

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6585504号
(P6585504)

(45) 発行日 令和1年10月2日(2019.10.2)

(24) 登録日 令和1年9月13日(2019.9.13)

(51) Int.Cl.	F 1	
C07K 7/02	(2006.01)	C07K 7/02
A61K 47/60	(2017.01)	A61K 47/60
A61P 35/00	(2006.01)	A61P 35/00
A61P 43/00	(2006.01)	A61P 43/00
A61K 41/00	(2006.01)	A61K 41/00

請求項の数 12 (全 55 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-547561 (P2015-547561)
(86) (22) 出願日	平成25年12月12日 (2013.12.12)
(65) 公表番号	特表2016-511222 (P2016-511222A)
(43) 公表日	平成28年4月14日 (2016.4.14)
(86) 國際出願番号	PCT/US2013/074762
(87) 國際公開番号	W02014/093675
(87) 國際公開日	平成26年6月19日 (2014.6.19)
審査請求日	平成28年12月9日 (2016.12.9)
(31) 優先権主張番号	61/736,067
(32) 優先日	平成24年12月12日 (2012.12.12)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)
(31) 優先権主張番号	13/803,878
(32) 優先日	平成25年3月14日 (2013.3.14)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)

(73) 特許権者	506115514 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94607-5200, オークランド, フランクリン ストリート 1111, 12番 フロア
(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敏
(74) 代理人	100087871 弁理士 福本 積
(74) 代理人	100087413 弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

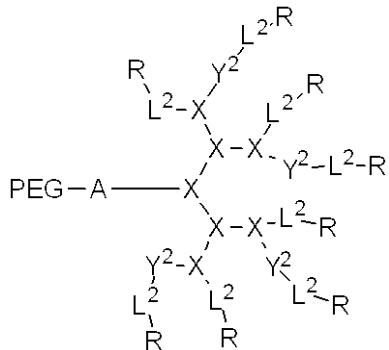
(54) 【発明の名称】ポルフィリン修飾されたテロデンドリマー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下:

【化 1】



10

(式中、

PEG は、分子量 1 ~ 100 kDa を有する、ポリエチレンゴリコール (PEG) ポリマーであり;

A は、少なくとも 1 個の分岐したモノマー単位 X を含み、且つ少なくとも 1 個の PEG 基に連結され;

各分岐したモノマー単位 X はリジンであり;

20

各 Y^2 は、存在しないか、又はシステインであり；

各 L^2 は、独立して、結合又はリンカーであり；

各 R は、ポルフィリン、コール酸、(3, 5, 7, 12)-7, 12-ジヒドロキシ-3-(2, 3-ジヒドロキシ-1-プロポキシ)-コール酸(CA-4OH)、(3, 5, 7, 12)-7-ヒドロキシ-3, 12-ジ(2, 3-ジヒドロキシ-1-プロポキシ)-コール酸(CA-5OH)、(3, 5, 7, 12)-7, 12-ジヒドロキシ-3-(3-アミノ-2-ヒドロキシ-1-プロポキシ)-コール酸(CA-3OH-NH₂)、ギ酸コレステロール、ドキソルビシン、及びレインからなる群から独立して選択され、ここで少なくとも1個の R 基は、ポルフィリンである。)の構造を有する化合物。

10

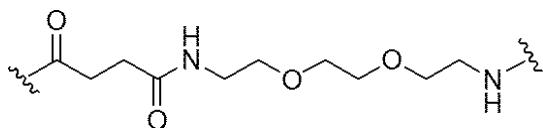
【請求項2】

リンカー L^2 が、存在する場合には、ポリエチレングリコール、ポリセリン、ポリグリシン、ポリ(セリン-グリシン)、脂肪族アミノ酸、6-アミノヘキサン酸、5-アミノペンタン酸、4-アミノブタン酸及び-アラニンからなる群から独立して選択される、請求項1記載の化合物。

【請求項3】

各リンカー L^2 が、下記式：

【化2】



20

を有する、請求項1記載の化合物。

【請求項4】

各残存する R が、コール酸である、請求項1記載の化合物。

【請求項5】

PEGは、PEG5kであり；

Aは、リジンであり；

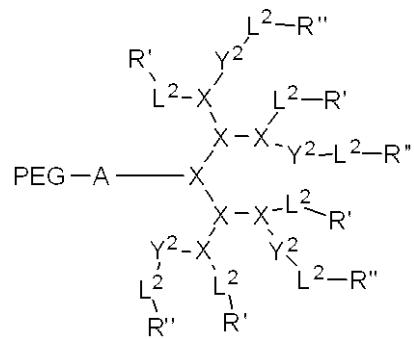
各 L^2 は、結合又はリンカー E b e s (8-アミノ-3, 6-ジオキサオクチルコハク酸)であり；及び 各 R は、コール酸又はポルフィリンである、請求項1記載の化合物。

30

【請求項6】

下記：

【化3】



40

(式中、

各 R' は、コール酸(CA)、(3, 5, 7, 12)-7, 12-ジヒドロキシ-3-(2, 3-ジヒドロキシ-1-プロポキシ)-コール酸(CA-4OH)、(3, 5, 7, 12)-7-ヒドロキシ-3, 12-ジ(2, 3-ジヒドロキシ-1-プロポキシ)-コール酸(CA-5OH)及び(3, 5, 7, 12)-7, 12-ジヒドロキシ-3-(3-アミノ-2-ヒドロキシ-1-プロポキシ)-コール酸(CA-3OH-NH₂)からなる群から選択され；並びに

各 R'' は、ピロフェオホルビド-a、フェオホルビド、クロリン e 6、ブルプリン及び

50

フルプリニミドからなる群から選択されるポルフィリンである。)

からなる群から選択される、請求項 5 記載の化合物。

【請求項 7】

ポルフィリンが、ピロフェオホルビド - a である、請求項 6 記載の化合物。

【請求項 8】

化合物が、下記：

(1) 各 L^2 が結合であり、各 Y^2 が存在せず、各 R' がコール酸であり、各 R'' がピロフェオホルビド - a である化合物；

(2) 各 L^2 がリンカー E b e s (8-アミノ-3,6-ジオキサオクチルコハク酸) 10 であり、各 Y^2 が存在せず、各 R' がコール酸であり、

各 R'' がピロフェオホルビド - a である化合物；

(3) 各 L^2 が結合であり、各 Y^2 がシステインであり、各 R' がコール酸であり、各 R'' がピロフェオホルビド - a である化合物；

(4) 各 L^2 がリンカー E b e s であり、各 Y^2 がシステインであり、各 R' がコール酸 20 であり、各 R'' がピロフェオホルビド - a である化合物；

(5) 各 L^2 が結合であり、各 Y^2 が存在せず、各 R' がコール酸であり、各 R'' がピロフェオホルビド - a である化合物；

(6) 各 L^2 がリンカー E b e s であり、各 Y^2 が存在せず、各 R' がコール酸であり、各 R'' がピロフェオホルビド - a である化合物；

(7) 各 L^2 が結合であり、各 Y^2 がシステインであり、各 R' がコール酸であり、各 R'' がピロフェオホルビド - a である化合物；並びに 20

(8) 各 L^2 がリンカー E b e s であり、各 Y^2 がシステインであり、各 R' がコール酸 20 であり、各 R'' がピロフェオホルビド - a である化合物

からなる群から選択される、請求項 6 記載の化合物。

【請求項 9】

内側及び外側を有するナノ担体であって、該ナノ担体が、複数の第一のコンジュゲートを含み、ここで各コンジュゲートは、請求項 1 記載の化合物であり、

ここで各コンジュゲートは、水性溶媒中で自己組織化し、ナノ担体を形成し、その結果疎水性ポケットが、各両親媒性化合物の疎水面の互いへの配向により、ナノ担体の内側に形成され、ここで各コンジュゲートの P E G は、ナノ担体の外側上に自己組織化している 30 、ナノ担体。

【請求項 10】

ナノ担体が、

(a) 疎水性薬物又は造影剤を更に含み、その結果疎水性薬物又は造影剤が、ナノ担体の疎水性ポケット内に封鎖され、前記疎水性薬物が、ボルテゾミブ、パクリタキセル、S N 3 8、カンプトテシン、エトポシド及びドキソルビシン、ドセタキセル、ダウノルビシン、V P 1 6、ブレドニソン、デキサメタゾン、ビンクリスチソル、ビンプラスチソル、テムシロリムス、カルムシン、ソラフィニブ、ラパチニブ、及びボルテゾミオブからなる群から選択される、

(b) ポルフィリンにキレートされた金属陽イオンを含み；

(c) ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{177}Lu 、 ^{67}Ga 、 ^{111}In 、及び ^{90}Y からなる群から選択される放射性 - 金属陽イオンを含み、ここで前記放射性金属が、ポルフィリンへキレートされている、

(d) コンジュゲートが、架橋基を介して架橋され、

(e) 各コンジュゲートが、

少なくとも 2 個のコール酸；

少なくとも 2 個のピロフェオホルビド - a 基；及び

少なくとも 2 個の架橋基を含み、

ここで、ナノ担体のコンジュゲートが、架橋基を介して架橋される、

(f) ポリエチレンギリコール (P E G) ポリマー；

P E G ポリマーに連結された結合リガンド；

親水面及び疎水面の両方を有する、少なくとも 2 個の両親媒性化合物；

P E G 及び両親媒性化合物へ、共有結合された、樹状分岐高分子、を含む、少なくとも 1 個の結合コンジュゲートを含み、

ここで、各結合コンジュゲートは、水性溶媒中で第一のコンジュゲートと自己組織化し、ナノ担体を形成し、その結果疎水性ポケットが、各両親媒性化合物の疎水面の互いへの配向により、ナノ担体の内側に形成され、ここで各コンジュゲートの P E G が、ナノ担体の外側上に自己組織化している、請求項 9 記載のナノ担体。

【請求項 1 1】

治療有効量の請求項 9 又は 1 0 記載のナノ担体を含む、音波力学療法により疾患を治療するための医薬組成物であって、該医薬組成物はそれを必要とする対象へ投与され、且つ該対象は音波に曝露される、医薬組成物。 10

【請求項 1 2】

対象における腫瘍検出を補助する方法であって、

投与された有効量の請求項 9 又は 1 0 記載のナノ担体 に第一波長の放射線 を曝露した対象由来の試料を準備し、

ここで該放射線は、ナノ担体上に存在するポルフィリンを励起し、その結果ポルフィリンが、第二波長の放射線を放出すること；並びに

励起されたポルフィリンにより放出された放射線を検出すること
を含む、腫瘍検出方法。 20

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、2012年12月12日に出願された米国特許仮出願第 6 1 / 7 3 6 , 0 6 7 号の優先権を主張する、2013年3月14日に出願された米国特許出願第 1 3 / 8 0 3 , 8 7 8 号の一部継続出願であり、これらの各々はあらゆる目的のためにその全体が本明細書中に組み込まれている。

【0 0 0 2】

連邦が支援した研究開発下で行われた発明の権利に関する陳述 30

本発明は、国立保健研究施設 (N I H) 及び国立癌研究所 (N C I) により授与された、グラント番号 2 R 0 1 C A 1 1 5 4 8 3 - 0 6 、並びに V A C a r e e r D e v e l o p m e n t A w a r d - 2 の下で米国政府の支援により行われた。米国政府は、本発明に一定の権利を有する。

【0 0 0 3】

発明の背景

様々な種類の癌の治療のためのいくつかの有効な化学療法薬は、非常に水に溶けにくく、望ましくない副作用を誘発するような製剤化を必要としている。近年、アブラキサン (登録商標) (パクリタキセル - 内包型アルブミンナノ粒子) 、ドキシリ (登録商標) (ドキソルビシン - 内包型リポソーム) などのナノ療法製剤が、これらの薬物の臨床毒性プロファイルは改善するが、それらの抗腫瘍作用は、当初の薬物製剤をわずかに上回るのみであることが示されている。これは一部、ナノ療法製剤の比較的大きいサイズ (一般に $> 1 0 0 \text{ nm}$) に起因し、このことは薬物が腫瘍塊に透過することができる程度を制限する。場合によっては、この大きいサイズはまた、ナノ治療薬が肝臓及び細網内皮系 (R E S) に捕獲されることを引き起こす。従ってインビボにおける抗癌剤の効果的送達のために、より小さい (2 0 ~ 8 0 nm) ステルス性及び生体適合性のナノ担体を開発することが必要とされている。 40

【0 0 0 4】

本発明者らは最近、パクリタキセル (P T X) 又は他の疎水性薬物のいくつかの新規ナノ担体を開発した。これらの新規ナノ担体は、ポリ (エチレングリコール) (P E G) 及 50

びオリゴコール酸を含むが、これらは、水性条件下で自己組織化し、PTXを疎水性内側に運搬することができるコア-シェル(コラン-PEG)構造を形成することができる。これらの両親媒性薬物-内包型ナノ粒子は、それら自身が改善された臨床毒性プロファイルを持つことにより治療的である。より重要なことに、癌細胞表面を標的化するリガンド及び/又は腫瘍血管リガンドにより修飾される場合、これらのナノ担体は、毒性のある治療薬を腫瘍部位へ送達することができるであろう。ナノ担体の最終的なサイズ(10~100nm)は、様々な異なるコラン-PEG調製品、又はその組合せを使用することにより、調整可能である。このナノ担体成分であるPEG及びコール酸は、全て生体適合性であり、且つ大部分は無毒である。実際、PTXナノ療法は、マウスモデル及びペットのイヌにおける抗癌治療に関して、インビボ投与において安全なプロファイルを示した。しかしこのナノ担体は、インビトロ及びインビボの両方における若干の溶血活性、並びにある種の薬物についての低下した内包能を示した。従って、改善された生体適合性及び多用途性を持つナノ担体を開発する必要性が存在する。

【0005】

本発明は、構成要素ビルディングブロックの親水性セグメント及び疎水性セグメントへのある種の変化は、ナノ担体の組織体を破壊することなく、その治療的特性を改善し、前述の必要性に対処するという、驚くべき発見を基にしている。

【発明の概要】

【0006】

発明の簡単な概要

10

20

一部の実施態様において、本発明は、式Iの化合物を提供する：



(式中、Bは、結合リガンドであることができ；各PEGは、分子量1~100kDaを有する、ポリエチレングリコール(PEG)ポリマーであることができ；Aは、少なくとも1個の分岐したモノマー単位Xを含み、且つ少なくとも1個のPEG基に連結されることができ；Dは、単独の焦点基、複数の分岐したモノマー単位X及び複数の末端基を有する樹状分岐高分子であることができ；Y¹及びY²の各々は、存在しないか、又はボロン酸、ジヒドロキシベンゼン及びチオールでできることができる架橋可能な基であることができ；L¹及びL²の各々は、独立して、結合又はリンカーあることができ、ここでL¹は、樹状分岐高分子の焦点基へ連結されることができ；各Rは、独立して樹状分岐高分子の末端基、ポルフィリン、疎水基、親水基、両親媒性化合物及び薬物であることができ、ここで少なくとも1個のR基は、ポルフィリンであることができ；添字kは、0又は1であることができ；添字mは、0~20の整数であることができ；添字nは、2~20の整数であることができ、ここで添字nは、樹状分岐高分子上の末端基の数と等しいことができ；並びに、添字pは、0~8であることができる。)。

30

【0007】

一部の実施態様において、本発明は、内側及び外側を有するナノ担体を提供し、このナノ担体は、複数の本発明のデンドリマーコンジュゲートを含み、ここで各化合物は、水性溶媒中で自己組織化し、ナノ担体を形成、その結果疎水性ポケットが、該ナノ担体の内側に形成され、且つここで各化合物のPEGは、該ナノ担体の外側上に自己組織化する。

40

【0008】

一部の実施態様において、本発明は、治療有効量の本発明のナノ担体を、それを必要とする対象へ投与すること、及び該対象を放射線に曝露し、これにより光線力学又は光温熱療法により疾患を治療することを含む、光線力学又は光温熱療法により疾患を治療する方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】図1は、本発明のテロデンドリマーの分岐した性質のいくつかの実施態様を示す。

【図2】図2は、4時間インキュベーションした後の、非標的化NPs対PLZ4-NPsの

50

、5637ヒト膀胱癌細胞への細胞取り込みを示す。(b)K9TCC-Pu-In細胞は、遊離PLZ4ペプチドと1時間予めインキュベーションし、引き続き2.2μMのPLZ4-NPと更に1時間インキュベーションした。遊離PLZ4非処置細胞を、100%対照として利用した。細胞は、ホルマリン中に固定し、フローサイトメトリーにより分析した。

【図3】図3は、(a)PLZ4-NP濃度(4時間インキュベーション)、及び(b)時間(2.2μMのPLZ4-NP)：の関数としての、K9TCC-Pu-In膀胱癌細胞による、PLZ4-NPの細胞取り込みを示している。(c)ヒト膀胱癌細胞株5637を、ガラス底ディッシュにおいて、2.2μMのPLZ4-NPと20分間インキュベーションした。核染色のためにDAPI含有培地を添加した後、高解像度トポグラフィー画像処理システム(Delta vision)を使用し、生存細胞画像を獲得した。矢印は膜分布を示している。(d)5637を、2.2μMのPLZ4-NPにより2時間処理した。洗浄後、次に細胞を、新鮮な完全培地において、更に0、24、48、及び72時間培養した。次に細胞を、トリプシン処理し、10%ギ酸(formal)中で固定し、その後被験細胞(test and cells)を、フローサイトメトリーにより分析した。

【図4】図4は、膀胱癌細胞により特異的に取り込まれたが、正常な尿路上皮細胞により取り込まれない、PLZ4-NPを示す。(a)正常なイヌ尿路上皮細胞(Uro)とブレDiO標識したヒト膀胱癌細胞株5637(BC)との共培養物を、PLZ4-NPにより2時間処理した(ポルフィリン(porphyrin)：赤色；DiO：緑色；Hochest：青色)(100×)。

【図5】図5は、(a)2.2μMのPLZ4-NPへの2時間曝露、それに続く様々なレベルの光による照射(赤色光、波長650nm)、並びに(b)PLZ4-NP又は5-ALAとの2時間のインキュベーション、それに続く赤色光4.2J/cm²への曝露：後の、5637膀胱癌細胞の細胞毒性を示している。

【図6】図6は、5637ヒト膀胱癌細胞のPZL4-NP及びPDT処理後の、ROS媒介性細胞死を示している。(a)細胞は、2.2μMのPLZ4-NPを含む又は含まざる2時間処理し、アミノフェニルフルオレセイン(APF；ROS指示薬)で30分間負荷した。その後、細胞を、PDTにより4.2J/cm²で処理し、フローサイトメトリーにより分析した；(b)細胞は、異なる濃度のPZL4-NPで2時間処理し、引き続きPDTにより処理した。24時間後、カスパーゼ3/7活性を、SensoLyte(登録商標)キット(Anaspec社、フリーモント、CA)により測定した。(PTXは、アボトーシスの陽性対照としての、パクリタキセル処理である。)。

【図7】図7は、5637細胞を、96-ウェル黒色-壁プレートにおいて、2.2μMのPLZ4-NPと共に2時間インキュベーションし、40nM DiOC₆(3)(緑色、m^{high})によりインキュベーション終了時から20分間染色し、ミトコンドリア膜電位(m)を評価し、引き続きPDT効果を誘起するために、各ウェルの一部を照射することを示している。24時間後、細胞死に関して、細胞をヨウ化プロピジウムにより染色した。

【図8】図8は、PDT後の細胞形態を示している。5637細胞を、8-ウェルチャンバースライド上で培養し、無処理、光のみ(4.2J/cm²)、PLZ4-NPのみ、若しくはPLZ4-NPと光(PDT)の組合せにより2時間処理処理するか、又はT-PNで2時間と後続のPDTにより処理した。その後細胞を固定し、Hema3(登録商標)により染色した。

【図9】図9は、ヌードマウスへの膀胱内投与後の同所性ヒト膀胱癌異種移植片モデルへのPLZ4-NPの選択的取り込みを示す。(a)ヒト患者由来の異種移植片(PDX)BL269fを、NSGマウスにおいて樹立した。BL269fのマウス同所性モデルは、BL269f細胞浮遊液を膀胱壁へ直接注射することにより作製した。4週間後、固形癌の成長が、減少した膀胱内腔容積と共に、認められた。本発明者らは、PLZ4-NP 30μlを、膀胱へ2時間、全身麻酔下で注射した。膀胱を、PBSで洗浄し、インビボ造影のために、体外へ分離した。その後、マウスを直ちに屠殺し、主要臓器を、エクス

10

20

30

40

50

ビボ造影のために、切除した。同様の実験を、膀胱腫瘍を移植しない正常N S Gマウスについて行った。(b) B L 2 6 9 f異種移植片を伴う又は伴わない膀胱を、O . C . T中に固定し、厚さ10ミクロンの凍結切片を得た。核をD A P Iにより対比染色し(青色)、且つ細胞内P L Z 4 - N Pは蛍光赤色であった。蛍光造影試験の後、組織を、H e m a 3(登録商標)により再度染色した(黄色矢印:曝露された膀胱癌組織、赤色矢印:無傷の正常尿路上皮細胞)(40×)。

【図10】図10は、非架橋のP L Z 4 - N Pの静脈内(i v)投与後24時間での、腫瘍/膀胱及び臓器のエクスピボ近赤外-赤色造影を示す。

【図11】図11は、ドキソルビシンのP L Z 4 - N P媒介したP D Tとの組合せの細胞毒性作用を示す。(a) 5 6 3 7細胞を、P L Z 4 - N P、P L Z 4 - N P - D o x又はP L Z 4 - N M - D o xにより、ドキソルビシン濃度1 μ g / m l及び/又は2 . 2 μ Mポルフィリンで、2時間処理した。洗浄後、細胞を、光曝露しないか又は2 . 1及び4 . 2 J / c m²で光曝露した。細胞生存度を、48時間後に測定した。* p < 0 . 0 5。 (b) 5 6 3 7細胞を、P L Z 4 - N P、P L Z 4 - N P - D o x、遊離D o x、ドキシル、P L Z 4 - N M - D o x、及びP L Z 4 - N PとP L Z 4 - N M - D o xの組合せにより、5分間及び2時間処理した。細胞内ドキソルビシン濃度を、フローサイトメトリーにより評価した。この結果は、3つの異なる独立した実験から、平均±S Dで表す。* p < 0 . 0 5 ; ** p < 0 . 0 1。 (c) 5 6 3 7細胞を、P L Z 4 - N P (P N P)、P L Z 4 - N M - D O X (P N - D O X)、P N PとP N - D O Xの組合せ、及びP L Z 4 - N P - D O X (P N P - D O X)により、2時間処理した。ポルフィリン(赤色)及びドキソルビシン(緑色)が、蛍光顕微鏡により検出された(100×)。(d) P L Z 4 - N P - D O X (P N P - D O X)の細胞内分布を、共焦点顕微鏡により(600×、油浸)、5分、1時間及び3時間で検出した。細胞を洗浄し、固定しなかった。P N P(ポルフィリン:赤色)、ドキソルビシン(緑色)。

【図12】図12は、以下を含む、本発明の様々な態様を示す:(a)線状P E G鎖の末端に結合された4個のピロフェオホルビド-a分子及び4個のコール酸を有する、多官能性、自己組織化されたポルフィリン-テロデンドリマー、P E G^{5k}-P o r₄-C A₄の概略図;(b)癌治療のためのスマート「エイト-イン-ワン」ナノ医薬品のプラットフォームとしてのナノポルフィリンの概略図;(c)ナノポルフィリンのT E M画像(リングステン酸(P T A)により染色);(d)空のナノポルフィリン及び異なる金属イオンのキレート後のナノポルフィリンの、吸光スペクトル;T E M(P T A により染色)により可視化した、C u (I I) (e)及びG d (I I I) (f)が内包されたナノポルフィリン;(g)P B S及びS D Sの存在下、励起光405nmでの、ナノポルフィリンの蛍光発光スペクトル;(h)励起帯域通過フィルター625/20nm及び発光フィルター700/35nmによる、S D S非存在下及び存在下での、ナノポルフィリン溶液(10 μ l)の近赤外赤色光造影;(i)R O S指示薬として2',7'-ジクロロフルオレセイン二酢酸塩(D C F)を使用する、P B S及びS D S中の、ナノポルフィリン(0 . 1 2 5 m g / m L)の一重項酸素生成;以下を含む、ナノポルフィリンの濃度-依存型光熱変換、(j)熱画像、及び(k)定量的温度変化曲線(n=2)、ここでS D S非存在下及び存在下での、ナノポルフィリン溶液(10 μ l)の温度は、N I Rレーザー(690nm)の1 . 2 5 w / c m²での20秒間照射後、サーマルカメラによりモニタリングした;並びに、(l)ナノポルフィリン溶液(4 . 0 m g / m L)の、N I Rレーザー1 . 2 5 w / c m²により、120秒間の照射により達成された高温での、ナノポルフィリン溶液の代表的熱画像。

【図13】図13は、P E G^{5k}-P o r₄-C A₄テロデンドリマーの化学構造を示す。

【図14】図14は、P E G^{5k}-P o r₄-C A₄テロデンドリマーのM A L D I - T O F質量スペクトルを示す。

【図15】図15は、P E G^{5k}-P o r₄-C A₄テロデンドリマーの、各々、D M S O - d 6 (a)及びD₂O (b)において記録された、¹H N M Rスペクトルを示す。P E G鎖(3 . 5 ~ 3 . 7 p p m)、コール酸(0 . 5 ~ 2 . 4 p p m)及びピロフェオホルビ

10

20

30

40

50

ド - a (0 . 9 ~ 2 . 2 p p m) の化学シフトは、 D M S O - d 6 (a) 中のテロデンドリマーの ¹H N M R スペクトルにおいて認めることができた。コール酸中のメチルプロトン 18、19 及び 21 の特徴的ピークが、各々、 0 . 5 8 、 0 . 8 0 及び 0 . 9 5 p p m に認められた。ピロフェオホルビド - a 中のメチルプロトン 8 及び 18 の特徴的ピークが、各々、 1 . 8 及び 1 . 9 p p m に認められた。 N M R スペクトルが D ₂O 中で記録された場合、 P E G ^{5k} - P o r ₄ - C A ₄ 中のコール酸プロトン及びピロフェオホルビド - a のプロトンのピークは、高度に抑制され (b) 、このことは、コラン及びピロフェオホルビド - a のプロトンの移動は、水性環境におけるコア - シェルミセルアーキテクチャーの形成により、高度に制限されたことを指摘している。

【図 16】図 16 は、以下を示す： (a) スペーサーとして E b e s を持つ、線状 P E G 鎖の末端に結合した 4 個のシステイン、4 個のピロフェオホルビド - a 分子及び 4 個のコール酸を有する、代表的架橋可能なポルフィリン - テロデンドリマー (P E G ^{5k} - C y s ₄ - P o r ₄ - C A ₄) の概略図； (b) ジスルフィド架橋したナノポルフィリンの T E M 画像 (P T A により染色) ； (c) 非架橋のナノポルフィリンと比較した、 P B S 及び S D S の存在下の、架橋したナノポルフィリンの蛍光発光スペクトル、ここではグルタチオン (G S H) を、ジスルフィド架橋を破壊するための還元剤として使用した (励起光 405 n m) ； (d) 最初の内包で添加された薬物のレベルに対する、ジスルフィド架橋した N P s のドキソルビシン内包及びサイズの変化、ここでは最終 N P 溶液の容積は 1 m L に維持し、且つテロデンドリマーの最終濃度は 2 0 m g / m L であった； (e) ヒト血漿中のナノポルフィリンからのドキソルビシンのリアルタイム放出試験のための、 F R E T - ベースのアプローチの概略図； 24 時間及び 28 時間での照射 (1 . 2 5 w / c m ² で 5 分間) による、ヒト血漿中のドキソルビシン - 内包型架橋されたナノポルフィリン (C N P - D O X) の、 F R E T シグナル (f) 、及び F R E T 比の変化 (g) ；並びに、 (h) 24 時間で、 G S H (1 0 m M) 処理されたヒト血漿中の N P - D O X の F R E T 比の変化。

【図 17】図 17 は、 N I R レーザー (6 9 0 n m) の 0 . 1 w / c m ² で 1 2 0 秒間照射後、サーマルカメラによりモニタリングした、 S D S の非存在下及び存在下での、 N P s (1 0 μ l) の熱画像を示す。ピロフェオホルビド - a の濃度は、 N M - P O R について 0 . 2 m g / m L で維持され、これは N P s の 1 . 0 m g / m L 中でのピロフェオホルビド - a の濃度と等しかった。

【図 18】図 18 は、 P E G ^{5k} - C y s ₄ - P o r ₄ - C A ₄ テロデンドリマーの化学構造を示す。

【図 19】図 19 は、染色しない、 C u (I I) 内包型ナノポルフィリンの T E M 画像を示す。

【図 20】図 20 は、 S D S 2 . 5 g / L の非存在下 (a) 及び存在下 (b) での、 N P s の粒子サイズを示す。粒子サイズは、動的光散乱 (D L S) により測定した。 N P s は、 S D S の添加時に完全に破壊された。

【図 21】図 21 は、 S D S の非存在下及び存在下での、ナノポルフィリン溶液の液滴の明視野画像を示す。

【図 22】図 22 は、 S D S 2 . 5 g / L の非存在下 (a) 及び存在下 (b) での、遊離ピロフェオホルビド - a 内包された標準 P E G ^{5k} - C A ₈ ミセル (N M - P O R) の粒子サイズを示す。粒子サイズは、動的光散乱 (D L S) により測定した。 N M - P O R は、 S D S の添加時に完全に破壊された。

【図 23】図 23 は、ナノポルフィリン溶液 (下側パネル) と比較した、励起帯域通過フィルター 6 2 5 / 2 0 n m 及び発光フィルター 7 0 0 / 3 5 n m による、 S D S 非存在下及び存在下での、遊離ピロフェオホルビド - a 内包された標準 P E G ^{5k} - C A ₈ ミセル (N M - P O R) 7 溶液 (1 0 μ L) (上側パネル) の、近赤外蛍光造影を示す。ピロフェオホルビド - a の濃度は、 N M - P O R について 0 . 2 m g / m L で維持され、これは N P s の 1 . 0 m g / m L 中でのピロフェオホルビド - a の濃度と等しかった。 S D S 中の平均蛍光強度の P B S 中の強度との比を計算することにより、 N P s は、同じ濃度の P o

10

20

30

40

50

rを伴うN M - P O Rよりも、10倍多く自己消光することがわかった。

【図24】図24は、N I Rレーザー(690nm)の1.25w/cm²で20秒間照射後、サーマルカメラによりモニタリングした、S D Sの非存在下及び存在下での、N M - P O R溶液(10μl)の熱画像を示す。ピロフェオホルビド-aの濃度は、N M - P O Rについて0.2mg/mLで維持され、これはN P sの1.0mg/mL中でのピロフェオホルビド-aの濃度と等しかった。

【図25】図25は、(a)ドキソルビシン(2.5mg/mL)、(b)パクリタキセル(1.0mg/mL)、(c)ビンクリスチン(1.5mg/mL)、(d)ボルテゾミブ(2.0mg/mL)、(e)ソラフェニブ(2.0mg/mL)、及び(f)17-アリルアミノ-17-デメトキシゲルダナマイシン(17AAG)(1.0mg/mL)の内包後の、非架橋ナノポルフィリン(20mg/mL)の粒子サイズを示す。粒子サイズは、動的光散乱(D L S)により測定した。

【図26】図26は、ヒト血漿の50%(v/v)で存在する、D O X - 内包型架橋されたN P s(N P - D O X)の連続粒子サイズ測定を示す。

【図27】図27は、P E G^{5k}-C y s₄-L₈-C A₈テロデンドリマーのM A L D I - T O F質量スペクトルを示す。

【図28】図28は、S D S非存在下(a)、並びに、2.5g/L S D Sの存在下(b)、2.5g/L S D S + 20mM N A Cの存在下(c)、2.5g/L S D S + 20mM G S Hの存在下(d)での、ジスルフィド架橋したN P sの粒子サイズを示す。粒子サイズは、動的光散乱(D L S)により測定した。S D S添加時に、非架橋N P sは、完全に破壊された。対照的に、架橋されたN P sのサイズは、同じ条件下で、20~30nmで持続された。形成されたジスルフィド架橋されたN P sは、S D S存在下では、内在性還元剤グルタチオン(G S H、20mM)及び外来性還元剤N - アセチルシステイン(N A C、20mM)の添加後およそ40分で解離した。

【図29】図29は、N P s、P o r負荷されたP E G^{5k}-C A₈ミセル(N M - P O R)及び遊離ピロフェオホルビド-a(P o r)に2時間曝露し、引き続き暗条件下で更に22時間のインキュベーションした後の、S K O V - 3卵巣癌細胞における細胞毒性を示す。

【図30】図30は、(a)4.4μM N P sへの2時間曝露、それに続く様々なレベルのN I R光の照射、並びに(b)N P s又は5-A L Aとの24時間のインキュベーション、それに続くN I R光への0.07W/cm²での60秒間の曝露：後の、S K O V - 3卵巣癌細胞における細胞毒性を示す。(c)は、S K O V - 3卵巣癌細胞のN P s及び光処理後の、R O S媒介した細胞死を示す。細胞は、2.2μM N P s含有又は非含有で24時間処理し、D C Fを30分間負荷した。N I R光への0.07W/cm²での60秒間の曝露による処理後、画像を、蛍光顕微鏡により獲得し、R O S生成を検出した。(d)は、96-ウェル黒色-壁プレートにおいて、2.2μMのN P sにより24時間処理し、40nM D i O C₆(3)(緑色、m^{high})によりインキュベーション終了時から20分間染色し、ミトコンドリア膜電位(m)を評価し、引き続きP D T効果を誘起するために、各ウェルの一部を照射した、S K O V - 3卵巣癌細胞を示す。照射領域は、「L」により印をつけた。24時間後、細胞死に関して、細胞を、ヨウ化プロピジウム(P I)により染色した。(e)は、様々な濃度のN P sで24時間処理し、引き続きP D Tにより処理した細胞における、カスパーゼ3/7活性を示している。24時間後、カスパーゼ3/7活性は、S e n s o L y t e(登録商標)キット(A n a s p e c社、フリーモント、C A)により測定した。(f)は、P D T後の細胞形態を示している。S K O V - 3卵巣癌細胞は、8-ウェルチャンバースライド上で培養し、P B S、N P s単独、及びN P sと光(0.07W/cm²で60秒間)の組合せにより、24時間処理した。その後細胞を固定し、2時間後H e m a 3(登録商標)により染色した。N P s + 光により処理した細胞は、明らかな核の膨潤、丸みを帯びた細胞、膜の損傷、及び細胞質凝集を示した。(g)は、ドキソルビシンのN P - 媒介型光線療法との組合せの、細胞毒性作用を示している。S K O V - 3卵巣癌細胞は、N P s単独、ドキソルビシン内包

10

20

30

40

50

型ナノポルフィリン (N P - D O X) 又はドキソルビシン内包型標準ミセル (N M - D O X) により、様々な濃度の D O X 及び / 又は N P s で 24 時間処理した。洗浄後、細胞を光に曝露し、24 時間後に細胞生存度を測定した。* p < 0.05。 (h) は、N P 単独及び遊離薬物 17 A A G と比較した、N P - A A G の P C 3 前立腺癌細胞に対する成長阻害作用を示す。N P 濃度は、N P - A A G 群及びN P 群について同じに維持した。これらの薬物を取り除き、新鮮培地と置き換え、その後細胞を、N I R 光に 2 分間曝露した。成長阻害は、72 時間後、M T T アッセイを使用し測定した。左側カラム、光なし；ボックス付き右側カラム、光あり。n = 3。 (i) は、24 時間後、アネキシン V 及び P I 染色を用いて分析されたアポトーシスを示す (n = 3)。 (j) は、12 時間後の、対応する抗体によるウェスタンプロットティングを使用する、H I F 1 、サバイビン、A K T 、S T A T 3 及びS r c のレベルの分析を示す。 10

【図 3 1】図 3 1 は、N P 単独及び遊離薬物 17 A A G と比較した、N P - A A G の L N C A P 前立腺癌細胞及びR P W E 1 正常前立腺細胞に対する成長阻害作用を示す。N P 濃度は、N P - A A G 群及びN P 群について同じに維持した。これらの薬物を取り除き、新鮮培地と置き換え、その後細胞を、N I R 光に 2 分間曝露した。成長阻害は、72 時間後、M T T アッセイを使用し測定した。左側カラム、光なし；ボックス付き右側カラム、光あり。n = 3。

【図 3 2】図 3 2 (a) は、10 × D M S O 中、架橋されたN P s 及びN M - P O R (両方共 0.5 mg / mL の P o r を含む) の吸光度を示す。図 3 2 (b) は、N I R 蛍光シグナルを示し、図 3 2 (c) は、架橋されたN P s 及びN M - P O R (P o r 投与量：5 mg / kg) の注射の 5 分後の、移植された腫瘍異種移植片を保有するヌードマウスから採取した血液液滴の定量的蛍光を示す。画像は、関心対象の領域 (R O I) の平均シグナルとして分析した。*** p < 0.001。 20

【図 3 3】図 3 3 は、光曝露後、ジスルフィド架橋されたN P s 及びN M - P O R (P o r 投与量：5 mg / kg) の注射後の 5 分の、移植された腫瘍異種移植片を保有するヌードマウスから採取した血液液滴のR O S 生成を示す。光線量：0.1 W で 60 秒及び 300 秒。R O S 指示薬として 2', 7'-ジクロロフルオレシンジアセタート (D C F) を使用した。** p < 0.002、*** p < 0.001。

【図 3 4】図 3 4 は、移植された腫瘍異種移植片を保有するヌードマウスからのエクスピボにおける溶血活性を示す。1 分間架橋されたN P (a, b) 及びN M - P O R (c, d) 注射したマウスから採取された血液 2 μl を、P B S の 100 μL に希釈し、その後 0 、 60 、及び 300 秒で、光曝露した (P o r 投与量：5 mg / kg)。光線量：0.1 W / cm² で光曝露した 4 時間後、血液細胞を、回転沈降させ、N M - P O R 処理マウスからの試料中に溶血を認めた (a, c)。細胞形態評価のために、300 秒試料からのC y t o s p i n 試料を更に作製した (b, d) (H e m a 3 (登録商標) 染色、100 × 油浸)。光曝露後、架橋されたN P 試料中に認められる正常血液細胞形態 (b) とは対照的に、N M - P O R 試料 (d) において、R B C 及びW B C の両方はひどく破壊され、これは恐らく血液細胞に対するR O S が関連した酸化的損傷に起因するであろう。 30

【図 3 5】図 3 5 は、光曝露後、ジスルフィド架橋されたN P s 及びN M - P O R (P o r 投与量：5 mg / kg) の注射後 5 分の、移植された腫瘍異種移植片を保有するヌードマウスから採取した血液液滴の温度を示す。光線量：0.1 W で 300 秒。温度は、サーマルカメラによりモニタリングした。 40

【図 3 6】図 3 6 は、光曝露後、P B S 及びジスルフィド架橋されたN P s 又はN M - P O R (P o r 投与量：5 mg / kg) の注射後 24 時間の、移植された腫瘍異種移植片を保有するヌードマウスの腫瘍でのR O S 生成を示す (n = 5)。光線量：1.25 W / cm² で 120 秒。R O S 指示薬として 2', 7'-ジクロロフルオレシンジアセタート (D C F) を使用し、測定した。* p < 0.01、*** p < 0.001。

【図 3 7】図 3 7 は、光曝露後、P B S 、ジスルフィド架橋されたN P s 及びN M - P O R (P o r 投与量：5 mg / kg) の注射後 24 時間の、移植された腫瘍異種移植片を保有するヌードマウスの腫瘍での温度変化 (T) を示す (n = 5)。光線量：1.25 W 50

/ cm²で120秒。温度は、サーマルカメラによりモニタリングした。*** p < 0.001。

【図38】図38(a)は、非架橋NPs及びジスルフィド架橋されたNPs(NP投与量: 25 mg/kg)の静脈内注射後の、SKOV-3卵巣癌異種移植片の代表的インビボNIRF造影を示す。白色矢印は、腫瘍部位を指している。(b)は、非架橋NPs(左側)及びジスルフィド架橋されたNPs(右側)の注射後24時間の、SKOV-3卵巣癌異種移植片の代表的エクスピボNIRF造影を示す。(c)は、非架橋NPs及びジスルフィド架橋されたNPsの注射後24時間の、腫瘍SKOV-3における定量的NIRF蛍光を示し(n = 4; NP投与量: 25 mg/kg)、ここで画像は、腫瘍中の関心対象の領域(ROI)の平均シグナルとして分析し、筋肉に対し規準化した(*** p < 0.001)。(d)は、大規模-画像処理(LSI)レーザー走査型共焦点顕微鏡により観察された、注射後1、24、48時間の、SKOV-3腫瘍中のジスルフィド架橋されたNPsの分布の投影像であり、NPsは赤色で撮像し、デキストラン-FITC標識された腫瘍血管は緑色で撮像した(バー=100 μm)。(e)は、ジスルフィド架橋されたNPsの注射(NP投与量: 25 mg/kg)後24時間での、乳癌を伴うトランジエニックマウス(FVB/nTg(MMTV-PyVmT))の代表的インビボ及びエクスピボNIRF光造影を示す。(f)は、LSIレーザー走査型共焦点顕微鏡により観察した、注射後24時間の、トランジエニックマウスにおける乳癌の肺転移でのNPsの蓄積を示す。

【図39】図39は、SDS及びGSH(10 mM)の非存在下及び存在下での、ジスルフィド架橋されたNPs(Por投与量: 5 mg/kg)の注射後5分での、異種移植片腫瘍モデルから採取した血液液滴の代表的NIR蛍光シグナルを示す。

【図40】図40は、トランジエニックマウス(FVB/nTg(MMTV-PyVmT))由来の乳癌の肺における転移病巣(矢印)を確認する、組織病理学的画像処理を示す(H&E染色、4×及び挿入図40×)。

【図41】図41(a)は、FLASH配列を使用するBruker Biospec 7T MRIスキャナー上での、T1-重み付きMR造影により得られた、SDS非存在下及び存在下での、Gd-NPsのインビトロMRシグナルを示す。(b)は、0.15 mL Gd-NPs(Gd投与量: 0.015 mmole/kg)の注射前及び後の、FLASH配列を使用する、乳癌を伴うトランジエニックマウス(FVB/nTg(MMTV-PyVmT))の、代表的冠状断面(coronal)及び軸面のMR画像を示す。白色矢印は、腫瘍部位を示している。(c)は、⁶⁴Cu-標識されたNPs(150~200 μL、⁶⁴Cu投与量: 0.6~0.8 mCi)の注射後4、8、16、24、48時間での、SKOV-3卵巣癌異種移植片を保有するヌードマウスのPET画像を示し、ここで白色矢印は、腫瘍部位を示す。(d)は、⁶⁴Cu及びGd二重標識されたNPs(150~200 μL、⁶⁴Cu投与量: 0.6~0.8 mCi、Gd投与量: 0.015 mmole/kg)0.15 mLの注射後4又は24時間での、FLASH配列を使用する、A549肺癌異種移植片を保有するヌードマウスの3D冠状断面MR画像を示し、ここで白色矢印は、腫瘍部位を示す。(e)は、二重標識されたNPsの注射後4又は24時間での、A549肺癌異種移植片を保有するヌードマウスの腫瘍切片のPET-MR画像を示し、ここで白色矢印は、腫瘍中心における壊死領域を示す。

【図42】図42は、遠心濾過後の、⁶⁴Cu-ナノポルフィリン(左側パネル)及びGd-⁶⁴Cu-ナノポルフィリン(右側パネル)の、インスタント薄層クロマトグラフィー(ITLC)トレースを示す。放射性化学物質の収量(RYC)は、96.5%以上であったのに対し、放射性化学物質の純度は97%以上であった。ITLC法: Biodeexストリップは、90 mM EDTA/0.9% NaCl(水性)中で呈色し、Bioscanプレートリーダー上で撮像した。

【図43】図43(a)は、架橋されたNPsの注射後24時間での、光照射後の、乳癌を伴うトランジエニックマウス(FVB/nTg(MMTV-PyVmT))の腫瘍における、代表的熱画像を示す。(b)は、PBSを注射したマウスの画像を示す。(c)

は、照射後、架橋されたNPs及びPBSが注射されたトランスジェニックマウスの腫瘍における温度変化を示す。(d)はレーザー照射後24時間での、架橋されたNPs及びPBS(対照)で処理された、トランスジェニックマウスの腫瘍部位での、ROS生成を示す。 $p < 0.025$ 。(e)は、照射後24時間での、PBS又はNPs注射されたマウスからの腫瘍の組織病理を示す。図43a-eに関して、光線量は、 1.25W/cm^2 で2分間であり、他方NPs投与量は、 25mg/kg (ポルフィリン 5mg/kg と等量)であった。(f)は、0、7、及び14日目に(黒色矢印)架橋されたNPs、CNP-DOX及びNM-DOX(ポルフィリンを伴わない標準ミセル)で処理され、引き続き照射後24時間(赤色矢印)に全ての群においてマウスの腫瘍上に光曝露された、乳癌のトランスジェニックマウス($n = 8$)の腫瘍容積の変化を示す。 $p < 0.01$ 。DOX投与量： 2.5mg/kg 、NP投与量： 25mg/kg (ポルフィリン 5mg/kg と等量)、光線量： 1.25W/cm^2 で2分間。(g)は、処理34日目のトランスジェニックマウスの写真を示す(*：乳腺腫瘍)。(h)は、0、4及び8日目に(黒色矢印)架橋されたNPs及びCNP-DOXで処理され、引き続き1及び9日目に照射された(赤色矢印)、SKOV-3卵巣癌異種移植片を保有するマウス($n = 8$)の腫瘍容積の変化を示す。PBS及びNM-DOXは、比較のために注射した。DOX投与量： 2.5mg/kg 、NP投与量： 25mg/kg (ポルフィリン 5mg/kg と等量)、光線量： 0.25W/cm^2 で2分間。 $p < 0.01$ 。(i)は、MRI-ガイド付きPTT/PDTを示す。レーザー照射前及び後に、Gd-NPs(Gd投与量： 0.015mmol/kg)注射したマウスの代表的MR画像。白色矢印は、腫瘍部位を示している。画像は、照射後0(注射前)、4、24、48、72、96及び168時間に収集した。MR造影は、線量 1.25W/cm^2 で3分間の照射後24時間で(照射後48時間)、腫瘍部位に大きいシグナル空隙(青色矢印)を示し、且つこれらの腫瘍は、照射後168時間(7日目)には完全にアブレーションされた。

【図44】図44は、NP-媒介したPDT後の、乳房腫瘍組織におけるカスパーゼ3反応性及びDNA損傷を示している。トランスジェニックマウスは、PBS(対照)又はNPsにより処理し、引き続き照射後24時間で、光処理した。DOX投与量： 2.5mg/kg 、NP投与量： 25mg/kg (ポルフィリン 5mg/kg と等量)、光線量： 1.25W/cm^2 で2分間。腫瘍を、更に24時間後に摘出し、且つホルマリン中に固定した。組織スライド(厚さ4ミクロン)を使用し、切断されたカスパーゼ3に関するIH-Cを行った。DNA損傷は、TUNEL(TdT-媒介型dUTPニック端標識)検出キット(GenScript社、ピスカタウェイ、NJ)を製造業者のマニュアルに従い用い、検出した。切断されたカスパーゼ3(細胞シグナル伝達)の抗体反応性は、免疫化学により検出した。

【図45】図45は、ナノポルフィリン(NPs)及びドキソルビシン内包されたナノポルフィリン(NP-DOX)により、0、4及び8日目に処理され(矢印の軸マーカー)、引き続き1日目、9日目にレーザー光(690nm)曝露された(三角の軸マーカー)、SKOV-3卵巣癌異種移植片を保有するマウスの体重変化を示している($n = 8$)。PBS及びドキソルビシン内包された標準ミセル(NM-DOX)を、比較のために注射した。DOX投与量： 2.5mg/kg 、NP投与量： 25mg/kg (ポルフィリン 5mg/kg と等量)、光線量： 0.25W/cm^2 で2分間。

【発明を実施するための形態】

【0010】

発明の詳細な説明

I. 定義

本明細書において使用される用語「デンドリマー」及び「樹状分岐高分子」とは、焦点、複数の分岐したモノマー単位、及び複数の末端基を含む、分岐したポリマーをいう。モノマーは、一緒に連結され、焦点から伸び、且つ末端基で終着する腕(又は「デンドロン」)を形成する。デンドリマーの焦点は、本発明の化合物の他のセグメントへ結合することができ、並びにこれらの末端基は、追加の化学部分により更に官能基化されてよい。

【0011】

本明細書において使用される用語「テロデンドリマー」とは、親水性PEGセグメント及びデンドリマーの1個又は複数の末端基に共有結合された1つ又は複数の化学部分を含むデンドリマーをいう。これらの部分は、疎水基、親水基、両親媒性化合物、及び薬物を含むことができるが、これらに限定されるものではない。様々な部分は、オルソゴナル保護基戦略を使用し、所望の末端基で、選択的に挿入されてよい。

【0012】

本明細書において使用される用語「ナノ担体」とは、本発明のデンドリマーコンジュゲートの凝集から生じるミセルをいう。このナノ担体は、疎水性コア及び親水性外側を有する。

10

【0013】

本明細書において使用される用語「モノマー」及び「モノマー単位」とは、ジアミノカルボン酸、ジヒドロキシカルボン酸及びヒドロキシルアミノカルボン酸をいう。本発明のジアミノカルボン酸基の例は、2,3-ジアミノプロパン酸、2,4-ジアミノブタン酸、2,5-ジアミノペンタン酸(オルニチン)、2,6-ジアミノヘキサン酸(リジン)、(2-アミノエチル)-システィン、3-アミノ-2-アミノメチルプロパン酸、3-アミノ-2-アミノメチル-2-メチルプロパン酸、4-アミノ-2-(2-アミノエチル)酪酸及び5-アミノ-2-(3-アミノプロピル)ペンタン酸を含むが、これらに限定されるものではない。本発明のジヒドロキシカルボン酸基の例は、グリセリン酸、2,4-ジヒドロキシ酪酸、グリセリン酸、2,4-ジヒドロキシ酪酸、2,2-ビス(ヒドロキシメチル)プロピオン酸及び2,2-ビス(ヒドロキシメチル)酪酸を含むが、これらに限定されるものではない。ヒドロキシルアミノカルボン酸の例は、セリン及びホモセリンを含むが、これらに限定されるものではない。当業者は、他のモノマー単位が、本発明において有用であることを理解するであろう。

20

【0014】

本明細書において使用される用語「アミノ酸」とは、アミン官能基を保有するカルボン酸をいう。アミノ酸は、先に記載されたジアミノカルボン酸を含む。アミノ酸は、天然の-L-アミノ酸を含み、ここでアミンは、カルボン酸のカルボニル炭素に隣接する炭素に結合される。天然の-L-アミノ酸の例は、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-ヒスチジン、L-リジン、及びL-アルギニンを含むが、これらに限定されるものではない。アミノ酸はまた、天然の-D-アミノ酸のD-エナンチオマー、並びに-L-アミノ酸及び他の非天然のアミノ酸も含んでよい。

30

【0015】

本明細書において使用される用語「リンカー」とは、デンドリマーコンジュゲートの1つのセグメントを別のものへ連結する化学部分をいう。リンカーのデンドリマーのセグメントへの連結に使用される結合の種類は、アミド、アミン、エステル、カルバメート、尿素、チオエーテル、チオカルバメート、チオカーボネート及びチオ尿素を含むが、これらに限定されるものではない。当業者は、他の型の結合も、本発明において有用であることを理解するであろう。

40

【0016】

本明細書に使用される用語「オリゴマー」とは、先に説明されたように、一緒に共有的に連結された5個又はそれ以下のモノマーをいう。モノマーは、線状又は分岐した様式で一緒に連結されてよい。オリゴマーは、テロデンドリマーの分岐したセグメントの焦点として、機能することができる。

【0017】

本明細書に使用される用語「疎水基」とは、水不溶性であるか又は水により撥水される化学部分をいう。疎水基の例は、長鎖アルカン及び脂肪酸、フルオロカーボン、シリコン、コレステロールなどのある種のステロイド、並びに例えば、ポリスチレン及びポリイソブレンを含む多くのポリマーを含むが、これらに限定されるものではない。

【0018】

50

本明細書に使用される用語「親水基」とは、水溶性であるか又は水に誘引される化学部分をいう。親水基の例は、アルコール、短鎖カルボン酸、第4級アミン、スルホン酸塩、リン酸塩、糖、及びPEGなどのある種のポリマーを含むが、これらに限定されるものではない。

【0019】

本明細書に使用される用語「両親媒性化合物」とは、疎水性部分及び親水性部分の両方を有する化合物をいう。例えば、本発明の両親媒性化合物は、該化合物の1つの親水面及び該化合物の1つの疎水面を有することができる。本発明において有用な両親媒性化合物は、コール酸並びにコール酸類似体及び誘導体を含むが、これらに限定されるものではない。

10

【0020】

本明細書に使用される用語「コール酸」とは、(R)-4-((3R,5S,7R,8R,9S,10S,12S,13R,14S,17R)-3,7,12-トリヒドロキシ-10,13-ジメチルヘキサデカヒドロ-1H-シクロ펜タ[a]フェナントレン-17-イル)ペンタン酸をいう。コール酸はまた、3,7,12-トリヒドロキシ-5-コラン-24-オイツク酸；17-((1-メチル-3-カルボキシプロピル)エチオコラン-3,7,12-トリオール；コラール酸；及び、コラリンとしても知られている。アロコール酸、フィトコール酸、アビコール酸、デオキシコール酸、ケノデオキシコール酸などのコール酸誘導体及び類似体も、本発明において有用である。コール酸誘導体は、ミセル安定性及び膜活性などの、テロデンドリマー組織化から生じるナノ担体の特性を調節するよう、設計することができる。例えばコール酸誘導体は、1又は複数のグリセロール基、アミノプロパンジオール基、又は他の基により修飾された親水面を有することができる。

20

【0021】

本明細書に使用される用語「薬物」又は「治療薬」とは、病態又は疾患を治療及び/又は改善することが可能である物質をいう。薬物は、疎水性薬物であってよく、これは水を撥水する任意の薬物である。本発明において有用な疎水性薬物は、パクリタキセル、ドキソルビシン、エトポシド、イリノテカン、SN-38、シクロスボリンA、ポドフィロトキシン、カルムスチン、アンホテリシン、イクサベピロン、パツピロン(エポテロンクラス)、ラパマイシン及び白金薬物を含むが、これらに限定されるものではない。本発明の薬物はまた、プロドラッグ型も含む。当業者は、他の薬物は本発明において有用であることを理解するであろう。

30

【0022】

本明細書に使用される用語「架橋可能な基」又は「架橋基」とは、例えば、第一の樹状分岐高分子上の第一の架橋可能な基が、第二の樹状分岐高分子上の第二の架橋可能な基に連結する、別の分子上の類似基又は相補基と結合することが可能な官能基をいう。本発明の架橋可能な基及び架橋基として好適な基は、チオール、例えばシステイン、ボロン酸、及びカテコールなどの1,2-ジヒドロキシベンゼンを含む1,2-ジオールを含む。架橋可能な基及び架橋基が一体化する場合、これらは、ジスルフィド及びボロン酸エステルなどの、架橋された結合を形成する。他の架橋可能な基及び架橋基が、本発明において適している。

40

【0023】

本明細書に使用される用語「結合切断成分」とは、本発明の架橋可能な基及び架橋基を用いて形成された架橋された結合を切断することが可能な物質をいう。この結合切断成分は、架橋された結合がジスルフィドの場合は、グルタチオンなどの還元剤であり、或いは架橋された結合がボロン酸及び1,2-ジオールから形成される場合は、マンニトールであることができる。

【0024】

本明細書に使用される用語「造影剤」とは、体の臓器、組織又は体系を造影することができる化学物質をいう。造影剤の例は、常磁性物質、光学プローブ、及び放射性核種を含

50

む。

【0025】

本明細書に使用される用語「治療する」、「治療している」及び「治療」は、軽減；寛解；症状の消失、又は患者の症状、損傷、病理若しくは病態の忍容性の増大；症状又は病態の頻度又は期間の減少；或いは、場合によっては、症状又は病態の開始の阻止などの、任意の主観的又は客観的パラメータを含む、損傷、病理、病態、又は症状（例えば疼痛）の治療又は改善の何らかの成功の兆候をいう。症状の治療又は改善は、任意の主観的又は客観的パラメータを基にすることができる；これは、例えば理学検査の結果を含む。

【0026】

本明細書に使用される用語「対象」とは、靈長類（例えばヒト）、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、イヌ、ネコ、ウサギ、ラット、マウスなどを含むが、これらに限定されるものではない、哺乳動物などの、動物をいう。いくつかの実施態様において、対象はヒトである。

【0027】

本明細書に使用される用語「治療有効量又は投与量」或いは「治療上十分な量又は投与量」或いは「有効な又は十分な量又は投与量」とは、それが投与されるものに関して治療的作用を生じる投与量をいう。正確な投与量は、治療の目的に応じて変動し、且つ公知の技術を用い、当業者により確認可能であろう（例えば、Lieberman、「医薬剤形（Pharmaceutical Dosage Forms）」（1-3巻、1992）；Lloyd、「医薬配合の技巧、化学及び技術（The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding）」（1999）；Pickar、「用量計算（Dosage Calculations）」（1999）；及び、「レミントンの調剤の科学と実践（Remington: The Science and Practice of Pharmacy）」、第20版、2003、Gennaro編集、Lippincott、Williams & Wilkins参照）。増感された細胞において、治療上有効な投与量は、非増感細胞に関する従来の治療上有効な投与量よりも低いことが多い。

【0028】

本明細書に使用される用語「光線力学療法」とは、光への曝露時に悪性細胞又は疾患細胞にとって毒性となり始める、無毒の光感受性化合物をいう。光線力学療法は、光増感剤、光源、及び酸素が関与している。光への曝露時に、光増感剤は、活性酸素種（一重項酸素、酸素フリーラジカル）を発生させ、これは悪性組織と反応しそれを破壊する。ポルフィリン、クロロフィル及び色素を含む、様々な光増感剤を使用することができる。

【0029】

本明細書に使用される用語「光温熱療法」とは、光への曝露時に熱を発生する無毒の光感受性化合物の使用をいう。光線力学療法同様、光温熱療法には、光増感剤及び光源、典型的には赤外が関与している。しかし光温熱療法は酸素を必要としない。ポルフィリン、クロロフィル及び色素を含む、様々な光増感剤を使用することができる。

【0030】

II. テロデンドリマー

本発明は、親水性ポリ（エチレングリコール）（PEG）セグメント及び疎水性セグメント、並びに少なくとも1個のポルフィリンを有する、両親媒性テロデンドリマーコンジュゲートを提供する。PEGセグメントは、1個又は複数のPEG鎖を含む、分岐した又は線状アーキテクチャーを有することができる。テロデンドリマーの疎水性セグメントは、疎水面及び親水面を有するコール酸により提供され得る。ポルフィリン、コール酸及びPEGは、様々な酸反復単位を含むことができるオリゴマー及び/又はポリマーにより結合される。典型的には、オリゴマー及びポリマーは、ジアミノカルボン酸、リジンを含む。テロデンドリマーは、溶液中で凝集し、疎水性内側及び親水性外側を持つミセルを形成することができる。これらのミセルは、水への溶解度が低い薬物又は他の物質を送達するためのナノ担体として使用することができる。

【0031】

一部の実施態様において、本発明は、ポリエチレングリコール（PEG）ポリマー；親

10

20

30

40

50

水面及び疎水面の両方を有する少なくとも2つの両親媒性化合物；少なくとも1個のポルフィリン；任意に少なくとも2個の架橋基；並びに、PEG、両親媒性化合物、ポルフィリン及び架橋基に共有結合された樹状分岐高分子を有するコンジュゲートを提供し、ここで各コンジュゲートは、水性溶媒中で自己組織化し、ナノ担体を形成し、その結果各両親媒性化合物の疎水面の互いへの配向により、疎水性ポケットがナノ担体の内側に形成され、ここで各コンジュゲートのPEGは、ナノ担体の外側上に自己組織化する。

【0032】

一部の実施態様において、本発明は、下記式Iの化合物を提供する：



(式中、Bは、結合リガンドであることができ；各PEGは、分子量1～100kDaを有する、ポリエチレングリコール(PEG)ポリマーであることができ；Aは、少なくとも1個の分岐したモノマー単位Xを含み、且つ少なくとも1個のPEG基に連結されることができ；Dは、単独の焦点基、複数の分岐したモノマー単位X及び複数の末端基を有する樹状分岐高分子であることができ；Y¹及びY²の各々は、存在しないか、又はボロン酸、ジヒドロキシベンゼン若しくはチオールであることができる架橋可能な基であることができ；L¹及びL²の各々は、独立して、結合又はリンカーであり、ここでL¹は、樹状分岐高分子の焦点基へ連結されることができ；各Rは、樹状分岐高分子の末端基、ポルフィリン、疎水基、親水基、両親媒性化合物及び薬物であることができ、ここで少なくとも1個のR基は、ポルフィリンであることができ；添字kは、0又は1であることができ；添字mは、0～20の整数であることができ；添字nは、2～20の整数であり、ここで添字nは、樹状分岐高分子上の末端基の数と等しいことができ；並びに、添字pは、0～8であることができる。)。

【0033】

いずれか好適な結合リガンドを、本発明の化合物において使用することができる。例えば、結合リガンドは、特定の臓器、健常組織又は疾患組織を標的化することができる。結合リガンドの例は、アミノ酸配列Q D G R M G Fを有する、PLZ4リガンドを含む。2010年9月23日に出願された米国特許出願第13/497,041号で、現時点での米国特許公開第2012/0230994号を参照されたい。

【0034】

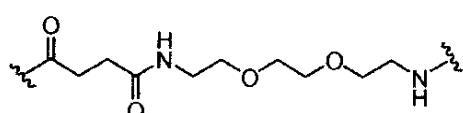
リンカーL¹及びL²は、いずれか好適なリンカーを含むことができる。概して、これらのリンカーは、2つのテロデンドリマーセグメントの各々との反応のための2個の官能基を有する、二官能性リンカーである。一部の実施態様において、リンカーL¹及びL²は、ヘテロ二官能性リンカーであることができる。一部の実施態様において、リンカーL¹及びL²は、ホモ二官能性リンカーであることができる。一部の実施態様において、リンカーL¹及びL²は、独立して、ポリエチレングリコール、ポリセリン、ポリグリシン、ポリ(セリン-グリシン)、脂肪族アミノ酸、6-アミノヘキサン酸、5-アミノペンタン酸、4-アミノブタン酸及び-アラニンであることができる。当業者は、リンカーのサイズ及び化学性質は、連結されるべきテロデンドリマーセグメントの構造を基に、変動され得ることを認めるであろう。

【0035】

一部の実施態様において、リンカーL¹及びL²は、下記式を有する：

【0036】

【化1】



10

20

20

30

40

50

【0037】

任意のサイズ及びアーキテクチャーのポリエチレングリコール(PEG)ポリマーが、本発明のナノ担体において有用である。一部の実施態様において、PEGは、1~100kDaである。他の実施態様において、PEGは、1~10kDaである。一部の他の実施態様において、PEGは、約3kDaである。更に別の実施態様において、追加のPEGポリマーは、両親媒性化合物に連結される。例えば、両親媒性化合物がコール酸である場合、最大3個のPEGポリマーが、各コール酸に連結される。両親媒性化合物に連結されたPEGポリマーは、サイズが200~10,000Daである。更に別の実施態様では、両親媒性化合物に連結されるPEGポリマーは、サイズが1~5kDaである。当業者は、他のPEGポリマー及び他の親水性ポリマーが本発明において有用であることを理解するであろう。PEGはいずれか好適な長さであることができる。10

【0038】

樹状分岐高分子は、いずれか好適な樹状分岐高分子であることができる。樹状分岐高分子は、アミノ酸又は他の二官能性AB2-型モノマー(ここで、A及びBは、一緒に反応することが可能である2種の異なる官能基であり、その結果生じるポリマー鎖は、A-B結合が形成される分岐点を有する)を含む分岐したモノマー単位で作製され得る。一部の実施態様において、各分岐したモノマー単位Xは、ジアミノカルボン酸、ジヒドロキシカルボン酸及びヒドロキシルアミノカルボン酸であることができる。一部の実施態様において、各ジアミノカルボン酸は、2,3-ジアミノプロパン酸、2,4-ジアミノブタン酸、2,5-ジアミノペンタン酸(オルニチン)、2,6-ジアミノヘキサン酸(リジン)、(2-アミノエチル)-システイン、3-アミノ-2-アミノメチルプロパン酸、3-アミノ-2-アミノメチル-2-メチルプロパン酸、4-アミノ-2-(2-アミノエチル)酪酸又は5-アミノ-2-(3-アミノプロピル)ペンタン酸であることができる。一部の実施態様において、各ジヒドロキシカルボン酸は、グリセリン酸、2,4-ジヒドロキシ酪酸、2,2-ビス(ヒドロキシメチル)プロピオン酸、2,2-ビス(ヒドロキシメチル)酪酸、セリン又はトレオニンであることができる。一部の実施態様において、各ヒドロキシルアミノカルボン酸は、セリン又はホモセリンであることができる。一部の実施態様において、ジアミノカルボン酸は、アミノ酸である。一部の実施態様において、各分岐したモノマー単位Xは、リジンである。20

【0039】

テロデンドリマーの樹状分岐高分子は、1、2、3、4、5、又はそれ以上の世代を含む、いずれか好適なデンドリマーの世代であることができ、ここでデンドリマーの各「世代」とは、焦点とデンドリマーの次の1本の枝の末端基の間で遭遇した分岐点の数をいう。テロデンドリマーの樹状分岐高分子は、1.5、2.5、3.5、4.5、5.5などの、部分世代(partial-generations)を含むこともでき、ここでデンドリマーの分岐点は、1本の枝のみを有する。例えば図1の構造を参照されたい。樹状分岐高分子の様々なアーキテクチャーは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31又は32末端基を含むが、これらに限定されるものではない、いずれか好適な数の末端基を提供することができる。30

【0040】

テロデンドリマー又はテロデンドリマーセグメントの焦点は、いずれか好適な官能基であることができる。一部の実施態様において、焦点は、テロデンドリマー又はテロデンドリマーセグメントの別のセグメントへの結合を可能にする官能基を含む。焦点官能基は、アルコール、アミン、チオール、又はヒドラジンを含むが、これらに限定されるものではない、求核基であることができる。焦点官能基はまた、アルデヒド、カルボン酸、又は酸クロリド若しくはN-ヒドロキシスクシンイミジルエステルを含むカルボン酸誘導体などの、求電子的基であってもよい。40

【0041】

テロデンドリマー外縁に導入された基Rは、ポルフィリン、親水基、疎水基、又は両親50

媒性化合物を含む、いずれか好適な部分であることができ、ここで少なくとも1個のR基は、ポルフィリンであることができる。いずれか好適なポルフィリンを、本発明のテロデンドリマーにおいて使用することができる。本発明において好適な代表的ポルフィリンは、ピロフェオホルビド-a、フェオホルビド、クロリンe6、プルプリン又はプルプリニミドを含むが、これらに限定されるものではない。一部の実施態様において、ポルフィリンは、ピロフェオホルビド-aであることができる。代表的構造を、以下に示す：

【0042】

【表1】

10

ポルフィリン	構造
ポルフィリン	
ピロフェオホルビド-a	
フェオホルビド	

20

30

【0043】

【表2】

ポルフィリン	構造	
クロリン e6		10
ブルプリン		20
ブルブリニミド		30

【0044】

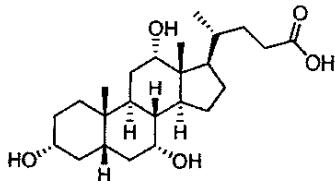
疎水基の例は、長鎖アルカン及び脂肪酸、フルオロカーボン、シリコーン、コレステロールなどのある種のステロイド、並びに例えば、ポリスチレン及びポリイソブレンを含む多くのポリマーを含むが、これらに限定されるものではない。親水基の例は、アルコール、短鎖カルボン酸、アミン、スルホン酸塩、リン酸塩、糖質、及びPEGなどのある種のポリマーを含むが、これらに限定されるものではない。両親媒性化合物の例は、1つの親水面及び1つの疎水面を有する分子を含むが、これらに限定されるものではない。

【0045】

本発明において有用な両親媒性化合物は、コール酸及びコール酸類似体及び誘導体を含むが、これらに限定されるものではない。「コール酸」とは、(R)-4-((3R,5S,7R,8S,9S,10S,12S,13R,14S,17R)-3,7,12-トリヒドロキシ-10,13-ジメチルヘキサデカヒドロ-1H-シクロ펜タ[a]フェナントレン-17-イル)ペンタン酸で、下記構造を有するものをいう：

【0046】

【化2】



10

【0047】

コール酸誘導体及び類似体は、アロコール酸、フィトコール酸、アビコール酸、デオキシコール酸、及びケノデオキシコール酸を含むが、これらに限定されるものではない。コール酸誘導体は、ミセル安定性及び膜活性などの、テロデンドリマー組織化から生じるナノ担体の特性を調節するように、デザインすることができる。例えば、コール酸誘導体は、1個又は複数のグリセロール基、アミノプロパンジオール基、又は他の基により修飾される親水面を有することができる。

【0048】

テロデンドリマー末端基はまた、パクリタキセル、ドキソルビシン、エトポシド、イリノテカン、SN-38、シクロスボリンA、ポドフィロトキシン、カルムスチン、アンホテリシン、イクサベピロン、パツピロン(エポテロンクラス)、ラパマイシン及び白金薬物などの薬物を含んでもよい。当業者は、他の薬物が、本発明において有用であることを理解するであろう。

20

【0049】

一部の実施態様において、各残存するRは、コール酸、(3, 5, 7, 12)-7, 12-ジヒドロキシ-3-(2, 3-ジヒドロキシ-1-プロポキシ)-コール酸、(3, 5, 7, 12)-7-ヒドロキシ-3, 12-ジ(2, 3-ジヒドロキシ-1-プロポキシ)-コール酸、(3, 5, 7, 12)-7, 12-ジヒドロキシ-3-(3-アミノ-2-ヒドロキシ-1-プロポキシ)-コール酸、ギ酸コレステロール、ドキソルビシン、及びレインであることができる。他の実施態様において、各残存するRは、コール酸であることができる。

30

【0050】

テロデンドリマー骨格は、枝の数並びに末端基及びR基の数及び化学的性質に応じて、変動することができ、これは、溶液の形態(conformation)、レオロジー特性、及び他の特徴を調節するであろう。テロデンドリマーは、いずれか好適な数nの末端基及びいずれか好適な数のR基を有することができる。一部の実施態様において、nは、2~70、又は2~50、又は2~30、又は2~10であることができる。一部の実施態様において、nは、2~20である。

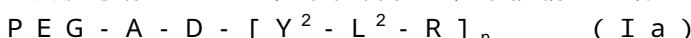
【0051】

テロデンドリマーは、外縁上のR基の単独の型か、又はいずれか好適な比のR基の任意の組合せを有することができる。概して、R基の数nの少なくとも半分は、末端基以外である。例えば、R基の数nの少なくとも半分は、疎水基、親水基、両親媒性化合物、薬物、又はそれらの任意の組合せであることができる。一部の実施態様において、R基の数nの半分は、両親媒性化合物である。

40

【0052】

一部の実施態様において、本化合物は、下記構造を有する：



(式中、各Rは、独立してポルフィリン、両親媒性化合物又は薬物であり、ここで少なくとも1個のR基は、ポルフィリンである。)。

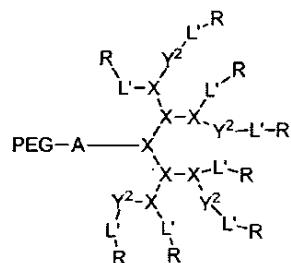
【0053】

50

一部の実施態様において、本化合物は、下記構造を有する：

【0054】

【化3】



10

【0055】

(式中、PEGは、PEG5kであることができ；各分岐したモノマー単位Xは、リジンであることができ；Aは、リジンであることができ；各L²は、結合又はリンク-Ebelsであることができ；各Y²は、存在しないか又はシステインであることができ；並びに、各Rは、コール酸又はポルフィリンであることができる。)。

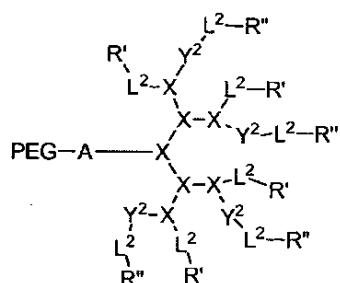
【0056】

20

一部の実施態様において、本化合物は、下記構造を有する：

【0057】

【化4】



30

【0058】

(式中、各R'は、コール酸(CA)、(3,5,7,12)-7,12-ジヒドロキシ-3-(2,3-ジヒドロキシ-1-プロポキシ)-コール酸(CA-40H)、(3,5,7,12)-7-ヒドロキシ-3,12-ジ(2,3-ジヒドロキシ-1-プロポキシ)-コール酸(CA-50H)又は(3,5,7,12)-7,12-ジヒドロキシ-3-(3-アミノ-2-ヒドロキシ-1-プロポキシ)-コール酸(CA-30H-NH₂)であることができ；並びに、各R"は、ピロフェオホルビド-a、フェオホルビド、クロリン-e6、ブルプリン及びブルプリニミドからなる群から選択されるポルフィリンであることができる)。他の実施態様において、ポルフィリンは、ピロフェオホルビド-aであることができる。一部の他の実施態様において、添字kは、1である。一部の他の実施態様において、本化合物は、下記であることができる：

(1) 各L²が結合であり、各Y²が存在せず、各R'がコール酸であり、各R"がピロフェオホルビド-aであり、及び添字kが0である化合物；

(2) 各L²がリンク-Ebelsであり、各Y²が存在せず、各R'がコール酸であり、各R"がピロフェオホルビド-aであり、及び添字kが0である化合物；

(3) 各L²が結合であり、各Y²がシステインであり、各R'がコール酸であり、各R"が

40

50

" がピロフェオホルビド - a であり、及び添字 k が 0 である化合物；

(4) 各 L^2 がリンカー E b e s であり、各 Y^2 がシステインであり、各 R' がコール酸であり、各 R'' がピロフェオホルビド - a であり、及び添字 k が 0 である化合物；

(5) 各 L^2 が結合であり、各 Y^2 が存在せず、各 R' がコール酸であり、各 R'' がピロフェオホルビド - a であり、及び添字 k が 1 である化合物；

(6) 各 L^2 がリンカー E b e s であり、各 Y^2 が存在せず、各 R' がコール酸であり、各 R'' がピロフェオホルビド - a であり、及び添字 k が 1 である化合物；

(7) 各 L^2 が結合であり、各 Y^2 がシステインであり、各 R' がコール酸であり、各 R'' がピロフェオホルビド - a であり、及び添字 k が 1 である化合物；又は

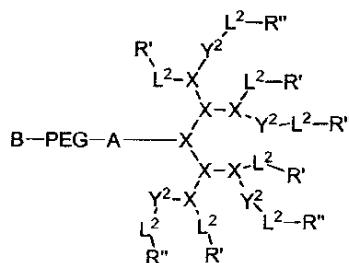
(8) 各 L^2 がリンカー E b e s であり、各 Y^2 がシステインであり、各 R' がコール酸であり、各 R'' がピロフェオホルビド - a であり、及び添字 k が 1 である化合物。 10

【0059】

一部の実施態様において、本化合物は、下記構造を有する：

【0060】

【化5】



20

【0061】

(式中、各 R' は、コール酸 (CA)、(3, 5, 7, 12) - 7, 12 - ジヒドロキシ - 3 - (2, 3 - ジヒドロキシ - 1 - プロポキシ) - コール酸 (CA - 40H)、(3, 5, 7, 12) - 7 - ヒドロキシ - 3, 12 - ジ (2, 3 - ジヒドロキシ - 1 - プロポキシ) - コール酸 (CA - 50H) 又は (3, 5, 7, 12) - 7, 12 - ジヒドロキシ - 3 - (3 - アミノ - 2 - ヒドロキシ - 1 - プロポキシ) - コール酸 (CA - 30H - NH₂) であることができ；並びに、各 R'' は、ピロフェオホルビド - a、フェオホルビド、クロリン e 6、ブルプリン及びブルプリニミドからなる群から選択されるポルフィリンであることができる)。他の実施態様において、ポルフィリンは、ピロフェオホルビド - a であることができる。一部の他の実施態様において、添字 k は 1 である。一部の他の実施態様において、本化合物は、下記であることができる： 30

【0062】

【表3】

化合物	B	PEG (mw)	A	X	L ²	Y ²	R'	R''
1	存在せず	5K	リジン	リジン	結合	存在せず	コール酸	ピロフェオホルビド-a
2	存在せず	5K	リジン	リジン	E b e s	存在せず	コール酸	ピロフェオホルビド-a
3	存在せず	5K	リジン	リジン	結合	システイン	コール酸	ピロフェオホルビド-a
4	存在せず	5K	リジン	リジン	E b e s	システイン	コール酸	ピロフェオホルビド-a
5	PLZ4	5K	リジン	リジン	結合	存在せず	コール酸	ピロフェオホルビド-a
6	PLZ4	5K	リジン	リジン	E b e s	存在せず	コール酸	ピロフェオホルビド-a
7	PLZ4	5K	リジン	リジン	結合	システイン	コール酸	ピロフェオホルビド-a
8	PLZ4	5K	リジン	リジン	E b e s	システイン	コール酸	ピロフェオホルビド-a

【0063】

本発明の化合物はまた、ポルフィリンにキレートされた金属陽イオンも含むことができる。いずれか好適な金属は、ポルフィリンにより、キレートされることができる。本発明において有用な金属は、アルカリ金属、アルカリ土類金属、遷移金属及び遷移元素後(post-transition)金属を含む。アルカリ金属は、Li、Na、K、Rb及びCsを含む。アルカリ土類金属は、Be、Mg、Ca、Sr及びBaを含む。遷移金属は、Sc、Ti、V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、Y、Zr、Nb、Mo、Tc、Ru、Rh、Pd、Ag、Cd、La、Hf、Ta、W、Re、Os、Ir、Pt、Au、Hg及びAcを含む。遷移元素後金属は、Al、Ga、In、Tl、Ge、Sn、Pb、Sb、Bi、及びPoを含む。これらの金属のいずれの放射性核種も、ポルフィリンによりキレートされることができる。一部の実施態様において、金属陽イオンは、ポルフィリンにキレートされることができる。他の実施態様において、金属陽イオンは、放射性金属陽イオンであることができる。一部の他の実施態様において、ポルフィリンにキレートされる放射性金属陽イオンは、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、¹⁷⁷Lu、⁶⁷Ga、¹¹¹In、及び⁹⁰Ytであることができる。

【0064】

I I I . 分岐したPEG部分を伴うテロデンドリマー

本発明のテロデンドリマーは、それらの焦点で共に連結されている、2つの分岐したセグメントを含む。一般にテロデンドリマーは、先に記載されたか又は既報(WO 2010/039496)の任意のテロデンドリマー及びオリゴマー焦点に結合された2個以上のPEG鎖を含む分岐したPEGセグメントを含む。

【0065】

テロデンドリマーの樹状分岐高分子は、1、2、3、4、5、又はそれ以上の世代を含む、いずれか好適なデンドリマーの世代であることができ、ここでデンドリマーの各「世代」とは、焦点とデンドリマーの次の1本の枝の末端基の間で遭遇した分岐点の数をいう。テロデンドリマーの樹状分岐高分子は、1.5、2.5、3.5、4.5、5.5などの部分世代を含むこともでき、ここでデンドリマーの分岐点は、1本の枝のみを有する。例えば、図1の構造を参照されたい。樹状分岐高分子の様々なアーキテクチャーは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31又は32末端基を含むが、これらに限定されるものではない、いずれか好適な数の末端基を提供することができる。

【0066】

一部の実施態様において、本化合物は、下記であることができ：

【0067】

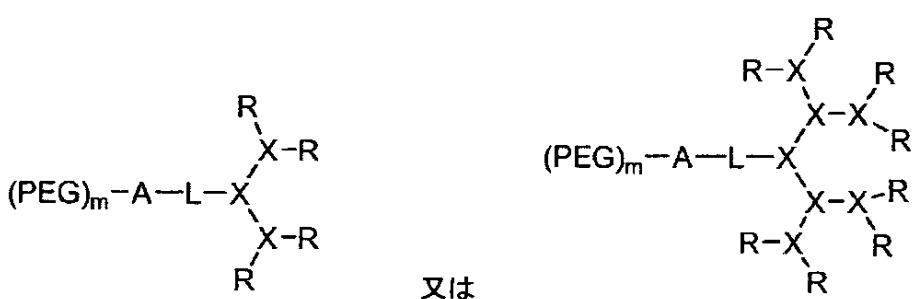
10

20

30

40

【化6】



【0068】

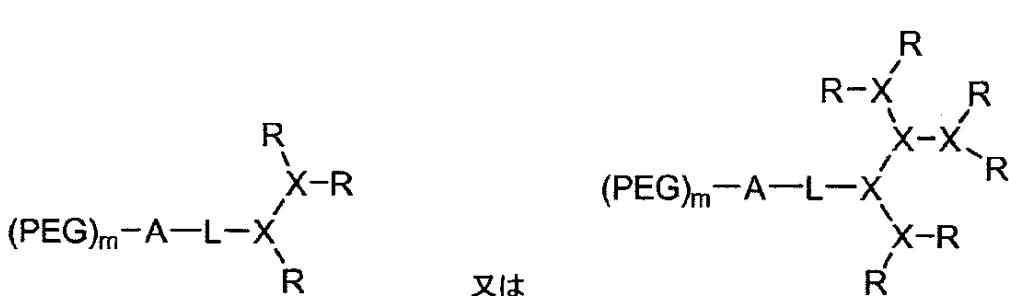
ここで、各分岐したモノマー単位Xは、リジンである。

【0069】

一部の実施態様において、本化合物は、下記であることができ：

【0070】

【化7】



【0071】

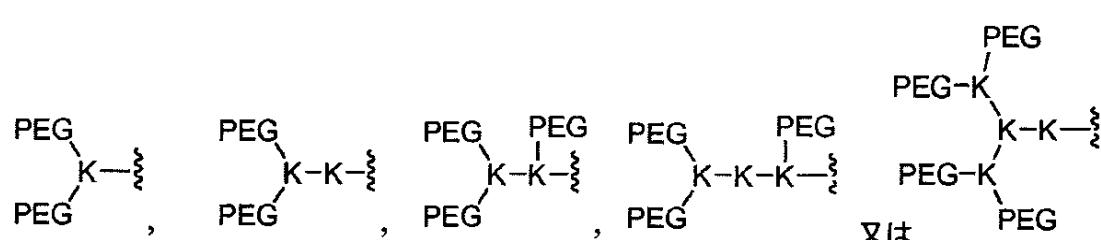
ここで、各分岐したモノマー単位Xは、リジンである。

【0072】

テロデンドリマー中のPEG-オリゴマー単位は、いずれか好適な数のPEG部分を含んでよい。PEG部分は、オルソゴナル保護基を使用し、オリゴマー上の様々な位置で、部位選択的に挿入することができる。一部の実施態様において、本化合物の(PEG)_m-A部分は、下記であることができ：

【0073】

【化8】



【0074】

ここで、各Kは、リジンである。

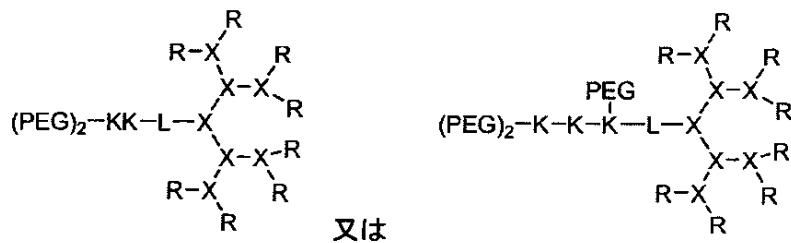
【0075】

50

一部の実施態様において、本テロデンドリマーは、以下であることができ：

【0076】

【化9】



10

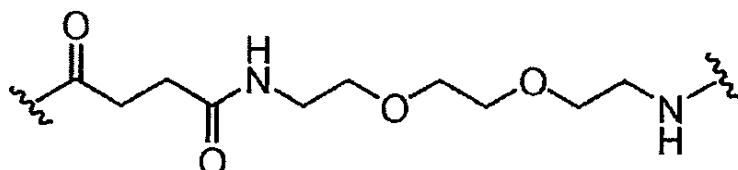
【0077】

ここで、各Kは、リジンであり；各PEGは、PEG2kであり；各分岐したモノマー単位Xは、リジンであり；各Rは、コール酸であり；並びに、リンクーLは、下記式を有する：

【0078】

【化10】

20



【0079】

I V . ナノ担体

本発明のテロデンドリマーは、凝集し、疎水性コア及び親水性外側を持つナノ担体を形成する。一部の実施態様において、本発明は、内側及び外側を有するナノ担体、複数の本発明のデンドリマーコンジュゲートを含むナノ担体を提供し、ここで各化合物は、水性溶媒中で自己組織化しナノ担体を形成し、その結果疎水性ポケットが、ナノ担体の内側に形成され、且つここで各化合物のPEGは、ナノ担体の外側上に自己組織化する。

30

【0080】

一部の実施態様において、ナノ担体の各コンジュゲートは、ポリエチレングリコール(PEG)ポリマー；親水面及び疎水面の両方を有する、少なくとも2つの両親媒性化合物；少なくとも1個のポルフィリン；任意に少なくとも2個の架橋基；並びに、PEG、両親媒性化合物、ポルフィリン及び架橋基に共有結合された、樹状分岐高分子：を有し、ここで各コンジュゲートは、水性溶媒中で自己組織化し、ナノ担体を形成し、その結果疎水性ポケットが、各両親媒性化合物の疎水面の互いへの配向により、ナノ担体の内側に形成され、ここで各コンジュゲートのPEGは、ナノ担体の外側上に自己組織化する。

40

【0081】

一部の実施態様において、ナノ担体は、疎水性薬物又は造影剤を含み、その結果疎水性薬物又は造影剤が、ナノ担体の疎水性ポケット内に封鎖されている。本発明のナノ担体において有用な疎水性薬物は、低い水への溶解度を有する任意の薬物を含む。一部の実施態様において、ナノ担体中の疎水性薬物は、ボルテゾミブ、パクリタキセル、SN38、カンプトシン、エトポシド及びドキソルビシン、ドセタキセル、ダウノルビシン、VP16、プレドニソン、デキサメタゾン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、テムシロリムス及びカルムシンであることができる。

50

【0082】

一部の実施態様において、ナノ担体は、光学プローブ、放射性核種、常磁性物質、金属キレート及び薬物に任意に連結される少なくとも1個のモノマー単位を含む。この薬物は、様々な親水性又は疎水性薬物であることができ、且つ本発明のナノ担体の内側に封鎖される疎水性薬物に限定されない。

【0083】

ナノ担体中に封鎖されるか又は本発明のコンジュゲートに連結され得る薬物は、細胞増殖抑制剤、細胞毒性物質（例えば、非限定的に、DNA相互作用薬（シスプラチン又はドキソルビシンなど））；タキサン（例えば、タキソテレ、タキソール）；トポイソメラーゼII阻害薬（エトポシドなど）；トポイソメラーゼII阻害薬（イリノテカン（又はCPT-11）、カンプトサー(camptostar)、又はトポテカンなど）；チューブリン相互作用薬（パクリタキセル、ドセタキセル又はエポチロンなど）；ホルモン剤（タモキシフェンなど）；チミジル酸合成酵素阻害薬（5-フルオロウラシルなど）；代謝拮抗薬（メトトレキセートなど）；アルキル化剤（テモゾロミド（Scherling-Plough社、ケニルウォース、NJからのテモダール（商標））、シクロホスファミドなど）；アロマターゼ組合せ；ara-C、アドリアマイシン、サイトキサン、及びゲムシタビンなどを含むが、これらに限定されるものではない。本発明のナノ担体において有用な他の薬物は、ウラシルマスター、クロルメチン、イホスファミド、メルファラン、クロラムブシル、ピポプロマン、トリエチレンメラミン、トリエチレンチオホスフォルアミン(triethylene thiophosphoramide)、ブルファン、カルムスチン、ロムスチン、ストレプトゾシン、ダカルバジン、フロキシウリジン、シタラビン、6-メルカブトプリン、6-チオグアニン、リン酸フルダラビン、オキサリプラチン、ロイコボリン、オキサリプラチン（Sanofi-Synthelabo Pharmaceuticals社、仏国からのエロキサチン（商標））、ペントスタチン、ビンプラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、ブレオマイシン、ダクチノマイシン、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、ミトラマイシン、デオキシコフォルマイシン、マイトイマイシン-C、L-アスパラギナーゼ、テニポシド17-エチニルエストラジオール、ジエチルスチルベストロール、テストステロン、ブレドニソン、フルオキシメステロン、ドロモスタノロンプロピオネート、テストラクトン、酢酸メゲストロール、メチルブレドニゾロン、メチルテストステロン、ブレドニソロン、トリアムシノロン、クロロトリアニセン、ヒドロキシプロゲステロン、アミノグルテミド、エストラムスチン、メドロキシプロゲステロン酢酸エステル、ロイプロリド、フルタミド、トレミフェン、ゴセレリン、シスプラチン、カルボプラチン、ヒドロキシ尿素、アムサクリン、プロカルバジン、ミトタン、ミトキサントロン、レバミソール、ナベルビン(Navelbine)、アナストロゾール(Anastrazole)、レトロゾール、カペシタビン、レロキサフィン、ドロロキサフィン、又はヘキサメチルメラミンを含むが、これらに限定されるものではない。プロドラッグ形も、本発明において有用である。

【0084】

本発明において有用な他の薬物は、⁶⁷Cu、⁹⁰Y、¹²³I、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁷⁷Lu、¹⁸Re、¹⁸⁶Re及び²¹¹Atなどの、放射性核種を含む。一部の実施態様において、放射性核種は、薬物として及び造影剤として治療において作用することができる。

【0085】

造影剤は、常磁性物質、光学プローブ、及び放射性核種を含む。常磁性物質は、ナノ担体の疎水性ポケット内に封鎖されている鉄ナノ粒子などの、鉄粒子を含む。

【0086】

一部の実施態様において、これらのコンジュゲートは、架橋基を介して架橋され得る。架橋基は、先に記載されたような、いずれか好適な架橋基であることができる。一部の実施態様において、架橋基は、チオール、ボロン酸又はジヒドロキシベンゼンであることができる。一部の実施態様において、架橋基は、チオールであることができる。一部の実施態様において、コンジュゲートの第一のセットはボロン酸架橋基を含み、及びコンジュゲ

10

20

30

40

50

ートの第二のセットはジヒドロキシベンゼン架橋基を含む。一部の実施態様において、ナノ担体の各コンジュゲートは、少なくとも2個のコール酸；少なくとも2個のピロフェオホルビド-a基；及び、少なくとも2個の架橋基を含み、ここでナノ担体のコンジュゲートは、架橋基を介して架橋されている。

【0087】

本ナノ担体は、先に記載されたようないずれか好適なポルフィリン(porphyring)を含むことができる。一部の実施態様において、ポルフィリンは、ピロフェオホルビド-aであることができる。一部の実施態様において、ポルフィリン基は、先に説明されたように、金属ヘキレートされることができる。いずれか好適な金属は、先に説明されたように、放射性及び非放射性金属を含み、ポルフィリンにキレートされることができる。一部の実施態様において、ナノ担体は、少なくとも1個のピロフェオホルビド-a基にキレートされた金属を含む。
10

【0088】

本発明の一部の実施態様は、各両親媒性化合物Rが、独立してコール酸、アロコール酸、フィトコール酸、アビコール酸、デオキシコール酸、又はケノデオキシコール酸であるナノ担体を提供する。

【0089】

本発明のナノ担体はまた、標的部位への結合のための結合リガンドを含むことができる。結合リガンドは、ナノ担体のコンジュゲートの一つへ連結されるか、又は分離されることができる。いずれか好適な結合リガンドを、先に説明されたように、本発明の化合物において使用することができる。例えば、結合リガンドは、特定の臓器、健常組織又は罹患組織を標的化することができる。結合リガンドの例は、アミノ酸配列c Q D G R M G F cを有するP L Z 4リガンドを含む。一部の実施態様において、ナノ担体は、ポリエチレングリコール(PEG)ポリマー、PEGポリマーに連結された結合リガンド、親水面及び疎水面の両方を有する少なくとも2個の両親媒性化合物、PEG及び両親媒性化合物に共有的に結合された樹状分岐高分子を含む、少なくとも1個の結合コンジュゲートを含み、ここで各結合コンジュゲートは、水性溶媒中で第一のコンジュゲートと自己組織化し、ナノ担体を形成し、その結果各両親媒性化合物の疎水面の互いへの配向により、疎水性ポケットがナノ担体の内側に形成され、ここで各コンジュゲートのPEGは、ナノ担体の外側上に自己組織化する。
20

【0090】

V. 治療方法

本発明のナノ担体は、ナノ担体の内側に疎水性薬物を封鎖することによるか、又は薬物のナノ担体のコンジュゲートへの共有的結合によるなど、薬物の投与を必要とする任意の疾患を治療するために使用することができる。ナノ担体はまた、ナノ担体の内側に造影剤を封鎖することによるか、又は造影剤のナノ担体のコンジュゲートへ結合することにより、造影のために使用することができる。

【0091】

一部の実施態様において、本発明は、本発明のナノ担体の治療有効量を、そのような治療を必要とする対象へ投与することを含む、疾患を治療する方法を提供し、ここでナノ担体は、薬物を含む。この薬物は、ナノ担体のコンジュゲートへ共有的に結合することができる。一部の実施態様において、この薬物は、ナノ担体の内側に封鎖された疎水性薬物である。一部の実施態様において、ナノ担体はまた、造影剤を含むことができる。この造影剤は、ナノ担体のコンジュゲートへ共有的に結合され得るか、又は造影剤は、ナノ担体の内側に封鎖され得る。一部の他の実施態様において、疎水性薬物と造影剤の両方が、ナノ担体の内側に封鎖される。更に別の実施態様において、薬物と造影剤の両方が、ナノ担体のコンジュゲートに共有的に連結される。更に別の実施態様では、ナノ担体はまた、放射性核種を含むこともできる。
40

【0092】

本発明のナノ担体を使用し治療する方法はまた、光線力学療法又は光温熱療法により疾

10

20

30

40

50

患を治療することを含む。これらの方は一般に、本発明のナノ担体を対象へ投与し、その後対象を特定の波長の放射線に曝露し、光の波長に応じて光線力学又は光温熱療法を誘導することに関与している。放射線又は光への曝露時に、金属に錯化されたか又はされないかのいずれかである、本発明のナノ担体において使用されるポルフィリンは、光線力学療法に好適な反応性一重項酸素を生じるか、又は光温熱療法に十分な熱を生じるかのいずれかである。一部の実施態様において、本発明は、治療有効量の本発明のナノ担体を、それを必要とする対象へ投与し、且つ対象を放射線に曝露し、これにより光線力学又は光温熱療法により疾患を治療することを含む、光線力学又は光温熱療法による疾患治療方法を提供する。一部の実施態様において、この方法は、光線力学療法により疾患を治療する方法である。他の実施態様において、この方法は、光温熱療法により疾患を治療する方法である。

10

【0093】

他の実施態様において、本発明は、治療有効量の本発明のナノ担体を、それを必要とする対象へ投与し、且つ対象を音波に曝露し、これにより疾患を音波力学療法により治療することを含む、音波力学療法による疾患治療方法を提供する。

【0094】

本発明のナノ担体は、例えば、非限定的に、下記などの癌を含む過増殖性疾患の治療のために、対象へ投与することができる：癌腫、神経膠腫、中皮腫、メラノーマ、リンパ腫、白血病、腺癌、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、膠芽細胞腫、白血病、リンパ腫、前立腺癌、及びバーキットリンパ腫、頭頸部癌、結腸癌、結腸直腸癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、食道癌、胃癌、膵臓癌、肝胆道癌、胆嚢癌、小腸癌、直腸癌、腎臓癌、膀胱癌、前立腺癌、陰茎癌、尿道癌、精巣癌、子宮頸癌、腫瘍、子宮癌、卵巣癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、膵臓内分泌腺癌、カルチノイド癌、骨癌、皮膚癌、網膜芽細胞腫、多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫、及び非ホジキンリンパ腫（追加の癌については「癌：原理と実践（CANCER: PRINCIPLES AND PRACTICE）」（De Vita、V. T. ら編集、2008）参照）。

20

【0095】

本発明のナノ担体により治療することができる他の疾患は、以下を含む：（1）炎症又はアレルギー性疾患、例えば全身アナフィラキシー又は過敏反応、薬物アレルギー、虫刺されアレルギーなど；炎症性腸疾患、例えばクローニ病、潰瘍性大腸炎、回腸炎及び腸炎など；膣炎；乾癬及び炎症性皮膚疾患、例えば皮膚炎、湿疹、アトピー性皮膚炎、アレルギー性接触皮膚炎、じんま疹など；血管炎；脊椎関節症；強皮症；呼吸器アレルギー性疾患、例えば喘息、アレルギー性鼻炎、過敏性肺疾患など、（2）自己免疫疾患、例えば関節炎（リウマチ性及び乾癬性）、変形性関節炎、多発性硬化症、全身性紅斑性狼瘡、糖尿病、糸球体腎炎など、（3）移植片拒絶反応（同種移植拒絶反応及び移植片対宿主疾患を含む）、並びに（4）望ましくない炎症反応が阻害されるべきその他の疾患（例えば、アテローム性動脈硬化症、筋炎、脳卒中及び閉鎖性頭部外傷などの神経学的状態、神経変性疾患、アルツハイマー病、脳炎、髄膜炎、骨粗鬆症、痛風、肝炎、腎炎、敗血症、サルコイドーシス、結膜炎、耳炎、慢性閉塞性肺疾患、静脈洞炎及びベーチェット症候群）。一部の実施態様において、疾患は、癌であることができる。他の実施態様において、疾患は、膀胱癌又は卵巣癌であることができる。

30

【0096】

加えて本発明のナノ担体は、ウイルス、細菌、真菌、及び寄生生物などの病原体による感染症の治療のために有用である。他の疾患は、本発明のナノ担体を用いて治療することができる。

【0097】

いずれか好適なコンジュゲート又はナノ担体を、本発明の方法において使用することができる。一部の実施態様において、ナノ担体の各コンジュゲートは、少なくとも2個のコール酸、少なくとも2個のピロフェオホルビド-a基、少なくとも2個の架橋基、及び少なくとも1個のピロフェオホルビド-a基にキレートされた金属を含み、ここでナノ担体

40

50

のコンジュゲートは、架橋基を介して架橋される。

【0098】

A. 製剤

本発明のナノ担体は、当業者に公知の様々な異なる様式で製剤化することができる。医薬として許容し得る担体は、投与される特定の組成物により、更には組成物を投与するためには使用される特定の方法により、一部決定される。従って、本発明の医薬組成物の多種多様な好適な製剤が存在する（例えば「レミントン薬科学(Remington 's Pharmaceutical Sciences)」、第20版、2003年、前掲参照）。有効な製剤は、経口及び経鼻製剤、非経口的投与のための製剤、及び徐放性を持つよう製剤化された組成物を含む。

【0099】

経口投与に適した製剤は、(a)液体溶液、水、食塩水又はPEG400などの希釈剤中に懸濁された本発明の化合物の有効量など；(b)液体、固体物、顆粒又はゼラチンとして、活性成分の予め決定された量を各々含有する、カプセル剤、サシェ剤、デポ剤又は錠剤；(c)適切な液体中の懸濁剤；(d)好適な乳剤；並びに、(e)貼付剤：からなることができる。先に説明された液体溶液は、滅菌溶液であることができる。医薬形状は、乳糖、ショ糖、マンニトール、ソルビトール、リン酸カルシウム、トウモロコシデンプン、ジャガイモデンプン、微結晶性セルロース、ゼラチン、コロイド状二酸化ケイ素、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、及び他の賦形剤、着色剤、充填剤、結合剤、希釈剤、緩衝剤、湿潤剤、保存剤、香味剤、色素、崩壊剤、及び医薬として適合性のある担体の1又は複数を含むことができる。舐剤の形状は、例えばショ糖など香味料中に活性成分を含有することができ、更に香錠は、ゼラチン及びグリセリン又はショ糖及びアカシアゴムなどの不活性基剤中に活性成分を含有し、例えば乳剤、ゲル剤などは、活性成分に加え、当該技術分野において公知の担体を含む。

【0100】

医薬調製品は、単位剤形が好ましい。そのような形状において、調製品は、適量の活性成分を含む単位投与量に分割される。単位剤形は、包装された調製品であることができ、この包装は、バイアル又はアンプル内に包装された錠剤、カプセル剤、及び散剤などの、調製品の個別の量を含む。同じく単位剤形は、カプセル剤、錠剤、カシェ剤、又は舐剤それ自身であることができるか、或いはこれは包装された形状のこれらのいずれかの好適な数であることができる。組成物は、望ましいならば、他の適合性のある治療薬を含むこともできる。好ましい医薬調製品は、本発明の化合物を持続放出製剤において送達することができる。

【0101】

本発明において有用な医薬調製品は、徐放性製剤を含む。一部の実施態様において、本発明において有用な徐放性製剤は、米国特許第6,699,508号に説明されており、これは米国特許第7,125,567号に従い調製することができ、これらの両特許は引用により本明細書中に組み込まれている。

【0102】

医薬調製品は、典型的には、ヒト及び非-ヒト哺乳動物を含む哺乳動物へ送達される。本方法を用いて治療される非-ヒト哺乳動物は、家庭用動物（すなわち、イヌ、ネコ、マウス、齧歯類、及びウサギ）及び農業用動物（ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ）を含む。

【0103】

本発明の方法を実践する上で、本医薬組成物は、単独で、又は他の治療薬若しくは診断薬と組合せて使用することができる。

【0104】

B. 投与

本発明のナノ担体は、必要に応じ頻繁に投与することができ、これは毎時、毎日、毎週又は毎月を含む。本発明の医薬方法において利用される化合物は、初回量約0.0001mg/kg～約1000mg/kgを毎日で投与される。1日投与量の範囲約0.01mg/kg～約500mg/kg、又は約0.1mg/kg～約200mg/kg、又は約

10

20

30

40

50

1 mg / kg ~ 約 100 mg / kg、又は約 10 mg / kg ~ 約 50 mg / kg を使用することができる。しかしこれらの用量は、患者の必要性、治療される病態の重症度、及び利用される化合物に応じ、変動することができる。例えば用量は、特定の患者において診断された疾患の型及び病期を考慮し、経験的に決定することができる。本発明の状況において、患者へ投与される投与量は、ある期間にわたり患者において有益な治療反応を作用するのに十分でなければならない。投与量のサイズはまた、特定の患者における特定の化合物の投与に付随する何らかの有害副作用の存在、性質、及び程度により決定されるであろう。特定の状況に関する適量の決定は、熟練開業医の技術の範囲内である。一般に治療は、本化合物の最適量よりも少ない比較的小用量で開始される。その後この用量は、状況下で最適効果に達するまで、少しずつ増加される。便宜上、総 1 日用量を、望ましいならば、分割し、その日のうちに部分毎に投与することができる。投与量は、治療担当医の決定により、毎日、又は隔日で与えることができる。投与量はまた、皮下カプセル剤、サシエ剤若しくはデポ剤の使用により、又は貼付剤若しくはポンプを介してなどで、長期間にわたり（数週、数ヶ月又は数年）、規則的又は連続して与えることができる。

【0105】

本医薬組成物は、局所的、非経口、静脈内、皮内、皮下、筋肉内、経結腸、経直腸、又は腹腔内を含む、様々な様式で、患者へ投与することができる。好ましくは、本医薬組成物は、非経口、局所的、静脈内、筋肉内、皮下、経口、又は例えば吸入により経鼻的に投与される。

【0106】

本発明の方法の実践において、本医薬組成物は、単独で、又は他の治療薬若しくは診断薬と組合せて使用することができる。本発明の併用プロトコールで使用される追加の薬物は、個別に投与することができるか、又は併用プロトコールにおいて使用される 1 又は複数の薬物を、混合物中など、まとめて投与することができる。1 又は複数の薬物が個別に投与される場合、各薬物の投与の時期及びスケジュールは変動し得る。その他の治療薬又は診断薬は、本発明の化合物と同時に、個別に又は異なる時点で投与することができる。

【0107】

V I . 造影方法

一部の実施態様において、本発明は、本発明のナノ担体の有効量を、造影される対象へ投与することを含む、造影方法を提供し、ここで該ナノ担体は、造影剤を含む。他の実施態様において、治療方法及び造影方法は、薬物及び造影剤の両方を有するナノ担体を同時に使用し達成される。

【0108】

造影剤の例は、常磁性物質、光学プローブ、及び放射性核種を含む。常磁性物質造影剤は、外部印加される場の下で磁気を帯びている。常磁性物質の例は、鉄粒子を含むナノ粒子を含むが、これに限定されるものではない。光学プローブは、1 つの放射線波長での励起、及び第二の異なる放射線波長での検出により、検出することができる蛍光化合物である。本発明において有用な光学プローブは、Cy 5.5、Alexa 680、Cy 5、DiD (1,1'-ジオクタデシル-3,3',3'-テトラメチルインドジカルボシアニン過塩素酸塩) 及び DiR (1,1'-ジオクタデシル-3,3',3'-テトラメチルインドトリカルボシアニンヨージド) を含むが、これらに限定されるものではない。他の光学プローブは、量子ドットを含む。放射性核種は、放射性壊変を受ける元素である。本発明において有用な放射性核種は、³H、¹¹C、¹³N、¹⁸F、¹⁹F、⁶⁰Co、⁶⁴Cu、⁶⁷Co、⁶⁸Ga、⁸²Rb、⁹⁰Sr、⁹⁰Y、⁹⁹Tc、^{99m}Tc、¹¹¹In、¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹²⁹I、¹³¹I、¹³⁷Cs、¹⁷⁷Lu、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、²¹¹At、Rn、Ra、Th、U、Pu 及び²⁴¹Am を含むが、これらに限定されるものではない。

【0109】

本発明のナノ担体はまた、腫瘍を検出するために使用することができる。例えば、ナノ担体のポルフィリン基は、第一波長の光に曝露された後、第二波長の光を放出することができる。第二波長の放出された光は次に、当該技術分野において公知の方法により検出する

10

20

30

40

50

ることができる。腫瘍の検出に有用なナノ担体は、ポルフィリンにキレートされた金属を含むか、又は金属を含まない。一部の実施態様において、本発明は、有効量の本発明のナノ担体を、対象へ投与すること；対象を、第一波長で放射線へ曝露し、ここで該放射線は、ナノ担体上に存在するポルフィリンを励起し、その結果ポルフィリンが、第二波長の放射線を放出すること；並びに、励起されたポルフィリンにより放出された放射線を検出し、これにより腫瘍を検出すること：を含む、対象の腫瘍を検出する方法を提供する。

【実施例】

【0110】

V I I . 実施例

材料

10

モノメチル-末端ポリ(エチレングリコール)モノアミン(Meo-PEG-NH₂、M_w: 5000Da)及び-アミノ--Boc-アミノポリ(エチレングリコール)(Boc-NH-PEG-NH₂、M_w: 5000Da)は、Rapp Polymere社(独国)から購入した。ピロフェオホルビド-aは、Santa Cruz Biotechnology社(サンタクルズ)から入手した。塩酸ドキソルビシン(DOX·HC1)(Novaplus)は、UC Davis Cancer Center Pharmacyから入手した。(Fmoc)lys(Boc)-OH、(Fmoc)Lys(Dde)-OH、(Fmoc)Lys(Fmoc)-OH、(Fmoc)Cys(Trt)-OH及び(Fmoc)Ebes-OHは、Anaspec社(サンノゼ、CA)から入手した。3,3'-ジヘキサデシルオキサカルボシアニン過塩素酸塩(Dio)及び4,6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI、青色)は、Invitrogen社から購入した。コール酸、MTT[3-(4,5-ジメチルジアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド]、エルマン試薬(DTNB、5,59-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)]及び他の全ての化学物質は、Sigma-Aldrich社(セントルイス)から購入した。

20

【0111】

PLZ4(アミノ酸配列:cQDGGRMGFc、ここで大文字はL-アミノ酸を表し、小文字はPLZ4の環化及び安定化に使用される非天然のD-システインを表す)は、既報のように(Bioconjug Chem 21, 1216-1224(2010); Biomaterials 30, 6006-6016(2009); 印刷に先立ちUrol Oncol Epub(2012))、Rink樹脂上の固相ペプチド合成により調製した。

30

【0112】

統計解析は、2群についてはスチューデントt-検定、及び複数群については一元配置ANOVAにより行った。全ての結果は、別に注記しない限りは、平均±標準誤差(SEM)として表した。P値<0.05を、統計学的に有意とみなした。

【0113】

実施例1. テロデンドリマーの合成

テロデンドリマーは、既報のように(Bioconjug Chem 21, 1216-1224(2010); Biomaterials 30, 6006-6016(2009))、ビルディングブロックとしてMeo-PEG-NH₂、Boc-NH-PEG-NH₂、リジン、コール酸及びピロフェオホルビド-aを使用する、液相縮合反応により合成した。

40

【0114】

PLZ4-テロデンドリマーを合成するために、第一銅イオンにより触媒される水相「クリック化学」を行い、PLZ4ペプチド上のアルキン基を、先に本発明者らが報告したテロデンドリマー(PEG^{5k}-CA₈)上のPEG末端のアジド基に、モル比1:2(PLZ4:PEG)でカップリングさせた。コンジュゲート後、PLZ4は検出されず、このことはPLZ4は、テロデンドリマーにうまくコンジュゲートされたことを示唆している。

50

【0115】

テロ дендролімірі - の合成。ポルフィリン / コール酸ハイブリッドテロ дендролімірі - を、段階的ペプチド化学を利用する液相縮合反応により合成した。NPsは、これらのテロ дендролімірі - の溶媒 - 蒸発法¹¹による自己組織化により形成された。このテロ дендролімірі - を、構造及び分子量に関して特徴づけた。NPsは、粒子サイズ、薬物負荷、安定性、ROS生成、吸光度、蛍光及び熱特性に関して特徴づけた。

【0116】

代表的ポルフィリン / コール酸ハイブリッドテロ дендролімірі - (PEG^{5k} - Por₄ - CA₄、図12a、図13)は、段階的ペプチド化学を利用するMeO - PEG - NH₂からの液相縮合反応により合成した。簡単に述べると、(Fmoc)LyS(Fmoc) - OH(3当量)を、カップリング試薬としてDIC及びHOBTを使用し、負のカイザー試験結果が得られるまで、PEGのN末端上にカップリングさせ、これによりカップリング反応の完了が示された。冷エーテルを添加することにより、PEG化された分子を沈殿させ、次に冷エーテルにより2回洗浄した。ジメチルホルムアミド(DMF)中の20%(v/v)4-メチルピペリジン処理により、Fmoc基を除去し、PEG化された分子が沈殿し、冷エーテルにより3回洗浄した。白色粉末沈殿を、真空下で乾燥させ、(Fmoc)Lys(Fmoc) - OHの1カップリング及び(Fmoc)lys(Boc) - OHの1カップリングを、各々実行し、PEGの一方の末端上に4個のBoc基及びFmoc基を末端とした樹状分岐ポリリジンの第三世代を生成した。ジクロロメタン(DCM)中での、各々、Fmocの20%(v/v)4-メチルピペリジンによる除去及びBoc基の50%(v/v)トリフルオロ酢酸(TFA)による除去後、コール酸NHSエステル¹及びピロフェオホルビド-aを、樹状分岐ポリリジンの末端にカップリングさせた。このテロ дендролімірі - 溶液を濾過し、次にMWC Oの3.5KDaの透析チューブ内で水4Lに対して透析し；貯留槽水を、24時間で4回完全に新しくした。最後に、テロ дендролімірі - を凍結乾燥した。PEG^{5k} - Por₄ - CA₄の分子量を、ABI 4700 MALDI TOF/TOF質量分析計(リニアモード)上で、マトリックスとしてR-シアノ-4-ヒドロキシケイヒ酸を使用し、収集した。単分散質量トレースを、テロ дендролімірі - について検出したところ、MALDI - TOF MSからのテロ дендролімірі - の分子量(図14)は、理論値とほぼ等しかった。このテロ дендролімірі - の¹H NMRスペクトルを、Advance 500核磁気共鳴分光計(Bruker社)上で、溶媒としてDMSO-d₆及びD₂Oを使用し、記録した。テロ дендролімірі - の濃度は、NMR測定について、5 × 10⁻⁴Mに維持した(図15)。

【0117】

チオール化されたピロフェオホルビド-aテロ дендролімірі - (PEG^{5k} - CyS₄ - Por₄ - CA₄と称す、図16a、図17)を、同じ戦略を用い^{1,2}、本発明者らの既報のチオール化テロ дендролімірі - (PEG^{5k} - CyS₄ - L₈ - CA₈)の8個のコール酸を4個に置き換えることにより合成した。PEG^{5k} - CyS₄ - Por₄ - CA₄合成の代表的手順は、以下である：(Fmoc)Lys(Fmoc) - OH(3当量)を、カップリング試薬としてDIC及びHOBTを使用し、負のカイザー試験結果が得られるまで、PEGのN末端上にカップリングさせ、これによりカップリング反応の完了が示された。冷エーテルを添加することにより、PEG化された分子を沈殿させ、次に冷エーテルにより2回洗浄した。ジメチルホルムアミド(DMF)中の20%(v/v)4-メチルピペリジン処理により、Fmoc基を除去し、PEG化された分子が沈殿し、冷エーテルにより3回洗浄した。白色粉末沈殿を、真空下で乾燥させ、(Fmoc)Lys(Fmoc) - OHの1カップリング及び(Dde)lys(Fmoc) - OHの1カップリングを、各々実行し、PEGの一方の末端上に4個のDde基及びFmoc基を末端とした樹状分岐ポリリジンの第三世代を生成した。次に、Fmoc基を除去した。(Fmoc)CyS(Trt) - OH、(Fmoc)Ebes - OH及びコール酸NHSエステル(12当量)を、樹状分岐ポリリジンの末端に段階的にカップリングさせた。DMF中の2%(v/v)ヒドラジンによるDde保護基の除去後、(Fmoc)Ebes - OH及びピロフェオホル

10

20

30

40

50

ビド - a (12 当量) を、引き続き、樹状分岐ポリリジンの末端上の使い残し (leftover) のアミノ基にカップリングさせた。システム上の Trt 基を、TFA / H₂O / エタノジチオール (EDT) / トリエチルシラン (TIS) (94 : 2.5 : 2.5 : 1, v/v) により除去し、PEG^{5k} - CyS₄ - Por₄ - CA₄ チオール化されたテロデンドリマーを生じた (図 16a, 図 17)。チオール化されたテロデンドリマーを、この混合物から、各々、DMF 及びエーテルによる溶解 / 再沈殿の 3 サイクルにより、回収した。最後に、このチオール化されたテロデンドリマーを、アセトニトリル / 水に溶解し、凍結乾燥した。PEG^{5k} - CyS₄ - Por₄ - CA₄ の分子量を、ABI 4700 MALDI-TOF / TOF 質量分析計 (リニアモード) 上で、マトリックスとして R-シアノ-4-ヒドロキシケイヒ酸を使用し、収集した。単分散質量トレースを、出発PEG 及びこのテロデンドリマーについて検出したところ、MALDI-TOF MS からのテロデンドリマーの分子量 (図 18) は、理論値とほぼ等しかった。

【0118】

実施例 2. 金属性テロデンドリマーの生成

金属性ナノポルフィリンの調製。キレートされた金属を伴うテロデンドリマーを生成するために、既報の方法^{6, 49}に従い、過剰な遊離金属イオン (例えば 10 倍過剰) を、テロデンドリマーと一緒に、メタノール / クロロホルム中で、1 ~ 5 時間、窒素下で、インキュベーションした。遊離金属は、分子量カットオフ値 3,500 のカラムfiltration により除去した。その後この金属ポルフィリン - 脂質を、アリコートとし、乾燥させ、アルゴン下、-20 で貯蔵した。

【0119】

実施例 3. ナノポルフィリンミセルの調製

金属性NPs を、音波処理により、PBS 中に金属 - テロデンドリマーを溶解することにより、作製した。チオール遊離ポルフィリン - テロデンドリマー 20 mg を、リン酸緩衝食塩水 (PBS) 1 mL 中に溶解し、引き続き 10 分間音波処理し、非架橋のナノポルフィリンを形成した。標的化ミセルを作製するために、PLZ4 - コンジュゲートされたテロデンドリマー (PLZ4 - PEG^{5k} - CA₈) を、PEG^{5k} - Por₄ - CA₄ と混合した。自己組織化後、より親水性の標的化 PLZ4 リガンドが、ミセルの表面上に提示された。

【0120】

ジスルフィド架橋されたミセルを作製するために、PEG^{5k} - CyS₄ - Por₄ - CA₄ 及び PEG^{5k} - CyS₄ - L₈ - CA₈ の総量 20 mg を、リン酸緩衝食塩水 (PBS) 1 mL 中に溶解し、ミセルを形成し、次に 10 分間音波処理した。このテロデンドリマー上のチオール基を、過酸化水素により酸化させ、ジスルフィド結合を形成した。遊離チオール基のレベルは、エルマン試験により経時的にモニタリングした。遊離チオール基のレベルを、低い値で一定に保った後、このミセル溶液を、透析せずに、更なる特徴決定に使用した。

【0121】

金属性ナノポルフィリンの特徴決定。ナノポルフィリンのサイズ及びサイズ分布を、動的光散乱 (DLS) 装置 (Microtrac 社) により測定した。濃度は、DLS 測定に関して 1.0 mg / mL に維持した。全ての測定は 25 で行い、データは、Microtrac FLEX ソフトウェア 10.5.3 により解析した。ナノポルフィリンの形態は、Philips CM-120 透過型電子顕微鏡 (TEM) において観察した。簡単に述べると、水性ナノ粒子溶液 (1.0 mg / mL) を、リンタングステン酸 (PTA) による 2 秒間の染色あり又はなしで、銅グリッド上に沈着させ、且つ室温で測定した。ナノポルフィリンの吸光度及び蛍光シグナルは、蛍光顕微鏡 (Spectramax M2, Molecular Devices 社、米国) で測定した。ナノポルフィリン溶液 (10 μl) の近赤外蛍光を、Kodak マルチモーダル造影システム IS2000 MM を使用し、走査した。ナノポルフィリン溶液 (10 μl) の熱特性は、Flir サーマルカメラを用いて試験した。ナノポルフィリンのROS 生成は、指示薬として 2',7'-

10

20

30

40

50

ジクロロフルオレシンジアセタート (D C F) を使用し試験し、 P B S と比較した。

【 0 1 2 2 】

放射標識。 0 . 1 M H C l 中の $^{64}\text{C}\text{u}\text{C}\text{l}_2$ (ワシントン大学、 M O 、米国) を、 1 . 0 M 酢酸アンモニウムにより、 pH 7 へ緩衝した。 P E G 5k - P o r ₄ - C A ₄ テロデンドリマーを、メタノールに溶解し、その後少量の緩衝された $^{64}\text{C}\text{u}\text{C}\text{l}_2$ を添加した。放射標識した溶液を、室温で 30 分間インキュベーションした。メタノールを蒸発させ、テロデンドリマーのフィルムを、 P B S と再水和させ、 $^{64}\text{C}\text{u}$ 標識された N P s を作製した。遊離 $^{64}\text{C}\text{u}$ は、カットオフ値 3500 k D a の A m i c o n 遠心フィルターユニット (M i l l i p o r e 社、ビレリカ、 M A 、米国) 、又は代わりに M i c r o B i o - S p i n 6 カラム (B i o - R a d 社、ハーキュリーズ、 C A 、米国) を使用する遠心濾過により除去した。放射化学的純度及び収量は、インスタント薄層クロマトグラフィー (I T L C) を用いて評価した。二重標識された G d / $^{64}\text{C}\text{u}$ N P s を調製するために、予め調製した G d - テロデンドリマーを、メタノール中の $^{64}\text{C}\text{u}$ - P E G 5k - P o r ₄ - C A ₄ テロデンドリマー放射標識溶液に添加し、引き続き乾燥し、 P B S 中に再構成し、精製した。

【 0 1 2 3 】

結果

N P s の合成及び特徴決定。 N P s は、線状ポリエチレンギリコール (P E G) 並びにピロフェオホルビド - a (P o r 、ポルフィリン類似体) の樹状オリゴマー及びコール酸 (C A) で構成された、新規クラスのハイブリッド両親媒性ポリマー (テロデンドリマーと称す) の自己組織化により形成した (図 12 ~ 図 15) 。代表的テロデンドリマーである P E G 5k - P o r ₄ - C A ₄ を、図 12 a に示す。透過型電子顕微鏡 (T E M) は、この N P s が、サイズ 20 nm の球形であることを示した (図 12 c) 。この N P s は、 2 つの吸収ピークを有し、一つは 405 nm で、及び一つは近赤外 (N I R) 範囲 680 nm であった (図 12 d) 。 P E G 5k - P o r ₄ - C A ₄ は、銅 (C u (I I)) 、パラジウム (P d (I I)) 、ガドリニウム (G d (I I I)) 及びガリウム (G a (I I I)) などの様々な金属イオンをキレートする固有の能力を有する。 P B S 中のこれらの金属 - テロデンドリマーの自己組織化により作製される、金属イオン - 内包型 N P s は、吸光度ピーク (650 ~ 690 nm) に独自のシフトを示すことがわかった (図 12 d) 。金属イオンが、 N P s のポルフィリン成分に内包された場合、これらの重原子は、電子を大きい角度で散乱させ、このことはより大きい位相シフトにつながり、 T E M のコントラストを増大する。従って金属イオン層は、 T E M 下で、染色なしでも、観察することができる (図 19) 。リンタンクス滕酸による染色及び T E M による観察後、金属層が、 N P s の疎水性コアと親水性コロナの境界面に認められた (図 12 e 、 f) 。

【 0 1 2 4 】

405 nm で励起した場合、 P B S 中に配合された N P s は、ピーク値 660 nm の非常に弱い赤色蛍光発光を示した (図 12 g 、赤色曲線) 。 - 相互作用及び疎水性特徴のために、 P o r 分子は、 N P s のコア内に高度に秩序付けられた構造を容易に形成することができ、これは水性媒体中での励起状態の強力な自己消光作用に寄与する¹⁰ので、これは予想外のことではない。対照的に、 N P s が、ドデシル硫酸ナトリウム (S D S) により破壊される場合¹¹ (図 20) 、 405 nm で励起されると、 660 nm で強力な蛍光が認められた (図 12 g 、青色曲線) 。図 12 h は、 S D S 添加あり又はなしで (図 21) 、 N P 濃度の関数として、 N P s の N I R 蛍光を比較した。 N P s の N I R 蛍光シグナルは、腫瘍部位及び / 又は腫瘍細胞内部で起こると予想されるミセル解離時に大きく増幅されることは明らかである。本発明者らは、比較のための P o r を物理的に封入するための、簡便なミセル - ベースのナノ担体として、 P E G 5k - C A ₈ ミセルを、先に報告した¹⁻¹⁷。 N P s は、同じ濃度の P o r を持つ P o r 内包型 P E G 5k - C A ₈ ミセル (N M - P O R) よりも 10 倍より強く自己消光することを示し (図 22 、図 23) 、このことは、ナノポルフィリン構築体のコア内に独特に組織化された P o r 分子の明確な特徴であることを指摘している。蛍光特性同様、 N P s は、アーキテクチャー - 依存型「オン / オフ

」光線力学変換も有する。光照射後 P B S 中で N P s により生成された一重項酸素は、最低であるが、 S D S の添加時には回復することができる（図 12 i）。

【0125】

N P s は P B S 中で高度に自己消光するので、エネルギーは、レーザー照射時に、蛍光及び／又は一重項酸素生成の代わりに、熱の形で放出される（図 12 j、k）。N P 濃度が、0 から 1.0 mg / mL まで増加する場合に、N P 溶液の温度は、24 から 62 まで上昇する。N P s が S D S 存在下で解離され同じ線量の光が照射される場合、強力な蛍光であるが、溶液温度のより有意性の低い上昇が認められた（図 12 j、k）。対照的に、N M - P O R は、同じ照射レベルで S D S 中のものと比べ、P B S 中において軽度の温度上昇のみを示し（図 24）、このことは、光熱変換は、P o r が、N P s の独自のアーキテクチャー内に閉じ込められる場合にのみ有効であることを指摘している。本発明者らは更に、光線量及びN P 濃度を変動することにより、N P s の光熱変換を細かく調整することができる。本発明者らは、4.0 mg / mL N P s に関して、1.25 W / cm²で 120 秒間の照射により、超高温（120 ）を達成することができ（図 121）、これは基板プラスチックフィルムの溶融に繋がることを明らかにした。低線量の光（0.1 W / cm²）で 120 秒間の照射の場合、N P 溶液の温度は、数度上昇したのみであった（図 17）。

【0126】

実施例 4. 薬物内包型ナノポルフィリンの調製

薬物内包されたミセルの調製

ドキソルビシンを、先に説明した溶媒蒸発法により、ミセルへ内包させた。D O X の高分子ミセルへの封入前に、D O X · H C 1 を、クロロホルム（C H C l₃）／メタノール（M e O H）（1：1、v / v）中のトリエチルアミン 3 モル当量と共に一晩攪拌し、D O X · H C 1 から H C 1 を除去した。テロデンドリマー 20 mg を、異なる量の中和したD O X と一緒に、最初に C H C l₃ / M e O H に溶解し、混合し、回転蒸発器上で蒸発させ、均質な乾燥ポリマーフィルムを得た。このフィルムを、リン酸緩衝溶液（P B S）1 mL 中に再構成し、引き続き 30 分間音波処理し、試料フィルムを、ミセル溶液に分散させた。それらのインビボでの運命を追跡するために、疎水性 N I R F 色素 D i D を、同様の方法を用い、一部のミセルに封入した。最後に、これらのミセル製剤を、0.22 μm フィルターにより濾過し、試料を滅菌した。D O X 量を決定するために、D O X - 内包型ミセルを、D M S O（ミセル溶液 / D M S O : 1 : 9、v / v）に希釈し、ミセルナノ粒子を解離し、蛍光を、N a n o D r o p 2000 分光計（T h e r m o S c i e n t i f i c 社）により測定し、ここで様々な濃度の一連のD O X / D M S O 標準溶液を使用し、較正曲線を得た。D O X 内包型ジスルフィド架橋されたミセルは、同じ方法により調製し、その後、過酸化水素によりチオールを酸化し、ミセル内ジスルフィド結合を形成した。

【0127】

ドキソルビシン、パクリタキセル、ピンクリスチン、ポルテゾミブ、ソラフェニブ及び 17 - アリルアミノ - 17 - デメトキシゲルダナマイシンなどの、疎水性薬物を、同様の方法を使用し、ナノポルフィリンへ内包させた。封入された薬物の量を決定するために、薬物 - 内包型ナノポルフィリンを、D M S O（ナノポルフィリン溶液 / D M S O : 1 : 9、v / v）で希釈し、ナノ粒子を解離した。薬物内包を、H P L C システム（W a t e r s 社）上で分析し、ここで様々な濃度の一連の薬物 / D M S O 標準溶液を使用し、較正曲線を得た。薬物内包型ジスルフィド架橋されたナノポルフィリンを、同じ方法により調製し、引き続きチオールを酸化し、ミセル内ジスルフィド結合を形成した²。

【0128】

ヒト血漿中のD O X 放出。 N P - D O X 溶液を調製し、血漿中のインビトロ薬物放出プロファイルを決定した。最初のD O X 濃度は 1.0 mg / mL であったのに対し、N P 濃度は 10 mg / mL であった。同じ薬物含量でD O X を伴うN P 単独及び本発明者らの報告した標準ミセル（ポルフィリンを伴う）¹¹も、比較のために調製した。D O X がN P s

10

20

30

40

50

のコア内に封入される場合、D O X と P o r の間の近接は、F R E T 範囲内であり、480 nmで、D O X の励起時に、D O X 分子から P o r 分子への十分なエネルギー転移が可能であった（図16e、f）。480 nmでの励起時に、N P s 単独のシグナルは、対応するF R E T シグナルと比べ、はるかに小さかった。従って、F R E T 比の動的变化をモニタリングすることにより、本発明者らはリアルタイムでN P s からのD O X の放出をモニタリングすることができた。これらのナノ粒子溶液のアリコートを、ヒト血漿により、9回希釈し、インキュベーター内で37度で、速度100 rpmで攪拌しながら、インキュベーションした。これらのナノ粒子溶液の蛍光スペクトルを、予め決められた時点で、N a n o D r o p 分光光度計（T h e r m o S c i e n t i f i c 社）により測定した。一部の実験において、D O X 内包型N P s に対する光又は温度の作用を試験するために、ナノ粒子溶液に、光を5分間照射し、固定された温度の水浴中でインキュベーションした。
10

【0129】

安定性試験は、高分子ミセルを効率的に破壊することができることが報告されている⁴ドデシル硫酸ナトリウム（S D S）の存在下、ナノポルフィリン及びジスルフィド架橋されたナノポルフィリンの、蛍光及び粒子サイズの変化をモニタリングすることにより行った。S D S 溶液（7.5 mg / mL）を、ナノポルフィリン（1.5 mg / mL）の水溶液へ添加した。最終のS D S 濃度は、2.5 mg / mL であり、且つミセル濃度は、1.0 mg / mL に維持した。これらの溶液の蛍光シグナルは、蛍光光度計（S p e c t r a M a x M 2、M o l e c u l a r D e v i c e s 社、米国）において測定した。ナノポルフィリン溶液のサイズ及びサイズ分布は、D L S により、予め決められた時間間隔で、モニタリングした。ミセルの安定性はまた、S D S と一緒にグルタチオン（G S H、20 mM）の存在下においても評価した。D O X - 内包型N P s の安定性は、健常ヒト志願者由来の50%（v / v）血漿中において更に試験した。この混合物は、生理的体温（37度）でインキュベーションし、引き続き予め決められた時間間隔で、最大48時間まで、サイズ測定した。
20

【0130】

結果

本発明者らは更に、P E G^{5k} - P o r₄ - C A₄ によって形成されたN P s は、様々な水に溶けにくい化学療法薬物及び分子標的化された薬物を効率的に運搬することができることを明らかにした。例えば、化学療法薬（ドキソルビシン、パクリタキセル及びピンクリスチン）並びに分子標的化された薬物、例えばプロテアソーム阻害薬（ボルテゾミブ）、チロシンキナーゼ阻害薬（ソラフェニブ）及び熱ショックタンパク質90（H s p 90）阻害薬（17-アリルアミノ-17-デメトキシグルダナマイシン、17 A A G）などは、N P s へ容易に取り込まれ、水への溶解度の有意な増加を生じる。薬物 - 内包型N P s の最終粒子サイズは、全ておよそ12~20 nmであり、これは空のN P s のサイズに類似していた（図25）。

【0131】

本発明者らは、D O X は、内包能3.7 mg / mL の架橋されたN P s の内側に封入されることができることを明らかにした（図16d）。D O X - 内包型架橋されたN P s（C N P - D O X）の最終粒子サイズは、およそ20 nmであり、D O X を最大2.5 mg / mL まで内包した。次に本発明者らは、C N P - D O X のヒト血漿との相互作用は、インビオ適用において血液中の状態を脱安定化するように刺激することを調べた。C N P - D O X の粒子サイズは、ヒト血漿中で高度に安定していた（図26）。本発明者らは、ドキソルビシンとN P s の間の蛍光共鳴エネルギー転移（F R E T）を利用し、ヒト血漿中のリアルタイム薬物放出をモニタリングした（図16e）。図16f - g に示したように、C N P - D O X が、ヒト血漿中で、37度で24時間インキュベーションされた場合、F R E T シグナルは非常に安定しており、これは、架橋されたN P s からのドキソルビシン放出は最小であることを示している。しかし、24時間及び28時間の光曝露により、各々、劇的なF R E T シグナルの減少が存在した（図16f - g）。前述の結果は、ジス
30
40
50

ルフィド架橋されたNPsは、光曝露により、薬物放出の引き金がひかれることを指摘している。或いは、DOX放出は、細胞内レベルでのGSH(～10mM)により引き金がひかれ、且つこれはFRETによりモニタリングした(図16h)。

【0132】

血液は、静脈内投与によるナノ粒子-ベースの薬物送達システムに関する最初の生物学的障壁である。血液タンパク質とリポタンパクの相互作用は、ナノ粒子の解離を引き起こすことがあり、これは早期の薬物放出に繋がり得る。血液循環中のNPsの構造安定性を更に増大するために、本発明者らは、NPプラットフォームに、可逆的ジスルフィド架橋戦略を適用した。4個のシステインを、テロデンドリマーのオリゴリジン骨格に導入し、PEG^{5k}-Cys₄-Por₄-CA₄を形成した(図16a、図18、図27)。次に得られるNPsを、システイン上のチオール基の酸化により、ジスルフィド結合により架橋した。TEMは、これらのジスルフィド架橋されたNPsは、直径20～30nmの球形小胞であることを示し(図16b)、これはそれらの非架橋の対応物に類似している。非架橋NPs同様、架橋されたNPsの蛍光も、PBS中において高度に消光された。

【0133】

それに対応して、蛍光は、SDS及びグルタチオン(GSH)などの内在性還元試薬の存在下で、細胞内レベルで、回復した¹¹(図16c)。図16cに示したように、ジスルフィド架橋されたNPsも、405nmで励起された場合に、660nmにピーク値のある非常に弱い赤色蛍光発光を示した(緑色曲線)。架橋されたNPsの蛍光発光スペクトルをSDS存在下で記録した場合、660nmでのピーク発光の増加が存在した(黒色曲線)。しかしこのピーク値は、同じポルフィリン濃度で、SDSの存在下で非架橋のNPsのものよりも、有意に低かった。GSHの添加時に、ジスルフィド架橋されたNPsは、完全に破壊され、且つ蛍光発光スペクトルの660nmでのピークは、SDS存在下での非架橋NPsのそれの類似の値まで更に増加した(桃色曲線)。架橋されたNPsはまた、SDS中でそれらの粒子サイズを保持することができるが、還元剤の添加により解離することができる(図28)。

【0134】

実施例5. インビトロにおける細胞毒性

方法

インビトロにおける細胞毒性及び機序。 SKOV-3卵巣癌細胞株及びPC3前立腺癌細胞株を使用し、NPsの光増感機能を評価した。細胞を、NPsにより24又は72時間処理し、引き続き処理後24時間の時点で光照射した。細胞生存度を、WST-8キットを使用し決定した。熱及びROS生成を、照射時点で調べた。

【0135】

SKOV-3卵巣癌細胞株を使用し、NPsの光増感機能を評価した。本発明者らは、最初に、これらの癌細胞を様々な濃度のNPs又は従来の光線力学診断/治療薬である5-アミノレブリン酸(5-ALA)により、24時間処理した。完全に洗浄後、細胞を、指定されたように、NIF光に曝露した。細胞生存度を、照射後24時間、WST-8増殖キットを用いて決定した。別の実験において、架橋されたNPs又はDOX内包型架橋されたNPs、遊離DOX、及びDOX内包型架橋されたミセル(ポルフィリン含まず)⁵を使用し、癌細胞を24時間処理した。3回洗浄した後、細胞に、光を1分間照射した。細胞生存度を、24時間のインキュベーション後、WST-8により決定した。別の試験において、LNCAP細胞、PC3細胞及びRPWE1細胞に対するNP-AAGの成長阻害作用を、NP単独と遊離薬物17AAGにより比較した。細胞は、5000個細胞/50μl/ウェルで播種し、指定された薬物で24時間処理した。これらの薬物を除去し、新鮮な培地と置き換え、次に細胞をNIR光に2分間曝露した。成長阻害は、72時間後に、MTTアッセイを用いて測定した。アポトーシスは、アネキシンV及びPI染色を使用し、24時間後に分析した。HIF1、サバイビン、AKT、STAT3及びSrcレベルを、ウェスタンプロット及び対応する抗体を用い、12時間後に分析した。

【0136】

10

20

30

40

50

本発明者らは、最初に、SKOV-3細胞を、2.2 μMのNPsあり又はなしで24時間処理し、引き続き96ウェルプレート中で2',7'-ジクロロフルオレシンジアセタート(DCF)を30分間負荷し、ROS生成をモニタリングした。細胞をPBSで3回洗浄し、新鮮な培地と置き換えた。ウェルの一部に、NIR光を照射し(例えば、0.07W/cm²で60秒間)、Metamorphプログラムを使用し、細胞画像を、蛍光顕微鏡下で獲得した。次に、NPsによる前処理後のSKOV-3細胞のミトコンドリア膜電位(Δm)の喪失を評価するために、本発明者らは、細胞に、40nM DiOC6(3)を20分間負荷し、ウェルの一部に、NIR光を照射した。24時間後、細胞を、ヨウ化プロピジウム(死滅した細胞)及びHoechst 33342(核)により標識し、画像を蛍光顕微鏡により獲得した。最後に、NPs及び光線療法に対する細胞反応を調べるために、本発明者らは、カスパー3/7活性を評価し、これは、アポトーシス経路活性化の部分のマーカーとして役立った。SKOV-3細胞を、2.2 μMのNPsあり又はなしで24時間処理した。洗浄後、細胞を、0.5、1及び2分間、光に曝露するか又は曝露しなかった。24時間インキュベーション後、カスパー3/7活性を、更に45分間にわたる更に50 μLの作業溶液の添加により、測定した。このプレートを、プレートリーダー(SpectraMax M2、Molecular Devices社、米国)により読み取った。最後に形態試験のために、SKOV-3細胞を、8-ウェルチャンバースライド上で培養し、NPsのあり又はなしで24時間処理した。光による処理の2時間後に、スライドを、Hema 3(登録商標)により染色した。

【0137】

20

結果

本発明者らは、NPsの独自のアーキテクチャー-依存性ROS生成(図12i)は、光増感剤それ自身の光毒性を軽減するために使用することができるることを認めた。光照射がないと、無傷のNPsは、SKOV-3卵巣癌細胞に対し1.0mg/mLまで観察可能な細胞毒性を示さないのでに対し、遊離Porは、投与量-依存様式で有意な細胞毒性を示した(図29)。光曝露後のNPsのインビトロ抗腫瘍作用は、光-線量及びNP-投与量に依存し(図30a、b)、且つ同じ線量の照射時に、細胞毒性は、5-アミノレブリン酸(図30-AALA、PDTに関するFDA承認薬)よりもはるかに強力であった(図30b)。細胞生存度の喪失は、細胞内ROS生成に関連し(図30c)、ミトコンドリア膜電位の喪失、細胞損傷、及びカスパー3/7活性化により証明される細胞アポトーシスを生じた(図30d-f)。更に本発明者らは、NP-DOX媒介性の化学療法と光線療法の併用は、NPs媒介した光線療法単独、遊離DOX、又はNM-DOX(ポルフィリンを伴わないDOX内包型標準ミセル)¹¹よりも、同じ光曝露後に有意により効果的であることを発見した(図30g)。本発明者らは更に、NP-媒介型光線療法は、Hsp90阻害薬17AAGなどの分子標的化された薬物と、相乗的に組み合わせができるることを明らかにした。強力な相乗作用が、アンドロゲン依存性PC3前立腺癌細胞(図30h、下側)及びアンドロゲン依存性LNCAP前立腺癌細胞(図31、左下側)の両方で、17AAG内包型NPs(NP-AAG)により認められた。不死化された正常前立腺細胞RWPE1は、この療法に対し比較的抵抗性であった(図31、右側)。NP-AAGは、アネキシンV及びPI染色により測定した場合(図30i)、PC3細胞におけるアポトーシスの誘導のより大きい作用を有する。興味深いことに、HIF1、Akt、サバイビン及びMMP2は、PDT上でNPsにより増大し、この誘導並びにSrcは、NP-AAGにより枯渇され(図30j)、これはNP-AAGの強力な相乗作用の機序を暗示している。

【0138】

40

ここで本発明者らの知る限りでは、インビオにおいて最初に、携帯可能な単波長NIRレーザーを使用し、同時のPTT/PDTに関して、「軟」有機NPsは、血液循環中では不活性で留まるが、腫瘍部位では熱及びROSを放出するように活性化されることができるスマートナノトランスデューサーとして使用することができるることを明らかにした。留まっている架橋されたNPsの蛍光は、移植された腫瘍異種移植片を保有するマウスへ

50

、静脈内注射した後、血液中で消光された（図32）。同様に、血液中の架橋されたNPsのROS生成は、低線量の光（一日の生活で受け取る690nmの太陽光に類似、0.1W/cm²）による曝露時に最低であった（図33）。光曝露後、血液中で、架橋されたNPsについて、明らかな溶血は、認められなかった（図34）。架橋されたNPsの熱発生も、同じ線量の光への曝露後には、無視できた（図35）。対照的に、Por封入された従来のPEG^{5k}-CA₈ミセルであるNM-PORは、架橋されたNPsよりも、マウスの血液中で5倍より高い蛍光を示し、有意に高量のROSを生成し、これは重度の溶血を生じた（図32-図34）。これは恐らく、物理的に封入された内側ミセルの場合の、Por分子のより少ない消光作用によるものであろう（図23）。これらの腫瘍は、PBS、架橋されたNPs及びNM-PORの注射の24時間後、治療的線量の光により（1.25W/cm²で120秒間）照射された。NPsは、NM-PORと比べ、腫瘍部位で、有意により高い量のROSを生成し、2.5倍の温度変化を引き起こしたことが認められた（図36、図37）。腫瘍部位でNPsの同時に起こるROS及び熱の発生は、腫瘍部位でのNPsの有意な蓄積及び注射後24時間での部分的解離の結果であろう（図38d）。図12i、jの結果を基に、無傷のNPsは、活性化され、熱を生じるのに對し、解離されたNPsは、活性化され、光照射時にROSを生じると予想される。前記結果は、NPsのアーキテクチャー依存性光特性は、血液中の光増感剤の意図されない毒性を最小化し、且つ同等のナノ担体よりも腫瘍へ有意に高量のROS及び熱を送達するために利用され得るであろうことを示唆している。

【0139】

10

実施例6. ヒト卵巣癌及び膀胱癌細胞の治療

SKOV-3ヒト卵巣癌細胞株及び5637ヒト膀胱癌細胞株を、ATCCから購入し、推奨培地において維持した。イヌの膀胱癌細胞株K9TCC-Pu-Inは、2009年7月に、Dr. Deborah Knapp (Purdue大学)により最初に開発され、博士から直接提供された。これらの細胞株は、Dr. Knapp研究室において、2009年に、形態学、免疫組織化学、遺伝子発現及び腫瘍原性アッセイを使用し、試験され、及び正当性が認証された。これらの細胞は、細胞株の特徴決定を行ったDr. Knappから直接得られ、且つ蘇生(resuscitation)後6ヶ月未満使用者の研究室において継代したので、再認証は不要であった。

【0140】

20

ナノポルフィリンの細胞取り込み

癌細胞を、8ウェル組織培養チャンバースライド（BD Biosciences社、ベッドフォード、MA、米国）において播種し、引き続き10%FBSを含有する細胞培養培地において24時間インキュベーションした。培地を交換し、ナノ-ポルフィリンミセルを、各ウェルへ添加した。予め決定した時点で、細胞をPBSにより3回洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで固定し、細胞核をDAPIにより染色した。スライドにカバースリップを載せ、且つDelta Vision画像処理システム（Applied Precision社、CA）により、製造業者のプロトコールに従い、観察した。

【0141】

30

別の実験セットにおいて、イヌの尿路上皮細胞を、完全培地（抗生物質を含有するRMIM1640中10%FBS）において3日間、集密度60%まで培養した。ヒト膀胱細胞株5637を、DIO(400nM)により20分間予め染色し、尿路上皮細胞と同じプレートで一晩共培養した。PLZ4-NP 2.2μMを添加し、細胞画像を、Delta Vision画像処理システムにより獲得した。

【0142】

40

実施例7. インビトロにおける光線力学療法（PDT）

K9TCC-Pu-In及び5637膀胱癌細胞株並びにSKOV-3卵巣癌細胞株を使用し、ナノ-ポルフィリンの光増感機能を評価した。本発明者らは、癌細胞を、2.2μMナノ-ポルフィリンにより2時間処理した。完全に洗浄した後、細胞を赤色光(650nm)に曝した。細胞生存度を、WST-8増殖キット（Caymen社）を用い、照

50

射後 24 時間決定した。従来の光線力学診断 / 治療薬である 5 - アミノレブリン酸 (5 - A L A) を、対照として使用した。別の実験において、D O X 内包型ナノポルフィリンを使用し、これらの癌細胞を処置し、引き続き光曝露した。暗毒性及びテロデンドリマー関連毒性を評価するために、これらの細胞はまた、テロデンドリマー及び空の架橋されたミセルにより、異なる希釈で処理し、且つ光曝露せずに合計 72 時間インキュベーションした。

【 0 1 4 3 】

動物及び腫瘍異種移植片モデル

6 ~ 8 週齢の雌の無胸腺ヌードマウス (N u / N u 系統) を、H a r l a n 社 (リバー モア、C A) から購入した。全ての動物を、A A A L A C 指針に従い、無病原体 - 条件下で維持し、実験前に少なくとも 4 日間馴化させた。全ての動物実験は、施設の指針を順守し、並びにカリフォルニア大学デービス校の動物の使用と飼養に関する管理諮問委員会 (Animal Use and Care Administrative Advisory Committee) により承認されたプロトコール第 07 - 13119 号及び第 09 - 15584 号に従い、実施した。卵巣癌の皮下異種移植片モデルを、P B S 及びマトリゲル (1 : 1 v / v) の混合液 100 μ L 中の S K O V - 3 卵巣細胞 7×10^6 個を、雌ヌードマウスの右脇腹に皮下注射することにより、樹立した。

【 0 1 4 4 】

患者 - 由来の異種移植片の樹立：本動物プロトコールは、実験実施前に、U C デービス校施設の動物の飼養と使用に関する委員会 (I A C U C) により承認された。皮下の患者 - 由来の異種移植片 (P D X) を樹立するために、N O D S C I D (N S G ; T h e J a c k s o n L a b o r a t o r y 社、ウェストサンクレメント、C A) の 4 ~ 5 週齢のマウスを使用した。新たな操作していない臨床の腫瘍断片 (3 ~ 5 mm³) を、滅菌鉗子により、トロカールに負荷した。次に負荷されたトロカールを、ゆっくり脇腹皮膚へ押し出し、トロカールプランジャーを押し下げ、腫瘍断片を吐出させた。トロカールをゆっくり取り外し、注射領域を滅菌した。

【 0 1 4 5 】

N S G マウスの同所性異種移植片モデルを作製するために、継代 # 1 P D X 標本を収集し、小片に切断した。A c c u t a s e (I n n o v a t i v e C e l l T e c h n o l o g y 社、サンディエゴ、C A) 1 m l により 37 度 30 分間処理した後、比較的大きい組織を除去するために細胞ストレーナー (B D F a l c o n 社、カナーン、C T) を通した後、単独の細胞浮遊液を得た。次に全身麻酔下で膀胱の位置を肉眼で調べながら、5 ~ 10 μ L P B S 中の細胞を、マウス膀胱壁に注射した。この手術後、マウスを毎日モニタリングした。

【 0 1 4 6 】

実施例 8 . ナノポルフィリンの生体分布

直径およそ 8 ~ 10 mm の皮下腫瘍を持つ、K 9 T C C - P u - I n 及び 5637 膀胱癌並びに S K O V - 3 卵巣癌の異種移植片マウスモデルに、インビボ N I R F 光学造影を施した。ナノ - ポルフィリンミセルの注射後異なる時点で、K o d a k マルチモーダル造影システム I S 2 0 0 0 M M を、励起帯域通過フィルター 625 nm 及び発光 700 nm で用い、マウスを走査した。マウスは、各造影前に、ペントバルビタール (60 mg / k g) の腹腔内注射により麻酔をかけた。インビボ造影後、動物を注射の 24、48 及び 72 時間後に C O₂ 過剰投与量により安楽死させた。腫瘍及び主要臓器を摘出し、K o d a k 画像処理ステーションにより画像処理した。

【 0 1 4 7 】

N I R F 造影試験は、N S G マウスの同所性異種移植片モデルにおいても行った。簡単に述べると、同所性ヒト膀胱癌を保持する雌の N S G マウス又は正常 N S G マウスに、P L Z 4 - N P 30 μ L を、全身麻酔下、尿道を介して、膀胱内注射した。2 時間インキュベーションした後、K o d a k 画像処理システムを使用する全身のインビボ造影のために、膀胱を摘出した。

10

20

30

40

50

【0148】

実施例9. NPs媒介性マルチモーダル画像処理

方法

動物モデル。6～8週齢の雌の無胸腺ヌードマウス（Nu/Nu系統）を、Harrow社（リバーモア、CA）から購入した。これらのマウスは、4～40月齢で、乳癌を自然発症することがわかっている。全ての動物を、AAALAC指針に従い、無病原体・条件下で飼育し、実験前に少なくとも4日間馴化させた。全ての動物実験は、施設の指針を順守し、並びにカリフォルニア大学デービス校の動物の使用と飼養に関する管理諮問委員会により承認されたプロトコール第07-13119号及び第09-15584号に従い、実施した。卵巣癌の皮下異種移植片モデルを、PBS及びマトリゲル（1:1v/v）の混合液100μL中のSKOV-3卵巣細胞又はA549肺癌細胞 2×10^6 個を、雌ヌードマウスの右脇腹に皮下注射することにより、樹立した。乳癌のトランスジェニックマウス（FVB/n Tg (MMTV-PyVMT)）は、Jackson Laboratory社に発注した。

【0149】

NIRF光学造影。トランスジェニックマウス（10～12週間）及びヌードマウスが樹立された腫瘍（直径6～10mm）を発症した後、これらに、尾静脈からNPs 100μLを注射することにより、インピボNIRF光学造影を施した。NPsの注射後異なる時点で、マウスを、麻酔下で、Kodakマルチモデル造影システムIS2000MMを、励起帯域通過フィルター625/20nm及び発光700/35nmで用い、走査した。インピボ造影後、動物を安楽死させた。腫瘍及び主要臓器を摘出し、Kodak画像処理ステーションにより画像処理した。組織レベルでの生体分布のキネティックをモニタリングするために、SKOV-3腫瘍-保有するマウスに、架橋されたNPs 100μLを、尾静脈を介して投与し、1、24、又は48時間に安楽死させた。安楽死の直前に、デキストラン-FITC溶液を、静脈内に注射し、血管を位置づけた（locate）。腫瘍を収集し、氷中の冷ホルマリン中で固定した。新たな横断面を、大規模画像処理（LSI）レーザー走査型共焦点顕微鏡造影のために作製した。加えて、転移性病巣を伴う肺も、比較的高齢のトランスジェニックマウス（20～24週間）から収集し、冷ホルマリン中に1時間固定した。肺表面を、LSIレーザー走査型共焦点顕微鏡法により撮像した。撮像後、肺に、組織病理学的評価を施した。場合によっては、マウスの血液を、予め決められた時点で、採取し、測定した。

【0150】

MR及PET画像処理。SDSの非存在下及び存在下での、Gd-NPsのインピトロMRIシグナル増強を、 128×128 マトリックスサイズを使うT1-重み付きファストローアングルショット（FLASH）配列（エコー時間（TE）/繰り返し時間（TR）=4/200ms）を用いる、Bruker Biospec 7T MRIスキャナーを使用して得た。SKOV-3卵巣癌異種移植片を保有するヌードマウス、A549肺癌異種移植片を保有するヌードマウス及び乳癌を伴うトランスジェニックマウス（FVB/n Tg (MMTV-PyVMT)）を、Bruker Biospec 7T MRIスキャナー上で撮像した。スピンエコー画像を獲得し、固体癌の位置及び容積を決定した。体内及び腫瘍内のGd-NPsキネティック、並びにナノ粒子-増強されたMRIシグナル強度を評価するために、 128×128 マトリックスサイズを使う動的T1-重み付きFLASH配列を使用し（TE/TR=4/200ms）、注射直前に、及びGd-NPsの注射（Gd投与量：Gd投与量：0.015～0.02mmole/kg）後予め決められた時点で、画像を獲得した。MRIはまた、同じパラメータを使用し、PTT/PDTの前及び後に、SKOV-3卵巣癌異種移植片を保有するヌードマウス内の腫瘍成長をモニタリングするために使用した。PETは、小動物用マイクロPETシステム（Siemens Inveon D-PET）上で、 ^{64}Cu -標識したNPs（150～200μL、 ^{64}Cu 投与量：0.6～0.8mCi）の注射後、SKOV-3卵巣癌異種移植片を保有するヌードマウスについて行った。PET-MRIを、小動物用マイクロ

10

20

30

40

50

P E Tシステム(Siemens Inveon D-PET)及びBruker Biopspec 7T MRIスキャナー上で行った。A549肺癌異種移植片を保有するヌードマウスは、P E T画像とM R画像の同時記録を促進するために、両スキャナーにはめ込まれた可動式ベッド上に配置した。 ^{64}Cu 及びG d二重-標識したNPs(150~200 μL 、 ^{64}Cu 投与量: 0.6~0.8 mCi、G d投与量: 0.015~0.02 m mole/kg)の尾静脈注射後、マウスを、麻酔下(酸素中の2%イソフルラン2 L/分)で、注射後4時間又は24時間に撮像した。P E T画像及びM R画像の同時記録のために、Amideソフトウェアを使用した。

【0151】

結果

NPs及びジスルフィド架橋されたNPsの粒子サイズは、およそ20~30 nmであり(図12c、図16b)、これは、腫瘍を標的化し透過するのに最適な範囲である^{11,14,20}。それらの可逆的に架橋する性質及び独特なアーキテクチャー-依存性蛍光特性を基に、架橋されたNPsは、血液中のバックグラウンド抑制及び腫瘍部位での優先的蓄積及びシグナル增幅により、改善された癌検出に関するNIRF I感度を増大するため、活性化可能な光学ナノプローブとして使用するのに特に適している。架橋されたNPsは、血液循環中で最小バックグラウンド蛍光シグナルを伴い、サイレント(又は「オフ」状態)で存在することができる(図38a、下側パネル)。血液中の架橋されたNPsの消光状態は更に、SDS及びGSHの添加による、蛍光の回復により明らかにされた(図39)。予想されたように、SKOV-3卵巣癌マウスモデルにおいて、全身内の全体的蛍光シグナルは、静脈内注射後、架橋されたNPsについて、非架橋のNPsよりも、劇的に低下した(図38a)。サイズにより媒介された増強された透過性亢進及び残存(EPR)効果による腫瘍部位での蓄積時に、これらの架橋されたナノプローブは、腫瘍部位での又は癌細胞内の、内在性還元剤GSHによるジスルフィド結合の切断により、「オン」に変化し、その後ミセル解離及び蛍光シグナル增幅が続く。架橋したNPsは、注射後24時間で、非架橋のNPsよりも、有意に高い腫瘍蓄積を示した(図38a)。注射後24時間でのエクスピボ造影は、非架橋NPs及び架橋されたNPsの両方が、正常臓器と比べ勝った腫瘍における蛍光シグナルを有することを示した(図38b)。腫瘍部位での架橋されたNPsの平均蛍光は、同じ群のマウスの筋肉における値よりも15倍高く、且つ腫瘍部位の非架橋のNPsの値よりも3倍高かった(図38c)。架橋されたNPsと非架橋のNPsの間の示差的蛍光シグナルは、循環内の架橋されたNPsの構築体の安定性、従ってより高い腫瘍への取り込みにより説明することができる。

【0152】

図38dは、架橋されたNPs(赤色)の腫瘍内分布の投影像を示す。腫瘍血管(BV)は、デキストラン-FITCにより標識した(緑色)。NPsからの全体のNIRFシグナルは、注射後1時間で、腫瘍組織の内側で非常に低かった(図38d、左側)。24時間で、有意なNIRFシグナルが、血管(緑色)の周囲に認められ(図38d、中央)、これは、BVの周囲の腫瘍組織へのNPsの蓄積及び部分的解離を示している。48時間時点では、NPsシグナルは、腫瘍全体を通じて散在性に分布し、それらの優れた組織透過能及び解離能を暗示している(図38d、右側)。これらの結果は、動物モデルにおいて下記の光線療法のデザインを導く上で非常に有益であることを証明した。

【0153】

次に本発明者らは、静脈内注射により自然発症した乳癌を伴うトランスジェニックマウス(10~12週齢)(FVB/n Tg(MMTV-PyV mT))において、架橋されたNPsのNIRF Iの能力を調べた。これらのトランスジェニックマウスは自然発症的に異なるサイズの複数の乳癌を発症し、且つ腫瘍細胞及び内皮細胞の両方が、同じマウスに由来するので、同系又は異系腫瘍インプラントモデルにおいて起こり得る腫瘍血管の人工物(artifact)の懸念は存在しない。24時間後、NPsが腫瘍内及び腫瘍細胞の内側に蓄積したので、高い蛍光が、全ての自然発症乳癌において認められ(図38e)、NPsは解離し、且つ消光し始めた。図38eにおいて、白色矢印は、腫瘍部位を指している

10

20

30

40

50

。腫瘍容積は、 $(L \times W^2) / 2$ により算出した（式中、Lは腫瘍直径（mm）の最長部分、及びWは最短部分である）。エクスピボ造影は、24時間後の、9つの摘出した乳房腫瘍全てにおいて、正常臓器と比べNPsの優先的取り込みを更に確認した。乳房脂肪体上の小さい腫瘍であっても（容積およそ 18 mm^3 ）、NPsからの非常に強力なNIRFシグナルを有する（図38e）ことは言及されるべきであり、これは、NPsは初期乳癌の検出における使用可能性があることを指摘している。次に本発明者らは、大規模造影（LSI）レーザー走査型共焦点顕微鏡を用い、より高齢のトランスジェニックマウス（20～24週間）におけるNPsの分布を調べ、肺内の転移性病巣の小さい限局性の蓄積をうまく位置づけした（容積およそ 0.006 mm^3 及び 0.5 mm^3 ）（図38f、図40）。図38fにおいて、白色矢印は、転移部位を指している。赤色：ナノポルフィリン；緑色：デキストラン-FITC標識した腫瘍血管（バー= $250\mu\text{m}$ ）。これらの結果は、NPsは、原発性腫瘍に加え、小さい転移性病巣を検出する大きい機会をもたらし得ることを指摘している。
10

【0154】

NPsは、Gd（III）をキレートする固有の能力を有し（図12d、f）、且つアーキテクチャー-依存性磁気共鳴特性を有し、このことは、NPsを高感度及び腫瘍-特異性MRIのための活性化可能な造影剤としてそれらを使用することを可能にする。図12g、hの蛍光測定同様、Gd-NPsがPBS中でそれらの完全性を保持する場合、最小MRIシグナル増強が存在する（図41a）。これは恐らく、疎水性コアと親水性コロナの間の境界面でのGd/Porのスタッキング（図12f）に起因し、その結果Gd（III）を水中のプロトンとの相互作用から遮蔽するのであろう。SDS中の解離時に、PorによりキレートされたGdイオンは、隣接プロトンのスピニ-格子緩和時間を短縮するように接近し、その結果MRIシグナルの増強を生じる（図41a）。循環NPsのバックグラウンドシグナルは低いので、このGd-NPsの独自のアーキテクチャー上の性質は、腫瘍の高感度のMRI検出の機会をもたらす。本発明者らは、「自然発症」乳癌を伴うトランスジェニックマウスにおけるMRIのためのGd-NPsの適応の正当性を確認した。注射後異なる時点での代表的切片のセットを、図41bに示した。本発明者らは、Gd-NPsは、注射後1.5時間で、腫瘍のコントラストを有意に増強することができ、正常組織においては非常に低いシグナル増強であることを明らかにした。この腫瘍のコントラストは、26時間以上持続された。これらの試験において使用したGd投与量は、ヒトに関する臨床推奨Gd投与量²¹の1/7と等しかった。これらの結果は、Gd-NPsが血液プール中を循環する場合には、全身におけるMRIシグナル増強は低いことを確認した。腫瘍部位又は腫瘍細胞に到達した後、Gd-NPsは解離し、Gdイオンの周囲のプロトンとの相互作用が可能になり、結果的に腫瘍部位でのみ有意なMRIコントラストを生じる（図12b）。

【0155】

更にNPsは、PET用ナノプローブとしての適用のための放射性追跡子を組み込む固有能力を有する。例えば、本発明者らは、簡便で迅速なワンポット式の高収率の放射標識戦略による、PET造影のために、NPsへ放射性追跡子（⁶⁴Cu（II））を組み込んだ（放射性化学物質の収率（RYC）>96.5%）（図12d、図42）。⁶⁴Cu（II）を直接キレートすることは、それらの生体分布のみではなく、薬物動態も、PETによりインビボにおいて非侵襲的に追跡することを可能にするという、NPsの固有能力である（図41c）。PET造影は、⁶⁴Cu-ナノポルフィリンは、注射後4時間から腫瘍部位に蓄積し始め、16時間で最高レベルに到達したことを示した。24時間後、この放射標識は、移植された腫瘍において主に認められ、体の残りの部分においては非常に低いバックグラウンドであることがわかった（図41c）。本発明者らはここでは実施しなかったが、⁶⁷Cuのキレート化及び癌-特異的送達は、全身のインサイチュ放射線治療のために使用する可能性がある。
40

【0156】

PETとMRIの相乗的組合せは恐らく、正確な診断を提供するための、次世代のデュ

10

20

30

40

50

アル - モダリティスキャナーとなり始めるであろう^{22, 23}。結果的に、P E T 画像（高感度及び定量化可能性）及びM R 画像（高軟組織解像度）の相補的強みを活用するデュアル - モダリティ薬剤を開発する大きな必要性が存在する^{24, 26}。G d (I I I) 及び放射性追跡子を同時にキレートする固有の能力を有する外来性キレート剤 - 非含有ナノプラットフォームとして、N P s は、P E T - M R I のためのデュアル - モダリティナノプローブの開発の大きな将来性を示している。本発明者らは、⁶⁴C u (I I) 及びG d (I I I) の両方を、N P s へ効率的に組み込むことができることを示した（図12d、図42）。二重標識されたN P s は、注射後24時間で、腫瘍部位において、M R I コントラスト及びP E T シグナルを有意に増強することができる（図41d、e）。興味深いことに、腫瘍の不均一性と腫瘍内のN P s の同質でない分布が、P E T - M R I により非侵襲性に明らかにされた（図41e）。

【0157】

実施例10. N P s 媒介型マルチモーダル療法

方法

インビボ治療試験。乳癌のトランスジェニックマウス（F V B / n T g (M M T V - P y V m T) 及びS K O V - 3 卵巣癌異種移植片を保有するヌードマウスを、インビボ治療試験のために使用した。トランスジェニックマウスにおいて腫瘍容積が4～5mmに到達した時点で、架橋されたN P s を、2.5mg / k g D O X を伴う又は伴わずに、尾静脈を介して毎週1回、3投与量を注射した。24時間後、全身麻酔下で、腫瘍を、ダイオードレーザーシステム（A p p l i e d O p t r o n i c s 社、ニューポート、C T ）により690nmで照射した。光線量は、全腫瘍をおおう0.8cm²ビームスポットを生じる光ファイバーを通じて、1.25W / cm²で2分間であった。腫瘍温度を、赤外カメラ（F l i r ）により記録した。照射後の腫瘍内のR O S 生成を、N P s 及びP B S で処理した腫瘍に由来する組織溶解液100μLと混合した2'，7' - ジクロロフルオレシンジアセタート（D C F ）を用いて測定した。場合によっては、マウスの血液を採取し、照射後の血液中のR O S 及び熱発生を、予め決められた時点で測定した。引き続き溶血した。腫瘍容積を、週2回測定し、一旦腫瘍サイズが1000mm³に到達したならば、マウスを屠殺した。腫瘍を、照射後24時間の組織病理学的評価のために摘出した。S K O V - 3 卵巣癌異種移植片モデルは、100万個の細胞を、下方脇腹部に皮下に注射することにより、樹立した。腫瘍が150～200mm³に到達した後、マウスに、P B S 、2.5mg / k g D O X 、並びに2.5mg / k g D O X 内包型又は非内包型架橋されたN P s を、3日毎に、3投与量与えた。レーザー光0.2W / cm²を、投薬の1及び3回目後に2分間あてた。腫瘍サイズ及び体重を、週2回測定し、同時に毒性の潜在的徴候について毎日マウスをモニタリングした。最終投薬の2日後、C B C 及び血清化学試験を行った。また各群から1匹のマウスを屠殺し、組織病理学的評価のために、主要臓器を摘出した。

【0158】

統計解析。統計解析は、2群についてはスチューデントt - 検定、及び複数群については一元配置A N O V A により行った。全ての結果は、別に注記しない限りは、平均±標準誤差（S E M ）として表した。P 値<0.05を、統計学的に有意とみなした。

【0159】

結果

P D T 及びP T T などの光 - ベースの技術は、癌治療の有望な機会をもたらす²⁷⁻³⁶。光線療法の臨床使用は、以下の点により妨げられている：1) 光増感剤は、腫瘍と正常組織の間の選択性が悪く、その結果限定された有効性及び正常組織への光毒性をもたらす³⁷⁻⁴¹；2) 光線療法が媒介した酸化的ストレスは、腫瘍微小環境において、サバイビン、A k t 、低酸素症誘導因子1（H I F - 1 ）、マトリクスメタロプロテイナーゼ - 2（M M P - 2 ）及び血管内皮増殖因子（V E G F ）などの、生存促進性及び血管新生性シグナル伝達分子の発現を誘導し、このことは治療効果に負の影響を及ぼし且つ腫瘍再発に繋がり得る^{27, 42, 43}。ミセル及びリポソームなどのナノ担体は、光線療法に関して、腫瘍

10

20

30

40

50

への光増感剤の標的化された送達のために使用されている^{6, 44}。しかしインビボにおける結果は、これらのナノ担体の腫瘍標的化特異性は、恐らくインビボにおける不安定性及び正常組織における非特異的標的化のために、予想されたほど良好ではないことを示している⁴⁴。より最近になって、有機ポルフィソーム(porphysome)ナノ小胞の新規クラス⁶が、PTTのための光を熱に効率的に変換する、多機能性生体光工学薬剤として報告された。残念ながら、ポルフィソームは、それらのかなり大きいサイズ(～100 nm)のために、一部高い肝臓及び脾臓蓄積を有し、結果的に細網内系(RES)による非特異的クリアランスを有する傾向がある^{11, 14, 20}。対照的に、架橋されたNPsは、極めて低い肝臓及び脾臓取り込み、並びに高い腫瘍標的化特異性を示した(図38b, c)。架橋されたNPsの使用は、光増感剤の光-毒性を最小化し、且つ光線療法の有効性を大きく増強することができることが予想される。

【0160】

PTTは、PDTと相乗作用を有し、且つ増感剤及び薬物の局所的透過性を亢進することにより、PDT及び化学療法の転帰を増強することができることを示す研究が存在する^{33, 45, 46}。いくつかの無機ナノ粒子錯体、例えば光増感剤にコンジュゲートされた金ナノロッド³³、グラフェンオキサイドナノ粒子⁴⁵、及びシリカ-コートされたパラジウム/銀ナノ粒子⁴⁶などが、PTT/PDTデュアル療法のために開発された。しかし、これらの錯体の合成は、複雑であり、且つこれらのナノ粒子の活性化には、複数波長のレーザー(例えば、808 nm及び675 nm)を使用する2つの個別の照射が必要である^{33, 45, 46}。また、これらの無機ナノ粒子の長期安全性に関する懸念も存在する。

【0161】

本発明者らはまた、トランスジェニックマウスの腫瘍部位での温度は、NPsの注射後24時間で、光照射(1.25 W/cm²で2分間)後、57まで上昇したことも明らかにした(図43a, c)。この温度は、癌細胞に不可逆的損傷を引き起こすのに十分である⁶。対照的に、PBS対照群での腫瘍部位の温度は、同じ光曝露により、わずか41まで上昇した(図43b, c)。照射後NPsにより生成されたROSも、PBS対照群での組織バックグラウンドよりも、有意に高かった(図43d)。組織病理学試験は、照射後24時間で、細胞破壊及びアポトーシスなどの重篤な組織損傷の大きい領域を明らかにし(図43e)、これらはTUNEL陽性結果及び切断されたカスパーゼ3免疫反応性により証明された(図44)。これらの変化は、熱及びROS生成の両方の作用に起因するであろう(図43a, c, d)。

【0162】

本発明者らは、架橋されたナノポルフィリンは、ヒト血漿中の薬物放出は最小化するが、光曝露及び細胞内還元剤により、薬物内容物を放出する引き金をひくことができる、プログラム可能に放出するナノ担体として使用することができることを、図16に示した。同時のPTT/PDT及び化学療法に関して、近赤外光の照射時に、薬物負荷され及び架橋されたNPsは、腫瘍部位において、一重項酸素、熱及び薬物を同時に放出するように活性化されると予想される。本発明者らは次に、トランスジェニック及び異種移植片マウスモデルにおける架橋されたNPsの抗癌効果を評価するために、インビボ治療試験を行った。トランスジェニックマウス試験において、NP-媒介したPTT/PDTは、光線量1.25 W/cm²で2分間、1週間に1回により、PBS対照群及びNM-DOX群と比べ、腫瘍成長を有意に阻害することができる。治療された腫瘍は、潰瘍化を伴い、12日目に完全に除去された(図43f)。触手可能な腫瘍は、32日目であっても検出されなかった(図43g)。PTT/PDTのDOXとのCNP-DOX媒介型併用療法は、同様の有効性を示した(図43f, g)。NP媒介型併用療法の有効性を効果的に比較するためには、本発明者らは、より低いNPs投与量及び/又はより少ない光線量を使用することが必要であろう。これは、今後の研究対象であろう。興味深いことに、SKOV-3卵巣癌異種移植片モデルにおいて、NP媒介型光線療法、遊離DOX、及びNM-DOX媒介型化学療法は、SKOV-3において、PBS対照群よりも遅い腫瘍成長を生じた(図43h)。同じ投与量のDOX、光増感剤(ポルフィリン)及び光(0.25

10

20

30

40

50

W / c m²で 2 分間) が投与される場合、C N P - D O X 媒介性併用療法は、これらの群間で最良の抗腫瘍活性を示し、本試験を通じて腫瘍成長を全体的に阻害した。治療の 3 回投薬後には、体重、全血球数、及び血清化学において、有意な変化は認められなかった(図 4 5、表 1)。マウスは、実験室において環境光を遮らずに取り扱い、皮膚の光 - 毒性は示されなかった。

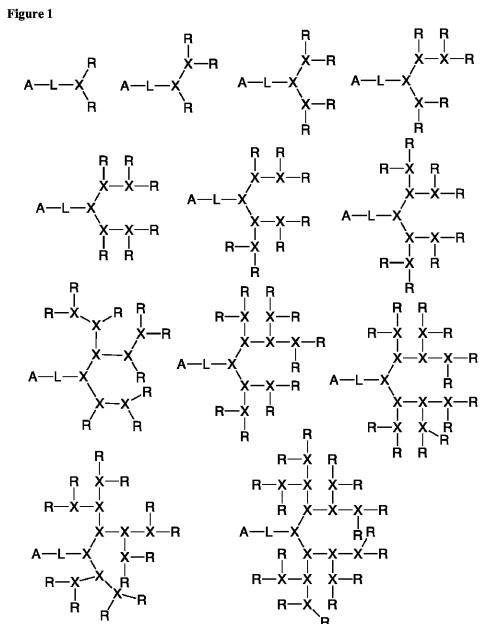
【 0 1 6 3 】

N P s の独自の造影能力を基に、M R I の深部組織浸透を利用する非侵襲的リアルタイム造影戦略を利用し、好都合なことにN P s の同時送達及び検出に加え、P T T / P D T 後の腫瘍サイズ及び腫瘍内部の壊死を含む、治療後のそれらの治療的有効性をモニタリングすることができる。概念実証として、本発明者らは、M R I を使用し、光照射を伴う又は伴わずに、G d - N P s の投与後の、S K O V - 3 卵巣癌マウスモデルにおける腫瘍成長を観察した(図 4 3 i)。M R 画像は、G d - N P s は、腫瘍部位での有意な蓄積を有し、これは注射後 4 時間で始まることを示した。治療群に関して、腫瘍は、注射後 2 4 時間で照射した。注射後 4 8 時間(照射後 2 4 時間)のM R 画像は、腫瘍の退縮及び腫瘍部位の壊死容積の増加を示した。M R I は、注射後 7 日目に完全な腫瘍除去を示した。対照的に、照射しない対照マウスの腫瘍成長は、M R 画像により明らかなほど影響されなかつた(データは示さず)。

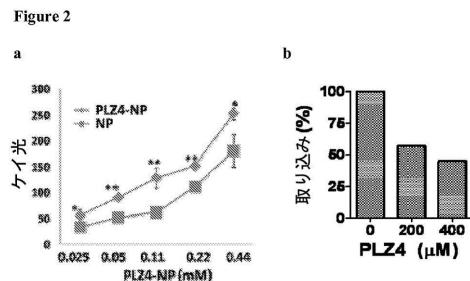
【 0 1 6 4 】

前述の発明は、理解を明確にする目的で例証及び実施例により一部詳細に説明されているが、当業者は、ある種の変更及び改変を、添付された請求項の範囲内で実行することができることを理解するであろう。加えて、本明細書に提供される参考文献の各々は、各参考文献が個別に引用により組み込まれているのと、同じ程度にその全体が引用により組み込まれている。本出願と本明細書に提供される参考文献の間に矛盾が存在する場合は、本出願が支配するものとする。

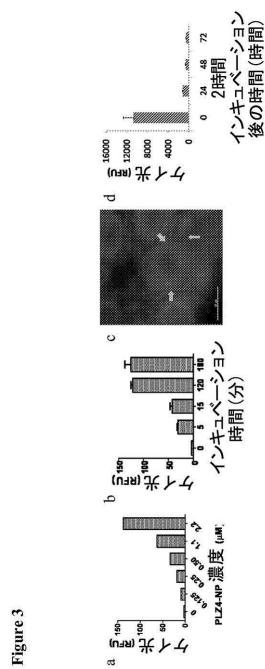
【 図 1 】



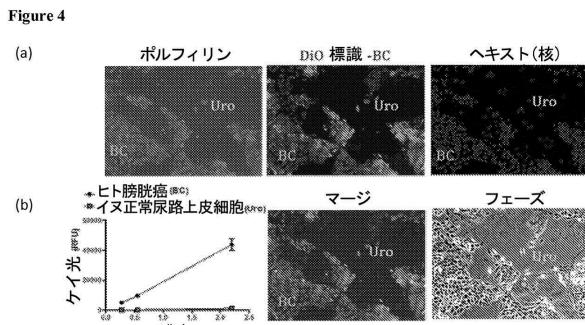
【 図 2 】



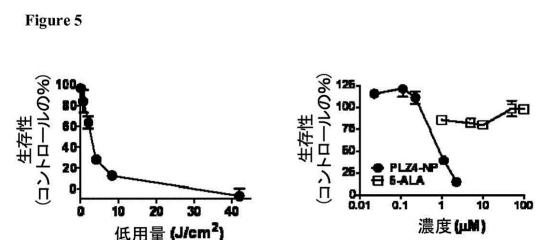
【図3】



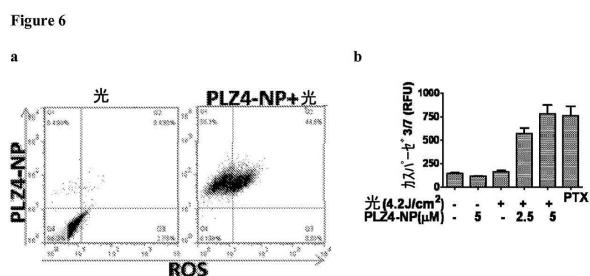
【図4】



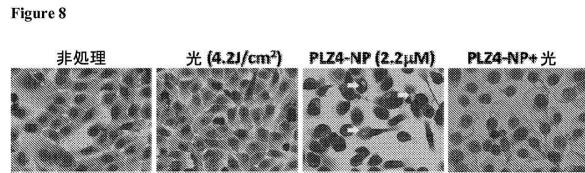
【図5】



【図6】



【図8】



【図7】

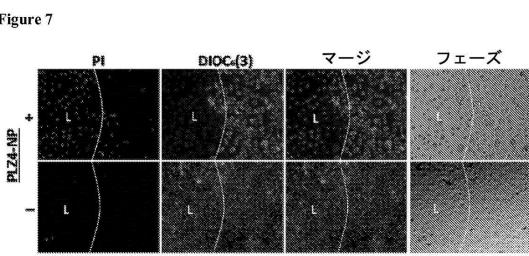
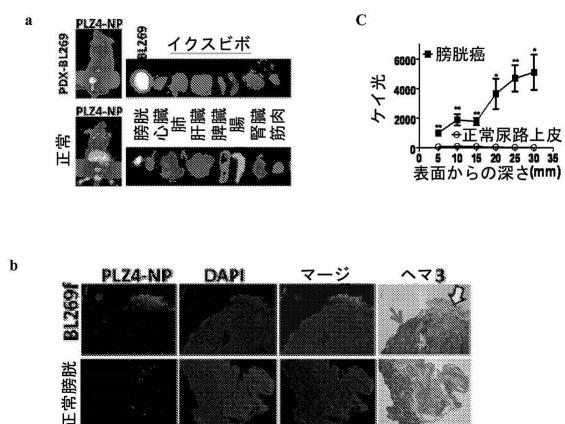
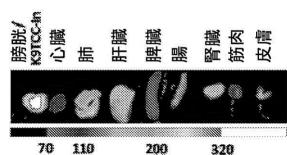


Figure 9



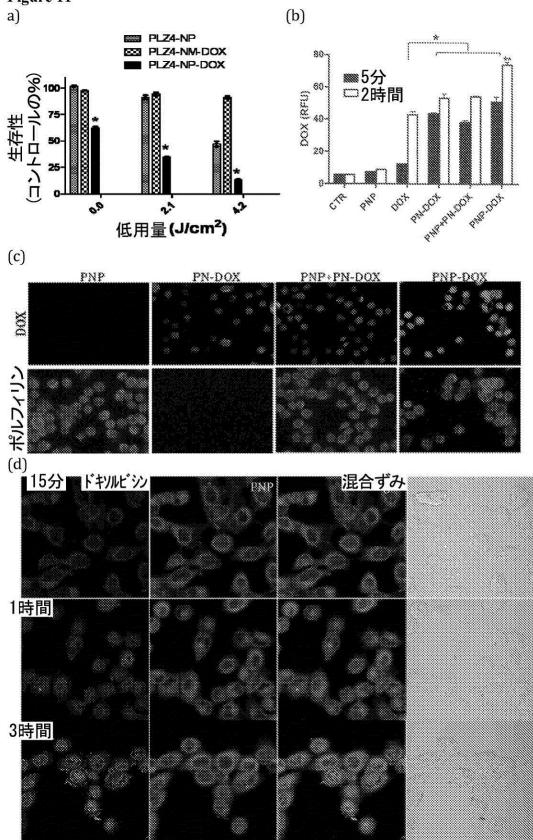
【図10】

Figure 10



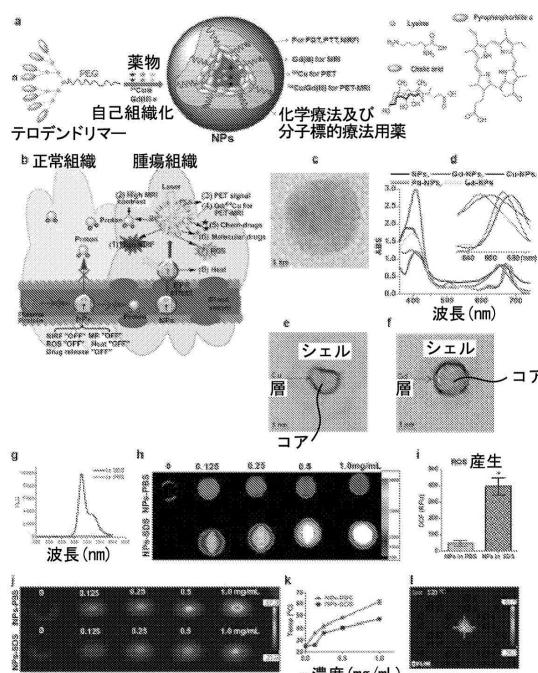
【図11】

Figure 11



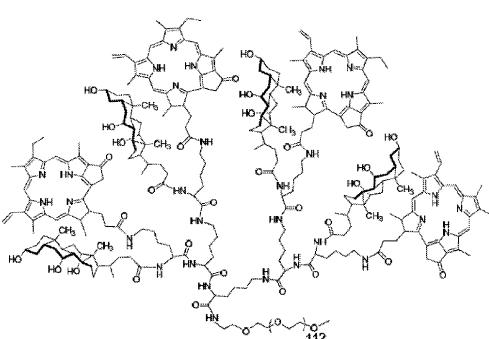
【図12】

Figure 12



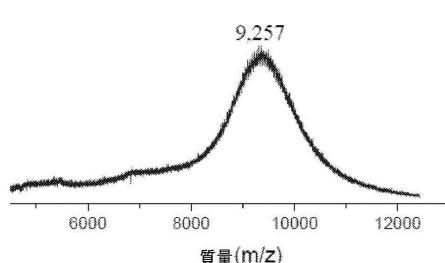
【図13】

Figure 13



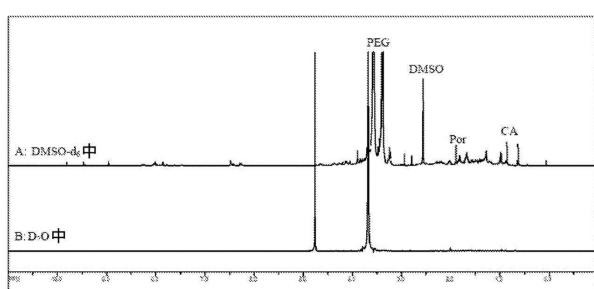
【図14】

Figure 14



【図15】

Figure 15



【図17】

Figure 17

A. PBS中のNPs

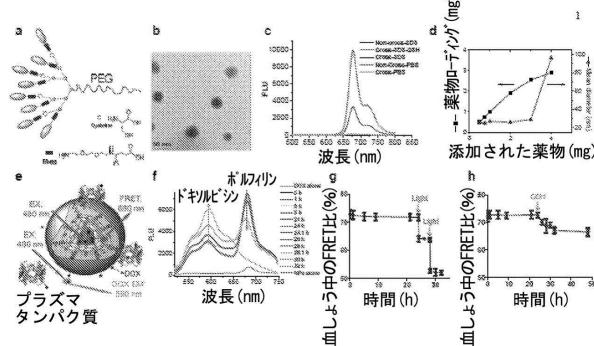


B. SDS中のNPs



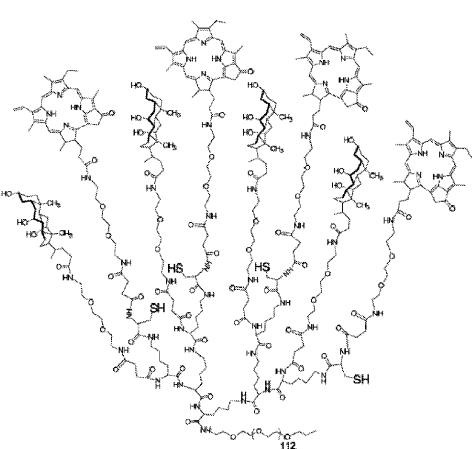
【図16】

Figure 16



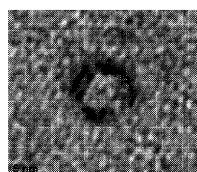
【図18】

Figure 18



【図19】

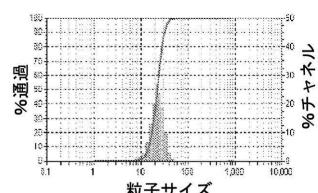
Figure 19



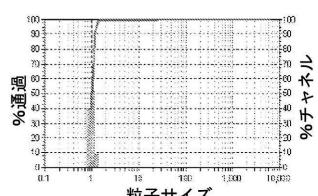
【図20】

Figure 20

A. PBS中のNPs

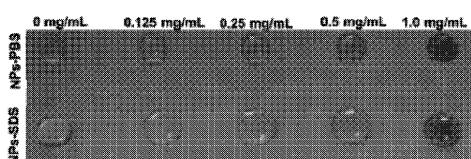


B. SDS中のNPs



【図21】

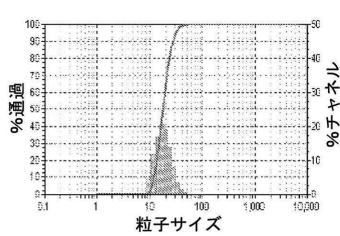
Figure 21



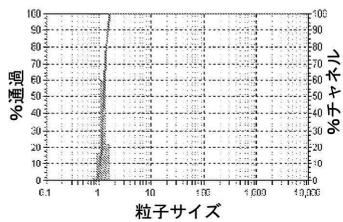
【図22】

Figure 22

A. PBS中のNM-POR

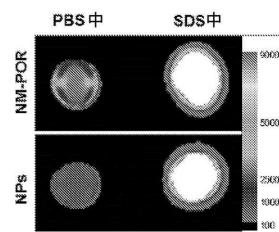


B. SDS中のNM-POR



【図23】

Figure 23



【図24】

Figure 24

A. PBS中のNM-POR



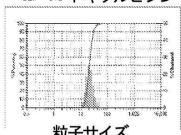
B. SDS中のNM-POR



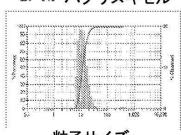
【図25】

Figure 25

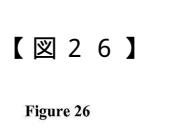
A. NP-ドキソルビシン



B. NP-パクリヌキセル



C. NP-ビンクリスチン



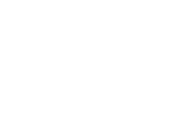
D. NP-ポルデソンブ



E. NP-ソラフェニブ

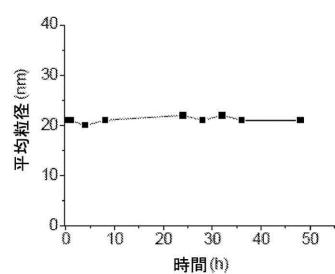


F. NP-17AAG



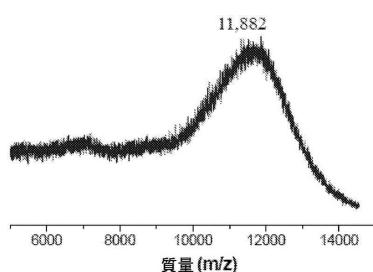
【図26】

Figure 26



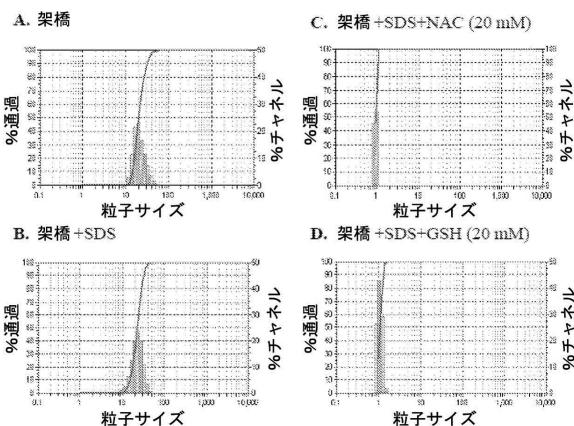
【図27】

Figure 27



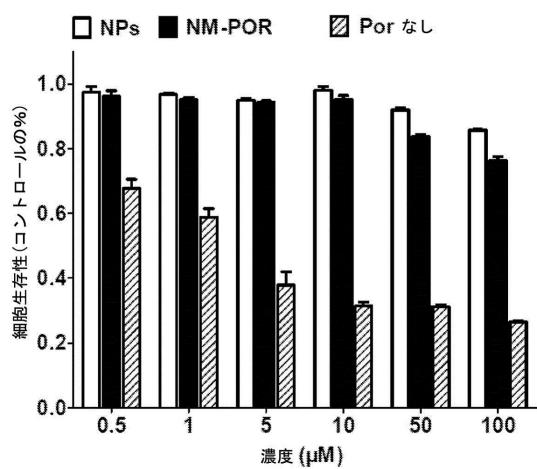
【図28】

Figure 28



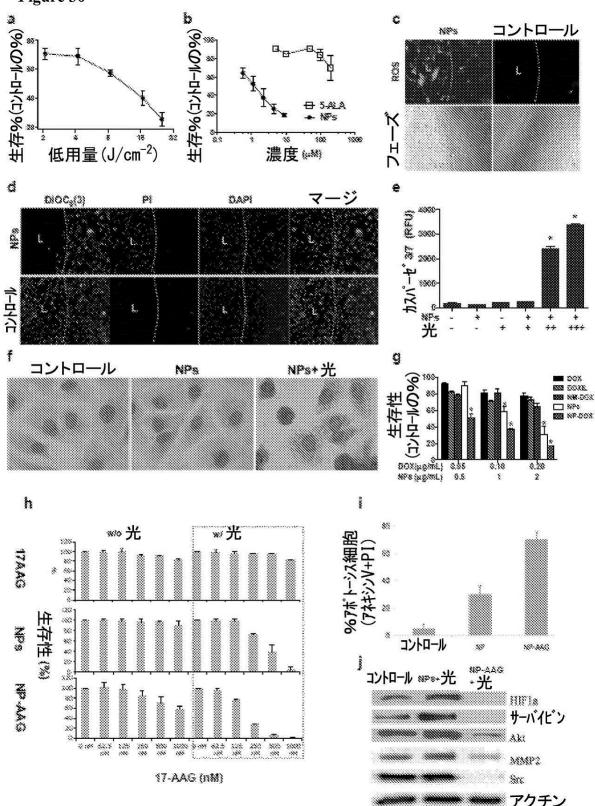
【図29】

Figure 29



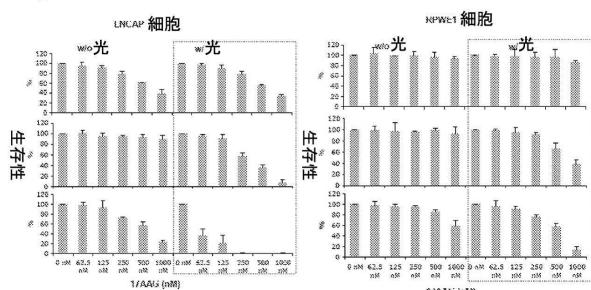
【図30】

Figure 30



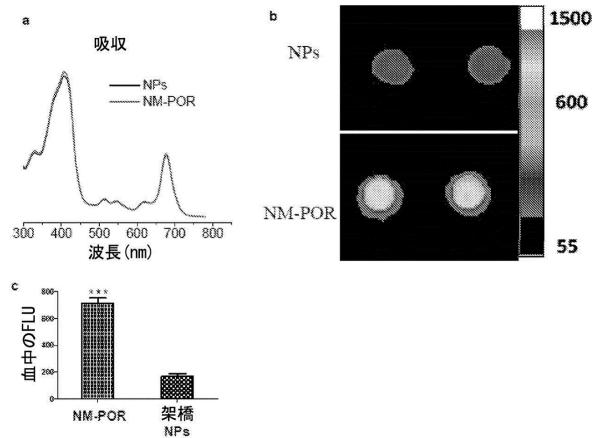
【図31】

Figure 31



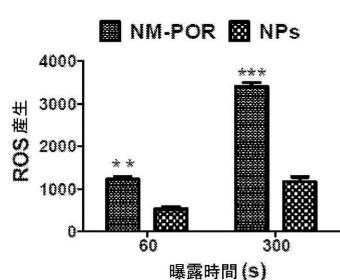
【図32】

Figure 32



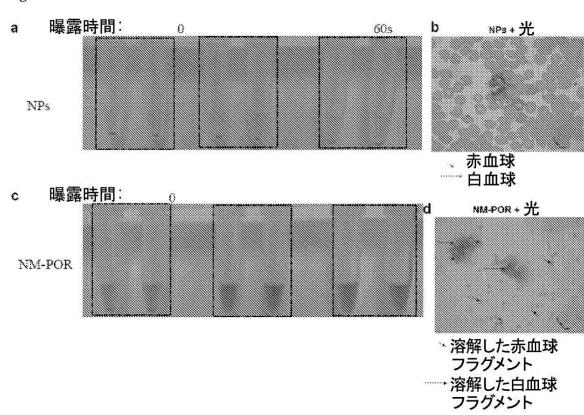
【図33】

Figure 33



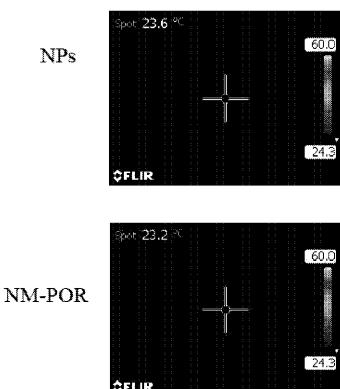
【図34】

Figure 34



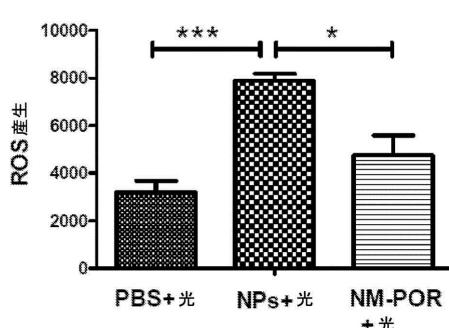
【図35】

Figure 35



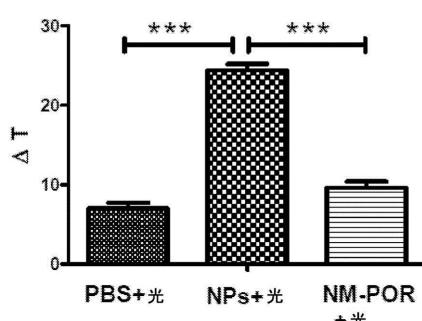
【図36】

Figure 36



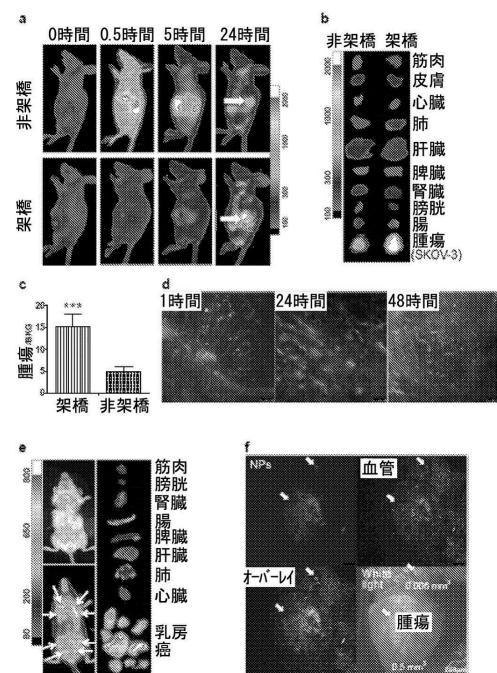
【図37】

Figure 37



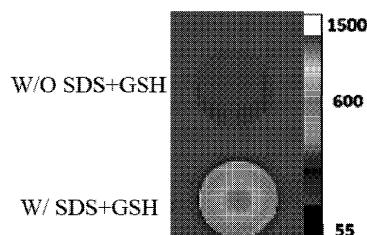
【図38】

Figure 38



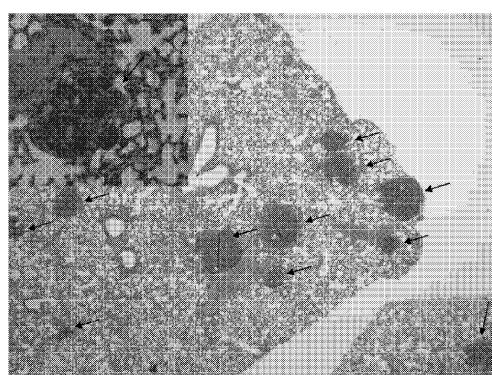
【図39】

Figure 39



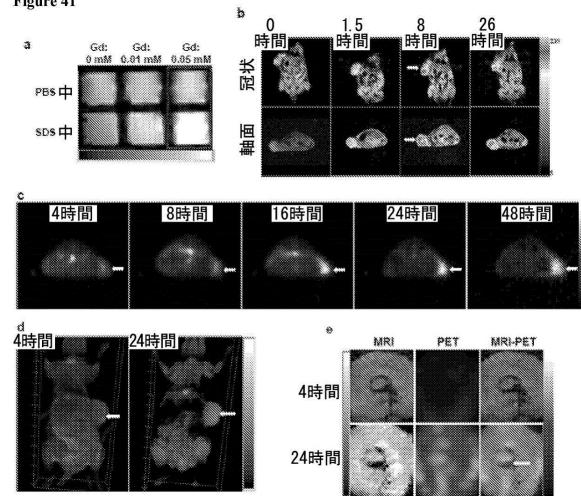
【図40】

Figure 40



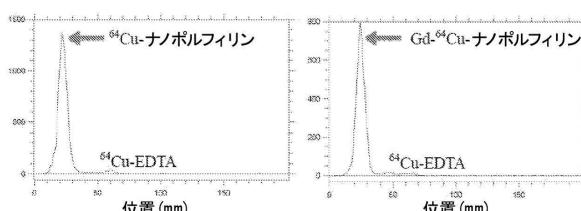
【図41】

Figure 41

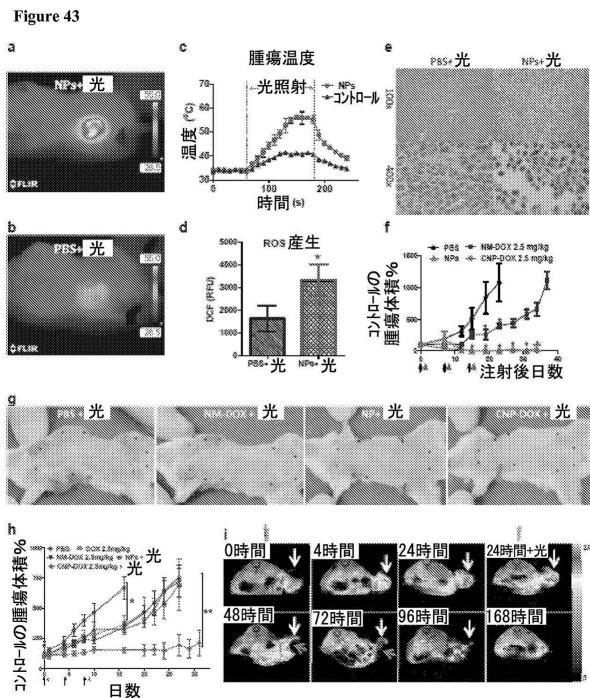


【図42】

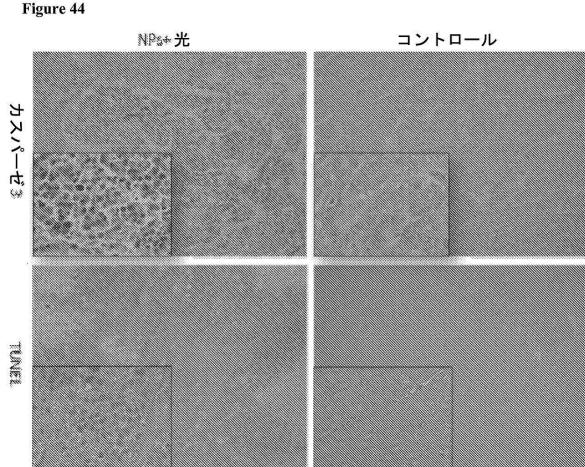
Figure 42



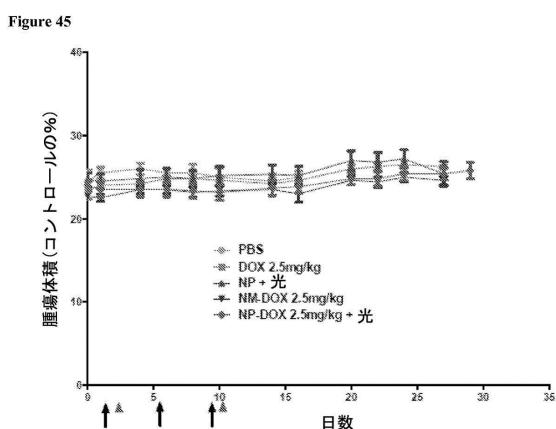
【図43】



【図44】



【図45】



フロントページの続き

(51) Int.CI.	F I
A 6 1 K 49/04 (2006.01)	A 6 1 K 49/04
A 6 1 K 31/704 (2006.01)	A 6 1 K 31/704
A 6 1 K 31/765 (2006.01)	A 6 1 K 31/765
C 0 7 D 487/22 (2006.01)	C 0 7 D 487/22

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100134784

弁理士 中村 和美

(72)発明者 キット エス . ラム

アメリカ合衆国, カリフォルニア 95618, デイビス, アリーナ ドライブ 1524

(72)発明者 ユエンペイ リー

アメリカ合衆国, カリフォルニア 95757, エルク グローブ, ネスリング サークル 99
44

(72)発明者 チョーンシエン パン

アメリカ合衆国, カリフォルニア 95618, デイビス, カルダー コート 2607

審査官 前田 憲彦

(56)参考文献 特表2012-503603 (JP, A)

国際公開第2012/158622 (WO, A1)

特開2005-255810 (JP, A)

米国特許出願公開第2005/0281777 (US, A1)

米国特許出願公開第2003/0073679 (US, A1)

米国特許出願公開第2012/0253191 (US, A1)

国際公開第2012/126115 (WO, A1)

Chemistry of Materials, 2007年, 19(23), p.5557-5562

(58)調査した分野(Int.CI., DB名)

C 0 7 D 4 8 7 / 0 0

A 6 1 K 3 1 / 0 0

A 6 1 K 4 1 / 0 0

A 6 1 K 4 7 / 0 0

A 6 1 K 4 9 / 0 0

C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)