

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6836510号  
(P6836510)

(45) 発行日 令和3年3月3日(2021.3.3)

(24) 登録日 令和3年2月9日(2021.2.9)

(51) Int.Cl.	F 1
A 61 K 47/24	(2006.01)
A 61 K 47/28	(2006.01)
A 61 K 47/30	(2006.01)
A 61 K 9/14	(2006.01)
A 61 K 33/00	(2006.01)
	A 61 K 47/24
	A 61 K 47/28
	A 61 K 47/30
	A 61 K 9/14
	A 61 K 33/00

請求項の数 11 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-546034 (P2017-546034)	(73) 特許権者	520061804 キュラディグム・エスアエス C U R A D I G M S A S フランス国、エフー 75012 パリ、リ ュ・ドゥ・ワティニー 60
(86) (22) 出願日	平成27年11月24日 (2015.11.24)	(74) 代理人	110001508 特許業務法人 津国
(65) 公表番号	特表2018-504450 (P2018-504450A)	(72) 発明者	ジェルマン, マチュー フランス国、エフー 94500 シャンピ ニ・シュル・マルヌ、アヴニュ・マルク ス・ドルモワ 3、アントレ・4
(43) 公表日	平成30年2月15日 (2018.2.15)	(72) 発明者	メイル, マリーエディット フランス国、エフー 94160 サン・マ ンデ、スクワール・ニュンジェセ 3
(86) 國際出願番号	PCT/EP2015/077446		
(87) 國際公開番号	W02016/083343		
(87) 國際公開日	平成28年6月2日 (2016.6.2)		
審査請求日	平成30年11月21日 (2018.11.21)		
(31) 優先権主張番号	14306874.0		
(32) 優先日	平成26年11月25日 (2014.11.25)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	歐州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】少なくとも2つの異なるナノ粒子と医薬化合物とを組み合わせた医薬組成物、その調製及び使用

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

(i) 少なくとも2つの別個の生体適合性脂質系及び/又はポリマー系ナノ粒子と(ii) 少なくとも1つの医薬化合物との組み合わせに特徴付けられる治療的又は予防的方法用の医薬であって、該少なくとも2つの生体適合性ナノ粒子各々の最長の寸法が4nmと500nmとの間であり、第1の生体適合性ナノ粒子の表面電荷が負でありかつ-10mV未満であり、そして、第2の生体適合性ナノ粒子又は任意の更なる生体適合性ナノ粒子の表面電荷が負でありかつ該第1の生体適合性ナノ粒子の負の表面電荷に対して少なくとも10mVの差を有し、該方法が、該少なくとも1つの医薬化合物を被験体に投与する工程と、該少なくとも2つの別個の生体適合性ナノ粒子を投与する別個の工程とを含み、該少なくとも2つの別個の生体適合性ナノ粒子が、該少なくとも1つの医薬化合物とは別々に、該少なくとも1つの医薬化合物の前の5分超~24時間との間で該被験体に投与され、そして、該生体適合性ナノ粒子が医薬化合物としては用いられない、医薬。

## 【請求項2】

前記少なくとも2つの別個の生体適合性ナノ粒子が、前記医薬化合物を必要としている前記被験体に、更なる別個の工程で別々に、又は同時に投与されるべきものである、請求項1記載の医薬。

## 【請求項3】

前記少なくとも2つの生体適合性ナノ粒子が、前記医薬化合物を必要としている被験体に別々に又は同時に、及び該医薬化合物の前の5分超~24時間との間

で、投与される、請求項 1 又は 2 記載の医薬。

【請求項 4】

前記少なくとも 2 つのナノ粒子各々が、更に、生体適合性コーティングで覆われている、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載の医薬。

【請求項 5】

前記少なくとも 1 つの医薬化合物の標準的な治療用量によってもたらされる治療上の有益性及び毒性と比較した場合、前記少なくとも 2 つの生体適合性ナノ粒子と該少なくとも 1 つの医薬化合物との併用投与が、前記被験体に対して、低減される毒性について該少なくとも 1 つの医薬化合物の治療上の有益性を維持するか、或いは同等の又は低減される毒性について該少なくとも 1 つの医薬化合物の治療上の有益性を増大する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項記載の医薬。 10

【請求項 6】

前記少なくとも 1 つの医薬化合物の標準的な治療用量と比較した場合、前記少なくとも 2 つの生体適合性ナノ粒子と該少なくとも 1 つの医薬化合物との併用投与が、該投与される少なくとも 1 つの医薬化合物の治療用量を少なくとも 10 % 低減することを可能しつつも、前記被験体に対して、同等の毒性又は低減される毒性について同じ治療上の有益性を維持するか、或いは、該被験体に対して、同等の又は低減される毒性について治療上の有益性を増大する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項記載の医薬。

【請求項 7】

前記少なくとも 2 つのナノ粒子が、前記少なくとも 1 つの医薬化合物を必要としている被験体にそれらを投与した後、1 時間 ~ 6 週間以内に、それが投与された該被験体から消失する、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項記載の医薬。 20

【請求項 8】

前記少なくとも 1 つの医薬化合物が、生物学的な化合物、低分子の標的化した治療薬、腫瘍溶解性ウイルス及び細胞傷害性化合物から選択される有機化合物である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項記載の医薬。

【請求項 9】

前記少なくとも 1 つの医薬化合物が、抗体、オリゴヌクレオチド及び合成ペプチドから選択される、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項記載の医薬。

【請求項 10】

前記少なくとも 1 つの医薬化合物が、金属のナノ粒子、金属酸化物のナノ粒子、金属硫化物のナノ粒子及びこれらの任意の混合物から選択される無機化合物である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項記載の医薬。 30

【請求項 11】

前記少なくとも 1 つの医薬化合物が、担体に封入されているか又は担体に結合されている、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項記載の医薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

発明の分野

本発明は、(i) 少なくとも 2 つの別個の生体適合性ナノ粒子と (ii) 少なくとも 1 つの目的の化合物（典型的には、少なくとも 1 つの医薬化合物）との組み合わせを含む、そのような少なくとも 1 つの目的の化合物を必要としている被験体に投与されるための医薬組成物であって、当該少なくとも 2 つの別個の生体適合性ナノ粒子が、当該目的の化合物の効率を高める、医薬組成物に関する。 40

【0 0 0 2】

少なくとも 2 つの生体適合性ナノ粒子は、被験体に逐次的に又は同時に投与されるが、少なくとも 1 つの目的の化合物とは別々に、典型的には、約 5 分超と約 72 時間との間の間隔で、好ましくは当該少なくとも 1 つの目的の化合物を当該被験体に投与する前に、投与される。 50

**【0003】**

少なくとも2つの生体適合性ナノ粒子の最長の寸法は、典型的には、約4nmと約500nmとの間である。第1の生体適合性ナノ粒子の表面電荷の絶対値は、少なくとも10mV( | 10mV | )であり、そして、第2の生体適合性ナノ粒子又は任意の更なる生体適合性ナノ粒子の表面電荷の絶対値は、当該第1の生体適合性ナノ粒子の表面電荷の絶対値と少なくとも10mVの差を有する。

**【0004】**

少なくとも1つの目的の化合物と一緒に少なくとも2つの別個の生体適合性ナノ粒子を被験体に併用(典型的には、逐次的に)投与は、標準的な医薬用量で投与した際に当該少なくとも1つの化合物によってもたらされる医薬上の有益性及び毒性と比較した場合、当該被験体においてその低減される毒性について当該少なくとも1つの目的の化合物の医薬上の(即ち、治療上の、予防上の又は診断上の)有益性を維持するか、或いは同等の又は低減される毒性についてその医薬上の有益性を増大する。

10

**【0005】**

本発明の医薬組成物は、典型的には、少なくとも1つの目的の化合物における標準的な医薬用量と比較した場合、投与される当該化合物の医薬用量を少なくとも10%低減することを可能にしつつも、被験体に対して、同等の毒性(好ましくは低減される毒性)について同じ医薬上の有益性を維持するか、或いは、被験体に対して、同等の又は低減される毒性について医薬上の有益性を増大する。

**【背景技術】**

20

**【0006】****背景**

安全性及び有効性を確保するために、治療上の化合物は、それを必要としている被験体において、最適な速度でその標的部位に選択的に送達されることが要求される。

**【0007】**

薬物動態(pK)は、生物に対して外部から投与される物質の成り行きの決定を扱う薬理学の一分野である。この決定は、十分に長い時間にわたって、好ましくは化合物が排出されるまで、全ての主要な組織における化合物の濃度を測定する工程を含む。薬物動態は、生物内におけるその吸収及び分布の機構、並びにその化学的变化を含む、インビボにおける化合物の挙動を合理的に説明することが必要とされる。生体が化合物をどのように処理するかを定量的に説明するキーとなるpKパラメータを得るために、血液中のpKプロファイルを様々なプログラムを用いてフィッティングできる。重要なパラメータは、最高濃度(C<sub>max</sub>)、半減期(t<sub>1/2</sub>)、クリアランス、曲線下面積(AUC)及び平均滞留時間(MRT)(即ち、化合物が生物内に留まる平均時間)を含む。化合物製剤の血液循環の延長が観察された場合、それは、通常、t<sub>1/2</sub>の増加、クリアランスの減少、AUCの増加及びMRTの増加に関連している。pKデータは、多くの場合、最小限の副作用で治療の効率を向上させるために、望ましい血中濃度を維持するための最適な用量及び投与計画の決定において用いられる。更に、当業者に周知であるとおり、化合物の血中濃度は、ほとんどの場合(典型的には、遊離型薬物について)、その有効性及び毒性の両方と相関している。

30

**【0008】**

40

治療上の及び予防上の化合物の物理化学的特性は、体内におけるその薬物動態的な及び代謝的な末路に対して重要な影響を有する。したがって、適切な物理化学的特性を選択することは、このような化合物を設計する場合にキーとなる。しかし、当該化合物は、常に生物自体によって内因的に提供される訳ではなく、通常、外部から投与されるため、その所望の薬理学的作用に適合(好ましくは最適化)させるため、その体内分布プロファイルを最適化しなければならない。

**【0009】**

その標的部位への化合物の送達を最適化するために幾つかのアプローチが研究されている。ストラテジーは、その血中半減期を延長し、その結果、標的部位へのその蓄積を増強するためのステルス特性を有する治療上の化合物を設計するものである。1つの好都合な

50

アプローチは、治療上の化合物にポリエチレングリコール(PEG)を共有結合させることであり、これは、循環している化合物のインビボにおける半減期( $t_{1/2}$ )を増加させることができが証明されており、インビボにおける半減期の増加レベルは、化合物の性質及びコーティングの性質に部分的に依存して変動する。また、被験体の体内におけるその体内分布プロファイルを改変することによって薬物の治療上の有効性を増強するために、リポソーム、エマルジョン又はミセル等の薬物担体が開発されている。

#### 【0010】

しかし、治療上の化合物の体内分布における選択性の欠如は、依然として懸念事項である。現在のところ、不良な薬物動態及び高い毒性が、治療上の化合物の開発における失敗の大きな原因である。

10

#### 【0011】

例として、ガンの処置の状況においては、ガン細胞を死滅させるために生体の必須機能を意図的に阻害することによって、正常細胞において毒性が生じ、そして、臨床医は、可能な処置域を見出すために、用量反応、及び腫瘍と正常組織との間の治療上の化合物の分布の差を当てにしなければならない。注目すべきことに、肝毒性は、依然として、肝臓における薬物誘発性の細胞傷害の直接的及び間接的機構に起因して、医薬の開発及び臨床使用から薬物を撤退させる主な理由となっている。

#### 【0012】

薬物担体等のナノ粒子状の化合物について提案されたアプローチ(非特許文献1)は、デコイの担体を予め注入して細網内皮系(RES)の貪食能を低減させ、飽和させ又は不活にさえすることである。また、障害又は遮断は、オプソニン分子の血漿レベルの減少に関連し得る。試験粒子を投与する前に、特定の剤、例えば、脂肪酸のアルキルエステル、硫酸デキストラン、希土類元素の塩(例えば、 $GdCl_3$ )、薬物担体(空であるか又はクロドロン酸が封入されているかのいずれか)を静脈内投与すると、クッパー細胞の取り込みにおいて中程度~劇的な低減をもたらすことが示されている。

20

#### 【0013】

例えば、非特許文献2の著者らは、彼らのナノ粒子「CREKA-SPIO」のクリアランスにおけるRESの役割を報告した。最初の実験では、静脈内(IV)注射された「CREKA-SPIO」ナノ粒子が、MDA-MB-435乳ガン異種移植片において有効に蓄積されないことを示した。対照的に、RES組織において高濃度の粒子がみられた。リポソーム性のクロドロン酸により肝臓内のRESマクロファージを枯渇させることによって、それらの粒子の半減期が5倍延長されることを、彼らは見出した。しかし、クロドロン酸の剤は、肝臓由来の及び脾臓由来のマクロファージのアポトーシスを誘導し、そして、これは、マクロファージの枯渇が免疫抑制及び感染に関連するリスクを増大させるので、全体的に有害であると考えられる。第2の実験では、著者らは、酸化鉄及びNi(II)が類似の血漿オプソニンを誘引し、したがって、Ni-リポソームが全身循環においてそれらを枯渇させ得ると仮定して、有望なデコイ粒子としてキレート化したNi(II)でコーティングされたリポソームについて試験した。実際、静脈内(IV)注射されたNi-リポソームは、CREKA-SPIOナノ粒子を注射する5分前又は48時間前に投与しようと、ナノ粒子の血中半減期を5倍増加させることを可能にする。しかし、腫瘍マウスにおいて死亡を引き起こす高い毒性が観察された。Ni-リポソームの代わりにプレーンリポソームについても試験した。しかし、Ni-リポソームと比較した場合、毒性は低減するが、プレーンリポソームは、それよりもはるかに効果が低かった。実際、血中半減期は、約2倍しか増加しなかった。

30

#### 【0014】

特許文献1は、典型的には、超音波に又はX線に曝露する状況、或いは磁気共鳴画像法(MRI)の状況、並びに治療の状況において、被験体における標的部位に所望の剤を選択的に投与する方法に関する。記載された当該方法の目的は、デコイ不活性担体の同時投与により具体的に投与される剤の総用量を低減しながら、目的の剤の効率を改善し又は維持することである。

40

#### 【0015】

50

記載された当該発明は、確率ベース (probability-based) のアプローチを使用する。標的化した目的の剤によってRES系の回避を促し、それによって所望の部位における目的の剤の取り込みを改善することを可能とするために、類似の物理的特徴を示す標的化した目的の剤（「活性組成物」中に存在）と共に標的化していない不活性な剤（「不活性担体」）を共投与 (co-administrated)（即ち、「実質的に同時に」）する。このアプローチによって、目的の剤への患者の曝露が少なくなり、そして、結果として、目的の剤の投与量当たりのコストが低くなる。活性組成物及びデコイ不活性担体は、互いから 5 分以内に（好ましくは互いから 2 分以内に）又はそれよりも短くでさえ投与される。このアプローチは、所望の場所を標的とするビヒクルの存在下で供給された場合、大過剰の非標的化「担体」又は「デコイ」ビヒクルの存在と、過剰のこのデコイ担体と標的化された目的の剤 10 とが細網内皮系による取り込みについて競合する確率と、に依拠している。RESによって捕捉される粒子の半減期は、用量依存性である（即ち、粒子の循環半減期は、投与量が増加するにつれて増加する）。高い投与量に関連するクリアランスの遅さは、投与される目的の剤の用量を減少させることを可能とする、剤全体の高濃度での維持に好都合であると考えられる。言い換えれば、その全体的な高い投与量に起因する剤全体の半減期の増加は、特許文献 1 の著者らによれば、標的化した剤にとって有益であるはずである。このアプローチが必要とする要件は、それぞれの組成がどのようなものであろうと、RESにおけるそのクリアランス特性に関して、活性剤及び不活性剤が似たように挙動することである。

#### 【 0 0 1 6 】

このアプローチでは、血中に存在する剤の全体量を増加させ、そして、その結果として、血中半減期を延長させるために、不活性剤及び活性剤の準同時 (quasi-concomitant) 注射が要求される。確率ベースのアプローチに明確に依拠するこのようなストラテジーは、不活性剤に勝る利点を活性剤に付与することによって標的部位におけるその良好な蓄積を達成するために、活性剤と標的化した剤との会合が必ず要求される。更に、準同時注射に起因して、活性組成物の目的の用途に応じた不活性担体の具体的な設計が要求され得る。 20

#### 【 0 0 1 7 】

特許文献 2 は、気体が充填されたマイクロビシクル（典型的には、少なくとも 0 . 5  $\mu$ m のサイズを有する）とマイクロビシクルに会合する成分（約 1 0 0 nm 未満のサイズを有する）とを含む集合体に関する。得られた集合体は、診断的に及び / 又は治療的に活性な製剤において医薬の活性成分として使用される。2 つの成分（即ち、気体が充填されたマイクロビシクルとマイクロビシクルに会合する成分）は、典型的には、標的化した超音波イメージングを含む超音波造影イメージング、超音波によって媒介される (ultrasound-mediated) 薬物送達及び他のイメージング技術の分野において、イメージングを増強するために、同時に投与される。 30

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

#### 【 0 0 1 8 】

【特許文献 1】国際公開第 2 0 0 5 / 0 8 6 6 3 9 号

【特許文献 2】国際公開第 2 0 0 5 / 0 6 3 3 0 5 号

40

#### 【非特許文献】

#### 【 0 0 1 9 】

【非特許文献 1】Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems. 1994, 11(1) :31-59

【非特許文献 2】Biomimetic amplification of nanoparticle homing to tumors, PNAS 2007

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【 0 0 2 0 】

先行技術から明らかなるとおり、そして、長期の医療上の必要性にもかかわらず、その許

50

容できない毒性に又はその不都合な薬物動態パラメータに起因して患者において効果的に使用することができない化合物（治療上の、予防上の及び診断上の化合物を含む）の改良は、依然として懸念事項である。

【課題を解決するための手段】

【0021】

詳細な説明

本発明は、治療の、予防の又は診断の状況におけるその（それらの）意図された用途が何である、目的の化合物（本明細書中では単に「化合物」とも特定される）又は目的の化合物の組み合わせの効率を最適化することを、ここに可能とする。（i）少なくとも2つの別個の生体適合性ナノ粒子と（ii）少なくとも1つの目的の化合物（典型的には、少なくとも1つの医薬化合物（即ち、治療上の、予防上の又は診断上の化合物））との組み合わせである本明細書中に記載の組成物は、当該少なくとも1つの目的の化合物の薬物動態パラメータを最適化し、そして、その結果として、例えばその許容できない毒性が原因で他の方法では開発することができなかつたであろう治療上の化合物の開発を、ここに可能にする。典型的には、当該生体適合性ナノ粒子は、例えば、医薬化合物等として（即ち、治療上の、予防上の又は診断上の化合物として）は用いられない。

10

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】化合物のサイズ（最長の寸法）に応じた、血液循環から治療上の化合物を除去するため可能となる経路の概略的な図。

20

【図2】MDA-MB-231-LucD3H2LN異種移植片における（i）実施例2の少なくとも2つの生体適合性ナノ粒子と（ii）Dox-NP（登録商標）とを含む医薬組成物の処置スケジュールの略図。

【図3】L-グルタミン酸N-（3-カルボキシ-1-オキソプロピル）-1,5-ジヘキサデシルエステル（SA-脂質）の化学式。

【発明を実施するための形態】

【0023】

本発明の典型的な組成物（本明細書中では、一般的に「医薬組成物」と特定される）は、（i）少なくとも2つの別個の生体適合性ナノ粒子と（ii）少なくとも1つの化合物（「目的の化合物」）との組み合わせを含む組成物であって、当該少なくとも2つの生体適合性ナノ粒子各自の最長の又は最大の寸法が、典型的には、約4nmと約500nmとの間であり、第1の生体適合性ナノ粒子（本明細書中では「第1の」生体適合性ナノ粒子とも特定される）の表面電荷の絶対値が、少なくとも10mV（±10mV）であり、そして、第2の生体適合性ナノ粒子（本明細書中では「第2の」生体適合性ナノ粒子とも特定される）又は任意の更なる生体適合性ナノ粒子の表面電荷の絶対値が、当該第1の生体適合性ナノ粒子の表面電荷の絶対値と少なくとも10mVの差を有する、組成物である。

30

【0024】

典型的には、（少なくとも2つの異なる）生体適合性ナノ粒子と目的の化合物との比は、0.1/1と1000/1との間又は0.5/1と1000/1との間、好ましくは0.5/1と500/1との間、更により好ましくは0.5/1と300/1との間である。

40

【0025】

用語「約」と「およそ」とは、値（例えば、ナノ粒子のサイズ又は時間の間隔等）に関連する場合、示された値との差異（それは、当業者に小さな差異であると理解されるであろう）が、それが関連する対象事項（subject-matter）の特性に実質的に影響を与える、そして、対象事項が、依然として請求項に係る発明の精神内にあることを示す。

【0026】

本発明の好ましい目的は、（i）少なくとも2つの別個の生体適合性ナノ粒子の及び（ii）少なくとも1つの医薬化合物の組み合わせを含む医薬組成物であって、当該少なくとも2つの生体適合性ナノ粒子各自の最長の又は最大の寸法が約4nmと約500nmとの間で

50

あり、第1の生体適合性ナノ粒子の表面電荷の絶対値が少なくとも10mV( | 10mV | )であり、そして、第2の生体適合性ナノ粒子又は任意の更なる生体適合性ナノ粒子の表面電荷の絶対値が、当該第1の生体適合性ナノ粒子の表面電荷の絶対値と少なくとも10mVの差を有し、当該組成物が、当該少なくとも1つの医薬化合物を必要としている被験体への当該少なくとも1つの医薬化合物の投与とは別々に(典型的には、5分超と約72時間と間の間隔で)、当該被験体に当該少なくとも2つの別個の生体適合性ナノ粒子を投与するために使用されるものであり、そして、当該生体適合性ナノ粒子が医薬化合物等としては用いられない、医薬組成物である。

## 【0027】

少なくとも1つの化合物の標準的な医薬用量によってもたらされる医薬上の有益性及び毒性と比較した場合、本発明の組成物を通じた、少なくとも2つの別個の生体適合性ナノ粒子の及び当該少なくとも1つの目的の化合物の被験体への併用投与は、典型的には、当該被験体に対して、その低減される毒性について当該少なくとも1つの化合物の同じ医薬上の(即ち、治療上の、予防上の又は診断上の)有益性を可能にする(維持する)か、或いは、当該被験体に対して、その同等の又は低減される毒性(好ましくは低減される毒性)について当該少なくとも1つの化合物の医薬上の有益性を増大する。

10

## 【0028】

本発明の医薬組成物は、典型的には、化合物の標準的な医薬用量と比較した場合、当該投与される少なくとも1つの医薬(即ち、治療上の、予防上の又は診断上の)化合物の用量を少なくとも10%、好ましくは少なくとも15%低減することを可能にしつつも、(i)被験体に対して、同等の毒性(好ましくは低減される毒性)について同じ医薬上の有益性を維持するか、或いは、(ii)当該被験体に対して、同等の毒性又は低減される毒性について医薬上の有益性を増大する。

20

## 【0029】

粒子の形状は、その「生体適合性」に影響を及ぼし得るため、かなり均質な形状を有する粒子が本明細書中では好ましい。したがって、薬物動態的な理由から、本質的に球形の/円形の又は卵形の形状であるナノ粒子が好ましい。また、このような形状は、ナノ粒子が細胞と相互作用したり、又は細胞に取り込まれたりするのに好都合である。球形の/円形の形状が特に好ましい。

## 【0030】

30

本発明の要旨において、用語「ナノ粒子」とは、ナノメートル範囲のサイズ、典型的には、約1nmと約500nmとの間、好ましくは約4nmと約500nmとの間、約4と約400nmとの間、約30nmと約300nmとの間、約20nmと約300nmとの間、約10nmと約300nmとの間、例えば、約4nmと約100nmとの間、例えば、約10nmと、15nmと又は20nmと約100nmとの間、或いは約100nmと約500nmとの間、典型的には、約100nmと約300nmとの間を有する生成物、特に、合成生成物を指す。

## 【0031】

用語「ナノ粒子のサイズ」、「ナノ粒子の最大サイズ」及び「ナノ粒子の最長サイズ」とは、本明細書中では、典型的には球形の/円形の又は卵形の形状である場合、「ナノ粒子の最長の又は最大の寸法」又は「ナノ粒子の直径」を指す。透過型電子顕微鏡(TEM)又はCryo-TEMは、ナノ粒子のサイズを測定するために使用され得る。同様に、動的光散乱法(DLS)は、溶液中のナノ粒子の流体力学的直径(hydrodynamic diameter)を測定するために使用され得る。これら2つの方法は、更に、サイズを確認するために、DLSによって測定されたナノ粒子の流体力学的直径と、TEM又はCryo-TEMによって測定されたナノ粒子のサイズとを比較するように交互に使用され得る。好ましい方法は、DLS(International Standard ISO22412 Particle Size Analysis - Dynamic Light Scattering, International Organisation for Standardisation (ISO) 2008を参照)である。

40

## 【0032】

本発明の状況において使用可能するために、「第1の」生体適合性ナノ粒子における絶対的な静電気の表面電荷(electrostatic surface charge)(本明細書中では「電荷」

50

又は「表面電荷」とも特定される)は少なくとも|10mV|(絶対値)(好ましくはこれよりも高く)であり、そして、「第2の」生体適合性ナノ粒子又は任意の更なる生体適合性ナノ粒子の表面電荷の値は、当該「第1の」生体適合性ナノ粒子の表面電荷の絶対値と少なくとも10mVの差を有していなければならない。ナノ粒子の表面電荷は、典型的には、ナノ粒子濃度0.2と10g/Lとの間で、pH6と8との間で、そして、典型的には水性媒体中の電解質濃度0.001と0.2Mとの間(例えば、0.01M又は0.15M)で、水性媒体中におけるゼータ電位測定によって決定される。

#### 【0033】

典型的には、本発明の「第1の」生体適合性ナノ粒子は、少なくとも|10mV|(即ち、-10mV未満又は+10mVを超える)、例えば、-12mVと又は-15mVと-20mVとの間未満の、或いは+12mVと又は+15mVと+20mVとの間を超える(典型的には、-15mV未満又は+15mVを超える)静電気の表面電荷を有する。「第2の」生体適合性ナノ粒子又は任意の更なる生体適合性ナノ粒子は、当該第1の生体適合性ナノ粒子の表面電荷の絶対値と少なくとも10mVの(正の又は負の)差を有する。好ましくは、本発明の「第1の」生体適合性ナノ粒子は、10mVを超える電子の表面電荷の絶対値(「表面電荷の絶対値」)を有し、当該電荷は、更により好ましくは、負電荷である。

#### 【0034】

少なくとも2つの別個の生体適合性ナノ粒子における複合特性、サイズ及び表面電荷によって、当該少なくとも2つの異なるナノ粒子の血液循環を短縮することを可能にする。したがって、本発明の少なくとも2つの別個の生体適合性ナノ粒子及び目的の化合物を逐次的に投与することによって、当該少なくとも2つの別個の生体適合性ナノ粒子と当該目的の化合物との共循環(co-circulation)が無くなること又は限定的な共循環が達成される。したがって、当該少なくとも1つの化合物の標準的な医薬用量によってもたらされる医薬上の有益性及び毒性と比較した場合、当該少なくとも2つの別個の生体適合性ナノ粒子における複合特性、サイズ及び表面電荷は、当該目的の化合物を安全に使用することを可能にしつつも、被験体に対して、その低減される毒性について当該少なくとも1つの化合物の同じ医薬上の(即ち、治療上の、予防上の又は診断上の)有益性を可能する(維持する)か、或いは、言い換えれば、当該被験体に対して、その同等の又は低減される毒性(好ましくは低減される毒性)について当該少なくとも1つの化合物の医薬上の有益性を増大する。

#### 【0035】

本発明の状況において使用可能な少なくとも2つの生体適合性ナノ粒子は全て、有機物又は無機物のいずれかであり得る。更に、有機ナノ粒子と無機ナノ粒子との混合物を、少なくとも2つの生体適合性粒子として使用し得る。

#### 【0036】

有機物の場合、本発明の医薬組成物中に存在するナノ粒子は、固体-脂質(solid-lipid)ナノ粒子等の脂質系ナノ粒子(グリセロ脂質、リン脂質、ステロール脂質等)、タンパク質系ナノ粒子(本明細書中では「タンパク質-ナノ粒子」とも特定される)(例えば、アルブミン)、ポリマー系ナノ粒子(「ポリマー性ナノ粒子」)、コポリマー系ナノ粒子(「コポリマー性ナノ粒子」)、炭素系ナノ粒子、ウイルス様ナノ粒子(例えば、ウイルスベクター)又はこれらの混合物であり得る。

#### 【0037】

有機ナノ粒子は、更に、ナノスフィア(ブレーンナノ粒子)又はナノカプセル(中空(hollow)ナノ粒子)(例えば、リポソーム、ゲル、ヒドロゲル、ミセル、デンドリマー等)であり得る。本明細書中に記載の有機ナノ粒子の混合物も用いられ得る。

#### 【0038】

ポリマー又はコポリマーは、天然の又は合成の由来であり得る。

#### 【0039】

有機ナノ粒子を調製するために本発明の状況において使用可能な合成の(人工の)及び天然のポリマー又はコポリマーの例は、ポリ乳酸(PLA)、ポリ(ラクチド-コ-グリコ

10

20

30

40

50

ール)酸(PLGA)、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリグラクチン、ポリラクチド、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、ポリプロピレングリコール、ポリソルベート、ポリビニルアルコール、ポリアクリルアミド、ポリメタクリル酸メチル、ポリシアノアクリル酸アルキル、ポリ乳酸-コ-グリコール酸、ポリ(アミドアミン)、ポリ(エチレンイミン)、アルギン酸塩、セルロース及びセルロース誘導体のポリマー、コラーゲン、ヒアルロン酸、ポリグルタミン酸(PGA)、アクチン、多糖並びにゼラチンから選択され得る。

【0040】

無機物の場合、そして、その最長の寸法が、典型的には、約10nm未満、例えば、約8nm未満、約7nm未満(典型的には、約7nmと約4nmとの間(例えば、約6nm未満、約5nm未満又は約4nm未満)を含む)である場合、ナノ粒子は、任意の無機材料からできていよい。無機材料は、例えば、ラントニドを含む、メンデレーエフの周期律表の3、4、5、6族に由来する金属元素を含み得る。ナノ粒子の最長の寸法が、典型的には、約10nm未満である場合、ナノ粒子は、集合してより大きな構造になり得る。より大きな構造になるナノ粒子の集合は、典型的には、ナノ粒子と生体適合性ポリマー、タンパク質等との間の相互作用によって誘発され得る。また、より大きな構造は、担体中(典型的には、ゼラチン構造(本明細書中では「ゼラチンナノ粒子」とも特定される)等のプレーン担体又はリポソーム等の中空担体)にナノ粒子を捕捉することによって得られ得る。インビボにおける投与後、これらより大きな構造は、更に、ナノ粒子を放出し得る。

【0041】

無機物である場合、及びナノ粒子の最長の寸法が、典型的には少なくとも10nm(典型的には、10と500nmとの間)である場合、ナノ粒子は、(i)例えば、Mg、Ca、Ba及びSrから選択される1つ以上の二価の金属元素、(ii)例えば、Fe及びAlから選択される1つ以上の三価の金属元素、並びに(iii)Siを含む1つ以上の四価の金属元素、のうちの少なくとも1つを含み得るか、又は、これらであり得る。

【0042】

特定の実施態様において、ナノ粒子の無機材料は、(i)例えば、Mg、Ca、Ba及びSrから選択される1つ以上の二価の金属元素、(ii)例えば、Fe及びAlから選択される1つ以上の三価の金属元素、並びに(iii)Siを含む1つ以上の四価の金属元素から選択される。

【0043】

更なる特定の実施態様において、ナノ粒子の無機材料は、炭酸カルシウム( $CaCO_3$ )、炭酸マグネシウム( $MgCO_3$ )、水酸化マグネシウム( $Mg(OH)_2$ )、水酸化鉄( $Fe(OH)_2$ )、オキシ水酸化鉄( $FeOOH$ )、酸化鉄( $Fe_3O_4$ 又は $Fe_2O_3$ )、酸化アルミニウム( $Al_2O_3$ )、水酸化アルミニウム( $Al(OH)_3$ )、オキシ水酸化アルミニウム( $AlOOH$ )及び酸化ケイ素( $SiO_2$ )から選択される。

【0044】

本明細書中に記載の組成物において用いられるナノ粒子は、生体適合性である(即ち、生体組織と適合する)べきである。したがって、それらの組成物によって要求される場合、ナノ粒子は、使用可能するために、生体適合性材料でコーティングされる。したがって、本発明の特定の実施態様において、本明細書中で言及されるナノ粒子は生体適合性コーティングで覆われる。

【0045】

生体適合性材料は、生物学的な標的と相互作用が可能な剤であり得る。

【0046】

ナノ粒子の表面上に正電荷を形成する剤は、例えば、アミノプロピルトリエトキシシラン(aminopropyltriethoxsilane)又はポリリジンから選択され得る。ナノ粒子の表面上に負電荷を形成する剤は、例えば、リン酸塩(例えば、ポリリン酸塩、メタリン酸塩、ピロリン酸塩等)、カルボン酸塩(例えば、クエン酸塩又はジカルボン酸、特にコハク酸)又は硫酸塩から選択され得る。

【0047】

10

20

30

40

50

特定の実施態様において、「第1の」ナノ粒子の絶対的な電荷が少なくとも10mV( | 10mV | )であり、そして、第2の生体適合性ナノ粒子又は任意の更なる生体適合性ナノ粒子の表面電荷の絶対値が、当該第1の生体適合性ナノ粒子の表面電荷の絶対値と少なくとも10mVの差を有する限り、少なくとも2つの異なるナノ粒子は、立体基(steric group)を提示する剤から選択される生体適合性材料でコーティングされ得る。このような基は、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)；ポリエチレンオキシド；ポリビニルアルコール；ポリアクリラート；ポリアクリルアミド(ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド))；ポリカルバミド；バイオポリマー；多糖(例えば、デキストラン、キシラン及びセルロース)；コラーゲン；双性イオン性(switterionic)化合物(例えば、ポリスルホベタイン)；等から選択され得る。

10

【0048】

生体適合性コーティングは、更に、標識剤、典型的には、標準的なイメージング装置を用いて色の可視化を可能にする剤を含み得る。

【0049】

いかなる粒子も存在しないで少なくとも1つの目的の化合物の標準的な医薬(典型的には、治療)用量によってもたらされる医薬上の有益性及び毒性と比較した場合、少なくとも2つの別個の生体適合性ナノ粒子と当該少なくとも1つの目的の化合物とを合わせた併用投与は、典型的には、当該少なくとも1つの目的の化合物とは別々に(好ましくは、5分超と約72時間との間隔で)、当該少なくとも1つの目的の化合物を必要としている被験体に当該少なくとも2つのナノ粒子を(同時に又は別々に)投与した際に、当該被験体に対して、低減される毒性について当該目的の化合物の医薬上の有益性(即ち、治療上の、予防上の又は診断上の有益性)、典型的には、治療上の有益性を維持するか、或いは同等の又は低減される毒性について当該化合物の医薬上の有益性を増大する。

20

【0050】

特定の実施態様において、化合物の標準的な治療用量と比較した場合、少なくとも2つの別個の生体適合性ナノ粒子と当該少なくとも1つの目的の化合物との併用投与は、典型的には、当該少なくとも1つの目的の化合物とは別々に(典型的には、目的の化合物の前に又は後に(好ましくは前に)、5分超と約72時間との間の間隔で)、当該少なくとも1つの目的の化合物を必要としている被験体に投与した際に、当該投与される化合物の治療用量を少なくとも10%、好ましくは少なくとも15%低減することを可能にしつつも、当該被験体に対して、同等の毒性又は低減される毒性(好ましくは低減される毒性)について同じ治療上の有益性を維持するか、或いは、当該被験体に対して、当該化合物の同等の又は低減される毒性について治療上の有益性を増大する。

30

【0051】

特定の実施態様において、ナノ粒子は、幾つかの目的の化合物、典型的には、2つの目的の化合物と共に投与される。

【0052】

ナノ粒子は、目的の化合物を必要としている被験体にそれらを投与した後、典型的には、1時間～6週間以内(例えば、4週間)、1時間～1ヶ月間以内に(例えば、1時間と3週間との間、又は1時間と2週間との間、或いは1時間と1週間との間)、これが投与された被験体から好ましくは消失する。

40

【0053】

ナノ粒子(存在する場合、その生体適合性コーティングを含む)を構成する材料は、当該ナノ粒子の生体内持続性(biopersistence)の決定において重要である。ナノ粒子は、生分解性(例えば、PLGA又はPLA等の生分解性ポリマーによって構成される場合)、溶解性(例えば、酸化鉄)又は、非生分解性及び非溶解性であると考慮され得る。生分解性の及び溶解性のナノ粒子は、被験体からの迅速なナノ粒子のクリアランスを促進する。

【0054】

本明細書中に上述のとおり、少なくとも2つの別個の生体適合性ナノ粒子と組み合わせて投与される、少なくとも1つの目的の化合物としては(典型的には、少なくとも1つの

50

目的の医薬化合物として)、異なる分子又は剤が本教示により使用され得る。この化合物は、既に説明したとおり、治療上の、予防上の又は診断上の化合物であり得る。それは、有機化合物又は無機化合物であり得る。

#### 【0055】

目的の化合物として使用可能な有機化合物の例は、生物学的な化合物、抗体、オリゴヌクレオチド、合成ペプチド、低分子の標的化した治療薬、腫瘍溶解性ウイルス、細胞傷害性化合物、及びこれらの任意の対応するプロドラッグ又は誘導体等から選択され得る。

#### 【0056】

特定の実施態様において、本発明の状況において用いられる目的の化合物は、生物学的な化合物、低分子の標的化した治療薬、腫瘍溶解性ウイルス及び細胞傷害性化合物から好ましくは選択される有機化合物である。別の特定の実施態様において、当該目的の化合物は、抗体、オリゴヌクレオチド及び合成ペプチドから選択される。

10

#### 【0057】

生物学的な化合物は、例えば、抗体、抗体-薬物複合体、好ましくは、モノクローナル抗体（「mAb」）（例えば、インフリキシマブ、アダリムマブ、ベバシズマブ、リツキシマブ、トラスツズマブ、ラニビズマブ、セツキシマブ、パナチムマブ（panatimumab））；タンパク質又は組み換えタンパク質（例えば、エンブレル（エタネルセプト）又はインターフェロンベータ1a）；ペプチド又は組み換えペプチド（例えば、インスリングラルギン又はベータセロン）；ワクチン（例えば、プレブナー13又はガーダシル）；バイオシミラー（例えば、エポジン）；酵素又は組み換え酵素（例えば、リプレガル又はクレオン）；等である。

20

#### 【0058】

オリゴヌクレオチドは、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アプタマー（例えば、ミポメルセンナトリウム）又はプルゼニド等である。

#### 【0059】

合成の又は人工のペプチドは、例えば、酢酸グラチラマー又は酢酸ロイプロリドである。

#### 【0060】

腫瘍溶解性ウイルスは、正常組織に対して害を引き起こすことなく、ガン組織に選択的に感染し、損傷を与える治療的に有用なウイルスである。腫瘍溶解性ウイルスは、例えば、Onyx-015等のアデノウイルス、Catavak等のコクサッキーウイルス、タリモジーン・ラハーパレプベック（talimogene laherparepvec）等の単純ヘルペスウイルス、MV-CEA等の麻疹（maesla）ウイルス、ニューカッスル病ウイルス、パルボウイルス、ポリオウイルス、レオウイルス、セネカバレーウイルス、レトロウイルス、ワクチニア、水疱性口内炎ウイルスから選択される。

30

#### 【0061】

低分子の標的化した治療薬は、一般的に、悪性細胞内で変異しているか、過剰発現しているか、又は他の点で重要なタンパク質における酵素ドメイン（ガン処置の状況における有望な標的）を阻害する。幾つかの治療剤は、細胞分裂（例えば、オーロラキナーゼ阻害剤又はサイクリン依存性キナーゼ阻害剤）、並びに他の生物学的機構（例えば、タンパク質の代謝回転及びクロマチン修飾（例えば、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤））を標的とするものを含む。低分子の標的化した治療薬は、例えば、イマチニブ、ラパマイシン、ゲフィチニブ、エルロチニブ、ソラフェニブ、スニチニブ、ニロチニブ、ダサチニブ、ラパチニブ、ボルテゾミブ、アトルバスタチン等である。

40

#### 【0062】

細胞傷害性化合物は、例えば、DNA修飾剤（例えば、アントラサイクリン（例えば、ドキソルビシン、ダウノルビシン等））、アルキル化剤（例えば、メルファラン又はテモゾロミド）、並びに明確化された生理学的機構（例えば、微小管の重合（例えば、タキソール）又は代謝物の合成（例えば、メトトレキサート））を非常に正確に妨害する薬物である。活性化可能な細胞傷害性化合物は、典型的には、光線力学的療法（例えば、フォト

50

フリン)の状況において用いられ、そして、その治療効果を生じさせるためにレーザー光源等の外部源によって活性化される。他の典型的な細胞傷害性化合物は、典型的には、本明細書中に記載されている、又は熟練のガン専門医によって知られている化学療法剤から選択される。

【0063】

プロドラッグ(例えば、カペシタビン又はイリノテカン)は、インピボでその活性型に代謝されて、その期待される治療効果を生じる。

【0064】

少なくとも1つの目的の化合物として使用可能な無機化合物の例は、遷移金属の配位錯体、放射性医薬化合物、ナノ粒子等から選択され得る。

10

【0065】

遷移金属の配位錯体は、幅広い配位数及び配位構造、到達可能な酸化還元状態、配位子置換の熱力学的な及び反応速度論的な「調整能(tune-ability)」、並びに広範な構造多様性を含む、より一般的な有機系薬物に勝る有望な利点を提供する。金属系物質は、細胞の標的分子と相互作用して、生化学的機能に影響を与え、その結果、悪性細胞が破壊される。遷移金属の配位錯体は、典型的には、DNA構造に作用する細胞傷害性剤(例えば、白金の配位錯体;シスプラチニン、カルボプラチニン、オキサリプラチニン(oxaloplatin)又はルテニウム、或いは金の配位錯体)である。

【0066】

放射性医薬化合物は、診断目的のために又は悪性細胞を選択的に破壊するために、放射線を放射する。典型的な放射性医薬品は、例えば、ストロンチウム-89、タリウム-201、テクネチウム(techtentium)-99、サマリウム-83等を含み得る。

20

【0067】

ナノ粒子は、典型的には、金属酸化物のナノ粒子(例えば、国際公開第2009/147214号及び同第2007/118884号を参照)、金属のナノ粒子(例えば、金の、白金の又は銀のナノ粒子)、金属硫化物のナノ粒子(例えば、Bi<sub>2</sub>S<sub>3</sub>)及びこれらの任意の混合物(例えば、酸化ハフニウム材料で覆われた金のナノ粒子)から選択され得る。ナノ粒子は、例えば、電磁放射線源、超音波源又は磁気源等の外部源を介して活性化され得るナノ粒子である。

【0068】

30

本明細書中で上述される生体適合性ナノ粒子と組み合わせて投与される(典型的には、本明細書中に記載のように逐次的に投与される)少なくとも1つの目的の化合物は、当業者には既知の手段により、担体に封入され又はこのような担体に接合(即ち結合)され得る。典型的な担体は、例えば、リポソーム(例えば、熱感受性の脂質を使用するDOXIL又はThermoDox)、ミセル、ポリマー性(即ち「ポリマー」)担体、ヒドロゲル、ゲル、コポリマー性担体、タンパク質担体、無機担体である。

【0069】

本発明の医薬組成物(目的の化合物と少なくとも2つの異なるナノ粒子との組み合わせによって定義される)は、多くの分野、特に、ヒトの医療又は獣医学において用いられ得る。この組成物は、典型的には、その年齢又は性別がどうであれ、動物において、好ましくは哺乳類において(例えば、獣医学の状況において)、更により好ましくはヒトにおいて使用するためのものである。

40

【0070】

本発明の医薬組成物は、心血管疾患、中枢神経系(CNS)疾患、消化管疾患、遺伝性障害、血液障害、ホルモン障害、免疫、感染性疾患、代謝性疾患、筋骨格障害、オンコロジー、呼吸器疾患、トキシコロジー等において用いられ得る。好ましい実施態様において、医薬組成物は、心血管疾患、CNS疾患、オンコロジー、感染性疾患及び代謝性疾患において用いられる。

【0071】

本発明の状況においては、一方の少なくとも2つの別個の生体適合性ナノ粒子と他方の

50

化合物（「目的の化合物」）とは、当該化合物の医薬上の有効性を最適化するために、有利には、当該化合物を必要としている被験体に別々に（典型的には、5分超と約72時間との間（典型的には、5分超と約24時間との間、好ましくは5分超と又は30分超と約12時間との間）の間隔で）投与される。

【0072】

本発明では、少なくとも2つの異なるナノ粒子と化合物（「目的の化合物」）とが、有利には、既に説明したとおりの当該化合物を必要としている被験体に別々に（典型的には、5分超と約72時間との間の間隔で）投与される場合、「第1の」生体適合性ナノ粒子の表面電荷の絶対値は、有利には、少なくとも10mV（|10mV|）であり、そして、「第2の」生体適合性ナノ粒子又は任意の更なる生体適合性ナノ粒子は、当該「第1の」生体適合性ナノ粒子の表面電荷の絶対値と少なくとも10mVの差を有する。10

【0073】

本発明の特定の実施態様において、少なくとも2つの異なるナノ粒子及び化合物（「目的の化合物」）が、5分超と約24時間との間の間隔で、当該化合物を必要としている被験体に別々に投与される場合、当該ナノ粒子は、好ましくは、当該化合物の前に投与され、「第1」の生体適合性ナノ粒子の表面電荷の絶対値は、有利には、少なくとも15mV（|15mV|）である。

【0074】

また、例えば本明細書中で言及する疾患に罹患している被験体を処置する方法であって、本発明の医薬組成物を被験体に投与すること、典型的には、本明細書中に記載するとおりの少なくとも2つの別個の生体適合性ナノ粒子と少なくとも1つの目的の化合物とを投与することを含む、方法も本明細書中に記載される。一方の当該少なくとも2つの生体適合性ナノ粒子と他方の当該少なくとも1つの化合物とが、互いから5分超と約72時間との間で投与される限り、当該少なくとも2つのナノ粒子又は少なくとも1つの目的の化合物のいずれかを最初に当該被験体に投与し得る。当該少なくとも2つのナノ粒子又は少なくとも1つの目的の化合物のいずれかの投与は、それぞれの単回投与であっても、それぞれの反復投与（例えば、それぞれの数回の逐次的投与）であってもよい。少なくとも2つの別個の生体適合性ナノ粒子を1回投与し、少なくとも1つの目的の化合物を1回を超えて投与してもよく、そして、逆もまた同様である。20

【0075】

特定の実施態様において、少なくとも2つの別個の生体適合性ナノ粒子は、少なくとも1つの目的の化合物を数回投与することを含むプロトコルの開始時に少なくとも投与される（即ち、当該少なくとも1つの目的の化合物の1回目の投与時に少なくとも、そして、その投与の前に又は後に）。

【0076】

別の特定の実施態様において、少なくとも2つの別個の生体適合性ナノ粒子は、少なくとも1つの目的の化合物を数回投与することを含むプロトコルの開始時には投与されず、そして、当該少なくとも1つの目的の化合物の2回目又は3回目の投与前に、及びその投与の前に又は後には、投与されない。30

【0077】

また、これら最後の2つの実施態様の状況においては、少なくとも2つの別個の生体適合性ナノ粒子は、その後に続く少なくとも1つの目的の化合物の投与の一部又は全ての期間中に、当該少なくとも1つの目的の化合物と一緒に（既に説明したとおり前に又は後に）投与され得る。40

【0078】

特定の実施態様において、本発明の少なくとも2つの異なるナノ粒子は、少なくとも1つの目的の化合物を被験体に投与する前に（典型的には、少なくとも1つの目的の化合物を投与する前の5分超と約72時間との間）被験体に投与される。

【0079】

本発明の医薬組成物の少なくとも2つの別個の生体適合性ナノ粒子は、皮下、皮内、経50

口経路、経鼻経路（吸入）、静脈内（IV）、動脈内及び／又は腹腔内等の任意の経路によつて投与され得る。好ましい投与経路は、静脈内経路である。本発明の医薬組成物の当該少なくとも2つの別個の生体適合性ナノ粒子は、異なる経路によつて同時に又は別々に投与され得る。

【0080】

本発明の医薬組成物の目的の化合物は、皮下、静脈内（IV）、皮内、動脈内、気道（吸入）、腹腔内、筋肉内及び／又は経口経路（per os）等の様々な経路によつて投与され得る。

【0081】

以下の実施例は、その範囲を限定することなく本発明を説明する。

10

【実施例】

【0082】

実施例1：「第1の」及び／又は「第2の」生体適合性ナノ粒子としてのリポソームの合成。

脂質膜再水和法（re-hydration method）を用いてリポソームを調製する。

【0083】

少なくとも10mV（|10mV|）の表面電荷の絶対値を有する「第1の」及び／又は「第2の」生体適合性ナノ粒子の合成：

【0084】

a) 脂質をクロロホルム中に可溶化した。最終的に、クロロホルムを窒素流下でエバボレートした。20mM HEPES及び140mM NaCl（pH 7.4）による脂質膜の再水和を60で実施し、その結果、脂質濃度は25mMになった。

20

【0085】

以下の脂質組成物を用いて、荷電リポソームを調製した。6.2%mol DPPC（ジパルミトイルホスファチジルコリン）；20%mol HSPC（水素添加ダイズホスファチジルコリン）；16%mol CHOL（コレステロール）；1%mol POPS（1-パルミトイル-2-オレオイルホスファチジルセリン）；1%mol DSPE-PEG（ジステアリルホスファチジルエタノールアミン-[メトキシ(ポリエチレングリコール(PolyEthyleneGlycol))-2000]）。

【0086】

30

b) 次いで、サンプルを液体窒素中に、そして60で制御された水浴中に続けて漬けることによって、凍結・融解サイクルを6回実施した。

【0087】

c) サーモバレル押出機（thermobarrel extruder）（LIPEX Extruder, Northern Lipids）を用いて、温度及び圧力の制御下でリポソームのサイズを較正した。全ての場合において、押出加工（extrusion）は60で実施した。最初に、5barの圧力において孔径0.45μmのポリエーテルスルホン（PES）膜に5回通し、次いで、10barにおいて孔径0.22μmのPES膜に12回通し、そして、最後に、15barにおいて0.1μmのポリフッ化ビニリデン（PVDF）膜に12回通すことを実施した。

【0088】

40

633nm HeNeレーザーを備えるZetasizer NanoZS（Malvern instrument）を用いた動的光散乱法（DLS）（90°の角度で）によつて、このようにして調製したリポソームのサイズ分布を決定した。リポソーム懸濁液を20mM HEPES及び140mM NaCl（pH 7.4）で100倍希釈した。リポソームのサイズ（即ち、流体力学的直径）は、約145nm（強度による分布）に等しく、多分散指数（PDI）は約0.1に等しかつた。

【0089】

当業者によつて理解されるとおり、選択された脂質組成物により所望の表面電荷が得られ、そして、その値は、Zetasizer NanoZS（Malvern instrument）を用いたゼータ電位測定によつて確認された。

【0090】

50

リポソームを 1 mM 塩化ナトリウム溶液で 100 倍希釈し、そして、得られた懸濁液の pH を pH 7.4 に調整した。リポソームの表面電荷は、pH 7.4、1 mM NaCl で約 -25 mV に等しかった。

【0091】

「第2の」及び/又は「第1の」生体適合性ナノ粒子の合成：

a) 脂質をクロロホルム中に可溶化した。最終的に、クロロホルムを窒素流下でエバボレートして、Pyrexチューブの壁上に脂質膜を形成した。25 mM HEPES 及び 150 mM NaCl (pH 7.4) による脂質膜の再水和を 60 で実施し、その結果、脂質濃度は 50 mM になった。

【0092】

10

以下の脂質組成物を用いた。5.7%mol DPPC (ジパルミトイルホスファチジルコリン) ; 21%mol HSPC (水素添加ダイズホスファチジルコリン) ; 16%mol CHOL (コレステロール) ; 5%mol POPS (1-パルミトイール-2-オレオイルホスファチジルセリン) ; 1%mol DSPE-PEG (ジステアリルホスファチジルエタノールアミン-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000])。

【0093】

b) 次いで、サンプルを液体窒素中に、そして 60 で制御された水浴中に続けて漬けることによって、凍結・融解サイクルを 6 回実施した。

【0094】

20

c) 次いで、リポソーム溶液を 230 W の出力のプローブを用いて 30 秒間超音波処理した。

【0095】

d) サーモバレル押出機 (LIPEX Extruder, Northern Lipids) を用いて、温度及び圧力の制御下でリポソームのサイズを較正した。押出加工は 60 で実施した。最初に、10 bar の圧力下で孔径 0.1 μm のポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜に 10 回通し、次いで、15 bar の圧力下で孔径 0.08 μm のポリカーボネート (PC) 膜に 10 回通し、そして、最後に、20 bar の圧力下で孔径 0.05 μm の PC 膜に 10 回通すことを行った。

【0096】

e) 次いで、カットオフ 300 KDa のポリエチレンスルホン (PES) 膜を用いて、Vivaspin 濃縮機において膜限外濾過することによってリポソーム溶液を 2 回濃縮した。

30

【0097】

633 nm HeNe レーザーを備える Zetasizer NanoZS (Malvern instrument) を用いた動的光散乱法 (DLS) (173 の角度で) によって、このようにして調製したリポソームのサイズ分布を決定した。リポソーム溶液を 25 mM HEPES 及び 150 mM NaCl (pH 7.4) で 200 倍希釈した。リポソームのサイズ (即ち、流体力学的直径) は、約 70 nm (強度による分布) に等しく、多分散指数 (PDI) は約 0.1 に等しかった。

【0098】

40

リポソームの表面電荷を、Zetasizer NanoZS (Malvern instrument) を用いたゼータ電位測定によって決定した。リポソーム溶液を 1 mM 塩化ナトリウム溶液で 200 倍希釈し、そして、溶液の pH を pH 7 に調整した。リポソームの表面電荷は、pH 7、1 mM NaCl で約 -40 mV に等しかった。

【0099】

実施例 2：「第1の」及び/又は「第2の」生体適合性ナノ粒子としてのリポソームの合成。

脂質膜再水和法を用いてリポソームを調製する。

【0100】

- 少なくとも 10 mV ( | 10 mV | ) の表面電荷の絶対値を有する「第1の」及び/又は「第2の」生体適合性ナノ粒子の合成：

a) 脂質をクロロホルム中に可溶化した。最終的に、クロロホルムを窒素流下でエバボレートして、Pyrexチューブの壁上に脂質膜を形成する。25 mM HEPES 及び 150 mM NaCl

50

(pH 7.4) による脂質膜の再水和を 60 で実施し、その結果、脂質濃度は 50 mM になる。

【0101】

以下の脂質組成物を用いる。5.9%mol HSPC (水素添加ダイズホスファチジルコリン) ; 3.8%mol CHOL (コレステロール) ; 3%mol DSPE-PEG (ジステアリルホスファチジルエタノールアミン - [メトキシ (ポリエチレンギリコール) - 2000] )。

【0102】

b) 次いで、サンプルを液体窒素中に、そして 60 で制御された水浴中に続けて漬けることによって、凍結・融解サイクルを 6 回実施した。

【0103】

c) 次いで、リポソーム溶液を 230 W の出力のプローブを用いて 30 秒間超音波処理した。

【0104】

d) サーモバレル押出機 (LIPEX (商標) Extruder, Northern Lipids) を用いて、温度及び圧力の制御下でリポソームのサイズを較正した。押出加工は 60 で実施した。最初に、15 bar の圧力下で孔径 0.1 μm のポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜に 10 回通し、次いで、20 bar の圧力下で孔径 0.08 μm のポリカーボネート (PC) 膜に 18 回通すことを行った。

【0105】

e) 次いで、カットオフ 300 KDa のポリエチレンスルホン (PES) 膜を用いて、Vivaspin 濃縮機において膜限外濾過することによってリポソーム溶液を 2 回濃縮した。

【0106】

633 nm HeNe レーザーを備える Zetasizer NanoZS (Malvern instrument) を用いた DLS (173 の角度で) によって、このようにして調製したリポソームのサイズ分布を決定した。リポソーム溶液を 25 mM HEPES 及び 150 mM NaCl (pH 7.4) で 200 倍希釈した。リポソームのサイズ (即ち、流体力学的直径) は、約 90 nm (強度による分布) に等しく、多分散指数 (PDI) は約 0.1 に等しかった。

【0107】

リポソームの表面電荷を、Zetasizer NanoZS (Malvern instrument) を用いたゼータ電位測定によって決定した。リポソーム溶液を 1 mM 塩化ナトリウム溶液で 200 倍希釈し、そして、溶液の pH を pH 7 に調整した。リポソームの表面電荷は、pH 7、1 mM NaCl で約 -25 mV に等しかった。

【0108】

リポソーム溶液の最終脂質濃度を比色アッセイによって測定した：ホスホリパーゼ D がホスファチジルコリン (phosphatidylcholine) 分子を切断し、それによって、発色基質と反応することにより青色色素を形成するコリン基が遊離する。脂質濃度は、100 mM であると見出された。

【0109】

- 「第 2 の」及び / 又は「第 1 の」生体適合性ナノ粒子の合成：

a) 脂質をクロロホルム中に可溶化した。最終的に、クロロホルムを窒素流下でエバボレートして、Pyrex チューブの壁上に脂質膜を形成した。25 mM HEPES 及び 150 mM NaCl (pH 7.4) による脂質膜の再水和を 60 で実施し、その結果、脂質濃度は 50 mM になった。

【0110】

以下の脂質組成物を用いた。5.7%mol DPPC (ジパルミトイールホスファチジルコリン) ; 2.1%mol HSPC (水素添加ダイズホスファチジルコリン) ; 1.6%mol CHOL (コレステロール) ; 5%mol POPC (1-パルミトイール - 2-オレオイルホスファチジルセリン) ; 1% mol DSPE-PEG (ジステアリルホスファチジルエタノールアミン - [メトキシ (ポリエチレンギリコール) - 2000] )。

【0111】

10

20

30

40

50

b) 次いで、サンプルを液体窒素中に、そして60で制御された水浴中に続けて漬けることによって、凍結・融解サイクルを6回実施した。

【0112】

c) サーモバレル押出機 (LIPEX Extruder, Northern Lipids) を用いて、温度及び圧力の制御下でリポソームのサイズを較正した。押出加工は60で実施した。最初に、5 barの圧力において孔径0.45 μmのポリエーテルスルホン (PES) 膜に5回通し、次いで、10 barにおいて孔径0.22 μmのPES膜に12回通し、そして、最後に、15 barにおいて0.1 μmのポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜に12回通すことを実施した。

【0113】

d) 次いで、カットオフ300KDaのポリエチレンスルホン (PES) 膜を用いて、Vivaspin濃縮機において膜限外濾過することによってリポソーム溶液を2回濃縮した。 10

【0114】

633 nm HeNeレーザーを備えるZetasizer NanoZS (Malvern instrument) を用いた動的光散乱法 (DLS) (173°の角度で) によって、このようにして調製したリポソームのサイズ分布を決定した。リポソーム溶液を25 mM HEPES及び150 mM NaCl (pH 7.4) で200倍希釈した。リポソームのサイズ (即ち、流体力学的直径) は、約145 nm (強度による分布) に等しく、多分散指数 (PDI) は約0.1に等しかった。

【0115】

リポソームの表面電荷を、Zetasizer NanoZS (Malvern instrument) を用いたゼータ電位測定によって決定した。リポソーム溶液を1 mM 塩化ナトリウム溶液で200倍希釈し、そして、溶液のpHをpH 7に調整した。リポソームの表面電荷は、pH 7、1 mM NaClで約-40 mVに等しかった。 20

【0116】

リポソーム溶液の最終脂質濃度を比色アッセイによって測定した：ホスホリパーゼDがホスファチジルコリン分子を切断し、それによって、発色基質と反応することにより青色色素を形成するコリン基が遊離する。脂質濃度は、100 mMであると見出された。

【0117】

実施例3：MDA-MB-231-lucD3H2LN異種移植片における実施例2の少なくとも2つの生体適合性ナノ粒子の懸濁液とDox-NP (登録商標) とを含む医薬組成物の有効性及び毒性を評価する方法 (図2を参照)。 30

(i) 実施例2による少なくとも2つの異なる「第1の」及び「第2の」生体適合性ナノ粒子と(ii) 目的の治療上の化合物としてのDox-NP (登録商標) (リポソーム封入ドキソルビシン) とを含む医薬組成物を、以下の方法でMDA-MB-231-lucD3H2LN異種移植腫瘍を有するヌードマウスに投与する。

【0118】

a) Dox-NP (登録商標) と実施例2による生体適合性ナノ粒子とを、外側尾静脈を介して静脈内注射 (IV) によって投与する。

Dox-NP (登録商標) (Avanti Polar lipids - 10% w/v スクロースを含む、10 mM ヒスチジン緩衝液中の2 mg/mL ドキソルビシンHCl (pH 6.5 ~ 6.8) のリポソーム製剤) を、注射されるドキソルビシンが3 mg/kgとなるために必要な体積で、更に希釈することなく注射する。 40

【0119】

実施例2による生体適合性ナノ粒子懸濁液を、更に希釈することなく用いる。

【0120】

b) 4グループのマウスを図2に示すとおり処置する：

- グループ1：5%無菌グルコース (対照 (ビヒクル) 群)。

1日目、7日目及び14日目に、5%無菌グルコース溶液をマウスに静脈内 (IV) 注射する。

- グループ2：実施例2による「第1の」及び「第2の」生体適合性ナノ粒子 (対照群) 。

50

1日目、7日目及び14日目に、実施例2による「第1の」及び「第2の」生体適合性ナノ粒子(10mL/kg)をマウスに静脈内(IV)注射する。各時点(日)で、第2の生体適合性ナノ粒子を注射する4時間前に第1の生体適合性ナノ粒子の注射を実施する。

- グループ3 : Dox-NP(登録商標)(3mg/kgドキソルビシン)(処置群)。

1日目、7日目及び14日目に、Dox-NP(登録商標)(3mg/kgドキソルビシン)をマウスに静脈内(IV)注射する。

- グループ4 : 医薬組成物(即ち、(i)実施例2による少なくとも2つの異なる(「第1の」及び「第2の」)生体適合性ナノ粒子と(ii)Dox-NP(登録商標)(3mg/kgドキソルビシン)との組み合わせ)(処置群)。

1日目、7日目及び14日目に、実施例2による生体適合性ナノ粒子(10mL/kg)とDox-NP(登録商標)(3mg/kgドキソルビシン)とをマウスに静脈内(IV)注射する。各時点(日)で、Dox-NP(登録商標)(3mg/kgドキソルビシン)を注射する4時間前に実施例2による「第1の」及び「第2の」生体適合性ナノ粒子の同時注射を実施する。 10

- グループ5 : 医薬組成物(即ち、(i)実施例2による少なくとも2つの別個の生体適合性ナノ粒子と(ii)Dox-NP(登録商標)(3mg/kgドキソルビシン)との組み合わせ)(処置群)。

1日目、7日目及び14日目に、実施例2による生体適合性ナノ粒子(10mL/kg)とDox-NP(登録商標)(3mg/kgドキソルビシン)とをマウスに静脈内(IV)注射する。各時点(日)で、Dox-NP(登録商標)(3mg/kgドキソルビシン)を注射するそれぞれ4時間前及び1時間前に実施例2による「第1の」及び「第2の」生体適合性ナノ粒子の注射を実施する。 20

【0121】

c) 医薬組成物の投与後に、任意の毒性の臨床徴候を評価する；そして

【0122】

d) 以下の式を用いてデジタルキャリパによる二次元の腫瘍体積測定から腫瘍体積を測定する：

【数1】

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = \frac{\text{長さ (mm)} \times (\text{幅})^2 (\text{mm}^2)}{2}$$

2

30

【0123】

実施例4: 「第1の」又は「第2の」生体適合性ナノ粒子としてのリポソームの合成。

脂質膜再水和法を用いてリポソームを調製する。

【0124】

a) 脂質をクロロホルム中に可溶化する。最終的に、クロロホルムを窒素流下でエバボレートして、Pyrexチューブの壁上に脂質膜を形成する。25mM HEPES及び150mM NaCl(pH7.4)による脂質膜の再水和を60で実施し、その結果、脂質濃度は50mMになる。

【0125】

以下の脂質組成物を用いて、荷電リポソームを調製した。5.8%mol DPPC(ジパルミトイルホスファチジルコリン)；2.1%mol HSPC(水素添加ダイズホスファチジルコリン)；1.6%mol CHOL(コレステロール)；5%mol POPS(1-パルミトイ-2-オレオイルホスファチジルセリン)。 40

【0126】

b) 次いで、サンプルを液体窒素中に、そして60で制御された水浴中に続けて漬けることによって、凍結・融解サイクルを6回実施する。凍結・融解の3サイクル毎に及び押出加工直前に、リポソーム溶液の超音波処理を30秒間実施する。

【0127】

c) サーモバレル押出機(LIPEX(商標)Extruder, Northern Lipids)を用いて、温度 50

及び圧力の制御下でリポソームのサイズを較正する。押出加工は 60 で実施する。10 bar の圧力下で孔径 0.1  $\mu\text{m}$  のポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜に 10 回通すことを行った。

【0128】

633 nm HeNe レーザーを備える Zetasizer NanoZS (Malvern instrument) を用いた動的光散乱法 (DLS) (173 の角度で) によって、このようにして調製したリポソームのサイズ分布を決定する。リポソーム溶液を 25 mM HEPES 及び 150 mM NaCl (pH 7.4) で 200 倍希釈する。リポソームのサイズ (即ち、流体力学的直径) は、約 170 nm (強度による分布) に等しく、多分散指数 (PDI) は約 0.2 に等しい。

【0129】

当業者によって理解されるとおり、選択された脂質組成物により所望の表面電荷が得られ、そして、その値は、Zetasizer NanoZS (Malvern instrument) を用いたゼータ電位測定によって確認される。リポソームを 1 mM 塩化ナトリウム溶液で 200 倍希釈し、そして、溶液の pH を pH 7 に調整する。リポソームの表面電荷は、pH 7、1 mM NaCl で約 -40 mV に等しい。

【0130】

リポソーム溶液の最終脂質濃度を比色アッセイ (Bartlett 法) によって測定する。この方法は、リン脂質の酸分解を通じた総リンの決定に基づいている。放出された無機リン酸塩は、モリブデン酸アンモニウムと反応し、錯体は、強い青色を呈する。脂質濃度は、約 50 mM に等しい。

【0131】

実施例 5：「第 1 の」又は「第 2 の」生体適合性ナノ粒子としてのリポソームの合成。

脂質膜再水和法を用いてリポソームを調製する。

【0132】

a) 脂質をクロロホルム中に可溶化する。最終的に、クロロホルムを窒素流下でエバボレートして、Pyrex チューブの壁上に脂質膜を形成する。25 mM HEPES 及び 150 mM NaCl (pH 7.4) による脂質膜の再水和を 60 で実施し、その結果、脂質濃度は 50 mM になる。

【0133】

以下の脂質組成物を用いて、荷電リポソームを調製した。45.15 %mol DPPC (ジパルミトイロホスファチジルコリン)；45.15 %mol CHOL (コレステロール)；0.60 %mol DSPE-PEG (ジステアリルホスファチジルエタノールアミン - [メトキシ (ポリエチレングリコール) - 2000] )；9.10 %mol L-グルタミン酸 N- (3-カルボキシ - 1-オキソプロピル) - 1,5-ジヘキサデシルエステル (SA-脂質)。SA-脂質は、リポソーム表面上に COOH 基をもたらす。

【0134】

b) 次いで、サンプルを液体窒素中に、そして 60 で制御された水浴中に続けて漬けることによって、凍結・融解サイクルを 6 回実施する。

【0135】

c) サーモバーレル押出機 (LIPEX (商標) Extruder, Northern Lipids) を用いて、温度及び圧力の制御下でリポソームのサイズを較正する。押出加工は 60 で実施する。3 bar の圧力下で孔径 0.45  $\mu\text{m}$  のポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜に 7 回通し、そして、10 bar の圧力下で孔径 0.22  $\mu\text{m}$  のポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜に 10 回通すことを行った。633 nm HeNe レーザーを備える Zetasizer NanoZS (Malvern instrument) を用いた動的光散乱法 (DLS) (173 の角度で) によって、このようにして調製したリポソームのサイズ分布を決定する。リポソーム溶液を 25 mM HEPES 及び 150 mM NaCl (pH 7.4) で 200 倍希釈する。リポソームのサイズ (即ち、流体力学的直径) は、約 230 nm (強度による分布) に等しく、多分散指数 (PDI) は約 0.2 に等しい。

【0136】

当業者によって理解されるとおり、選択された脂質組成物により所望の表面電荷が得ら

10

20

30

40

50

れ、そして、その値は、Zetasizer NanoZS (Malvern instrument) を用いたゼータ電位測定によって確認される。リポソーム溶液を 1 mM 塩化ナトリウム溶液で 200 倍希釈し、そして、溶液の pH を pH 7 に調整する。リポソームの表面電荷は、pH 7、1 mM NaCl で約 -60 mV に等しい。

【0137】

リポソーム溶液の最終脂質濃度を比色アッセイ (Bartlett 法) によって測定する。この方法は、リン脂質の酸分解を通じた総リンの決定に基づいている。放出された無機リン酸塩は、モリブデン酸アンモニウムと反応し、そして、錯体は、強い青色を呈する。脂質濃度は、約 50 mM に等しい。

【0138】

実施例 6：「第 1 の」又は「第 2 の」生体適合性ナノ粒子としてのリポソームの合成。

脂質膜再水和法を用いてリポソームを調製する。

【0139】

a) 脂質をクロロホルム中に可溶化する。最終的に、クロロホルムを窒素流下でエバボレートして、Pyrex チューブの壁上に脂質膜を形成する。25 mM HEPES 及び 150 mM NaCl (pH 7.4) による脂質膜の再水和を 60 で実施し、脂質濃度は 50 mM である。以下の脂質組成物を用いて、荷電リポソームを調製した。60%mol DSPC (1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン)、35%mol CHOL (コレステロール)；及び 5%mol スクシニル PE (1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-スクシニル)。

【0140】

b) 次いで、サンプルを液体窒素中に、そして 60 で制御された水浴中に続けて漬けることによって、凍結・融解サイクルを 6 回実施する。凍結・融解の 3 サイクル毎に及び押出加工直前に、リポソーム溶液の超音波処理を 30 秒間実施する。

【0141】

c) サーモバーレル押出機 (LIPEX (商標) Extruder, Northern Lipids) を用いて、温度及び圧力の制御下でリポソームのサイズを較正する。押出加工は 60 で実施する。12 bar の圧力下で孔径 0.22 μm のポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜に 12 回通すことを行った。

【0142】

d) p-アミノフェニル - - D - マンノピラノシド (MAN) とスクシニル PE リポソームとの複合化：カルボジイミドカップリングを用いて、スクシニル PE リポソーム表面をマンノース由来のリガンドである p-アミノフェニル - - D - マンノピラノシド (MAN) で修飾し、マンノース複合リポソームに発展させる。MAN は、そのアミノ基によって、予め形成されたスクシニル PE リポソームの表面上に存在するスクシニル PE のカルボン酸基に共有結合する。簡潔に述べると、予め形成されたスクシニル PE リポソーム溶液に、EDC (1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミド塩酸塩) (スクシニル PE / EDC のモル比 1:10) 及び N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) (NHS / EDC モル比 1:2.5) を添加する。次いで、懸濁液の pH を 1 M NaOH で 6 に調整し、そして、得られた懸濁液を室温で 15 分間攪拌する。続いて、溶液の pH を 1 M NaOH で 7 に調整し、そして、MAN 水溶液を当該溶液に添加する (スクシニル PE / MAN のモル比 1:2)。1 M NaOH を用いて pH を 7 に再調整し、そして、懸濁液を室温で更に 2 時間攪拌する。50 KDa セルロース膜を用いて (×500; ×500; ×500) の希釈率で 3 工程の透析を行うことによって、過剰の未結合の MAN、EDC 及び NHS の分子を除去する。

【0143】

注目すべきことに、透析により希釈が可能であるため、リポソーム溶液は、Vivaspin 濃縮機での膜限外濾過 (カットオフ 300 KDa のポリエチレンスルホン (PES) 膜を用いる) を用いて遠心分離 (典型的には、Sigma 3-15K 遠心分離機 (5; 1,200 rpm)) によって濃縮され得る。

【0144】

10

20

30

40

50

633 nm HeNeレーザーを備えるZetasizer NanoZS (Malvern instrument)を用いた動的光散乱法 (DLS) (173°の角度で)によって、このようにして調製したリポソームのサイズ分布を決定する。リポソーム溶液を25 mM HEPES及び150 mM NaCl (pH 7.4)で200倍希釈する。リポソームのサイズ(即ち、流体力学的直径)は、約230 nm(強度による分布)であり、多分散指数(PDI)はおよそ0.2である。

【0145】

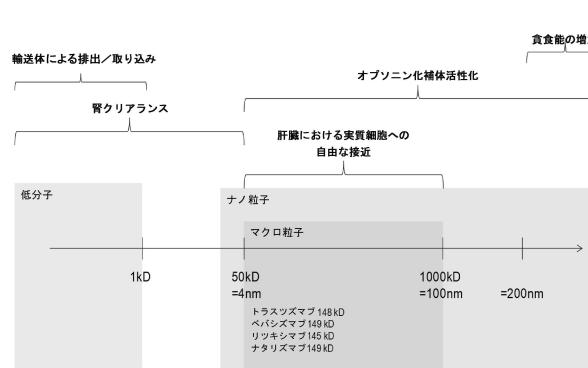
当業者によって理解されるとおり、選択された脂質組成物により所望の表面電荷が得られ、そして、その値は、Zetasizer NanoZS (Malvern instrument)を用いたゼータ電位測定によって確認される。リポソーム溶液をpH 7の1 mM 塩化ナトリウム溶液で200倍希釈する。リポソームの表面電荷は、1 mM NaCl、pH 7 でおよそ-70 mVである。

10

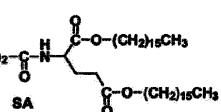
【0146】

リポソーム溶液の最終脂質濃度を比色アッセイ (Bartlett法)によって測定する。この方法は、リン脂質の酸分解を通じた総リンの決定に基づいている。放出された無機リン酸塩は、モリブデン酸アンモニウムと反応し、そして、錯体は、強い青色を呈する。脂質濃度は、約50 mMに等しい。

【図1】



【図3】



【図2】

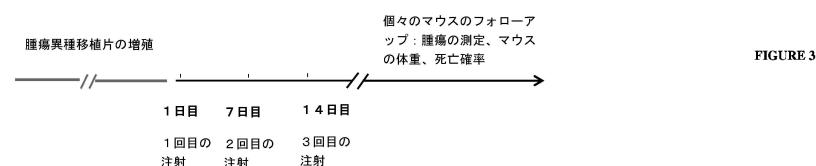


FIGURE 3

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K	35/768 (2015.01)	A 6 1 K 35/768
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D
A 6 1 K	31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 K	38/02 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088
A 6 1 K	31/704 (2006.01)	A 6 1 K 38/02
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/704
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00
B 8 2 Y	5/00 (2011.01)	A 6 1 P 35/00
B 8 2 Y	40/00 (2011.01)	B 8 2 Y 5/00
		B 8 2 Y 40/00

(72)発明者 ポティエ , アニエス

フランス国、エフ - 7 5 0 0 6 パリ、リュ・サント - バーヴ 6

(72)発明者 レヴィ , ローラン

フランス国、エフ - 7 5 0 1 4 パリ、ブルヴァール・ラスパイユ 2 4 6

審査官 渡邊 潤也

(56)参考文献 特表2 0 0 7 - 5 2 3 0 9 0 ( J P , A )

Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology , 1 9 8 0 年 8 月 , 29(2) , p.349-360

Biomaterials , 英国 , 2 0 1 0 年 , 31 , p.3657-3666

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

A 6 1 K 9 / 0 0

A 6 1 K 4 7 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C a p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )