

氏名	伊藤 千尋
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博士甲 第 号
学位授与の日付	2025年3月10日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	ヘモグロビン-アルブミンクラスターを基盤としたドキソルビン および一酸化炭素ナノ共輸送体の創製と有用性評価
論文審査委員	（主査）教授 松元 一明（博士（薬学）） （副査）教授 登美 斉俊（博士（薬学）） 専任講師 中澤 洋介（博士（薬学））
慶應義塾大学学位規程第11条に基づく審査委員会実施日： 2025年 1月 31日	

論文内容の要旨

1. 研究背景

医療技術の発展に伴いがんの奏効率は上昇しているが、がん治療後の後遺症や合併症が問題視されている。特に抗がん剤が誘発する心血管疾患は、患者の生活の質の低下や予後不良を左右する重要な因子の1つである。今日のがん化学療法で汎用されているドキソルビン (DOX) は、強力な抗腫瘍効果を有する一方で、重篤な副作用として用量依存かつ不可逆的な心毒性を惹起する。現時点において有効な DOX 誘発心毒性の予防法および治療法は存在せず、治療中に心毒性を発症すると DOX によるがん化学療法の中断を余儀なくされる。そのため、DOX 誘発心毒性の発現を未然に防ぐことが DOX によるがん治療の成功率の向上につながる。

これまでに、DOX 誘発心毒性の発現を減らす方策として、高分子物質やナノ粒子が腫瘍部位に集積しやすい Enhanced permeability and retention (EPR) 効果の概念に基づき、リポソームやアルブミンを利用した DOX 製剤の創製がなされてきた。実際に、DOX のリポソーム製剤である Doxil®や酸感受性ヒドラゾンリンカーを介して生体内アルブミンに結合する Aldoxorubicin (ALDOX) が開発され、これらの製剤は DOX と同等の有効性を維持したまま心毒性を軽減することが示されている。しかし、このようなキャリアや DOX 誘導体を利用した製剤であっても、投与された DOX の全量を腫瘍部位に送達させることは不可能であり、少なからず心毒性を含む臓器傷害を引き起こす。そのため、近年では臓器保護剤を DOX と併用するアプローチに関する基礎研究が行われ、DOX が惹起する細胞毒性 (臓器傷害) を全身的に抑制する可能性が示されている。

そこで本研究では、抗酸化作用をはじめ様々な細胞保護作用を有する一酸化炭素 (CO) を細胞保護剤として着目し、CO と DOX を共輸送する新規 DOX 製剤の創製を行い、副作用の発現を軽減した DOX 製剤を開発することを目的とした。本目的を達成するために、まず、CO と DOX のデュアルデリバリーシステムとしてヘモグロビンの分子表面を平均 3 分子のアルブミンで被覆したヘモグロビン-アルブミンクラスター (HA) のヘモグロビンとアルブミンに CO と DOX をそれぞれ担持させた DOX 担持ヘモ

グロビン-アルブミンクラスターCO 体 (CO-HA-DOX) を2つの創製アプローチにより設計・作製した。次に、有効性と忍容性(安全性)を兼ね備えた新規 DOX 製剤としての有用性を *in vitro* および *in vivo* で評価した。以下に得られた知見を総括する。

2. 結果と考察・展望

2-1. CO-HA-DOX の作製および有用性評価

抗腫瘍効果と安全性を向上させる CO-HA と DOX の結合アプローチとして、腫瘍部位特異的に DOX が HA から放出されることが理想的である。近年、エネルギー代謝経路の違いによりがん微小環境は低 pH であることを利用した酸応答性抗がん剤は、腫瘍選択的な薬物放出により副作用を軽減させる創薬戦略として期待されている。なかでも、ALDOX は構造中にヒドラゾン結合と末端にマレイミド基を有し、生体内アルブミンの遊離システイン (Cys-34) に共有結合するアルブミン-ヒッチハイク型酸応答性 DOX プロドラッグ製剤として開発され、非臨床および臨床試験において優れた抗腫瘍効果と安全性を示している。また、マレイミド化合物を含むアルブミン結合分子は *in vivo* において生体内アルブミンを利用するヒッチハイク型よりも、あらかじめアルブミン複合体として投与することで腫瘍ターゲティング能が向上して高い抗腫瘍効果を示すことが実証されている。このような背景から、腫瘍送達性・選択性に富んだ安全性と有効性の高い DOX 製剤として HA のヘモグロビンに細胞保護効果を有する CO を、分子表面のアルブミンに酸応答性を示す ALDOX を共有結合させた CO-HA-DOX を設計し、合成した。CO-HA-DOX の製剤特性を評価した結果、CO-HA-DOX は約 12 nm の負に帯電した粒子であり EPR 効果による腫瘍集積性が期待できることが示された。また CO-HA-DOX はヘモグロビン CO 体にアルブミンと DOX がそれぞれ平均 3 分子結合していた。さらに CO-HA-DOX は酸応答的に DOX および CO を放出し、低 pH 環境である腫瘍部位において DOX を放出することが期待された。次に、2 次元培養した 8 種類のがん細胞を用いて細胞毒性を評価した結果、CO-HA-DOX はいずれのがん細胞においても用量依存的な細胞増殖抑制効果を示したが、その効果は DOX の約 1/7~1/15 であった。さらに、生体内の腫瘍環境を模倣した 3 次元培養がん細胞スフェロイドに対して、CO-HA-DOX は濃度依存的にスフェロイドの増大および生細胞数を反映する酸性ホスファターゼの活性を抑制した。興味深いことに、2 次元培養細胞試験の結果と比べて、3 次元培養細胞試験における CO-HA-DOX と DOX の有効性の差は小さかった。これは、CO-HA-DOX は酸性環境であるがんスフェロイドの中心部に浸透し、DOX を効率的に放出することでがん細胞への殺細胞効果が強まったことに起因すると考えられる。さらに共焦点レーザー顕微鏡における DOX およびアルブミンの細胞内局在観察とフローサイトメトリーによる DOX の細胞内取り込み評価の結果から、CO-HA-DOX の大部分の DOX は細胞外で解離して細胞内に取り込まれ、一部の DOX は CO-HA-DOX として細胞内に取り込まれた後に放出されると考えられた。続いて、Colon-26 細胞皮下移植モデルマウスを用いて *in vivo* 抗腫瘍効果を検討したところ、CO-HA-DOX は DOX が有効性を示さない DOX 等量で腫瘍体積の増加を抑制した。腫瘍集積性の評価において CO-HA-DOX は DOX の約 5.5 倍の DOX 由来蛍光が腫瘍部位に検出されたことから、CO-HA-DOX の優れた DOX 送達性が *in vivo* における高い抗腫瘍効果に繋がったと考えられた。加えて、健常マウスにおける CO-HA-DOX の生体適合性評価におい

て、白血球数および血小板数の減少が認められたが、その他の項目 (体重、生化学パラメータ、組織形態) に異常は認められなかった。元来、HA は人工酸素運搬体として開発され、*in vivo* において優れた生体適合性を有することが明らかになっているため、CO-HA-DOX 投与による血液毒性は DOX の細胞毒性に由来すると考えられる。最後に、CO-HA-DOX 由来 CO の心筋細胞保護作用を *in vitro* において DOX に CO-HA を併用することで検討した結果、DOX による心筋細胞の萎縮を抑制した。さらに *in vivo* において DOX 投与により惹起された心筋傷害マーカー (CK-MB および LDH) の上昇は CO-HA の併用により抑制され、CO-HA によって供給される CO は心保護に寄与することが示された。

よって、CO-HA-DOX は腫瘍への効率的な DOX 送達性および CO 共輸送による心保護効果を発揮し、有効性および安全性の高い新規 DOX 製剤として利用できることを実証した。

2-2. ヒト血清アルブミンのリガンド結合能を利用した改良型 CO-HA-DOX の作製と有用性評価

「2-1. CO-HA-DOX の作製および有用性評価」の項では、HA を輸送担体として用いた CO と DOX の共輸送は抗腫瘍効果を損なうことなく DOX 誘発心毒性を抑制する概念実証を得た。しかし、Lot 間で同一仕様の (DOX 結合数が同じ) CO-HA-DOX を調製するためには厳格かつ煩雑な調製 (結合) 過程の制御が必要である上に、リンカー修飾による疎水性の増大により CO-HA への DOX 結合数に限界があった。ゆえに、HA を基盤とした実用的な CO と DOX の共輸送体を実現するためには、CO-HA に多量の DOX を簡便に担持できる手法の確立が望まれる。本研究では、One-pot で調製かつ高率に薬物を搭載可能な CO-HA と DOX の新たな結合様式として、アルブミンのリガンド (脂肪酸) 結合能に着目した。アルブミンには脂肪酸結合サイトが 7-9 か所存在し、脂肪酸の炭素鎖長や不飽和度によりその結合数や結合親和性は異なることが知られている。近年ではアルブミンと脂肪酸の高親和性を利用し、薬物を脂肪酸に結合しプロドラッグ化することで体内動態の改善を図った製剤の開発が盛んに行われており、一部の製剤 (Levemir[®], Aristada[®]) が実用化されている。そこで、CO-HA に One-pot で高率に DOX を担持可能な調製を実現するため、5 種類の飽和脂肪酸 (カプリン酸 (C10)、ラウリン酸 (C12)、ミリスチン酸 (C14)、パルミチン酸 (C16)、ステアリン酸 (C18)) を用いて飽和脂肪酸-DOX 誘導体 (C10-DOX、C12-DOX、C14-DOX、C16-DOX、C18-DOX) を合成し、脱脂 CO-HA (脱脂アルブミンで作製した CO-HA) の脂肪酸結合サイトを介して担持させた改良型 CO-HA-DOX を調製した。全ての飽和脂肪酸-DOX 誘導体において添加量に比例して脱脂 CO-HA に対する DOX の結合数は増加し、修飾後においても脱脂 CO-HA と比較して粒子径の増大はみられなかった。また炭素鎖長の短い C10-DOX や C12-DOX では経日的に DOX 結合数が減少し、クラスターとの結合が不安定であることが示された。5 種類の飽和脂肪酸-DOX 誘導体の中でも、C18-DOX を用いて調製した改良型 CO-HA-DOX は、クラスター1 分子に対し DOX が平均 6 分子結合した約 10 nm の負に帯電したナノ粒子であり、作製後 1 週間において最も安定に C18-DOX を担持していた。そのため、C18-DOX を用いて調製した改良型 CO-HA-DOX の構造評価と有効性評価を行った。改良型 CO-HA-DOX は脱脂 CO-HA と同等の製剤特性を有し、37℃におい

て低 pH 応答的に緩徐な DOX 放出性を示した。一方で、生体環境に近い pH 7.4 ではほとんど DOX を放出しなかった。次に、2 次元および 3 次元培養したがん細胞を用いて改良型 CO-HA-DOX の殺細胞効果を検討したところ、改良型 CO-HA-DOX の殺細胞効果は DOX より低かった。これは、改良型 CO-HA-DOX では酸性条件 (pH 5.5) で緩徐に DOX を放出するため、生体内 pH (約 7.4) に制御された細胞培養培地中では十分な DOX が放出されずに有効性が発揮できなかったためと推察される。一方、Colon-26 細胞皮下移植モデルマウスにおける *in vivo* 有効性試験では、改良型 CO-HA-DOX は DOX と同等の抗腫瘍効果を示し、腫瘍増大を劇的に抑制した。この結果は、改良型 CO-HA-DOX は、優れた生体適合性や血中滞留性 (半減期: 18 時間) を有する CO-HA をキャリアとして用いるため、EPR 効果を介して腫瘍へ DOX を効率的に送達したためと考えられる。実際に投与 24 時間後の臓器分布評価において、多くの改良型 CO-HA-DOX が血中に残存し、腫瘍部位では DOX と比較して約 5 倍の DOX が分布していた。さらに改良型 CO-HA-DOX は肝臓、腎臓、肺に高い分布がみられた。これは、肝臓、腎臓、肺に高発現している脂肪酸輸送タンパク質により C18-DOX が捕捉されたことに起因すると考えられた。また、DOX 投与により上昇する心機能マーカー (CK-MB) は、改良型 CO-HA-DOX 投与時には抑制された。さらに DOX 投与群では顕著な体重減少が観察されたのに対し、改良型 CO-HA-DOX 投与群では一過性の体重減少がみられたが、観察期間終了時 (投与開始 14 日後) までに投与開始前の体重まで回復した。これらの結果から、改良型 CO-HA-DOX は DOX 誘発心毒性を抑制する DOX 製剤であることが示された。

よって、脂肪酸結合サイトを利用して調製した改良型 CO-HA-DOX は優れた有効性と安全性を両立した新規 DOX 製剤として期待できる。

以上、本研究では、ヘモグロビンをアルブミンで被覆した HA に CO と DOX を担持させた新規 DOX 製剤の創製とその臨床応用に向けた基盤情報の構築を行った。まず、CO-HA の分子表面に酸応答性 DOX プロドラッグ (ALDOX) を共有結合した CO-HA-DOX を作製し、CO と DOX の共輸送の有用性の概念実証を得た。次に共有結合型 CO-HA-DOX の検討で明らかになった CO-HA-DOX のデメリットであるクラスターに対する DOX 担持数の制限と結合過程の煩雑さを克服すべく、アルブミンのリガンド (脂肪酸) 結合能を利用した One-pot 調製で多くの DOX (酸応答性飽和脂肪酸-DOX 誘導体) を担持した改良型 CO-HA-DOX の調製手法を確立し、改良型 CO-HA-DOX は有効性と安全性を兼ね備えた新規 DOX 製剤であることを示した。本結果は有効性と忍容性を有する新規 DOX 製剤を提示するだけでなく、CO と毒性の高い薬剤を共輸送することで臓器保護効果を付与したドラッグデリバリー製剤開発の新たなアプローチも提示しており、今後、様々な疾患治療薬開発への応用が期待される。

論文審査結果の要旨

1. 審査概要及び判定結果

2025年1月31日に実施された審査委員会では、まず申請者が約25分間のプレゼンテーションを行い、その後約50分の質疑応答を行なった。最後に、申請者が退出して、審査委員による協議を行った。

審査委員からの「2次元培養がん細胞と比較して、3次元培養がん細胞に対する有効性が高いのはpHが関与しているのか。スフェロイド内部のpHはどれくらいなのか。」という質問に対し、申請者は「*in vitro* 放出試験において酸性条件下(pH 5.5)のDOX放出性が高い共有結合型CO-HA-DOXはColon-26スフェロイドに対する抗腫瘍効果が高いことから、スフェロイド内部のpHが関与している可能性がある。また、スフェロイド内部は低酸素・低栄養環境であることが報告されているため、がん細胞の栄養源となるアルブミンを含むCO-HA-DOXは容易に細胞内へ取り込まれた結果、2次元培養がん細胞毒性試験の結果と比較して高い有効性を示した可能性が考えられる。なお、スフェロイド内部のpHを明示した報告はないが、生理条件(pH 7.4)よりも低いことが予想される。」と回答した。

審査委員からの「CO-HA-DOXはDOXと比較して血漿中では60倍のDOX由来蛍光が観察されている一方で、腫瘍では5.5倍のDOX由来蛍光が観察されている。CO-HA-DOXの組織移行性が低いのではないのか。」という質問に対し、申請者は「本検討では投与後24時間における臓器分布のみを観察しているため、動態特性が異なるDOXとCO-HA-DOXの臓器移行性を比較することは難しい。薬物動態試験においてCO-HA-DOX投与後の経時的な臓器および血漿中DOX濃度を測定し、K_p値や腫瘍組織内AUCから組織移行性を総合的に評価する必要があると考えられる。」と回答した。

審査委員からの「CO-HA-DOXはDOXと比較して腫瘍部位に高いDOX由来蛍光が観察されているが、これは腫瘍集積性、血中滞留性のどちらによる影響が大きいのか。」という質問に対し、申請者は「CO-HA-DOXは腫瘍集積性、血中滞留性のいずれの影響も受けた結果、腫瘍部位の高いDOX由来蛍光の検出につながったと考えられる。CO-HA-DOXを製剤設計するとき用いた1つの概念であるEPR効果は、血管透過性が亢進し、リンパ系が未発達である腫瘍組織においてナノサイズの高分子が腫瘍部位に集積しやすい現象であり、血中滞留性の高い物質が腫瘍に集積しやすいとされている。そのため、血中滞留性が高いCO-HA-DOXはEPR効果の影響を大きく受け、腫瘍組織への送達性や集積性が向上したと考えられる。」と回答した。

審査委員からの「改良型CO-HA-DOXの*in vivo*安全性評価において、DOX投与群ではCK-MBの上昇はみられないのか。」という質問に対し、申請者は「本検討ではDOX投与群においてControl群と比較してCK-MBの上昇はみられなかった。しかし今回の検討では、採血時の手技の問題でControl群の血漿に溶血が見られ、血漿中ヘモグロビンの影響によりControl群のCK-MBの比色定量値が高く検出され、DOX投与群との差が表れなかった可能性がある。審査までには間に合わなかったが、現在、再実験を行っている。」と回答した。公聴会までに実施した再検討において、溶血していないControl群の血漿中CK-MBを測定した結果、DOX投与群と比較して低値を示すことを確認した。

審査委員からの「ALDOXはどのような製剤か。CO-HA-DOXとALDOXを比較した

際の違いは何か。」という質問に対し、申請者は「ALDOX は末端のマレイミド基が生体内アルブミンの遊離システイン (Cys-34) に共有結合することで DOX の血中滞留性を改善した DOX プロドラッグ製剤である。本研究では、CO-HA-DOX と ALDOX を直接比較した検討は実施していないが、マレイミド化合物を含むアルブミン結合分子は、*in vivo* において生体内アルブミンを利用するヒッチハイク型よりも、あらかじめアルブミンに複合体として結合させて投与することで腫瘍ターゲティング能が向上することが報告されている (Um W et al., *Bioconjug. Chem.* **2019**)。そのため CO-HA-DOX は ALDOX と比較して高い腫瘍送達性を示すと考えられる。また CO-HA-DOX は ALDOX と細胞保護効果を有する CO を共輸送しているため、ALDOX 単体で投与するよりも強力な臓器保護効果 (心毒性発現の抑制) を示す可能性がある。」と回答した。

審査委員からの「CO はがん細胞に対しどのような効果をもたらすのか。」という質問に対し、申請者は「これまでに、CO の抗腫瘍メカニズムは腫瘍代謝制御に起因することが報告されている。一方で、CO ががん細胞保護効果を示すことも報告されている。そのため、CO のがん細胞に対する作用機序の詳細は不明な点が多く、CO ががん細胞に対し殺細胞的もしくは細胞保護的のいずれに働くかは未だ議論が行われている。本研究において、CO-HA 由来 CO の抗腫瘍効果に与える影響を検討し、CO-HA は DOX の殺細胞効果に影響を与えなかったことから、CO-HA-DOX 由来の CO はがん細胞には作用を及ぼさないと考えている。これは CO-HA の CO 濃度が、がん細胞に薬理効果を示す閾値に達しなかったことに起因すると考えられる。」と回答した。

審査委員からの「共有結合理型 CO-HA-DOX と改良型 CO-HA-DOX はどちらが良いのか。臓器分布の評価において様々な臓器に分布していない共有結合理型 CO-HA-DOX の方が優れているのではないか。」という質問に対し、申請者は「共有結合理型 CO-HA-DOX と改良型 CO-HA-DOX を直接比較した検討は行っていないため分からない。*In vivo* 有効性評価において、改良型 CO-HA-DOX は共有結合理型 CO-HA-DOX では達成できなかった有意な抗腫瘍効果を実現したことは、臨床で使用する観点から考えると、改良型 CO-HA-DOX が共有結合理型 CO-HA-DOX より優れていると評価するに値すると考える。さらに改良型 CO-HA-DOX は DOX 投与で懸念される心毒性を含む臓器傷害や体重減少を抑制できるため、投与回数を増やすことによりさらなる抗腫瘍効果も期待できる。また、NCI-N87 細胞皮下移植モデルマウスにおける臓器分布評価において、改良型 CO-HA-DOX 投与後 48 時間における腫瘍部位の DOX 蛍光強度は、投与後 24 時間の結果とほとんど変化がなかった一方で、他の臓器では投与後 48 時間時点で腫瘍部位よりも低い DOX 蛍光強度を示した。加えて、改良型 CO-HA-DOX では肝臓の他に腎臓や肺への高い DOX 分布がみられたものの、*in vivo* 安全性評価において顕著な臓器傷害を示さなかった。これらの事実に加えて、改良型 CO-HA-DOX の酸応答的な DOX 放出性を鑑みると、腫瘍部位以外低 pH 環境ではない臓器へ送達された改良型 CO-HA-DOX は DOX を解離せずに、再度血流に乗り持続的に CO-HA-DOX が腫瘍に送達されている可能性が考えられる。よって改良型 CO-HA-DOX は共有結合理型 CO-HA-DOX と比較して、有効性や安全性、DOX 送達性の観点において優れていると考えられる。」と回答した。

審査委員からの「CO-HA-DOX の臓器分布の評価において、摘出した臓器を用いて蛍光強度を評価しているが、IVIS の利点である全身画像を用いて生きた状態で集積を評価すべきではないか。」という質問に対し、申請者は「*in vivo* イメージングによる評価

も検討したが、DOX の蛍光波長が低波長であるため、自家蛍光によるバックグラウンドとの差をつけることが難しかった。また、DOX の蛍光波長では深部臓器の蛍光を検出することは出来なかった。そのため、*in vivo* イメージングは断念し、*ex vivo* における臓器分布評価を実施した。」と回答した。

審査委員からの「CO-HA-DOX はどのように腫瘍内もしくはがん細胞に取り込まれているのか。」という質問に対し、申請者は「ヒト乳がん細胞(MCF-7細胞)を用いたCO-HA-DOX の細胞内局在および取り込み実験の結果より、大部分が細胞外でクラスターからDOX が解離して受動拡散により細胞内へ取り込まれ、一部のDOX はクラスターに結合した状態(CO-HA-DOX)で細胞内へ取り込まれていると考えられる。また *in vivo* では、分子表面にアルブミンを有するCO-HA-DOX は腫瘍微小環境中のアルブミンレセプター(gp60)やアルブミン結合タンパク質(SPARC)を介して腫瘍微小環境を突破していると考えられる。」と回答した。

審査委員からの「がん細胞の pH はどれくらいか。細胞内・細胞外のどちらの酸性環境に依存してDOX を放出しているのか。」という質問に対し、申請者は「一般的にがん細胞では、解糖系の亢進によりがん細胞外へプロトンが排出されるため、がん細胞外が正常細胞と比較して酸性であることが知られている。がん細胞の pH は明確には明らかになっていないが、pH 5.5~7 と幅があること、酸性度はがん細胞種により異なることが報告されている。」と回答した。

審査委員からの「本研究では、飽和脂肪酸-DOX 誘導体を用いて改良型 CO-HA-DOX を作製しているが、不飽和脂肪酸-DOX 誘導体を検討しなかった理由は何か。」という質問に対し、申請者は「炭素数 18 の不飽和度が異なる脂肪酸(ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸)を用いて合成した脂肪酸-DOX 誘導体のうち、飽和脂肪酸であるステアリン酸-DOX 誘導体はアルブミンナノ粒子との安定性が最も高く、疎水性が高い不飽和脂肪酸-DOX 誘導体を用いたアルブミンナノ粒子は凝集しやすいことが報告されている(Yang Y et al., *Nano Lett.* 2023)。そのため、本研究では X 線結晶構造解析により脂肪酸結合サイトが明らかになっている炭素数 10~18 の飽和脂肪酸を用いた飽和脂肪酸-DOX 誘導体に焦点をあてて検討した。」と回答した。

本研究は、HA を基盤とした CO と DOX のデュアルデリバリーシステムを確立し、CO と DOX の共輸送の有用性について、新たな知見を提供した。本結果は有効性と忍容性を有する新規 DOX 製剤を提示するだけでなく、CO と毒性の高い薬剤を共輸送することで臓器保護効果を付与したドラッグデリバリー製剤開発の新たなアプローチも提示しており、今後、様々な疾患治療薬開発への応用が期待される。

申請者は、審査会における質問やコメントに対して、丁寧且つ適切に回答しており、本研究およびその関連領域に対する知識と理解は、概ね満足できるものであった。

以上より、申請者は博士(薬学)学位に十分値するものと評価された。

論文目録

Chihiro Ito, Kazuaki Taguchi, Taiga Yamada, Kengo Hanaya, Yuki Enoki, Takeshi Sugai, Teruyuki Komatsu, Kazuaki Matsumoto. Dual delivery of carbon monoxide and doxorubicin using haemoglobin-albumin cluster: proof of concept for well-tolerated cancer therapy. *Journal of Materials Chemistry B.*, 12(23), 5600-5608. (2024).