

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7676331号
(P7676331)

(45)発行日 令和7年5月14日(2025.5.14)

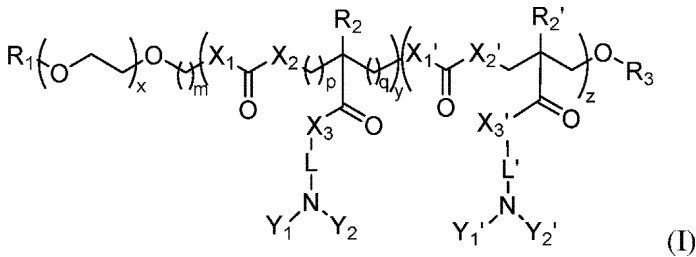
(24)登録日 令和7年5月2日(2025.5.2)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 8 G	64/42 (2006.01)	C 0 8 G	64/42
A 6 1 K	9/107(2006.01)	A 6 1 K	9/107
A 6 1 K	31/7084(2006.01)	A 6 1 K	31/7084
A 6 1 K	38/20 (2006.01)	A 6 1 K	38/20
A 6 1 K	38/21 (2006.01)	A 6 1 K	38/21
請求項の数 15 (全55頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2021-576271(P2021-576271)	(73)特許権者	508152917
(86)(22)出願日	令和2年6月22日(2020.6.22)		ザ ボード オブ リージェンツ オブ ザ
(65)公表番号	特表2022-536993(P2022-536993		ユニバーシティー オブ テキサス シス
	A)		テム
(43)公表日	令和4年8月22日(2022.8.22)		THE BOARD OF REGENTS
(86)国際出願番号	PCT/US2020/038915		OF THE UNIVERSITY OF
(87)国際公開番号	WO2020/263733		TEXAS SYSTEM
(87)国際公開日	令和2年12月30日(2020.12.30)		アメリカ合衆国 7 8 7 0 1 テキサス,
審査請求日	令和5年6月21日(2023.6.21)		オースティン, ウェスト 7 番 ストリ
(31)優先権主張番号	62/865,187		ート 2 1 0
(32)優先日	令和1年6月22日(2019.6.22)	(74)代理人	100102978
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 清水 初志
		(74)代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		(74)代理人	100119507
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 生分解性超 pH 感受性ポリマー

(57)【特許請求の範囲】
【請求項 1】

式：



10

のポリマーまたはその薬学的に許容される塩であって、
式中：

R₁は、水素、アルキル(C₈)、置換アルキル(C₈)、またはチオール反応基であり；
mは、1～8の整数であり；
pおよびqは、各々独立して、1、2、または3であり；
xは、10～200の整数であり；
yは、40～180の整数であり；
zは、0～200の整数であり；
ここで、yまたはzのいずれかのモノマーは該ポリマー中にランダムに分布しており；

20

X_1 、 X_2 、 X_1 、および X_2 は、各々独立して、Oまたは NR_a であり、ここで、
 R_a は、アルキル(C₆)または置換アルキル(C₆)であり；
 R_2 および R_2 は、各々独立して、水素、アルキル(C₈)、または置換アルキル(C₈)であり；
 R_3 は、水素、アルキル(C₈)、または置換アルキル(C₈)であり；
 X_3 および X_3 は、各々独立して、Oまたは NR_b であり、ここで、
 R_b は、水素、アルキル(C₆)、または置換アルキル(C₆)であり；
 L および L は、各々独立して、以下の式の基であり：

$$-X_4-S(O)_n-X_5-$$

式中：

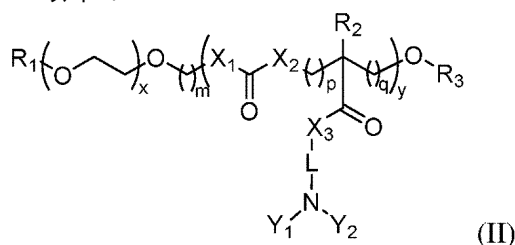
n は、0、1、または2であり；かつ

X_4 および X_5 は、各々独立して、アルカンジイル(C₈)または置換アルカンジイル(C₈)であり；かつ

Y_1 、 Y_2 、 Y_1 、および Y_2 は、各々独立して、アルキル(C₁₂)、置換アルキル(C₁₂)、アルケニル(C₁₂)、もしくは置換アルケニル(C₁₂)であり；または、 Y_1 および Y_2 もしくは Y_1 および Y_2 は、一緒になり、かつ、アルカンジイル(C₁₂)、アルケンジイル(C₁₂)、またはいずれかの基の置換型である、ポリマー。

【請求項 2】

以下：



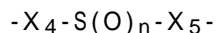
またはその薬学的に許容される塩としてさらに定義され、
 ここで：

R_1 は、水素、アルキル(C₈)、置換アルキル(C₈)、またはチオール反応基であり；
 m は、1～8の整数であり；
 p および q は、各々独立して、1、2、または3であり；
 x は、10～200の整数であり；
 y は、40～180の整数であり；

X_1 および X_2 は、各々、Oまたは NR_a であり、ここで、

R_a は、水素、アルキル(C₆)、または置換アルキル(C₆)であり；
 R_2 は、水素、アルキル(C₈)、または置換アルキル(C₈)であり；
 R_3 は、水素、アルキル(C₈)、または置換アルキル(C₈)であり；
 X_3 は、Oまたは NR_b であり、ここで、

R_b は、水素、アルキル(C₆)、または置換アルキル(C₆)であり；
 L は、以下の式の基であり：



式中：

n は、0、1、または2であり；かつ

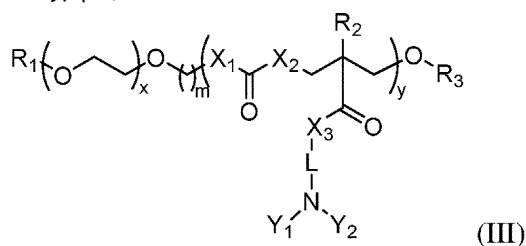
X_4 および X_5 は、各々独立して、アルカンジイル(C₈)または置換アルカンジイル(C₈)であり；かつ

Y_1 および Y_2 は、各々独立して、アルキル(C₁₂)、置換アルキル(C₁₂)、アルケニル(C₁₂)、もしくは置換アルケニル(C₁₂)であり；または、 Y_1 および Y_2 は、一緒になり、かつ、アルカンジイル(C₁₂)、アルケンジイル(C₁₂)、もしくはいずれかの基の置換型で

ある、
請求項1記載のポリマー。

【請求項3】

以下：



10

またはその薬学的に許容される塩としてさらに定義され、
ここで：

R_1 は、水素、アルキル(C₈)、置換アルキル(C₈)、またはチオール反応基であり；

m は、1～8の整数であり；

x は、10～200の整数であり；

y は、40～180の整数であり；

X_1 および X_2 は、各々、Oまたは NR_a であり、ここで、

R_a は、水素、アルキル(C₆)、または置換アルキル(C₆)であり；

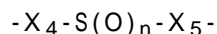
R_2 は、水素、アルキル(C₈)、または置換アルキル(C₈)であり；

R_3 は、水素、アルキル(C₈)、または置換アルキル(C₈)であり；

X_3 は、Oまたは NR_b であり、ここで、

R_b は、水素、アルキル(C₆)、または置換アルキル(C₆)であり；

L は、以下の式の基であり：



式中：

n は、0、1、または2であり；かつ

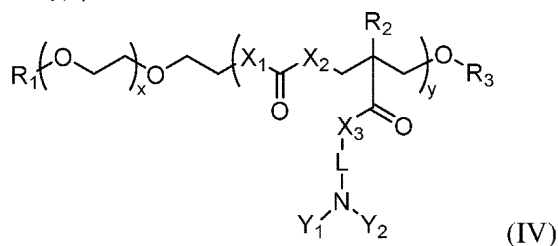
X_4 および X_5 は、各々独立して、アルカンジイル(C₈)または置換アルカンジイル(C₈)であり；かつ

Y_1 および Y_2 は、各々独立して、アルキル(C₁₂)、置換アルキル(C₁₂)、アルケニル(C₁₂)、もしくは置換アルケニル(C₁₂)であり；または、 Y_1 および Y_2 は、一緒になり、かつ、アルカンジイル(C₁₂)、アルケンジイル(C₁₂)、もしくはいずれかの基の置換型である、

請求項1または請求項2記載のポリマー。

【請求項4】

以下：



40

またはその薬学的に許容される塩としてさらに定義され、
ここで：

R_1 は、水素、アルキル(C₈)、置換アルキル(C₈)、またはチオール反応基であり；

x は、10～200の整数であり；

y は、40～180の整数であり；

50

X_1 および X_2 は、各々、Oまたは NR_a であり、ここで、

R_a は、水素、アルキル(C_6)、または置換アルキル(C_6)であり；

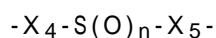
R_2 は、水素、アルキル(C_8)、または置換アルキル(C_8)であり；

R_3 は、水素、アルキル(C_8)、または置換アルキル(C_8)であり；

X_3 は、Oまたは NR_b であり、ここで、

R_b は、水素、アルキル(C_6)、または置換アルキル(C_6)であり；

Lは、以下の式の基であり：



式中：

n は、0、1、または2であり；かつ

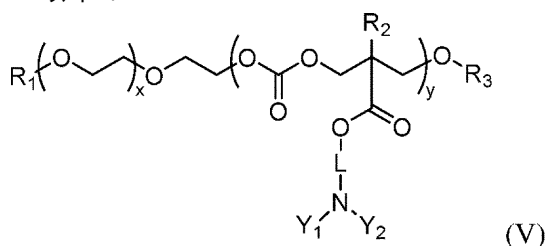
X_4 および X_5 は、各々独立して、アルカンジイル(C_8)または置換アルカンジイル(C_8)であり；かつ

Y_1 および Y_2 は、各々独立して、アルキル(C_{12})、置換アルキル(C_{12})、アルケニル(C_{12})、もしくは置換アルケニル(C_{12})であり；または、 Y_1 および Y_2 は、一緒になり、かつ、アルカンジイル(C_{12})、アルケンジイル(C_{12})、もしくはいずれかの基の置換型である、

請求項1～3のいずれか一項記載のポリマー。

【請求項5】

以下：



またはその薬学的に許容される塩としてさらに定義され、

ここで：

R_1 は、水素、アルキル(C_8)、置換アルキル(C_8)、またはチオール反応基であり；

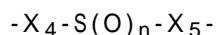
x は、10～200の整数であり；

y は、40～180の整数であり；

R_2 は、水素、アルキル(C_8)、または置換アルキル(C_8)であり；

R_3 は、水素、アルキル(C_8)、または置換アルキル(C_8)であり；

Lは、以下の式の基であり：



式中：

n は、0、1、または2であり；かつ

X_4 および X_5 は、各々独立して、アルカンジイル(C_8)または置換アルカンジイル(C_8)であり；かつ

Y_1 および Y_2 は、各々独立して、アルキル(C_{12})、置換アルキル(C_{12})、アルケニル(C_{12})、もしくは置換アルケニル(C_{12})であり；または、 Y_1 および Y_2 は、一緒になり、かつ、アルカンジイル(C_{12})、アルケンジイル(C_{12})、もしくはいずれかの基の置換型である、

請求項1～4のいずれか一項記載のポリマー。

【請求項6】

以下：

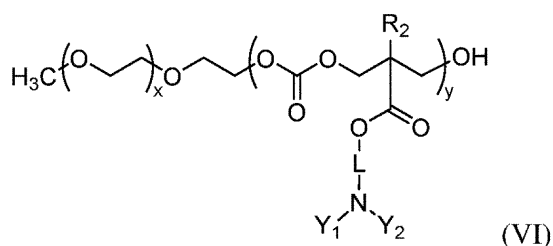
10

20

30

40

50



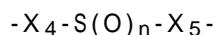
またはその薬学的に許容される塩としてさらに定義され、
ここで：

xは、10～200の整数であり；

yは、40～180の整数であり；

R₂は、水素、アルキル(C₈)、または置換アルキル(C₈)であり；

Lは、以下の式の基であり：



式中：

nは、0、1、または2であり；かつ

X₄およびX₅は、各々独立して、アルカンジイル(C₈)または置換アルカンジイル(C₈)であり；かつ

Y₁およびY₂は、各々独立して、アルキル(C₁₂)、置換アルキル(C₁₂)、アルケニル(C₁₂)、もしくは置換アルケニル(C₁₂)であり；または、Y₁およびY₂は、一緒になり、かつ、アルカンジイル(C₁₂)、アルケンジイル(C₁₂)、もしくはいずれかの基の置換型である、

請求項1～5のいずれか一項記載のポリマー。

【請求項7】

pが1である、請求項1または請求項2記載のポリマー。

【請求項8】

qが1である、請求項1、2、または7のいずれか一項記載のポリマー。

【請求項9】

mが1、2、または3である、請求項1～3、7、および8のいずれか一項記載のポリマー。

【請求項10】

mが2である、請求項9記載のポリマー。

【請求項11】

X₁、X₂、およびX₃がOである、請求項1～4および7～10のいずれか一項記載のポリマー。

【請求項12】

R₁がアルキル(C₈)または置換アルキル(C₈)である、請求項1～5および7～11のいずれか一項記載のポリマー。

【請求項13】

以下：

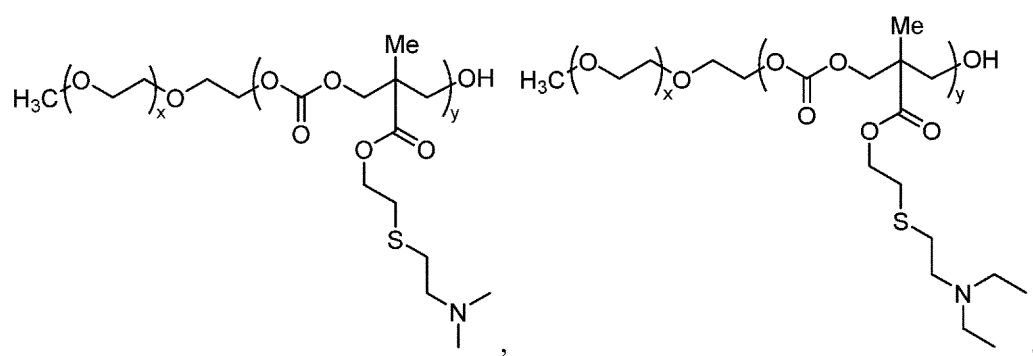
10

20

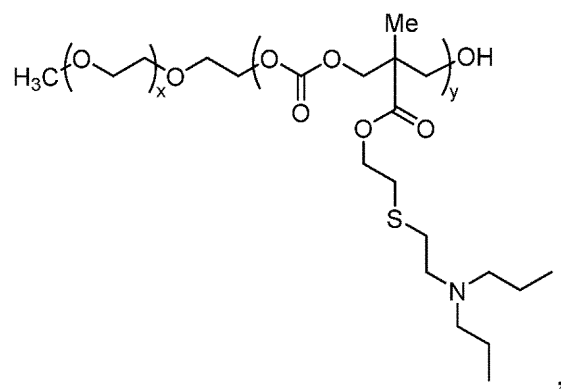
30

40

50



10

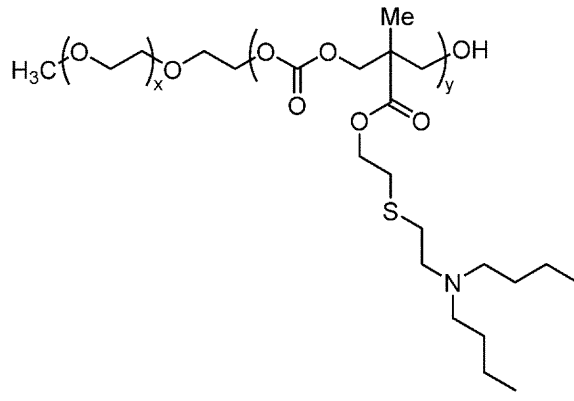


20

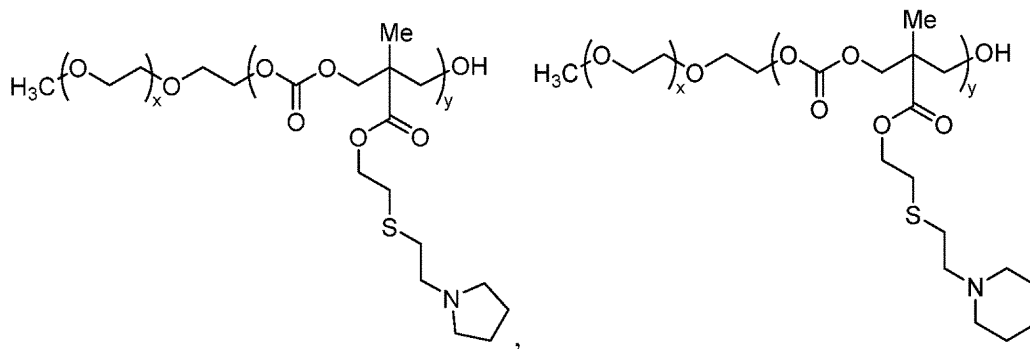
30

40

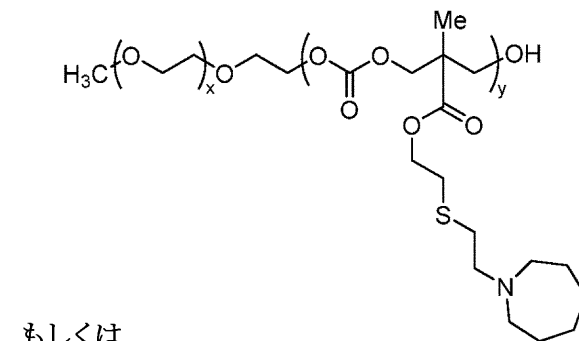
50



10



20



30

,もしくは

またはその薬学的に許容される塩としてさらに定義される、請求項1～12のいずれか一項記載のポリマー。

【請求項14】

(A)請求項1～13のいずれか一項記載のポリマー、および

(B)治療剤

を含む組成物であって、該ポリマーが該治療剤を封入している、組成物。

【請求項15】

治療有効量の請求項14記載の組成物を含む、患者の疾患または障害を処置するための薬学的組成物であって、

40

治療剤が、該疾患または障害を処置するために十分である、薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2019年6月22日付の米国仮出願第62/865,187号に対する優先権を主張し、この全内容は参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

本発明は、国立衛生研究所によって与えられた助成金番号R01 CA216839およびU01 CA218422の下で政府支援によってなされた。政府は本発明において一定の権利を有する

50

【 0 0 0 3 】

本開示は、一般に、分子および細胞生物学、薬物送達、ならびナノテクノロジーの分野に関する。より具体的には、本開示は、治療剤の送達に使用され得る分解性ポリマーに関する。

【背景技術】

【 0 0 0 4 】

2. 関連技術の説明

刺激応答性材料は、近年、広範囲の医療用途へ急速に進出した(Blum et al., 2015; Reineke, 2016; Torchilin, 2014; Yang et al., 2016)。様々なpH感受性ポリマーおよびナノ粒子が、腫瘍イメージングおよび薬物送達用途のために設計および研究された(Moitra et al., 2013; Moitra et al., 2014; Zhang et al., 2015)。多くの生物学的用途について、初期エンドソーム対後期エンドソームのような異なる成熟状態でのオルガネラpH間の差、または腫瘍微小環境pHと正常組織pHとの差は、1 pH単位未満ほどの小さなpH差を含む小さなものであり(Casey et al., 2009; Gerweck and Seetharaman, 1996)、このため、従来の低分子または高分子pHセンサーが識別するのは困難である。近年、環境pHに対してバイナリー応答を有する一連の超pH感受性(UPS)コポリマーが開発された。異なる疎水性置換基を有する第3級アミンのようなイオン化可能な残基が、ポリ(メタクリル酸メチル)(PMMA)ポリマーの骨格上へ導入された。疎水性ミセル化は鋭いpH応答(例えば、0.25 pH単位以内の蛍光オン/オフ活性化)に寄与すると理論化された。結果として生じたランジスター様ナノ粒子は、腫瘍イメージングおよび手術(Zhou et al., 2011a; Zhou et al., 2011b; Wang et al., 2013; Zhao et al., 2016)、エンドサイトーシスオルガネラおよびリソソーム異化のイメージおよび振動(Wang et al., 2015; Wang et al., 2017)、ならびにがん免疫療法のためのナノワクチン(Wang et al., 2016; Luo et al., 2017)を含む、複数の生物学的用途において改善された精度を示した。

【 0 0 0 5 】

前述したように、現在のUPSコポリマーは、非分解性PMMAポリマー骨格を用いて合成されており、これは、これらのポリマーの、体から排出される能力を妨げる。がん手術のような特定の医療用途について、イメージング剤(例えば、インドシアニンググリーン)の使用頻度(即ち、手術前の単回注入)および低毒性により、PMMAデザインはヒト使用に安全である。しかし、薬物または遺伝子送達のような反復注入が必要とされる他の用途においては、PMMAデザインは、体内における過剰な物質蓄積をもたらし、これらのUPSコポリマーの長期臨床使用の安全性を制限する可能性がある。

【 0 0 0 6 】

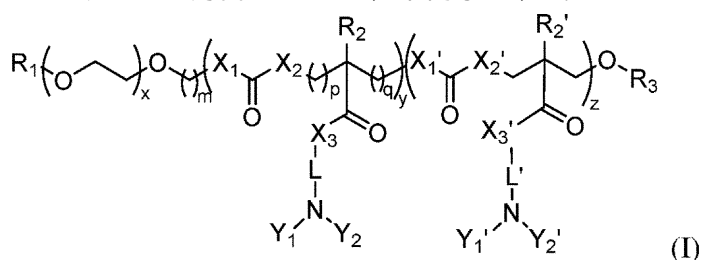
従って、インビボで分解され得る、治療剤を送達するために使用され得るポリマーシステムを開発および製造する必要性が残っている。

【発明の概要】

【 0 0 0 7 】

概要

いくつかの局面において、本開示は、式：



のポリマーまたはその薬学的に許容される塩を提供し、

式中：

n は、0、1、または2であり；かつ

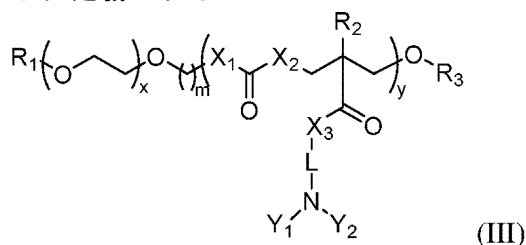
X_4 および X_5 は、各々独立して、アルカンジイル(C_8)または置換アルカンジイル(C_8)であり；かつ

Y_1 および Y_2 は、各々独立して、アルキル(C_{12})、置換アルキル(C_{12})、アルケニル(C_{12})、もしくは置換アルケニル(C_{12})であり；または、 Y_1 および Y_2 は、一緒になり、かつ、アルカンジイル(C_{12})、アルケンジイル(C_{12})、もしくはいずれかの基の置換型である。

【0009】

いくつかの態様において、ポリマーは、以下またはその薬学的に許容される塩としてさらに定義される：

10



ここで：

20

R_1 は、水素、アルキル(C_8)、置換アルキル(C_8)、またはチオール反応基であり；

m は、1～8の整数であり；

x は、10～200の整数であり；

y は、20～200の整数であり；

X_1 および X_2 は、各々、Oまたは NR_a であり、ここで、

R_a は、水素、アルキル(C_6)、または置換アルキル(C_6)であり；

R_2 は、水素、アルキル(C_8)、または置換アルキル(C_8)であり；

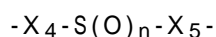
R_3 は、水素、アルキル(C_8)、または置換アルキル(C_8)であり；

X_3 は、Oまたは NR_b であり、ここで、

R_b は、水素、アルキル(C_6)、または置換アルキル(C_6)であり；

L は、以下の式の基であり：

30



式中：

n は、0、1、または2であり；かつ

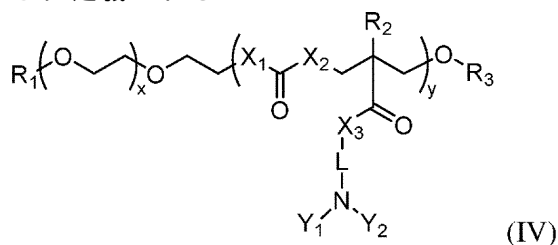
X_4 および X_5 は、各々独立して、アルカンジイル(C_8)または置換アルカンジイル(C_8)であり；かつ

Y_1 および Y_2 は、各々独立して、アルキル(C_{12})、置換アルキル(C_{12})、アルケニル(C_{12})、もしくは置換アルケニル(C_{12})であり；または、 Y_1 および Y_2 は、一緒になり、かつ、アルカンジイル(C_{12})、アルケンジイル(C_{12})、もしくはいずれかの基の置換型である。

40

【0010】

いくつかの態様において、ポリマーは、以下またはその薬学的に許容される塩としてさらに定義される：



50

ここで：

R_1 は、水素、アルキル(C_8)、置換アルキル(C_8)、またはチオール反応基であり；

x は、10～200の整数であり；

y は、20～200の整数であり；

X_1 および X_2 は、各々、Oまたは NR_a であり、ここで、

R_a は、水素、アルキル(C_6)、または置換アルキル(C_6)であり；

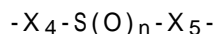
R_2 は、水素、アルキル(C_8)、または置換アルキル(C_8)であり；

R_3 は、水素、アルキル(C_8)、または置換アルキル(C_8)であり；

X_3 は、Oまたは NR_b であり、ここで、

R_b は、水素、アルキル(C_6)、または置換アルキル(C_6)であり；

L は、以下の式の基であり：



式中：

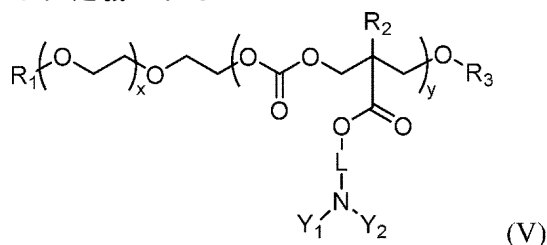
n は、0、1、または2であり；かつ

X_4 および X_5 は、各々独立して、アルカンジイル(C_8)または置換アルカンジイル(C_8)であり；かつ

Y_1 および Y_2 は、各々独立して、アルキル(C_{12})、置換アルキル(C_{12})、アルケニル(C_{12})、もしくは置換アルケニル(C_{12})であり；または、 Y_1 および Y_2 は、一緒になり、かつ、アルカンジイル(C_{12})、アルケンジイル(C_{12})、もしくはいずれかの基の置換型である。

【0011】

いくつかの態様において、ポリマーは、以下またはその薬学的に許容される塩としてさらに定義される：



ここで：

R_1 は、水素、アルキル(C_8)、置換アルキル(C_8)、またはチオール反応基であり；

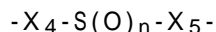
x は、10～200の整数であり；

y は、20～200の整数であり；

R_2 は、水素、アルキル(C_8)、または置換アルキル(C_8)であり；

R_3 は、水素、アルキル(C_8)、または置換アルキル(C_8)であり；

L は、以下の式の基であり：



式中：

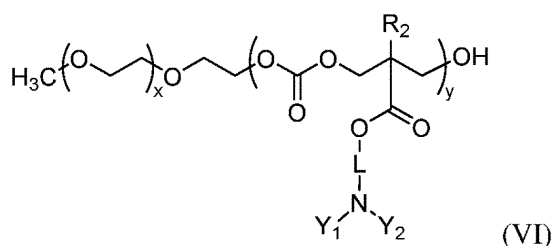
n は、0、1、または2であり；かつ

X_4 および X_5 は、各々独立して、アルカンジイル(C_8)または置換アルカンジイル(C_8)であり；かつ

Y_1 および Y_2 は、各々独立して、アルキル(C_{12})、置換アルキル(C_{12})、アルケニル(C_{12})、もしくは置換アルケニル(C_{12})であり；または、 Y_1 および Y_2 は、一緒になり、かつ、アルカンジイル(C_{12})、アルケンジイル(C_{12})、もしくはいずれかの基の置換型である。

【0012】

いくつかの態様において、ポリマーは、以下またはその薬学的に許容される塩としてさらに定義される：



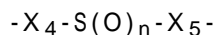
ここで：

xは、10～200の整数であり；

yは、20～200の整数であり；

R₂は、水素、アルキル(C₈)、または置換アルキル(C₈)であり；

Lは、以下の式の基であり：



式中：

nは、0、1、または2であり；かつ

X₄およびX₅は、各々独立して、アルカンジイル(C₈)または置換アルカンジイル(C₈)であり；かつ

Y₁およびY₂は、各々独立して、アルキル(C₁₂)、置換アルキル(C₁₂)、アルケニル(C₁₂)、もしくは置換アルケニル(C₁₂)であり；または、Y₁およびY₂は、一緒になり、かつ、アルカンジイル(C₁₂)、アルケンジイル(C₁₂)、もしくはいずれかの基の置換型である。

【0013】

いくつかの態様において、pは1である。いくつかの態様において、qは1である。いくつかの態様において、mは、1、2、または3、例えば2である。いくつかの態様において、X₁は0である。いくつかの態様において、X₂は0である。いくつかの態様において、X₃は0である。

【0014】

いくつかの態様において、R₁は、アルキル(C₈)または置換アルキル(C₈)である。いくつかの態様において、R₁は、アルキル(C₈)、例えばメチルである。いくつかの態様において、R₃は水素である。いくつかの態様において、R₂は、アルキル(C₈)または置換アルキル(C₈)である。いくつかの態様において、R₂は、アルキル(C₈)、例えばメチルである。

【0015】

いくつかの態様において、LのX₄は、アルカンジイル(C₆)または置換アルカンジイル(C₆)である。いくつかの態様において、LのX₄は、アルカンジイル(C₆)、例えば-CH₂CH₂-である。いくつかの態様において、LのX₅は、アルカンジイル(C₆)または置換アルカンジイル(C₆)である。いくつかの態様において、LのX₅は、アルカンジイル(C₆)、例えば-CH₂CH₂-である。いくつかの態様において、nは0である。

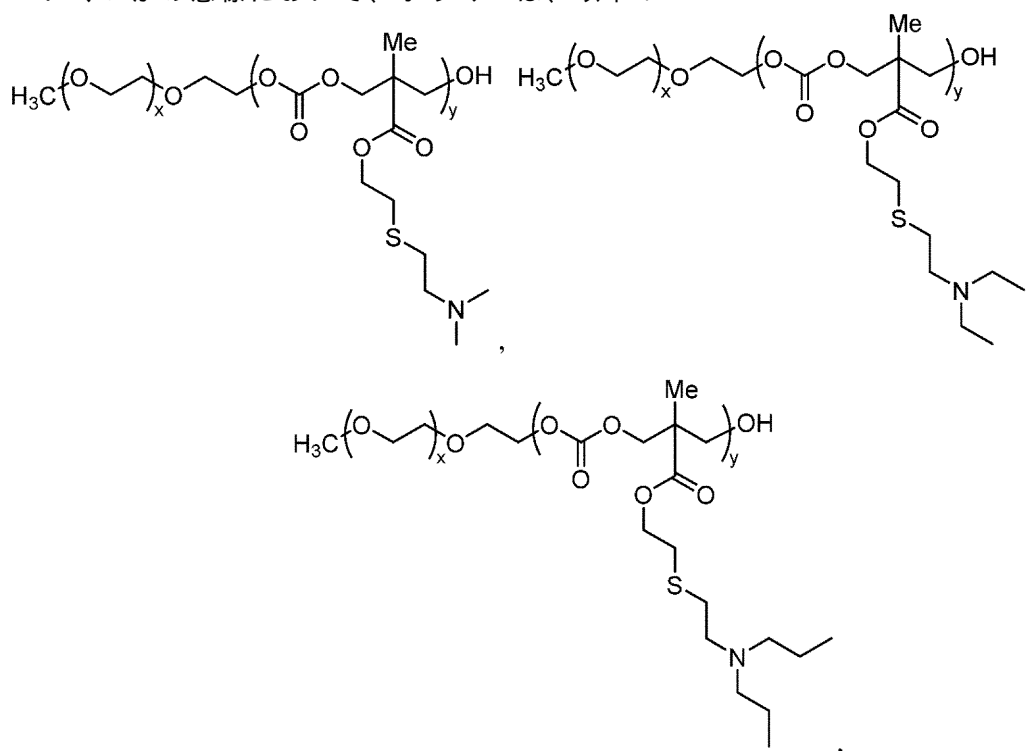
【0016】

いくつかの態様において、Y₁は、アルキル(C₁₂)または置換アルキル(C₁₂)である。いくつかの態様において、Y₁は、アルキル(C₂₋₁₂)または置換アルキル(C₂₋₁₂)である。いくつかの態様において、Y₁はアルキル(C₂₋₁₂)である。いくつかの態様において、Y₁は、メチル、エチル、n-プロピル、またはn-ブチルである。いくつかの態様において、Y₂は、アルキル(C₁₂)または置換アルキル(C₁₂)である。いくつかの態様において、Y₂は、アルキル(C₂₋₁₂)または置換アルキル(C₂₋₁₂)である。いくつかの態様において、Y₂はアルキル(C₂₋₁₂)である。いくつかの態様において、Y₂は、メチル、エチル、n-プロピル、またはn-ブチルである。いくつかの態様において、Y₁およびY₂は、一緒になり、かつ、アルカンジイル(C₁₂)または置換アルカンジイル(C₁₂)である。いくつかの態様において、Y₁およびY₂は、一緒になり、かつ、アルカンジイル(C₈)または置換アルカンジイル(C₈)

8)である。いくつかの態様において、 Y_1 および Y_2 は、一緒になり、かつ、アルカンジイル(C₈)であり、例えば、 Y_1 および Y_2 は、一緒になり、かつ、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、または $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ である。

【0017】

いくつかの態様において、ポリマーは、以下：



10

20

30

40

50



、もしくは

【 0 0 1 8 】

【 0 0 1 9 】

【 0 0 2 0 】

40

(B)治療劑

【 0 0 2 1 】

50

ある。

【 0 0 2 2 】

いくつかの態様において、組成物は、薬学的組成物として製剤化されており、かつ、賦形剤をさらに含む。いくつかの態様において、薬学的組成物は、経口的に、脂肪内に、動脈内に、関節内に、頭蓋内に、皮内に、病巣内に、筋肉内に、鼻腔内に、眼内に、心膜内に、腹腔内に、胸膜内に、前立腺内に、直腸内に、髄腔内に、気管内に、腫瘍内に、臍帯内に、腔内に、静脈内に、小胞内に、硝子体内に、リポソームによって、局所に、粘膜に、非経口的に、直腸に、結膜下に、皮下に、舌下に、局所的に、経類的に、経皮的に、腔に、クリームで、脂質組成物で、カテーテルによって、洗浄によって、持続注入によって、注入によって、吸入によって、注射によって、局所送達によって、または局所灌流によって、投与するために製剤化されている。いくつかの態様において、薬学的組成物は、注射によって投与するために製剤化されており、例えば、動脈内投与、筋肉内投与、腹腔内投与、腫瘍内投与、または静脈内投与用に製剤化されている。いくつかの態様において、賦形剤は、ピヒクル、例えば、注射に適した水溶液である。

10

【 0 0 2 3 】

別の局面において、本開示は、疾患または障害を処置する方法であって、その必要がある患者へ、治療有効量の本明細書に記載される組成物を投与する工程を含み、治療剤が、疾患または障害を処置するために十分である、方法を提供する。いくつかの態様において、疾患または障害はがんである。いくつかの態様において、治療剤は、がんを標的とするように免疫系を調節することができる。いくつかの態様において、治療剤は、1つまたは複数のがん細胞に対する免疫応答を生じさせる。

20

【 0 0 2 4 】

本明細書において使用される場合、「pH応答性ミセル」、「pH感受性ミセル」、「pH活性化可能ミセル」、および「pH活性化可能ミセル(pHAM)ナノ粒子」は、本明細書では交換可能に使用され、1つまたは複数のブロックコポリマーを含むミセルを示し、これはpH（例えば、あるpH超過または未満）に依存して解離する。非限定的な例として、あるpHにおいて、ブロックコポリマーは実質的にミセル形態である。pHが変化する（例えば、減少する）につれて、ミセルは解離し始め、そして、pHがさらに変化する（例えば、さらに減少する）につれて、ブロックコポリマーは実質的に解離（非ミセル）形態で存在する。

【 0 0 2 5 】

本明細書において使用される場合、「pH転移範囲」は、それを超えるとミセルが解離するpH範囲を示す。

30

【 0 0 2 6 】

本明細書において使用される場合、「pH転移値」(pH_t)は、ミセルの半数が解離するpHを示す。

【 0 0 2 7 】

本明細書に記載される任意の方法または組成物は、本明細書に記載される任意の他の方法または組成物に関して実施され得ることが意図される。

【 0 0 2 8 】

用語「含む (comprise)」（および「含む (comprises)」、および「含むこと (comprising)」、等の含むの任意の形態)、「有する (have)」（および「有する (has)」、および「有すること (having)」、等の有するの任意の形態)、「含有する (contain)」（および「含有する (contains)」、および「含有すること (containing)」、等の含有するの任意の形態)、ならびに「包含する (include)」（および「包含する (includes)」、および「包含すること (including)」、等の包含するの任意の形態)は、オープンエンドの連結動詞である。結果として、1つまたは複数の記載された工程または要素を「含む」、「有する」、「含有する」、または「包含する」方法、組成物、キット、またはシステムは、それらの記載の工程または要素を有するが、それらの工程または要素のみを有することに限定されず；それは、記載されていない要素または工程を有してもよい（即ち、カバーしてもよい）。同様に、1つまたは複数の記載された特徴を「含む」、「有する」、

40

50

「含有する」、または「包含する」方法、組成物、キット、またはシステムの要素は、それらの特徴を有するが、それらの特徴のみを有することに限定されず；それは、記載されていない特徴を有してもよい。

【0029】

本発明の方法、組成物、キット、およびシステムのいずれかの任意の態様が、記載された工程および／または特徴を含む／包含する／含有する／有するのではなく、記載された工程および／または特徴からなるまたはそれらから本質的になってもよい。従って、請求項のいずれにおいても、用語「からなる」または「から本質的になる」を、そうでなければオープンエンドの連結動詞を使用していたものから所定の請求項の範囲を変更するために、上記に記載のオープンエンドの連結動詞のいずれかの代わりに用いてもよい。

10

【0030】

特許請求の範囲における用語「または」の使用は、本開示は選択肢ならびに「および／または」のみを指す定義をサポートしているが、選択肢のみを指すことが明確に示されない限りまたは選択肢が相互に排他的でない限り、「および／または」を意味するために使用される。

【0031】

本出願全体にわたって、用語「約」は、値が、その値を決定するために用いられる装置または方法についての誤差の標準偏差を含むことを示すために用いられる。

【0032】

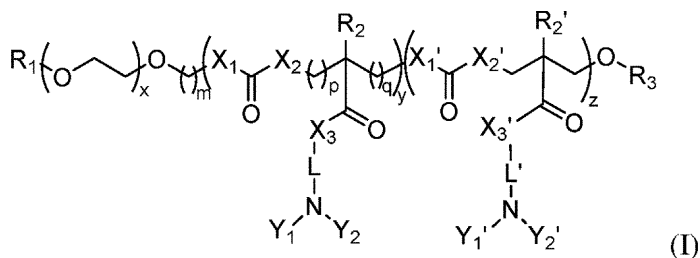
長年の特許法に従って、単語「1つの(a)」および「1つの(an)」は、特許請求の範囲または明細書において単語「含む」と共に使用される場合、特段の記載が無い限り、1つまたは複数を意味する。

20

【0033】

[本発明1001]

式：



30

のポリマーまたはその薬学的に許容される塩であって、

式中：

R_1 は、水素、アルキル(C₈)、置換アルキル(C₈)、またはチオール反応基であり；

m は、1～8の整数であり；

p および q は、各々独立して、1、2、または3であり；

x は、10～200の整数であり；

y は、20～200の整数であり；

40

z は、0～200の整数であり；

ここで、 y または z のいずれかのモノマーは該ポリマー中にランダムに分布しており；

X_1 、 X_2 、 X_1' 、および X_2' は、各々独立して、Oまたは NR_a であり、ここで、

R_a は、アルキル(C₆)または置換アルキル(C₆)であり；

R_2 および R_2' は、各々独立して、水素、アルキル(C₈)、または置換アルキル(C₈)であり；

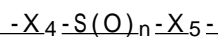
R_3 は、水素、アルキル(C₈)、または置換アルキル(C₈)であり；

X_3 および X_3' は、各々独立して、Oまたは NR_b であり、ここで、

R_b は、水素、アルキル(C₆)、または置換アルキル(C₆)であり；

L および L' は、各々独立して、以下の式の基であり；

50



式中：

n は、0、1、または2であり；かつ

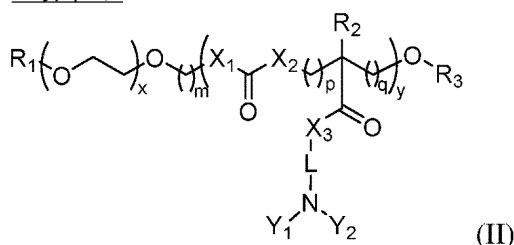
X_4 および X_5 は、各々独立して、アルカンジイル(C₈)または置換アルカンジイル(C₈)であり；かつ

Y_1 、 Y_2 、 Y_1 、および Y_2 は、各々独立して、アルキル(C₁₂)、置換アルキル(C₁₂)、アルケニル(C₁₂)、もしくは置換アルケニル(C₁₂)であり；または、 Y_1 および Y_2 もしくは Y_1 および Y_2 は、一緒になり、かつ、アルカンジイル(C₁₂)、アルケンジイル(C₁₂)、またはいずれかの基の置換型である、

ポリマー。

[本発明1002]

以下：



またはその薬学的に許容される塩としてさらに定義され、
ここで：

R_1 は、水素、アルキル(C₈)、置換アルキル(C₈)、またはチオール反応基であり；

m は、1～8の整数であり；

p および q は、各々独立して、1、2、または3であり；

x は、10～200の整数であり；

y は、20～200の整数であり；

X_1 および X_2 は、各々、Oまたは NR_a であり、ここで、

R_a は、水素、アルキル(C₆)、または置換アルキル(C₆)であり；

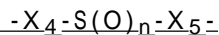
R_2 は、水素、アルキル(C₈)、または置換アルキル(C₈)であり；

R_3 は、水素、アルキル(C₈)、または置換アルキル(C₈)であり；

X_3 は、Oまたは NR_b であり、ここで、

R_b は、水素、アルキル(C₆)、または置換アルキル(C₆)であり；

L は、以下の式の基であり：



式中：

n は、0、1、または2であり；かつ

X_4 および X_5 は、各々独立して、アルカンジイル(C₈)または置換アルカンジイル(C₈)であり；かつ

Y_1 および Y_2 は、各々独立して、アルキル(C₁₂)、置換アルキル(C₁₂)、アルケニル(C₁₂)、もしくは置換アルケニル(C₁₂)であり；または、 Y_1 および Y_2 は、一緒になり、かつ、アルカンジイル(C₁₂)、アルケンジイル(C₁₂)、もしくはいずれかの基の置換型である、

本発明1001のポリマー。

[本発明1003]

以下：

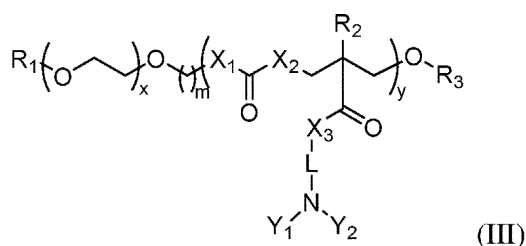
10

20

30

40

50



(III)

またはその薬学的に許容される塩としてさらに定義され、

ここで：

R_1 は、水素、アルキル_(C 8)、置換アルキル_(C 8)、またはチオール反応基であり；

m は、1～8の整数であり；

x は、10～200の整数であり；

y は、20～200の整数であり；

X_1 および X_2 は、各々、Oまたは NR_a であり、ここで、

R_a は、水素、アルキル_(C 6)、または置換アルキル_(C 6)であり；

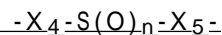
R_2 は、水素、アルキル_(C 8)、または置換アルキル_(C 8)であり；

R_3 は、水素、アルキル_(C 8)、または置換アルキル_(C 8)であり；

X_3 は、Oまたは NR_b であり、ここで、

R_b は、水素、アルキル_(C 6)、または置換アルキル_(C 6)であり；

L は、以下の式の基であり；



式中：

n は、0、1、または2であり；かつ

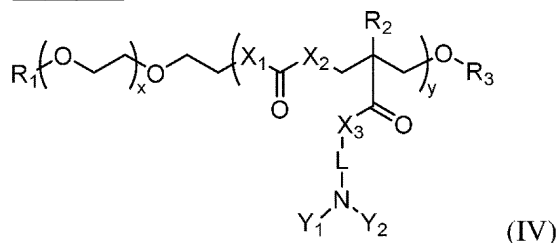
X_4 および X_5 は、各々独立して、アルカンジイル_(C 8)または置換アルカンジイル_(C 8)であり；かつ

Y_1 および Y_2 は、各々独立して、アルキル_(C 12)、置換アルキル_(C 12)、アルケニル_(C 12)、もしくは置換アルケニル_(C 12)であり；または、 Y_1 および Y_2 は、一緒になり、かつ、アルカンジイル_(C 12)、アルケンジイル_(C 12)、もしくはいずれかの基の置換型である、

本発明1001または本発明1002のポリマー。

[本発明1004]

以下：



(IV)

またはその薬学的に許容される塩としてさらに定義され、

ここで：

R_1 は、水素、アルキル_(C 8)、置換アルキル_(C 8)、またはチオール反応基であり；

x は、10～200の整数であり；

y は、20～200の整数であり；

X_1 および X_2 は、各々、Oまたは NR_a であり、ここで、

R_a は、水素、アルキル_(C 6)、または置換アルキル_(C 6)であり；

R_2 は、水素、アルキル_(C 8)、または置換アルキル_(C 8)であり；

R_3 は、水素、アルキル_(C 8)、または置換アルキル_(C 8)であり；

10

20

30

40

50

X_3 は、Oまたは NR_b であり、ここで、

R_b は、水素、アルキル(C_{6})、または置換アルキル(C_{6})であり；

L は、以下の式の基であり；

$-X_4-S(O)_n-X_5-$

式中；

n は、0、1、または2であり；かつ

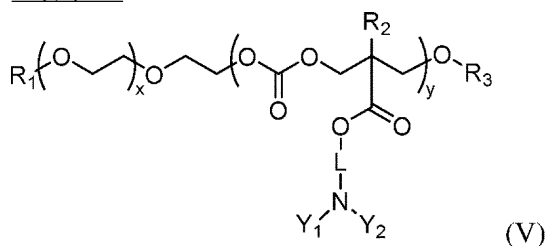
X_4 および X_5 は、各々独立して、アルカンジイル(C_8)または置換アルカンジイル(C_8)であり；かつ

Y_1 および Y_2 は、各々独立して、アルキル(C_{12})、置換アルキル(C_{12})、アルケニル(C_{12})、もしくは置換アルケニル(C_{12})であり；または、 Y_1 および Y_2 は、一緒になり、かつ、アルカンジイル(C_{12})、アルケンジイル(C_{12})、もしくはいずれかの基の置換型である、

本発明1001～1003のいずれかのポリマー。

[本発明1005]

以下；



またはその薬学的に許容される塩としてさらに定義され、

ここで；

R_1 は、水素、アルキル(C_8)、置換アルキル(C_8)、またはチオール反応基であり；

x は、10～200の整数であり；

y は、20～200の整数であり；

R_2 は、水素、アルキル(C_8)、または置換アルキル(C_8)であり；

R_3 は、水素、アルキル(C_8)、または置換アルキル(C_8)であり；

L は、以下の式の基であり；

$-X_4-S(O)_n-X_5-$

式中；

n は、0、1、または2であり；かつ

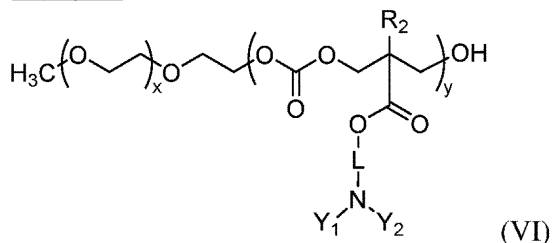
X_4 および X_5 は、各々独立して、アルカンジイル(C_8)または置換アルカンジイル(C_8)であり；かつ

Y_1 および Y_2 は、各々独立して、アルキル(C_{12})、置換アルキル(C_{12})、アルケニル(C_{12})、もしくは置換アルケニル(C_{12})であり；または、 Y_1 および Y_2 は、一緒になり、かつ、アルカンジイル(C_{12})、アルケンジイル(C_{12})、もしくはいずれかの基の置換型である、

本発明1001～1004のいずれかのポリマー。

[本発明1006]

以下；



10

20

30

40

50

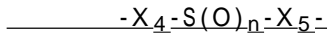
またはその薬学的に許容される塩としてさらに定義され、
ここで：

x は、10～200の整数であり；

y は、20～200の整数であり；

R_2 は、水素、アルキル (C_{8}) 、または置換アルキル (C_{8}) であり；

L は、以下の式の基であり：



式中：

n は、0、1、または2であり；かつ

X_4 および X_5 は、各々独立して、アルカンジイル (C_{8}) または置換アルカンジイル (C_{8}) であり；かつ

Y_1 および Y_2 は、各々独立して、アルキル (C_{12}) 、置換アルキル (C_{12}) 、アルケニル (C_{12}) 、もしくは置換アルケニル (C_{12}) であり；または、 Y_1 および Y_2 は、一緒になり、かつ、アルカンジイル (C_{12}) 、アルケンジイル (C_{12}) 、もしくはいずれかの基の置換型である、

本発明1001～1005のいずれかのポリマー。

[本発明1007]

p が1である、本発明1001または本発明1002のポリマー。

[本発明1008]

q が1である、本発明1001、1002、または1007のいずれかのポリマー。

[本発明1009]

m が1、2、または3である、本発明1001～1003、1007、および1008のいずれかのポリマー。

[本発明1010]

m が2である、本発明1009のポリマー。

[本発明1011]

X_1 が0である、本発明1001～1004および1007～1010のいずれかのポリマー。

[本発明1012]

X_2 が0である、本発明1001～1004および1007～1011のいずれかのポリマー。

[本発明1013]

X_3 が0である、本発明1001～1004および1007～1012のいずれかのポリマー。

[本発明1014]

R_1 がアルキル (C_{8}) または置換アルキル (C_{8}) である、本発明1001～1005および1007～1013のいずれかのポリマー。

[本発明1015]

R_1 がアルキル (C_{8}) である、本発明1014のポリマー。

[本発明1016]

R_1 がメチルである、本発明1015のポリマー。

[本発明1017]

R_3 が水素である、本発明1001～1005および1007～1016のいずれかのポリマー。

[本発明1018]

R_2 がアルキル (C_{8}) または置換アルキル (C_{8}) である、本発明1001～1017のいずれかのポリマー。

[本発明1019]

R_2 がアルキル (C_{8}) である、本発明1018のポリマー。

[本発明1020]

R_2 がメチルである、本発明1019のポリマー。

[本発明1021]

L の X_4 が、アルカンジイル (C_{6}) または置換アルカンジイル (C_{6}) である、本発明1001～1020のいずれかのポリマー。

10

20

30

40

50

[本発明1022]

LのX₄が、アルカンジイル(C₆)である、本発明1021のポリマー。

[本発明1023]

LのX₄が、-CH₂CH₂-である、本発明1022のポリマー。

[本発明1024]

LのX₅が、アルカンジイル(C₆)または置換アルカンジイル(C₆)である、本発明1001～1023のいずれかのポリマー。

[本発明1025]

LのX₅が、アルカンジイル(C₆)である、本発明1024のポリマー。

[本発明1026]

LのX₅が、-CH₂CH₂-である、本発明1025のポリマー。

[本発明1027]

nが0である、本発明1001～1026のいずれかのポリマー。

[本発明1028]

Y₁が、アルキル(C₁₂)または置換アルキル(C₁₂)である、本発明1001～1027のいずれかのポリマー。

[本発明1029]

Y₁が、アルキル(C₂～12)または置換アルキル(C₂～12)である、本発明1028のポリマー。

[本発明1030]

Y₁がアルキル(C₂～12)である、本発明1028または本発明1029のポリマー。

[本発明1031]

Y₁が、メチル、エチル、n-プロピル、またはn-ブチルである、本発明1028～1030のいずれかのポリマー。

[本発明1032]

Y₂が、アルキル(C₁₂)または置換アルキル(C₁₂)である、本発明1001～1031のいずれかのポリマー。

[本発明1033]

Y₂が、アルキル(C₂～12)または置換アルキル(C₂～12)である、本発明1032のポリマー。

[本発明1034]

Y₂がアルキル(C₂～12)である、本発明1032または本発明1033のポリマー。

[本発明1035]

Y₂が、メチル、エチル、n-プロピル、またはn-ブチルである、本発明1032～1034のいずれかのポリマー。

[本発明1036]

Y₁およびY₂が、一緒になり、かつ、アルカンジイル(C₁₂)または置換アルカンジイル(C₁₂)である、本発明1001～1027のいずれかのポリマー。

[本発明1037]

Y₁およびY₂が、一緒になり、かつ、アルカンジイル(C₈)または置換アルカンジイル(C₈)である、本発明1036のポリマー。

[本発明1038]

Y₁およびY₂が、一緒になり、かつ、アルカンジイル(C₈)である、本発明1037のポリマー。

[本発明1039]

Y₁およびY₂が、一緒になり、かつ、-CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, または-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-である、本発明1037のポリマー。

[本発明1040]

以下：

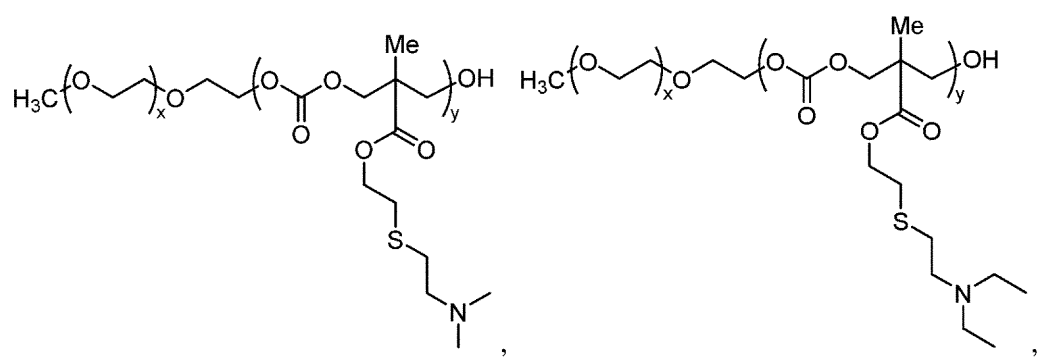
10

20

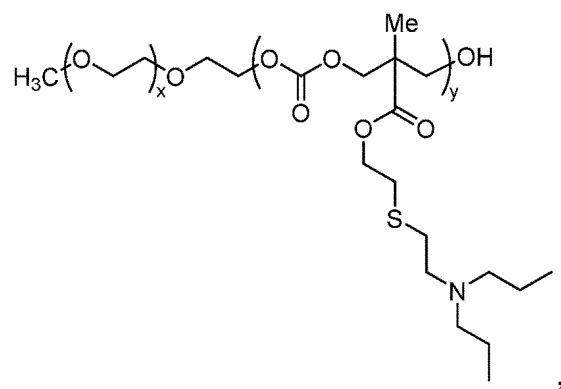
30

40

50



10

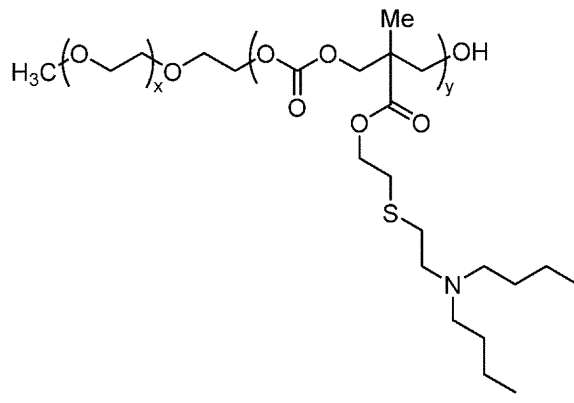


20

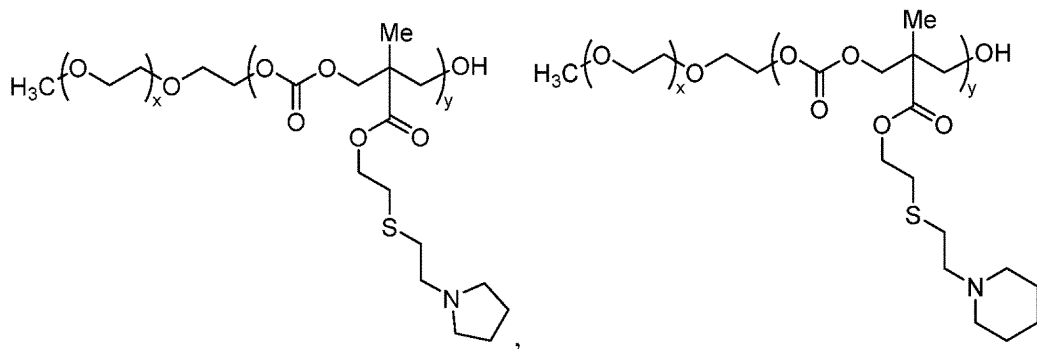
30

40

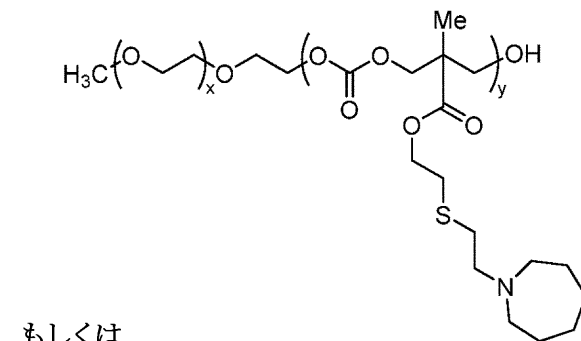
50



10



20



,もしくは

30

またはその薬学的に許容される塩としてさらに定義される、本発明1001～1039のいずれかのポリマー。

[本発明1041]

xが、40～160の整数である、本発明1001～1040のいずれかのポリマー。

[本発明1042]

xが、80～150の整数である、本発明1041のポリマー。

[本発明1043]

yが、40～180の整数である、本発明1001～1042のいずれかのポリマー。

[本発明1044]

yが、80～150の整数である、本発明1043のポリマー。

[本発明1045]

本発明1001～1044のいずれかの複数のポリマーを含む、ミセル。

[本発明1046]

(A)本発明1001～1044のいずれかのポリマー、および

(B)治療剤

を含む組成物であって、該ポリマーが該治療剤を封入している、組成物。

[本発明1047]

ポリマーがミセルを形成している、本発明1046の組成物。

[本発明1048]

40

50

ミセルが治療剤を完全に封入している、本発明1046または本発明1047の組成物。

[本発明1049]

治療剤が、免疫系に影響を与える薬剤である、本発明1046～1048のいずれかの組成物。

[本発明1050]

治療剤がサイトカインまたは免疫系調節剤である、本発明1049の組成物。

[本発明1051]

サイトカインが、IL-1、IL-2、IL-12、またはIL-15である、本発明1050の組成物。

[本発明1052]

免疫系調節剤が、cGAMPまたは1型インターフェロンである、本発明1050の組成物。

[本発明1053]

治療剤が抗原である、本発明1049の組成物。

[本発明1054]

抗原が抗がん抗原である、本発明1053の組成物。

[本発明1055]

抗がん抗原がE7ペプチドである、本発明1054の組成物。

[本発明1056]

薬学的組成物として製剤化されており、かつ、賦形剤をさらに含む、本発明1046～1055のいずれかの組成物。

[本発明1057]

薬学的組成物が、経口的に、脂肪内に、動脈内に、関節内に、頭蓋内に、皮内に、病巣内に、筋肉内に、鼻腔内に、眼内に、心膜内に、腹腔内に、胸膜内に、前立腺内に、直腸内に、髄腔内に、気管内に、腫瘍内に、臍帯内に、腔内に、静脈内に、小胞内に、硝子体内に、リポソームによって、局所に、粘膜に、非経口的に、直腸に、結膜下に、皮下に、舌下に、局所的に、経類的に、経皮的に、腔に、クリームで、脂質組成物で、カテーテルによって、洗浄によって、持続注入によって、注入によって、吸入によって、注射によって、局所送達によって、または局所灌流によって、投与するために製剤化されている、本発明1056の組成物。

[本発明1058]

薬学的組成物が、注射によって投与するために製剤化されている、本発明1057の組成物。

[本発明1059]

薬学的組成物が、動脈内投与、筋肉内投与、腹腔内投与、腫瘍内投与、または静脈内投与用に製剤化されている、本発明1057の組成物。

[本発明1060]

賦形剤がビヒクルである、本発明1056～1059のいずれかの組成物。

[本発明1061]

ビヒクルが、注射に適した水溶液である、本発明1060の組成物。

[本発明1062]

疾患または障害を処置する方法であって、

その必要がある患者へ、治療有効量の本発明1046～1061のいずれかの組成物を投与する工程を含み、

治療剤が、該疾患または障害を処置するために十分である、方法。

[本発明1063]

疾患または障害ががんである、本発明1062の方法。

[本発明1064]

治療剤が、がんを標的とするように免疫系を調節することができる、本発明1062または本発明1063の方法。

[本発明1065]

治療剤が、1つまたは複数のがん細胞に対する免疫応答を生じさせる、本発明1062～10

10

20

30

40

50

64のいずれかの方法。

本開示の他の目的、特徴および利点は、以下の詳細な説明から明らかになるであろう。しかし、詳細な説明および具体例は、本開示の具体的な態様を示しているが、例示のためのみに与えられていると理解されるべきであり、何故ならば、本開示の精神および範囲内における様々な変更および改変がこの詳細な説明から当業者に明らかになるためである。

【図面の簡単な説明】

【0034】

以下の図面は本明細書の一部を形成し、本開示のある局面をさらに実証するために含まれている。本開示は、本明細書に示される具体的な態様の詳細な説明と組み合わせてこれらの図面の1つまたは複数を参照することによってよりよく理解され得る。

【0035】

【図1】図1A～Cは、生分解性UPSコポリマーの超pH感受性応答のキャラクタリゼーションを示す。(図1A) pHは、異なる第3級アミン置換基を有するPEO-b-P(MAC-SR)コポリマーのプロトン化度の関数として変化する。PEO₁₂₃-b-P(MAC-SDMA)₁₃₅のデータを別に図4に提示する。(図1B) pK_a値は、P(MAC-SR)セグメント(中性/脱プロトン化状態)の繰り返し単位のlog Pと逆相関する。青色および桃色の点は、それぞれ、側鎖として線形および環状ジアルキル第3級アミンを有するコポリマーを示す。(図1C) PEO-b-P(MAC-SR)ブロックコポリマーのlog Pの関数としてのpH転移の鋭さ(pH_{10%-90%})。一般的に使用されるポリ塩基(ポリ(エチレンジアミン)、キトサン、ポリヒスチジン、ポリリジン)を比較のために示す(Li et al., 2016)。

【図2】図2AおよびBは、可溶性ユニマー状態からミセル状態への相転移が、コポリマーの超pH感受性応答を駆動することを示す。(図2A) PEO₁₂₃-b-P(MAC-SC7A)₁₃₅コポリマーのpH滴定中のプロトン化度の関数としての数加重流体力学的径(number-weighted hydrodynamic diameter)および光散乱計数率。(図2B)臨界ミセル化プロトン化度を上回るおよび下回る、95%および85%のプロトン化度でのPEO₁₂₃-b-P(MAC-SC7A)₁₃₅のTEM画像および数加重流体力学的径分布。

【図3】図3A～Eは、pH 6.5および7.4での重水素化緩衝溶液中におけるPEO₁₂₃-b-P(MAC-SC7A)₁₃₅コポリマーの分解研究を示す。(図3A)コポリマーおよびその分解生成物の化学構造。経時的な(図3B) pH 6.5および(図3C) pH 7.4重水素化緩衝溶液中のPEO₁₂₃-b-P(MAC-SC7A)₁₃₅コポリマーの¹H NMRスペクトル。分かりやすくするために、スペクトルの選択された領域のみを提示した。完全なスペクトルを図6および7に示す。(図3D) pH 6.5重水素化緩衝溶液中におけるPEOセグメントの正規化プロトンシグナルと比べての、ピーク(d1+d2)およびピーク(d3+d4)の積分比率。(図3E) pH 6.5および7.4重水素化緩衝溶液中におけるPEOセグメントの正規化プロトンシグナルと比べてのピーク(d3+d4)の積分比率。

【図4】PEO₁₂₃-b-P(MAC-SDMA)₁₃₅およびPEO₁₂₃-b-P(MAC-SC7A)₁₃₅のプロトン化度の関数としてのpH変化を示す。

【図5】(図5A)PEO₁₂₃-b-P(MAC-SDMA)₁₃₅コポリマーのpH滴定中のプロトン化度の関数としての数加重流体力学的径および光散乱計数率を示す。(図5B) CMPD(約50%)を上回るおよび下回る、55%および45%のプロトン化度でのPEO₁₂₃-b-P(MAC-SDMA)₁₃₅のTEM画像および数加重流体力学的径分布。スケールバー：50 nm。

【図6】55日間にわたるpH 6.5重水素化緩衝溶液中におけるPEO₁₂₃-b-P(MAC-SC7A)₁₃₅コポリマーの完全な¹H NMRスペクトルを示す。

【図7】55日間にわたるpH 7.4重水素化緩衝溶液中におけるPEO₁₂₃-b-P(MAC-SC7A)₁₃₅コポリマーの完全な¹H NMRスペクトルを示す。

【図8】HEK-Blue(商標)IL-2レポーター細胞によって評価されたインビトロでの正規化IL-2機能を示す。IL-2濃度：200、50、10、2、0.5、0.2、0.05、0.01 ng/mL；PEG-b-P(MAC-SDPA)濃度：40、10、2、0.4、0.1、0.04、0.01、0.002 μg/mL。

【図9】IL-2療法による異なる処置下のB16F10腫瘍増殖曲線を示す。遊離IL-2またはPEG-b-P(MAC-SDPA)-IL-2を、1日目および5日目に腫瘍内にまたは静脈内に注射した(IL-2

10

20

30

40

50

: 1注射当たり1 μg ; PEG-b-P(MAC-SDPA): 1注射当たり200 μg 。

【図10】11日以内の体重変化曲線を示す。遊離IL-2またはPEG-b-P(MAC-SDPA)@IL-2を、1日目および5日目に腫瘍内にまたは静脈内に注射した(IL-2: 1注射当たり1 μg ; PEG-b-P(MAC-SDPA): 1注射当たり200 μg)。

【図11】1.0 mg/mL生分解性PEG-b-P(MAC-SC7A)ミセルナノ粒子中のcGAMPのローディング効率を示す。

【図12】図12A~Cは、dUPSポリマーのSTING結合および活性化を示す。図12A 等温滴定カロリーメトリー(ITC)は、PSC7AコポリマーがPSDEAと比べてSTINGへの遙かにより高い結合親和性を有することを示す。 K_d : 見かけの解離定数。図12B ITC実験からの、STINGへの異なるdUPSポリマーの K_b 値の要約(結合親和性、 K_d の逆数)。図12C STING結合親和性と相関する、dUPSコポリマー(0.5 μM 、48時間)とインキュベートされたTHP1-ISG細胞のインターフェロン(IFN)誘導レベル。統計的有意性をt-検定によって計算した: ***P 0.001、**P 0.01、*P 0.05。

10

【図13】図13AおよびBは、PSC7Aナノワクチンは腫瘍担持マウスにおいて腫瘍増殖を阻害し生存期間を延長することができることを示す。2 $\times 10^5$ 個の図13A TC-1または図13B B16-F10メラノーマ細胞が接種されたC57BL/6マウス(1群当たりn = 9)を、上に示される特定の時点で、PBS、腫瘍抗原ペプチド単独、PSC7A NP、低用量PSC7Aワクチン(Vax.低)、または高用量PSC7Aワクチン(Vax.高)で処置した。ワクチン接種は、強力な腫瘍増殖阻害およびこれらのマウスの延長された生存期間をもたらした。腫瘍増殖研究について、データを平均値 \pm s.e.m.として示し、統計的有意性をt-検定によって計算した: ***P 0.001、**P 0.01、*P 0.05。

20

【図14】図14AおよびBは、PSC7Aナノワクチンは2つの動物腫瘍モデルにおいて腫瘍増殖を阻害することを示す。非分解性PC7Aナノワクチンを比較のために使用した。2 $\times 10^5$ 個の図14A TC-1または図14B B16-F10メラノーマ細胞が接種されたC57BL/6マウス(1群当たりn = 9)を、特定の時点で、PBS、腫瘍抗原ペプチド、PSC7Aワクチン、またはPC7Aワクチンで処置した。データを平均値 \pm s.e.m.として示し、統計的有意性をt-検定によって計算した: ***P 0.001、**P 0.01、*P 0.05。

【図15】図15A~Cは、分解性PSC7A NPおよび非分解性PC7A NPの短期安全性評価を示す。図15A C57BL/6マウス(1群当たりn = 4)の右側腹部にPBS、300 μg PSC7A NP、または300 μg PC7A NPを皮下注射した。図15B アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、尿素およびクレアチニンレベルの血清濃度を、注射から24時間後にAbcam (商標) Assay Kitによって定量的に測定した。図15C インターロイキン-6 (IL-6)、インターロイキン-10 (IL-10)、単球走化性タンパク質-1 (MCP-1)、インターフェロン- (IFN-)、腫瘍壊死因子(TNF)、およびインターロイキン-12p70 (IL-12p70)タンパク質レベルの血清濃度を、注射から24時間後にBD (商標) CBA Mouse Inflammation Kitによって定量的に測定した。統計的有意性をt-検定によって計算した: ***P 0.001、**P 0.01、*P 0.05。

30

【図16】PSC7A NPの短期安全性評価のための主要臓器の組織学的分析を示す。PBS、300 μg PSC7A NPまたは300 μg PC7A NPが右側腹部に皮下注射された後のC57BL/6マウスからの臓器の代表的なH&E切片。投与から24時間後、マウスを殺し、臓器を採取した。心臓、肝臓、脾臓および腎臓の組織像は、PBSと比較して、いずれのポリマーによる処置後も顕著な変化はなかった。各臓器群について、スケールバー: 5 mm (上部)および250 μm (下部)。

40

【図17】図17A~Dは、分解性PSC7A NPおよび非分解性PC7A NPの長期安全性評価を示す。図17A C57BL/6マウスの右側腹部にPBS、300 μg PSC7A NP、または300 μg PC7A NPを皮下注射した。PSC7A NPおよびPC7A NP群において注射部位で炎症性結節が形成された。結節の表面積を楕円モデルに基づいて計算した。図17B 経時的な結節表面積の変化。図17C 左: 60日目の注射部位から採取された皮膚組織の写真; 上から下へ、PC7A NP、PSC7A NPおよびPBSで処置されたマウスである。右: PSC7AおよびPC7A群からの皮膚組織の拡大図。図17C 左: 60日目のホルマリン固定およびパラフィン包埋され

50

た皮膚組織(注射部位)のH&E染色；上から下へ、PC7A NP、PSC7A NPおよびPBSで処置されたマウスである。スケールバー：2.5 mm。中央：PC7A群からの肉芽腫性炎症によって囲まれた結節の拡大図。スケールバー：250 μ m。挿入図：正方形で示される領域の拡大図。左下、左上および右の矢印は、それぞれ、マクロファージ、リンパ球および好中球を示す。スケールバー：50 μ m。右：PSC7A群からの皮膚組織の拡大図。スケールバー：250 μ m。

【図18】PSC7A NPの長期安全性評価のための皮膚組織(注射部位)の組織学的分析を示す。PBS、300 μ g PSC7A NPまたは300 μ g PC7A NPが右側腹部に皮下注射された後のC57BL/6マウスからの皮膚組織(注射部位)の代表的なH&E切片。投与後1、15および30日目に、マウスを殺し、皮膚組織を採取した。挿入図：正方形で示される領域の拡大図。ダークグレー、ライトグレー、およびミディアムグレーの矢印は、それぞれ、マクロファージ、リンパ球および好中球を示す。スケールバー：2.5 mm (上部)、1 mm (中央および下部)、50 μ m (挿入図)。

10

【図19】dUPSポリマーのlog Pの関数としてのpH転移の鋭さ($\text{pH}_{10\%-90\%}$)を示す。一般的に使用されるポリ塩基(ポリ(エチレンイミン)、キトサン、ポリヒスチジン、ポリリジン)を比較のために示す。

【発明を実施するための形態】

【0036】

例示的な態様の説明

いくつかの局面において、本開示は、特定の転移pHより上で解体し(dissemble)かつ分解性骨格を含有するpH応答性ナノ粒子を形成することができるポリマーを提供する。いくつかの態様において、これらのポリマーは、鋭いpH転移値を有し、かつ、ポリマーのクリアランスを加速させる1つまたは複数の分解性基を含有する。これらのポリマーは、広範囲のpH転移点を有し得、特異的組織への薬物化合物の送達のような、広範囲の用途を可能にする。いくつかの局面において、本開示は、がんを処置するために使用され得る免疫系調節剤のような治療剤を含む治療剤を体へ送達することなど、上述のようなpH応答性システムにおいてこれらのポリマーを使用する方法を提供する。

20

【0037】

A. 化学的定義

化学基の文脈において使用される場合、「水素」は-Hを意味し；「ヒドロキシ」は-OHを意味し；「オキソ」は=Oを意味し；「カルボニル」は-C(=O)-を意味し；「カルボキシ」は-C(=O)OH(-COOHまたは-CO₂Hとも書く)を意味し；「ハロ」は独立に-F、-Cl、-Brまたは-Iを意味し；「アミノ」は-NH₂を意味し；「ヒドロキシアミノ」は-NHOHを意味し；「ニトロ」は-NO₂を意味し；イミノは=NHを意味し；「シアノ」は-CNを意味し；「イソシアニル」は-N=C=Oを意味し；「アジド」は-N₃を意味し；一価の文脈で「ホスフェート」は-OP(O)(OH)₂またはその脱プロトン型を意味し；二価の文脈で「ホスフェート」は-OP(O)(OH)O-またはその脱プロトン型を意味し；「メルカプト」は-SHを意味し；かつ「チオ」は=Sを意味し；「チオカルボニル」は-C(=S)-を意味し；「スルホニル」は-S(O)₂-を意味し；かつ「スルフィニル」は-S(O)-を意味する。

30

【0038】

化学式の文脈において、記号「-」は単結合を意味し；「=」は二重結合を意味し；「≡」は三重結合を意味する。記号「----」

40

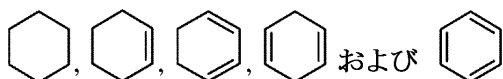
は、任意選択の結合であり、存在する場合は単結合または二重結合である。記号「====」


は単結合または二重結合である。従って、式



50


は、例えば、





を包含する。また、そのような環の原子は一つも2つ以上の二重結合の部分形成しないことが理解される。さらに、共有結合の記号「-」は、1または2個の立体的原子を接続している場合、好ましい立体化学を示すものではないことが注意される。むしろ、それは全ての立体異性体およびその混合物を含むものである。記号「」

10


は、結合にわたって垂直にひかれた場合

(例えば、メチルについて -CH₃)

、その基の結合点を示す。結合点を一義的に特定することにおいて読者を助けるために、結合点は典型的により大きな基に対してのみこのように特定されることが注意される。記号「」

は、くさびの太い端部に結合した基が「紙面から出る」場合の単結合を意味する。記号「」

20

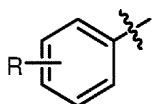
は、くさびの太い端部に結合した基が「紙面の中に入る」場合の単結合を意味する。記号「」

は、二重結合の周囲のジオメトリー（例えば、EまたはZ）が定義されていない場合の単結合を意味する。このため、両方の選択肢、ならびにその組み合わせが意図されている。本出願で示される構造の原子上の定義されていない原子価はいずれも、その原子に結合した水素原子を暗に表す。炭素原子上の太い点は、その炭素に結合した水素は紙の平面から外側に配向されていることを示している。

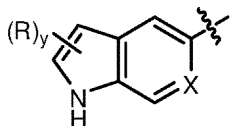
【0039】

30

変数が環系上の「浮遊基」として、例えば、式：



における基「R」として描写される場合、安定な構造が形成される限りにおいて、変数は、描写された、暗示された、または明確に定義された水素を包含する、環原子のいずれかと結合した任意の水素原子と置き換わってもよい。変数が縮合環系上の「浮遊基」として、例えば、式：



40

における基「R」として描写される場合、特に断らない限り、変数は縮合環のどちらかの環原子のいずれかと結合した任意の水素原子と置き換わってもよい。置き換わることができる水素としては、安定な構造が形成される限りにおいて、描写された水素（例えば、上記の式の窒素と結合した水素）、暗示された水素（例えば、示されていないが存在すると理解される上記の式の水素）、明確に定義された水素、および、その存在が環原子との同一性に依存している任意選択の水素（例えば、基Xが-CH-に等しい場合、Xに結合した水

50

素)が挙げられる。描写された例において、Rは、縮合環系の5員環または6員環のいずれかに存在してもよい。上記の式において、括弧で囲まれたRのすぐ後の下付き文字「y」は、数値変数を表す。特に指定が無い限り、この変数は0、1、2、または2より大きい全ての整数であることができ、環または環系の置換可能な水素原子の最大数によってのみ限定される。

【0040】

化学基および化合物クラスについて、基またはクラス中の炭素原子の数は以下に示すとおりである：「C_n」または「C=n」は、基/クラス中の炭素原子の正確な数(n)を定義する。「C_n」は、基/クラス中にあり得る炭素原子の最大数(n)を定義し、最小数は問題の基/クラスにとって可能な限り小さい。例えば、基「アルキル(C₈)」、「シクロアルカンジイル(C₈)」、「ヘテロアリール(C₈)」、および「アシル(C₈)」中の炭素原子の最小数は1であり、基「アルケニル(C₈)」、「アルキニル(C₈)」、および「ヘテロシクロアルキル(C₈)」中の炭素原子の最小数は2であり、基「シクロアルキル(C₈)」中の炭素原子の最小数は3であり、かつ基「アリール(C₈)」および「アレンジイル(C₈)」中の炭素原子の最小数は6であることが理解される。「C_n~n'」は、基中の炭素原子の最小(n)および最大数(n')の両方を定義する。したがって、「アルキル(C₂~10)」は、2~10個の炭素原子を有するアルキル基を示す。これらの炭素数を示す数字は、それが修飾する化学基またはクラスの前にあっても後にあってもよく、また括弧内にあってもなくてもよく、意味のいかなる変更も意味しない。したがって、「C5オレフィン」、「C5-オレフィン」、「オレフィン(C₅)」、および「オレフィン_{C5}」なる用語はすべて同義語である。以下に示す場合を除き、基または化合物が炭素原子の指定の数に一致するかどうかを判定するために、あらゆる炭素原子を計数する。例えば、基ジヘキシルアミノはジアルキルアミノ(C₁₂)基の一例であるが、ジアルキルアミノ(C₆)基の一例ではない。同様に、フェニルエチルはアルキル(C₈)基の一例である。本明細書において定義される任意の化学基または化合物クラスが「置換」なる用語で修飾される場合、水素原子に置き代わる部分のいかなる炭素原子も計数しない。したがって、メトキシヘキシルは、合計7個の炭素原子を有するが、置換アルキル(C₁~6)の一例である。特に記載がない限り、炭素原子の制限なしに請求項に挙げられる任意の化学基または化合物クラスは、12以下の炭素原子の制限を有する。

【0041】

「飽和」なる用語は、化合物または化学基を修飾するために用いられる場合、化合物または化学基が、以下に示す場合を除いて、炭素-炭素二重結合および炭素-炭素三重結合を有しないことを意味する。この用語が原子を修飾するために用いられる場合、原子はいかなる二重または三重結合の一部でもないことを意味する。飽和基の置換型の場合、1つまたは複数の炭素酸素二重結合または炭素窒素二重結合は存在してもよい。さらに、そのような結合が存在する場合、ケト-エノール互変異性またはイミン/エナミン互変異性の一部として起こり得る炭素-炭素二重結合を除外するものではない。「飽和」なる用語が物質の溶液を修飾するために用いられる場合、その溶液中にその物質がそれ以上溶解し得ないことを意味する。

【0042】

「脂肪族」なる用語は、そのように修飾された化合物または化学基は非環式または環式であるが、非芳香族の化合物または基であることを示す。脂肪族化合物/基において、炭素原子は直鎖、分枝鎖、または非芳香環(脂環式)中で一緒に連結され得る。脂肪族化合物/基は、一重炭素-炭素結合によって連結された飽和(アルカン/アルキル)、あるいは1つもしくは複数の炭素-炭素二重結合(アルケン/アルケニル)または1つもしくは複数の炭素-炭素三重結合(アルキン/アルキニル)による不飽和であり得る。

【0043】

「アルキル」なる用語は、結合点としての炭素原子を有し、直鎖または分枝鎖非環式構造を有し、かつ炭素および水素以外の原子を有しない、一価飽和脂肪族基を指す。基-CH₃(Me)、-CH₂CH₃(Et)、-CH₂CH₂CH₃(n-Prまたはプロピル)、-CH(CH₃)₂(i-Pr

、ⁱPrまたはイソプロピル)、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ (n-Bu)、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ (sec-ブチル)、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ (イソブチル)、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ (tert-ブチル、t-ブチル、t-Buまたは^tBu)、および $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ (neo-ペンチル)はアルキル基の非限定的な例である。「アルカンジイル」なる用語は、結合点としての1つまたは2つの飽和炭素原子を有し、直鎖または分枝鎖非環式構造を有し、炭素-炭素二重または三重結合を有さず、かつ炭素および水素以外の原子を有しない、二価飽和脂肪族基を指す。基- CH_2- (メチレン)、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2-$ 、および $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ はアルカンジイル基の非限定的な例である。「アルキリデン」なる用語は、RおよびR'が独立に水素またはアルキルである二価の基= CRR' を指す。アルキリデン基の非限定的な例には、 $=\text{CH}_2$ 、 $=\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)$ 、および $=\text{C}(\text{CH}_3)_2$ が含まれる。「アルカン」は、Rがこの用語が上で定義されるとおりのアルキルである、式H-Rを有する化合物のクラスを指す。

10

【0044】

「アルケニル」なる用語は、結合点として炭素原子を有し、直鎖または分枝鎖非環式構造を有し、少なくとも1つの非芳香族炭素-炭素二重結合を有し、炭素-炭素三重結合を有さず、かつ炭素および水素以外の原子を有しない、一価不飽和脂肪族基を指す。非限定的な例としては、 $-\text{CH}=\text{CH}_2$ (ビニル)、 $-\text{CH}=\text{CHCH}_3$ 、 $-\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ (アリル)、 $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_3$ 、および $-\text{CH}=\text{CHCH}=\text{CH}_2$ が挙げられる。「アルケンジイル」なる用語は、結合点として2つの炭素原子を有し、直鎖または分枝鎖非環式構造を有し、少なくとも1つの非芳香族炭素-炭素二重結合を有し、炭素-炭素三重結合を有さず、かつ炭素および水素以外の原子を有しない、二価不飽和脂肪族基を指す。基- $\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CHCH}_2-$ 、および $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2-$ は、アルケンジイル基の非限定的な例である。アルケンジイル基は脂肪族である一方、いったん両末端で連結されると、この基が芳香族構造の一部を形成することを妨げないことが注意される。「アルケン」および「オレフィン」なる用語は同義語であり、Rがこの用語が上で定義されるとおりのアルケニルである、式H-Rを有する化合物のクラスを指す。同様に、「末端アルケン」および「オレフィン」なる用語は同義語であり、たった1つの炭素-炭素二重結合を有するアルケンであって、その結合が分子の末端にあるビニル基の一部である、アルケンを指す。

20

【0045】

化学基が「置換」なる修飾語句と共に用いられる場合、1つまたは複数の水素原子は、各場合で独立して、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{F}$ 、 $-\text{Cl}$ 、 $-\text{Br}$ 、 $-\text{I}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{CO}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ 、 $-\text{NHCH}_3$ 、 $-\text{NHCH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_3$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_3$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$ 、または $-\text{S}(\text{O})_2\text{NH}_2$ で置き換えられている。例えば、以下の基は置換アルキル基の非限定的な例である： $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CN}$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、および $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ 。「ハロアルキル」なる用語は、置換アルキルの部分集合であり、炭素、水素およびハロゲン以外の他の原子が存在しないように、水素原子の置き換えがハロ (すなわち、 $-\text{F}$ 、 $-\text{Cl}$ 、 $-\text{Br}$ 、または $-\text{I}$) に限定されている。基- CH_2Cl は、ハロアルキルの非限定的な例である。「フルオロアルキル」なる用語は、置換アルキルの部分集合であり、炭素、水素およびフッ素以外の他の原子が存在しないように、水素原子の置き換えがフルオロに限定されている。基- CH_2F 、 $-\text{CF}_3$ 、および $-\text{CH}_2\text{CF}_3$ はフルオロアルキル基の非限定的な例である。

30

40

【0046】

「チオール反応基」なる用語は、メルカプト基($-\text{SH}$)との反応を受けて共有結合を形成することができる官能基である。このような基は文献において周知である。2つの原型的な基としては、ヨードアセトアミドなどのハロアセトアミド、ならびにマレイミドが挙げられる。これらの基は、システイン残基のメルカプト基と反応して硫黄原子へ共有結合を形成するために使用され得る。

【0047】

B. ブロックコポリマー

50

本明細書に開示されるpH応答性ミセルおよびナノ粒子はブロックコポリマーを含む。ブロックコポリマーは、親水性ポリマーセグメントおよび疎水性ポリマーセグメントを含む。疎水性ポリマーセグメントはpH感受性である。例えば、疎水性ポリマーセグメントは、pH感受性にするためにイオン化可能アミン基を含むことができる。ブロックコポリマーは、これらのイオン化可能ブロックコポリマーの超分子自己組織化に基づいてpH活性化可能ミセル(pHAM)ナノ粒子を形成する。より高いpHでは、ブロックコポリマーはミセルに集合し、一方、より低いpHで、疎水性ポリマーセグメント中のアミン基のイオン化がミセルの解離をもたらす。イオン化可能基は、異なるpHで微調整可能な親水性/疎水性ブロックとして機能することができ、ミセルの動的自己組織化に直接影響を与えることができる。

【0048】

10

いくつかの態様において、本ポリマーは、ポリカーボネートまたはポリ尿素のような分解性ポリマーベースを使用して構築される1つまたは複数のブロックを含有する。これらの成分は、疎水性ポリマーセグメントを構築するために使用され得る。いくつかの態様において、これらのポリマーセグメントは、ホモポリマーを形成するために1つのモノマー単位を含有する。他の態様において、ポリマーセグメントは、ポリマーセグメントを形成するために2つ以上のモノマー単位を含有し得る。ポリマーセグメントが2つ以上のモノマー単位を含有する場合、モノマー単位は、ある単位の単一のブロック、続いての追加のモノマー単位の各々についての別個のブロックであってもよく、または、異なるモノマー単位がポリマーブロック全体にわたってランダムに分散していてもよい。

【0049】

20

本明細書に記載されるポリマーを、例えば、上記、概要セクション、および下記の特許請求の範囲において示す。これらは、実施例セクションに概略を示す合成法を用いて作製してもよい。これらの方法は、当業者によって適用される有機化学の原理および技術を用いて、さらに改変および最適化することができる。そのような原理および技術は、例えば、Smith, March 's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, (2013)において教示され、これは参照により本明細書に組み入れられる。加えて、合成法は、当業者によって適用されるプロセス化学の原理および技術を用いて、バッチまたは連続のどちらでも、予備的、パイロットまたは大規模生産のために、さらに改変および最適化してもよい。そのような原理および技術は、例えば、Anderson, Practical Process Research & Development - A Guide for Organic Chemists (2012)において教示され、これは参照により本明細書に組み入れられる。

30

【0050】

本明細書に記載されるポリマーは、1つまたは複数の不斉に置換された炭素または窒素原子を含んでもよく、光学活性型またはラセミ型で単離されてもよい。したがって、特定の立体化学または異性体型が具体的に示されない限り、化学式のすべてのキラル、ジアステレオマー、ラセミ型、エピマー型、およびすべての幾何異性型が意図される。ポリマーは、ラセミ体およびラセミ混合物、単一の鏡像異性体、ジアステレオマー混合物および個々のジアステレオマーとして出現し得る。いくつかの態様において、単一のジアステレオマーを得る。ポリマーのキラル中心は、SまたはR立体配置を有し得る。いくつかの態様において、本ポリマーは、定義された立体化学的配向を有する2つ以上の原子を含有し得る。

40

【0051】

本明細書に記載されるポリマーを表すために用いる化学式は、典型的には、可能ないくつかの異なる互変異性体の1つを示すにすぎない。例えば、ケトン基の多くの型が対応するエノール基と平衡で存在することが公知である。同様に、イミン基の多くの型がエナミン基と平衡で存在する。所与の化合物についてどの互変異性体を示すかに関係なく、またどの1つが最も多いかに関係なく、所与の化学式のすべての互変異性体が意図される。

【0052】

加えて、本明細書に記載されるポリマーを構成する原子は、そのような原子のすべての同位体型を含むことが意図される。同位体は、本明細書において使用される場合、原子番号が同じであるが質量数は異なる原子を含む。一般的な例として、水素の同位体にはトリ

50

チウムおよび重水素が含まれ、炭素の同位体には ^{13}C および ^{14}C が含まれるが、これらに限定されない。

【0053】

いくつかの態様において、本明細書に記載されるポリマーは、塩または非塩形態で存在する。塩形態に関して、いくつかの態様において、塩が全体として薬理的に許容される限り、本明細書に記載されるポリマーの任意の塩形態の一部を形成する特定の陰イオンまたは陽イオンは重要ではない。薬学的に許容される塩ならびにそれらの調製法および使用法のさらなる例は、Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, and Use (2002)に示され、これは参照により本明細書に組み入れられる。

【0054】

C. ミセルシステムおよび組成物

本明細書に開示されるシステムおよび組成物は、異なるpHレベルに調整された単一のミセルまたは一連のミセルを利用する。さらに、ミセルは狭いpH転移範囲を有する。いくつかの態様において、ミセルは約1 pH単位未満のpH転移範囲を有する。様々な態様において、ミセルは約0.9 pH単位未満の、約0.8 pH単位未満の、約0.7 pH単位未満の、約0.6 pH単位未満の、約0.5 pH単位未満の、約0.4 pH単位未満の、約0.3 pH単位未満の、約0.25 pH単位未満の、約0.2 pH単位未満の、または約0.1 pH単位未満のpH転移範囲を有する。狭いpH転移範囲は、有利なことに、pHの微妙な変化でフルオロフォアの完全なターンオンをもたらし得るより鋭いpH応答を提供する。

【0055】

ミセルのサイズは、典型的にはナノメートルスケール（即ち、直径約1 nm～1 μm）である。いくつかの態様において、ミセルは約10～約200 nmのサイズを有する。いくつかの態様において、ミセルは約20～約100 nmのサイズを有する。いくつかの態様において、ミセルは約30～約50 nmのサイズを有する。

【0056】

D. 標的指向部分

ミセルおよびナノ粒子は標的指向部分をさらに含んでもよい。標的指向部分は、ナノ粒子またはミセルを、例えば、特定の細胞表面受容体、細胞表面マーカー、または細胞小器官（例えば、核、ミトコンドリア、小胞体、葉緑体、アポプラスト、またはペルオキシソーム）へ標的指向させるために使用することができる。このような標的指向部分は、受容体リサイクリング、マーカーリサイクリング、細胞内pH調節、エンドサイトーシス輸送の研究において有利である。

【0057】

標的指向部分は、例えば、抗体または抗体断片（例えば、Fab'断片）、タンパク質、ペプチド（例えば、シグナルペプチド）、アプタマー、または小分子（例えば、葉酸）であり得る。当技術分野において公知の方法を用いて、標的指向部分を、ブロックコポリマーへコンジュゲートする（例えば、親水性ポリマーセグメントへコンジュゲートする）ことができる。標的指向部分の選択は個々の標的に依存する。例えば、抗体、抗体断片、小分子、または結合パートナーが、細胞表面受容体および細胞表面マーカーを標的とするためにより適切であり得るが、一方、ペプチド、特にシグナルペプチドも、細胞小器官を標的とするためにより適切であり得る。

【0058】

E. 抗原

いくつかの局面において、本開示は、組成物に1種類または複数種類の抗原成分を提供する。抗原は、免疫応答を促進する物質であり、それにより、抗体が該物質に対して特異的に生成される。免疫原性がより大きいことで、免疫系が適切な免疫応答を容易に発生する物質もあれば、抗原に対する抗体を生成するのに十分な免疫応答を生成するために助けを要する物質もある。大部分のがんは、抗原に対する抗体の生成を強化するために追加的な活性化を要する可能性がある。抗原のいくつかの非限定的な例には、がん特異的表面タンパク質またはがん細胞によって過剰発現される表面タンパク質のタンパク質またはその

10

20

30

40

50

フラグメントが含まれる。

【 0 0 5 9 】

i. がん

多様な異なるペプチド、タンパク質フラグメント、またはタンパク質が、本組成物中に抗原として使用され得る。いくつかの非限定的な例は、5T4、707-AP (707アラニンプロリン)、9D7、AFP (-胎児タンパク質)、AlbZIP HPG1、 5 1-インテグリン、 5 6-インテグリン、 -メチルアシル-補酵素Aラセマーゼ、ART-4 (T細胞により認識される腺がん抗原4)、B7H4、BAGE-1 (B抗原)、BCL-2、BING-4、CA15-3/CA27-2 9、CA19-9、CA72-4、CA125、カルレチキュリン、CAMEL (メラノーマ上CTL認識抗原)、CASP-8 (カスパーゼ-8)、カテプシンB、カテプシンL、CD19、CD20、CD22、 10 CD25、CD30、CD33、CD40、CD52、CD55、CD56、CD80、CEA (がん胎児性抗原)、CLCA2 (カルシウム活性化塩素チャネル-2)、CML28、コアクトシン (Coactosin) 様タンパク質、コラーゲンXXIII型、COX-2、CT-9/BRD6 (プロモドメイン精巢特異タンパク質)、Cten (C末端テンシン様タンパク質)、サイクリンB1、サイクリンD1、cyp-B (シクロフィリンB)、CYPB1 (チトクロムP450 1B1)、DAM-10/MAGE-B1 (分化抗原メラノーマ10)、DAM-6/MAGE-B2 (分化抗原メラノーマ6)、EGFR/Her1、EMMPRIN (腫瘍細胞関連細胞外マトリックスメタロプロテイナーゼ誘導因子)、EpCam (上皮細胞接着分子)、EphA2 (エフリンA型受容体2)、EphA3 (エフリンA型受容体3)、ErbB3、EZH2 (Zesteホモログエンハンサー2)、FGF-5 (線維芽細胞増殖因子5)、F 20 N (フィブロネクチン)、Fra-1 (Fos関連抗原1)、G250/CAIX (糖タンパク質250)、GAGE-1 (G抗原1)、GAGE-2 (G抗原2)、GAGE-3 (G抗原3)、GAGE-4 (G抗原4)、GAGE-5 (G抗原5)、GAGE-6 (G抗原6)、GAGE-7b (G抗原7b)、GAGE-8 (G抗原8)、GDEP (前立腺差次的発現遺伝子)、GnT-V (N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼV)、gp100 (糖タンパク質100kDa)、GPC3 (グリピカン3)、HAGE (ヘリカーゼ抗原)、HAST-2 (ヒト印環腫瘍-2)、ヘプシン、Her2/neu/ErbB2 (ヒト上皮受容体-2/神経性)、HERV-K-MEL、HNE (ヒト好中球エラスターゼ)、ホメオボックスNKX3.1、HOM-TES-14/SCP-1、HOM-TES-85、HPV-E6、HPV-E7、HST-2、hTERT (ヒトテロメラーゼ逆転写酵素)、iCE (腸カルボキシシルエステラーゼ)、IGF-1R、IL-13Ra2 (インターロイキン13受容体 2鎖)、IL-2R、IL-5、未熟ラミニン受容体、カリクレイン2、カリクレイン4、Ki67、KIAA0205、KK-LC-1 (北九州肺がん抗原1)、KM 30 -HN-1、LAGE-1 (L抗原)、リビン (livin)、MAGE-A1 (メラノーマ抗原A1)、MAGE-A10 (メラノーマ抗原A10)、MAGE-A12 (メラノーマ抗原A12)、MAGE-A2 (メラノーマ抗原A2)、MAGE-A3 (メラノーマ抗原A3)、MAGE-A4 (メラノーマ抗原A4)、MAGE-A6 (メラノーマ抗原A6)、MAGE-A9 (メラノーマ抗原A9)、MAGE-B1 (メラノーマ抗原B1)、MAGE-B10 (メラノーマ抗原B10)、MAGE-B16 (メラノーマ抗原B16)、MAGE-B17 (メラノーマ抗原B17)、MAGE-B2 (メラノーマ抗原B2)、MAGE-B 3 (メラノーマ抗原B3)、MAGE-B4 (メラノーマ抗原B4)、MAGE-B5 (メラノーマ抗原B5)、MAGE-B6 (メラノーマ抗原B6)、MAGE-C1 (メラノーマ抗原C1)、MAGE-C 2 (メラノーマ抗原C2)、MAGE-C3 (メラノーマ抗原C3)、MAGE-D1 (メラノーマ抗原D1)、MAGE-D2 (メラノーマ抗原D2)、MAGE-D4 (メラノーマ抗原D4)、MAGE- 40 E1 (メラノーマ抗原E1)、MAGE-E2 (メラノーマ抗原E2)、MAGE-F1 (メラノーマ抗原F1)、MAGE-H1 (メラノーマ抗原H1)、MAGEL2 (MAGE様2)、マンマグロビンA、MART-1/Melan-A (T細胞により認識されるメラノーマ抗原1/メラノーマ抗原A)、MART-2 (T細胞により認識されるメラノーマ抗原2)、マトリックスタンパク質22、MC1R (メラノコルチン1受容体)、M-CSF (マクロファージコロニー刺激因子遺伝子)、メソセリン、MG50/PXDN、MMP11 (M期リンタンパク質11)、MN/CA IX抗原、MRP-3 (多剤耐性関連タンパク質3)、MUC1 (ムチン1)、MUC2 (ムチン2)、NA88-A (患者M88のNA cDNAクローン)、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ-V、Neo-PAP (Neo-ポリ(A)ポリメラーゼ)、NGEP、NMP22、NPM/ALK (ヌクレオフォスミン/未分化リンパ腫キナーゼ融合タンパク質)、NSE (神経特異的エノラーゼ)、NY-ESO-1 50

(ニューヨーク食道 (esophageous) 1)、NY-ESO-B、OA1 (眼白子症1型タンパク質)、OFA-iLRP (がん胎児抗原-未熟ラミニン受容体)、OGT (O-結合型N-アセチルグルコサミントランスフェラーゼ遺伝子)、OS-9、オステオカルシン、オステオポンチン、p15 (タンパク質15)、p15、p190マイナーbcr-abl、p53、PAGE-4 (前立腺GAGE様タンパク質4)、PAI-1 (プラスミノージェン活性化因子阻害物質1)、PAI-2 (プラスミノージェン活性化因子阻害物質2)、PAP (前立腺酸性ホスファターゼ)、PART-1、PATE、PDEF、Pim-1-キナーゼ、Pin1 (プロピルイソメラーゼ)、POTE、PRAME (メラノーマ優先発現抗原)、プロステイン (prostein)、プロテイナーゼ3、PSA (前立腺特異抗原)、PSCA、PSGR、PSM、PSMA (前立腺特異膜抗原)、RAGE-1 (腎性抗原)、RHAMM/CD168 (ヒアルロン酸媒介運動性受容体)、RU1 (腎遍在性1)、RU2 (腎遍在性1)、S-100、SAGE (肉腫抗原)、SART-1 (扁平上皮抗原拒絶腫瘍1)、SART-2 (扁平上皮抗原拒絶腫瘍1)、SART-3 (扁平上皮抗原拒絶腫瘍1)、SCC (扁平上皮がん抗原)、Sp17 (精子タンパク質17)、SSX-1 (滑膜肉腫Xブレークポイント1)、SSX-2/HOM-MEL-40 (滑膜肉腫Xブレークポイント)、SSX-4 (滑膜肉腫Xブレークポイント4)、STAMP-1、STEAP (6回膜貫通上皮抗原前立腺)、サバイビング (surviving)、サバイピン2B (イントロン2保持サバイピン)、TA-90、TAG-72、TARP、TGFb (TGF)、TGFbRII (TGF 受容体II)、TGM-4 (前立腺特異的トランスグルタミナーゼ)、TRAG-3 (タキソール耐性関連タンパク質3)、TRG (テスチン (testin) 関連遺伝子)、TRP-1 (チロシン関連タンパク質1)、TRP-2/6b (TRP-2/新規エクソン6b)、TRP-2/INT2 (TRP-2/イントロン2)、Trp-p8、チロシナーゼ、UPA (ウロキナーゼ型プラスミノージェン活性化因子)、VEGF (血管内皮増殖因子)、VEGFR-2/FLK-1 (血管内皮増殖因子受容体2)、WT1 (ウィルムス腫瘍遺伝子) を含み、または例えば、 α -アクチニン-4/m、ARTC1/m、bcr/abl (ブレークポイントクラスター領域-エーベルソン融合タンパク質)、 β -カテニン/m (β -カテニン)、BRCA1/m、BRCA2/m、CASP-5/m、CASP-8/m、CDC27/m (細胞分裂周期27)、CDK4/m (サイクリン依存性キナーゼ4)、CDKN2A/m、CML66、COA-1/m、DEK-CAN (融合タンパク質)、EFTUD2/m、ELF2/m (伸長因子2)、ETV6-AML1 (Ets異種遺伝子6/急性骨髄性白血病1遺伝子融合タンパク質)、FN1/m (フィブロネクチン1)、GPNMB/m、HLA-A*0201-R170I (HLA-A2遺伝子中の 2ドメインの α -ヘリックスの残基170におけるアルギニンからイソロイシンへの交換)、HLA-A11/m、HLA-A2/m、HSP70-2M (熱ショックタンパク質70-2変異型)、KIAA0205/m、K-Ras/m、LDLR-FUT (LDR-フコシルトランスフェラーゼ融合タンパク質)、MART2/m、ME1/m、MUM-1/m (メラノーマ遍在性変異型1)、MUM-2/m (メラノーマ遍在性変異型2)、MUM-3/m (メラノーマ遍在性変異型3)、ミオシンクラスI/m、neo-PAP/m、NFYC/m、N-Ras/m、OGT/m、OS-9/m、p53/m、Pml/RAR (前骨髄球性白血病/レチノイン酸受容体)、PRDX5/m、PTPRK/m (受容体型タンパク質チロシンホスファターゼ)、RBAF600/m、SIRT2/m、SYT-SSX-1 (シナプトタグミンI/滑膜肉腫X融合タンパク質)、SYT-SSX-2 (シナプトタグミンI/滑膜肉腫X融合タンパク質)、TEL-AML1 (トランスロケーションEtsファミリー白血病/急性骨髄性白血病1融合タンパク質)、TGF RII (TGF 受容体II)、TPI/m (トリオースホスファターゼイソメラーゼ) を非限定的に含む群より選択される、がん疾患に発現される変異型抗原を含み得る。

【 0 0 6 0 】

F. キット

本開示はまたキットを提供する。本明細書に開示される成分のいずれかをキット中に組み込むことができる。ある態様において、キットは、上述のpH応答性システムまたは組成物を含む。

【 0 0 6 1 】

キットは、少なくとも1つのバイアル、試験管、フラスコ、ボトル、注射器または他の容器を概して含み、この中に成分を入れることができ、好ましくは、適切に分注させ得る。キット中に2種以上の成分が存在する場合、キットはまた、追加の成分が別に入れられ得る、第2、第3または他の追加の容器を概して含有する。しかし、成分の様々な組み合わせ

せが1つの容器中に含まれていてもよい。いくつかの態様において、シリーズ中のミセル集団の全てが単一の容器中で組み合わせられる。他の態様において、シリーズ中のミセル集団の一部または全てが別々の容器中に提供される。

【0062】

本開示のキットはまた、典型的に、商品販売のため厳重に密封した様々な容器を含有する包装を含む。このような包装は、所望の容器が保持される、ボール紙または射出もしくはブロー成形プラスチック包装を含み得る。キットはまた、キット成分を使用するための説明書を含んでもよい。説明書は、実施することができるバリエーションを含んでもよい。

【実施例】

【0063】

10

G. 実施例

以下の実施例は本開示の好ましい態様を実証するために含まれる。以下の実施例に開示される技術は、本開示の実施において十分に機能することが本発明者によって見出された技術を示し、従って、その実施のための好ましいモードを構成すると考えられ得ることが、当業者によって認識されるべきである。しかし、当業者は、本開示に照らし、本開示の精神および範囲から逸脱することなく、開示される具体的な態様において多くの変更を行い、同様または類似の結果を依然として得ることができることを認識するべきである。

【0064】

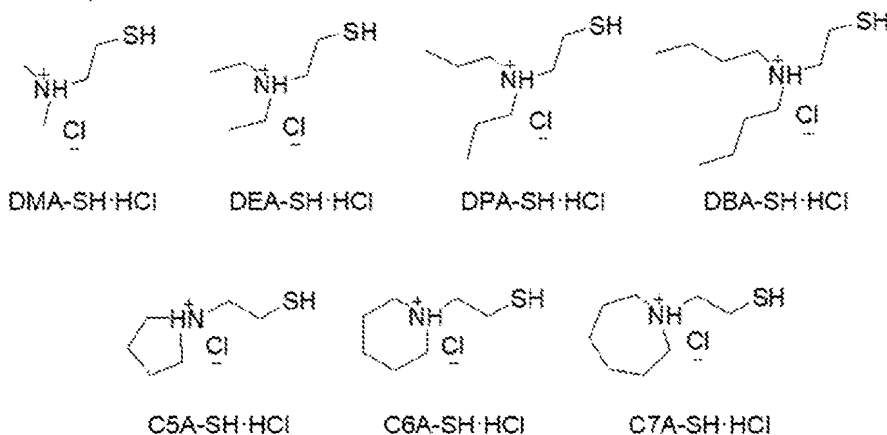
実施例1：合成キャラクタリゼーション、材料、および方法

1. 材料

20

全ての試薬を、指定されない限り、商業的供給源から購入したかまたは合成し、さらに精製することなく使用した。それらは、ポリ(エチレングリコール)メチルエーテル(mPEG 5k-OH、 $M_n = 5.4 \times 10^3$ g/mol、 ^1H NMRによって測定した)、1-(3,5-ビス-トリフルオロメチル-フェニル)-3-シクロヘキシルチオ尿素(TU、合成した) (Natarajan et al., 2005)、1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデカ-7-エン(DBU、99%、Sigma-Aldrich)、ジプロピルアミン(DPA、99%、Sigma-Aldrich)、ジブチルアミン(DBA、99.5%、Sigma-Aldrich)、ピロリジン(C5A、99%、Sigma-Aldrich)、ピペリジン(C6A、99.5%)、ヘキサメチレンイミン(C7A、99%、Sigma-Aldrich)、エチレンスルフィド(98%、Sigma-Aldrich)、2,2-ジメトキシ-2-フェニルアセトフェノン(DMPA、99%、Sigma-Aldrich)であった。2-ジメチルアミノエタントール塩酸塩(DMA-SH·HCl、95%)および2-ジエチルアミノエタントール塩酸塩(DEA-SH·HCl、95%)をSigma-Aldrichから購入した。他のアミノチオール塩酸塩分子(下記に示される)を、報告された通りに(Hao et al., 2015)合成した。

30



40

【0065】

PEO-b-PMACコポリマーの合成

まず、5-メチル-5-アリルオキシカルボニル-1,3-ジオキサン-2-オン(MAC)モノマーを報告された通りに(Hu et al., 2007)合成した。PEO-b-PMACコポリマーを、開始剤とし

50

てmPEG_{5k}-OHを用いて開環重合(ROP)によって合成した([モノマー]/[開始剤] = 200)。典型的に、精製アルゴンで満たされたグローブボックス中において、シュレンク反応フラスコに0.4 g mPEG_{5k}-OH、3.2 g MACモノマーおよび16.0 mLジクロロメタン(DCM)を入れた。3回の凍結-ポンプ-解凍サイクル後、重合を開始するために0.6 g TUおよび0.16 mL DBUを導入した。反応を30 で15時間油浴中に置き、次いで安息香酸の添加によってクエンチした。DCM溶媒を蒸発によって除去し、濃縮残渣を過剰量の冷エーテル中へ沈殿させた。未反応出発物質および不純物を除去するために、精製プロセスを2回繰り返した。結果として生じたPEO-b-PMACコポリマーを400 MHz ¹H NMR、ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC、Viscotech GPCmax、PLgel 5 μm MIXED-Dカラム、Polymer Labs製。1% v/v TEAを含むTHFを溶出剤として1.0 mL/分で使用した)によって特徴付けた。PEG₁₂₃-b-PMAC₁₂₅について、

10

¹H NMR (400 MHz,

CDCl₃, 25 °C): δ 5.92-5.84 (m, 1H, -CH=CH₂), 5.33-5.23 (m, 2H, -CH=CH₂), 4.63 (br, 2H, -OCH₂CH=CH₂), 4.38-4.22 (m, 4H, -OCH₂-C-CH₂O-), 3.64 (s, 2H, -OCH₂CH₂), 3.38 (s, 3H, -OCH₃), 1.28 (s, 3H, CH₃), 1.22 (s, 3H, C(CH₃)CH₂OH). GPC (THF, IR): $M_n = 2.58 \times 10^4$ g/mol, $M_w = 3.47 \times 10^4$ g/mol, $M_w/M_n = 1.35$).

【 0 0 6 6 】

20

PEO-b-P(MAC-SR · HCl)コポリマーの合成

PEO-b-P(MAC-SR · HCl)コポリマーを、アリル含有PEO-b-PMACとアミノチオール塩酸塩とのチオール-エン反応によって合成した。下記において、本発明者らは一例としてPEO-b-P(MAC-SDEA · HCl)の合成を選択した。まず、0.1 g PEO₁₂₃-b-PMAC₁₂₅ (0.419 mmol)を石英フラスコ中の15 mL DMF中に溶解し、窒素下で10 ~ 20分間撹拌した。次いで、1.06 g DEA-SH · HCl (6.29 mmol)および21.5 mg DMPA (0.084 mmol)をフラスコ中へ添加した。さらに20分間窒素パージした後、反応を開始するためにフラスコをUV光(365 nm)下に置いた。12時間後、反応混合物を蒸留水中において透析し、凍結乾燥し、白色粉末が得られた。一連のPEO-b-P(MAC-SR · HCl)コポリマーを¹H NMRおよびGPCによって確認した。結果を表1に要約する。

30

【 0 0 6 7 】

(表1) PEO-b-P(MAC-SR · HCl)コポリマーのキャラクタリゼーション

40

50

コポリマー	$M_{n,HNMR}$ ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	P(MAC-SR·HCl)の 繰り返し単位の数	$M_{w,GPC}$ ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) ^c	$M_{n,GPC}$ ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) ^c	PDI ^c
PEO ₁₂₃ - <i>b</i> -P(MAC-SDMA·HCl) ₁₃₅	5.2×10^4	135 ^a	3.8×10^4	2.4×10^4	1.58
PEO ₁₂₃ - <i>b</i> -P(MAC-SDEA·HCl) ₁₁₅	4.8×10^4	115 ^b	3.2×10^4	2.0×10^4	1.56
PEO ₁₂₃ - <i>b</i> -P(MAC-SDPA·HCl) ₁₁₅	5.1×10^4	115 ^b	3.7×10^4	2.4×10^4	1.52
PEO ₁₂₃ - <i>b</i> -P(MAC-SDBA·HCl) ₁₀₅	5.5×10^4	105 ^b	3.3×10^4	2.0×10^4	1.65
PEO ₁₂₃ - <i>b</i> -P(MAC-SC5A·HCl) ₁₁₀	4.6×10^4	110 ^b	3.0×10^4	1.9×10^4	1.58
PEO ₁₂₃ - <i>b</i> -P(MAC-SC6A·HCl) ₁₁₅	5.5×10^4	115 ^b	3.2×10^4	2.2×10^4	1.49
PEO ₁₂₃ - <i>b</i> -P(MAC-SC7A·HCl) ₁₃₅	5.9×10^4	135 ^a	3.9×10^4	2.7×10^4	1.45

^a PEO-*b*-PMACコポリマー前駆体についての繰り返し単位の数140である。

^b PEO-*b*-PMACコポリマー前駆体についての繰り返し単位の数125である。

^c $M_{w,GPC}$ 、 $M_{n,GPC}$ およびPDI ($M_{w,GPC}/M_{n,GPC}$)は、GPC中において標準としてのポリスチレンおよび溶出溶媒としてのTHF (1% v/v TEA)を使用することによって得られた。

【 0 0 6 8 】

10

20

30

40

50

PEO₁₂₃-*b*-P(MAC-SDMA·HCl)₁₃₅ (PSDMA) ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ 4.29 (s, 4H, -OCH₂-C-CH₂O-), 4.25 (t, 2H, -OCH₂CH₂-), 3.64 (s, 2H, -OCH₂CH₂), 3.38 (s, 3H, -OCH₃), 3.35-3.31 (t, 2H, -SCH₂CH₂N-), 3.02-2.98 (m, 2H, -SCH₂CH₂N-), 2.92 (s, 6H, -N(CH₃)₂), 2.66 (t, 2H, -OCH₂CH₂CH₂S-), 2.00-1.95 (m, 2H, -OCH₂CH₂CH₂S-), 1.28 (s, 3H, -CH₃).

PEO₁₂₃-*b*-P(MAC-SDEA·HCl)₁₁₅ (PSDEA) ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ 4.29 (s, 4H, -OCH₂-C-CH₂O-), 4.25 (t, 2H, -OCH₂CH₂-), 3.64 (s, 2H, -OCH₂CH₂), 3.38 (s, 3H, -OCH₃), 3.20-3.14 (m, 6H, -SCH₂CH₂N(CH₂CH₃)₂-), 3.03-3.00 (m, 2H, -SCH₂CH₂N-), 2.66 (t, 2H, -OCH₂CH₂CH₂S-), 2.00-1.95 (m, 2H, -OCH₂CH₂CH₂S-), 1.38 (t, 6H, -N(CH₂CH₃)₂), 1.28 (s, 3H, -CH₃).

10

PEO₁₂₃-*b*-P(MAC-SDPA·HCl)₁₁₅ (PSDPA) ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ 4.29 (s, 4H, -OCH₂-C-CH₂O-), 4.25 (t, 2H, -OCH₂CH₂-), 3.64 (s, 2H, -OCH₂CH₂), 3.38 (s, 3H, -OCH₃), 3.19 (s, 2H, -SCH₂CH₂N-), 3.04-2.98 (m, 2H, -SCH₂CH₂N- and -N(CH₂CH₂CH₃)₂), 2.66 (t, 2H, -OCH₂CH₂CH₂S-), 2.00-1.95 (m, 2H, -OCH₂CH₂CH₂S-), 1.85-1.81 (m, 4H, -N(CH₂CH₂CH₃)₂), 1.28 (s, 3H, -CH₃), 1.01 (t, 6H, -N(CH₂CH₂CH₃)₂).

20

PEO₁₂₃-*b*-P(MAC-SDBA·HCl)₁₀₅ (PSDBA) ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ 5.92-5.84 (m, 1H, -CH=CH₂), 5.33-5.23 (m, 2H, -CH=CH₂), 4.64-4.63 (d, 2H, -OCH₂CH=CH₂), 4.34-4.28 (m, 4H, -OCH₂-C-CH₂O-), 4.24 (t, 2H, -OCH₂CH₂-), 3.64 (s, 2H, -OCH₂CH₂), 3.38 (s, 3H, -OCH₃), 2.92 (m, 2H, -SCH₂CH₂N-), 2.82 (m, 2H, -SCH₂CH₂N-), 2.75 (m, 4H, -N(CH₂CH₂CH₂CH₃)₂), 2.62 (t, 2H, -OCH₂CH₂CH₂S-), 1.98-1.93 (m, 2H, -OCH₂CH₂CH₂S-), 1.60 (s, 4H, -N(CH₂CH₂CH₂CH₃)₂), 1.39-1.33 (m, 4H, -N(CH₂CH₂CH₂CH₃)₂), 1.29-1.29 (m, 6H, -CH₃), 0.95 (t, 6H, -N(CH₂CH₂CH₂CH₃)₂).

30

PMACのアリル基のうちの少量のパーセンテージは、ジブチル基の立体障害により、DBA-SH・HClと完全には反応しなかった。

40

50

PEO₁₂₃-b-P(MAC-SC5A·HCl)₁₁₀ (PSC5A) ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ 4.29 (s, 4H, -OCH₂-C-CH₂O-), 4.25 (t, 2H, -OCH₂CH₂-), 3.64 (s, 2H, -OCH₂CH₂), 3.38 (s, 3H, -OCH₃), 3.55-3.29 (m, 6H, -SCH₂CH₂N(CH₂CH₂)₂), 3.01 (m, 2H, -SCH₂CH₂N-), 2.66 (t, 2H, -OCH₂CH₂CH₂S-), 2.11 (s, 4H, -N(CH₂CH₂)₂), 2.00-1.95 (m, 2H, -OCH₂CH₂CH₂S-), 1.28 (s, 3H, -CH₃).

PEO₁₂₃-b-P(MAC-SC6A·HCl)₁₁₅ (PSC6A) ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ 4.29 (s, 4H, -OCH₂-C-CH₂O-), 4.25 (t, 2H, -OCH₂CH₂-), 3.64 (s, 2H, -OCH₂CH₂), 3.38 (s, 3H, -OCH₃), 3.21 (br, 6H, -SCH₂CH₂N(CH₂CH₂)₂CH₂), 3.07 (s, 2H, -SCH₂CH₂N-), 2.66 (t, 2H, -OCH₂CH₂CH₂S-), 2.00 (m, 6H, -OCH₂CH₂CH₂S- and -N(CH₂CH₂)₂CH₂), 1.68 (m, 2H, -N(CH₂CH₂)₂CH₂), 1.28 (s, 3H, -CH₃).

10

PEO₁₂₃-b-P(MAC-SC7A·HCl)₁₃₅ (PSC7A) ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ 4.29 (s, 4H, -OCH₂-C-CH₂O-), 4.25 (t, 2H, -OCH₂CH₂-), 3.64 (s, 2H, -OCH₂CH₂), 3.38 (s, 3H, -OCH₃), 3.26 (s, 2H, -SCH₂CH₂N-), 3.23-3.21 (m, 4H, -N(CH₂CH₂CH₂)₂), 2.66 (t, 2H, -OCH₂CH₂CH₂S-), 2.00-1.95 (m, 6H, -OCH₂CH₂CH₂S- and -N(CH₂CH₂CH₂)₂), 1.74 (s, 2H, -N(CH₂CH₂CH₂)₂), 1.28 (s, 3H, -CH₃).

20

【 0 0 6 9 】

ミセルナノ粒子の調製

PEO-b-P(MAC-SC7A)を一例として使用する。典型的な手順において、10 mg PEO₁₂₃-b-P(MAC-SC7A·HCl)₁₃₅コポリマーを、150 mM NaClを含む蒸留水中に溶解した。最終pH値を8.0超に調節するために、NaOH溶液を添加した。3000 Da分子量カットオフ遠心管を用いた超遠心分離を3サイクル行うことによって、過剰なNaOHおよび塩を除去した。ポリマー濃度を1.0 mg/mLに調節するために、蒸留水をミセル溶液へ添加した。

30

【 0 0 7 0 】

pH滴定実験

PEO-b-P(MAC-SC7A)を一例として使用する。典型的な実験において、ポリマー濃度を1.0 mg/mLにするために、10 mg PEO₁₂₃-b-P(MAC-SC7A·HCl)₁₃₅コポリマーを、先ず、10 mL蒸留水中に溶解した。塩濃度を150 mMへ調節するために、NaClを添加した。次いで、PEO₁₂₃-b-P(MAC-SC7A·HCl)₁₃₅コポリマーを完全に脱プロトン化するために、NaOH溶液を添加した。攪拌下で少量(1 μLずつ)の0.5 M HCl溶液を添加することによって、pH滴定を行った。pH値を、微小電極を備えるMettler Toledo pHメーターを使用して測定した。全範囲におけるpH減少を、総添加HCl体積の関数としてモニターした。完全プロトン化状態(100%プロトン化度)および脱プロトン化状態(0%プロトン化度)を、pH滴定曲線の一次微分の2つの極値点によって決定した。選択されたプロトン化度で、100 μLのポリマー溶液を動的光散乱測定(DLS、Malvern Nano-ZSモデル、He-Neレーザー、λ = 633 nm)のために取り出した。他のPEO-b-P(MAC-SR)コポリマーも同様の滴定手順に従った。

40

【 0 0 7 1 】

異なるコポリマーのTEM画像

ポリマー濃度を1.0 mg/mLにするために、PEO₁₂₃-b-P(MAC-SC7A·HCl)₁₃₅を、先ず、蒸留水中に溶解した。塩濃度を150 mMへ調節するために、NaClを添加した。滴定座標に基づいて、プロトン化度を95%および85%へ調節するために、対応する量の0.5 M NaOHを添加した。ポリマー溶液を0.2 mg/mLへ希釈し、銅グリッド上に落とした。グリ

50

ッドを乾燥させ、蒸留水を使用してグリッドを数秒間リンスし、NaClを除去し、その後、ネガティブ染色のためにリンタンゲステン酸(PTA)を添加した。同様に、55%および45%のプロトン化度を有するPEO₁₂₃-b-P(MAC-SDMA)₁₃₅コポリマーをTEMによって画像化した。

【0072】

pH 6.5および7.4緩衝液中におけるPEO₁₂₃-b-P(MAC-SC7A)₁₃₅の分解研究

pH 6.5および7.4の重水素化リン酸緩衝溶液をD₂O中のNa₂HPO₄およびNaH₂PO₄ (50 mM)によって調製した。NaClを150 mMの最終濃度に達するまで添加した。pH 6.5溶液では、ポリマー濃度を5.0 mg/mLにするために、5.0 mg PEO₁₂₃-b-P(MAC-SC7A・HCl)₁₃₅コポリマーを1.0 mL 重水素化リン酸緩衝溶液中に溶解した。ポリマー溶液のpHを濃NaODおよびDCl溶液によって6.5へさらに調節した。管を次いで密封し、150 rpmの速度で37 振盪機中へ置いた。ある時間で、ポリマー溶液を¹H NMR測定のためにNMRチューブ中へ移した。ポリマー溶液のpHを1日おきに調節した。pH 7.4溶液研究を同様の手順に従って行った。

【0073】

等温滴定カロリーメトリー(ITC)

Marvin ITC200マイクロカロリーメーターを使用して、STING二量体およびdUPSコポリマー間の結合親和性を測定するために、ITCを使用した。25 mM HEPES (pH 6.5)を含有する緩衝液中において20 で滴定を行った。滴定トレースをNITPICによって積分し、曲線をSEDFITによってフィッティングした。GUSSEI (biophysics.swmed.edu/MBR/software.html)を使用して、図を作成した。

【0074】

STINGレポーター実験

THP1-ISG細胞(5 × 10⁵細胞/mL)を、37 で5% CO₂および正常O₂レベル中にて48時間、完全培地(RPMI-1640、10%ウシ胎仔血清、100 U/mLペニシリンGナトリウムおよび100 μg/mLストレプトマイシン)中においてホルボール12-ミリストート13-アセタート(PMA)と共にインキュベートし、さらに24時間、新鮮培地を補充した。次いで、細胞を、48時間、異なるdUPSコポリマー(0.5 μM)を含む新鮮培地と共にインキュベートした。細胞培養上清中のIRF誘導性Luciアルシフェラーゼのレベルを、ルシフェラーゼ検出試薬であるQUANTI-Luc (商標)を用いて評価した。

【0075】

PSC7Aワクチンおよび腫瘍療法実験

腫瘍特異的抗原ペプチドおよびPSC7Aナノ粒子を物理的に混合することによって、ナノワクチンを作製した。非分解性PC7Aベースのナノワクチンを比較のために使用した。6~8週齢のC57BL/6マウスの右大腿部に、2 × 10⁵個のTC-1細胞またはB16F10メラノーマ細胞を皮下接種した。TC-1腫瘍モデルにおいて、接種後8、14、24日目に、PBS、E7p単独(0.5 μg)、PSC7A NP単独(30 μg)、低用量PSC7Aナノワクチン(6 μg PSC7A NP中0.1 μg E7p)、高用量PSC7Aナノワクチン(30 μg PSC7A NP中0.5 μg E7p)、および高用量PC7Aナノワクチン(30 μg PC7A NP中0.5 μg E7p)を、マウスの尾基部中へ皮下注射した。B16F10腫瘍モデルにおいて、接種後5、10、15日目に、PBS、Trp1,2単独(0.5 μg Trp1₂₁₄₋₂₃₇および0.5 μg Trp2₁₇₃₋₁₉₆)、PSC7A NP単独(30 μg)、低用量PSC7Aナノワクチン(6 μg PSC7A NP中0.1 μg Trp1および0.1 μg Trp2)、高用量PSC7Aナノワクチン(30 μg PSC7A NP中0.5 μg Trp1および0.5 μg Trp2)、および高用量PC7Aナノワクチン(30 μg PC7A NP中0.5 μg Trp1および0.5 μg Trp2)を、マウスの尾基部中へ皮下注射した。腫瘍増殖を、その後、デジタルキャリパーを用いて測定し、0.5 × 長さ × 幅²として計算した。腫瘍体積が2000 mm³に達した時点でマウスを犠牲にした。

【0076】

統計解析

OriginおよびGraphpad Prismを使用して統計解析を行った。データを平均値 ± s.e.m.として表す。データをt-検定によって解析し、P 0.05 (**P 0.001、**P 0.01

、*P (0.05)の場合、統計的に有意と見なした。

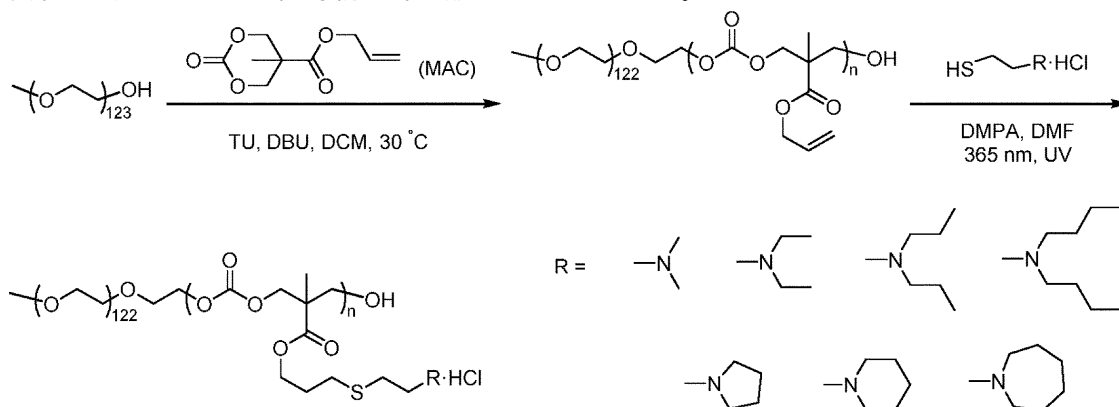
【0077】

実施例2：pH応答性生分解性ポリマーのライブラリーの合成およびキャラクタリゼーション

スキーム1は、開環重合(ROP)を使用する生分解性UPSコポリマーの合成を示す(Chen et al., 1997; Brannigan and Dove, 2017; Feng et al., 2012)。最初に、アリル官能化ブロックコポリマー、ポリ(エチレンオキシド)-b-ポリ(5-メチル-5-アリルオキシカルボニル-1,3-ジオキサン-2-オン) (PEO-b-PMAC)を、ジクロロメタン(DCM)中において高分子開始剤としてのメトキシ末端ポリエチレングリコール(PEO)(mPEG_{5k}-OH、 $M_n = 5.4 \times 10^3$ g/mol、¹H NMRによって測定した)および環状モノマーとしての5-メチル-5-アリルオキシカルボニル-1,3-ジオキサン-2-オン(MAC)を使用して合成した。1-(3,5-ビス-トリフルオロメチル-フェニル)-3-シクロヘキシルチオ尿素(TU)および1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデカ-7-エン(DBU)の有機共触媒を使用した。反応混合物を30℃で15時間加熱し、¹H NMRによって測定してPMACセグメント中125~140個の繰り返し単位を有するPEO-b-PMACコポリマーが得られた。pH感受性を与えるために、PEO-b-PMACを、UV光(365 nm、スキーム1)下でチオール-エン反応によって一連のプロトン化第3級アミン(R・HCl)とさらに反応させた。結果として、生分解性超pH感受性コポリマーPEO-b-P(MAC-SR・HCl)のライブラリーを、プロトン化状態で合成した(表1)。PSRは、下記のブロックコポリマーPEO-b-P(MAC-SR・HCl)およびその脱プロトン化状態を指すために使用した。

【0078】

スキーム1．開環重合およびチオール-エン反応によるPEO-b-P(MAC-SR・HCl)の合成。最終コポリマーは、親水性PEOセグメント、生分解性ポリカーボネート骨格、およびpH感受性を与えるイオン化可能な第3級アミンからなる。



【0079】

新たに合成された一連のdUPSコポリマー(1.0 mg/mL)のpH滴定を、生理食塩濃度を模倣するために150 mM NaClの存在下で行った。データをコポリマー上の第3級アミン残基のプロトン化度に対するpHとして示す。プロトン化度をプロトン化形態の総アミンのモル百分率として計算した。各コポリマーの見かけのpK_aを、プロトン化度が50%となるpHとして測定した。pH転移の鋭さを評価するために、10%プロトン化度と90%プロトン化度との間のpH範囲である、pH_{10%-90%}を各コポリマーについて測定した。

【0080】

結果は、PEO₁₂₃-b-P(MAC-SDMA)₁₃₅ (ジメチルアミン側鎖を有するコポリマー) (PSDMA)を除いて、全ての他のコポリマーがpH滴定座標の大部分において超pH感受性挙動を示したことを示す(図1A)。超感受性pH応答は、広範囲のプロトン化度にわたる、特に10%から90%までにおける、顕著なpHプラトーによって表され、これは、狭いpH範囲内での強いpH緩衝効果を実証している。興味深いことに、PEO₁₂₃-b-P(MAC-SDMA)₁₃₅は二セグメント化pH応答を示し、50%超のプロトン化度では広い応答、50%未満では狭い応答

を示した(図4を参照のこと)。 $\text{pH}_{10\%-90\%}$ 値はこれらのコポリマーについて0.5以下であった。ジメチルアミン側鎖を有するPSDMAについて、より高い $\text{pH}_{10\%-90\%}$ 値(1.2)が観察された。一般的に使用されるポリ塩基(例えば、ポリ(エチレンジイミン)、キトサン、ポリヒスチジン、ポリリジン)は、 $\text{pH}_{10\%-90\%}$ 2である広いpH応答を示す(図19) (Li et al., 2016)。さらに、ジメチルアミン側鎖を有する非分解性PMMAコポリマーは、全pH滴定座標にわたって広いpH応答を示した(Li et al., 2016)。

【0081】

PEO-b-P(MAC-SR·HCl)コポリマーの見かけの pK_a 値は、第3級アミン置換基の疎水性と逆相関を示した(図1B)。P(MAC-SR)セグメント(中性/脱プロトン化状態)の繰り返し単位のオクタノール-水分配係数(log P)を、分子疎水性を定量化するために使用した。データは、環状または線形アミンを含有するコポリマーについてのlog Pの関数としての見かけの pK_a の収束した線形相関を示す。より疎水性の側鎖がより低い pK_a 値をもたらした。これらのコポリマーの pK_a 値は、7.7 ~ 5.2の広範囲の生理的pHを包含した。

【0082】

log Pの関数としての $\text{pH}_{10\%-90\%}$ のプロットは、超pH感受性応答についての疎水性閾値の存在を示す(図1C)。log P 2を有するコポリマーについて、 $\text{pH}_{10\%-90\%}$ 値は0.5以下であった。log P 2であるPEO₁₂₃-b-P(MAC-SDMA)₁₃₅について、より高い $\text{pH}_{10\%-90\%}$ 値(1.2)が観察された。比較のために、最も一般的に使用されるポリ塩基(例えば、ポリ(エチレンジイミン)、キトサン、ポリヒスチジン、ポリリジン)は、log P 2を有して親水性であり、広いpH応答を示す。ポリ(エチレンジイミン)は、その強い親水性(log P = -3.8)およびプロトン化過程における負の協同性に起因して、最も高い $\text{pH}_{10\%-90\%}$ 値(5.6)を有した。これらの結果は非分解性PMMAポリマーと一致しており、分子疎水性が両システムにおける超pH感受性についての共通のドライバーであることを示唆している(Li et al., 2016)。

【0083】

2つのコポリマーPEO₁₂₃-b-P(MAC-SC7A)₁₃₅ (PSC7A)およびPEO₁₂₃-b-P(MAC-SDMA)₁₃₅ (PSDMA)について、疎水性駆動相転移(即ち、ミセル化)およびpH感受性に対するその影響を、疎水性閾値を上回るおよび下回るlog P値を用いて調べた。PEO₁₂₃-b-P(MAC-SC7A)₁₃₅について、pH滴定中の動的光散乱(DLS)結果(図2A)は、プロトン化度が90%を上回った場合、ポリマー鎖は10 nm未満の流体力学的径を有するユニマーとして存在したことを示している。散乱計数率の増加によって示されるように、プロトン化度が90%以下へ低下した場合、ミセルが形成し始めた。臨界ミセル化プロトン化度(CMPD)は、それを下回るとポリマー鎖が自己組織化し始めるプロトン化度として定義された。PEO₁₂₃-b-P(MAC-SC7A)₁₃₅について、CMPD値は90%である。95%および85%のプロトン化度でのPEO₁₂₃-b-P(MAC-SC7A)₁₃₅の透過型電子顕微鏡(TEM)画像および数加重流体力学的径分布(図2B)は、CMPDを横切った相転移をさらに裏付けた。ミセル直径は、90%を下回るプロトン化度でおよそ45 nmにとどまった。

【0084】

ミセル化誘発超pH感受性は、PEO₁₂₃-b-P(MAC-SDMA)₁₃₅ (PSDMA)によって、よりよく説明される。このポリマーは、二セグメント化pH応答を示し、50%超のプロトン化度では広い応答、50%未満では狭い応答を示す(図5)。プロトン化度50%超では、PEO₁₂₃-b-P(MAC-SDMA)₁₃₅はユニマーとしてとどまり、広いpH応答を示した。プロトン化度50%未満では、劇的に鋭いpH応答が観察された。超pH感受性応答はCMPDを横切ったミセルの形成と同時に起こり、これは、相転移誘発超pH感受性応答の直接的な証拠を可能にした。興味深いことに、ジメチルアミン側鎖を有する非分解性PMMAポリマーは、pH滴定の全過程において相転移挙動を一切示さなかった。これらの結果は、ポリカーボネート骨格PMACはPMMAよりも疎水性が高く、また、ミセル形成にも寄与することを示唆している。

【0085】

PEO₁₂₃-b-P(MAC-SC7A)₁₃₅を代表的な生分解性コポリマーとして選択し、正常な生

10

20

30

40

50

理的pH環境および初期エンドソームpH環境をそれぞれ模倣するpH 7.4および6.5でのその分解特性を調べた。PEO₁₂₃-b-P(MAC-SC7A)₁₃₅の見かけのpK_aは6.9であり、それによって、このコポリマーは、pH 7.4および6.5で、それぞれ、ミセルまたはプロトン化ユニマー状態で存在する。コポリマーを、NaCl (150 mM)を含む重水素化リン酸緩衝溶液(50 mM)中に5.0 mg/mLで調製した。pHを6.5または7.4に調節するために、NaODまたはDCl溶液を添加した。図3Aは、PEO₁₂₃-b-P(MAC-SC7A)₁₃₅コポリマーおよびその分解生成物の構造を示す。分解過程において、コポリマーは、全てポリカーボネートエステル骨格の加水切断(図3A中の左の構造上の円)に起因して、オリゴマー、モノマー、PEOセグメント、二酸化炭素に分解し得る。側鎖上のエステル基のさらなる加水分解(図3A中の右の構造上の円)は、追加の分解生成物、2,2-ビス(ヒドロキシメチル)プロピオン酸(bis-HPA)および3-(2-アゼパン-1-イル-エチルスルファニル)-プロパノールをもたらす。両方のpH溶液中における55日間にわたる分解生成物の形成をモニターするために、¹H NMRを用いた。PEOセグメントのプロトンシグナルは経時的に変化せず、そのピーク積分を定量化のために他のプロトンピークに対する内部参照として使用した。

【0086】

図3Bは、経時的なpH 6.5でのPEO₁₂₃-b-P(MAC-SC7A)₁₃₅の分解プロファイルを示す。コポリマーは溶液中においてプロトン化ユニマーとして存在したため、全てのプロトンピークが時間ゼロで可視であった(例えば、c1、d1およびe1に対応するプロトンシグナル)。最初の数日以内に、新しいピーク(c3、c4、d2およびd3)が形成し、それらの強度は経時的に増加した。25日目に、コポリマーの大部分がモノマー構造(図3A中の黄色パネル)およびPEOに分解したようであった。25～55日目の追加の加水分解は、僅かな割合のさらなる分解生成物bis-HPA (d4)を示す。分解速度の定量化を、d1およびd2(それぞれ、ポリマーおよびオリゴマー状態由来)のピーク強度の減少またはd3およびd4(モノマーおよびbis-HPA)の増加を分析することによって行った。データは、12日目に相対的ピーク強度50%で2組の曲線が同時に交差していることを示している(図3D)。本明細書において使用される場合、 $t_{1/2}$ は、50%のコポリマーがモノマーに変換される半減期と定義される。

【0087】

pH 7.4での分解プロファイルは、ミセルの形成に起因してより複雑である。時間ゼロで、PEOピークのみが¹H NMRによって可視であり(図3C)、これは、P(MAC-SC7A)セグメントのミセル形成が、プロトンシグナルの速い横緩和に起因して信号抑制を生じさせたためであった。時間の経過とともに、分解されたモノマーおよびbis-HPA由来のプロトンシグナルが、より遅い形成速度であったが、観察された。興味深いことに、55日目に、MACモノマーに対するbis-HPAのより高い比率が見られた。モノマーおよびbis-HPAピーク(d3+d4)の定量分析は、より高いpH環境において27日間の $t_{1/2}$ を示した(図3E)。pH 6.5と比べてのpH 7.4でのより遅い分解速度は、疎水性ミセルコアのためのPMACへの水の浸透およびアクセスの制限、またはpH 7.4でのカーボネート結合の酸触媒加水分解の減少を含む、いくつかの要因に起因し得る。

【0088】

ポリカーボネート骨格は加水分解的に活性であり、ポリマーが水性環境下で生体適合性PEOセグメントおよび小分子に自然分解することを可能にする。分解速度は、pH 7.4でカーボネート基への水のアクセスを制限するPSC7Aセグメントのミセル化に恐らく起因して、加水分解がpH 7.4では6.5よりも遅い速度で生じることを実証している($t_{1/2}$ は、それぞれ、27および12 dである)。

【0089】

実施例3：IL-2積載ミセルの封入

PEG-b-P(MAC-SDPA) (pK_a=6.1)ミセルを、T細胞増殖因子であるIL-2を腫瘍微小環境へ送達するために開発した。典型的な手順において、0.2 mg PEG-b-P(MAC-SDPA)を0.05 mLメタノール中に溶解し、次いで、0.5 mL PBS (pH 7.4)中へ滴下し、空のミセルを形成した。メタノールを限外濾過(100 kDa、5000 rpm/15分、2回について)によっ

10

20

30

40

50

て除去した。ミセルをPBS中に再懸濁し、次いで、異なる量のヒト組換えIL-2タンパク質と混合した。

【0090】

20 μ g (10 %)、10 μ g (5 %)、または1 μ g (0.5 %) IL-2をPEG-b-P(MAC-SDPA)ミセルと混合することによって、IL-2ローディング効率を評価した。遊離IL-2を、限外濾過(100 kDa、5000 rpm/15分、2回について)によってIL-2積載PEG-b-P(MAC-SDPA)ミセルから除去した。IL-2濃度をHPLCによって決定するために、濾液を収集した。全ての場合において、90%超のIL-2タンパク質がPEG-b-P(MAC-SDPA)ミセル内にローディングされたことがわかった。PEG-b-P(MAC-SDPA)ミセル中のIL-2含有量は、それぞれ、8.26 %、4.31 %および0.45 %であると計算された。IL-2-PEG-b-P(MAC-SDPA)の粒度は、動的光散乱解析によって決定されたように約55 nmであった。

10

【0091】

A. インビトロでのIL-2効果の評価

IL-2によって誘導されるJAK-STAT経路の活性化をモニターするために設計されているHEK-Blue (商標) IL-2レポーター細胞を使用して、IL-2機能を調べた。簡潔には、予め温めたPBSによって細胞をリンスし、フラスコから分離し、約280,000細胞/mLで細胞懸濁液を調製した。次いで、20 μ Lの遊離IL-2またはIL-2積載PEG-b-P(MAC-SDPA)を平底96-ウェルプレートへ添加した。サンプルをCO₂インキュベーター中において37 °Cで1ウェル当たり180 μ Lの細胞懸濁液と共にインキュベートした(IL-2濃度: 200、50、10、2、0.5、0.2、0.05、0.01 ng/mL; PEG-b-P(MAC-SDPA)濃度: 40、10、2、0.4、0.1、0.04、0.01、0.002 μ g/mL)。24時間後、1ウェル当たり20 μ Lの誘導HEK-Blue (商標) IL-2細胞上清を別の96-ウェルプレート中へ添加し、100 μ L QUANTI-Blue (商標) 検出溶液と混合した。プレートを37 °Cインキュベーターで1時間インキュベートし、次いで、630 nmで分光光度計を使用してSEAPレベルを決定した。

20

【0092】

データは、PEG-b-P(MAC-SDPA)封入IL-2の生物学的効果が遊離IL-2と比べて劇的に増強されたことを示す(図8)。PEG-b-P(MAC-SDPA)封入IL-2および遊離IL-2のEC₅₀は、それぞれ、0.8 ng/mLおよび15 ng/mLであった。ミセル送達IL-2は遊離IL-2と比べておよそ20倍のより高い効力を示した。

【0093】

30

B. インビボでの抗腫瘍有効性の評価

B16F10メラノーマ腫瘍モデル中における遊離IL-2およびPEG-b-P(MAC-SDPA)-IL-2の腫瘍増殖阻害効果を評価した。C57Bl/6jマウスに、先ず、B16F10細胞(100 μ L PBS中 2.5×10^5 細胞)を接種した。腫瘍が50 ~ 80 mm³のサイズに成長した時点で、マウスを無作為に5つの群に分けた。遊離IL-2またはPEG-b-P(MAC-SDPA)-IL-2を、1日目および5日目に腫瘍内にまたは静脈内に注射した(IL-2: 1注射当たり1 μ g; PEG-b-P(MAC-SDPA): 1注射当たり200 μ g)。

【0094】

図9に示されるように、i.v.注射後のPEG-b-P(MAC-SDPA)-IL-2は、同じ用量での遊離IL-2のi.v.注射と比べて改善された腫瘍増殖抑制を示した。i.t注射後のIL-2の抗腫瘍効果もまた、遊離IL-2と比べてPEG-b-P(MAC-SDPA)ミセル中にローディング後に増強された。全ての処置群がPBS対照に比べて腫瘍増殖阻害を示した。

40

【0095】

PBSおよび遊離IL-2 i.t群のマウスの体重は、恐らく腫瘍増殖に起因して1週間後に僅かに増加した。PEG-b-P(MAC-SDPA)-IL-2群(i.vおよびi.tの両方)については、治療中に明らかな体重の減少は認められなかった。しかし、i.v注射後、遊離IL-2はマウスにおいていくらかの一時的な減少を引き起こし(図10)、これは、遊離IL-2の全身投与の潜在的な副作用を示している。

【0096】

実施例4: cGAMPミセルの封入

50

cGAMPは、STING経路を通してI型IFN産生をトリガーする、内因性セカンドメッセンジャーかつ高親和性リガンドである。それはアニオン性の高水溶性分子であり、その活性および治療効果は、低いバイオアベイラビリティおよび不十分な薬物様特性によって制限される。cGAMPの効率的な細胞質送達のために、本発明者らの生分解性PEG-b-P(MAC-SC7A)ミセルに基づいてナノ粒子を開発した。

【0097】

典型的な製剤化プロセスにおいて、ポリマー濃度を1.0 mg/mLにするために、PEG-b-P(MAC-SC7A・HCl)を、先ず、5%グルコース水溶液中に溶解した。少量のHClを次いで添加し、続いて異なる量のcGAMP (ポリマーの2%、5%および10%、w/w)を添加した。最終pHを約7.4に調節するために、溶液に特定の体積のNaOHを添加した。限外濾過(10 kDa)後、濾液を収集し、ローディングされていないcGAMPの量をHPLCによって測定した。対応するcGAMPローディング効率を以下のように計算した：

ローディング効率(%) = (ローディングされたcGAMPの重量 / 総cGAMPの重量) × 100 %。

【0098】

結果を図11に示す。PEG-b-P(MAC-SC7A)ナノ粒子中のcGAMPのローディング効率は90%もの高さに達し得る(1.0 mg/mL PSC7Aでの2% cGAMP)。他の2つの製剤のローディング効率もまた80%超に達する。これは、cGAMP積載ナノ粒子製剤について非常に高い。一方、製剤は非常に安定している。ローディング効率は24時間後でさえあまり変わらない。

【0099】

実施例5：STING活性化、抗原送達、およびがんのT細胞療法

インターフェロン遺伝子刺激因子(STING)は、自然免疫において重要な役割を果たす小胞体(ER)結合ホモ二量体タンパク質である(Barber, 2015; Ishikawa and Barber, 2008)。STING活性化は、がんに対するCD8⁺ T細胞応答を増強するI型インターフェロン(IFN)のアップレギュレーションをもたらす(Baccala et al., 2007; Fuertes et al., 2013; Zitvogel et al., 2015)。以前、腫瘍抗原の効率的な封入およびリンパ節常在性樹状細胞への細胞質送達を可能にする非分解性ポリマーナノ粒子、PC7A NPが報告された。このポリマーはまた、STINGに結合してこれを活性化し、抗原特異的T細胞の生成のために共刺激経路(CD80/CD86)をオンにする(Luo et al., 2017)。

【0100】

この研究において、一連のdUPSコポリマー(PSC7A、PSC6A、PSC5AおよびPSDEA)の結合親和性を、先ず、STINGのC末端ドメイン(139-397 AA)に対して評価した。全てのコポリマーが溶液中においてカチオン性ユニマーとしてとどまるpH 6.5を、結合試験のために選択した。等温カロリメトリー(ITC)結果は、PSC7Aコポリマーが、26 nMの解離定数(K_d)でSTINGへの最も高い結合親和性を有したことを示す(図12A)。環状第3級アミンを有する他の2つのコポリマーPSC6AおよびPSC5Aは、それぞれ、43および84 nMのK_d値で、より少ない結合を有した。線形第3級アミンを有するコポリマーPSDEAは、STINGへの無視できる結合を有した。STINGへの非分解性PC7AのK_d値は72 nMであり、PSC7Aによるものよりも高い。48時間の異なるコポリマー(0.5 μM)による処理後のSTING活性化を評価するために、THP1-ISG細胞を使用した(図12C)。インターフェロン調節因子誘導性プロモーターの制御下のルシフェラーゼレポーター遺伝子によって、THP1-ISG細胞をトランスフェクトした。STING活性化で、I型IFNの分泌が、発光検出のためのルシフェラーゼ発現を活性化する。結果は、IFN誘導が、線形類似体と比べて環状第3級アミンを有するdUPSコポリマーで上昇したことを示している。特に、PSC7AコポリマーはIFN誘導を最大で14倍増加させ、これは、ITC測定によるSTINGへの最も高い結合親和性と相関した。

【0101】

STING結合および活性化アッセイに基づいて、PSC7Aコポリマーをその後のT細胞ワクチン研究のために選択した(図13)。PSC7Aナノ粒子を先ず製造し、次いで腫瘍特異的抗原

ペプチドと混合した。ヒトパピローマウイルス(HPV)E6/E7トランスフェクトTC-1およびマウスB16-F10メラノーマ腫瘍モデルを使用した。6～8週齢のC57BL/6マウスの右大腿部に、まず、腫瘍細胞(2×10^5)を接種した。TC-1モデルにおいて、E7ペプチド抗原(E7p, GQAEPDRAHYNIVTFCKCD (SEQ. No. 1))

を使用した。異なる群に、腫瘍接種後8、16および24日目に(図13Aに示される)尾基部で皮下注射した。PBS、E7pおよびPSC7A NP単独群を対照として使用した。結果は、E7pおよびPSC7A NP単独群はPBS対照と比べて最低限の腫瘍増殖阻害応答を有したことを示している。ほとんどの動物が腫瘍接種後30日以内に失われた。対照的に、E7p-PSC7A NP群は、劇的に改善された腫瘍増殖阻害および延長された生存期間をもたらした。低用量PSC7Aワクチン群(6 μ g PSC7A NP中0.1 μ g E7p)は、腫瘍接種から50日後で50%の動物生存をもたらし、一方、高用量ワクチン群(30 μ g PSC7A NP中0.5 μ g E7p)は完全生存転帰を有した(図13A)。B16-F10メラノーマ腫瘍モデルについて、腫瘍関連抗原の組み合わせ(Trp1₂₁₄₋₂₃₇およびTrp2₁₇₃₋₁₉₆)をPSC7A NP中にローディングした。ペプチド-PSC7A NP群もまた、PBS対照およびペプチドまたはPSC7A NP単独群と比べて、有意に改善された腫瘍増殖阻害および延長された生存期間を示した(図13B)。これらの2つのモデルにおいて、PSC7Aナノワクチンは、同じ用量でのPC7Aナノワクチンと比較して、TC-1モデルにおいては僅かに改善された腫瘍阻害およびB16F10モデルにおいては同様の応答を示した(図14)。

【0102】

結果は、環状アミンを有するdUPSポリマーは、ジアルキルアミンを有するポリマーと比べてより強いSTING結合親和性およびインターフェロン誘導を示し、これらの中でPSC7Aが最適であることを示している。2つのマウス腫瘍モデルにおけるインビボ研究は、抗原積載PSC7A NPは、腫瘍増殖阻害および動物生存を有意に改善して、抗腫瘍免疫を効果的にもたすことができることを示している。

【0103】

実施例6：短期間および長期間にわたるナノ粒子の安全性評価

特にSTING経路を通じて自然免疫系に能動的に関与するポリマーについて、治療中の反復投与に対する安全性表示が最も重要である。この研究において、ワクチン接種研究に使用したdUPS PSC7Aポリマーを、その非分解性PMMAベース前身であるPC7Aと直接比較した(図15A)。6～8週齢のC57BL/6マウスの右側腹部に、高用量のPSC7A NPまたはPC7A NP(300 μ g、ワクチン用量の10倍)を皮下注射した。注射から24時間後に血清を採取し、全身炎症性サイトカイン濃度を測定した。いずれのポリマーによっても処置から24時間後に、明らかな急性腎または肝毒性は観察されなかった(図15B)。概して、全身サイトカイン発現がPSC7A NPによってよりもPC7A NPによってより高度に誘導され(図15C)、これは、PSC7A NPに対するより少ない全身炎症反応を示している。主要臓器(心臓、肝臓、脾臓、および腎臓)の組織学的分析は、PBSと比較して、いずれのポリマーによる処置後も顕著な変化はない(図16)。

【0104】

長期安全性研究において、非分解性PC7Aに対する生分解性PSC7Aの優位性はより顕著である。このアッセイにおいて、マウスにPBS、300 μ g PSC7A NP、または300 μ g PC7A NPを皮下注射し、60日間にわたって観察した(図17A)。進行をモニターするために、結果として生じた皮下結節の表面積を楕円モデルに基づいて計算した(図17B)。投与後1日以内に、恐らく自然免疫刺激に起因して、PC7AおよびPSC7Aの両方について注射部位で大きな急性炎症反応が観察された。組織学的には、注射後24時間で、大量の好中球浸潤および壊死性残屑が観察された(1日目の時点、図18)。この初期急性炎症反応の後、皮下結節はサイズが縮小し、徐々に慢性肉芽腫性炎症反応へと移行し、マクロファージおよびリンパ球のより多くの浸潤が見られるようになった(15および30日目の時点、図18)。PSC7A誘発結節は、PC7Aによって誘発されたものよりも速い速度でサイズが縮小し、これは、PSC7Aポリマーが分解され注射部位から排出され、組織の最終的な治癒を可能にすること

を示している。PSC7A結節サイズ縮小の半減期は約13日であり、分解速度についての上記の化学データを支持している。対照的に、PC7Aによって誘発された結節は、投与後45日まで経時的にサイズが縮小し、その後、結節はサイズおよび外観が一定のままであった。60日目に、全ての残りのマウスの注射部位での皮膚組織を組織学的分析のために採取した(図17C)。肉眼で見て、PC7A群からの6/6の皮膚サンプルが、小さくて硬い黄色の結節を含有する。対照的に、PSC7A群(0/6)はいずれも結節を含有せず、外観がPBS処置群に類似している。60日目のH&E染色は、PC7Aで処置されたマウスにおいて、「コア/ウォール」外観を伴う、肉芽腫性炎症によって囲まれた結節を明らかにする(図17D)。ここで、「ウォール」は、急性および慢性の自然刺激および異物反応から生じる、散在性リンパ球および好中球を伴うマクロファージから主に構成されている。「コア」は壊死性であり、いくつかの浸潤性マクロファージ、好中球、およびリンパ球を伴って、主に瀕死細胞のタンパク質残屑からなる。対照的に、PSC7Aで処置されたマウスからの皮膚組織は、PBSによって処置されたマウスとの比較によって、結節の完全な消失および健康な状態への回復を実証している。

【0105】

インビボ安全性研究は、PSC7AおよびPC7Aの両方が短期間で急速な自然炎症反応を引き起こし、PSC7A NPからの全身サイトカインレベルはPC7A NPよりも低いことを示している。長期PSC7A分解は注射部位の完全な治癒を可能にし、一方、肉芽腫性炎症によって囲まれた結節がPC7A部位において持続する。まとめると、これらのデータは、経時的なPSC7Aの完全な分解、およびPC7Aと比較して顕著に改善された安全性プロファイルを支持している。

【0106】

本明細書において開示され、特許請求された組成物および方法は全て、本開示を考慮することにより過度の実験なしに作製、実施することができる。本開示の組成物および方法を特定の態様の観点から説明したが、本開示の概念、精神および範囲から逸脱することなく、組成物および方法に対して、ならびに本明細書に記載の方法の工程または工程の順序に対して、変更を適用してもよいことが当業者に明らかであろう。より具体的には、化学的および生理学的の両方に関連するある薬剤を本明細書に記載の薬剤の代わりに使用してもよく、一方、同一または同様の結果が達成されるであろうことが明らかであろう。当業者に明らかなこのような同様の置換および改変は全て、添付の特許請求の範囲によって定義される本開示の精神、範囲および概念の内にあると見なされる。

【0107】

参考文献

下記の参考文献は、本明細書に記載されるものを補う例示的な手順またはその他の詳細をそれらが提供する程度まで、参照により本明細書に具体的に組み入れられる。

10

20

30

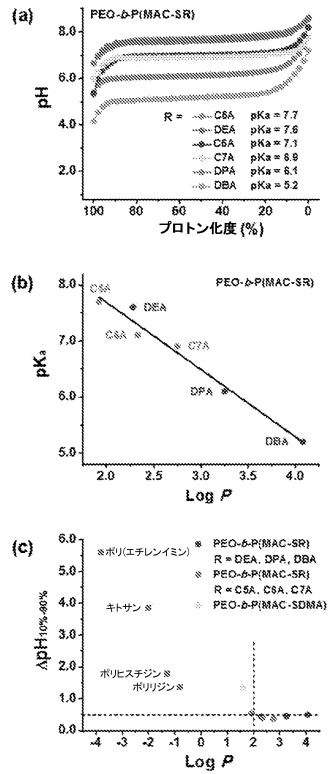
40

50

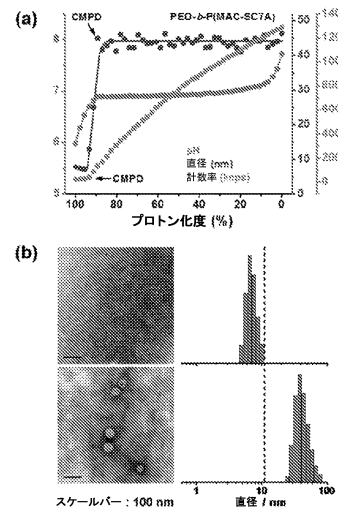
- Baccala *et al.*, *Nat. Med.*, 13:543-551, 2007.
- Barber, *Nat. Rev. Immunol.*, 15:760-770, 2015.
- Blum *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 137:2140-2154, 2015.
- Casey *et al.*, *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.*, 11:50, 2009.
- Fuertes *et al.*, *Trends Immunol.*, 34:67-73, 2013.
- Gerweck and Seetharaman, *Cancer Res.*, 56:1194, 1996.
- Hao *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 137:9206, 2015. 10
- Hu *et al.*, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, 45:5518, 2007.
- Huang *et al.*, *Nat. Biomed. Eng.*, 2019.
- Ishikawa and Barber, *Nature*, 455:674-678, 2008.
- Luo *et al.*, *Nat. Nanotech.*, 12:648, 2017.
- Li *et al.*, *Nat. Commun.*, 7:13214, 2016.
- Moitra *et al.*, *Angew. Chem.*, 126:1131-1135, 2013.
- Moitra *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53:1113-1117, 2014. 20
- Natarajan *et al.*, *J. Org. Chem.*, 70:6362, 2005.
- Reineke, *ACS Macro Lett.*, 5:14-18, 2016.
- Torchilin, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 13:813, 2014.
- Wang *et al.*, *Nat. Mater.*, 13:204, 2013.
- Wang *et al.*, *Nat. Commun.*, 6:8524, 2015.
- Wang *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 56:1319-1323, 2016.
- Wang *et al.*, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 113:87-96, 2017.
- Yang *et al.*, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 105:228-241, 2016. 30
- Zhang *et al.*, *ACS Macro Lett.*, 4:620-623, 2015.
- Zhao *et al.*, *Nat. Biomed. Eng.*, 1:0006, 2016.
- Zhou *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 50:6109-6114, 2011a
- Zhou *et al.*, *Angew. Chem.*, 123:6233-6238, 2011b
- Zitvogel *et al.*, *Nat. Rev. Immunol.*, 15:405-414, 2015.

【図面】

【図 1】



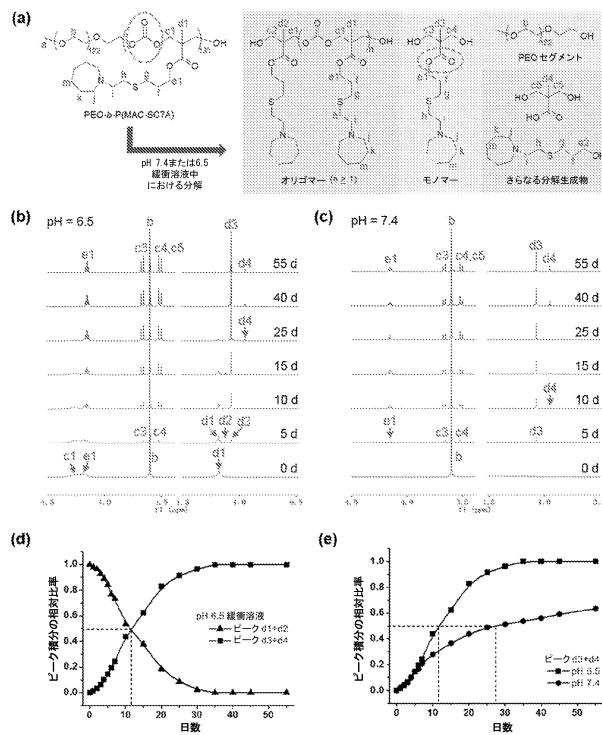
【図 2】



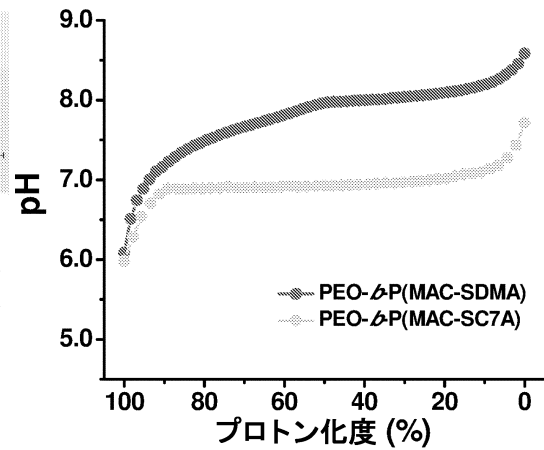
10

20

【図 3】



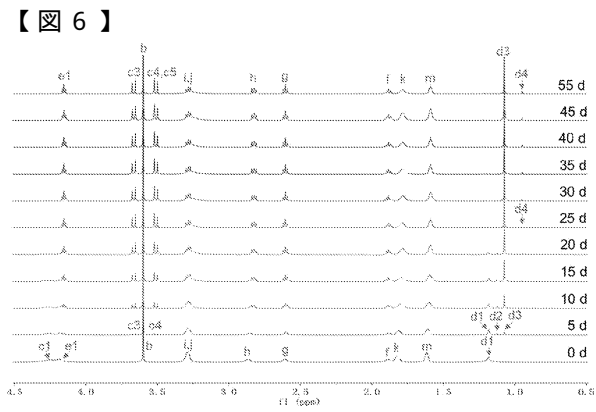
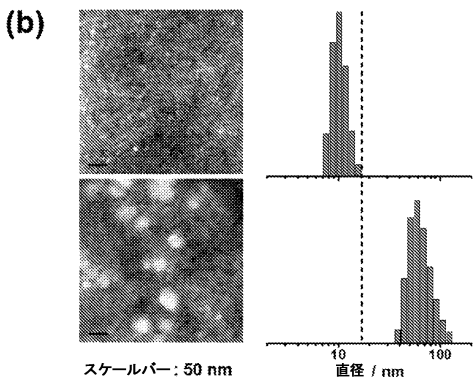
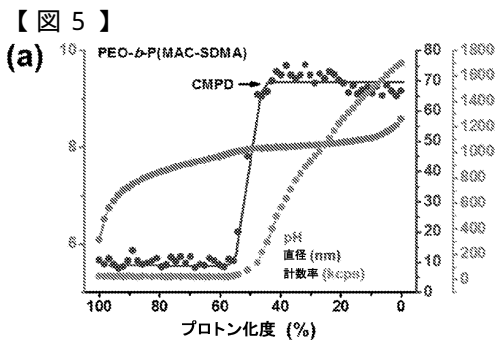
【図 4】



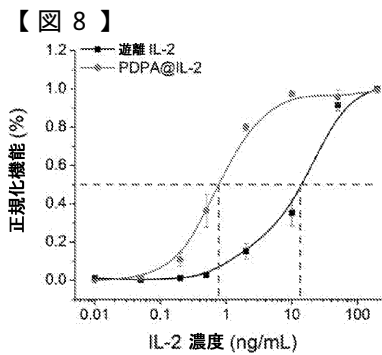
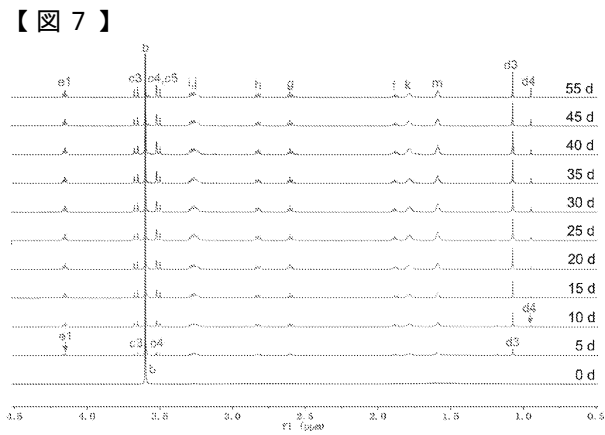
30

40

50



10

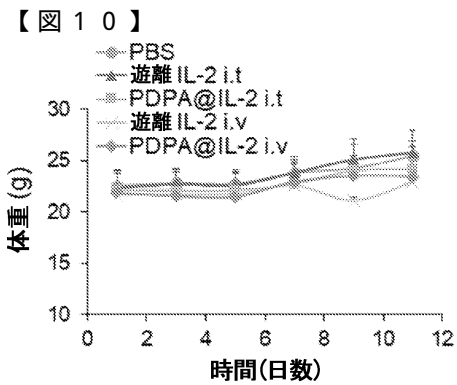
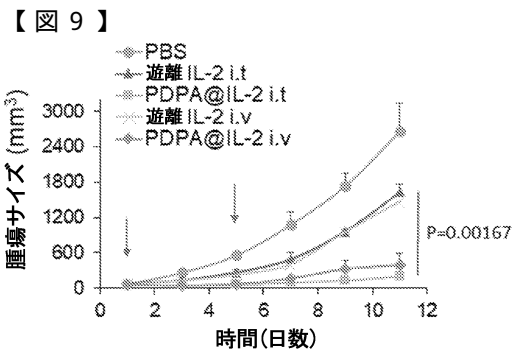


20

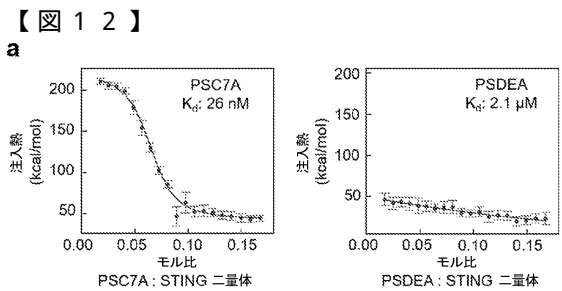
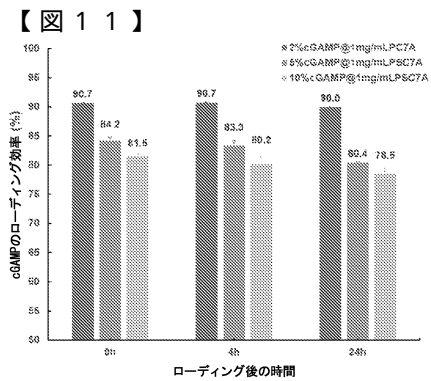
30

40

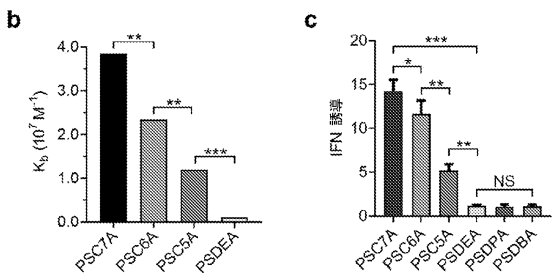
50



10



20

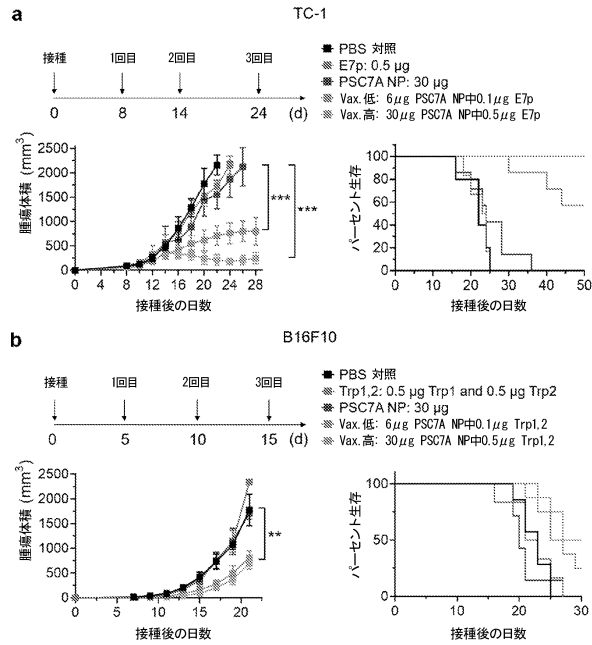


30

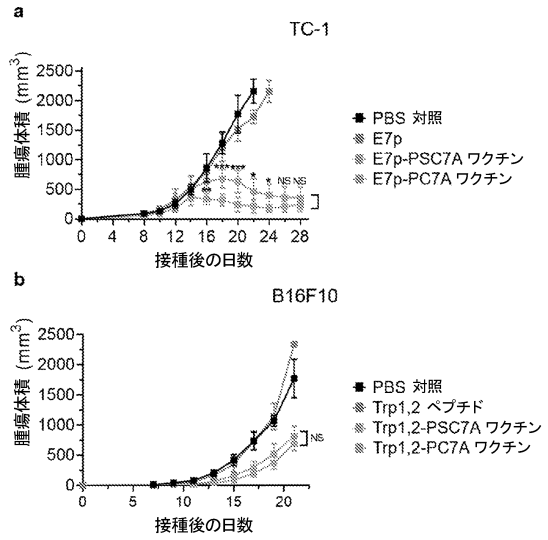
40

50

【図 1 3】

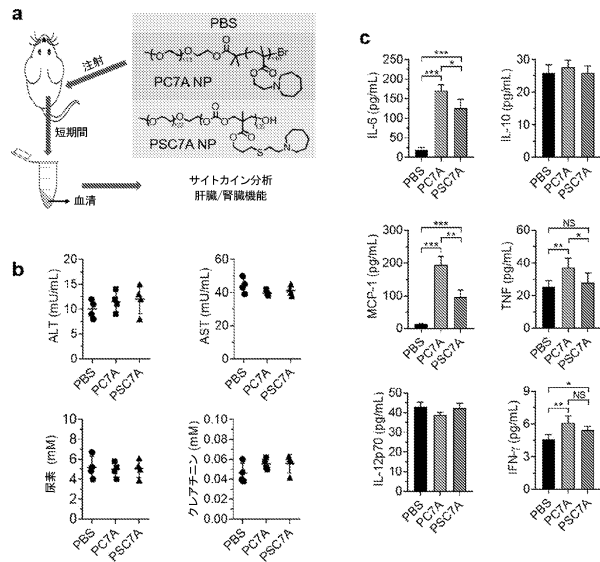


【図 1 4】

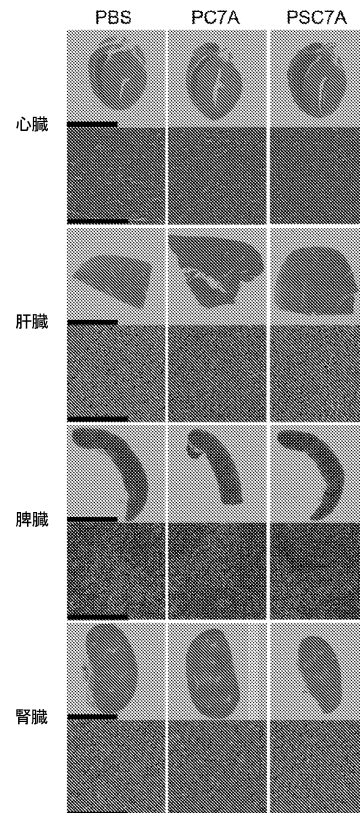


10

【図 1 5】



【図 1 6】



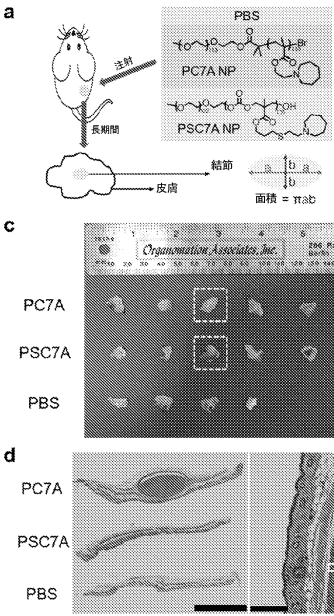
20

30

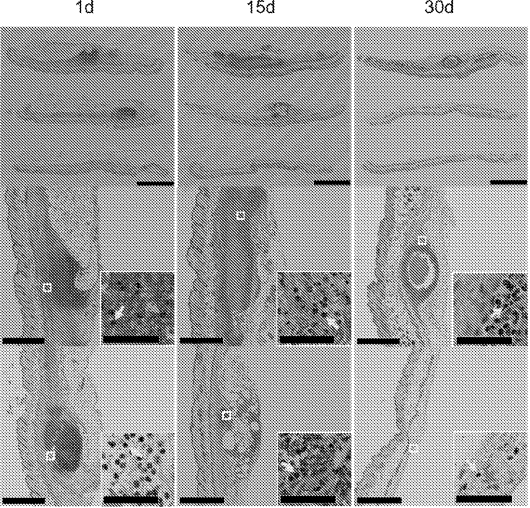
40

50

【図 17】

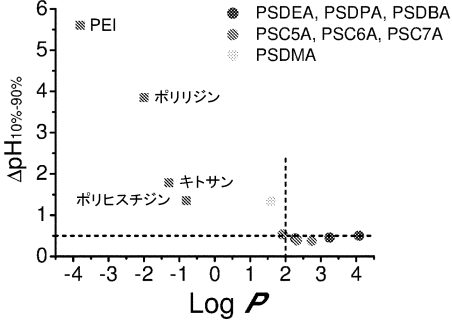


【図 18】



10

【図 19】



20

【配列表】

0007676331000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 39/00 (2006.01)
 A 6 1 K 47/34 (2017.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 C 0 8 G 65/332 (2006.01)

A 6 1 K 39/00 Z
 A 6 1 K 47/34
 A 6 1 P 35/00
 C 0 8 G 65/332

- 弁理士 刑部 俊
 (74)代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一
 (74)代理人 100148699
 弁理士 佐藤 利光
 (74)代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一
 (74)代理人 100129506
 弁理士 小林 智彦
 (74)代理人 100205707
 弁理士 小寺 秀紀
 (74)代理人 100114340
 弁理士 大関 雅人
 (74)代理人 100121072
 弁理士 川本 和弥
 (72)発明者 ガオ ジンミン
 アメリカ合衆国 7 5 3 9 0 テキサス州 ダラス ハリー ハイน์ズ ブールバード 5 3 2 3 ユー
 ティー サウスウエスタン メディカル センター内
 (72)発明者 ワン シュー
 アメリカ合衆国 7 5 3 9 0 テキサス州 ダラス ハリー ハイน์ズ ブールバード 5 3 2 3 ユー
 ティー サウスウエスタン メディカル センター内
 (72)発明者 タン ホウリャン
 アメリカ合衆国 7 5 3 9 0 テキサス州 ダラス ハリー ハイน์ズ ブールバード 5 3 2 3 ユー
 ティー サウスウエスタン メディカル センター内
 (72)発明者 リー ウェイ
 アメリカ合衆国 7 5 3 9 0 テキサス州 ダラス ハリー ハイน์ズ ブールバード 5 3 2 3 ユー
 ティー サウスウエスタン メディカル センター内
 (72)発明者 ウィルヘルム ジョナサン
 アメリカ合衆国 7 5 3 9 0 テキサス州 ダラス ハリー ハイน์ズ ブールバード 5 3 2 3 ユー
 ティー サウスウエスタン メディカル センター内
 (72)発明者 スマー バラン
 アメリカ合衆国 7 5 3 9 0 テキサス州 ダラス ハリー ハイน์ズ ブールバード 5 3 2 3 ユー
 ティー サウスウエスタン メディカル センター内

審査官 佐藤 貴浩

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 9 / 1 1 1 1 2 1 (W O , A 1)

特表 2 0 1 7 - 5 2 6 7 5 3 (J P , A)

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 0 8 G 6 3 / 0 0 - 6 4 / 4 2
 C 0 8 G 6 5 / 0 0 - 6 7 / 0 4
 A 6 1 K 3 8 / 2 0
 A 6 1 K 3 8 / 2 1
 A 6 1 K 3 9 / 0 0
 A 6 1 P 3 5 / 0 0
 A 6 1 K 3 1 / 7 0 8 4

A 6 1 K 9 / 1 0 7
A 6 1 K 4 7 / 3 4