

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6152391号
(P6152391)

(45) 発行日 平成29年6月21日 (2017. 6. 21)

(24) 登録日 平成29年6月2日 (2017. 6. 2)

(51) Int. Cl. F I
C O 8 F 251/00 (2006. 01)
A 6 1 K 9/10 (2006. 01)
A 6 1 K 47/34 (2017. 01)
A 6 1 K 47/36 (2006. 01)
A 6 1 K 45/00 (2006. 01)

C O 8 F 251/00
A 6 1 K 9/10
A 6 1 K 47/34
A 6 1 K 47/36
A 6 1 K 45/00

請求項の数 27 (全 82 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-559046 (P2014-559046)
(86) (22) 出願日 平成25年3月4日 (2013. 3. 4)
(65) 公表番号 特表2015-512978 (P2015-512978A)
(43) 公表日 平成27年4月30日 (2015. 4. 30)
(86) 国際出願番号 PCT/CA2013/000203
(87) 国際公開番号 W02013/127004
(87) 国際公開日 平成25年9月6日 (2013. 9. 6)
審査請求日 平成28年3月2日 (2016. 3. 2)
(31) 優先権主張番号 61/605, 995
(32) 優先日 平成24年3月2日 (2012. 3. 2)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 514221779
ザ ガバニング カウンシル オブ ザ
ユニバーシティ オブ トロント
カナダ国 エム5ジー 1エル5 オンタ
リオ, トロント, カレッジ ストリート
100
(74) 代理人 100091096
弁理士 平木 祐輔
(74) 代理人 100118773
弁理士 藤田 節
(74) 代理人 100122389
弁理士 新井 栄一
(74) 代理人 100111741
弁理士 田中 夏夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 セラノスティクスにおいて有用なポリマーナノ粒子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ナノ粒子を製造する方法であって、

(a) 溶液中にポリマーを可溶化するステップと、

(b) カルボン酸側基又はアルキルアミノアルキルエステル側基を含む重合可能なモノマーを供給するステップと、

(c) モノマーをグラフト重合して可溶化したポリマー上にポリマー鎖を形成するステップと、

(d) 形成している鎖と反応する官能基を有する ポリエトキシ化ソルビタン をベースとした分子を供給するステップと、を含み、ステップ(c)が ポリエトキシ化ソルビタン をベースとした分子の存在下で行われ、ポリエトキシ化ソルビタン をベースとした分子をポリマー鎖に共有結合させる、方法。

【請求項 2】

溶液が、ヒドロキシル溶媒を含む請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

工程(a)のポリマーが、デンプンを含む請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

ポリエトキシ化ソルビタン をベースとした分子が、R(C9-C31)-C(0)O-基を有する ポリエトキシ化ソルビタンエステル であり、ポリエトキシ化ソルビタンエステル が、重合ステップの間にR(C9-C31)-C(0)O-基のC-C共有結合を介して第二のポリマーに結合される請求項1

に記載の方法。

【請求項5】

生物学的薬剤の送達のためのナノ粒子を製造する方法であって、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法を含み、薬剤が、ステップ(a)のポリマーに共有結合している方法。

【請求項6】

生物学的薬剤の送達のためのナノ粒子を製造する方法であって、薬剤及び請求項1～4のいずれか1項に記載の方法によって得られたナノ粒子を液体媒体中で分散させて薬剤をナノ粒子中に取り込むステップを含む方法。

【請求項7】

第一のポリマー、
第一のポリマーにグラフトした第二のポリマー、及び
第二のポリマーに共有結合したポリエトキシ化ソルビタンをベースとした部分を含むナノ粒子。

【請求項8】

第二のポリマーが、第二のポリマーの主鎖の2つの炭素当たり約1個のカルボキシル基を有する重合したビニル基を含む請求項7に記載のナノ粒子。

【請求項9】

第二のポリマーが、ポリ(メタクリル酸)である請求項8に記載のナノ粒子。

【請求項10】

ポリエトキシ化ソルビタンをベースとした部分が、R(C9-C31)-C(=O)O-基を有するポリエトキシ化ソルビタンエステルであり、ポリエトキシ化ソルビタンエステルが、R-基のC-C共有結合を介して第二のポリマーに結合している請求項7に記載のナノ粒子。

【請求項11】

第一のポリマーが、デンプンを含む請求項10に記載のナノ粒子。

【請求項12】

第二のポリマーが、架橋されている請求項11に記載のナノ粒子。

【請求項13】

請求項12に記載の複数のナノ粒子を含む組成物であって、薬学的に活性な薬剤をさらに含む組成物。

【請求項14】

請求項12に記載の複数のナノ粒子を含む組成物であって、さらにシグナル分子、生物学的薬剤、又は薬学的に活性な薬剤を含む組成物。

【請求項15】

薬学的に活性な薬剤をさらに含む請求項14に記載の組成物。

【請求項16】

多糖を含む第一のポリマー、
第一のポリマーにグラフトしたポリ(メタクリル酸)を含む第二の架橋したポリマー、及び
第二のポリマーの炭素主鎖とR基との間のC-C結合によって第二のポリマーに共有結合している(C9-C31)R-C(=O)O-基を含む、ポリソルベートを含むナノ粒子。

【請求項17】

ポリソルベートが、基- $O(CH_2CH_2O)_w-C(=O)(C_{17})R$ 、 $HO(CH_2CH_2O)_x-$ 、 $HO(CH_2CH_2O)_y-$ 、 $HO(CH_2CH_2O)_z-$ を含み、但し、 $w+x+y+z=20$ である請求項16に記載のナノ粒子。

【請求項18】

第一のポリマーがデンプンを含む請求項17に記載のナノ粒子。

【請求項19】

ポリ(メタクリル酸)のメタクリレートモノマー単位に対する多糖のモノマー単位のモル比が、0.2と8.0の間である請求項18に記載のナノ粒子。

【請求項20】

10

20

30

40

50

ポリソルベート及びポリ(メタクリル酸)のメタクリレートモノマー単位のモル比が、0.002と0.03の間である請求項19に記載のナノ粒子。

【請求項 2 1】

ナノ粒子を製造する方法であって、

(a)溶液中でポリマーを可溶化するステップ、

(b)アルキルアミノアルキルエステル側基を含む重合可能なモノマー又はビニル基及び1個のカルボキシル基を含むモノマーを供給するステップ、

(c)架橋剤を供給するステップ、

(d)モノマーをグラフト重合して可溶化したポリマー上にポリマー鎖を形成して、ナノ粒子を形成するステップ、及び

(e)モノマーのグラフト重合の間にポリエトキシ化ソルビタンをベースとした分子をポリマー鎖に共有結合させるステップ

を含む方法。

【請求項 2 2】

工程(a)のポリマーが、デンプンを含む請求項21に記載の方法。

【請求項 2 3】

モノマーが、ジエチルアミノエチルメタクリル酸である請求項22に記載の方法。

【請求項 2 4】

多糖を含む第一のポリマー、

第一のポリマーにグラフトした、メタクリル酸のアルキルアミノアルキルエステル、又はビニル基及び1個のカルボキシル基を含むモノマーを含む第二の架橋ポリマーであって、架橋している第二のポリマー、及び

第二のポリマーに共有結合したポリエトキシ化ソルビタンをベースとした部分を含むナノ粒子。

【請求項 2 5】

第二のポリマーが、重合したジエチルアミノエチルメタクリレートである請求項24に記載のナノ粒子。

【請求項 2 6】

第二のポリマーが、重合したメタクリル酸を含む請求項24に記載のナノ粒子。

【請求項 2 7】

モノマーが、メタクリル酸である請求項22に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、治療剤及び/又は診断剤の送達のために有用なポリマーナノ粒子に関する。

【背景技術】

【0002】

多くの天然の多糖類、例えばデンプン及びアルギネートなどが食品中に見出されており又は食品成分として使用されている。デンプンは、自然界に生ずる最も豊富な多糖類の1つである。このバイオポリマーは、 $(C_6H_{10}O_5)_n$ の分子式を有し、nは、300から1000までの範囲である[1]。デンプンは、アミロース及びアミロペクチンと呼ばれる2つのポリマーの混合物から成る[1、2]。アミロース分子は、 α -1,4-アセタール結合によって連結された α -D-グルコピラノース単位から成る。アミロペクチン分子は、はるかに大きく高度に枝分かれしている。この分子は、 α -1,4線状結合を含み、 α -1,6結合を介して分岐している[1、2]。産業界で使用される殆どのデンプンは、通常は、20%と30%の間でアミロースを含み、残りはアミロペクチン(70~80%)及び脂質及びタンパク質等の微量成分(1%未満)である[3]。

【0003】

デンプンには明白な利点がある。デンプンは、比較的安全であり、インビボの適用に対してとても適した生体適合性及び生分解性プロファイルを有する。コロイド系との関連で

10

20

30

40

50

、デンプンは、それを生体分子開発のための有用な候補にする安定化特性を有する。デンプンは、アルコールに特徴的なさまざまな化学反応を受けることができる多数のヒドロキシル基を含有している。これは、さまざまな薬剤、標的成分、金属キレート剤、蛍光プローブなどが、デンプンベースの材料に抱合されることを可能にする。デンプンベースの材料はまた、かなり費用効果的でもあり得る。これらの利点にもかかわらず、デンプンは、生体材料として及び薬剤送達の適用において限定的な利用がなされてきた。天然デンプンは、その乏しい機械的及び化学的性質のために、限定された用途を有するが、さまざまな変性をデンプンの特性を改善するため及びその応用を広げるために行うことができる。最も一般的な化学変性は、グラフト、酸化、エステル化、エーテル化、及び加水分解である。アクリルベースのモノマーによるデンプンのグラフトにより、アクリルポリマーのpH応答性とデンプンの生分解性及び安定化特性との組合せのために薬物送達及び生物医学的応用の可能性を有する材料を生成することができる。

10

【0004】

制御された薬物送達のために、デンプン-キサンタンガムヒドロゲルが、デンプンとキサンタンガムをトリメタリン酸ナトリウムにより架橋することによって合成されている[4]。デンプンは、放射線、光分解、又は触媒、及び金属イオン、過氧化物若しくは過硫酸塩などの開始剤を用いて、さまざまなビニルモノマーのグラフト重合[5]によって変性されている[5~12]。デンプンへのビニルモノマーのグラフトは、フリーラジカル開始反応によって一般に達成される。デンプンのグラフト共重合体は、ヒドロゲル、凝集剤、イオン交換体、高吸収性樹脂などとして使用されてきている[13~18]。

20

【0005】

親水性アクリルモノマーは、調節可能な膨潤動態を有するヒドロゲルを形成することができ、薬物送達及び骨芽細胞接着性の改良などのその他の生物医学的応用のために利用されている[19~21]。デンプンの生分解性特性とアクリル系ポリマーのpH応答性との組合せは、生物医学及び薬剤送達において可能性を有する興味深いヒドロゲルにつなげることができる。既刊の研究は、過硫酸カリウムがメタクリル酸のデンプンへのグラフトを開始することができることを示しているが、相当量のホモポリマーが形成される[22]。過硫酸カリウム/チオ硫酸ナトリウムレドックス開始システムを使用することによって、Hebeishらは、ホモポリマーの形成を最小限にしながらポリメタクリル酸をデンプンに効率よくグラフトすることができた[6、7]。

30

【0006】

多くの応用において、pHのような環境刺激に応答する速い相転移が望ましい。しかしながら、大きい規模のバルクヒドロゲルは、ポリマーネットワーク中の立体構造変化並びにそのネットワーク中の溶質及び水の拡散に時間がかかるために、寸法変化が通常は遅くなる。その応答時間は拡散距離の二乗に比例するので、その相移転速度はヒドロゲルの寸法を調節することによって制御することができる[23]。一般に、ナノサイズのポリマーは、マイクロ秒のオーダーでの膨潤平衡及び相転移を受ける。それ故に、刺激応答性のナノ粒子は、刺激応答性の薬剤送達において潜在的に有用であり、それらの刺激に対する著しく速い応答のためにセンサー又はマイクロスイッチとして役立つことができる。

40

【0007】

ビニルモノマーのグラフト重合については多数の出版物があるにも関わらず、ナノサイズのデンプンに基づくpHに敏感な粒子の開発及び特徴づけに関する既報データは非常に限られている。Saboktakinらは、バルクポリマーを産生するためのポリメタクリル酸のカルボキシメチルデンプンへのグラフトについて最近記載している[24]。その著者らは、続いて凍結乾燥法を使用してナノ粒子を産生したが、彼らの方法では、水性媒体中におけるナノ粒子の安定なコロイド分散が得られない。Saboktakinらは、パクリタキセルの送達システムとしてのキトサンナノ粒子上へのポリメタクリル酸のグラフトについても記載している[24(a)]。Hiroseらは、国際特許公開WO 2011/084060において、2-ブロモイソブチリルブロミドのようなリンカーによる主鎖のヒドロキシル基の変性の後にメチルアクリレートモノマーが原子移動ラジカル重合(ATRP)によってグラフトされるデンプンの主鎖を有する

50

ポリマーについて記載している。ナノ粒子は、エマルジョン拡散法によってデンプンポリマーにより形成された。

【発明の概要】

【0008】

本明細書に記載されている発明は、ナノ粒子の合成のための方法を含む。

【0009】

本発明のナノ粒子は、カルボキシル基又はアミノ基を含むグラフトされたポリマー鎖を有するポリマー主鎖を含む。ナノ粒子の一部として共有結合しているのは、ナノ粒子の外面に存在するポリエトキシ化部分である。

【0010】

本発明のナノ粒子は、例えば、治療及び/又はシグナル分子のためのキャリアとして特に有用である。

【0011】

好ましくは、本発明のナノ粒子は、モノマーが主鎖ポリマーにグラフト重合し、ポリエトキシ化部分はその重合に加わってそのナノ粒子の一部として共有結合的に組み込まれるようになる「ワンポット」合成法において水溶液中で形成される。

【0012】

開示された実施形態において、ポリマー主鎖は、デンプンによって提供され、モノマーは、メタクリル酸(MAA)、ジエチルアミノエチルメタクリレート(DEAEM)であり、該ポリエトキシ化部分は、ポリソルベート80(Tween(登録商標)80)によって提供される。

【0013】

本発明のナノ粒子は、キャリアナノ粒子として特に有用である。そのキャリアのカーゴ又はペイロードは、薬物等の治療剤、フルオロフォア、例えばフルオレセインアミン、ガドリニウム等のシグナル分子であり得る。

【0014】

ナノ粒子の形成後に、ナノ粒子に治療物質が充填され得る。別法では、特にその粒子カーゴが、患者の中に存在する間にそのキャリア粒子から取り外すことが意図されていないシグナル分子又はその他の分子を含む場合、そのポリマーにはナノ粒子の製造前にそこへの共有結合によってその分子により機能性を付与することができる。開示されている例においては、有機キレート剤、ジエチレントリアミンペンタ酢酸二無水物(DTPAビス無水物)を、ナノ粒子に共有結合させた。1つの例において、DTPAは、ナノ粒子の製造前に多糖ポリマーの主鎖に共有結合され、別の例では、DTPAは、既に形成されているナノ粒子に結合された。 Gd^{+3} は、ナノ粒子の一部として予め組み込まれているキレート剤に充填された。

【0015】

別の例においては、水溶性であることが知られている薬剤の塩酸ドキソルビシンが、本発明のナノ粒子に充填され、インビボ挙動が特徴づけされた。

【0016】

比較的低い多分散指数(PDI)を有する本発明のナノ粒子を得ることが可能である。単分散型の例、即ち、ナノ粒子が0.12未満のPDIを有する組成物が提供される。

【0017】

複数のカルボキシル基又はアミノ基が存在する本発明のナノ粒子は、pHに敏感であり、ほぼ数ミリ秒程度で相転移を示す例が提供される。1つの態様において、さまざまな処理パラメーター及びpHによって決まる典型的に示された粒子の大きさが調べられている。平均直径が100nmから300nmを超えるまでの範囲であるナノ粒子組成物が本明細書には例示されている。

【0018】

抗癌剤のドキソルビシンの場合、1つの例は、薬剤抵抗性株化細胞中のIC50の減少を提供し、最大19倍までの減少が観察される薬物充填ナノ粒子を示す。従って、キャリアナノ粒子の可能性のある用途は、薬物抵抗性の乳癌の治療のためのドキソルビシンの制御された送達におけるものである。

10

20

30

40

50

【0019】

Gd⁺³充填ナノ粒子は、核磁気共鳴映像法(MRI)造影剤において使用することができ、この用途は本明細書に例示されている。

【0020】

粒子に共有結合された有機蛍光プローブを有するナノ粒子の使用もまたフルオレセインアミン異性体Iによって例示されている。

【0021】

本発明のナノ粒子は、インビトロ及びインビボの応用を有する。本明細書に記載されているインビトロの研究は、例えば、癌細胞による粒子の細胞取り込み及び肝細胞に対する最小の細胞毒性を示し、薬物送達及び診断への応用に有用であることを示唆している。

10

【0022】

典型的に示される粒子のNMR調査は、ポリソルベート80(PS80)が重合してポリメタクリル酸がグラフトしたデンプンのナノ粒子中に入り、その粒子の表面に存在することを示している。界面活性剤の性質を示すことが知られているポリエトキシ化ポリソルベートをナノ粒子に共有結合させることにより、生体系中のキャリアに安定性が付与される。その上、PS80は、血液中で低密度リポタンパク質(LDL)に結合し、LDL受容体の媒介による経細胞輸送によってナノ粒子が血液脳関門を通過することを促進することが知られている。この共有結合したPS80は、そのような粒子に脳を標的とするのに有利な電位を与えることができる。本明細書に記載されている我々の生体外の研究に加えて、画像データは、ナノ粒子の血液脳関門を通過する能力についての証拠を提供している。

20

【0023】

従って、本発明の実施形態は、ナノ粒子を製造する方法であって、

- (a) 溶液中にポリマーを可溶化するステップと、
 - (b) カルボン酸側基を含む重合可能なモノマーを供給するステップと、
 - (c) モノマーをグラフト重合して可溶化したポリマー上にポリマー鎖を形成するステップと、
 - (d) 形成している鎖と反応する官能基を有するエトキシ化分子を供給するステップと、
- を含み、

ステップ(c)がエトキシ化分子の存在下で行われて、エトキシ化分子をポリマー鎖に共有結合させる、方法である。

30

【0024】

溶液としては、ヒドロキシル溶媒、例えば、水、1種以上のアルコール、特にエタノール、又は水とアルコール(1種以上)の、特に水とエタノールの混合物を含むことができる。

【0025】

ポリマーは、ポリマーの構成単位当たり0.05と3の間(又は0.5と3の間、又は1と3の間、又は2と3の間)の置換度を有するポリヒドロキシルポリマーであり得、モノマーは、アルケニル基を含むことができ、グラフト重合ステップは、架橋剤の存在下で行うことができる。

40

【0026】

1つの実施形態によれば、ステップ(c)のモノマーは、架橋剤の量の1倍と20倍(モル/モル)の間の量で存在する。

【0027】

重合ステップは、フリーラジカル開始剤の存在下で行われるフリーラジカルグラフト重合であり得る。開始剤は、遷移金属を実質的に含まないものであり得る。特定の開始剤は、過硫酸塩(persulfate)又はその機能的同等物である。

【0028】

エトキシ化分子のエトキシ基(ethoxylate group)は、遊離のヒドロキシル基で終端することができる。エトキシ化分子は、界面活性剤分子をポリマー鎖に共有結合させるように

50

化学反応するアルケニル基を含むことができる。特定の実施形態において、エトキシ化分子は、R(C9-C31)-C(O)O-基を有するポリエトキシ化ソルビタンであり、ソルビタンは、重合ステップの間にR(C9-C31)-C(O)O-基のC-C共有結合を介して第二のポリマーに結合される。R(C9-C31)-C(O)O-基は、少なくとも1つのC-C不飽和を含むことができ、それは重合ステップにおいてC-C共有結合を形成するように反応する。

【0029】

ステップ(C)のポリマーの量及びモノマーの量は、ポリマーのモノマー単位に対するポリマー鎖中のモノマー単位のマール比が0.1と10の間であるナノ粒子を製造するように選択することができる。

【0030】

重合ステップは、界面活性剤、多くの場合、アニオン界面活性剤の存在下で行うことができる。

【0031】

実施形態は、生物学的薬剤の送達のためのナノ粒子を製造するステップを含み、薬剤は、ステップ(a)のポリマーに共有結合している。ポリマーは、ポリヒドロキシル化ポリマーであり得、薬剤は、そのヒドロキシル水素原子の置換によってポリマーに共有結合している。薬剤は、金属を錯体化することができる有機部分 (organic moiety) であり得、方法は、金属-有機部分錯体を形成するステップを含むことができる。金属(1種以上)は、核磁気共鳴映像法において信号を提供するように選択することができ、例えば、 Gd^{+3} であり得る。

【0032】

ステップ(c)のモノマーの量は、製造されるナノ粒子の水溶液の、pH7.4及び10mMのイオン強度で測定される、ゼータ電位の絶対値が少なくとも15mVとなるように十分に高く選択され得る。

【0033】

生物学的薬剤の送達のためのナノ粒子は、薬剤及び本発明の方法によって得られたナノ粒子を、液体媒体中で分散させて薬剤をナノ粒子中に取り込むことによって製造され得る。

【0034】

生物学的薬剤の送達のためのナノ粒子は、本発明の方法によって製造されたナノ粒子に、薬剤をナノ粒子のポリマー鎖のカルボン酸基に、共有結合させることによって製造され得る。

【0035】

1つの実施形態によれば、本発明は、キャリアナノ粒子を製造する方法であって、
(i) 水溶液中にポリマーを可溶化するステップと、
(ii) カルボン酸側基を含む重合可能なモノマーを供給するステップと、
(iii) モノマーをグラフト重合して可溶化したポリマー上にポリマー鎖を形成するステップと、
(iv) 形成している鎖と反応する官能基を有するポリエトキシ化分子を供給するステップと、
を含み、

重合ステップ(iii)がポリエトキシ化分子の存在下で行われ、ポリエトキシ化分子を形成している鎖に共有結合させ、重合生成物がナノ粒子の外側にポリエトキシ化部分を有するナノ粒子を形成する方法である。

【0036】

本発明は、(a)第一のポリマー、(b)第一のポリマーにグラフトした第二のポリマー、及び(c)第二のポリマーに共有結合したポリエトキシ化部分を含むナノ粒子を含む。

【0037】

1つの実施形態において、ナノ粒子の第二のポリマーは、第二のポリマーの主鎖の2つの炭素当たり約1個のカルボキシル基を有する重合したビニル基を含むことができる。第二

10

20

30

40

50

のポリマーは、ポリアルケニルポリマーであり得る。ポリアルケニルポリマーは、ポリアクリル酸であり得る。特定の実施形態によれば、ポリアクリル酸は、ポリ(メタクリル酸)である。

【0038】

ポリエトキシ化部分は、 $R(C_9-C_{31})-C(O)O-$ 基を有するソルビタンであり得、ソルビタンは、 $R-$ 基のC-C共有結合を介して第二のポリマーに結合している。

【0039】

ナノ粒子の第一のポリマーは、ポリヒドロキシルポリマーを含むことができる。

【0040】

第二のポリマーは、架橋されていてもよい。

10

【0041】

実施形態は、複数のナノ粒子を含む組成物を含み、組成物は、薬学的に活性な薬剤を含むことができる。そのような薬剤は、例えばナノ粒子に吸着され得る。

【0042】

組成物は、ナノ粒子及びシグナル分子を含むことができる。シグナル分子は、有機部分によりキレート化された金属であり得、部分はナノ粒子に共有結合されている。有機部分は、第一のポリマーに共有結合させることができる。

【0043】

シグナル分子は、ナノ粒子に共有結合させることができ、好ましくはカルボン酸側基に共有結合する。シグナル分子の例は、フルオロフォアである。

20

【0044】

ナノ粒子を含む組成物は、薬学的に活性な薬剤をさらに含むことができる。

【0045】

1つの実施形態は、(I)多糖を含む第一のポリマー、(II)第一のポリマーにグラフトしたポリ(メタクリル酸)を含む第二の架橋したポリマー、及び(III)第二のポリマーの炭素主鎖とR基との間のC-C結合によって第二のポリマーに共有結合している $(C_9-C_{31})R-C(O)O-$ 基を含む、ポリソルベートを含むナノ粒子を含む。

【0046】

ナノ粒子の $(C_9-C_{31})R-C(O)O-$ 基は、 $-(C_{17})R-C(O)O-$ であり得、式中、 R は、直鎖のアルキルである。ポリソルベートは、基 $-O(CH_2CH_2O)_w-C(O)(C_{17})R$ 、 $HO(CH_2CH_2O)_x-$ 、 $-HO(CH_2CH_2O)_y-$ 、 $-HO(CH_2CH_2O)_z-$ を含むことができ、但し、 $w+x+y+z=20$ である。多糖の分子量は、約2,600Daと約4,500Daの間であり得る。

30

【0047】

ポリ(メタクリル酸)のメタクリレートモノマー単位に対する多糖のモノマー単位のモル比は、0.2と8.0の間であり得る。

【0048】

ポリ(メタクリル酸)のメタクリレートモノマー単位に対するポリソルベートのモル比は、0.002と0.03の間であり得る。

【0049】

本発明の1つの実施形態は、ナノ粒子を製造する方法であって、

40

(a) 溶液中でポリマーを可溶化するステップ、

(b) アルキルアミノアルキルエステル側基を含む重合可能なモノマーを供給するステップ、

(c) 架橋剤を供給するステップ、及び

(d) モノマーをグラフト重合して可溶化したポリマー上にポリマー鎖を形成して、ナノ粒子を形成するステップ

を含む方法である。

【0050】

ポリマーは、ポリマーの構成単位当たり0.05と3の間の置換度を有するポリヒドロキシルポリマーであり得、モノマーは、アルケニル基を含むことができ、グラフト重合ステッ

50

プは、架橋剤の存在下で行うことができる。ポリヒドロキシルポリマーは、ポリマーの構成単位当たり1と3の間の置換度を有することができる。

【0051】

重合可能なモノマーは、メタクリル酸のアルキルアミノアルキルエステル、例えばジエチルアミノエチルメタクリレートであり得る。

【0052】

架橋剤は、エチレングリコールジメタクリレートであり得る。

【0053】

ステップ(d)のモノマーは、架橋剤の量の1倍と200倍の間の量(モル/モル)で存在することができる。

10

【0054】

ステップ(c)のポリマーの量及びモノマーの量は、ポリマーのモノマー単位に対するポリマー鎖中のモノマー単位のモル比が0.05と20の間、例えば2と4の間であるナノ粒子を製造するように選択することができる。

【0055】

ポリソルベートは、ステップ(d)において存在することができる。

【0056】

重合可能なモノマーは、ポリソルベートの量の5倍と50倍の間の量(モル/モル)、又は約10倍と40倍の間、又は約15倍と35倍の間、又は約20倍と30倍の間の量(モル/モル)で存在することができる。

20

【0057】

非イオン性安定剤、例えばポリビニルピロリドンを経ステップ(d)において存在させることができる。

【0058】

本発明は、(i)多糖を含む第一のポリマー、及び(ii)第一のポリマーにグラフトしたメタクリル酸のアルキルアミノアルキルエステルを含む第二の架橋ポリマーであって、架橋している第二のポリマーを含むナノ粒子を含む。

【0059】

第二のポリマーは、重合したジエチルアミノエチルメタクリル酸であり得る。

【0060】

30

第二のポリマーは、第二のポリマーの主鎖の2つの炭素当たり約1個のカルボキシル基を有する重合したビニル基を含むことができる。多糖は、デンプンであり得る。ナノ粒子は、それらの周囲の溶液のpHを約4から約7.4まで変化させたとき、500倍と1500倍の間で、或いは、それらの周囲の溶液のpHを約4から約7.4まで変化させたとき、約600倍と1400倍の間、又は約700倍と約1300倍の間又は約500倍と1300倍の間又は約400倍と1100倍の間、又は約700倍と1100倍の間、又は約800倍、又は約900倍、又は約1100倍の増加した体積変化を示すように製造することができる。

【図面の簡単な説明】

【0061】

【図1】ドキシソルビシンと1の最大化学量論比を有するナノ粒子のカルボン酸基との間の相互作用に対する図形データを示す図である。(A)さまざまなpHの緩衝液中に8.5mMのドキシソルビシンを滴下するブランクの示差エンタルピー曲線。(B)さまざまなpHの緩衝液中の0.1mg/mlのPMAA-g-St-PS80ナノ粒子中に8.5mMのドキシソルビシンを滴下する示差エンタルピー曲線。イオン強度は、NaCl添加によって0.15Mで一定に保たれた。

40

【図2】(A)デンプン、(B)PMAA-PS80、及び(C)PMAA-PS80-g-StのFTIRスペクトルを示す図である。主要なピークは、特定されて本書で説明されている。

【図3A】0.05MのNaOD中のA)PS80、B)デンプン、C)PMAA-PS80、D)PMAA-PS80-g-St-2の¹H NMRスペクトルを示す図である。主要なピークは分子模型上に示されているように特定されている。

【図3B】0.05MのNaOD中のE)PS80、F)デンプン、G)DTPA、H)St-DTPA、I)PMAA-PS80-g-St

50

、及びJ)PMAA-PS80-g-St-DTPAの ^1H NMRスペクトルを示す図である。主要なピークは分子模型上に示されているように特定されている。

【図4】血液脳関門を横切る毛細血管内腔からのPMAA-g-St-PS80-FITCの血管外漏出、PMAA-PS80-g-Stナノ粒子についての脳内分布及び蓄積の定性的及び定量的結果、全脳の生体外の近赤外蛍光画像を示す図である。(A)ナノ粒子が注射されていない正常脳と比較した、ナノ粒子の静脈内(iv)注射後の時間に応じた、脳内の相対蛍光強度の比。データは平均±標準偏差(n=4)として示されている。(B)生理食塩水(左)、PMAA-PS80-g-St(中央)及びPMAA-PS80-g-St(右)のiv投与に続いて45分間灌流されたマウスの脳の蛍光顕微鏡画像。PMAA-PS80-g-Stナノ粒子で処理した試料については、その粒子は脳毛細血管の血管周囲の領域で検出され得る。

10

【図5】ターポリマー合成の反応スキームにおけるさまざまな段階を説明している図式である。

【図6】以下を示す図である。(A)pH=7.4の0.15MのPBS中のPMAA-g-St-2のTEM画像。ナノ粒子は、モリブデン酸アンモニウムにより染色され、炭素被覆したグリッド上で乾燥された。(B)0.15MのpH7.4のPBS中のナノ粒子の強度加重流体力学直径。粒子は、ガウス分布を示し、比較的単分散型であった。

【図7】PDEAEM-g-St-2ナノ粒子のTEM画像を示す図である。

【図8】以下を示す図である。(A)0.15MのPBS中のMAA/Stの異なる供給モル比を有するナノ粒子についての相対直径対pH。D_{7.4}及びD₄は、それぞれpH7.4及び4における粒子の直径である。(B)さまざまなMAA/Stモル比の粒子についての表面電荷に対するpHの影響。イオン強度は、NaClを用いて10mMで一定に保たれた。データ点は、3つの単独測定の前平均±標準偏差を表す。

20

【図9】以下を示す図である。(A)電位差滴定曲線。空三角は、PMAA-g-St-2ラテックス分散液についての補正されていない電位差滴定曲線を表す。固形分=0.104重量%、C_s=0.05 N NaCl、[NaOH]=0.1N、[HCl]=0.1N。黒丸は、補正後の滴定曲線を表す。中空の丸は、ブランクの滴定曲線を示す。矢印は当量点を表す。この当量点は、さまざまなナノ粒子のバッチにおけるMAA含量を計算するために使用される。(B)さまざまなデンプン及びMAA含量のナノ粒子に対するイオン化度(α)に応じた、見掛けの解離常数(pK_a)の変化。

【図10】注射の間に30秒の安定化時間を用いる正及び逆電位差滴定を示す図である。(A)PMAA、(B)PMAA-g-St-2、(C)PMAA-g-St-4。正滴定と逆滴定との間の時間のずれは、高いデンプン含量を有するナノ粒子の場合においてのみ観察された。

30

【図11】さまざまなデンプン及びMAA含量のナノ粒子についてのイオン化度(α)に応じた、見掛けの解離定数(pK_a)における変化を示す図である。

【図12】粒径及びpH感度に対する(A)SDS、(B)PS80、(C)全体のモノマー濃度、及び(D)架橋剤モル比の影響を示す図である。黒の四角は粒径を表し、黒の三角は相対粒子径を表す。データ点は、3つの単独測定の前平均±標準偏差を表す。

【図13】(A)pH7.4の0.15Mのリソソーム緩衝液中のドキシソルビシンが詰め込まれている(LC=33%)PMAA-PS80-g-Stナノ粒子の数加重ガウス分布、及び(B)ドキシソルビシンが詰め込まれている(LC=33%)ナノ粒子の透過型電子顕微鏡写真(TEM)を示す図である。

【図14】(A)天然型のドキシソルビシン、(B)PMAA-PS80-g-Stナノ粒子、(C)ドキシソルビシンが詰め込まれている(LC=50%)ナノ粒子、及び(D)室温で6か月保存後のドキシソルビシンが詰め込まれている(LC=50%)ナノ粒子のXRDスペクトルを示す図である。ドキシソルビシンについて、天然型においてはディフラクトグラム中に結晶相の存在を示すはっきりとしたピークが見られるが、ナノ粒子は典型的な非晶質パターンを示す。ドキシソルビシンが詰め込まれているナノ粒子のディフラクトグラム中にピークがないのは、結晶ドキシソルビシンの非晶質ドキシソルビシンへの相変態を指し示す。

40

【図15】ドキシソルビシンと1の最大化学量論比を有するナノ粒子のカルボン酸基との間の相互作用に対する図形データを示す図である。(A)さまざまなNaCl含量を有する蒸留した脱イオン水(DDIW)中に8.5mMのドキシソルビシンを滴下するブランクの示差エンタルピー曲線。(B)さまざまなpHのさまざまなNaCl含量を有するDDIW中の0.1mg/mlのPMAA-g-St-PS8

50

0ナノ粒子中に8.5mMのドキソルビシンを滴下する示差エンタルピー曲線。

【図16】pHに依存するドキソルビシンのナノ粒子からの解離を示す図である。50%の薬物充填量を有するナノ粒子からの37℃におけるドキソルビシン解離の動態に対するpHの影響が示されている。透析バッグからの遊離のドキソルビシンの解離が対照として使用された。各緩衝系に対して、イオン強度はNaClを添加することによって0.15Mで一定に保たれた。

【図17】以下の(A)及び(B)を示す図である。(A)MDA-MB435/LCC6細胞(野生型(WT)及び多剤耐性型(MDR1)の両方とも、蛍光NPsと一緒に4時間のインキュベーションあり及び無し(対照)である)の蛍光顕微鏡画像。細胞核は、Hoescht 33342により染色されDAPIフィルターにより可視化され、細胞膜は、Vybrant(商標)DiIにより染色されCy3フィルターにより可視化され、そしてNPsは、フルオレセインアミン異性体Iにより標識化され、FITCフィルターにより可視化された。光学スライスが細胞の最上及び最下領域から2µm毎に採取され、細胞核のほぼ中間点の画像の選択を可能にした。(B)0.25mg/mlのPMAA-PS80-g-St NPsで4時間処理されたMDA-MB435/LCC6細胞のTEM顕微鏡写真。このナノ粒子は、ガドリニウムイオン(金属)が充填されており、電子密度の高い沈着物として現れる。左側の画像に点線で示されている領域は、右側の画像で拡大されている。

【図18】ナノ粒子が、野生型及び薬物抵抗性のヒト乳癌細胞によって効果的にエンドサイトーシスによって取り込まれることを示す図である。MDA-MB435/LCC6細胞に対するフローサイトメリーヒストグラムは、粒子摂取の際のインキュベーション時間及び温度の効果を示す。細胞は、0.25mg/mlの最終のナノ粒子濃度での蛍光標識したナノ粒子により37℃でインキュベートされた。(A)MDA-MB435/WT (1)バックグラウンド、(2)1時間のインキュベーション、(3)4時間のインキュベーション、(4)24時間のインキュベーション。(B)MDA-MB435/WT (1)バックグラウンド、(2)4℃、(3)24℃。(C)MDA-MB435/MDR1 (1)バックグラウンド、(2)1時間のインキュベーション、(3)4時間のインキュベーション、(4)24時間のインキュベーション。(D)MDA-MB435/MDR1 (1)バックグラウンド、(2)4℃、(3)24℃。488nmアルゴンイオンレーザーを用いる励起及び530nmで測定される発光。

【図19】ドキソルビシンが充填されているナノ粒子が、多剤耐性タンパク質1(MDR1)発現性ヒト乳癌細胞において著しく低い50%抑制濃度(IC50)値を示すことを明らかにしている図である。MTTアッセイにより、MDA-MB435/LCC6細胞型の遊離のドキソルビシン及びドキソルビシンが充填されているナノ粒子に対する応答が測定された。(A-B)増加する濃度の遊離のドキソルビシン及びドキソルビシンが充填されているナノ粒子への24時間(A)及び48時間(B)にわたる暴露後のMDA-MB435/LCC6/WT(n=3)細胞の細胞生存率。(C-D)増加する濃度の遊離のドキソルビシン及び薬物が充填されているナノ粒子への24時間(C)及び48時間(D)にわたる暴露後のMDA-MB435/LCC6/MDR1(n=3)細胞の細胞生存率。無処理の細胞及びブランクのナノ粒子と共にインキュベートされた細胞が、それぞれ遊離の薬物及び薬物を充填したナノ粒子に対する対照として使用された。細胞生存率は、各処理群に対する対照のパーセントとして表現されている。データ点は、それぞれの実験に対して示されている試験数の平均±標準偏差を表す。

【図20】(A)SA-NPs及びPF-NPsのTEM画像を示す図である。(B)染料結合されたナノ粒子は、近赤外(NIR)蛍光特性を示す。(C)SA-NPs及びPF-NPsの物理化学的特性の概要。粒径は、5分間の平均された測定値の数加重した直径を指す。充填効率(IE%)は、NPs中に組み込まれた最初に加えられた薬物の割合であり、一方、薬物充填含量(IC%)はナノ粒子の全重量に対する薬物重量のパーセントである。全ての値は、3つの独立試験の平均±標準偏差として記載されている。添加液中のドキソルビシン(Dox)の総量は1.25mgであった。

【図21】(A)Omniscan(登録商標)(0.1mmol/kg Gd³⁺)を注射した、(B)PolyGd(0.025mmol/kg Gd³⁺)を注射した、そして(C)PolyGd-Dox(0.025mmol/Kg Gd³⁺)を注射した、Balb/cマウスのコロナT₁強調(3D-FLASH、TE/TR 3/25ミリ秒、フリップ角20°)全身画像を示す図である。心臓、肝臓、膀胱はスライスAに示されている。スライスBは、腎臓及び大静脈を示す。Omniscan(登録商標)の四分の一の用量でPolyGd及びPolyGd-Doxは長期間にわたりはるかに高いコントラストを生じる。

【図 2 2】脳(左)及び血液(右)に対する蛍光強度(ベースラインに対して正規化されている)の割合を示す図である。そのデータは、PMAA-g-St-PS80の脳内の堆積に対する証拠を提供している。

【図 2 3】以下を示す図である。(A)SA-NPs及びPF-NPsのTEM画像。(B)SA-NPs及びPF-NPsの物理化学的特性の概要。粒径は、5分間の測定値の平均した数加重した直径を指す。充填効率(LE%)は、NPs中に組み込まれた最初に加えられた薬物の割合であり、一方、薬物充填含量(IC%)はナノ粒子の全重量に対する薬物重量のパーセントである。全ての値は、3つの独立試験の平均±標準偏差として記載されている。添加液中のDoxの総量は1.25mgであった。

【図 2 4】以下を示す図である。(A)トリパンプブルー排除アッセイを用いるラット肝臓細胞中のブランクの線状ポリマー及びナノ粒子、 Gd^{3+} を充填したポリマー及びナノ粒子、並びに遊離の Gd^{3+} のインビトロの細胞毒性。 Gd^{3+} の線状ポリマー及びナノ粒子中への充填は細胞における Gd^{3+} の毒性を著しく減少した(*対照と比較して統計的に有意($p<0.05$))。(B)培養液中のラット肝臓細胞に対する、生理食塩水(黒)、ブランクのポリマー(濃い灰色)、PolyGd(薄い灰色)及び遊離の Gd^{3+} (白)の30分、60分、120分、又は240分さらされたときの毒性。「生存%」は、トリパンプブルーを排除している肝細胞のパーセントを表す。3つの試験の平均及び標準偏差が示されている。星印(*)は、対照と比較した生存価における有意差($p<0.05$)を意味する。

【図 2 5】培養液中のラット肝臓細胞に対する、生理食塩水(黒)、ブランクのポリマー(濃い灰色)、PolyGd(薄い灰色)及び遊離の Gd^{3+} (白)の30分、60分、120分、又は240分さらされたときの毒性を示す図である。「生存%」は、トリパンプブルーを排除している肝細胞のパーセントを表す。3つの試験の平均及び標準偏差が示されている。星印(*)は、対照と比較した生存価における有意差($p<0.05$)を意味する。

【図 2 6 A】以下を示す図である。(A)同所性の乳房の腫瘍モデルを持っているマウスにおけるSA-NPs及びPF-NPsの全体の動物のリアルタイムの生体内分布及び腫瘍標的指向。ナノ粒子と結びついた蛍光は、静脈注射前(ベースライン)及びその後のナノ粒子注射に続く最大14日までのさまざまな時間で測定された。腫瘍は矢印で示されている。

【図 2 6 B】(B)SA-NPs及びPF-NPsの全身(左)及び腫瘍(右)からの時間に依存した排出プロファイル。対象領域に対する蛍光強度は、平均放射効率として記録された。データは平均±標準偏差($N=2\times 3$)として示されている。

【図 2 7 A】全身分布の定量的MRIを示す図である。(A) Gd^{3+} を充填したPMAA-g-Stポリマー($0.025\text{mmol/kg } Gd^{3+}$)を注射したBalb/cマウスの R_1 マップ。

【図 2 7 B】(B)左心室血液、肝臓、膀胱、及び腎臓の、Omniscan(登録商標)($0.1\text{mmol/Kg } Gd^{3+}$)、PolyGd($0.025\text{mmol/Kg } Gd^{3+}$)、及びPolyGd-Dox($0.025\text{mmol/Kg } Gd^{3+}$)に対するベースラインと対比した時間毎の緩和率 ΔR_1 の変化。PolyGd及びPolyGd-Doxは、Omniscan(登録商標)と比較して延長時間に対する血液の緩和速度においてはるかに高い増加を引き起こす。データは3つの独立した実行の平均±標準偏差として示されている。

【図 2 7 C】(C)SA-NPs及びPF-NPsについての組織分布及び腫瘍蓄積の定量的結果。ナノ粒子の静脈注射後の時間に応じた、NIR染料を結合したナノ粒子を注射してない普通の主要な臓器及び腫瘍と比較した、主要な臓器、腫瘍、及び血液中における相対的な蛍光強度の比。データは、平均±標準偏差($N=2\times 3$)として示されている。

【図 2 8】SA-NPs及びPF-NPsについての組織分布及び腫瘍蓄積の定量的結果を示す図である。ナノ粒子の静脈注射後の時間に応じた、NIR染料を結合したナノ粒子を注射してない普通の主要な臓器及び腫瘍と比較した、主要な臓器、腫瘍、及び血液中における相対的な蛍光強度の比。データは、平均±標準偏差($n=2\times 3$)として示されている。

【図 2 9】腫瘍を持っているBalb/cマウスにおけるPolyGd($0.025\text{mmol/kg } Gd^{3+}$)の生体内分布、排除及び腫瘍蓄積を示す図である。 Gd^{3+} 含量は、ICP-AESを用いて測定された。データは3つの独立した実行の平均±標準偏差として示されている。

【図 3 0】ナノ粒子中に組み込まれたポリソルベート80(PS80)の概略図を示す図である。PS80は、順々に脳微小血管中の低密度リポタンパク質(LDL)受容体に結合してナノ粒子の

10

20

30

40

50

トランスサイトosisを可能にするアポリポタンパク質E(Apo-E)に結合することができる。NMRデータは、St-g-PMAAナノ粒子及び線状ポリマー中へのPS80の重合を示している。共有結合したPS80は、インビボでの安定性を確保する。

【図3 1】粒子表面のポリソルベート80の発現を示唆するTOF-SIMSデータを示す図である。TOF-SIMSは、ソルビタン分子の側鎖である一連のオレイン酸及びステアリン脂肪酸を表すプラスイオンモードでの255、265、267、281及び283の特性ピークによってPS80の存在をはっきりと示す。

【図3 2 A】 Gd^{3+} 充填ナノ粒子の投与後のマウス脳の磁気共鳴(MR)画像化を示す図である。(A)ベースライン及びPMAA-g-St-P80の投与後20分におけるマウスの冠状の脳切片の R_1 マップ。(B)さまざまな時点における脳の R_1 値。

【図3 2 B】(C)脳内分布の定量的なMRI: Gd^{3+} を充填したPMAA-PS80-g-Stナノ粒子(0.05mmol/kg Gd^{3+})を注射したBalb/cマウス(n=3)の R_1 マップ。(D) Gd^{3+} を充填したPMAA-PS80-g-St-DTPAポリマー超過時間に対する矢状静脈洞、心室、皮質、及び皮質下部の縦緩和率(R_1)。星印(*)は、ベースラインと比較した R_1 値における有意差($p<0.05$)を意味する。

【図3 2 C】(E)さまざまな時点での脳の R_1 値。

【図3 3 A】以下を示す図である。(A)生物発光画像法(左)及び近赤外色素(Hilyte Fluor 750、フルオレセインアミン異性体I)により標識化されたPMAA-PS80-g-Stナノ粒子の分布(右)によって得られた脳腫瘍の代表的な画像。その結果は、脳腫瘍中でのナノ粒子の集積を強く示している。MDA-MB-231-luc-D3H2LNの脳転移が細胞の頭蓋内注射によって構築された。1週間後、その脳腫瘍はルシフェリン溶液の腹腔内注射に続いて3~5分間撮像された。その蛍光画像は、ナノ粒子の尾静脈注射の6時間後を取得された。

【図3 3 B】(B)Hoescht 33342で染色した細胞核(青)及びNIR HF 750で標識化したナノ粒子を可視化するDAPI及びRFPフィルターセットを用いて得られた脳腫瘍部分の蛍光顕微鏡画像。この画像はナノ粒子(赤)及びDox(緑)が共存していて、Doxがナノ粒子によって腫瘍組織に送達され、脳腫瘍中のナノ粒子から放出されることを示唆していることをはっきりと示す。

【図3 4 A】 $Gd(III)$ を充填した線状ポリマーがマウス腫瘍モデル中で著しいMRコントラストを実現することを示す図である。(A)PolyGd(上)及びPolyGd-Dox(下)の腫瘍分布(0.025mmol/kg Gd^{3+}): T_1 強調画像(1)及び対応する R_1 マップ(2)。矢印は右後方横腹の皮下に移植した腫瘍を示す。

【図3 4 B】(B)造影剤注射後48時間でもなお高められた腫瘍 R_1 を見せている腫瘍周辺及び腫瘍コアにおける ΔR_1 の経時変化。データは3つの独立した実行の平均±標準偏差として示されている。

【図3 5 A】EMT6/WT腫瘍を持っているマウスにおけるデンプンに基づくナノ粒子の抗腫瘍活性を示す図である。腫瘍細胞は、ゼロ日目に同所移植された。マウスは、(A)5%ブドウ糖(n=2×4)、(B)遊離のDox(n=8)、PF-NPs(n=2×4)、及び(C)PF-NPsにより、8日目及び15日目にDoxと等しい2×10mg/kgの用量で処理された。最高62日までの腫瘍容積。各曲線は、一匹の動物を表す。

【図3 5 B】EMT6/WT腫瘍を持っているマウスにおけるデンプンに基づくナノ粒子の抗腫瘍活性を示す図である。腫瘍細胞は、ゼロ日目に同所移植された。マウスは、(D)SA-NPs(n=2×3)により、8日目及び15日目にDoxと等しい2×10mg/kgの用量で処理された。最高62日までの腫瘍容積。各曲線は、一匹の動物を表す。(E)5%ブドウ糖、遊離のDox、PF-NPs、及びSA-NPsに対する Kaplan-Meier 生存曲線。生存曲線における傾向は著しく異なった($p=0.0033$, Mantel Cox)。マウスは8日目及び15日目にさまざまな製剤の静脈注射によって処理された。

【図3 5 C】(F)Doxと等しい2×10mg/kgの用量で、5%ブドウ糖(n=2×4)、遊離のDox(n=2×4)、PF-NPs(n=2×4)、及びSA-NPs(n=2×3)により処理された腫瘍を持っているマウスの体重の時間プロフィール。Balb/cマウスは、乳房脂肪体中にEMT6/WT腫瘍を接種され、接種後8日目及び15日目に処置を受けた。各曲線は、一匹の動物を表す。

【図3 5 D】(G)Doxと等しい2×10mg/kgの用量で、5%ブドウ糖(n=2×4)、遊離のDox(n=2

10

20

30

40

50

×4)、PF-NPs(n=2×4)、及びSA-NPs(n=2×3)により処理された腫瘍を持っているマウスの体重の時間プロフィール。Balb/cマウスは、乳房脂肪体中にEMT6/WT腫瘍を接種され、接種後8日目及び15日目に処置を受けた。各曲線は、一匹の動物を表す。

【図36A】以下を示す図である。(A)Gd³⁺を充填したPMAA-g-St-DTPAを0.03mmol Gd/kgで注射する前(ベースライン)及び15分後に得られた(1)全身及び(2)頸部及び頭部のコントラストの増強を表示しているMIP血管造影図。

【図36B】(B)全身血管造影図中の下大静脈から測定された血管の信号対雑音(S/N)比及びコントラスト対雑音比(C/N)の動態。*は、ベースラインと比較した有意差(p<0.05)を意味する。データは3つの独立した実行の平均及び標準偏差として示されている。

【図37】(A)純粋なデンプン、(B)PDEAEM、及び(C)PDEAEM-g-StのFTIRスペクトルを示す図である。

【図38】(A)デンプン、(B)PDEAEM、及び(C)PDEAEM-g-Stの¹H NMRスペクトルを示す図である。

【図39】0.15MのPBS(pH=4)中のPDEAEM-g-St-1ナノ粒子の強度-重量分布を示す図である。

【図40】0.15MのPBS(pH=7.4)中のPDEAEM-g-St-1の強度-重量分布を示す図である。

【図41】媒体のpHに応じた25℃でのさまざまなデンプン組成のPDEAEM-g-St粒子の直径を示す図である。

【図42】Gd結合PDEAEM-g-St-DTPAナノ粒子の異なるpHにおける直径を示す図である。

【図43】ナノ粒子中の近赤外色素結合を示す図である。A)結合反応の概略図。(B)ブランクと比較したNIR色素で標識化したPMAA-g-St-PS80。C)ナノ粒子は、4.3 µmol/gの色素含量により820nmで蛍光放射を示す。

【図44】(A)ネズミの乳癌腫瘍モデルにおけるPMAA-g-St-P80ポリマーの腫瘍蓄積を示す図である。その動物は、0.2mlのPMAA-g-St-PS80(4.5mg/ml)の尾静脈注射後のさまざまな時点で撮像された。その腫瘍は矢印で示されている。

【0062】

表の簡単な説明

表1は、ナノ粒子調製レシピ及びポリマー組成を示す。反応収率は、フィード中のMAA、PS80、及びデンプンの全重量に対する精製されたターポリマーの割合と定義された。

【0063】

表2は、薬物充填ナノ粒子の特徴づけを示す。粒径及び表面電荷に対する薬物充填の影響が示される。粒径は、5分間で平均された測定値の数加重直径を指す。充填効率は、NPs中に組み込まれた最初に加えられた薬物の割合であり、一方、薬物充填含量は、ナノ粒子の全重量に対する薬物の重量のパーセントである。全ての値は、3つの独立した試験の平均±標準偏差として記録されている。

【0064】

表3は、さまざまなpHの0.15MのPBS中のさまざまなMAA/Stの供給モル比を有するナノ粒子の強度加重流体力学直径を示す。イオン強度はNaClを用いて一定に保たれた。全ての値は、3つの独立した試験の平均±標準偏差として記載されている。

【0065】

表4は、pH4及びpH7.4及びイオン強度10mMの緩衝液におけるゼータ電位と共に滴定データから計算されたフィード及び生成物のMAA含量を示す。全ての値は、3つの独立した試験の平均±標準偏差として記載されている。

【0066】

表5Aは、St-DTPA-g-PMAA-P80のGd³⁺含量及びインビトロの緩和能を示す。緩和能は、0.9%NaCl中3T及び7Tで測定された。オムニスキャン(Omniscan)が、比較のために含まれた。

【0067】

表5Bは、Omniscan(登録商標)、PolyGd、及びPolyGd-Doxに対するGd³⁺含量、Dox含量、分子量、粒径、及びr₁を示す。r₁は、生理食塩水中3T及び7Tで測定された。3つの独立し

10

20

30

40

50

た実験の平均及び標準偏差が示されている。Omniscan(登録商標)の分子量は、その分子式に基づいて計算された。

【0068】

表6は、Omniscan(登録商標)、PolyGd、及びPolyGd-Doxに対する Gd^{+3} 含量、Dox含量、分子量、粒径、及び r_1 を示す。 r_1 は、生理食塩水中3T及び7Tで測定された。3つの独立した実験の平均及び標準偏差が示されている。Omniscan(登録商標)の分子量は、その分子式に基づいて計算された。

【0069】

表7は、さまざまなPDEAEM-g-Stバッチのフィードの組成を示す。

【発明を実施するための形態】

【0070】

[実施例]

化学物質及び試薬

可溶性デンプン(MW2,600-4,500Da)、メタクリル酸(MAA)、N,N'-メチレンビスアクリルアミド(MBA)、チオ硫酸ナトリウム(STS)、過硫酸カリウム(KPS)、ポリソルベート80(PS80)、及びドデシル硫酸ナトリウム(SDS)は、Sigma-Aldrich Canada(カナダ、オンタリオ州オークビル)から購入した。MAA阻害剤は、使用前に真空蒸留によって除去された。全てのその他の化学物質は試薬グレードで、入荷されたままで使用された。

【0071】

株化細胞及びメンテナンス

ネズミ乳癌株化細胞EMT6/WTは、Dr. Ian Tannock (オンタリオ州癌協会(Ontario Cancer Institute)、カナダ、オンタリオ州トロント)により最初に提供され、現在我々の研究室で維持されている。細胞の単層が、5%CO₂/95%空気の加湿した培養器中37°Cの75cm²ポリスチレン組織培養瓶で培養された。癌細胞は、10%ウシ胎仔血清(Cansera Inc.、カナダ、オンタリオ州エトビコーク)を補って、 α -最小必須培地中で維持された(オンタリオ州癌協会メディアラボラトリー(Ontario Cancer Institute Media Laboratory)、カナダ、オンタリオ州トロント)。コンフルエンスまで成長した細胞は、0.05%トリプシン-EDTA(Invitrogen Inc.、カナダ、オンタリオ州バーリントン)によりトリプシン処理され、新鮮な成長培地中に希釈され(1/10)、再び蒔かれた。

【0072】

実験動物及び同所性乳腺腫瘍の誘発

全ての動物研究は、大学健康ネットワーク(University Health Network)における動物実験委員会(animal care committee)によって認可されており、全ての実験は、動物ケアに関するカナダ評議会(Canadian Council on Animal Care)によって出された全ての指針及び規則に従って実施された。生まれて8週間経った雌のBalb/cマウス(Jackson laboratory、米国メイン州)が使用された。その動物は、研究の期間中、食物及び水への自由な接近を許容された。腫瘍の調査については、100万のネズミのEMT6乳癌細胞が、左脇腹に皮下注射された。腫瘍は成長について観察され、MRI調査は、腫瘍の平均直径が5mmのところから開始された。

【0073】

ナノ粒子の調製及び特性づけ

[実施例1]

ポリメタクリル酸-グラフト-デンプン(PMMA-g-St)ナノ粒子の合成

PMMA-PS-80-g-Stナノ粒子の合成

フリーラジカル分散重合法が、過硫酸カリウム/チオ硫酸ナトリウム開始(KPS/STS)システムを用いてPMMA-g-Stナノ粒子をワンポットで調製するために、使用された。一連の予備調査が、安定な粒子を得るために必要となる適当な界面活性剤タイプ及び濃度並びにモノマー濃度を特定するために実施された。

【0074】

重合は、ウォーターバス中に浸された、窒素導入口、凝縮器、温度計、及び電磁攪拌機

10

20

30

40

50

を取り付けた500mlの三つ口フラスコ中で行われた。所望量のデンプンが、蒸留水中に95℃で30分間加熱することによって溶解され、70℃まで冷却され、溶解している酸素を除去するためにN₂で30分間パージした。その後所要量のSDS、PS80、KPS及びSTSがそのデンプン溶液に攪拌下で加えられた。15分後、所要量の窒素でパージしたMAA及びMBAをその溶液に加えることによって反応が開始された。オパール色が5分後に現れ、反応は、完全な転化を確保するために70℃で8時間続けられた。その生成物は温水によって徹底的に2回洗浄され、メタノールによって抽出され、その後未反応物質及びホモポリマーを除去するために超遠心分離にかけられた。精製された粒子は、凍結乾燥され、その後の使用のためにデシケーター中で保存された。

【0075】

10

グラフト収率パーセント(GY%)は、方程式1:

【数1】

$$GY \% = \frac{W_I}{W_T} \times 100\% \quad (1)$$

【0076】

(式中、W_Iは、精製産物の重量であり、W_Tは、フィード中のモノマーの全重量である)を用いて計算された。

【0077】

別の例において、重合は、ウォーターバスに浸されており、窒素導入口、凝縮器、温度計、及び電磁攪拌機を備えている500mlの三つ口フラスコ中で行われた。最初に所望量のデンプン(図1)が170mlの蒸留した脱イオン水(DDIW)に溶解され、95℃で30分間加熱された。その溶液は、70℃に冷却され、溶解している酸素を除去するためにN₂により30分間パージされた。次に、5mlのDDIWに溶解した0.45mmolのKPS及び1.36mmolのSTSが加えられた。10分後、10mlのDDIWに溶解した所望量のSDS及びPS80(図1)を攪拌しながら反応混合物に加えた。15分後、反応は、窒素によりパージされた10mlの水中の既知量のMAA及びMBA(表1)を添加することによって開始され、最終溶液体積はDDIWを添加することによって200mlに調整された(表1)。5分後にオパール色が現れ、反応は完全な転化を確保するために70℃で8時間継続された。その生成物は温水及びメタノールによって徹底的に洗浄され、その後未反応物質及びホモポリマーを除去するために超遠心分離法(96,000g)にかけられた。精製された粒子は、凍結乾燥され、その後の使用のためにデシケーター中で保存された。

20

30

【0078】

その反応収率パーセント(RY%)は、次の方程式:

【数2】

$$RY \% = \frac{W_I}{W_T} \times 100\%$$

【0079】

(式中、W_Iは、精製産物の重量であり、W_Tは、フィード中のMAA、デンプン、及びPS80の合計重量である)

を用いて計算された。

40

【0080】

フーリエ変換赤外分光(FTIR)によるグラフトの確認

FTIRスペクトルが、パーキンエルマースペクトル1000シリーズ分光計(米国マサチューセッツ州)に基づいて記録された。スペクトルは、4cm⁻¹の解像度により取られ、32スキャンの中で平均化された。試料は完全に乾燥したKBrと共に十分に粉碎され、ペレットが真空下での圧縮によって作製された。

【0081】

プロトン核磁気共鳴分光法(¹H NMR)

¹H NMR測定結果は、Varian Mercury 400 MHz(米国カリフォルニア州)を使用して得られた。PMAA-g-St(架橋なし)の試料が、0.01MのNaODに溶解されて、15mg/mlの溶液濃度を得

50

た。スペクトルは、25°のパルス角度、10秒の遅延時間、及び2秒の捕捉時間で得られた。全ての化学シフトは水ピークを基準として100万分の1(ppm)で記録されている。

【0082】

透過電子顕微鏡法(TEM)によるナノ粒子の検査

透過電子顕微鏡法(TEM)が、ナノ粒子の形及び形態を検査するために使用された。PBS(pH=7.4)中のナノ粒子懸濁液がモリブデン酸アンモニウムにより染色され、炭素で被覆されたグリッド上に置かれた。その試料は、ろ紙により吸い取られ、そのまま乾燥された。透過電子顕微鏡写真が、100kVの加速電圧によるHitachi H7000電子顕微鏡(Hitachi Canada, Ltd.、カナダオンタリオ州、ミシサーガ)によって取得された。

【0083】

動的光散乱による粒径の測定

1つの例において、粒径は、NICOMP(商標)380ZLS(PSSNICOMP、米国カリフォルニア州、サンタバーバラ)装置を用いる動的光散乱(DLS)によって測定された。粒径は、HeNeレーザー光線により90°の検出角度で、37°Cで測定された。精製したラテックスが蒸留水中に分散され、Hielscher UP100Hプローブウルトラソニケーター(Hielscher USA, Inc.、米国ニュージャージー州、リングウッド)を、80%のピーク振幅及び溶液中5mmのプローブ深さで5分間用いて、5mg/mlのストックのラテックス懸濁液が調製された。ストック懸濁液は、さまざまなpH及び0.15Mの一定のイオン強度の水性緩衝溶液により10倍に希釈された。得られた希釈ラテックス懸濁液のpHは、pHメーターにより確認された。各試料についての粒径は、3回測定され、その3つのものの平均が記録された。強度加重平均直径(intensity-weighted mean diameter)が、それはオリジナルデータから直接計算され、体積加重及び数加重平均直径よりもより再現性があるので、流体力学的大きさとして使用された。粒径分布は、多分散指数(PdI)を用いて評価された。一般に0.12より小さいPdI値を有する粒子は、単分散とみなされる。

【0084】

ゼータ電位測定

表面電荷に対する粒子組成及びpHの影響を調査するために、粒子のゼータ電位が電気泳動移動度を用いて測定された。ストックのラテックス懸濁液が、異なるpH及び10mMの一定のイオン強度の緩衝溶液により希釈された。ゼータ電位は、Malvern zeta sizer Nano-ZS(Malvern、英国ウースターシャー)を用いてその後測定された。

【0085】

ナノ粒子の電気泳動移動度の値を測定するため、ストックのラテックス懸濁液が、異なるpH及び10mMの一定のイオン強度の緩衝溶液により希釈された。測定された電気泳動移動度(μ)は、次の式[25]:

【数3】

$$\xi = \frac{3}{2} \left(\frac{\mu \eta}{\epsilon_0 \epsilon_r f(\kappa R)} \right)$$

【0086】

(式中、Rは、粒子半径であり、 η は溶液粘度であり、 κ は逆デバイ長であり、 ϵ_0 は真空の誘電率であり、 ϵ_r は媒体の誘電定数であり、そして $f(\kappa R)$ は1:1の電解液に対するヘンリー関数である)

を用いてゼータ電位(ξ)と関連付けられる。

【0087】

滴定調査

電位差滴定が、Fisher Scientific Accumet AB15 pHメーター(Fisher Scientific、カナダ、オンタリオ州トロント)により行われた。試料は、0.050gの精製した粒子を50mLの0.05MのNaCl中に懸濁することによって用意された。滴定は、pH電極(Fisher Scientific)、及び窒素ラインを取り付けた、十分にきれいにした温度制御された(25°C)100mLのビーカー中で行われた。ポリマー懸濁液は、電磁攪拌機を用いて連続的に攪拌された。HCl及

10

20

30

40

50

びNaOHの0.1Mの体積標準溶液(Fisher Scientific、カナダ、オンタリオ州トロント)が滴定剤として使用された。そのラテックスのpHは、3.0まで下げられ、溶解している二酸化炭素をその系から除去するために滴定の前に20分間窒素がそのラテックス中にバブリングされた。不活性な雰囲気を維持するために滴定中に窒素が試料の上に穏やかに吹付けられた。特に断りのない限り、全てのデータは、正(酸中への塩基)滴定を用いて取得された。懸濁液は、平衡を確保するために各滴定剤添加の間において5分間安定化させた。最初の滴定データは、遊離の H^+ 及び OH^- の寄与を考慮することによって補正され、終点をよりはっきりとさせた。その補正は、方程式[26、27]:

【数 4】

$$[V]_{pH} = [V_{NaOH}]_{pH} + [V_{H^+}^0]_{pH} - [V_{OH^-}^0]_{pH}$$

10

【0088】

(式中、 $[V_{NaOH}]$ は分散液に加えられるNaOHの体積であり、

【数 5】

$$[V_{H^+}^0] \text{ 及び } [V_{OH^-}^0]$$

【0089】

は、分散液中と同じpHのブランクの溶液に加えられるHCl及びNaOHの体積である)に従って実施される。この補正によって、分散液中及びブランクの溶液中の H^+ 及び OH^- に対する同じ活量係数を仮定すれば、 $[V]_{pH}$ の値は、当量点において一定であるはずである。

20

【0090】

PMAA-g-Stナノ粒子合成

最大7.2%までの固形分を有する安定なPMAA-g-Stラテックスが上記の方法を用いて調製された。グラフトは、ワンポット合成工程で同時に起こるグラフト及びナノ粒子形成を可能にする修正された水分散液重合法を用いて実施された。その方法は、油及び有機溶媒の使用を必要としないことが見出された。最初に、モノマー、界面活性剤、及び開始剤が全て水に溶解する。

【0091】

表1に描かれているように、反応収率(RY%)は、フィード中のMAA濃度の増加に伴って増加する。この結果は、より高いMAA濃度におけるデンプンとPS80の付近におけるMAA分子のより大きな利用可能性によって説明され得る。デンプンマクロラジカルは、MAAより動きが少なく、従って、それらのMAA分子との反応は近接するモノマー分子の利用可能性に基本的に依存する。

30

【0092】

どんな理論にも制約されないが、開始剤が高温で分解するとき、発生した遊離ラジカルは、デンプン上で、溶質のモノマーと反応してオリゴマーラジカルを形成すると考えられる。成長するオリゴマー鎖は、それらの分子量及び濃度が上昇するにつれて次第に互いに連結する。臨界鎖長において、その形成されたグラフトポリマーは低いpHの媒体(カルボン酸基のプロトン化、及び開始剤からの硫酸イオンの生成による)に不溶性となり、安定剤を吸着して安定な粒子核を形成する。一旦粒子が形成されると、それらは連続相からモノマーを吸収する。この段階から、重合は、主としてモノマーで膨張した粒子中で起こる。

40

【0093】

表1は、選択されたナノ粒子バッチのレシピ及びそれらのそれぞれのグラフト収率(GY%)をまとめている。MAA濃度の増加は、グラフト収率の増加を伴った。これは、より高いMAA濃度におけるデンプンに近接しているモノマー分子のより大きな利用可能性の点から説明され得る。デンプンのマクロラジカルは、比較的に動かない。その結果、これらのマクロ分子のモノマーとの反応は基本的にデンプンに近接しているMAA分子の利用可能性に依存する。

50

【0094】

新しい分散重合法によるターポリマーナノ粒子の好結果の合成は、以下のように説明され得る。最初に、全ての反応物は水に溶解する。重合が進行するにつれて、形成されたターポリマーは、臨界鎖長において、カルボン酸基のプロトン化及びPS80疎水性側鎖の存在によって、低いpHの重合媒体中に不溶となる。その上、PMAAは、50℃のより低い臨界溶解温度(LCST)を示すことが知られており、それは70℃の重合温度で水溶液から沈殿することができることを意味する[28~30]。PMAAのこのLCST特性は、ナノ粒子形成に寄与することもできる。ポリマーの「ナノ沈殿物」は、安定剤を吸着して粒子核を形成することができる。その後それらは、連続相からモノマー又は低分子量ラジカルを吸収してより大きく成長することができる。界面活性剤の助けにより、そのより大きなナノ粒子は安定化される。重合条件下で形成されたターポリマーの相転移特性に基づいて、我々は、ワンポット合成プロセスの中で同時のグラフト及びナノ粒子形成を可能にするこの新たな水分散重合法を開発した。この方法は、油及び有機溶媒の使用を必要とせず、従って、逆マイクロエマルジョン重合法以上に有利である。

10

【0095】

グラフトの機構及びポリマー組成

FTIR及びNMR調査を用いて、グラフトを確認し、ポリマー組成及びグラフトの機構を検討した。デンプン、PMAA及びグラフトしたデンプンのFTIRスペクトルが、図2に示されている。天然デンプンのスペクトルと比較して、大きな変化は、 1738cm^{-1} におけるカルボニルC=O吸収周波数の存在である。天然デンプンにおける 1166cm^{-1} 、 1090cm^{-1} 、 1020cm^{-1} 、及び 954cm^{-1} のピークは、CO結合伸縮に起因している。 1090cm^{-1} 及び 1020cm^{-1} のピークは、無水グルコース環CO/CC伸縮の特徴を示す。 1645cm^{-1} の特性ピークは、デンプン中の結合した水の存在に起因する。水素結合したヒドロキシル基(O-H)によるブロードバンドが 450cm^{-1} に現れており、分子間及び分子内結合した遊離のヒドロキシル基に関連した複雑な振動性伸縮によるものである。 2940cm^{-1} のバンドは、C-H伸縮の特徴を示す。天然デンプンにおける 3450cm^{-1} の強いOH伸縮バンドは、グラフト反応の後に強度が低下しており、デンプンのOH基を介したMAAとのデンプンの反応を暗示している。また、グラフトポリマーは、 $520\sim 920\text{cm}^{-1}$ のピラノース環振動及びさらにPMAAのデンプンへのグラフトを確認するMAAホモポリマーにはない 1032cm^{-1} のCO/CC環伸縮の特性ピークも示す。

20

【0096】

図3は、a)PS80、b)可溶性デンプン、c)PMAA及びd)PMAA-g-Stの ^1H -NMRスペクトルを示す。0.86ppmにおけるピークは、PS80の脂肪族 CH_3 プロトンに相当する。1.27におけるピークは、界面活性剤の脂肪族 CH_2 領域に由来している。3.62ppmにおける大きいピークは、PS80のポリエチレンオキシド領域の CH_2 プロトンからである。5.33における小さいピークは、脂肪酸鎖(二重結合)中のCH基からである。脂肪族領域中のより小さいピークは、脂肪酸尾部のさまざまな部分に属する。デンプンのスペクトルは、3.5ppmにおいて、C6炭素に結合したデンプン単位の CH_2 に帰せられる特性ピークを示す。3.8ppmにおけるピークは、C1~C5炭素に加えられるCH単位に結合された水素に帰せられる。5.1ppmにおけるピークは、R-OHヒドロキシル基の水素に帰せられる。興味深いことに、ホモポリマーPMAAのスペクトルは、PMAA及びPS80の両方に特徴的なピークを示す。0.94ppm及び1.66ppmにおけるピークは、それぞれPMAAの CH_3 及び CH_2 に由来する。5.33ppmにおけるCHのピークは、PS80-PMAAコポリマーではなく、PS80が、MAAモノマーとその二重結合を介して反応することを示している。PS80は、主要な疎水性置換基として、モノ-、ジ-、及びトリ-不飽和脂肪酸エステルを含有しており、この界面活性剤に対する重合経路の可能性を引き上げる。さらに、酸化反応に加わるPS80の能力はこれまでに文献によく解説されている[31~33]。実際に、PS80は、薬物安定性の評価のための酸化剤として使用されてきた[34]。開始剤の存在下で、界面活性剤上のアルキルフリーラジカルは、水素引き抜き反応によって形成され得る。これは、熱又は光化学のRH結合の均一開裂を含む、さまざまなプロセスによって起こり得る。その後、フリーラジカルは、モノマーの二重結合を攻撃することによってグラフト重合反応に加わることができる。

30

40

50

【0097】

PMAA-g-Stポリマーの¹H NMRスペクトルは、デンプン、MAA、及びPS80に特有のピークを示す。グラフトによってもたらされた化学環境の改変により、0.94、1.29、1.66、3.5のピークにおける小さいシフト並びに3.5ppmのピークにおける形状のわずかな変化が存在する。また、5.1におけるピークの相対強度の減少が存在し、デンプンのヒドロキシル基がグラフト反応に関与していることを示している。このピークは、試料中に存在する無水グルコース単位の量に直線的に依存している。3.52、3.70、及び1.66のピークの下面積は、最終生成物におけるデンプン、MMA、及びPS80のモル比を計算するために使用され、表1に示された。加えて、滴定調査からの当量点データを用いて、我々は異なる供給モノマー比で調製されたナノ粒子中のMAA含量を決定した。これらのデータもまた、表2に示されている。フィード及び生成物中のMAAとデンプンのモル比の間には比較的良好な関係が存在する。しかしながら、フィード中のPS80の小さい画分のみがその最終生成物中には組み込まれる。最終生成物中のその界面活性剤の相対的モル比は、フィード中のMAAの量が減ると減少し、おそらく、PS80は、主としてMAAモノマーとの共重合を通してグラフトポリマー中に組み込まれることを暗示している。

10

【0098】

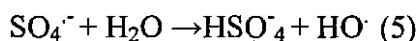
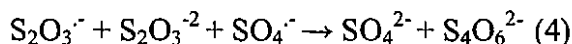
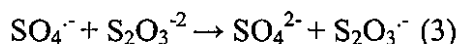
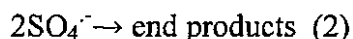
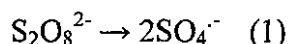
さらなるFTIR及びH¹ NMRスペクトルが図4に示されている。

【0099】

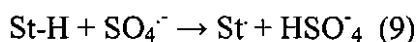
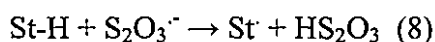
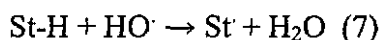
デンプンへのPMAAのグラフトのための開始プロセス及びフリーラジカル形成は、次の反応スキームによって説明され得る [35、36]。

20

【化1】



30



【0100】

反応(3)、(5)、及び(6)は、さまざまなフリーラジカル種の連続形成に有利であるが、反応(2)及び(4)は、フリーラジカルの消滅をもたらす。チオ硫酸塩 (thiosulfate) が存在すると、さまざまなフリーラジカル: 硫酸ラジカル、チオ硫酸ラジカル、及びヒドロキシルラジカルが存在し、それらはデンプンを攻撃してデンプン分子上で水素引き抜き及びフリーラジカルの形成をもたらすことができるものと考えられる。ヒドロキシルラジカル又はデンプンラジカルは、MAAの二重結合を攻撃し、MAAのデンプンへのグラフトを引き起こすことができる。従って、開始された鎖へのMAA分子のその後の添加は、図5によるグラフト鎖を増殖させる。最後に、成長しているグラフト鎖は、連結又は不均化によって停止される(図5)。MAAの同時の単独重合がMAAモノマー上のフリーラジカルの開始作用によってある程度さらに起こることに注意すべきである。

40

【0101】

ナノ粒子の形態及び粒径

分析された全てのナノ粒子は、およそ100~200nmの粒径及びどちらかといえば球状の非常に均一な形態を示した(図6A)。このナノ粒子は、多孔質の綿ボール様の表面形態を有す

50

る。多孔質構造を有することは、pH等の環境刺激に応じたより速い相転移とともにより高い薬物充填を促進することに関して有利であり得る。ある程度の粒子の凝集及び融合の存在もあるが、これはTEM試料調製の性質によるものであり得る。TEMグリッド上に近接近して置かれる粒子は、乾燥及び電子線の影響によって部分的に融合し得る。そのような挙動は一般的であり、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)粒子などの他のポリマーナノ粒子についても頻繁に報告されている[37]。

【0102】

表3に示されているように、ナノ粒子の粒径は、ターポリマーPMAA-PS80-g-St-3については、ポリマー組成及びpHによって、70nmから310nmまでの範囲であった。DLS測定からの典型的な粒径分布プロットは、図6Bに示されている。一般に、粒径分布は、多分散指数PdIがおおよそ0.09~0.14で、PMAAナノ粒子(PdI=0.26)を除いて比較的狭い。粒径は、薬物応用におけるナノ粒子の性能を決定する重要なパラメーターである。それは、反応速度(pH等の刺激に対する)、薬の放出、細胞取り込み、並びに癌細胞を効果的に殺す粒子の能力などの特性に影響を及ぼす。加えて、粒径は、インビボの薬物動態及び生体内分布に、すなわち封入された薬物の治療効果に大きな影響を及ぼす。PMAA-g-Stナノ粒子の粒径は、粒子が細胞取り込み機構を受け易くするとともに、ナノ粒子に対して受動的な腫瘍標的特性を与える、血管透過性・滞留性亢進(EPR)効果の影響を粒子が受け易くする[38]。腫瘍血管系の空隙率(最も末梢のヒト腫瘍の有効な平均細孔径は約300nmである)及びリンパ排水の欠如のために、適切な大きさのコロイドナノ粒子は、EPRによって腫瘍中に選択的に分配される。

【0103】

典型的な試料のTEM写真(図6)は、ナノ粒子が、ほぼ100~200nmの粒径、球に近い形、及び多孔性の綿ボール様の形態を有することを示している。多孔質構造は、pHのような環境刺激に応じたより速い相転移とともにより高い薬物充填を促進することに関して、密度の高い構造よりも有利であり得る。図7は、PDEAEM-g-St-2ナノ粒子のTEM画像を示している。

【0104】

均一な粒径もまた、体内のナノ粒子の分布及びそれらの生体細胞との相互作用がその粒径によって大きく影響されるために、薬物送達の適用に重要である。一般に、単分散粒子は、より均一な物理的及び化学的特性を示し、より洗練された理にかなった薬物送達システムを考案することを容易にする。

【0105】

生理的pH範囲でpH応答性の膨れを示すPMAA-g-Stナノ粒子

表3及び図8Aにおける結果は、pHを5から7.4まで増すと共に粒径が増大し、その粒径のpHに依存する変化は、MAA/Stのモル比に関連することを実証している。図8は、粒径がpHを4から7.4まで上げると共に増加し、その増加の規模はMAA含量によって決定されることを示している。例えば、PMAAナノ粒子の平均直径は、pH4における70.5nmからpH7.4における152nmまで2.2倍増加し、一方、PMAA-g-St-4は1.2倍に増加するのみであり、言い換えると、PMAAについては10.1倍の、PMAA-g-St-4については1.5倍の体積比($V_{7.4}/V_4$)になる。一般に、デンプン含量の増加は、pH感度における減少をもたらす。これは、より低いMAA含量はイオン化されたカルボン酸基のより低い含量に起因するものとされるより小さい静電反発力をもたらす、それゆえ膨れを低下させるという事実のせいとされ得る。異なるpH感度は、異なる量のイオン化可能な及び/又はイオン化されたカルボン酸基を意味する。より低いMAA含量は、より小さい静電反発力及びpH7.4におけるより低い膨れをもたらす、より小さい $V_{7.4}/V_4$ 値につながる。

【0106】

図8Aは、また、粒径の劇的な増加がpH5とpH6の間で起こることを示しており、PMAA含有ナノ粒子の体積相転移pHと合致する、この領域におけるイオン化遷移を示している[39]。PMAAのpKaより低いpH値において、プロトン化したカルボン酸基は、崩壊構造につながる広範な水素結合を形成する。より高いpH値においてカルボン酸基の増加したイオン化は、

ポリマー鎖の間に高い静電反発力をもたらし、それゆえ粒子を大きくした。

【0107】

粒子の表面電荷に対するpH及びPMAA含量の影響

ナノ粒子のゼータ電位が、表4及び図8Bにまとめられている。このデータは、全てのナノ粒子が、そのナノ粒子と結合しているカルボン酸基のイオン化によって、2から7までの媒体のpHの増大と共に増加する負の表面電荷を有することを示している。ゼータ電位は、液体のイオンによって作り出される電気二重層における電荷であり、それぞれの粒子の周りに存在する。水溶液中に分散されたナノ粒子は、静電的安定化(表面電荷)によって又は立体安定化(粒子表面における界面活性剤又はその他の分子)によって、或いは両方の組合せによって安定化され得る。一般に、 $\pm 20\text{mV}$ を超えるゼータ電位値が安定なコロイド分散の特徴と考えられる。DLVO理論によれば、凝集は、粒子間の引きつけるファンデルワールス力が、静電気反発力を圧するときに起こる。表4及び図8Bに示されているように、殆どのナノ粒子生成物は、調査されたさまざまなpH値において -20mV に近いかそれを超えるゼータ電位を有し、それ故コロイド的に安定であることが期待される。ナノ粒子中のPMAA含量が減少するとゼータ電位も低下する。pH4において、PMAA-g-St-4ナノ粒子は -2.7mV のゼータ電位を有し、それは、それらがいくらかのコロイド安定性の問題を有するであろうことを意味する。これらのデータは、高いpHにおけるより大きい負電荷と共に、PMAAがナノ粒子の表面電荷に大きく寄与することを示唆する。

10

【0108】

デンプンに基づくナノ粒子におけるカルボン酸基の特性付け

20

図9は、 $C_s=0.05\text{N}$ NaClでのPMAA-g-St-2ラテックス分散液の電位差滴定の例を示す。特別な定めのない限り、5分の安定化時間が各滴定剤の添加の間で設けられた。これは、平衡を得るために要する緩和時間が対応する低分子量の弱酸と比較して普通は非常に長いので、高分子電解質ラテックス粒子の滴定においては常法である。オリジナルの滴定データは、遊離の H^+ 及び OH^- の寄与を考慮に入れて補正され、終点をより明瞭にした。その補正は、方程式2[26、27]:

【数6】

$$[V]_{\text{pH}} = [V_{\text{NaOH}}]_{\text{pH}} + [V_{\text{H}^+}^0]_{\text{pH}} - [V_{\text{OH}^-}^0]_{\text{pH}} \quad (2)$$

【0109】

30

に従って実施される。上式中、 $[V_{\text{NaOH}}]$ は分散液に加えられるNaOHの体積であり、

【数7】

$$[V_{\text{H}^+}^0] \text{ 及び } [V_{\text{OH}^-}^0]$$

【0110】

は、その分散液中と同じpHのブランクの溶液に加えられるHCl及びNaOHの体積である。この補正により、分散液中及びブランクの溶液中の H^+ 及び OH^- に対して同じ活量係数を仮定すると、 $[V]_{\text{pH}}$ の値は、当量点で定数であるはずである。我々は、上記の手順を使って矢印で示されている2.39mlの当量点を決めた。この値は、単純なスプレッドシートプログラミングを用いる滴定曲線の変曲点から決定したものと十分一致している。

40

【0111】

滴定調査からの当量点データを用いて、我々は異なる供給モノマー比を有するさまざまなPMAA-g-Stバッチに対するMAA含量を確定した。これらのデータは、それらの対応する当量点データと共に表4に示されている。

【0112】

さまざまな組成のナノ粒子の pK_a 値が α に対して描かれた。 pK_0 値は、 pK_a 値を $\alpha=0$ に外挿することによって求められた。その pK_0 値は、ナノ粒子中のデンプン含量に依存することが見出された。それはPMAA-PS80ナノ粒子に対する4.9からPMAA-PS80-g-St-4ナノ粒子に対する5.8まで殆ど1単位増加した。PMAA-PS80-g-St-1粒子、PMAA-PS80-g-St-2粒子、及びPMAA-PS80-g-St-3粒子の固有のイオン化定数は、それぞれ5.0、5.1、及び5.5であった(図

50

9)。デンプン含量を増加することによる pK_0 の増大は、デンプンのヒドロキシル基とターポリマーの酸基との間のより高い度合いの水素結合の観点から説明され得る。ターポリマーのイオン化挙動における変化(pK_a の動きの変化によって証明される)は、粒子のより低い電荷密度、水に対するより高い親和性を促進することができるデンプンの親水性、並びにイオン性基のより拡大された立体配座及びより高い空間的隔離をもたらすであろうデンプンのより堅い鎖構造による可能性がある。

【0113】

電位差滴定法もPMAA-g-Stナノ粒子中のカルボン酸官能基の分布を調べるために使用された。ヒドロゲルナノ粒子のゲル相は、イオンに対して透過性である。それ故、滴定剤イオンは、水性のバルク相には制限されず、ゲル相中に拡散してそのゲル相中に存在する官能基を中和することができる。バルク相とゲル相の間の安定化時間は、滴定される官能基の分布に大きく依存する。表面に接近可能な基は、より短い平衡時間を必要とし、一方表面下に埋もれている滴定可能な基は、平衡に達するまでにより長い時間を要する。

【0114】

各添加の間の安定化時間をたった30秒として、速い逆滴定(塩基中への酸)が後に続く正滴定(酸中への塩基)の調査が、ナノ粒子中の酸基の分布の見識を得るために使用された。もし水相及びゲル相が滴定剤の次の量の添加前に完全に平衡に達している場合は、その正滴定及び逆滴定は完全にオーバーラップするはずであるが、もし平衡になっていない場合、その2つの滴定の間にはいくらかの時間のずれが観察されるはずである。図10は、PMAA及びMAA:Stのさまざまな供給比によるPMAA-g-Stの2つの異なるバッチに対する正滴定及び逆滴定の曲線を示している。PMAA粒子(図10A)及び高いMAA含量を有するPMAA-g-St粒子(図10B)は、両方とも正滴定と逆滴定の間で良好なオーバーラップを示しており、一方で、高いデンプン含量を有するPMAA-g-St粒子は、滴定の開始及び終わり近くのみで良好なオーバーラップを示した(図10C)。酸性基の滴定が発生するpH領域に大きなずれがあった。PMAA粒子及び低いデンプン含量を有するPMAA-g-St粒子についての速い安定化時間は、 H^+ イオンの拡散がゲル構造によって妨害されないことを示唆している。これは粒子表面近くにカルボン酸基が存在するためである可能性がある。対照的に、高いデンプン含量を有するPMAA-g-Stゲルにおける H^+ 付加の速度は、ゲル中の滴定可能な基に向けた H^+ 拡散の速度より速いようであり、物質移動過程がゲル構造によって一部妨害されることを示唆している。これらの結果に基づき、高レベルのデンプン含量を有するPMAA-g-Stナノ粒子中のカルボン酸基は、PMAA及びより低いデンプン含量のPMAA-g-St粒子におけるものよりも粒子表面に接近できにくいと結論づけることが妥当である。

【0115】

ポリ酸の酸強度又はイオン化の容易さは、各逐次電荷が、クーロン場がポリマーコイルの周りに積み重なるにつれて除去するのがより困難になるという点で、単一酸のそれとは異なる。ポリ酸の強度は、「見掛けの」 pK_a 値によって表され、方程式3:

$$pK_a = pH - \log\left(\frac{\alpha}{1-\alpha}\right) = pK_0 + 0.4343 \frac{\Delta G_{el}}{RT} \quad (3)$$

【0116】

(式中、 pK_0 は、固有の解離定数の負対数であり、Rは、気体定数であり、Tは、ケルビン温度であり、そして ΔG_{el} は、静電的相互作用期間である)によるイオン化度(α)と関係している[40、41]。

【0117】

そのイオン化度(α)は、

10

20

30

40

【数 9】

$$\alpha = \frac{[V]_{pH}}{[V]_{eq}} \quad (4)$$

【0118】

(式中、 $[V]_{eq}$ は、当量点の体積である)
によって計算される。

【0119】

方程式3は、非静電気期間(pK_0)と静電的相互作用期間(ΔG_{el})の和の観点から、 pK_a を説明している。図11においては、さまざまな組成物のナノ粒子の pK_a 値が α に対してプロットされている。 pK_0 値は、 pK_a 値を $\alpha=0$ に外挿することによって求められた。PMAAナノ粒子の pK_0 は、4.9であることが見出された。この値は、デンプン含量を増加することによって殆ど1単位増大した。実際に、5.8の pK_0 が、PMAA-g-St-4ナノ粒子について計算された。PMAA-g-St-1粒子、PMAA-g-St-2粒子、及びPMAA-g-St-3粒子の固有のイオン化定数は、それぞれ5.0、5.1、及び5.5であった。PMAAについての pK_0 の実験値は、線状PMAA及びまたイソ酪酸のそれとよく一致しており、恐らくラテックス表面のカルボン酸基の大部分がバルク水中におけるものと同じ環境を有していることを示している。上記のように、より低いPMAA含量のナノ粒子は、表面下に埋もれたそれらのCOOH基のいくらかを有する。これにより、それらのカルボン酸基の付近における誘電率を低下して pK_0 値を増すことができる。

【0120】

デンプン含量の増加は、ナノ粒子のイオン化挙動を変化させた(図11)。高いMAA含量を有するPMAA及びPMAA-g-Stの pK_a 値は、イオン化度の増加と共に最初は急激に増大した。 pK_a 値は、25%のイオン化付近でプラトーになり、40%のイオン化後に増大し始める。この挙動は、他の研究者によって同様に文書化されており、PMAAのコンパクトな/広がったコイル変形に起因する。一般に、その低いイオン化度でのコンパクト構造と一体となったPMAA粒子の高い電荷密度は、イオン化の範囲で pK_a 値における急激な初期の増加をもたらす。強い静電気反発力を最小限にするために、ポリマーは、より伸長されたコイル配列への立体構造変化を起こす。より高いデンプン含量を有するPMAA-g-St粒子は、異なる pK_a プロフィールを示した。この pK_a は、低いイオン化度で著しく高く、しかしながら、最高50%までの見掛けの解離定数において増加は殆どない。酸基は、このイオン化領域において単離された単位として挙動するようであり、小さい傾斜を有する pK_a 曲線を生ずる。これは、粒子のより低い電荷密度とともに、イオン化が可能な基のより伸張性の立体配座及びより高い空間的隔離をもたらす溶媒(水)とのより高度な適合性を促進するデンプンの親水性と関連付けて説明され得る。しかしながら、この pK_a 値は、より高い静電反発力によって50%のイオン化を超えて増加し始める。

【0121】

粒径及びpH感度に対する処理パラメーターの影響

図12Aは、粒径及び相転移に対するSDS濃度の影響を示す。PMAA-g-St粒子の直径は、界面活性剤含量が増加すると減少した。SDS界面活性剤の両親媒性構造は、水溶液中のポリマー粒子を安定させる助けとなり、それゆえポリマー鎖がより小さい粒子を形成することを可能にする。粒径に対する界面活性剤量の影響は顕著であった。例えば、SDSが0.17mmolから0.69mmolまで変化すると、粒径は591nmから298nmまで変化した。0.17mmol(0.05g)より下のSDSレベルは粒子の凝集をもたらした(矢印により注釈をつけられている)。PMAA-g-StコポリマーはCOOH基のイオン化のために負に帯電され、SDSはアニオン界面活性剤であるために、粒子表面に吸着されたSDSは粒子の凝集を防ぎながら、粒子が水中に分散することを助ける。pH=4における粒径に対するpH=7.4における粒径の比($D_{7.4}/D_4$)が、pH応答性を測定するために使用された。その比は、低いSDSレベルにおいて減少したが、しかしながら、これは粒子の凝集及びDLSによる誤解させるような高い読みをもたらす低いpH値での減少された量のSDSによる粒子の貧弱な安定性のためである。

【0122】

PS80濃度の増加の粒径及びpH応答性に対する影響は、図12Bに示されている。PS80量の増加は、粒径を若干増加させた。平均粒径は、0.13mmolのPS80での238nmから0.27mmolのPS80での300nmまで増加している。PS80レベルのさらなる増加は粒径に影響を及ぼさなかった。PS80濃度の増加は、また、粒子のpH感度の縮小をもたらした。上述のように、PS80は、フリーラジカルの形成並びにその二重結合によって重合反応に加わることができ、それ故、それはポリマー鎖の架橋を潜在的に推進することができる。多分、PS80濃度を増加することによって粒子の内部及び相互架橋が増加されて、ナノ粒子のpH感度の減少をもたらすことになる。

【0123】

全体のモノマー濃度が0.156mol/lから0.41mol/lに増加されると、平均粒径は、298nmから788nmまで増加した(図12C)。モノマー濃度が0.61mol/Lまでさらに増加されたとき、幅広の粒径分布が得られた(データは示されていない)。モノマー濃度のさらなる増加は、大規模な粒子の凝集をもたらした。モノマー濃度の増加は、それが核生成過程にさまざまに影響を及ぼすので、一般的に最終の粒径の増大を引き起こす。第一に、グラフトしたポリマー鎖は、連続相中に、この相の増大した溶解力によって、より長く留まることができる。その結果、そのオリゴマーは、沈殿前により長い鎖長に成長する。第二に、そのオリゴマー鎖の成長反応速度は増加する。また、安定剤の吸着速度は、その媒体の溶解力の変化のため、減少する。これらの効果の全てが、粒子核の平均サイズの増加に寄与する。興味深いことに、pH感度は、フィード中のモノマー濃度の変化の結果として著しく影響されることはなかった。

【0124】

図12Dは、粒径及びpH感度に対する架橋剤モル比、X、の影響を示す。架橋剤モル比は、次の方程式:

【数10】

$$X = \frac{\text{架橋剤のモル数}}{\text{全体のモノマーのモル数}} \quad (5)$$

【0125】

を用いて計算された。粒径は、架橋剤モル比(X)の増加の結果増加した。より高い架橋レベルでは、より多くのポリマー鎖が架橋されてより大きい粒子をもたらすことができることが仮定され得る。また、個々のより小さい粒子の間で架橋及び粒子拡散してより大きい粒子を形成するという、高い可能性が存在する。体積相転移の大きさは、架橋レベルを下げることによって減少された。架橋剤の含量は、架橋密度及びヒドロゲルの網目サイズに対して直接の影響を有しており[4]、従って、架橋剤含量は、ヒドロゲルの膨潤挙動に対して大きな影響を有する。架橋剤レベルの増加と共に架橋間のポリマー鎖長は減少し、その結果、ゲルの膨潤を制限する弾力的に伸縮する力が劇的に増加した。これはより高い架橋レベルにおける粒子のpH応答性の減少を説明する。

【0126】

PMAA-g-Stナノ粒子を合成するワンポット水性分散液重合法が、かくして例示されている。粒径及びナノ粒子のpH応答性の膨潤は、合成パラメーター、例えば、MAA/St比、界面活性剤濃度、架橋剤濃度、及び全体のモノマー濃度に依存する。これらのパラメーターの調節は、さまざまな粒径及びpH応答性を有するPMAA-g-Stナノ粒子の生成を示す。PS80は、生成物をターポリマーにする重合に参加することが見出された。ポリソルベートは、また、安定なナノ粒子の形成においても役割を果たす。重合中のデンプンの存在も、より均一な粒径分布を与えるようである。MAA/St比によって、そのナノ粒子は、媒体のpHが7.4と4.0の間で変化するとき、最高10倍の体積変化を起こすことができる。

【0127】

上述の例は、特にナノ粒子の合成及び特徴づけに関する本発明の実施形態を説明している。

【0128】

ナノ粒子の製造は、ポリマー主鎖を可溶化することを含む。実施例において、主鎖は、約2,600Daから約4,500Daの範囲の分子量を有するデンプンによって提供される。上記のように、デンプンは、天然に存在する生体適合性、生分解性の毒性のないポリマーである。デンプンは、グリコシド結合によって連結されたグルコース単位から構成されている。天然デンプンの主成分は、アミロース及びアミロペクチンである。好ましい実施形態において、ポリマー主鎖をつくり上げているモノマー単位は、0.5と3の間の置換度を有するヒドロキシル基を有する。これは、平均して主鎖中のモノマー単位は、それらがポリマー中に現れるとき、平均して0.5から3個のヒドロキシル基を有することを意味する。従って、例えば、線状のグルコースポリマーであるアミロースは、約3の置換度を有する。この置換度は、約1から約3まで、又は2から約3までの範囲であり得、或いはそれは約1、約2、又は約3であり得る。従って、このポリマー主鎖は、複数のヒドロキシル基を有しており、そのためポリヒドロキシル化されていると言われる。モノマー単位は、例えば、1つ以上のペントース又はヘキソース(例えばグルコース)であり得、そのためそれは主鎖のモノマー単位当たり5個又は6個の炭素を有することができる。好ましくは、主鎖は、モノマー当たり3、4、5、6又は7個、より好ましくは、5又は6個、最も好ましくは6個の炭素を有する。比較的高分子量の多糖類(例えば、二糖又は三糖とは対照的に)の例としては、カロース、ラミナリン、クリソラミナリン、キシラン、アラビノキシラン、マンナン、フコイダン及びガラクトマンナンが挙げられる。アミロースのような体内で容易に分解され得る多糖類は、それらのインビボの挙動を活用するために使用され得るが、セルロースのような消化されにくい多糖類も、本発明のナノ粒子を形成することができる。天然に存在するデンプンとしては、トウモロコシデンプン、ジャガイモデンプン、サツマイモデンプン、コムギデンプン、サゴヤシデンプン、タピオカデンプン、コメデンプン、ダイズデンプン、アロールートデンプン、アミオカデンプン、ワラビデンプン、ハスデンプン、ワキシトウモロコシデンプン(waxy maize starch)、及び高アミローストウモロコシデンプンが挙げられる。

10

20

【0129】

本発明のナノ粒子の製造は、モノマーをポリマーにグラフト重合することを含む。実施例において、メタクリル酸がデンプンにグラフトされた。メタクリル酸は、 α 、 β -不飽和カルボン酸であり、該実施例の重合製造プロセスは、フリーラジカルグラフト重合として知られている。そのような重合プロセスは、フリーラジカル開始剤の存在下で一般的には行われる。グラフト重合プロセスが進行すると、モノマー分子は、C-C結合が炭素をベースにした分子鎖とその分子鎖の側基からのカルボキシル基を形成している分子鎖に成長する。カルボキシル基は、その環境によってプロトン(H^+)を失うことができるブレンステッド酸であり、まさにカルボキシレート基(CO_2^-)として存在する。それ故、分子鎖上のカルボキシル基の数について言及されるとき、カルボキシル基の形は、それが CO_2H 又は CO_2^- であるかは考慮に入れられない。ナノ粒子におけるカルボキシル基の酸挙動は、ナノ粒子の特性、特に異なるpHにおけるその挙動に寄与し、これについては他の場所で議論される。モノマーが α 、 β -不飽和カルボン酸であるとき、ナノ粒子の一部として形成される分子鎖は、交互に並ぶ炭素上にカルボキシル基を有する炭素をベースにした分子鎖を含有する。

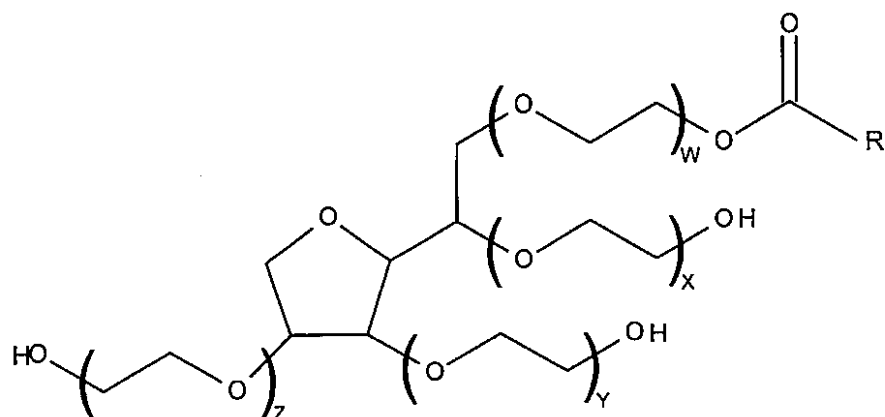
30

40

【0130】

本発明の好ましい「ワンポット」合成において、その重合反応は、重合反応に加わる、即ち形成されつつある側鎖と共有結合を形成するエトキシ化分子の存在下で行われる。実施例において、エトキシ化分子は、Tween(登録商標)80として市販されているポリソルベート80である。単語のポリソルベートは、構造:

【化 2】

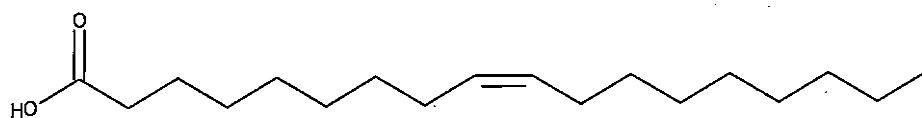


10

【0131】

を有する化合物の群を表現する。与えられたポリソルベートについて、 $w+x+y+z$ は与えられた数「 n 」に等しく、「 R 」は1つ以上の脂肪ヒドロカルビル基である。基- $O(O)C-R$ は、一般的には天然に存在する脂肪酸に相当する。ポリソルベート80の場合、 $n=20$ であり、 R 基は、オレイン酸：

【化 3】



20

【0132】

における R 基と同じである。実は、ポリソルベート80に対する別の名前は、ソルビタン核、オキシエチレン基($-CH_2-CH_2-O-$)及びそのソルビタンにエステル結合によって結合されたオレイン酸の存在を反映しており、そして n の値を示している、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレエートである。

【0133】

実施例で記載されているように、ポリソルベート80のオレイン酸 R 基は、モノマーのグラフト重合中に成長している側鎖に共有結合し、ポリエトキシ化部分はナノ粒子の外側表面に存在することになる。本発明は、ナノ粒子の合成中にこの挙動を見せるエトキシ化分子を含み、その重合ステップは、エトキシ化分子をポリマー鎖に共有結合させるエトキシ化分子の存在下で行われる。好ましくは、重合ステップは、ポリエトキシ化分子の存在下で行われ、ポリエトキシ化分子を形成しつつある分子鎖に共有結合させ、その重合した生成物がナノ粒子の外側にポリエトキシ化部分を有するナノ粒子を形成する。

30

【0134】

他の場所で示されているように、ポリエトキシ化部分は、本発明のナノ粒子に有用な実用特性を与える。ナノ粒子中に組み込まれるエトキシ化分子中のオキシエチレン単位又は基の数は、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39又は40であり得る。与えられたポリソルベートは、しばしば分子の混合物であり、それ故これらの数は平均を指していることに注意すべきである。好ましくは、このポリエトキシ化分子は、ソルビタンをベースとした分子である。より好ましくは、それはポリソルベートである。

40

【0135】

本発明のナノ粒子に対して特性化されたように、ポリソルベートの R 基の $C=C$ (不飽和)は、ナノ粒子合成の重合に関与する。従って、このポリエトキシ化部分は、合成中に形成するポリマー鎖に共有結合され、且つ形成されたナノ粒子の鎖に共有結合されることになる。 $R(C_9\sim C_{31})-C(O)O-$ 基を有するポリエトキシ化ソルビタンであって、グラフト重合の間にソルビタンがその $R(C_9\sim C_{31})-C(O)O-$ 基の $C-C$ 共有結合を介して第二のポリマーに結合するポリエトキシ化ソルビタンは、本発明の実施形態である。好ましくは、ソルビタンは、

50

オキシエチレン単位の総数が少なくとも10であるポリソルベートである。R(C9~C31)-C(=O)-基が、重合の段階においてC-C共有結合を形成する反応をする少なくとも1つのC-C不飽和を含むことも好ましい。そのR(C9~C31)-C(=O)-基は、C9、C10、C11、C12、C13、C14、C15、C16、C17、C18、C19、C20、C21、C22、C23、C24、C25、C26、C27、C28、C29、C30、C31のいずれかであり得る。偶数である炭素の総数を有する脂肪酸(R-CO₂H)はより一般的あり、このことは、この状況において奇数を有するR基がより一般的で、それが好ましいものをもたらし得ることを意味する。

【0136】

不飽和を含むポリソルベート80のオレイン酸成分以外の脂肪酸としては、例えば、リノール酸、アラキドン酸、ミリストレイン酸、パルミトレイン酸、サピエン酸、エライジン酸、バクセン酸、リノエライジン酸、 α -リノレン酸、エイコサペンタエン酸、エルカ酸などがある。ナノ粒子に対するさまざまな状況の下で、1つ以上のこれらの脂肪酸に基づく1つ以上のポリソルベートをその中に組み込むことが有利であることが見出され得る。

10

【0137】

実施例で説明されているように、グラフト重合段階のポリマー及びモノマーの相対量は、異なるポリマー/モノマー比を有するナノ粒子を得るように変化させることができる。ナノ粒子に関して、モノマー分子は、重合中に形成される分子鎖の一部であり、それ故モノマー単位と呼ばれることもできる。実施例が、ポリマー主鎖のモノマー単位に対する重合モノマーのモノマー単位のマール比(即ちMMA/St)が0.6から4.7であるナノ粒子を示す。約0.1と約10、又は0.2と9.0、又は0.2と8、又は0.2と8.0、又は0.2と7.0、又は0.3と7.0、又は0.3と6.0、又は0.4と6.0、又は0.4と5.0、又は0.4と4.0、又は0.4と3.0、又は0.5と6.0、又は0.6と6.0、又は0.7と6.0、又は0.8と6.0の間、又は1と5.0の間のその他の比を得ること、或いは、約0.1、約0.2、約0.3、約0.4、約0.5、約0.6、約0.7、約0.8、約0.9、約1、約1.5、約2、約2.5、約3、約3.5、約4、約4.5、約5、約5.5、約6、約6.5、約7、約7.5、約8、約8.5、約9、約9.5又は約10の比を得ることが可能である。

20

【0138】

実施例に同様に記載されているのは、ポリエトキシ分子及び重合したモノマーのモノマー単位の相対量が、ナノ粒子合成中にポリソルベート80及びMAAの量を変化させることによって、変えられたナノ粒子である。それらの粒子成分に対しては、約0.003から約0.01までの重合した分子鎖のモノマー単位に対するエトキシ化分子のマール比が示された。その他の比、即ち、約0.0005と1の間、約0.0006と0.1の間、約0.001と0.1の間、約0.001と0.05の間、約0.001と0.04の間、約0.002と0.04の間、約0.002と0.03の間、約0.002と0.02の間又は約0.003と0.01の間の比を得ること、或いは、例えば、約0.0005、約0.0007、約0.0009、約1、約0.9、約0.8、約0.7、約0.6、約0.5、約0.4、約0.3、約0.2、約0.1、約0.005、約0.006、約0.007、約0.008、又は約0.009の比を得ることが可能である。

30

【0139】

実施例のグラフト重合においてN,N'-メチレンビスアクリルアミドが使用された。実施例において、重合モノマー、MAA、及び架橋剤、MBA、のマール比は、約3:1から約7:1までの範囲であった。重合段階で使用されるモノマーの量は、マール基準で架橋剤の量の1倍と20倍の間であり得、又はそれは、1倍と15倍の間、又は1倍と10倍の間、又は2倍と10倍の間、又は2倍と9倍の間、又は2倍と8倍の間、2倍と7倍の間、又は2倍と6倍の間であり得、或いはモノマーの量は、マール基準で架橋剤の量の3倍と6倍の間であり得る。

40

【0140】

ナノ粒子の応用及び使用

本発明のナノ粒子のさまざまな改変により、特に医療に関連する多数の応用においてそれらの有用性が実証された。ナノ粒子の改変バージョンは、そのナノ粒子の合成中、又はそれらの作製後の両方で得ることが可能である。

【0141】

以下により詳細に記載されている1つの応用において、薬物送達剤としての本発明のナノ粒子の有用性が薬物ドキソルビシンを利用して実証されている。アントラサイクリン環

50

抗生物質の仲間の一つであるドキソルビシンは、さまざまなヒト及び動物の固形腫瘍において広い抗腫瘍活性を有する周知の抗癌剤である[42、43]。しかしながら、この薬物は非常に狭い治療指数を有しており、その臨床用途は、心臓毒性及び骨髓機能抑制などのいくつかの望ましくない副作用によって妨げられている[44～46]。もう一つの制限は、この薬物がよく知られたp-糖タンパク質(P-gp)基質であることである。P-gpは、多くの抗癌剤の細胞内蓄積を妨げ、それ故、主に能動的取り込みを妨げ、プラスに帯電した両親媒性の薬物の細胞流出をATPに依存する形式で増加させることによって、それらの細胞毒性活性の低下を引き起こす。P-gpの過剰発現は、癌細胞における多剤耐性の主要なメカニズムの1つであると思われる[47～50]。

【0142】

ドキソルビシンの適切なナノ粒子系との結合体は、ドキソルビシン化学療法と関連するいくつかの制限に立ち向かうことができる[51～55]。適切なナノキャリアシステム中に薬物を組み込むことによるそれらの標的化された送達により、インビボにおける薬物の生体内分布及び薬物動態が改変する[56]。原則として、薬物を充填したナノ粒子の腫瘍中の蓄積は、血管透過性・滞留性亢進(EPR)効果として知られる非特異性標的プロセスによって達成され得る[38、57]。腫瘍に特有であり正常組織にはない、漏出性血管系及び限定されたリンパ排水は、多種多様の腫瘍の間質腔内における高分子薬物搬送システムの集積をもたらす。ナノ粒子などのコロイド状キャリアとのドキソルビシンの結合体は、多剤耐性(MDR)を克服する可能性があり得る。P-gpは、薬物が、それが細胞膜内に存在するときのみ腫瘍細胞から流出され、それがそのエンドサイトーシス後に細胞質又はリソソーム中にある場合には流失されないことを認識することが仮説として取り上げられている[53、54、58、59]。

【0143】

血液脳関門(BBB)と称される、脳毛細血管内皮を裏打ちしている上皮様の密着帯(tight junctions)の存在によって、全ての新たな可能性のある脳薬剤のうち98%を超えるものが、それらがBBBを超えることができないために、無効になる。薬剤の脳送達の分野においては、このBBBを克服するための多数の試み、例えば、密着帯の浸透圧開口、プロドラッグの使用、並びに標的抗体、リポソーム、及びナノ粒子のようなキャリアシステムがある[60～63]。ほぼ10年の間、界面活性剤を被覆したナノ粒子が該BBBを超えて薬物を首尾よく輸送することが報告されている。ナノ粒子に媒介される薬物輸送は、特にポリソルベート、とりわけポリソルベート80(Tween80)による粒子の被覆に部分的に依存する[63～67]。これらの材料による上塗りは、血漿からのアポリポタンパク質E(ApoE)のナノ粒子表面への吸着をもたらす。そして、その粒子は低密度リポタンパク質(LDL)粒子に似ているように見え、LDL受容体と相互作用してBBBを裏打ちしている内皮細胞によるそれらのファゴサイトーシスをもたらす。ナノ粒子中に封入された薬物又はイメージングプローブは、受容体に媒介されるトランスサイトーシスによってこれらの細胞中にその後移送され得る[63、68、69]。加えて、密着結合の調節又はP-糖タンパク流出系の抑制等のプロセスも起こり、その結果ナノ粒子の脳への取り込みをもたらすものと思われる。今日まで、多くのさまざまな界面活性剤が評価されている。ポリソルベート80の上塗りのみが静脈内投与後に脳標的効果を生じることが明らかにされており、脳標的におけるポリソルベート80についての特異的役割を示唆している[63]。ポリソルベート80を上塗りすることの効果は、ナノ粒子の表面に吸収された界面活性剤が、粒子表面に対する高い親和性を有する血液成分による置き換えによりインビボで脱着され得るという事実のために限定される。

【0144】

別の応用において、本発明のナノ粒子の有用性は、医療診断の領域で実証されており、以下に記載されている例は、核磁気共鳴映像法(MRI)、及び蛍光プローブの領域における使用を示している。

【0145】

核磁気共鳴映像法は、診断及び分析に用いる既知の強力なモダリティであり、優れた軟組織コントラストを有する任意の平面内の生体構造の非侵襲性三次元視覚化を提供し、

10

20

30

40

50

定量的な生体指標を用いる脈管及び組織の生理機能及び病状の調査を可能にする[70、71]。MR画像における軟組織のコントラストは、画像検査法、プロトコール及び組織の緩和時間定数(例えば、 T_1 、 T_2)に応じて多因子性である。外因性の常磁性造影剤、例えば、 Gd^{3+} 、 Fe^{3+} 、及び Mn^{2+} 錯体が、一般に使用され、それは特定の適用において、周囲の水プロトンの緩和率を変えて血管及び軟組織コントラストを際立たせる[72]。

【0146】

ガドリニウム(Gd^{3+})は、高い緩和効率及び磁気モーメントの故にMRIに使用される主要な常磁性分子である[73~75]。しかしながら、ガドリニウムはその遊離の形において、生体系に対して毒性が強く、それ故、 Gd^{3+} 造影剤がそれらの臨床安全性プロファイルを改善するために安定な水溶性キレートとして組み立てられる[76~78]。 Gd^{3+} をベースとする造影剤の「緩和能」と呼ばれるコントラストを高める能力は、 Gd^{3+} イオンの内部配位圏内の交換可能な水分子の数に正比例する[72~74]。あいにく、有機キレート剤による Gd^{3+} の錯体形成は、内圏の水分子の数を減少する。それ故、 Gd^{3+} をベースとするMRI造影剤のデザインにおける主要課題の1つは、それらの中毒性副作用を最小限にしながらいかにしてそれらの緩和能を増すかということである。

10

【0147】

臨床上用いられる Gd^{3+} 造影剤、例えば、ジエチレントリアミン五酢酸ガドリニウム(マグネピスト(登録商標))及びジエチレントリアミン五酢酸ビスメチルアミドガドリニウム(Omniscan(登録商標))などは、毒性がなく、それにもかかわらず、比較的低い T_1 緩和能、細胞外間隙への素早い血管の血管外漏出、全身への非特異性分布、及び速い腎クリアランスを示す。その結果、臨床診療において、 Gd^{3+} 造影剤の頻回注射又は導入がただ一つの診断のために必要となる[79]。対照的に、毒性のない高分子のMRI造影剤、例えば、PEG、ポリ(L-リジン)、ポリ(グルタミン酸)、デンドリマー、デキストラン、及びリポソーム、ミセル、及びその他のそのような系を含めた超分子系などは、血流中でより高い T_1 緩和能及びより長い収容期間を示す[80~90]。これらの高分子及び超分子系もまた、血管透過性・滞留性亢進(EPR)効果として知られる漏れやすい血管系及び発達中の周囲のリンパ管による腫瘍の消極的な標的指向を有効にする[57、91]。

20

【0148】

デンプンをベースにした誘導体、例えば、カルボキシメチルデンプンなどは、血漿増補液としてヒトで既に使用されており、それはデキストランと比較するとそのより低い免疫の可能性のために一般に耐容性良好である。アルブミンとは違って、カルボキシメチルデンプンは、免疫学的に活性であり得るペプチド成分を含んでおらず、抗体産生を誘発することができる。[92]

30

本明細書で例示されているように、ポリメタクリル酸-グラフト-デンプン-DTPA(PMAA-g-St-DTPA)を含有するデンプンをベースにしたナノ粒子は、水中の単一のワンポット合成方法で合成され得る。そのポリマーは高い親和性によりガドリニウムに結合することができる。この合成方法は、生理的pHにおいて溶解する適切な分子量のポリマーを得るように調整することができる。

【0149】

この系のデンプン及びメタクリル酸成分による豊富なヒドロキシル及びカルボン酸基のお蔭で、高範囲の薬物、標的指向化部分、及び蛍光プローブがポリマーに結合され得る。

40

【0150】

[実施例2]

抗癌剤ドキソルビシンの送達のためのSt-g-PMAA-P80ナノ粒子

ナノ粒子のドキソルビシン(カチオン性、 $M_w=579.98\text{g/mol}$)を取り込む能力が薬物取り込み調査を用いて評価された。15ミリグラムの凍結乾燥されたナノ粒子が10mlの蒸留した脱イオン水(DDIW)中に懸濁される。薬物は、 $0.1\sim 5\text{mg/ml}$ の濃度でその懸濁液に加えられ、24時間そのナノ粒子に吸着させられる。その粒子は、次に30000rpmで30分間の超遠心分離にかけられ、上澄み液中の薬物の量が紫外分光光度計を用いて分析される。その後、粒子中に取り込まれた薬物の量が、充填用溶液中の初期の薬物濃度から最後の薬物濃度を差し

50

引くことによって計算される。薬物充填量及び封入効率は、その時次の方程式を用いて計算される：

【数 1 1】

$$\text{薬物充填量\%} = \frac{\text{充填された薬物の重量}}{\text{薬物の重量} + \text{ナノ粒子の重量}} \times 100\%$$

$$\text{薬物充填効率\%} = \frac{\text{充填された薬物の重量}}{\text{充填溶液中の初期の薬物濃度}} \times 100\%$$

10

【0 1 5 1】

PolyGd-Doxナノ粒子の粒径及び表面電荷は、DLS及び電気泳動移動度測定によって測定された。そのナノ粒子分散液は、pH=7.4及び150mM(寸法測定)又は10mM(ζ-電位測定)のイオン強度を有するPBSを用いて0.5mg/mlに希釈された。すべての寸法及びζ-電位測定は、Malvern Zetasizer Nano ZS(ウースターシャー、英国)を用いて実施された。各測定は3重に行われ、平均±標準偏差が報告されている(表5A及び5B)。

【0 1 5 2】

そこにあるデータは、PMAA-PS 80-g-Stナノ粒子が、それらのコロイド安定性を失うことなく、相当量のDoxを充填することができることを示している(図13)。図14に示されているのは、A)天然型のドキシソルビシン、B)PMAA-PS 80-g-Stナノ粒子、C)ドキシソルビシンを充填したナノ粒子(LC=50%)、D)室温で6か月保存した後のドキシソルビシンを充填したナノ粒子(LC=50%)のXRDスペクトルである。ドキシソルビシンについては、天然型においては結晶相の存在を示すはっきりしたピークがディフラクトグラム中に見られるが、一方ナノ粒子は、典型的な非結晶質のパターンを示している。ドキシソルビシンが充填されたナノ粒子のディフラクトグラム中にピークがないことは、結晶質ドキシソルビシンの非結晶質のドキシソルビシンへの相変態を示唆している。

20

【0 1 5 3】

ナノ粒子薬物送達システムの頻繁に起こる制限は、運ばれることができる薬物の量である。例えば、ポリアルキルシアノアクリレート(PACA)ナノ粒子は、ドキシソルビシンに対して74%の充填効率で3.7%の充填含量を示した[93]。ドキシソルビシンの充填含量及び充填効率は、ポリ(乳酸-co-グリコール酸)(PLGA)ナノ粒子においてそれぞれ5%及び47%であった[94]。表2は、さまざまな充填含量の粒子に対する充填効率、大きさ及びゼータ電位を示している。本発明のSt-g-PMAA-P80ナノ粒子は、高い充填能力を有しており、その充填効率は、最も高い充填含量においてさえも事実上変化がなく100%近くに留まる。それ故、さまざまな薬物充填を有するナノ粒子が、充填効率と粒子の大きさ及び安定性に著しい妥協をすることなく、ナノ粒子対薬物比を変化させることによって容易に調製され得る。この高い充填効率は、高価な薬物の浪費を減少する。高い充填含量の送達システムを有することは、繰り返される注射に対しては望ましい、より少量のキャリア材料を使用することを可能にする。その上、高い充填含量の粒子を有することは、少量の薬物充填粒子がそれらの作用点に到達するとしても、標的臓器及び組織中の望ましい薬物レベルが達成され得るよう

30

40

【0 1 5 4】

ドキシソルビシンのナノ粒子との相互作用の見識を得るために、ITC及びFTIRが使用された。FTIRデータは、ナノ粒子のカルボキシル基とDox(ドキシソルビシン)のアミン基との間の強い静電相互作用に対する証拠を提供した。また、デンプンのOH基とDoxのOH及びNH₂基との間における可能性のある水素結合に対するいくつかの証拠も存在する。ITCの結果は、Doxとナノ粒子のカルボン酸基との間に非常に強い相互作用があることを1の最大の化学量論比により示した。その相互作用の大きさは、媒体のpH及びイオン強度に大きく依存する(図1及び15)。

【0 1 5 5】

50

粒子からのdoxのインビトロでの放出に対するpHの影響が、透析法を用いて調査された(図16)。粒子は、pHに依存するdoxの徐放を示した。ナノ粒子は、pH5と比較してpH7.4及び6において著しく遅い薬物放出を示す。pH7.4において、バースト放出はほとんどなく、放出される薬物は90時間後で20%未満である。pH6で放出速度は徐々に増加し、90時間後に充填された薬物の35%近くが放出される。pHが5まで下がると、薬物放出速度に著しい増加がある。これは、初めの8時間内の20%の初期バースト、それに続く90時間後で90%を超える薬物が放出されることをもたらす比較的遅い放出速度を特徴とする。St-g-PMMA-P80ナノ粒子からのpH依存性の薬物放出は、薬物-ポリマー相互作用の程度並びに粒子のpH依存性の体積変化と関連付けて説明され得る。酸性の環境中で著しく速い薬物放出を示すナノ粒子の薬物送達システムを有することは、腫瘍部位において薬物レベルを増しながら健全な組織への薬物暴露を最小限にする手段として寄与する。ヒトの腫瘍は、5.7から7までの酸性のpH状態を見せることが示されている。急速に成長する腫瘍細胞は、グルコース取り込みの割合は高められるが、低下された酸化リン酸化の割合を有しており、乳酸の蓄積及びその後の酸性の腫瘍微小環境をもたらす。このワールブルク効果と称される酸素の存在中の腫瘍による高い乳酸産生の持続は、インビボの腫瘍細胞に対する成長有利性を提供する。加えて、殆どの腫瘍に典型的な不十分な血液供給及び乏しいリンパ排液もまた腫瘍微小環境の酸性度に寄与する。St-g-PMMA-P80ナノ粒子は、このpHの傾きを活用して高い局所的薬剤濃度を獲得し、全般的な全身暴露を最小限にすることができる可能性がある。

【0156】

[実施例3]

カスパーゼ阻害剤ペプチドの送達のためのPMMA-PS 80-g-Stナノ粒子

N-ベンジルオキシカルボニル-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-フルオロメチルケトン(Z-DEVD-FMK)などのカスパーゼ阻害剤ペプチドは神経細胞死を減少させることが実証されているが[95~97]、血液脳関門(BBB)を横断することはできない

水溶性が乏しい薬物、例えば、カスパーゼ阻害剤ペプチドなどを効果的に充填するために、ポリマーに脂質鎖が導入された。典型的な反応において、ミリスチン酸(10mg、0.043mmol)が、5mlのDMSO中でEDC(34mg、0.175mmol)及びNHS(40mg、0.350mmol)と共に室温で1時間インキュベートされ、5mlのDMSO/H₂O混合物中に溶解したPMMA-PS80-g-St(200mg)が加えられた。その混合物は、室温で24時間攪拌され、次いで透析物を12時間毎に変える48時間にわたるDDIW(2L、MWC0=12000kDa)に対する透析によって精製された。固体の脂質ポリマーは凍結乾燥によって得られた。Z-DEVD-FMKがモデルのカスパーゼ阻害剤ペプチドとして使用された。自己集合したナノ粒子を調製するために、10mgの脂質-ポリマーが2.0mlのDDI水中に溶解された。その脂質ポリマー溶液は、次に氷浴に入れられ、Hielscher UP100Hプローブウルトラソニケーター(Hielscher USA, Inc.、ニュージャージー州リングウッド、米国)を用いて超音波処理をしながら、200 μ L(5 $\times$ 40 μ L)のペプチド溶液(CH₃CN/H₂O(2/8、v/v)中1mg/ml)が10秒毎に脂質ポリマー溶液に少しずつ増やしながらかえられた。ペプチドを充填したナノ粒子(NPs)の粒径は、ゼータサイザーナノシステムを使用することによって37nmであると測定された。その充填効率は、91%より高いことが見出された。

【0157】

[実施例4]

MDA-MB435/LCC6ヒト乳癌細胞による粒子の取り込み

MDA-MB435/LCC6細胞によるフルオレスカミンで標識化されたナノ粒子の取り込みが、蛍光顕微鏡検査法及びフローサイトメトリーを用いて調査された。フルオレセインアミン(FA)がNPsに共有結合された。簡潔に言うと、200mgのNPsが20mlのDDIW中に分散され、その後50mgのNHS及びEDCが添加された。45分後、10mgのFAを加えることによって反応が開始された。その混合物は光から保護され、室温で24時間攪拌された。そしてpHが7.4に調整され、粒子は次に3回洗浄され、続いて未反応の染料を除去するために遠心分離にかけられた。

【0158】

フルオレスカミンが粒子に共有結合され、それ故粒子からの染料の漏れはなかった。イ

10

20

30

40

50

ンキュベーション後、細胞表面に緩く結合した粒子が洗い落とされることを確保するために、細胞は冷たいPBSにより徹底的に洗浄された。それぞれ厚さが1 μm の細胞の連続z-切片は、細胞の表面から3 μm と15 μm の間の全ての切片において蛍光活性を示し、ナノ粒子は細胞表面に結合されるほか細胞によって内部移行もされることを示している(データは示されていない)。ナノ粒子と一緒に細胞のインキュベーションの前の核の染色(DAPI)及び細胞膜の染色(Vybrant(登録商標)DiI)は、膜結合型の小胞経路による粒子取り込み(即ちエンドサイトーシス)、又は細胞膜の侵入による粒子取り込みの識別を可能にする。もし粒子が受動拡散によって細胞に入るならば、それらの周囲に膜結合小胞はないことが予想され、結果としてナノ粒子からの蛍光シグナルは細胞内小胞からのシグナル(Vybrant(登録商標)DiI)と共に局在化することは予想されない。しかしながら、もしナノ粒子がエンドサイトーシス式のメカニズムにより細胞中に取り込まれるならば、膜結合小胞は粒子を取り囲み、標識化したナノ粒子及び着色した膜小胞からのシグナルの共局在化が予想される。図17Aは、野生型(MDA MB435-WT)及び多剤耐性(MDA MBA435-MDR1)細胞による粒子取り込みを示している。ナノ粒子の細胞とのインキュベーションがない場合は、FITCフィルターを用いているシグナルはなく、膜結合小胞を表している内在化されたVybrant(登録商標)DiIで着色された細胞膜の、限定された数の小さい細胞内の蛍光フォーカス(野生型及びMDR細胞の両方に対するコントロール)が存在した。しかしながら、ナノ粒子との4時間にわたるインキュベーションの後には、より多数のより大きい蛍光フォーカスが両方の株化細胞中に観察された。着色された細胞膜(Vybrant(登録商標)DiI)から形成された膜結合小胞を表すことができるこれらの赤い蛍光フォーカスは、ナノ粒子シグナル(FITC)から観察される蛍光グリーンフォーカスと同調した。図17Bに示されているように、 Gd^{3+} が充填されているナノ粒子は、電子密度の高い沈着物のように見える。これは、St-g-PMMA-P80ナノ粒子が膜結合小胞を介して細胞によって取り込まれ、野生型及び耐性ヒト乳房腫瘍細胞の両方において細胞質ゾルの核周辺領域を往復することを示唆している。

【0159】

フローサイトメトリーが、MDA453株化細胞中(WT及びMDR1の両方)のSt-g-PMMA-P80ナノ粒子の細胞取り込みを測定するために使用された。図18に示されているように、ナノ粒子の細胞レベルは、WT(A、B)及びMDR1(C、D)細胞の両方において37°Cでのインキュベーションにより徐々に増大し、24時間のインキュベーションまでに飽和には達しなかった。興味深いことに、抵抗性株化細胞は、野生型と比較してより速くより高い程度の粒子の取り込みを示した。WT及びMDR1細胞に対する平均の蛍光強度は、1時間後にそれぞれ896及び1897であった。これらの値は、24時間後には11510及び18574に増大した。このデータは、ナノ粒子取り込みが、我々が1時間以内に大きな取り込みを見ることができたように、37°Cで比較的速いことを示している。その代わりに、細胞が4°Cでインキュベートされたとき、粒子の細胞取り込みにおいて著しい減少があった。4°Cでインキュベートされた細胞は、バックグラウンドと比較してほんのわずかに高い蛍光強度値を示し、これは細胞表面が粒子に内在化されないで結合したことを表している可能性がある。低温での粒子の細胞取り込みにおける顕著な減少、一般的な代謝阻害薬は、ナノ粒子の細胞取り込みがエネルギーに依存するプロセスであることを示している。エンドサイトーシスは活発なプロセスであるために、このメカニズムによる取り込みは低温では減速し、ここで見られたようなナノ粒子取り込みにおける著しい減少は、細胞膜を横断する拡散よりはむしろエンドサイトーシスによる内部移行と合致する。

【0160】

[実施例5]

野生型及び多剤耐性ヒト乳癌株化細胞に対するNPs抗腫瘍効果のインビトロ評価

遊離のDox及びDoxを充填したナノ粒子のMDA-MB435/LCC6乳癌株化細胞に対する有効性が、野生型及び耐性細胞の両方において評価された(図19)。細胞は増大する濃度のドキソルビシン又はドキソルビシンを充填したナノ粒子により24時間及び48時間処理され、細胞の生存がMTTアッセイを用いて測定された。遊離のDox及びDox充填ナノ粒子の両方とも野生型株化細胞に対して同様に有効であった(図19A、B)。全ての処理が、野生型細胞に対して

10

20

30

40

50

細胞毒性を用量依存的形で顕在化させた。24時間処理に対するIC₅₀値は、遊離のDox及び薬物充填ナノ粒子に対してそれぞれ0.34 $\mu\text{g/ml}$ 及び0.32 $\mu\text{g/ml}$ であった。これらの値は、処理の長さを48時間に増すことによって0.07 $\mu\text{g/ml}$ (遊離のDox)及び0.06 $\mu\text{g/ml}$ (ナノ粒子)に減少した。このデータは、ドキソルビシンのナノ粒子中への充填が薬物活性の損失をもたらさないことを示している。

【0161】

遊離の薬物及び薬物を充填したナノ粒子の細胞毒性もまたMDR1株化細胞中で評価された。MDR細胞に対してDox濃度を増すことは、それが野生型に対してしたのと同じ規模では細胞の生存を減少させなかった。この耐性細胞における遊離のDoxのIC₅₀は、24時間及び48時間の処理に対してそれぞれ57.01 $\mu\text{g/ml}$ 及び7.69 $\mu\text{g/ml}$ であった(図19C、D)。Dox充填ナノ粒子は、24時間及び48時間のインキュベーション時間に対して2.99 $\mu\text{g/ml}$ 及び0.62 $\mu\text{g/ml}$ のIC₅₀値で、遊離の薬物と比較して著しく良好に機能した。処理時間を増すとより高い死滅をもたらすようである。さらに重要なことには、ドキソルビシンのナノ粒子中への充填は耐性細胞におけるIC₅₀で最大19倍の減少をもたらす。

【0162】

[実施例6]

新規なDTPA含有St-g-PMAA-P80ポリマー及びナノ粒子の合成

デュアルモードナノ粒子の調製

PF-NPs及びSA-NPsの概略構造とそれらの調製手順が図20に示されており以下に示すように調製される。

【0163】

Gd³⁺充填PMAA-g-St-DTPAポリマー(PF-NPs)の調製

PMAA-g-St-DTPAは、最初にジエチレントリアミンペンタ酢酸二無水物(DTPAビス無水物)をデンブunに結合させ、その後のMAAのグラフト重合によって合成された。

【0164】

DTPA-ビス-無水物の合成:DTPA-ビス-無水物は、Andersenらによって記載されている方法[98]に従って合成された。DTPA(5g、0.0125モル)、無水酢酸(3.62ml)、及びピリジン(4.61ml)が、温度計、機械攪拌機、及び冷水で冷却される還流冷却器を取り付けた50mlの三口の平底の反応器中で混合された。その混合物はオイルバス中で朝まで攪拌と共に60℃に加熱された。そのフラスコはイソプロピルアルコール(IPA)ですすがれ、内容物はブフナー漏斗によって濾過され、アセトニトリルで2回洗浄され、真空下で朝まで乾燥された。

【0165】

St-DTPAの合成:可溶性デンブun(3g)が、50mlの乾燥DMSOに溶解され、続いて1.5gのDTPA-ビス-無水物が加えられた。その溶液は、室温で24時間攪拌され、DMSOに対して24時間、その後水に対してさらに24時間透析された。その生成物(St-DTPA)は次いで50℃のオーブン中で一晩乾燥された。

【0166】

PMAA-g-St-DTPAポリマーの合成:PMAA-g-St-DTPAポリマーは、以前に我々の研究室で開発されたワンポット分散液重合法[99]の改良されたものを用いて合成された。簡潔に言えば、1.55gのSt-DTPAが150mlの蒸留水中に70℃で30分間加熱することによって溶解された。その溶液は、溶解している酸素を除去するためにN₂により30分間バージされた。その後、0.25gのSDS、1.5gのPS80、0.18gのKPS及び0.25gのSTSが、攪拌下でそのSt-DTPA溶液に加えられた。10分後、反応が2gの窒素をバージしたMAAの添加によって開始された。5分後にオパール色が現れ、その反応は、完全なグラフトを確保するために70℃で8時間続けられた。その生成物は、温水により2回しっかり洗浄され、メタノールにより抽出され、続いて未反応物質及びホモポリマーを除去するために透析にかけられた。その精製された粒子は、次に真空オーブン中で24時間乾燥され、その後の使用のためにデシケーター中で保存された。

【0167】

PMAA-g-St-DTPAポリマーへのGd³⁺の充填:PMAA-g-St-DTPAポリマー(0.5g)が、10mlのDDIW

水中に分散された。そのpHは、0.1NのNaOHを用いて6.5に調整された。次に、10mlの塩化ガドリニウム六水和物の水溶液(10mg/ml)が攪拌しながら滴下方式で加えられ、その反応のpHは、NaOHによりその実験を通して6.5に保たれた。攪拌はその後1時間継続され、その生成物は、キシレノールオレンジテスト[100]を用いて、洗浄媒体中に遊離の Gd^{3+} が検出されなくなるまで、0.9%NaClに対して徹底的に透析された。次に、生成物は凍結乾燥され、その後の使用のために保存された。生成物中の Gd^{3+} 含量は、誘導結合されたプラズマ原子発光分光法(ICP-AES、Optima7300、PerkinElmer、シェルトン、米国)を用いて測定された。

【0168】

DTPA二無水物(DTPA-A)が、周囲温度の乾燥DMSO中の膨潤したSt-g-PMMA-P80の懸濁液に加えられた。その懸濁液は、周囲温度で24時間かき混ぜられ、次いで氷水浴により冷却される。蒸留水(100ml)が加えられ、その懸濁液は室温で1時間かき混ぜられる。ポリマーが、水に対して48時間透析され、30分間の30000rpmでの超遠心分離法によって集められる。別法では、DTPAは、上で概要を述べた手順に従って最初にデンプンに共有結合させることができ、得られたデンプン-DTPAは、以前に記載されている方法を用いてSt-g-PMMA-P80を合成するために使用することができる。得られたDTPAを含むSt-g-PMMA-P80は、次に効果的に Gd^{3+} を取り込むことができる。簡潔に言えば、0.5グラムのポリマーが10mlのDDIW水中に分散される。そのpHは、0.1NのNaOHを用いて6.5に調整される。次に、12.5mlの塩化ガドリニウム六水和物の水溶液(10mg/ml)が攪拌しながら滴下方式で加えられ、反応のpHは、水酸化ナトリウムによりその実験を通して6.5に保たれる。攪拌はその後24時間継続され、得られた生成物は、キシレノールオレンジテストを用いて洗浄媒体中に遊離の Gd^{3+} が検出されなくなるまで、0.9%NaClに対する透析により精製される。次に、生成物は凍結乾燥され、その後の使用のために保存される。その後、ガドリニウム含量は、誘導結合されたプラズマ原子発光分光法(ICP-AES)を用いて測定される。

【0169】

生物環境内での得られたランタニド錯体の安定性は、遊離の Gd^{3+} の毒性が強いので考慮すべき重要事項である。DTPAは、ガドリニウムの強いキレート化剤である。DTPA-ガドリニウム錯体は、生体系において安定であることが知られている。ナノ粒子の大きさは、モノマー濃度、界面活性剤レベルなどの反応パラメーターを変更することによって調節することができる。別法では、DTPAは、予め形成されたSt-g-PMMA-P80ナノ粒子中にデンプンのヒドロキシル基との反応を通して組み込むことができる。我々のデータは、DTPAを含むナノ粒子はガドリニウムと安定な錯体を形成することができることを示している($\log K_d=17.5$)。

【0170】

Gd^{+3} を充填したナノ粒子のMRI造影剤としての性能についての定量的情報を得るために、我々は3.0T及び7.0Tにおける緩和能を測定した。ナノ粒子のさまざまな濃度のT1値がインビボで測定され、 $1/T1$ と濃度との間の直線近似(linear fit)が緩和能を得るために実行された。その緩和能の値は、表5A及び5Bに記載されている。臨床的に利用可能なMRI造影剤である、オムニスキャンに対する緩和能が、比較のために挙げられている。Gdを充填したSt-g-PMMA-P80は、オムニスキャンと比較して著しく高い緩和能の値を示した。この緩和能は、高分子造影剤に対して期待される磁場強度に依存することが見出される。

【0171】

1つの例において、ナノ粒子はDoxが充填された。簡潔には、50mgの凍結乾燥されたナノ粒子が10mlのDDIW中に懸濁された。Doxが、2.5mg/mlの濃度でその懸濁液に加えられ、そのナノ粒子と共に48時間インキュベートされた。その粒子は、次に96,000gで30分間超遠心分離にかけられ、DDIWで2回洗浄された。次いで、PF-NPsは凍結乾燥され、その後の使用のために4°Cで保存された。

【0172】

自己集合ナノ粒子(SA-NPs)の調製

PMMA-PS80-g-St可溶性ポリマーは、ほんのわずかな修正を加えた上記の方法を用いて合

10

20

30

40

50

成された。架橋剤(MBA)はなしで、PS80の量は1グラムに増やされた。

【0173】

次にHilyte Fluor(商標)750が、上記の方法を用いてポリマーに共有結合された。最後に、自己集合ナノ粒子(SA-NPs)を調製するために、8mgのポリマーが1.8mlの無菌の5%ブドウ糖中に溶解された。ポリマー溶液は、次に氷浴中に入れられ、Hielscher UP100Hプローブウルトラソニケーター(Hielscher USA, Inc.、米国ニュージャージー州、リングウッド)を用いた超音波処理の下、ドキシソルビシン溶液(5%ブドウ糖中12mg/ml)の170 μ l (5 $\times$ 34 μ l)が、30秒毎に少しずつポリマー溶液に加えられた。その超音波処理は、さらに10分間続いた。そのDoxの添加は、ナノ粒子の自発的な形成をもたらした。そのSA-NPsは、次に、結合されていないDoxを除去するために、イオン交換樹脂、Sephadex G50 fine(GE Health care、ニュージャージー州ピスカワウェイ、米国)中を通過させた。

10

【0174】

図20中の概略図に示されているように、PF-NPsの場合、NIR蛍光プローブは、共有結合されており、薬物は事前形成された架橋PMAA-Ps80-g-Stナノ粒子中に充填されていた。そのSA-NPsは、Doxの可溶性PMAA-PS80-g-Stポリマーへの付加が後に続く染料の共有結合により水性媒体中で自然発生的に形成された。PMAA-PS80-g-Stポリマーのカルボン酸基に対するHiLyte Fluor(商標)750の結合、及びドキシソルビシンのイオン錯体生成は、全体の疎水性を増し、PS80の存在によって安定化される密度の高いナノ構造物の形成及びマイナスに帯電したカルボン酸基の存在による粒子表面上におけるイオン反発力を結果的にもたらしうことが考えられる。

20

【0175】

SA-NPs及びPF-NPsは、それぞれ 62 ± 5 nm(PdI=0.12)及び 137 ± 3 nm(PdI=0.07)の粒径を示す(図23D-E)。TEMの写真は、粒径がDLSデータと良好な一致をしていることを示し、SA-NPsとPF-NPsとの間の異なる形態を示唆している。PF-NPsは、多孔質の綿ボール構造を有するほぼ球状であり、一方SA-NPsは、球状から離れ、よりコンパクトな総合的な形態を示す。これらナノ粒子の表面電荷は、マイナスあり、 -38 ± 1 (SA-NPs)及び -35 ± 5 (PF-NPs)の ξ -電位値を有した。

【0176】

[実施例7]

St-DTPA-g-PMAA-P80キレート Gd^{+3} 対遊離の Gd^{+3} の細胞生存率についての細胞毒性

30

インビボでの使用に対するナノ粒子の安全性の初期評価として、それらの毒性が単離したラット肝臓細胞を用いて遊離のガドリニウム溶液と対照して評価された。このモデルは素早い毒性スクリーニングのために使用されており、インビトロ-インビボ毒性外挿を実証している。肝細胞生存率が細胞膜崩壊を測定するトリパンプルー(0.1%w/v)排除試験によって顕微鏡で評価された。肝細胞の生存率が3時間のインキュベーション中30分毎に測定され、その細胞は使用前に少なくとも80%が生存可能であった。800 μ lの各試料がその肝細胞に加えられた。対照のブランクと、 Gd^{+3} を充填したポリマー及びナノ粒子の間で統計的に有意な違いはなかった。遊離の Gd^{+3} は、著しい肝細胞毒性を示し、1.5mg/mlのガドリニウム溶液にさらしたとき、240分後にそれぞれ肝細胞の生存が15%未満であった(図24)。ポリマー及びナノ粒子中に充填した同じ用量の Gd^{+3} への240分にわたる肝細胞の暴露は、ポリマー及びナノ粒子に対してそれぞれ65%及び68%の生存をもたらした。このデータは、 Gd^{+3} をSt-DTPA-PMAA-P80ポリマー/ナノ粒子に充填することが、ガドリニウムの毒性を著しく低下することを示している。

40

【0177】

細胞生存率

インビボでの使用に対するナノ粒子の安全性の初期評価として、それらの毒性が単離したラット肝臓細胞を用いて遊離のガドリニウム溶液と対照して評価された。このモデルは素早い毒性スクリーニングのために使用されており、インビトロ-インビボ毒性外挿を実証している。肝細胞生存率が細胞膜崩壊を測定するトリパンプルー(0.1%w/v)排除試験によって顕微鏡で評価された。肝細胞の生存率が3時間のインキュベーション中30分毎に測

50

定され、その細胞は使用前に少なくとも80%が生存可能であった。800 μ lの各試料がその肝細胞に加えられた。対照のブランクと、 Gd^{+3} を充填したポリマーの間で統計的に有意な違いはなかった。遊離の Gd^{+3} は、著しい肝細胞毒性を示し、1.5mg/mlのガドリニウム溶液にさらしたとき、240分後にそれぞれ肝細胞の生存が15%未満であった(図25)。ポリマー及びナノ粒子中に充填した同じ用量の Gd^{+3} への240分にわたる肝細胞の暴露は、ポリマー及びナノ粒子に対してそれぞれ65%及び68%の生存をもたらした。このデータは、 Gd^{+3} をPMAA-PS80-g-St-DTPAポリマーに充填することが、ガドリニウムの毒性を著しく低下することを示している。

【0178】

[実施例8]

近赤外色素(HiLyte Fluor750)のSt-g-PMAA-P80ポリマー及びナノ粒子への結合

近赤外色素(HiLyte Fluor750)は、St-g-PMAA-P80にカルボジイミド化学反応(図43A)を用いることで共有結合される。簡潔には、20mgのポリマー/ナノ粒子が、DDIW水中に分散され、続いてEDC(48mg)及びNHS(45mg)が加えられ、90分間攪拌されて、St-g-PMAA-P80上のカルボン酸基を活性化させる。図43Bは、ナノ粒子とのNIR共役の視覚効果を示している。その後、200 μ lのHiLyte Fluor750ヒドラジド(1mg/ml)が添加され、その混合物は暗所で一晩攪拌される。その生成物は、次に水に向けた透析により精製され、続いて凍結乾燥され、その後の使用のために-20℃で保存される。NIR染料で標識化されたSt-g-PMAA-P80は、820nmで蛍光放射を示す(図43C)。

【0179】

[実施例9]

St-g-PMAA-P80の生体内分布及び標的能力

インビボ全身蛍光画像

NIR染料、HiLyte Fluor750、及びドキシソルピシンが共充填されたナノ粒子が調製された。上で説明したようにして合成され、凍結乾燥されてデシケーター中で保存されたSt-g-PMAAナノ粒子が使用された。100mgのナノ粒子が、2mlのDDIW中に分散され、30mgのEDC/NHSが加えられた。30分後、0.2mlのHiLyte Fluor750ヒドラジド(1.25mg/ml)が攪拌下で加えられた。その混合物は光から保護され、室温で24時間攪拌された。最後に、その生成物は、pH7.4に中和され、連続する水による洗浄及び遠心分離によって精製された。ナノ粒子は次に上で説明した方法を用いてDoxを充填された。

【0180】

ナノ粒子の粒径は、 137 ± 3 nmであり、0.12の多分散指数を有することが見出された。従って、これらのナノ粒子の直径は、多くの固形腫瘍中に見出される透過性の脈管構造の細孔の大きさより小さく、ナノ粒子は固形腫瘍中に血管透過性・滞留性亢進(EPR)によって選択的に蓄積することができるはずであることを示唆している。その粒子は、球形であり、多孔質の綿ボール構造を示した。

【0181】

ナノ粒子の全般的な表面電荷は、マイナスで、 -35 ± 5 のゼータ電位値であることが見出された。このマイナスの表面電荷は、粒子の表面のカルボン酸基の存在及び少量の残存しているアニオン界面活性剤、SDS、のせいであり得る。このナノ粒子の正味の表面電荷は、それらの安定性並びに体循環におけるさまざまな生理的リポタンパク質の吸着に対して顕著な効果を有しており、インビボでのナノ粒子のクリアランスにおいて重要な役割を果たすことができる。HiLyte Fluor750含量は、 $3.9 \pm 0.02\%$ であった。

【0182】

図26は、仰向けに横たわっているマウスのインビボの蛍光画像を示す。製剤及び近赤外放射波長の非常に高い蛍光シグナル強度によって、低いバックグラウンド干渉による良好な深い組織浸透性が可能である。高レベルの蛍光が注射1時間後に体全体で検出され、膀胱からくる最高の信号レベルが腎臓経路によるポリマーの排出を示した。早い時点での体全体のシグナルの検出は、多分、血液中にある粒子と皮膚及び皮下の脂肪部分における粒子堆積の組合せのためである。高度に灌流した臓器、例えば、肝臓及び心臓などから記録

10

20

30

40

50

された高い蛍光は、臓器を通過する循環血液と、肝臓によって作られる細網内皮系(RES)の細胞による粒子取り込みによるものとが組み合わされた活性として説明され得る。肝臓における高められた取り込みは、血液中に循環しているポリマーをとらえることに関与する、これらの組織中に存在しているマクロファージが大きい要因となっているものと考えられる。前記のことは文献で議論されている大部分の製剤と比較して、肝臓の取り込みは、比較的低いように思われる。この製剤は、蛍光レベルが9日後にはベースラインに殆ど戻るので、時間が経つと体から除去されるようである。9日後に肝臓で検出されるシグナルはごくわずかであり、ポリマーは14日後には体から完全に排除されるようである。

【0183】

非侵襲性リアルタイムの蛍光画像が、同所性マウスEMT6乳房腫瘍を持つBalb/cマウスにおけるナノ粒子の生体内分布及び腫瘍蓄積を追跡するために利用された。HiLyte Fluor(商標)750の近NIR放射($\lambda_{ex}=754\text{nm}$ 、 $\lambda_{em}=778\text{nm}$)及びこれらのナノ粒子の高い蛍光強度のお蔭で、自己蛍光のバックグラウンドレベルが確かに排除され得るように検出限界を設定することが可能である(図26A)。

【0184】

図26Aは、時間ゼロ(ベースライン)及び尾の側部静脈中への各製剤の注射後のさまざまな時間におけるマウスの全身画像を示している。注射後1時間で、はっきりとした蛍光シグナルが、血液、皮膚、臓器及び皮下脂肪中へのナノ粒子の分布によって全身で検出可能である。図26Aに描かれているように、SA-NPs及びPF-NPsは、確かな生体内分布プロファイルを示した。SA-NPsの注射の1時間後には、強い蛍光シグナルが膀胱内で観察され(図26A、上パネル)、腎臓経路による排出を示していた。膀胱のシグナルは注射6時間後には著しく減少したが、強い蛍光を体全体で依然として検出することができ、SA-NPsの排除に向けた速い成分と遅い成分の両方を示唆した。重要なことに、SA-NPsを投与されたマウスは、腫瘍組織中に強い蛍光シグナルを示し、その他の灌流された組織、例えば肝臓などは、実質的により低いレベルのナノ粒子の蓄積を示した。これと合致して、接種された腫瘍は、周囲の組織学的に正常な組織から描き出されて、腫瘍中にSA-NPsの比較的大きな蓄積を示唆することができた。重要なのは、そのような蛍光サインが、1週間を超えて持続したことである。

【0185】

生体内分布の異なるパターンが、PF-NPsに対しては観察された。かなりの量の蓄積が肝臓及び脾臓中で示され、これは注射1時間後に観察された強い蛍光によって明らかにされる。さらに、これらの粒子は、膀胱中で最初の6時間の間有意な蛍光蓄積は検出されなかった。ここでは系統的に検討はされなかったが、糞便中でより高いレベルの蛍光がPF-NPsを注射されたそれらのマウスにおいて観察されており、これら粒子は肝胆道経路により大部分撤去されることを示唆していることに言及する価値がある(個人的な見解)。注射1時間後に、腫瘍は周辺組織から区別され得るが、腫瘍中のPF-NPs蓄積の度合いは、SA-NPsより相当低いように見える。

【0186】

SA-NPs及びPF-NPsの時間依存性の排出プロファイルは、Xenogen IVISシステムを使用してさらに定量化され、図26Bにプロットされた。SA-NPsは、最初に、多分、尿中排泄を通じた除去による迅速除去相を示し、遅れた時点におけるよりゆっくりの除去が続いた。SA-NPsの注射15分後における平均全身NIR蛍光強度は、 $1.5 \pm 0.2 \times 10^8 (\text{p/s/cm}^2/\text{sr}) / (\mu\text{W/cm}^2)$ であった。それは6時間で $0.87 \pm 0.05 \times 10^8 (\text{p/s/cm}^2/\text{sr}) / (\mu\text{W/cm}^2)$ まで急速に減少した。体の蛍光は、24時間及び72時間の時点に対してそれぞれ $0.63 \pm 0.09 \times 10^8 (\text{p/s/cm}^2/\text{sr}) / (\mu\text{W/cm}^2)$ 及び $0.50 \pm 0.05 \times 10^8 (\text{p/s/cm}^2/\text{sr}) / (\mu\text{W/cm}^2)$ であると測定された。これらの値は、注射14日(336時間)後にベースラインまで戻った。しかしながら、PF-NPsの全身蛍光強度は、全身においてはるかに遅い速度で減少した。体の蛍光は、粒子投与15分後に $1.28 \pm 0.26 \times 10^8 (\text{p/s/cm}^2/\text{sr}) / (\mu\text{W/cm}^2)$ で測定され、24時間及び72時間でそれぞれ $0.63 \pm 0.09 \times 10^8 (\text{p/s/cm}^2/\text{sr}) / (\mu\text{W/cm}^2)$ 及び $0.50 \pm 0.05 \times 10^8 (\text{p/s/cm}^2/\text{sr}) / (\mu\text{W/cm}^2)$ までゆっくり減少した。

【0187】

その結果は、SA-NPsは腎臓経路による排泄による速い最初の排出を受け、その後より遅い排出相が続く、粒子は14日の期間内に体から取り除かれることを示す。PF-NPsは、より大きい粒径及びそれらのより高度に架橋されている性質により、腎臓経路によっては取り除かれず、実質的により遅い速度でおそらく肝胆輸送メカニズムによって除去される。

【0188】

腫瘍組織中のナノ粒子のリアルタイムの薬物動態

腫瘍中のナノ粒子に対する薬物動態パラメーターが、図26B中のデータから抽出され表6でまとめられた。腫瘍中のナノ粒子の蓄積、保持、及び排出と関連するこれらのパラメーターは、ナノスケールの薬物送達システムの治療効果を大まかに予測する。一般に、SA-NPsは、PF-NPsについて観察されたものと比較して腫瘍中により高い程度まで蓄積したが、より速い速度で消えた。腫瘍中の蛍光強度のピークは、SA-NPsについては $6.15 \pm 1.04 \times 10^8$ (p/s/cm²/sr)/(μW/cm²)であり、PF-NPsについては $0.15 \pm 0.25 \times 10^8$ (p/s/cm²/sr)/(μW/cm²)であると測定された。SA-NPsについての腫瘍AUCは、PF-NPsよりも3.5倍大きく、腫瘍中におけるPF-NPsよりもSA-NPsのより大規模な蓄積を反映していた。SA-NPsのより大きい腫瘍蓄積は、PF-NPsと比較してそれらのより長い血液循環及び大きさがより小さいことに支えられている。しかしながら、PF-NPsは、 277 ± 33 hrsの大きい $t_{1/2}$ の値及び 0.0025 ± 0.0003 hrs⁻¹のより小さい k_{el} に反映される、より遅い腫瘍クリアランスを示し、一方、SA-NPsについての $t_{1/2}$ 及び k_{el} は、 92 ± 12 hrs及び 0.0075 ± 0.0006 hrs⁻¹であった。

【0189】

生体外 (ex vivo) イメージングにより測定されたナノ粒子の血液循環及び臓器分布

全体の動物のイメージングが、ナノ粒子の組織分布を測定するために実施された(図27A)。組織分布及び腫瘍蓄積も、集められた血液並びにさまざまな時点で切開された腫瘍及び肝臓、肺、腎臓、脾臓、皮膚、腸及び心臓を含む臓器の生体外のNIR蛍光分析から評価された。そのデータは、組織の平均ベースライン値に対して標準化された蛍光強度の割合として示されている(図27B、C)。SA-NPsは、PF-NPsと比較して血液中でより高い濃度で及びより長い時間にわたって検出された。注射後30分近くで、血液蛍光強度の割合は、SA-NPs及びPF-NPsに対して、それぞれ 150.0 ± 12.5 及び 70.0 ± 6.0 であると測定された。注射後4時間でこれらの値は、それぞれ 47 ± 8 及び 4.1 ± 0.5 に減少した。これらのデータに基づいて、PF-NPs及びSA-NPsに対する63分及び230分の血液循環半減期が計算された。PF-NPsは、肝臓、脾臓、肺、心臓、及び腸において相当に高レベルの蓄積を示し、その一方で、かなり高レベルのSA-NPsを、腎臓及び腫瘍中で検出することができた。PF-NPsで処理したマウスの腸における高レベルの蛍光は、肝臓に蓄積されている粒子が、糞便により排出されることを示唆している。この排出様式は尿による排出より一般に遅い。このため、肝臓からの蛍光は長期間にわたって非常に強いままである。これらの結果は、生きている動物の全身のイメージングと十分一致している。

【0190】

腫瘍中のナノ粒子の血管外漏出を証明する腫瘍組織の顕微鏡イメージング

光顕レベルでのSA-NPs及びPF-NPsの腫瘍分布が、蛍光顕微鏡検査法を用いて調べられた。媒体のみ(5%ブドウ糖)が注入された腫瘍の組織切片が、FITC(励起:460~490nm、発光500~535nm)発光ウインドウに画像化され、自己蛍光の相対的水準が測定された。図28に示されているように、低い水準の自己蛍光が媒体処理組織のいくつかの部位で観察された。このスペクトル放射の性質のより精密な検査は、FITCで標識化されたナノ粒子のよりはっきりとした放射ピークに対比して、幅広い波長分布を示した。そのような自己蛍光は、リポフチン、コラーゲン、及びヘムのような広げられたπ軌道システムを含む組織中に生じる。したがって、FITC発光ウインドウ内の自己蛍光に対するナノ粒子に媒介された蛍光をはっきりと区別するため、組織部位は、FITC及びTRITC(励起540~565nm、発光575~620nm)発光ウインドウの両方の面に画像化された。これらの結果の組合せは、図28に示されているように、自己蛍光(黄緑)に対するナノ粒子(緑)に媒介された蛍光の明確な描写を可能にした。図に示されているように、投与後4時間で、SA-NPsは、PF-NPsにおいて見られた

ものと比較して、マウスの腫瘍組織中でより大きい範囲まで蓄積し、腫瘍の微小血管系から腫瘍を持っている組織中にずっと大きい範囲まで浸出した。対照的に、PF-NPsは、バルクの腫瘍実質内でより限定された分布を示した。PF-NPsは、腫瘍血管のより大きいエレメントに大部分とどめられ、血管周囲の領域に結びつけられた。

【0191】

[実施例10]

インビボのMRI解析

Gd³⁺-充填PMAA-g-St-PS80(PolyGd)及びドキシソルビシンを充填したGd³⁺-充填PMAA-g-St-PS80(PolyGd-Dox)のインビボのさまざまな臓器中の正のコントラストの向上を生ずる能力が市販されているOmniscan(登録商標)と比較された(図21)。主要な臓器、例えば、肝臓、脾臓、心臓、腸、及び膀胱などが、スライスAに示されており、一方スライスBは、脳、大動脈、及び腎臓についての詳細を提供している。0.05mmol/Kg Gd³⁺の臨床用量で、Omniscan(登録商標)は、肝臓及び心臓血管系においてごく小さいコントラストの向上を示した。それは脈管構造から急速に浸出させられ、コントラストの向上は注射5分後においてさえも乏しかった。その製剤は、強い膀胱シグナルによって明らかなように、腎臓経路を通過して体から急速に除去される。Omniscan(登録商標)用量の半分(0.025mmol/Kg Gd³⁺)で、PMAA-g-St-PS80製剤は、肝臓及び心臓血管系において著しく高いコントラストを生じた。60分後でさえ持続する強い血液プール効果が存在し、この製剤のより長い血液循環半減期に対する証拠を提供している。その造影剤は、腎臓及び次に膀胱において観察される強いコントラストの高まりによって明らかなように、腎臓経路によって排除されるように思われる。その膀胱の信号は時間を超えて急速に増加し続け、腎臓経路を通過するポリマーの排出に対する証拠を提供する。腎臓経路を通過して消える製剤を有することは、この排出経路が肝胆道経路よりもずっと速いので臨床的に望ましい。

【0192】

PMAA-g-St-PS80製剤のより長い血液循環、その優れたコントラストの向上及び血液プール効果によって、心筋生存度及びアテローム性動脈硬化の診断及び特性解析のための心臓及び全身のMRIスキャンを提供するために、それらはより低い総量のGd³⁺及び最高3回の注射の代わりに単回投与で使用されることができた。加えて、血管系を詳細に検出するために必要な高い分解能及び低い投与量により、それは、高度に灌流適用された臓器、例えば肺、肝臓、腎臓及び脳中の微小出血などにおける病原性状態の早期発見を提供できそうである。

【0193】

T₁強調画像は、主としてRF伝達及び受信コイルの感度プロファイルのために、造影剤分布の定性的な反映のみを提供する。対照的に、R₁マップは、全身における造影剤分布のより良好な定量的測度を提供する。

【0194】

その造影剤の全身分布の一時的な挙動は、注射後の複数の時点で動物を動かさないでR₁マップを構成することによって定量化された(図27A)。次に、臓器特異性の濃度プロファイルは、手作業で分割した対象領域におけるR₁測定結果から方程式1(前述の)に従って直接定量化された(図27B、C)。

【0195】

肝臓のR₁値は、 $1.0 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$ のそのベースライン値から注射後60分で $2.1 \pm 0.3 \text{ s}^{-1}$ まで増加し(ΔR_1 約 1.1 s^{-1})、腎臓のR₁値は、 $0.6 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$ から注射後5分で $1.4 \pm 0.3 \text{ s}^{-1}$ まで増加した(ΔR_1 約 0.8 s^{-1})。膀胱のR₁は、ベースラインで $0.4 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$ と測定され、造影剤投与後は急激に増加して、注射5分後及び60分後にはそれぞれ $1.1 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$ (ΔR_1 約 0.7 s^{-1})及び $2.3 \pm 0.4 \text{ s}^{-1}$ (ΔR_1 約1.9)と測定された。300分までに、心臓及び腎臓のR₁値においては著しい低下があり、一方肝臓及び膀胱のR₁値は高いままであった。同様の傾向がPolyGd-Doxについても観察された。誘導結合プラズマ原子発光分光法(ICP-AES)を用いて臓器のGd³⁺含量を測定することによってそのデータはさらに検証され(図29)、R₁値と臓器のGd³⁺含量との間の良好な一致が観察された。

【0196】

左心室(LV)血液の R_1 は、全身画像の血管造影剤強化の有用な指標を提供する。Omniscan (登録商標)について、LVの R_1 は、 $0.7 \pm 0.2 \text{ s}^{-1}$ のベースライン値から注射後2分の $0.8 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$ まで(ΔR_1 約 0.1 s^{-1})わずかに増加した。この増加は統計的に重要ではなく、LVの R_1 値は、その後の全ての時点でベースライン(約 0.7 s^{-1})に接近したままであった。PolyGd注射に続いてLVの R_1 は、そのベースライン値の $0.62 \pm 0.04 \text{ s}^{-1}$ から注射後5分で $1.5 \pm 0.2 \text{ s}^{-1}$ まで増加し(ΔR_1 約 0.9 s^{-1})、180分後でさえも $1.0 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$ で上昇したままであった。

【0197】

[実施例11]

PMAA-g-St-PS80の脳標的能力

10

特定のナノ粒子のPS80コーティングは、血液から粒子表面へのApo-Eの高められた吸着を引き起こすことが示唆されている(図30)。その後、ナノ粒子表面のApo-Eの存在は、これらのナノ粒子の脳毛細血管内皮細胞内の内部移行を、これらの細胞によって発現されるLDL受容体によって促進する。LDL受容体によるSt-g-PMAA-P80の微細血管中への取り込みの概略図は、図30に示されている。TOF-SIMSは、表面組成及び表面化学の分析を可能にする感受性の高い表面特定技術である。感度は、ppmのオーダーであり、さらに表面選択性は、サンプリングが試料の表面の1~2nm以内で行われる、即ち、表面のわずかの原子層のみがサンプリングされるほどのものである。TOF-SIMSは、負のイオンモードにおける255、265、及び283m/zの特性ピークによって明らかにされているようにナノ粒子の表面のPS80の存在をはっきりと示している。これらのピークは一連のオレイン酸及びビステアリン酸を示しており、ソルビタン分子の側鎖であり、対照試料(PS80無し)には存在しなかった。St-g-PMAA-P80ナノ粒子表面にポリソルベート80の発現を示しているToF-シムスのデータは図31に示されている。

20

【0198】

PMAA-g-St-PS80の血液脳関門を横切る能力を調査するために、脳のMRIスライスが採取された。図32は、さまざまな脳スライスのベースライン及びポリマー注射後20分におけるさまざまな脳スライスの R_1 マップを示している。脳血管中の著しい増強が観察された。また、脳の特定領域、例えば、矢状静脈洞、脳室、皮質及び脳梁などにおける r_1 値の著しい増加が存在した。脳室における際立った増強は、脳脊髄液(CSF)中のポリマーの存在に対する証拠を提供する。ナノ粒子の注射前と後におけるさまざまな脳スライスの R_1 マップの調査は、矢状静脈洞、脳室等の特定の脳領域において、そしてそれほどではないにせよ皮質及び皮質下領域において増強を明らかにした。注射後30分において、 R_1 値は、皮質、皮質下、脳室、及び矢状静脈洞に対して、それぞれ、 $1.1 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$ 、 $1.1 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$ 、 $1.6 \pm 0.2 \text{ s}^{-1}$ 、及び $1.7 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$ と測定された。これらの値は、注射後180分において、 $1 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$ 、 $0.9 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$ 、 $1.5 \pm 0.3 \text{ s}^{-1}$ 、及び $1.1 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$ まで減少した(図32C)。

30

【0199】

[実施例12]

生体外調査

生体外調査が、PMAA-g-St-PS80の脳標的能力をさらに確認するために行われた。製剤が尾静脈を通して注射され、一定の時点でその動物は犠牲にされ、脳が取り出され、洗浄され、蛍光技術を用いてポリマー含量が測定され、製剤の血中含量も測定された(図22)。血液の蛍光がベースラインに戻ったときの24時間における脳内の蛍光の存在は、製剤の臓器レベルでの脳堆積を示す。さらに、PMAA-g-St-PS80投与後の灌流された脳スライス中の蛍光顕微鏡検査法が、細胞段階における脳中へのポリマー堆積を調査するために使用された(図4)。我々のデータは、PMAA-g-St-PS80ナノ粒子が脳毛細血管から浸出し(内皮の堅固な結合を浸透)、脳の血管周囲の領域内に堆積されることを確認している。

40

【0200】

PS80を含む製剤及びPS80のない製剤に対する灌流された脳組織の蛍光顕微鏡調査が実施された。図4Bに示されているように、PMAA-g-St(SP80無し)製剤を受けている灌流された脳試料(中央のパネル)中にはポリマーと関連付けられる蛍光は検出されなかった。一方、

50

PMAA-PS80-g-Stの試料は、微小血管内皮細胞内並びに脳毛細血管の血管周囲領域内における粒子に結合した蛍光の局在性のはっきりとした証拠を提供している(一番右のパネル)。ニューロンによる取り込みの証拠は、ここで調査した時点(注射後45分)では存在しなかった。

【0201】

[実施例13]

PMAA-g-St-PS80の腫瘍標的の可能性

線状ポリマーの腫瘍標的能力が、ネズミ乳癌腫瘍モデル(同所性ネズミEMT6乳房の腫瘍を持っているBalb/cマウス)を用いて調査された。その腫瘍蓄積は、インビボの蛍光画像及びMRIの両方を用いて調査された(図44)。ポリマーは優れた腫瘍蓄積を示した。腫瘍容積が、処理後のさまざまな時点で算定された。

10

【0202】

MIP血管造影図の定性分析は、造影剤投与後の動脈及び静脈の長期間及び持続する可視化を示唆した(図36A)。個々の T_1 強調画像の定量分析は、信号強度の標準偏差によって割られた下大静脈信号強度の比として定義される信号対雑音比(SNR)、及び雑音の信号強度の標準偏差によって割られた下大静脈信号強度とバックグラウンドの軟組織の信号強度の間の差として定義されるコントラスト対ノイズ比(CNR)において、ポリマーの造影剤の投与後に有意な($P<0.05$)上昇を実証し、それは注射2時間後でさえも高められたままであった(図36B)。

【0203】

20

図34Aは、EMT6WT乳癌異種移植片を持っているBalb/cマウスの注射前とPolyGd及びPolyGd-Doxの $0.025\text{mmol/kg Gd}^{3+}$ の用量での注射後の複数の時点での T_1 強調MR画像及び対応する R_1 マップを示す。図34Bは、ベースラインに対する一時的な定量的な R_1 変化(ΔR_1)を表示している。高分子の造影剤の遅い腫瘍蓄積が観察され、それは腫瘍周辺への注射後2時間の $0.66 \pm 0.13\text{s}^{-1}$ (PolyGd)及び3時間の $0.31 \pm 0.06\text{s}^{-1}$ (PolyGd-Dox)のピークへの ΔR_1 の漸増とその後の注射後48時間の $0.34 \pm 0.04\text{s}^{-1}$ (PolyGd)及び $0.13 \pm 0.02\text{s}^{-1}$ (PolyGd-Dox)における持続した ΔR_1 の上昇によって反映された。PolyGdとPolyGd-Doxのピーク ΔR_1 の間には統計的に有意な違い($p<0.05$)が存在した。高分子造影剤の腫瘍中で蓄積する能力は、血管透過性・滞留性亢進(EPR)と調和し、腫瘍血管系の漏れやすい性質、及び乏しい腫瘍が関連するリンパ排水と相まってPolyGd及びPolyGd-Doxの長期にわたる血液循環を示す。

30

【0204】

図35は、EMT6/WT腫瘍を持つマウスにおけるデンプンベースのナノ粒子の抗腫瘍活性を示す。腫瘍細胞は、その日に同所性に移植され、マウスはその後、8日目及び15日目にDoxと等しい $2 \times 10\text{mg/kg}$ の用量で、(A)5%ブドウ糖($n=2 \times 4$)、(B)遊離のDox($n=8$)、PF-NPs($n=2 \times 4$)、(C)PF-NPs、又は(D)SA-NPs($n=2 \times 3$)により処理された。腫瘍容積は、最高62日目まで測定された。5%ブドウ糖、遊離のDox、PF-NPs、及びSA-NPsに対するカプランマイヤー生存曲線も用意された(図35E)。生存曲線における傾向は、さまざまな処理にわたって著しく異なった($p=0.0033$, Mantel Cox)。動物の体重の長手記録が、安楽死を求める毒性限界として測定される全体の初期体重の20%の損失をもって、動物の生存能力の一般的な尺度として使用された。図35Fは、図2において投与された処置を受ける前と後のマウスについての体重のプロファイルを示している。どの場合においても、マウスは腫瘍が 600mm^3 の切断サイズに達する前に死亡したりそれらの体重の20%を失ったりすることはなかった。Doxの群は全て、処置の開始後最初の20日間にわたって体重ロスのいくつかの証拠を示した。概して、遊離のDox、SA-NPs、及びPF-NPsによる処置は、その処置開始の30日後にほんの少数のマウスにおいてのみ、 1g (ほぼ5%)を超える体重ロスをもたらした。食べること、飲むこと、みづくろい動作、探索行動、活気、又はその他の身体的特性の変化はどの処置グループにおいても記録されず、投与された用量でのナノ粒子の要因を背景とした一般毒性がないことを示唆した。

40

【0205】

腫瘍蛍光シグナルは、注射後4日後でさえも比較的強いままであった(図44)。蛍光画像

50

の高感度により、腫瘍は数日にわたって観測され得る。MRIは、より低感度ではあるが、腫瘍の形態、構造、及び腫瘍中のポリマー分布についてのより詳細を提供する。近赤外蛍光プローブ及びMRI造影剤の両方に適合するPMAA-g-St-PS80プラットフォームにより、これら2つの技術は、腫瘍の大きさ(例えば治療への対応)、形態、及び腫瘍中の時間をかけ過ぎたポリマー蓄積及び分布に関するより詳細な情報を得るために組み合わせることができる可能性を有する。

【0206】

本発明の一部としてのドキシソルビシンの使用は、先行の実施例に開示されている。その他の薬物又は治療物質が本発明のナノ粒子のカーゴとして充填され得る。これらとしては、例えば、アミホスチン、アボミン、三酸化ヒ素、ベツリン酸、ブレオマイシン、ボルテゾミブ、ボセンタン、カルムスチン、セレコクシブ、シスプラチン、シクロホスファミド、シタラビン、4-S-システアミニルカテコール、4-S-システアミニルフェノール、ダカルバジン、ドセタキセル、エベロリムス、レナリドミド、パクリタキセル、カルボプラチン、ダカルバジン、フルオロウラシル、フルタミド、メシル酸イマチニブ、メルカプトプリン、メトトレキサート、マイトマイシン、オキサリプラチン、パクリタキセル、プレドニゾン、リツキシマブ、ソラフェニブ、タモキシフェン、テモゾロマイド、サリドマイド、チオグアニン、トラスツズマブ、バルプロ酸、ビンブラスチン、ビンブラスチンなどが挙げられる。

【0207】

血液脳関門を横切ることにおける本発明のナノ粒子の有効性が実証されており、本発明は、本発明のナノ粒子の使用を含み、以下:神経変性障害;精神神経疾患;脳腫瘍、てんかん、片頭痛、ナルコレプシー、不眠症、慢性疲労症候群、高山病、脳炎、髄膜炎、及びエイズによる認知症からなる群から選択される中枢神経系(CNS)障害;血管新生と関連する障害;炎症性又は自己免疫疾患;加齢黄斑変性症;又はリソソーム蓄積症、のいずれかの治療のためのナノ粒子の充填されたカーゴとしての治療物質を送達することが本発明の範囲内である。これは、ナノ粒子の平均サイズが約100nm以下である場合に特に当てはまる。

【0208】

[実施例14]

結合したGdを有するPMAA-g-St-DTPAのpH依存性の緩和能及びMRコントラスト

腫瘍は代謝作用からの乳酸の多量の産生により局所pHの低下を引き起こすことが知られている。ここで我々は、PMAA-g-St-DTPA-Gdナノ粒子が異なるpH値で異なる緩和能を提供することができ、MRイメージングによって、腫瘍組織又は感染病巣中の正常な生理的pH7.4からのpH偏向の検出においてそれらの使用の可能性を示唆することを立証している(表6)。

【0209】

[実施例15]

ポリ(ジエチルアミノエチルメタクリレート)-グラフトデンプン(PDEAEM-g-St)及びPDEAEM-g-St-DTPAナノ粒子の合成及び特性化

フリーラジカル分散重合法が、粒子を調製するために使用された。その重合は、窒素下で、 α, α' -アゾジイソブチルアミジン二塩酸塩(V-50)を開始剤として、エチレングリコールジメタクリレート(EGDM)を形成されたナノ粒子のための架橋剤として、そしてポリビニルピロリドン(PVP)を非イオン性安定剤として使用して実施された。その重合は、水-エタノール混合物(9:1)を用いて、70℃で6時間行われた。得られた粒子は、水とエタノールを使用して洗浄及び精製された。PDEAEM-g-Stの線状ポリマーも、架橋剤の使用を除いた同じ合成方法を用いて調製された。

【0210】

PDEAEMのデンプンへのグラフトは、FTIR及び ^1H NMR分光法によって確認される。TEMが粒子の形態を調べるために使用される。DLSは、大きさに対するpH及び粒子組成物の影響を調査するために使用される。滴定調査は、DEAEMの内容の見解、そしてまたグラフトコポリマーの pK_a を得るために使用される。

【0211】

PDEAEM-g-St-DTPAナノ粒子を合成するために、2gの乾燥したデンブun-DTPAが清浄な2口の反応フラスコ中の40mLの脱イオン水に加えられ、均一になるまでそのまま攪拌された。その溶液のpHは、0.1NのNaOH溶液を用いてほぼ8に調整され、95mLの全容積となるように水が加えられた。その溶液は、攪拌プレート上の加熱されたウォータージャケット中に入れられ、窒素ガスをパージしながら15分間70℃で加熱及び攪拌されるままにされた。開始剤、V-50、が、次にその反応フラスコに加えられた。別のシンチレーションバイアル中で0.2gのPVPと水が、0.3~0.5gのTween80と共に又は無しで混合され、ボルテックス装置上に均一になるまで置かれ、次いで反応フラスコに加えられた。別のシンチレーションバイアル中で、2.0gのモノマーDEAEM、75 μ Lの架橋剤EGDM、5mLのエタノール及び5mLの脱イオン水と一緒に加えられ、ボルテックス装置上に均一になるまで置かれた。次に、それらは反応フラスコ中に加えられた。次に、その反応系は、ゆるい通気孔を有するフィルムでシールされ、その後70℃で8時間そのまま置かれ、そしてそれはまた一晚攪拌したままにされた。窒素パージはその分散液から除去され、代わりにその容器は通気された。次に、その分散液は、12,000~14,000 MWC0 Spectra/Por(登録商標)透析膜に移され、24時間、媒体が最低でも3回、2時間毎にリフレッシュされて、濾水中で透析された。次いで、洗浄された試料は、わずかな熱の中であと24時間、又は結晶生じるまで乾燥された。PDEAEM-g-St-DTPAナノ粒子及び線状ポリマーは、DTPAをPDEAEM-g-Stに結合させることによって調製され得る。

10

【0212】

20

最大で4.5%の固形分含量を有する安定なPDEAEM-g-Stラテックスが、記載されている方法を用いて首尾よく調製された。使用された分散重合法は、極めて容易であり、油及び有機溶媒の使用を必要とせず、この方法を逆マイクロエマルジョン重合法よりも有利にしている。最初に、全てのモノマーは、水に溶解し、重合が進行するにつれて形成されたグラフトポリマーは高いpHで不溶性となり、粒子の形で沈殿し、その後これらの粒子は界面活性剤の助けにより安定化される。表7は、4つの異なるバッチのフィード組成物をまとめている。グラフト収率はDEAEM濃度に依存した。DEAEM濃度を増すことはグラフト収率の増加とともに起こった。これは、より高いDEAEM濃度でデンブunに接近しているモノマー分子のより大きい利用の可能性と関連付けて説明され得よう。デンブunのマクロラジカルは、比較的固定されている。その結果、これらの巨大分子のモノマーとの反応はDEAEMモノマーのデンブun近接に対する可能性に基本的に依存する。

30

【0213】

分析された全てのナノ粒子は、比較的均一な粒径分布及びどちらかと言えば球状を有する非常に均一な形態を示した。これらのナノ粒子は、平坦な表面形態を有する。軽度の粒子凝集及び融合の存在があるが、これはTEM試料調製の性質のためであり得る。

【0214】

FTIR及び ^1H NMRによるグラフトの立体配座

デンブun、PDEAEM及びPDEAEM-g-StのFTIRスペクトルが図37に示されている。天然デンブunのスペクトルと比較すると、大きな変化は、 1724cm^{-1} におけるカルボニルC=O吸収周波数及び $2962\sim 2964\text{cm}^{-1}$ における第三級アミン基のストレッチ振動の存在である。天然デンブun中の 1166 、 1090 、 1020 、及び 954cm^{-1} におけるピークは、CO結合伸縮に起因している。 1090 及び 1020cm^{-1} におけるピークは、無水のグルコース環CO/CC伸縮の特徴を示している。 1645cm^{-1} に発生している特性ピークは、デンブun中に結合した水の存在に起因している。水素結合したヒドロキシル基(O-H)による広帯域は 3450cm^{-1} に現れ、原因は、分子間及び分子内結合したヒドロキシル基と関係する複雑な振動伸縮に帰せられる。 3450cm^{-1} におけるOH伸縮バンドは、PDEAEMホモポリマーには存在しない。 $2916\sim 2920\text{cm}^{-1}$ のバンドは、C-H伸縮の特徴を示している。天然デンブun中の 3450cm^{-1} における強いOH伸縮バンドは、グラフト反応の後は強度が減少し、デンブunのOH基を介したデンブunのDEAEMとの反応を暗に示唆した。また、グラフトポリマーは、PDEAEMホモポリマーにはなかった $520\sim 920\text{cm}^{-1}$ におけるピラノース環振動の特性ピークを示し、PDEAEMのデンブunへのグラフトを

40

50

立証した。

【0215】

図38は、a)可溶性デンプン、c)PDEAEM、及びd)PDEAEM-g-Stの¹H-NMRスペクトルを示している。デンプンのスペクトルは、C6炭素に結合しているデンプン単位のCH₂に帰せられる3.51ppmの特性ピークを示している。3.82ppmのピークは、C1～C5炭素に加えられるCH単位に結合している水素に帰せられる。5.24ppmのピークは、R-OHヒドロキシル基の水素に帰せられる。PDEAEM-g-StポリマーのNMRスペクトルはデンプンとPDEAEMの両方の特徴的なピークを示している。3.34、3.59、及び5.24のピークには小さなシフトが、並びに3.82ppmのピークには形状の小変化がグラフトによって引き起こされた化学環境の変化によって存在する。また、5.43のピークの相対強度における減少があり、デンプンのヒドロキシル基がグラフト反応に関与していることを示している。

10

【0216】

粒径に対するpH及びデンプン含量の影響

動的光散乱が、異なるpH及び一定のイオン強度の緩衝液中でのさまざまなデンプン:DEAEM比を有するナノ粒子の大きさを測定するために使用された。pH4及び7.4のPBS中のPDEAEM-g-St粒子の強度重量分布を示している典型的な動的レーザー光散乱データが、図39及び40に示されている。その粒子は単分散のものであり、ガウス分布に従った。図41における結果は、粒径がpH及びデンプン含量の関数として変化することを明らかにしている。PDEAEMナノ粒子は、pH4で521nmの平均直径を有した。その大きさはpH7.4でナノ粒子と結合している第三級アミン基の脱プロトン化によって221.8nmに減少した。この平均直径における変化は、pHによる体積における913倍の変化になる。グラフトは場合によっては粒径を2倍を超えて実際に減少することが観察された。DEAEMとデンプンの1:1.4のモル比を有するナノ粒子は、低いpHで250nmの平均直径を有し、7.4のpHでは129nmに縮小した。一般に、デンプン含量の増加は、pH感度における減少をもたらした。しかしながら、デンプンを含む粒子は、生理的pH範囲近くで比較すると、DEAEMナノ粒子と比較してより鋭い相転移を有するようであった。

20

【0217】

充填したGdを有するPDEAEM-g-St-DTPAのpH依存性の粒径

典型的な重合において、以下のレシピが使用され、Gd³⁺が上に記載されている方法を用いてPMAA-g-St-DTPA-PS80ナノ粒子に結合された。さまざまなpHの緩衝液中の粒径が、DLSによって測定された。図42中の結果は、pHが低下すると粒径が増大することを示している。粒子容積が増加すると、粒子の水和が増加し、それはMRの下でのより高い緩和能を生むことができ、従って、腫瘍又は感染病巣と健常組織との間のpHの違いを画像化する可能性を有する。レシピ: マルトデキストリン-DTPA(1.4g); 水(163.5mL); 添加されるNaOH(pHを調整するため(23.5mLでpH8.0); エタノール(5mL); V-50(0.2g); PVP(0.2g); Tween80(0.5g); DEAEM(1.8g); 及びEGDM(65 µL)。

30

【0218】

[実施例16]

ドキソルビシンの脳腫瘍への送達

化学療法薬(例えば、ドキソルビシン)及びモノクローナル抗体を含めた多数の治療剤が、BBBを横切ることができず、そのため、脳腫瘍の効果的な治療を提供することができない。脳腫瘍への治療剤の送達の1つの例として、乳癌の脳転移が使用された。1万のMDA-MB 231-luc 3N2細胞が頭蓋内に注射された。

40

【0219】

図33Aは、生物発光画像法により得られた脳腫瘍の典型的な画像(左)及び腫瘍の頭蓋内接種の1週間後に注射したFH750で標識したナノ粒子の分布(右)を示す。その結果は、ナノ粒子の脳腫瘍中における蓄積を強く示唆している。それらの画像は、ナノ粒子の尾静脈注射6時間後にとられた。固定されそしてスライスされた脳腫瘍組織がAMG EVOSf1蛍光顕微鏡(Advanced Microscopy Group、ワシントン州ボセル)を用いる蛍光顕微鏡により観察され、その画像は、Hoescht33342及びNIR HF750で標識化したナノ粒子を可視化するために

50

、DAPI及びRFPフィルターセットを用いて取得された。図33Bは、ナノ粒子及びナノ粒子から解放されたDoxをはっきりと示している。

【0220】

本発明の一部としてのドキシソルビシンの使用が先の実施例中に開示されている。その他の薬物又は治療物質が本発明のナノ粒子のカーゴとして充填され得る。これらとしては、例えば、アミホスチン、アポミン、三酸化ヒ素、ベツリン酸、ブレオマイシン、ボルテゾミブ、ボセンタン、カルムスチン、セレコクシブ、シスプラチン、シクロホスファミド、シタラビン、4-S-システアミニルカテコール、4-S-システアミニルフェノール、ダカルバジン、ドセタキセル、エベロリムス、レナリドミド、パクリタキセル、カルボプラチン、ダカルバジン、フルオロウラシル、フルタミド、メシル酸イマチニブ、メルカプトプリン、メトトレキサート、マイトマイシン、オキサリプラチン、パクリタキセル、プレドニゾン、リツキシマブ、ソラフェニブ、タモキシフェン、テモゾロマイド、サリドマイド、チオグアニン、トラスツズマブ、バルプロ酸、ビンブラスチン、ビンブラスチンなどが挙げられる。

10

【0221】

血液脳関門を横切ることにおける本発明のナノ粒子の有効性が実証されており、本発明は、本発明のナノ粒子の使用を含み、以下：神経変性障害；精神神経疾患；脳腫瘍、てんかん、片頭痛、ナルコレプシー、不眠症、慢性疲労症候群、高山病、脳炎、髄膜炎、及びエイズによる認知症からなる群から選択される中枢神経系(CNS)障害；血管新生と関連する障害；炎症性又は自己免疫疾患；加齢黄斑変性症；又はリソソーム蓄積症、のいずれかの治療のためのナノ粒子の充填されたカーゴとしての治療物質を送達することが本発明の範囲内である。これは、ナノ粒子の平均サイズが約100nm以下である場合に特に当てはまる。

20

【0222】

当然のことながら、端点による数値域の列挙は、その範囲内に組み込まれた全てのものを含む。また、異なる列挙された範囲内に端点を有する列挙された範囲は、そのような列挙された範囲の端点を有する任意のその他の範囲の開示である。例えば、範囲20から350及び10から300の列挙は、範囲20から300及び10から350の開示である。

(付記)

(付記1)

ナノ粒子を製造する方法であって、

30

(a)溶液中にポリマーを可溶化するステップと、

(b)カルボン酸側基を含む重合可能なモノマーを供給するステップと、

(c)モノマーをグラフト重合して可溶化したポリマー上にポリマー鎖を形成するステップと、

(d)形成している鎖と反応する官能基を有するエトキシ化分子を供給するステップと、を含む、

ステップ(c)がエトキシ化分子の存在下で行われ、エトキシ化分子をポリマー鎖に共有結合させる、方法。

(付記2)

溶液が、ヒドロキシル溶媒を含む請求項1に記載の方法。

40

(付記3)

ヒドロキシル溶媒が水を含む請求項2に記載の方法。

(付記4)

ポリマーが、ポリマーの構成単位当たり0.05と3の間の置換度を有するポリヒドロキシルポリマーであり、モノマーがアルケニル基を含み、グラフト重合ステップが架橋剤の存在下で行われる付記1、2又は3に記載の方法。

(付記5)

ポリヒドロキシルポリマーが、0.5と3の間の置換度を有する付記4に記載の方法。

(付記6)

ポリヒドロキシルポリマーが、2と3の間の置換度を有する付記4に記載の方法。

50

- (付記 7)
ポリヒドロキシルポリマーが、0.5と3の間の置換度を有する多糖を含む付記4に記載の方法。
- (付記 8)
ポリヒドロキシルポリマーが、グルコースを含む付記7に記載の方法。
- (付記 9)
多糖が、デンプンを含む付記7に記載の方法。
- (付記 10)
ステップ(c)のモノマーが、架橋剤の量の1倍と20倍(モル/モル)の間の量で存在する付記4、5又は6に記載の方法。
- (付記 11)
ステップ(c)のモノマーが、架橋剤の量の3倍と6倍の間の量で存在する付記10に記載の方法。
- (付記 12)
重合ステップが、フリーラジカル開始剤の存在下で行われるフリーラジカルグラフト重合である付記4から11のいずれかに記載の方法。
- (付記 13)
開始剤が、遷移金属を実質的に含まない付記4から12のいずれかに記載の方法。
- (付記 14)
開始剤が、過硫酸塩又はその機能的同等物である付記4から12のいずれかに記載の方法。
- (付記 15)
エトキシ化分子のエトキシ基が、遊離のヒドロキシル基で終端している付記1から14のいずれかに記載の方法。
- (付記 16)
エトキシ化分子が、化学反応して界面活性剤分子をポリマー鎖に共有結合させるアルケニル基を含む付記1から15のいずれかに記載の方法。
- (付記 17)
エトキシ化分子が、R(C9-C31)-C(O)O-基を有するポリエトキシ化ソルビタンであり、ソルビタンが、重合ステップの間にR(C9-C31)-C(O)O-基のC-C共有結合を介して第二のポリマーに結合される付記16に記載の方法。
- (付記 18)
ソルビタンが、オキシエチレン単位の総数が少なくとも10であるポリソルベートである付記17に記載の方法。
- (付記 19)
オキシエチレン単位の総数が、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30又は32である付記15に記載の方法。
- (付記 20)
前記R(C9-C31)-C(O)O-基が、重合ステップにおいて反応してC-C共有結合を形成する少なくとも1つのC-C不飽和を含む、付記17、18又は19に記載の方法。
- (付記 21)
ポリエトキシ化分子が、ポリソルベート80である付記20に記載の方法。
- (付記 22)
ステップ(C)のポリマーの量及びモノマーの量が、ポリマーのモノマー単位に対するポリマー鎖中のモノマー単位のモル比が0.1と10の間であるナノ粒子を製造するように選択される付記1から21のいずれかに記載の方法。
- (付記 23)
ステップ(C)のポリマーの量及びモノマーの量が、ポリマーのモノマー単位に対するポリマー鎖中のモノマー単位のモル比が0.3と7.0の間であるナノ粒子を製造するように選択される付記22に記載の方法。

10

20

30

40

50

(付記 2 4)

ステップ(C)のポリマーの量及びモノマーの量が、ポリマーのモノマー単位に対するポリマー鎖中のモノマー単位のモル比が1と5.0の間であるナノ粒子を製造するように選択される付記22に記載の方法。

(付記 2 5)

ステップ(c)におけるエトキシ化分子の量及びモノマー量が、モノマー単位に対するエトキシ化分子のモル比が0.0005と1の間であるナノ粒子を製造するように選択される付記1から24のいずれかに記載の方法。

(付記 2 6)

ステップ(c)におけるエトキシ化分子の量及びモノマー量が、モノマー単位に対するエトキシ化分子のモル比が0.003と0.01の間であるナノ粒子を製造するように選択される付記25に記載の方法。

(付記 2 7)

重合ステップが、界面活性剤の存在下で行われる付記1から26のいずれかに記載の方法。

(付記 2 8)

界面活性剤が、アニオン界面活性剤である付記27に記載の方法。

(付記 2 9)

生物学的薬剤の送達のためのナノ粒子を製造する方法であって、付記1から28のいずれかに記載の方法を含み、薬剤が、ステップ(a)のポリマーに共有結合している方法。

(付記 3 0)

ポリマーが、ポリヒドロキシル化ポリマーであり、薬剤が、そのヒドロキシル水素原子の置換によってポリマーに共有結合している付記29に記載の方法。

(付記 3 1)

薬剤が、金属を錯体化することができる有機部分を含む付記29に記載の方法。

(付記 3 2)

金属-有機部分錯体を形成するステップをさらに含む付記31に記載の方法。

(付記 3 3)

金属が、核磁気共鳴映像法において信号を提供するように選択される付記31又は32に記載の方法。

(付記 3 4)

金属が、 Gd^{+3} である付記33に記載の方法。

(付記 3 5)

ステップ(c)のモノマーの量が十分に高く、製造されるナノ粒子の水溶液の、pH7.4及び10mMのイオン強度で測定される、ゼータ電位の絶対値が、少なくとも15mVである付記1から34のいずれかに記載の方法。

(付記 3 6)

生物学的薬剤の送達のためのナノ粒子を製造する方法であって、薬剤及び付記1から35のいずれかに記載の方法によって得られたナノ粒子を液体媒体中で分散させて薬剤をナノ粒子中に取り込むステップを含む方法。

(付記 3 7)

生物学的薬剤の送達のためのナノ粒子を製造する方法であって、付記1から35のいずれかに記載の方法によって製造されたナノ粒子に、薬剤をナノ粒子のポリマー鎖の前記カルボン酸基に、共有結合させることを含む方法。

(付記 3 8)

キャリアナノ粒子を製造する方法であって、

(i)水溶液中にポリマーを可溶化するステップと、

(ii)カルボン酸側基を含む重合可能なモノマーを供給するステップと、

(iii)モノマーをグラフト重合して可溶化したポリマー上にポリマー鎖を形成するステップと、

10

20

30

40

50

(iv)形成している鎖と反応する官能基を有するポリエトキシ化分子を供給するステップと、
を含み、

重合ステップ(ii)がポリエトキシ化分子の存在下で行われ、ポリエトキシ化分子を形成している鎖に共有結合させ、重合生成物がナノ粒子の外側にポリエトキシ化部分を有するナノ粒子を形成する方法。

(付記39)

第一のポリマー、

第一のポリマーにグラフトした第二のポリマー、及び

第二のポリマーに共有結合したポリエトキシ化部分
を含むナノ粒子。

10

(付記40)

第二のポリマーが、第二のポリマーの主鎖の2つの炭素当たり約1個のカルボキシル基を有する重合したビニル基を含む付記39に記載のナノ粒子。

(付記41)

第二のポリマーが、ポリアルケニルポリマーである付記39に記載のナノ粒子。

(付記42)

ポリアルケニルポリマーが、ポリアクリル酸である付記41に記載のナノ粒子。

(付記43)

ポリアクリル酸が、ポリ(メタクリル酸)である付記42に記載のナノ粒子。

20

(付記44)

ポリエトキシ化部分が、R(C9-C31)-C(O)O-基を有するソルビタンであり、ソルビタンが、R-基のC-C共有結合を介して第二のポリマーに結合している付記39から43のいずれかに記載のナノ粒子。

(付記45)

第一のポリマーが、ポリヒドロキシルポリマーを含む付記39から44のいずれかに記載のナノ粒子。

(付記46)

ポリヒドロキシルポリマーが、0.05と3の間の置換度を有する多糖を含む付記45に記載のナノ粒子。

30

(付記47)

多糖が、デンプンを含む付記46に記載のナノ粒子。

(付記48)

第二のポリマーが、架橋されている付記47に記載のナノ粒子。

(付記49)

付記39から48のいずれかに記載の複数のナノ粒子を含む組成物であって、薬学的に活性な薬剤をさらに含む組成物。

(付記50)

薬剤が、ナノ粒子に吸着されている付記49に記載の組成物。

(付記51)

付記39から48のいずれかに記載の複数のナノ粒子を含む組成物であって、さらにシグナル分子を含む組成物。

40

(付記52)

シグナル分子が、有機部分によりキレート化された金属であり、部分がナノ粒子に共有結合されている付記51に記載の組成物。

(付記53)

有機部分が、第一のポリマーに共有結合されている付記52に記載の組成物。

(付記54)

シグナル分子が、ナノ粒子に共有結合されており、好ましくはカルボン酸側基に共有結合している付記51に記載の組成物。

50

(付記 5 5)

シグナル分子が、フルオロフォアである付記51又は54の組成物。

(付記 5 6)

薬学的に活性な薬剤をさらに含む付記51から54のいずれかに記載の組成物。

(付記 5 7)

多糖を含む第一のポリマー、

第一のポリマーにグラフトしたポリ(メタクリル酸)を含む第二の架橋したポリマー、及び

(C9-C31)R-C(0)O-基を含み、第二のポリマーの炭素主鎖とR基との間のC-C結合によって第二のポリマーに共有結合しているポリソルベートを含むナノ粒子。

10

(付記 5 8)

(C9-C31)R-C(0)O-基が、Rが直鎖のアルキルである-(C17)R-C(0)O-である付記57に記載のナノ粒子。

(付記 5 9)

ポリソルベートが、基- $O(CH_2CH_2O)_w-C(0)(C17)R$ 、 $HO(CH_2CH_2O)_x-$ 、 $-HO(CH_2CH_2O)_y-$ 、 $-H O(CH_2CH_2O)_z-$ を含み、但し、 $w+x+y+z=20$ である付記58に記載のナノ粒子。

(付記 6 0)

多糖の分子量が、2,600Daと4,500Daの間である付記57、58又は59に記載のナノ粒子。

(付記 6 1)

第一のポリマーがデンプンを含む付記57、58又は59に記載のナノ粒子。

20

(付記 6 2)

ポリ(メタクリル酸)のメタクリレートモノマー単位に対する多糖のモノマー単位のモル比が、0.2と8.0の間である付記57から61のいずれかに記載のナノ粒子。

(付記 6 3)

ポリソルベート及びポリ(メタクリル酸)のメタクリレートモノマー単位のモル比が、0.002と0.03の間である付記57から62のいずれかに記載のナノ粒子。

(付記 6 4)

ナノ粒子を製造する方法であって、

(a)溶液中でポリマーを可溶化するステップ、

(b)アルキルアミノアルキルエステル側基を含む重合可能なモノマーを供給するステップ、

(c)架橋剤を供給するステップ、及び

(d)モノマーをグラフト重合して可溶化したポリマー上にポリマー鎖を形成して、ナノ粒子を形成するステップ

を含む方法。

30

(付記 6 5)

ポリマーが、ポリマーの構成単位当たり0.05と3の間の置換度を有するポリヒドロキシルポリマーであり、モノマーが、アルケニル基を含み、グラフト重合ステップが、架橋剤の存在下で行われる付記64に記載の方法。

40

(付記 6 6)

ポリヒドロキシルポリマーが、ポリマーの構成単位当たり1と3の間の置換度を有する付記65に記載の方法。

(付記 6 7)

ポリヒドロキシルポリマーが、0.5と3の間の置換度を有する多糖を含む付記65に記載の方法。

(付記 6 8)

ポリヒドロキシルポリマーが、グルコースを含む付記67に記載の方法。

(付記 6 9)

多糖が、デンプンを含む付記67に記載の方法。

50

- (付記 70)
溶液が、ヒドロキシル溶媒を含む付記64から69のいずれかに記載の方法。
- (付記 71)
ヒドロキシル溶媒が、水及び/又はアルコールを含む付記70に記載の方法。
- (付記 72)
ヒドロキシル溶媒が、水及びエタノールを含む付記71に記載の方法。
- (付記 73)
重合可能なモノマーが、メタクリル酸のアルキルアミノアルキルエステルである付記64から72のいずれかに記載の方法。
- (付記 74) 10
モノマーが、ジエチルアミノエチルメタクリル酸である付記73に記載の方法。
- (付記 75)
重合ステップが、フリーラジカル開始剤の存在下で行われるフリーラジカルグラフト重合である付記64から74のいずれかに記載の方法。
- (付記 76)
開始剤が、遷移金属を実質的に含まない付記75に記載の方法。
- (付記 77)
開始剤が、過硫酸塩又はその機能的同等物である付記75又は76に記載の方法。
- (付記 78)
架橋剤が、エチレングリコールジメタクリレートである付記64から77のいずれかに記載の方法。 20
- (付記 79)
ステップ(d)のモノマーが、架橋剤の量の1倍と200倍の間の量(モル/モル)で存在する付記64から78のいずれかに記載の方法。
- (付記 80)
ステップ(d)のモノマーが、架橋剤の量の3倍と50倍の間の量(モル/モル)で存在する付記79に記載の方法。
- (付記 81)
ステップ(c)のポリマーの量及びモノマーの量が、ポリマーのモノマー単位に対するポリマー鎖中のモノマー単位のモル比が0.05と20の間であるナノ粒子を製造するように選択される付記64から80のいずれかに記載の方法。 30
- (付記 82)
ステップ(c)のポリマーの量及びモノマーの量が、ポリマーのモノマー単位に対するポリマー鎖中のモノマー単位のモル比が2と4の間であるナノ粒子を製造するように選択される付記81に記載の方法。
- (付記 83)
ポリソルベートが、ステップ(d)において存在する付記64から82のいずれかに記載の方法。
- (付記 84)
ポリソルベートのR基が、不飽和を含むヒドロカルビル基である付記83に記載の方法。 40
- (付記 85)
ポリソルベートが、ポリソルベート80である付記84に記載の方法。
- (付記 86)
重合可能なモノマーが、ポリソルベートの量の5倍と50倍の間の量(モル/モル)で存在する付記83、84又は85に記載の方法。
- (付記 87)
重合可能なモノマーが、ポリソルベートの量の20倍と30倍の間の量(モル/モル)で存在する付記86に記載の方法。
- (付記 88)
非イオン性安定剤がステップ(d)において存在する付記64から87のいずれかに記載の方 50

法。

(付記 8 9)

安定剤が、ポリビニルピロリドンである付記88に記載の方法。

(付記 9 0)

生物学的薬剤の送達のためのナノ粒子を製造する方法であって、付記64から89のいずれかに記載の方法を含み、薬剤がステップ(a)のポリマーに共有結合している方法。

(付記 9 1)

薬剤が、金属を錯体化することができる有機部分を含む付記90に記載の方法。

(付記 9 2)

金属-有機部分錯体を形成するステップをさらに含む付記91に記載の方法。

(付記 9 3)

有機部分が、DTPAである付記92に記載の方法。

(付記 9 4)

金属が、核磁気共鳴映像法において信号を提供するように選択される付記92又は93に記載の方法。

(付記 9 5)

金属が、 Gd^{+3} である付記94に記載の方法。

(付記 9 6)

生物学的薬剤の送達のためのナノ粒子を製造する方法であって、薬剤及び付記64から95のいずれかに記載の方法によって得られたナノ粒子を液体媒体中で分散させて薬剤をナノ粒子中に取り込むステップを含む方法。

(付記 9 7)

多糖を含む第一のポリマー、及び

第一のポリマーにグラフトしたメタクリル酸のアルキルアミノアルキルエステルを含む第二の架橋ポリマーであって、架橋している第二のポリマーを含むナノ粒子。

(付記 9 8)

第二のポリマーが、重合したジエチルアミノエチルメタクリル酸である付記97に記載のナノ粒子。

(付記 9 9)

第二のポリマーが、第二のポリマーの主鎖の2つの炭素当たり約1個のカルボキシル基を有する重合したビニル基を含む付記97に記載のナノ粒子。

(付記 1 0 0)

多糖が、デンプンである付記97、98又は99に記載のナノ粒子。

(付記 1 0 1)

付記97から100のいずれかに記載のナノ粒子の溶液を含む組成物であって、ナノ粒子が、それらの周囲の溶液のpHを約4から約7.4まで変化させたとき、500倍と1500倍の間で増加した体積変化を示す組成物。

(付記 1 0 2)

ナノ粒子が、それらの周囲の溶液のpHを約4から約7.4まで変化させたとき、700倍と1100倍の間で増加した体積変化を示す付記101に記載の組成物。

(付記 1 0 3)

付記97から100のいずれかに記載の複数のナノ粒子を含む組成物であって、シグナル分子をさらに含む組成物。

(付記 1 0 4)

シグナル分子をさらに含む付記101又は102に記載の組成物。

(付記 1 0 5)

シグナル分子が、有機部分によりキレート化された金属であり、部分がナノ粒子に共有結合されている付記103又は104に記載の組成物。

(付記 1 0 6)

10

20

30

40

50

有機部分が、第一のポリマーに共有結合している付記105に記載の組成物。

(付記107)

金属が、核磁気共鳴映像法において信号を提供するように選択され、多糖のモノマー単位に対するメタクリル酸のアルキルアミノアルキルエステルのモル比が0.5と5の間である付記106に記載の組成物。

(付記108)

多糖のモノマー単位に対するメタクリル酸のアルキルアミノアルキルエステルのモル比が0.5と2の間である付記107に記載の組成物。

(付記109)

付記97から100のいずれかに記載の複数のナノ粒子を含む組成物であって、薬学的に活性な薬剤をさらに含む組成物。

(付記110)

薬剤が、ナノ粒子に吸着されている付記109に記載の組成物。

【0223】

本明細書に挙げられている全ての文書の内容、及びこの出願が優先権を主張している米国特許仮出願第61/605,995号の内容は、参照により本明細書に組み込まれている。

【表 1】

試料コード	フィード組成		ポリマー組成* (モル比) MAA/PS 80/St	グラフト収率(GY%)
	St (mmol)	MAA (mmol)		
PMAA	0	28.0	1 / 0.0021 / 0	N/A
PMAA-g-St-1	4.9	23.1	1 / 0.0029 / 0.28	67
PMAA-g-St-2	9.6	18.4	1 / 0.0041 / 0.66	60
PMAA-g-St-3	12.0	16.0	1 / 0.0045 / 0.90	55
PMAA-g-St-4	18.0	10.0	1 / 0.011 / 2.12	52

10

20

30

40

【表 2】

試料コード	フィード組成		ポリマー組成*		MAA含量** (mmol/g)	反応収率(RY%)
	MAA (mmol)	St (mmol)	(モル比)			
			MAA/PS 80/St			
PMAA-PS 80	28.0	0	1 / 0.0075 / 0		8.34	50
PMAA-PS 80-g-St-1	23.1	4.9	1 / 0.015 / 0.34		6.23	67
PMAA-PS 80-g-St-2	18.4	9.6	1 / 0.019 / 0.66		4.58	60
PMAA-PS-80-g-St-3	16.0	12.0	1 / 0.024 / 0.86		3.36	55
PMAA-PS-80-g-St-4	10.0	18.0	1 / 0.039 / 2.16		2.01	52

KPS = 0.45 mmol, STS = 1.36 mmol, PS 80 = 0.57 mmol, SDS = 0.69 mmol, MBA = 3.2 mmol, 水 = 200 ml, 温度 = 65 °C.

*¹H NMRを用いて計算

** 滴定を用いて計算

10

20

30

40

【表 3】

試料コード	MAA: Stモル比 (フィード)	サイズ(nm)					$V_{7.4}/V_4$	PDI
		pH=4	pH=5	pH=6	pH=7.4			
MAA	N/A	70.5 ± 0.4	88.2 ± 0.8	138.0 ± 1.0	152.2 ± 1.1	10.1	0.26	
MAA-g-St-1	4.7	110.4 ± 0.4	116.5 ± 1.4	180.9 ± 0.4	200.4 ± 0.9	6.0	0.14	
MAA-g-St-2	1.9	201.2 ± 0.5	223.8 ± 1.2	290.2 ± 21.5	298.4 ± 2.6	3.3	0.09	
MAA-g-St-3	1.3	229.0 ± 5.2	240.2 ± 1.9	297.1 ± 1.4	310.0 ± 3.1	2.48	0.11	
MAA-g-St-4	0.6	235.1 ± 3.4	237.7 ± 2.1	264.3 ± 4.0	271.7 ± 3.3	1.5	0.12	

* pH=4の粒径の3乗に対するpH=7.4の粒径の3乗の比

【表 4】

試料コード	フィードの MAA含量 (mmol/g)	当量点 (ml)	生成物の MAA含量 (mmol/g)	ゼータ電位(mV)	
				pH=7.4	pH=4
PMAA	9.25	4.2	8.34	-41.7 ± 0.6	-31.5 ± 1.3
PMAA-g-St-1	6.92	3.1	6.23	-34.3 ± 0.9	-24.3 ± 0.8
PMAA-g-St-2	5.0	2.39	4.58	-33.0 ± 0.8	-19.5 ± 0.4
PMAA-g-St-3	4.10	1.7	3.36	-31.9 ± 0.7	-19.1 ± 0.2
PMAA-g-St-4	2.57	1.0	2.01	-15.6 ± 1.4	-2.7 ± 0.7

10

20

30

40

【表 5 A】

製剤	Gd含量 (重量%)	r_1 ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)		サイズ (nm)	ゼータ電位 (mV)
		3T	7T		
オムニスキャン	26.7	4.04	3.9	N/A	N/A
St-DTPA-g-PMAA-LP	9.3	21.8	16.7	可溶性	N/A
St-DTPA-g-PMAA-NP	17.2	29.2	23.1	205 ± 9	-28.5 ± 0.7

10

20

30

40

【表 5 B】

製剤	Gd含量 (重量%)	Dox充填含量 (重量%)	r_1 ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)		分子量 (kDa)	粒径 (nm)	ゼータ電位 (mV)
			3 T	7 T			
Omniscan(登録商標)	26.7 ± 1.0	N/A	4.0 ± 0.1	3.9 ± 0.1	0.57	可溶性	N/A
PolyGd	9.3 ± 0.7	N/A	21.8 ± 0.2	16.7 ± 0.3	47 ± 5 ^a	可溶性	N/A
PolyGd-Dox	8.2 ± 0.5	10.1 ± 0.8	19.2 ± 0.7	13.5 ± 0.4	N/A	67 ± 10	-28 ± 5

10

20

30

40

【表 6】

薬物動態パラメーター	SA-NPs	PF-NPs
$t_{1/2}$ (hr)	92.5 ± 11.9	277.2 ± 33.3
K_{el} (hr ⁻¹)	0.0075 ± 0.0006	0.0025 ± 0.0003
AUC (p/sec/cm ² /sr)/(μw/cm ²)/hr × 10 ¹⁰	8.03 ± 1.60	2.24 ± 0.50

10

20

30

40

【表 7】

試料コード	フィード組成(mol/l)			グラフト収率%
	デンプン	DEAEM	EGDM	
PDEAEM	0	0.43	0.0026	N/A
PDEAEM-g-St-1	0.11	0.32	0.0026	25
PDEAEM-g-St-2	0.25	0.18	0.02	22
PDEAEM-g-St-3	0.36	0.07	0.02	16

文献

1. Kerr, .W., Chemistry and industry of starch. Chemistry and industry of starch., 1950(Ed. 2).
2. Ellis, H. and S. Ring, A study of some factors influencing amylose gelation . Carbohydr. Polym., 1985. 5(3): p. 201-213.
3. Cui, S.W., Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications. 2005, New York: Taylor & Francis.
4. Shalviri, A., Q. Liu, M.J. Abdekhodaie, and X.Y. Wu, Novel modified starch-xanthan gum hydrogels for controlled drug delivery: Synthesis and characterization. Carbohydr. Polym., 2010. 79(4): p. 898-907. 10
5. Celik, M. and M. Sacak, Synthesis and characterization of starch poly (methyl methacrylate) graft copolymers. J. Appl. Polym. Sci., 2002. 86(1): p. 53-57.
6. Beliakova, M.K., A.A. Aly, and F.A. Abdel Mohdy, Grafting of poly (methacrylic acid) on starch and poly (vinyl alcohol). Starch Starke, 2004. 56(9): p. 407-412.
7. Hebeish, A., M. Beliakova, and A. Bayazeed, Improved synthesis of poly (MAA)-starch graft copolymers. J. Appl. Polym. Sci., 1998. 68(10): p. 1709-1715.
8. Liu, M., R. Cheng, J. Wu, and C. Ma, Graft copolymerization of methyl acrylate onto potato starch initiated by ceric ammonium nitrate. J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem., 1993. 31(13): p. 3181-3186. 20
9. Mino, G. and S. Kaizerman, A new method for the preparation of graft copolymers. Polymerization initiated by ceric ion redox systems. J. Polym. Sci., 1958. 31(122): p. 242-243.
10. Sangramsingh, N., B. Patra, B. Singh, and C. Patra, Graft copolymerization of methyl methacrylate onto starch using a Ce (IV)-glucose initiator system. J. Appl. Polym. Sci., 2004. 91(2): p. 981-990.
11. Trimmell, D. and E. Stout, Grafting acrylic acid onto starch and poly (vinyl alcohol) by photolysis. J. Appl. Polym. Sci., 1980. 25(10): p. 2431-2434. 30
12. Zhang, L.M. and D.Q. Chen, Grafting of 2 (Dimethylamino) ethyl Methacrylate onto Potato Starch Using Potassium Permanganate/Sulfuric Acid Initiation System. Starch Starke, 2001. 53(7): p. 311-316.
13. Chan, W.C. and C.Y. Chiang, Flocculation of clay suspensions with water in soluble starch grafting acrylamide/sodium allylsulfonated copolymer powder. Journal of Applied Polymer Science, 1995. 58(10): p. 1721-1726.
14. Elvira, C, J. Mano, J. San Roman, and R. Reis, Starch-based biodegradable hydrogels with potential biomedical applications as drug delivery systems. Biomaterials, 2002. 23(9): p. 1955-1966. 40
15. Khalil, M., S. Farag, and S. Fattach, Hydrolysis of poly (acrylamide)-starch graft copolymer. Journal of Applied Polymer Science, 1995. 57(3): p. 335-342.
16. Rath, S. and R. Singh, Flocculation characteristics of grafted and ungrafted starch, amylose, and amylopectin. Journal of Applied Polymer Science, 1997. 66(9): p. 1721-1729.
17. Shah, S., B. Patel, C. Patel, and H. Trivedi, Saponification of graft copolymers of sodium salt of partially carboxymethylated amylose and its water absorbency. Starch Starke, 1992. 44(3): p.108-110.
18. Singh, R.P., G. Karmakar, S. Rath, N. Karmakar, S. Pandey, T. Tripathy, J. 50

- Panda, K. Kanan, S. Jain, and N. Lan, Biodegradable drug reducing agents and flocculants based on polysaccharides: materials and applications. *Polymer Engineering & Science*, 2000. 40(1): p. 46-60.
19. Aoki, T., M. Kawashima, H. Katono, K. Sanui, N. Ogata, T. Okano, and Y. Sakurai, Temperature-responsive interpenetrating polymer networks constructed with poly (acrylic acid) and poly (N, N-dimethylacrylamide). *Macromolecules*, 1994.27 (4): p. 947-952.
 20. Bearinger, J., D. Castner, and K. Healy, Biomolecular modification of p (A Am-co-EG/AA) IPNs supports osteoblast adhesion and phenotypic expression. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, 1998. 9(7): p. 629-652. 10
 21. Vernon, B., S.W. Kim, and Y.H. Bae, Insulin release from islets of Langerhans entrapped in a poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) polymer gel. *J Biomater Sci Polym Ed*, 1999. 10(2): p. 183-98.
 22. Bayazeed, A., M. Elzairy, and A. Hebeish, Synthesis and Application of New Thickeners Part I: Preparation of Poly (Acrylic Acid) Starch Graft Copolymer. *Starch Starke*, 1989.41(6): p. 233- 236.
 23. Hirose, Y., T. Amiya, Y. Hirokawa, and T. Tanaka, Phase transition of submicron gel beads. *Macromolecules*, 1987.20(6): p. 1342-1344.
 24. Saboktakin, M.R., A. Maharramov, and M.A. Ramazanov, pH-sensitive starch hydrogels via free radical graft copolymerization, synthesis and properties. *Carbohydr. Polym.*, 2009.77(3): p. 634-638. 20
 25. Wiersema, P., A. Loeb, and J.T.G. Overbeek, Calculation of the electrophoretic mobility of a spherical colloid particle. *J. Colloid Interface Sci.*, 1966.22(1): p. 78-99.
 26. Kawaguchi, S., Y. Nishikawa, T. Kitano, K. Ito, and A. Minakata, Dissociation behavior of poly (itaconic acid) by potentiometric titration and intrinsic viscosity. *Macromolecules*, 1990. 23(10): p. 2710-2714.
 27. Kitano, T., S. Kawaguchi, K. Ito, and A. Minakata, Dissociation behavior of poly (fumaric acid) and poly (maleic acid). 1. Potentiometric titration and intrinsic viscosity. *Macromolecules*, 1987.20(7): p. 1598-1606. 30
 28. Wu, X.Y., Q. Zhang, and R. Arshady, Stimuli sensitive hydrogels: response and release modulation, in *Introduction to polymeric biomaterials*, R. Arshady, Editor. 2004, Citus Books: London.
 29. Zeman, L. and D. Patterson, Pressure effects in polymer solution phase equilibria. II. Systems showing upper and lower critical solution temperatures. *J. Phys. Chem.*, 1972.76(8): p. 1214-1219.
 30. Aggarwal, A., R. Saxena, B. Wang, and G.T. Caneba, Studies of the polymerization of methacrylic acid via free-radical retrograde precipitation polymerization process. *J. Appl. Polym. Sci.*, 1996.62(12): p. 2039-2051.
 31. Donbrow, M., E. Azaz, and A. Pillersdorf, Autoxidation of polysorbates. *J. Pharm. Sci.*, 1978. 67(12): p. 1676-1681. 40
 32. Ha, E., W. Wang, and Y.J. Wang, Peroxide formation in polysorbate 80 and protein stability, *J. Pharm. Sci.*, 2002.91(10): p. 2252-2264.
 33. Donbrow, M., *Nonionic surfactants: physical chemistry*. 1987, New York: Marcel Dekker.
 34. Nema, S., R. Washkuhn, and R. Brendel, Excipients and their use in injectable products. *J. Pharm. Sci. Technol.*, 1997.51(4): p. 166.
 35. Ghosh, P., S.C. Chadha, A.R. Mukherjee, and S.R. Palit, Endgroup studies in persulfate initiated vinyl polymer by dye techniques. Part I. Initiation by persulfate alone. *Journal of Polymer Science Part A: General Papers*, 1964.2(10): p 50

- . 4433-4440.
36. Hohenstein, W. and H. Mark, Polymerization of olefins and diolefins in suspension and emulsion. Part II. *Journal of Polymer Science*, 1946.1(6): p. 549-580.
 37. Tauer, K., A.M .I. Ali, and M. Sedlak, On the preparation of stable poly (2-hydroxyethyl methacrylate) nanoparticles. *Colloid Polym. Sci.*, 2005.283(4): p. 351-358.
 38. Maeda, H., J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, and K. Hori, Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Controlle d Release*, 2000. 65(1-2): p. 271-284. 10
 39. Wu, X.Y. and P.I. Lee, Preparation and characterization of thermal-and pH-sensitive nanospheres. *Pharm. Res.*, 1993. 10(10): p. 1544-1547.
 40. Hoare, T. and R. Pelton, Functional group distributions in carboxylic acid containing poly (N- isopropylacrylamide) microgels. *Langmuir*, 2004. 20(6): p. 2123-2133.
 41. Kawaguchi, S., A. Yekta, and M.A. Winnik, Surface characterization and dissociation properties of carboxylic acid core-shell latex particle by potentiometric and conductometric titration. *J Colloid Interface Sci*, 1995. 176(2): p. 362-369.
 42. Bouma, J., J.H. Beijnen, A. Bult, and W.J.M. Underberg, Anthracycline anti tumour agents. *Pharm. World Sci.*, 1986. 8(2): p. 109-133. 20
 43. Adriamycin monograph, in *Compendium of pharmaceuticals and specialities*, L . Welbanks, Editor. 2000, Canadian pharmacists association: Ottawa, ON. p. 31-32.
 44. Alvarez, R.H., Present and future evolution of advanced breast cancer therapy. *Breast Cancer Res*, 2010. 12(Suppl 2): p. SI.
 45. Teraoka, K., M. Hirano, K. Yamaguchi, and A. Yamashina, Progressive cardiac dysfunction in adriamycin-induced cardiomyopathy rats. *Eur. J. Heart Failure*, 2000. 2(4): p. 373-378.
 46. Yeh, E.T.H., A . Tong, D.J. Lenihan, S.W. Yusuf, J. Swafford, C. Champion, J .-B. Durand, H. Gibbs, A.A. Zafarmand, and M.S. Ewer, Cardiovascular Complications of Cancer Therapy. *Circulation*, 2004. 109(25): p. 3122-3131. 30
 47. Arceci, R.J., Can multidrug resistance mechanisms be modified? *Br J Haematol.*, 2000. 110(2): p. 285-291.
 48. Higgins, C.F., Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature*, 2007. 446(7137): p. 749-757.
 49. Wong, H.L., X.Y. Wu, and R. Bendayan, Multidrug resistance in solid tumors and its reversal., in *Pharmaceutical perspectives of cancer therapeutics.*, Y. L U and R.I. Mahato, Editors. 2007, Springer: New York, NY. p. 121-148.
 50. Glavinas, H., P. Krajcsi, J. Cserepes, and B. Sarkadi, The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity. *Curr. Drug Delivery*, 2004. 1(1): p. 27-42. 40
 51. Bennis, S., C. Chapey, J. Robert, and P. Couvreur, Enhanced cytotoxicity of doxorubicin encapsulated in polyisohexylcyanoacrylate nanospheres against multidrug-resistant tumour cells in culture. *Eur. J. Cancer*, 1994. 30(1): p. 89-93.
 52. Couvreur, P., L. Grislain, V. Lenaerts, F. Brasseur, P. Guiot, and A. Biersacki, Biodegradable polymeric nanoparticles as drug carrier for antitumor agents, in *Polymeric Nanoparticles and Microspheres*, P. Guiot and P. Couvreur, Editors. 1986, CRC Press: Boca Raton, FL. p. 27-93.
 53. Shuhendler, A.J., R.Y. Cheung, J. Manias, A. Connor, A.M. Rauth, and X.Y. 50

Wu, A novel doxorubicin-mitomycin C co-encapsulated nanoparticle formulation exhibits anti-cancer synergy in multidrug resistant human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.*, 2010. 119(2): p. 255-269.

54. Prasad, P., J. Cheng, A. Shuhendler, A.M. Rauth, and X.Y. Wu, A novel nanoparticle formulation overcomes multiple types of membrane efflux pumps in human breast cancer cells. *Drug Delivery Transl Res.*, 2012. 2(2): p. 1-11.

55. Wong, H.L., A.M. Rauth, R. Bendayan, J.L. Manias, M. Ramaswamy, Z. Liu, S. Z. Erhan, and X.Y. Wu, A new polymer-lipid hybrid nanoparticle system increases cytotoxicity of doxorubicin against multidrug-resistant human breast cancer cells. *Pharm. Res.*, 2006. 23(7): p. 1574- 1585.

10

56. Torchilin, V.P., Passive and active drug targeting: drug delivery to tumors as an example, in *Handb Exp Pharmacol.*, M. Schafer-Korting, Editor. 2010, Springer: New York, NY. p. 3-53.

57. Maeda, H., The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Adv Enzyme Regul.*, 2001.41(1): p. 189-207.

58. Brigger, I., C. Dubernet, and P. Couvreur, Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Delivery Rev.*, 2002.54(5): p. 631-651.

59. Panyam, J. and V. Labhasetwar, Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Delivery Rev.*, 2003.55(3): p. 329-347.

20

60. Abbott, N.J. and I.A. Romero, Transporting therapeutics across the blood-brain barrier. *Mol. Med. Today.*, 1996.2(3): p. 106-113.

61. Chauhan, N.B., Trafficking of intracerebroventricularly injected antisense oligonucleotides in the mouse brain. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 2002.12(5): p. 353-357.

62. Neuwelt, E., K. Maravilla, E. Frenkel, S. Rapaport, S. Hill, and P. Barnett, Osmotic blood-brain barrier disruption. Computerized tomographic monitoring of chemotherapeutic agent delivery. *J. Clin. Invest.*, 1979.64(2): p. 684-688.

63. Wohlfart, S., S. Gelperina, and J. Kreuter, Transport of drugs across the blood-brain barrier by nanoparticles. *J. Controlled Release.*, 2011.161(2): p. 264 -273.

30

64. Alyautdin, R.N., V.E. Petrov, K. Langer, A. Berthold, D.A. Kharkevich, and J. Kreuter, Delivery of loperamide across the blood-brain barrier with polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Pharm. Res.*, 1997.14(3): p. 325-328.

65. Kreuter, J., T. Hekmatara, S. Dreis, T. Vogel, S. Gelperina, and K. Langer, Covalent attachment of apolipoprotein A1 and apolipoprotein B-100 to albumin nanoparticles enables drug transport into the brain. *J. Controlled Release.*, 2007. 118(1): p. 54-58.

66. Tosi, G., L. Costantino, F. Rivasi, B. Ruozi, E. Leo, A. Vergoni, R. Tacchi, A. Bertolini, M. Vandelli, and F. Forni, Targeting the central nervous system: in vivo experiments with peptide-derivatized nanoparticles loaded with Loperamide and Rhodamine-123. *J. Controlled Release.*, 2007.122(1): p. 1-9.

40

67. Kurakhmaeva, K.B., I.A. Djindjikhshvili, V.E. Petrov, V.U. Balabanyan, T. A. Voronina, S.S. Trofimov, J. Kreuter, S. Gelperina, D. Begley, and R.N. Alyautdin, Brain targeting of nerve growth factor using poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *J. Drug Targeting.*, 2009.17(8): p. 564-574.

68. Zensi, A., D. Begley, C. Pontikis, C. Legros, L. Mihoreanu, S. Wagner, C. Bikhel, H. von Briesen, and J. Kreuter, Albumin nanoparticles targeted with Apo E enter the CNS by transcytosis and are delivered to neurones. *J. of Controlled*

50

Release, 2009.137(1): p. 78-86.

69. Michaelis, K., M.M. Hoffmann, S. Dreis, E. Herbert, R.N. Alyautdin, M. Michaelis, J. Kreuter, and K. Langer, Covalent linkage of apolipoprotein E to albumin nanoparticles strongly enhances drug transport into the brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2006.317(3): p. 1246-1253.

70. Lauterbur, P.C., Image formation by induced local interactions: examples employing nuclear magnetic resonance. *Nature*, 1973.242(5394): p. 190-191.

71. Yan, G.P., L. Robinson, and P. Hogg, Magnetic resonance imaging contrast agents: overview and perspectives. *Radiography*, 2007.13(suppl 1): p. e5-el9.

72. Lauffer, R.B., Paramagnetic metal complexes as water proton relaxation agents for NMR imaging: theory and design. *Chem. Rev.*, 1987.87(5): p. 901-927.

73. Aime, S., M. Fasano, and E. Terreno, Lanthanide (III) chelates for NMR biomedical applications. *Chem. Soc. Rev.*, 1998.27(1): p. 19-29.

74. Caravan, P., J.J. Ellison, T.J. McMurry, and R.B. Lauffer, Gadolinium (III) chelates as MRI contrast agents: structure, dynamics, and applications. *Chem. Rev.*, 1999. 99(9): p. 2293- 2352.

75. Weinmann, H.J., R.C. Brasch, W.R. Press, and G.E. Wesbey, Characteristics of gadolinium- DTPA complex: a potential NMR contrast agent. *Am. J. Roentgenol.*, 1984. 142(3): p. 619- 624.

76. Haley, T., K. Raymond, N. Komesu, and H. Upham, Toxicological and pharmacological effects of gadolinium and samarium chlorides. *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, 1961. 17(3): p. 526- 532.

77. Spencer, A.J., S.A. Wilson, J. Batchelor, A. Reid, J. Pees, and E. Harpur, Gadolinium chloride toxicity in the rat. *Toxicol. Pathol.*, 1997. 25(3): p. 245-255.

78. Graca, J., F. Davison, and J. Feavel, Comparative toxicity of stable rare earth compounds. III. Acute toxicity of intravenous injections of chlorides and chelates in dogs. *AMA Arch. Ind. Health*, 1964. 8: p. 555-564.

79. Lu, Z.R., A.M. Mohs, Y. Zong, and Y. Feng, Polydisulfide Gd (III) chelates as biodegradable macromolecular magnetic resonance imaging contrast agents. *Int. J. Nanomed.*, 2006. 1(1): p. 31-40.

80. Bogdanov Jr, A., S. Wright, E. Marecos, A. Bogdanova, C. Martin, P. Petherick, and R. Weissleder, A long-circulating co-polymer in "passive targeting" to solid tumors. *J. Drug Targeting*, 1997. 4(5): p. 321-330.

81. Cai, J., E.M. Shapiro, and A.D. Hamilton, Self-assembling DNA quadruplex conjugated to MRI contrast agents. *Bioconjugate Chem.*, 2009. 20(2): p. 205-208.

82. Doble, D.M.J., M. Botta, J. Wang, S. Aime, A. Barge, and K.N. Raymond, Optimization of the relaxivity of MRI contrast agents: Effect of poly (ethylene glycol) chains on the water- exchange rates of Gd III complexes. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001. 123(43): p. 10758-10759.

83. Kobayashi, H., S. Kawamoto, S.K. Jo, H.L. Bryant Jr, M.W. Brechbiel, and A. Robert, Macromolecular MRI contrast agents with small dendrimers: pharmacokinetic differences between sizes and cores. *Bioconjugate Chem.*, 2003. 14(2): p. 388-394.

84. Langereis, S., Q.G. De Lussanet, M.H.P. Van Genderen, W.H. Backes, and E. Meijer, Multivalent contrast agents based on gadolinium-diethylenetriaminepentaacetic acid- terminated poly (propylene imine) dendrimers for magnetic resonance imaging. *Macromolecules*, 2004. 37(9): p. 3084-3091.

85. Mulder, W.J.M., G.J. Strijkers, A.W. Griffioen, L. van Bloois, G. Molema, G. Storm, G.A. Koning, and K. Nicolay, A liposomal system for contrast-enhanced

10

20

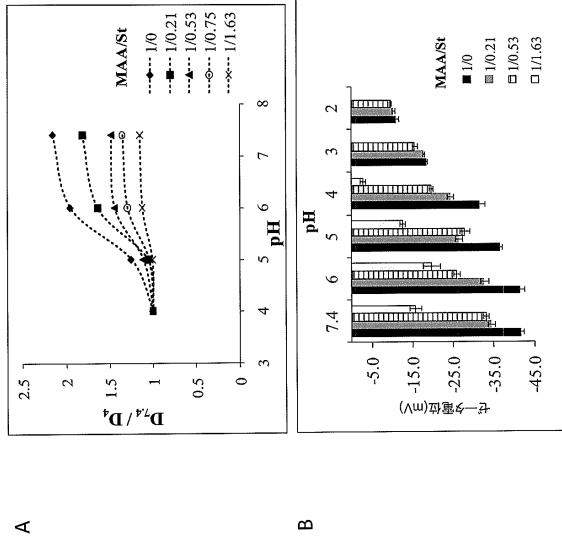
30

40

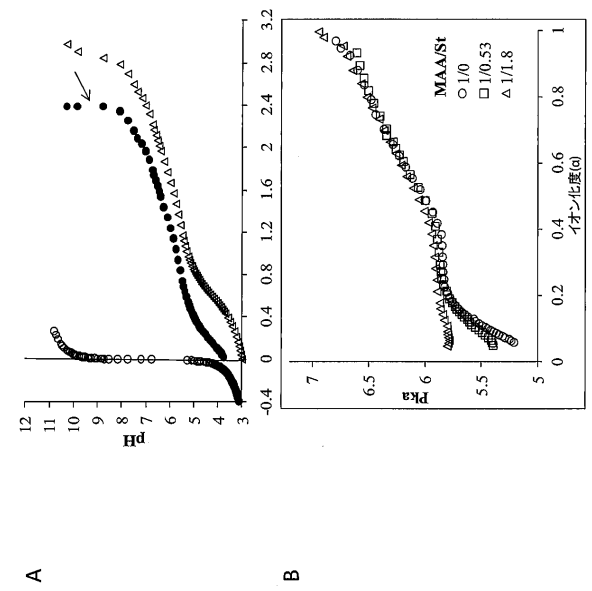
50

- magnetic resonance imaging of molecular targets. *Bioconjugate Chem.*, 2004. 15(4): p. 799-806.
86. Rebizak, R., M. Schaefer, and E. Dellacherie, Polymeric conjugates of Gd^{3+} - diethylenetriaminepentaacetic acid and dextran. 1. Synthesis, characterization, and paramagnetic properties. *Bioconjugate Chem.*, 1997. 8(4): p. 605-610.
 87. Steve, R., M.O. Guler, R.E. Bras, T.J. Meade, and S.I. Stupp, Self-assembled peptide amphiphile nanofibers conjugated to MRI contrast agents. *Nano Lett.*, 2005. 5(1): p. 1-4.
 88. Vexler, V.S., O. Clement, H. Schmitt Willich, and R.C. Brasch, Effect of varying the molecular weight of the MR contrast agent Gd-DTPA-polylysine on blood pharmacokinetics and enhancement patterns. *J Magn Reson Imaging*, 1994. 4(3): p. 381-388. 10
 89. Wen, X., E.F. Jackson, R.E. Price, E.E. Kim, Q. Wu, S. Wallace, C. Charnsangavej, J.G. Gelovani, and C. Li, Synthesis and characterization of poly (L-glutamic acid) gadolinium chelate: a new biodegradable MRI contrast agent. *Bioconjugate Chem.*, 2004. 15(6): p. 1408-1415.
 90. Zhang, G., R. Zhang, X. Wen, L. Li, and C. Li, Micelles based on biodegradable poly (l-glutamic acid)-b-poly(lactide) with paramagnetic Gd ions chelated to the shell layer as a potential nanoscale MRI- visible delivery system. *Biomacromolecules*, 2007.9(1): p. 36-42. 20
 91. Maeda, H., J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, and K. Hori, Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of Controlled Release*, 2000. 65(1-2): p. 271-284.
 92. Peters, T., *The plasma proteins*. 1975, New York: Academic Press.
 93. Alhareth, K., C. Vauthier, C. Gueutin, G. Ponchel, and F. Moussa, Doxorubicin loading and in vitro release from poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles produced by redox radical emulsion polymerization. *Journal of Applied Polymer Science*, 2011.119(2): p. 816-822.
 94. Park, J., P.M. Fong, J. Lu, K.S. Russell, C.J. Booth, W.M. Saltzman, and T.M. Fahmy, PEGylated PLGA nanoparticles for the improved delivery of doxorubicin. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2009.5(4): p. 410-418. 30
 95. Hara, H., R.M. Friedlander, V. Gagliardini, C. Ayata, K. Fink, Z. Huang, M. Shimizu-Sasamata, J. Yuan, and M.A. Moskowitz, Inhibition of interleukin 16 converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997.94(5): p. 2007-2012.
 96. Thornberry, N.A. and Y. Lazebnik, Caspases: enemies within. *Science*, 1998. 281(5381): p. 1312-1316.
 97. Robertson, G.S., S.J. Crocker, D.W. Nicholson, and J.B. Schulz, Neuroprotection by the inhibition of apoptosis. *Brain Pathology*, 2000.10(2): p. 283-292.
 98. Andersen, E.R., L.T. Holmaas, and V. Olaisen, Process for the production of DTPA-bis anhydride. 2008, EP Patent 1,711,479. 40
 99. Shalviri, A., H.K. Chan, G. Raval, M.J. Abdekhodaie, Q. Liu, H. Heerklotz, and X.Y. Wu, Design of pH-responsive Nanoparticles of Terpolymer of Poly (methacrylic acid), Polysorbate 80 and Starch for Delivery of Doxorubicin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013.101: p. 405- 413.
 100. Barge, A., G. Cravotto, E. Gianolio, and F. Fedeli, How to determine free Gd and free ligand in solution of Gd chelates. A technical note. *Contrast Media Mol. Imaging*, 2006.1(5): p. 184- 188.

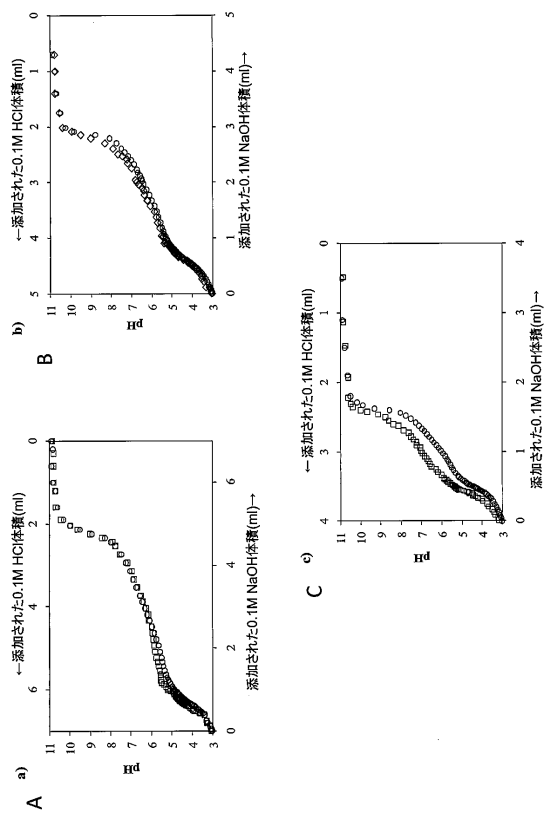
【図 8】



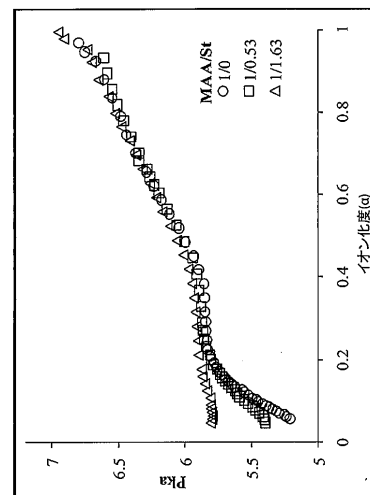
【図 9】



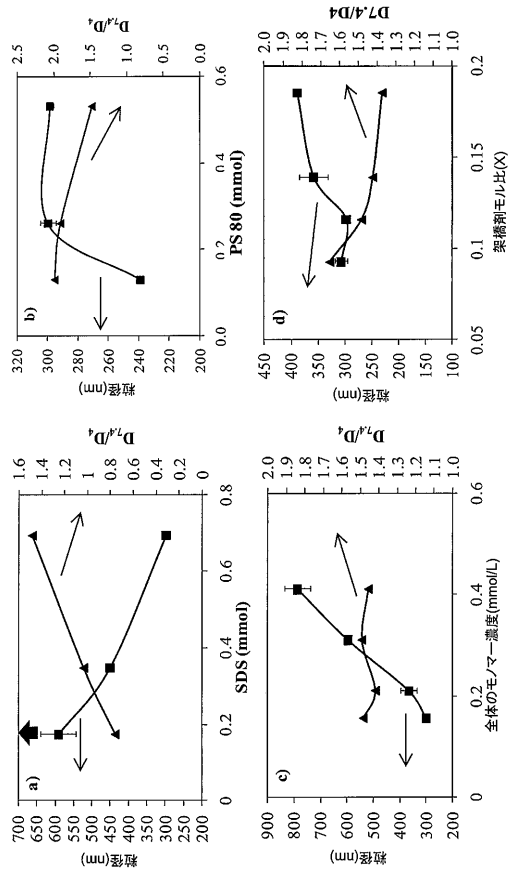
【図 10】



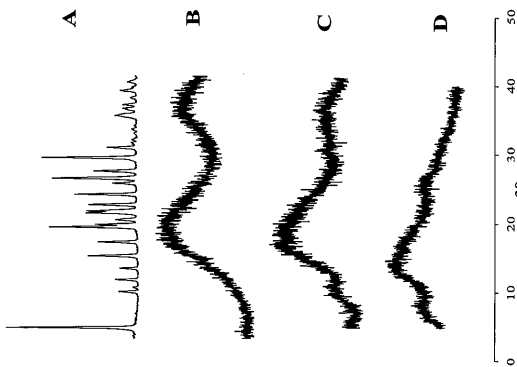
【図 11】



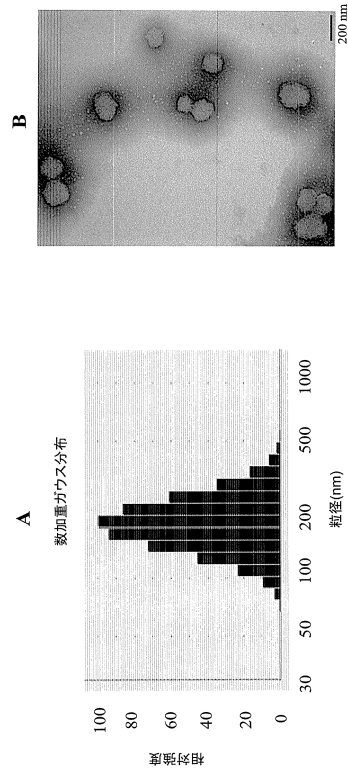
【図 1 2】



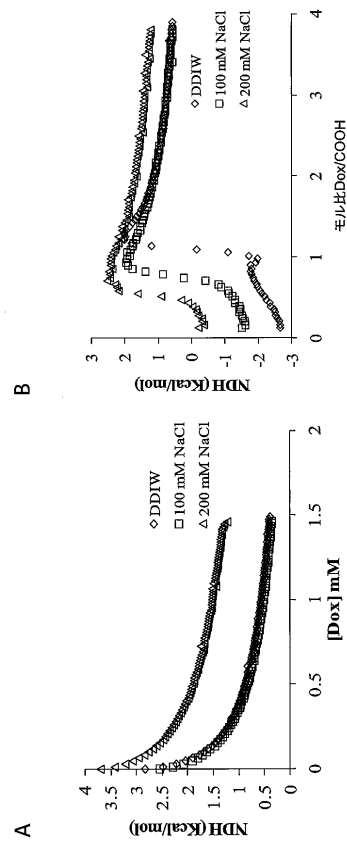
【図 1 4】



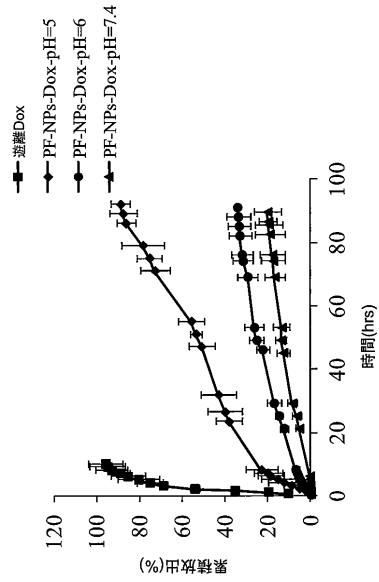
【図 1 3】



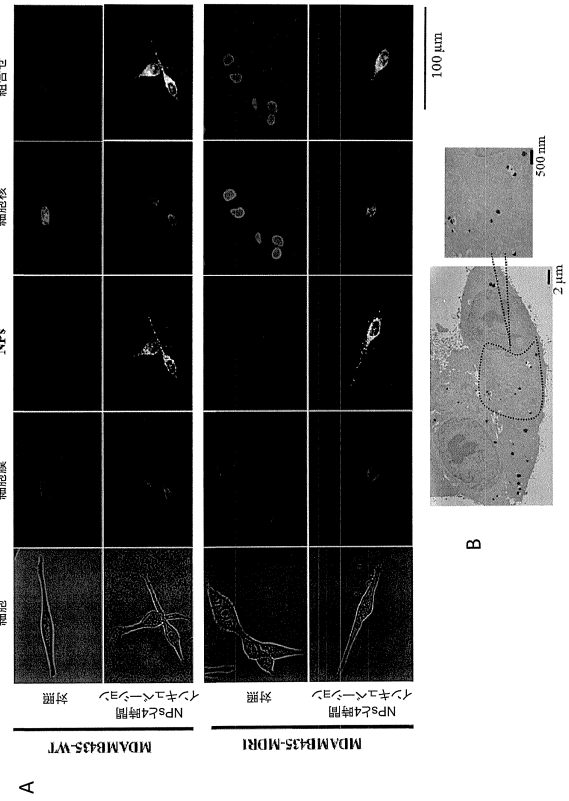
【図 1 5】



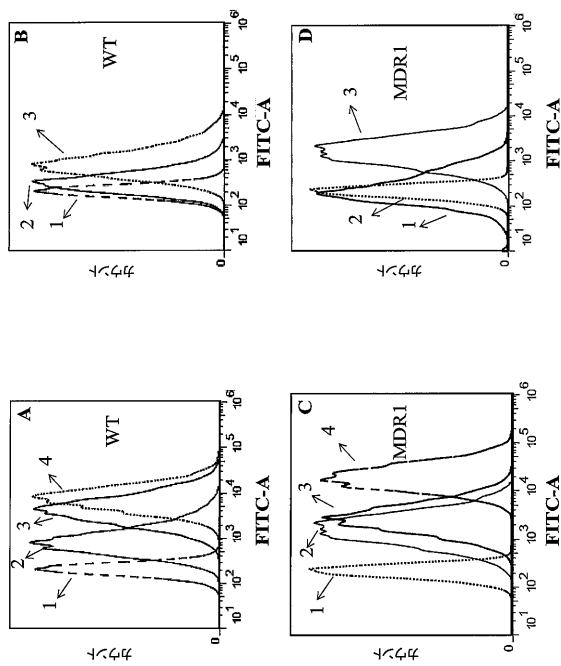
【図 16】



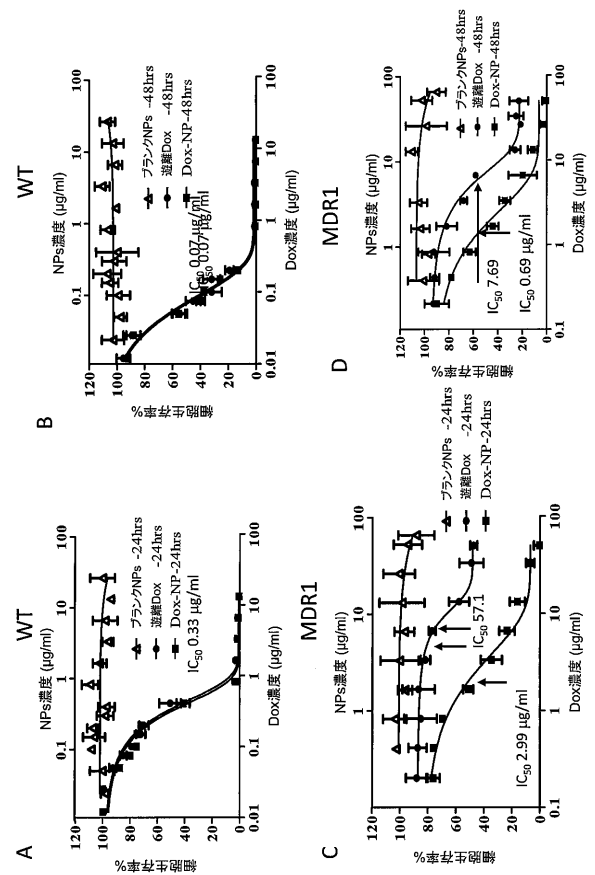
【図 17】



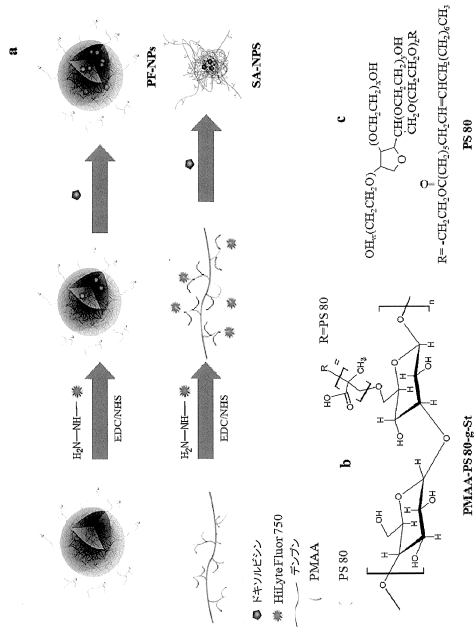
【図 18】



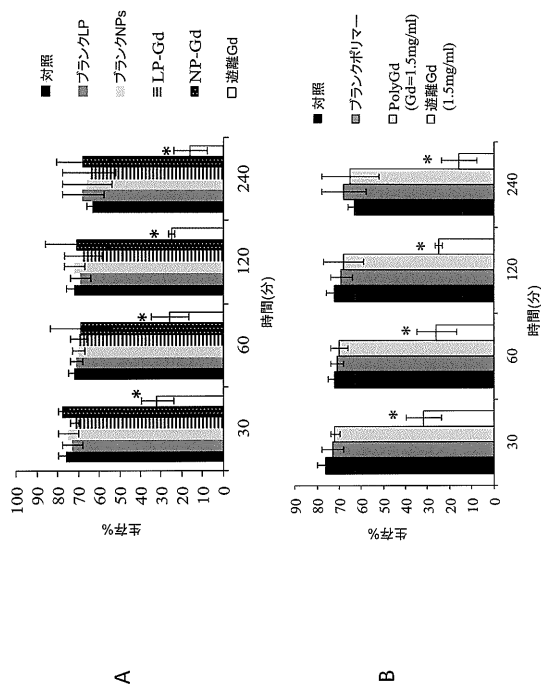
【図 19】



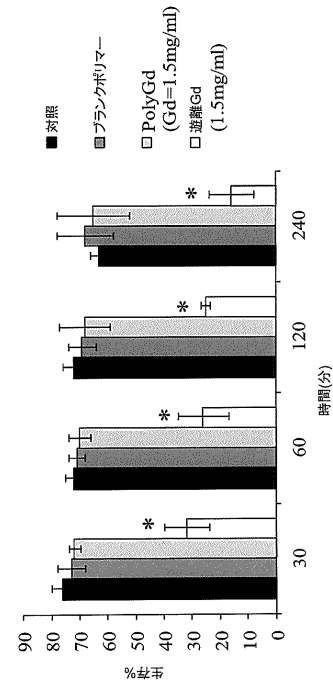
【図 2 0】



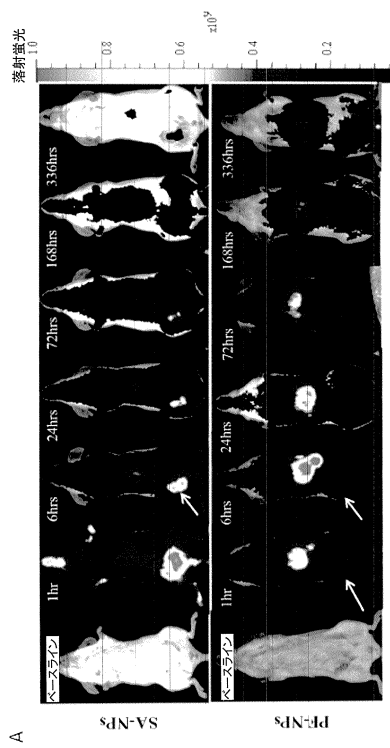
【図 2 4】



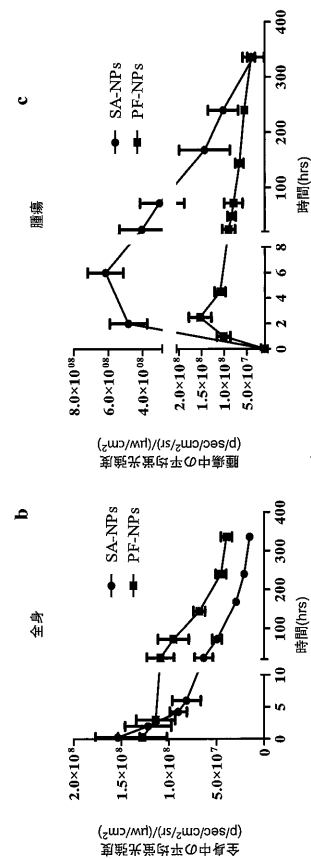
【図 2 5】



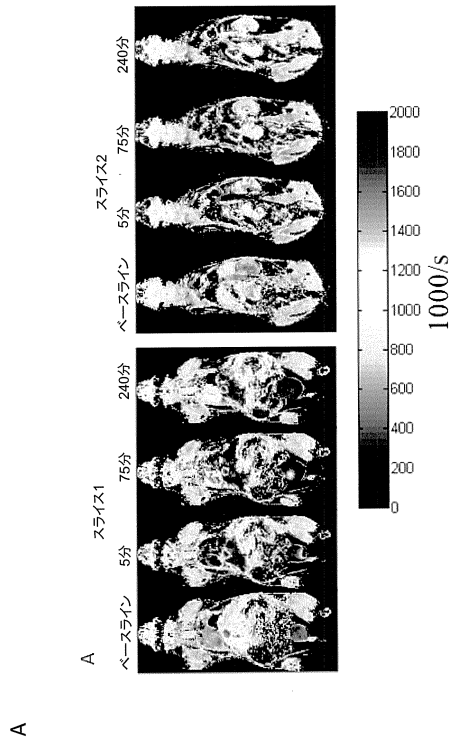
【図 2 6 A】



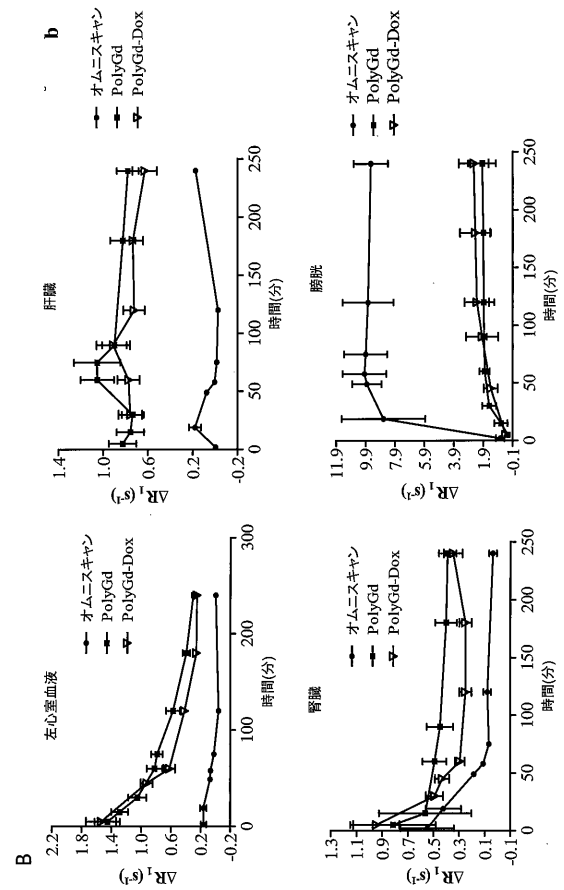
【図 2 6 B】



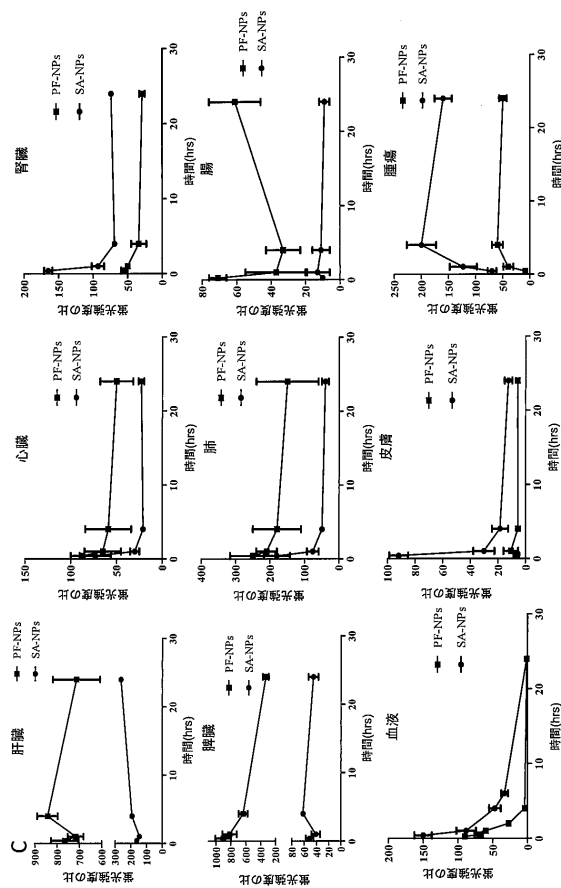
【図 27 A】



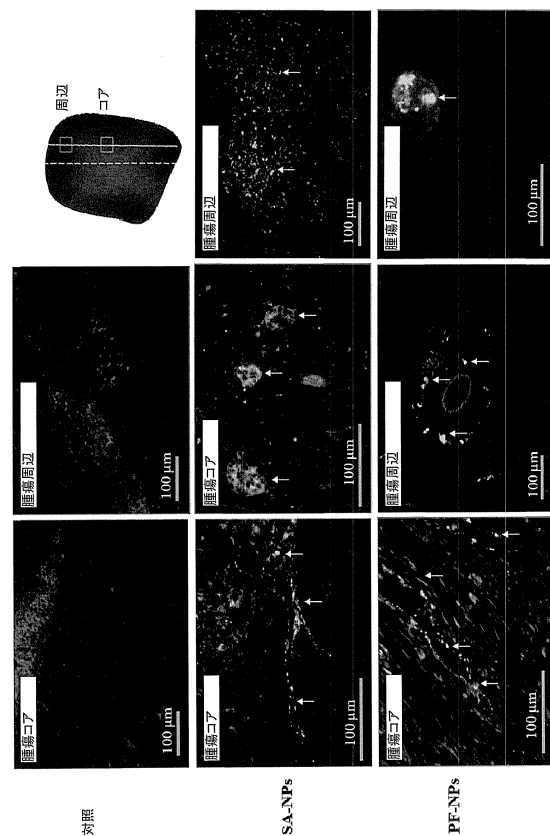
【図 27 B】



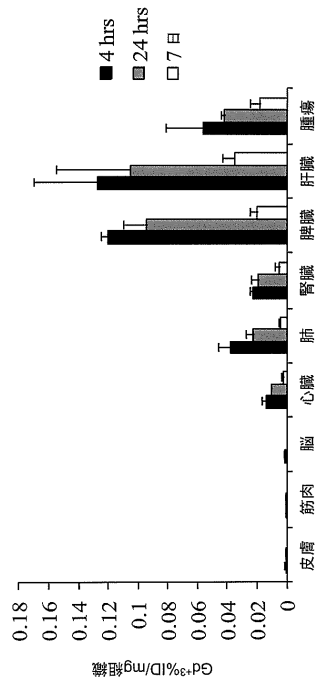
【図 27 C】



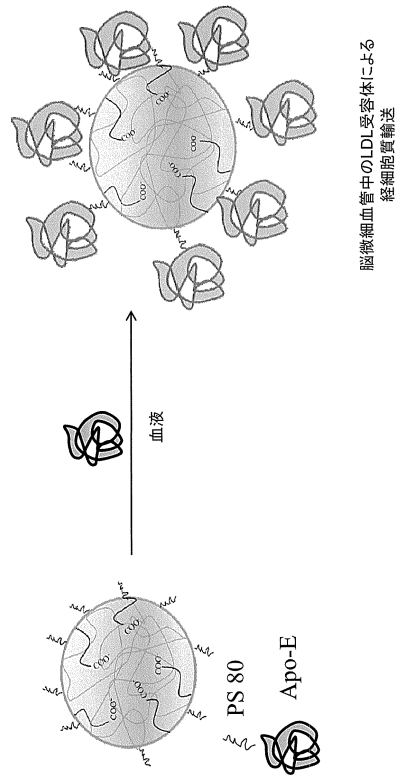
【図 28】



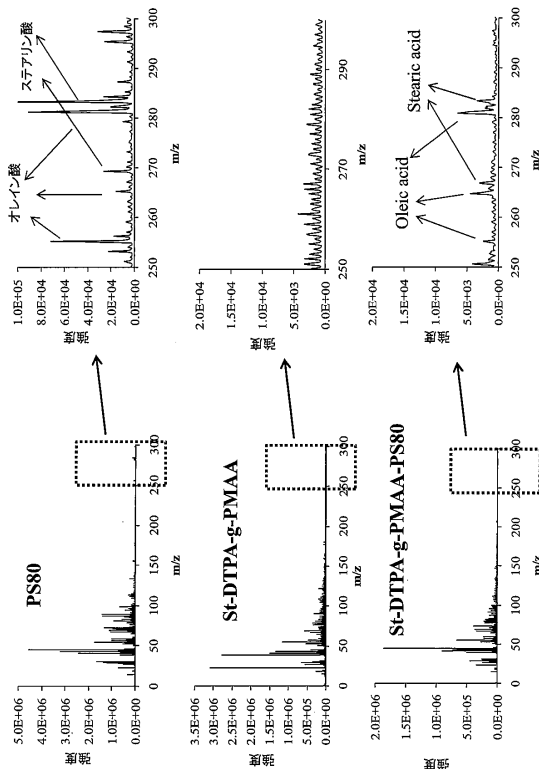
【図 29】



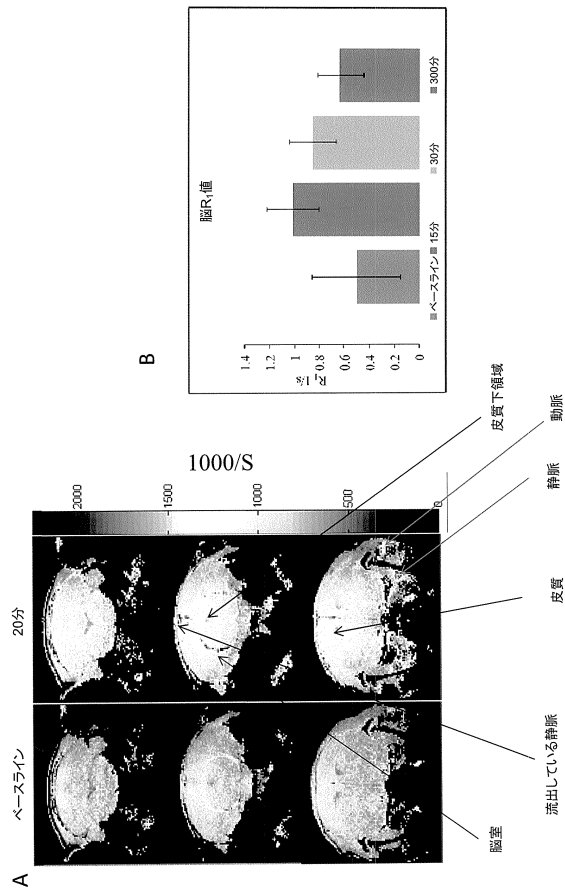
【図 30】



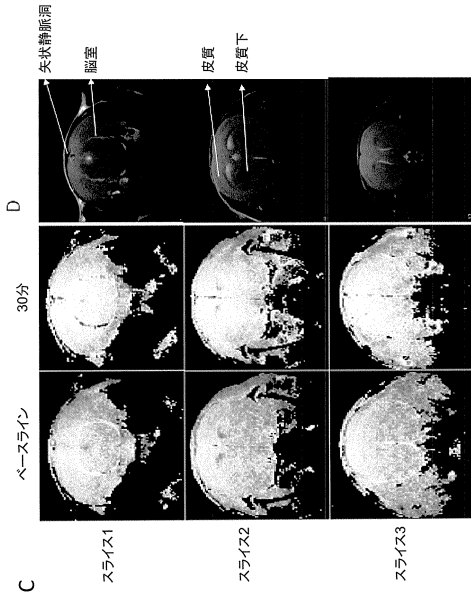
【図 31】



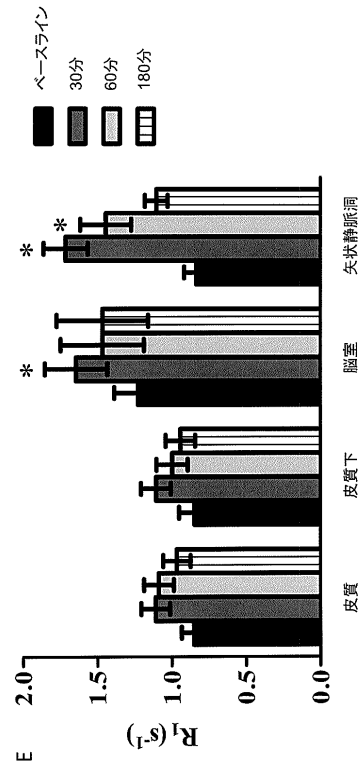
【図 32 A】



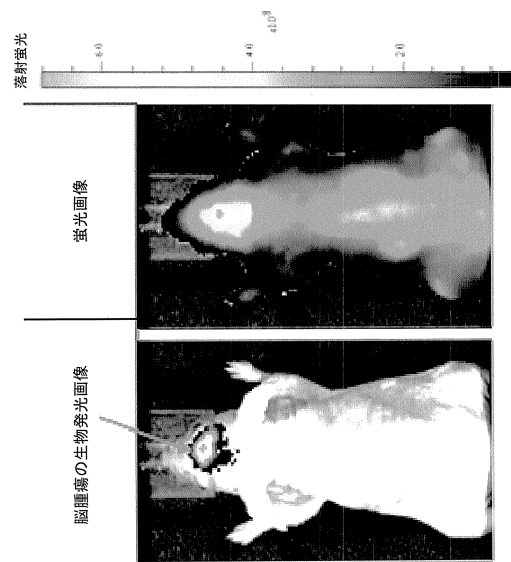
【図 3 2 B】



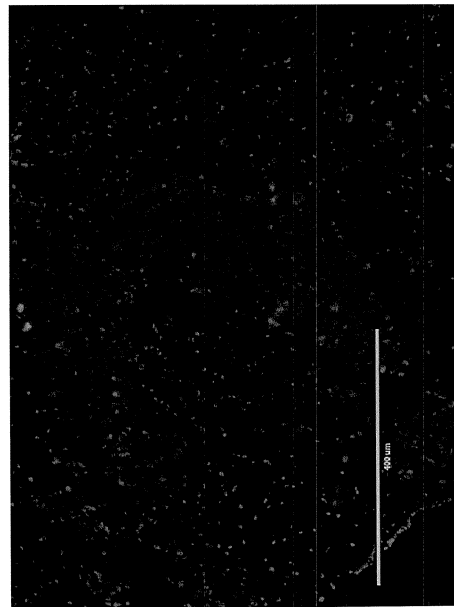
【図 3 2 C】



【図 3 3 A】



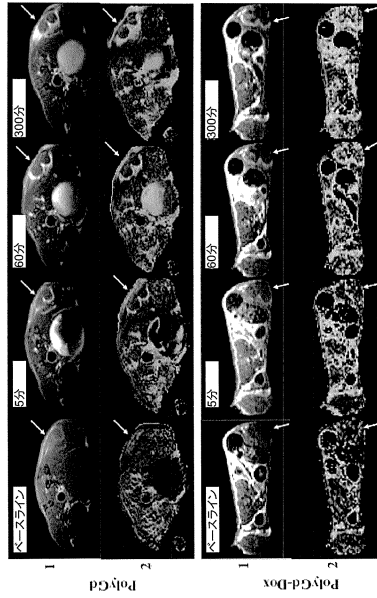
【図 3 3 B】



A

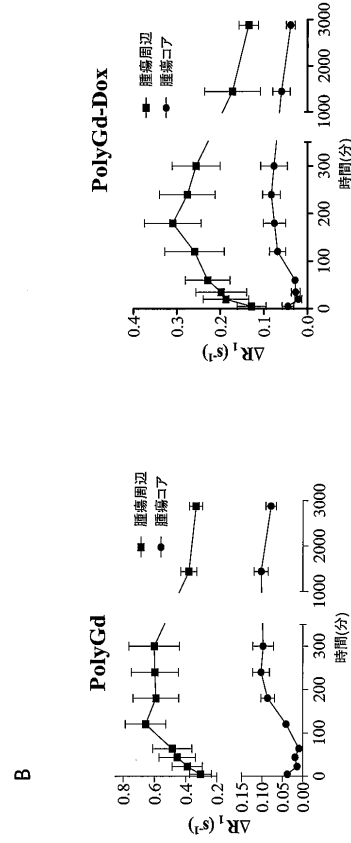
B

【図 3 4 A】



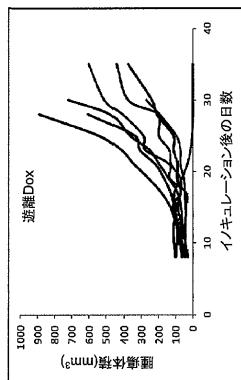
A

【図 3 4 B】

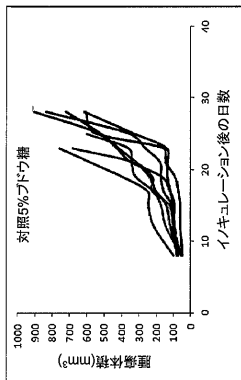


B

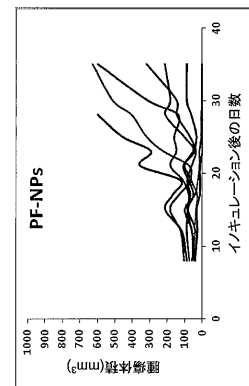
【図 3 5 A】



B

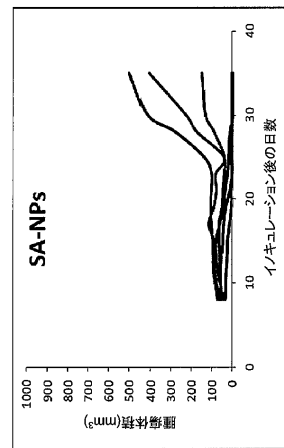


A

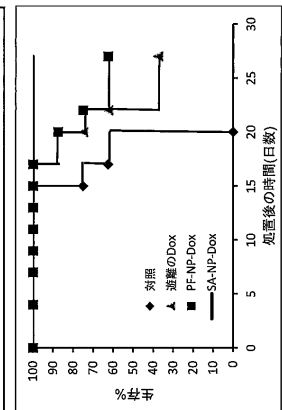


C

【図 3 5 B】

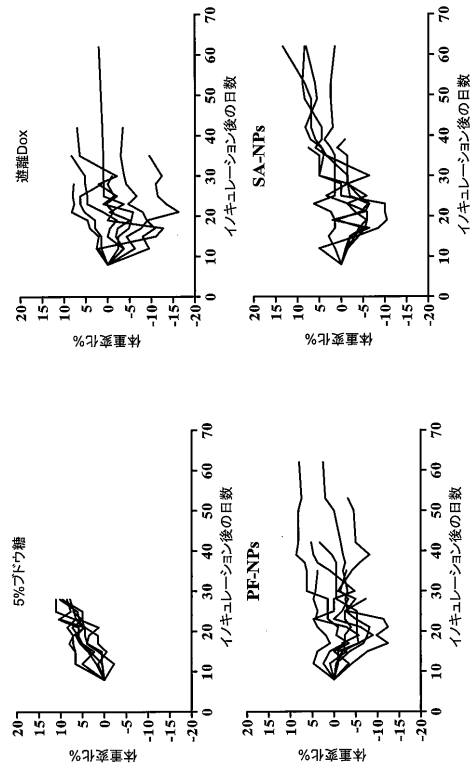


D



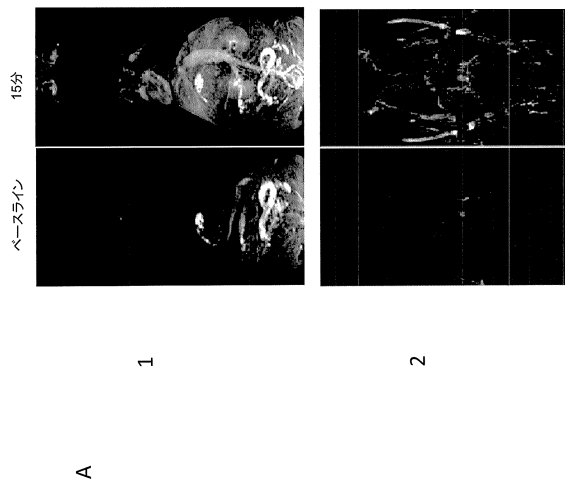
E

【図 3 5 C】



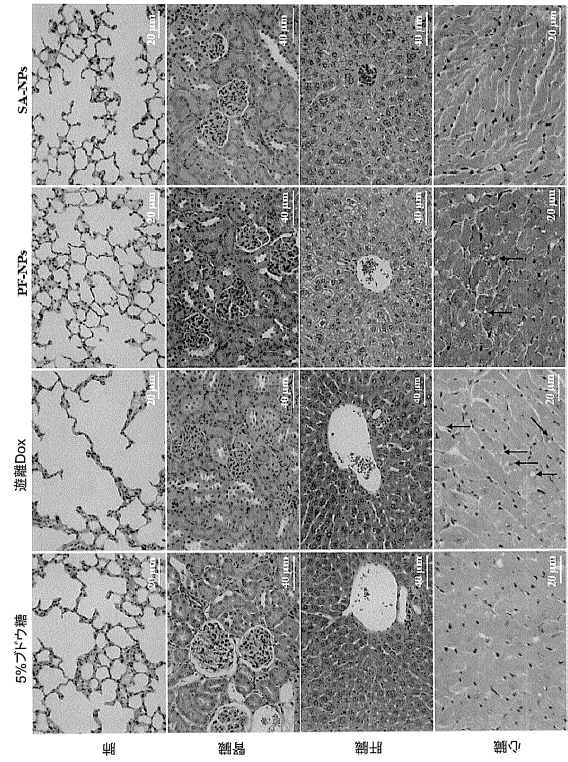
F

【図 3 6 A】



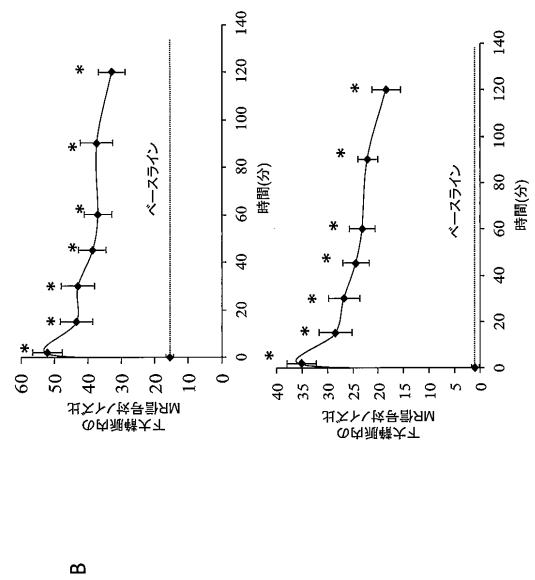
A

【図 3 5 D】



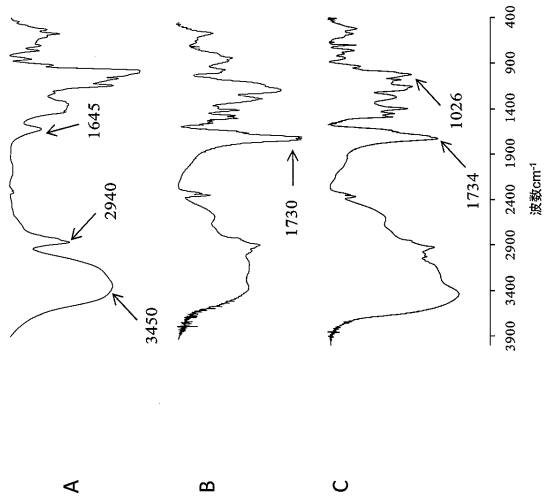
G

【図 3 6 B】

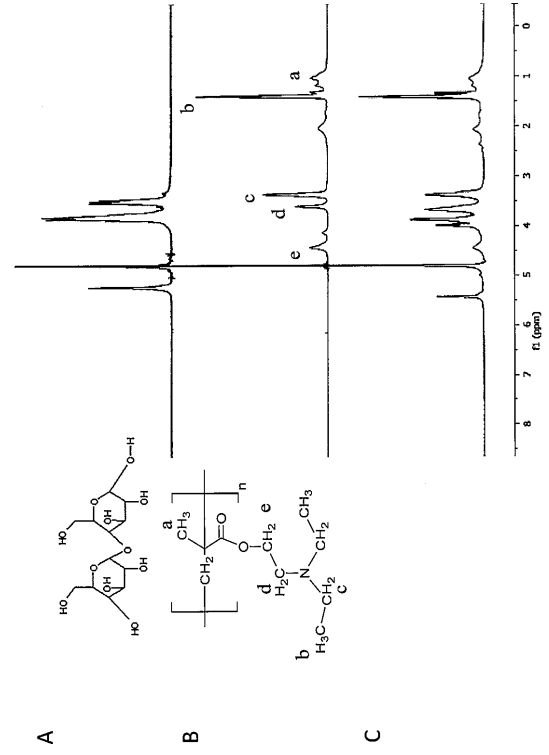


B

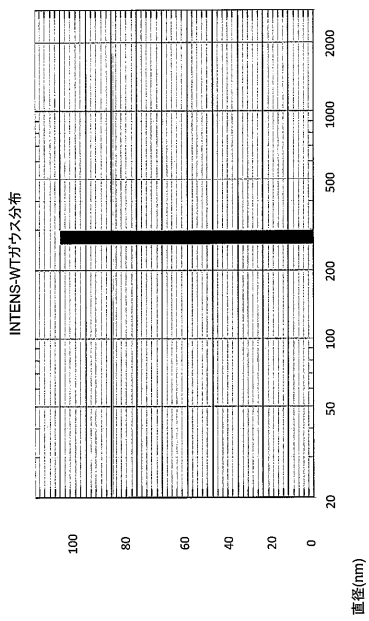
【図 37】



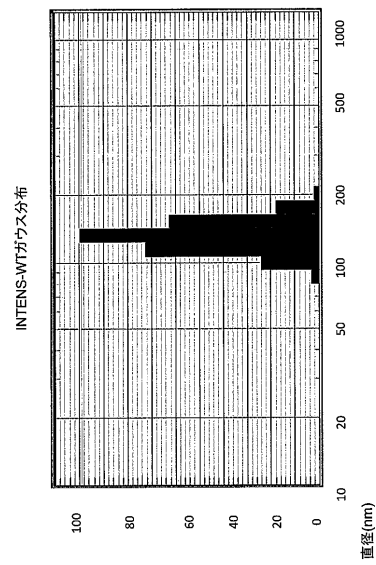
【図 38】



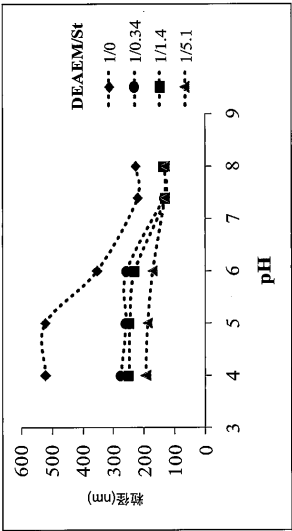
【図 39】



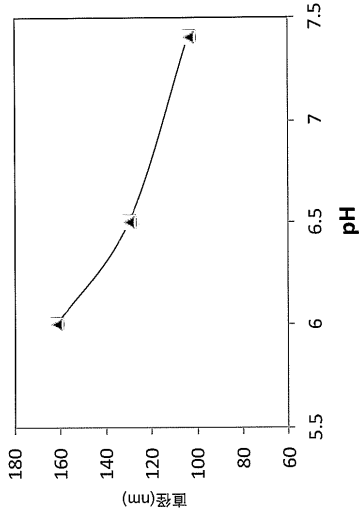
【図 40】



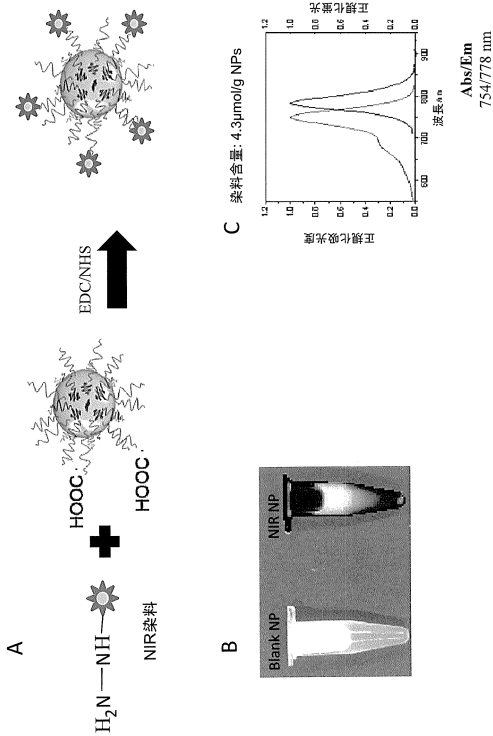
【図 4 1】



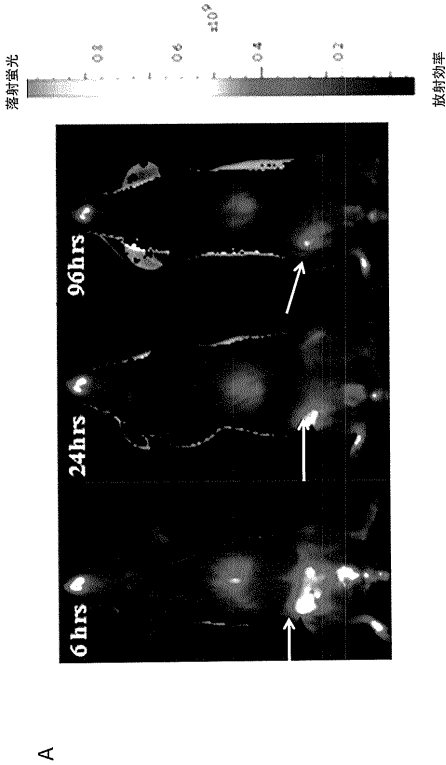
【図 4 2】



【図 4 3】



【図 4 4】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K 31/704	(2006.01)	A 6 1 K 31/704
A 6 1 K 49/00	(2006.01)	A 6 1 K 49/00
C 0 8 F 8/14	(2006.01)	C 0 8 F 8/14
C 0 8 F 8/00	(2006.01)	C 0 8 F 8/00
C 0 8 G 81/00	(2006.01)	C 0 8 G 81/00
C 0 8 L 51/08	(2006.01)	C 0 8 L 51/08

(74)代理人 100169971

弁理士 菊田 尚子

(72)発明者 ウー, シャオ ユー

カナダ国 エム2エヌ 3エックス2 オンタリオ, トロント, キングスデール アベニュー 2
3 4

(72)発明者 シャルヴィリ, アリレザ

カナダ国 エム5ジェイ 2エックス1 オンタリオ, トロント, クイーンズ クウェイ ダブリ
ュ. 2 7 0 2-2 2 8

(72)発明者 ツァイ, ピン

カナダ国 エム3シー 4ジー9 オンタリオ, トロント, レスリー ストリート 6 0 4-1 1
0 5

審査官 小森 勇

(56)参考文献 特開昭6 2-5 3 3 6 6 (J P, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C 0 8 F 2 5 1/0 0
A 6 1 K 9/1 0
A 6 1 K 3 1/7 0 4
A 6 1 K 4 5/0 0
A 6 1 K 4 7/3 4
A 6 1 K 4 7/3 6
A 6 1 K 4 9/0 0
C 0 8 F 8/0 0
C 0 8 F 8/1 4
C 0 8 G 8 1/0 0
C 0 8 L 5 1/0 8