処理した混合物を、１５秒間液体窒素に浸漬し、１２ｍＬの５％ ｗ／ｗ ＰＶＡ溶液（ｐＨ７．４５）をこれに加える。この混合物を、Ｐｏｗｅｒｇｅｎ ５００ホモジナイザー（Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｗａｌｔｈａｍ、ＭＡ）を使用して１２０秒間均質化し、次に、４０ｍＬの１％ ｗ／ｗ ＰＶＡ（ｐＨ７．４５）を含むビーカーに移す。その後、この溶液を、磁気攪拌棒を使用して３時間攪拌し、有機溶媒を蒸発させる。この粒子を、１０，０００ｒｍｐで１５分間遠心分離することによって単離し、１５ｍＬのＰＢＳ緩衝液で２回洗浄し、凍結乾燥させる。

【０２４０】

実施例８についての参考文献

【０２４１】

【化４】

Cordes, E. H.; Bull, H. *Chemical Reviews* **1974**, *74*, 581.

Gopferich, A. *Biomaterials* **1996**, *17*, 103.

Gopferich, A.; Tessmar, J. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54*, 911.

Kumar, N.; Langer, R. S.; Domb, A. J. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54*, 889.

実施例９：リンカーを有する粒子の形成

この実施例において、本発明のポリケタール分子を、活性物質を結合し得るリンカーを使用して改変した。具体的には、ニトリロ三酢酸（ＮＴＡ）リンカーをＰＣＡＤＫに添加した。ニッケル（Ｎｉ）でロードした場合、ＮＴＡリンカーは、ヒスチジンタグ付きタンパク質の結合を可能にした（図５４）。次に、改変したＰＣＡＤＫは、活性物質（例えば、増殖因子）の迅速な送達に理想的なマイクロスフェアを形成した（図５５）。

【０２４２】

材料および方法

ＮＴＡリンカーを含むＰＣＡＤＫ粒子の合成

ＰＣＡＤＫは、上記に記載されるように以前に合成されている（Ｌｅｅ Ｓら、Ｐｏｌｙｋｅｔａｌ ｍｉｃｒｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ：ａ ｎｅｗ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｖｅｈｉｃｌｅ ｆｏｒ ｓｕｐｅｒｏｘｉｄｅ ｄｉｓｍｕｔａｓｅ．Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇ Ｃｈｅｍ．（２００７）Ｊａｎ～Ｆｅｂ；１８（１）：４～７、ならびにＨｅｆｆｅｍａｎ ＭＪおよびＭｕｒｔｈｙ Ｎ．Ｐｏｌｙｋｅｔａｌｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ

：ａ　ｎｅｗ　ｐＨ－ｓｅｎｓｉｔｉｖｅ　ｂｉｏｄｅｇｒａｄａｂｌｅ　ｄｒｕｇ　ｄｅｌｉｖｅｒｙ　ｖｅｈｉｃｌｅ．　Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇ　Ｃｈｅｍ．（２００５）Ｎｏｖ－Ｄｅｃ；１６（６）：１３４０－２（これらは、参考として本明細書に援用される）もまた参照のこと）。

【０２４３】

ポリケタールの合成後、９０ｍｇのＰＣＡＤＫを、ＤＯＧＳ－ＮＴＡ（ＡｖａｎｔｉＰｏｌａｒ　Ｌｉｐｉｄｓ）の１ｍＬの１０ｍｇ／ｍＬジクロロメタン溶液（１０％　ＤＯＧＳ－ＮＴＡの最終濃度）に溶解させた。溶解度を確実にするために、この混合物を、水浴のソニケーター内で数秒間／数分間、超音波処理した。次に、この重合体溶液を、５ｍＬのＰＶＡ（２％）を含むバイアルに注ぎ、６０秒間均質化した。生じた溶液を、４～６時間、４０ｍＬの０．５％　ＰＶＡで攪拌した。次に、粒子を遠心分離し、脱イオン水で数回洗浄し、凍結乾燥のために液体窒素中で凍結させた。生じた凍結乾燥粒子を、ＳＥＭを使用して画像化し、図５６に示す。

【０２４４】

ＰＣＡＤＫ－ＮＴＡのニッケルローディング

Ｈｉｓ－タグ付きタンパク質に結合し得る粒子を得るために、粒子にニッケルをロードする必要があった。したがって、粒子を、１０ｍｇ／ｍＬの５０ｍＭ　$NiCl_2$とともにインキュベートし、室温で２時間攪拌した。ニッケルの取り込みを決定するために、本発明者らは、粒子を$NiCl_2$とともに一晩インキュベートし、そして粒子を遠心分離し、上清内の未結合のニッケルを分光光度的に測定した。図５７のデータが実証するように、種々のＮＴＡローディングにおいて、溶液中の遊離のニッケルが減少し、粒子にニッケルがロードしたことを示した。

【０２４５】

ＰＣＡＤＫ－ＮｉＮＴＡへのＨｉｓ－タグ付きタンパク質の結合

粒子上のＮｉＮＴＡがＨｉｓ－タグ付きタンパク質を結合し得るか否かを決定するために、種々の濃度のＨｉｓ－ＧＦＰを、４℃で一晩、ＰＣＡＤＫ－ＮｉＮＴＡ（１％溶液ｗ／ｖ）とともにインキュベートした。粒子を遠心分離し、ＰＢＳで数回洗浄し、その後、分析のために再懸濁した。図５８は、表示のためにグレースケールに変換した、ＧＦＰについての代表的な蛍光染色である。画像が示すように、これらの粒子は、その表面にＧＦＰを保持した。結合したＨｉｓ－ＧＦＰの量をさらに定量化するために、粒子に、増加量のＨｉｓ－ＧＦＰをロードし、数回洗浄し、結合のレベルを決定するためにこれらの粒子に対してＥＬＩＳＡを実行した。図５９のデータ（１％　ＮＴＡ）および図６０のデータ（１０％　ＮＴＡ）が示すように、ＰＣＡＤＫ－ＮｉＮＴＡは、用量依存的にＨｉｓ－タグ付きタンパク質を結合した。１％　ＮＴＡにおいて、これらの粒子は、６０ｎｇ　Ｈｉｓ－ＧＦＰのローディングで結合が飽和し、一方、１０％　ＮＴＡでは、１２０ｎｇ　Ｈｉｓ－ＧＦＰのローディングで飽和に達した。線形範囲の大半の点において、結合は、おおよそ５０％有効（ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ）であった。図６２のデータは、Ｈｉｓ－ＧＦＰのパーセント結合が、ＮＴＡの量とともに増大する（ｅｎｃｒｅａｓｅ）ことを示す。図２８は、ＮＴＡへのＨｉｓ－ＧＦＰ結合が少なくとも１５時間安定であることを示す。

【０２４６】

結合が可逆的であるか否かを決定するために、種々のＮＴＡ濃度のＨｉｓ－ＧＦＰをロードした粒子を、イミダゾール（２００ｍＭ）（Ｎｉ－ＮＴＡ複合体の競合因子）とともにインキュベートした。種々の時点で上清を収集し、ＧＦＰの蛍光についてアッセイした。図６１のデータが実証するように、Ｈｉｓ－ＧＦＰが、粒子からやや迅速に放出され、大半のタンパク質は、３０分で放出された。このことは、タンパク質が粒子に不可逆的に結合しているのではなく、良好なバイオアベイラビリティを有するはずであることを示唆する。

【図１】

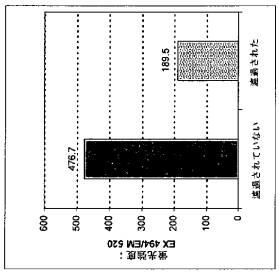


FIG. 1

【図２】

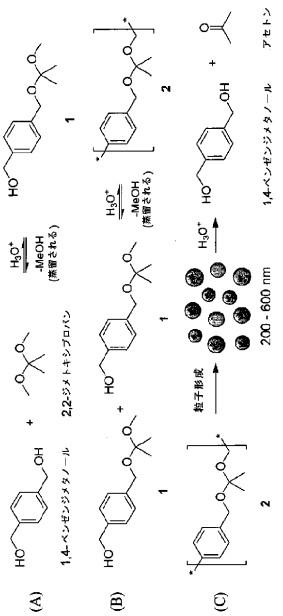


FIG. 2

【図３】

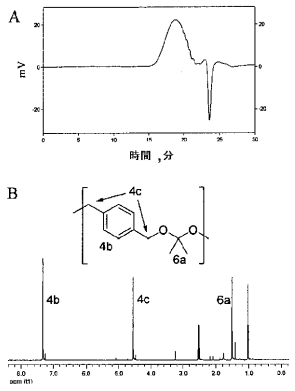


FIG. 3

【図４】

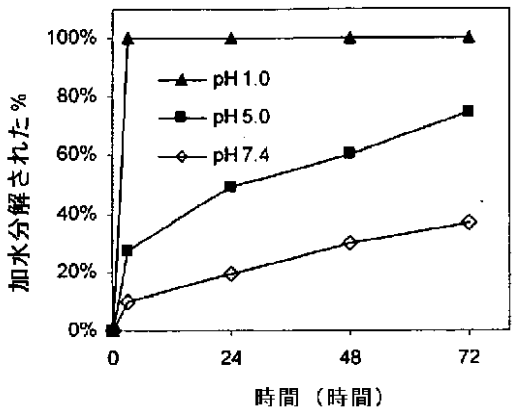
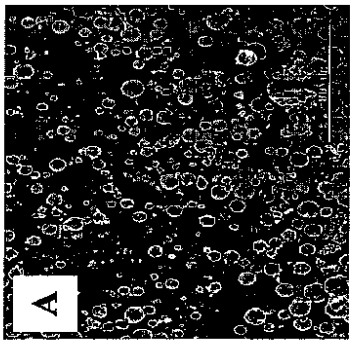
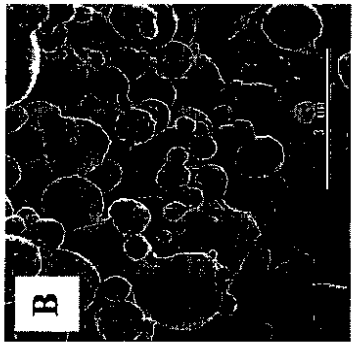


FIG. 4

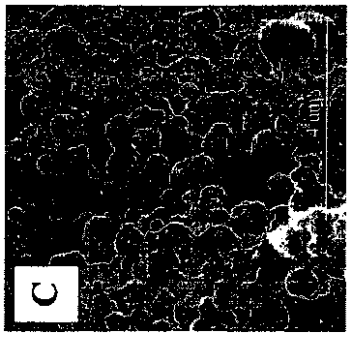
【図５Ａ】



【図５Ｂ】



【図５Ｃ】



【図６】

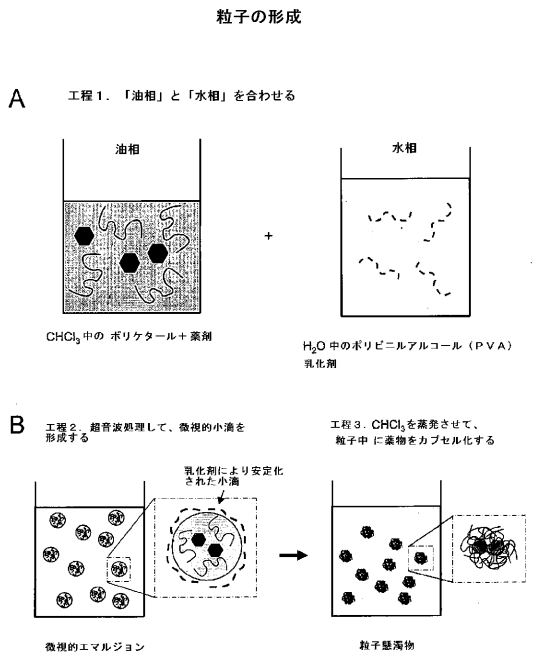


FIG. 6

【図７】

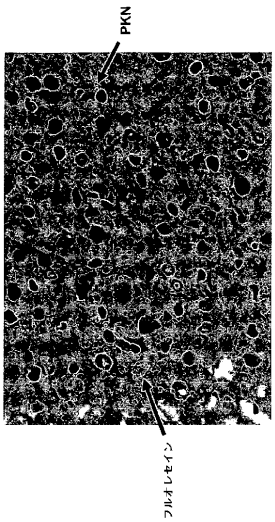


FIG. 7

【図８】

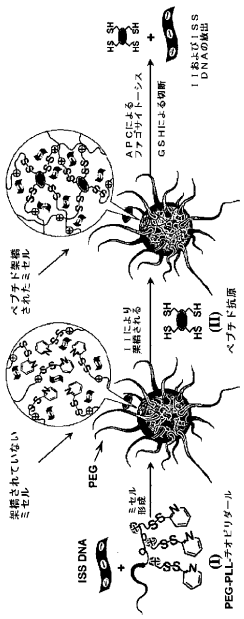
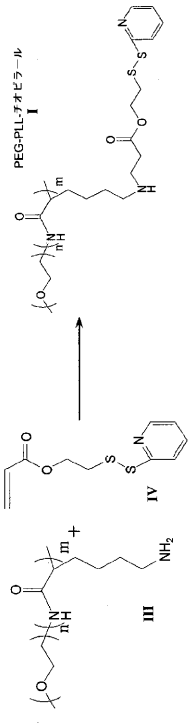


FIG. 8

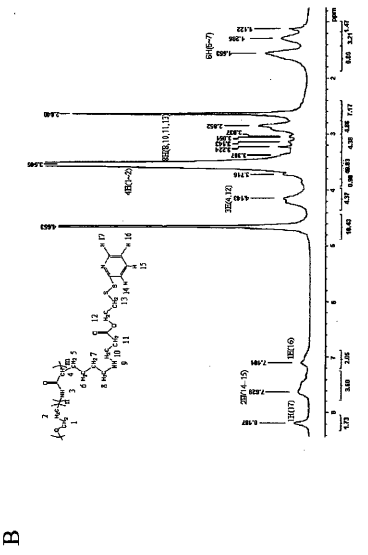
【図９－１】



A

FIG. 9

【図９－２】

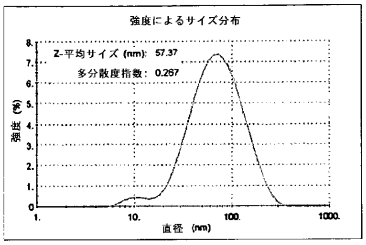


B

FIG. 9 continued

【図９－３】

C



D

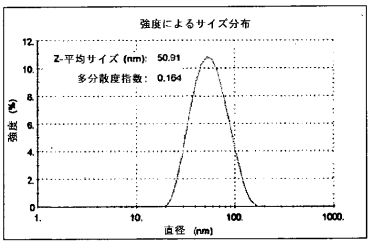
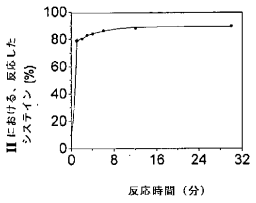


FIG. 9 続き

【図９－４】

E



F

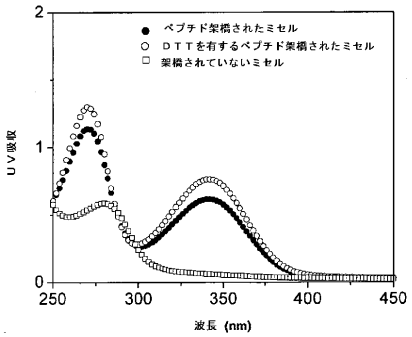
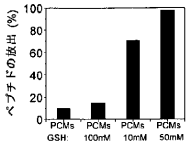


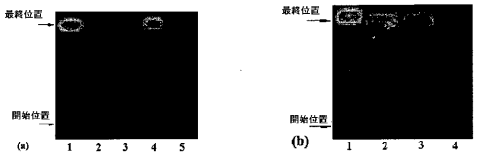
FIG. 9 続き

【図１０】

A



B



(a): レーン 1: DNA 単独；
レーン 2:DNA, 共重合体 (II);
レーン 3: DNA, II, ペプチド；
レーン 4: DNA, II, PVS:
レーン 5: DNA, II, ペプチド , PVS.

(b):レーン1: DNA 単独；
レーン 2: DNA, II, ペプチド, PVS, グルタチオン (10mM);
レーン 3: DNA, II, ペプチド, PVS, グルタチオン (15mM);
レーン 4: DNA, II, ペプチド PVS.

C

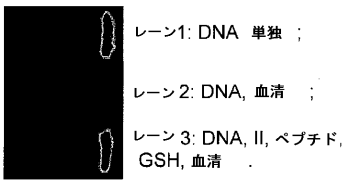
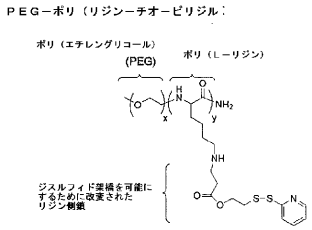


FIG. 10

【図１１－１】

A



B

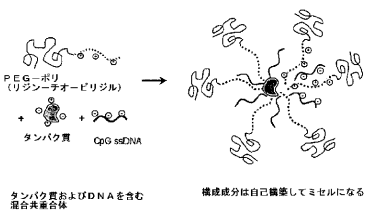
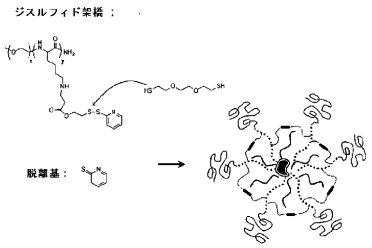


FIG. 11

【図１１－２】

C



D

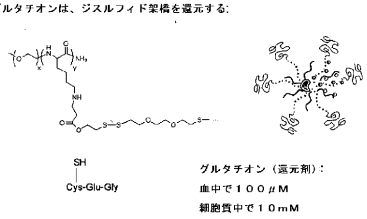


FIG. 11 続き

【図１２Ａ】

A

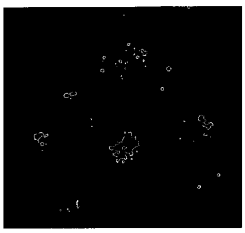


FIG. 12

【図１２Ｂ】

B

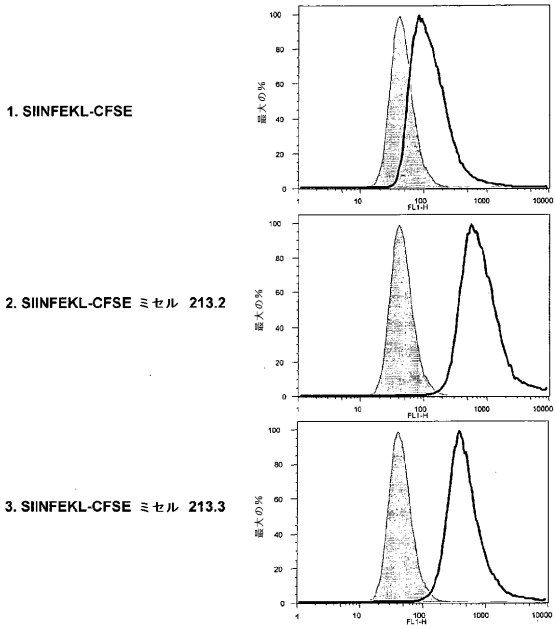


FIG. 12 続き

【図１２Ｃ】

C

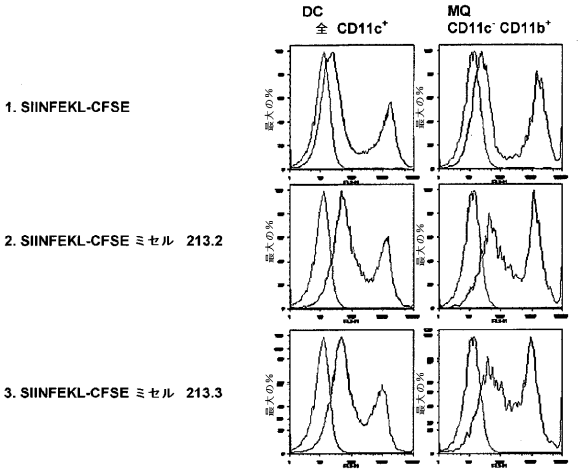


FIG. 12 続き

【図１３】

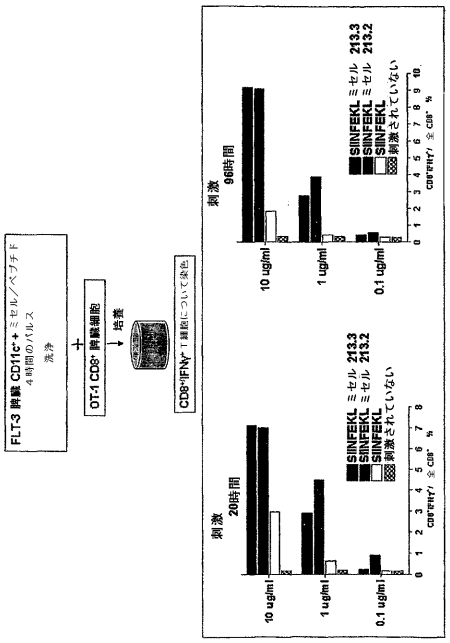


FIG. 13

【図１４Ａ】

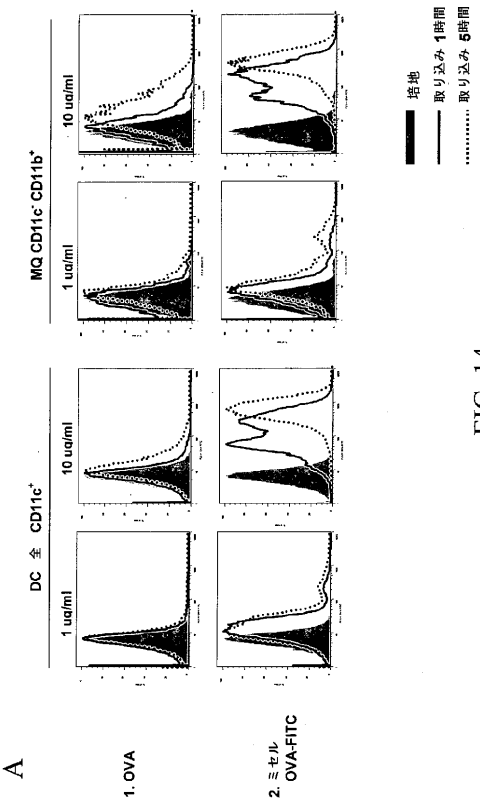


FIG. 14

【図１４Ｂ】

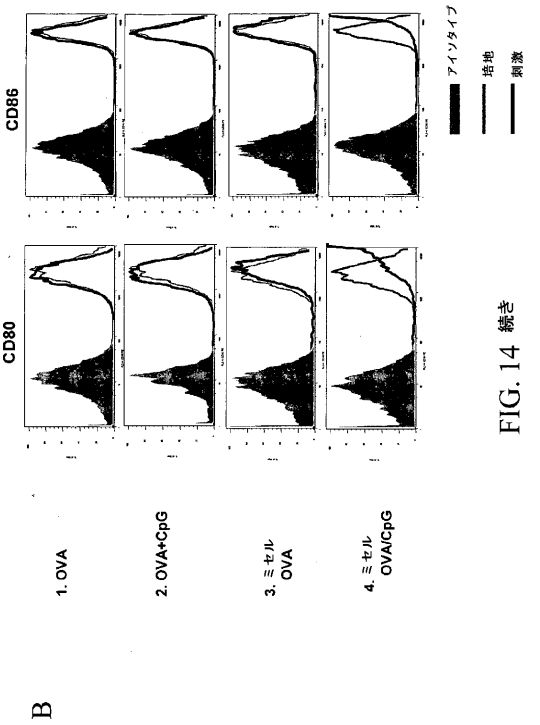


FIG. 14 続き

【図１５】

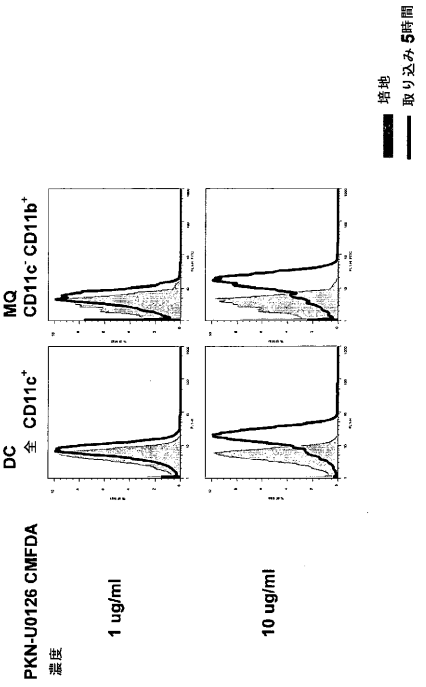


FIG. 15

【図１６】

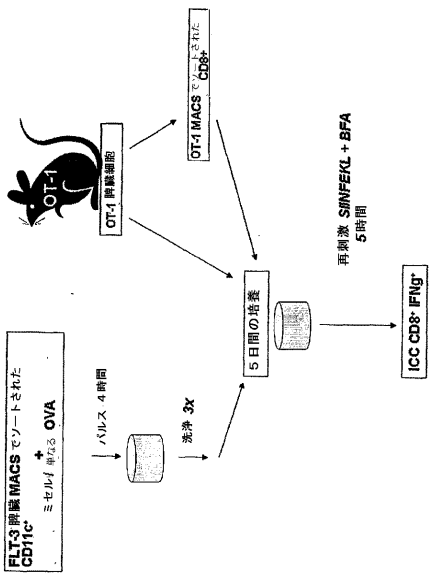
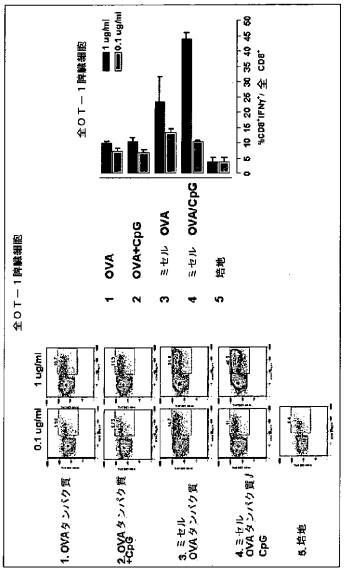


FIG. 16

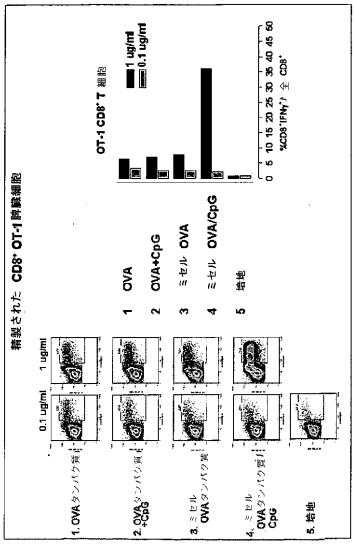
【図１７Ａ】



A

FIG. 17

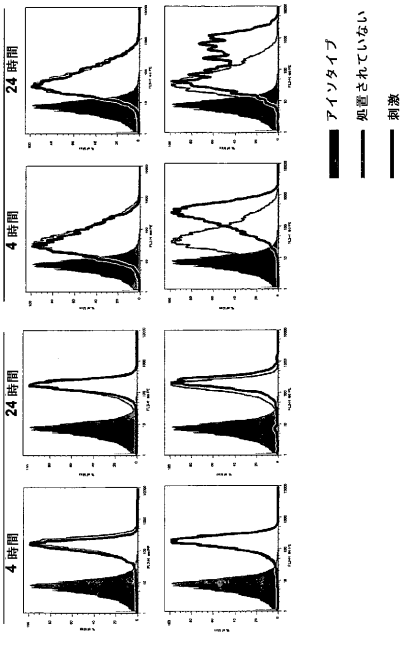
【図１７Ｂ】



B

FIG. 17 続き

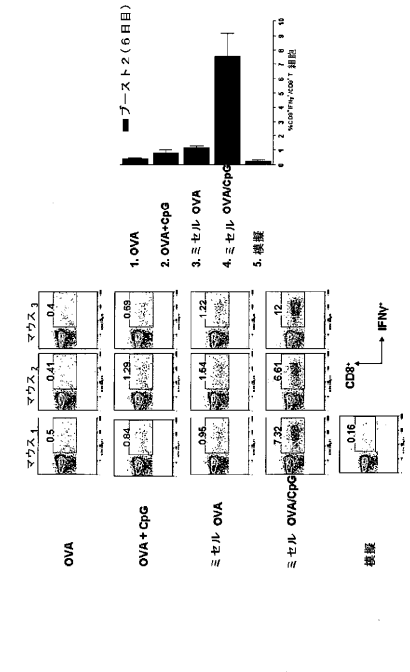
【図１７Ｃ】



C

FIG. 17 続き

【図１８Ａ】



A

FIG. 18

【図１８Ｂ】

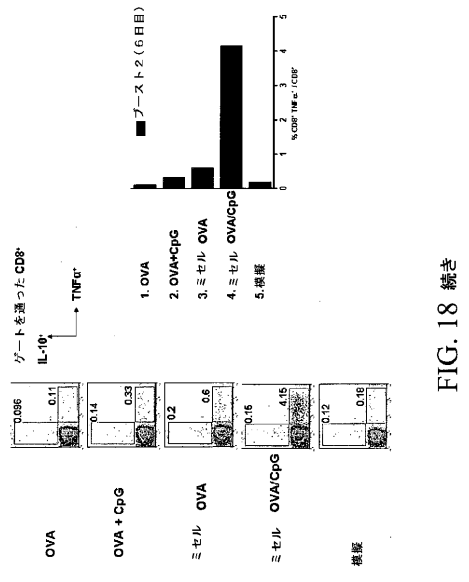


FIG. 18 続き

【図１８Ｃ】

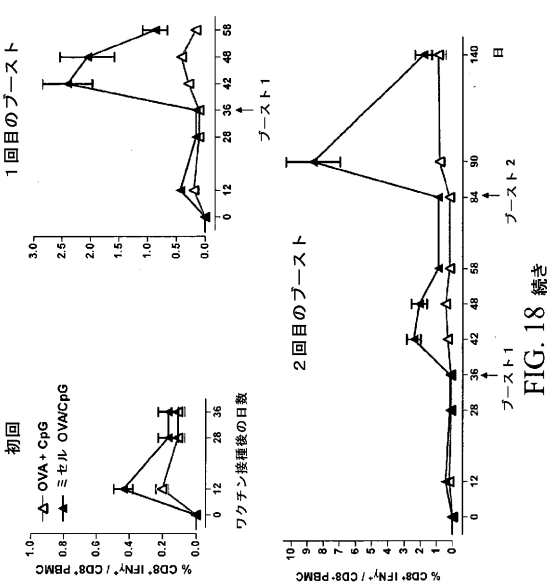


FIG. 18 続き

【図１８Ｄ】

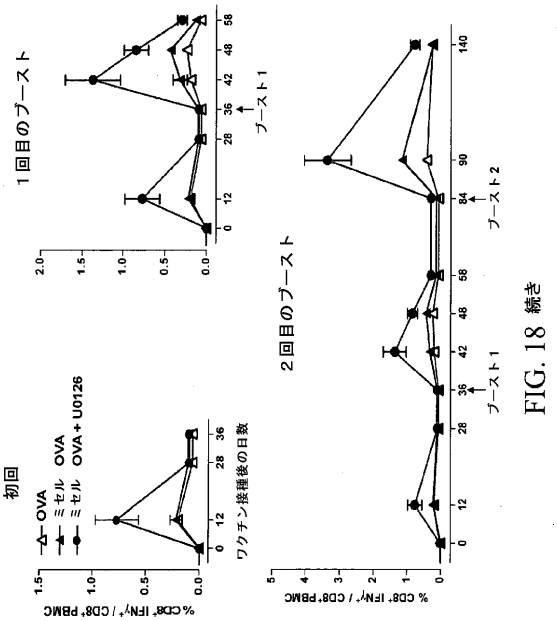


FIG. 18 続き

【図１８Ｅ】

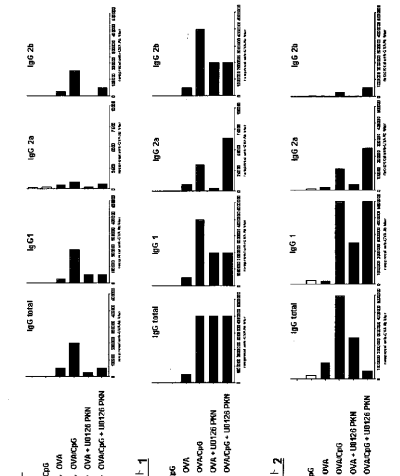
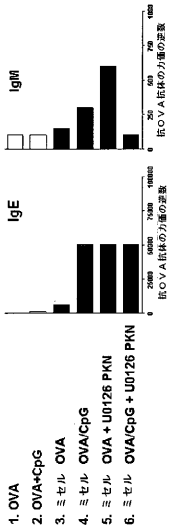


FIG. 18 続き

【図１８Ｆ】



F

FIG. 18 続き

【図１９】

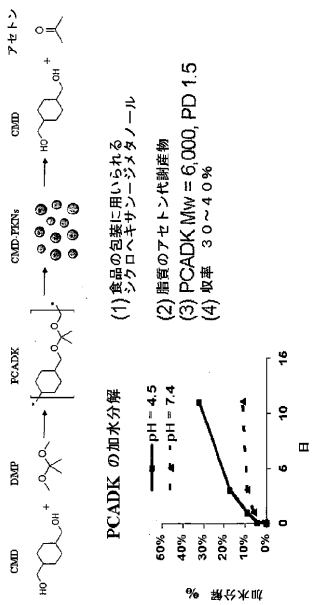


FIG. 19

【図２０】

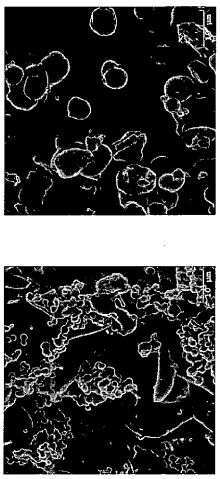


FIG. 20

【図２１】

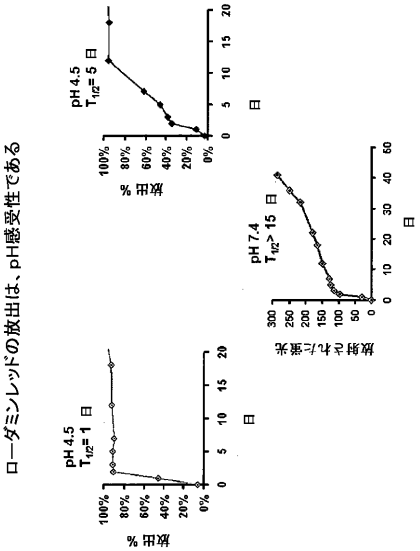


FIG. 21

【図２２】

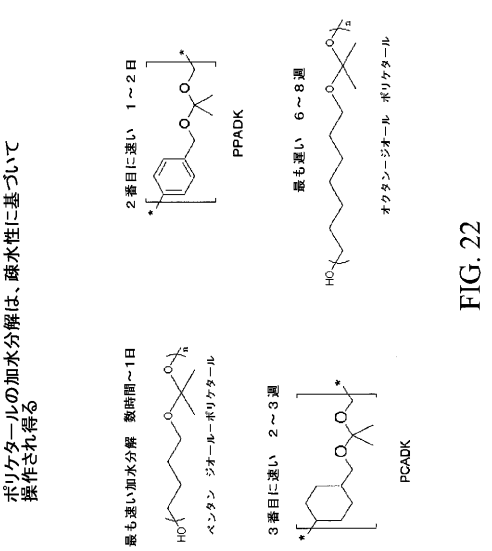


FIG. 22

【図２３】

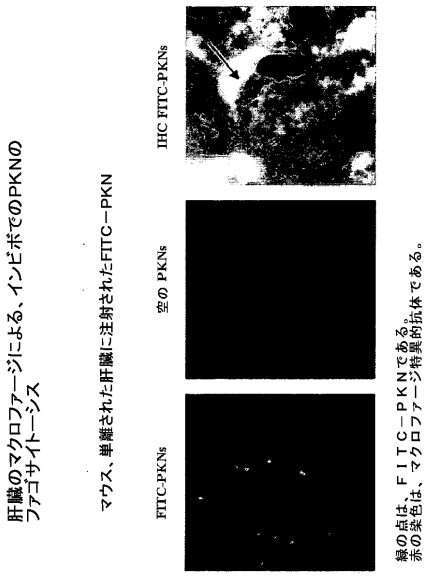


FIG. 23

【図２４Ａ】

A

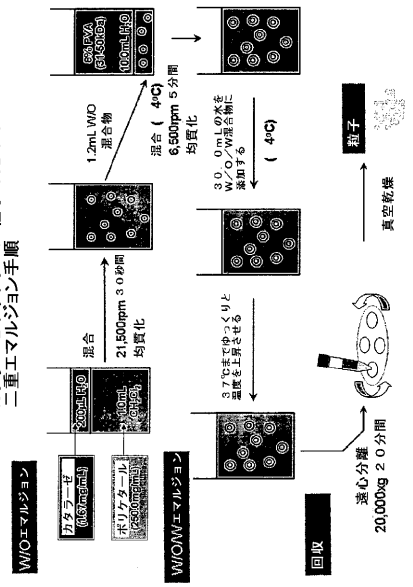


FIG. 24

【図２４Ｂ】

B

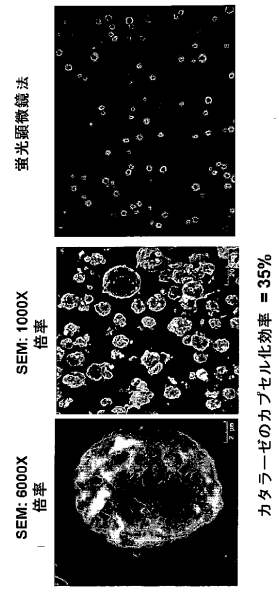


FIG. 24 続き

【図２４Ｃ】

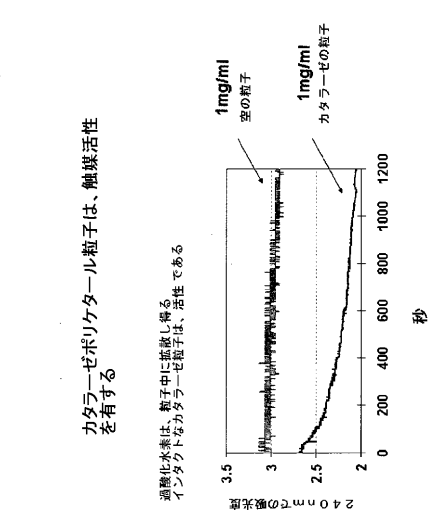


FIG. 24 続き

C

【図２５】

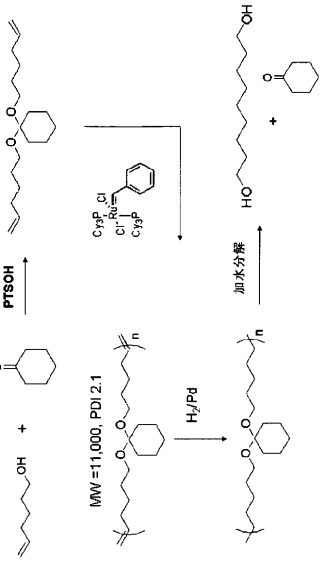


FIG. 25

【図２６】

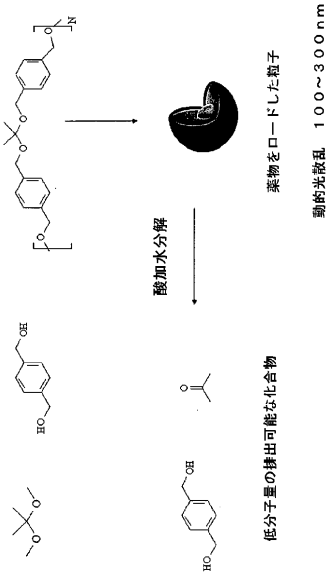


FIG. 26

【図２７】

PCADK を使用して形成されたナノ粒子
（超音波処理を使用）

- 溶媒蒸発により形成されるナノ粒子（単一エマルジョン）

バッチ	重合体 (mg)	PVA (mg)	CH_2Cl_2 (ul)	緩衝液 (ml)	有効直径 (nm)
1	20	10	500	5	361.3
2	40	10	500	5	367.8
3	10	10	500	5	307.8
4	20	5	500	5	457.5
5	20	20	500	5	307.4
6	20	10	250	5	331.2
7	20	10	1000	5	378.2

- 結論：形成される粒子は、２００～３００ｎｍの範囲内である。

FIG. 27

【図２８】

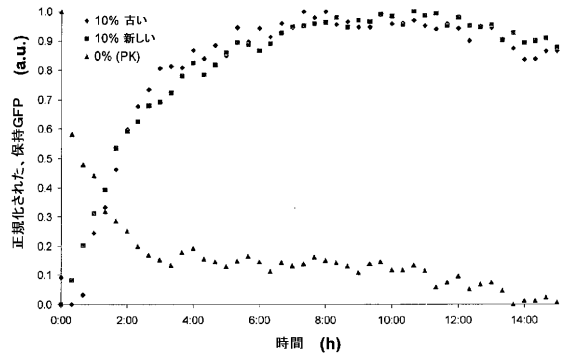
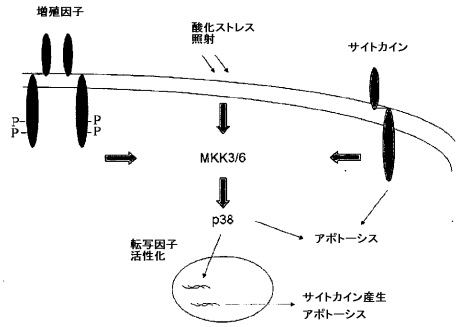


FIG. 28

【図２９】

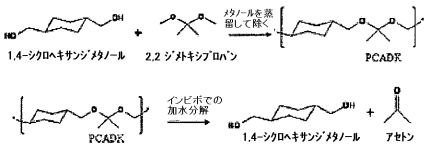
FIG. 29



p38活性化の供給源および下流の影響を示す概略図

【図３０】

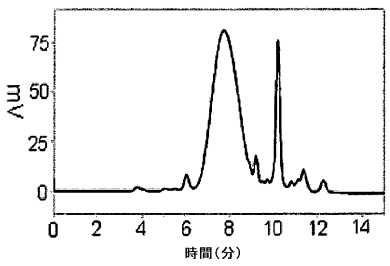
FIG. 30



ポリ(1，4－シクロヘキサン－アセトン　ジメチレン　ケタール)(PCADK)の合成。PCADKは、反応物として1，4－シクロヘキサンジメタノールおよび2，2　ジメトキシプロパンを用いるアセタール交換反応を使用して合成される。PCADKは、1，4－シクロヘキサンジメタノールおよびアセトンに加水分解する

【図３１】

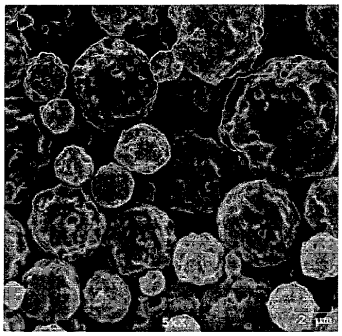
FIG. 31



THF中のPCADKのGPCトレース。Y－軸は、262nmでの相対UV吸光度を示す。Mw＝6，282、多分散性指数(PDI)＝1．54

【図３２】

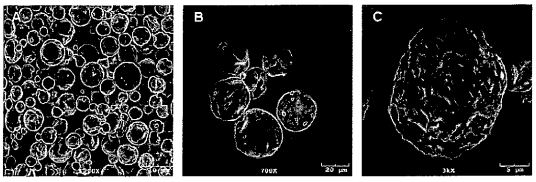
FIG. 32



SB239063をロードした粒子(PK－p38$_i$)の代表的なSEM画像。これらの画像は、およそ3～15μmの粒径を反射する

【図３３】

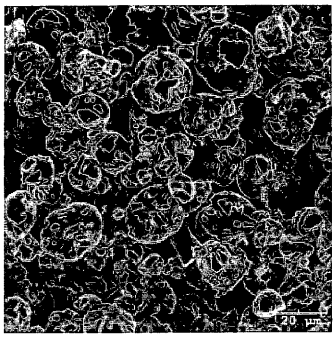
FIG. 33



粒径は容易に改変され得る。A)元のプロトコールで生成された粒子のSEM。B)低減された均質化速度から生成された粒子の、より高倍率のSEM。C)低減されたPVA濃度から生成された粒子の高倍率画像

【図３４】

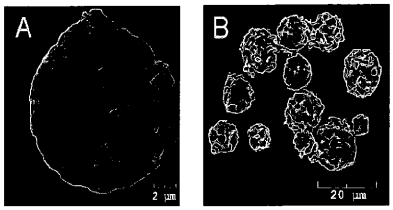
FIG. 34



代替的な多孔質粒子の代表的なSEM画像。最初の分散物へのN－ヘキサンの添加は、多孔質粒子の形成をもたらした。これらの粒子のおおよそのサイズは、10～25μmである。

【図３５】

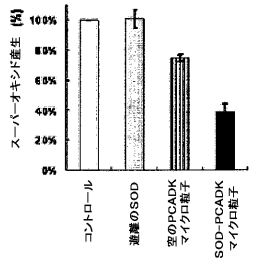
FIG. 35



SOD－PKNのSEM画像
(A) 6000X の倍率
(B) 1000X の倍率

【図３６】

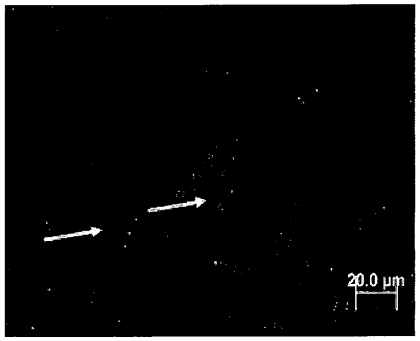
FIG. 36



PK－SODで事前に処理し、LPSで刺激した、培養されたマクロファージからの群分けしたデータ。SODをロードしたポリケタールでのマクロファージの前処理は、空のPKおよび遊離SODと比較して、LPSに刺激されたスーパーオキシド放出において有意な低下をもたらした

【図３７】

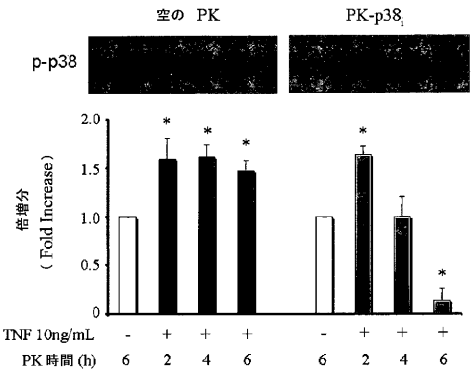
FIG. 37



培養したマクロファージとともにインキュベートした、FITCをロードしたポリケタールの代表的な蛍光画像。マクロファージを、PK－FITCとともに2時間インキュベートし、その後、徹底的な洗浄およびイメージングを行った。矢印は、FITC色素を取り込んだ細胞を示す。空の粒子がマクロファージの表面に結合していることも見受けられ得る

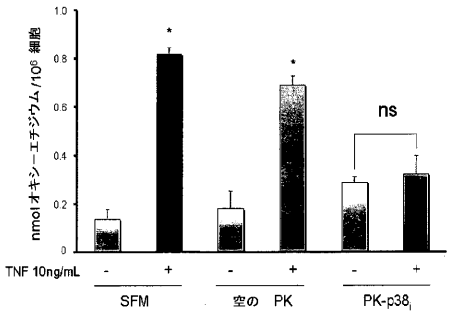
【図３８】

FIG. 38



【図３９】

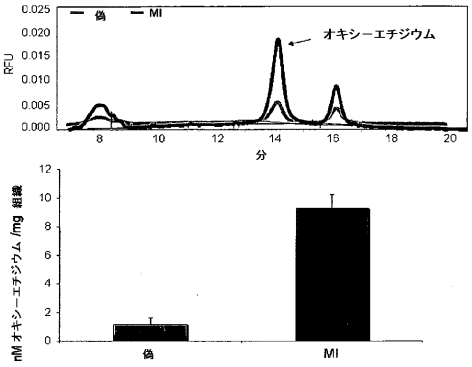
FIG. 39



6時間ポリケタールで事前に処理し、20分間10ng／mL TNF－αおよび20分間ジヒドロエチジウムで刺激したマクロファージからの群分けしたデータ。TNF－a処理による細胞外スーパーオキシド放出の有意な増大を示すHPLCデータ。　この増大は、空のPKによって妨害されなかったが、PK－p38i前処理によって完全に阻害された（＊p＜0．05 Tukey－Kramerに従ったANOVA）

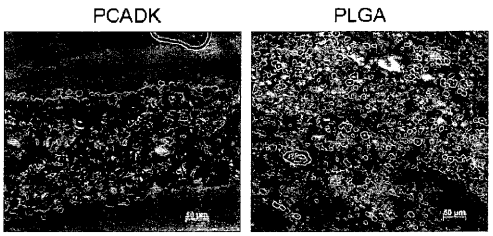
【図４０】

FIG. 40



【図４１】

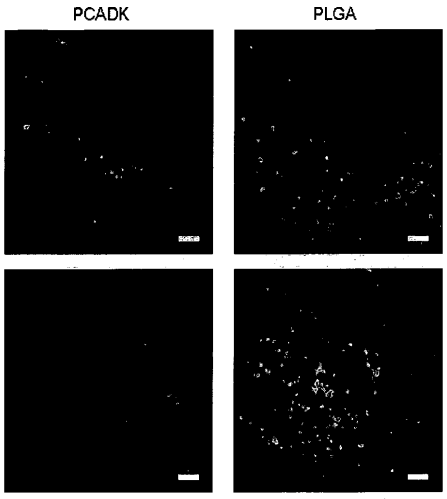
FIG. 41



梗塞後3日の脚の筋肉の代表的なH＆E染色。左のパネルにおいて、注射されたPCADKは、境界外のわずかな細胞の染色をともなう、画定された注射領域を形成する。対照的に、PLGA（右）は、線維症および炎症性細胞の集団の証拠を示す。

【図４２】

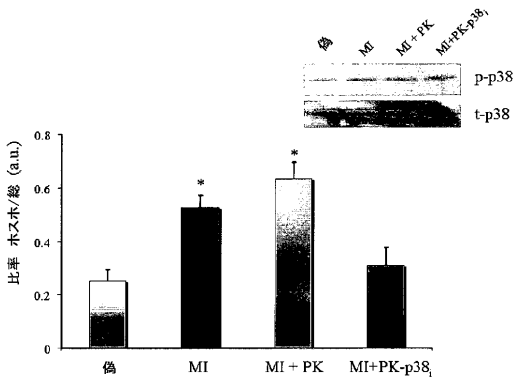
FIG. 42



青色 = DAPI; 緑色 = α-CD45; スケール = 20μm

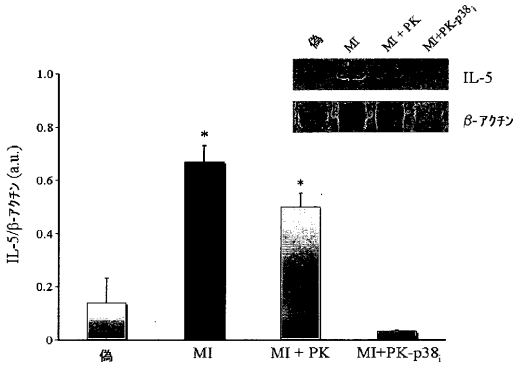
【図４３】

FIG. 43



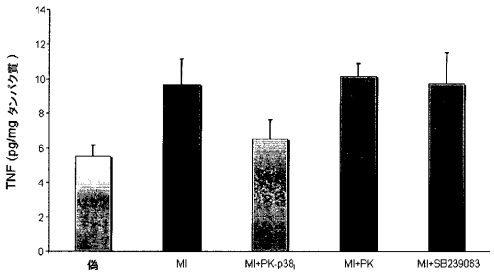
【図４４】

FIG. 44



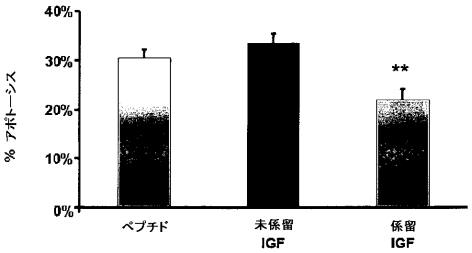
【図４５】

FIG. 45



【図４６】

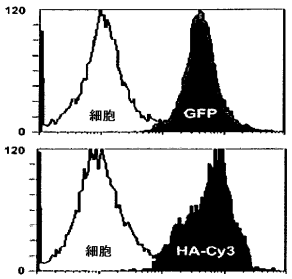
FIG. 46



移植された細胞の死滅が持続した増殖因子の処置によって逆転した。新生仔心筋細胞を、注射前に緑色膜色素で染色し、それから、注射から14日後に開裂カスパーゼ－3について染色した。データは、群当りn＞4動物からの平均＋SEMである（＊＊ペプチドのみまたは未係留IGFに対してp＜0．01）

【図４７】

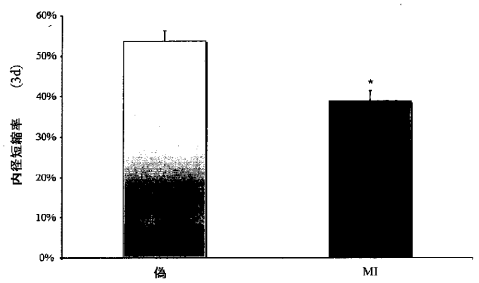
FIG. 47



GFPおよびHAアデノウイルスを使用する細胞の追跡。単離直後に、細胞を、100MOIのGFPまたは血球凝集素アデノウイルスとともに懸濁物中で2時間インキュベートした。細胞を24時間平板培養し、フローサイトメトリーを実行した

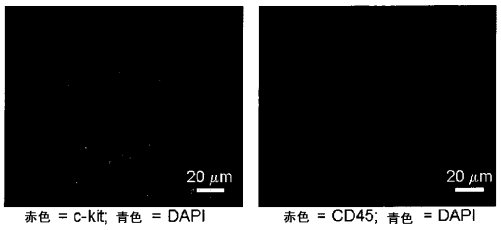
【図４８】

FIG. 48



【図４９】

FIG. 49



心臓の幹細胞の単離。細胞を、記載されるように単離し、4%パラホルムアルデヒド中で固定し、示されるマーカー(maker)に対する抗体、次に蛍光二次抗体で染色した。

【図５０】

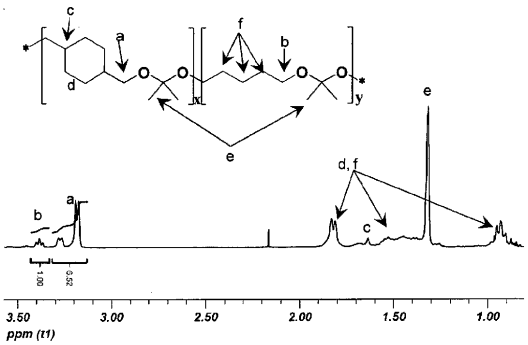


Figure 50. PK3 の H-NMR スペクトル

【図５１】

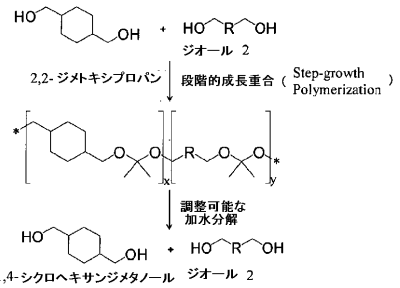


Figure 51 1，4－シクロヘキサンジメタノール（第二のジオール）および2，2－ジメトキシプロパンからのポリケタール共重合体の合成

【図５２】

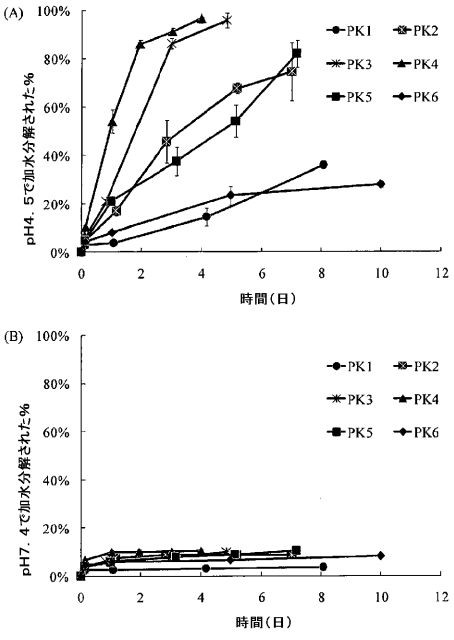


Figure 52. ポリケタールの加水分解の速度論が共重合体化によって調整され得る。(A)pH4．5の緩衝液中でのポリケタール共重合体PK1～PK6の加水分解プロフィール、および(B)pH7．4の緩衝液中でのPK1～PK6の加水分解プロフィール。

【図５３】

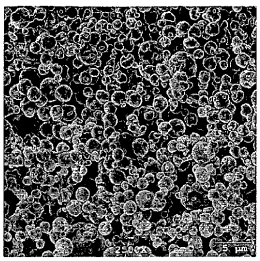


Figure 53. PK3で処方した粒子のSEM画像。二重エマルジョン手順によって処方された空の粒子のSEM画像

【図５４】

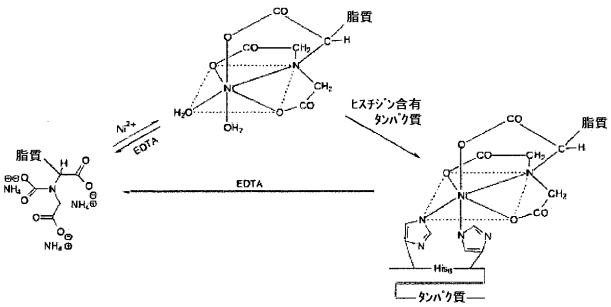


Figure 54

【図５６】

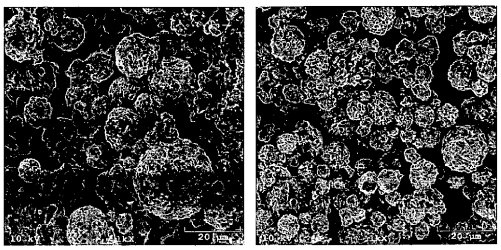


Figure 56. 10% NTA PCADKマイクロ粒子のSEM顕微鏡写真

【図５７】

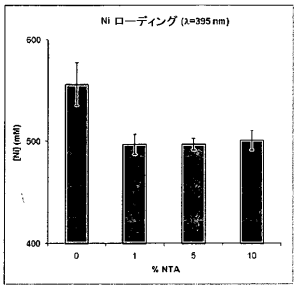


Figure 57. ローディング溶液中でのNiの枯渇についての分光光度測定
種々の濃度のNTA－リガンド（0%、1%、5%、10%）を含むPCADK粒子を、$NiCl_2$溶液にロードした。撹拌しながら一晩、粒子をインキュベートした後で、溶液を遠心分離し、上清を、Ni含量について分光光度的に分析した。NTA－リガンドを含まない粒子の上清は、約550mMの濃度のニッケルを有したが、1%、5%および10% NTA粒子は、それらの上清に約500mM Niを有した。このデータは、粒子の表面が1% NTA－リガンド含有物で飽和されていることを示唆する。原子吸光分光を使用するさらなる定量的な試験が、現在進行中である

【図５８】

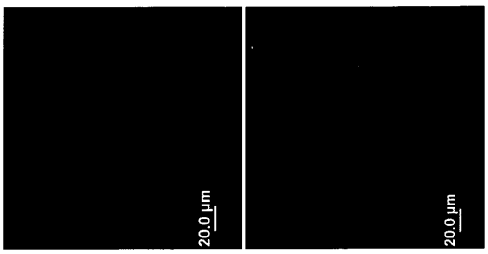


Figure 58.
His－タグ付き緑色蛍光タンパク質（GFP）がNi依存的である。10% NTA粒子をNiで満たし、徹底的に洗浄し、次にHis－タグ付きGFPの100nM溶液中でインキュベートした。粒子をPBSで徹底的に洗浄し、蛍光顕微鏡法を使用して画像化した。（a）PCADK－NTA粒子を、$NiCl_2$の代わりにPBSでロードした。GFP由来の非常に微かな蛍光が見られる。（b）$NiCl_2$をロードしたPCADK－NTA粒子は、GFPとのかなりの関連性を示す。

【図５９】

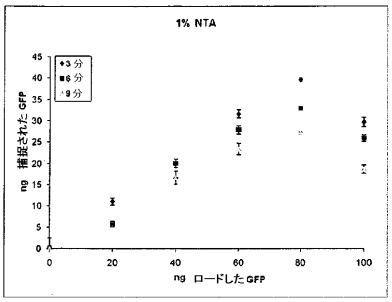


Figure 59.
1% NTA－PCADK粒子（粒子上のELISA）についての特異的結合曲線。1% NTA－PCADK粒子をNiで満たし、種々の濃度のHis－タグ付きGFPをロードした。GFPローディングの後の徹底的な洗浄の後、ホースラディシュペルオキシダーゼ（HRP）結合体化GFP抗体（α－GFP Ab）を、粒子（1：5000希釈物のα－GFP Abおよび1%ヤギ血清を含むPBS－T 1mlあたり、1mg粒子で懸濁した粒子）とともに2時間室温でインキュベートした。次に、粒子を3容量のPBS－Tで洗浄した。HRP活性の比色測定を、1ウェルあたり種々の量の粒子を使用してプレートリーダー上で行った。1－step Slow TMB－ELISA基質（3, 3', 5, 5'－テトラメチルベンジデン、Pierce）を基質として使用し、吸光度を370nmで測定した。3分、6分および9分からの読み取り値を比較し、上記に示す。特異的結合曲線は、60ng GFP／mg粒子でロードした場合、1% NTA粒子がGFPで飽和することを示唆する。

【図６０】

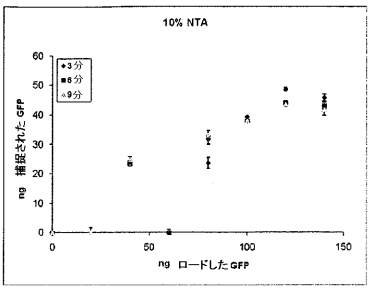


Figure 60.
10% NTA－PCADK粒子（粒子上のELISA）についての特異的結合曲線。10% NTA－PCADK粒子を、Niで満たし、種々の濃度のHis－タグ付きGFPをロードした。GFPローディングの後の徹底的な洗浄の後、ホースラディシュペルオキシダーゼ（HRP）結合体化GFP抗体（α－GFP Ab）を、粒子（1：5000希釈物のα－GFP Abおよび1%ヤギ血清を含むPBS－T 1mlあたり、1mg粒子で懸濁した粒子）とともに2時間室温でインキュベートした。次に、粒子を3容量のPBS－Tで洗浄した。HRP活性の比色測定を、1ウェルあたり種々の量の粒子を使用してプレートリーダー上で行った。1－step Slow TMB－ELISA基質（3, 3', 5, 5'－テトラメチルベンジデン、Pierce）を基質として使用し、吸光度を370nmで測定した。3分、6分および9分からの読み取り値を比較し、上記に示す。特異的結合曲線は、120ng GFP／mg粒子でロードした場合、10% NTA粒子がGFPで飽和することを示唆する

【図６２】

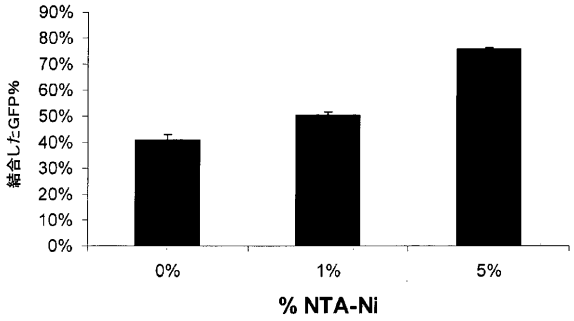
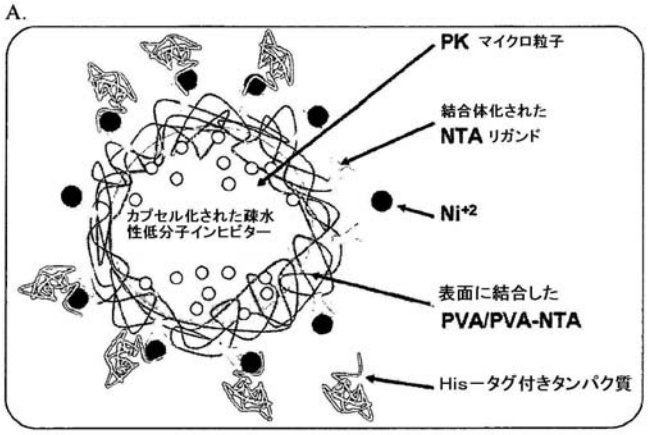


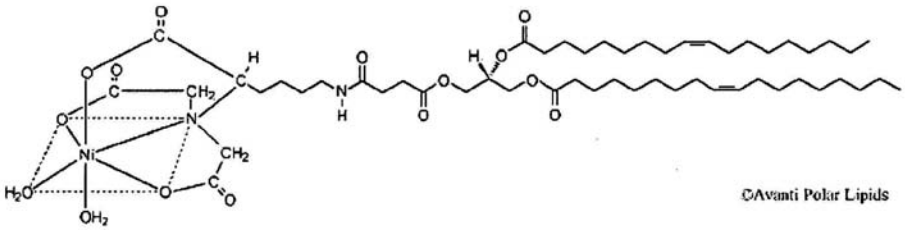
Figure 62

【図５５】

A.



B.



1,2-ジオレイル -sn- グリセロ -3-{[N(5- アミノ -1- カルボキシペンチル)イミノ二酢酸]スクシニル}

Figure 55.

【図６１】

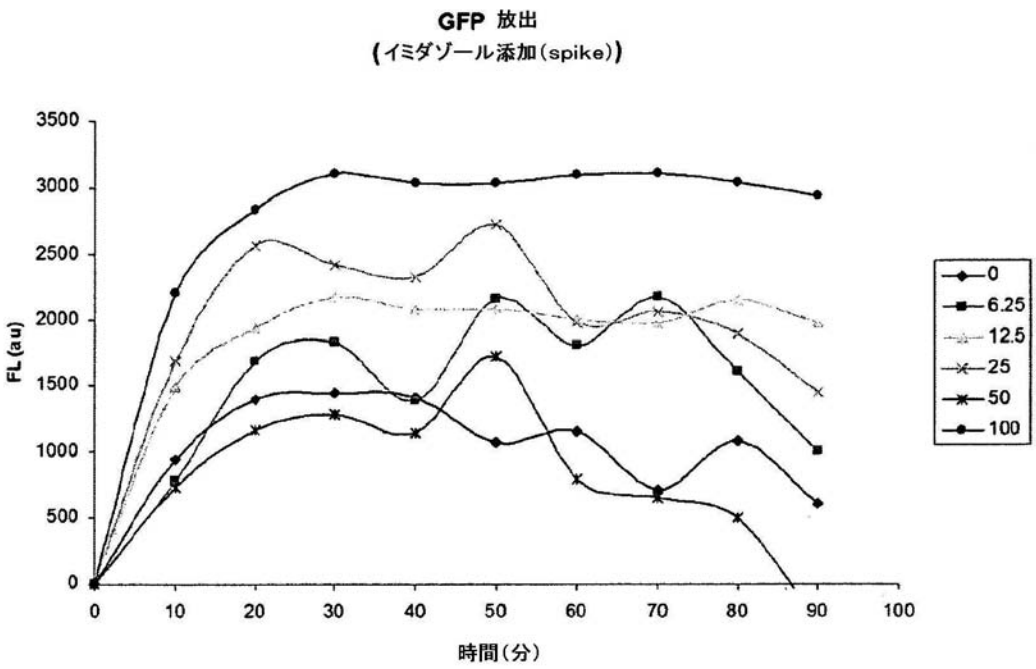


Figure 61.
GFP結合は可逆的である。GFPをロードした粒子を、イミダゾール(200mM最終濃度)(NTA－Ni複合体への競合的結合リガンド)の添加(spike)に供し、上清の蛍光強度を、時間の関数として測定した。データは、GFPが、200mMイミダゾールの存在下、30分で最も解離することを示唆する。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/003422

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K47/48 C08G4/00 A61K9/16

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 practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2006/122223 A (UNIV EMORY [US]; GEORGIA TECH RES INST [US]; UNIV ROCHESTER MEDICAL CT) 16 November 2006 (2006-11-16) abstract claims 1-61 examples 1-6	1-14, 24-44 15
Y	WO 2005/023294 A (GEN HOSPITAL CORP [US]; PAPISOV MIKHAIL I [US]; YURKOVETSKIY ALEXANDER) 17 March 2005 (2005-03-17) paragraphs [0083] - [0085] claims 25,29	15

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

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
22 July 2008	04/08/2008

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Vázquez Lantes, M

Form PCT/ISA/210 (secondsheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2008/003422

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 26-35 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the composition.Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the International application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search reportcovers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2008/003422

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006122223 A	16-11-2006	AU 2006243960 A1	16-11-2006
		CA 2608086 A1	16-11-2006
		EP 1893661 A2	05-03-2008
WO 2005023294 A	17-03-2005	AU 2004270251 A1	17-03-2005
		CA 2537993 A1	17-03-2005
		EP 1667726 A2	14-06-2006
		JP 2007504253 T	01-03-2007

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

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
C07K 14/705	*(2006.01)*	C07K 14/705		4J005
C07K 16/00	*(2006.01)*	C07K 16/00		4J200
A61K 9/14	*(2006.01)*	A61K 9/14		
A61K 45/00	*(2006.01)*	A61K 45/00		
A61K 48/00	*(2006.01)*	A61K 48/00		
A61K 31/7088	*(2006.01)*	A61K 31/7088		
A61P 3/10	*(2006.01)*	A61P 3/10		
A61P 11/06	*(2006.01)*	A61P 11/06		
A61P 11/08	*(2006.01)*	A61P 11/08		
A61P 17/00	*(2006.01)*	A61P 17/00		
A61P 17/06	*(2006.01)*	A61P 17/06		
A61P 31/04	*(2006.01)*	A61P 31/04		
A61P 31/12	*(2006.01)*	A61P 31/12		
A61P 31/18	*(2006.01)*	A61P 31/18		
A61P 31/00	*(2006.01)*	A61P 31/00		
A61P 31/16	*(2006.01)*	A61P 31/16		
A61P 33/06	*(2006.01)*	A61P 33/06		
A61P 35/00	*(2006.01)*	A61P 35/00		
A61P 37/02	*(2006.01)*	A61P 37/02		
A61P 37/06	*(2006.01)*	A61P 37/06		
A61P 37/08	*(2006.01)*	A61P 37/08		
A61P 39/06	*(2006.01)*	A61P 39/06		
A61P 29/00	*(2006.01)*	A61P 29/00	101	
A61P 43/00	*(2006.01)*	A61P 43/00	111	
C08G 65/34	*(2006.01)*	C08G 65/34		
C08L 101/16	*(2006.01)*	C08L 101/16		

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

(72)発明者 マーシー, ニーレン
アメリカ合衆国 ジョージア 30308, アトランタ, ウエスト ピーチツリー ストリート 855, アパートメント 1628
(72)発明者 デイビス, マイケル
アメリカ合衆国 ジョージア 30345, アトランタ, フィッシャー トレイル 1920
(72)発明者 パレンドラン, バリー
アメリカ合衆国 ジョージア 30322, アルファレッタ, ブルック フォード ポイント 335
(72)発明者 ヤング, スティーブン シー.
アメリカ合衆国 ジョージア 30126, マーブルトン, インディアン ウッド サークル 6076

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA21 BA31 BA41 BA63 CA01 CA11 DA02 GA11 HA01 HA17

4C076 AA16 AA29 AA95 CC07 CC13 CC21 CC27 CC31 EE23 EE26
EE47 EE49H EE49M EE49N EE49Q FF21 FF29 FF34 FF66 GG08
GG16 GG37
4C084 AA03 AA13 AA17 BA35 MA05 MA23 MA43 MA66 NA05 NA13
ZA591 ZA891 ZB071 ZB081 ZB131 ZB151 ZB261 ZB331 ZB351 ZC022
ZC202 ZC351 ZC372 ZC412 ZC422
4C086 AA01 EA16 MA02 MA05 MA07 MA21 MA43 MA66 NA05 NA13
ZA59 ZA89 ZB07 ZB08 ZB13 ZB15 ZB26 ZB33 ZB35 ZC35
4H045 AA10 AA30 BA50 CA40 DA01 DA50 DA76 EA20 EA50 FA50
4J005 AA21 BA00 BB02
4J200 AA02 AA04 AA26 AA28 BA00 BA07 BA21 BA31 DA22 EA11