

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6400026号  
(P6400026)

(45) 発行日 平成30年10月3日 (2018. 10. 3)

(24) 登録日 平成30年9月14日 (2018. 9. 14)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 49/14 (2006. 01)

A 6 1 K 49/14 Z N A

A 6 1 K 9/10 (2006. 01)

A 6 1 K 9/10

A 6 1 K 47/42 (2017. 01)

A 6 1 K 47/42

A 6 1 K 47/36 (2006. 01)

A 6 1 K 47/36

A 6 1 K 47/02 (2006. 01)

A 6 1 K 47/02

請求項の数 18 (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-556563 (P2015-556563)  
 (86) (22) 出願日 平成26年1月31日 (2014. 1. 31)  
 (65) 公表番号 特表2016-509007 (P2016-509007A)  
 (43) 公表日 平成28年3月24日 (2016. 3. 24)  
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2014/050265  
 (87) 国際公開番号 W02014/122431  
 (87) 国際公開日 平成26年8月14日 (2014. 8. 14)  
 審査請求日 平成29年1月19日 (2017. 1. 19)  
 (31) 優先権主張番号 1302199. 3  
 (32) 優先日 平成25年2月7日 (2013. 2. 7)  
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

前置審査

(73) 特許権者 515217890  
 オーソペディック リサーチ ユーケー  
 英国, ダブル1ジー 9ディーキュー, ロ  
 ンドン, 10エー チャンドス ストリ  
 ート, ファーロング ハウス  
 (74) 代理人 110000671  
 八田国際特許業務法人  
 (72) 発明者 サンティン, マッテオ  
 英国, ビーエヌ2 4ディーキュー ブラ  
 イトン サセックス, クレイフォード ロ  
 ード 18  
 (72) 発明者 イクル, スティーブン トーマス  
 英国, ビーエヌ2 1 2 ビーエヌ イース  
 トボーン サセックス, ハースト ロード  
 75

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 骨のための生体特異的な薬剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

核磁気共鳴影像法 (MRI) またはコンピューター断層撮影法 (CT) を用いて可視化  
 するための、造影剤のコアを含む骨生体特異的な薬剤であって、

前記造影剤のコアは、ポリマーシェルによって囲まれており、

前記ポリマーシェルは、骨 - 標的ペプチドに共有結合しており、

前記ペプチドは、使用時、骨を標的とし、

前記ペプチドは、破骨細胞 - 破骨細胞相互作用および / または破骨細胞 - 骨芽細胞相互  
 作用を阻害し、

前記ペプチドは、配列番号 1 ~ 15 から選択されたペプチドを含む、骨生体特異的な薬  
 剤。 10

【請求項 2】

前記造影剤のコアの平均直径が 5 nm ~ 30 nm である、請求項 1 に記載の生体特異的  
 な薬剤。

【請求項 3】

前記造影剤のコアが

金属材料を含む；

磁性材料を含み、および MRI 造影剤である；または

鉄、ニッケル、コバルトもしくはジスプロシウムまたは 1 以上のこれらの元素を含む、  
 酸化物もしくは合金のような化合物であり、この際前記造影剤のコアがマグネタイト (F 20

e<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)を含んでもよい、  
請求項 1 または 2 に記載の生体特異的な薬剤。

【請求項 4】

前記造影剤のコアが、非磁性材料を含み、ならびにMRI造影剤およびCT造影剤の両方であり、この際前記造影剤のコアが、ガドリニウム、金、ヨウ素またはボロサルフェート(borosulfate)を含んでもよい、請求項 1 または 2 に記載の生体特異的な薬剤。

【請求項 5】

前記ポリマーシェルの、  
ポリペプチド、荷電タンパク質、多糖または核酸を含む；  
キトサン、コラーゲン、ゼラチン、ヒアルロン酸、ポリ(エチレングリコール)ポリ(乳酸)、ポリ(グルコール酸)、ポリ(ε-カプロラクトン)およびポリ(アクリル酸)を含む生体適合性の天然または合成ポリマーを含む；  
無水コハク酸で誘導体化されている；または  
骨を標的とする、1種または2種以上の骨-標的ペプチドに共有結合している、  
請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の生体特異的な薬剤。

10

【請求項 6】

前記骨-標的ペプチドが、  
例えば骨芽細胞、骨細胞、破骨細胞、骨前駆細胞、破骨前駆細胞または骨ライニング細胞のような、排他的に骨に存在する細胞を標的とする；  
例えばヒドロキシアパタイトのような、骨ミネラル相を標的とする；または  
RANKL-誘導破骨細胞分化および活性を減少または抑制するために、RANKに結合することによりOPGをミミックするアミノ酸配列を含む、  
請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の生体特異的な薬剤。

20

【請求項 7】

前記骨-標的ペプチドが、カルボジイミドの化学的性質を用いて前記ポリマーシェルに共有結合している、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の生体特異的な薬剤。

【請求項 8】

前記生体特異的な薬剤が、前記骨-標的ペプチドの存在により骨へと運ばれる、生体活性化合物を含み、この際前記生体活性化合物が、色素、電気化学メディエータ、タンパク質、ペプチド、化学化合物(例えば、薬)、遺伝物質(例えば、オリゴヌクレオチド、DNA、RNA)、小分子、抗体、または酵素から構成される分子の群から選択されてもよい、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の生体特異的な薬剤。

30

【請求項 9】

前記生体特異的な薬剤の平均直径が1000nm未満である、または100~450nmである、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の生体特異的な薬剤。

【請求項 10】

診断に用いられる、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の骨生体特異的な薬剤。

【請求項 11】

MRI生体標識物としてまたはCT生体標識物として使用される、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の骨生体特異的な薬剤。

40

【請求項 12】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の骨生体特異的な薬剤を含む、生体標識物。

【請求項 13】

MRIまたはCT画像検査法で使用される、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の骨生体特異的な薬剤。

【請求項 14】

治療に用いられる、好ましくは薬剤として用いられる、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の骨生体特異的な薬剤。

【請求項 15】

50

骨疾患を治療する、予防するまたは改善することに用いられる、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の骨生体特異的な薬剤。

【請求項 1 6】

前記骨疾患が、骨吸収、骨腫瘍の治療、パジェット病、変形性関節症、骨粗しょう症、骨肉腫、骨減少症ならびに溶骨性および造骨性の表現型などを含む骨転移を含む、請求項 1 5 に記載の骨生体特異的な薬剤。

【請求項 1 7】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の骨生体特異的な薬剤、および薬学的に許容されるベヒクルを含む、薬剤組成物。

【請求項 1 8】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の治療上有効な量の骨生体特異的な薬剤と、薬学的に許容されるベヒクルとを接触させることを有する、請求項 1 7 に記載の組成物の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、骨のための生体特異的な薬剤、特に骨に対して特異的なペプチドで機能化された、ナノ粒子、サブミクロン粒子および原子または分子要素を含む、骨生体特異的な薬剤に関する。本発明は、特に、核磁気共鳴画像法 (MRI) およびコンピューター断層撮影法 (CT) のような画像診断法におけるこれらの骨生体特異的な薬剤の使用、ならびに骨リモデリング活性の画像化、病理学的な骨の状態および / もしくは骨修復プロセスの検出または治療における前記剤の使用に関する。本発明は、生体特異的な薬剤を用いる骨の疾患および骨病変の診断ならびに / または治療にまで及ぶ。

【背景技術】

【0002】

核磁気共鳴画像法 (MRI) およびコンピューター断層撮影法 (CT) は、組織の画像化に最適な方法である。MRI は、大きな磁場の力に基づき、高含水組織のタンパク質のアラインメントを一時的に変化させる正味の磁気ベクトルを生成する。MRI は主に、脳腫瘍と同様に靱帯、腱および脊髄での損傷の画像化に適している。しかしながら、その技術は、CT によって得ることができる画像化と同じくらい詳細な骨組織の画像化ができない。

【0003】

CT は、検知器によって検知された X 線減衰に基づき、ピクセル値が計算され、次に画像に変換される。定量的コンピューター断層撮影法 (QCT) は、二次元領域の骨密度とは対照的に、骨密度を測定することができ、3 次元での実際の体積 ( $\text{mg} / \text{cm}^3$ ) を測定することができる。これにより、オペレーターは、皮質骨と海綿質骨とを区別することができ、また正確に骨格の経時変化を測定することができる。結果として、QCT は、主に椎体海綿質骨密度検査のために用いられる。QCT は、代謝的に活発で構造的に重要な骨梁を選択的に評価でき、脊椎骨折を区別でき、そして骨損失を測定できる。しかし、QCT は、非常に高額であり、二重エネルギー X 線吸収測定法 (DXA) と比べた際、患者により高用量のイオン化放射線を照射する。

【0004】

造影剤は、画像鮮明度を向上させるため、両方の技術において画像化の改良に不可欠である。組織に対する特異性のない造影剤は、現在、MRI で使用されており、酸化鉄ナノ粒子またはガドリニウムのどちらかに基づいている。しかし、良好な画像化と患者への安全性とを提供するとはいえ、これらの造影剤は、特定の組織および細胞型を認識することができない。さらに、現在の CT 造影剤、例えばヨウ素系化合物は、素早い腎クリアランス、腎臓毒性および血管透過による短い撮像時間を含む、いくつかの制限がある。

【0005】

骨粗しょう症の発症機序は、明確ではないが、データは、破骨細胞の骨吸収活性と骨芽

10

20

30

40

50

細胞の骨形成活性との間の不均衡によって生じることを示している。この不均衡な細胞活動は、臨床的に有意な骨折の起始部である微小破壊の形成の原因となる骨組織の進行性の衰えを引き起こす。疫学研究は、これらの骨折が、椎体、転子下的大腿骨 (sub-throcanteric femoral bone) および手根骨を含む、特定の解剖学的部位で発生しやすいことを示している。不均衡な細胞活動が、ほとんどの骨粗しょう症の症例において重要な役割を果たしているが、骨損失 (すなわち骨減少症) への相対的な寄与は、年齢、性別、骨粗しょう症への遺伝的な性質、運動不足、投薬、健康状態および栄養を含む、多くの異なる要因により変化するのである。一般的に、骨粗しょう症は、原発性 (すなわち老人性) または続発性 (すなわち非加齢性) のどちらかに分類される。

【0006】

10

原発性骨粗しょう症は、さらにⅠ型 (すなわち閉経後) またはⅡ型 (すなわち非加齢性) のいずれかにカテゴライズされる。Ⅰ型骨粗しょう症は、大部分が更年期でのエストロゲン減少により、50～70歳で主に発症し、柱骨に影響を及ぼす。Ⅱ型は、直接的に老化に関連し、通常、70歳以上で発症し、柱骨と皮質骨の両方に影響を及ぼす。しかし、骨密度の変化が年齢に関係なくすべての人で起こることはよく知られている。通常の成長の間、骨形成は、最大骨量 (PBM) に到達する30～35歳までは、骨減少よりも速い。PBMに到達すると、男女共に、かなりの個人差があり、1年あたり0.5～2%の割合で骨の減少が始まる。女性では、閉経がさらに約10年の間、骨の減少の割合を加速させる。

【0007】

20

続発性骨粗しょう症は、健康状態を根底とする合併症またはライフスタイル (例えばアルコール摂取、薬物乱用または質の悪い食生活) のいずれかに起因し、あらゆる年齢の人々に影響を与える。実際に、人生の初期に予測されるよりも低い骨密度の幼児は、骨粗しょう症を発症すると報告されている。続発性骨粗しょう症を引き起こしうる健康状態は、ホルモンの不均衡、関節リウマチ、肝不全、腎不全、正常に機能しない胃腸機能、多発性硬化症、壊血病、神経性無食欲症およびアスリート三主徴症候群を含む。いくつかのケースでは、骨粗しょう症を引き起こす状態ではないが、薬が使用される。健康状態を管理するためのコルチコステロイド、いくつかのホルモン、およびリチウムのような薬剤は、続発性骨粗しょう症の発症とつながっている。一般的に、骨粗しょう症は、男性よりも女性において臨床的優位性がある。

【0008】

30

骨肉腫は、十分に組織化されていない類骨につながる骨芽細胞分化または骨統合性に影響を与える骨成長を特徴とする、最も一般的な原発性肉腫 (発生率: 0.2～3/100,000/年) である。骨肉腫も悪性でありうるが、悪性腫瘍の中での絶対発生率は低い。厳格な組織学的定義では、骨肉腫病変は、組織学的特徴および悪性度において、著しく異なり、その予後は、それらのパラメータだけではなく、その解剖学的部位に依存する。骨肉腫の他の特徴は、不定量の軟骨基質と時として実際の骨生産を支配する繊維組織を生み出す傾向がある。結果として、3つのサブタイプの分類、すなわち造骨性、軟骨簿細胞性および線維芽細胞の骨肉腫がある。骨格組織では、骨肉腫は、通常、長い四肢骨の骨幹端、もっとも一般的には膝周辺で発症し、軸骨格または頭蓋顔面骨でのその存在は、成人で広く観察される。骨に関し、骨肉腫は、骨の内部 (髄内のまたは皮質内の部分)、骨の表面、および骨外性部位で発症するのである。

【0009】

40

骨転移は、造骨性、溶骨性または造骨性および溶骨性両方の表現型により特徴づけられる。異なる悪性腫瘍は、骨向性および骨での最も一般的な転移性沈着である癌での骨に対するより高い親和性を示す。最後に骨に至る一般的な癌は、乳癌、前立腺癌および肺癌を含む。したがって、腫瘍学の分野における重要な課題として広く認められている。骨の時点で、転移細胞は、可溶性媒体の放出を通じてまたは細胞間接触を介してRANKLの発現および放出の増加を含む、造骨性の増殖および活性を増やす。次に、このことは、前破骨細胞の分化とRANKL-RANK相互作用による成熟破骨細胞の活性を盛んにする。

50

破骨細胞による骨吸収は、サイトカインおよび腫瘍細胞に必要である TGF- $\beta$  やインシュリン様成長因子 (IGF) のような他の成長因子を放出し、よって腫瘍の成長を促進し、そのプロセスを持続させる。増加した骨吸収は、X線、濃度測定法およびMRIによって測定可能な溶骨性病変を残す。造骨性転移は、異常な骨形成を増加させ、X線およびMRIで骨の高密度領域として見られる。

#### 【0010】

骨吸収活性化の頻度は、骨吸収段階と骨形成段階での差異よりも、健康な骨と病変した骨との間で変化する。骨活性化の頻度は、骨の表面でのいわゆる骨多細胞ユニット (BMU) の量により特徴づけられ、これは通常の骨よりも骨粗しょう症の骨で多く、増加した破骨細胞および骨格での吸収窩と関連している。骨粗しょう症のような全身性疾患の骨生検での組織学的染色は、診断として用いられるであろうし、染色は、診断や治療に用いられる固体微粒子物質を微視的に局所化できるであろう (すなわち鉄のプルシアンブルー染色)。

10

#### 【0011】

上記観点から、骨関連疾患を診断および/または治療するための新たな方法を提供することの必要性の増加は明らかであろう。

#### 【発明の概要】

#### 【0012】

したがって、本発明の第1の態様によると、核磁気共鳴映像法 (MRI) またはコンピュータ断層撮影法 (CT) を用いて可視化される、造影剤のコアを含み、前記造影剤のコアが、骨-標的ペプチドで機能化された、ポリマーシェルによって囲まれ、前記ペプチドが、使用時、骨への生体特異的な薬剤を標的とする、骨生体特異的な薬剤が提供される。

20

#### 【0013】

本発明の骨生体特異的な薬剤は、以下で詳述する、異なるナノ粒子、サブミクロン粒子および原子または分子要素の範囲の設計、開発ならびに改良に、ならびにMRIまたはCT画像化技術のいずれかでのそれらの使用に基づいている。骨生体特異的な薬剤は、通常の造影剤を含むコアを含み、コアは、骨の細胞 (例えば、骨芽細胞または破骨細胞) または石灰化した骨細胞外マトリクスを特異的に認識できるペプチドで機能化されている。したがって、前記ペプチドは、薬剤を骨病理学での生体認識に対して特異的にする。実施例1~3に記載され、および図5Eに示されているように、本発明者らは、異なる範囲の骨-標的ペプチドがポリマーシェルを機能化するために用いられる一連の異なる骨特異的な薬剤を調製した。コア内の造影剤として用いられる材料、ポリマーシェルを形成するポリマー、および骨特異的な機能化ペプチドの厳選により、骨生体特異的な薬剤がさまざまな骨関連疾患の診断および/または治療のいずれかで使用されうる。よって、生体特異的な薬剤は、骨リモデリング活動の画像化、病態の検出 (例えば、骨吸収または骨腫瘍) および/または骨折もしくは外科的介入後の組織修復過程で用いられるであろう。有利には、本発明の生体特異的な薬剤は、骨リモデリングに必須である病変した骨の要素と特異的に接触するために設計され、低侵襲性初期診断および/または骨疾患の治療のための注入材料として注意深く調製されうる。

30

40

#### 【0014】

好ましくは、造影剤は、外側のポリマーシェルで覆われた本発明の骨生体特異的な薬剤の内側のコアを形成または構成する。造影剤コアの平均直径は、5 nm ~ 30 nm、または10 nm ~ 20 nmであろう。

#### 【0015】

MRIまたはCTを用いて可視化される、造影剤コアは、金属または非金属材料を含むことができる。造影剤コアは、磁性または非磁性材料を含むことができる。造影剤が磁性である形態では、MRI造影剤を含みうる。造影剤は、常磁性または超常磁性材料を含むことができる。例えば、造影剤コアは、鉄、ニッケル、コバルトもしくはジスプロシウムまたは1以上のこれらの元素を含む、酸化物もしくは合金のような化合物を含むことがで

50

きる。好ましくは、造影剤は、マグネタイト ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) を含む。

#### 【0016】

造影剤材料は非磁性である形態では、MRIおよびCT造影剤の両方を含むことができる。例えば、造影剤コアは、ガドリニウム、金、ヨウ素またはホウ硫酸塩 ( $\text{boro-sulphate}$ ) を含むことができる。これらの材料のそれぞれは、MRI造影剤またはCT造影剤のいずれかとして用いることができる。好ましくは、造影剤は、ガドリニウムを含む。

#### 【0017】

骨生体特異的な薬剤のポリマーシェルは、ポリマーを含むことができ、ポリマーは、ポリペプチド、帯電したタンパク質、多糖または核酸を含むであろう。適切なポリマーは、制限されないが、キトサン、コラーゲン、ゼラチン、ヒアルロン酸、ポリ(エチレングリコール)ポリ(乳酸)、ポリ(グリコール酸)、ポリ( $\alpha$ -カプロラクトン)およびポリ(アクリル酸)を含む、任意の生体適合性の天然または合成ポリマーを含むことができる。ポリマーシェルのための好ましいポリマーは、キトサンを含むであろう。キトサンは、ランダムに分布した  $\alpha$ -(1-4)-結合D-グルコサミン(脱アセチル化( $\text{deacetylated}$ )ユニット)およびN-アセチル-D-グルコサミン(アセチル化ユニット)を含む鎖状多糖として知られている。

#### 【0018】

ポリマーシェルは、ポリマーおよび造影剤コア表面の化学的性質に応じて、物理吸着または共有結合によって造影剤に結合している。骨-標的ペプチドとの効率の良い機能化を可能にするために、ポリマーシェルを誘導体化することが好ましいであろう。例えば、ポリマーシェルは、ポリマーを無水コハク酸と反応させることで誘導体化されうる。このことは、立体障害を減少させるであろう、ポリマーと骨-標的ペプチドとの間のスペースを提供するために行われうる。また、使用されるポリマー(例えば、キトサン)の溶解度および生理的pHを改善するであろう。無水コハク酸はまた、ジヒドロ-2,5-フランジオンとして知られており、分子式 $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_3$ である。ポリマー、例えば、キトサンを無水コハク酸で誘導体化しうる方法は、当業者に知られているであろうし、実施例1にも記載される。

#### 【0019】

ポリマーシェルに結合する骨-標的ペプチドの量は、官能基の量、使用するポリマーの種類および結合の化学的性質に依存する。好ましくは、前記ペプチドは、ポリマーシェルの外表面を覆うように相隔たる配列で並べられる。ポリマーシェルは、骨生体特異的な薬剤を骨への標的とする、骨-標的ペプチドの1種類(すなわち、同じ配列)で機能化されるであろう。しかし、前記シェルは、2種類以上(すなわち、異なる配列を有する)の骨-標的ペプチドで機能化されうる。

#### 【0020】

例えば、骨-標的ペプチドは、骨生体特異的な薬剤を骨に排他的に存在する細胞、例えば、骨芽細胞、破骨細胞、骨前駆細胞、破骨前駆細胞または骨ライニング細胞への標的とするであろう。好ましくは、骨-標的ペプチドは、骨生体特異的な薬剤を骨芽細胞または破骨細胞への標的とする。骨芽細胞および破骨細胞間ならびに骨芽細胞および破骨細胞内細胞間情報伝達に対し特異的であるギャップ結合情報伝達(例えば、コネクシン43、 $\text{cx}43$ )をミミックできる配列を有するペプチドはまた、骨-標的ペプチドとして用いられるであろう。さらに、骨-標的ペプチドは、骨生体特異的な薬剤を骨ミネラル相、すなわちヒドロキシアパタイトへ導くことができる。したがって、ヒドロキシアパタイト-標的ペプチドを含む骨生体特異的な薬剤は、衝撃的な出来事に続くまたは骨粗しょう症のような疾患の進行の間の形成する骨組織のミネラル化をモニターするための有益なツールである。

#### 【0021】

パジェット病のような骨リモデリングサイクルおよび海綿骨転移癌に関連した多くのヒト骨疾患は、オステオプロテゲリン( $\text{osteoprotegerin}$ )(OPG)とR

10

20

30

40

50

ANKLとの間の不均衡を示している。したがって、本発明者らは、RANK-RANKL-OPG経路および関連経路が代謝性骨疾患の治療用や診断用である費用効率の高い、生体特異性材料を開発するのに役立つであろうと考えている。

【0022】

したがって、骨-標的ペプチドは、ギャップ結合細胞間情報伝達(GJIC)およびRANK-RANKL-OPGトライアド経路に関連しうる。本発明の骨生体特異的な薬剤がRANK-RANKLに特異的であるという事実は、検体内の細胞を同定し、標的とするであろうことを意味する。骨肉腫や骨疾患のような疾患では、腫瘍は、X線やMRIにより特定されるであろうし、骨生体特異的な薬剤は、シグナルを強めることができ、他では検出できないであろうより小さな病変を可視化しうる分解能を改善できる。

10

【0023】

骨-標的ペプチドは、RANKL-誘導破骨細胞分化および活性を減少または抑制するために、RANKに結合することによりOPGをミミックするアミノ酸配列を含むであろう。あるいは、骨標的ペプチドは、破骨細胞-破骨細胞相互作用およびまたは破骨細胞-骨芽細胞相互作用の阻害に関与するConnexin43のようなタンパク質をミミックすることができるであろう。骨-標的ペプチドはまた、移動する骨芽細胞または骨のミネラル相(例えば、ヒドロキシアパタイト)を認識するのに用いられうる。したがって、骨-標的ペプチドは、下記のアミノ酸配列の一つを含むであろう。

【0024】

(a)SRPTEKTIFFII(SEQ ID No. 1)。このペプチドは、Connexin43ミミックペプチド(Cx43)Gap27に由来し、破骨細胞-破骨細胞相互作用および/または破骨細胞-骨芽細胞相互作用を阻害するために用いられうる。このペプチドは、本明細書で言及する際、GAP27pとする。既知の配列であり、骨芽細胞-破骨細胞接触依存性細胞情報伝達を阻害する。

20

【0025】

(b)YCLEIEFCY(SEQ ID No. 2)。このペプチドは、OPG残存113-122(これは、OPGのアミノ酸配列を表し、アミノ酸113~122により同定されたタンパク質の部位に由来する)に基づき、特異的にRANKに結合し、RANKL-誘導破骨細胞分化および活性を阻害する。このペプチドは、本明細書で言及する際、OP3-1とする。

30

【0026】

(c)YCEIEFCYLIR(SEQ ID No. 3)。このペプチドは、OPG残存113~122に基づき、特異的にRANKに結合し、RANKL-誘導破骨細胞分化および活性を阻害する。このペプチドは、本明細書で言及する際、OP3-4とする。

【0027】

(d)FHRRIKA(SEQ ID No. 4)。このペプチドは、特異的に骨芽細胞に結合し、移動を促進する。

【0028】

(e)PSHRN(SEQ ID No. 5)。このペプチドもまた、特異的に骨芽細胞に結合する。

40

【0029】

(f)YIGSR(SEQ ID No. 6)。このペプチドは、特異的に骨内皮細胞に結合する。

【0030】

(g)STLPIPHFSRE(SEQ ID No. 7)。このペプチドは、ヒドロキシアパタイトに高い親和性を有する。

【0031】

(h)VTKHLNQISQSY(SEQ ID No. 8)。このペプチドもまた、ヒドロキシアパタイトに高い親和性を有する。

【0032】

50

本発明者らは、いくつかの形態において、ポリマーシェルへ骨 - 標的ペプチドを結合するためにCペプチドまたはスペーサーペプチド、好ましくはそれらの誘導体化した形態（例えば、コハク酸との）を用いることが好ましいことを見出した。かかるCペプチドは、溶液中での改善した溶解性を示し、したがって、ペプチドの薬剤へのグラフト工程を促進し、その後バイオリガンドの細胞への提示を改善する。

【0033】

一つの実施形態では、用いられるであろう適切なCペプチドは、アミノ酸配列K - (KK)を含むであろう。このペプチドは、本明細書で言及する際、SEQ ID No. 9またはG1PLとする。このペプチドは、極性分子であり、よって溶解性と到達性を改善する。

10

【0034】

他の実施形態では、Cペプチドは、アミノ酸配列K - (KK) - (KKKK)を含むであろう。このペプチドは、本明細書で言及する際、SEQ ID No. 10またはG2PLとする。

【0035】

さらに他の実施形態では、Cペプチドは、アミノ酸配列K - (KK) - (KKKK) - (KKKKKKKK)を含むであろう。このペプチドは、本明細書で言及する際、SEQ ID No. 11またはG3PLとする。

【0036】

したがって、骨 - 標的ペプチドは、SEQ ID No. 9 ~ 11、もしくは機能的変異体またはそのフラグメントのいずれかを含むであろう。例えば、SEQ ID No. 1 ~ 8としたペプチドのいずれかは、SEQ ID No. 9 ~ 11と結合されるであろう。したがって、他の実施形態では、骨 - 標的ペプチドは、下記のアミノ酸配列、もしくは機能的フラグメントまたはそれらの変異体を含むであろう：

20

(i) (KKKK) - (KK) - K - YCLEIEFCY (SEQ ID No. 12)。このペプチドは、CペプチドG2PL（すなわち、SEQ ID No. 10）に係留したOP3 - 1ペプチド（すなわち、SEQ ID No. 2）を含むであろう。このペプチドは、本明細書で言及する際、G2PL - OP3 - 1とする。

【0037】

本発明者らはまた、骨 - 標的ペプチドは、1, 4, 7, 10 - テトラアザシクロドデカン - 1, 4, 7, 10 - テトラ酢酸（すなわち、DOTA）を含みうることを示している。それは、ガドテル酸を含み、キレート剤として有機酸「DOTA」からなる、大環状構造のGd系MRI造影剤である。したがって、他の実施形態では、骨 - 標的ペプチドは、下記のアミノ酸配列、もしくは機能的フラグメントまたはそれらの変異体を含むであろう：

30

(j) DOTA - KGG - YCLEIEFCYLIR (SEQ ID No. 13)。MRI可視化Gd<sup>3+</sup>のキレート化のための新規のDOTA - 係留OP3 - 4ペプチドである。このペプチドは、本明細書で言及する際、DOTA - OP3 - 4とする。

【0038】

(k) DOTA - Gd - KGG - YCLEIEFCYLIR (SEQ ID No. 14)。このペプチドは、Gd<sup>3+</sup>キレートを含む新規のMRI - 検出OP3 - 4誘導体である。このペプチドは、本明細書で言及する際、DOTA - Gd - OP3 - 4とする。

40

【0039】

(l) DOTA - Gd - FHRRIRKA (SEQ ID No. 15)。このペプチドは、Gd<sup>3+</sup>キレートを含む新規のMRI - 検出骨芽細胞移動誘導体である。このペプチドは、本明細書で言及する際、DOTA - Gd - FHRRIRKAとする。

【0040】

DOTA分子は、かなり大きく、非常に酸性で反応性が高く、そしてこの分子は、骨 - 標的ペプチドの効力を損なうことを避けるためにスペーサーペプチドまたはCペプチドのユーザーを必要とするであろう。

50



## 【 0 0 4 1 】

実施例で記載するように、骨 - 標的ペプチドは、既知の方法で合成され得、例えば、通常の 9 - フルオレニルメチルオキシカルボニル ( F m o c ) 保護 / 脱保護戦略を用いる固相ペプチド合成 ( S P P S ) である。

## 【 0 0 4 2 】

骨 - 標的ペプチドは、環化されるであろう。環化形態は、より化学的に安定であり、改善された活性を報告するものがあり ( S h i n J e t a l 2 0 0 8 参照 )、例えばジメチルスルホキシド ( D M S O ) 酸化によりシステイン - システインジスルフィド結合を形成する。

## 【 0 0 4 3 】

骨 - 標的ペプチドは、共有結合により骨生体特異的な薬剤のポリマーシェルの結合しているであろう。好ましくは、ポリマーシェルは、例えば無水コハク酸を用いて、誘導化されうる、キトサンを含む。一つの形態において、前記ペプチドは、本発明のナノ粒子を製作するためにカルボキシジイミドの化学作用を用いてポリマーシェルと共有結合しているであろう。

## 【 0 0 4 4 】

骨生体特異的な薬剤は、骨 - 標的ペプチドの存在により骨へと運ばれうる、生物活性化化合物を含む。例えば、生物活性化化合物は、色素、電気化学メディエータ、タンパク質、ペプチド、化学化合物 ( 例えば、薬 )、遺伝物質 ( 例えば、オリゴヌクレオチド、DNA、RNA )、小分子、抗体、または酵素からなる分子の群から選択されうる。生物活性化化合物は、骨生体特異的な薬剤に結合され、例えば架橋時のカプセル化、吸収、イオンチャネル型相互作用または直接にポリマーコーティングの共有結合によるであろう。

## 【 0 0 4 5 】

一つの形態では、骨生体特異的な薬剤は、ナノ粒子を含むであろう。他の形態では、骨生体特異的な薬剤は、サブミクロン粒子を含むであろう。ナノ粒子は、実質的に球状でありうる。

## 【 0 0 4 6 】

生体特異的な薬剤の平均直径は、サブミクロン、すなわち 1 0 0 0 n m 未満でありうる。生体特異的な薬剤の平均直径は、1 0 0 ~ 4 5 0 n m でありうる。

## 【 0 0 4 7 】

骨生体特異的な薬剤は、まずイオンチャネル型の架橋工程を行い、次に所定の濃度のポリマーおよび架橋剤を溶解することにより生産されるであろう。内部造影剤コアは、混合物に添加されるであろう。ポリマーは、造影剤を含む溶液に溶解されるであろう ( 例えば、連続攪拌中の液滴 )。混合物は、反応させることができるであろう ( 例えば、少なくとも 3 0 分 )。混合物は、その後、遠心分離され、得られた粒子 ( つまり、生体特異的な薬剤 ) は、適切な溶媒 ( 例えば、エタノールまたは水 ) にて回収されるであろう。粒子は、保存のために凍結乾燥するおよび / または特性を明らかにされるであろう。C ペプチド ( またはスパーサー ) は、例えば開環反応を行うため、例えば無水コハク酸の場合に、加えられるであろう。最後に、骨 - 標的ペプチドは、例えばカルボキシジイミドの化学作用を用いて、加えられるであろう。

## 【 0 0 4 8 】

実施例 4 に記載されているように、本発明者らは、本発明の骨生体特異的な薬剤が、用いられる造影剤の材料によって、MRI または CT 画像化技術にて効果的に使用されうることを明らかにしている。

## 【 0 0 4 9 】

したがって、第 2 の態様では、診断に用いるための、第 1 の態様の骨生体特異的な薬剤を提供する。

## 【 0 0 5 0 】

骨生体特異的な薬剤が、さまざまな異なる生物学的な画像処理アプリケーションでバイオセンサーとして用いられうることは明らかであるだろう。例えば、生体特異的な薬剤は

10

20

30

40

50

、好ましくは、生体標識として、MRIまたはCT画像化技術にて用いられる。

【0051】

したがって、第3の態様では、MRI生体標識として、またはCT生体標識として、第1の態様の骨生体特異的な薬剤の使用を提供する。

【0052】

第4の態様では、第1の態様の骨生体特異的な薬剤を含む生体標識を提供する。

【0053】

生体標識は、MRIまたはCT画像検査で使用されうる。

【0054】

第5の態様では、第1の態様の骨生体特異的な薬剤の使用を含むMRIまたはCT画像検査法を提供する。

10

【0055】

本発明者らは、骨生体特異的な薬剤が骨リモデリング活性の画像化、病態の検出（例えば骨吸収、骨腫瘍、骨粗しょう症など）および/または骨折後の骨組織修復過程で用いられうることを明らかにしている。さらに、骨特異的な薬剤の強力な骨-標的タンパク質を利用できるさまざまな画像化技術に加えて、実施例5はまた、どのように本発明の骨生体特異的な薬剤を破骨細胞形成および破骨細胞の活性化を抑制するために効果的に使用できるかについて明らかにしている。したがって、本発明者らは、骨生体特異的な薬剤が骨疾患の治療のためのさまざまな治療用途に用いられうると考えている。

【0056】

20

したがって、第6の態様では、治療に用いられ、好ましくは薬剤としての第1の態様の骨生体特異的な薬剤を提供する。

【0057】

本発明の骨生体特異的な薬剤は、骨疾患を予防するまたは治療するために特に有益である。

【0058】

したがって、第7の態様では、骨疾患を治療する、予防するまたは改善することに用いられる、第1の態様の骨生体特異的な薬剤を提供する。

【0059】

第8の態様では、骨疾患を治療する、予防するまたは改善する方法が提供され、前記方法は、かかる治療を必要とする患者に対し、治療上有効な量の第1の態様の骨生体特異的な薬剤を投与することを含む。

30

【0060】

治療されうる骨疾患の例は、骨吸収、骨腫瘍の治療、パジェット病、変形性関節症、骨粗しょう症、骨肉腫、骨減少症ならびに溶骨性および造骨性の表現型などを含む骨転移を含む

本発明の骨生体特異的な薬剤が、単剤治療で用いられうる、薬剤として使用されうるとは明らかであるだろう。また、本発明の薬剤は、添加物として、もしくはそれらの組み合わせとしてまたは骨疾患を治療するための既知の治療との組み合わせとして用いられるであろう。

40

【0061】

本発明の生体特異的な薬剤は、特に、組成物が使用される方法に応じて、多くの異なる形態を有する組成物と組み合わせられるであろう。したがって、例えば、組成物は、粉、粉懸濁液、タブレット、カプセル、液体、ゲル、ヒドロゲル、エアロゾル、スプレー、ミセル溶液の形態、または治療を必要とするヒトもしくは動物に投与されうるその他の適切な形態であろう。本発明の薬剤のベヒクルが、投与される被験者に良好な耐容性を示すものであるべきことは明らかであろう。

【0062】

本発明の生体特異的な薬剤を含む薬剤はまた、持続放出性または遅延放出性デバイスに含有されるであろう。デバイスは、少なくとも治療部位に隣接して設置されるであろう。

50

かかるデバイスは、本発明の生体特異的な薬剤での長期治療が必要とされるときに、通常頻繁な投与（例えば、少なくとも連日投与）を必要とするときに、特に有効であろう。

【0063】

好ましい形態として、本発明の生体特異的な薬剤および本発明の組成物は、被験者に対し、血流に注入または治療を必要とする部位、すなわち骨へと直接注入することで投与されるであろう。注入は、静脈に（ボラス投与もしくは点滴）もしくは皮下に（ボラス投与もしくは点滴）、または皮内に（ボラス投与もしくは点滴）もしくは骨内にされうる。

【0064】

必要とされる本発明の生体特異的な薬剤の量は、その生物活性およびバイオアベイラビリティにより決定され、それぞれ投与方法、薬剤の物理化学的性質および単剤療法または併用療法のいずれかで用いられるかに依存することは明らかであろう。投与頻度はまた、治療される被験者での薬剤の半減期に影響されるであろう。投与される最適用量は、当業者によって決定されるであろうし、使用する特定の薬剤、薬剤組成物の強さ、投与方法および診断もしくは治療される疾患の進行で変わるであろう。治療される特定の被験者によって決まる追加の要素は、被験者の年齢、体重、性別、食習慣、および投与時期を含む、投与量の調整を必要とするであろう。

【0065】

一般的に、生体特異的な薬剤の体重あたり  $0.01 \mu\text{g} / \text{kg}$  から体重あたり  $0.5 \text{g} / \text{kg}$  の1日用量が、骨疾患の治療、改善、または予防のために用いられるであろう。

【0066】

本発明の薬剤は、疾患の発症前、発症中または発症後に投与されうる。1日用量は、単回投与（例えば、1日1回の注入）で与えられるであろう。また、薬剤は、1日あたり2回以上の投与を必要とするであろう。例として、薬剤は、 $25 \text{mg}$  から  $7000 \text{mg}$ （すなわち、体重  $70 \text{kg}$  と仮定して）の1日2回（または治療される骨疾患の重症度によりそれ以上）投与されるであろう。治療を受ける患者は、目が覚めたときに1回目、その後夜に2回目の投与またはその後3～4時間おきに投与されるであろう。または、持続放出性デバイスは、反復投与をする必要なしに患者へ薬剤の適量を与えるために用いられうる。

【0067】

製薬産業で通常用いられているような、既知の手段（例えば、インビボ実験、臨床試験など）は、生体特異的な薬剤を含む特定の製剤を製造および正確な治療計画（例えば、薬剤の1日投与量や投与頻度）を作成するために用いられるであろう。

【0068】

したがって、本発明の第9の態様では、第1の態様の骨生体特異的な薬剤、および薬学的に許容されるベヒクルを含む、薬剤組成物を提供する。

【0069】

本発明はまた、第10の態様として、第1の態様の治療上有効な量の骨生体特異的な薬剤と、薬学的に許容されるベヒクルとを接触させることを含む、第9の態様の組成物の製造方法を提供する。

【0070】

「被験者」は、脊椎動物、哺乳類、または家畜でありうる。したがって、本発明の組成物および薬剤は、いかなる哺乳類、例えば、家畜（例えば、馬）、ペットを治療するために用いられるであろうし、または他の獣医用外用薬で用いられるであろう。しかし、もっとも好ましくは、被験者はヒトである。

【0071】

生体特異的な薬剤の「治療上有効な量」は、被験者に投与される際、骨疾患を治療する、または所望の効果をもたらすために必要とされる薬剤または薬物の量であるいかなる量をいう。例えば、用いられる薬剤の治療上有効な量は、約  $0.01 \text{mg}$  ～ 約  $800 \text{mg}$  でありうる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 2 】

本明細書において「薬学的に許容されるベヒクル」とは、薬剤組成物を製剤化するのに有用であると当業者に知られているいかなる既知の化合物または既知の化合物の組み合わせをいう。

## 【 0 0 7 3 】

一つの実施形態では、薬学的に許容されるベヒクルは、固体であり、組成物は、粉またはタブレットの形態でありうる。固体の薬学的に許容されるベヒクルは、香味剤、潤滑剤、可溶化剤、懸濁化剤、染料、賦形剤、流動促進剤、圧縮補助剤、不活性バインダ、甘味料、防腐剤、染料、コーティング、またはタブレット - 崩壊剤となりうる 1 以上の物質を含むであろう。ベヒクルはまた、封入材料でありうる。粉において、ベヒクルは、本発明の微粉化した活性薬剤と混合する微細化した固体である。タブレットにおいて、活性薬剤（例えば、生体特異的な薬剤）は、適切な割合で必要な圧縮特性を有するベヒクルと混合され、所望の形やサイズに圧縮されるであろう。粉およびタブレットは、好ましくは、カプセルまたはセルの 99% まで含む。適切な固体のベヒクルは、例えば、リン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、タルク、糖、ラクトース、デキストリン、スターチ、ゼラチン、セルロース、ポリビニルピロリジン、低融点ワックスおよびイオン交換樹脂を含む。他の実施形態では、薬剤ベヒクルは、ゲルであり、組成物はクリームなどの形態でありうる。

10

## 【 0 0 7 4 】

しかし、薬剤ベヒクルは、液体であり得、薬剤組成物は、溶液の形態である。液体ベヒクルは、溶液、懸濁液、エマルジョン、シロップ、エリキシル剤および加圧組成物を調製するのに用いられる。本発明の薬剤は、水、有機溶媒、薬学的に許容される油もしくは脂またはそれらの両方のような薬学的に許容されるベヒクルに溶解または懸濁されうる。液体ベヒクルは、可溶化剤、乳化剤、バッファ、防腐剤、甘味料、香味剤、懸濁化剤、増粘剤、染料、粘度調節剤、安定剤または浸透圧調節剤のような他の適切な医薬品添加物を含むことができる。経口および非経口投与のための液体ベヒクルの適切な例は、水（部分的に上記の添加物、例えばセルロース誘導体、好ましくは、カルボキシメチルセルロースナトリウム液）、アルコール（一価アルコールおよび多価アルコール、例えばグリコールを含む）およびそれらの誘導体、ならびに油（例えば、分別されたココナッツ油およびラッカセイ油）を含む。

20

30

## 【 0 0 7 5 】

非経口投与のために、ベヒクルはまた、オレイン酸エチルやミリスチン酸イソプロピルのような油性エステルでありうる。滅菌液体ベヒクルは、非経口投与のための滅菌液体形態組成物において有用である。

## 【 0 0 7 6 】

滅菌溶液または懸濁液である、液体薬剤組成物は、例えば、筋肉、くも膜下、硬膜外、腹腔内、静脈内および特に皮下注入に利用されうる。薬剤は、滅菌水、生理食塩水、または他の適切な滅菌の注入可能媒体を用いて投与時に溶解または懸濁されるであろう滅菌固体組成物として調製されうる。

## 【 0 0 7 7 】

本発明の生体特異的な薬剤および薬剤組成物は、他の溶質または懸濁化剤（例えば、溶液を等張にするのに十分な生理食塩水またはグルコース）、胆汁塩、アカシア、ゼラチン、モノオレイン酸ソルビタン、ポリソルベート 80（エチレンオキシドと共重合したソルビトールおよびその無水物のオレイン酸エステル）などを含む滅菌溶液または懸濁液の形態で経口投与されうる。本発明の生体特異的な薬剤はまた、液体または固体組成物形態のいずれかで経口投与されうる。経口投与に適した組成物は、錠剤、カプセル、顆粒、タブレット、および粉などの固体形態、ならびに溶液、シロップ、エリキシル剤、および懸濁液のような液体形態を含む。非経口投与に有用な形態は、滅菌溶液、エマルジョン、および懸濁液を含む。

40

## 【 0 0 7 8 】

50

本明細書に記載されたすべての特徴、および／または開示されたいかなる方法もしくはプロセスのすべての工程は、少なくともいくつかのかかる特徴および／または工程が互いに排他的である組み合わせを除き、いかなる組み合わせにおける上記のいかなる態様と組み合わせられうる。

【0079】

本発明のよりよい理解のため、およびその実施形態がどのような効果を奏するのかを示すために、例として、添付の図面が参照される。

【図面の簡単な説明】

【0080】

【図1】図1は、コハク酸誘導体化キトサン (S u c - C h i) を生成するための無水コハク酸によるキトサン (C S) 誘導体化反応のスキームを示す。

10

【図2】図2は、非誘導体化キトサン (C S、A) および誘導体化キトサン (S u c - C h i、B) のNMRデータを示す。(B)の垂直矢印は、非修飾C Sに存在するピークの消失を示す。

【図3】図3は、非誘導体化C Sと比較した、s u c - c h iにおける無水コハク酸でのC Sの誘導体化の度合いを示す。

【図4】図4は、S u c - C h iでのC S誘導体化および次のアミノ酸配列Y C E I E F C Y L I Rを有するO P 3 - 4ペプチドでのその機能化のF T I Rスペクトルを示す。

【図5】図5Aは、動的光散乱法 (D L S) 分析 (AおよびB) およびC Sビーズ (AおよびC) の走査型電子顕微鏡 (S E M) (CおよびD) ならびに本発明の生体特異的造影剤ナノ粒子の一形態を示す。図5Eは、本発明のナノ粒子の一形態の略図である。

20

【図6-1】図6は、ろ過工程ありおよびなしにおけるナノ粒子サイズでのキトサン濃度の影響を示す。(A) 150分子量、(B) 400分子量。

【図6-2】図6は、ろ過工程ありおよびなしにおけるナノ粒子サイズでのキトサン濃度の影響を示す。(C) 600分子量、(D) 異なる分子量のC h (n = 4) での濃度依存性。

【図7】図7は、D O T A - O P 3 - 4の代表的な構造を示し、すなわち骨細胞で発現したサイトカインを特異的に標的とする、O P Gミミックペプチド (O P 3 - 4) と、造影剤としてガドリニウム ( $G d^{3+}$ ) のような複数の金属イオンをキレートするために用いられうる、D O T Aとの結合の結果を示す。

30

【図8】図8は、D O T A - O P 3 - 4の集合の略図である。数字の矢印は、集合の順番を示す。

【図9】図9は、D O T A - O P 3 - 4のイオントラップM Sスペクトルを示す。

【図10】図10は、G 2 P L - O P 3 - 1の集合の略図である。数字の矢印は、集合の順番を示す。

【図11】図11は、G 2 P L - O P 3 - 1のイオントラップM Sスペクトルを示す。

【図12】図12は、ナノ粒子でのおよびナノ粒子 - D O T A - G d - O P 3 - 4複合体でのO P 3 - 4ペプチドのアミノ酸分析を示す。

【図13】図13は、D O T A - G d - O P 3 - 4複合体、ならびにネガティブコントロールのD O T A - O P 3 - 4複合体およびP B SのM R I分析を示す。

40

【図14】図14は、0.4  $\mu g / ml$  での磁性ナノ粒子 - O P 3 - 4複合体 (m S C B)、ナノ粒子 - D O T A - G d - O P 3 - 4複体のM R I分析を示す。リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) をネガティブコントロールとして用いた。ガドリニウム系および磁性ビーズ系造影剤は、それぞれ典型的な明暗画像を提供する。

【図15】図15は、r h R N A K L誘導破骨細胞形成へのペプチドの影響を示す。モノサイトは、濃度が100  $\mu M$  のペプチドを加えた M E M培地で6日間培養した。r h R N A K L濃度は、50  $ng / ml$  であり、r h M - C S F濃度は、25  $ng / ml$  であり、r h O P Gは、50  $ng / ml$  であった。それぞれの用量の培地は、3日後に交換された。

【図16】図16は、r h R N A K L誘導破骨細胞形成へのペプチド係留ナノ粒子の影

50

響を示す。モノサイトは、ペプチド (100  $\mu$ M) およびビーズ (25  $\mu$ g/ml) を加えた MEM 培地で 6 日間培養した。rh R N A K L 濃度は、50 ng/ml であり、rh M - C S F 濃度は、25 ng/ml であり、rh O P G は、50 ng/ml であった。それぞれの用量の培地は、3 日後に交換された。

【図 17】図 17 は、ローダミン - ファロイジンおよび H o e s c h t 33258 二重染色を用いた F - アクチン環形成の分析により決定されたモノサイトモノカルチャーでの rh R N A K L 誘導破骨細胞活性の阻害を示す。

【図 18】図 18 は、骨スライスでの培養された細胞の代表的な S E M 顕微鏡写真である。(A) 未処理細胞 (B) M - C S F のみ (C ~ D) M - C S F + rh R A N K (E ~ F) 代表的な吸収窩 (G ~ H) O P 3 - 4 ペプチドおよび係留造影剤で処理した細胞。

10

#### 【実施例】

##### 【0081】

###### 実施例

本発明者らは、改善した装置および診断 (例えば、MRI または CT 画像化のいずれかによる) または骨関連疾患の治療のための方法を提供することに関心を有していた。したがって、本発明者らは、図 5 E で示す、骨の細胞 (例えば、骨細胞、骨芽細胞) もしくは骨にのみ存在するペプチド (例えばヒドロキシアパタイト特異的ペプチド) を認識する、1 以上のペプチドで誘導体化または機能化された、ポリマー 6 (例えば、キトサン) で覆われた、造影剤コア 4 (例えば、鉄酸化またはゴールドメタリックコア) を含む、新規の骨特異的な薬剤 2 (例えば、微粒子、サブミクロン粒子、および原子または分子要素) を設計し、発展させている。コア 4、アウターシェル 6 を形成するポリマーコーティング、ポリマーアウターシェル 6 に結合する骨 - 特異的な機能化ペプチド 8 における材料の厳選により、ナノ粒子 2 などは、診断または治療で用いられうる。例えば、前記粒子 2 は、骨リモデリング活性の画像化、病態の検出および / または組織修復プロセスの検出で用いられうる。下記実施例は、これらの研究の結果を記載する。

20

##### 【0082】

###### 実施例 1 - キトサンへの無水コハク酸の結合

本発明者らは、キトサン (CS)、造影剤または薬剤の他の活性成分をコートするために用いられうる多糖は、無水コハク酸に結合しうることを明らかにしている。キトサンコハク酸エステル複合体は、タブレットで用いられうる生体適合性および生分解性ドラッグデリバリー薬剤であるとして、当技術分野で公知である。

30

##### 【0083】

###### 1. 材料および方法

###### (i) キトサン (CS) 誘導体化

CS は、既知の開環反応 (Y a n e t a l . , 2006, Y a k u g a k u Z a s s h i , 126, 789 - 793) を用いて無水コハク酸により誘導体化された (S u c - C h i)。1% (W/V) CS 溶液 (1% v/v 酢酸中) は、0.8  $\mu$ m 細孔膜 (M i l l i p o r e) を通してろ過され、メタノールで希釈された (1:4)。無水コハク酸 (99% GC, S i g m a A l d r i c h) は、4% (w/v) の 5 ml アセトンに溶解され、磁気攪拌下、液滴で加えられ、室温で攪拌しながら一晩置かれた。形成されたゲルは、過剰な溶液が除かれ、メタノールで 2 倍希釈され、3 日間超純水で透析された。水は 1 日 2 回交換され、その後、得られた沈殿物は、遠心分離により回収し、凍結乾燥された。

40

##### 【0084】

###### (ii) S u c - C h i サブミクロンビーズ (すなわち、ナノ粒子) の製造

S u c - C h i ビーズは、確立したイオンゲル法 (A g n i h o t r i , e t a l . , 2004) を用いて製造された。簡潔には、トリポリリン酸ナトリウム (T P P) 溶液 (1 mg/ml) は、1 mg/ml の S u c - C S 溶液 (上記) に体積比 1:5、磁気攪拌下液滴で加えられ、室温で 45 分、反応させた。核磁気共鳴画像法 (MRI) または CT 画像化生体特異的造影剤 (すなわち、本発明のナノ粒子 2) を製造するために、酸化鉄

50

コア4粒子( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 、10nm平均直径)または金コア4粒子(<20nm平均直径)はまず、Suc-C S溶液に添加する前、超音波処理を用いてTPP溶液に分散された。加えられたコア粒子4の重量は、溶解ポリマー6の半分であった。その後、コア4粒子は、(滅菌するために)エタノールを用いて遠心分離により洗浄され、その後超純水で洗浄され、滅菌PBSに戻された。

#### 【0085】

##### (iii) ペプチド合成

表1に記載されたペプチド8およびそれらに対応するアミノ酸配列は、合成され、その後コア粒子4を機能化するために用いられた。

#### 【0086】

##### 【表1】

表1—造影剤生体機能化に用いられる代表的ペプチドリスト

名前	配列	機能
GAP27p	SRPTEKTIFII	Cx43 GAP27由来。破骨細胞—破骨細胞および破骨細胞—骨芽細胞をブロックするために用いられる(Chaytor, et al., 1997, Ilvesaro, et al., 2001)
OP3-1	YCLEIEFCY	OPG残基113~122に基づく。特異的にRANKに結合し、RANKL誘導破骨細胞分化および活性を阻害する(Cheng, et al., 2004, Shin, et al., 2008, Ta, et al., 2010)
OP3-4	YCEIEFCYLIR	OPG残基113~122に基づく。特異的にRANKに結合し、RANKL誘導破骨細胞分化および活性を阻害する(Cheng, et al., 2004, Shin, et al., 2008, Ta, et al., 2010)
G1PL G2PL G3PL	K-(KK) K-(KK)-(KKKK) K-(KK)-(KKKK)-(KKKKKKKK)	水溶液中での改善した溶解性を有するペプチドのナノサイズ可撓性担体(Lloyd, et al., 2007, Meikle, et al., 2011)
G2PL-OP3-1	(KKKK)-(KK)-K-YCLEIEFCY	プロドラッグ:新規OP3-1係留G2PL
DOTA-OP3-4	DOTA-KGG-YCLEIEFCYLIR	MRI可視化 $\text{Gd}^{3+}$ のキレート化のための新規のDOTA-係留OP3-4ペプチド
DOTA-Gd-OP3-4	DOTA-KGG-YCLEIEFCYLIR	$\text{Gd}^{3+}$ キレートを有する新規のMRI-検出OP3-4誘導体
DOTA-Gd-FHRRKA	DOTA-Gd-FHRRKA	$\text{Gd}^{3+}$ キレートを有する新規のMRI-検出骨芽細胞移動誘導体

注:G1PL、G2PLおよびG3PLは、直鎖分子ではなく、ハイパーブランチ(樹枝状)である。G2PL分子(垂直)がOP3-1(水平)に共役している図10を参照。

#### 【0087】

ペプチド2は、テンタゲルS-NH<sub>2</sub>樹脂(0.1mmol)および反応溶媒としてジメチルホルムアミド(DMF)による従来の9-フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)保護/脱保護ストラテジーを用いて固相ペプチド合成法(SPPS)により合成された。酸依存Fmoc-Rink-Amideリンカー(リンカー)は、最初に、ペプチド8の後の開裂のために樹脂に結合された。その後、ペプチド8は、C末端から最初

10

20

30

40

50

のアミノ酸を加え、次に、表 1 に示される、ペプチド配列のように、その後のアミノ酸の配列カップリング/脱保護工程により合成された。カップリング反応 (30 分 × 2) は、アミノ基活性化のための HBTU (O - ベンゾトリアゾール N, N, N', N' - テトラメチル - ウロニウム - ヘキサフルオロ - ホスファート)、および三級塩基として N, N - ジイソプロピルエチルアミン (DIEA) を用いて行われた。保護されたアミノ基の曝露は、DMF の 20 % (v/v) ピペリジンで Fmoc 保護基を開裂することで得られた (2 分、× 3)。すべての調製物において、樹脂、リンカーおよびアミノ酸は、それぞれ 1 : 4 : 4 の分子比で加えられた。HBTU および DIEA (ジイソプロピルエチルアミン) は、それぞれアミノ酸のモル濃度の 1 ~ 2 倍であった。各カップリングおよび/または脱保護工程に続いて、洗浄工程 (DMF で × 3) が行われた。

10

#### 【0088】

表 1 に示される、オステオプロゲリン (Osteoprotegerin) 様ペプチド、OP3 - 1 および OP3 - 4 は、(Gongora - Benitez, et al., 2011) に記載された、システイン - システインジスルフィド結合を形成するためにジメチルスルホキシド (DMSO) 酸化により環化された。OP3 は、OPG タンパクのセグメントである。骨芽細胞表面の RANK (しばしば、可溶型で放出) は、破骨細胞上の RANK と相互作用し、よって破骨細胞分化および増大された活性を誘導する反応カスケードを開始する。OPG (骨芽細胞により放出された) は、RANKL のためのデコイであり、その RANKL への結合は、RANKL - RANKL 相互作用を阻害し、よってカスケードを停止する。したがって、OPG 模倣体は、骨関連標的細胞のレセプターのためのリガンドとなるであろう。合成後、環化されたペプチドは、3 時間、窒素雰囲気下で樹脂から切断された。切断後、ペプチドは、冷たいジメチルエーテルで回収され、遠心分離により分離され、窒素流で乾燥された。その後、ペプチドは、60 ml の酸化バッファー (10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> および 2 mM Gdn·HCl、5 % DMSO、pH 7) に溶解され、12 時間振とうされた。その後、溶液は、1 M HCO<sub>2</sub>H (250 μl) で酸性にされ、LC - MS により精製された。純粋フラクションは、混合され、凍結乾燥された。環化の程度 (ジスルフィド架橋の形成) は、エルマン試薬を用いて自由チオール基の定量のための一般的な方法により決定された。ペプチドは、最終的に、HPLC および MS により明らかにされた。

20

#### 【0089】

(iv) ペプチド - 係留生体特異的な造影剤の製造 (すなわち、ナノ粒子)

上記ペプチド 2 は、本発明のナノ粒子 2 を作製するためにカルボジイミドの化学的性質によりコア 4 粒子に共有結合された。非誘導化粒子は、まず、2 ml の 2 - (N - モルフォリノ) エタンスルホン酸 (MES) バッファー (0.1 M MES、0.3 M NaCl、pH 6.5) に分散され、1 mg/ml のビーズ濃度が得られた。その後、コア 4 粒子のカルボキシル基は、1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (EDC、4 mM) および N - ヒドロキシスクシンイミド (NHS、10 mM) の添加により活性化された。活性化反応は、室温で 30 分間、進められた。過剰な EDC は、-メルカプトエタノール (2.8 μl) の添加により不活化され、コア 4 粒子は、脱塩メンブレンにより洗浄された。その後、表 1 から選択されたペプチド (例えば、YCEIEFCYLIR 配列を有する OP3 - 4 ペプチド) が 1 mg/ml である MES バッファー溶液は、体積比 1 : 1 でコア 4 粒子の溶液に加えられた。抱合反応は、室温で 3 時間、磁気攪拌下で進められた。当該反応は、その後、5 ~ 10 mM の最終濃度を得るためにヒドロキシアミンの添加によりクエンチされた。

30

40

#### 【0090】

図 5 E を参照すると、本発明のナノ粒子 2 の一実施形態の略図が示されている。前記図は、ポリマーアウターシェル 6 (例えば、キトサン) でコートされたインナーコア 4 (例えば、イオン酸化または金) を有するナノ粒子 2 を示す。シェル 6 は、骨の細胞、または骨のみに存在する他のペプチド、例えば、ヒドロキシアパタイトを認識する、ペプチド 8 のコーティングで機能化されている。その後、結果として得られるナノ粒子 2 は、限外ろ

50



過スピンカラム (MWC O 100, 000) を用いて生成され、凍結乾燥され、-20 で保存された。図1は、Suc - ChiへのCSの誘導体化およびそれに続くOP3 - 4ペプチドでの機能化のスキームを示す。

#### 【0091】

##### 2. 結果

CSおよびSuc - Chiの<sup>1</sup>H NMRスペクトルを図2に示す。簡潔に、シグナルは、下記のように割り当てられる：2.50 ~ 2.70 ppm (H - Ac) は、GlcNAcモノマーのアセチルタンパク質に割り当てられた；2.50 - 2.75 ppm (H2D) は、GlcNAcモノマーのプロトン2に割り当てられた；3.95 ~ 4.65 ppm (H2 - 2) は、GlcNAcおよびGlcNAcモノマー両方のプロトン2 ~ 6に割り当てられた；4.65 ~ 4.90 ppm (HOD) は、溶媒 (HOD) に対応する；5.10 ~ 5.30 ppm (H1 - A) は、GlcNAcモノマーのプロトン1に対応する；5.30 ~ 5.65 ppm (H1 - D) は、GlcNAcモノマーのプロトン1に対応する。CSのスペクトルと対比すると、Suc - Chiのスペクトルは、無水コハク酸のCSへの結合が成功していることを裏付けている。ここでは、5.00 ~ 5.70 ppm (図2B、矢印、最初の2つを参照) およびH2Dの3.6 ~ 3.9 ppmの範囲でのH1 (D)、H1 - AおよびH2Dの分解能の悪いまたは消失したシグナルが見られる。CSのスペクトルでは見られないがSuc - Chiのスペクトルで見られる、2.34 ~ 2.57 ppmの範囲での新たなシグナルは、スクシニル基の2つのメタン水素基 (-COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH) に帰し、他の報告 (Liang, et al., 2012, Xiangyang, et al., 2007) と一致する。

#### 【0092】

滴定により決定された置換度は、<sup>1</sup>H NMRにより25.5%および30.6%であった。精度は低いが、電位差滴定分析は、CSおよびSuc - Chiの両方でフリー - NH<sub>2</sub>の分子量を決定することができた。図3に示すように、CSで算出された誘導体化の度合い (DD) の値は、79.92% (±5.85) であり、Suc - Chiでは、54.4% (±3.7) であった。前記滴定は、両方のポリマーに対し5回繰り返された。これらのデータは、無水コハク酸でのCSの誘導体化後、-NH<sub>2</sub>基の量の減少を示唆している。非誘導体化 - NH<sub>2</sub>基の存在は、ナノ粒子2製造の間に、TPPによるCS架橋をするために重要であった。

#### 【0093】

図4に示すように、FTIRの結果はまた、キトサンからSuc - Chiへの誘導体化の成功およびそれに続くOP3 - 4の結合を示した。1級および2級アミンのN - H伸縮およびO - H伸縮は、バンド1 (3500 ~ 3200 cm<sup>-1</sup>) に含まれる。OP3 - 4のスペクトルでのバンド1の主な寄与は、アミド結合に含まれるアミンからである。バンド2 (1640 ~ 1580 cm<sup>-1</sup>) は、4つの種に存在する、第1アミンでのN - H変角 (deformation)；アミドのN - H変角ならびにOP3 - 4, Suc - ChiおよびSuc - Chi - OP3 - 4の場合での2級アミドでのカルボニル伸縮にも対応するであろう。Suc - Chiに存在し、Suc - Chi - OP3 - 4では見られない、バンド3 (1722 cm<sup>-1</sup>) は、前述のアミド結合を介する結合に加え (バンド3)、エステル結合を通じてスクシニル基の多糖への結合の結果としてのカルボニル伸縮に帰されるであろう。チロシンおよびフェニルアラニンに存在する芳香族構造は、不飽和種でのC - H伸縮から生じる、バンド4を持つSuc - Chi - OP3 - 4にて確認しうる。OP3 - 4サンプルにて弱く存在し、Suc - ChiおよびCSでは存在しない、Suc - Chi - OP3 - 4のスペクトルでのバンド5 (500 ~ 540 cm<sup>-1</sup>) にある大きなピークは、ジスルフィド結合の存在に帰せられる。<sup>1</sup>H NMRおよび滴定により得られた結果から、スクシニル基は、CSのアミノ基への結合に成功していたと判断された。FTIRの結果は、さらにOP3 - 4ペプチドのSuc - Chiへの結合の成功を示唆している。

#### 【0094】

動的光散乱法の解析 (DLS) および走査型電子顕微鏡 (SEM) は、ナノ粒子が、MRI 検出可能なナノ粒子 2 を製造するために  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  コア 4 粒子の取込後、 $408.3 \text{ nm}$  ( $0.4$  の PDI) に増加した、 $366.4 \text{ nm}$  の平均流体力学直径 ( $Z_{\text{average}}$ ) を有したことを示した (図 5 参照)。ろ過工程の有無によるキトサン分子量の変化、および濃度は、ナノ粒子 2 サイズと多分散性指数 (PDI) とでチューニングされた (図 6 A ~ D 参照)。

【0095】

実施例 2 - OP3 と DOTA との結合

本発明者らは、次に、タンパク質、破骨細胞や骨芽細胞のような、骨の細胞で特異的に発現した、オステオプロテゲリン (osteoprotegerin) 3 (OP3) が、ガドリニウムを含む、さまざまな造影剤をコートするために用いられうるキレート剤である、ドタレム (Dotarem) (DOTA) に結合しうるかどうかを決定することに着手した。ドタレムは、ガドテル酸、既知の巨大環状構造の GD 系 MRI 造影剤である。それは、キレート剤として有機酸 DOTA からなる。

【0096】

1. 材料および方法

新規 DOTA - OP3 - 4 複合タンパク質は、OP3 - 1 および OP3 - 2 の合成で記載した Fmoc を用いて固相ペプチド合成法により合成された。しかし、この場合、最初にリジンコアアミノ酸を加え、次に、DOTA と Met で保護された  $\text{NH}_2$  基とをカップリングした。その後、2つのグリシンアミノ酸は、OP3 - 4 ペプチドのその後の集合に続くスペーサーを形成するためにカップリングされた。DOTA 分子と OP3 - 4 配列間のリジン - グリシン - グリシンスペーサーの導入は、合成中の潜在的な立体障害およびペプチドのポテンシーへの影響を避けるために重要であると考えられる。DOTA - OP3 - 4 の構造は、図 7 に示される。

【0097】

同様の固相ペプチド合成法は、ペプチドの造影剤への安定した結合を有利にできる直鎖状末端 (図 8 参照) または分岐末端 (図 10 参照) を有する新規誘導体化生体特異的なペプチドを合成するのに用いられた。

【0098】

2. 結果

図 9 および 11 は、直鎖状 (図 9) および分岐 (図 11) OP3 - 4 ペプチドの代表的な質量分析スペクトルを示す。これらは、コア 4 粒子への安定した結合と当該粒子の機能化の形成に必要なそれらのペプチドの合成に成功したことを示す。95% を超える純度が精製後に得られた。

【0099】

実施例 3 - 生体特異的な造影剤の生成 - OP3 に結合する、DOTA 被覆ガドリニウム

本発明者らは、次に、ガドリニウム (Gd) 系造影剤が DOTA 被覆と骨特異的なタンパク質オステオプロテグリン 3 (OP3) との結合により本発明のナノ粒子 2 を形成するために生成されうるかどうかを決定することに着手した。期待は、それらがまた MRI および / または CT 画像化技術で使用されうることであった。

【0100】

1. 材料および方法

新規ペプチドは、MRI および CT のための生体特異的な造影剤 (すなわち、機能化ナノ粒子 2) を製造するために用いられた (表 1 参照)。コア 4 粒子、 $\text{Gd}^{3+}$  のキレート化は、15 時間、バッファーシステムにおいて、 $\text{GdCl}_3$  と DOTA - OP3 - 4 とをインキュベートすることによりなされた。DOTA 部分は、多座配位子として働き、 $\text{Gd}^{3+}$  を複合体にする場合、MRI - 可視化ペプチドとするために金属カチオンをエンベロープした。複合体での DOTA リガンドと金属イオンとの配位は、リガンドの配座および金属カチオンの幾何学的傾向に依存する。DOTA は、それ自体で、8 配位のリガンドとして働き、4つのアミノ基および4つのカルボキシレート基と金属とを結合する。本研究

では、カルボキシレート基の一つがペプチドとの共有結合に用いられるため、DOTA分子は、7配位として働く。しかし、アミノ酸結合DOTAのカルボキシレート基およびペプチドは、8配位子をもたらし、そして8配位の状態に戻り、安定性の高い配位複合体を形成する(Viola-Villegas, et al., 2009)。

#### 【0101】

結果として得られたナノ粒子2は、線状または分岐ルート(root)を有するペプチド8とポリマー6の薄膜またはセラミック(すなわち、MRI造影剤)もしくは金コア4粒子(すなわち、CT造影剤)で被覆された磁性コア4粒子とを直接結合して得られた。この場合、ポリマーのカルボン酸基もしくはヒドロキシル基およびセラミックの表面機能化は、表1から選択された生体特異的なペプチドが共有結合によりグラフトされたアミノ酸で活性化および誘導体化された。

10

#### 【0102】

##### 2. 結果

Gd<sup>3+</sup>のキレート化の成功は、LC-MSにより確認され、DOTA-OP3-4のm/zの694.1のピークがGd<sup>3+</sup>のキレート化後の[M+3H]<sup>3+</sup>に対応するm/zの714.8のピークに置き換わっていた。アミノ酸分析は、OP3-4のガドリニウム(Gd)系ナノ粒子2への結合の成功を裏付けた(図12)。加水分解後、ポリマー中に存在するグルコサミンユニットの量およびアミノ酸の量が決定された。ナノ粒子2に結合したペプチド8の量は、ピークエリアの積分により算出した。OP3-4ペプチド8で機能化されたGdナノ粒子2の加水分解生成物の代表的なLCプロファイルは、図12

20

#### 【0103】

重要なことには、ナノ粒子-OP3-4およびナノ粒子-DOTA-Gd-OP3-4において、結合したペプチド8の量は、ナノ粒子2のグラムあたり4.2ミリモルと算出された。個々のアミノ酸は、OP3-4配列での量を反映したモル比で検出された。

#### 【0104】

##### 実施例4-MRIでのナノ粒子の使用試験

30

本発明者らは、次に、T1およびT2モードでのポジティブMRIシグナリングのための生体特異的なペプチド-機能化ナノ粒子2を試験した。生体特異的なナノ粒子2は、Gdコア4を誘導化ペプチド8で覆い、あらかじめ生物活性ペプチドで機能化したナノ粒子にグラフトすることで得られた。

#### 【0105】

##### 1. 材料および方法

ペプチド(DOTA-OP3-4およびDOTA-Gd-OP3-4)のPBSバッファー溶液は、まず最少量のDMSOにペプチドを溶解して調製され、次に希釈して20 μg/mlペプチドのPBS(1%DMSO)原液とし、0.1M HClでpHを7.2に調整した。さまざまなナノ粒子2(すなわち、コア4粒子のみ、ナノ粒子-OP3-4複合体、ナノ粒子-DOTA-Gd-OP3-4複合体)は、同じPBSバッファー溶液に懸濁された。DOTA-Gd<sup>3+</sup>(20 μg/ml)およびFe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>ナノ粒子(10 nm、20 μg/ml)の原液は、調製され、ガドリニウム系およびFe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>系造影剤それぞれのポジティブコントロールとして用いられた。

40

#### 【0106】

ナノ粒子-OP3-4複合体とナノ粒子-DOTA-Gd-OP3-4複合体との比較が最初に行われた。このため、ワットマンろ紙(円形、15 mm直径、cat:1441150, USA)を原液に浸した。

#### 【0107】

ナノ粒子2およびペプチド8の濃度の影響に関する本研究では、異なる濃度のペプチド

50

8 およびナノ粒子2が、原液の2倍希釈系列により調製された。DOTA-Gd-OP3-4の濃度は、(10、5、2.5、1.25、0.625、0.313、0.078、0.039、0.020、0.010および0.005  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )であり、コア4パーティクルのみでは、(20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.313、0.078、0.039、0.020および0.010  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )であった。次に、検体は、ウェルあたり500  $\mu\text{l}$ の量で24ウェル培養皿にセットされた。すべてのMRIは、Clinical Imaging Science Centre, Brighton and Sussex Medical School, UKのSiemens A VANTO 1.5 T MRI scannerを用いて行われた。

【0108】

10

## 2. 結果

図13は、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)に浸したネガティブコントロールフィルター、造影剤コア4を含まないDOTA-OP3-4ペプチド8からなるネガティブコントロールおよびガドリニウム-キレートDOTA-OP3-4ナノ粒子2の代表的なMRIスキャンを示す。前記スキャンは、ネガティブコントロールがノイズシグナルのみを示す一方、ガドリニウムコア4をキレートしたペプチド8が明らかなポジティブシグナルを示すことを明確に表している。ガドリニウム-キレートDOTA-OP3-4およびペプチド-機能化磁性ナノ粒子2のいずれかに浸したフィルターの比較分析では、検出の選択モードでの2つの造影剤から期待される典型的な明暗画像を示した。

【0109】

20

実施例5-OP3およびOP4-結合ナノ粒子のインビトロでの阻害効果試験

本発明者は、次に、オステオプロテゲリン(osteoprotegerin)3または4(OP3またはOP4)ペプチドと結合したDOTA-被覆ガドリニウムコア4を含むナノ粒子が、インビトロでの破骨細胞形成および破骨細胞活性を阻害するかどうかを決定した。

【0110】

## 1. 材料および方法

破骨細胞は、RNAKおよびM-CSFを有する細胞の添加(spliking)またはM-CSFを添加した骨芽細胞の単核細胞共培養システムに基づく一般的な方法により、健康なヒトドナーからの末梢血から単離した新鮮な単核細胞から得られた。ペプチドおよびペプチド-係留ナノ粒子2(すなわち、ナノ粒子-OP3-4、磁性ナノ粒子-OP3-4、ナノ粒子-OP3-DOTAおよびナノ粒子-OP3-4-Gd-DOTA)は、アミノ酸分析により決定された50  $\mu\text{M}$ のペプチド当量濃度で細胞に添加された。ネガティブコントロールは、試験材料を添加されず、ポジティブコントロールは、rh OPG(50 ng/ml)を添加された。添加(spliking)は、単核細胞の破骨細胞への分化の前後のいずれかに行われた。

30

【0111】

破骨細胞形成および破骨細胞活性の阻害は、光学顕微鏡検査を用いたTRAPポジティブ多核細胞(MNC)の数および落射蛍光顕微鏡検査を用いたF-アクチン環をもつMNC細胞の数を計測することで定量的に評価された。破骨細胞活性はまた、SEMによる骨スライスで形成された吸収窩の数の分析により定量的に評価された。培地は、すべての成長因子および試験材料を添加した新たな培地に3日ごとに交換された。

40

【0112】

3つの異なるアプローチが、破骨細胞形成および破骨細胞活性の阻害を決定するために用いられた。これらの方法は：(1)TRAPポジティブ多核細胞の数の計測；(2)ヘキスト(Hoechst)33258およびローダミン・ファロイジン二重染色を用いてアクチン環(MNC-AR+)を有する多核細胞の数の計測；(3)骨スライスでの細胞培養後に形成された吸収窩の評価により骨吸収の度合いの決定、であった。細胞が顕微鏡で計測するには多すぎた場合、画像編集ソフト(ImageJ v1.44p)が細胞を区別および計測するために用いられた。前記ソフトは、破骨細胞および非破骨細胞の両

50

方の色および形により細胞を計測することができ、発現した破骨細胞形成の度合いは、フィールドあたりのTRAPポジティブ細胞の割合であった(Labno)。

【0113】

## 2. 結果

破骨細胞形成でのOP3-4およびその $Gd^{3+}$ キレート化誘導体により機能化されたナノ粒子2の影響に関する研究の結果は、図15に示される。すべての薬剤において、ナノ粒子2およびガドリニウムに結合しないならびに結合した修飾ペプチド8は、コントロールとは著しく異なるレベルで破骨細胞の形成を減少したが、有効性の度合いは異なっていた(図15)。

【0114】

さらに、ペプチド-機能化磁性ナノ粒子は、非機能化ナノ粒子と比較した際、破骨細胞形成を著しく減少するように思われる(図16参照)。ナノ粒子-OP3-4, ナノ粒子-DOTA-OP3-4およびナノ粒子-DOTA- $Gd$ -OP3-4で処理した培地でのTRAPポジティブMNCの数は、有意に異なるものではなかった。このことは、さまざまに修飾されたペプチドとそのナノ粒子2へのグラフトは、破骨細胞形成を阻害する能力を変化させなかったことを示している。 $Gd^{3+}$ は、そのものを用いた場合、インビトロおよびインビボの両方で有毒である。しかし、 $Gd^{3+}$ をしっかりとトラップするDOTAのような大環状キレートは、イオン溶解度を改善し、よって細胞毒性を回避する。実際、多くの自由カルボキシル基および改善した溶解度を有するSuc-Chiは、さらに $Gd^{3+}$ を含み、DOTA- $Gd$ -OP3-4の生体適合性を改善するであろう。

【0115】

すでに分化した破骨細胞の活性への明らかな阻害効果は、図17に示される。

【0116】

最後に、分化した破骨細胞の活性の阻害は、SEMにより明確に観察され、図18に示すように、コントロール細胞によりもたらされた窩がないことを示している。

【0117】

## サマリー

薬剤の局所注入による骨病理学の診断および治療は、広く支持されている。本発明者らは現在、MRIおよびCT画像化で用いる新規の造影剤を発展させ、薬剤は、石灰化した骨細胞外マトリクスと同様に、骨の細胞、骨芽細胞および破骨細胞を認識できる。これらの生物学的認識特性は、さまざまな骨の細胞および骨のミネラル相に特異的な新規誘導化ペプチドの合成により得られた。誘導化は、画像化特性に影響を与えることなくナノ粒子またはイオン組成物の造影剤と安定した結合を有利にするために設計された。磁化ポリマービーズ、主にキトサンナノビーズの形態での造影剤の特定のタイプは、磁性コアを被覆するもしくはガドリニウム-修飾ペプチドをグラフトする方法、またはペプチドの架橋マトリクスでのイオン散在のいずれかにより得られた。骨の細胞および構成成分を認識する能力は、細胞の挙動を制御する能力と結び付けられた。分化した破骨細胞の活性を認識および阻害するだけでなく、破骨細胞への分化プロセスの間に単核細胞をも認識できる生体特異的な造影剤は、骨芽細胞移動を有利にできる薬剤とともに得ることができた。

【0118】

要約すると:-

1. ヒドロキシアパタイト-特異的ペプチドを有し、骨芽細胞-および破骨細胞-特異的ペプチドも有する、 $Fe_3O_4$ ナノ粒子(すなわち、MRI造影剤)および金ナノ粒子(すなわち、CT造影剤)のようなサブミクロン粒子の表面機能化が好ましい。

【0119】

2. ヒドロキシアパタイト-特異的ペプチドを有し、骨芽細胞-および破骨細胞-特異的ペプチドにより機能化されたポリマービーズにも覆われたガドリニウム(すなわち、MRI造影剤)およびヨウ素またはボロサルフェート(boro-sulphate)(すなわち、MRI造影剤)。

【0120】

3. ヒドロキシアパタイト - 特異的ペプチドを有し、骨芽細胞 - および破骨細胞 - 特異的ペプチドをも有するガドリニウム（すなわち、MRI造影剤）およびヨウ素（すなわち、MRI造影剤）複合体。

【0121】

4. 形態およびサイズがポリマーの調整された物理化学的性質により決定され、ならびに生物学的認識および生体活性が組織細胞を認識できる特異的ペプチドを有する誘導体により得られる、合成または天然ポリマーの被覆により形成されたナノ粒子。

【0122】

5. 架橋および生体機能化がナノ粒子の安定性および生体特異的 / 生体活性分子の存在を最適化するように調整されている、あらかじめ組織 - 特異的ペプチドで機能化された合成および天然ポリマー（例えば、キトサン）の架橋（主にイオン架橋）により形成されたナノ粒子。これらのナノ粒子は、MRI用およびCT用の造影剤を分散させた薬剤に含まれる。

10

【0123】

すべての場合において、これらの生体特異的な薬剤は、造影剤の特性と、組織画像化および再生を誘導可能な、組み合わせられ、組み込まれた生物学的認識および生物活性とを組み合わせる。

【0124】

インビトロでの骨芽細胞および破骨細胞の単培養および共培養の研究は、骨特異的ペプチドの細胞への能力を示した。細胞プロセスを促進する骨芽細胞 - 特異的ペプチド（例えば、FHRRIKA）の能力および破骨細胞形成を阻害するOPG - ミミックペプチドの能力を考えると、これらの新規材料はまた、骨欠損の治療での融合（すなわち、治療と診断の組み合わせ）剤として用いられうる。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0125】

【非特許文献1】Agnihotri S, A, Mallikarjuna N, N & Aminabhavi T, M (2004). Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. Journal of Controlled Release, 100, 5 - 28

30

【非特許文献2】Chaytor A T, Evans W H & Griffith T M (1997). Peptides homologous to extracellular loop motifs of connexin 43 reversibly abolish rhythmic contractile activity in rabbit arteries. The Journal of Physiology, 503, 99 - 110

【非特許文献3】Cheng X, Kinosaki M, Takami M, Choi Y, Zhang H & Murali R (2004). Disabling of Receptor Activator of Nuclear Factor- $\kappa$ B (RANK) Receptor Complex by Novel Osteoprotegerin-like Peptidomimetics Restores Bone Loss in Vivo. Journal of Biological Chemistry, 279, 8269 - 8277

40

【非特許文献4】Gongora-Benitez M, Tulla-Puche J, Paradis-Bas M, Werbitzky O, Giraud M & Albericio F (2011). Optimized Fmoc solid-phase synthesis of the cysteine-rich peptide linaclootide. Peptide Science, 96, 69 - 80

50

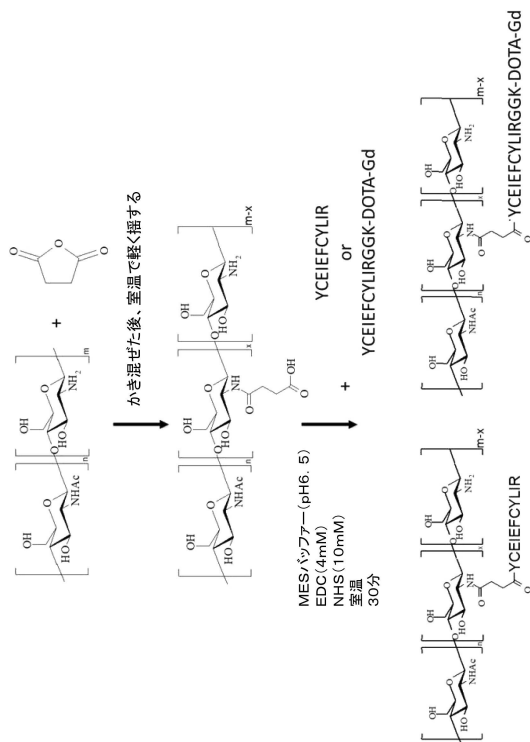
- 【非特許文献5】Ilvesaro J, Tavi P & Tuukkanen J (2001). Connexin-mimetic peptide Gap 27 decreases osteoclastic activity. BMC Musculoskeletal Disorders, 2
- 【非特許文献6】Labno C. (2011). Integrated Light Microscopy Core: Two Ways to Count Cells with ImageJ [Online]. University of Chicago. Available: [http://digital.bsd.uchicago.edu/resources\\_files/cell%20counting%20automated%20and%20manual.pdf](http://digital.bsd.uchicago.edu/resources_files/cell%20counting%20automated%20and%20manual.pdf) [Accessed 01/12/2011 2011] 10
- 【非特許文献7】Liang N, Sun S, Li X, Piao H, Piao H, Cui F & Fang L (2012). -Tocopherol succinate-modified chitosan as a micellar delivery system for paclitaxel: Preparation, characterization and in vitro/in vivo evaluations. International Journal of Pharmaceutics, 423, 480-488
- 【非特許文献8】Lloyd A, William, John G, William, Heath H, Standen G, Matteo S & Meikle S, Thomas. 2007. Biomaterials with Functionalised Surfaces. USA patent application 12/517,705 20
- 【非特許文献9】Meikle S T, Perugini V, Guildford A L & Santin M (2011). Synthesis, Characterisation and in vitro Anti-Angiogenic Potential of Dendron VEGF Blockers. Macromolecular Bioscience, 11, 1761-1765
- 【非特許文献10】Shin J, Kim Y-M, Li S-Z, Lim S-K & Lee W (2008). Structure-Function of the TNF Receptor-like Cysteine-rich Domain of Osteoprotegerin. Molecules and Cells, 25, 352-357 30
- 【非特許文献11】Ta H M, Nguyen G, Thi, Tuyet, Jin H, Mi, Choi J, Park H, Kim N, Hwang H-Y & Kim K, Kyu (2010). Structure-Based Development of a Receptor Activator of Nuclear Factor- $\kappa$ B Ligand (RANKL) Inhibitor Peptide and Molecular Basis for Osteoporosis Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107, 20281-20286 40
- 【非特許文献12】Viola-Villegas N & Doyle R P (2009). The coordination chemistry of 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid (H<sub>4</sub>DOTA): Structural overview and analyses on structure-stability relationships. Coordination Chemistry Reviews, 253, 1906-1925
- 【非特許文献13】Xiangyang X, Ling L, Jianping Z 50

, Shiyue L, Jie Y, Xiaojin Y & Jinsheng R (2007). Preparation and characterization of N-succinyl-N-octyl chitosan micelles as doxorubicin carriers for effective anti-tumor activity. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 55, 222-228

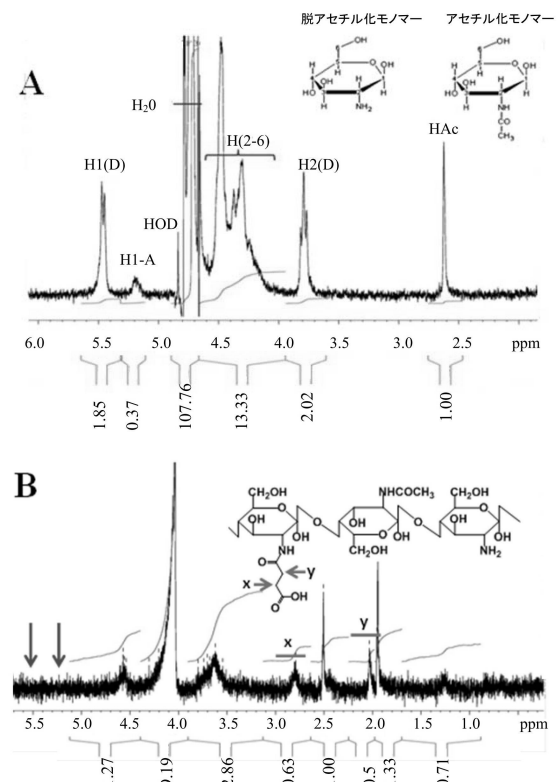
【非特許文献14】Yan C, Chen D, Gu J, Hu H, Zhao X & Qiao M (2006). Preparation of N-succinyl-chitosan and its physical-chemical properties as a novel excipient. Yakugaku Zasshi, 126, 789-793

10

【図1】

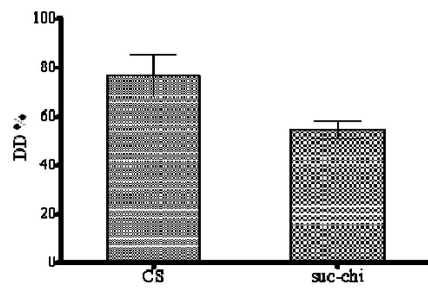


【図2】

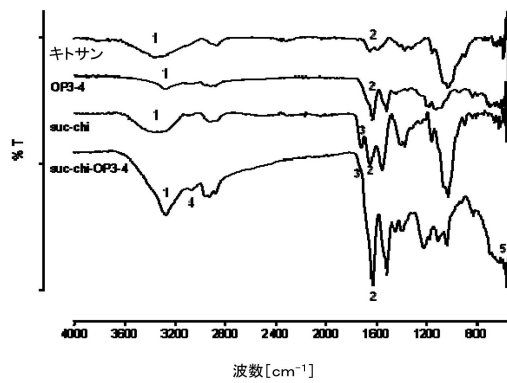




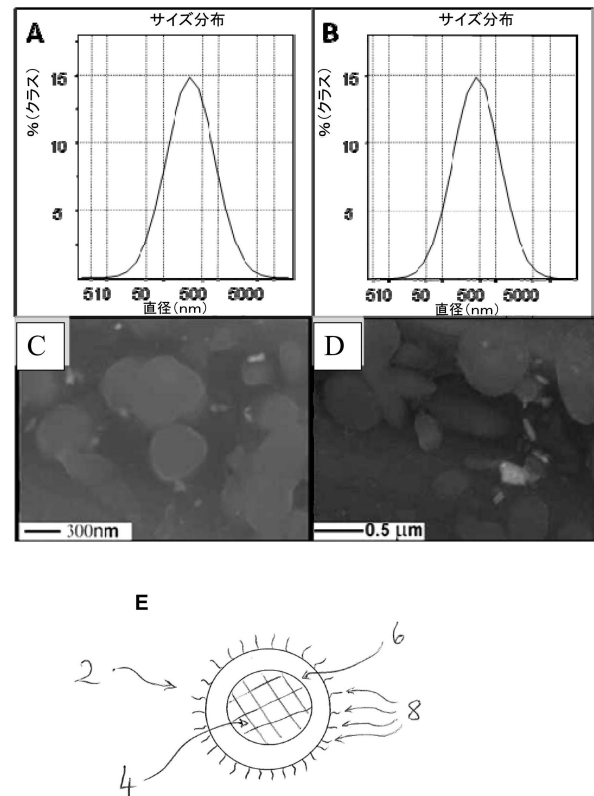
【図3】



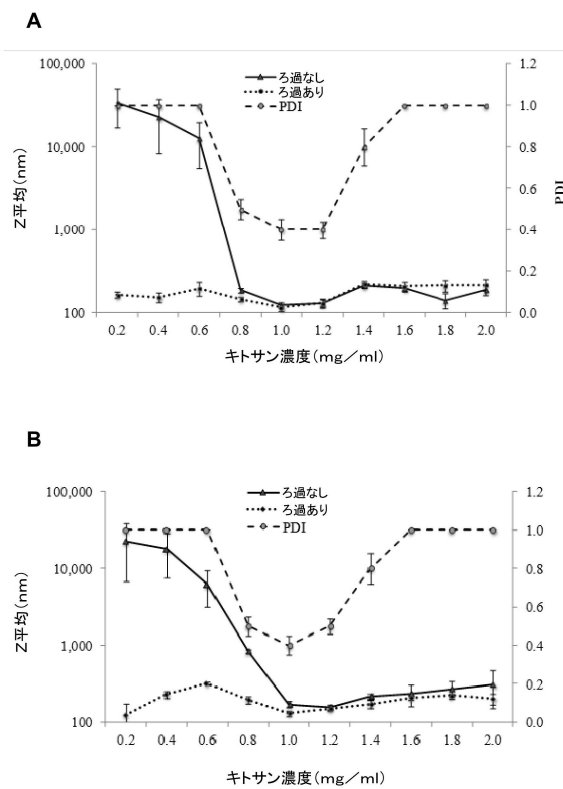
【図4】



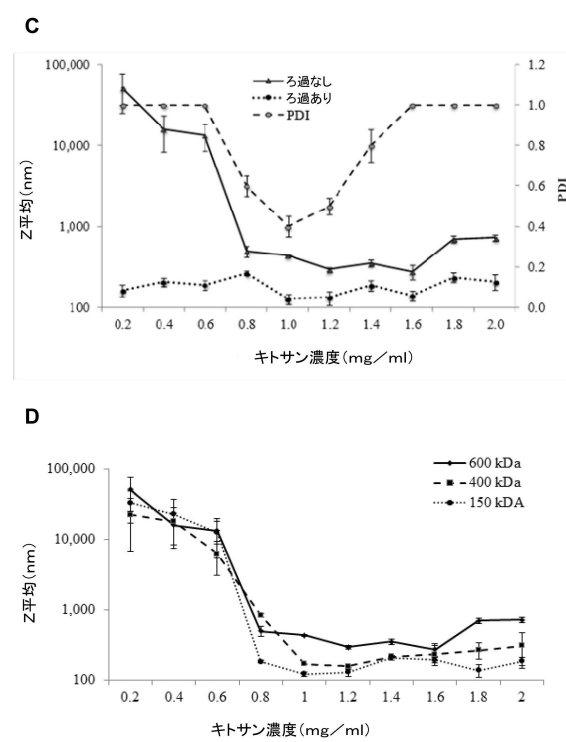
【図5】



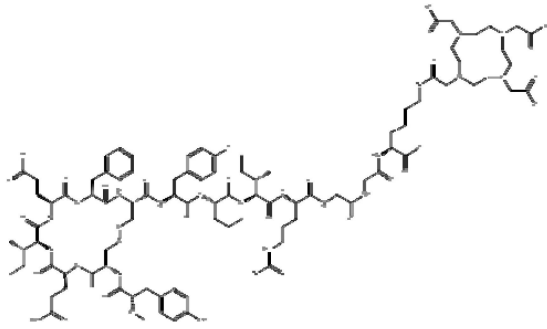
【図6 - 1】



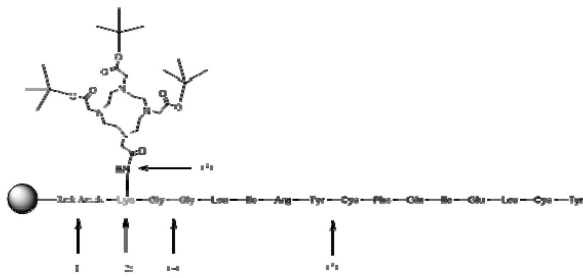
【図6 - 2】



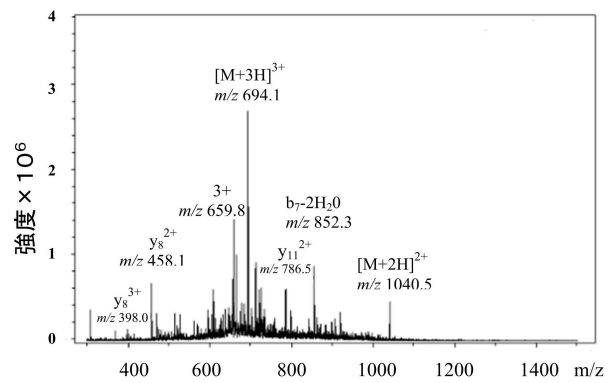
【図 7】



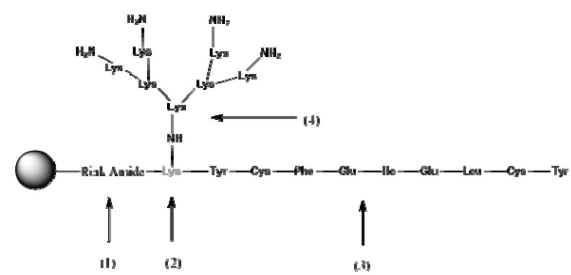
【図 8】



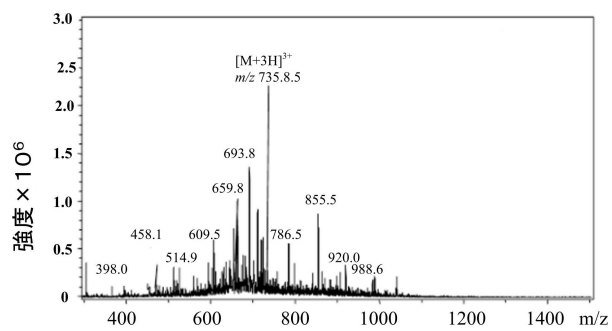
【図 9】



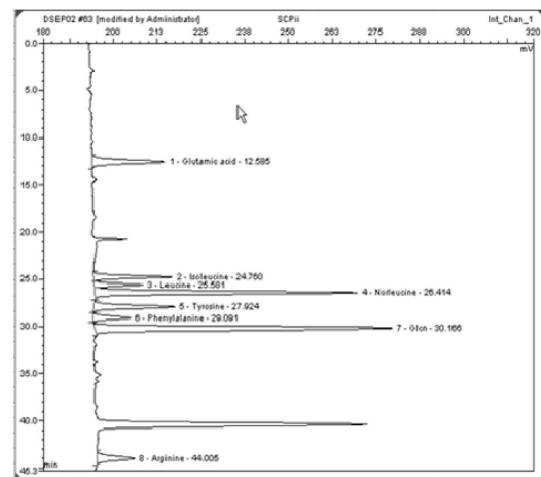
【図 10】



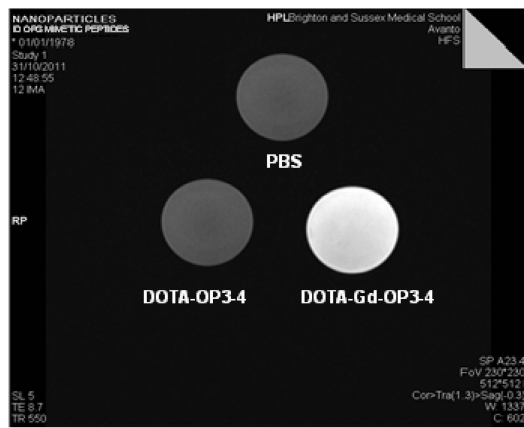
【図 11】



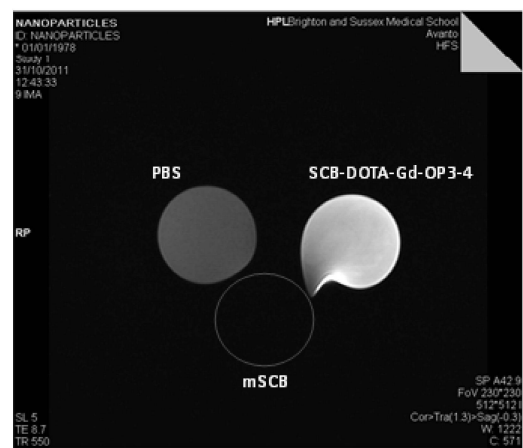
【図 12】



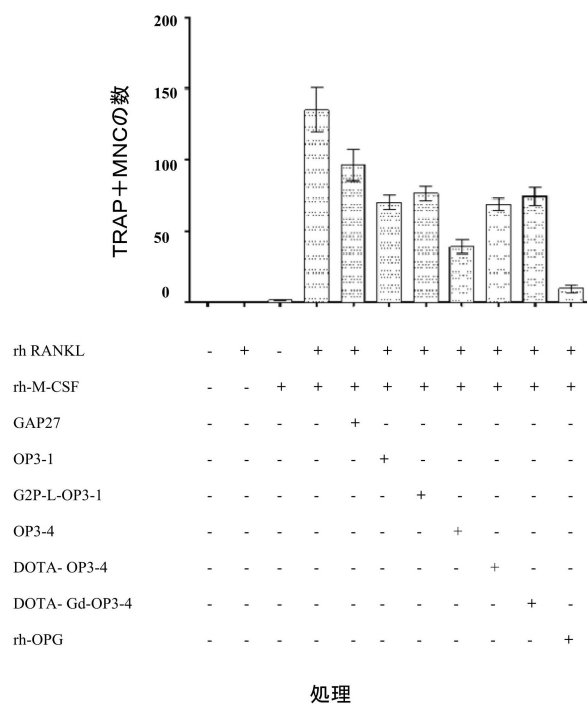
【 図 1 3 】



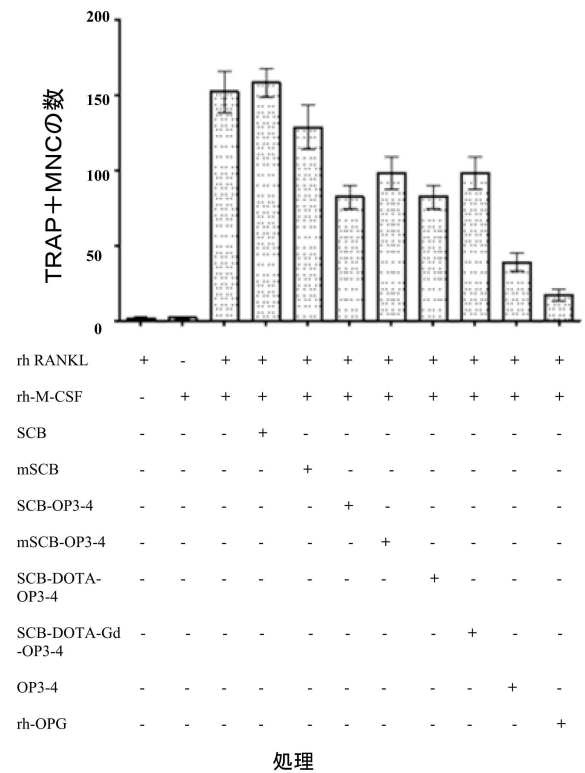
【 図 1 4 】



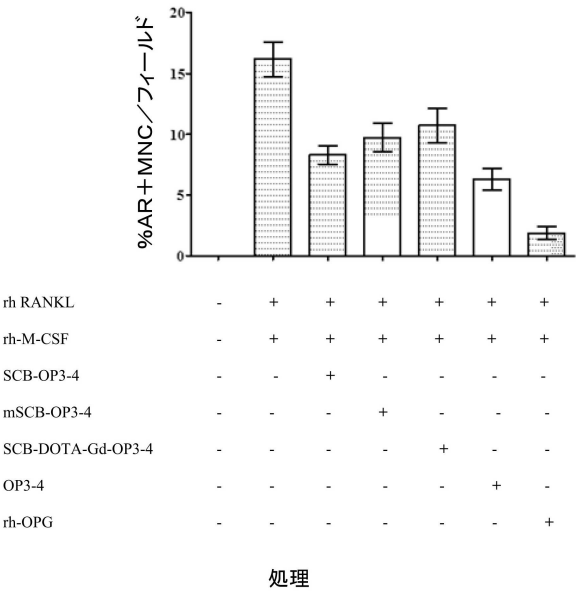
【 図 1 5 】



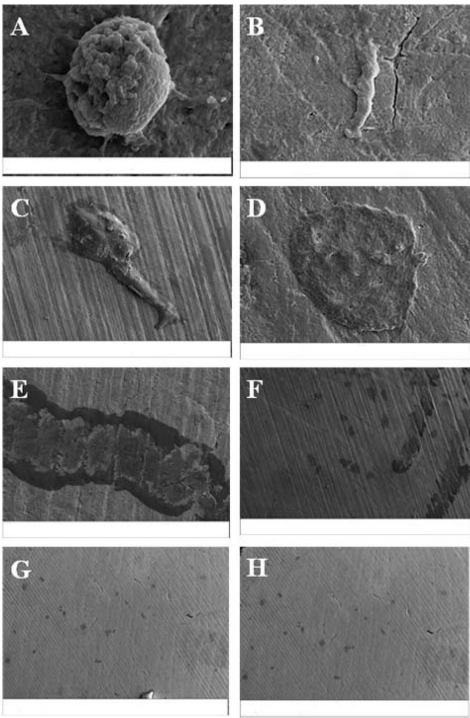
【 図 1 6 】



【図 17】



【図 18】



【配列表】

0006400026000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K 47/32	(2006.01)	A 6 1 K 47/32
A 6 1 K 47/34	(2017.01)	A 6 1 K 47/34
A 6 1 P 19/08	(2006.01)	A 6 1 P 19/08
C 0 7 K 7/04	(2006.01)	C 0 7 K 7/04
C 0 7 K 7/64	(2006.01)	C 0 7 K 7/64

(72)発明者 ムブンディ, ルビンダ  
ザンビア, セナンガ, ピー.オー.ボックス 920193, プロット ナンバー 1050

審査官 小森 潔

(56)参考文献 特表2008-533203(JP,A)  
Advanced Drug Delivery Reviews, 2012年, Vol. 64  
, No. 12, p1220-1238  
Nanotechnology, 2011年, Vol. 22, No. 3, 035102, p1-  
11  
World Neurosurgery, 2013年 1月 5日, [online], doi:10.1016/j.  
wneu.2013.01.011, Retrieved from the internet: , URL, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878875013000181>  
Pharmaceutical Research, 2012年, Vol. 29, No. 4, p  
953-960  
ACS Nano, 2011年, Vol. 5, No. 5, p3905-3916  
Cell, 2001年, Vol. 107, No. 4, p513-523

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
A 6 1 K 49/14  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)