

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-526011

(P2016-526011A)

(43) 公表日 平成28年9月1日(2016.9.1)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
A61K 9/51 (2006.01)	A 61 K 9/51	4 C 076
C07J 5/00 (2006.01)	C 07 J 5/00	C S P 4 C 084
A61P 35/00 (2006.01)	A 61 P 35/00	Z N A 4 C 086
A61P 29/00 (2006.01)	A 61 P 29/00	4 C 091
A61P 5/44 (2006.01)	A 61 P 5/44	4 H 006
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 32 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2016-507628 (P2016-507628)	(71) 出願人 500182460 ユニバーシティ・オブ・ジョージア・リサーチ・ファウンデイション・インコーポレイテッド アメリカ合衆国 30602-7411 ジョージア州アセンズ、ボイド・グラデュエイト・スタディーズ・リサーチ・センター
(86) (22) 出願日	平成26年4月9日 (2014.4.9)	(74) 代理人 100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	平成27年10月2日 (2015.10.2)	(74) 代理人 100113413 弁理士 森下 夏樹
(86) 國際出願番号	PCT/US2014/033431	(74) 代理人 100181674 弁理士 飯田 貴敏
(87) 國際公開番号	W02014/169007	(74) 代理人 100181641 弁理士 石川 大輔
(87) 國際公開日	平成26年10月16日 (2014.10.16)	
(31) 優先権主張番号	61/810,076	
(32) 優先日	平成25年4月9日 (2013.4.9)	
(33) 優先権主張国	米国 (US)	

(54) 【発明の名称】併用療法用ナノ粒子

(57) 【要約】

化学療法剤と抗炎症剤とを含むナノ粒子は、前立腺癌細胞に対して特に細胞毒性を有する。本開示は、とりわけ、化学療法剤と、抗炎症剤および骨吸収阻害剤の1種以上との組合せを送達する能力を有するナノ粒子 (NP) プラットフォームについて記載する。このナノ粒子を癌の治療に使用することができる。幾つかの実施形態では、ナノ粒子を前立腺癌の治療に使用する。幾つかの実施形態では、ナノ粒子をCRCの治療に使用する。本明細書に記載するように、化学療法剤と抗炎症剤との組合せをナノ粒子で送達すると、前立腺癌細胞に対する相乗的細胞毒性作用が得られる。驚くべきことには、ナノ粒子で送達すると、ナノ粒子を用いずに化学療法剤と抗炎症剤を同時投与する場合と比較して、癌細胞に対する細胞毒性作用が向上する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

前立腺癌の治療薬の製造における、化学療法剤と抗炎症剤とを含むナノ粒子の使用。

【請求項 2】

前記ナノ粒子が親水性コアと前記コアを取り囲む親水性層とを含む、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

前記化学療法剤と前記抗炎症剤が前記コアに結合している、請求項 1 または 2 に記載の使用。

【請求項 4】

前記化学療法剤がシスプラチニンである、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 5】

前記抗炎症剤がアスピリンである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 6】

前記前立腺癌が去勢抵抗性前立腺癌である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 7】

前記ナノ粒子は、同等の用量の前記遊離化学療法剤と前記遊離抗炎症剤との組合せよりも前立腺癌細胞に対する細胞毒性が高い、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 8】

治療を必要とする対象の前立腺癌の治療方法において、
化学療法剤と抗炎症剤とを含むナノ粒子を治療有効量、前記対象に投与する工程、
を含む方法。

【請求項 9】

前記ナノ粒子が親水性コアと前記コアを取り囲む親水性層とを含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記化学療法剤と前記抗炎症剤が前記コアに結合している、請求項 8 または 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記化学療法剤がシスプラチニンである、請求項 7 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記抗炎症剤がアスピリンである、請求項 7 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記前立腺癌が去勢抵抗性前立腺癌である、請求項 7 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記ナノ粒子は、同等の用量の前記遊離化学療法剤と前記遊離抗炎症剤との組合せよりも前立腺癌細胞に対する細胞毒性が高い、請求項 7 ~ 13 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 15】

コアの少なくとも一部を形成する疎水性ポリマーがポリ乳酸 (P L A) を含むポリマーと、ポリ乳酸 - c o - グリコール酸 (P L G A) を含むポリマーとからなる群から選択される疎水性ナノ粒子コアと；

親水性ポリマー部分が前記コアの少なくとも一部を形成する疎水性ポリマー部分を介して前記コアに結合している、前記コアを取り囲む親水性層と；

前記コアに結合した抗炎症剤と；

前記コアに結合した化学療法剤と；
を含むナノ粒子。

【請求項 16】

前記抗炎症剤がコルチコステロイドまたは非ステロイド系抗炎症薬である、請求項 1 5 50

に記載のナノ粒子。

【請求項 17】

前記抗炎症剤がアスピリンである、請求項15に記載のナノ粒子。

【請求項 18】

前記抗炎症剤がプレドニゾンである、請求項15に記載のナノ粒子。

【請求項 19】

前立腺癌ターゲティング部分をさらに含む、請求項15～18のいずれか一項に記載のナノ粒子。

【請求項 20】

前記ターゲティング部分が、前立腺特異膜抗原に選択的に結合するように構成された部分である、請求項19に記載のナノ粒子。 10

【請求項 21】

前記ターゲティング部分が、アミノ酸配列W Q P D T A H H W A T L（配列番号1）を有するペプチド、またはその前立腺特異膜抗原結合断片を含む、請求項19に記載のナノ粒子。

【請求項 22】

前記抗炎症剤が、前記疎水性コアの少なくとも一部を形成するポリマーにコンジュゲートしている、請求項15～21のいずれか一項に記載のナノ粒子。

【請求項 23】

前記化学療法剤が、前記疎水性コアの少なくとも一部を形成するポリマーにコンジュゲートしている、請求項15～22のいずれか一項に記載のナノ粒子。 20

【請求項 24】

前記抗炎症剤がコンジュゲートしているポリマーは、前記化学療法剤がコンジュゲートしているポリマーである、請求項23に記載のナノ粒子。

【請求項 25】

骨吸収阻害剤をさらに含む、請求項15～24のいずれか一項に記載のナノ粒子。

【請求項 26】

前記骨吸収阻害剤がパミドロネートである、請求項25に記載のナノ粒子。

【請求項 27】

治療を必要とする対象を治療するための、請求項15～25のいずれか一項に記載のナノ粒子の使用。 30

【請求項 28】

コアの少なくとも一部を形成する疎水性ポリマーがポリ乳酸（PLA）を含むポリマーと、ポリ乳酸-c o -グリコール酸（PLGA）を含むポリマーとからなる群から選択される疎水性ナノ粒子コアと；

親水性ポリマー部分が前記コアの少なくとも一部を形成する疎水性ポリマー部分を介して前記コアに結合している、前記コアを取り囲む親水性層と；

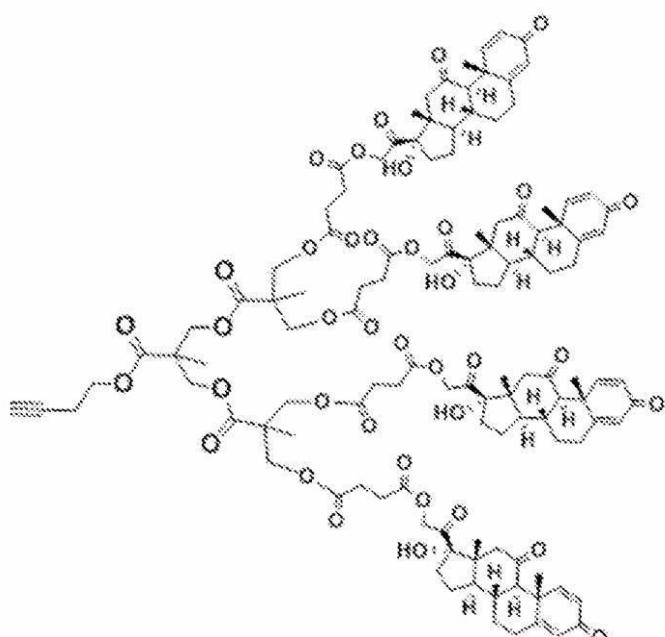
前記コアに結合した骨吸収阻害剤と；

前記コアに結合した化学療法剤と；

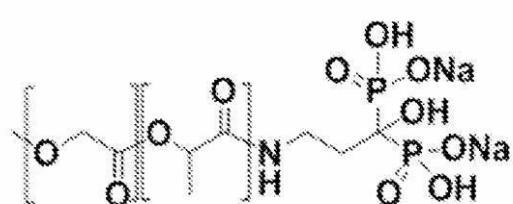
を含むナノ粒子。 40

【請求項 29】

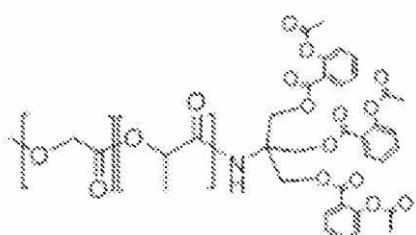
【化 1】



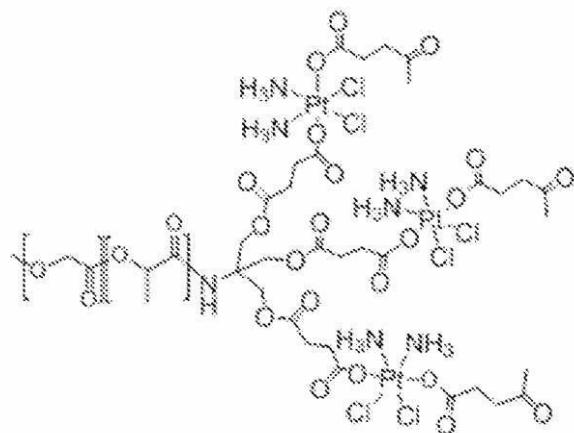
10



20

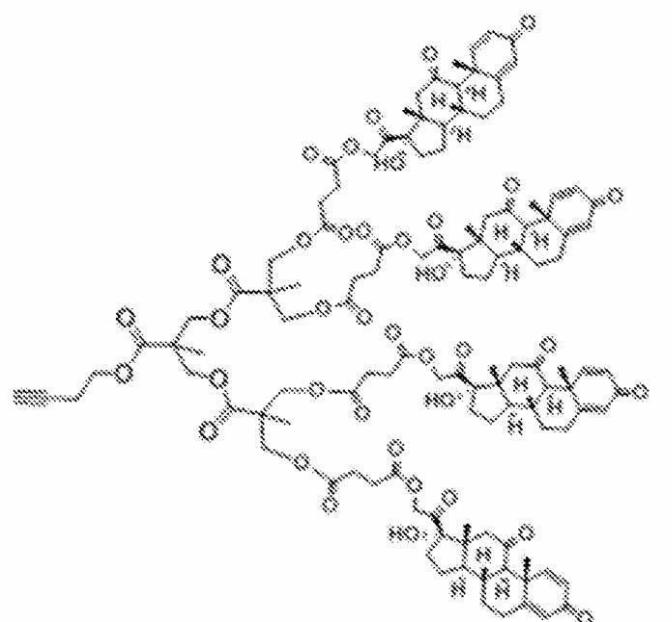


30

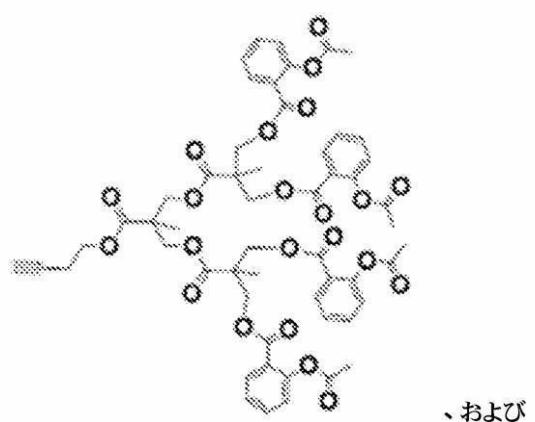


40

【化 2】



10

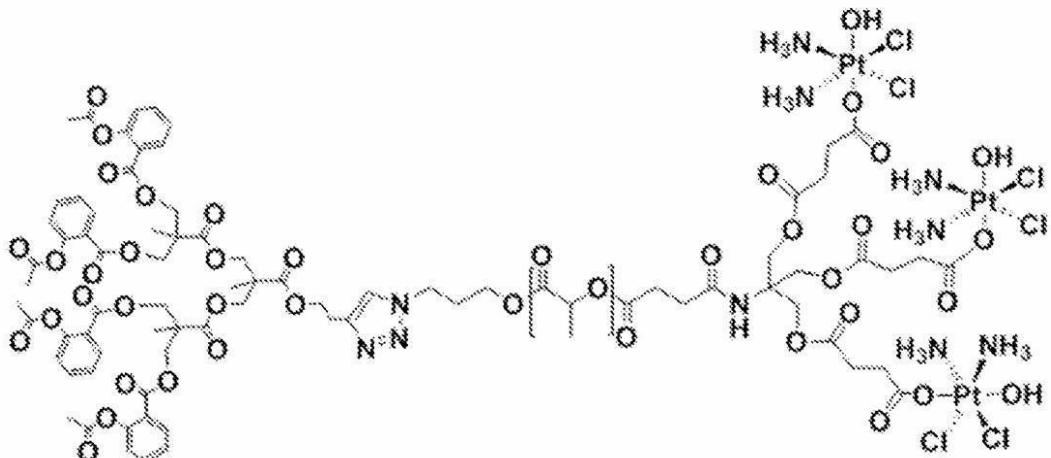


20

、および

30

【化 3】



からなる群から選択される化合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

政府の支援についての陳述

本発明は、米国政府国防総省により支給された助成金番号W81XWH-12-1-0406の下、政府の支援により行われた。政府は本発明に一定の権利を有する。

【0002】

関連出願

本願は、2013年4月9日に出願された米国仮特許出願第61/810,076号明細書の優先権の利益を主張し、この特許出願は、本開示と矛盾しない範囲で、その内容全体が本明細書に援用される。

【0003】

本開示は、癌の治療などの治療を目的とする治療剤を含有するナノ粒子に関し、特に、前立腺癌、例えば、去勢抵抗性前立腺癌（CPRC）を治療するための、治療剤の組合せを含有するナノ粒子に関する。

【背景技術】

【0004】

前立腺癌は、米国では男性の癌による死因の第2位となっている。男性ホルモンであるアンドロゲンは、前立腺癌の腫瘍増殖に重要な役割を果たす。従って、アンドロゲン遮断療法（去勢術）は、幾つかの化学療法剤と共に、前立腺癌の主要な治療法の1つになった。去勢後、癌の進行が著しく遅くなることが多い。しかし、ほとんどの場合、癌の進行は去勢抵抗性前立腺癌（CRPC）と称される病期で最終的に再燃する。

【0005】

去勢抵抗性前立腺癌（CRPC）は、米国および世界中の男性が罹患する最も一般的且つ致命的な形態の癌の1つである。現在、化学療法は、CRPC患者の生存率を改善することが判明している唯一の癌療法形態である。しかし、化学療法剤は、慢性炎症および骨転移などのCRPCに関連する症状の多くの緩和に役立たない。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

本開示は、とりわけ、化学療法剤と、抗炎症剤および骨吸収阻害剤の1種以上との組合せを送達する能力を有するナノ粒子（NP）プラットフォームについて記載する。このナ

ノ粒子を癌の治療に使用することができる。幾つかの実施形態では、ナノ粒子を前立腺癌の治療に使用する。幾つかの実施形態では、ナノ粒子をC R P Cの治療に使用する。

【0007】

本明細書に記載するように、化学療法剤と抗炎症剤との組合せをナノ粒子で送達する、前立腺癌細胞に対する相乗的細胞毒性作用が得られる。驚くべきことには、ナノ粒子で送達すると、ナノ粒子を用いずに化学療法剤と抗炎症剤を同時投与する場合と比較して、癌細胞に対する細胞毒性作用が向上する。

【0008】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載の前立腺癌の治療方法は、前立腺癌に罹患している対象に化学療法剤と抗炎症剤とを含むナノ粒子を治療有効量投与する工程を含む。

10

【0009】

本明細書に記載の様々な実施形態では、化学療法剤と抗炎症剤とを含むナノ粒子を、前立腺癌の治療薬の製造に使用する。

【0010】

本明細書に記載の幾つかの実施形態では、ナノ粒子は、(i)コアの少なくとも一部を形成する疎水性ポリマーが、ポリ乳酸(P L A)を含むポリマーと、ポリ乳酸-c o -グリコール酸(P L G A)を含むポリマーとからなる群から選択される、疎水性ナノ粒子コアと；(ii)親水性ポリマー部分が、コアの少なくとも一部を形成する疎水性ポリマー部分を介してコアに結合している、コアを取り囲む親水性層と；(iii)コアに結合した抗炎症剤と；(iv)コアに結合した化学療法剤と；を含む。

20

【0011】

本明細書に記載の幾つかの実施形態では、方法は、癌細胞を、少なくとも1種の化学療法剤と抗炎症剤とを含むナノ粒子と接触させる工程を含む。好ましくは、本方法は、癌細胞を、細胞の癌性増殖(c a n c e r o u s g r o w t h)を阻害するのに有効な量のナノ粒子と接触させる工程を含む。より好ましくは、本方法は、癌細胞を細胞毒性量のナノ粒子と接触させる工程を含む。本方法は癌患者の治疗方法であってもよく、この場合、本方法は治療有効量のナノ粒子を患者に投与する工程を含む。本方法は、前立腺癌またはC R P Cに罹患している患者、またはそれに罹患するリスクがある患者を特定する工程と、ナノ粒子をその患者に投与する工程とをさらに含んでもよい。

30

【0012】

本明細書に記載の様々な実施形態の1つ以上が従来の療法および治療剤より有利な点は、以下の詳細な説明を添付の図面と併せて読めば、当業者には容易に明らかとなるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】生分解性ポリマープラットフォームと、化学療法薬と、抗炎症薬とを使用するナノ粒子の製造を示す略図である。

【図2A】本明細書に記載の教示に従って製造したナノ粒子の一実施形態の透過型電子顕微鏡画像である。

【図2B】本明細書に記載の教示に従って製造したナノ粒子の一実施形態のサイズを示す動的光散乱法ヒストグラムである。

40

【図2C】本明細書に記載の教示に従って製造したナノ粒子の一実施形態のゼータ電位測定値を示すグラフである。

【図3】本明細書に記載の教示に従って製造したナノ粒子の一実施形態を含む、異なる構造の、ヒト前立腺癌P C - 3細胞に対する細胞毒性を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0014】

略図は、必ずしも縮尺通りに記載されていない。図中で使用する同様の番号は、同様の構成要素、および工程等を指す。しかし、ある番号を使用して所定の図中の構成要素を指示する場合、これは同じ番号で標識された別の図中の構成要素を限定するものではないこ

50

とを理解されたい。さらに、異なる番号を使用して構成要素を指示する場合、これは異なる番号の構成要素が同じであってはならないまたは類似していってはならないことを示すものではない。

【0015】

以下の詳細な説明では、この一部を構成し、デバイス、システム、および方法の幾つかの特定の実施形態が例証として示されている添付の図面を参照する。他の実施形態も考えられ、本開示の範囲または精神から逸脱することなく行われ得ることを理解されたい。従って、以下の詳細な説明は、限定的な意味に解釈されるべきではない。

【0016】

本開示は、とりわけ、化学療法剤と、抗炎症剤および骨吸収阻害剤の1種以上との組合せを含むナノ粒子について記載する。

【0017】

本明細書に記載のナノ粒子は、幾つかの実施形態では、疎水性コアと、コアを取り囲む親水性層と、治療剤と、1つ以上の任意選択的なターゲティング部分とを含む。複数の実施形態では、治療剤は、コア内に含有されるまたは埋め込まれる。治療剤、即ち、薬剤は好ましくはコアから所望の速度で放出される。複数の実施形態では、コアは生分解性であり、コアが分解または浸食されるにつれ、薬剤を放出する。ターゲティング部分が存在する場合、それは好ましくは、細胞成分と相互作用できるように、またはナノ粒子の表面特性に影響を及ぼすようにコアから外側に延び、そのような相互作用または表面特性は癌細胞などの所望の細胞に優先的に分布するのに有利になる。ターゲティング部分は、コア、またはコアと相互作用する成分に繋がっていてもよい。

【0018】

I. コア

ナノ粒子のコアは1種または複数種の任意の好適な成分から形成されてもよい。好ましくは、コアは、疎水性ポリマーまたはポリマーの疎水性部分などの疎水性成分から形成される。コアは、同様にまたは代わりに、水性環境中で、疎水性コアと親水性の外面とを有する粒子に自己組織化し得る、疎水性部分と親水性部分とを有するブロック共重合体を含んでもよい。幾つかの実施形態では、コアは、1種以上の生分解性ポリマーまたは生分解性部分を有するポリマーを含む。

【0019】

任意の好適な合成ポリマーまたは天然の生体吸収性ポリマーを使用してもよい。当業者にはこのようなポリマーが認識可能または識別可能である。合成生分解性ポリマーの非限定的な例としては：ポリ（アミド）、例えば、ポリ（アミノ酸）およびポリ（ペプチド）；ポリ（エステル）、例えば、ポリ（乳酸）、ポリ（グリコール酸）、ポリ（乳酸-*c*o-グリコール酸）（PLGA）、およびポリ（カプロラクトン）；ポリ（酸無水物）；ポリ（オルトエステル）；ポリ（カーボネート）；ならびに、これらの化学的誘導体（置換、化学基、例えば、アルキル、アルキレンなどの付加、ヒドロキシル化、酸化、および、当業者が通常行う他の修飾）、フィブリン、フィブリノーゲン、セルロース、デンプン、コラーゲン、およびヒアルロン酸、これらの共重合体および混合物が挙げられる。これらのポリマーおよび他の好適なポリマーの特性および放出プロファイルは既知であるか、または容易に特定することができる。

【0020】

本明細書に記載の様々な実施形態では、コアはPLGAを含む。PLGAは、治療剤を送達し、所望の速度で放出するのに使用される周知の、よく研究された疎水性生分解性ポリマーである。

【0021】

好ましくは、コアの形成に使用されるポリマーの少なくとも一部は、疎水性部分と親水性部分とを有する両親媒性である。疎水性部分はコアを形成することができ、親水性部はコアを取り囲む層を形成し、ナノ粒子が免疫系に認識されることを回避するのに役立つことができ、血中半減期を延長することができる。両親媒性ポリマーの例としては、疎水

10

20

30

40

50

性ブロックと親水性ブロックとを有するブロック共重合体が挙げられる。幾つかの実施形態では、コアは、ブロック共重合体の疎水性部分、疎水性ポリマー、またはこれらの組合せから形成される。

【0022】

疎水性ポリマー対両親媒性ポリマーの比を変えて、ナノ粒子のサイズを変えることができる。疎水性ポリマー対両親媒性ポリマーの比が大きいと、ナノ粒子の直径が大きくなることが多い。任意の好適な疎水性ポリマー対両親媒性ポリマー比を使用することができる。幾つかの実施形態では、ナノ粒子は、約50/50の両親媒性ポリマー対疎水性ポリマー重量比、または両親媒性ポリマーを親水性ポリマーより多く含む比、例えば、約20/80の比、約30/70の比、約40/60の比、約55/45の比、約60/40の比、約65/45の比、約70/30の比、約75/35の比、約80/20の比、約85/15の比、約90/10の比、約95/5の比、約99/1の比、または約100%両親媒性ポリマーを含む。

10

【0023】

複数の実施形態では、疎水性ポリマーは、PLGA、例えば、PLGA-COOHまたはPLGA-OHを含む。複数の実施形態では、両親媒性ポリマーは、PLGAおよびPEG、例えば、PLGA-PEGを含む。両親媒性ポリマーは、分岐鎖親水性部分を有する樹枝状ポリマーであってもよい。分岐鎖ポリマーは2つ以上の末端を有するため、2つ以上の部分が分岐鎖親水性ポリマー尾部の末端に結合することが可能となる。

20

【0024】

本明細書に記載のナノ粒子は、任意の好適なサイズを有してもよい。幾つかの実施形態では、ナノ粒子の平均直径は約500nm以下、例えば、約250nm以下または約200nm以下である。典型的には、ナノ粒子の平均直径は約5nm以上となる。幾つかの実施形態では、ナノ粒子の平均直径は約20nm～約300nm、例えば、約50nm～約150nm、または約80nm～約130nmである。

【0025】

I I . コアを取り囲む親水性層

本明細書に記載のナノ粒子は、親水性コアを取り囲む親水性層を任意選択的に含んでもよい。親水性層はナノ粒子が免疫系に認識されることを回避するのに役立つことができ、ナノ粒子の血中半減期を延長することができる。

30

【0026】

上記で示したように、親水性層を全部または一部、両親媒性ポリマーの、例えば、疎水性ブロックと親水性ブロックとを有するブロック共重合体の親水性部分で形成することができる。

【0027】

任意の好適な親水性ポリマーまたは両親媒性ポリマーの親水性部分で、親水性層またはその一部を形成してもよい。親水性ポリマーまたはポリマーの親水性部分は、直鎖または分岐鎖または樹枝状のポリマーであってもよい。好適な親水性ポリマーの例としては、多糖類、デキストラン、キトサン、ヒアルロン酸、ポリエチレングリコール、およびポリメチレンオキサイド等が挙げられる。

40

【0028】

幾つかの実施形態では、ブロック共重合体の親水性部分はポリエチレングリコール(PEG)を含む。複数の実施形態では、ブロック共重合体は、PLGAを含む疎水性部分と、PEGを含む親水性部分とを含む。

【0029】

親水性ポリマーまたはポリマーの親水性部分は、生理学的条件下で電荷を有する部分を含有してもよく、それはpH約7.4の緩衝生理食塩水、例えば、リン酸またはクエン酸緩衝生理食塩水等で近似することができる。様々な実施形態では、親水性ポリマーまたはポリマーの一部は、生理学的水性環境に置かれると、酸素アニオンを生じ得るヒドロキシル基を含む。例えば、ポリマーはPEG-OHを含むことができ、このOHは生理学的条件

50

件下で電荷を有する部分となる。

【0030】

生理学的条件下で電荷を有する部分は、ナノ粒子の電荷密度またはゼータ電位に寄与し得る。ゼータ電位とは、コロイド系の界面動電位に関する用語である。ゼータ電位は直接測定することはできないが、それは電気泳動移動度または動的電気泳動移動度等を用いて実験的に求めることができる。

【0031】

本明細書に記載のナノ粒子は、任意の好適なゼータ電位を有することができる。様々な実施形態では、本明細書に記載のナノ粒子は負のゼータ電位を有する。例えば、ナノ粒子のゼータ電位は約 - 5 mV 以下であってもよい。幾つかの実施形態では、本明細書に記載のナノ粒子のゼータ電位は約 - 15 mV ; 例えば、約 - 17 mV ~ 約 - 13 mV である。

10

【0032】

I I I . 治療剤

本明細書に記載のナノ粒子は、任意の 1 種以上の治療剤を含んでもよい。治療剤は、ナノ粒子のコアに埋め込まれても、またはコア内に含有されてもよい。好ましくは、治療剤はコアから所望の速度で放出される。コアが、既知の放出速度を有するポリマー (PLGA など) またはポリマーの組合せから形成される場合、放出速度は容易に制御することができる。

【0033】

複数の実施形態では、治療剤またはその前駆体をポリマーまたはナノ粒子の他の成分に、ターゲティング部分に関して前述したようにコンジュゲートさせる。治療剤を、切断可能なリンカーを介してコンジュゲートさせることができる。

20

【0034】

治療剤は、任意の好適な濃度でナノ粒子中に存在してもよい。例えば、治療剤は、ナノ粒子の約 0.01 重量 % ~ 約 30 重量 % の濃度でナノ粒子中に存在してもよい。

【0035】

様々な実施形態では、ナノ粒子は 1 種以上の化学療法剤を含む。本明細書で使用する場合、「化学療法剤」とは、癌を治療するための薬剤、例えば、細胞毒性剤または抗腫瘍剤である。任意の好適な化学療法剤を本明細書に記載のナノ粒子中に含むことができる。化学療法剤の例としては、(i) アルキル化剤、例えば、シクロホスファミド、メクロレタミン、クロラムブシル、およびメルファラン等；(ii) アントラサイクリン系薬剤、例えば、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、ミトキサントロン、およびバルルビシン等；(iii) 細胞骨格阻害剤 (disruptors)、例えば、パクリタキセル、およびドセタキセル等；(iv) エポチロン系薬剤、例えば、エポチロン等；(v) ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、例えば、ボリノstatt (vorinostat)、およびロミデプシン (romidepsin) 等；(vi) トポイソメラーゼ I 阻害剤、例えば、イリノテカン、およびトポテカン (topotecan) 等；(vii) 阻害剤またはトポイソメラーゼ II、例えば、エトポシド、テニポシド、およびタフルポシド (taf luposide) 等；(viii) キナーゼ阻害剤、例えば、ボルテゾミブ、エルロンタイプ、ゲフィチニブ、イマチニブ、ベルムラフェニブ (vermrafenib)、ビスマデギブ (vismodegib)、およびビスマデギブ等；(ix) モノクローナル抗体、例えば、ベバシズマブ、セツキシマブ、イピリムマン、オファツムマブ、オクレリズマブ (ocrelizumab)、パニツマブ、およびリツキシマブ等；(x) ヌクレオチド類似体および前駆体類似体、例えば、アザシチジン、アザチオプリン、カペシタビン、シタラビン、ドキシフルリジン、フルオロウラシル、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、メルカプトプリン、メトトレキサート、およびチオグアニン等；(xi) ペプチド系抗生物質、例えば、ブレオマイシン、およびアクチノマイシン等；(xii) 白金製剤、例えば、カルボプラチン、シスプラチン、およびオキサリプラチン等；(xiii) レチノイド系薬剤、トレチノイン、アリトレチノイン、およびベキサロテン等；(xiv) ビンカアルカロイド系薬剤および誘導体、例えば、ビンプラスチ

30

40

50

ン、ビンクリスチン、シンデシン、およびビノレルビン等；(x v)ならびに同様のものが挙げられる。幾つかの実施形態では、1種以上の化学療法剤の少なくとも1種は、ドセタキセル、ミトキサントロン、パクリタキセル、サトラプチン、およびシスプラチンからなる群から選択される。

【 0 0 3 6 】

様々な実施形態では、ナノ粒子は1種以上の抗炎症剤を含む。任意の好適な抗炎症剤が本明細書に記載のナノ粒子中に含まれてもよい。使用し得る抗炎症剤の例としては、(i)コルチコステロイド、例えば、プレドニゾン、プレドニスロン、デキサメタゾン、フルドロコルチゾン、およびヒドロコルチゾン等；(i i)非ステロイド系抗炎症薬(N S A I D)、例えば、アスピリン、サリチル酸コリンマグネシウム、サリチル酸コリン、セレコキシブ、ジクロフェナクカリウム、ジクロフェナクナトリウム、ジクロフェナクナトリウムとミソプロストールの合剤、ジフルニサル、エトドラク、フェノプロフェンカルシウム、フルルビプロフェン、イブプロフェン、インドメタシン、ケトプロフェン、サリチル酸マグネシウム、メクロフェナム酸ナトリウム、メクロフェナム酸、メロキシカム、ナブメトン、ナブロキセン、アーブロキセンナトリウム、オキサプロジン、ピロキシカン、ロフェコキシブ、サルサレート、サリチル酸ナトリウム、スリンダク、トルメチンナトリウム、およびバルデコキシブ等；(i i i) T N F - 阻害剤(可溶性受容体、抗体、キサンチン誘導体、5 - H T 2 A 作動薬等)、例えば、インフリキシマブ、アダリムマブ、セルトリズマブペゴル、ゴリムマブ、エタネルセプト、ペントキシフィリン、ブプロピオン、(R) - D O I 、 T C B - 2 、 L S D 、および L A - S S - A z 等；(i v)ならびに同様のものが挙げられる。様々な実施形態では、抗炎症剤は N S A I D である。幾つかの実施形態では、 N S A I D はアスピリンである。

【 0 0 3 7 】

様々な実施形態では、ナノ粒子は1種以上の骨吸収阻害剤を含む。P C a 骨転移は大部分、骨芽細胞性であり、組織化されていない骨が異常沈着し、それに伴って、骨格骨折、脊髄圧迫、および重症骨痛が増加する。化学療法は生存率を改善するが、C R P C における骨転移に及ぼす影響が小さい。骨を標的とする療法により骨格関連事象(S R E)が低減するが、大部分の患者で生存率に対する影響は認められなかった。従って、骨転移は臨床における課題であり、有効な解決法が限られている。著しく高い骨形成速度と吸収速度に関連する骨転移は、C R P C 患者の骨痛を緩和するために化学療法剤と抗炎症剤とを組み合わせた単一の製剤に骨吸収阻害剤を使用する根拠となる。任意の好適な骨吸収阻害剤を本明細書に記載のナノ粒子中に含むことができる。使用し得る骨吸収阻害剤の例としては、(i)ビスホスホネート系薬剤、例えば、アレンドロネート、コレカルシフェロール、ゾレドロン酸、エチドロネート、イバンドロネート、リセドロネート、ゾレドロン酸、パミドロネート、およびチルドロネート等；(i i)他の骨吸収阻害剤、例えば、硝酸ガリウム、およびデノスマブ等；が挙げられる。

【 0 0 3 8 】

幾つかの実施形態では、ナノ粒子は化学療法剤と抗炎症剤とを含む。様々な実施形態では、ナノ粒子は、化学療法剤と、抗炎症剤と、骨吸収阻害剤とを含む。

【 0 0 3 9 】

様々な実施形態では、ナノ粒子は、治療剤の1種以上のプロドラッグを含み、プロドラッグはポリマーまたは別の治療剤等にコンジュゲートしており、放出されるとき治療剤となる。本開示の目的では、コンジュゲートした治療剤とプロドラッグは互換的に使用される。さらに、本開示の目的では、ナノ粒子に関して言及される治療剤は、ナノ粒子から放出される治療剤である。例えば、ナノ粒子から放出される時、プロドラッグがシスプラチニまたはアスピリンに変化するシスプラチニプロドラッグまたはアスピリンプロドラッグを含有するナノ粒子は、本明細書ではシスプラチニおよびアスピリンを含むナノ粒子と称される。

【 0 0 4 0 】

複数の実施形態では、1種以上の治療剤は、ナノ粒子の一部を形成するポリマーにコン

10

20

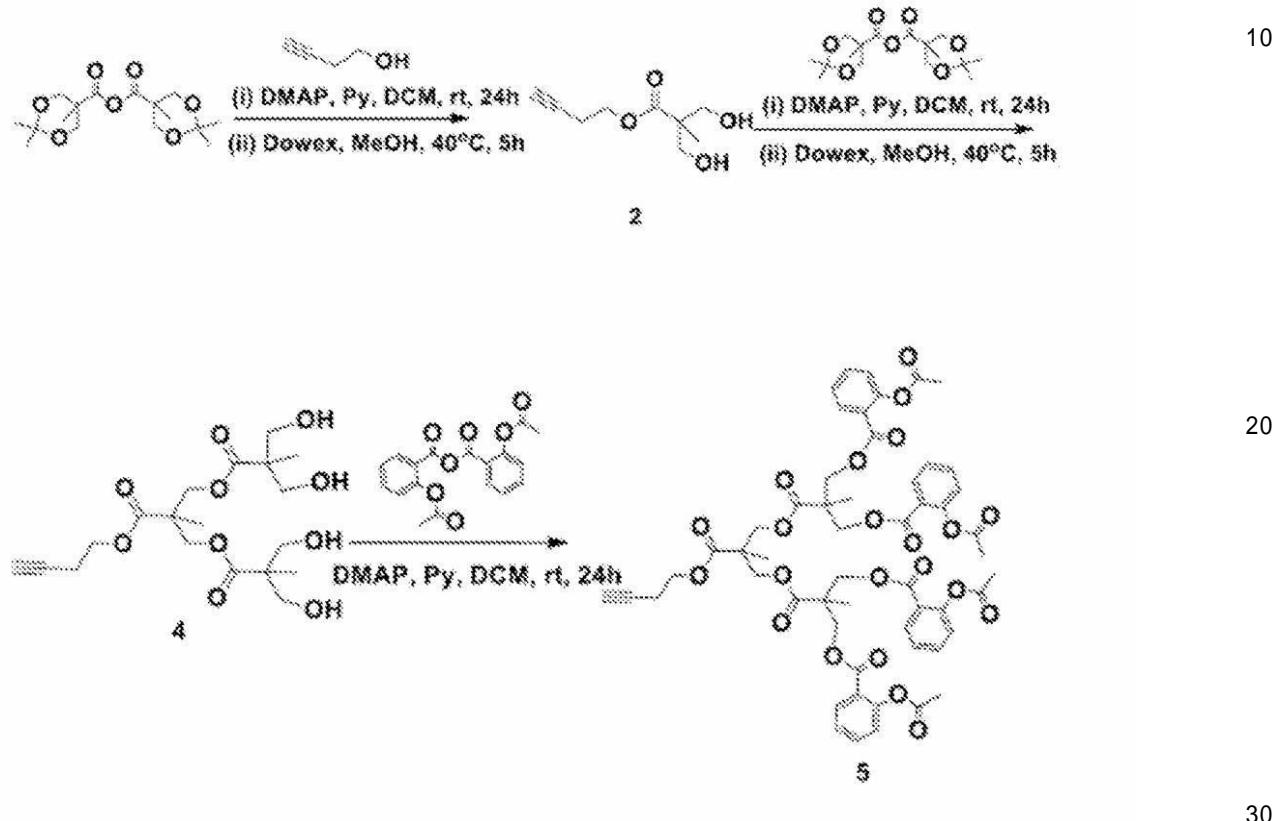
30

40

50

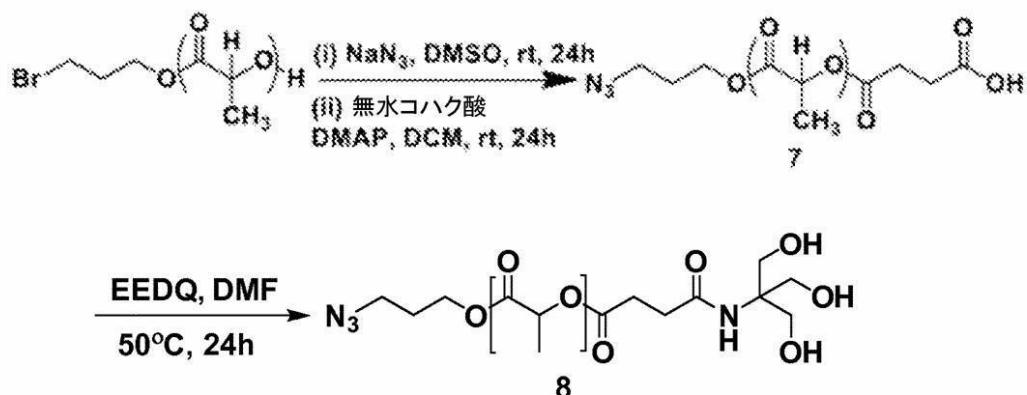
ジュゲートしている。例示の目的と概念を証明する目的で、アスピリンおよびシスプラチ¹⁰ンがコンジュゲートしたPLAを、ナノ粒子に組み込まれるように合成した。抗炎症薬であるアスピリンで官能化されたアルキン-[G-2]Bis-MPAデンドロンを、スキーム1に示すように合成した。一端にアジド官能基を有し、もう一端に脂肪族-OH官能基を有するPLAを合成し、化学療法剤であるPt(IV)プロドラッグを組み込んだ(スキーム2)。最後に、クリックケミストリー法を利用してこれらの2つの構造を組み合わせ、両方の薬物で官能化されたPLAポリマーを得た(スキーム3)。

【化1】



スキーム1:アスピリンで官能化されたアルキン-[G-2]Bis-MPAデンドロンの合成

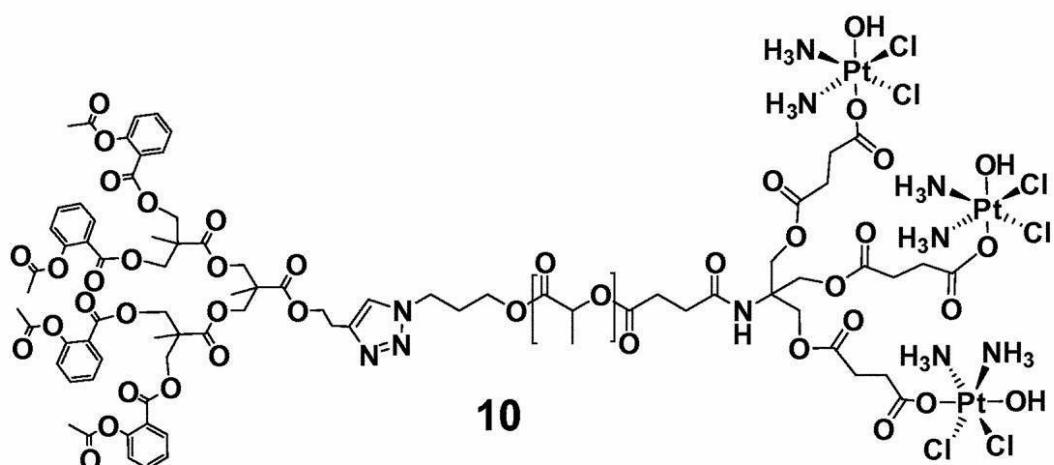
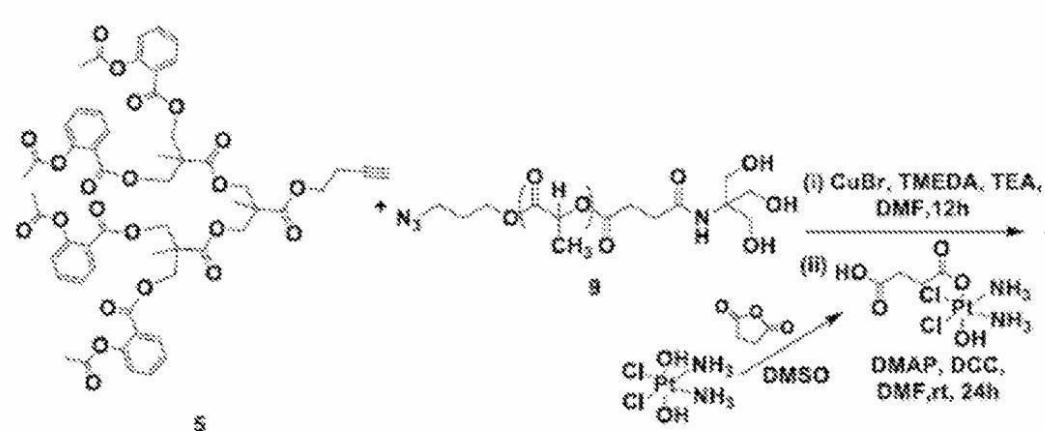
【化2】



スキーム2:アジドおよびトリスで官能化されたPLAの合成

【化3】

20



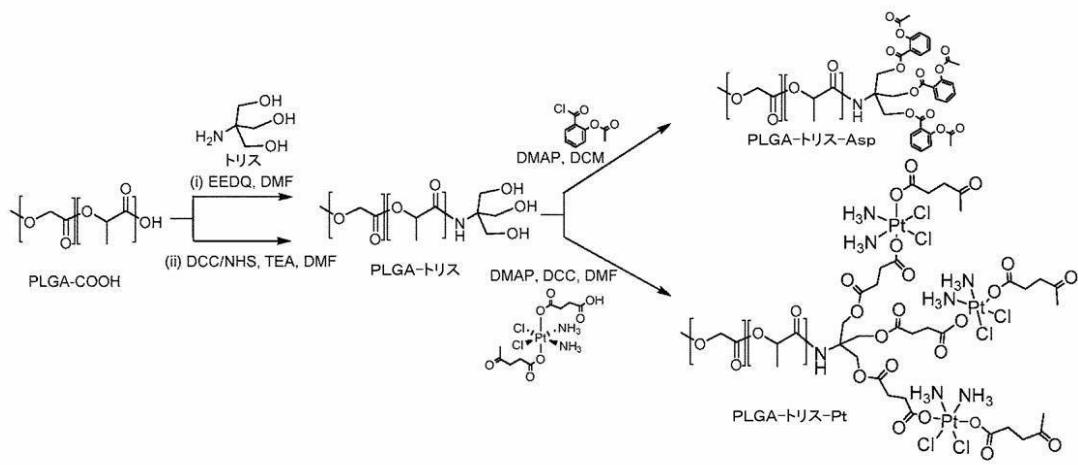
スキーム3:アスピリンおよびPt(IV)プロドラッグで官能化されたPLAの合成

50

【0041】

別の例として、アスピリンおよびシスプラチニンがコンジュゲートしたPLGAを、下記のスキーム4に示すようにナノ粒子に組み込まれるように合成した。高い再現性と、ポリマープラットフォームへの薬物の添加効率の向上を達成するために、薬物に共有結合する3つの部位を有するトリス分子でPLGAを官能化した。単純なエステル結合を用いて、個々の薬物をPLGA-トリスプラットフォームに結合させた。

【化4】

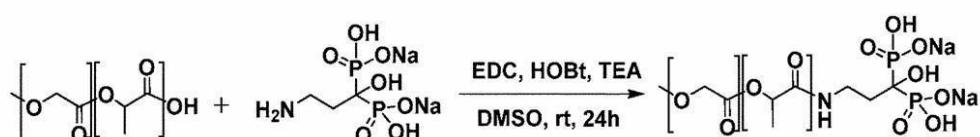


スキーム4.PLGA-トリスの合成、ならびにアスピリンプロドラッグおよびシスプラチニンプロドラッグでのその誘導体化。

【0042】

さらに別の例として、スキーム5に従って、骨転移阻害剤であるパミドロネートがコンジュゲートしたPLGAを合成した。

【化5】



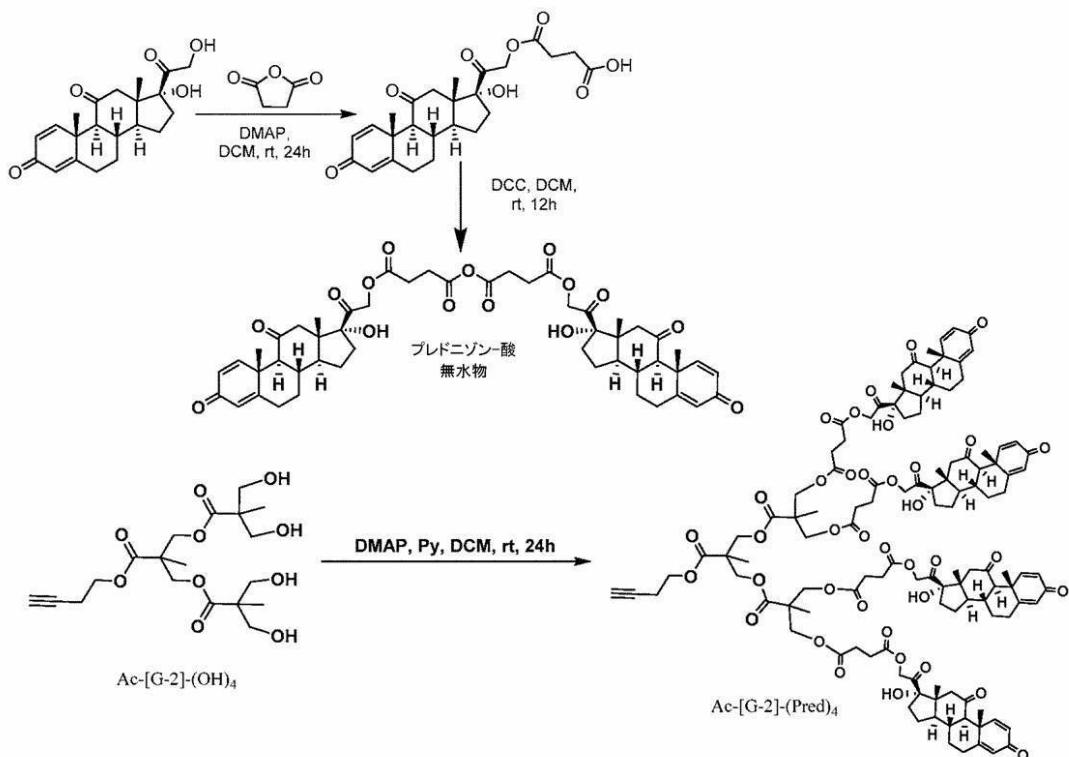
スキーム5.PLGA-パミドロネートの合成

【0043】

さらに別の例として、プレドニゾンがコンジュゲートしたデンドロンは、プレドニゾンをスクシネート部分で官能化し、それをデンドロン表面にエステル結合により結合させるスキーム6に従って合成した。このアルキン誘導プレドニゾン修飾デンドロンを利用して、ポリマー主鎖に、例えば、シスプラチニン薬と共に結合させることができる。

40

【化6】



スキーム6. プレドニゾンがコンジュゲートしたデンドロンの合成

【0044】

他の治療剤をポリマーに結合するように合成または修飾することができ、アスピリンで官能化されたアルキン - [G-2] Bis-MPA デンドロンおよび Pt (IV) プロドラッグを例として示していることが分かるであろう。

【0045】

例として、上記の合成スキームと、Pathak R. K., et al. (2014 Feb. 10), The prodrug platinum-A: simultaneous release of cisplatin and aspirin. A new Chem. Int. Ed. Engl.; 53 (7): 1963-7に記載の合成スキームを組み合わせて、アスピリンプロドラッグを Pt (IV) にコンジュゲートさせ（例えば、Pathak らに記載のように）、PLA または他の好適なポリマーを Pt (IV) にコンジュゲートさせることもできる（例えば、前述のように）。

【0046】

IV. 癌ターゲティング部分

本明細書に記載のナノ粒子は、ナノ粒子を癌細胞にターゲティングする1つまたは複数の部分を任意選択的に含んでもよい。本明細書で使用する場合、ナノ粒子を癌細胞に「ターゲティングする」とは、ナノ粒子が、他の細胞と比較して標的とする癌に、実質的に類似しているが標的指向性ではないナノ粒子より高い濃度で集積することを意味する。実質的に類似しているが標的指向性ではないナノ粒子は、標的指向性のナノ粒子と同じ成分を実質的に同じ相対濃度（例えば、約5%以内）で含むが、ターゲティング部分を含まない。

【0047】

癌ターゲティング部分は、コアの一部を形成する分子またはコアに結合している分子への結合などの、任意の好適な方法でコアに繋がっていてもよい。幾つかの実施形態では、ターゲティング部分は、コアの一部を形成する疎水性に結合している親水性ポリマーに結合している。様々な実施形態では、ターゲティング部分は、コアの一部を形成する疎水性

10

20

30

40

50

プロックを有するプロック共重合体の親水性部分に結合している。

【0048】

ターゲティング部分は、ポリマーの任意の好適な部分に結合していてもよい。幾つかの実施形態では、ターゲティング部分はポリマーの末端に結合している。様々な実施形態では、ターゲティング部分は、ポリマー末端以外の位置でポリマーの主鎖または主鎖に結合した分子に結合している。2つ以上のターゲティング部分が所定のポリマーに結合してもよい。複数の実施形態では、ポリマーは複数の末端を有する樹枝状ポリマーであり、ターゲティング部分は末端の2つ以上に結合していてもよい。

【0049】

ターゲティング部分が結合しているポリマーまたはその一部は、好適な官能基を有するまたは有するように修飾されているターゲティング部分と反応し、それに結合するように、-OH、-COOH、-NH₂、-SH、-N₃、-Br、-Cl、-I、-CH=CH₂、C≡CH、または-CHO等の適切な官能基を含有しても、または含有するように修飾されていてもよい。

10

【0050】

ターゲティング部分は、ナノ粒子中に任意の好適な濃度で存在してもよい。濃度を初期in vitro分析に基づいて容易に変え、in vivoで試験する前または使用する前に最適化できることが分かるであろう。幾つかの実施形態では、ターゲティング部分は、約5%～約100%の表面被覆率を有することになる。

20

【0051】

好ましくは、ターゲティング部分がナノ粒子のコアから延び、ターゲティング部分の作用を促進するように、ターゲティング部分は親水性ポリマーまたはポリマーの親水性部分に結合している。様々な実施形態では、ターゲティング部分はPEGに結合している。

【0052】

任意の好適な癌ターゲティング部分は、本明細書に記載のナノ粒子に結合していてもよい。癌ターゲティング部分の例としては、癌細胞に選択的な、または過剰発現した、アップレギュレートされた、または他の方法で非癌細胞には見られない量で存在する、細胞表面抗原またはマーカーに結合する部分が挙げられる。幾つかの実施形態では、癌ターゲティング部分は前立腺癌ターゲティング部分である。前立腺癌ターゲティング部分の例としては、前立腺特異膜抗原(PSMA)に選択的に結合する部分、例えば、PSMAに結合する抗体または抗体断片、およびアミノ酸配列WQPDTHHHWATL(配列番号1)を有するペプチドまたはそのPSMA結合断片等が挙げられる。

30

【0053】

V. ナノ粒子の合成

本明細書に記載のナノ粒子は、任意の好適なプロセスで合成するまたは組織化することができる。好ましくは、ナノ粒子は、プロセスによるばらつきを最小限に抑えるために一工程で組織化される。一工程プロセスはナノ沈殿および自己組織化を含むことができる。

【0054】

一般に、ナノ粒子は、疎水性成分を有機溶媒、好ましくは沈殿に使用される水性溶媒中に混和し得る溶媒に溶解または懸濁させることにより合成するまたは組織化させることができる。複数の実施形態では、アセトニトリルを有機溶媒として使用するが、任意の好適な溶媒、例えば、ジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、またはアセトン等を使用することもできる。親水性成分を好適な水性溶媒、例えば、水、または4重量%エタノール等に溶解させる。有機相溶液を水相溶液に滴下し、疎水性成分をナノ沈殿させ、水性溶媒中でナノ粒子を自己組織化させることができる。

40

【0055】

ナノ粒子を形成するのに適切な条件を決定するプロセスは、次のように行うことができる。簡潔には、官能化ポリマー、および、含まれる場合または適宜、他の成分を、有機溶媒混合物に共溶解させることができる。この溶液を熱(例えば、65°の)水性溶媒(例えば、水、4重量%エタノール等)に滴下することができ、その時、溶媒が蒸発し、疎水

50

性コアが親水性ポリマー成分、例えば、PEGによって取り囲まれたナノ粒子を得ることができる。諸条件、所望のターゲティング部分表面添加レベル（存在する場合）が達成された後、治療剤はナノ沈殿およびナノ粒子の自己組織化中に含まれ得る。

【0056】

手動混合により結果に望ましい再現性がなかった場合、マイクロ流体チャネルを使用してもよい。

【0057】

周知のまたは公開された方法を用いて、ナノ粒子のサイズ、電荷、安定性、薬物添加量、薬物放出速度、表面形態、および安定性のキャラクタリゼーションを行うことができる。

10

【0058】

(a) ポリマー溶液の組成を制御すること、および(b) 混合時間、温度、および水対有機溶媒の比などの混合条件を制御することにより、ナノ粒子の特性を制御することができる。合成に必要な処理工程の数と共に、ナノ粒子特性にばらつきが生じる可能性が増加する。

【0059】

疎水性コア成分対両親媒性シェル成分の比を変えることにより、製造されるナノ粒子のサイズを変えることができる。また、ポリマーの長さを変えることにより、混合時間を変えることにより、および有機対相の比を調節することにより、ナノ粒子サイズを制御することもできる。様々な長さのPLGA-b-PEGからなるナノ粒子に関する従来の経験から、短鎖ポリマー（例えば、PLGA₃₀₀₀~PEG₇₅₀）の最低約20nmから長鎖ポリマー（例えば、PLGA_{100,000}~PEG_{10,000}）の最大約150nmまでナノ粒子サイズが増加することが示唆される。従って、ポリマーの分子量はサイズの調節に役立つ。

20

【0060】

ナノ粒子表面電荷は、適切な電荷を有する末端基を有するポリマーを混合することにより制御することができる。さらに、親水性ポリマーの長さが異なるポリマー、分岐鎖親水性ポリマーを混合することにより、または疎水性ポリマーを添加することにより、組成および界面化学を制御することができる。

30

【0061】

形成後、ナノ粒子を回収し、遠心分離または遠心分離限外濾過等により洗浄することができる。凝集が起こった場合、ナノ粒子の精製は、透析により、比較的低速で比較的長く遠心分離することにより、または界面活性剤の使用等により行うことができる。

【0062】

回収後、残存する溶媒を除去することができ、粒子を乾燥させることができるが、これは成分の尚早な分解または放出を最小限に抑えるのに役立つはずである。ナノ粒子は、マンニトールなどの增量剤を使用して凍結乾燥しても、または他の方法で使用する前に貯蔵する準備をしてもよい。

【0063】

治療剤はそれらの溶解度に応じて有機相に配置されることもあればまたは水相に配置されることもあることが分かるであろう。

40

【0064】

本明細書に記載のナノ粒子は、ナノ粒子中に含まれるのに好適であると当該技術分野で一般に知られているまたは理解されているリン脂質またはコレステロール成分などの他の任意の好適な成分を含むことができる。同時係属中の特許出願であるPCT/US2012/053307号明細書は、ナノ粒子中に含まれ得る幾つかの追加の成分について記載している。同時係属中の特許出願、PCT/US2012/053307号明細書。

【0065】

PCT/US2012/053307号明細書に開示されているナノ粒子は、ナノ粒子をアポトーシス細胞にターゲティングするターゲティング部分、例えば、ホスファチジル

50

セリン(PS)をターゲティングする部分を含む。ターゲティング部分はナノ粒子の成分にコンジュゲートしている。このような部分は、様々なポリペプチドまたは2,2'-ジピコリルアミン亜鉛(Zn²⁺-DPA)配位錯体を含む。複数の実施形態では、本明細書に記載のナノ粒子は、アポトーシス細胞ターゲティング部分を含まないか、または実質的に含まない。複数の実施形態では、本明細書に記載のナノ粒子は、ナノ粒子の成分にコンジュゲートしているアポトーシス細胞ターゲティング部分を含まないか、または実質的に含まない。複数の実施形態では、本明細書に記載のナノ粒子は、PSターゲティング部分を含まないか、または実質的に含まない。複数の実施形態では、本明細書に記載のナノ粒子は、PS-ポリペプチドターゲティング部分またはZn²⁺-DPA部分を含まないか、または実質的に含まない。複数の実施形態では、本明細書に記載のナノ粒子は、ナノ粒子の成分にコンジュゲートしているPS-ポリペプチドターゲティング部分またはZn²⁺-DPA部分を含まないか、または実質的に含まない。

10

【0066】

PCT/US2012/053307号明細書に開示されているナノ粒子は、ナノ粒子の成分にコンジュゲートした、単糖類などのマクロファージターゲティング部分を含む。複数の実施形態では、本明細書に記載のナノ粒子はマクロファージターゲティング部分を含まないか、または実質的に含まない。複数の実施形態では、本明細書に記載のナノ粒子は、ナノ粒子またはその成分にコンジュゲートしているマクロファージターゲティング部分を含まないか、または実質的に含まない。複数の実施形態では、本明細書に記載のナノ粒子は、単糖部分を含まないか、または実質的に含まない。複数の実施形態では、本明細書に記載のナノ粒子は、ナノ粒子またはその成分にコンジュゲートしている単糖部分を含まないか、または実質的に含まない。

20

【0067】

VI. 使用および試験

一般に、本明細書に記載のナノ粒子は、癌、例えば、前立腺癌；より詳細には去勢抵抗性前立腺癌の治療または研究に使用することができる。

【0068】

本明細書で製造されるナノ粒子の性能および特性は任意の好適な方法で試験するまたは調べることができる。例として、細胞によるアッセイを用いて治療有効性を評価することができる。毒性試験、体内分布試験、薬物動態試験、および有効性試験は、細胞または齧歯動物または他の哺乳動物で行うことができる。ゼブラフィッシュまたは他の動物モデルを治療試験に使用することもできる。齧歯動物、ウサギ、またはブタ等を使用してナノ粒子の治療能力を評価することができる。ナノ粒子の特性を最適化する目的で使用され得る、ナノ粒子の性能または特性を評価するために行われ得る試験のその他の幾つかの詳細については後述する。しかし、当業者には、他のアッセイおよび手順を容易に行うことができる事が分かる。

30

【0069】

ナノ粒子の取り込みおよび結合特性は、任意の好適な細胞株、例えば、RAW 264.7細胞、J774細胞、ジャーカット細胞、およびHUVEC細胞で評価することができる。ナノ粒子の免疫調節の役割は、これらの細胞を様々な濃度のナノ粒子に曝したときの、サイトカインの放出を測定することにより評価することができる。例えば、Salvador-Morales C, Zhang L, Langer R, Farokhzad OC, Immunocompatibility properties of lipid-polymer hybrid nanoparticles with heterogeneous surface functional groups, Biomaterials 30:2231-2240, (2009)に記載のように；オプソニン処理されたナノ粒子を単離するためにカラムを使用して、補体活性化を調べ、どの経路で起こるかを特定することができる。ナノ粒子サイズは、体内分布を決定する要因

40

50

となり得るため、ナノ粒子を様々なサイズ（例えば、20～40、40～60、60～80、80～100、100～150、および150～300nm）に区分し、サイズに応じて試験することができる。

【0070】

ナノ粒子に使用される治療剤に適切な細胞タイプを使用して、治療有効性または適切なターゲティングを評価することができる。当該技術分野で一般に理解されているまたは知られているように、治療結果または薬理学的結果に適切なアッセイを使用することができる。

【0071】

ラットまたは他の好適な哺乳動物で、体内分布（biodistribution）試験および薬物動態（PK）試験を行うことができる。PK分析およびbiodistribution分析では、スプラーグドーリーラットにナノ粒子を外側尾静脈注射により投与することができる。最初、注射の1～24時間後にbiodistributionを追跡することができる。動物を犠牲にすることでき；脳、心臓、腸、肝臓、脾臓、腎臓、筋肉、骨、肺、リンパ節、消化管、および皮膚を切除し、その重量を測定し、ホモジナイズすることができる。組織濃度および血中半減期の測定を様々な時点に行うことができる。

【0072】

表面積または重量によるスケーリングなどの周知の方法による動物試験から、ヒトに使用するのに有効なナノ粒子の治療量を推定することができる。

【0073】

VII. 定義

本明細書で使用する科学技術用語は全て、特記しない限り、当該技術分野で通常使用される意味を有する。本明細書に記載する定義は、本明細書で頻用される特定の用語の理解を容易にしようとするものであり、本開示の範囲を限定するものではない。

【0074】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用する場合、単数形である「1つの（a）」、「1つの（an）」、および「その（the）」は、その内容から明らかに他の意味に解釈されない限り、複数の指示対象を有する実施形態を包含する。本明細書および添付の特許請求の範囲で使用する場合、「または」という用語は、その内容から明らかに他の意味に解釈されない限り、一般に「および／または」を含む意味で使用される。

【0075】

本明細書で使用する場合、「有する（have）」、「有する（having）」、「含む（include）」、「含む（including）」、「含む（comprise）」または「含む（comprising）」等はオープンエンドの意味で使用され、一般に、「含むが、限定されるものではない」ことを意味する。「から本質的になる」、および「からなる」等は、「含む（comprising）」等に包含されることが分かるであろう。

【0076】

本明細書で使用する場合、「疾患」は、正常な機能を損なう、生物またはその部分の1つまたは複数についての状態を意味する。本明細書で使用する場合、疾患という用語は、このような疾患、障害、状態、および機能障害等の用語を包含する。

【0077】

本明細書で使用する場合、「治療する」等は、疾患の1つまたは複数の症状を治癒、予防、または緩和することを意味する。

【0078】

本明細書で使用する場合、「疎水性」の化合物とは、水に不溶であるか、または水に対する溶解度が1ミリグラム／リットル未満の化合物である。

【0079】

本明細書で使用する場合、「親水性」の化合物とは、水に可溶であるか、または水に対する溶解度が1ミリグラム／リットル超の化合物である。

10

20

30

40

50

【0080】

本明細書で使用する場合、「結合する（bind）」、または「結合した（bound）」等は、化学成分が任意の好適なタイプの結合、例えば、共有結合、イオン結合、水素結合、またはファンデルワールス力等により連結していることを意味する。「結合する（bind）」、および「結合した（bound）」等は、「結合する（attach）」、および「結合した（attached）」等と互換的に使用される。

【0081】

本明細書で使用する場合、ナノ粒子のコアに「結合した（attached）」分子または部分は、コアに埋め込まれていても、コア内に含有されていても、コアの少なくとも一部を形成する分子に結合していても、コアに結合した分子に結合していても、またはコアに直接結合していてもよい。

10

【0082】

本明細書で使用する場合、ナノ粒子中の薬剤に関する遊離治療剤の「同等の」用量とは、ある用量のナノ粒子中に存在するのと本質的に同量の治療剤を含有する、遊離治療剤の用量である。

【0083】

本明細書で使用する場合、「遊離」治療剤は、ナノ粒子中に存在しない、またはナノ粒子と結合していない治療剤である。

【0084】

VIII. 参照による援用

20

本明細書で引用される特許、特許出願公開、および非特許文献はそれぞれ、本開示と矛盾しない範囲で、その各内容全体が本明細書に援用される。

【0085】

以下で、代表的なナノ粒子、ナノ粒子の製造方法、およびナノ粒子の使用方法の様々な実施形態について説明する非限定的な例を示す。

【実施例】

【0086】

癌を治療するための化学療法剤および抗炎症剤を送達するためにナノ粒子を使用するという概念の証明として、抗炎症剤であるアスピリンと、化学療法剤である Pt (IV) プロドラッグとを有するデンドロン / 分岐鎖末端ポリマー（蝶ネクタイ型ポリマー）の合成およびキャラクタリゼーションを行い、これらのポリマーを組織化して、併用療法用ナノ粒子を構成した。図 1 は、ナノ粒子を構成するための一般的スキームを示す。前立腺癌 PC - 3 細胞を用いて、これらのナノ粒子の抗癌活性をスクリーニングした。

30

【0087】

上記スキーム 1 に示すように、アスピリンで官能化されたアルキン - [G - 2] Bis - MPA デンドロンの合成とキャラクタリゼーションを行った。一端にアジド官能基を有し、もう一端に脂肪族 - OH 官能基を有するポリラクチド (PLA) を合成し、化学療法剤である Pt (IV) プロドラッグを組み込んだ（スキーム 2、上記）。最後に、クリッケミストリー法を利用してこれらの 2 つの構造を組み合わせ、これらの両方の薬物で官能化された PLA ポリマーを得た（スキーム 3、上記）。異なる分析法および分光法で、これらの化合物のキャラクタリゼーションを行った。

40

【0088】

1 の合成およびキャラクタリゼーション：ブチナルコール (0.68 g、9.7 mmol) と DMAP (0.18 g、1.5 mmol) を 50 mL 丸底フラスコ内のピリジン (2.3 g、2.92 mmol) に溶解した後、CH₂Cl₂ 15 mL を添加した。イソプロピリデン - 2,2 - ビス (メトキシ) プロピオン酸の酸無水物 (Bis - MPA) (4.18 g、12.6 mmol) をゆっくり添加した。この溶液を室温で 12 時間攪拌した。激しく攪拌しながら反応を水 3 mL で停止させた後、CH₂Cl₂ 50 mL で希釈し、この溶液を Na₂CO₃ の 10% (20 mL × 3) と飽和食塩水 (10 mL) で洗浄した。有機相を MgSO₄ で乾燥し、濾過し、濃縮した。粗生成物の精製は、ヘキサン (1

50

0.0 mL) で溶出し、EtOAc:ヘキサン (10:90、700 mL)、続いてEtOAc:ヘキサン (15:85) に極性を徐々に高くするシリカフラッシュクロマトグラフィーにより行い、1を無色油状物として得た。収量: 1.98 g (89%)。¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ PPM, 4.24 (t, 2H), 4.20 (d, 2H), 3.63 (d, 2H), 2.54 (t, 2H), 1.98 (t, 1H), 1.42 (s, 3H), 1.38 (s, 3H), 1.20 (s, 3H)。¹³C NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 174, 98.0, 79.7, 69.85, 65.90, 62.23, 41.86, 24.19, 23.06, 18.90.

【0089】

2の合成およびキャラクタリゼーション: 1 (1.73 g、7.64 mmol) を 100 mL 丸底フラスコ内のメタノール 50 mL に溶解した溶液に DOWEX 50W 樹脂 (3.5 g) を添加した。この混合物を 40 度で攪拌した。樹脂を濾別し、濾液を濃縮し、高真空中で乾燥して、2を無色油状物として得た。収量: 1.26 g (89%)。¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.07 (s, 3H), 2.03 (t, 1H), 2.57 (t, 2H), 3.73 (d, 2H), 3.87 (d, 2H), 4.26 (d, 2H)。¹³C NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 18.91, 17.06, 49.38, 62.35, 67.76, 70.12, 79.94, 175.45.

【0090】

3の合成およびキャラクタリゼーション: 化合物 2 (1.00 g、5.37 mmol) と DMAP (0.197 g、1.611 mmol) を 100 mL 丸底フラスコ内のピリジン (3.5 mL、42.96 mmol) に溶解した後、CH₂C₁₂ 15 mL を添加した。イソプロピリデン-2,2-ビス(メトキシ)プロピオニ酸の酸無水物 (Bis-MPA) (4.60 g、13.96 mmol) をゆっくり添加した。この溶液を室温で終夜攪拌した。激しく攪拌しながら反応を水 3 mL で停止させた後、CH₂C₁₂ 50 mL で希釈し、この溶液を Na₂CO₃ 水溶液の 10% (20 mL × 3)、NaHSO₄ 水溶液の 10% (20 mL × 3) および飽和食塩水 (10 mL) で洗浄した。有機相を MgSO₄ で乾燥し、濾過し、濃縮した。粗生成物の精製は、ヘキサン (100 mL) で溶出し、EtOAc:ヘキサン (10:90、700 mL)、続いてEtOAc:ヘキサン (15:85) に極性を徐々に高くするシリカフラッシュクロマトグラフィーにより行い、3を無色油状物として得た。収量: 1.37 g (53%)。¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ PPM, 4.19 (brs, 4H), 4.10 (t, 2H), 4.38 (d, 2H), 3.49 (d, 2H), 2.40 (t, 2H), 2.03 (brt, 1H), 1.27 (s, 6H), 1.22 (s, 6H), 1.16 (s, 3H), 1.06 (s, 6H)。¹³C NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 173.48, 172.26, 98.08, 79.7, 70.13, 65.94, 65.91, 65.32, 62.71, 46.75, 42.03, 24.93, 22.23, 18.83, 18.53, 17.65.

【0091】

4の合成およびキャラクタリゼーション: 3 (1.32 g、2.66 mmol) を 100 mL 丸底フラスコ内のメタノール 50 mL に溶解した溶液に DOWEX 50W 樹脂 7.5 g を添加した。この混合物を 40 度で攪拌した。樹脂を濾別し、濾液を濃縮し、高真空中で乾燥して、2を無色油状物として得た。収量: 1.38 g。¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.05 (s, 3H), 1.29 (s, 3H), 2.02 (t, 1H), 2.54 (t, 2H), 3.01 (brs, 4H), 3.65-3.78 (m, 8H), 4.23 (t, 2H), 4.41 (d, 2H)。¹³C NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 175.08, 172.79, 79.57, 70.30, 67.08, 64.81, 62.89, 49.76, 46.35, 18.83, 18.06, 17.11.

【0092】

5の合成およびキャラクタリゼーション: 化合物 4 (0.2 g、0.46 mmol) と

10

20

30

40

50

D M A P (0 . 0 3 3 g 、 0 . 2 7 6 m m o l) を 1 0 0 m L 丸底フラスコ内のピリジン (0 . 6 0 0 m L 、 7 . 3 6 m m o l) に溶解した後、 C H ₂ C l ₂ 1 5 m L を添加した。アスピリンの酸無水物 (0 . 8 1 9 g 、 2 . 3 9 6 m m o l) をゆっくり添加した。この溶液を室温で終夜攪拌した。激しく攪拌しながら反応を水 3 m L で停止させた後、 C H ₂ C l ₂ 5 0 m l で希釈し、この溶液を N a ₂ C O ₃ 水溶液の 1 0 % (2 0 m L × 3) 、 N a H S O ₄ 水溶液の 1 0 % (2 0 m L × 3) および飽和食塩水 (1 0 m L) で洗浄した。有機相を M g S O ₄ で乾燥し、濾過し、濃縮した。粗生成物の精製は、 E t O A c : ヘキサン (1 5 : 8 5) を溶出するシリカフラッシュクロマトグラフィーにより行い、 1 5 を無色油状物として得た。収量 : 1 . 3 7 g (5 3 %) 。 ¹ H N M R (C D C l ₃ , 4 0 0 M H z) : P P M , 7 . 0 6 - 8 . 1 9 (m , 1 6 H) , 4 . 1 7 - 4 . 4 4 (m , 1 2 H) , 1 . 9 7 - 2 . 4 6 (m , 1 4 H) , 1 . 2 0 (b r s , 1 6 H) , 0 . 8 5 (b r s , 8 H) . ¹ ³ C N M R (C D C l ₃ , 3 0 0 M H z) : 1 7 1 . 9 3 , 1 7 0 . 4 3 , 1 6 9 . 5 5 , 1 5 0 . 9 8 , 1 3 4 . 5 0 , 1 3 2 . 5 1 , 1 3 1 . 3 8 , 1 2 6 . 0 5 , 1 2 3 . 8 1 , 7 0 . 2 1 , 6 5 . 7 9 , 6 2 . 8 4 , 5 3 . 4 1 , 4 6 . 6 2 , 3 4 . 6 5 , 2 9 . 0 4 , 2 5 . 2 6 , 2 0 . 9 8 , 1 8 . 7 9 , 1 7 . 1 2 , 1 4 . 0 9 . E S I M S : 1 0 8 9 . 3 (M + N a) + .

【 0 0 9 3 】

6 、 N ₃ - P L A - O H の合成およびキャラクタリゼーション : B r - P L A - O H (2 . 3 7 g 、 0 . 2 5 m m o l) とアジ化ナトリウム (5 7 8 m g 、 8 . 8 8 m m o l) を D M S O 中で混合した。この反応混合物を 5 0 に 2 4 時間加熱した。反応混合物を室温に冷却した後、冷却された水に注ぎ、続いて、ポリマーをジクロロメタンで迅速に抽出した。溶媒を M g S O ₄ で乾燥し、減圧濃縮して粘性油状物を得た。次いで、ジエチルエーテルを用いてこれを再結晶し、白色の固体生成物を得た。収量 1 . 9 8 g . ¹ H N M R (C D C l ₃ , 4 0 0 M H z) : p p m 5 . 1 7 (q , 1 7 1) , 4 . 2 3 (t , 2 H) , 3 . 3 8 (t , 2 H) , 1 . 9 1 (t , 2 H) , 1 . 5 8 (d , 5 3 2 H) . ¹ ³ C N M R (C D C l ₃) : 1 6 9 . 5 4 , 6 8 . 9 7 , 6 6 . 6 7 , 4 7 . 8 4 , 2 8 . 1 0 , 1 6 . 6 1 . I R . 3 5 1 2 , 3 0 0 3 , 2 9 4 9 , 2 1 0 0 , 1 7 5 3 , 1 4 5 4 , 1 3 7 8 , 1 0 8 0 , 8 7 8 , 7 5 4 .

【 0 0 9 4 】

7 、 N ₃ - P L A - C O O H の合成およびキャラクタリゼーション : N ₃ - P L A - O H (2 . 0 g 、 0 . 2 5 m m o l) と、 D M A P (1 5 3 m g 、 1 . 2 5 m m o l) と、無水コハク酸 (6 2 5 m g 、 6 . 2 5 m m o l) をジクロロメタン 3 0 m L に溶解して、室温で攪拌しながら終夜反応させた。ジクロロメタン - メタノール (1 : 1) ~ デジエチルエーテル (過剰) 溶媒を用いて複数回沈殿させることにより生成物を単離した。これを減圧乾燥して白色の固体生成物を得た。収量 1 . 9 0 g . ¹ H N M R (C D C l ₃ , 4 0 0 M H z) : P P M , 5 . 1 4 (t , 1 4 0 H) 4 . 2 2 (t , 2 H) , 3 . 3 7 (t , 2 H) , 2 . 7 0 (m , 4 H) , 1 . 9 0 (t , 2 H) , 1 . 5 8 (d , 4 4 6 H) . ¹ ³ C N M R (C D C l ₃ , 1 0 0 M H z) : 1 7 5 . 1 5 , 6 5 . 0 6 , 3 1 . 9 0 , 2 9 . 6 8 , 2 9 . 6 4 , 2 9 . 5 6 , 2 9 . 4 9 , 2 9 . 3 4 , 2 9 . 2 2 , 2 8 . 5 4 , 2 5 . 8 5 , 2 2 . 6 7 , 1 4 . 0 9 . 収量 1 . 9 8 g . ¹ H N M R (C D C l ₃ , 4 0 0 M H z) : p p m 5 . 1 7 (q , 1 7 1) , 4 . 2 3 (t , 2 H) , 3 . 3 8 (t , 2 H) , 1 . 9 1 (t , 2 H) , 1 . 5 8 (d , 5 3 2 H) . ¹ ³ C N M R (C D C l ₃) : 1 6 9 . 5 4 , 6 8 . 9 7 , 6 6 . 6 7 , 4 7 . 8 4 , 2 8 . 1 0 , 1 6 . 6 1 .

【 0 0 9 5 】

8 、 N ₃ - P L A - トリスの合成およびキャラクタリゼーション : N ₃ - P L A - O H (0 . 7 4 5 g 、 0 . 0 9 1 9 m m o l) と、トリス (0 . 1 1 3 g 、 0 . 9 1 9 m m o l) と、 E E D Q (0 . 2 3 0 g 、 0 . 9 1 9 m m o l) をジメチルホルムアミド 3 0 m L に溶解した。この混合物を 6 0 で 2 4 時間攪拌した後、真空乾燥した。粗混合物は、 3 L の水に対して 2 4 時間透析 (M W C O 2 0 0 0) を行い、水を 1 2 時間毎に交

10

20

30

40

50

換することにより精製した、またはジクロロメタン：メタノール：ジエチルエーテル（1：4：5）で沈殿させた。得られた残渣を液体窒素で凍結し、凍結乾燥した。収量（0.500g、72%）。¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) : PPM, 5.14 (t, 140H) 4.34 (brs, 3H), 4.18 (brt, 2H), 3.67 (br 6H), 3.36 (t, 2H), 2.67 (m, 4H), 1.88 (t, 2H), 1.55 (d, 485H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) : 169.54, 68.97, 66.56, 16.61.

【0096】

9、Asp-PLA-トリスの合成およびキャラクタリゼーション：N₃-PLA-トリス（46mg、0.0057mmol）と、Ac-[G-2]-(Asp)₄（12.27mg、0.0115mmol）と、CuBr（2.56mg、0.0115）と、PMDETA（1.99mg、0.0115mmol）を窒素パージ下でジメチルホルムアミド5mLに溶解した。この混合物を窒素ガス通気下、室温で攪拌した。溶媒を蒸発乾固した。ジクロロメタン：メタノール：ジエチルエーテル（1：4：5）混合物で沈殿させることにより粗混合物を精製した。得られたペレットを液体窒素で凍結し、凍結乾燥した。収量（41mg、71%）。¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) : PPM, 7.91 (d, 4H), 7.55 (t, 4H), 7.29 (t, 4H), 7.09 (d, 4H), 5.14 (t, 89H) 4.43 - 4.15 (m, 16H), 3.66 (br 6H), 3.37 (t, 2H), 2.47 (m, 4H), 2.34 (s, 12H), 2.03 (d, 9H), 1.89 (t, 2H), 1.56 (d, 305H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) : 171.66, 169.52, 163.29, 150.76, 134.00, 131.34, 125.85, 123.64, 122.40, 69.22, 65.55, 62.88, 61.63, 47.37, 46.11, 20.74, 16.59.

【0097】

10、Asp-PLA-トリス-Ptの合成およびキャラクタリゼーション：Asp-PLA-トリス（35mg、0.0036mmol）と、モノスクシナート-Pt（IV）（13mg、0.029mmol）と、EDC（5.6mg、0.029mmol）と、DMAP（2mg、0.015mmol）を、無水ジメチルホルムアミド10mLに溶解した。この混合物を室温で終夜攪拌した。3Lの水に対して24時間透析（MWCO 2000）を行い、12時間毎に交換することにより粗混合物を精製した。透析した試料を液体窒素で凍結し、凍結乾燥した。得られたポリマーをDCMに溶解し、濾過した。この溶液を濃縮し、ジエチルエーテルを用いて再沈殿し、淡黄色固体を得た。DCM-エーテルを用いて溶解-再沈殿することによりポリマーを2回精製し、最後に乾燥してPt（IV）がコンジュゲートしたもの、即ち、PLA-Pt（IV）を得た。精製したポリマーの収率は65%であった。この凍結乾燥生成物をジクロロメタンに溶解し、濾過して過剰のモノスクシナート-Pt（IV）を除去した。次いで、溶媒を蒸発させて、オフホワイト黄色固体生成物を得た。収量（26mg、68%）。¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) : PPM, 7.90 (d, 4H), 7.55 (t, 4H), 7.25 (t, 4H), 7.08 (d, 4H), 6.86 - 6.96 (br m, 18H), 5.14 (t, 239H), 4.45 - 4.16 (m, 16H), 3.69 (br 6H), 3.37 (t, 2H), 2.73 (m, 4H), 2.47 (m, 12H), 2.28 - 2.33 (s, 12H), 2.04 (d, 9H), 1.72 (t, 2H), 1.56 (d, 851H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) : 195.31, 175.11, 169.57, 139.27, 136.18, 131.25, 129.71, 111.94, 110.15, 68.98, 16.62.

【0098】

PLGA-トリスの合成：PLGA-COOH（固有粘度d/L 0.15~0.25）（500mg、0.090mmol）と、NHS（12.37mg、0.107mmol）

)とを無水CH₂Cl₂中で混合した混合物を0で30分間攪拌した。DCC(20.34mg、0.098mmol)をCH₂Cl₂に溶解した溶液を反応混合物に滴下した。反応を0から室温で12時間攪拌した。沈殿したN,N'-ジシクロヘキシル尿素(DCU)副生成物を濾別し、ロータリーエバポレータを用いてこの溶液を蒸発させた。この残渣を無水CH₂Cl₂に溶解した。トリエチルアミン(18.13mg、0.18mmol)とトリス(22.0mg、0.18mmol)とをDMF10mLに溶解した溶液を上記反応混合物にゆっくり添加した。この反応混合物を激しく攪拌しながら室温に24時間保った。溶媒を蒸発乾固した。残渣をCH₂Cl₂に溶解し、濾過し、ジエチルエーテルとメタノール(CH₂Cl₂:MeOH:ジエチルエーテル:1:5:4)で沈殿させた。このプロセスを5回繰り返した。収量、190mg、37%。¹H NMR(CDCl₃, 400MHz): ppm 5.20(m), 4.81(m), 4.28(br), 3.66(s), 1.56(d).

【0099】

PLGA-トリス-Aspの合成: PLGA-トリス(100mg、0.016mmol)とDMAP(6.1mg、0.050mmol)とを無水CH₂Cl₂中で混合した混合物を室温で30分間攪拌した。アスピリンクロライド(99.0mg、0.5mmol)のCH₂Cl₂溶液を反応混合物に滴下した。反応を室温で24時間攪拌した。溶媒を蒸発乾固した。残渣をCH₂Cl₂に溶解し、ジエチルエーテルとメタノールで沈殿させた(CH₂Cl₂:MeOH:ジエチルエーテル:1:5:4)。このプロセスを5回繰り返した。収量、94mg、90%。¹H NMR(CDCl₃, 400MHz): ppm 7.90(d), 7.60(t), 7.19(t), 7.03(d), 5.21(m), 4.82(m), 3.24(s), 1.88(s), 1.58(m).

【0100】

PLGA-パミドロネートコンジュゲートの合成: パミドロネートのナトリウム塩(25.0mg、0.0896)を10%酢酸水溶液に溶解し、この溶液を凍結し、凍結乾燥した。PLGA(500mg、0.0896mmol)の遊離カルボン酸基の活性化は、ポリマーをDMSOとジクロロメタンとの1:1混合物4mLに溶解することにより行った。溶液を攪拌しながら0に2時間保った。予め凍結乾燥したパミドロネートをDMSO1mLに溶解して、反応混合物に添加し(注: それは十分溶解せず、懸濁液になることがある、それを添加することがある)、それを0で2時間攪拌した後、室温で8~12時間攪拌した。反応混合物を濃縮し、生成物をジエチルエーテル:メタノール(1:1)で沈殿させた。収量、450mg、87%。¹H NMR(CDCl₃): ppm: 5.16-5.20(m), 4.62-4.87(m), 2.62-2.74(t), 1.44-1.51(m). ¹³C NMR(CDCl₃): 169.38, 166.34, 69.15, 66.80, 60.89, 40.48, 16.64.

【0101】

プレドニゾンモノスクシネートの合成: プレドニゾン(0.2g、0.558mmol)と、DMAP(68.41mg、0.558mmol)と、無水コハク酸(55.83g、0.558mmol)を、ジクロロメタン60mLに溶解し、室温で3日間攪拌しながら終夜反応させた。次いで、反応混合物を水5mLで反応停止させた。その後、反応混合物をジクロロメタン50mLで希釈し、10%NaHSO₄水溶液(20mL×3)および飽和食塩水で抽出した。有機相をMgSO₄で乾燥し、溶媒を蒸発乾固して白色の固体生成物を得た。収量160mg、62%、2回目は175mg、68%。¹H NMR(CDCl₃, 400MHz): PPM, 7.69(d, 1H), 6.22(d, 1H), 5.08(d, H), 4.70(d, 1H), 2.85(d, 1H), 2.72(m, 5H), 2.27-2.51(m, 4H), 1.90-2.07(m, 4H), 1.69(m, 1H), 1.42(s, 4H), 1.26(m, 1H), 0.67(s, 3H). ¹³C NMR(CDCl₃, 100MHz): 208.96, 186.63, 171.73, 155.63, 127.47, 124.51, 89.56, 67.89, 60.15, 51.42, 49.58, 49.51, 42.43, 36.06, 34.90

3, 33.66, 32.23, 28.66, 28.52, 23.23, 18.73, 15.48.

【0102】

ブレドニゾン酸無水物の合成：モノスクシナート-ブレドニゾン（200mg、0.436mmol）をCH₂Cl₂15mLに懸濁した懸濁液を調製し、1,3-ジシクロヘキシリカルボキサミド（DCC）（45mg、0.2183mmol）をCH₂Cl₂5mLに溶解した溶液を添加した。反応混合物を室温で終夜攪拌した。尿素DCC副生成物であるジシクロヘキシリ尿素（DCU）をガラスフィルターで濾別し、少量のCH₂Cl₂で洗浄した。溶媒を蒸発させ、得られた残渣をEtOAcに加えた。得られた懸濁液をガラスフィルターで濾過することにより、残留DCUを除去した。濾液を蒸発させて酸無水物を白色固体油状物として得た。化合物を次の反応に直接使用した。収量219mg、50%。¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) : PPM, 7.66 (d, 1H), 6.19 (d, 1H), 5.07 (d, 1H), 4.74 (d, 1H), 2.73-2.87 (m, 6H), 2.29-2.48 (m, 4H), 1.91-2.05 (m, 6H), 1.56-1.69 (m, 3H), 1.40 (s, 4H), 1.28 (m, 2H), 1.10 (m, 1H), 0.65 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100MHz) : 190.35, 186.64, 171.20, 155.20, 127.41, 124.59, 113.29, 88.53, 68.03, 60.15, 51.47, 49.57, 42.36, 36.08, 33.66, 32.21, 30.18, 28.21, 24.80, 23.24, 18.78, 15.45.

10

20

30

40

50

【0103】

Ac-[G-2]-Pred₄の合成：Ac-[G-2]-OH₄（19.54mg、0.046mmol）とDMAP（3.45mg、0.028mmol）を50mL丸底フラスコ内のCH₂Cl₂に溶解した。モノスクシナート-ブレドニゾンの酸無水物（219mg、0.243mmol）をゆっくり添加した。この溶液を室温で終夜攪拌した。激しく攪拌しながら反応を水4mLで反応停止させた後、CH₂Cl₂50mLで希釈し、この溶液をNa₂CO₃の10%（20mL×3）および飽和食塩水（10mL）で洗浄した。有機相をMgSO₄で乾燥し、濾過し、濃縮してペースト状の物質を生成物として得た。%。¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) : PPM, 7.66 (d, 3H), 6.14 (d, 3H), 6.03 (s, 3H), 5.02 (d, 3H), 4.70 (d, 3H), 4.18 (m, 6H), 2.86 (m, 3H), 2.67 (m, 12H), 2.25-2.49 (m, 14H), 1.66-1.99 (m, 18H), 1.53 (m, 8H), 1.39 (s, 12H), 1.06-1.23 (m, 18H), 0.61 (s, 9H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100MHz) : 209.58, 205.09, 186.89, 175.20, 172.02, 167.91, 157.69, 156.26, 127.24, 124.25, 88.43, 68.24, 60.01, 51.40, 49.50, 49.23, 42.57, 36.08, 34.61, 33.58, 32.29, 28.84, 28.71, 25.46, 24.80, 23.24, 18.79, 18.70, 15.38.

【0104】

モノスクシナート-Pt(IV) : [ジアミノジクロロモノスクシナート白金(IV)]の合成：ジアミノジクロロジヒドロキシ白金(IV) {0.2g、0.59mmol}と無水コハク酸（0.054g、0.531mmol）とをDMSO（16mL）中で混合した混合物を24時間攪拌した。次いで、凍結乾燥により溶媒を濃縮した。粗生成物をアセトンで再結晶し、-20°Cに2時間保った後、遠心分離により生成物を白みがかった黄色固体として分離した。収量160mg（63%）。¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) : PPM, 5.77-56.03 (broad m, 6H), 2.27-2.33 (m, 4H). ¹³C NMR (CDCl₃, 300MHz) : 180.18, 174.52, 31.76, 30.68.

【0105】

N P の製造： P L G A - b - P E G - O H と (アスピリン)₄ - P L A - [P t (I V) プロドラッグ]₃ ポリマー (図 1) をナノ沈殿法で自己組織化することにより合成した併用療法 N P 。動的光散乱法 (D L S) および透過型電子顕微鏡法 (T E M) を使用して、これらの N P のサイズと形態を明らかにし (図 2 A および図 2 B) 、それは 106.2 + 1.9 nm であった。ゼータ電位測定値から、 N P は負電荷を有しており (図 2 C) 、ゼータ電位が -15.8 ± 0.4 mV であることが分かった。 P t は誘導結合プラズマ質量分析 (I C P - M S) による N P の組成分析から添加量が 2.4 % であることが分かり、 H P L C からアスピリンは添加量が 3.0 % であることが分かった。

【 0106 】

抗癌活性 *in vitro* 試験：併用療法の能力を実証するために、ヒト前立腺癌 P C - 3 細胞株に対して M T T (3 - (4 , 5 -ジメチルチアゾール - 2 - イル) - 2 , 5 -ジフェニルテトラゾリウムプロマイド) アッセイを用いることによりこのプラットフォームの *in vitro* 抗癌活性を調べ、シスプラチン、アスピリン、および遊離製剤中のそれらの組合せと比較した (インキュベート時間 = 48 時間 ; ナノ粒子処理 = 12 時間) 。ナノ粒子構造は、遊離薬物または遊離製剤中のそれらの組合せと比較して有効性が高いことが判明した (図 3) 。 P C - 3 細胞に対する様々な構造の I C₅₀ を下記の表 1 に示す。

【 0107 】

【 表 1 】

表1: MTTアッセイによる細胞傷害特性

治療用構造	I C ₅₀ (μ M)
シスプラチン	14
アスピリン	>100
遊離シスプラチン+遊離アスピリン	12
シスプラチン-アスピリン-ナノ粒子	シスプラチンに関して 2.3 アスピリンに関して 23

10

20

30

【 0108 】

要約： C R P C を治療するための化学療法薬と抗炎症薬を送達する併用療法を開発した。アスピリンで官能化されたアルキンデンドロンを合成し、クリックケミストリー法により P L A - アジドと結合させ、最後にこれを P t (I V) プロドラッグで修飾した。これらのポリマーを用いてブレンドされた N P を合成し、 D L S および T E M でキャラクタリゼーションを行った。初期の研究から、ナノ粒子が前立腺癌細胞に対して顕著な抗癌作用を有することが分かった。

【 0109 】

他のポリマーにコンジュゲートした治療剤または治療剤 - デンドロンを合成した。このような化合物はナノ粒子に容易に組み込むことができる。

40

【 0110 】

このようにして、併用療法用ナノ粒子の実施形態を開示する。当業者には、本明細書に記載のナノ粒子および方法を、開示したもの以外の実施形態で実施できることが分かるであろう。開示した実施形態は例証の目的で示されており、本発明を限定するものではない。

【図2A】

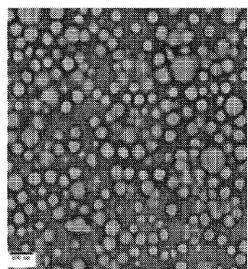


Fig. 2A

【図1】

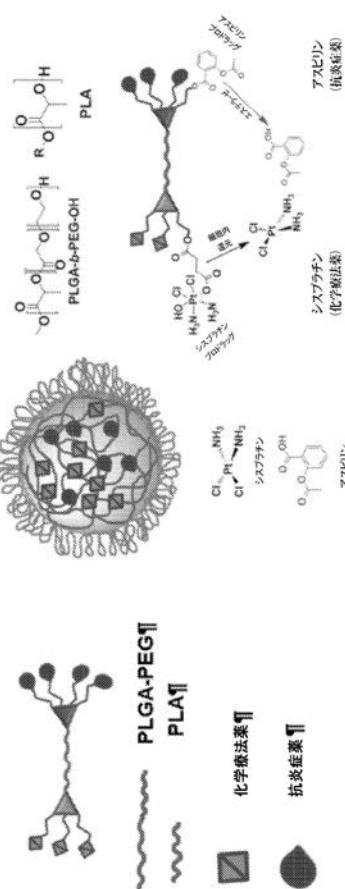


図1

【図2B】

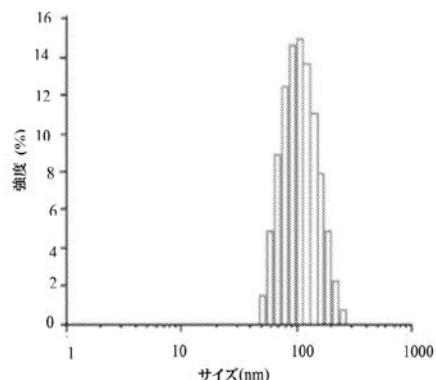


図2B

【図2C】

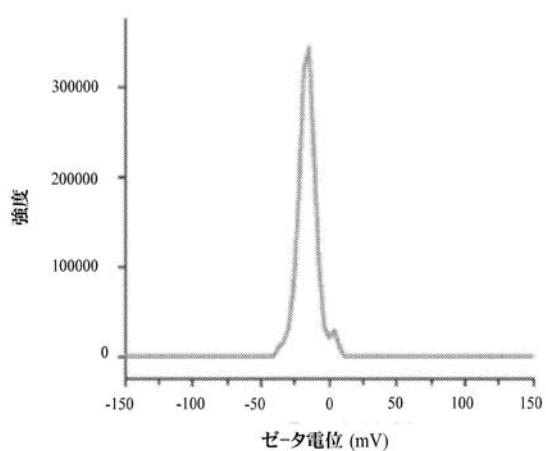
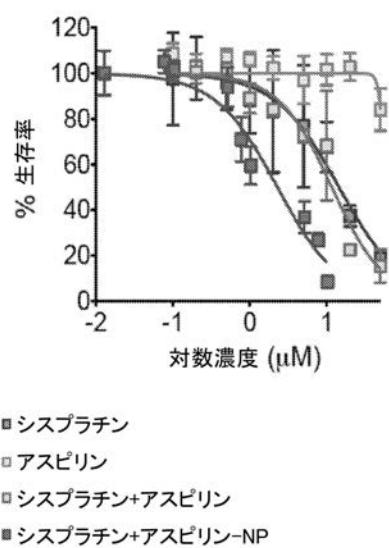


図2C

【図3】

図3



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2014/033431						
Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)								
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 8-13 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Claims 8-13 pertain to a method for treatment of the human by therapy, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv), to search. 2. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 24,26 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: Claims 24,26 are unclear since they refer to claims which are not searchable due to not being drafted in accordance with the second and third sentence of Rule 6.4(a). 3. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 4-7,11-14,22-23,25,27 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). 								
Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)								
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <p>Group 1, claims 1, 3-7, 14 (all partial), 2 related to a nanoparticle comprising a hydrophilic core; a hydrophilic layer surrounding the core; a chemotherapeutic agent attached to the core; and an anti-inflammatory agent attached to the core.</p> <p>Group 2, claims 1, 3-7, 14 (all partial), 15-27 related to a nanoparticle comprising a hydrophobic core; a hydrophilic layer surrounding the core; a chemotherapeutic agent attached to the core; and an anti-inflammatory agent attached to the core.</p> <p>Group 3, claim 28 related to a nanoparticle comprising a hydrophobic core; a hydrophilic layer surrounding the core; an inhibitor of bone resorption attached to the core; and a chemotherapeutic agent attached to the core.</p> <p>Group 4, claim 29 related to a compound.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims. 2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees. 3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 4. <input checked="" type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: claims 1, 3-7, 14 (all partial), 2 <p>Remark on Protest</p> <table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top; padding-right: 10px;"><input type="checkbox"/></td> <td>The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</td> </tr> <tr> <td style="vertical-align: top; padding-right: 10px;"><input type="checkbox"/></td> <td>The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.</td> </tr> <tr> <td style="vertical-align: top; padding-right: 10px;"><input type="checkbox"/></td> <td>No protest accompanied the payment of additional search fees.</td> </tr> </table>			<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.
<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.							
<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.							
<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.							

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2014/033431
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 9/16(2006.01)i, A61K 47/48(2006.01)i, A61K 47/30(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 9/16; A61K 9/14; A61K 47/30; A61K 48/00; A61K 38/19; A61K 47/48; A61P 35/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: nanoparticle, hydrophilic core, hydrophilic shell, chemotherapeutic agent, anti-inflammatory agent, prostate cancer		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011-084620 A2 (BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC. et al.) 14 July 2011 See abstract, claims 9, 11-12, 16-17, page 23, lines 22-31, page 33, lines 5-11, pages 34, lines 3-21.	1-3
A	US 2011-0200677 A1 (CHANDRAN, SACHIN S. et al.) 18 August 2011 See abstract, claims 1, 3, 31.	1-3
A	US 2010-0203142 A1 (ZHANG, LIANGFANG et al.) 12 August 2010 See abstract, claim 1.	1-3
A	ULLEN, A. et al., 'Additive/synergistic antitumoral effects on prostate cancer cells in vitro following treatment with a combination of docetaxel and zoledronic acid', Acta Oncologica, 2005, Vol. 44, No. 6, pp. 644-650 See abstract, pages 647-648.	1-3
A	CLEMENTI, CHIARA et al., 'Dendritic poly (ethylene glycol) bearing paclitaxel and alendronate for targeting bone neoplasms', Molecular pharmaceutics, 2011 (Epub. 24 May 2011), Vol. 8, No. 4, pp. 1063-1072 See abstract, pages 1070-1071.	1-3
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 24 October 2014 (24.10.2014)		Date of mailing of the international search report 27 October 2014 (27.10.2014)
Name and mailing address of the ISA/KR  International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-472-7140		Authorized officer SIHN, Young Sihn Telephone No. +82-42-481-8270

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US2014/033431

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011-084620 A2	14/07/2011	CN 102791294 A EA 201290506 A1 EP 2512522 A2 EP 2512522 A4 JP 2013-514977 A US 2013-0017265 A1 WO 2011-084620 A3	21/11/2012 29/03/2013 24/10/2012 25/09/2013 02/05/2013 17/01/2013 17/11/2011
US 2011-0200677 A1	18/08/2011	WO 2009-070302 A1	04/06/2009
US 2010-0203142 A1	12/08/2010	EP 2144600 A2 EP 2144600 A4 JP 2010-523595 A JP 2013-163696 A US 2009-074828 A1 WO 2008-124632 A1 WO 2008-124639 A2 WO 2008-124639 A3	20/01/2010 16/03/2011 15/07/2010 22/08/2013 19/03/2009 16/10/2008 16/10/2008 27/11/2008

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 33/24 (2006.01)	A 6 1 K 33/24	4 H 0 5 0
A 6 1 K 31/616 (2006.01)	A 6 1 K 31/616	
A 6 1 K 47/34 (2006.01)	A 6 1 K 47/34	
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	
A 6 1 K 31/573 (2006.01)	A 6 1 K 31/573	
A 6 1 K 31/663 (2006.01)	A 6 1 K 31/663	
A 6 1 P 19/08 (2006.01)	A 6 1 P 19/08	
C 0 7 D 249/04 (2006.01)	C 0 7 D 249/04	5 0 3
C 0 7 C 69/157 (2006.01)	C 0 7 C 69/157	
C 0 7 F 9/38 (2006.01)	C 0 7 F 9/38	E
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	

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

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ダール, シャンタ

アメリカ合衆国 ジョージア 3 0 6 0 6 , アセンズ, ティモシー ロード 1 5 0 0

(72)発明者 パサク, ラケシュ クマール

アメリカ合衆国 ジョージア 3 0 6 0 5 , アセンズ, サウス ポーブ ストリート 3 7 1

F ターム(参考) 4C076 AA65 CC04 CC27 EE24 EE41 EE48 EE59 FF31 FF67

4C084 AA01 AA02 AA20 BA01 BA18 CA62 DC50 MA02 MA38 NA12

NA13 ZA971 ZA972 ZB111 ZB112 ZB261 ZB262

4C086 AA01 AA02 DA10 DA17 DA34 HA12 HA24 HA26 HA28 MA02

MA03 MA04 MA05 MA38 NA12 NA13 ZA97 ZB11 ZB26

4C091 AA01 BB03 BB05 CC01 DD01 EE07 FF01 GG01 HH01 JJ03

KK12 LL01 MM03 NN01 PA03 PA05 PA09 PB02 QQ01

4H006 AA01 AA03 AB22 BJ50 BS30 KA06

4H050 AA01 AA03 AB28