

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7487892号
(P7487892)

(45)発行日 令和6年5月21日(2024.5.21)

(24)登録日 令和6年5月13日(2024.5.13)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	47/14 (2017.01)	A 6 1 K	47/14
A 6 1 K	47/28 (2006.01)	A 6 1 K	47/28
A 6 1 K	47/24 (2006.01)	A 6 1 K	47/24
A 6 1 K	47/26 (2006.01)	A 6 1 K	47/26
A 6 1 K	47/42 (2017.01)	A 6 1 K	47/42
請求項の数 18 (全40頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2021-538933(P2021-538933)	(73)特許権者	390040604
(86)(22)出願日	令和1年9月13日(2019.9.13)		イギリス国
(65)公表番号	特表2022-501423(P2022-501423 A)		THE SECRETARY OF ST
			ATE FOR DEFENCE IN H
(43)公表日	令和4年1月6日(2022.1.6)		ER BRITANNIC MAJEST
(86)国際出願番号	PCT/GB2019/000134		Y'S GOVERNMENT OF TH
(87)国際公開番号	WO2020/053541		E UNETED KINGDOM OF
(87)国際公開日	令和2年3月19日(2020.3.19)		GREAT BRITAIN AND N
審査請求日	令和4年9月12日(2022.9.12)		ORTHERN IRELAND
(31)優先権主張番号	1814959.1		イギリス国 ウィルシャー エスピー4
(32)優先日	平成30年9月14日(2018.9.14)		0ジェイキュー ソールズベリー ポート
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)	(73)特許権者	521108342
			ザ ユニヴァーシティー オヴ ストラス
			クライド
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 医薬ベシクル製剤を調製するための方法、ならびに関連する製品および使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

血液脳関門を通過して送達するための医薬ベシクル製剤を調製するための方法であって、

a) それぞれ5：4：1のモル比で提供される、モノパルミトイルグリセロール、コレステロールおよびリン酸ジセチルを含むベシクル成分を50℃～150℃の範囲の温度で加熱するステップ；

b) 医薬剤を薬学的に許容可能な担体中に溶解させ、得られた医薬剤－担体混合物を30～99℃の範囲で加熱するステップ；

c) 医薬剤－担体混合物をベシクル成分に添加して、製剤混合物をもたらすステップ；
ならびに

d) 製剤混合物を加工して、医薬剤と担体とが複数のベシクル内に封入された医薬ベシクル製剤を形成するステップ

を含み、

医薬剤が経口投与可能な抗生剤であり、

医薬ベシクル製剤が薬学的に許容可能な担体中に溶解した、既知数量の医薬剤に還元されて、二相性医薬ベシクル製剤をもたらし、かつ

前記ベシクルが、i) グルコサミンおよび／またはii) トランスフェリンで修飾され、ここで

i) については、パルミチン酸が、グルコサミンへと、共有結合的に連結され、パルミトイル化グルコサミンを提供し、

i i) については、コレステロール部分をコレステロール-PEG-マレイミドにより置きかえることにより、コレステロールが修飾され、ベシクル成分が更にチオール化トランスフェリン、またはトランスフェリン野生型配列若しくは塩基配列と少なくとも70%同一である任意の変異体、または任意のアミノ酸部分であり、トランスフェリン野生型配列若しくは塩基配列の所望の特性を保持する任意の断片、をチオール化トランスフェリン、または変異体、または断片と、修飾コレステロールとの間に共有結合が形成されるように含む、方法。

【請求項2】

デオキシコール酸ナトリウムが、ベシクル成分中に、かつ／または医薬剤を薬学的に許容可能な担体中に溶解させる場合に提供される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

i i) について、コレステロールのコレステロール-PEG-マレイミドに対する比が、コレステロール：コレステロール-PEG-マレイミド=4：1である、請求項1または2のいずれか1項に記載の方法。

【請求項4】

医薬剤-担体混合物とベシクル成分とが、それぞれ3：1の比で提供される、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

医薬ベシクル製剤が、加工後において、少なくとも1つの凍結乾燥および融解のサイクルを経る、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

医薬剤が、フルオロキノロンおよびテトラサイクリンを含む群から選択される、請求項1から5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

医薬剤が、レボフロキサシン、シプロフロキサシン、およびドキシサイクリンを含む群から選択される、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

a) モノパルミトイルグリセロール、コレステロールおよびリン酸ジセチルを5：4：1のモル比で含む複数のベシクル；および

b) 薬学的に許容可能な担体中に溶解した状態で複数のベシクル内に封入された医薬剤を含み、

前記医薬剤が経口投与可能な抗生剤であり、

前記ベシクルが、i) グルコサミンおよび／またはi i) トランスフェリンで修飾されたベシクルであり、ここで

i) については、グルコサミンで修飾されたベシクルは、パルミチン酸が、グルコサミンへと共有結合的に連結し、パルミトイル化グルコサミンを形成したベシクルであり、

i i) については、トランスフェリンで修飾されたベシクルが、コレステロール部分をコレステロール-PEG-マレイミドにより置きかえることにより、コレステロールが修飾され、修飾されたコレステロールとチオール化トランスフェリン、またはその変異体、または断片との間に共有結合が形成されたベシクルであり、ここで変異体は、トランスフェリン野生型配列若しくは塩基配列と少なくとも70%同一である変異体であり、断片は、トランスフェリン野生型配列若しくは塩基配列の所望の特性を保持する任意のアミノ酸部分である断片であり、

医薬ベシクル製剤が二相性医薬ベシクル製剤であって、前記二相性医薬ベシクル製剤は、薬学的に許容可能な担体中に溶解した既知数量の医薬剤に復元される性質を有するものである、

血液脳関門を通過して送達するための医薬ベシクル製剤。

【請求項9】

ベシクルが、50～4000nmのサイズである、請求項8に記載の血液脳関門を通過して送達するための医薬ベシクル製剤。

10

20

30

40

50

【請求項 10】

前記複数のベシクルおよび／または薬学的に許容可能な担体中の医薬剤が更にデオキシコール酸ナトリウムを含む、請求項 8 または 9 に記載の血液脳関門を通過して送達するための医薬ベシクル製剤。

【請求項 11】

i i) について、コレステロールのコレステロール-PEG-マレイミドに対する比が、コレステロール：コレステロール-PEG-マレイミド＝4：1である、請求項 8 から 10 のいずれか 1 項に記載の血液脳関門を通過して送達するための医薬ベシクル製剤。

【請求項 12】

医薬剤-担体混合物とベシクル成分とが、それぞれ 3：1 の比で提供される、請求項 8 から 11 のいずれか 1 項に記載の血液脳関門を通過して送達するための医薬ベシクル製剤。

【請求項 13】

医薬剤が、フルオロキノロンおよびテトラサイクリンを含む群から選択される、請求項 8 から 12 のいずれか 1 項に記載の血液脳関門を通過して送達するための医薬ベシクル製剤。

【請求項 14】

医薬剤が、レボフロキサシン、シプロフロキサシン、およびドキシサイクリンを含む群から選択される、請求項 8 から 13 のいずれか 1 項に記載の血液脳関門を通過して送達するための医薬ベシクル製剤。

【請求項 15】

医薬剤が、30mg/ml の濃度で存在する、請求項 8 から 14 のいずれか 1 項に記載の血液脳関門を通過して送達するための医薬ベシクル製剤。

【請求項 16】

請求項 8 から 15 のいずれか 1 項に記載の血液脳関門を通過して送達するための医薬ベシクル製剤を含む医薬キット。

【請求項 17】

医薬としての使用のための、請求項 8 から 15 のいずれか 1 項に記載の血液脳関門を通過して送達するための医薬ベシクル製剤、または請求項 16 に記載の医薬キット。

【請求項 18】

類鼻疽菌 (*Burkholderia pseudomallei*)、または野兔病菌 (*Francisella tularensis*) による感染の防止または処置における使用のための、請求項 8 から 15 のいずれか 1 項に記載の血液脳関門を通過して送達するための医薬ベシクル製剤、または請求項 16 に記載の医薬キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、医薬ベシクル製剤を調製するための方法と、特に、鼻疽菌 (*Burkholderia pseudomallei*) および野兔病菌 (*Francisella tularensis*) などの細菌、ならびにベネズエラウマ脳炎ウイルス (VEEV) などのウイルスによる感染の防止または処置のための、関連する医薬ベシクル製剤、医薬キット、および医薬としての使用とに関する。本発明は、特に、レボフロキサシン、ドキシサイクリン、またはシプロフロキサシンなどの抗生剤と、ヒト化抗 VEEV モノクローナル IgG である、Hu1A3B-7 などの抗ウイルス剤とを含む、医薬剤を封入する、非イオン性界面活性剤ベシクル (NISV)、またはこの修飾ベシクルを含む、医薬ベシクル製剤を調製する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

細菌およびウイルスのそれぞれに対して効果的な、抗生剤および抗ウイルス剤を包摂する、抗微生物薬剤は、動物宿主における感染を解消させるための、最も一般に展開される戦略のうちの 1 つであり続けている。しかし、抗微生物性耐性の発生は、微生物が、処置を回避する能力と並んで、不断の憂慮点である。さらに、新たな抗微生物療法における投

10

20

30

40

50

資がなされていないことも、十分に記録されている。

類鼻疽菌とは、環境中のグラム陰性細菌であり、ヒト疾患である、類鼻疽の原因物質である。鼻疽菌 (*B. pseudomallei*) とは、タイおよびオーストラリア北部などの熱帯地域に特有であり、水田などの湿潤条件と、特に関連する。ヒトの曝露は、皮膚を介する経路を含む経路を介して生じる、例えば、ひっかき傷または他の病変の結果として生じる可能性があり、接種物のサイズに応じて、急性熱病をもたらさう。細菌はまた、吸気を介して、ヒトに感染する結果として、より急性の肺感染ももたらさう。

【0003】

野兎病菌 (*F. tularensis*) とは、細胞内の病原体であり、疾患である、野兎病の原因物質であると考えられる。野兎病菌の、典型的な人畜共通宿主は、齧歯動物およびウサギ目動物を含むが、ヒトにおける野兎病の発生も記録されている。野兎病菌の、4つの公知の亜種 (*F. tularensis tularensis*、*F. tularensis holarctica*、*F. tularensis mdeiasiatica*、および *F. tularensis novicida*) のうち、野兎病菌亜種である、*F. tularensis tularensis* は、特に、呼吸器経路を介して、低感染用量 (<50 コロニー形成単位) で、ヒトに感染することが可能な、最も臨床的に関与性の亜種であると考えられる。

アルファウイルスである、VEEV は、ウマおよびヒトを含む動物において、疾患を引き起こすことが可能であり、蚊およびダニなどの媒介節足動物を介して伝染する。VEEV は、生物兵器物質としての歴史的使用と関連している。

【0004】

鼻疽菌、野兎病菌、および VEEV などの微生物学的作用物質は、全て、効果的な医学的対抗策の開発に対する難題を提示する。鼻疽菌および野兎病菌のいずれも、自然免疫による防御を回避する機構を発生させ、宿主環境内に遷延する。特に、鼻疽菌は、複数の分泌機構および他の免疫調節機構を発達させて、細胞内の肉芽腫性病変内の、長期にわたる生存を可能とし、これにより、この病原体に接近し、効果的に処置することを、極めて困難としている。実際、1つの記録された症例は、元の曝露の60年後に再出現する、鼻疽菌のヒト感染について記載している。同様に、VEEV などのウイルスも、宿主細胞内で複製する、それらの必要のために、処置するのが困難なことで有名である。脳炎ウイルスを処置する能力は、ウイルスが、血液脳関門 (BBB) により保護される *in vivo* 部位である、脳にアクセスし、複製する場合、さらに複雑化される。

【0005】

現在のところ、類鼻疽、野兎病、または VEEV に対するワクチンは、完全には認可されていない。結果として、感染を処置するのに、既存の抗微生物剤に対する、過重な依存がなされている。しかし、以下の例は、このような感染を除去するための、既存の抗微生物剤の使用に影響しう、律速因子を強調する。

鼻疽菌は、排出ポンプにより、抗生物質を、能動的に排出し、これにより、この細菌を、複数の抗生物質に対して耐性とし、*in vivo* において、効果的に処置することを、極めて困難とすることが公知である。実際、データは、単一の抗生物質投与レジメンが、鼻疽菌に対して、部分的に効果的であるに過ぎないことを示唆する。類鼻疽に対する有効性を改善するための、1つの選択肢は、組合せ療法の適用、すなわち、急性期のために、β-ラクタムおよびセファロスポリンなど、複数の抗生物質を投与して、重篤な敗血症および死亡を防止し、口腔内根絶期のために、コトリモキサゾールなどの抗生物質と、静菌性の広域スペクトル抗生物質である、クロラムフェニコールおよびドキシサイクリンとの混合物を投与して、残存する細菌を死滅させることである。しかし、このような手法は、このような抗生物質の組合せから生じうる副作用の危険性がある。

【0006】

抗生物質による野兎病感染の処置はまた、抗生物質の適正な選択にも依存する。例えば、β-ラクタムおよびマクロリドは、不適切である。アミノグリコシドは、効果的でありうるが、このような抗生物質の投与は、非経口投与および毒性についての、血清レベルのモニタ

10

20

30

40

50

リングに対する要件のために、実際的でない場合がある。シプロフロキサシンは、野兎病の処置に好ましい抗生剤でありうるが、マウスモデルおよびヒト感染の発生率に由来するデータは、このレジメンが、抗生剤の投与が、中止された場合における、感染の再発のために、最適ではないことを示唆している。

現在のところ、V E E Vに対する抗ウイルス剤は、認可されていない。ウイルスは、宿主細胞内で複製する、それらの必要のために、細菌の病原体と比較して、処置するのがより困難なことで有名である。一般的なウイルス標的はまた、多種多様なウイルス（例えば、DNAウイルス、RNAウイルス、エンベロープウイルス）のために、同定することも困難であるため、抗ウイルス剤は、特異的なウイルス科またはウイルス属だけに対して有用である傾向がある。宿主特異的応答を、ウイルス感染へとターゲティングすることにより、より広範な手法が達成されうる。しかし、V E E Vのための療法を含む、このような療法は、いまだ最適化されていない。

【0007】

したがって、細菌などの微生物の中の、抗生剤耐性に関する憂慮点一般、および選択された処置レジメンが、所望されない副作用を付与する潜在的可能性を踏まえると、疾患の、効果的で、安全で、かつ十分に忍容された処置が必要とされている。また、抗微生物剤の、病原体の処置に有益な、特定の細胞内ニッチへの送達を最適化することも所望される。このような必要は、鼻疽菌、野兎病菌、およびV E E Vのそれぞれによる感染について、明らかである。

【発明の概要】

【0008】

本発明は、医薬ベシクル製剤を調製するための方法であって、a) 界面活性剤、疎水性物質、および両親媒性物質を含むベシクル成分を有機溶媒の存在下または非存在下で加熱するステップ；b) 医薬剤を薬学的に許容可能な担体中に溶解させ、得られた医薬剤－担体混合物を加熱するステップ；c) 加熱された医薬剤－担体混合物を加熱されたベシクル成分に添加して、製剤混合物をもたらすステップ；ならびにd) 製剤混合物を加工して、医薬剤と担体とを、ベシクル成分を含むベシクル内に封入して、医薬ベシクル製剤を形成するステップを含み、医薬ベシクル製剤が、使用の前に、薬学的に許容可能な担体で復元される方法を提供する。ベシクル内に封入された医薬剤の濃度は、復元の前に測定されうる。さらに、医薬ベシクル製剤は、使用の前に、薬学的に許容可能な担体中に溶解した、既知数量の医薬剤に復元されて、二相性医薬ベシクル製剤をもたらす。

【0009】

第1の態様に従い、本発明は、医薬ベシクル製剤を調製するための方法であって、a) モノパルミトイルグリセロール、コレステロールおよびリン酸ジセチルを含むベシクル成分を50℃～150℃の範囲の温度で加熱するステップ；b) 医薬剤を薬学的に許容可能な担体中に溶解させ、得られた医薬剤－担体混合物を30～99℃の範囲で加熱するステップ；c) 医薬剤－担体混合物をベシクル成分に添加して、製剤混合物をもたらすステップ；ならびにd) 製剤混合物を加工して、医薬剤と担体とが複数のベシクル内に封入された医薬ベシクル製剤を形成するステップを含み、医薬ベシクル製剤が薬学的に許容可能な担体中に溶解した、既知数量の医薬剤に復元されて、二相性医薬ベシクル製剤をもたらす方法を提供する。

当業者により理解される、「ベシクル」という用語は、医薬剤などの化合物または物質を封入するか、またはこれと会合することが可能な、ナノ粒子状構造またはマイクロ粒子状構造を指す場合がある。医薬剤と、ベシクルとの会合について記載するのに、「封入された」という用語が使用される一方で、医薬剤は、ベシクル表面に結合させられることの結果としてもまた、ベシクルと会合することが想定される。

【0010】

「医薬剤」という用語は、動物に対する、生物学的効果、特に、動物内部の組織または細胞に対する生物学的効果を誘導することが可能な、1つまたは少なくとも1つの成分（すなわち、1つを超える成分を包摂する）を指す。「医薬剤」という用語は、動物におけ

10

20

30

40

50

る疾患の防止または処置における使用に適する、治療用成分、例えば、抗生剤、抗ウイルス剤、および／または病原体を認識するか、もしくはこれらに結合することが可能な抗体などの生物学的分子、ならびに／あるいは細菌、酵母、またはウイルスなど、特定の生物学的作用物質、および、特に、疾患を引き起こすことが可能な病原体であると考えられる、生物学的実体により発現させられる要素（例えば、タンパク質、糖タンパク質）など、ワクチンとして作用することが可能な、他の生物学的分子などの薬物を含む。疾患の例は、感染（例えば、細菌性病原体またはウイルス性病原体により引き起こされる感染）、がん、炎症性機能不全（例えば、関節炎）、糖尿病、および／またはアレルギーを含むがこれらに限定されない。「医薬剤」という用語は、疾患に対抗するために、動物の免疫応答を修飾することにより、動物の状態を改善するように作用しうる薬剤を含みうる。

10

【0011】

「医薬剤」という用語は、ヒトなどの動物における免疫応答を刺激する能力を伴う、免疫原性成分を指す場合がある。このような免疫応答は、全身性免疫応答の場合もあり、かつ／または例えば、腸粘膜および／もしくは肺粘膜における、粘膜性免疫応答の場合もあり、これらは、体液性免疫応答を刺激する場合もあり、かつ／または細胞媒介性免疫応答を刺激する場合もある。免疫原性成分は、特異的作用物質と会合する、エピトープまたは標的（「抗原」）、例えば、動物において疾患を引き起こすことが可能な、細菌またはウイルスなどの作用物質と会合する、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、糖タンパク質、多糖、核酸、またはこれらの任意の変異体もしくは断片を表しうる。免疫原性成分は、動物における、作用物質特異的免疫応答を刺激するか、またはこれを刺激する一助となることが可能な、組換え抗原を含む抗原でありうる。

20

【0012】

「薬学的に許容可能な担体」という用語は、その中で、医薬剤が混合されうる物質、例えば、医薬剤と混合して、溶液またはエマルジョンをもたらすことが可能な液体、および、例えば、*in vivo*において、医薬剤を投与するのに適する物質を指す。「薬学的に許容される担体」という用語は、リン酸緩衝生理食塩液（PBS）など、当業者に公知の物質を包摂する。好ましくは、二相性製剤中の医薬担体（すなわち、それぞれ、ベシクル内に封入される医薬担体、および製剤を再構成するのに使用される医薬担体）は、同じ医薬担体である。

【0013】

「医薬ベシクル製剤」という用語は、ベシクル成分から形成された複数のベシクルであって、それらの中に薬学的に許容可能な担体中の医薬剤が封入された（すなわち、それらの中に封入され、かつ／またはそれらに結合した）、複数のベシクルを指す。

30

方法ステップa) およびb) に関して、加熱される成分に有害でない加熱温度が使用されるべきことが理解されるものとする。ステップa) について、ベシクル成分は、約130℃の温度で加熱されうる。しかし、市販の自動式実験室装置（例えば、Precision Nanosystem製のNanoassembler（登録商標）などのマイクロフルイディクスデバイス）の使用を包摂する方法は、低温、例えば、65℃を利用しうる。低温で行われるステップa) について、ベシクル成分は、有機溶媒、例えば、濃度を100%とするメタノールの存在下で加熱されうる。

40

好ましくは、ステップb) の方法に関して、加熱温度は50℃～60℃、特に60℃である。

【0014】

ステップd) に関して、「～を加工すること」という用語は、非限定例に従えば、ベシクル成分／医薬剤－担体混合物から、医薬剤を封入するベシクルをもたらすことを可能とする実験室工程などの実験室工程を含む。

製剤混合物は、振とうおよび後続のペレット化により加工されうる。例えば、2500rpmで、2分間にわたる、ボルテクシングによる振とう工程が適用されうる。代替的に、プローブ型のホモジナイザーも使用されうる。その後における、製剤混合物の濃縮は、遠心分離により達成されうる。好ましくは、製剤混合物は、例えば、100,000×g

50

で、1時間にわたる、超遠心分離によりペレット化されうる。代替的に、ペレット化は、スピнкаラムを使用するサイズ除外濾過などのサイズ除外濾過を介しても達成されうる。スピнкаラム法は、自動式実験室装置上で調製されるベシクルに、特に適する。例えば、Nanoassembler（登録商標）上で調製されたベシクルは、VivaSpinカラムにより、封入されていない薬物から分離されうる。

【0015】

好ましくは、加工の後、ベシクル内に封入された医薬剤の濃度は、例えば、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、ブラッドフォードアッセイ、またはニンヒドリンアッセイにより測定される。

「二相性医薬ベシクル製剤」という用語は、ある量の医薬剤は、ベシクル内に封入される（すなわち、それらに結合させられ、かつ／またはそれらの中に封入される）が、残りの医薬剤は、ベシクルが懸濁させられる水溶液中に遊離する（すなわち、ベシクルに結合させられず、かつ／またはこれらの中に封入されていない）形でデザインされた製剤を指す。二相性医薬ベシクル製剤は、典型的に、医薬剤が、溶液中に所定の濃度の、同じ医薬剤に結合させられた／この中に封入されたベシクルを再懸濁させることにより調製される。好ましい組合せは、結合／封入抗生剤の、遊離抗生剤に対する50／50比、または平衡製剤もしくは安定製剤を達成するのに必要な比である。

【0016】

本発明者らは、医薬ベシクル製剤を作製するための方法であって、医薬剤を、ベシクル担体に結合させ、かつ／またはこの中に封入する手法を最適化し、反復的な試験により、このような製剤が、*in vivo*における医薬の送達および有効性の、ベシクル担体の非存在下で送達される、同じ医薬剤と比べた改善をもたらすことを裏付けることを要求する方法を作出することに成功した。

本発明の方法は、それに、えり抜きの医薬剤が結合させられ、かつ／またはこの中に封入される、生体適合性で生体分解性のベシクルの作製を提供し、前記医薬剤を、動物へと送達するためのプラットフォーム技術を提供する。ベシクルの物理的特性は、本発明者らにより、医薬剤の、細胞への取込みを増強する特性；組織ターゲティング薬物送達を達成するための修飾に適する特性、例えば、病原体が常在しうるので、全病原体の除去の一助となるニッチ；バイオアベイラビリティの増大；合成するのに廉価である特性；および凍結乾燥に適する特性を含む、一連の利点を付与することが示されている。

【0017】

驚くべきことに、本発明の方法は、送達系、特に、経口投与可能な抗生剤を含む、経口投与可能な医薬剤の送達および有効性を改善する、経口送達系を提供する。さらに、方法は、医薬の副作用、特に、抗生剤誘導性の体重減少に対する保護において、送達系に予測外で高度に有意義な利益をもたらす。したがって、ベシクルプラットフォームは、抗微生物剤の経口送達のための利用に対する潜在的可能性を有するだけでなく、また、有害な副作用を引き起こしうる場合もあり、送達の増強を要求する場合もある、ある範囲の他の治療剤に対する潜在的可能性も有する。

本発明者らはまた、本発明の方法が、様々な異なる抗微生物剤を、ベシクル内に封入する（すなわち、ベシクルに結合し、かつ／またはこの中に封入する）能力を有することも示した。二相性製剤は、複数の温度および時点の、液体形態および凍結乾燥形態における安定性のために開発され、評価された。例えば、方法を使用する、抗生剤の製剤の最適化は、 -20°C で保持された場合の安定性と、最小阻害濃度（MIC）および最小殺菌濃度（MBC）について、非製剤化抗生剤と異なる値を伴う、*in vitro*における、完全な抗微生物性活性とを保持することが裏付けられている。全ての被験温度および3カ月間にわたり、凍結乾燥状態で保管された、凍結乾燥二相性製剤の安定性は、使用についての現実的な概念を強調する。適合的であり、かつ／または新規である治療用製剤の安定性は、とりわけ、低温保管が、たやすく利用可能ではない、低中所得国（LMIC）へと販売される場合、ますます大きな関心の対象である。

【0018】

全体として、本発明者らにより考案された方法は、送達の一助となり、*in vivo*における医薬剤の有効性の点で、遊離（すなわち、ベシクル担体に結合させられず、かつ／またはこの中に封入されていない）医薬剤と比較して、明らかな生存上の利点をもたらしうる修飾に対して、極めて適合性である、ベシクルプラットフォーム技術の産出を可能とすることが示されている。さらに、本発明は、反復投与から生じる副作用（主に、体重の減少）に対して、著明に保護する。

本発明のベシクルは、例えば、使用サイトカインが上昇した状態に対する治療剤としての、空のNISV、または修飾NISVを開示する、PCT/GB96/01861において記載されているNISVである。当業者により理解される通り、このようなベシクルは、界面活性剤すなわち、ミセルなどの凝集物を形成する、水不溶性（または油可溶性）成分および水溶性成分の結果として、溶液中にNISVを形成することが可能な化合物；界面活性剤と混合して、ベシクルの物理的特性が依存する二重層を形成することが可能な疎水性物質；ならびにベシクルに、負の電荷を帯びさせることから、ベシクルを安定化させ、効果的な分散をもたらす、電荷産生性の両親媒性物質を含む。

【0019】

本発明に関して、選択されたベシクル成分は、界面活性剤である、モノパルミトイルグリセロールと、両親媒性物質である、コレステロールおよびリン酸ジセチルの形態にある疎水性物質とを含む。これらの特異的化合物は、本発明者らにより、特に、本発明の方法に適することが示されている。

好ましくは、界面活性剤、疎水性物質および両親媒性物質が、それぞれ5：4：1のモル比で提供される。この比は、本発明の方法において特に良好に作用することが示されている。

【0020】

また、PCT/GB96/01861においても記載されている通り、NISVは、*in vivo*における、脂肪、脂肪酸、および脂質の、膜を越える輸送を容易とする物質（本明細書の後出では、このようなベシクルは、「ビロソーム」と称される）を組み込む。したがって、好ましくは、胆汁酸塩が、ベシクル成分中に、かつ／または医薬剤を、薬学的に許容可能な担体中に溶解させる場合に供給される。本発明者らは、ビロソームの送達、腸組織内で、検出可能な毒性を及ぼさず、さらに、抗生剤の、ビロソーム内の経口送達、それぞれ、鼻疽菌および野兔病菌により引き起こされる細菌性疾患についての、2つのマウスモデルにおいて、有意な生存上の利点をもたらしているのを、有利であることを示した。

【0021】

好ましくは、胆汁酸塩は、デオキシコール酸ナトリウム、例えば、PBS中のデオキシコール酸ナトリウムである。

ターゲティングされる細胞または組織が必要とされる適用では、ベシクル成分が、*in vivo*における受容体媒介性輸送機構により認識されるリガンドをさらに含むことが好ましい。

「リガンド」という用語は、タンパク質受容体、例えば、宿主細胞受容体などの生体物質に結合することが可能であり、かつ／またはこれらと複合体を形成しうる物質を指す。リガンドの、本発明の方法により、すなわち、医薬ベシクルの形成時における、ベシクル内の封入、および／またはこれへの結合による組み込みを介して作製されたベシクルとの会合は、医薬ベシクルの、*in vivo*における、特異的障壁を越える輸送、または例えば、宿主受容体媒介性輸送機構の結果としての、*in vivo*における、特異的なニッチ（例えば、細胞型、組織型、または細胞内の環境）への侵入を容易としうる。

【0022】

脳へのターゲティング送達の場合、好ましくは、リガンドは、グルコサミンおよび／もしくはトランスフェリン、またはこれらの任意の変異体もしくは断片である。

タンパク質に関する記載を通して使用される、「変異体」という用語は、野生型配列、またはそれらが由来する塩基配列と異なる、アミノ酸の配列を指す場合があるが、この場

10

20

30

40

50

合、変異体は、野生型配列または塩基配列の、所望の特性を保持する。例えば、トランスフェリンに由来する変異体は、元のトランスフェリンタンパク質と比べて、所望されるレベルの、リガンド構造／機能を保持するので、構造的／機能的変異体であると考えられるであろう。当業者により理解される通り、アミノ酸置換は、「保存的」置換、すなわち、アミノ酸を、同様の特性を伴う、別のアミノ酸で置きかえる置換の場合もあり、「非保存的」置換、すなわち、異なる特性を伴う、別のアミノ酸で置きかえる置換の場合もある。当業者によりさらに理解される通り、適切な変異体は、野生型配列または塩基配列と比較して、好ましくは、少なくとも70%同一、例えば、少なくとも75%同一、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一であり、好ましくは、少なくとも95%同一である。

10

【0023】

タンパク質に関する記載を通して使用される、「断片」という用語は、典型的に、野生型配列または塩基配列の、任意のアミノ酸部分を指す場合があるが、この場合、断片は、野生型配列または塩基配列の、所望の特性（例えば、構造的特性、機能的特性）を保持する。例えば、タンパク質断片は、タンパク質の野生型配列または塩基配列のうちの、5～10アミノ酸の配列であって、特定のエピトープをコードし、したがって、エピトープ断片であると考えられる配列でありうる。

【0024】

本発明者らは、グルコサミン（gNISVを形成する）および／またはトランスフェリン（tNISVを形成する）で修飾されたNISV（本明細書の後出において、このようなベシクルは、「ブレインソーム」と称される）が、BBBを隔てた、それらの送達を増強するように適合しているので有利であることを示した。例えば、これらのグルコサミン修飾NISVおよびトランスフェリン修飾NISVは、抗VEEVモノクローナル抗体である、1A3B-7、特に、ヒト化形である、Hu1A3B-7をロードされて成功している。さらに、抗体をロードされたgNISVも、静脈内注射により、Balb/cマウスに送達され、抗体カーゴが、脳組織内の免疫組織化学により検出され、注射の90分後にピークに達している。このような修飾の利益は、VEEV Hu1A3B-7モノクローナル抗体の、NISV内およびgNISV内のカプセル化が、VEEVのエアロゾルモデルにおける生存を、遊離（非カプセル化）モノクローナル抗体（mAb）と比較して、著明に延長することにより裏付けられている。カプセル化による生存の利点は、肺内および脳内のウイルス負荷の減少と関連する。

20

30

【0025】

好ましくは、グルコサミンは、パルミトイル化グルコサミンである。パルミチン酸は、グルコサミンへと、共有結合的に連結され、グルコサミンの疎水性を増強し、したがって、ベシクルの二重層へと挿入されるその能力を増強する。パルミトイル化グルコサミンは、自動式プロトコールにおいて使用される有機相中の溶解により、ベシクル製剤中に組み入れられうるので、グルコサミンのこの形態（すなわち、変異体）は、gNISVの形成に、特に適する。好ましくは、トランスフェリンは、一級アミン基と反応して、スルフィドリル基を付加する、トラウト試薬を使用してチオール化される。コレステロール部分は、共有結合が、チオール化リガンドと、修飾コレステロールとの間に形成されるように、コレステロール-PEG-マレイミドにより置き換えられる。この配置は、細胞ターゲティングリガンドおよび／または組織ターゲティングリガンドが、ベシクルに接合することを可能とする。コレステロールの、コレステロール-PEG-マレイミドに対する任意の比が想定されるが、特に、4:1が好ましい。他の細胞ターゲティングリガンドおよび／または組織ターゲティングリガンドも、同様に、ベシクルへと接合させられうるので、結果として得られるベシクルを、他の解剖学的ニッチへとターゲティングしうる。

40

好ましくは、医薬剤-担体混合物とベシクル成分とは、それぞれ3:1の比で提供される。本発明者らは、この比が、本発明、特にBBBを越えるように適合したベシクルに特に適することを示した。

【0026】

50

好ましくは、本発明の方法ステップは、g N I S Vおよびt N I S Vなどの修飾ベシクルを調製するために、N a n o A s s e m b l e r（登録商標）上で実施される。

本発明者らは、N I S Vおよびこれらの変異体（ピロソーム；ブレインソーム）の作製を自動化し、迅速にスケールアップする能力の、市販のN a n o A s s e m b l e r（登録商標）装置における裏付けに成功したことを示した。g N I S Vおよびt N I S Vのいずれも、製剤の自動化および迅速なスケールアップを可能とするN a n o A s s e m b l e r（登録商標）を使用して作出された。例えば、ある範囲の抗ウイルス剤（例えば、I F N - α 2 β などのインターフェロン）をロードされたブレインソームを、迅速に作製する、N a n o A s s e m b l e r（登録商標）の、さらなる有用性は、ナノベシクルを、多目的で魅力的な薬物送達技術として際立たせる。加えて、N a n o a s s e m b l e r（登録商標）による、ブレインソームおよびピロソームの作製を、作出されるバッチの、サイズおよびローディングの点における特徴付けを伴い、成功裏にスケールアップし、自動化するための作業も企図されている。

【0027】

医薬ベシクル製剤は、保管および／または販売の前に、凍結および凍結乾燥させられる。この場合、好ましくは、凍結および凍結乾燥の前に、低温保護剤が添加される、例えば、濃度を100mMとするスクロースを添加する。後続の、凍結乾燥バッチの保管、および再水和の後における効能の実証も達成されている。

好ましくは、医薬剤は、抗菌剤および／または抗ウイルス剤である。

本発明者らは、二相性のN I S V製剤およびピロソーム製剤が、M I CアッセイおよびM B Cアッセイにおいて、抗微生物性活性を維持することが示されることを示すことに成功した。本発明者らにより企図された各アッセイでは、ピロソーム製剤化抗生剤は、非製剤化抗生剤と同等の抗微生物性活性を及ぼしたことから、製剤化の工程が、被験抗生剤に有害な作用を及ぼさなかったことを指し示す。さらに、報告されたデータは、ピロソームによる抗生剤の送達は、有意な生存上の利点をもたらすだけでなく、また、抗生剤の反復投与および感染と関連する、体重の減少という、重篤な副作用も低減することを示す。

【0028】

凍結乾燥二相性N I S Vおよびピロソーム抗生剤製剤はまた、i n v i v oにおける、それらの毒性についても評価された。抗生剤のカプセル化は、特に、抗生剤誘導性の体重減少の緩和、および軽微な臓器病態からの保護により、有益であることが理解された。特に、結果は、ピロソームが、マウスのミクロビオームに対して、有害作用を及ぼさなかったことを裏付けた。さらに、粗病態データは、N I S Vおよびピロソームが、例えば、ドキシサイクリンにより引き起こされる組織損傷に対して保護することを示唆した。したがって、本発明の方法により作出される、N I S V製剤およびピロソーム製剤は、十分に忍容され、抗生剤の、反復的な、毎日の投与の副作用に対抗するのに有益な特性を有する。

【0029】

抗菌剤は、 β -ラクタム（例えば、アモキシシリンおよびフルクロキサシリンなどのペニシリン；セファレキシンなどのセファロスポリン）、アミノグリコシド（例えば、ストレプトマイシン、カナマイシン）、クロラムフェニコール、糖ペプチド（例えば、バンコマイシン）、キノロン（例えば、シプロフロキサシン、レボフロキサシンなどのフルオロキノロン）、オキサゾリジノン（例えば、リネゾリド、テジゾリド）、スルホンアミド（例えば、スルファジアジン）、テトラサイクリン（例えば、テトラサイクリン、ドキシサイクリン、オキシテトラサイクリン）、マクロリド（例えば、エリスロマイシン、クラリスロマイシン）、アンサマイシン（例えば、ゲルダナマイシン、リファマイシン）、ストレプトマイシン（例えば、プリスチナマイシンIA）、およびリポペプチド（例えば、ダプトマイシン）を含む抗生剤の群から選択されうる。

好ましくは、抗菌剤は、フルオロキノロンおよびテトラサイクリンを含む群から選択される。

【0030】

さらに好ましくは、抗菌剤は、レボフロキサシン、シプロフロキサシン、およびドキシ

10

20

30

40

50

サイクリンを含む群から選択される。

N I S V 製剤技術およびピロソーム製剤技術は、少なくとも3つの抗生剤（ドキシサイクリン、レボフロキサシン、シプロフロキサシン）の、N I S V およびピロソーム内への封入の成功へと適合させられている。成分（モノパルミトイルグリセロール、リン酸ジセチル、およびコレステロール）の混合物が、迅速に加熱され、選び出された抗生剤が添加され、次いで、抗生剤－ベシクル製剤を形成するように加工される。ピロソーム製剤は、加熱段階後において、抗生剤の溶解と同時に、胆汁酸塩を添加することにより調製される。製剤が伴う抗生剤濃度は、1～100mg/mlでありうる。

【0031】

作出される製剤は、*in vitro* および *in vivo* において、安定であり、抗微生物性活性を保持するので、有利である。例えば、特徴付けは、レボフロキサシンの、N I S V へのカプセル化が、野兎病菌に感染させたハチノスツヅリガ (*galleria*) (適切な無脊椎動物感染モデル) の生存を、著明に延長することを同定した。さらなる *in vivo* データは、ベシクル製剤が、ピロソーム－レボフロキサシン製剤およびピロソーム－ドキシサイクリン製剤のいずれによっても、類鼻疽についてのマウスモデルにおいて、生存率および生存時間を、遊離抗生剤と比較して増大させ、治療有効性を増強することを示唆する。感染についての野兎病菌モデルでも、同様の予備的所見が示されている。本発明者らは、N I S V およびピロソームが、例えば、シプロフロキサシンまたはレボフロキサシンの投与後における、抗生剤誘導性の体重減少に対して保護することを示した。さらに、レボフロキサシンの、経口送達型ピロソーム内のカプセル化は、肝臓内の蓄積を、2倍に増大させ、これにより、この鍵となる臓器内の抗生剤濃度を、より長期にわたり維持することから、肯定的な治療的含意をもたらす。

【0032】

好ましくは、抗菌剤は、30mg/mlの濃度である。工程の持続的な開発の後、30mg/mlの抗生剤出発濃度が、特に、効果的に作用することが見出された。このような濃度は、30mg/mlの濃度の抗生剤を、薬学的に許容可能な担体へと添加することにより達成され、これが、ベシクル成分へと添加され、製剤混合物が加工される。例えば、HPLCによる、任意の、濃度の定量の後、医薬ベシクル製剤は、ベシクル内外でほぼ等しい抗生剤濃度をもたらす、抗生剤の、薬学的に許容可能な担体中の容量および濃度で再懸濁させられた。

【0033】

抗ウイルス剤は、ウイルスの侵入および脱殻の阻害剤、DNAポリメラーゼ阻害剤（例えば、アシクロビル）、mRNA阻害剤（例えば、リバビリン、カルボジン）、放出阻害剤（例えば、ノイラミニダーゼ阻害剤）、および免疫調節剤（例えば、インターフェロン）を含む抗ウイルス剤の群から選択されうる。

好ましくは、抗ウイルス剤は、IFN- γ 、IFN- α 、カルボジン、DZ-13 (Xie et al. Regulatory roles of c-jun in H5N1 influenza virus replication and host inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1842(2014), 2479-88)、および抗ウイルス抗体、またはこれらの任意の変異体もしくは断片を含む群から選択される。

本発明者らにより開発されたブレインソームは、大型の抗体 (VEEV Hu1A3B-7を含む) および／またはサイトカイン（例えば、IFN α 2 β ）を封入することが可能であると示されているので有利である。さらに、gNISVは、*in vivo* における、医薬剤（例えば、IgG Ab）の、脳への送達を、遊離抗体と比較して増強することが示されている。

【0034】

好ましくは、抗ウイルス抗体は、Hu1A3B-7 VEEV mAb、またはこの任意の変異体もしくは断片である。

本出願者らは、NISVおよびgNISVによる、Hu1A3B-7 VEEV mAbの送達、遊離mAbと比較して有利であることを示した。いずれのプラットフォームも、肺内のウイルス負荷を低減し、生存を延長し、死亡率を低減する。gNISVプラット

10

20

30

40

50

フォームは、脳内のウイルス負荷を、著明に低減する。

本発明はまた、第1の態様に従い調製される、医薬ベシクル製剤も提供する。

第2の態様に従い、本発明は、a) モノパルミトイルグリセロール、コレステロールおよびリン酸ジセチルを含むベシクル；b) 医薬剤；ならびにc) 薬学的に許容可能な担体を含む、医薬ベシクル製剤を提供する。

【0035】

好ましくは、モノパルミトイルグリセロール、コレステロールおよびリン酸ジセチルは、それぞれ、5：4：1のモル比で存在する。

好ましくは、医薬ベシクル製剤は、*in vivo*における受容体媒介性輸送機構により認識されるリガンドをさらに含む。

好ましくは、リガンドは、グルコサミンおよび／もしくはトランスフェリン、またはこれらの任意の変異体もしくは断片である。

好ましくは、医薬ベシクル製剤のベシクル成分は、50～4000 nmのサイズである。抗生剤を封入したベシクルについて、ベシクル成分は、好ましくは、2700～3400 nmである。ブレインソーム（例えば、抗体を封入したブレインソーム）として修飾されたベシクルについて、サイズは、好ましくは、100～600 nmである。

【0036】

好ましくは、医薬剤は、抗菌剤および／または抗ウイルス剤である。

好ましくは、抗菌剤は、フルオロキノロンおよびテトラサイクリンを含む群から選択される。

好ましくは、抗菌剤は、レボフロキサシン、シプロフロキサシン、およびドキシサイクリンを含む群から選択される。

好ましくは、抗菌剤は、30 mg/mlの濃度で存在する。

好ましくは、抗ウイルス剤は、IFN- γ 、IFN- α 、カルボジン、DZ-13、および抗ウイルス抗体、またはこれらの任意の変異体もしくは断片を含む群から選択される。

好ましくは、抗ウイルス抗体は、Hu1A3B-7 VEEV mAb、またはこの任意の変異体もしくは断片である。

【0037】

第3の態様に従い、本発明は、第2の態様に従う医薬ベシクル製剤を含む医薬キットを提供する。

第4の態様に従い、本発明は、医薬としての使用のための、第2の態様に従う医薬ベシクル製剤、または第3の態様に従う医薬キットを提供する。

好ましくは、本発明は、動物における感染の防止または処置のための医薬としての使用のための、第2の態様に従う医薬ベシクル製剤、または第3の態様に従う医薬キットを提供する。

【0038】

本発明の医薬ベシクル製剤は、任意の投与経路、例えば、筋内（筋肉への）投与、皮下（皮膚の下への）投与、皮内（皮膚への）投与、腹膜内（腹膜の体腔への）投与、静脈内（静脈への）投与、鼻腔内（鼻腔を介する）投与、または吸入投与を介する非経口送達を介して、動物へと投与されることが想定される。しかし、特に、ビロソームについて、医薬ベシクル製剤は、経口経路を介して、動物へと投与されることが好ましい。驚くべきことに、本発明の医薬ベシクル製剤は、既にバイオアベイラビリティを有する医薬剤の、動物における、抗生剤誘導性の体重減少に対する保護；時間経過にわたる、標的組織への貯留および濃縮の改善；免疫調節効果をもたらすこと；ならびに腸内、特に、に対する腸マイクロビオームにおける毒性を付与しないことを含む利益を増進することが示されている。

【0039】

好ましくは、動物は、ヒトである。

好ましくは、本発明は、類鼻疽菌、野兎病菌、またはVEEVによる感染の防止または処置における使用のための、第2の態様に従う医薬ベシクル製剤、または第3の態様に従

10

20

30

40

50

う医薬キットを提供する。

本発明はまた、第1の態様に従う医薬ベシクル製剤を調製するための、N a n o A s s e m b l e r（登録商標）の使用も提供する。

本発明の一態様における、任意の特色は、任意の適切な組合せで、本発明の、他の任意の態様へと適用されうる。特に、方法態様は、医薬ベシクル製剤態様、医薬キット態様、および／または使用態様へと適用されることが可能であり、この逆もまた成立しうる。本発明の方法は、実施例を参照することにより、実質的に、本明細書で記載される通りに、医薬ベシクル製剤、医薬キット、および使用へと拡張される。

全ての態様では、本発明は、任意の特色または特色の組合せを含みうるか、これらから本質的になりうるか、またはこれらからなりうる。

ここで、本発明は、以下の、非限定的な実施例および図面を参照しながら記載される。

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図1】液体フォーマットまたは凍結乾燥フォーマットの温度範囲で保管された場合における、二相性製剤の安定性を裏付けるグラフである。

【図2】ハチノスツツリガ（*Galleria mellonella*）モデルにおける、N I S V内で製剤化されたレボフロキサシンの抗微生物機能についての、i n v i v o評価についてのグラフである。

【図3】抗生剤の、二相性N I S V製剤およびピロソーム製剤：体重変化についての、反復投与忍容性研究についてのグラフである。

【図4】反復安全性／毒性研究のための、マウス対照群における体重変化を裏付けるグラフである。

【図5】反復安全性／毒性研究の、レボフロキサシン製剤の、毎日の投与後における、マウスの体重変化を裏付けるグラフである。

【図6】反復安全性／毒性研究の、ドキシサイクリン（*doxycycline*）製剤の、毎日の投与後における、マウスの体重変化を裏付けるグラフである。

【図7】反復安全性／毒性研究の、シプロフロキサシン製剤の、毎日の投与後における、マウスの体重変化を裏付けるグラフである。

【図8】抗生剤製剤による処置後における、広範なミクロビーム解析についてのグラフである。

【図9】N I S Vの存在下における、樹状細胞の活性化のモジュレーションについてのグラフである。

【図10】鼻疽菌のエアロゾルモデルにおける、ピロソームーレボフロキサシンの、遊離レボフロキサシンと比較した効果についてのグラフである。

【図11】鼻疽菌のエアロゾルモデルにおける、ピロソームードキシサイクリンの、遊離ドキシサイクリンと比較した効果についてのグラフである。

【図12】鼻疽菌のエアロゾル抗原投与への曝露、およびピロソームーレボフロキサシンまたは遊離レボフロキサシンによる処置の後における、動物の体重データについてのグラフである。

【図13】野兔病菌のエアロゾルモデルにおける、ピロソームーレボフロキサシンの、遊離レボフロキサシンと比較した効果についてのグラフである。

【図14】マウス組織内の、ウサギI g G抗体の貯留についてのグラフである。

【図15】Hu1A3B-7 V E E V m A bの異なる製剤による処置後における、マウス臓器内のウイルス負荷についてのグラフである。

【図16】異なるHu1A3B-7 V E E V m A bによる処置後における、V E E Vのエアロゾルモデルにおける、マウスの生存についてのグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0041】

本発明の方法は、医薬ベシクル製剤を調製するための方法であって、a) モノパルミトイルグリセロール、コレステロールおよびリン酸ジセチルを含むベシクル成分を50℃～

10

20

30

40

50

150℃の範囲の温度で加熱するステップ；b) 医薬剤を薬学的に許容可能な担体中に溶解させ、得られた医薬剤－担体混合物を30～99℃の範囲で加熱するステップ；c) 医薬剤－担体混合物をベシクル成分に添加して、製剤混合物をもたらすステップ；ならびにd) 製剤混合物を加工して、医薬剤と担体とが複数のベシクル内に封入された医薬ベシクル製剤を形成するステップを含み、医薬ベシクル製剤が薬学的に許容可能な担体中に溶解した、既知数量の医薬剤に復元されて、二相性医薬ベシクル製剤をもたらす方法を提供する。

【0042】

特に、本発明の方法が、送達系、特に、経口投与可能な抗生剤を含む、経口投与可能な医薬剤の送達および有効性を改善する、経口送達系を提供することを裏付ける、多様な研究が実行されている。さらに、方法は、医薬の副作用、例えば、抗生剤誘導性の体重減少に対する保護において、送達系に、予測外かつ高度に有意義な利益をもたらす。特に、本発明者らは、鼻疽菌、野兔病菌、およびVEEVに対する、本発明の有効性を示した。

【0043】

材料および方法

抗生剤

抗生剤である、レボフロキサシン $\geq 98.0\%$ (HPLC)、ドキシサイクリンハイクレート $\geq 98.0\%$ (HPLC)、およびシプロフロキサシン (Sigma-Aldrich) は、乾燥粉末形態で得、全ての研究で使用した。ピロソーム製剤を作り、非製剤化薬物として投与するために、抗生剤をPBS中に所定の濃度で懸濁させた。

【0044】

VEEVモノクローナル抗体の合成

ヒト化抗VEEVモノクローナル抗体は、既に記載されている通りに作製した (S.A. Goodchild, L.M. O'Brien, J. Steven, M.R. Muller, O.J. Lanning, C.H. Logue, R.V. D'Elia, R.J. Phillpotts, S.D. Perkins. A humanised murine monoclonal antibody with broad serogroup specificity protects mice from challenge with Venezuelan equine encephalitis virus. Antiviral Res., 90(2011), 1-8)。略述すると、Hu1A3B-7を発現させるベクターをトランスフェクトしたCHO DG44細胞を、10% (容量/容量) FBS、1%抗真菌剤、25mgのゲンタマイシン、1mMのピルビン酸ナトリウム、2mMのグルタミン、1% (容量/容量) ペニシリン/ストレプトマイシン、1% (容量/容量) の非必須アミノ酸および1% (容量/容量) の必須アミノ酸 (Gibco)、ならびに10mMのメトトレキサート (Sigma) を補充した、IMDM培地中で培養した。Prosep-A (Millipore) を使用する、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーを使用して、ヒト化抗体を精製し、PBSに透析した。

【0045】

細菌

類鼻疽菌の臨床分離株である、K96423を、in vitro研究およびin vivo研究のために使用した。細菌をエアロゾル抗原投与のために、回転プラットフォーム上、37℃のルリア培養液中で増殖させ、L-寒天プレート上で数え上げた。

野兔病菌株であるLVSは、DSTLの培養物コレクション内、-20℃で保管されたワクチンアンプルから導出した。細菌を、補充BCGA (blood cysteine glucose agar) 上、37℃で一晩にわたり培養し、PBSに採取し、0.15～0.20の間のOD₆₀₀ (1mL当たり 1×10^9 CFU) を得るように希釈した。抗原投与のための細菌数は、試料の系列希釈 (1:10) において寒天上で決定した。

【0046】

ウイルス調製物

組織培養物：L929細胞系 (マウス線維芽細胞) およびVero (サル腎臓) 細胞系 (European Collection of Animal Cell Cultures, UK) を、推奨される培養培地を使用する、標準的方法により繁殖させた。実験

の目的で、細胞を、2%（容量／容量）のウシ胎仔血清、2 mMのL-グルタミン、50 U/mlのペニシリン、および50 µg/mlのストレプトマイシン（L15 MM）を補充した、ライボピッツL-15培地中で維持した。培地および補充物質は全て、Sigma-Aldrich（UK）により供給された。

【0047】

原液：強毒力ウイルス株VEEV株である、TrDを調製するために、哺乳マウスに約103 pfuのウイルスを脳内感染させた。感染脳を24時間後に摘出し、L15 MM中に10%の組織懸濁液として調製し、10,000×gで15分間にわたる遠心分離により清明化させた。力価は、Ver o細胞内のカルボキシメチルセルロースオーバーレイ下におけるプラーク形成により決定した。

ウイルスの滴定：ウイルスの力価は、Ver o細胞内の、1.5%（質量／容量）のカルボキシメチルセルロースオーバーレイ下におけるプラーク形成により決定した。略述すると、細胞を、24ウェルプレートに播種し（ウェル1つ当たりの細胞1×10⁵個）、一晩にわたりインキュベートした。培地を除去し、細胞に、L15 MM中で希釈されたウイルス100 µlをオーバーレイした。室温で30分間にわたるインキュベーションの後、3%（質量／容量）のカルボキシメチルセルロース中で希釈された、2倍濃度のL15 MM 1 mlを、各ウェルに、注意深く添加した。細胞を、72時間にわたりインキュベートし、10%（容量／容量）のホルマール生理食塩液で、一晩にわたり固定し、次いで、0.1%（質量／容量）のクリスタルバイオレットで染色した。プラークをカウントし、ウイルスの量を計算した。

【0048】

単相性および二相性の、NISV製剤およびピロソーム製剤の調製

略述すると、1-モノパルミトイルグリセロール、コレステロール、およびリン酸ジセチルを、5：4：1のモル比で組み合わせ、130℃に加熱した。NISVを調製するために、PBS中に30 mg/mlの、関与性の抗生剤を添加した。ピロソームのために、0.025 Mの炭酸緩衝液中に、デオキシコール酸ナトリウムを伴う、30 mg/mlの関与性の抗生剤を添加した。ベシクル成分への添加の前に、抗生剤を60℃にあらかじめ加熱した。その後、調製物を2分間にわたり十分にボルテクシングした。抗生剤は、ベシクルの形成に応じて封入されるか、または5サイクルにわたる凍結－融解の後で封入された。封入されなかった抗生剤は、遠心分離を介して除去し、ペレット化させ、ベシクルを単相性調製物に適切な緩衝液中、または二相性調製物をもたらすように、ある量の適切な抗生剤を、ベシクル内に封入された抗生剤と同等な濃度（すなわち、50／50の封入調製物：遊離調製物）で含有する、適切な緩衝液中に再懸濁させた。

【0049】

NISVは、24.8 mgのモノパルミトイルグリセロール、8.2 mgのジセチルリン酸、および23.2 mgのコレステロールを130℃で溶融させ、加熱されたPBS 5 mlを添加し、2分間にわたりボルテクシングすることにより作った。超音波処理ベシクルは、同じベシクル成分を5 mlのPBS中で混合し、60分間にわたり90℃に加熱することにより作った。その後、プローブ型超音波処理装置を使用して最大能力の20%で4分間にわたり超音波処理した。無菌性を確保するため、X225照射装置を毎分2.2 Gyで10 Gyの最終線量まで使用して、全てのベシクル試料を照射した。

【0050】

N-パルミトイルグルコサミン（NPG）の合成

86.3 mgのグルコサミンを93 µlのトリエタノールアミンおよび15 mlのジメチルスルホキシド中で溶解させた。次いで、この混合物を283 mgのパルミチン酸N-ヒドロキシスクシンイミドに添加し、4 mlのクロロホルム中で溶解させた。溶液を暗所内、室温で48時間にわたり攪拌した。ミックスを冷却し、氷冷水を添加することにより、パルミトイル化グルコサミンを析出させた。次いで、ミックスを真空フィルターに適用して、析出物を分離した。個別の水、クロロホルム、およびエタノールによる洗浄をパルミトイル化グルコサミンに適用してから、40℃で、48時間にわたり乾燥させた。

【0051】

ヒトホロトランスフェリンによるチオール化

トランスフェリンを10倍モル過剰量のトラウト試薬と、25℃で1時間にわたり混合することにより、ヒトホロトランスフェリンをチオールで修飾した。過剰量のトラウト試薬は、分子量カットオフを5kDaとするVivaspin 6カラムを使用して除去した。

【0052】

マイクロフルイディクスを使用する、ベシクルの調製

ベシクルは、NanoAssembler (商標) benchtop (Precision Nanosystems) を、60℃の温度で保持された、300μmのSHM (staggered herringbone micromixer) チップと共に使用して調製した。ベシクル成分：パルミチン、コレステロール、およびリン酸ジセチルを、メタノール (menthol) 中に、5.62mg/mlの総濃度、5:4:1の比で可溶化させ、60℃に加熱した。抗体 (ウサギIgG、mAbである、Hu1A3B-7、またはヒトIgG-FITC) を、PBS中に、2mg/mlで可溶化させた。水流と、溶媒流とを、12ml/分の組合せ流量、3:1の比で混合した。薬物のカプセル化と、ベシクルの製剤化は、マイクロフルイディクスタップ内で、同時に生じる。メタノールおよび封入されなかった薬物は、分子量カットオフを300kDaとする、Vivaspin 20 (Sartorius) スピнкаラムを使用して除去した。封入された抗体の濃度は、標準的なブラッドフォードアッセイを使用して決定した。gNISVは、6.4mgの

パルミトイル化グルコサミンを、メタノール中に溶解させたベシクル成分に添加して、同様に調製した。tNISVは、PEG-マレイミドを、NISVミックス中に組み入れることにより合成した。メタノールおよび封入されなかったカーゴを除去した後、ベシクルを、チオール化トランスフェリンと共に、25℃で、1時間にわたりインキュベートした。次いで、過剰量のトランスフェリンは、分子量カットオフを100kDaとする、Vivaspin 20カラムを使用して除去した。

【0053】

ベシクル製剤のための凍結乾燥

スクロースをNISV調製物に100mMの濃度まで添加した。24時間後、Christ Epsilon 2-4LD Freeze Dryer内で凍結乾燥させる前に、調製物を-80℃で静置し、復水器温度を-70℃として、-40℃で48時間にわたり乾燥させた。

ビロソームの、生物物理的特徴付け

ビロソーム調製物の大型バッチを凍結乾燥および保管のために製剤化およびアリコート分割した。アリコートを要求される通りに回収し、逆浸透水中に再懸濁させるのに続き、十分に振とうした。ベシクルサイズおよびゼータポテンシャルは、Malvern Zetasizer (Zetasizer 3000HS, Malvern Instruments Ltd., UK) を使用して決定した。遠心分離によりベシクルをペレット化させ、HPLCを使用して、封入された抗生剤含量を決定した。

【0054】

HPLC法

HPLC解析は、50℃で維持されたC18カラム (150mm×4.6mm、5μm) を使用して、Agilent 1290 Infinity Series HPLC上で実行した。抗生剤 (ドキシサイクリン、レボフロキサシンおよびシプロフロキサシン) のための移動相は、H₃PO₄およびアセトニトリルまたはメタノールにより、pH2とした、0.02MのNa₂HPO₄からなった。

安定性研究

NISV調製物およびビロソーム調製物の各々の大型バッチを製剤化し、アリコートを-20℃、4℃、室温、および37℃で、液体製剤または凍結乾燥調製物として静置した。アリコートを多様な時点において回収し、凍結乾燥調製物を逆浸透水中に再懸濁させる

10

20

30

40

50

のに続き、十分に振とうした。ベシクルサイズおよびゼータポテンシャルは、Malvern Zeta-sizer (Zetasizer 3000HS, Malvern Instruments Ltd., UK) を使用して決定した。遠心分離により、ベシクルをペレット化させ、HPLCを使用して、封入された抗生剤含量を決定した。

PK/PD研究

NI SV 製剤化抗生剤およびピロソーム製剤化抗生剤 (50~100 mg/kg) の凍結乾燥調製物を、逆浸透水中に再懸濁させ、腹腔内経路または強制経口投与により、動物に投与した。他のマウス群は、同一濃度の抗生剤を、溶液として施された。初期実験では、血液を、24時間後までの時点において、浅静脈切開から得た。後続の実験では、マウスを終末麻酔により殺し、血液を心臓および肺から回収し、肝臓および脾臓を摘出した。各組織を秤量し、ホモジナイゼーションの前に、4倍容量の生理食塩液を添加した。試料を除タンパク質処理し、0.2 μmのPFTFフィルターに通した。

【0055】

最小阻害濃度 (MIC)

抗生剤製剤についてのMICは、Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) ガイドラインに従い、培養液微量希釈法を使用して、鼻疽菌株であるK96243、および野兔病菌であるSchuS4について決定した。アッセイは、96ウェルマイクロ滴定プレート内のアイソセンシテテスト培養液 (BSAC) もしくはミュラーヒントン培養液 (CLSI)、または病原体の要求に適する培養液中の抗生剤濃度を64 mg/L~0.03 mg/Lの範囲とし、細菌の最終濃度を1 mL当たり約 5×10^5 CFUとして実施した。37℃で、24時間にわたるインキュベーション後、プレートの光学濃度 (OD) を自動式プレートリーダー内、590 nmの波長で読み取った。MICは、細菌の増殖のうちの>80%を阻害する濃度として決定した。

【0056】

最小殺菌濃度 (MBC)

抗生剤製剤についてのMBCは、増殖を示さない、100 μLのMIC希釈液アリコートをして寒天プレートまたはBCGAプレートに三連で播種し、37℃で48時間にわたりインキュベートすることにより決定した。MBCは、元の接種物中の細菌のうちの99.9%を死滅させる抗生剤の最低濃度として記録した。

ハチノスツツリガ感染

ハチノスツツリガ (*G. mellonella*) の幼虫を暗所で保管した。全てのアッセイで体重0.2~0.3 gの幼虫を利用した。10 mLのハミルトンシリンジを使用して、左最後部腹脚を介して、接種物 (幼虫1匹当たり 3×10^6 CFUの野兔病菌LVS) のアリコート10 mLを、各幼虫の血体腔に注射した。感染の後、幼虫をプラスチック製容器内でインキュベートした。10 mLのハミルトンシリンジはまた、感染の24時間後において、抗微生物剤 (レボフロキサシン15 mg/kg) および対照 (PBS) を注射するのにも使用した。幼虫は、接触に応答した動きを提示しなくなったら、死んだと考えた。

【0057】

ミクロビオーム研究および毒性研究

BALB/cマウスをマウス12匹ずつの群に割り付け、1~7日目に経口経路 (10 mg/mLの濃度で、毎日0.1 mL) を介してPBS、空のピロソーム、空のNI SV、抗生剤、NI SV-抗生剤、またはピロソーム-抗生剤で処置した。糞便試料を処置の3日前、最終投与の24時間後 (8日目)、処置の停止の14日後 (22日目)、および28日後 (36日目) に回収した。動物の体重および状態を、毎日記録した。8日目に、各群内の半分のマウスを殺し、血清、小腸、および大腸を回収した。血清試料は、-80℃で凍結させて保管し、大腸および小腸は、内容物を除去し、渦巻き状に巻き、10%ホルマリン中で固定した。残りのマウスは、さらに28日間にわたり、秤量および観察してから、8日目に殺したマウスについて記載した通りに、殺し、血清および組織を採取した。

【0058】

DNAの抽出およびbTEFAP（登録商標）

製造元の指示書に従い、Power Soil（登録商標）DNA単離キット（Qiagen）を使用して、ゲノムDNAを糞便試料から単離した。推奨される、250mgの土壌に対する代替物として、細胞の溶解を経るように、約200mgの糞便試料をPowerBeadチューブに添加した。50μLのC6液を使用して、精製DNAをスピンフィルターから溶出させ、PCR増幅まで、-20℃で保管した。

16Sのユニバーサル真正細菌プライマーである、515F GTGCCAGCMGC CGCGGTAAおよび806R GGA CTACHVGGGTWTC TAATを利用して、bTEFAP（登録商標）DNA解析サービスを介する方法により、各試料の微生物環境を、HiSeq 2500上で査定した。各試料は、HotStarTaq Plus Master Mix Kit（Qiagen、Valencia、CA）を、以下の条件：94℃で3分間に続き、94℃で30秒間；53℃で40秒間；および72℃で1分間の28サイクル下で使用する、単一ステップの、30サイクルのPCRを受け；この後、72℃で5分間にわたる、最終的な伸長ステップを実施した。PCRの後、異なる試料からの、全ての単位複製配列産物を、等濃度で混合し、Agencourt Ampure beads（Agencourt Bioscience Corporation、MA、USA）を使用して精製した。製造元のプロトコールに従い、Illumina HiSeq化学反応を利用して、試料をシーケンシングした。

【0059】

特許権のある解析パイプライン（www.mrdnablab.com、MR DNA、Shallowater、TX）を使用して、シーケンシングから導出された、Q25配列データを加工した。配列から、バーコードおよびプライマーを取り外し、次いで、<200bpの短い配列を除去し、塩基判定が不明確な配列を除去し、6bpを超えるホモポリマーの連なりを伴う配列も除去した。次いで、配列を脱ノイズ化し、キメラ配列を除去した。OTU（operational taxonomic unit）は、3%の多様性（97%の類似性）でクラスター化し、シングルトン配列を除去した後で規定した。次いで、BLASTnを、GreenGenes/RDP/NCBIから導出され、集成されたデータベースに対して使用して、OTUを、分類学的に分類し、各分類学的レベルの、「カウント」ファイルおよび「百分率」ファイルの両方にコンパイルした。カウントファイルが、各試料中で、指定された分類学的分類にマップされる配列の、実際の配列数を含有するのに対し、パーセントファイルは、これらの相対百分率（比率）を含有する。

【0060】

XLstat、NCSS 2007、「R」、およびNCSS 2010を含む、様々なコンピュータパッケージを使用して統計学的解析を実施した。アルファ多様性解析およびベータ多様性解析は、既に記載されている通り、Qiime（www.qiime.org）を使用して行った。

【0061】

樹状細胞の活性化

骨髄細胞は、8週齢の雄BALB/cマウスの大腿骨から得、GM-CSFエンリッチ完全DMEM（DMEM10%ウシ胎仔血清、100U/mlのペニシリン、100μg/mlストレプトマイシン、および2mMのL-グルタミン）を使用して、樹状細胞に分化させた。これは、定期的に、80%のCD11c+細胞を結果としてもたす。次いで、BMDcを、24ウェル組織培養プレート上、完全RPMI（RPMI1640、10%のウシ胎仔血清、100U/mlのペニシリン、100μg/mlのストレプトマイシン、および2mMのL-グルタミン）中に、ウェル1つ当たりの細胞1×10⁶個で播種し、LPS（3μg/ml）で刺激するか、または対照として、非刺激のまま放置した。同時に、細胞を、溶融法により作製されたNISV、もしくは超音波処理法により作製されたNISVで処置するか、非処置のまま放置した。24時間後に、細胞を採取し、フローサイトメトリーによる解析の前に、抗CD40-APC、抗CD80-PerCP、およ

10

20

30

40

50

び抗CD86-PE-Cy7の1/100希釈液で染色した。補償電圧および光電子倍增管電圧は、単一染色対照を使用して設定した。FMO (fluorescence minus one) 対照は、適正なゲーティング戦略を同定するために使用し、陰性対照を作製するために使用した。

【0062】

動物感染研究

6～8週齢の雌BALB/cマウス (Charles River, UK) を、クラスIII高格納精度の堅固なアイソレーターに移し、そこで、不断の給餌および給水を施し、少なくとも5日間にわたり馴致させた。マウスを、処置群 (群1つ当たり15匹) に割り付け、5つのケージで飼育した。コンピュータ制御型送達プラットフォーム (Biaera Technologies) を使用して、マウスに、鼻腔限定曝露システムにより、エアロゾル経路を介して、50～100CFU (10MLD) の、鼻疽菌であるK96243、または野兎病菌であるSchuS4を抗原投与した。抗生剤投与を、感染の6時間後に開始する、最適用量未満の治療研究デザインを使用し、毎日1回7日間だけにわたり投与して、治療有効性について調べた。抗生剤であるレボフロキサシンおよびドキシサイクリンを、50mg/kgで、毎日、経口経路により送達し、処置を、7日間にわたり継続した。処置群は、ピロソーム送達型抗生剤または非製剤化抗生剤を含んだ。処置群1つ当たりのマウス5匹ずつの垂群を、感染後3日目に殺処分して、肺、脾臓、および肝臓における細菌負荷を決定した。Biaeraエアロゾルデバイスを使用して、マウスに、エアロゾルによるVEEV Trinidad Donkey Strainを抗原投与した。マウスを、毎日2回ずつチェックし、臨床症状について評価し、マウスを、毎日秤量した。所定の客観的臨床徴候のセットに基づき、人道的限界に達したマウスは、速やかに殺処分した。異なる時点において、一部のマウスについては、生存時間を記録し、他のマウスは、組織を解析するために殺処分した。全ての手順および飼育は、UK Animal (Scientific Procedures) Act (1986) に準拠した。

【0063】

組織内のウイルスの滴定

マウス組織 (脳、肺、肝臓、および脾臓) 内に存在するVEEV株であるTrDの量は、Vero細胞内の滴定により決定した。組織を除去し、70μmのナイロン製の細胞ストレイナー (BD Falcon) に通すことにより、2mLのL15MM中でホモジナイズした。次いで、細胞懸濁液を、L15MM中で、系列希釈 (1:10) した。希釈されたホモジネート (100μL) を、単層コンフルエントのVero細胞を含有する、24ウェルプレートのウェルに添加した。細胞を、72時間にわたりインキュベートし、この時間の後、10% (容量/容量) のホルマリン生理食塩水を添加することにより、単層を固定し、0.1% (重量/容量) のクリスタルバイオレットで染色した。

【0064】

サイトカイン解析

サイトカイン解析のために、細胞懸濁液の200mLアリコートを、2000rpmで、5分間にわたり遠心分離した。サイトカイン解析のために、上清を除去し、-80℃で保管した。サイトカインのレベルは、製造元の指示書に従い使用される、23プレックスマウスLuminexアレイ (Bio-Rad) を介して測定した。加えて、洗浄ステップのために、磁気プレート洗浄機 (Bio-Rad) を使用し、最終的に、PBS中に4%のパラホルムアルデヒドを、4℃で、少なくとも24時間にわたり使用して、試料を固定した。

【0065】

免疫組織化学

ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織試料を使用して、組織中のウサギIgGを位置特定するプロトコルを標準化した。キシレンならびにエタノールおよび水の段階系列を使用し、最後に、TBSで処理して、組織切片を、脱パラフィン化および再水させた。プロテイナーゼKによる酵素的消化 (DAKO)、ならびにpH6.0およびp

10

20

30

40

50

H 9 . 0 の緩衝液 (D A K O) による高温抗原賦活化 (H T A R) を含む、いくつかの方法を使用して、4 μ m の組織切片内の抗原を賦活化させた。プロテイナーゼ K 前処理により、最良の結果が得られた。酵素的消化を停止させた (T B S 中で 3 回の洗浄) のに続き、ポリクローナルヤギ抗ウサギ I g G A l e x a 5 6 8 標識抗体を伴うインキュベーション (室温および 1 : 1 0 0 の希釈率で 3 0 分間にわたる) を行った。T B S により 3 回にわたる洗浄の後、V e c t a s h i e l d a n t i f a d e h a r d s e t 封入剤 (V e c t o r l a b o r a t o r i e s) を使用して、スライドに封入し、N i k o n N i - S E 顕微鏡内の蛍光下で研究した。

同様に、同じ抗原賦活化法 (プロテイナーゼ K) を使用して、光学顕微鏡による、ウサギ I g G の免疫組織学的検出のためにも、組織切片を使用した。脱ろう / 再水和プロトコールは、メタノール中の過酸化水素溶液を使用して、内因性ペルオキシダーゼをクエンチングするステップを含んだ。ピオチニル化ヤギ抗ウサギ I g G ポリクローナル抗体 (P i e r c e) (室温で、1 : 2 0 0 に希釈して、3 0 分間にわたる) に続き、アビジン-ビオチンペルオキシダーゼ複合体反応 (P i e r c e) を行った。N O V A R E D (V e c t o r) を使用して、反応を生じさせた。

デジタル画像解析のために、F F P E 切片を、免疫組織化学で染色した。画像解析ソフトウェア (N i k o n B r - N I S) を使用して、平均値強度を計算した。最大強度を 1 0 0 とする。

【 0 0 6 6 】

統計学的解析

プログラムである、S P S S V 2 1 . 0 (I B M) または G r a p h p a d P R I S M V 6 . 0 を使用して、様々な統計学的解析を実施した。G r a p h p a d P R I S M V 6 . 0 を使用して、グラフを構築した。ログランク検定を使用して、生存データを比較した。連続データは、条件が満たされる場合 (ガウス分布、および不等分散のためのルビン / バートレット検定について評価する Q Q プロット) は、パラメトリック解析 (A N O V A 、 T 検定、G L M) により解析し、これらの基準が満たされない場合は、ノンパラメトリック検定 (クラスカル-ワリス、マン-ホイットニー、ムード) により解析した。場合によって、対数変換などの変換を使用して、パラメトリック基準に達することも可能であった。二値データについては、分割表を使用した。ファミリーワイズエラーのための多重検定補正は、解析との個別の比較時に実施した。これらは、ボンフェローニ補正およびダン補正を含んだ。

【 0 0 6 7 】

結果

カプセル化の効率および安定性についての評価

カプセル化の効率は、遠心分離により、封入されなかった抗生剤を除去し、H P L C を介する、速やかな解析のために、ペレットを、適切な緩衝液中に再懸濁させることにより決定した。生成された値は、ベシクルに封入された抗生剤の量を表す。定量のために、H P L C を使用して、単相性製剤および二相性製剤の両方を、時間経過にわたる、抗生剤の、各製剤型中の貯留により決定される安定性について調べた。N I S V 試料およびピロソーム試料の、ゼータポテンシャルおよびサイズもまた測定した。

【 0 0 6 8 】

これらの解析は、二相性製剤が、単相性製剤より、遙かに優れていることを決定したので、最初の 2 つの時点の後、二相性製剤だけを、引き続き安定性アッセイにかけた。N I S V およびピロソームの両方の二相性製剤を、液体調製物および凍結乾燥調製物の両方として、ある範囲の温度 (3 7 $^{\circ}$ C 、室温、4 $^{\circ}$ C 、および - 2 0 $^{\circ}$ C) で調べた。最適の安定性は、凍結乾燥させて保管された、二相性ピロソームにより裏付けられたが、二相性製剤の全ては、抗生剤貯留の点で、研究において経過した時間 (3 カ月間) にわたり、比較的安定であった。レボフロキサシンおよびドキシサイクリンの二相性製剤についての代表的データを、図 1 に示す (時間経過にわたる、初期に封入された抗生剤の百分率) 。二相性抗生剤製剤は、既に記載されている通りに作り、溶液として放置するか、または、その後、

凍結乾燥（FD）させた。いずれの製剤も、様々な、異なる保管温度（37℃、室温、4℃、または−20℃）で放置し、製造後複数の時点（1週間後、1カ月後、3カ月後）においてアッセイして、ベシクル内の内部化を維持した抗生剤のレベルを決定した。FD製剤は、各時点において、アッセイのために再水和させた。データは、初期に封入された抗生剤の百分率として提示する）。

【0069】

レボフロキサシンおよびドキシサイクリンを封入する、ピロソーム製剤技術の適合の成功についてさらに例示するために、mg/ml単位の、各製剤により送達された総抗生剤を、封入された総抗生剤の百分率と合わせて、表1に記録する。各製剤について、総抗生剤のうちの、50%を超える抗生剤が封入された。抗生剤カーゴを伴う、ピロソームの平均サイズは、2700〜3400 nmの範囲であり、ゼータポテンシャルは、−30〜−23の範囲であり、ここで、ゼータポテンシャルについての負の値は、製剤の安定性を指し示す。

【0070】

【表1】

抗生剤製剤	製剤中の全抗生剤(mg/ml)	製剤中に封入された抗生剤(mg/ml)	封入百分率(%)	サイズ	ゼータポテンシャル
ピロソーム- レボフロキサシン	19.4	11.4	58.9	2846.0 ± 124.42	−29.667 ± 0.31
ピロソーム- ドキシサイクリン(deoxycycline)	17.2	9.2	53.5	3329.33 ± 85.62	−23.33 ± 0.29

表1:ピロソーム製剤の総ローディング、封入百分率、およびゼータポテンシャル。表中に提示される値は、遊離抗生剤の除去後において、HPLCを介して決定される封入濃度により、溶解法を介してピロソームを作ることから生成する。サイズおよびゼータポテンシャルの測定値は、Malvern Zeta-sizerにより決定し、データは、3例の独立試料についての生の値として提示する。平均値およびSEMを強調する。

【0071】

ピロソーム製剤の安定性（ゼータポテンシャルを介して決定される）を、凍結乾燥調製物として、ある範囲の温度（室温、+4℃、および−20℃）、およびある範囲の製造後時間（1週間後、1カ月後、および3カ月後）において調べた（表2）。ピロソームのゼータポテンシャルは、全ての時点および全ての温度にわたり、比較的一定を維持した。室温で保持された場合の、ピロソームによるドキシサイクリン製剤では、わずかなばらつきが見られたが、これらの研究で使用された、全ての製剤は、−20℃で保管され、製造から1カ月以内に使用された。

【0072】

10

20

30

40

50

【表 2】

保管時間	ピロソーム製剤					
	レボフロキサシン			ドキシサイクリン		
	室温	4° C	-20° C	室温	4° C	-20° C
開始時	-28.1			-19.8		
	-30.2			-22.6		
	-32.7			-27.8		
平均値の SEM	-30.22 0.42	該当なし	該当なし	-23.40	該当なし	該当なし
1週間	-24.40	-28.90	-17.90	-24.00	-28.30	-28.10
	-26.10	-31.90	-18.00	-30.00	-27.90	-25.90
	-25.90	-31.50	-19.00	-27.30	-26.50	-28.50
平均値の SEM	-25.47 0.17	-30.77 0.30	-18.30 0.11	-27.10 0.55	-27.57 0.17	-27.50 0.26
1カ月	-24.20	-26.50	-29.80	-16.50	-26.70	-22.20
	-26.30	-30.00	-30.20	-18.40	-28.20	-22.80
	-28.00	-31.00	-32.70	-18.70	-30.00	-26.50
平均値の SEM	-26.17 0.35	-29.17 0.43	-30.90 0.29	-17.87 0.22	-28.30 0.30	-23.83 0.43
3カ月	-28.90	-29.90	-26.00	-35.30	-23.40	-33.60
	-29.40	-30.90	-28.50	-36.40	-28.10	-36.40
	-29.20	-32.60	-27.90	-37.00	-29.00	-35.00
平均値の SEM	-29.17 0.05	-31.13 0.25	-27.47 0.24	-36.23 0.16	-26.83 0.55	-35.00 0.26

表2:ゼータポテンシャルにより測定される時点および保管条件に伴うピロソームの安定性。ピロソーム抗生剤製剤は、既に記載した通りに作り、その後、凍結乾燥(FD)させた。製剤を様々な異なる保管温度(37℃、室温、4℃、または-20℃)で放置し、製造後複数の時点(1週間後、1カ月後、および3カ月後)においてアッセイして、ベシクルのゼータポテンシャルを決定した。FD製剤は、各時点においてアッセイのために再水和させた。測定値は、Malvern Zeta-sizerにより決定し、データは、時点および保管条件ごとに3例ずつの独立試料についての生の値(ゼータポテンシャル)として提示する。平均値およびSEMを太字で強調する。

【0073】

封入される抗生剤を低減せずに、抗生剤を含有する凍結乾燥ベシクルを、室温で、なおまたは37℃で保管する能力は、この製剤技術の著明な利益であり、低温保管を不要とする。

【0074】

*in vitro*における、製剤の、最小阻害濃度(MIC)および最小殺菌濃度(MBC)についての評価

抗生剤の、NISVまたはピロソームによる製剤が、抗微生物機能に有害な影響を及ぼす可能性を除外するために、*in vitro*において、製剤の、野兔病菌および鼻疽菌に対するMICおよびMBCについて調べた。これらのアッセイの各々では、NISV製剤化抗生剤およびピロソーム製剤化抗生剤は、非製剤化抗生剤と同等の抗微生物性活性を及ぼした(表3)ことから、製剤化の工程が、抗生剤カーゴに、有害な影響を及ぼさなか

ったことを指し示す。

【0075】

製剤化抗生剤についての *in vitro* 評価に付随して、本発明者らはまた、簡単なモデルにおいて、多少とも予備的な、*in vivo* スクリーニングも実行した。野兎病菌 LVS を抗原投与されたミツバチガ幼虫（ハチノスツツリガ）モデルを使用して、製剤化抗生剤は、野兎病菌 LVS に感染させたハチノスツツリガの、生存および罹患までの時間の両方を延長する、すなわち、非製剤化抗生剤と比較した、抗微生物活性の著明な増強を及ぼすことが裏付けられた（図 2 A および 2 B ; グラフに表されたデータは、群 1 つ当たりのハチノスツツリガを 10 匹とする、4 つの独立の実験から作成された、カプランマイヤープロットである（群 1 つ当たりの N の合計 = 40））。さらに、本発明者らは、蛍光標識された NISV が、*in vitro* において、マクロファージに、30 分以内に、迅速に取り込まれ、そこで、さらに 90 分間にわたり、蓄積を持続することを示した。Image Stream 技術を使用して、本発明者らは、NISV が、個々の細胞内で、たやすく可視化されることを示した。

【0076】

【表 3】

抗生剤製剤	細菌			
	鼻疽菌 K96243		野兎病菌 SCHU-S4	
	MIC (μ g/ml)	MBC (μ g/ml)	MIC (μ g/ml)	MBC (μ g/ml)
遊離シプロフロキサシン	2	16	0.06	4
NISV 二相性シプロフロキサシン	2	16	0.125	4
遊離レボフロキサシン	2	32	0.06	4
NISV 二相性レボフロキサシン	2	8	0.03	4
ビロソーム 二相性レボフロキサシン	4	8	0.06	4
遊離ドキシサイクリン	1	16	0.5	>64
NISV 二相性ドキシサイクリン	1	16	1.5	>64
ビロソーム 二相性ドキシサイクリン	1	16	0.5	>64

表 3: MIC および MBC の決定による *in vitro* における製剤化抗生剤の抗微生物特性の評価。表において表された値は、各実験において 3 回ずつの技術的反復を伴う、3 つの独立の実験から生成される中央値である。MIC とは、増殖を阻害する最低濃度である、すなわち、値は、OD により測定される増殖が、陽性対照の 10% 未満である場合に記録される。MBC とは、陽性対照の増殖のうちの 99.9% を防止する最低濃度である、すなわち、寒天プレート上の、10 μ l の液滴に由来する細菌コロニーは存在しない。

【0077】

in vivo における、見本 NISV 製剤および見本ビロソーム製剤の、非経口投与または経口投与の後における、組織分布の薬物動態／薬力学（PK／PD）についてのスクリーニング

レボフロキサシンを組み込む NISV およびビロソームを、*in vivo* における、PK／PD 解析のための、見本製剤として選択した。時間経過研究では、雌 Balb/c マウス（群 1 つ当たりの $n = 5$ ）に、それぞれ、腹腔内経路または経口投与経路により、

N I S V またはピロソームを投与し、血液および組織を、24時間中に複数の間隔で回収した。血液試料および組織試料を、HPLCによる抗生剤濃度についての解析のために加工した。二相性のN I S V 内またはピロソーム内で製剤化され、凍結乾燥したレボフロキサシン、または遊離レボフロキサシンについての、Cmax（投与間隔中の最大薬物濃度）、Tmax（Cmaxが観察される時点）、および曲線下面積（AUC、すなわち、総薬物濃度－時間経過曲線下面積）の計量を、血液（パネル1）、肝臓（パネル2）、または脾臓（パネル3）について、表4に示す。ピロソーム内で経口投与されたレボフロキサシンは、肝臓貯留についてのAUC値を、2倍に増大させ、最高の効能を裏付けた。

【0078】

【表4】

パネル1				
血漿	全ての群について50mg/kgの用量			
製剤	経路	Cmax	Tmax	AUC
		μg/ml	時間	μg/ml/h
レボフロキサシン	腹腔内	50.2155	0.3	122.1861
FD二相性NISV レボフロキサシン	腹腔内	50.5442	0.45	120.8761
レボフロキサシン	経口	46.07238	0.6	119.6124
FD二相性ピロソーム レボフロキサシン	経口	44.21877	0.3	116.8437
パネル2				
肝臓	全ての群について100mg/kgの用量			
製剤	経路	Cmax	Tmax	AUC
		μg/ml	時間	μg/ml/h
レボフロキサシン	腹腔内	2.099737	0.25	5.73601
FD二相性NISV レボフロキサシン	腹腔内	1.125444	0.6	5.339507
レボフロキサシン	経口	1.947519	0.25	6.588408
FD二相性ピロソーム レボフロキサシン	経口	1.698263	0.35	11.59386
パネル3				
脾臓	全ての群について100mg/kgの用量			
製剤	経路	Cmax	Tmax	AUC
		μg/ml	時間	μg/ml/h
レボフロキサシン	腹腔内	1.289808	0.25	1.092219
FD二相性NISV レボフロキサシン	腹腔内	0.655502	0.3	1.182148
レボフロキサシン	経口	0.569373	0.35	1.552381
FD二相性ピロソーム レボフロキサシン	経口	0.699086	0.4	1.562795

表4: NISV内およびピロソーム内のレボフロキサシンの二相性製剤についてのPK/PD解析。遊離レボフロキサシン製剤、NISVによるレボフロキサシン製剤、およびピロソームによるレボフロキサシン製剤の腹腔内経路または経口経路を介する投与後における、血液中、肝臓内、および脾臓内の鍵となるPK/PD計量についての概要。Balb/cマウス5匹ずつの群に投与し、処置の0.25、0.5、1、2、4、8、16、および24時間後に、これらを殺処分した。ナイーブマウスを対照として使用した。Cmaxデータ、Tmaxデータ、およびAUCデータは、標準式を使用して生データから計算した。

【0079】

ピロソーム製剤についての、安全性／毒性研究

Balb/cマウスに、14日間にわたり、毎日施される、シプロフロキサシン製剤、レボフロキサシン製剤、およびドキシサイクリン製剤の忍容性を査定する研究を実施した。120匹の雌Balb/cマウスを、マウス10匹ずつ、12の群に割り付け、1～14日目において、方法で示した通りに処置した。動物の体重および状態を、毎日記録した。この研究中に、マウスは死ななかった。しかし、処置経路間および抗生剤製剤間で、体重の変化が見られた（図3に示される結果）。

【0080】

腹腔内経路または経口経路を介して投与されたシプロフロキサシンは、実験が進行するにつれて、体重の減少を、著明に誘導することが示された（ $P < 0.001$ ）。しかし、シプロフロキサシンの、NISVおよびピロソームへのカプセル化は、この体重減少作用を、著明に、それぞれ、約25%および40%失効化させた（ $P = 0.002$ ）。腹腔内経路および経口経路の両方を介する、レボフロキサシンの、体重の減少全体に対する作用は、最小限であり、NISVおよびピロソームによるカプセル化は、効果を及ぼさなかった（それぞれ、 $P = 0.499$ および $P = 0.616$ ）。両方の経路を介して投与された場合、実験の進行につれて、ドキシサイクリンベースの体重の減少について、強い徴候が観察された（ $P < 0.001$ ）。ピロソーム内のカプセル化は、体重の減少を、それほど変更しなかったが、ドキシサイクリン（doxycycline）の、NISVへのカプセル化は、わずかながら、肯定的な効果を及ぼした（ $P = 0.091$ ）。

【0081】

15日目に、各群内、半分のマウスを殺し、剖検を実施した。残りのマウスは、剖検を実施する前に、さらに7日間にわたり、秤量および観察した。シプロフロキサシンまたはレボフロキサシンの、任意の抗生剤製剤により処置された群では、15日目にまたは22日目に、異常な所見が注目されなかった。ドキシサイクリン処置群では、一部の軽微な病理学的観察がなされた。15日目に、ドキシサイクリンを経口で施されるマウスでは、異常な所見が見られなかったが、腹腔内注射を介して、ドキシサイクリンを施されるマウスは、肝臓の外縁が丸くなり、腹壁および腸（大腸および小腸）に及ぶ、腹膜の癒着が見られた。これらの所見は、全ての動物で、腹腔内群の両方（NISV群およびPBS群）で一貫していた。

【0082】

22日目にもまた、ドキシサイクリンピロソームを経口で施されるマウスでは、異常な所見が見られなかった。ドキシサイクリンを、PBS中に、経口で施される群では、2匹のマウスの肝臓が、わずかに丸くなった。腹腔内経路を介して、ドキシサイクリンで処置された群では、NISVカプセル化群のうちの一部に、軽微な腹膜癒着が見られたが、PBSドキシサイクリン製剤で処置された、全てのマウスは、脾臓、膵臓、腸、および腎臓に及ぶ腹膜癒着を示した。全体として、これらの所見は、抗生剤のNISV製剤およびピロソーム製剤が、忍容性を著明に改善し、抗生剤の反復投与のための組織保護効果をもたらすことを示唆する。

【0083】

反復投与の安全性／毒性研究を実行して、ピロソームによる抗生剤製剤の忍容性を査定した。マウス10匹の群に、0.1mlの（マウス1匹当たり1mgの濃度の）各抗生剤を、毎日投与した。ピロソーム製剤は、経口経路により投与した。全ての群に、適切な対照（PBS中の、遊離抗生剤）を組み入れた。マウスを、毎日秤量し、データを、出発体重からの百分率の変化として記録した。

生理食塩液中またはピロソーム内に製剤化された、異なる抗生剤による処置の、体重の増加、ミクロビオーム組成物、小腸組織学、および血清セロトニンレベルに対する効果を査定した。レボフロキサシン、ドキシサイクリン、またはシプロフロキサシンを、経口において、7日間にわたり施し、半分のマウスを、8日目に殺して、処置の直接的な影響を査定した。糞便ペレットを、8日目に殺したマウスから回収した。残りのマウスは、

処置の停止後、28日間にわたりモニタリングし、22日目に、糞便ペレットを回収し、36日目に、終了時の試料を回収した。

【0084】

死亡は見られず、全ての動物において、小腸組織学は正常であり、群間で、血清セロトニンレベルの統計学的有意差は見られなかった（データは示さない）。しかし、処置群間で、体重増加の統計学的有意差が注目された（図4（PBS対照群および空のピロソーム対照群）；図5（レボフロキサシン製剤）；図6（ドキシサイクリン（doxycycline）製剤）；図7（シプロフロキサシン製剤）；各動物についての、毎日の体重変化の百分率、および各処置群についての平均値を計算した。誤差バーは、平均値の標準誤差（SEM）を表す）。

10

【0085】

PBSにより処置された群では、マウスは、8日目までに、それらの出発体重に対する、0.6%の平均値体重減少を示し、36日目に、3.8%の平均値体重増加を示した。空のピロソームで処置されたマウスは、8日目までに、それらの出発体重に対して、平均0.3%減少し、36日目に、7.5%の平均値体重増加を示した。PBS中のレボフロキサシンで処置されたマウスは、8日目までに、それらの出発体重に対して、平均3.3%減少し、36日目に、3.2%の平均値体重増加を示した。レボフロキサシンピロソームにより処置された群では、マウスは、8日目までに、それらの出発体重に対する、0.9%の平均値体重減少を示し、36日目に、6.6%の平均値体重増加を示した。PBS中のドキシサイクリンにより処置された群では、マウスは、8日目までに、それらの出発体重に対する、5.2%の平均値体重減少を示し、36日目に、1.7%の平均値体重増加を示した。ドキシサイクリンピロソームで処置されたマウスは、8日目までに、それらの出発体重に対して、平均0.9%減少し、36日目に、1.5%の平均値体重増加を示した。PBS中のシプロフロキサシンで処置されたマウスは、8日目までに、それらの出発体重に対して、平均4.4%減少し、36日目に、2.4%の平均値体重増加を示した。シプロフロキサシンピロソームにより処置された群では、マウスは、8日目までに、それらの出発体重に対する、0.1%の平均値体重増加を示し、36日目に、9.1%の平均値体重増加を示した。

20

【0086】

特に、処置の9、10、11、15、23、27、および36日後において、ピロソームレボフロキサシン群は、体重減少が、非製剤化レボフロキサシンで処置されたマウスより、著明に小さかった（ $p < 0.05$ ）。興味深いことに、治療は、8日目に終了し、これは、3日間連続して、群間で、体重の有意差が観察されたときである。ピロソームドキシサイクリン処置群と、遊離ドキシサイクリン処置群との間では、有意差が見られなかった。

30

体重の増加において見られる有意差を査定するために、各動物の、百分率による体重変化についての曲線下面積（AUC）を計算し、一元ANOVA検定を使用して、群を比較した。この解析では、データを、8日目の、投与期間の終了時まで査定し、殺された動物については、36日目に査定した。8日目までのデータについての解析では、ANOVA検定は、群間で有意差が見られることを指し示し（ $p = 0.0001$ ）、36日目までのデータでもまた、ANOVA検定は、有意差を指し示した（ $p = 0.0020$ ）。データに対して群間比較を実施して、単一変数の影響を査定した。この解析が、PBS中のシプロフロキサシンにより処置された群と、シプロフロキサシンピロソームにより処置された群との間で、統計学的有意差が見られることを指し示した（ $p = 0.0152$ ）ことは重要である。同様の正の傾向は、PBS中のレボフロキサシンを、レボフロキサシンピロソームと対比して比較する場合、およびPBSを、空のピロソームと対比して比較する場合にも見られた。

40

【0087】

マイクロビオーム解析

ピロソームが、抗生剤誘導性の体重減少を改善する能力について探索するために、マウ

50

スのマイクロビオームを、遊離抗生剤またはビロソームカプセル化抗生剤による処置後36日間にわたりモニタリングした。マウスに抗生剤を投与し、マイクロビオームを、次世代シーケンシングにより特徴付けした。属データを、それらが属する、具体的な門に類別し、各処置群についての、百分率による存在度を計算した。データは、面グラフ／積み重ね棒グラフ上でグラフ化した。

結果は、ビロソームが、マイクロビオームに対して、有害作用を及ぼさなかったことを裏付ける(図8)。一般に、抗生剤処置の効果は、8日目に、グラム陰性菌である、バクテロイデス門(*Bacteroidetes*)を低減し、グラム陽性菌である、フィルミクテス門(*Firmicutes*)を増大させ、36日目までに、処置前の比への、漸進的な回復をもたらす。しかし、これらの変化は、ビロソーム処置群内で、少量のウェルコミクロビウム門(*Verucomicrobia*)種の出現を伴ったが、これは、マイクロビオーム内で、有益な効果を及ぼすと考えられる。

【0088】

合計59の属を、高頻度(標本のうちの、少なくとも75%において存在する)として規定した。これらの59の属の、ベースライン試料中の存在には、ある程度の変動が見られたが、少なくとも57の属は、全ての群内に存在した。8および22日目に、わずかな表出の低減が見られたが、一部は、36日目までに回復した。ドキシサイクリンビロソーム群の含量は、全ての時点において、他の全ての群より、実質的に少なかった。データを査定したところ、これは、他の全ての群では、高レベル存在する、クロストリジウム綱(*Clostridia*)配列の、この群における、ほぼ完全な非存在に起因することが明らかとなった。8および22日目における全ての試料を含む、ドキシサイクリンビロソーム群内の大半の試料が、クロストリジウム綱(*Clostridia*)を欠いたのに対し、クロストリジウム綱(*Clostridia*)を有した試料は、少数であり、他の群に由来する試料の、100~1000分の1のクロストリジウム綱(*Clostridia*)を有した。

【0089】

合計81の属を、低頻度(標本のうちの、25%未満において存在する)として規定した。これらの81の属のうちの15以下の属は、任意の時点において、任意の1つの群内に存在したが、大半の属は、大半の標本において非存在であった。全体で、これらの属は、微生物相補性の全体を、ごくわずかししか説明しないが、データは、ビロソームレボフロキサシン処置群が、これらの低頻度属について、より多様な微生物叢を有したことを示唆する。

したがって、全体として、マイクロビオーム解析は、ビロソームプラットフォームが、*in vivo*において、忍容良好であり、抗生剤による攪乱後の腸内において、バクテロイデス門の回復、および有益な細菌(ウェルコミクロビウム門)の増殖を促しうることを裏付けた。

【0090】

免疫調節特性

骨髄細胞を、8週齢の雄BALB/cマウスの大腿骨から得、GM-CSFエンリッチ培地を使用して、骨髄由来樹状細胞(BMDc)に分化させた。これは、規定通りに、80%のCD11c+細胞を、結果としてもたらした。BMDcを、96ウェル組織培養マイクロ滴定プレート上に、ウェル1つ当たりの細胞 5×10^5 個で播種し、LPS(3 μ g/ml)で刺激するか、または対照として、非刺激のまま放置した。同時に、細胞を、溶解法により作製されたNISV、もしくは超音波処理法により作製されたNISVで処置するか、非処置のまま放置した。24時間後に、細胞を採取し、フローサイトメトリーによる解析の前に、CD40、CD80、またはCD86に対する抗体で染色した。いずれかのNISV製剤で処置された、LPS非刺激細胞内では、CD40、CD80、またはCD86のレベルは、影響を受けなかった(図9; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。しかし、いずれかのNISV製剤で処置された、LPS刺激細胞内では、CD40およびCD80のレベルは、下方調節された(図9)。これに対し、いずれかのNISV製剤で処

置された、L P S 刺激細胞内では、C D 8 6 レベルが上昇したが、これは、骨髓性 D C の成熟に典型的である（図 9）。

【0091】

i n v i v o における、鼻疽菌および野兔病菌による感染を処置するピロソーム製剤についての評価

抗生剤投与を、感染の 6 時間後に開始する、最適用量未満の治療研究デザインを使用して、類鼻疽のエアロゾルモデルにおいてレボフロキサシンおよびドキシサイクリンのピロソーム製剤の有効性について調べ、毎日 1 回 7 日間だけにわたり経口経路を介して投与して、治療有効性について調べた。処置群は、ピロソーム送達型抗生剤または非製剤化抗生剤を含み、対照群は、P B S または空のピロソームを施された。正確に同じデザイン、条件、および同一な処置群により、この研究を、2 回にわたり反復し、解析のために、データを、層別化し、組み合わせて、ピロソームによるカプセル化についての、遊離レボフロキサシンと対比した、生存に対する有意な利点 ($p = 0.014$)（図 10）、およびピロソームによるカプセル化についての、遊離ドキシサイクリンと対比した、生存に対する有意な利点 ($p < 0.001$)（図 11）を示した。グラフ上に表されたデータは、群 1 つ当たりのマウスを 10 匹とする、 Kaplan-Meier プロットである。いずれの図も、実験 1（左上パネル）、実験 2（右上パネル）、および組合せ（下パネル）の層別化データの結果を示す。P B S 処置群および空のピロソーム処置群を、対照として組み入れた。

【0092】

ピロソーム内でレボフロキサシンを送達することにより付与される、遊離レボフロキサシンを上回る生存の利点に加えて、ピロソーム-レボフロキサシン処置群の体重減少は、レボフロキサシンと比較して、有意に小さかった（図 12）。表示されるデータは、個々のマウスについてのプロット（実験 1（左上パネル）；実験 2（右上パネル）；および箱髴図を、四分位範囲内で使用する、組合せ（下パネル）のデータ）である。P B S 処置群および空のピロソーム処置群を、対照として組み入れた。ピロソーム-レボフロキサシン処置群に由来する組合せデータが、体重減少の高度な有意差 ($p < 0.001$ 、図 12) を示したように、レボフロキサシン処置群では、ピロソーム製剤を施されるマウスにおける、抗生剤誘導性の体重減少に対する保護が、極めて顕著であった。

【0093】

鼻疽菌と同様に、野兔病菌の感染後においても、B a l b / c マウスを、ピロソーム送達型レボフロキサシンで処置した。100 c f u のエアロゾル化野兔病菌である、S c h u S 4（約 20 M L D）への曝露の 72 時間後において、抗生剤療法（20 m g / k g）を開始し、マウス 15 匹の群に、毎日、3 日間だけにわたり送達した。ピロソーム送達型レボフロキサシンを、経口経路により施される動物は、死亡までの時間を、遊離レボフロキサシンを施される動物と比較して、有意に ($p < 0.05$) 延長した（図 13）。この結果は、抗生剤のピロソーム送達の利点についての、さらなる証拠をもたらす。

【0094】

細菌学的解析、免疫学的解析、および血液化学的解析は、ピロソーム抗生剤処置群と、遊離抗生剤処置群との間の変化の裏書きを示す。鼻疽菌の感染後 3 日目に、肺、脾臓、および肝臓の組織試料についてのサイトカイン解析は、ピロソーム-レボフロキサシン処置群において、炎症促進性サイトカインの減少を示し、これは、肝臓損傷と関連する酵素である、A L T および G G T の低減と相関した。

ピロソームによる抗生剤送達の有益な効果についての他の証拠は、ピロソーム封入レボフロキサシンを投与されたマウスが、一部の、鍵となる炎症性サイトカインのレベルを、非製剤化レボフロキサシンを施されるマウスと比較して、有意に ($p < 0.05$ ：肺における I L - 6、脾臓における I L - 13、肝臓におけるエオタキシン、肺および肝臓における G M - C S F、肝臓における M I P 1 b) 低減した、野兔病菌研究から導出された。バークホルデリア属 (B u r k h o l d e r i a) 感染マウスにおけるサイトカインレベルの解析も、同様の傾向を示した。

【0095】

全体として、データは、ピロソームによる抗生剤の送達、有意な生存の利点をもたらすだけでなく、また、抗生剤投与の反復と関連する副作用も低減し、免疫応答をモジュレートして、これらの感染において、通常明らかな、サイトカイン誘導性の死亡率も低減することを指し示す。

ある範囲の抗ウイルス剤の、改変NISV内の封入

脳炎ウイルス（例えば、VEEV）に効果的な治療を開発するために、NISVを、これらの血液脳関門（BBB）を越える通過を容易とするように改変した。この手法は、パルミトイル化グルコサミンでコーティングするか、またはNISV製剤内のコレステロール部分をトランスフェリンに共有結合的に連結して、それぞれ、gNISVおよびtNISV（「ブレインソーム」）を創出することにより達成した。in vivoにおける、Glut-1受容体（BBBの内皮組織内でよく見られる）への結合を目的として、パルミトイル化グルコサミンを、gNISVに組み込んだ。同様に、ヒトホロトランスフェリンのチオール化により、tNISVを調製して、NISV内に含まれる、通常のコレステロールのうちの一部（29%）を置換した、マレイミド修飾コレステロール成分への結合を可能とした。

【0096】

抗体の、NISVおよびブレインソームへの封入を最適化するために、とりわけ、VEEV mAbのためのモデルとして、本発明者らは、非特異的ウサギIgGを使用した。これは、NISV、gNISV、およびtNISVへの、高効率の（25～32%の封入を達成する）封入に成功した（表5）。これらの条件を使用して、VEEV mAbを、gNISVに、同様の高効率で組み込み、tNISVに製剤化した（表5）。IFN α 2 β もまた、優れた効率（43%）で、NISVへの封入に成功した。

【0097】

【表5】

製剤	サイズ(nm)	ゼータポテンシャル	PDI	封入百分率
gNISV IgG	600	17	0.6	30
tNISV IgG	316	10	0.5	25
NISV IgG	300	20	0.7	32
gNISV VEEV	200	13	0.4	25.9
NISV IFN α 2 β	100	12	0.6	43

表5:抗ウイルスカーゴ(または代理物)をロードされたNISV変異体についての生物物理的特徴付け

【0098】

自動式（スケールアップ型）NISV調製についての特徴付け

ナノベシクルの作製（ブレインソームおよびピロソーム）は、選択されたコーティングを伴い、サイズ範囲を最適化したナノベシクルを調製するように、規定通りに自動化され、かつ、一貫した製造工程を達成することを目的とする、NanoAssembler（登録商標）により、スケールアップに成功している。NanoAssembler（登録商標）を使用して、NISV、ブレインソーム、およびピロソームの全てを作ること成功している（表6）。ブレインソームをもたらすための、NISVの改変は、ゼータポテンシャルまたはベシクルサイズの特性に対して、非コーティングNISVと比較して、著明な影響を及ぼさなかった。

【0099】

10

20

30

40

50

【表 6】

小胞	サイズ(nm単位のz平均)	ゼータポテンシャル(-mV)	濃度(mg/ml)
NISV ドキシサイクリン(deoxycycline)	175	22.7	20
NISV レボフロキサシン	124	20	11
ビロソーム レボフロキサシン	136	20	13

10

表6:自動式(スケールアップ型)NISV調製についての特徴付け

【0100】

*in vitro*および*in vivo*における、BBB-CNSへの送達の評価を含む、NISV貯留の特徴付け

まず、染料は、通常の状況下では、BBBを越えることができないので、gNISVを、モデルカーゴとしてのヘキスト染料で染色した。染色されたgNISVを、Balb/cマウスに静脈内注射し、90分後に、脳組織を摘出した。予測される通り、ヘキスト染料は、単独では、BBBを越えず、脳内では検出されなかった。ヘキスト染料をカプセル化したgNISVが、BBBを越えて、細胞の核を染色したのに対し、ヘキスト染料をカプセル化する、非改変NISVでは、核染色は、ほとんど検出されなかった。これらのデータは、gNISVが、BBBを越え、それらのカーゴを放出することが可能であることを指し示す。

20

gNISVが、このモデルカーゴを送達することを裏付けたので、その後、最終的に、ヒト化抗VEEVモノクローナルIgGである、Hu1A3B-7をカプセル化する意図で、gNISVを使用して、ポリクローナルウサギ抗体(分子量:150kDa)をカプセル化した。

【0101】

gNISV内にカプセル化されたウサギIgGを、マウスへの静脈内注射により、単回において送達した初期研究は、90分後における、マウス脳内の抗体の存在を明らかにした(図14;組織切片を、ウサギIgGについて蛍光染色し、組織切片内の全蛍光を、画像解析ソフトウェアで測定した。表示されるデータは、時点1つ当たり、群1つ当たり、3匹ずつのマウスの平均値である。遊離IgG抗体は、対照として使用した)。脳内の抗体レベルが、4時間後までに減衰したのに対し、gNISVにより送達された抗体レベルの著明な増強は、この時点においても、肝臓内および肺内に存在した。

30

Hu1A3B-7の、gNISVおよびtNISVへのカプセル化を試みた。ウサギIgGの、gNISV内の静脈内送達の後における、マウス脳についての免疫組織化学解析は、非製剤化ウサギ抗体を注射されたマウスに由来する脳組織とは対照的に、これらのマウスに由来する脳血管系と関連するだけでなく、また、脳組織内に広がったウサギ抗体の存在も裏付けた。

40

エアロゾル化VEEVの感染後における、見本NISV製剤についての、詳細な評価

VEEV mAbである、Hu1A3B-7 (S.A. Goodchild, L.M. O'Brien, J. Steven, M.R. Muller, O.J. Lanning, C.H. Logue, R.V. D'Elia, R.J. Phillpotts, S.D. Perkins. A humanised murine monoclonal antibody with broad serogroup specificity protects mice from challenge with Venezuelan equine encephalitis virus. Antiviral Res., 90(2011), 1-8; WO2011036435A1において、さらに開示されている)は、*in vivo*における感染研究時に使用される、えり抜きの抗ウイルス剤であった。VEEV感染についての、致死性のエアロゾルモデルを、約300PFUのVEEV Trinidad Donkey Strainに曝露される、BALB/c

50

マウスに対して使用した。この抗原投与は、感染の約2日後に、死亡までの時間を、5～6日間の間とする、感染の臨床徴候を引き起こす。

【0102】

カプセル化および凍結乾燥の工程は、mAbの活性に対して、有害な作用を及ぼさず、ブランクアッセイは、遊離mAbと、mAbのNISV製剤およびgNISV製剤とについて、同様の結果をもたらすことが裏付けられた。空のベシクル対照は、抗ウイルス活性を有さないことが示され、培地だけの対照と同じく作用した（データは示さない）。

小スケールの予備研究を行って、IV経路を介して、治療を施すことの有用性について調べた（表7）。エアロゾル経路を介して、群（PBS対照群、空のベシクル対照群、VEEV Hu1A3B-7 mAb群、NISV Hu1A3B-7 mAb群、およびgNISV Hu1A3B-7 mAb群）1つ当たり5匹ずつのBALB/cマウスを、VEEVに曝露し、静脈内処置を、感染の24時間後に、1回施した。対照マウスが、疾患に斃れる前の、感染後5日目に、全てのマウスを殺処分した。ウイルス力価のために、脳組織および肺組織を摘出し、加工した。静脈内送達されたNISVプラットフォームは、肺内および脳内のウイルス負荷を、著明に減少させた（PBS対照と比較して、 $P=0.001$ であり、遊離mAbと比較して、 $P=0.007$ であり；データは示さない）。

【0103】

【表7】

群	処置レジメン	治療経路	治療の開始時点(時間)	処置の長さ(日)	マウスの数
1a	PBS	静脈内	24	1	5
2a	VEEV mAb Hu1A3B-7	静脈内	24	1	5
3a	NISV mAb Hu1A3B-7	静脈内	24	1	5
4a	gNISV mAb Hu1A3B-7	静脈内	24	1	5
5a	空のgNISV	静脈内	24	1	5

表7:エアロゾルによるVEEV感染のNISVおよびgNISV mAbによる静脈内処置のための動物研究計画

【0104】

NISVプラットフォーム製剤と、遊離化合物との差違を、より十分に特徴付けるために、腹腔内処置モデルを使用した（表8）。この経路は、Hu1A3B-7 mAbの有効性について評価するために、より一貫し、より適することが既に示されている。

【0105】

10

20

30

40

50

【表 8】

群	処置レジメン	治療経路	治療の開始時点(時間)	処置の長さ(日)	マウスの数
6a+b	PBS	腹腔内	24	1	10
7a+b+c	VEEV mAbであるHu1A3B-7(100 μ l中に100 μ g)	腹腔内	24	1	15
8a+b+c	NISV mAbであるHu1A3B-7(100 μ l中に100 μ g)	腹腔内	24	1	15
9a+b+c	gNISV mAbであるHu1A3B-7(100 μ l中に100 μ g)	腹腔内	24	1	15
10a+b	空のgNISV(100 μ g)	腹腔内	24	1	10

表8:エアロゾルによるVEEV感染のNISVおよびgNISV mAbによる腹腔内処置のための動物研究計画

【0106】

エアロゾルVEEVモデルを使用して、同一の処置群（PBS対照、空のベシクル対照、VEEV Hu1A3B-7 mAb、NISV Hu1A3B-7 mAb、およびgNISV Hu1A3B-7 mAb）について評価し、腹腔内経路を介して、治療を、ここでもまた、24時間後において1回施した。これらの研究では、処置群1つ当たりのマウス合計15匹ずつを使用し、5匹のマウスを、感染後5日目に、ウイルス学解析のために殺処分し、残る10匹のマウスを、生存についてモニタリングした。

【0107】

同一のデザインの、2つの独立の研究を実行し、全ての処置群について、同様の結果を示した。実験1では、Hu1A3B-7 mAbを封入された、NISVおよびgNISVのいずれも、肺内のウイルス負荷を、PBS処置群と比較して低減した（それぞれ、 $p < 0.001$ および $P = 0.003$ ）。NISV封入mAbはまた、遊離Hu1A3B-7 mAbと、肺内のウイルス力価の点でも、有意に異なった（ $p < 0.001$ ）。NISV封入mAbはまた、脾臓内でも、PBSおよび遊離Hu1A3B-7 VEEV mAbと比較して良好な効能を示した（それぞれ、 $p < 0.001$ および $p < 0.05$ ）。脳をターゲティングするように特異的にデザインされた、gNISVカプセル化mAbの効能が、脳内で、他の全ての製剤および対照より、有意に良好であったことは重要である。これは、NISV処置群およびgNISV処置群における生存の延長をもたらし、NISVは、遊離Hu1A3B-7 VEEV mAbより、有意に良好である（ $p = 0.008$ ）。

【0108】

実験2では、gNISVの効能は、肺内で、PBS対照より良好であり（ $p = 0.0031$ ）、脳内でも、全ての製剤と比較して、有意に良好であった。NISV製剤およびgNISV製剤の効能は、脾臓組織内で、PBS対照より、有意に良好であった（それぞれ、 $p = 0.0143$ および $P < 0.001$ ）。興味深いことに、遊離Hu1A3B-7 VEEV mAbもまた、脾臓内で、有益な効果を示したことから、低量のVEEV特異的活性成分にもかかわらず、治療が効果的であったことを指し示す。この実験では、gNISV mAbは、生存を、遊離Hu1A3B-7 VEEV mAbと比較して、有意に（ $p = 0.0036$ ）改善し、NISV mAb群も、同様の傾向を示した。

【0109】

実験1および2からのデータを組み合わせると、遊離Hu1A3B-7 VEEV mAb

bの正の効果が明らかであるが、カプセル化製剤（N I S V Sおよびg N I S V）によりもたらされる利点が際立っていることが、より重要なことである。N I S V m A b製剤およびg N I S V m A b製剤のいずれも、肺内のウイルス負荷を、P B S対照および遊離H u 1 A 3 B-7 V E E V m A b対照と比較して、有意に低減した。さらに、g N I S Vは、脳内のウイルス負荷も、両方の対照と比較して、有意に低減した。興味深いことに、脾臓データは、遊離H u 1 A 3 B-7 V E E V m A bが、ウイルス負荷を、P B S対照と比較して、著明に低減することにより、治療的利益をもたらすことを示したが、N I S V m A b群およびg N I S V m A b群の脾臓内のウイルス負荷は、遊離H u 1 A 3 B-7群と、有意には異ならなかった（図15；エアロゾル化V E E Vを抗原投与されたB A L B/cマウス。処置群1つ当たりのマウス10匹ずつを、感染後5日目に殺処分し、肺内、脳内、脾臓内、および肝臓内のウイルス力価を決定した。A N O V Aおよび多重比較により生成されたP値）。

【0110】

肺内および脳内の、遊離m A bの、限定的な効果は、調製物中の、V E E V特異的活性成分のレベルに起因する可能性が極めて高かった。しかし、これは、最適用量未満レベルの治療用化合物の有効性を増大させる能力を裏付けることにより、N I S Vカプセル化の利点をさらに強調する。これは、最適用量未満レベルの抗生剤を使用して、N I S V封入およびピロソーム封入の利点を裏付けた、抗生剤データと符合する。

実験1からの生存データと、実験2からの生存データとの組合せは、N I S V H u 1 A 3 B-7 V E E V m A b製剤およびg N I S V H u 1 A 3 B-7 V E E V m A b製剤のいずれの効能も、P B Sおよび遊離H u 1 A 3 B-7 V E E V m A bより、有意に良好であったことを示す（それぞれ、 $p = 0.0294$ および $p = 0.0030$ ；図16）。

【0111】

全体として、このデータは、N I S Vおよびg N I S Vによる、H u 1 A 3 B-7 V E E V m A bの送達、遊離m A bと比較して有利であることを指し示す。いずれのプラットフォームも、肺内のウイルス負荷を低減し、生存を延長し、死亡率を低減する。g N I S Vプラットフォームは、脳内のウイルス負荷を、著明に低減する。これは、医薬剤などのカーゴを、脳に送達するように、特異的にデザインされたベシクルが、この組織をターゲティングし、治療的に関与性である濃度のカーゴを送達することが可能であることを示唆するであろう。

【0112】

本発明についての、上記の記載は、純粹に、例を目的としてなされたものであり、詳細の改変は、本発明の範囲内でなされることが理解されるであろう。記載、および（適切な場合における）特許請求の範囲で開示される、各特色は、独立に提供される場合もあり、任意の適切な組合せで提供される場合もある。さらに、本発明についての記載は、方法、医薬組成物、および関連するキットを、具体的に参照してなされ、より具体的には、鼻疽菌、野兔病菌、およびV E E Vに対する使用のための、医薬ベシクル製剤および関連する医薬キットを参照してなされた。当業者は、本発明のさらなる適用に想到するであろう。

本発明のまた別の態様は、以下のとおりであってもよい。

〔1〕 医薬ベシクル製剤を調製するための方法であって、

a) モノパルミトイルグリセロール、コレステロールおよびリン酸ジセチルを含むベシクル成分を50℃～150℃の範囲の温度で加熱するステップ；

b) 医薬剤を薬学的に許容可能な担体中に溶解させ、得られた医薬剤-担体混合物を30～99℃の範囲で加熱するステップ；

c) 医薬剤-担体混合物をベシクル成分に添加して、製剤混合物をもたらすステップ；
ならびに

d) 製剤混合物を加工して、医薬剤と担体とが複数のベシクル内に封入された医薬ベシクル製剤を形成するステップ

を含み、

10

20

30

40

50

医薬ベシクル製剤が薬学的に許容可能な担体中に溶解した、既知数量の医薬剤に還元されて、二相性医薬ベシクル製剤をもたらす方法。

〔2〕モノパルミトイルグリセロール、コレステロールおよびリン酸ジセチルが、それぞれ5：4：1のモル比で提供される、前記〔1〕に記載の方法。

〔3〕デオキシコール酸ナトリウムが、ベシクル成分中に、かつ／または医薬剤を薬学的に許容可能な担体中に溶解させる場合に提供される、前記〔1〕～〔2〕のいずれか1項に記載の方法。

〔4〕ベシクル成分が、*in vivo*における受容体媒介性輸送機構により認識されるリガンドをさらに含む、前記〔1〕～〔3〕のいずれか1項に記載の方法。

〔5〕リガンドが、グルコサミンおよび／もしくはトランスフェリン、またはこれらの任意の変異体もしくは断片である、前記〔4〕に記載の方法。

〔6〕グルコサミンが、パルミトイル化グルコサミンである、前記〔5〕に記載の方法。

〔7〕共有結合が、チオール化リガンドと修飾コレステロールとの間に形成されるように、リガンドがチオール化され、コレステロール部分をコレステロール-PEG-マレイミドにより置きかえることにより、コレステロールが修飾される、前記〔4〕～前記〔6〕に記載の方法。

〔8〕医薬剤-担体混合物とベシクル成分とが、それぞれ3：1の比で提供される、前記〔1〕～〔7〕のいずれか1項に記載の方法。

〔9〕医薬ベシクル製剤が、加工後において、少なくとも1つの凍結乾燥および融解のサイクルを経る、前記〔1〕～〔8〕のいずれか1項に記載の方法。

〔10〕医薬剤が、抗菌剤および／または抗ウイルス剤である、前記〔1〕～〔9〕のいずれか1項に記載の方法。

〔11〕抗菌剤が、フルオロキノロンおよびテトラサイクリンを含む群から選択される、前記〔10〕に記載の方法。

〔12〕抗菌剤が、レボフロキサシン、シプロフロキサシン、およびドキシサイクリンを含む群から選択される、前記〔10〕～前記〔11〕に記載の方法。

〔13〕抗菌剤が、30 mg/mlの濃度である、前記〔10〕～前記〔12〕に記載の方法。

〔14〕抗ウイルス剤が、IFN- γ 、IFN- α 、カルボジン、DZ-13、および抗ウイルス抗体、またはこれらの任意の変異体もしくは断片を含む群から選択される、前記〔10〕に記載の方法。

〔15〕抗ウイルス抗体が、Hu1A3B-7 VEEV mAb、またはこの任意の変異体もしくは断片である、前記〔14〕に記載の方法。

〔16〕a)モノパルミトイルグリセロール、コレステロールおよびリン酸ジセチルを含むベシクル；

b)医薬剤；ならびに

c)薬学的に許容可能な担体を含む医薬ベシクル製剤。

〔17〕モノパルミトイルグリセロール、コレステロールおよびリン酸ジセチルが、それぞれ5：4：1のモル比で存在する、前記〔16〕に記載の医薬ベシクル製剤。

〔18〕*in vivo*における受容体媒介性輸送機構により認識されるリガンドをさらに含む、前記〔16〕～前記〔17〕に記載の医薬ベシクル製剤。

〔19〕リガンドが、グルコサミンおよび／もしくはトランスフェリン、またはこれらの任意の変異体もしくは断片である、前記〔18〕に記載の医薬ベシクル製剤。

〔20〕ベシクルが、50～4000 nmのサイズである、前記〔16〕～前記〔19〕に記載の医薬ベシクル製剤。

〔21〕医薬剤が、抗菌剤および／または抗ウイルス剤である、前記〔16〕～前記〔20〕に記載の医薬ベシクル製剤。

〔22〕抗菌剤が、フルオロキノロンおよびテトラサイクリンを含む群から選択される、

10

20

30

40

50

前記〔21〕に記載の医薬ベシクル製剤。

〔23〕抗菌剤が、レボフロキサシン、シプロフロキサシン、およびドキシサイクリンを含む群から選択される、前記〔22〕に記載の医薬ベシクル製剤。

〔24〕抗菌剤が、30mg/mlの濃度で存在する、前記〔21〕～前記〔23〕に記載の医薬ベシクル製剤。

〔25〕抗ウイルス剤が、IFN- γ 、IFN- α 、カルボジン、DZ-13、および抗ウイルス抗体、またはこれらの任意の変異体もしくは断片を含む群から選択される、前記〔21〕に記載の医薬ベシクル製剤。

〔26〕抗ウイルス抗体が、Hu1A3B-7 VEEV mAb、またはこの任意の変異体もしくは断片である、前記〔25〕に記載の医薬ベシクル製剤。

〔27〕前記〔16〕～前記〔26〕に記載の医薬ベシクル製剤を含む医薬キット。

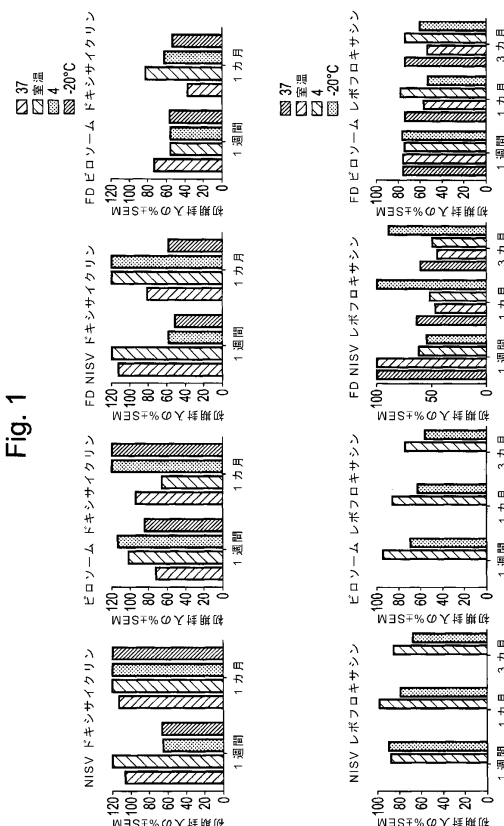
〔28〕医薬としての使用のための、前記〔16〕～前記〔26〕に記載の医薬ベシクル製剤、または前記〔27〕に記載の医薬キット。

〔29〕類鼻疽菌 (*Burkholderia pseudomallei*)、野兔病菌 (*Francisella tularensis*)、またはVEEVによる感染の防止または処置における使用のための、前記〔16〕～前記〔26〕に記載の医薬ベシクル製剤、または前記〔27〕に記載の医薬キット。

【図面】

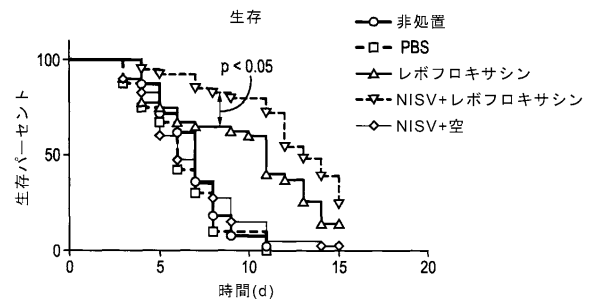
【図1】

Fig. 1



【図2A】

Fig. 2A



10

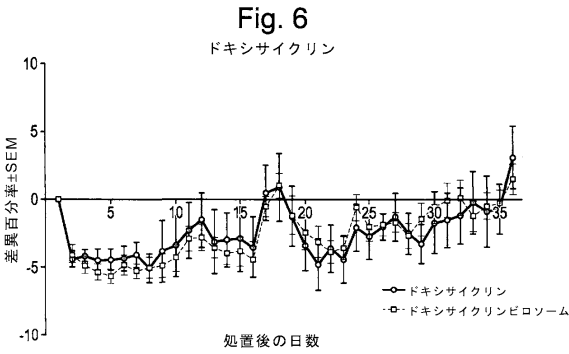
20

30

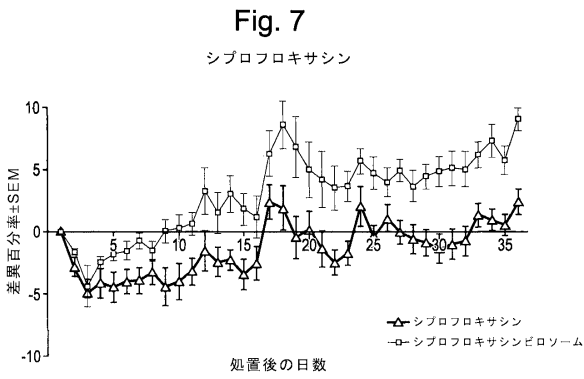
40

50

【図 6】

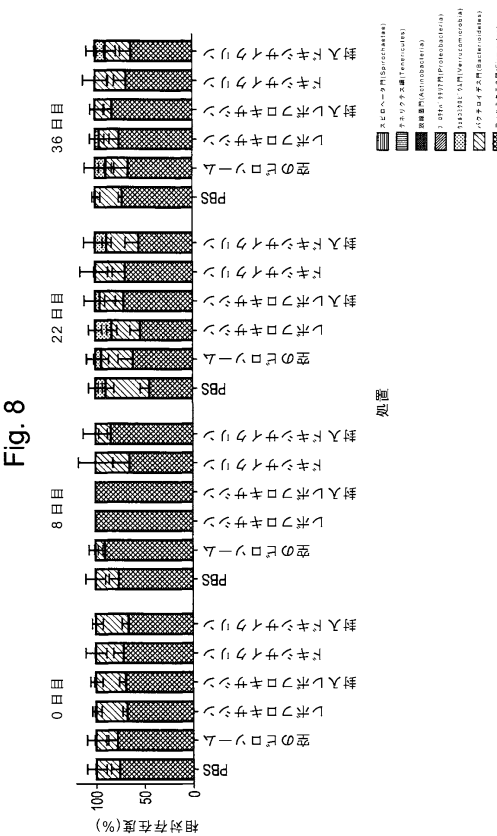


【図 7】

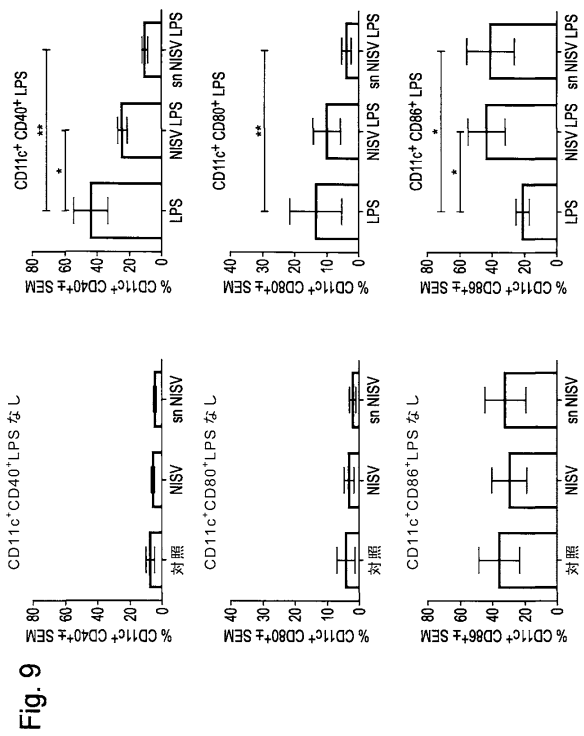


10

【図 8】



【図 9】



20

30

40

50

【図 10】

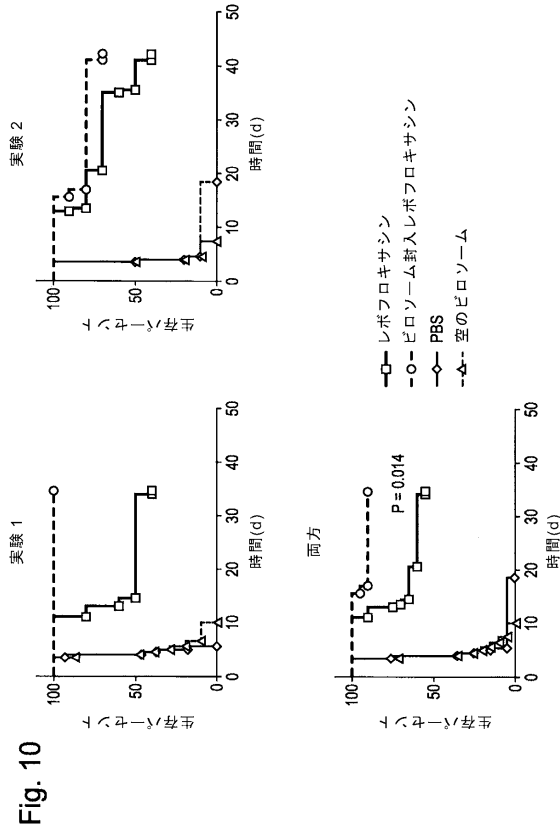


Fig. 10

【図 11】

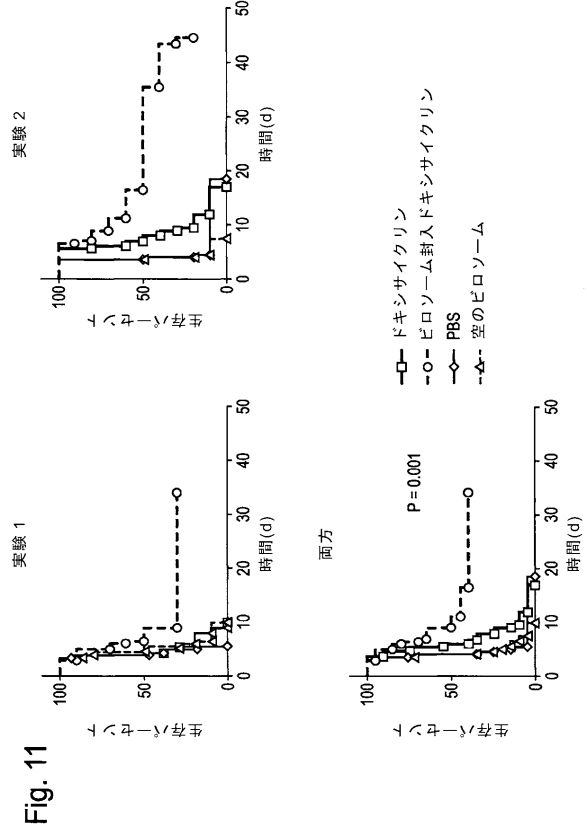


Fig. 11

【図 12】

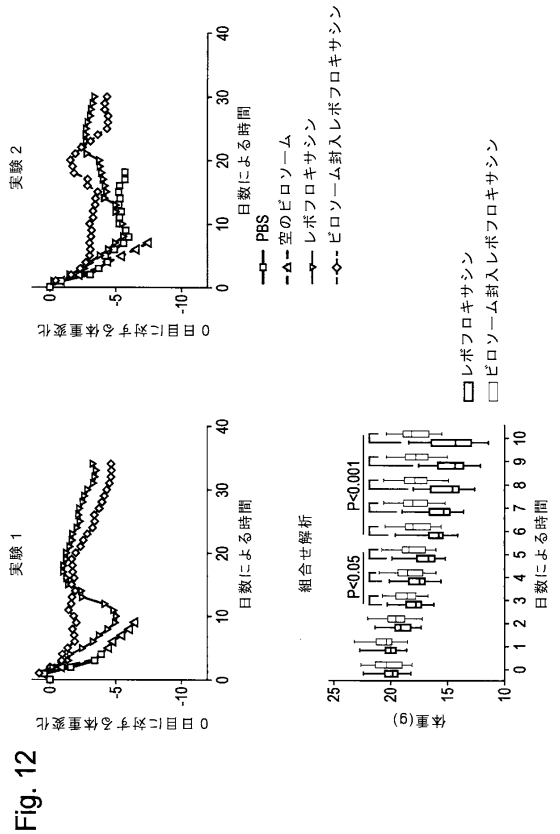
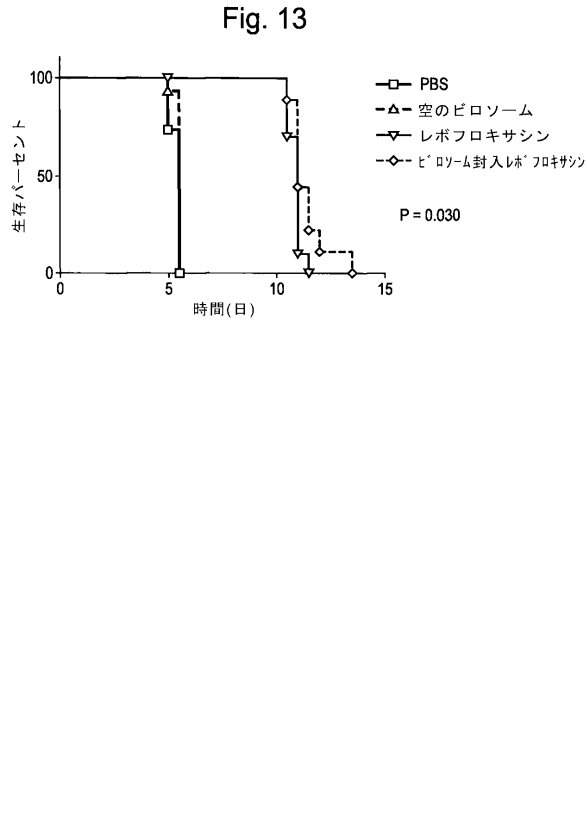


Fig. 12

【図 13】



10

20

30

40

50

【図 1 4】

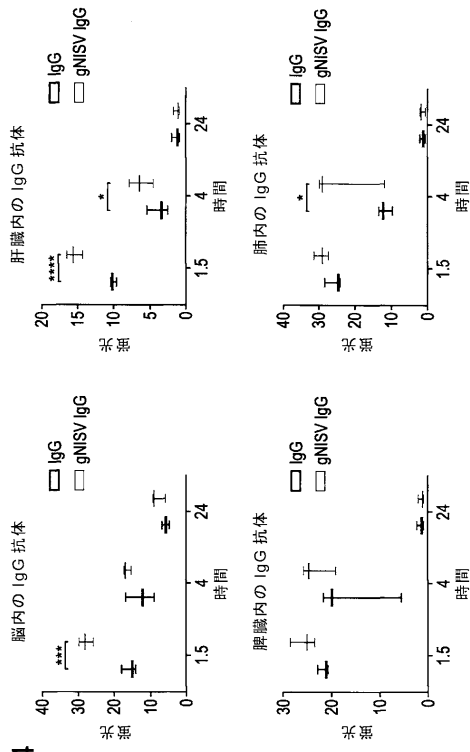


Fig. 14

【図 1 6】

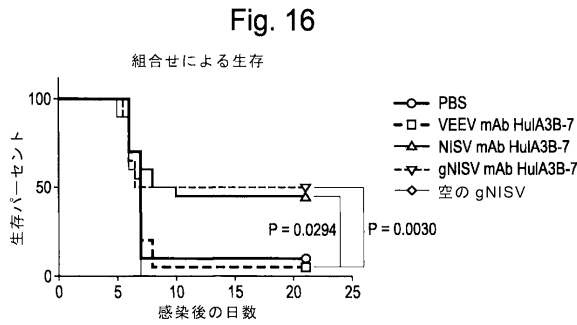


Fig. 16

【配列表】

0007487892000001.app

【図 1 5】

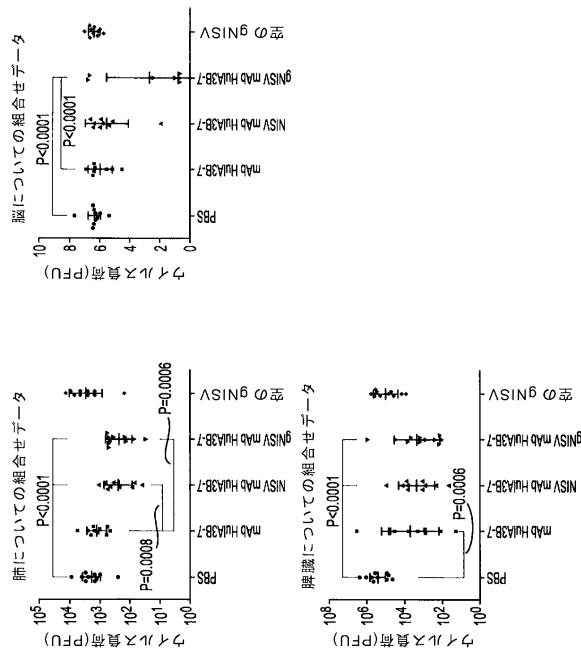


Fig. 15

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	31/538 (2006.01)	A 6 1 K	31/538
A 6 1 K	31/496 (2006.01)	A 6 1 K	31/496
A 6 1 K	31/65 (2006.01)	A 6 1 K	31/65
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04

イギリス ジー 1 1 エックスキュー グラスゴー リッチモンド ストリート 1 6

(74)代理人 100094569

弁理士 田中 伸一郎

(74)代理人 100103610

弁理士 ▲吉▼田 和彦

(74)代理人 100109070

弁理士 須田 洋之

(74)代理人 100119013

弁理士 山崎 一夫

(74)代理人 100123777

弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111796

弁理士 服部 博信

(74)代理人 100212509

弁理士 太田 知子

(72)発明者 ウィリアムソン エセル ダイアン

イギリス ウィルトシャー エスピー 4 0 ジェイキュー ソールズベリー ディーエステーエル
ポートン ダウン ジー 0 2 ビルディング 0 0 5 ディーエステーエル アイピー グループ

(72)発明者 デリア リカルド ヴィンチェンツォ

イギリス ウィルトシャー エスピー 4 0 ジェイキュー ソールズベリー ディーエステーエル
ポートン ダウン ジー 0 2 ビルディング 0 0 5 ディーエステーエル アイピー グループ

(72)発明者 ロバーツ クレイグ ウィリアム

イギリス ジー 4 0 アールイー グラスゴー カテドラル ストリート 1 6 1 ユニヴァーシティー
オブ ストラスクライド ストラスクライド インスティテュート オブ ファーマシー アンド バイ
オメディカル サイエンスーズ内

(72)発明者 ウッズ スチュアート

イギリス ジー 4 0 アールイー グラスゴー カテドラル ストリート 1 6 1 ユニヴァーシティー
オブ ストラスクライド ストラスクライド インスティテュート オブ ファーマシー アンド バイ
オメディカル サイエンスーズ内

審査官 田澤 俊樹

(56)参考文献 特表 2 0 1 2 - 5 3 2 2 0 0 (J P, A)

国際公開第 2 0 1 3 / 0 5 9 6 1 7 (W O, A 1)

特開平 4 - 1 5 9 2 1 6 (J P, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 6 9

3 1 / 0 0 - 3 3 / 4 4

A 6 1 P 1 / 0 0 - 4 3 / 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 / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T
N)