

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6573633号
(P6573633)

(45) 発行日 令和1年9月11日(2019.9.11)

(24) 登録日 令和1年8月23日(2019.8.23)

(51) Int.Cl.

F I

A 6 1 K 47/69 (2017.01)

A 6 1 K 47/69

A 6 1 K 47/65 (2017.01)

A 6 1 K 47/65

A 6 1 K 47/52 (2017.01)

A 6 1 K 47/52

A 6 1 K 31/5377 (2006.01)

A 6 1 K 31/5377

A 6 1 K 31/506 (2006.01)

A 6 1 K 31/506

請求項の数 34 (全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-569722 (P2016-569722)
 (86) (22) 出願日 平成27年5月27日 (2015.5.27)
 (65) 公表番号 特表2017-521371 (P2017-521371A)
 (43) 公表日 平成29年8月3日 (2017.8.3)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/032565
 (87) 国際公開番号 W02015/183882
 (87) 国際公開日 平成27年12月3日 (2015.12.3)
 審査請求日 平成30年5月2日 (2018.5.2)
 (31) 優先権主張番号 62/004,738
 (32) 優先日 平成26年5月29日 (2014.5.29)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/094,923
 (32) 優先日 平成26年12月19日 (2014.12.19)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(73) 特許権者 500213834
 メモリアル スローン ケタリング キャ
 ンサー センター
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 1006
 5, ニューヨーク, ヨーク アベニュー 1275
 (73) 特許権者 508057896
 コーネル・ユニバーシティー
 CORNELL UNIVERSITY
 アメリカ合衆国14850ニューヨーク州
 イサカ、パイン・トゥリー・ロード395
 番、スウィート310
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ナノ粒子薬物コンジュゲート

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ナノ粒子；

酵素感受性リンカー部分；および

薬物部分

を含むナノ粒子薬物コンジュゲート（NDC）であって、

前記ナノ粒子が、シリカベースのコア、および前記コアの少なくとも一部を取り囲むシリカシェルを含み、

前記NDCは、10nm未満の直径を有し、

前記ナノ粒子が、有機ポリマーでコーティングされており、

前記薬物部分および酵素感受性リンカー部分が切断可能なリンカー-薬物構築物を形成し、前記切断可能なリンカー-薬物構築物は、前記ナノ粒子と共有結合的に連結し、酵素触媒性の薬物放出を促進する、ナノ粒子薬物コンジュゲート（NDC）。

【請求項2】

前記酵素感受性リンカー部分が、1つまたは複数のアミノ酸を含む、請求項1に記載のNDC。

【請求項3】

前記酵素感受性リンカー部分が、

(アミノ-(スペーサー)_x)_y-ペプチドまたは(スペーサー)_z-ペプチドを含み、前記スペーサーが、2~50個の原子を有しており、

10

20

x が 1 ~ 5 の整数であり、
 y が 1 ~ 5 の整数であり、
 z が 5 ~ 15 の整数であり、

前記酵素感受性リンカー部分が、前記酵素感受性リンカー部分と前記薬物部分の間に分解可能な部分を含む、請求項 1 に記載の N D C。

【請求項 4】

前記酵素感受性リンカー部分が、ペプチドと前記薬物部分の間にスペーサーを含む、請求項 1 に記載の N D C。

【請求項 5】

蛍光化合物を含む、請求項 4 に記載の N D C。

10

【請求項 6】

放射性標識をさらに含む、請求項 1 に記載の N D C。

【請求項 7】

前記酵素感受性リンカー部分が、プロテアーゼ結合時に C 末端での加水分解を受け、それによって前記ナノ粒子から前記薬物部分を放出させることができる、請求項 1 に記載の N D C。

【請求項 8】

前記薬物部分が、受容体チロシンキナーゼ (R T K) 阻害剤を含む、請求項 1 に記載の N D C。

【請求項 9】

1 ~ 20 の標的化部分をさらに含み、前記標的化部分が腫瘍細胞上の受容体と結合する、請求項 1 に記載の N D C。

20

【請求項 10】

セラノスティックである、請求項 9 に記載の N D C。

【請求項 11】

前記蛍光化合物が C y 5 . 5 である、請求項 5 に記載の N D C。

【請求項 12】

前記薬物部分が前記放射性標識に付着している、請求項 6 に記載の N D C。

【請求項 13】

前記 1 つまたは複数のアミノ酸が、ペプチドまたはポリペプチドを含み、かつ、1 ~ 10 個のアミノ酸を含み、

30

前記 (アミノ - (スペーサー) _x) _y - ペプチドまたは (スペーサー) _z - ペプチドがジペプチドであり、前記ジペプチドがフェニルアラニン - アルギニン (P h e - A r g) またはフェニルアラニン - リシン (P h e - L y s) のうちの 1 つであり、

前記スペーサーが P E G であり、

前記分解可能な部分がアミド結合であり、前記分解可能な部分が、プロテアーゼの存在下での前記薬物部分の切断を可能にする、請求項 3 に記載の N D C。

【請求項 14】

前記スペーサーが、ポリエチレングリコール (P E G)、P E G ₂、またはパラ - アミノベンジルオキシカルバメート (P A B C) からなる群から選択される要素を含み、

40

前記蛍光化合物が前記ナノ粒子と会合しているか、または前記ナノ粒子のコア内部にある、請求項 5 に記載の N D C。

【請求項 15】

前記プロテアーゼが、トリプシンを含めたセリンプロテアーゼであるか、またはカテプシン B を含めたシステインプロテアーゼである、請求項 7 に記載の N D C。

【請求項 16】

前記受容体チロシンキナーゼ (R T K) 阻害剤が、前記薬物部分の活性結合部位の基本的な化学構造を乱すことなく、前記酵素感受性リンカー部分への付着をもたらすように修飾された、その類似体またはその薬学のおよび / または治療的均等物を含むダサチニブまたはゲフィチニブである、請求項 8 に記載の N D C。

50

【請求項 17】

前記標的化部分が、環状アルギニルグリシルアスパラギン酸 (c R G D) を含む、請求項 9 に記載の N D C。

【請求項 18】

ナノ粒子；

酵素感受性リンカー部分；および

薬物部分

を含むナノ粒子薬物コンジュゲート (N D C) であって、

前記 N D C は、10 nm 未満の直径を有し、

前記ナノ粒子が、有機ポリマーでコーティングされており、

前記薬物部分および酵素感受性リンカー部分が切断可能なリンカー - 薬物構築物を形成し、前記切断可能なリンカー - 薬物構築物は、前記ナノ粒子と共有結合的に連結し、酵素触媒性の薬物放出を促進し、そして、

(i) 前記薬物部分が、ダサチニブ、ゲフィチニブ、ダサチニブの類似体およびゲフィチニブの類似体からなる群から選択される要素を含み、(ii) 前記有機ポリマーが、少なくとも 1 つのリンカー - 薬物構築物に付着した少なくとも 1 つの二官能化マレイミドシリル - ポリエチレングリコール基を含み、(iii) プロテアーゼを介して切断可能なリンカー - 薬物構築物が形成され、前記酵素切断可能リンカー - 薬物構築物が、前記酵素感受性リンカー部分によって前記ナノ粒子と共有結合的に連結されており、(iv) 平均の薬物部分とナノ粒子との比が 1 ~ 20 の範囲である、ナノ粒子薬物コンジュゲート (N D C)。

【請求項 19】

前記酵素感受性リンカー部分が、1 つまたは複数のアミノ酸を含む、請求項 18 に記載の N D C。

【請求項 20】

前記酵素感受性リンカー部分が、

(アミノ - (スペーサー)_x)_y - ペプチドまたは (スペーサー)_z - ペプチドを含み、

前記スペーサーが、2 ~ 50 個の原子を有しており、

x が 1 ~ 5 の整数であり、

y が 1 ~ 5 の整数であり、

z が 5 ~ 15 の整数であり、

前記酵素感受性リンカー部分が、前記酵素感受性リンカー部分と前記薬物部分の間に分解可能な部分を含む、請求項 18 に記載の N D C。

【請求項 21】

前記酵素感受性リンカー部分が、ペプチドと前記薬物部分の間にスペーサーを含む、請求項 18 に記載の N D C。

【請求項 22】

蛍光化合物を含む、請求項 21 に記載の N D C。

【請求項 23】

放射性標識をさらに含む、請求項 18 に記載の N D C。

【請求項 24】

前記酵素感受性リンカー部分が、プロテアーゼ結合時に C 末端での加水分解を受け、それによって前記ナノ粒子から前記薬物部分を放出させることができる、請求項 18 に記載の N D C。

【請求項 25】

前記薬物部分が、受容体チロシンキナーゼ (R T K) 阻害剤を含む、請求項 18 に記載の N D C。

【請求項 26】

1 ~ 20 の標的化部分をさらに含み、前記標的化部分が腫瘍細胞上の受容体と結合する、請求項 18 に記載の N D C。

10

20

30

40

50

【請求項 27】

セラノスティックである、請求項 26 に記載の N D C。

【請求項 28】

前記蛍光化合物が C y 5 . 5 である、請求項 22 に記載の N D C。

【請求項 29】

前記薬物部分が前記放射性標識に付着している、請求項 23 に記載の N D C。

【請求項 30】

前記 1 つまたは複数のアミノ酸が、ペプチドまたはポリペプチドを含み、かつ、1 ~ 10 個のアミノ酸を含み、

前記 (アミノ - (スペース) _x) _y - ペプチドまたは (スペース) _z - ペプチドがジペプチドであり、前記ジペプチドがフェニルアラニン - アルギニン (P h e - A r g) またはフェニルアラニン - リシン (P h e - L y s) のうちの 1 つであり、

前記スペースが P E G であり、

前記分解可能な部分がアミド結合であり、前記分解可能な部分が、プロテアーゼの存在下での前記薬物部分の切断を可能にする、請求項 20 に記載の N D C。

【請求項 31】

前記スペースが、ポリエチレングリコール (P E G)、P E G ₂、またはパラ - アミノベンジルオキシカルバメート (P A B C) からなる群から選択される要素を含み、

前記蛍光化合物が前記ナノ粒子と会合しているか、または前記ナノ粒子のコア内部にある、請求項 22 に記載の N D C。

【請求項 32】

前記プロテアーゼが、トリプシンを含めたセリンプロテアーゼであるか、またはカテプシン B を含めたシステインプロテアーゼである、請求項 24 に記載の N D C。

【請求項 33】

前記受容体チロシンキナーゼ (R T K) 阻害剤が、前記薬物部分の活性結合部位の基本的な化学構造を乱すことなく、前記酵素感受性リンカー部分への付着をもたらすように修飾された、その類似体またはその薬学的および / または治療的均等物を含むダサチニブまたはゲフィチニブである、請求項 25 に記載の N D C。

【請求項 34】

前記標的化部分が、環状アルギニルグリシルアスパラギン酸 (c R G D) を含む、請求項 26 に記載の N D C。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は、それぞれ 2014 年 5 月 29 日および 2014 年 12 月 19 日に出願された米国仮特許出願第 62 / 004 , 738 号および同第 62 / 094 , 923 号の優先権および利益を主張し、それらの全体を本明細書において参考として援用する。

【0002】

技術分野

本発明は、一般に、がんおよび他の疾患の検出、防止および治療のための治療剤の送達 (例えば、標的薬物放出) 用のナノ粒子コンジュゲートに関する。

【背景技術】

【0003】

ナノ治療送達ビヒクルは、典型的には、1 ~ 1 , 000 nm のサイズ範囲のマクロまたはスプラ分子の多成分系であり、本来的に治療薬である (例えば、活性医薬成分なし) か、または治療的送達系として機能する。これまで、リポソームナノ粒子およびバイオロジックは、様々な種類のがんを治療するために使用される FDA に認可された製品、または臨床試験中の製品の数の大部分を構成しているが、多くのポリマーベースの粒子製剤は、現在、初期試験段階である。

【 0 0 0 4 】

ナノ治療的送達系のための望ましい候補は、薬物の生物学的利用能および薬物動態を好都合に変更し、同時にオフターゲットの毒性を最少化することができる、制御された仕方での薬物化合物の取り込みおよび放出という共通の特徴を共有している。疾患部位での、それらの正確な位置特定および保持を評価するために、画像化ラベルをその中に組み込むのが理想的である。

【 0 0 0 5 】

しかし、これらの系は異なる機序を使用して機能する。例えば、抗体薬物コンジュゲート (ADC) は、主に、腫瘍細胞の能動的標的化および薬物分子の条件付き放出によって、より低い薬物毒性を達成する。細胞表面の抗原と結合すると、活性薬物放出が、細胞内部移行およびエンドソーム取り込みの後に起こる。他方、より大きいペイロード (Doxil では約 10,000 の薬物分子) を受動的にロードされる一般にずっと大きい集合複合体 (約 20 ~ 150 nm の直径) であるリポソームおよびポリマーベースの薬物送達系は、通常、標的化能力が欠如している (BIND-014 は例外である)。したがって、これらの複合体は、ナノ製剤化薬物の首尾よい送達のためには、主に、周知の強化された透過性および保持 (EPR) 効果に依存している。リポソームの侵入型透過 (interstitial permeation) は、それらのサイズに起因して劣っている可能性があるが、遊離薬物は、十分に理解されていない様々な機序によって放出される。例えば、Abraxane (約 140 nm) は、疎水性化合物の生物学的利用能を増進させるために、異なるアプローチに依存する。この場合、アルブミンと薬物 (パクリタキセル) の特定の製剤は、初期複合体を形成し、これは、次いで、注入されると、より小さいタンパク質 - 薬物凝集体に分散すると推定される。

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 6 】

したがって、十分な生体内安定性を提供し、所望の部位での生物活性化合物の制御放出を示す薬物送達のための独特のプラットフォームの必要性がある。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 7 】

本明細書では、ナノ粒子薬物コンジュゲート (NDC)、特に、共有結合的に付着した薬物分子を有するシリカベースのナノ粒子プラットフォームの方法および組成物を提供する。NDC は、ナノ治療薬として実証されている。サイズ、分子組成および化学 (例えば、薬物放出の方式) の組合せは、狭い治療指数、用量制限毒性および限られた臨床的有用性を含む従来の製剤化を妨害する主要な障害物を克服する目的での他のナノ治療製品において見られる有益な特性を利用し得る。

【 0 0 0 8 】

一態様では、本発明は、ナノ粒子 (例えば、1 nm ~ 25 nm の範囲内の直径を有する) ; リンカー部分 ; および薬物部分 (例えば、その任意の類似体を含むダサチニブまたはゲフィチニブ) を含むナノ粒子薬物コンジュゲート (NDC) であって、ナノ粒子が、有機ポリマー (例えば、有機ポリマーは、少なくとも 1 つのリンカー - 薬物構築物に付着した少なくとも 1 つの二官能化マレイミドシリル - ポリエチレングリコール基を含む) でコーティングされており、薬物部分およびリンカー部分が、ナノ粒子と共有結合的に連結する (例えば、リンカー部分によって) 切断可能な (例えば、プロテアーゼによって) リンカー - 薬物構築物を形成する (例えば、平均の薬物部分とナノ粒子との比は 1 ~ 20 の範囲である) 、ナノ粒子薬物コンジュゲート (NDC) を対象とする。

【 0 0 0 9 】

ある特定の実施形態では、リンカー部分は、1 個または複数のアミノ酸 (例えば、ペプチドまたはポリペプチド) (例えば、1 ~ 10 個のアミノ酸) を含む。ある特定の実施形態では、リンカー部分は、(アミノ - (スペーサー)_x)_y - ペプチドまたは (スペーサー)_z - ペプチド [例えば、ジペプチド (例えば、フェニルアラニン - アルギニン (Ph

10

20

30

40

50

e - A r g) またはフェニルアラニン - リシン (P h e - L y s))] を含み、ここで、
 スペースは 2 ~ 5 0 個の原子を有し (例えば、スペースは P E G である)、x は 1 ~
 5 の整数であり、y は 1 ~ 5 の整数であり、z は 5 ~ 1 5 の整数であり、リンカー部分は、
 リンカー部分と薬物部分の間に分解可能な部分 (例えば、アミド結合) を含む (例えば、
 プロテアーゼの存在下で薬物部分の切断を可能にする)。ある特定の実施形態では、リン
 カー部分は、ペプチドと薬物部分の間にスペース (例えば、ポリエチレングリコール
 (P E G))、P E G₂、パラ - アミノベンジルオキシカルバメート (P A B C)) を含
 む。ある特定の実施形態では、N D C は、蛍光化合物 (例えば、ナノ粒子のコア内部で、
 例えばナノ粒子と会合している) をさらに含む。ある特定の実施形態では、N D C は、放
 射性標識をさらに含む。

10

【 0 0 1 0 】

ある特定の実施形態では、リンカー部分は、プロテアーゼ (例えば、セリンプロテアー
 ゼ (例えば、トリプシン)、システインプロテアーゼ (例えば、カテプシン B)) 結合時
 に C 末端で加水分解を受け、それによって、ナノ粒子から薬物部分を放出することができ
 る。

【 0 0 1 1 】

ある特定の実施形態では、薬物部分は、受容体チロシンキナーゼ (R T K) 阻害剤 (例
 えば、薬物部分の活性結合部位の基本的な化学構造を乱すことなく、リンカー部分への付
 着をもたらすように修飾された、その任意の類似体 (例えば、その任意の薬学的および /
 または治療的均等物) を含むダサチニブまたはゲフィチニブ) を含む。

20

【 0 0 1 2 】

ある特定の実施形態では、N D C は、1 ~ 2 0 個の標的化部分 (例えば、環状アルギニ
 ルグリシルアスパラギン酸 (c R G D)) をさらに含み、標的化部分は、腫瘍細胞上の受
 容体と結合する。

【 0 0 1 3 】

ある特定の実施形態では、N D C は、セラノスティックである。

【 0 0 1 4 】

ある特定の実施形態では、蛍光化合物は C y 5 . 5 である。

【 0 0 1 5 】

ある特定の実施形態では、薬物部分は、放射性標識に付着する。

30

【 0 0 1 6 】

ある特定の実施形態では、ナノ粒子は、シリカベースのコア、およびコアの少なくとも
 一部を取り囲むシリカシェルをさらに含む。

【 0 0 1 7 】

本発明の所与の態様に関して説明される実施形態の要素は、本発明の別の態様の種々の
 実施形態において使用され得る。例えば、1 つの独立請求項に従属する従属請求項の特徴
 は、他の独立請求項のいずれかの装置および / または方法において使用することができる
 ことが企図されている。

例えば、本発明は以下の項目を提供する。

(項目 1)

40

ナノ粒子 (例えば、1 n m ~ 2 5 n m の範囲内の直径を有する) ;

リンカー部分 ; および

薬物部分 (例えば、その任意の類似体を含むダサチニブまたはゲフィチニブ)

を含むナノ粒子薬物コンジュゲート (N D C) であって、

前記ナノ粒子が、有機ポリマー (例えば、前記有機ポリマーは、少なくとも 1 つのリンカ
 ー - 薬物構築物に付着した少なくとも 1 つの二官能化マレイミドシリル - ポリエチレング
 リコール基を含む) でコーティングされており、

前記薬物部分およびリンカー部分が、前記ナノ粒子と共有結合的に連結する (例えば、前
 記リンカー部分によって) 切断可能な (例えば、プロテアーゼによって) リンカー - 薬物
 構築物を形成する (例えば、平均の薬物部分とナノ粒子との比は 1 ~ 2 0 の範囲である)

50

、ナノ粒子薬物コンジュゲート（NDC）。

（項目2）

前記リンカー部分が、1つまたは複数のアミノ酸（例えば、ペプチドまたはポリペプチド）（例えば、1～10個のアミノ酸）を含む、項目1に記載のNDC。

（項目3）

前記リンカー部分が、
（アミノ-（スペーサー）_x）_y-ペプチドまたは（スペーサー）_z-ペプチド[例えば、ジペプチド（例えば、フェニルアラニン-アルギニン（Phe-Arg）またはフェニルアラニン-リシン（Phe-Lys））]を含み、

前記スペーサーが、2～50個の原子を有しており（例えば、前記スペーサーはPEGである）、

xが1～5の整数であり、

yが1～5の整数であり、

zが5～15の整数であり、

前記リンカー部分が、前記リンカー部分と前記薬物部分の間に分解可能な部分（例えば、アミド結合）を含む（例えば、プロテアーゼの存在下での前記薬物部分の切断を可能にする）、項目2に記載のNDC。

（項目4）

前記リンカー部分が、ペプチドと前記薬物部分の間にスペーサー（例えば、ポリエチレングリコール（PEG））、PEG₂、パラ-アミノベンジルオキシカルバメート（PABOC）を含む、項目1～3のいずれか一項に記載のNDC。

（項目5）

蛍光化合物（例えば前記ナノ粒子のコア内部で、例えば前記ナノ粒子と会合している）をさらに含む、前記項目のいずれかに記載のNDC。

（項目6）

放射性標識をさらに含む、前記項目のいずれかに記載のNDC。

（項目7）

前記リンカー部分が、プロテアーゼ（例えば、セリンプロテアーゼ（例えば、トリプシン）、システインプロテアーゼ（例えば、カテプシンB））結合時にC末端での加水分解を受け、それによって前記ナノ粒子から前記薬物部分を放出させることができる、前記項目のいずれか一項に記載のNDC。

（項目8）

前記薬物部分が、受容体チロシンキナーゼ（RTK）阻害剤（例えば、前記薬物部分の活性結合部位の基本的な化学構造を乱すことなく、前記リンカー部分への付着をもたらすように修飾された、その任意の類似体（例えば、その任意の薬学的および/または治療的均等物）を含むダサチニブまたはゲフィチニブ）を含む、前記項目のいずれか一項に記載のNDC。

（項目9）

1～20の標的化部分（例えば、環状アルギニルグリシルアスパラギン酸（cRGD））をさらに含む、前記標的化部分が腫瘍細胞上の受容体と結合する、前記項目のいずれか一項に記載のNDC。

（項目10）

セラノスティックである、項目8に記載のNDC。

（項目11）

蛍光化合物がCy5.5である、項目4に記載のNDC。

（項目12）

前記薬物部分が放射性標識に付着している、項目5に記載のNDC。

（項目13）

前記ナノ粒子が、シリカベースのコア、および前記コアの少なくとも一部を取り囲むシリカシェルをさらに含む、前記項目のいずれかに記載のNDC。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1A】図1Aは、ゲフィチニブおよび類似体（APdMG1およびdPEG₂APdMG2）の化学構造を表す図である。

【0019】

【図1B】図1Bは、アミド結合を介して直接接続したリンカー - 薬物の化学構造（Phe - Arg - APdMG3）を表す図である。

【0020】

【図1C】図1Cは、dPEG₂スパーサーを介して接続したリンカー - 薬物の化学構造（Phe - Arg - dPEG₂APdMG4）を表す図である。

10

【0021】

【図1D】図1Dは、分解可能なPABCスパーサーを介して接続したリンカー - 薬物の化学構造（Phe - Lys - PABC - APdMG5）を表す図である。

【0022】

図2A～2Cは、リンカーの種類を示す図である。

【0023】

【図2A】図2Aは、Phe - Arg - APdMGが、薬物付着のためにアミド結合を利用することを表す図である。酵素はジペプチド配列（Phe - Arg）を認識し、結合し、次いでジペプチドに対するアミド結合C末端を加水分解し、APdMG1を放出する。

【0024】

20

【図2B】図2Bは、Phe - Arg - dPEG₂APdMGが、薬物放出を増進させるために薬物とジペプチドの間により長い10個の原子PEGスパーサーを取り込むdPEG₂APdMG2を使用することを示す図である。

【0025】

【図2C】図2Cは、Phe - Lys - PABC - APdMGが、ジペプチド（Phe - Lys）とアミノプロピル - dMGの間にパラ - アミノベンジルオキシ（aminobenzoxy） - カルバメート（またはPABC）スパーサー基を利用することを示す図である。スパーサー - 薬物の酵素触媒放出の後、スパーサーは自発的に薬物から分解する。

【0026】

図3A～3Cは、代表的な、リンカー - 薬物構築物からの薬物の酵素（トリプシン）触媒放出を示すグラフである。データは、APdMGおよびdPEG₂APdMGが構築物から放出されることを示す。保持時間は括弧内に示される。トリプシンアッセイは、10 mMリン酸緩衝液（pH7.2）中37℃で実施した。

30

【0027】

【図3A】図3Aは、60分間でのPhe - Arg - APdMG3（上部）およびPhe - Arg - APdMG + トリプシン（下部）のLCMSデータを示すグラフである。

【0028】

【図3B】図3Bは、10分間でのPhe - Arg - dPEG₂APdMG4（上部）およびPhe - Arg - dPEG₂APdMG + トリプシン（下部）のLCMSデータを示すグラフである。

40

【0029】

【図3C】図3Cは、10分間でのPhe - Arg - PABC - APdMG5（上部）およびPhe - Arg - PABC - APdMG + トリプシン（下部）のLCMSデータを示すグラフである。

【0030】

図4Aおよび4Bは、HPLCにより348nmで経時的にモニターした、遊離リンカー - 薬物構築物Phe - Arg - APdMG、Phe - Arg - dPEG₂APdMGおよびPhe - Lys - PABC - APdMGについてのin vitroでの薬物放出アッセイを示すグラフである。遊離薬物%は、放出された薬物を、348nmで決定されたリンカー - 薬物構築物の初期薬物ロードで除したものである。

50

【0031】

【図4A】図4Aは、トリプシンで処理された遊離リンカー-薬物構築物を表すグラフである。トリプシンアッセイは、10 mMリン酸緩衝液 (pH 7.2) 中、37 °C で実施した。

【0032】

【図4B】図4Bは、カテプシンBで処理された遊離リンカー-薬物構築物を表すグラフである。カテプシンBアッセイは、25 mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 中で実施した。

【0033】

図5Aおよび5Bは、トリプシンの存在下でのNDCからの*in vitro*での薬物放出の代表的なHPLCプロファイルを示すグラフである。NDCは、トリプシンで処理し、次いで5分および120分後にHPLCにより分析した。データは、化合物2または3がC'ドットから放出されることを示す。トリプシンアッセイは、10 mMリン酸緩衝液 (pH 7.2) 中、37 °C で実施した。348 nmでのHPLC分析。

10

【0034】

【図5A】図5Aは、NDC6のHPLCプロファイルを示すグラフである。

【0035】

【図5B】図5Bは、NDC7のHPLCプロファイルを示すグラフである。

【0036】

図6Aおよび6Bは、酵素の存在下、NDCからの*in vitro*での薬物放出を表すグラフである。酵素反応を、HPLCにより348 nmで経時的にモニターした。トリプシンアッセイは、10 mMリン酸緩衝液 (pH 7.2) 中、37 °C で実施し；カテプシンBアッセイは、25 mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 中、37 °C で実施した。

20

【0037】

【図6A】図6Aは、トリプシンで処理されたC'ドット-(Cy5)-PEG-Phe-Arg-dPEG₂APdMG6の薬物放出を示すグラフである。

【0038】

【図6B】図6Bは、カテプシンBで処理されたC'ドット-(Cy5)-PEG-Phe-Lys-PABC-APdMG7の薬物放出を示すグラフである。

【0039】

【図7】図7は、ゲフィチニブ、C'ドット-(Cy5)-PEG-Phe-Arg-dPEG₂APdMG6およびC'ドット-(Cy5)-PEG-Phe-Lys-PABC-APdMG7で処理されたH1650細胞のウエスタンブロット分析を示す図である。細胞を、ゲフィチニブまたは指定されたNDCで、指示濃度で18時間、続いてEGF (50 ng/mL) で5分間処理した (pEGFR-リン酸化EGFR; tEGFR-全EGFR)。

30

【0040】

【図8】図8は、C'ドット-(Cy5)-PEG-Phe-Arg-dPEG₂-Gly-D-Tyr(¹³¹I)-APdMG8のラジオGPC (radioGPC) を示すグラフである。ピーク積分に基づいて>90%の放射化学的収率。より小さいピークは、残留遊離¹³¹Iと推定される。

40

【0041】

【図9A】図9Aおよび9Bは、放射性標識を付着するための薬物構成成分でD-チロシン残基を取り込むリンカー-薬物構築物、Phe-Arg-dPEG₂-D-Tyr-アミノプロピル-dMGおよびPhe-Lys-PABC-D-Tyr-アミノプロピル-dMG (化合物23および24) を示す図である。

【図9B】図9Aおよび9Bは、放射性標識を付着するための薬物構成成分でD-チロシン残基を取り込むリンカー-薬物構築物、Phe-Arg-dPEG₂-D-Tyr-アミノプロピル-dMGおよびPhe-Lys-PABC-D-Tyr-アミノプロピル-dMG (化合物23および24) を示す図である。

50

【0042】

【図10】図10は、ナノ粒子薬物コンジュゲート（NDC）からの酵素媒介性薬物放出を例示するスキーム1を示す図である。

【0043】

【図11】図11は、C'ドット - (Cy5) - PEG - mal がリンカー - 薬物構築物 Phe - Arg - dPEG₂APdMG₄およびPhe - Lys - PABC - APdMG₅と反応して、NDC C'ドット - (Cy5) - PEG - Phe - Arg - dPEG₂APdMG₆およびC'ドット - (Cy5) - PEG - Phe - Lys - PABC - APdMG₇を生じることを例示するスキーム2を示す図である。

【0044】

【図12】図12は、APdMG₁の合成プロセスを例示するスキーム3を示す図である。

【0045】

【図13】図13は、dPEG₂APdMG₂の合成プロセスを例示するスキーム4を示す図である。

【0046】

【図14】図14は、Phe - Arg - APdMG₃およびPhe - Arg - dPEG₂APdMG₄の合成プロセスを例示するスキーム5を示す図である。

【0047】

【図15】図15は、Phe - Lys - PABC - APdMG₍₅₎の合成プロセスを例示するスキーム6を示す図である。

【0048】

図16A～16Dは、mal - PEG - C'ドットならびにNDC₆および7の特徴付けを示す図である。

【0049】

【図16A】図16Aは、348nmでの分析的C₁₈逆相HPLCを示すグラフである。

【0050】

【図16B】図16Bは、TEM画像を示すグラフである。

【0051】

【図16C】図16Cは、吸光度および発光スペクトルを示すグラフである。

【0052】

【図16D】図16Dは、FCS相関曲線を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0053】

本開示の特徴および利点は、類似した参照文字が全体を通して対応する要素を同定する図面と併用すれば、以下に示す詳細な説明からより明らかになるであろう。図面において、類似した参照番号は一般に、同一の、機能的に類似した、かつ/または構造的に類似した要素を示す。

定義

【0054】

本開示がより容易に理解されるように、ある特定の用語をまず以下に定義する。本明細書を通して、以下の用語および他の用語のための追加的な定義が示される。

【0055】

本出願において、「または(or)」の使用は、別段の記述のない限り、「および/または(and/or)」を意味する。本出願で使用されるように、「含む(comprise)」という用語および用語の変形体、例えば「含むこと(comprising)」および「含む(comprises)」は、他の添加物、構成成分、整数またはステップを排除しないものとする。本出願で使用されるように、「約(about)」および「およそ(approximately)」という用語は均等語として使用される。約/およそを伴うかまたは伴わないで、本出願において使用される

10

20

30

40

50

任意の数値は、当業者によって理解される任意の正常な変動をカバーするものとする。

【0056】

ある特定の実施形態では、「およそ」または「約」という用語は、別段の記述がない限り、または文脈から別段明らかでない限り（そうした数が可能な値の100%を超える場合を除いて）、記述された参照値のいずれかの（それより大きいまたは小さい）方向に25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%またはそれ未満内に含まれる値の範囲を指す。

【0057】

「投与」という用語は、物質を対象中に導入することを指す。一般に、例えば、非経口（例えば、静脈内）、経口、局所、皮下、腹腔、動脈内、吸入、膣、直腸、鼻、脳脊髄液中への導入または身体区画（body compartments）への滴下注入を含む任意の投与経路を利用することができる。一部の実施形態では、投与は経口である。追加的にまたは代替的に、一部の実施形態では、投与は非経口である。一部の実施形態では、投与は静脈内である。

【0058】

「薬剤（agent）」という用語は、例えばポリペプチド、核酸、サッカリド、脂質、小分子、金属またはそれらの組合せを含む任意の化学的部類の化合物またはエンティティーを指す。文脈から明らかであるように、一部の実施形態では、薬剤は、細胞もしくは生物またはその画分、抽出物もしくは構成成分である、またはそれを含み得る。一部の実施形態では、薬剤は、それが自然界において見出されるかつ／またはそれから得られるという点で、天然産物であるまたはそれを含む。一部の実施形態では、薬剤は、人間の手の活動によって設計され、操作され、かつ／もしくは生産されるという点で人為的である、ならびに／または自然界では見出せない1つまたは複数のエンティティーであるまたはそれを含む。一部の実施形態では、薬剤は、単離された形態または純粋な形態で利用され得る。一部の実施形態では、薬剤は、粗製の形態で利用され得る。一部の実施形態では、潜在的な薬剤は、例えば、それらの中で活性薬剤を同定するまたは特徴付けるためにスクリーニングされ得るコレクションまたはライブラリーとして提供される。利用できる薬剤の一部の特定の実施形態には、小分子、抗体、抗体断片、アプタマー、siRNA、shRNA、DNA/RNAハイブリッド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、ペプチド、ペプチド模倣物、ペプチド核酸、小分子等が含まれる。一部の実施形態では、薬剤は、ポリマーであるまたはそれを含む。一部の実施形態では、薬剤は、少なくとも1つのポリマー部分を含有する。一部の実施形態では、薬剤は、治療薬、診断薬および／または薬物を含む。

【0059】

「ペプチド」または「ポリペプチド」という用語は、ペプチド結合によって一緒に連結した少なくとも2個（例えば、少なくとも3個）のアミノ酸のストリングを指す。一部の実施形態では、ポリペプチドは天然由来のアミノ酸を含み；代替的にまたは追加的に、一部の実施形態では、ポリペプチドは、1個または複数の非天然アミノ酸（すなわち、自然界では生じないが、ポリペプチド鎖中に取り込むことができる化合物；例えば、機能性イオンチャネル中に首尾よく取り込まれた非天然アミノ酸の構造を示す<http://www.cco.caltech.edu/~dadgrp/Unnatstruct.gif>を参照されたい）を含み、かつ／または当技術分野で公知のようなアミノ酸類似体を代替的に用い得る）。一部の実施形態では、タンパク質中のアミノ酸の1個または複数は、例えば、炭水化物基、リン酸基、ファルネシル基、イソファルネシル基、脂肪酸基、コンジュゲーション、官能化または他の修飾のため等のリンカーなどの化学的エンティティーの付加によって修飾され得る。

【0060】

本明細書で使用される「会合した（associated）」という用語は、一般に、十分に安定しており、したがってエンティティーが、関連する条件、例えば生理学的条件下で、物理的に近接して留まった構造を形成するように、直接的または間接的に互いに物理的に近接

10

20

30

40

50

する（例えば、連結剤としての役割を果たす1つまたは複数の追加のエンティティによって）、2つまたはそれ超のエンティティを指す。一部の実施形態では、会合した部分は互いに共有結合的に連結する。一部の実施形態では、会合したエンティティは共有結合的に連結しい。一部の実施形態では、会合したエンティティは、特異的な非共有結合相互作用によって互いに連結される（すなわち、それらの相互作用パートナーと使用の関連において存在する他のエンティティを識別する相互作用リガンド間の相互作用、例えばストレプトアビジン/アビジン相互作用、抗体/抗原相互作用などによって）。代替的にまたは追加的に、十分な数の、より弱い非共有結合相互作用は、部分が会合したまま留まるのに十分な安定性を提供することができる。例示的な非共有結合相互作用には、これらに限定されないが、静電相互作用、水素結合、親和性、金属配位、物理吸着、ホスト-ゲスト相互作用、疎水性相互作用、パイスタッキング相互作用、ファンデルワールス相互作用、磁気相互作用、静電相互作用、双極子-双極子相互作用等が含まれる。

10

【0061】

本明細書で使用される「生分解性」材料は、細胞中に導入された場合、細胞に対する重大な毒性効果を伴うことなく、細胞機構（例えば、酵素分解）または加水分解によって、細胞が再使用または廃棄できる構成成分へ分解されるものである。ある特定の実施形態では、生分解性材料の分解によって生成した構成成分は、炎症および/または*in vivo*での他の有害効果を誘発しない。一部の実施形態では、生分解性材料は酵素的に分解される。代替的にまたは追加的に、一部の実施形態では、生分解性材料は、加水分解によって分解される。一部の実施形態では、生分解性ポリマー材料は、分解してそれらの構成成分ポリマーになる。一部の実施形態では、生分解性材料（例えば生分解性ポリマー材料を含む）の分解には、エステル結合の加水分解が含まれる。一部の実施形態では、材料（例えば生分解性ポリマー材料を含む）の分解には、ウレタン連結の切断が含まれる。

20

【0062】

本明細書で使用される「機能的（functional）」生体分子は、それによって特徴付けられる特性および/または活性を示す形態の生体分子である。生体分子は、2つの機能（すなわち、二機能性）または多くの機能（すなわち、多機能性）を有し得る。

【0063】

本明細書で使用される「*in vitro*」という用語は、多細胞生物内ではなく、むしろ、人工的環境、例えば試験管または反応容器中、細胞培養物中等において起こる事象を指す。

30

【0064】

本明細書で使用される「*in vivo*」は、ヒトおよび非ヒト動物などの多細胞生物内において起こる事象を指す。細胞ベースの系の関連では、用語は、生きた細胞内で起こる事象（例えば*in vitro*での系とは対照的に）を指すために使用され得る。

【0065】

本明細書で使用される「画像化剤」という用語は、それと接合している薬剤（例えば、ポリサッカリドナノ粒子）の検出を容易にする、任意の元素、分子、官能基、化合物、それらの断片または部分を指す。画像化剤の例には、これらに限定されないが：種々のリガンド、放射性核種（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{18}F 、 ^{19}F 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{135}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{64}Cu 、 ^{187}Re 、 ^{111}In 、 ^{90}Y 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{177}Lu 、 ^{89}Zr 等）、蛍光色素（特定の例示的な蛍光色素については、以下を参照されたい）、化学発光剤（例えばアクリジニウムエステル（acridinum ester）、安定化されたジオキセタンなど）、生物発光剤、スペクトル的に分解可能な無機蛍光半導体ナノ結晶（すなわち、量子ドット）、金属ナノ粒子（例えば、金、銀、銅、白金等）ナノクラスター、常磁性金属イオン、酵素（酵素の具体的な例については、以下を参照されたい）、比色分析的標識（例えば、色素、コロイド金など）、ピオチン、ジゴキシゲニン（dioxigenin）、ハプテン、およびそのために抗血清またはモノクローナル抗体を利用できるタンパク質が含まれる。

40

【0066】

50

本明細書で使用される「ナノ粒子」という用語は、1000ナノメートル(nm)未満の直径を有する粒子を指す。一部の実施形態では、ナノ粒子は、全米科学財団(National Science Foundation)によって定義されるように、300nm未満の直径を有する。一部の実施形態では、ナノ粒子は、国立衛生研究所(National Institutes of Health)によってされるように、100nm未満の直径を有する。一部の実施形態では、ナノ粒子は、それらが、一般に、空間またはコンパートメントを取り囲み封入する(例えば、内腔を規定するため)両親媒性エンティティーから構成されるミセル膜によってバルク溶液から分離された、封入されたコンパートメントを含むという点でミセルである。一部の実施形態では、ミセル膜は、例えば生体適合性および/または生分解性ポリマーなどの少なくとも1つのポリマーから構成される。

10

【0067】

本明細書で使用される「対象」という用語は、ヒトおよび哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ブタ、ネコ、イヌおよびウマ)を含む。多くの実施形態では、対象は、哺乳動物、具体的には霊長類、特にヒトである。一部の実施形態では、対象は、畜牛、ヒツジ、ヤギ、雌ウシ、ブタなどの家畜;ニワトリ、カモ、ガチョウ、シチメンチョウなどの家禽;ならびに家畜化された動物、特にイヌおよびネコなどのペットである。一部の実施形態では(例えば、特に研究関連において)、対象哺乳動物は、例えば齧歯動物(例えば、マウス、ラット、ハムスター)、ウサギ、霊長類または近交系ブタなどのブタなどである。

【0068】

本明細書で使用される「治療(treatment)」という用語は(「治療する(treat)」または「治療すること(treating)」も)、特定の疾患、障害および/または状態を、部分的にもしくは完全に緩和、改善、軽減(relieve)、阻害する、その発症を遅延させる、その重症度を軽減させる、ならびに/または、特定の疾患、障害および/または状態の1つまたは複数の症状、特徴および/もしくは原因の発生を減少させる物質の任意の投与を指す。そうした治療は、関係する疾患、障害および/もしくは状態の兆候を示さない対象、ならびに/または疾患、障害および/もしくは状態の初期兆候だけしか示さない対象の治療であってよい。代替的にまたは追加的に、そうした治療は、関係する疾患、障害および/または状態の1つまたは複数の確立された兆候を示す対象の治療であってよい。一部の実施形態では、治療は、関係する疾患、障害および/または状態を患っていると診断されている対象の治療であってよい。一部の実施形態では、治療は、関係する疾患、障害および/または状態の発現のリスクの増大と統計的に相関のある1つまたは複数の易罹患性(susceptibility)因子を有していることが公知である患者の治療であってよい。

20

30

詳細な説明

【0069】

本明細書で、ある特定の実施形態では、非毒性でマルチモダリティーの、臨床的に証明されている、共有結合的に付着した薬物分子/部分を有するシリカベースのナノ粒子プラットフォームを含むナノ粒子薬物コンジュゲート(NDC)を説明する。ナノ粒子薬物コンジュゲート(NDC)は、画像化能力、および腎臓を介して効率的にクリアにする標的化リガンドを実証する。さらに、コンジュゲートは、がん検出、防止および/または治療のための治療剤を包含する。例えば、特異的な受容体チロシンキナーゼ(RTK)阻害剤を含有するNDCが合成されており、それらは、制御されかつ予測可能な仕方で薬物化合物を放出することが実証されている。さらに、ウエスタンブロット分析は、細胞中での低減されたRTKリン酸化レベルを示しており、これは、in vitroでのNDCベースの薬物送達を示唆している。

40

【0070】

一部の実施形態では、シリカベースのナノ粒子プラットフォームは、モジュラー機能(modular functionality)の範囲でのサブ10nm範囲まで小さく制御可能な直径を有する蛍光性の有機シリカコアシェル粒子である極小ナノ粒子すなわち「Cドット」を含む。Cドットは、米国特許第8298677B2号「Fluorescent silica-based nanoparticles」、米国特許公開第2013/0039848A1号「Fluorescent silica-based nanop

50

articles」および米国特許公開第2014/0248210A1号「Multimodal silica-based nanoparticles」に記載されている。これらの内容を、それらの全体において、参照により本明細書に組み込む。コアのシリカマトリックス中へ組み込まれるものは、区別できるその光学的特性を提供するCy5、5などの近赤外色素分子である。コアを取り囲むものは、シリカの層またはシェルである。シリカ表面は、水性条件および生物学的に関連した条件での安定性を増進させるために、シリル-ポリエチレングリコール(PEG)基で共有結合的に修飾されている。これらの粒子は、*in vivo*で評価され、主にそれらのサイズおよび不活性表面に起因して、優れたクリアランス特性を示す。Cドットに組み込まれる追加的な機能の中には、外科的用途およびがんにおける黒色腫検出のためのリンパ節の可視化におけるそれらの使用を可能にする、化学センシング、非光学的(PET)画像コントラストおよび*in vitro*/*in vivo*での標的化能力がある。

【0071】

Cドットは、それらの物理的特性ならびに実証されているヒトの*in vivo*特徴に起因して、薬物送達のための独特のプラットフォームを提供する。これらの粒子は、極めて小さく、所望のクリアランスおよび薬物動態特性を維持しながら、腫瘍内微小環境におけるEPR効果により利益を受ける。この目的を達成するために、本明細書では、ある特定の実施形態では、薬物構築物がCドット(または他のナノ粒子)に共有結合的に付着するナノ粒子薬物送達系が説明される。薬物送達のためのCドットベースのNDCは、良好な生体内安定性を提供し、時期尚早の薬物放出を最小化し、生物活性化合物の制御放出を示す。ある特定の実施形態では、ペプチドベースのリンカーは、NDC用途に使用される。抗体およびポリマーの関連において、これらのリンカーは、*in vitro*と*in vivo*の両方で安定であり、リソソームプロテアーゼによる酵素触媒加水分解に依存する、高度に予想可能な放出動力学を有している。例えば、リソソーム中での高度に発現したプロテアーゼであるカテプシンBは、巨大分子からの薬物放出を容易にするために利用することができる。巨大分子の主鎖と薬物分子の間に短いプロテアーゼ感受性ペプチドを組み込むことによって、酵素の存在下での薬物の制御放出を得ることができる。

【0072】

ある特定の実施形態では、NDCは、極めて小さく(例えば、約5nm~約10nm(例えば、約6nm)の平均直径を有する)、例えば薬物放出がプロテアーゼによって触媒される場合、酵素感受性リンカーを利用する。一例では、ゲフィチニブ、重要な表皮性増殖因子受容体変異体(EGFR^{mt+})-チロシンキナーゼ阻害剤(TKI)がん薬は、修飾され、粒子上に取り込まれた。得られるNDCは優れた*in vitro*での安定性、溶解性を示し、EGFR^{mt+}-発現NSCLC細胞において活性であることが証明されている。

【0073】

ある特定の実施形態では、NDCは、例えば特定の組織型(例えば、特定の腫瘍)を標的とする1つまたは複数の標的化部分を含む。標的部分を有するNDCは、腫瘍細胞における薬物の内部移行を増進させる(例えば、標的化リガンドは腫瘍細胞上の受容体と結合し、かつ/または薬物を腫瘍細胞中に送達する(例えば、高い透過性によって))。例えば、追加的な標的化部分(例えば、cRGD)を有する粒子治療薬を作り出すために、シリカナノ粒子を、cRGDY-PEGコンジュゲートとマレイミド二官能化PEGの混合物に添加する。マレイミド二官能化PEGは、薬物-リンカーコンジュゲートの追加的な付着を支援してセラノスティック産物を作り出す。

【0074】

一部の実施形態では、極小粒子は、PET標識および/または光学的プローブと会合し得る。ナノ粒子は、標的部位での薬物蓄積を評価するために、*in vivo*で観察することができる(例えば、PETによって)。例えば、PET標識を有するナノ粒子(例えば、薬物物質なしで)を最初に投与し得る。次いで、*in vivo*でのナノ粒子のPET画像を分析することによって、腫瘍中の薬物(例えば、ナノ粒子とコンジュゲートされた)の濃度および蓄積速度を推定し得る。用量は、個人化された薬を提供するための得ら

10

20

30

40

50

れた推定値（例えば、患者の体重よりむしろ腫瘍サイズ）に基づいて決定され得る。一部の実施形態では、放射性標識化された薬物を、*in vivo*で追跡することができる。高度に濃縮された化学療法薬物は、それが標的化されていない場合、危険である可能性がある。一部の実施形態では、光学的プローブ（例えば、フルオロフォア）を有するナノ粒子を、腫瘍の手術中の画像化（例えば、組織／腫瘍の表面が曝露されている場合）および／またはバイオプシーのために使用し得る。

【0075】

治療剤およびナノ粒子を、別個に、放射性標識化するまたは光学的に標識化することができ、これは、治療剤およびナノ粒子の独立したモニタリングを可能にする。一実施形態では、放射性フッ素化された（すなわち、 ^{18}F ）ダサチニブを、NHSEステル連結によって、ナノ粒子に付着されたPEG-3400部分とカップリングさせる。放射性フッ素は、放射性ヨウ素化C24I）蛍光性（Cy5）ナノ粒子からの薬物の分布および放出の時間依存性の変化を独立にモニターできるようにするのに非常に重要である。この仕方

10

【0076】

NDICは、分子リンカーを介して、Cドットナノ粒子（または他のナノ粒子）に共有結合的に付着する薬物化合物である。ある特定の実施形態では、リンカーは、細胞のリソソーム中で主に見出される酵素であるトリプシン（調節酵素）および／またはカテプシンBに対して感受性のペプチド（例えば、ジペプチド）配列を組み込む。2つの部類のリンカー化学に関連する実験を、制御された薬物放出のために本明細書で説明する（1つはリンカーと薬物の間にアミド結合を取り込むことであり；もう1つはリンカーと薬物の間に分解可能な部分を利用することである）。一部の実施形態では、リンカーは、特定の条件下、例えばタンパク分解性加水分解でナノ粒子（例えば、Cドット）から薬物を放出するように設計される。

20

【0077】

使用できる薬物の例は、ダサチニブおよびゲフィチニブなどのRTK阻害剤を含み、これらは、ヒトまたはネズミ起源の原発性腫瘍細胞（例えば、ヒト患者の脳腫瘍外植片からの高悪性度の神経膠腫、ニューロスフェアの遺伝子操作されたマウスモデル）および／または非神経起源の腫瘍細胞株によって発現された、血小板由来の増殖因子受容体（PDGFR）またはEGFR mt^+ を標的とすることができる。ダサチニブおよびゲフィチニブ類似体は、活性結合部位を規定する基本的な化学構造を乱すことなく、いくつかのリンカーへの共有結合的な付着を可能にするように合成することができる。

30

【0078】

合成アプローチが確認され、所望のリンカー-薬物構築物およびNDICが得られた。NDIC特徴付けおよび酵素放出アッセイのためのHPLC/LCMS法も開発された。*in vitro*での酵素薬物放出アッセイによって、NDIC設計における多くの重要な構造的要因が明らかになった。例えば、Cドットとリンカーの間の間隔を、異なるサイズのPEG鎖を使用して変化させると、酵素触媒薬物放出を可能にするために、Cドットとリンカーの間の十分な間隔が重要であることが明らかになった。同様に、リンカーと薬物の間の間隔が、酵素媒介性放出に重要であることも判明した。さらに、リンカーと薬物の間に分解可能な部分を利用するリンカー設計は、簡単なアミド結合を使用した場合より、大幅に速い放出動力学を示した。一部の実施形態では、分解可能な部分は、酵素的に切断かつ／または活性化することができる炭水化物および／または任意のリンカーであってよい。

40

【0079】

細胞ベースのアッセイも実施した。ダサチニブまたはゲフィチニブ類似体のいずれかを組み込んだリンカー-薬物構築物およびNDICを、原発性脳腫瘍細胞（ニューロスフェア

50

）および／または脳に転移している腫瘍細胞株（例えば、肺、扁平上皮がん）に対してテストした。E G F R m t + のリン酸化レベルは、N D Cならびに遊離リンカー - 薬物構築物に曝露された細胞株において低下または消失し、N D Cは、いくつかの場合、ネイティブな薬物（native drug）より強力な阻害活性を示した。

【 0 0 8 0 】

一態様では、薬物部分がリンカー部分を介してナノ粒子に共有結合的に連結する、薬物部分、リンカー部分およびナノ粒子を含むナノ粒子薬物コンジュゲート（N D C）を本明細書で説明する。ある特定の実施形態では、N D Cは、リンカー部分と薬物部分の間にアミド結合および／または分解可能な部分を含む。ある特定の実施形態では、リンカー部分はペプチド（例えば、ジペプチド）を含む。ある特定の実施形態では、リンカー部分は、プロテアーゼが結合するとC末端での加水分解をもたらし、それによってナノ粒子から薬物部分を放出する。ある特定の実施形態では、薬物部分は、受容体チロシンキナーゼ（R T K）阻害剤（例えば、薬物部分の活性結合部位の基本的な化学構造を乱すことなく、リンカー部分への付着をもたらすように修飾された、その任意の類似体、例えばその任意の薬学的および／または治療的均等物を含むダサチニブまたはゲフィチニブ）を含む。ある特定の実施形態では、ナノ粒子はより新しい世代のCドットまたはC'ドットである。別の態様では、本発明は、本明細書で説明する実施形態のいずれかのN D Cの投与および／または検出を含む、疾患（例えば、がん）の検出、防止および／または治療の方法を対象とする。

【 0 0 8 1 】

ナノサイズの薬物送達ビヒクルは、（１）体全体および細胞内のトラフィックを可能にする、それらの小さなサイズ；（２）カーゴ搭載および放出を可能にする、それらの高い表面積対体積比；ならびに（３）溶解性を増進させ、結合を制御し、生物学的に活性な機能を取り込む、それらの調節可能な表面化学に起因して、魅力的なものである。

【 0 0 8 2 】

i n v i v oでのナノ粒子薬物送達は、粒子の取り込み（オプソニン化）、排出（腎臓）または非特異的な損失（血管外漏出）を引き起こし、治療ペイロードが所望の細胞に到達するのを妨げる可能性がある、多くの生物物理学および生化学的課題に満ちている。薬物送達構築物の主要パラメーターの１つはその物理的サイズであり、より小さい粒子（例えば、約5 nm未満またはそれに等しい流体力学直径の粒子）は、非特異的に血管外遊出する（extravasate）ことができるが、ずっと大きい粒子または凝集体（例えば、約500 nm超もしくはそれに等しい直径の粒子または凝集体）は、それらの意図された標的ヘトラフィックされるのではなくむしろ微小血管系中に留まる可能性がある。非生分解性材料については、所望の薬物動態を可能にするために腎臓クリアランスの速度を制限しながら、粒子除去の手段としての腎臓濾過を可能にする、5 nm ~ 10 nmの範囲の好ましい直径が存在することが見出されている。さらに、このサイズレジームの粒子は、強化された透過性および保持（E P R）効果、すなわち、漏れやすい脈管構造に起因した腫瘍内微小環境における巨大分子の受動的蓄積を利用することもできることが見出された。

【 0 0 8 3 】

例えば、ある特定の実施形態では、極小（例えば、5 nm ~ 10 nmの範囲の直径を有する）のものを、その全体において、参照により本明細書に組み込まれる米国特許公開第2014/0248210A1号に記載されているようにしてヒトにおいてテストした。この例では、5人の患者において有害事象は見られず、薬剤は、試験期間にわたって十分に許容されるものであった。組織1グラム当たりの注射用量のパーセンテージ（% I D / g）対注射後の時間、および対応する平均臓器吸収用量で表された薬物動態挙動は、他の一般に使用される診断用放射性トレーサーで見出されるものに匹敵していた。この代表的な患者の一連のP E T画像化は、主要な臓器および組織からの推定される血液プール活性の漸進的な損失を示し、注射後（p . i .）72時間で感知できるほどの活性は見られなかった。これらの患者における全身クリアランス半減時間は、13 ~ 21時間の範囲であ

ると推定された。興味深いことに、多くの疎水性分子、タンパク質およびより大きい粒子プラットフォーム（10 nm超）とは対照的に、肝臓、脾臓、または骨髄における顕著な局在化は見られなかった。患者は、甲状腺組織取り込みをブロックするためにヨウ化カリウム（KI）で予備処置されたが、この患者では、他の組織と比べて、より高い平均吸収甲状腺用量が得られた。粒子は、やはり主に、腎臓と膀胱壁の両方で腎臓によって排出され（甲状腺および腫瘍の後、以下を参照されたい）、これは、72時間p.i.までで最も高い%ID/g値の1つを示している；腎臓で排出される放射性医薬品によくあるように、膀胱壁は、他の主要臓器および組織よりも高い平均吸収用量を受けた。これらの発見は、肝胆道よりむしろ、腎臓の排出が、体からのクリアランスの主な経路である事実を強調している。

10

【0084】

表皮性増殖因子受容体（EGFR）が、標的療法のために使用される。構成的活性化をもたらすEGFR変異は、転移性非小細胞肺癌（NSCLC）の10～35%において見出されており、EGFR阻害剤は全身性疾患に対しては効果的であるが、脳転移の制御は、薬物送達によって制限されたままである。EGFR変異は、原発性多形性膠芽腫（GBM）（2つの高頻度に見られる形態の脳がん）の40～50%においても見出される。ゲフィチニブなどのEGFR-チロシンキナーゼ阻害剤（TKI）は、前臨床設定において有望さが示されているが、それらは、多分、不十分な組織または中枢神経系（CNS）浸透および用量制限毒性のため、脳がん患者においてはほとんど効果のないことが実証されている。

20

【0085】

ゲフィチニブは、EGFRのキナーゼドメイン活性部位と結合しそれを阻害する。ND Cとの関連でゲフィチニブを利用するためには、キナーゼドメインとの薬物の結合をそれほど乱さない化学的に反応性基を取り込むことが重要である。X線結晶学的試験およびSAR試験によって、モルホリノ基をアミンで置き換えても、薬物活性をそれほど変えることはないが、修飾のための必要化学的機能（アミン）が提供され、結果として、CドットまたはC'ドットへの共有結合的な付着をもたらされることが明らかになった（図1A）。

【実施例】

【0086】

1つの実施例は、ナノ粒子薬物コンジュゲート（例えば、共有結合的に付着した薬物分子を有するシリカベースのナノ粒子プラットフォーム）の例示的な合成ならびにそれらの特徴付けおよび予備的な生物学的評価を実証する。

30

【0087】

商業的に入手可能なdes-モルホリノ-ゲフィチニブ（dMG）を用いて、所望のアミノプロピル-dMG（APdMG）を、Boc保護されたアミノプロピルブロミドの求核置換（例えば、1ステップで）、続く酸脱保護によって得た（図1A、図10（スキーム1））。さらに、以下でさらに詳細に説明されるゲフィチニブ類似体2は、Fmoc-dPEG2-COOHをカップリングさせ、続く塩基脱保護ステップによって1から容易に得られた（図1A、図11（スキーム2））。APdMG1およびdPEG₂APdMG2が、EGFRに対する活性を保持していることを確認するために、H1650細胞を化合物で処理し、ウエスタンブロットにより分析してEGFR中のホスホ-Tyr¹⁶⁸レベルを評価した。H1650細胞は、受容体の構成的活性をもたらす変異EGFR（L858RおよびE746-A750）を含有する、モデルヒト腫瘍由来の非小細胞肺癌（NSCLC）系統（気管支肺胞上皮癌）である。両方の化合物は、1および10 μMの濃度でのホスホ-Tyr¹⁶⁸の阻害で、ゲフィチニブと同様の効果を示したが、dPEG₂APdMG2は低減した活性を示した。

40

【0088】

3つのリンカータイプを、Cドットベースの薬物送達について検討した（図1B～1D）。3つのリンカータイプは、薬物放出のためにプロテアーゼを利用するジペプチド配列

50

を含む。プロテアーゼはジペプチドを認識してそれと結合し、C末端で加水分解をもたらし、リンカーから薬物構成成分を放出する。本明細書で説明するリンカー-薬物構築物を評価するために、2つのモデルプロテアーゼ、トリプシンおよびカテプシンBを使用した。トリプシンは、代表的なセリンプロテアーゼとして選択した。これは、アルギニンおよびリシンなどの塩基性アミノ酸を含有するペプチドに対して高度に活性であり、これらの残基に対するC末端を切断する。カテプシンBは、よりストリンジェントな基質特異性を有するシステインプロテアーゼである。今まで記載されている最小の基質コンセンサス配列は、疎水性および塩基性残基を含有するジペプチドモチーフである。トリプシンと同様に、カテプシンBは、塩基性アミノ酸に対するC末端を切断する。ジペプチドのフェニルアラニン-アルギニン(Phe-Arg)およびフェニルアラニン-リシン(Phe-Lys)は、トリプシンおよびカテプシンについてのトリプシン/カテプシンB認識モチーフであり、これらはリンカー-薬物構築物中に含まれる(図1B~D)。

10

【0089】

Phe-Arg-APdMGは、プロテアーゼ感受性リンカー-薬物構築物を得るためのアプローチの一例である(図2Aおよび2B)。そうした設計では、ゲフィチニブ類似体1を、ジペプチド配列のC末端に直接付着させる。化合物3を、固相ペプチド合成(SPPS)法を使用して合成し、続く2でのC末端の修飾および最終脱保護ステップによって3を得た(図11(スキーム3))。

【0090】

薬物構成成分のジペプチドモチーフへの近接近を考慮し、酵素が結合し、リンカー-薬物を加水分解するのを妨害する可能性がある、潜在的な立体的問題に対処した。ペプチドと薬物の間の距離を増大させるために、APdMG1を修飾してdPEG₂APdMG2を得た(図13(スキーム4))。ジペプチド構成成分とdPEG₂APdMG2の間のカップリング反応、続く脱保護ステップによって、Phe-Arg-dPEG₂APdMG4(Phe-Argとゲフィチニブ類似体の間の10個の原子の短いPEGスペーサーを含有するリンカー-薬物構築物)を得た。

20

【0091】

APdMG1に対する構造的変化を導入することなく、ジペプチドと薬物構成成分の間の大きい間隔を保持するために、Phe-Lys-PABC-APdMG5を合成した。このリンカーは、ペプチドと薬物の間に自壊性(self-immolative)パラ-アミノベンジルオキシカルバメート(PABC)基を取り込む(図1Dおよび2A~2C)。酵素的加水分解されると、この基は、さらに分解してパラ-アミノベンジルアルコールとCO₂になり、それによって、APdMGを放出する。化合物5の合成はFmoc-Lys(Mtt)-OHで始まる(図13(スキーム6))。保護されたアミノ酸は、パラ-アミノベンジルアルコールで修飾されてFmoc-Lys(Mtt)-PABA18をもたらす。Fmoc基が除去され、Fmoc-Phe-OHとカップリングすると、保護されたジペプチド、Fmoc-Phe-Lys(Mtt)-PABA19が形成される。次いで、-PABAの遊離ヒドロキシル基は、パラ-ニトロフェノールカーボネートクロリドで活性化され、活性化されたカーボネート20をもたらす。次いで、これはAPdMG1と反応し、化合物21をもたらす。一連の脱保護およびカップリングの後、化合物22が得られた。最終脱保護ステップは、酸性条件を必要とした。しかし、パラ-アミノベンジルオキシカルバメート基自体は、そうした条件下(例えば、酸性条件)で、分解の影響を受けやすい。十分に穏やかな条件(例えば、0.5% TFA)により、リンカーを保持しながら、リシンからMtt基および末端チオールからMmt基が除去され、所望の生成物16が得られることが分かった。リシン側鎖をマスキングするMtt基は、パラ-ニトロフェノールカーボネートクロリドの存在下で安定であるが、穏やかな酸性条件下での除去に対して不安定であるので、この全般的な合成アプローチに非常に適している。これは、パラ-ニトロフェノールカーボネートクロリドの存在下で容易に除去された、リシン側鎖保護のための、より一般的に使用される、非常に変化しやすい(hyper-labile)Mmt基とは対照的である。

30

40

50

【0092】

3つのリンカー-薬物構築物を評価するために、化合物3～5を酵素的加水分解にかけた(表1、図3A～3C、4Aおよび4B)。薬物-リンカー構築物を、トリプシンまたはカテプシンBのいずれかでインキュベートし、反応を、HPLCまたはLCMSでモニターした。トリプシンは3つすべての構築物に対して活性であった：60分までに、APdMG1をもたらすPhe-Arg-APdMG3の完全な加水分解が観察され；完全な、Phe-Arg-dPEG₂APdMG4からのdPEG₂APdMG2の放出、およびPhe-Lys-PABC-APdMG5からのAPdMG1の放出のためには10分間しかかからなかった。しかし、構築物をカテプシンBで処理した場合、Phe-Arg-APdMG3については、加水分解は観察されなかったが、Phe-Arg-dPEG₂APdMG4は完全に加水分解されて、dPEG₂APdMG2の放出がもたらされた。

10

【0093】

以下の表1は、リンカー-薬物構築物についての薬物放出アッセイによって得られた半減期を例示する。

【表1】

表1

基質	トリプシン $t_{1/2}$ ^a (分)	カテプシンB $t_{1/2}$ ^a (分)
Phe-Arg-APdMG (3)	9	NH
Phe-Arg-dPEG ₂ APdMG (4)	2	110
Phe-Lys-PABC-APdMG (5)	1	1

20

NH - 加水分解なし

^a 348nmでのHPLCによって決定して、リンカーまたは粒子から、薬物の50%が放出された時間。

【0094】

薬物放出プロファイルを得るために化合物3～5について*in vitro*でのアッセイを実施し、構築物の酵素媒介性加水分解を、異なる時間点にわたってモニターした(図4Aおよび4B)。Phe-Arg-APdMG3については、薬物APdMG1の50%は9分間で放出されたが、Phe-Arg-dPEG₂APdMG4は50%薬物放出について、2分間以内で、著しく速かった。化合物5もやはり速く、50%薬物放出のために1分未満しか必要としなかった。カテプシンBの存在下で、薬物放出が観察されなかったので、Phe-Arg-APdMG3は不十分な基質であることが判明した。Phe-Arg-dPEG₂APdMG4については、薬物の50%が110分間で放出された。Phe-Lys-PABC-APdMG5は50%薬物のためには<1分間しか必要とせず、それが、酵素のための非常に効率的な基質であることを示唆している。

30

【0095】

トリプシンとカテプシンBの両方について、3つのリンカー-薬物構築物についての薬物放出の速度は、同じ一般的傾向にしたがっている：Phe-Lys-PABC-APdMG5 > Phe-Arg-dPEG₂APdMG4 > Phe-Arg-APdMG3 (最も速い方から最も遅い方へ)。Phe-Arg-APdMG3およびPhe-Arg-dPEG₂APdMG4についての結果は、薬物のジペプチド単位への近接が、酵素活性および薬物放出に影響を及ぼすことを示唆している。薬物とジペプチドの間隔(距離)が、10個の原子のPEG基の取り込みを介して増大した場合、加水分解(薬物放出)は増進する。この効果は、構築物3を加水分解することができない、カテプシンBで最も顕著に観察される。しかし、薬物とジペプチド4の間に10個の原子のPEGスパーサーを取り込むことによって、加水分解および薬物放出が観察される。

40

【0096】

50

NDCを調製するために、マレイミド官能化C'ドット(C'ドット-(Cy5)-PEG-mal)を合成した。Cy5フルオロフォアで修飾されたシランを調製し、NH₄OHの希釈溶液中へ、テトラメチルオルトシラン(TMOS)と一緒に、滴定し(モル比TMOS: Cy5: NH₃: H₂Oは1: 0.001: 0.44: 1215である)、24時間混合した(Urata C、Aoyama Y、Tonegawa A、Yamauchi Y、Kuroda K. Dialysis process for the removal of surfactants to form colloidal mesoporous silicananoparticles. Chem Commun (Camb). 2009年; (34巻): 5094~6頁)(Yamada H、Urata C、Aoyama Y、Osada S、Yamauchi Y、Kuroda K. Preparation of Colloidal Mesoporous Silica Nanoparticles with Different Diameters and Their Unique Degradation Behavior in Static Aqueous Systems. Chem. Mater. 2012年; 24巻(8号): 1462~71頁)(Wang J、Sugawara-Narutaki A、Fukao M、Yokoi T、Shimajima A、Okubo T. Two-phase synthesis of monodisperse silicananospheres with amines or ammonia catalyst and their controlled self-assembly. ACS Appl Mater Interfaces. 2011年; 3巻(5号): 1538~44頁)。これは、Cy5カプセル化されたシリカ粒子をもたらし、その表面を、PEG-シラン(500 g/モル)(Suzuki K、Ikari K、Imai H. Synthesis of silica nanoparticles having a well-ordered mesostructured using a double surfactant system. J Am Chem Soc. 2004年; 126巻(2号): 462~3頁)およびマレイミド-PEG-シラン(1: 2.3: 0.006のモル比PEG-シラン: TMOS: mal-PEG-シラン)での処理によって、さらに、マレイミド基でPEG化し、官能化した。48時間後、反応混合物を透析し、濾過し、ゲル濾過により精製した。ナノ粒子を、それぞれ直径、形態および全体的純度について蛍光相関分光法(FCS)、透過電子顕微鏡法(TEM)および分析的HPLCによって特徴付けした。得られたC'ドットは10 nm未満の直径であり、狭い粒径分布を有していた(図16A~16D)。

【0097】

リンカー-薬物4および5(例えば、C'ドット-(Cy5)-PEG-Phe-Arg-dPEG₂APdMG(6)およびC'ドット-(Cy5)-PEG-Phe-Lys-PABC-APdMG(7))を取り込んだNDCを、Phe-Arg-dPEG₂APdMG(4)およびPhe-Lys-PABC-APdMG(5)をC'ドット-(Cy5)-PEG-malに加えて、構築物上の末端チオールを粒子上のマレイミド基と反応させることによって得た(スキーム2)。NDC生成物を単離した後、ゲル濾過により精製してNDC6および7を得、TEMおよびHPLCによって特徴付けした(図16Aおよび図16B)。分析的HPLCを、夾雑物の存在を評価し、また、粒子当たりの薬物分子の数または薬物と粒子の比(DPR)を決定するために使用した(表2)。ゲフィチニブ類似体の濃度は、348 nmで容易に測定することができ、粒子濃度は、C'ドット内に包埋されたCy5のため、650 nmで得ることができる。平均DPRは中程度であることが分かったが、NDCは、DPR推定値が1未満から15超の範囲にある測定可能な不均一性を示した。ゲフィチニブ類似体の不十分な溶解性のため予想されるように、NDCの沈殿は観察されなかった。FCSを、リンカー-薬物コンジュゲーションに起因した粒子サイズの変化を評価するために使用した。表2に示すように、NDCは、ベースのmal-C'ドットにわたって、最小の直径の増大を示した。

【0098】

以下の表2は、ナノ粒子特徴付けの概要を例示する。

【表 2】

表2

粒子	直径 ^a (nm)	DPR 平均 ^b (範囲)
C'ドット-(Cy5)-PEG-Mal	6.3	—
C'ドット-(Cy5)-PEG-Phe-Arg-dPEG ₂ APdMG (6)	6.4	5 (1-15)
C'ドット-(Cy5)-PEG-Phe-Lys-PABC-APdMG (7)	6.5	2 (1-15)

DPR - 薬物と粒子の比

^a FCSによって決定^b HPLCによって決定

【0099】

経時的な酵素依存性薬物放出を、C'ドット-(Cy5)-PEG-Phe-Arg-dPEG₂APdMGおよびC'ドット-(Cy5)-PEG-Phe-Lys-PABC-APdMGについて測定して、*in vitro*での薬物放出プロファイルを得た(図6Aおよび6B)。トリプシンでの薬物放出を実証する代表的なHPLCデータを図5Aおよび5Bに示す。NDC6および7は、トリプシンのための優れた基質であり、50%薬物放出を達成するのに、それぞれ44分間および6分間を必要とした(図6A、表1)。

カテプシンBの存在下で、放出動力学は、両方のNDCについて著しく遅く：薬物放出の50%は、NDC6について560分間、NDC7について510分間で達成された(図6B、表1)。一緒にすると、データは、薬物構成成分の制御放出をもたらす、粒子表面上のリンカー-薬物構築物の接近可能性(accessibility)を実証している。

【0100】

NDCの安定性を、水性条件において、酸性および中性のpH(5.0および7.2)下、37℃で評価した。NDC6とNDC7はどちらも、HPLCで測定して、48時間で分解または薬物放出を示さなかった。*in vivo*で起こり得る逆マイケル反応またはチオール交換反応の可能性に起因した抗体薬物コンジュゲートからのリンカー-薬物構築物の損失が観察されたため、チオール-マレイミドベースのコンジュゲーションの精査を招くこととなった。過剰なチオールの存在下でのNDCの*in vitro*での安定性を評価するために、NDC7を、30mMのグルタチオン(glutathione)で、37℃、pH7.2で48時間インキュベートした。リンカー-薬物の5%未満が、48時間後にC'ドットから分離された(表4)。

【0101】

以下の表3は、リンカー-薬物構築物についての薬物放出アッセイによって得られた半減期を例示する。

【表 3】

表3

基質	トリプシン $t_{1/2}$ ^a (分)	カテプシンB $t_{1/2}$ ^a (分)
C'ドット-(Cy5)-PEG-Phe-Arg-dPEG ₂ APdMG (6)	44	560
C'ドット-(Cy5)-PEG-Phe-Lys-PABC-APdMG (7)	6	510

^a 薬物の50%がリンカーまたは粒子から放出された時間。HPLCによって決定。

【0102】

以下の表4は、NDC安定性データを例示する。

10

20

30

40

【表 4】

表4

粒子	pH 5.2 ^a 48 時間	pH 7.2 ^b 48 時間	グルタチオン ^c 48 時間	媒体 18 時間
NDC 6	約 1%	約 2%	約 5%	< 5%
NDC 7	約 6%	約 2%	約 4%	< 1%

^a 25mM酢酸ナトリウム緩衝液^b 50mMリン酸緩衝液^c 50mMリン酸緩衝液中の10mMグルタチオン(還元型)^d DEM、無血清、細胞処理後18時間

10

【0103】

C'ドット-(Cy5)-PEG-Phe-Arg-dPEG₂APdMGおよびC'ドット-(Cy5)-PEG-Phe-Lys-PABC-APdMGの生物学的活性を、H1650細胞の処理、続く、EGFRにおけるホスホ-Tyr¹⁶⁸のウエスタンブロットによる検出によって評価し、ゲフィチニブと比較した。血清飢餓細胞を各化合物と18時間にわたってインキュベートし、次いでEGF刺激にかけた。ゲフィチニブ対照は、EGFRのTyr¹⁶⁸リン酸化の用量依存的減少を示し、1μMで完全に消失した(図7)。NDC6および7も用量依存的阻害を示し; NDC6で処理された細胞は、10μMで検出可能なレベルのホスホ-Tyr¹⁶⁸を示した。対照的に、NDC7は良好な活性を示し、100nMでホスホ-Tyr¹⁶⁸は大幅に減少しており、1μMのNDC濃度で完全に消失している。時期尚早の薬物放出が起こり、ホスホ-Tyr¹⁶⁸EGFRの減少が観察され得る可能性があることを所与として、これらのアッセイで使用したNDCの安定性をモニターした。H1650細胞を18時間で処理するために使用したNDC6または7(10μM)を含む一定分量の媒体をHPLCで分析した。媒体中に遊離薬物が検出されず、NDCは損なわれていなかったため、両方の粒子はこれらの条件下で安定であることが証明された(表3)。NDC6および7に加えて、最終的なin vivoでの試験のための二次的画像化モダリティ(secondary imaging modality)の組み込みを検討した。Phe-Arg-dPEG₂-D-Tyr-アミノプロピル-dMGを有するリンカー-薬物構築物を、放射性標識を付着させるために、薬物構成成分でD-チロシン残基を取り込んで合成した(化合物23および24)。NDC C'ドット-(Cy5)-PEG-Phe-Arg-dPEG₂-D-Tyr-APdMGを調製し、¹³¹Iを用いて、>90%の放射化学的純度で首尾よく放射性ヨウ化した(図8)。

20

30

試薬:

【0104】

商業的供給源から購入した溶媒および試薬は、さらに精製することなく使用した。アセトニトリル、ジエチルエーテル、ジメチルホルムアミド(DMF)、酢酸エチル、ヘキサン、ヘキサフルオロイソプロパノール(HFIP)、メタノール、塩化メチレン(DCM)およびトリフルオロ酢酸(TFA)は、Fisherから得た。ジメチルスルホキシド(DMSO)、ジイソプロピルエチルアミン(DIEA)、トリエチルアミン(TEA)、炭酸カリウム、N-(tert-ブチルオキシカルボニル)-アミノプロピルブロミド、(3-アミノプロピル)トリエトキシシラン(APTES)、(3-メルカプトプロピル)トリメトキシシラン(MPTMS)、テトラメチルオルトケイ酸塩(TMOS)、ウシトリプシンは、Sigma-Aldrichから購入した。O-Des-モルホリノプロピルゲフィチニブは、Toronto Research Chemicals(TRC)から得た。2-(7-アザ-1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート(HATU)はGenescryptから購入した。クロロトリチル樹脂および保護されたアミノ酸(Fmoc-Arg-OH、Fmoc-Lys(Mtt)-OH、Fmoc-Phe-OH)は、EMD Chemicalsから得た。Fmoc-N-dPEG₂OH、Mmt-S-dPEG₈-

40

50

OH、mal-dPEG₁₂-NHSは、Quanta Biosciencesから購入した。Cy5マレイミドおよびSuperdex 200（分取グレード）はGE Life Sciencesから得た。DMSO-dおよびCDCl₃は、Cambridge Isotopesから購入した。固相合成は、Torviiqからのポリプロピレンフリットシリンジ中で実施した。シリカ、TLCプレート、4 g、12 g、24 gおよび40 gのRediSep Rf順相カートリッジは、Teledyne ISCOから得た。

フラッシュクロマトグラフィー：

【0105】

順相（シリカゲル）精製は、4 g、12 g、24 gおよび40 gカートリッジを使用してTeledyne ISCO CombiFlash Rfで実施した。

10

分析的HPLC：

【0106】

試料は、5～95%アセトニトリル水溶液（0.5% TFA）の直線勾配を使用して、1.2 mL / 分で10分間、C4またはC18のいずれか 4.6 x 50 mm逆相XBridge分析のカラム（Waters）で、Waters Alliance HPLCシステムまたはAutopure LCMSシステム（2767サンプルマネージャ、2996フォトダイオードアレイ検出器、2420ELS検出器、Micromass ZQ、2525バイナリーグラジエントモジュール、カラムフルイデックスオーガナイザー、515HPLCポンプ、ポンプ制御モジュールII）で実行した。試料は、348 nm

20

または650 nmのいずれかで分析した。

分取HPLC：

【0107】

試料は、5～95%アセトニトリル水溶液（0.5% TFA）の直線勾配を使用して、20 mL / 分で30分間、C18 19 x 150 mm逆相XBridge分取カラム（Waters）で、Waters分取システム（2996フォトダイオードアレイ検出器、2545バイナリーグラジエントモジュール）またはAutopure LCMSシステムのいずれかで精製した。試料は、220 nmまたは348 nmのいずれかで分析した。

核磁気共鳴（NMR）；

【0108】

¹H-NMRおよび¹³C-NMRデータはBruker Ultrashield 500 Plusで得た。

30

トリプシンでの薬物放出アッセイ：

【0109】

アッセイは、25 μMのNDC（例えば、6または7）または遊離リンカー-薬物（例えば3、4または5）および200 nMトリプシンを用いて、25 mMリン酸緩衝液（pH 7.2）中、37 °Cで実施した。分析のため、70 μLの分量を取り出し、指定された時間点（例えば、5、15、30、60、120分間またはそれ超）で、酸（HCl）でクエンチし、次いでHPLC / LCMSで実行した。NDCは水中、4 °Cで貯蔵した。トリプシンストック液は以下の通り調製した：1 mgのトリプシンを1 mL水に溶解し、一定分量にし、次いで直ちに急速冷凍し、-80 °Cで、最大で4週間貯蔵した。薬物放出アッセイの前に、酵素活性を、基質Z-Arg-Arg-パラ-ニトロ-アニリンを使用してテストした。遊離薬物%（図3およびS3）は、遊離薬物の量を、リンカー-薬物構築物またはNDCのためにロードされた薬物の初期量で除したものである。遊離薬物の量は、348 nmでの放出された薬物に対応するHPLCピークの面積により決定される。ロードされた薬物の量は、酵素処理前のリンカー-薬物構築物またはNDCについての348 nmでのHPLCピークの面積である。Cy5-PEG-malは348 nmでバックグラウンド吸光度を有するため、NDCについてのバックグラウンドサブトラクションが必要である。すべての緩衝液および溶液は、超純水（18 MΩ-cmの抵抗率）を使用して調製した。

40

50

カテプシン B での薬物放出アッセイ：

【 0 1 1 0 】

アッセイは、25 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 中、37 °C で、25 μM NDC (例えば、6 または 7) または遊離リンカー - 薬物 (例えば、3、4 または 5) および 200 nM カテプシン B を用いて実施した。DTT は、このアッセイには使用しなかった。分析のために、70 μL の分量を取り出し、指定された時間点 (例えば、5、15、30、60、120 分間またはそれ超) で、酸 (HCl) でクエンチし、次いで HPLC / LCMS で実行した。NDC は水中、4 °C で貯蔵した。カテプシン B ストック液は以下の通り調製した：1 mg のカテプシン B を 1 mL の 50 mM 酢酸ナトリウムおよび 2.5 mM EDTA に溶解し、一定分量にし、次いで直ちに急速冷凍し、-80 °C で数週間貯蔵した。薬物放出アッセイの前に、酵素活性を、基質 Z-Arg-Arg-パラ-ニトロ-アニリンを使用してテストした。遊離薬物 % (図 4A、4B、6A および 6B) は、上記段落で説明したように、遊離薬物の量を、リンカー - 薬物構築物または NDC のためにロードされた薬物の初期量で除したものである。すべての緩衝液および溶液は、超純水 (18 MΩ-cm の抵抗率) を使用して調製した。

NDC 安定性アッセイ：

【 0 1 1 1 】

アッセイは、25 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) または 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) 中、7.5 μM NDC (例えば、6 または 7) を用いて実施し、37 °C で最大で 48 時間インキュベートした。リン酸緩衝液 (pH 7.2) 中で 10 mM グルタチオン (還元型) も評価した。次いで 20 μL の一定分量を HPLC で分析した。1つの実験について、H1650 細胞を、無血清 DEM 中で、10 μM NDC で 18 時間処理 (以下のホスホEGFR アッセイを参照されたい) した後、媒体を回収し、HPLC で分析した。

H1650 細胞でのホスホEGFR アッセイ：

【 0 1 1 2 】

H1650 細胞を、2 mL の 10% FBS DEM 培地を含む 6 ウェルプレート中で播種し (150 万個の細胞)、24 時間成長させた。細胞を 1 mL の無血清 DEM 培地で洗浄し、次いで Gefitinib または NDC で、指示濃度で終夜 (18 時間) インキュベートした。次いで、細胞を 50 ng/mL EGFR 抗体で 5 分間処理し、次いで 1 mL の PBS で洗浄した。トリプシン (0.5 mL、0.25%) を各ウェルに加え、細胞が脱離するまで (約 5 分間) インキュベートした。1 mL の 10% FBS DEM 培地をウェルに加え、細胞を、10 mL の 10% FBS DEM 培地を含有した 15 mL 円錐管に移した。細胞を、4 °C、3000 rpm で 5 分間遠心沈殿させた。細胞ペレットを 1 mL の冷 PBS で洗浄し、1.5 mL チューブに移し、遠心沈殿させた。PBS をデカントし、70 μL の RIPA (プロテアーゼおよびホスファターゼ阻害剤を含有する) をペレットに加え、すり混ぜ (titrated)、氷上で 10 分間インキュベートした。チューブを、4 °C で、最高速度で 10 分間回転させた。溶解物を新しい 1.5 mL チューブに移し、-80 °C で貯蔵した。タンパク質濃度を、ブラッドフォードアッセイによって決定した。ウェスタンブロットを、Novex 8% トリス-グリシンゲル (1.5 mm x 15 ウェル)、トリス-グリシン SDS ランニング緩衝液、NuPAGE トランスファー緩衝液、1x TBS 洗浄緩衝液中の 0.1% Tween-20、およびブロッキング緩衝液としての洗浄緩衝液中の 5% 乳汁を使用して、Life Technologies 装置で実行した。一次抗体は以下のようにして適用した：抗リン酸化-EGFR (pEGFR、Tyr¹⁰⁶⁸) (1:1000 希釈; Cell Signaling)、抗EGFR (D38B1) (1:5000 希釈; Cell Signaling)、モノクローナル抗-アクチンクローン AC-15 (1:5000 希釈; Sigma-Aldrich)。適用された二次抗体は、ヤギ抗マウス IgG-HRP (1:10000 希釈; Santa Cruz Biotechnology) およびヤギ抗ウサギ IgG-HRP (1:5000 希釈; Santa Cruz Biotechnology) であった。

O - d e s - モルホリノ - ゲフィチニブ、d M G の調製 (図 1 2 (スキーム 3) の 8) :
【 0 1 1 3 】

化合物は商業的に得た。

【 0 1 1 4 】

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d6): 9.69 (s, 1H), 9.47 (s, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.22 (dd, J = 6.9, 2.7Hz, 1H), 7.84 (ddd, J = 9.1, 4.4, 2.7 Hz, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.41 (t, J = 9.1Hz, 1H), 7.22 (s, 1H), 3.98 (s, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d6):

155.83, 153.91, 151.89, 146.73, 146.20, 122.74, 121.69, 116.50, 116.33, 109.51, 107.18, 105.25, 55.92. $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{ClFN}_3\text{O}_2$ (正確な質量 319.1) についての ESI-MS (m/z): [M+H]⁺ 計算値 320.1、実測値 320.2。

N - (t e r t - ブチルオキシカルボニル) - アミノプロピル - d M G の合成 (図 1 2 (スキーム 3) の 9) :

【 0 1 1 5 】

500 mg の化合物 8 を、100 mL の無水 DMF に溶解した。K₂CO₃ (mg、mmol) を溶液に加えた。反応を 60 で 16 時間進行させ、TLC および / または HPLC でチェックした。溶媒を真空中で除去し、褐色油状物を得、これを、DCM ~ DCM 中の 20% MeOH の直線勾配を使用して、24 g の Redi Sep Rf 順相カートリッジでフラッシュ精製した。最終生成物を、白色固体 (312 mg、62% 収率) として単離した。

【 0 1 1 6 】

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d6): 9.57 (s, 1H), 8.49 (s, 1H), 8.12 (dd, J = 6.8, 2.7 Hz, 1H), 7.81 (m, 1H), 7.44 (t, J = 9.1 Hz, 1H), 7.20 (s, 1H), 6.92 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 4.17 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.15 (q, J = 6.5 Hz, 2H), 1.95 (p, J = 6.5Hz, 2H), 1.38 (s, 9H). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d6): 156.01, 155.59, 154.39, 152.61, 146.92, 123.40, 122.29, 118.62, 116.54, 116.37, 107.23, 102.59, 77.51, 66.69, 55.84, 37.22, 35.75, 28.95, 28.22. $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{ClFN}_4\text{O}_4$ (正確な質量 476.2) についての ESI-MS (m/z): [M+H]⁺ 計算値 477.2、実測値 477.3。

アミノプロピル - O - d e s - モルホリノ - ゲフィチニブ、A P d M G の調製 (図 1 A および図 1 2 (スキーム 3) の 1) :

【 0 1 1 7 】

化合物 9 (100 mg、0.21 mmol) を 1 mL TFA : 水 (9 : 1) で 30 分間処理した。TFA : 水を真空中で除去し、薄黄色油状物を得た。油状物をジエチルエーテルで洗浄し、次いで水 : アセトニトリル (1 : 1) の溶液に溶解し、凍結させ、凍結乾燥した。黄褐色固体を得た (TFA 塩、98 mg、95% 収率)。

【 0 1 1 8 】

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d6): 10.73 (s, 1H), 8.80 (s, 1H), 8.03 (s, 1H), 8.05 - 8.00 (m, 1H), 7.88 (s, 3H), 7.72 (ddd, J = 9.0, 4.3, 2.6 Hz, 1H), 7.54 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 7.35 (s, 1H), 4.27 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.04 (p, J = 6.7, 6.3 Hz, 2H), 2.13 (dt, J = 12.2, 6.0 Hz, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d6): 158.02, 148.80, 116.96, 116.79, 107.60, 103.66, 66.17, 56.42, 36.39, 26.59. $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{ClFN}_4\text{O}_2$ (正確な質量 376.1) についての ESI-MS (m/z): [M+H]⁺ 計算値 377.1、実測値 377.2。

9 - フルオレニルメトキシカルボニル - N - アミド - d P E G₂ - アミノプロピル - d M G、Fmoc - d P E G₂ A P d M G の調製 (図 1 3 (スキーム 4) の 10) :

【 0 1 1 9 】

DMF (500 μL) 中に d P E G₂ A P d M G 2 (25 mg、0.05 mmol、TFA 塩) および Fmoc - N - アミド - d P E G₂ - COOH (20 mg、0.05 mmol) を含有する溶液を調製した。DIEA (19 mg、0.15 mmol、26 μL)、続いて、DMF (100 μL) 中の HATU (19 mg、0.05 mmol) の溶液を

10

20

30

40

50

加えた。反応を室温で30分間進行させ、完了をLCMSで決定した。真空中で体積を減少させ、酢酸エチルおよび酢酸エチル中の10%メタノールの勾配を使用してシリカゲルクロマトグラフィーによって精製した。画分を集め、プールし、溶媒を真空中で除去した。単離された生成物は白色固体(84%収率)であった。

【0120】

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): 9.55 (d, J = 10.7 Hz, 1H), 8.51 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 8.18 - 8.07(m, 1H), 7.96 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 7.87 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.83 - 7.76 (m, 2H), 7.67 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.49 - 7.36 (m, 3H), 7.31 (td, J = 7.5, 1.2 Hz, 3H), 7.21 (s, 1H), 4.28 (d, J = 6.9 Hz, 2H), 4.24 - 4.10 (m, 3H), 3.94 (s, 3H), 3.60 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.46 (s, 4H), 3.36 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 3.27 (q, J = 6.6 Hz, 2H), 3.10 (q, J = 5.9 Hz, 2H), 2.32 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 1.97 (p, J = 6.5 Hz, 2H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃): 170.08, 143.85, 127.54, 126.98, 125.10, 120.05, 102.60, 69.42, 69.04, 66.78, 66.58, 55.87, 46.69, 40.01, 39.94, 39.85, 39.77, 39.68, 39.60, 39.51, 39.43, 39.35, 39.25, 39.18, 39.07, 39.01, 36.16, 35.69, 28.67, 0.08. C₄₀H₄₁ClFN₅O₇ (正確な質量757.27) について
のESI-MS (m/z): [M+H]⁺ 計算値758.3、実測値758.4。
アミノ-dPEG₂-アミノプロピル-dMG、dPEG₂APdMGの調製(図1Aおよび図13(スキーム4)の2):

【0121】

化合物10(10mg、0.013mmol)を、DMF(1mL)中の30%ピペリジンに溶解し、室温で15分間反応させた。溶媒を真空中で除去し、水/アセトニトリルに溶解し、逆相(C18)HPLCで精製した。生成物を白色粉末(7mg、80%収率)として回収した。

【0122】

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): 10.66 (s, 1H), 8.78 (s, 1H), 8.05 - 7.97 (m, 3H), 7.80 (s, 3H), 7.72 (ddd, J = 9.0, 4.3, 2.6 Hz, 1H), 7.54 (t, J = 9.1 Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 4.20 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.65 - 3.48 (m, 7H), 3.27 (q, J = 6.6 Hz, 2H), 2.96 (q, J = 5.5 Hz, 2H), 2.34 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 1.98 (t, J = 6.5 Hz, 2H). ¹³C-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): 116.96, 69.55, 69.29, 66.73, 66.61, 56.38, 38.57, 36.03, 35.63, 28.58. C₂₅H₃₁ClFN₅O₅ (正確な質量535.20) について
のESI-MS (m/z): [M+H]⁺ 計算値536.2、実測値536.3。

Boc-N-アミノ-(dPEG₂)₃-Phe-Arg(Pbf)-OHの調製(図14(スキーム5)の11):

【0123】

クロロトリチル樹脂(100mg、0.1mmol、1mmol/g)をフリットシリンジ反応容器に移し、2mL無水DCM中に10分間懸濁させた。溶媒を分注し、無水DCM中のDIEAの溶液、続いて無水DCM中のFmoc-Arg(Pbf)-OH(97.5mg、1.5当量)の溶液をシリンジ中に抜き取り; 40分間攪拌した。溶液を分注し、樹脂を2分間、DCMで2x、次いでDMFで2x洗浄した。標準的な固相ペプチド合成手順を実施して最終ペプチドを得た。手短に言えば、Fmoc脱保護を、30%ピペリジン/DMF(1mL)を使用して樹脂を、2x、10分間洗浄して遂行した。これに、4x、それぞれ2分間のDMF(1mL)洗浄が続いた。カップリング反応を、次の順番でシリンジに加えられた、3当量過剰の保護されたアミノ酸(2mL DMF中)、9当量過剰のDIEA(120mg、0.9mmol、160μL、1mL DMF中)、3当量過剰のHATU(mmol、mg、μL、2mL DMF中)を使用して室温で実施し、1時間振とうさせた。これに、4x、それぞれ2分間のDMF(1mL)洗浄が続いた。Fmoc-Phe(116mg)、続いてFmoc-N-dPEG₂-OHの3つの残基(120mg)を加えた。配列、最終Fmoc脱保護および洗浄が完了した後、2mLのDMF中のBOC無水物(mmol、mg)およびDIEA(mmol、mg、

10

20

30

40

50

μL) を使用して N 末端アミンをキャップした。ペプチド - 樹脂を DMF (1 mL、2 分間、2 x)、次いで DCM (1 mL、2 分間、4 x) で洗浄した。次いで、DCM (2 mL) 中の 50% HFIP をシリンジに加え、室温で 1 時間振とうさせることによって、保護されたペプチド生成物を樹脂から切り離した。次いで粗製ペプチドを逆相 HPLC で精製した。 $\text{C}_{54}\text{H}_{86}\text{N}_8\text{O}_{17}\text{S}$ (正確な質量 1150.56) についての ESI-MS (m/z): $[\text{M} + \text{H}]^+$ 計算値 1151.6、実測値 1151.7。

Boc-N-アミド-(dPEG₂)₃-Phe-Arg(Pbf)-APdMG の調製 (図 14 (スキーム 5) の 12):

【0124】

DMF (1 mL) 中に化合物 11 (23 mg、0.02 mmol、1 当量) および APdMG1 (9 mg、0.024 mmol、1.2 当量) を含有する溶液を調製した。続いて、この DIEA (10 mg、0.08 mmol、14 μL 、4 当量) に HATU (9 mg、0.024 mmol、1.2 当量) を加えた。反応を HPLC でモニターし、30 分間以内で完了した。溶媒を真空中で除去し、次いで DCM 中に再懸濁させた。DCM 溶液を水 4 x で洗浄し、次いで蒸発させて黄褐色油状物を得た。 $\text{C}_{72}\text{H}_{102}\text{ClFN}_{12}\text{O}_{18}\text{S}$ (正確な質量 1508.68) についての ESI-MS (m/z): $[\text{M} + \text{H}]^+$ 計算値 1509.7、実測値 1509.7; $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$ 計算値 755.4、実測値 755.0。

Boc-N-アミド-(dPEG₂)₃-Phe-Arg(Pbf)-dPEG₂APdMG の調製 (図 14 (スキーム 5) の 13):

【0125】

DMF (1 mL) 中に化合物 11 (30 mg、0.026 mmol、1 当量) および dPEG₂APdMG2 (18 mg、0.034 mmol、1.3 当量) を含有する溶液を調製した。続いて、この DIEA (14 mg、0.1 mmol、18 μL 、4 当量) に、HATU (13 mg、0.034 mmol、1.3 当量) を加えた。反応を HPLC でモニターし、30 分間以内で完了した。溶媒を真空中で除去し、次いで DCM 中に再懸濁させた。DCM 溶液を水 4 x で洗浄し、次いで蒸発させて黄褐色油状物を得た。 $\text{C}_{79}\text{H}_{115}\text{ClFN}_{13}\text{O}_{21}\text{S}$ (正確な質量 1667.77) についての ESI-MS (m/z): $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$ 計算値 834.9、実測値 834.7。

H₂N-(dPEG₂)₃-Phe-Arg-APdMG の調製 (スキーム 6 の 14):

【0126】

TFA/水 (9:1、1 mL) を化合物 12 (前のステップから約 0.02 mmol) に加え、室温で 1 時間放置した。反応物を蒸発させ、次いで ACN/水に溶解し、凍結させ、凍結乾燥して黄褐色固体を得た。粗製物を逆相 HPLC で精製した。最終生成物を白色固体 (14 mg) として得た。 $\text{C}_{54}\text{H}_{78}\text{ClFN}_{12}\text{O}_{13}$ (正確な質量 1156.55) についての ESI-MS (m/z): $[\text{M} + \text{H}]^+$ 計算値 1157.6、実測値 1157.8; $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$ 計算値 579.3、実測値 579.1。

H₂N-(dPEG₂)₃-Phe-Arg-(dPEG₂)-APdMG の調製 (図 14 (スキーム 5) の 15):

【0127】

TFA/水 (9:1、1 mL) を化合物 13 (前のステップから約 0.026 mmol) に加え、室温で 1 時間放置した。反応物を蒸発させ、次いで ACN/水に溶解し、凍結させ、凍結乾燥して黄褐色固体を得た。粗製物を逆相 HPLC で精製した。最終生成物を白色固体 (24 mg) として得た。 $\text{C}_{61}\text{H}_{91}\text{ClFN}_{13}\text{O}_{16}$ (正確な質量 1315.64) についての ESI-MS (m/z): $[\text{M} + \text{H}]^+$ 計算値 1316.7、実測値 1316.5; $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$ 計算値 658.6、実測値 658.5。

S-アセチル-メルカプトアセトアミド-(dPEG₂)₃-Phe-Arg-APdMG の調製 (図 14 (スキーム 5) の 16):

【0128】

DMF (200 μL) 中に化合物 14 (5 mg、0.004 mmol、1 当量) および

10

20

30

40

50

DIEA (1.5 mg、0.012 mmol、2 μ L、3 当量) を含有する溶液を調製した。次いで、DMF (100 μ L) 中のSAMA-OPfp (2 mg、0.006 mmol、1.5 当量) を溶液に加え、1 時間反応させた。溶媒を真空中で除去し、次いで逆相HPLCで精製した。3 mgの白色固体を回収した。 $C_{61}H_{91}ClFN_{13}O_{16}$ (正確な質量1315.64) についてのESI-MS (m/z): $[M+H]^+$ 計算値1316.7、実測値1316.5; $[M+2H]^2+$ 計算値658.6、実測値658.5。

S-アセチル-メルカプトアセトアミド-(dPEG₂)₃-Phe-Arg-dPEG₂APdMGの調製(図14(スキーム5)の17):

【0129】

10

DMF (200 μ L) 中に化合物15 (5 mg、0.004 mmol、1 当量) およびDIEA (1.5 mg、0.012 mmol、2 μ L、3 当量) を含有する溶液を調製した。次いで、DMF (100 μ L) 中のSAMA-OPfp (2 mg、0.006 mmol、1.5 当量) を溶液に加え、1 時間反応させた。溶媒を真空中で除去し、次いで逆相HPLCで精製した。3 mgの白色固体を回収した。 $C_{65}H_{95}ClFN_{13}O_{18}S$ (正確な質量1431.63) についてのESI-MS (m/z): $[M+2H]^2+$ 計算値716.8、実測値716.7。

メルカプトアセトアミド-(dPEG₂)₃-Phe-Arg-APdMG、Phe-Arg-APdMGの調製(図1Bおよび図14(スキーム5)の3):

【0130】

20

このステップを、使用する直前に実施した。1 mgの化合物16を、100 μ Lの水/MeOH (1:1) に溶解し、それに、2 μ Lの1N NaOHを加えた。15分後、2 μ Lの1M HClを加えて中和した。溶液を直接使用した。 $C_{56}H_{80}ClFN_{12}O_{14}S$ (正確な質量1230.53) についてのESI-MS (m/z): $[M+H]^+$ 計算値1231.5、実測値1231.4; $[M+2H]^2+$ 計算値616.3、実測値616.3。

メルカプトアセトアミド-(dPEG₂)₃-Phe-Arg-dPEG₂APdMG、Phe-Arg-dPEG₂APdMGの調製(図1Cおよび図14(スキーム5)の4):

【0131】

30

このステップを、使用する直前に実施した。1 mgの化合物17を、100 μ Lの水/MeOH (1:1) に溶解し、それに、2 μ Lの1N NaOHを加えた。15分後、2 μ Lの1M HClを加えて中和した。溶液を直接使用した。 $C_{63}H_{93}ClFN_{13}O_{17}S$ (正確な質量1389.62) についてのESI-MS (m/z): $[M+H]^+$ 計算値1390.6、実測値1390.5; $[M+2H]^2+$ 計算値695.8、実測値695.7。

Fmoc-Lys(Mtt)-PABOHの調製(図15(スキーム6)の18):

【0132】

DMF (5 mL) 中のFmoc-Lys(Mtt)-OH (748 mg、1.2 mmol、1 当量) およびパラ-アミノベンジルアルコール (300 mg、2.4 mmol、2 当量) の溶液を調製した。DIEA (465 mg、3.6 mmol、630 μ L、3 当量)、続いてDMF (2 mL) 中のHATU (502 mg、1.3 mmol、1.1 当量) の溶液を加えた。HPLC/LCMSで決定して、反応は30分以内に完了した。溶媒を真空中で部分的に除去し、酢酸エチル/水で抽出した。酢酸エチル層を水で4 \times 洗浄し、次いで蒸発させてオレンジ色固体を得た。粗製物を、ヘキサンおよび酢酸エチルの直線勾配を使用して、40 gのRediSep Rf順相カートリッジで精製した。最終生成物を、白色固体 (850 mg、97% 収率) として単離した。

【0133】

40

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 7.96 (s, 1H), 7.73 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.54 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.47 - 7.41 (m, 6H), 7.39 - 7.20 (m, 12H), 7.18 - 7.11 (m, 2H), 7

50

.05 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 5.29 (s, 1H), 4.63 (s, 1H), 4.44 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.28 (s, 3H), 2.11 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 1.88 (s, 1H), 1.58 (s, 5H), 1.51 (s, 1H), 1.38 (s, 2H). ^{13}C -NMR (500 MHz, CDCl_3): 146.36, 143.22, 141.32, 135.70, 128.57, 128.52, 128.49, 127.79, 127.74, 127.12, 126.14, 124.92, 120.16, 120.02, 77.27, 77.02, 76.76, 70.62, 64.92, 60.41, 47.16, 43.30, 30.57, 23.43, 21.07, 20.93, 14.21, 0.01. $\text{C}_{48}\text{H}_{47}\text{N}_3\text{O}_4$ (正確な質量 729.36) についての ESI-MS (m/z): $[\text{M} + \text{H}]^+$ 計算値 730.4、実測値 730.2。

Fmoc-Phe-Lys(Mtt)-PABOH の調製 (図 15 (スキーム 6) の 19) :

【0134】

Fmoc 基を、9 mL の DMF 中の 30 % ピペリジンを使用して 10 分間、Fmoc-Lys(Mtt)-PABOH 18 (425 mg、0.6 mmol、1 当量) から除去した。溶媒を真空中で除去し、得られた油状物を 10 mL の DMF に再懸濁させた。DMF (5 mL) 中の Fmoc-Lys(Mtt)-OH (748 mg、1.2 mmol、1 当量) およびパラ-アミノベンジルアルコール (300 mg、2.4 mmol、2 当量) の溶液を調製した。DIEA (465 mg、3.6 mmol、630 μL 、3 当量)、続いて DMF (2 mL) 中の HATU (502 mg、1.3 mmol、1.1 当量) の溶液を加えた。HPLC/LCMS で決定して、反応は 30 分以内に完了した。溶媒を真空中で部分的に除去し、酢酸エチル/水で抽出した。酢酸エチル層を水で 4 \times 洗浄し、次いで蒸発させてオレンジ色固体を得た。粗製物を、ヘキサンおよび酢酸エチルの直線勾配を使用して、40 g の Redi Sep Rf 順相カートリッジで精製した。最終生成物を、白色固体 (850 mg、97 % 収率) として単離した。

【0135】

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) 8.20 (s, 1H), 7.73 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.50 (s, 2H), 7.48 - 7.34 (m, 8H), 7.34 - 7.20 (m, 11H), 7.20 - 7.07 (m, 7H), 7.04 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 6.28 (s, 1H), 5.22 (s, 1H), 4.62 (s, 2H), 4.43 (dd, $J = 10.7, 6.7$ Hz, 1H), 4.32 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 3.05 (s, 2H), 2.27 (s, 3H), 2.11 - 2.02 (m, 2H), 1.89 (s, 1H), 1.46 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H), 1.26 (s, 2H). ^{13}C -NMR (500 MHz, CDCl_3) 146.35, 141.31, 136.97, 135.70, 129.10, 128.93, 128.57, 128.50, 127.82, 127.74, 127.71, 127.39, 127.12, 126.14, 124.91, 124.84, 120.10, 120.04, 77.28, 77.23, 77.02, 76.77, 70.60, 67.15, 64.96, 54.06, 47.08, 43.35, 31.30, 30.60, 23.52, 20.93. $\text{C}_{57}\text{H}_{56}\text{N}_4\text{O}_5$ (正確な質量 876.43) についての ESI-MS (m/z): $[\text{M} + \text{H}]^+$ 計算値 877.4、実測値 877.3。

Fmoc-Phe-Lys(Mtt)-PABC-APdMG の調製 (図 15 (スキーム 6) の 21) :

【0136】

化合物 19 (420 mg、0.5 mmol、1 当量) を、無水 DCM (20 mL) に溶解した。ピリジン (216 mg、2.7 mmol、5.4 当量)、続いて無水 DCM 中の 4-ニトロフェニルクロロホルメート (180 mg、0.9 mmol、1.8 当量) の溶液を加えた。反応を室温で 2 時間進行させ、次いで HPLC および TLC でチェックした。溶媒を真空中で除去し、次いで、ヘキサンおよび酢酸エチルの直線勾配を使用して 24 g の Redi Sep Rf 順相カートリッジで精製した。生成物 Fmoc-Phe-Lys(Mtt)-PABC-pNP (20) を、黄色固体 (360 mg、70 % 収率) として単離した。Fmoc-Phe-Lys(Mtt)-PABC-pNP (50 mg、0.05 mmol、1 当量) を、無水 DCM (3 mL) に溶解した。次いで、無水 DCM 中の APdMG 1 (25 mg、0.05 mmol、TFA 塩、1 当量) の DIEA (65 mg、0.5 mmol、90 μL 、10 当量) との溶液を Fmoc-Phe-Lys(Mtt)-PABC-pNP に加えた。反応を室温で 4 時間進行させ、次いで HPLC および TLC でチェックした。溶媒を真空中で除去し、粗製物を、ヘキサンおよび酢酸エチルの直線勾配を用いて、4 g の Redi Sep Rf 順相カートリッジで精製した。最終生成物

を、黄色固体 (3 8 m g 、 6 0 % 収率) として単離した。 $C_{76}H_{72}ClFN_8O_8$ (正確な質量 1 2 7 8 . 5 1) についての E S I - M S (m / z) : [M + H] ⁺ 計算値 1 2 7 9 . 5 、実測値 1 2 7 9 . 4 ; [M + 2 H] ²⁺ 計算値 6 4 0 . 3 、実測値 6 4 0 . 3 。

M m t - S - d P E G ₈ - P h e - L y s (M t t) - p A B C - d M G の調製 (図 1 5 (スキーム 6) の 2 2) :

【 0 1 3 7 】

1 8 m g の化合物 2 1 (0 . 0 1 4 m m o l 、 1 当量) を、 2 m L の D M F 中の 3 0 % ピペリジンで脱保護した。 5 分後、 H P L C / L C M S により、反応が完了していることを確認し、溶媒を真空中で除去した。得られた油状物を、 D M F (0 . 5 m L) に溶解し、それに、 M m t - S - d P E G ₈ - C O O H (1 3 m g 、 0 . 0 1 7 m m o l 、 1 . 2 当量) および D I E A (9 m g 、 0 . 0 7 0 m m o l 、 1 3 μ L 、 5 当量) を加えた。 D M F (2 0 0 μ L) 中の H A T U (6 m g 、 0 . 0 1 4 m m o l 、 1 . 2 当量) の溶液を調製し、反応物に加えた。 1 時間後、 H P L C / L C M S により、反応は完了していると思われ、溶媒を真空中で除去した。残留した油状物を、 D C M ~ D C M 中の 1 0 % M e O H の直線勾配を使用して、 4 g の R e d i S e p R f 順相カートリッジでフラッシュ精製した。最終生成物を、白色固体 (2 3 m g 、 9 2 % 収率) として単離した。 $C_{100}H_{114}ClFN_8O_{16}S$ (正確な質量 1 7 6 8 . 7 7) についての E S I - M S (m / z) : [M + 2 H] ²⁺ 計算値 8 8 5 . 9 、実測値 8 8 6 . 0 。

H S - d P E G ₈ - P h e - L y s - P A B C - アミノプロピル - d M G の調製 (図 1 5 (スキーム 6) の 5) :

【 0 1 3 8 】

1 0 m g の化合物 2 2 (5 . 6 μ m o l) を、 2 m L の D C M 中の 0 . 5 % T F A / 5 % T I S で 2 時間処理し、次いで H P L C / L C M S でチェックして、脱保護の完了を確認した。溶液を真空中で除去し、次いで冷エーテルで 3 × 洗浄した。白色固体を、水 / アセトニトリル (1 : 1) に溶解し、凍結させ、凍結乾燥した。得られた白色固体を、さらに精製することなく使用した (6 m g 、 8 6 % 収率) 。 $C_{60}H_{82}ClFN_8O_{15}S$ (正確な質量 1 2 4 0 . 5 3) についての E S I - M S (m / z) : [M + H] ⁺ 計算値 1 2 4 1 . 5 、実測値 1 2 4 1 . 6 ; [M + 2 H] ²⁺ 計算値 6 2 1 . 3 、実測値 6 2 1 . 3 。

C ' ドット - (C y 5) - P E G - マレイミドの調製 :

【 0 1 3 9 】

マレイミドおよび N H S エステル官能化ポリエチレングリコール (m a l - d P E G ₁₂ - N H S) を、 D M S O 中、アミノシラン (A P T E S) でコンジュゲートした (モル比 m a l - P E G - N H S : A P T E S : D M S O 1 : 0 . 9 : 6 0) 。反応混合物を、窒素下、室温で 4 8 時間放置してシラン官能化された m a l - d P E G (m a l - d P E G - A P T E S) を生成した。マレイミド官能化 C y 5 (m a l - C y 5) を、 D M S O 中で、チオール - シラン (M P T M S) と反応させた (モル比 C y 5 : M P T M S : D M O S 1 : 2 5 : 1 1 5 0) 。反応物を、窒素下、室温で 2 4 時間放置してシラン官能化 C y 5 (C y 5 - M P T M S) を生成した。次いで、 T M O S および C y 5 - M P T M S を、水酸化アンモニウム (ammonia hydroxide) 溶液 (約 p H 8) に滴定した (モル比 T M O S : C y 5 : N H 3 : H 2 O 1 : 0 . 0 0 1 : 0 . 4 4 : 1 2 1 5) 。溶液を、 6 0 0 r p m で、室温で 2 4 時間攪拌して、均一な C y 5 カプセル化されたシリカナノ粒子を形成させた。次いで、 m a l - d P E G - A P T E S およびシラン官能化ポリエチレングリコール (P E G - シラン、 M W およそ 5 0 0 、 G e l e s t) を合成溶液に加えて、粒子をペグ化し、表面官能化させた (P E G - シラン : T M O S : m a l - P E G - A P T E S 1 : 2 . 3 : 0 . 0 0 6) 。溶液を 6 0 0 r p m 、室温で 2 4 時間攪拌し、次いで、攪拌なしで、 8 0 ° でさらに 2 4 時間インキュベートした。溶液を、 2 0 0 0 m L の脱イオン水中で 2 日間透析し (1 0 k M W C O) 、 2 0 0 n m シリンジフィルターで濾過し、最後にクロマトグラフィーで精製 (S u p e r d e x 2 0 0) して、所望の m a

1 - C' ドットを得た。

C' ドット - (Cy5) - PEG - Phe - Arg - dPEG₂ - Gly - D - Tyr - APdMGの調製：

【0140】

化合物6を得るために使用したのと同じ全般的合成戦略を使用した。リンカー - 薬物構築物 Phe - Arg - dPEG₂ - Gly - D - Tyr - APdMG (23) を合成した。(C₇₄H₁₀₅ClFN₁₅O₂₀S (正確な質量 1609.71) についてのESI-MS (m/z) : [M + 2H]²⁺ 計算値 805.9、実測値 805.6)。この構築物を、NDC6 および7について説明したように、C' ドット - (Cy5) - PEG - mal に付着させた。

10

C' ドット - (Cy5) - PEG - Phe - Lys - PABC - Gly - D - Tyr - APdMGの調製：

【0141】

化合物7を得るために使用したのと同じ全般的合成戦略を使用した。リンカー - 薬物構築物 Phe - Lys - PABC - Gly - D - Tyr - APdMG (24) を合成した。(C₇₁H₉₄ClFN₁₀O₁₈S (正確な質量 1460.61) についてのESI-MS (m/z) : [M + H]⁺ 計算値 1461.6、実測値 1461.3 ; [M + 2H]²⁺ 計算値 731.3、実測値 731.5)。この構築物を、NDC6 および7について説明したように、C' ドット - (Cy5) - PEG - mal に付着させた。

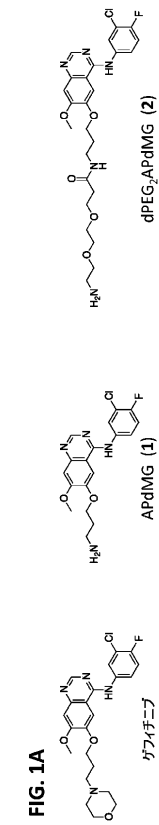
C' ドット - (Cy5) - PEG - Phe - Arg - dPEG₂ - Gly - D - Tyr - アミノプロピル - APdMGの放射性ヨウ素化物の調製：

20

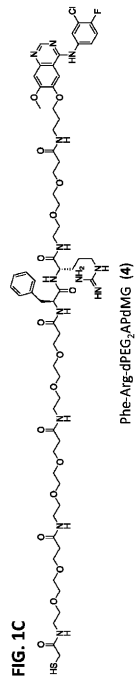
【0142】

放射性ヨウ素化を、Iodogen プロトコールを使用して、C' ドット - (Cy5) - PEG - Phe - Arg - dPEG₂ - Gly - D - Tyr - APdMG で実施した。ヨウ素化反応物をPD10カラムで精製し、次いでGPC (Superdex) で分析した。

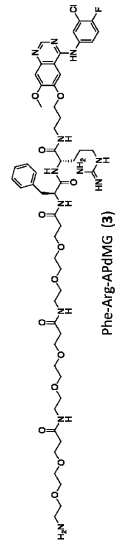
【図 1 A】



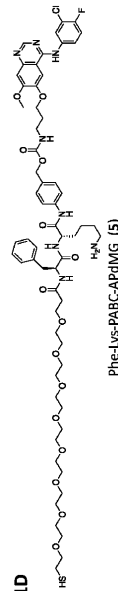
【図 1 C】



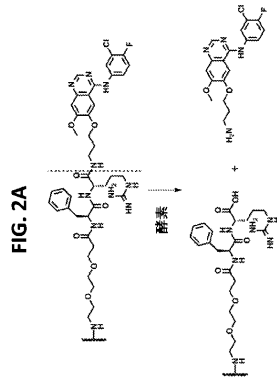
【図 1 B】



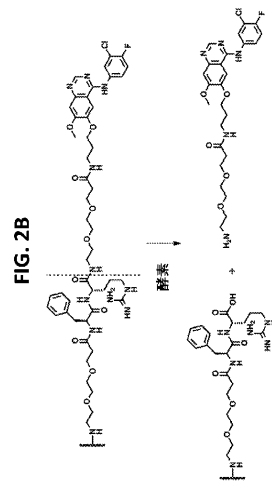
【図 1 D】



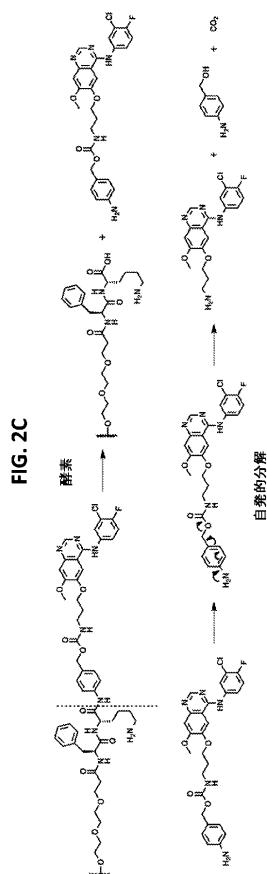
【図 2 A】



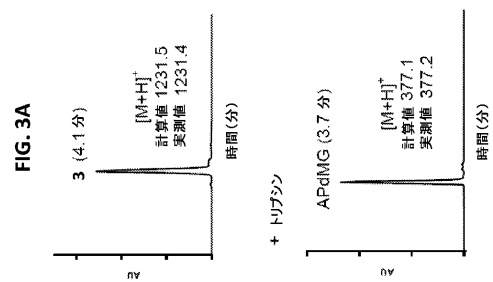
【図 2 B】



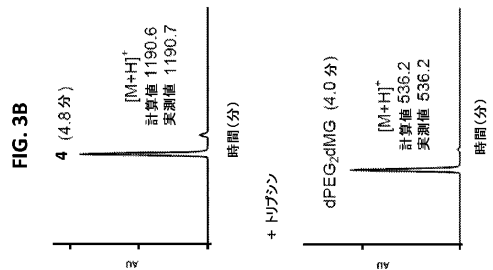
【図 2 C】



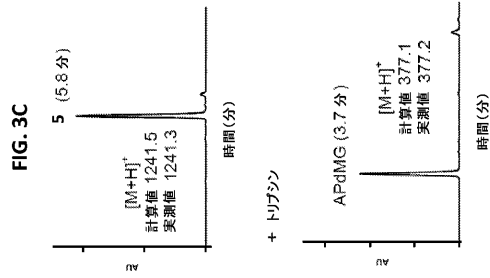
【図 3 A】



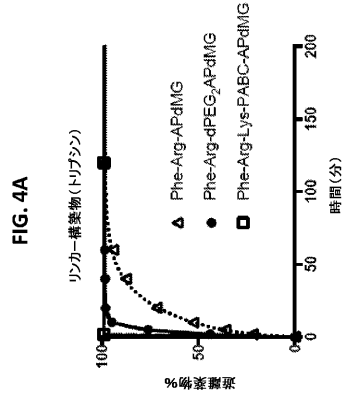
【図 3 B】



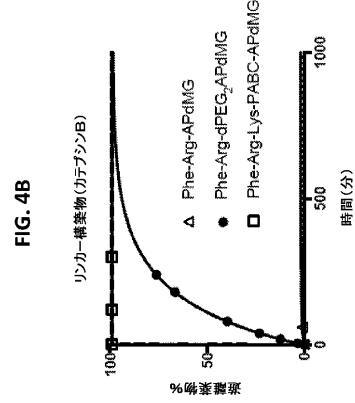
【図 3 C】



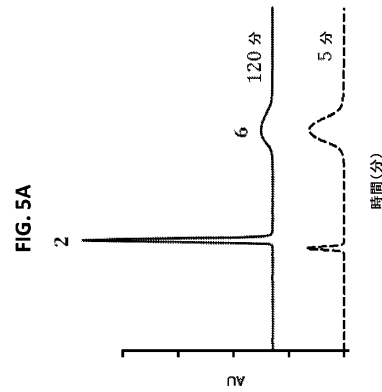
【図 4 A】



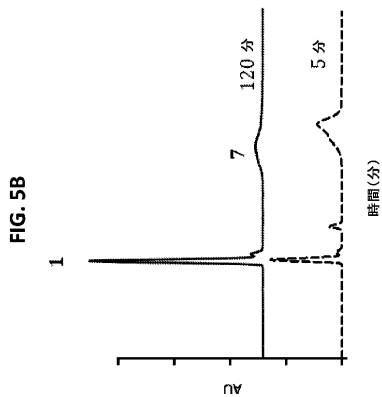
【図 4 B】



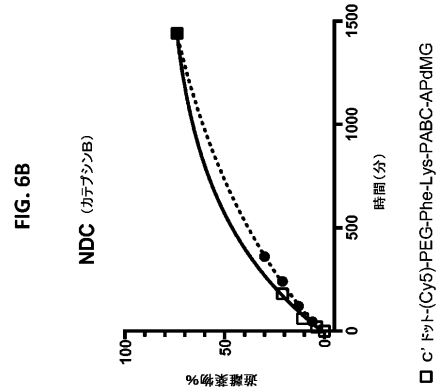
【図 5 A】



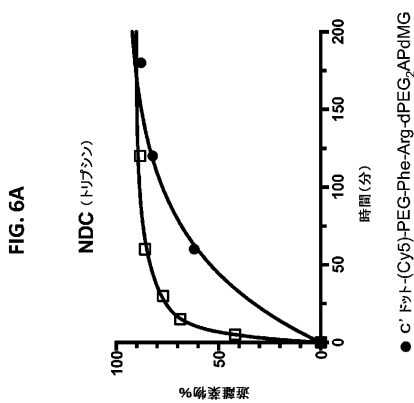
【図 5 B】



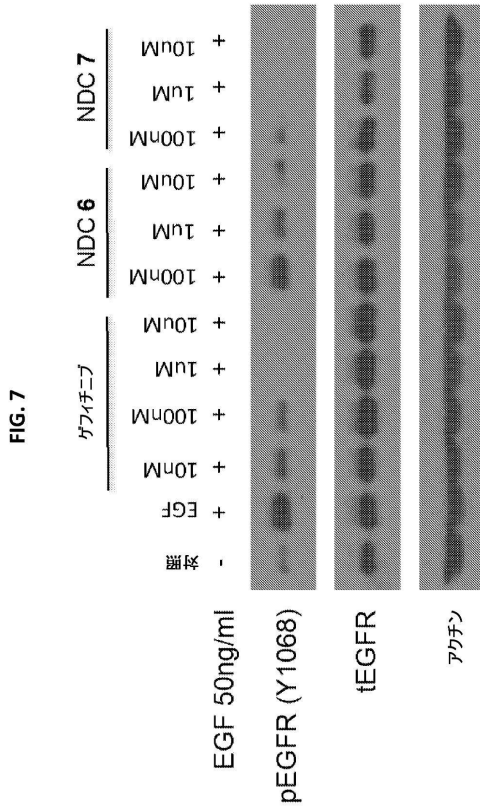
【図 6 B】



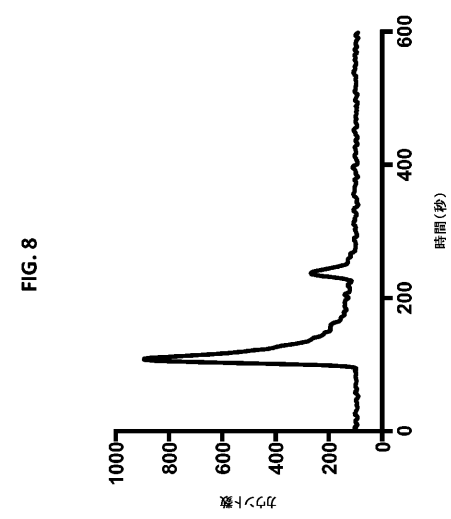
【図 6 A】



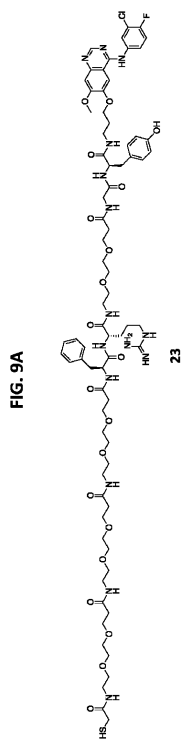
【圖 7】



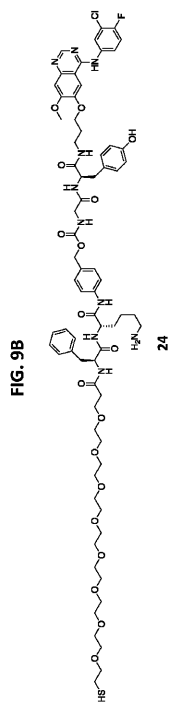
【 図 8 】



【 図 9 A 】

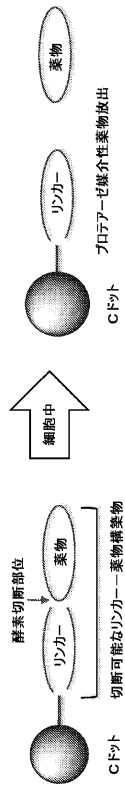


【 図 9 B 】



【図 10】

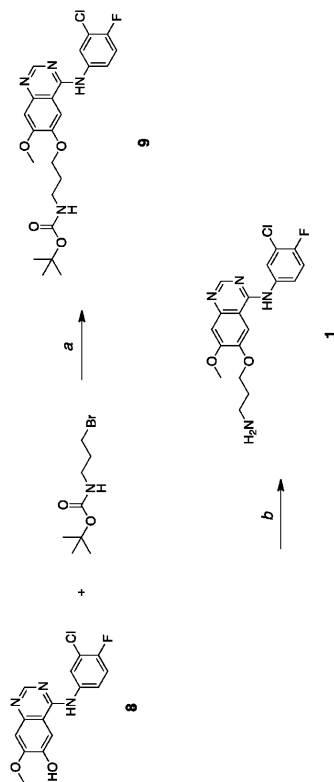
FIG. 10



スキーム1

【図 12】

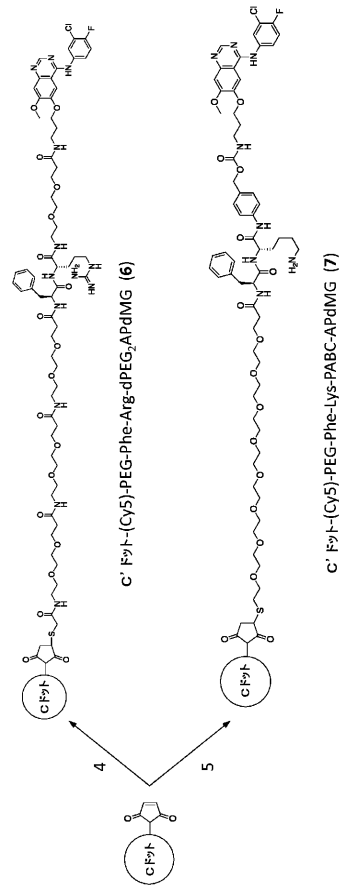
FIG. 12



スキーム3

【図 11】

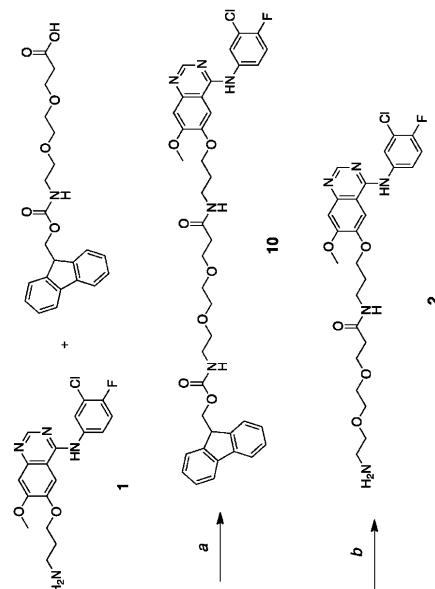
FIG. 11



スキーム2

【図 13】

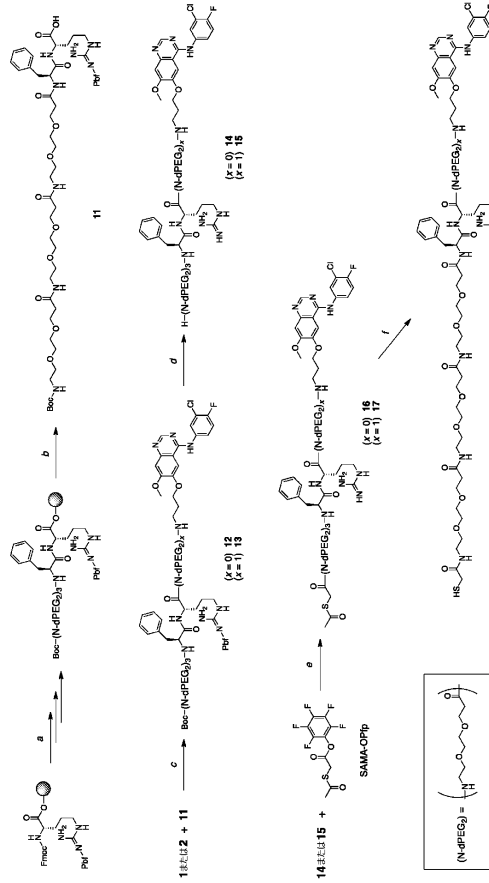
FIG. 13



スキーム4

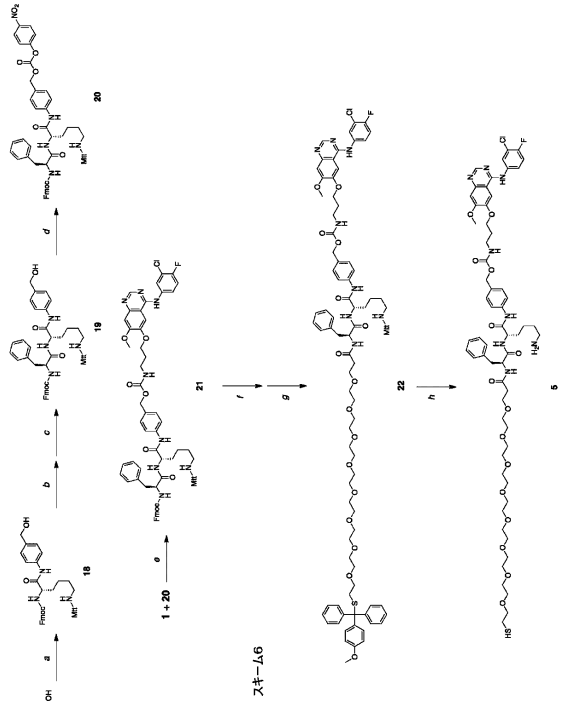
【図 14】

FIG. 14



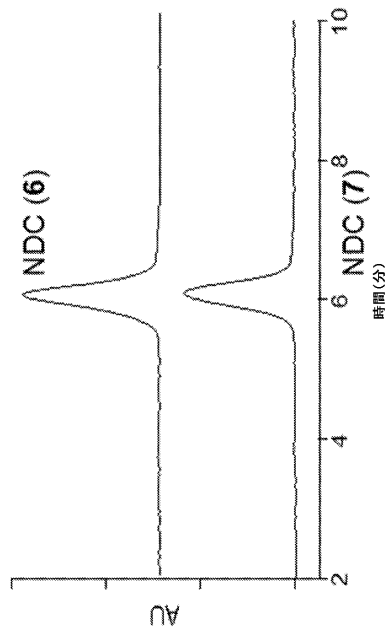
【図 15】

FIG. 15



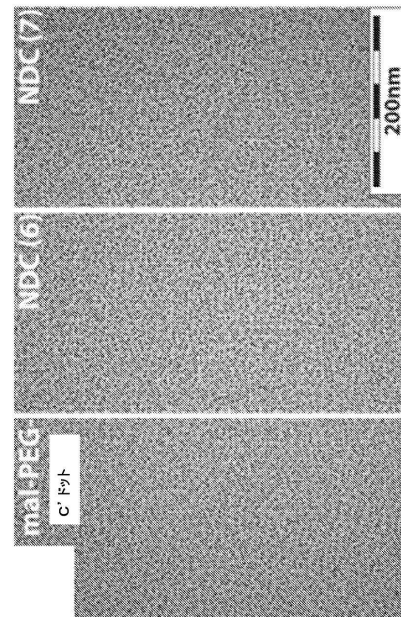
【図 16 A】

FIG. 16A



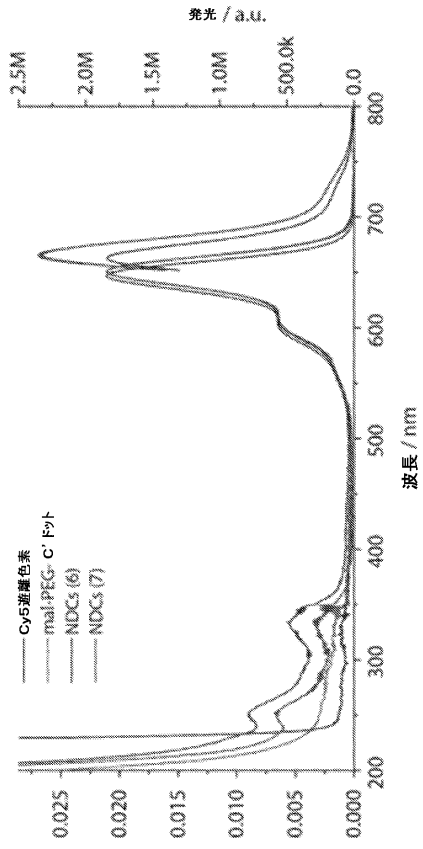
【図 16 B】

FIG. 16B



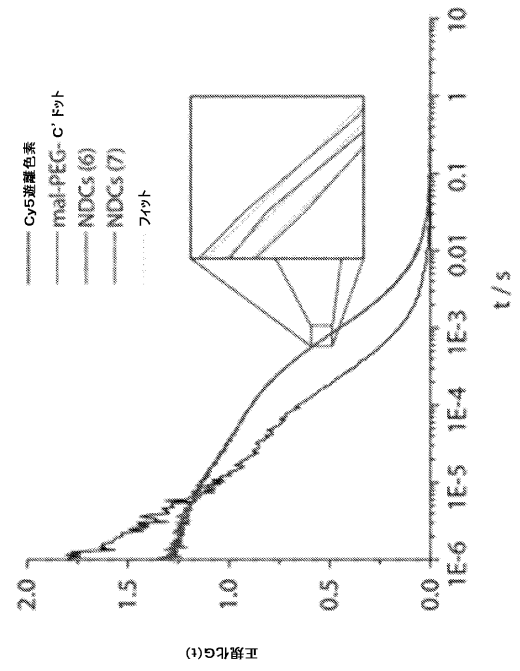
【図 16C】

FIG. 16C



【図 16D】

FIG. 16D



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 A 6 1 K 49/00 (2006.01) A 6 1 K 49/00
 A 6 1 P 35/00 (2006.01) A 6 1 P 35/00

早期審査対象出願

(74)代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72)発明者 ブラッドベリー, ミシェル エス.
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 0 6 5, ニューヨーク, ヨーク アベニュー 1 2 7 5
 , メモリアル スローン ケタリング キャンサー センター 気付
 (72)発明者 ヨー, パーニー
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 0 6 5, ニューヨーク, ヨーク アベニュー 1 2 7 5
 , メモリアル スローン ケタリング キャンサー センター 気付
 (72)発明者 ウィースナー, ウルリッヒ
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 4 8 5 0, イサカ, ホワイト パーク ロード 1 0 5
 (72)発明者 マ, カイ
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 4 8 5 0, イサカ, エヌ. トリップハンマー ロード
 2 2 5 0, アpartment エヌ2エー

審査官 山村 祥子

(56)参考文献 国際公開第2 0 1 1 / 0 0 3 1 0 9 (WO, A 1)
 特表2 0 1 3 - 5 2 3 8 9 5 (JP, A)
 国際公開第2 0 1 3 / 1 9 2 6 0 9 (WO, A 1)
 ACS NANO, 2 0 1 3 年, VOL.7, NO.3, p.2078-2089
 INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY, 2 0 1 3 年, VOL.42, p.373-383

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 A 6 1 K 4 7 / 0 0
 A 6 1 K 9 / 0 0
 A 6 1 K 3 1 / 5 0 6
 A 6 1 K 3 1 / 5 3 7 7
 A 6 1 K 4 9 / 0 0
 C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)