

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6347743号  
(P6347743)

(45) 発行日 平成30年6月27日(2018.6.27)

(24) 登録日 平成30年6月8日(2018.6.8)

(51) Int.Cl.	F 1
A 61 K 31/7036	(2006.01)
A 61 K 47/24	(2006.01)
A 61 K 9/127	(2006.01)
A 61 K 47/02	(2006.01)
A 61 K 47/28	(2006.01)
	A 61 K 31/7036
	A 61 K 47/24
	A 61 K 9/127
	A 61 K 47/02
	A 61 K 47/28

請求項の数 41 (全 75 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-509488 (P2014-509488)
(86) (22) 出願日	平成24年5月4日(2012.5.4)
(65) 公表番号	特表2014-513135 (P2014-513135A)
(43) 公表日	平成26年5月29日(2014.5.29)
(86) 國際出願番号	PCT/US2012/036576
(87) 國際公開番号	W02012/151517
(87) 國際公開日	平成24年11月8日(2012.11.8)
審査請求日	平成27年5月1日(2015.5.1)
(31) 優先権主張番号	61/547,325
(32) 優先日	平成23年10月14日(2011.10.14)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	61/482,996
(32) 優先日	平成23年5月5日(2011.5.5)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	516026321 マティナス バイオファーマ ナノテクノロジーズ, インコーポレーテッド アメリカ合衆国 07921 ニュージャージー州, ベドミニスター, スイート 302, ルート 206 サウス 1545
(73) 特許権者	502155611 ラトガーズ, ザ ステイト ユニバーシティ オブ ニュー ジャージー アメリカ合衆国 ニュージャージー, ニュー ブランズウィック, サマーセットストリーツ, オールド クイーンズ
(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】コクリエート組成物およびその製造および使用方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

コクリエートの集団を含むコクリエート組成物であって、コクリエートが、

- a) 1種以上の負に荷電した第1の脂質；
- b) 2価カチオンまたはより高い価数のカチオンである、カチオン；
- c) 中性の第2の脂質または中性の第2の脂質の群；および
- d) 生体関連分子

を含み、

生体関連分子が親水性である、または親水性領域を含み、

1種以上の負に荷電した第1の脂質の、中性の第2の脂質または中性の第2の脂質の群に対する比が、4:1～9:1であり、101種以上の負に荷電した第1の脂質が、ホスファチジルセリンを含み、中性の第2の脂質または中性の第2の脂質の群がホスファチジルコリン又はスフィンゴミエリンを含み、生体関連分子が、アミノグリコシドを含む、前記コクリエート組成物。

## 【請求項 2】

第2の脂質が、生体関連分子と水素結合を形成することが可能な脂質を含む、請求項1に記載のコクリエート組成物。

## 【請求項 3】

第2の脂質が負に荷電した第1の脂質の中に埋め込まれている、請求項1に記載のコクリ

20

エート組成物。

【請求項 4】

コクリエートの平均粒径が1ミクロン未満である、請求項1に記載のコクリエート組成物。

【請求項 5】

コクリエートの平均粒径が300nm未満である、請求項1に記載のコクリエート組成物。

【請求項 6】

ホスファチジルセリンが、ジオレオイルPS(DOPS)またはダイズ由来ホスファチジルセリン(ダイズPS)である、請求項1に記載のコクリエート組成物。

【請求項 7】

コクリエートが少量の、第1または第2の脂質とは異なる第3の脂質をさらに含む、請求項1に記載のコクリエート組成物。

【請求項 8】

第3の脂質が、双性イオン性脂質、PEG化脂質、カチオン性脂質、またはポリカチオン性脂質からなる群より選択される、請求項7に記載のコクリエート組成物。

【請求項 9】

2価またはより高い価数のカチオンが金属イオンである、請求項1に記載のコクリエート組成物。

【請求項 10】

2価またはより高い価数の金属カチオンが、カルシウム、亜鉛、バリウム、およびマグネシウムカチオンからなる群より選択される、請求項9に記載のコクリエート組成物。

【請求項 11】

生体関連分子が正または負に荷電している、請求項1に記載のコクリエート組成物。

【請求項 12】

アミノグリコシドが、ゲンタマイシン、ネチルマイシン、トブラマイシン、アミカシン、カナマイシンA、カナマイシンB、ネオマイシン、パロモマイシン、ニアミン、ストレプトマイシン、ジヒドロストレプトマイシン、アプラマイシン、リボスタマイシン、又はスペクチノマイシンからなる群より選択される、請求項1に記載のコクリエート組成物。

【請求項 13】

アミノグリコシドがアミカシンである、請求項12に記載のコクリエート組成物。

【請求項 14】

さらに凝集阻害剤を含む、請求項1に記載のコクリエート組成物。

【請求項 15】

凝集阻害剤が塩化ナトリウムである、請求項14に記載のコクリエート組成物。

【請求項 16】

コクリエートが胆汁酸塩をさらに含む、請求項1に記載のコクリエート組成物。

【請求項 17】

有効量の請求項1に記載のコクリエート組成物および製薬上許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 18】

a) 生体関連分子を、1種以上の負に荷電した第1の脂質および中性の第2の脂質または中性の第2の脂質の群を含むリボソームと混合すること；および  
b) カルシウム、亜鉛、バリウム、およびマグネシウムカチオンからなる群より選択される2価カチオンまたはより高い価数のカチオンであるカチオンを加えて、コクリエート組成物を製造すること

を含み、

1種以上の負に荷電した第1の脂質の、中性の第2の脂質または中性の第2の脂質の群に対する比が、4:1～9:1であり、

中性の第2の脂質または中性の第2の脂質の群がホスファチジルコリン又はスフィンゴミエリンを含む、請求項1に記載のコクリエート組成物を製造する方法。

10

20

30

40

50

**【請求項 19】**

総脂質の生体関連分子に対する比が少なくとも4:1である、請求項18に記載の方法。

**【請求項 20】**

2価の金属カチオンがカルシウムであり、カルシウムカチオンが塩化カルシウムから供給される、請求項18に記載の方法。

**【請求項 21】**

混合物の塩化カルシウム濃度が2 mM～10 mMである、請求項20に記載の方法。

**【請求項 22】**

さらに、リポソームと混合する前に生体関連分子を濾過または精製することを含む、請求項18に記載の方法。

10

**【請求項 23】**

さらに、凝集阻害剤をコクリエート組成物と混合する工程c)を含む、請求項18に記載の方法。

**【請求項 24】**

凝集阻害剤が塩化ナトリウムである、請求項23に記載の方法。

**【請求項 25】**

混合物の塩化ナトリウム濃度が1 mM～1 Mである、請求項24に記載の方法。

**【請求項 26】**

さらに、コクリエート組成物を凍結乾燥により乾燥する工程c)を含む、請求項18に記載の方法。

20

**【請求項 27】**

さらに、コクリエート組成物を凍結乾燥により乾燥する工程d)を含む、請求項23に記載の方法。

**【請求項 28】**

疾患または障害を治療するための、請求項1に記載の組成物。

**【請求項 29】**

疾患または障害が、真菌感染、細菌感染またはウイルス感染である、請求項28に記載の組成物。

**【請求項 30】**

コクリエートの集団を含むアミノグリコシド-コクリエート組成物であって、コクリエートが、

30

a) 1種以上の負に荷電した第1の脂質；

b) 2価カチオンまたはより高い価数のカチオンである、カチオン；

c) 中性の第2の脂質または中性の第2の脂質の群；および

d) アミノグリコシド；

を含み、

1種以上の負に荷電した第1の脂質の、中性の第2の脂質または中性の第2の脂質の群に対する比が、4:1～9:1であり、

1種以上の負に荷電した第1の脂質が、ホスファチジルセリンを含み、

中性の第2の脂質または中性の第2の脂質の群がホスファチジルコリン又はスフィンゴミエリンを含む、前記アミノグリコシド-コクリエート組成物。

40

**【請求項 31】**

アミノグリコシド-コクリエート組成物を製造するために使用されるアミノグリコシドの少なくとも5%が、アミノグリコシド-コクリエート組成物の中に組み込まれる、請求項30に記載のコクリエート組成物。

**【請求項 32】**

コクリエートが少量の、第1または第2の脂質とは異なる第3の脂質をさらに含み、第3の脂質が、双性イオン性脂質、PEG化脂質、カチオン性脂質、またはポリカチオン性脂質からなる群より選択される、請求項30に記載のコクリエート組成物。

**【請求項 33】**

50

アミノグリコシドがアミカシンまたはゲンタマイシンである、請求項30に記載のコクリエート組成物。

【請求項 3 4】

コクリエートの平均粒径が1ミクロン未満である、請求項30に記載のコクリエート組成物。

【請求項 3 5】

ホスファチジルセリンが、ジオレオイルPS(DOPS)、またはダイズ由来ホスファチジルセリン(ダイズPS)を含む、請求項30に記載のコクリエート組成物。

【請求項 3 6】

2価またはより高い価数のカチオンが金属イオンである、請求項30に記載のコクリエート組成物。 10

【請求項 3 7】

さらに凝集阻害剤を含む、請求項30に記載のコクリエート組成物。

【請求項 3 8】

有効量の請求項30に記載のコクリエート組成物および製薬上許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 3 9】

a) アミノグリコシドを脂質を含むリポソームと混合すること；および  
b) カルシウム、亜鉛、バリウム、およびマグネシウムカチオンからなる群より選択される2価カチオンまたはより高い価数のカチオンであるカチオンを加えて、コクリエート組成物を製造すること 20

を含む、請求項30に記載のコクリエート組成物を製造する方法。

【請求項 4 0】

総脂質のアミノグリコシドに対する比が少なくとも10:1である、請求項39に記載の方法。 。

【請求項 4 1】

中性の第2の脂質または中性の第2の脂質の群が、スフィンゴミエリンを含む、請求項1または30に記載のコクリエート組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】 30

【0 0 0 1】

関連出願

本出願は、2012年4月23日に出願された米国仮出願第61/636,793号；2012年4月5日に出願された米国仮出願第61/620,656号；2012年3月8日に出願された米国仮出願第61/608,272号；2012年1月25日に出願された米国仮出願第61/590,531号；2011年10月14日に出願された米国仮出願第61/547,325号；2011年12月13日に出願された米国仮出願第61/570,067号；2011年9月13日に出願された米国仮出願第61/534,075号；および2011年5月5日に出願された米国仮出願第61/482,996号の利益を主張する。前記出願のそれぞれの全文がこの参照により全体として本明細書に組み込まれるものとする。

【背景技術】 40

【0 0 0 2】

コクリエート(cochleate)は、ホスファチジルセリンとカルシウムとの相互作用により自発的に形成される、無水の、安定な、多層の脂質結晶である(例えば、米国特許第4,078,052号；第5,643,574号；第5,840,707号；第5,994,318号；第6,153,217号；第6,592,894号、ならびにPCT公開公報WO 200404/091572；WO 2004/091578；WO 2005/110361および米国特許公開公報2010/0178325を参照されたい。前記のそれぞれがこの参照により本明細書に組み込まれるものとする)。コクリエート製剤は、粘膜分泌物、血漿および胃腸液を含む生理的液体中で損なわれないため、経口、粘膜および静脈内を含む多くの投与経路による生物活性化合物の送達を仲介する。伝統的に、このようなコクリエート製剤は、アンホテリシンB(amphotericin B)(AmB)などの疎水性の医薬品有効成分(API)の取り込みに限定 50

されてきた。したがって、当技術分野において、親水性APIの安定で増強されたコクリエート化(encapsulation)に適したコクリエート組成物を製造および使用するための組成物および方法を提供することが強く必要とされている。

#### 【発明の概要】

##### 【0003】

本発明は、少なくとも部分的に、目的の生体関連分子をコクリエート化するための、特に親水性生体関連分子のコクリエート化を増強するための、安定なコクリエート製剤を製造することができるという発見に基づく。

##### 【0004】

一態様において、本発明は、コクリエートの集団を含むコクリエート組成物であって、コクリエートが、a)負に荷電した第1の脂質；b)2価カチオンまたはより高い価数のカチオンである、カチオン；c)カチオンと相互作用するアニオン性官能基を持たない第2の脂質；およびd)さらなる生体関連分子を含む、前記コクリエート組成物を提供する。前記コクリエート組成物を含む医薬組成物、前記コクリエート組成物を製造する方法、および前記コクリエート組成物を治療的適用に使用する方法も提供される。

##### 【0005】

別の態様において、本発明は、コクリエートの集団を含むコクリエート組成物であって、コクリエートが、a)負に荷電した第1の脂質；b)2価カチオンまたはより高い価数のカチオンである、カチオン；c)カチオンとイオン的に相互作用するカチオン性官能基を有する両親媒性の第2の脂質；およびd)さらなる生体関連分子を含む、前記コクリエート組成物を提供する。前記コクリエート組成物を含む医薬組成物、前記コクリエート組成物を製造する方法、および前記コクリエート組成物を治療的適用に使用する方法も提供される。

##### 【0006】

さらに別の態様において、本発明は、コクリエートの集団を含むアミノグリコシド-コクリエート組成物であって、コクリエートが、a)負に荷電した脂質；b)2価カチオンまたはより高い価数のカチオンである、カチオン；c)アミノグリコシドを含む、前記コクリエート組成物を提供する。前記コクリエート組成物を含む医薬組成物、前記コクリエート組成物を製造する方法、および前記コクリエート組成物を治療的適用に使用する方法も提供される。

##### 【図面の簡単な説明】

##### 【0007】

【図1】コクリエート製剤を調製するための典型的な方法の代表的概略図を示す図である。

【図2A-2B】トリ型結核菌101感染(図2A)およびトリ型結核菌109感染(図2B)マクロファージをアミカシン-コクリエート調製物により処理した結果を示す図である。

【図3A-3B】経口投与(図3A)または腹腔内投与(図3B)アミカシン-コクリエート調製物により治療されたトリ型結核菌101感染C57/B16マウスのin vivo有効性の結果を示す図である。

【図4】アンホテリシンB(AmB)の構造式を示す図である。

【図5】アンホテリシンB-コクリエート(CAMB)を作るための製造戦略の概略を示す図である。

【図6】in vitroでのCAMBおよびファンギゾン(DAMB)を用いたマクロファージにおけるカンジダ(Candida)感染の治療の結果を示す図である。

【図7】マウスの全身アスペルギロシス(Aspergillosis)感染およびその後のアンホテリシンB-コクリエート(CAMB)の経口投与による治療の生存率の評価および組織負荷の分析の模式的プロトコールを示す図である。

【図8】CAMBおよびDAMBを用いたアスペルギルス・フミガタスに感染したマウスの治療結果を示す図である。

【図9】アスペルギルス・フミガタスに感染し、CAMBにより治療されたマウスにおけるアスペルギルス菌の組織負荷を示す図である。

【図10】イヌおよびヒトへの投与から得たCAMB薬物動態データの結果を示す図である。

10

20

30

40

50

【図11】インフルエンザタンパク質-コクリエートの経口または筋肉内投与によりもたらされる抗インフルエンザ特異的血清抗体力値を示す図である。

【図12】インフルエンザタンパク質-コクリエートの経口投与によりもたらされる検出可能なインフルエンザウイルスレベルを示さないマウスのパーセンテージを示す図である。

【図13A - 13B】親水性分子のコクリエート化を増強するために有用なコクリエート化法(図13A)および生成物(図13B)の概要図を示す図である。

【図14】APIのコクリエート化のために提供されてコクリエート内に存在する脂質の組成の違いによる親水性APIのコクリエート化の量の結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

10

【0008】

#### 発明の詳細な説明

本発明は、目的の生体関連分子をコクリエート化するための、特に親水性生体関連分子のコクリエート化を増強するための、安定なコクリエート製剤を製造することができるという発見に関する。特に、本明細書に定義される特徴を有する第2の脂質を加えることにより、親水性生体関連分子のコクリエート化効率を劇的に増加させることができることは、驚くべきことであり、予想されなかつたことであった。

【0009】

本発明をより容易に理解するために、まずいくつかの用語を定義する。さらなる定義は詳細な説明全体に渡って記載される。

20

【0010】

#### I. 定義

本明細書において、冠詞「a」および「an」は、1つまたは1つよりも多い(すなわち、少なくとも1つの)冠詞の文法的対象を指す。例として、「要素(an element)」は、1つの要素または1つよりも多い要素を意味する。

【0011】

本明細書において使用される場合、用語「アシル」はその炭素原子を介して水素(すなわち、ホルミル)または脂肪族基(例えば、アセチル)等に結合するカルボニル基を指す。

【0012】

30

本明細書において使用される場合、用語「脂肪族基」は、直鎖または分枝鎖を特徴とする、典型的には1~24個の炭素原子を有する有機分子を含む。複雑な構造において、鎖は分枝、架橋、または交差架橋していてもよい。脂肪族基としては、脂肪族基、アルケニル基、アルキニル基、およびそれらの任意の組合せが挙げられる。

【0013】

本明細書において使用される場合、用語「アルキル」は、1個以上の炭素原子、例えば、1~24個の炭素原子を有する飽和炭化水素を含む化学基を指し、直鎖アルキル基(例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル等)および分枝鎖アルキル基(イソプロピル、tert-ブチル、sec-ブチル、イソブチル等)を含む。直鎖および分枝鎖アルキル基の両方がこの用語に包含されると理解されるべきである。ある実施形態において、直鎖または分枝鎖アルキル基は、その骨格に30個以下の炭素原子を有し得る(例えば、直鎖ではC1~C30または分枝鎖ではC3~C30)。ある実施形態において、直鎖または分枝鎖アルキル基は、その骨格に20個以下(例えば、直鎖ではC1~C20または分枝鎖ではC3~C20)、さらに特定の実施形態においては、18個以下の、炭素原子を有し得る。例えば、「C4~C24アルキル」における用語「C4~C24」は、4~24個の炭素原子を含むアルキル基を意味する。

40

【0014】

本明細書において使用される場合、用語「アルケニル」、「アルキニル」、および「アルケニレン」は、アルキルに類似しているが、それぞれ少なくとも1つの二重または三重炭素-炭素結合を含む不飽和脂肪族基を指す。

50

## 【0015】

本明細書において使用される場合、用語「体液」は、体から排泄または分泌される液体ならびに正常には排泄または分泌されない液体（例えば、羊水、房水、胆汁、血液および血漿、脳脊髄液、耳垢および耳漬、カウパー液および尿道球腺液、乳び、キームス、大便、膣液、間質液、細胞内液、リンパ液、月経、母乳、粘液、胸膜液、膿、唾液、皮脂、精液、血清、汗、滑液、涙、尿、膣分泌液、ガラス体液、嘔吐物）を指す。

## 【0016】

本明細書において使用される場合、用語「コクリエート」、「脂質沈殿物」および「沈殿物」は、互換的に使用され、一般に、内部の水空間をほとんどまたは全く含まない、典型的には積み重ねられたおよび／または巻き上げられた、カチオンシート（カチオンシートは1種以上の多価カチオンを含む）および脂質二重層シートを交互に含む脂質沈殿成分を指す。さらに、用語「コクリエート化」は、例えばカチオンシートに組み込まれることおよび／または脂質二重層に含まれることにより、コクリエート構造と一体化することを意味する。

10

## 【0017】

本明細書において使用される場合、「細胞と接触する」は、本明細書に記載される薬剤の1種以上の組合せに細胞を曝すことであると定義される。一実施形態において、前記組合せは、局所、領域内または全身手段を用いて、直接または間接的に細胞に投与することができる。

## 【0018】

20

用語「モジュレート」は、下方制御および上方制御を含む。本明細書において、用語「下方制御」、「減少」、「低下」、「阻害」等はすべて、一般に、統計的に有意な量の減少を意味するために使用される。本明細書において、用語「上方制御」、「増加」、「増強」等はすべて、一般に、統計的に有意な量の増加を意味するために使用される。例えば、増加または減少は、対照と比較して、少なくとも約10%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、100%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%、1000%、もしくはそれ以上、または10～1000%の間（下限および上限を含む）の任意の範囲の差であり得る。いくつかの実施形態において、対照は、治療をおこなった場合とおこなわなかった場合とにおける細胞増殖などの細胞状態における変化であり得る。別の実施形態において、対照は、対象の野生型ポリペプチドの活性であり得る。「過活性」または「有意に高いレベルの活性」は、活性の評価に使用したアッセイの標準誤差よりも大きい分子または試験サンプルの活性レベルを指し、好ましくは、基準または対照サンプル（好ましくはいくつかの対照サンプルの平均活性）と比較して少なくとも2倍、より好ましくは3、4、5または10倍以上である。用語「低活性」は、「過活性」の反対を指す。

30

## 【0019】

本明細書において使用される場合、用語「多価カチオン」は、2価カチオンもしくはより高い価数のカチオン、または2価以上の正の電荷を有する任意の化合物を指し、カルシウム、バリウム、亜鉛、鉄およびマグネシウムなどの鉱物カチオン、ならびに負に荷電した脂質にキレート化または架橋することが可能な複数の正電荷を有するイオンまたは他の構造を形成することが可能な薬物および他の化合物などの他の元素を含む。それに加えて、またはそれに代えて、多価カチオンは他の多価カチオン性化合物、例えば、カチオン性生体関連分子またはプロトン化された生体関連分子を含み得る。

40

## 【0020】

本明細書において使用される場合、用語「プロトン化可能な」は、1個以上のプロトンを獲得する能力を有する分子を指す。プロトン化可能な分子は弱塩基性である可能性があり、酸付加またはプロトン付加によりプロトン化され得る。それに加えて、またはそれに代えて、プロトン化可能な分子は中性または弱酸性である可能性があり、同じ方法でプロトン化され得る。したがって、プロトン化可能な分子がアニオン性または中性であって、プロトン化によりカチオン性になるか、またはプロトン化可能な分子がカチオン性であつ

50

て、プロトン化によりさらに高いカチオン性になる可能性がある。場合により、プロトン化された状態は、酸性化または本明細書に記載される他の方法により誘導することができる。プロトン化は分子をカチオン性にするか、または既にカチオン性である生体関連分子の価数を、例えば1価から2価もしくは3価へと増大させる。同様に、本明細書において使用される場合、用語「プロトン化」は、分子の価数を増大させる過程を指す。「プロトン化された」は、プロトン化を受けた生体関連分子を指す。結果として、価数は、例えば0から1、1から2、2から3、3から4、またはそれらの任意の組合せ、例えば0から3に増加し得る。価数を増大させるあらゆる方法、例えばpHの増加を、分子をプロトン化するために使用することができる。用語「弱塩基性」は、中性のpHでプロトンを受容する能力を有する分子を指す。すなわち、弱塩基性生体関連分子はプロトン化によりカチオン性またはさらに高いカチオン性になることができる。このように、弱塩基性分子はアニオン性または中性である可能性があり、プロトン化によりカチオン性になり得る。あるいは、弱塩基性分子はカチオン性である可能性があり、プロトン化によりさらに高いカチオン性に、すなわち、多カチオン性になり得る。対照的に、「弱酸性」分子は、中性のpHでプロトンを放出する能力を有する。「プロトン化可能な弱酸性」分子は、それらの弱酸性のために、低いpHにおいてプロトンを受容する能力を有する。

#### 【0021】

本明細書において使用される場合、用語「生体関連分子」は、コクリエート化されるべき分子を指し、一般にコクリエートの沈殿に使用される脂質およびイオンを指さない。生体関連分子には、生物学的に興味深い特性を有する任意の化合物、例えば、生体系の生命現象に関与するものが含まれる。生体関連分子は、有機または無機、モノマーまたはポリマー、宿主生物体に対して内因性であるまたはない、天然またはin vitroで合成されたもの等であり得る。

#### 【0022】

本明細書において使用される場合、用語「生存」は以下：死までの生存、全生存としても知られる（前記死は、死因を問わない死、または腫瘍関連の死のいずれであってもよい）；「無再発生存」（再発という用語は限局性および遠位再発の両方を含む）；無転移生存；無病生存（病気という用語は癌およびそれに伴う病気を含む）のすべてを含む。前記生存の長さは定義された開始点（例えば診断または治療開始の時）および終了点（例えば、死、再発または転移）を基準にして計算することができる。さらに、治療の有効性の基準は、化学療法への反応、生存率、ある期間内の転移率、および腫瘍再発率を含むように拡大することができる。

#### 【0023】

本明細書において使用される場合、用語「被験体」は、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類動物、または任意の他の哺乳動物を含むがこれらに限定されない任意の動物を意味する。一実施形態において、被験体は霊長類動物である。別の実施形態において、被験体はヒトである。

#### 【0024】

本明細書において使用される場合、用語「相乗的」は、一緒に投与された場合、個々の治療の相加効果よりも高い有効性を有する、本明細書に記載される治療薬の組合せを指す。治療の組合せ（例えば、治療薬の組合せ）の相乗効果により、疾患または障害、例えば増殖性障害を有する被験体に対して、より少ない投与量の1種以上の治療薬を使用することおよび/または薬剤の投与頻度を減らすことが可能になる。より少ない投与量の1種以上の治療薬を利用することにより、疾患または障害の治療における治療の効果を減少させることなく、被験体に対する薬剤の投与に伴う毒性が減少する。さらに、相乗効果は、疾患または障害、例えば増殖性障害の予防、管理または治療における薬剤の改善された効果をもたらすことができる。最後に、治療の組合せの相乗効果は、いずれかの治療薬の単独での使用に伴う有害なまたは望まれない副作用を回避または減少させ得る。本明細書において使用される場合、用語「組合せ」は、1種よりも多い治療薬の使用を指す。用語「組合せ」

10

20

30

40

50

の使用は、治療薬が疾患または障害、例えば増殖性障害を有する被験体に投与される順序を限定しない。本明細書に記載される化合物などの第1の治療薬は、アミノグリコシド-コクリエート組成物などの第2の治療薬の投与の前に（例えば、5分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、8週間、または12週間前に）、同時に、または後に（例えば、5分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、8週間、または12週間後に）、疾患または障害を有する被験体に投与することができる。

## 【0025】

「転写されたポリヌクレオチド」または「ヌクレオチド転写物」は、本発明のマーカーの転写および存在する場合にはRNA転写物の正常な転写後プロセシング（例えば、スプライシング）、およびRNA転写物の逆転写により作られた成熟mRNAのすべてまたは一部と相補的または相同なポリヌクレオチド（例えば、mRNA、hnRNA、cDNA、または前記RNAもしくはcDNAの類似物）である。

## 【0026】

特定のタンパク質のアミノ酸配列とそのタンパク質をコードし得るヌクレオチド配列との間には、遺伝コード（下に示す）により定義される通りの、公知の明確な対応が存在する。同様に、特定の核酸のヌクレオチド配列とその核酸によりコードされるアミノ酸配列との間には、遺伝コードにより定義される通りの、公知の明確な対応が存在する。

## 【0027】

## 遺伝コード

アラニン(Ala、A)	GCA、GCC、GCG、GCT	10
アルギニン(Arg、R)	AGA、ACG、CGA、CGC、CGG、CGT	
アスパラギン(Asn、N)	AAC、AAT	
アスパラギン酸(Asp、D)	GAC、GAT	
システイン(Cys、C)	TGC、TGT	
グルタミン酸(Glu、E)	GAA、GAG	
グルタミン(Gln、Q)	CAA、CAG	
グリシン(Gly、G)	GGA、GGC、GGG、GGT	
ヒスチジン(His、H)	CAC、CAT	20
イソロイシン(Ile、I)	ATA、ATC、ATT	
ロイシン(Leu、L)	CTA、CTC、CTG、CTT、TTA、TTG	
リジン(Lys、K)	AAA、AAG	
メチオニン(Met、M)	ATG	
フェニルアラニン(Phe、F)	TTC、TTT	30
プロリン(Pro、P)	CCA、CCC、CCG、CCT	
セリン(Ser、S)	AGC、AGT、TCA、TCC、TCG、TCT	
スレオニン(Thr、T)	ACA、ACC、ACG、ACT	
トリプトファン(Trp、W)	TGG	
チロシン(Tyr、Y)	TAC、TAT	40
バリン(Val、V)	GTA、GTC、GTG、GTT	
終止コドン(end)	TAA、TAG、TGA	

遺伝コードの重要で周知の特徴は、その重複性であり、それにより、タンパク質を作るために使用されるアミノ酸のほとんどに対して、1種よりも多いコード化ヌクレオチドトリプレットが使用される（上に示した）。したがって、いくつかの異なるヌクレオチド配列がある1つのアミノ酸配列をコードし得る。このようなヌクレオチド配列は、それらがすべての生物体において同じアミノ酸配列の生産をもたらすので（ある生物体がいくつかの配列を他の配列と比べて効率的に翻訳する場合があるが）、機能的に同等であると考えられる。さらに、時折、あるヌクレオチド配列中にプリンまたはピリミジンのメチル化型

が見いだされ得る。このようなメチル化はトリヌクレオチドコドンと対応するアミノ酸の間のコード化関係に影響を与えない。

#### 【0028】

前記の点から、本発明の融合タンパク質またはポリペプチド（またはその任意の部分）をコードするDNAまたはRNAのヌクレオチド配列を、DNAまたはRNAをアミノ酸配列に翻訳するための遺伝コードを用いて融合タンパク質またはポリペプチドアミノ酸配列を導き出すために使用することができる。同様に、融合タンパク質またはポリペプチドアミノ酸配列について、その融合タンパク質またはポリペプチドをコードすることができる対応するヌクレオチド配列を遺伝コードから推論することができる（その重複性のために、あるアミノ酸配列に対して複数の核酸配列ができるであろう）。そこで、本明細書における融合タンパク質またはポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の説明および／または開示は、ヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列の説明および／または開示をも含むと見なされるべきである。同様に、本明細書における融合タンパク質またはポリペプチドアミノ酸配列の説明および／または開示はそのアミノ酸配列をコードすることができるすべての可能なヌクレオチド配列の説明および／または開示をも含むと見なされるべきである。

10

#### 【0029】

### II. コクリエート組成物

#### A. コクリエート

コクリエートおよびそれを製造および使用する方法は、例えば、米国特許第4,078,052号；第5,643,574号；第5,840,707号；第5,994,318号；第6,153,217号；第6,592,894、ならびにPCT公開公報WO 200404/091572；WO 2004/091578；WO 2005/110361および米国特許公開公報2010/0178325（これらのそれぞれがこの参照により本明細書に組み込まれる）に開示されている。コクリエート送達ビヒクルは、単純な天然の材料、例えば、ホスファチジルセリンおよびカルシウムから構成可能な安定な脂質-カチオン沈殿物である。天然の分子（例えば、ダイズ脂質）および／または合成もしくは改変脂質の混合物を利用することができる。

20

#### 【0030】

コクリエート構造は、一体となった「コクリエート化された」分子の分解からの保護を提供する。血清および粘膜分泌物中のin vivoの二価カチオン濃度は、コクリエート構造が維持される程度である。そのため、コクリエートと一体となった分子、例えば生体関連分子の大部分は、本来固体の、非水性の、安定な、不浸透性構造の内層中に存在する。コクリエート構造は一連の固体層を含むので、コクリエートの外層が苛酷な環境条件または酵素に曝された場合でさえも、コクリエート構造内部の成分は実質的に損なわれないままである。

30

#### 【0031】

コクリエート内部は本来水を含まず、酸素の浸透に対して抵抗性である。酸素および水は、貯蔵寿命の減少につながる分子の分解および変質の主要な原因である。したがって、コクリエート化により、コクリエート化された生体関連分子に広範な貯蔵安定性を与えることができる。

40

#### 【0032】

貯蔵に関して、コクリエートはカチオンを含有する緩衝液中に貯蔵することができ、または凍結乾燥もしくは他の方法により粉末に変えて室温で貯蔵することができる。所望の場合には、コクリエートは投与の前に液体により再構成することができる。コクリエート調製物は、カチオンを含有する緩衝液中、4で2年以上、および凍結乾燥された粉末として室温で1年以上安定であることが示されている。

#### 【0033】

一実施形態において、コクリエートは、a)負に荷電した脂質成分、b)多価カチオン成分、およびc)カチオンと相互作用するアニオン性官能基を持たない第2の脂質および／またはカチオンとイオン的に相互作用するカチオン性官能基を有する両親媒性の第2の脂質を

50

含む。

【0034】

コクリエートは、安全で、単純で、明確に定義された天然物質、例えばPSおよびカルシウムから容易に調製することができる。天然脂質（例えば、ダイズ脂質）、合成脂質、および／または改変脂質の混合物も利用することができる。ホスファチジルセリンはすべての生体膜の天然の成分であり、脳において最も濃度が高い。使用されるリン脂質は合成的に製造することができ、または天然の供給源から調製することができる。ダイズPSは安価であり、大量に入手可能であり、ヒトにおける使用に適している。臨床研究により、PSが安全であること、および老齢脳における精神機能の維持に関与している可能性があることが示されている。多くのカチオン性脂質と異なり、コクリエート（少なくとも部分的にアニオン性脂質から構成される）は非炎症性および生物分解性である。マウスへの静脈内、腹腔内、鼻腔内および経口を含むさまざまな経路による複数回のコクリエートの投与のin vivoの耐性を評価した。同じ動物への高用量のコクリエート製剤の複数回の投与は毒性を示さず、コクリエートマトリックスに対する免疫反応の発生またはコクリエートビヒクルに伴う何らかの副作用のいずれももたらさない。

【0035】

本明細書において使用される場合、用語「中性脂質」は、生理的pHにおいて荷電されない形態または中性の双性イオン形態のいずれかで存在する多くの一連の脂質のいずれかを含み、そのためアニオン性官能基を持たない脂質の群に含まれる。このような脂質としては、例えば、ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、セラミド、スフィンゴミエリン、ジヒドロスフィンゴミエリン、セファリン、およびセレブロシドが挙げられる。本明細書に記載されるコクリエート組成物において使用するための中性脂質の選択は、一般に、例えばコクリエートの粒径および安定性を考慮することにより導かれる。さまざまな鎖長および飽和度を有するさまざまなアシル鎖基を有する脂質が利用可能であり、周知の技術により単離または合成することができる。一群の実施形態において、C14～C22の範囲の炭素鎖長を有する飽和脂肪酸を有する脂質を使用することができる。別の群の実施形態において、C14～C22の範囲の炭素鎖長を有する一または二不飽和脂肪酸を有する脂質を使用することができる。さらに、飽和および不飽和脂肪酸鎖の混合物を有する脂質を使用することができる。いくつかの実施形態において、本発明において使用される中性脂質は、DOPE、DSPC、DPPC、POPCまたは任意の関連するホスファチジルコリンである。本発明に有用な中性脂質は、スフィンゴミエリン、ジヒドロスフィンゴミエリン、またはセリンおよびイノシトールなどの他のヘッド基を有するリン脂質から構成されていてもよい。

【0036】

それにも関わらず、正味で中性の脂質はアニオン性官能基を含む（すなわち、カチオンとイオン的に相互作用することが可能な）ヘッド基を含むことができることに留意されたい。いかなる特定の理論にも拘束されることを望まないが、目的の医薬品有効成分(API)などの親水性分子または親水性領域を有する大分子は、損なわれずにコクリエート結晶マトリックス内部に埋め込まれた状態を保つ「いかだ」のように作用する脂質領域とAPIとを結びつけることにより予期せぬ増強された方式でコクリエート中に製剤することができると考えられる。

【0037】

他の実施形態において、「両親媒性脂質(amphiphilic lipidsまたはamphipathic lipids)」は、本明細書に記載されるコクリエート組成物に有用であり、脂質材料の疎水性部分が疎水相中に配向し、親水性部分が水相に配向する、任意の好適な材料を指す。一実施形態において、両親媒性分子は水不溶性炭化水素鎖に結合した極性水溶性基を有する。両親媒性脂質はアニオン性官能基を持たない脂質の群に含まれる。このような化合物としては、リン脂質、アミノ脂質、およびスフィンゴ脂質が挙げられるが、これらに限定されない。代表的なリン脂質としては、スフィンゴミエリン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファ

10

20

30

40

50

チジン酸、パルミトイロオレオイルホスファチジルコリン、リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイロホスファチジルコリン(DPPC)、ジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)、またはジリノレイルホスファチジルコリンが挙げられる。スフィンゴ脂質、糖スフィンゴ脂質類、ジアシルグリセロール、およびベータ-アシルオキシ酸などの他のリンを含まない化合物も使用することができる。さらに、このような両親媒性脂質は、トリグリセリドおよびステロールなどの他の脂質と容易に混合することができる。脂質混合物のステロール成分は、存在する場合、リポソーム、脂質ビヒクルまたは脂質粒子調製物の分野で従来使用されるいかななるステロールであってもよい。一実施形態において、ステロールはコレステロールである。

10

## 【0038】

いくつかの両親媒性脂質は本発明に使用することができる負に荷電した脂質である。本明細書において使用される場合、用語「負に荷電した脂質」には、酸性、塩基性または生理的pHの水溶液において形式的負電荷を有するヘッド基を有する脂質が含まれ、また、双性イオン性ヘッド基を有する脂質も含まれる。本発明における使用に適したこのようなアニオン性脂質としては、ホスファチジルセリン(PS)、ジオレオイルホスファチジルセリン(DOPS)、ホスファチジン酸(PA)、ホスファチジルイノシトール(PI)、および/またはホスファチジルグリセロール(PG)カルジオリピン、ジアシルホスファチジルセリン、ジアシルホスファチジン酸、N-ドデカノイルホスファチジルエタノールアミン、N-スクシニルホスファチジルエタノールアミン、N-グルタリルホスファチジルエタノールアミン、リジルホスファチジルグリセロール、中性脂質と結合した他のアニオン性修飾基、および/またはこれらの脂質の1種以上と他の脂質との混合物が挙げられるが、これらに限定されない。

20

## 【0039】

他の両親媒性脂質は、カチオン性官能基(すなわち、アニオンとイオン的に相互作用する能力)を有し得る正に荷電した脂質である。およその生理的pHで正味の正電荷を有するカチオン性脂質の例としては、N,N-ジオレイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロリド(「DODAC」)；N-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル-N,N-N-トリエチルアンモニウムクロリド(「DOTMA」)；N,N-ジステアリル-N,N-ジメチルアンモニウムプロミド(「DDAB」)；N-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(「DOTAP」)；1,2-ジオレイルオキシ-3-トリメチルアミノプロパンクロリド塩(「DOTAP.CI」)；3.ベータ-(N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル)コレステロール(「DC-Chol」)、N-(1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N-2-(スペルミンカルボキシアミド)エチル)-N,N-ジメチル-アンモニウムトリフルオロアセテート(「DOSPA」)、ジオクタデシルアミドグリシルカルボキシスペルミン(「DOGS」)、1,2-ジオレオイル(dileoyl)-sn-3-ホスホエタノールアミン(「DOPE」)、1,2-ジオレオイル-3-ジメチルアンモニウムプロパン(「DODAP」)、N,N-ジメチル-2,3-ジオレイルオキシ)プロピルアミン(「DODMA」)、およびN-(1,2-ジミリストリオキシプロブ-3-イル)-N,N-ジメチル-N-ヒドロキシエチルアンモニウムプロミド(「DMRIE」)が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、例えばLIPOFECTIN(DOTMAおよびDOPEを含む。GIBCO/BRLより入手可能)、およびLIPOFECTAMINE(DOSPAおよびDOPEを含む。GIBCO/BRLより入手可能)などの多くの市販のカチオン性脂質の調製物を使用することができる。いくつかの実施形態において、カチオン性脂質はアミノ脂質であり得る。

30

## 【0040】

一実施形態において、脂質は、負に荷電した脂質が総脂質の少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、もしくはそれ以上、またはこれらの間の任意の範囲を構成する脂質の混合物である。50%～100%の間の任意の範囲および値の負に荷電した脂質はここに包含されることが意図される。あるいは、特定の脂質の比を比分析により評価することができる。例えば、負に荷電した脂質の特定の第2の脂質または第2の脂質の群(例えばスフィンゴミエリンまたはホスファチジルコリン)に対する比は、少なくとも1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、15:1、20:1、25:1、30:1、35:1、40:1、45:1、50:1、100:1、もしくはそれ以上、またはこれらの間の任意の範囲であり

40

50

得る。1:1~100:1の間のすべての範囲および値はここに包含されることが意図される。

【0041】

本明細書において使用される脂質にはダイズをベースとする脂質が含まれる。いくつかの実施形態において、脂質には、ダイズをベースとするリン脂質などのリン脂質が含まれる。脂質は天然または合成であってよい。例えば、脂質には、エステル化された脂肪酸アシル鎖、またはエーテル結合（米国特許第5,956,159号に記載される）、ジスルフィド結合、およびそれらの類似物などの非エステル結合により結合した有機鎖が含まれ得る。

【0042】

一実施形態において、脂質鎖は約6~約26個の炭素原子を有し、脂質鎖は飽和または不飽和であり得る。本発明に有用な脂肪アシル脂質鎖としては、n-テトラデカン酸、n-ヘキサデカン酸、n-オクタデカン酸、n-エイコサン酸、n-ドコサン酸、n-テトラコサン酸、n-ヘキサコサン酸、cis-9-ヘキサデセン酸、cis-9-オクタデセン酸、cis,cis-9,12-オクタデセジエン酸、全-cis-9,12,15-オクタデセトリエン酸、全-cis-5,8,11,14-エイコサテラエン酸、全-cis-4,7,10,13,16,19-ドコサヘキサエン酸、2,4,6,8-テトラメチルデカン酸、ラクトバシル酸等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0043】

本発明のコクリエート組成物は、さらに、脂質調製物に使用されることが公知のさらなる化合物、例えば、PEG化脂質を含むことができる。PEG化脂質には、ポリエチレングリコール(PEG)のポリマーに共有結合した脂質が含まれる。PEGは、従来その分子量により分類され、例えば、PEG 6,000 MWは約6000の分子量を有する。PEG化脂質を加えることにより、一般に、コクリエート化することが可能な化合物（例えば、ペプチド、ヌクレオチド、および栄養素）の量が増加するであろう。PEG化脂質の例は、PEG 5,000 MWを有するジパルミトイロホスファチジルエタノールアミン(DPPE)である。

【0044】

B. 生体関連分子

本発明のコクリエートは、好ましくは生体関連分子と混合される、または生体関連分子を「ロード」される。「生体関連分子」はコクリエート化されるべき分子であり、一般にコクリエートの沈殿に使用される脂質およびイオンを指さない。生体関連分子には、生物学的に興味深い特性を有する任意の分子、例えば、生体の生命現象に関与するものが含まれる。生体関連分子は、有機または無機、モノマーまたはポリマー、宿主生物体に対して内因性であるまたはない、天然またはin vitroで合成されたもの等であり得る。

【0045】

生体関連分子の非限定的な例としては、ビタミン、ミネラル、栄養素、微量栄養素、アミノ酸、毒素、殺菌剤、静菌剤、補因子、酵素、ポリペプチド、ポリペプチド凝集体、ポリヌクレオチド、脂質、炭水化物、ヌクレオチド、デンプン、色素、脂肪酸、飽和脂肪酸、一不飽和脂肪酸、多不飽和脂肪酸、香味料、精油、抽出物、ホルモン、サイトカイン、ウイルス、細胞小器官、ステロイドおよび他の多環構造、糖類、金属、代謝毒、抗原、造影剤、ポルフィリン、テトラピロール色素、薬物等が挙げられる。

【0046】

生体関連分子は、造影剤などの診断薬であってもよい。造影剤としては、核剤(nuclear agent)および蛍光プローブ、例えばポルフィリンが挙げられる。ポルフィリンには、テトラピロール剤または色素が含まれる。このようなテトラピロール剤の1つは、可視スペクトル（暗紫色）に高い吸収を有する疎水性の蛍光性分子であるテトラフェニルポルフィリン亜鉛(ZnTPP)である。

【0047】

ポリヌクレオチドは、発現して生物活性ポリペプチドまたはポリヌクレオチドを生成するものであり得る。ポリペプチドは、免疫原として作用し得るか、例えば酵素活性を有し得る。ポリヌクレオチドは、触媒活性を有するか、例えばリボソームであるか、または転写もしくは翻訳の阻害剤（例えば、小干渉RNA(siRNA)またはアンチセンス分子）として作用する可能性がある。ポリヌクレオチドは、モルホリノアンチセンス分子などの修飾され

10

20

30

40

50

たアンチセンス分子を含むアンチセンス分子であり得る。ポリヌクレオチドは修飾することができ、例えば、モルホリノ骨格を有するように合成することができる。発現される場合、好ましくは、ポリヌクレオチドは、当業者に公知のプロモーターなどの必要な調節要素を含む。ポリペプチドの特定の例はインスリンである。

【0048】

生体関連分子は水性媒体中で疎水性である有機分子であり得る。また、生体関連分子は、生理的pHで1価または多価カチオン性、アニオン性、または正味で中性の水溶性分子であり得る。

【0049】

薬物は、タンパク質、小ペプチド、生物活性ポリヌクレオチド、抗生物質、抗ウイルス剤、麻酔剤、抗精神病薬、抗感染剤、抗真菌剤、抗癌剤、免疫抑制剤、免疫賦活薬、ステロイド抗炎症剤、非ステロイド抗炎症剤、抗酸化剤、合成または天然由来の抗うつ剤、精神機能を維持もしくは増強するまたは精神機能低下を阻害する物質、抗けいれん薬、HIVプロテアーゼ阻害剤、非求核性逆転写酵素阻害剤、サイトカイン、精神安定薬、粘液溶解薬、拡張薬、血管収縮薬、鬱血除去薬、ロイコトリエン阻害剤、抗コリン剤、抗ヒスタミン剤、コレステロール脂質代謝調節剤または血管拡張薬であり得るが、これらに限定されない。また、薬物は任意の店頭薬（処方箋不要の薬物）であってもよい。

10

【0050】

抗真菌剤は、ポリエンマクロライド、テトラエンマクロライド、ペンタエンマクロライド、フッ素化ピリミジン、イミダゾール、アゾール、トリアゾール、ハロゲン化フェノールエーテル、チオカルバメート、アリルアミン、ステロール阻害剤、および真菌の細胞壁成分に内挿する薬剤であり得る。

20

【0051】

非ステロイド抗炎症薬(NSAIDS)は、典型的には炎症、筋挫傷、および高熱を治療するために使用される。NSAIDSはシクロオキシゲナーゼ-1(COX1)およびシクロオキシゲナーゼ-2(COX2)を阻害することにより機能する。COX1酵素は胃の内壁の保護に関与し、COX2酵素は炎症過程に重要なプロスタグランジンの生産に関与している。残念ながら、市販のNSAIDSの調製品はCOX1およびCOX2の両方に対して作用を有し、そのため潰瘍、胃のむかつきまたは吐き気などの望まれない副作用を有する。

30

【0052】

好適な薬物の例としては、アンホテリシンB(Amphotericin B)、アシクロビル(acyclovir)、アドリアマイシン(adriamycin)、カルバマゼピン(carbamazepine)、イベルメクチン(ivermectin)、メルファレン(melphalen)、ニフェジピン(nifedipine)、インドメタシン(indomethacin)、クルクミン(curcumin)、アスピリン(aspirin)、イブプロフェン(ibuprofen)、ナプロキセン(naproxen)、アセトアミノフェン(acetaminophen)、ロフェコキシブ(rofecoxib)、ジクロフェナク(diclofenac)、ケトプロフェン(ketoprofen)、メロキシカム(meloxicam)、ナブメトン(nabumetone)、エストロゲン、テストステロン、ステロイド、フェニロイン(phenyloin)、エルゴタミン(ergotamines)、カンナビノイド、ラパマイシン(rapamycin)、プロパナジド(propanadid)、プロポフォール(propofol)、アルファジオン(alphadione)、エキノマイシン(eginomycin)、ミコナゾール(miconazole)、ミコナゾール硝酸塩、ケトコナゾール(ketoconazole)、イトラコナゾール(itraconazole)、フルコナゾール(fluconazole)、グリセオフルビン(griseofulvin)、クロトリマゾール(clotrimazole)、エコナゾール(econazole)、テルコナゾール(terconazole)、ブトコナゾール(butoconazole)、オキシコナゾール(oxiconazole)、スルコナゾール(sulconazole)、サペルコナゾール(saperconazole)、ボリコナゾール(voriconazole)、シクロピロックスオラミン(ciclopirox olamine)、ハロプロジン(halopropin)、トルナフタート(tolnaftate)、ナフチフィン(naftifine)、テルビナフィン塩酸塩(terbinafine hydrochloride)、モルホリン、フルシトシン(flucytosine)、ナタマイシン(natamycin)、ブテナフィン(butenafine)、ウンデシレン酸、ホワイトフィールド軟膏(Whitefield's ointment)、プロピオン酸、カプリル酸、クリオキノール(clioquinol)、硫化セレン、テニポシド(teniposide)、ヘキサメチル

40

50

メラミン、タキソール(taxol)、タキソテール(taxotere)、18-ヒドロキシデオキシコルチコステロン、プレドニゾロン(prednisolone)、デキサメタゾン(dexamethasone)、コルチゾン(cortisone)、ヒドロコルチゾン(hydrocortisone)、ピロキシカム(piroxicam)、ジアゼパム(diazepam)、ベラパミル(verapamil)、バンコマイシン(vancomycin)、トブラマイシン(tobramycin)、テイコプラニン(teicoplanin)、ブレオマイシン(bleomycin)、ペプチドグリカン、リストセチン(ristocetin)、シアロ糖タンパク質、オリエンチシン(orienticin)、アバポルシン(avaporcin)、ヘレベカルジン(helveticardin)、ガラカルジン(galactardin)、アクチノイジン(actinoidin)、ゲンタマイシン(gentamycin)、ネチルマイシン(neomycin)、アミカシン(amikacin)、カナマイシンA(kanamycin A)、カナマイシンB、ネオマイシン(neomycin)、パロモマイシン(paromomycin)、ネアミン(neamine)、ストレプトマイシン(streptomycin)、ジヒドロストレプトマイシン(dihydrostreptomycin)、アプラマイシン(apramycin)、リボスタマイシン(ribostamycin)、スペクチノマイシン(spectinomycin)、カスボファンギン(caspofungin)、エキノカンジンB(echinocandin B)、アクレアシンA(aculeacin A)、ミカファンギン(micafungin)、アニデュラファンギン(anidulafungin)、シロフンギン(cilofungin)、ニューモカンジン(pneumocandin)、ゲルダナマイシン(geledanamycin)、ナイスタチン(nystatin)、リファンピン(rifampin)、チルホスチン(typhostin)、グルカン合成阻害剤、ビタミンA酸、メサラミン(mesalamine)、リセドロネート(resedronate)、ニトロフラントイント(nitrofurantoin)、ダントロレン(dantrolene)、エチドロネート(etidronate)、ニコチン、アミトリptyリン(amitriptyline)、クロミプラミン(clomipramine)、シタロプラム(citalopram)、ドチエピン(dothiepin)、ドキセピン(doxepin)、フルオキセチン(fluoxetine)、イミプラミン(imipramine)、ロフェプラミン(lofepramine)、ミルタザピン(mirtazapine)、ノルトリptyリン(nortriptyline)、パロキセチン(paroxetine)、レボキセチン(reboxetine)、セルトラリン.sertraline)、トラゾドン(trazodone)、ベンラファキシン(venlafaxine)、ドーパミン、セイヨウオトギリソウ(St. John's wort)、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、アマスタチン(amastatin)、アンチパイン(antipain)、ベスタチン(bestatin)、ベンズアミジン(benzamidine)、キモスタチン(chymostatin)、3,4-ジクロロイソクマリン、エラスタチナール(elastatinal)、ロイペプチド(ieupeptin)、ペプスタチン(pepstatin)、1,10-フェナントロリン、ホスホラミド(phosphoramidon)、エトスクシミド(ethosuximide)、エトトイント(ethotoin)、フェルバメート(felbamate)、ホスフェニトイント(fosphenytoin)、ラモトリギン(lamotrigine)、レビチラセタム(levitiracetam)、メフェニロイン(mephenyloin)、メトスクシミド(methsuximide)、オキシカトバゼピン(oxcarbazepine)、フェノバルビタール(phenobarbital)、フェンスクシミド(phensuximide)、ブリミド(pramipexole)、トピリメート(topiramate)、トリメタジオン(trimethadione)、ゾニサミド(zonisamide)、サキナビル(saquinavir)、リトナビル(ritonavir)、インジナビル(indinavir)、ネルフィナビル(nelfinavir)、およびアンプレナビル(amprenavir)が挙げられる。

#### 【0053】

薬物は、シクロスボリン、アンギオテンシンI、IIおよびIII、エンケファリンおよびその類似物、ACTH、抗炎症性ペプチドI、II、III、プラジキニン、カルシトニン、 $\beta$ -エンドルフィン、ジノルフィン、ロイコキニン、黄体ホルモン放出ホルモン(LHRH)、インスリン、ニューロキニン、ソマトスタチン、P物質、甲状腺放出ホルモン(TRH)およびバソプレシンなどのポリペプチドであり得る。

#### 【0054】

薬物は抗原であり得るが、タンパク質抗原に限定されない。抗原は炭水化物またはDNAであってよい。抗原タンパク質の例としては、膜タンパク質、炭水化物、ウイルス由来のエンベロープ糖タンパク質、動物細胞タンパク質、植物細胞タンパク質、細菌タンパク質、および寄生虫タンパク質が挙げられる。

#### 【0055】

抗原は、供給源粒子、細胞、組織、または生物体から公知の方法により抽出することができる。抗原の生物活性は維持される必要はない。しかしながら、いくつかの例において

10

20

30

40

50

(例えば、タンパク質が膜融合またはリガンド結合活性または免疫系により認識される複合体構造を有する場合)、生物活性を維持することが望ましい。これらの場合には、膜タンパク質の生物活性を破壊しない界面活性剤を含有する抽出緩衝液を使用する。好適な界面活性剤としては、コール酸塩、デオキシコール酸塩等などのイオン性界面活性剤またはTween、BRIGもしくはTritonなどの不均質ポリオキシエチレン界面活性剤が挙げられる。

#### 【0056】

この方法を利用することにより、抗原の生物活性を保持したままのリポソームへの再構成、および効率的なコクリエート化が可能になる。この方法はまた、音波処理、極端なpH、温度、または圧力(これらすべては抗原の生物活性形態への効率的な再構成に悪影響を有し得る)を使用せずにおこなうことができる。

10

#### 【0057】

好適な栄養素としては、リコ펜、植物性化学物質または動物性化学物質などの微量栄養素、ビタミン、ミネラル、脂肪酸、アミノ酸、魚油、魚油抽出物、糖類、生薬製品および精油および着香剤が挙げられるが、これらに限定されない。特定の例としては、ビタミンA、B、B1、B2、B3、B12、B6、B-複合体、C、D、E、およびK、ビタミン前駆物質、カロテノイド、およびベータ-カロテン、レスベラトロール、ビオチン、コリン、イノシトール、イチョウ、ルテイン、ゼアキサンチン、クエルセチン、シリビニン、ペリリルアルコール、ゲニステイン、スルフロファン(sulfurophane)、およびエイコサペンタエン酸(EPA)、ガンマ-3、オメガ-3、ガンマ-6およびオメガ-6脂肪酸を含む必須脂肪酸、生薬、香辛料、および鉄が挙げられる。ミネラルとしては、ホウ素、クロム、コロイド状ミネラル、コロイド状銀、銅、マンガン、カリウム、セレン、バナジウム、硫酸バナジル、カルシウム、マグネシウム、バリウム、鉄および亜鉛が挙げられるが、これらに限定されない。

20

#### 【0058】

本明細書において使用される場合、「微量栄養素」は、体が外部の供給源から得なければならない栄養素である。一般に、微量栄養素は少量で体に必須である。

#### 【0059】

生体関連分子は糖類または甘味剤、例えば、サッカリン、イソマルト、マルトデキストリン、アスパルテーム、グルコース、マルトース、デキストロース、フルクトースおよびスクロースであり得る。着香剤としては、肉桂、バニラ、アーモンド、ペパーミント、スペアミント、カモミール、ゼラニウム、ショウガ、グレープフルーツ、ヒソップ、ジャスミン、ラベンダー、レモン、レモングラス、マジョラム、ライム、ナツメグ、オレンジ、ローズマリー、セージ、バラ、タイム、アニス、バジル、黒こしょう、茶または茶抽出物、生薬、柑橘類、香辛料または種子の油および抽出物を含むがこれらに限定されない、油、精油、または抽出物が挙げられる。

30

#### 【0060】

いくつかの実施形態において、生体関連分子はプロトン化された生体関連分子であり得る。一実施形態において、生体関連分子はプロトン化された弱塩基性生体関連分子である。従来、弱塩基性生体関連分子(例えば、バンコマイシンおよびトブラマイシン)の薬物動態は、それらの乳などの脂質中の低い溶解度に支配されてきた。さらに、本発明に従って使用するのに適した生体関連分子には、プロトン化された弱酸性生体関連分子またはプロトン化された両性生体関連分子が含まれ得る。弱酸性生体関連分子または両性生体関連分子は最初の正電荷を含んでも含まなくてもよい。このような生体関連分子は、プロトン化によりカチオン性にもなるであろう。プロトン化可能な生体関連分子は負に荷電しているか、正に荷電しているか、荷電していないか、または双性イオン性である可能性がある。一実施形態において、プロトン化された生体関連分子は1価である。他の実施形態において、プロトン化された生体関連分子は多価、例えば2価、3価等である。ある実施形態において、生体関連分子の大きさおよび/または立体構造のためにより高い価数が好ましい。一実施形態において、プロトン化された生体関連分子は、プロトン化されたタンパク質などのプロトンされたペプチドである。別の実施形態において、プロトン化された生体関連分子はプロトン化されたヌクレオチドである。プロトン化されたヌクレオチドは、ブ

40

50

ロトン化されたDNA、プロトン化されたRNA、プロトン化されたモルホリノ、プロトン化されたsiRNA分子、プロトン化されたリボザイム、プロトン化されたアンチセンス分子、またはプロトン化されたプラスミドであり得るが、これらに限定されない。

【0061】

一実施形態において、生体関連分子は、アミノ糖複合体、例えばアミノグリコシドまたはアミノグリコペプチドである。アミノ糖複合体の例としては、バンコマイシン、ティコプラニン、ブレオマイシン、ペプチドグリカン、リストセチン、シアロ糖タンパク質、オリエンチシン、アバポルシン、ヘレベカルジン、ガラカルジン、アクチノイジン、ゲンタマイシン、ネチルマイシン、トプラマイシン、アミカシン、カナマイシンA、カナマイシンB、ネオマイシン、パロモマイシン、ネアミン、ストレプトマイシン、ジヒドロストレプトマイシン、アプラマイシン、リボスタマイシン、およびスペクチノマイシンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0062】

本明細書において使用される場合、用語「アミノ糖複合体」は、別の分子と共有結合により結合したアミノ糖または炭水化物を含む化合物を指す。アミノ糖複合体のサブグループの例としては、アミノ糖タンパク質、アミノグリコシド、グリコサミノグリカン、およびアミノ糖ペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。「アミノ糖ペプチドは」は、合成されたおよび化学的に修飾された誘導体を含む、1以上のペプチドに共有結合により結合したアミノ糖または炭水化物を含む化合物である。アミノ糖ペプチドとしては、バンコマイシン、ティコプラニン、ブレオマイシン、ペプチドグリカン、リストセチン、シアロ糖タンパク質、オリエンチシン、アバポルシン、ヘレベカルジン、ガラカルジン、およびアクチノイジンが挙げられるが、これらに限定されない。これらの化合物の誘導体、例えば反応性アミンの還元的アルキル化により提供されるものも含まれる。Sundram et al., J. Org. Chem. 60:1102-03 (1995)を参照されたい。米国特許第4,639,433号、第4,643,987号および第4,698,327号には、バンコマイシンのN-アルキルおよびN-アシル誘導体が記載されている。欧州特許第435 503A1号および第667 353 A1号には、バンコマイシンおよびオリエンチシンAを含むさまざまなアミノ糖ペプチドの還元的アルキル化が記載されている。同様に、「アミノグリコシド」は、ストレプチジン(streptidine)または2-デオキシストレプトアミンまたはそれらの類似物にグリコシド結合により結合する少なくとも2つのアミノ糖を含む化合物である。類似物は、例えば酵素による切断に対する抵抗性を増大させるために修飾されたアミノグリコシドを含むことが意図されている。このような誘導体（例えば、カナマイシンの半合成誘導体であるアミカシン）は、他のアミノグリコシドに対して耐性を築いた個人または集団の治療に必要であり、現在または将来開発されるすべてのこのような誘導体は本発明の範囲に包含されるアミノグリコシドである。類似物は、構造的に関連するアミノサイクリトール（例えば、スペクチノマイシン）を含むことも意図される。アミノグリコシドとしては、ゲンタマイシン、ネチルマイシン、トプラマイシン、アミカシン、カナマイシンA、カナマイシンB、ネオマイシン、パロモマイシン、ネアミン、ストレプトマイシン、ジヒドロストレプトマイシン、アプラマイシン、リボスタマイシン、およびスペクチノマイシンが挙げられるが、これらに限定されない。アミノグリコシドは、場合により、ストレプトマイシン系（例えば、ストレプトマイシンおよびジヒドロストレプトマイシン）、カナマイシン系（例えば、カナマイシン、アミカシン、トプラマイシン）、ゲンタマイシン系（例えば、ゲンタマイシンおよびネチルマイシン）、およびネオマイシン系に分類することができる。アプラマイシンおよびスペシノマイシン(specinomycin)は、獣医師が非ヒト動物を治療するために使用する典型的なアミノグリコシドである。

【0063】

別の実施形態において、生体関連分子はエキノカンジンである。特に好ましい実施形態において、エキノカンジンは、以下：カスボファンギン、エキノカンジンB、アクレアシンA、ミカファンギン、アニデュラファンギン、シロフンギン、およびニューモカンジンのうちの1つ以上である。

10

20

30

40

50

## 【0064】

いくつかの実施形態において、生体関連分子は核酸、ポリペプチドおよび／または抗体である。

## 【0065】

例えば、アンチセンス核酸分子、すなわち、センス核酸標的に相補的な、例えば二本鎖cDNAまたはmRNA分子に相補的な分子のコクリエート化が有用であり得る。その結果、アンチセンス核酸分子はセンス核酸標的に水素結合する（すなわち、アニールする）ことができる。アンチセンス核酸は、コード鎖全体と、またはその一部のみと、例えばタンパク質コード領域（またはオープンリーディングフレーム）の全部または一部と、相補的であり得る。アンチセンス核酸分子は、本発明のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列のコード鎖の非コード領域の全部または一部に対してアンチセンスであり得る。非コード領域（「5'および3'非翻訳領域」）は、コード領域に隣接する5'および3'配列であり、アミノ酸に翻訳されない。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、約5、10、15、20、25、30、35、40、45、または50またはそれ以上のヌクレオチド長であり得る。本発明のアンチセンス核酸は、当業者に公知の方法を用いる化学合成および酵素的連結反応を用いて構築することができる。本発明のアンチセンス核酸分子は、典型的には、本発明の選択されたマーカーに相当するポリペプチドをコードする細胞mRNAおよび／またはゲノムDNAとハイブリダイズまたは結合して、例えば転写および／または翻訳を阻害することによりマーカーの発現を阻害するように、被験体に投与されるか、in situで生成される。ハイブリダイゼーションは、安定な二本鎖を形成する従来のヌクレオチドの相補性によるものであってよく、または、例えば、DNA二本鎖に結合するアンチセンス核酸分子の場合には、二重らせんの主溝における特異的相互作用によるものであってよい。本発明のアンチセンス核酸分子の投与経路の例としては、組織部位での直接注射、または血液もしくは骨髄に関連する体液中へのアンチセンス核酸の注入が挙げられる。あるいは、アンチセンス核酸分子は選択された細胞を標的とするように改変した後、全身投与することができる。例えば、全身投与のために、アンチセンス分子を、それらが選択された細胞表面に発現される受容体または抗原に特異的に結合するように、例えば細胞表面受容体または抗原に結合するペプチドまたは抗体とアンチセンス核酸分子とを連結することにより、改変することができる。アンチセンス核酸分子は、本明細書に記載されるベクターを用いて細胞に送達することも可能である。アンチセンス分子の十分な細胞内濃度を達成するために、アンチセンス核酸分子が強いpol IIまたはpol IIIプロモーターの制御下に置かれているベクター構築物が好ましい。

## 【0066】

本発明のアンチセンス核酸分子は、-アノマー核酸分子であり得る。-アノマー核酸分子は、相補的RNAと特異的二本鎖ハイブリッドを形成し、そこでは、通常の-単位とは対照的に、鎖は互いに平行である(Gaultier et al., 1987, Nucleic Acids Res. 15:6625-6641)。また、アンチセンス核酸分子は、2'-o-メチルリボヌクレオチド(Inoue et al., 1987, Nucleic Acids Res. 15:6131-6148)またはキメラRNA-DNA類似物(Inoue et al., 1987, FEBS Lett. 215:327-330)を含み得る。

## 【0067】

本明細書において使用される「RNA干渉剤」は、RNA干渉(RNAi)により、標的遺伝子、例えば本発明のマーカーの発現に干渉するまたは発現を阻害する任意の薬剤であると定義される。このようなRNA干渉剤としては、標的遺伝子、例えば本発明のマーカーと相同であるRNA分子、またはその断片、短鎖干渉RNA(siRNA)、およびRNA干渉(RNAi)により標的遺伝子の発現に干渉するまたは発現を阻害する小分子を含む核酸分子が挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0068】

「RNA干渉(RNAi)」は、標的遺伝子と同一であるか高度に類似している配列のRNAの発現または導入が、その標的遺伝子から転写されたメッセンジャーRNA(mRNA)の配列特異的分解または特異的転写後遺伝子サイレンシング(PTGS)をもたらし(Coburn, G. and Cullen,

10

20

30

30

40

50

B. (2002) J. of Virology 76(18):9225を参照されたい)、それにより標的遺伝子の発現を阻害する、進化的に保存された過程である(例えば、米国特許出願第20030153519A1号；第20030167490A1号；および米国特許第6,506,559号；第6,573,099号を参照されたい。これらは全体として参照により本明細書に組み込まれる)。一実施形態において、RNAは二本鎖RNA(dsRNA)である。この過程は、植物、無脊椎動物、および哺乳動物細胞において報告されている。自然界において、RNAiは、長いdsRNAのsiRNAと呼ばれる二本鎖断片への前進的切断を促進するdsRNA-特異的エンドヌクレアーゼであるダイサー(Dicer)により開始される。siRNAは、標的mRNAを認識および切断するタンパク質複合体中に組み込まれる。また、RNAiは、標的遺伝子を阻害またはサイレンシングするために、核酸分子、例えば合成siRNAまたはRNA干渉剤を導入することにより開始することができる。本明細書において使用される場合、「標的遺伝子発現の阻害」または「マーカー遺伝子発現の阻害」は、発現またはタンパク質活性または標的遺伝子(例えば、本発明のマーカー遺伝子)もしくは標的遺伝子によりコードされるタンパク質(例えば、本発明のマーカータンパク質)のレベルにおける何らかの減少を含む。減少は、RNA干渉剤により標的化されなかった場合の標的遺伝子の発現または標的遺伝子によりコードされたタンパク質の活性もしくはレベルと比較して、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%または99%、またはそれ以上であり得る。10

#### 【0069】

本発明はまた、「短鎖干渉RNA(siRNA)」(本明細書において「小干渉RNA」とも呼ばれる)に関する。前記分子は、例えば、RNAiにより、標的遺伝子の発現を阻害する機能を有する薬剤であると定義される。本明細書において使用される場合、用語siRNAは、当技術分野において配列特異的RNAiを仲介することが可能な分子であると定義されるすべての用語と同等であることが意図される。このような同等物としては、例えば、二本鎖RNA(dsRNA)、マイクロRNA(mRNA)、短鎖ヘアピンRNA(shRNA)、短鎖干渉オリゴヌクレオチド、および転写後遺伝子サイレンシングRNA(ptgsRNA)が挙げられる。siRNAは化学的に合成されてもよく、in vitroでの転写により生産されてもよく、または宿主細胞内で生産されてもよい。一実施形態において、siRNAは、約15～約40ヌクレオチド長、好ましくは、約15～約28ヌクレオチド長、より好ましくは約19～約25ヌクレオチド長、より好ましくは約19、20、21、または22ヌクレオチド長の二本鎖RNA(dsRNA)であり、それぞれの鎖に約0、1、2、3、4、または5ヌクレオチド長を有する3'および/または5'オーバーハングを含んでもよい。オーバーハングの長さは2つの鎖の間で独立しており、すなわち、一方の鎖のオーバーハングの長さは第2の鎖のオーバーハングの長さに依存しない。好ましくは、siRNAは、標的のメッセンジャーRNA(mRNA)の分解または特異的転写後遺伝子サイレンシング(PTGS)によりRNA干渉を促進することができる。20

#### 【0070】

別の実施形態において、siRNAは小ヘアピン(ステムループとも呼ばれる)RNA(shRNA)である。一実施形態において、これらのshRNAは、短い(例えば19～25ヌクレオチド)アンチセンス鎖、次いで5～9ヌクレオチドのループ、および類似のセンス鎖から構成される。あるいは、センス鎖がヌクレオチドループ構造の前にあり、アンチセンス鎖がその後にあってもよい。これらのshRNAは、プラスミド、レトロウイルス、およびレンチウイルスに含有され、例えば、pol III U6プロモーター、または別のプロモーターから発現される(例えば、Stewart, et al. (2003) RNA Apr; 9(4):493-501を参照されたい。これは参照により本明細書に組み込まれる)。30

#### 【0071】

RNA干渉剤、例えばsiRNA分子は、癌を有するまたは癌を有するリスクがある被験体に、本発明のマーカー遺伝子、例えば癌において過剰発現されるマーカー遺伝子(例えば、表3に記載されるマーカー)の発現を阻害し、それにより被験体における癌を治療、予防、または阻害するために投与し得る。

#### 【0072】

また、本発明はリボザイムを包含する。リボザイムは、それらが相補領域を有するmRNA50

などの1本鎖核酸を切斷することができるリボヌクレアーゼ活性を有する触媒RNA分子である。そのため、リボザイム（例えば、Haselhoff and Gerlach, 1988, *Nature* 334:585-591に記載されるハンマー・ヘッド・リボザイム）は、mRNA転写物を触媒的に切斷することによりそのmRNAによりコードされるタンパク質の翻訳を阻害するために使用することができる。標的のポリペプチドをコードする核酸分子に特異性を有するリボザイムは、マーカーに対応するcDNAのヌクレオチド配列に基づいて設計することができる。例えば、Tetrahymena L-19 IVS RNAの誘導体を、活性部位のヌクレオチド配列が切斷すべきヌクレオチド配列と相補的であるように構築することができる（Cechら、米国特許第4,987,071号；およびCechら、米国特許第5,116,742号を参照されたい）。あるいは、本発明のポリペプチドをコードするmRNAは、RNA分子のプールから特異的リボヌクレアーゼ活性を有する触媒RNAを選択するために使用することができる（例えば、Bartel and Szostak, 1993, *Science* 261:1411-1418を参照されたい）。

#### 【0073】

本発明はまた、3重らせん構造を形成する核酸分子を包含する。例えば、本発明のポリペプチドの発現は、そのポリペプチド（例えばプロモーターおよび／またはエンハンサー）をコードする遺伝子の調節領域に相補的なヌクレオチド配列を標的として、標的細胞における遺伝子の転写を防止する3重らせん構造を形成することにより阻害することができる。一般的に、Helene (1991) *Anticancer Drug Des.* 6(6):569-84; Helene (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660:27-36; およびMaher (1992) *Bioassays* 14(12):807-15を参照されたい。

#### 【0074】

さまざまな実施形態において、核酸分子は、例えば、安定性、ハイブリダイゼーション、または分子の溶解度を改良するために、塩基分子、糖分子またはリン酸骨格を改変することができる。例えば、核酸分子のデオキシリボースリン酸骨格を改変してペプチド核酸分子を作ることができる（Hyrup et al., 1996, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 4(1): 5-23を参照されたい）。本明細書において使用される場合、用語「ペプチド核酸」または「PNA」は、デオキシリボースリン酸骨格が擬似ペプチド骨格により置換されており、4種の天然の核酸塩基のみが保持されている核酸擬似物、例えばDNA擬似物を指す。PNAの中性の骨格が、低いイオン強度の条件下でのDNAおよびRNAへの特異的ハイブリダイゼーションを可能にすることが示されている。PNAオリゴマーの合成は、Hyrup et al. (1996), *supra*; Perry-O'Keefe et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14670-675に記載される通りの標準的な固相ペプチド合成プロトコールを用いて実施することができる。

#### 【0075】

PNAは、治療的および診断的適用に使用することができる。例えば、PNAは、例えば、転写もしくは翻訳の停止または複製の阻害を誘導することによる、遺伝子発現の配列特異的モジュレーションのためのアンチセンスまたはアンチジーン剤として使用することができる。例えば、PNAは、例えばPNA指向PCRクランピングによる遺伝子における単一塩基対突然変異の分析において；他の酵素、例えば、S1ヌクレアーゼと組み合わせて使用される人工制限酵素として（Hyrup (1996), *supra*）；またはDNA配列およびハイブリダイゼーションのプローブもしくはプライマーとして（Hyrup, 1996, *supra*; Perry-O'Keefe et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14670-675）、使用することができる。

#### 【0076】

別の実施形態において、PNAは、例えばそれらの安定性または細胞による取り込みを増大させるために、PNAに親油性もしくは他の補助基を結合することにより、PNA-DNAキメラを形成することにより、またはリポソームもしくは当業者に公知の他の薬物送達技術を使用することにより、改変することができる。例えば、PNAおよびDNAの有利な特性を組み合わせることが可能なPNA-DNAキメラを作ることができる。このようなキメラにより、DNA認識酵素、例えば、RNASE HおよびDNAポリメラーゼがDNA部分と相互作用することが可能になる一方で、PNA部分が高い結合親和性および特異性を提供する。PNA-DNAキメラは、塩基の積み重ね、核酸塩基間の結合の数、および配向性の観点で選択される適切な長さのリン

10

20

30

40

50

カーや用いて連結することができる(Hyrup, 1996, *supra*)。PNA-DNAキメラの合成はHyrup (1996), *supra*およびFinn et al. (1996) *Nucleic Acids Res.* 24(17):3357-63に記載される通りにおこなうことができる。例えば、DNA鎖は、標準的なホスホラミダイト結合化学および改変されたヌクレオシド類似物を用いて固体支持体上で合成することができる。5'-(4-メトキシトリチル)アミノ-5'-デオキシ-チミジンホスホラミダイトなどの化合物を、PNAとDNAの5'末端の連結に使用することができる(Mag et al., 1989, *Nucleic Acids Res.* 17:5973-88)。次に、PNAモノマーを段階的な方法で結合して、5'PNAセグメントおよび3'DNAセグメントを有するキメラ分子を製造する(Finn et al., 1996, *Nucleic Acids Res.* 24(17):3357-63)。あるいは、キメラ分子は、5'DNAセグメントおよび3'PNAセグメントを用いて合成することができる(Petersen et al., 1975, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 5:1119-1124)。 10

#### 【0077】

他の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、ペプチド(例えば、*in vivo*で宿主細胞受容体を標的とするための)、または細胞膜(例えば、Letsinger et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6553-6556; Lemaitre et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:648-652; PCT公開公報WO 88/09810を参照されたい)もしくは血液脳関門(例えば、PCT公開公報WO 89/10134を参照されたい)を通過する輸送を促進する薬剤などの他の付属基を含み得る。さらに、オリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーションをトリガーとする切断剤(例えば、Krol et al., 1988, *Bio/Techniques* 6:958-976を参照されたい)またはインターラート剤(例えば、Zon, 1988, *Pharm. Res.* 5:539-549を参照されたい)により改変することができる。この目的で、オリゴヌクレオチドを別の分子、例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーションをトリガーとする架橋剤、輸送剤、ハイブリダイゼーションをトリガーとする切断剤等とコンジュゲートすることができる。 20

#### 【0078】

本発明はまた、本発明の核酸分子に相補的な少なくとも1つの領域を有する分子ビーコン核酸分子を、分子ビーコンがサンプル中の本発明の核酸分子の存在を定量化するために有用であるように含む。「分子ビーコン」核酸は、一対の相補領域を含み、それと結合した発蛍光団および蛍光消光剤を有する核酸分子である。発蛍光団および消光剤は核酸の異なる部分と相補領域が互いにアニールした時に発蛍光団の蛍光が消光剤により消光されるような方向で結合している。核酸分子の相補領域が互いにアニールしない場合には、発蛍光団の蛍光が消光される程度はより低い。分子ビーコン核酸分子は、例えば米国特許第5,876,930号に記載されている。 30

#### 【0079】

さらに、アプタマーが考えられ、米国特許第5,270,163号およびWO 91/19813に開示される方法を用いて製造することができる。

#### 【0080】

本発明はまた、所望の生物活性を有する単離されたタンパク質に関する。目的の天然ポリペプチドは、標準的なタンパク質精製技術を用いる適切な精製法により細胞もしくは組織供給源から単離すること、組換えDNA技術により製造すること、または標準的なペプチド合成法を用いて化学的に合成することが可能である。典型的には、生物活性部分は、対応するタンパク質の少なくとも1つの活性を有する領域またはモチーフを含む。タンパク質の生物活性部分は、例えば、10、25、50、100またはそれ以上のアミノ酸長さを有するポリペプチドであり得る。さらに、タンパク質の他の領域を削除した他の生物活性部分を組換え技術により調製して、本発明のポリペプチドの天然型の1つ以上の機能的活性に関して評価することができる。 40

#### 【0081】

本発明はまた、キメラまたは融合タンパク質を提供する。本明細書において使用される場合、「キメラタンパク質」または「融合タンパク質」は、非相同ポリペプチド(すなわち、バイオマーカーに相当するポリペプチド以外のポリペプチド)に操作可能に連結した本発明のバイオマーカーに相当するポリペプチドの全部または一部(好ましくは生物活性 50

を有する部分)を含む。融合タンパク質において、用語「操作可能に連結した」は、本発明のポリペプチドと非相同ポリペプチドとが互いにインフレームで融合していることを示すことを意図している。非相同ポリペプチドは、本発明のポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端に融合し得る。このような融合タンパク質は当業者に周知であり、例えば、非相同シグナル配列に融合した標的タンパク質の活性を増大または阻害する標的タンパク質またはポリペプチド、ペプチドタグ、免疫グロブリン融合タンパク質等が挙げられる。本発明のキメラおよび融合タンパク質は、標準的な組換えDNA技術により製造することができる。別の実施形態において、融合遺伝子は、自動DNA合成機を含む従来技術により合成することができる。あるいは、アンカープライマーを用いて遺伝子断片のPCR増幅をおこない、それにより2つの連続する遺伝子断片の間の相補的オーバーハングが生じ、次いでそれをアニールおよび再増幅して、キメラ遺伝子配列を作ることができる(例えば、Ausubel et al., supraを参照されたい)。さらに、既に融合分子(例えば、GSTポリペプチド)をコードする多くの発現ベクターが市販されている。本発明のポリペプチドをコードする核酸は、融合分子が本発明のポリペプチドにインフレームで連結するように前記発現ベクターにクローン化することができる。

#### 【0082】

また、目的の標的分子に結合する、または目的の生物活性(例えば、生物学的過程の活性を適切に増大または阻害すること)を有する抗体も考えられる。ポリクローナルおよびモノクローナル抗体を調製する標準的技術を用いて、単離された標的ポリペプチドまたはその断片(または前記ポリペプチドをコードする核酸)を免疫原として使用して前記免疫原に結合する抗体を作ることができる。

#### 【0083】

本明細書において他に特定されない限り、用語「抗体」(単数および複数)は、抗体の天然型(例えば、IgG、IgA、IgM、IgE)、および短鎖抗体などの組換え抗体、キメラおよびヒト化抗体および多特異的抗体、ならびに前記すべての断片および誘導体(断片および誘導体は少なくとも1つの抗原結合部位を有する)を広く包含する。抗体誘導体は抗体にコンジュゲートしたタンパク質または化学分子を含み得る。

#### 【0084】

本明細書において使用される場合、用語「抗体」は、抗体の「抗原結合部分」(または簡単に「抗体部分」)も含む。本明細書において使用される場合、用語「抗原結合部分」は、標的の抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体の1以上の断片を指す。抗体の抗原結合機能は、全長の抗体の断片によりおこなうことができるが示されている。抗体の「抗原結合部分」という用語に包含される結合断片の例としては、(i) Fab断片、VL、VH、CLおよびCH1ドメインからなる1価の断片；(ii)  $F(ab')_2$ 断片、ヒンジ領域においてジスルフィド架橋により連結する2つのFab断片を含む2価の断片；(iii) VHおよびCH1ドメインからなるFd断片；(iv) 抗体の單一アームのVLおよびVHドメインからなるFv断片；(v) VHドメインからなるdAb断片(Ward et al., (1989) Nature 341:544-546)；ならびに(vi) 単離された相補性決定領域(CDR)が挙げられる。さらに、Fv断片の2つのドメイン、VLおよびVHは別の遺伝子によりコードされるが、それらは組換え法を用いて合成リンカーにより結合することができ、それにより、それらを單一のタンパク質鎖として製造することができ、そのタンパク質鎖の中では、VLおよびVH領域は対になって1価のポリペプチド(单鎖Fv(scFv)として知られる；例えば、Bird et al. (1988) Science 242:423-426；およびHuston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883；およびOsbourn et al. 1998, Nature Biotechnology 16: 778を参照されたい)を形成する。このような单鎖抗体も、抗体の「抗体結合部分」という用語の中に包含されることが意図されている。完全なIgGポリペプチドまたは他のアイソタイプをコードする発現ベクターを作るために、特定のscFvの任意のVHおよびVL配列をヒト免疫グロブリン定常領域cDNAまたはゲノム配列と連結させることができる。また、VHおよびVLは、タンパク質化学または組換えDNA技術のいずれかを用いてFab、Fvまたは免疫グロブリンの他の断片の生成において使用することができる。二重特異性抗体などの单鎖抗体の他の形態も包含される。二重特異性抗

10

20

30

40

50

体は、2価の二重特異性抗体であり、そこではVHおよびVLドメインが単一のポリペプチド鎖上に発現されるが、短すぎて同じ鎖上の2つのドメインの間で対になることができないリンカーを用いることにより、ドメインが別の鎖の相補的ドメインと対になるように強制して、2つの抗原結合部位を作るようとする（例えば、Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2:1 121-1123を参照されたい）。

#### 【0085】

さらに、抗体またはその抗原結合部分は、抗体または抗体部分と1つ以上の他のタンパク質またはペプチドとの共有結合または非共有結合による結合により形成される、より大きい免疫接着ポリペプチド(*immunoadhesion polypeptides*)の一部であり得る。このような免疫接着ポリペプチドの例としては、四量体scFvポリペプチドを作るためのストレプトアビジンコア領域の使用(Kipriyanov, S.M., et al. (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101)および2価のビオチン化scFvポリペプチドを作るためのシステイン残基、マーカーペプチドおよびC末端ポリヒスチジンタグの使用(Kipriyanov, S.M., et al. (1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058)が挙げられる。FabおよびF(ab')<sub>2</sub>断片などの抗体部分は、全抗体のそれぞれパパインまたはペプシン消化などの従来の技術を用いて、全抗体から調製することができる。さらに、抗体、抗体部分および免疫接着ポリペプチドは、本明細書に記載される標準的な組換えDNA技術を用いて得ることができる。

#### 【0086】

抗体は、ポリクローナルもしくはモノクローナル；異種、同種異系、もしくは同一遺伝子；またはその改変型（例えば、ヒト化、キメラ等）であってよい。抗体は完全なヒト抗体であってもよい。好ましくは、本発明の抗体は、目的の生存促進性シグナル伝達経路ポリペプチドまたはその断片に特異的にまたは実質的に特異的に結合する。本明細書において使用される場合、用語「モノクローナル抗体」および「モノクローナル抗体組成物」は、抗原の特定のエピトープと免疫反応可能な抗原結合部位を1種のみ含む抗体ポリペプチドの集団を指すのに対して、用語「ポリクローナル抗体」および「ポリクローナル抗体組成物」は、特定の抗原と相互作用可能な抗原結合部位を複数種含む抗体ポリペプチドの集団を指す。モノクローナル抗体組成物は、典型的には、それが免疫反応する特定の抗原に対して単一の結合親和性を示す。

#### 【0087】

本発明のコクリエートは、広い範囲の生体関連分子対脂質の比で調製することができる。例として、生体関連分子の脂質に対する比は、重量で約20,000:1～約0.5:1、またはその間の任意の範囲であり得る。一実施形態において、比は重量で約1:1である。他の実施形態において、比は、重量で約2:1、3:1、4:1、5:1、10:1、20:1、50:1、100:1、200:1、もしくは400:1、またはその間の任意の範囲である。20,000:1～0.5:1の間のすべての個々の範囲および値が本発明に包含される。

#### 【0088】

本発明のコクリエートは、併用療法における場合のように、場合により1種以上のさらなる生体関連分子を含むことができる。

#### 【0089】

一実施形態において、生体関連分子は、静電気的、疎水性、共有結合性、またはイオン性相互作用により、疎水性テイルなどのコクリエートの脂質成分と結合しており、またはコクリエートの二重層の成分、例えばリン脂質もしくは他の脂質と結合している。架橋による生体関連分子の脂質への共有結合は、公知の方法により達成することができる。あるいは、生体関連分子が好適な条件下で脂質成分もしくは疎水性テイルから脱離することができるよう、共有結合は可逆的である。例えば、生体関連分子を、標的の組織、器官、または構造（例えば、血漿タンパク質、腸タンパク質、エンドソームまたは細胞内環境）に内在する酵素により切断され得るリンカーを介してリン脂質と結合することにより、生体関連分子を標的の組織、器官または他の構造に送達することができる。それに代わる実施形態において、生体関連分子は任意の他の手段、例えば静電的相互作用および／または

10

20

30

40

50

疎水性相互作用により結合することができる。

【0090】

別の実施形態において、生体関連分子は、静電気的、疎水性、共有結合性、またはイオン性相互作用により、コクリエートの脂質成分のヘッド基と結合している。

【0091】

生体関連分子は、本明細書に記載される任意の方法において、脂質成分または脂質成分の疎水性テイルもしくはヘッド基と結合させることができる。例えば、一実施形態において、生体関連分子は、標的環境と接触すると生体関連分子が脂質成分から脱離するよう<sup>10</sup>に、脂質成分と結合している。生体関連分子は、本明細書に記載される任意のリンカー、例えば還元性のリンカー、または他の方法で可逆的なリンカーまたは酵素、タンパク質、もしくは標的環境に内在性の分子により消化可能なリンカーによりコクリエートの成分と結合することができる。酵素は、被験体に内在性の細胞外、細胞内またはエンドソーム酵素であり得る。別の実施形態において、生体関連分子は脂質成分と静電的に結合し、被験体の細胞または器官におけるpH勾配と接触するとコクリエートから脱離する。

【0092】

C. 凝集阻害剤

いくつかの実施形態において、本発明のコクリエートは、場合により1種以上の凝集阻害剤を含み得る。本明細書において使用される場合、用語「凝集阻害剤」は、コクリエートの凝集を阻害する薬剤を指す。凝集阻害剤は、典型的には、少なくともコクリエートの表面上に存在し、コクリエートの表面上のみに存在する場合がある（例えば、凝集阻害剤がコクリエート形成後に導入される場合）。凝集阻害剤は、コクリエート形成の前、後、および間に加えることができる。凝集阻害剤のタイプおよび／または量は、所望のコクリエートの粒径および／または分布が得られるように調節することができる。それに加えて、またはそれに代えて、凝集阻害剤（1種または複数種）は、コクリエートの粒径および／または粒径分布を、コクリエートの凝集が最小化または除去されるように安定化するために使用することができる。

【0093】

コクリエートの形成は、荷電した脂質と反対に荷電した多価カチオンとの相互作用により自発的に起こる結晶化事象と考えることができる。しかしながら、形成されるコクリエート結晶の粒径を調節することは、本発明以前に、困難であることが証明されている。

【0094】

水性懸濁液において、一般に単純なコクリエートは凝集し、長期間貯蔵すると数ミクロンの大きさになり得る、より大きい塊を形成する。カルシウムが脂質ヘッド基と結合するために、コクリエートの表面は疎水性の性質を有する。水性緩衝液に懸濁された時のコクリエートの凝集は、水に曝される表面積を最小化する疎水性相互作用の結果である。

【0095】

このような凝集は阻害およびさらには逆転することが可能であり、個々のコクリエート粒子は、コクリエートの表面特性を変えることによりコクリエート-コクリエート相互作用を阻害することにより安定化することができる。

【0096】

凝集は、カルシウム添加の時点およびその後に、リポソーム懸濁液にリポソーム-リポソーム相互作用を防止する材料を加えることにより阻害することができる。あるいは、凝集阻害剤は、コクリエートの形成の後に加えることができる。さらに、凝集阻害剤の量を変化させることにより、コクリエートの粒径の調節が可能になる。

【0097】

このような組成物は、コクリエートが小さい方が、細胞による取り込みが大きくなり迅速な効果をもたらすことができることを含むいくつかの理由から有利である。このような組成物は、例えば、生体関連分子を迅速かつ効果的に送達することができる場合（例えば、真菌または細菌感染に対する殺真菌剤または殺細菌剤）に、好適である。さらに、粒径は、ある細胞がある粒径の粒子をより高いまたは低い効果で取り込む場合に、標的化効

10

20

30

40

50

果を有し得る。粒径は、コクリエートが細胞と相互作用する方式（例えば、融合事象または取り込み）にも影響を与える。

【0098】

凝集阻害剤は、一部は、凝集が阻害されるようにコクリエートの表面特性を改変することにより作用する。凝集は、例えば、凝集を阻害しつゝまたはコクリエート構造の性質を変化させる（例えば表面の疎水性および／または表面の電荷の変化）、コクリエート周囲の立体的かさ高さにより阻害することができる。

【0099】

用語「被覆」、「被覆された」、「被覆する」等は、他に指示されない限り、コクリエートの少なくとも外側表面に存在する薬剤（例えば、凝集阻害剤）を指す。前記薬剤は、薬剤の少なくとも一部が二重層中に組み込まれることにより二重層と結合してもよく、および／または他の方法により、例えばカチオンに対するイオン性誘因または脂質に対する疎水性もしくはイオン性誘因により結合してもよい。10

【0100】

本明細書において論じられる通り、コクリエートは、脂質、例えばホスファチジルセリン(PS)などのリン脂質のカルシウムにより誘導される再構築および融合により形成することができる。カルシウム含有水溶液中でのコクリエート表面の疎水性の性質のために、形成されたコクリエートは、本発明の凝集阻害剤が存在しない場合、凝集して、より大きい塊、例えばアスピリンコクリエートにおける針状構造を形成する。カチオン添加の時点で合体してコクリエートを形成し得るリポソームの相互作用を制限および／または阻害することにより、得られるコクリエート結晶の粒径が制限され、より大きい粒子への凝集が防止される。カルシウムの添加の前にリポソームに凝集阻害剤（例えば、カゼイン）を加えることにより、安定で非凝集性のナノコクリエート構造が得られる。20

【0101】

使用される凝集阻害剤のタイプおよび／または量も、得られるコクリエートの粒径を決定し得る。異なる濃度の凝集阻害剤の存在もコクリエートの粒径分布の調節を可能にする。。

【0102】

コクリエートの形成後の1種以上の凝集阻害剤の添加も凝集を阻害し、逆転さえする。

【0103】

本発明により使用することができる好適な凝集阻害剤としては、以下：カゼイン、カッパ-カゼイン、乳、アルブミン、血清アルブミン、ウシ血清アルブミン、ウサギ血清アルブミン、メチルセルロース、エチルセルロース、プロピルセルロース、ヒドロキシセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロース、カルボキシエチルセルロース、プルラン、ポリビニルアルコール、アルギン酸ナトリウム、ポリエチレングリコール、ポリエチレンオキシド、キサンタンガム、トラガカントガム、グーガム、アカシアガム、アラビアガム、ポリアクリル酸、メチルメタクリレートコポリマー、カルボキシビニルポリマー、アミロース、高アミロースデンプン、ヒドロキシプロピル化高アミロースデンプン、デキストリン、ペクチン、キチン、キトサン、レバン、エルシナン、コラーゲン、ゼラチン、ゼイン、グルテン、カラギーナン、カルナウバワックス、シェラック、ラテックスポリマー、乳タンパク質単離物、ダイズタンパク質単離物、乳清タンパク質単離物およびそれらの混合物の1つ以上が挙げられるが、これらに限定されない。40

【0104】

好ましい凝集阻害剤はカゼインである。カゼインは高度にリン酸化された、カルシウム結合タンパク質である。いかなる特定の理論にも拘束されることを望まないが、カルシウムが負に荷電した脂質（例えば、PS）とカゼインとの間の相互作用を仲介することにより、コクリエートの表面特性を凝集が阻害されるように変更すると考えられる。別の好ましい凝集阻害剤は、乳、およびハーフアンドハーフ(Half and Half)、クリーム等の他の乳50

製品である。好ましい乳製品はカゼインをも含有する。別の好ましい凝集阻害剤は、賦形剤、例えばメチルセルロースである。他の好ましい凝集阻害剤としては、アルブミン、血清アルブミン、ウシ血清アルブミンおよびウサギ血清アルブミンが挙げられる。

#### 【0105】

本発明の組成物に1種以上の凝集阻害剤を使用してもよい。例えば、乳およびメチルセルロースの両方を凝集阻害剤として使用してもよい。

#### 【0106】

一実施形態において、本発明のコクリエート組成物は、約10%～約0.1%の凝集阻害剤を含む。好ましくは、凝集阻害剤はコクリエート組成物の約1%を構成する。別の実施形態において、本発明のコクリエート組成物は、重量で約0.1:1～約4:1の凝集阻害剤対脂質の比を含む。凝集阻害剤対脂質の比は約1:1であり得る。当業者は、通常の実験により、所望の粒径のコクリエートを形成するために必要な凝集阻害剤の量を容易に決定することができるであろう。

10

#### 【0107】

別の実施形態において、凝集阻害剤は、他の凝集阻害剤を使用せずにまたは使用して達成することができるもの（例えば、より多くのおよび／または異なる凝集阻害剤を使用した場合）よりも相対的に大きい粒径を有するコクリエート組成物を達成する量で使用することができる。このような組成物は、例えば、生体関連物質の遅発性の取り込みおよび／または放出が望まれる場合、または標的とする細胞または器官が比較的大きい粒径範囲のコクリエートをより効果的に取り込む場合に、有用であり得る。例えば複数の融合事象が要求される場合には、生体関連分子がより大きいコクリエートから放出されるのにはより長い時間がかかり得るので、このような組成物は持続活性を有する可能性がある（より小さいコクリエート組成物と比較して）。

20

#### 【0108】

さらに別の実施形態において、凝集阻害剤の量および／またはタイプは、生体関連分子が長時間に渡って放出されるように、広い粒径分布を有するコクリエート組成物を製造するように選択することができる。これは、より小さいコクリエートがまず急速に取り込まれ、次いで次第に大きいコクリエートの取り込みまたは融合事象が起こるためである。さらに、粒径はどのタイプの細胞がコクリエートを取り込むかののみでなく、ある細胞がコクリエートとどのように相互作用するかに影響を与える。例えば、粒径は、コクリエートが細胞により取り込まれるか、細胞と1以上の融合事象を起こすかに影響し得る。

30

#### 【0109】

それに加えて、さらに別の実施形態において、数種の組成物を組み合わせて所望の放出プロファイル、例えば、パルス放出、または組合せ放出を得ることができる。例えば、急速放出ナノコクリエート組成物を、遅延放出大粒径コクリエート組成物または標準的コクリエート組成物と混合して、即時放出および遅延放出の両方が実現されるようにすることができる。一例において、小さいおよび大きい抗生物質コクリエートの両方を投与することにより、高い初期投与量（小さいコクリエート）により被験体を治療し、かつ残留する細菌に対して効果を有するのに十分な抗生物質を血清中に維持する（大きいコクリエート）。さらに、コクリエート組成物は異なる生体関連分子を有してもよい。例えば、胃保護薬を最初の放出のためのナノコクリエート（または長時間放出のための大きい分布）と共に製剤し、1種以上の非ステロイド抗炎症薬を、胃保護薬が放出された後に放出されるように大きいコクリエートと共に製剤することができる（NSAID）。

40

#### 【0110】

また、凝集阻害剤は、粒径および粒径分布を安定化するために使用することができる。例えば、凝集阻害剤は、標準的コクリエートおよび／または凝集阻害剤を有するコクリエートのコクリエート粒径および分布を「固定」するために使用することができる。本発明のコクリエート組成物は典型的には長期間に渡って安定であるが、標準的コクリエート（凝集阻害剤を使用せずに形成されたコクリエート）は時間と共に凝集する傾向がある。そこで、標準的コクリエートは、前記凝集阻害剤の添加、例えばコクリエート形成後のメチ

50

ルセルロースの添加により粒径を減少することおよび／または安定化することができる。

【0111】

凝集阻害剤の存在下で形成されたコクリエートは、凝集阻害剤が存在しなかった場合と比較して凝集がないまたは少ない。したがって、このような組成物は、例えば細胞による取り込みが大きいことおよび有効性が増大することを含むいくつかの理由により有利である。本発明のコクリエート組成物は、好ましくは、約5、4、3、2、または1マイクロメートル未満の平均直径を有する。コクリエート組成物は、約900 nm、800 nm、700 nm、600 nm、500 nm、400 nm、300 nm、200 nm、または100 nm未満の平均直径を有してもよい。これらの値の間のすべての個々の値(880、435、350)が含まれ、本発明の範囲に包含されることが意図されている。別の実施形態において、本発明のコクリエート組成物は、約1マイクロメートル以上、例えば、2、3、4、5、10、50、または100マイクロメートルの平均直径を有するコクリエート集団を含む。これらの範囲に含まれるすべての個々の値および範囲が含まれ、本発明の範囲に包含されることが意図されている。

【0112】

粒径分布は、標準的コクリエート(凝集阻害剤を使用せずに形成されたコクリエート)において観察されるものと比較して狭い可能性がある。凝集阻害剤を含むコクリエート組成物の粒径分布は、標準的コクリエート組成物において観察されるものと比較して有意に改善されている可能性がある。好ましくは、コクリエートは、約30、20、10、5、3または1 μm、900 nm、800 nm、700 nm、600 nm、500 nm、400 nm、300 nm、200 nm、または100 nmよりも小さい粒径分布を有する。これらの値の間の個々の値(550 nm、420 nm、475 nm等)が含まれ、本発明の範囲に含まれることが意図されている。このような組成物は、マクロファージによる取り込みが望まれる場合に特に望ましい。望まれる器官または細胞による取り込みに適している大きさおよび／または器官または細胞による取り込みに適していない大きさに粒径を調節することができるが容易に理解され得る。別の実施形態において、より広い粒径分布のコクリエート、例えば、約10、20、50、100、200、300、400、500マイクロメートルまたはそれ以上の粒径分布のコクリエートが使用される。これらの範囲の中の個々の値が含まれ、本発明の範囲に含まれることが意図されている。このような組成物は生体関連分子の長時間放出に有用であり得る。

【0113】

さらに、上で論じた通り、異なる生体関連分子の所望の放出パターン、例えば、パルス放出、遅延放出および／または持続放出を達成するための、1種以上の生体関連分子、1種以上の粒径分布、および1種以上の平均直径を有するコクリエート集団の組合せが意図されている。

【0114】

II. コクリエートの製造方法

一態様において、本発明はコクリエートを形成する方法を提供する。米国特許第4,078,052号；第5,643,574号；第5,840,707号；第5,994,318号；第6,153,217号；第6,592,894号、ならびにPCT公開公報WO 200404/091572；WO 2004/091578；WO 2005/110361および米国特許公報第2010/0178325号(これらのそれぞれがこの参照により本明細書に組み込まれる)に記載されるものを含むがそれらに限定されない公知の方法を、コクリエートを形成するため使用することができる。

【0115】

一実施形態において、一般に、方法は、溶媒の存在下で生体関連分子を脂質に導入し、水溶液を加えてリポソームを形成し、リポソームを沈殿させてコクリエートを形成することを含む。例えば、一般に、方法は、生体関連分子がリポソームと一体となるように溶媒の存在下で生体関連分子をリポソームに導入し、リポソームを沈殿させて生体関連分子コクリエートを形成することを含む。

【0116】

生体関連分子を溶媒の存在下でリポソームに導入する工程はさまざまな方法で達成することができるが、それらはすべて本発明の範囲に包含される。一実施形態において、生体

10

20

30

40

50

関連分子は、溶媒と生体関連分子の溶液をリポソームに導入することにより、導入される。好ましくは、リポソームは、リポソーム懸濁液、好ましくは水性リポソーム懸濁液である。好ましい実施形態において、溶液は、溶液を滴下して加えることによりリポソームに導入される。他の実施形態において、溶液は連続的な流れにより、または塊として加えることができる。さらに、溶液は、乾燥した脂質に、溶液の前もしくは後に、または溶液と共に水を加えて、導入することができる。

【0117】

別の実施形態において、生体関連分子は、溶媒の前または後にリポソームに導入される。例えば、生体関連分子は、溶媒を含むリポソーム懸濁液に導入することができる。次に、混合物に攪拌、混合、ボルテックス混合等をおこなって、生体関連分子とリポソームとの一体化を促進することができる。導入される生体関連分子は、粉末または液体の形態であってよい。

10

【0118】

リポソームは、任意の公知のリポソーム調製法により調製し得る。そこで、リポソームは、例えば、溶媒注入、脂質水和、逆相蒸発、凍結および解凍の繰り返しによる凍結乾燥により調製することができる。リポソームは、マルチラメラ(MLV)またはユニラメラ(ULV)であってよく、スマールユニラメラベシクル(SUV)を含む。これらのリポソーム溶液における脂質濃度は、約0.1 mg/ml ~ 500 mg/ml であり得る。好ましくは、脂質濃度は、約0.5 mg/ml ~ 約50 mg/ml、より好ましくは約1 mg/ml ~ 約25 mg/ml である。

【0119】

20

リポソームは、例えば、透析、カラムクロマトグラフィー、バイオビーズSM-2を用いる界面活性剤除去により、逆相蒸発(REV)により、または高圧押出による中間粒径のユニラメラベシクルの形成により調製される、ラージユニラメラベシクル(LUV)、安定な多重ラメラベシクル(SPLV)またはオリゴラメラベシクル(OLV)であってよい。方法は、Biochemical Analysis, 33:337 (1988)に記載されている。これらすべての方法および当業者に公知の他の方法により製造されたリポソームを、本発明を実施するために使用することができる。

【0120】

一実施形態において、リポソームの少なくとも大部分はユニラメラである。方法はさらに、大部分のリポソームがULVになるように、MLVおよびULVリポソームの両方を含むリポソーム懸濁液を濾過する工程および/または小さい開口を通して懸濁液を機械的に押し出す工程を含む。好ましい実施形態において、少なくとも70%、80%、90%または95%のリポソームがULVである。

30

【0121】

別の実施形態において、コクリエートは沈殿により形成される。リポソームは多価カチオンにより沈殿して、生体関連分子-コクリエートを形成する。多価カチオンは、完全にまたは本質的に、カルシウム、マグネシウム、バリウム、亜鉛、および/または鉄を含むがこれらに限定されないカチオン金属からなる。それに加えて、またはそれに代えて、多価カチオンは他の多価カチオン化合物を含み得る。本明細書において使用される場合、用語「多価」は、2以上の価数、例えば2価、3価等を有するイオンを指す。

40

【0122】

本発明に関して任意の好適な溶媒を使用することができる。ある応用に好適な溶媒は当業者が容易に特定することができる。好ましくは溶媒はFDAに許容される溶媒である。

【0123】

溶媒は有機溶媒または無機溶媒であり得る。一実施形態において、溶媒は水混和性溶媒である。好適な溶媒としては、ジメチルスルホキシド(DMSO)、メチルピロリドン、N-メチルピロリドン(NMP)、アセトニトリル、アルコール、例えば、エタノール(EtOH)、ジメチルホルムアミド(DMF)、テトラヒドロフラン(THF)、およびそれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない。一般に、溶媒中の生体関連分子濃度は、約0.01 mg/ml ~ 200 mg/mlの間である。好ましくは、生体関連分子濃度は、約0.05 mg/ml ~ 約100 mg/ml、より好

50

ましくは、約0.1 mg/ml ~ 20 mg/ml の間である。

【0124】

溶媒は、場合により、例えばリポソーム形成前、リポソーム工程および／またはコクリエートが形成された後に除去することができる。任意の公知の溶媒除去法を使用し得る。例えば、溶媒は、接線流および／または濾過および／または透析によりリポソーム懸濁液から除去することができ、または洗浄、濾過、遠心分離、および／または透析によりコクリエートから除去することができる。コクリエートは、例えば緩衝液または水（最適にはカルシウムまたは他のカチオンを有する）により洗浄することができる。

【0125】

本発明の方法を利用して、広い範囲の脂質対生体関連分子の比を達成することができる。異なる比は異なる生物活性を有し得る。コクリエート中に組み込まれる生体関連分子の量は、所望の通りに変化させることができる。所望の目的のための最適な脂質：生体関連分子の比は容易に決定することができる。投与されたコクリエートに対する生物学的反応の性質および大きさを確認するために、コクリエートを標的の宿主に投与することができる。コクリエート中の生体関連分子の最大量を得るために、ある1つの使用に最適な比が高い比から低い比までの範囲に渡る可能性があることは明白である。本明細書において開示されるすべての比は、他に指示されない限り、w/wである。一実施形態において、脂質対生体関連分子の比は約10,000:1 ~ 1000:1の間である。この範囲の比は、少量の分子を投与することが望まれる場合（例えば、放射性薬剤または活性の高い、希少なもしくは高価な分子を投与する場合）に好適である。別の実施形態において、比は、約8,000:1 ~ 4,000:1の間、例えば、約6,000:1である。このような比は、例えば、ポルフィリンの送達において好適である。さらに別の実施形態において、比は約5,000:1 ~ 50:1の間である。さらに別の実施形態において、脂質対生体関連分子の比は約20:1 ~ 約0.5:1の間である。別の実施形態において、脂質対生体関連分子の比は約1:1 ~ 約10:1の間である。このような比は、例えば抗真菌剤の送達に好適である。さらに別の実施形態において、脂質対生体関連分子の比は約2:1、約3:1、または約1.5:1 ~ 3.5:1の間である。約0.25:1 ~ 約40,000:1の間のすべての個々の値および範囲が本発明の範囲に包含される。さらなる値も本発明の範囲に包含される。コクリエート製剤はまた、特定の細胞および／または組織を標的とするための標的化分子（例えば、センダイ(Sendai)ウイルスエンベロープポリペプチドなどの融合分子）を用いて、または用いずに調製することができる。

【0126】

いくつかの実施形態において、生体関連分子は疎水性である。他の実施形態において、生体関連分子は両親媒性である。さらに他の実施形態において、生体関連分子は親水性および／または水溶性である。

【0127】

コクリエート内に取り込まれた疎水性生体関連分子（例えば、ベータ-カロテンコクリエート）は、疎水性生体関連分子がリポソームと一体となるように疎水性生体関連分子を溶媒の存在下でリポソームに導入し、リポソームを沈殿させて疎水性生体関連分子-コクリエートを形成することにより、形成することができる。特に好ましい実施形態において、コクリエート中の生体関連分子のローディング（例えば、疎水性、両親媒性、親水性、および／または水溶性）は、コクリエートを従来の方法（すなわち、米国特許第5,994,318号に記載されるもの）を用いて形成した場合に観察されるローディングよりもかなり高い。

【0128】

上記方法における本発明のコクリエート組成物の形成は、負に荷電した脂質と多価カチオンとの結晶化を含む。したがって、結晶化を支配するパラメーター、例えば、温度、脂質濃度、多価カチオン濃度、カチオン添加速度、pHおよび混合速度のすべてをコクリエート形成を調節するために利用することはできる。ある実施形態において、生体関連分子の一体化および／またはコクリエート化の効率に影響を与えるためにイオン条件を作り出すまたは調節することができる。例えば、リポソーム懸濁液の塩濃度を増

10

20

30

40

50

大することにより、環境を疎水性または両親媒性生体関連分子を受け入れにくいものにして、それによりリポソームおよびコクリエートのローディング効率を増大させることができる。イオン条件は、生成するコクリエートの最終的構造にも影響を与える。また、生体関連分子の高いローディングは、例えばカルシウムおよびホスファチジルセリンのみから形成されるコクリエートにおいて観察される高度に規則的な構造に影響を与える。それに加えて、またはそれに代えて、得られるコクリエートのローディングおよび構造に影響を与えるためにpH条件を作り出すまたは調節することができる。このような変動は、本明細書および日常的な実験を用いて当業者が容易に操作できるものである。さらに、コクリエートは非常に熱力学的に安定なので、ある生成物に対してコクリエート形成法が開発されれば、最終生成物は予想通りに高い信頼性で作ることができる。

10

### 【0129】

したがって、別の態様において、本発明は、プロトン化された生体関連分子を有する無水コクリエートを製造する方法を提供する。該方法は、一般に、負に荷電した脂質をプロトン化された生体関連分子および2価金属カチオンと接触させる工程を含む。いかなる特定の理論にも拘束されることを望まないが、負に荷電した脂質がカチオン性にプロトン化された生体関連分子とイオン性相互作用を形成すると考えられる。次に、2価金属カチオンが脂質およびプロトン化された生体関連分子を沈殿させて、無水コクリエートを形成する。このような方法は当業者に周知であり、少なくとも、米国特許公開公報第2007/0237814号に記載されている。

### 【0130】

別の態様において、本発明は、一般的に、凝集阻害剤を含むコクリエートを製造する方法を目的とする。凝集阻害剤は、コクリエートの形成の前、間、または後に導入することができる。すなわち、凝集阻害剤は、脂質-生体関連分子溶液に、リポソーム溶液に、または沈殿したコクリエートに加えることができる。例えば、一実施形態において、凝集阻害剤は、後にコクリエートが形成される（カチオン添加または透析により）リポソーム懸濁液に導入される。すなわち、凝集阻害剤はリポソームの形成前に導入することができる。例えば、それは懸濁の前の乾燥した脂質に加えてもよいし、生体関連分子の添加の前または後にリポソーム懸濁液に直接加えてもよい。このような実施形態において、コクリエートは最初に所望の粒径範囲に形成され、その後の凝集は凝集阻害剤の存在により防止される。

20

### 【0131】

他の実施形態において、本発明の方法は、凝集阻害剤をコクリエート組成物に導入する工程を含み得る。例えば、該方法は、さらにコクリエートの形成（凝集阻害剤を導入する前の）を含み得る。該方法は、既に形成されたコクリエート、例えば供給者から入手したコクリエートの提供を含み得る。該方法はさらに、凝集したコクリエートに凝集阻害剤を加えることによりコクリエートを脱凝集させる工程を含み得る。

30

### 【0132】

さらに他の実施形態において、凝集したコクリエートを別の脱凝集法、例えば均質化を用いて脱凝集し、再凝集を防止するために凝集阻害剤を導入することができる。さらに別の実施形態において、コクリエートの形成中に凝集阻害剤を導入することができる。例えば、凝集阻害剤はカチオンと共に、または透析中に加えることができる。好ましい実施形態において、凝集阻害剤は、得られるコクリエートを所望の粒径に調節するのに好適な量で加える。

40

### 【0133】

方法は、本明細書に開示される選択自由の成分の任意のものまたはすべてを加えてコクリエートを形成することを含み得る。例えば、コクリエートはさらなるカチオン性化合物、プロトン化された生体関連分子、負に荷電していない脂質、および／または凝集阻害剤を含み得る。

### 【0134】

本明細書に記載される方法はいずれも、1バッチで約1 mg～約500 gの任意の量のコクリ

50

エートを製造するために利用することができる。コクリエートの特性評価が望まれる研究室においては小さいバッチが好ましい。一方、大量生産が望まれる製造においては大きいバッチが好ましい。好ましくは大きいバッチは50 g以上、より好ましくは75 g以上である。

#### 【 0 1 3 5 】

### III. 本発明の方法

さらに別の態様において、本発明は、本明細書に記載される1種以上のコクリエート組成物により治療することができる障害のリスクを有する（もしくは障害に罹りやすい）または障害を有する被験体を治療する予防的および治療的方法の両方を提供する。

#### 【 0 1 3 6 】

多くの天然に生じる膜融合事象は、カルシウムと負に荷電したリン脂質（例えば、PSおよびホスファチジルグリセロール）との相互作用を伴う。カルシウムに誘導される負に荷電した脂質を含有する膜の搅乱、およびそれに続く膜融合事象は、多くの天然の膜融合過程における重要なメカニズムである。したがって、コクリエートは膜融合仲介物質と考えることができる。

#### 【 0 1 3 7 】

融合事象は、コクリエートの外側層と細胞膜の間で起こり、その結果、コクリエート化された物質が標的細胞の細胞質の中に送達される。コクリエートのカルシウムの豊富な高濃度に規則的な膜が最初に天然の膜の間近に接近すると、細胞膜の搅乱および再規則化が誘導され、その結果、コクリエートの外側層と細胞膜との間の融合事象が起こる。この融合の結果、少量のコクリエート化された物質が標的細胞の細胞質の中に送達される。次に、コクリエートは細胞から抜け出し、同じまたは別の細胞と別の融合事象を起こすことができる。

#### 【 0 1 3 8 】

それに加えて、またはそれに代えて、特に活動的な食細胞により、コクリエートはエンドサイトーシスにより取り込まれ、エンドサイトーシス小胞内から融合する。痕跡量の蛍光性脂質を加えて作られたコクリエートが、*in vitro*で白血球の形質膜および内部の膜に結合し、徐々に脂質を移動させることができた。

#### 【 0 1 3 9 】

コクリエートは、さまざまな投与経路による培養細胞、組織または生物体への生体関連分子の送達に有用である。本明細書において使用される場合、用語「送達」は、生体関連分子を、生体関連分子がその活性の少なくとも一部を維持したままで、宿主、食品、製剤、医薬組成物、または任意の他の系に運ぶまたは輸送する任意の手段を指す。

#### 【 0 1 4 0 】

コクリエートはさらなる薬剤と共に投与することができる。第2の薬剤は同じコクリエート調製物中で、本発明のコクリエート調製物と混合された別のコクリエート調製物中で、他の形態（例えば、カプセルもしくは丸剤）で別々に、またはコクリエート調製物と共に担体中で、送達することができる。コクリエートはさらに、他の薬剤、ペプチド、ヌクレオチド（例えば、DNAおよびRNA）、抗原、栄養素、香味剤および/またはタンパク質などの1種以上の追加の生体関連分子を含むことができる。

#### 【 0 1 4 1 】

また、本発明のコクリエート組成物は、*in vitro*診断アッセイにおいて使用するためのレポーター分子（発蛍光団、放射性標識または造影剤であり得る）を含むことができる。コクリエートは、コクリエートを特定の細胞標的に結合させるための分子、または特定の細胞型に選択的に入ることを促進する分子を含むことができる。

#### 【 0 1 4 2 】

本発明のコクリエートの1つの利点は、特に親水性APIの増強されたコクリエート化のための、組成物の安定性である。コクリエートは、心配なく任意の経路、例えば粘膜または全身経路により投与することができる。コクリエートは、心配なく経口または点滴注入により、ならびに経口、鼻腔内、眼内、直腸内、腔内、肺内、局所、皮下、皮内、筋肉内、

10

20

30

40

50

静脈内、経皮、全身、髄腔内（CSF内）等などのより伝統的な経路により、投与することができる。粘膜表面への直接適用はコクリエートにより可能になる魅力的な送達手段である。送達は、例えば、鼻腔用スプレーまたは鼻浴(nasal bath)または灌注によりおこなうことができる。

#### 【0143】

本発明の別の利点は、コクリエートの粒径を調節する能力である。コクリエートおよびコクリエート組成物の粒径の調節は、生体関連分子が細胞により取り込まれる方式を変える。例えば、一般に、小さいコクリエートは急速にかつ効率的に細胞に取り込まれる一方で、より大きいコクリエートはよりゆっくりと取り込まれるが、より長期間に渡って効果を保持する傾向がある。また、いくつかの場合には、ある細胞においては小さいコクリエートが大きいコクリエートよりも効果的であるが、他の細胞においては大きいコクリエートが小さいコクリエートよりも効果的である。

10

#### 【0144】

また、コクリエートおよびコクリエート組成物は、食物または飲料調製物中に入れて、ヒトならびにイヌ、ネコ、および家畜などの非ヒト動物に投与することができる。このような組成物は、製造者により（例えば、栄養素の入った補助食品）、または消費者により（例えば、コクリエート組成物が食品添加物として別に販売されている場合）、食品または飲料組成物に導入され得る。例えば、栄養素および／または香味剤を、特にその栄養素および／または香味剤が壊れやすく、酸素および／または水に曝された場合に通常は分解するか活性を失う場合に、ドッグフードまたはキャットフードに組み入れることができる。コクリエートは極端な圧力および温度条件下で安定なので、ドッグフードまたはキャットフードの調製品にどの工程でコクリエートを加えててもよい。

20

#### 【0145】

本発明のコクリエートおよびコクリエート組成物のもう1つの利点は、多くの望まれない副作用を減らす能力である。現在市販されている多くの薬物は胃腸不快感を引き起こし、しばしば多くの重要臓器における毒性につながる高い血中濃度を引き起こす。例えばアスピリンの摂取は胃部不快感、吐き気、および嘔吐をもたらし得る。

#### 【0146】

本発明のもう1つの利点は、コクリエートを特定の細胞または器官による取り込みのために製剤することができる。慣習的に、日和見感染と戦うことを目的として、感染の部位における中程度のレベルを得るためにしばしば高レベルの薬物を静脈内投与する。これは、望まれない副作用を引き起こす可能性があり、例えばバンコマイシンの場合、斑状皮膚発疹、アナフィラキシー、静脈注射の部位の静脈炎および痛み、悪寒、発疹および発熱が起こり得る。また、急速な静脈内注入は、紅斑性またはじんましん反応、潮紅、頻脈、および低血圧、一般に永続しない聴覚障害、過剰に高い薬物血漿濃度に伴う聴器毒性、および頻度は低いが腎毒性を含むさまざまな症状を引き起こし得る。本発明のコクリエートを使用することにより、循環血液中の遊離の薬物を減少させることにより毒性レベルを下げることができる。さらに、生体関連分子を感染の部位に直接送達することができる、それにより胃腸不快感の発生を減少させるまたはなくすことができる。

30

#### 【0147】

例えば、アミノグリコシドは胃腸管からほとんど吸収されない。経口投与または直腸投与のいずれかの後に、典型的には用量の1%未満が吸収される。また、脳脊髄液には不十分な濃度のアミノグリコシドが見いだされる。さらに、薬物は腸において不活性化されず、正常な腎臓により比較的迅速に排泄される。すなわち、それらは糞便中に定量的に排出される。けれども、長期の経口または直腸投与は、腎障害を有する患者において有毒な濃度に達するアミノグリコシドの蓄積をもたらし得る。これらの薬物の漿膜表面を有する体腔内への点滴注入は、急速な吸収および予期しない毒性、すなわち、神経筋遮断をもたらし得る。同様に、アミノグリコシドを大きい傷、火傷、または皮膚潰瘍に長期間に渡って局所適用した場合、特に腎不全がある場合には中毒が起こり得る。

40

#### 【0148】

50

さらに、それらの極性の性質のために、アミノグリコシドは、大部分がほとんどの細胞、中枢神経系、および目から遮断される。慣習的に投与されるアミノグリコシドの分泌および組織における濃度は低い。しかしながら、腎皮質において、および内耳の内リンパおよび外リンパにおいて高濃度が見いだされており、これがこれらの薬物により引き起こされる腎毒性および聴器毒性の一因となっていると考えられる。アミノグリコシドは広く使用される薬剤であるが、重大な毒性がアミノグリコシドの有用性に対する主要な制限となっている。最低血清濃度の上昇により明らかになる臨界値より高い一定の薬物血漿濃度は、ヒトにおける毒性と相関する。アミノグリコシドは、可逆的および不可逆的な前庭、蝸牛、および腎毒性を生じさせる潜在能力を有する。これらの副作用はこれらの化合物の使用を難しくし、それらの適切な投与を困難にする。

10

#### 【0149】

本発明のコクリエートおよびコクリエート組成物は、ヒトおよび非ヒト動物の両方を含む動物に投与することができる。それは、例えば動物の餌または水に入れて動物に投与することができる。例えば、本発明の抗生物質-コクリエートを、感染を防除するため、または成長もしくは乳の生産を促進するために、家禽ならびに反芻動物およびブタを含む他の家畜に投与することができる。これらの薬剤により治療することができる多くの状態の中に、家畜生産者に厳しい経済的損失を引き起こし得る病気である腸炎がある。腸炎は、ニワトリ、豚、ウシおよびヒツジに起こり、主に嫌気性細菌、特にウェルシュ菌(*Clostridium perfringens*)が原因である。反芻動物の腸性毒血症(その一例はヒツジの「過食病」である)はウェルシュ菌感染により引き起こされる状態である。したがって、このような状態の治療も本発明の方法に包含される。

20

#### 【0150】

##### a. 予防法

一態様において、本発明は、被験体において、少なくとも1種の生体関連分子、例えば、タンパク質、小ペプチド、抗ウイルス剤、麻酔剤、抗感染剤、抗真菌剤、抗癌剤、免疫抑制剤、ステロイド抗炎症剤、非ステロイド抗炎症剤、精神安定剤、粘液溶解剤、拡張剤、血管収縮薬、鬱血除去薬、ロイコトリエン阻害剤、抗コリン剤、抗ヒスタミン剤、または血管拡張剤により治療することができる疾患または障害を予防する方法を提供する。本明細書において言及される薬剤により治療することができる疾患または状態のリスクを有する被験体は、例えば、当業者に公知の診断または予後アッセイのいずれかまたはそれらの組合せにより識別することができる。予防薬の投与は、疾患または障害に特徴的な症状が現れる前に、疾患または障害が予防されるようにおこなうことができ、またはその進行に遅れておこなうことができる。

30

#### 【0151】

##### b. 治療法

別の態様において、本発明は治療目的でコクリエート組成物を投与する方法を提供する。一実施形態において、本発明は本発明の組成物の投与により利益を得る可能性がある被験体を治療する方法を提供する。本発明のコクリエート組成物から利益を得る可能性があるあらゆる治療適応を本発明の方法により治療することができる。本発明は、1種以上の生体関連分子により治療することができる疾患または状態のリスクを有するまたは該疾患または障害を有する被験体を治療する方法を提供する。方法は、疾患または障害を予防、改善、その進行を終結または遅延するように、本発明の組成物を被験体に投与する工程を含む。疾患または障害は、本明細書において論じられる疾患または障害のいずれであってもよい。

40

#### 【0152】

本発明の組成物は、単独で、または上記の第2の治療と組み合わせて、被験体に投与することができる。本発明の組成物は、第2の治療の投与の前に、同時に、または後に被験体に投与することができる。

#### 【0153】

治療薬は、適切な動物モデルにおいて試験することができる。例えば、本発明のコクリ

50

エート組成物を動物モデルにおいて使用して、前記薬剤による治療の有効性、毒性、または副作用を決定することができる。あるいは、治療薬を動物モデルにおいて使用してその薬剤の作用メカニズムを決定することができる。例えば、薬剤を動物モデルにおいて使用して、その薬剤による治療の有効性、毒性、または副作用を決定することができる。あるいは、薬剤を動物モデルにおいて使用してその薬剤の作用メカニズムを決定することができる。

#### 【0154】

本明細書において使用される場合、用語「治療」または「治療する」は、疾患もしくは障害、疾患もしくは障害の症状、または疾患もしくは障害の素因の治癒、癒し、緩和、軽減、変更、矯正、改善、改良またはそれらへの影響を目的とする、疾患もしくは障害、疾患もしくは障害の症状、または疾患もしくは障害の素因を有する患者への治療薬（例えば、本発明のコクリエート組成物によりコクリエート化された抗生物質）の適用もしくは投与、または疾患もしくは障害、疾患もしくは障害の症状、または疾患もしくは障害の素因を有する患者から分離された組織または細胞系への治療薬の適用もしくは投与であると定義される。本明細書において使用される場合、用語「治療された」は、治癒された、癒された、緩和された、軽減された、変更された、矯正された、改善された、改良されたまたは影響された疾患または障害を指す。例えば、本発明のある治療法は、炎症が減少または緩和されるような抗炎症コクリエートの投与を提供する。本発明の他の治療法としては、真菌感染が軽減または矯正されるような抗真菌コクリエートの投与が挙げられる。

#### 【0155】

用語「治癒」、「癒し」、「緩和」、「軽減」、「変更」、「矯正」、「改善」、「改良」および「影響」は、好適なまたは適切な対照と比較して評価される。「好適な対照」または「適切な対照」は、比較の目的に役立つ当業者に公知の任意の対照または標準である。一実施形態において、「好適な対照」または「適切な対照」は、本明細書に記載される生体関連分子を取り込んだコクリエートを投与する前に測定された、値、レベル、形質(feature)、特徴、特質等である。例えば、宿主に本発明のコクリエート組成物を投与する前にコロニー形成単位の数を測定することができる。別の実施形態において、「好適な対照」または「適切な対照」は、被験体、例えば、例えば正常な体質を示す対照のまたは正常な被験体において測定される値、レベル、形質、特徴、特質等である。さらに別の実施形態において、「好適な対照」または「適切な対照」は、あらかじめ定義された値、レベル、形質、特徴、特質等である。

#### 【0156】

本発明の方法は、宿主に生体関連分子を投与する方法であって、生体関連分子が本発明のコクリエートまたはコクリエート組成物と一体となっている、前記方法を含む。本発明のコクリエートおよびコクリエート組成物は、経口、経鼻、局所、静脈内、経皮、口腔、舌下、直腸、腔内または非経口投与され得る。

#### 【0157】

本発明は、本発明の組成物の投与から利益を得る可能性がある被験体を治療する方法を提供する。生体関連分子、例えば薬物または栄養素から利益を得る可能性がある任意の治療適応症を本発明の方法により治療することができる。したがって、本発明は、例えば、タンパク質、小ペプチド、生物活性ポリヌクレオチド、抗生物質、抗ウイルス剤、麻酔剤、抗精神病薬、抗感染剤、抗真菌剤、抗癌剤、免疫抑制剤、免疫賦活薬、ステロイド抗炎症剤、非ステロイド抗炎症剤、抗酸化剤、合成または天然由来の抗うつ剤、精神機能を維持または増強するもしくは精神機能低下を阻害する物質、抗けいれん薬、HIVプロテアーゼ阻害剤、非求核性逆転写酵素阻害剤、サイトカイン、精神安定薬、粘液溶解薬、拡張薬、血管収縮薬、鬱血除去薬、ロイコトリエン阻害剤、抗コリン剤、抗ヒスタミン剤、コレステロール脂質代謝調節剤または血管拡張薬により治療することができる疾患または障害のリスクを有する、または前記疾患または障害を有する被験体を治療する方法を提供する。該方法は、本発明のコクリエート組成物を、疾患または障害が治療されるように被験体に投与する過程を含む。疾患または障害は、例えば、炎症、疼痛、感染、真菌感染、細菌

10

20

30

40

50

感染、ウイルス感染、寄生虫性疾患、免疫不全、遺伝性障害、変性疾患、癌、増殖性疾患、肥満、うつ病、脱毛、勃起不全、高血圧、低血圧、痴呆、老人性痴呆、または栄養失調、急性および慢性白血病およびリンパ腫、肉腫、腺腫、癌腫、上皮癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、乳癌、肺癌、肝細胞癌、腎細胞癌、胆道癌、大腸癌、卵巣癌、子宮癌、黒色腫、子宮頸癌、精巣癌、食道癌、胃癌、中皮腫、神経膠腫、膠芽腫、下垂体腺腫、統合失調症、強迫性障害(OCD)、双極性障害、アルツハイマー病、パーキンソン病、細胞増殖性障害、血液凝固障害、異常フィブリノーゲン血症および血友病(AおよびB)、自己免疫疾患、例えば、全身性紅斑性狼瘡、多発性硬化症、重症筋無力症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少症、グレーブス病、同種移植拒否、強直性脊椎炎、乾癬、強皮症、ブドウ膜炎、湿疹、皮膚疾患、高脂血症、高血糖症、および高コレステロール血症であり得る。

#### 【0158】

本発明のコクリエート組成物は、より良い健康または生活の質を増進するために、例えばコレステロールの吸收を制限するため、または脂質代謝、体重増加、空腹、加齢、または成長を調節するために使用することも可能である。しわの減少、発毛、色素形成、または皮膚疾患などの美容効果を取り扱い得る。コクリエートは、囊胞性線維症または筋ジストロフィーなどの遺伝性疾患も治療し得る。

#### 【0159】

本発明のコクリエート組成物は、頭痛、関節炎、関節リウマチ、変形性関節症、アテローム性動脈硬化、急性痛風、例えばスポーツ障害に伴う急性または慢性軟部組織損傷、テニス肘、滑液包炎、腱炎、椎間板ヘルニアなどの急性または慢性背痛、手根管症候群、糸球体腎炎、心臓炎、潰瘍性大腸炎、喘息、敗血症、および足底筋膜炎を含むさまざまな炎症を治療するために使用することができる。本発明のコクリエート組成物は、手術または他の医療処置の結果としてもたらされる疼痛を軽減するために使用することもできる。本発明のコクリエート組成物はさらに、カンジダ(candida)、例えばイースト菌感染症、白癬(tinea)、例えば、水虫、粊糠疹、鶯口瘡、クリプトコッカス髄膜炎、ヒストプラスマ症、およびプラストミセス症を含むさまざまな真菌感染を治療するために使用することができる。

#### 【0160】

本発明のコクリエート組成物は、中程度から重度の下気道感染、皮膚感染、胆道感染、骨感染、抗生物質予防投与、偽膜性腸炎、中枢神経系感染(例えば、髄膜炎および脳室炎)、腹腔内感染(例えば、腹膜炎)、肺炎、敗血症、軟部組織感染、好中球減少性敗血症、関節感染、炎症性心内膜炎(infective endocarditis)、および尿路感染を含むがこれらに限定されない、さまざまな細菌感染を治療するために使用することができる。

#### 【0161】

本発明の抗生物質調製物により治療することができる細菌の例としては、トリ型結核菌(Mycobacterium avium)などのマイコバクテリア、黄色ブドウ球菌(Staphylococcus aureus)、表皮ブドウ球菌(Staphylococcus epidermidis)、化膿性連鎖球菌(Streptococcus pyogenes)、肺炎連鎖球菌(Streptococcus pneumoniae)、D群連鎖球菌(Streptococcus Group D)、ウェルシュ菌(Clostridium perfringens)、インフルエンザ菌(Haemophilus influenzae)、大腸菌(Escherichia coli)、緑膿菌(Pseudomonas aeruginosa)、およびクレブシエラ肺炎桿菌(Klebsiella pneumonia)が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0162】

感染源の細胞内滞留は治療を困難にし得るので、完全な治癒はすべての細胞内細菌の根絶を必要とする。そこで、細胞内抗生物質濃度を増加させる治療アプローチにより、殺細菌剤による殺菌を増大させ、感染の完全な除去を確実にすることができる。

#### 【0163】

好ましい実施形態において、本発明の抗細菌コクリエートは、細菌コロニー数を少なくとも10%減少させる能力を有する。より好ましくは、抗細菌コクリエートは、細菌コロニー数を少なくとも25%、さらに好ましくは50%、75%、85%、95%、96%、97%、98%、99%、99.50

5%、99.9%、または100%減少させることができる。これらの範囲および値の間に入るすべての個々の値および範囲は本発明の範囲に包含される。

#### 【0164】

また、本発明は、喘息、慢性副鼻腔炎、アレルギー性真菌性副鼻腔炎、洞菌腫(sinus mycetoma)、非侵入性真菌誘導粘膜炎、非侵襲性真菌誘導腸粘膜炎、慢性中耳炎、慢性大腸炎、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、カンジダ菌血症、腹腔内膿瘍、腹膜炎、胸膜腔感染、食道カンジダ症および侵襲性アスペルギルス症を含むがこれらに限定されない、さまざまな真菌感染を治療するための手段を提供する。本発明の抗真菌コクリエート組成物を用いて治療することができる真菌の例としては、これらに限定されないが、アブシジア属(Absidia)、黄色コウジ菌(Aspergillus flavus)、アスペルギルス・フミガタス(Aspergillus fumigatus)、アスペルギルス・グラウクス(Aspergillus glaucus)、偽巣性コウジ菌(Aspergillus nidulans)、アスペルギルス・テレウス(Aspergillus terreus)、アスペルギルス・ベルシコロル(Aspergillus versicolor)、アルタナリア属(Alternaria)、バシジオボラス属(Basidiobolus)、ビボラリス属(Bipolaris)、カンジダ・アルビカンス(Candida albicans)、カンジダ・グラブラタ(Candida glabrata)、カンジダ・ギリエルモンジイ(Candida guilliermondii)、カンジダ・クルセイ(Candida krusei)、カンジダ・リポリチカ(Candida lypolytica)、カンジダ・パラブシローシス(Candida parapsilosis)、カンジダ・トロピカリス(Candida tropicalis)、クラドスボリウム属(Cladosporium)、コニディオボラス属(Conidiobolus)、クスダマカビ属(Cunninghamella)、クルプラリア属(Curvularia)、ドレシュレラ属(Dreschlera)、エクセロヒルム属(Exserohilum)、フザリウム属(Fusarium)、マルブランキア属(Malbranchia)、ペシロンブセス属(Paecilomyces)、ペニシリウム属(Penicillium)、シュードアレシェリア属(Pseudallescheria)、クモノスカビ属(Rhizopus)、スエヒロタケ属(Schizophyllum)、スプロトリクス属(Sporothrix)、アクレモニウム属(Acremonium)、アラクニオタス・シトリヌス(Arachniotus citrinus)、アウロバシジオウム属(Aurobasidiom)、ビューベリア属(Beauveria)、ケトミウム属(Chaetomium)、クリオスボリウム属(Chrysosporium)、エピコッカム属(Epicoccum)、エキソフィリア・ジエンセルメイ(Exophilia jeanselmei)、ゲオトリクム属(Geotrichum)、オイジオデンドロン属(Oidiodendron)、フォーマ属(Phoma)、ピトミセス属(Pithomyces)、リノクラジエラ属(Rhinocladiella)、ロドツルラ属(Rhodoturula)、サグラハマラ属(Sagrahamala)、スコレバシジウム属(Scolebasidium)、スコプラリオブシス属(Scopulariopsis)、ウスチラゴ属(Ustilago)、トリコデルマ属(Trichoderma)、および接合菌類(Zygomycete)が挙げられる。

#### 【0165】

好ましい実施形態において、本発明の抗真菌コクリエートは、真菌コロニー形成単位(CFU)を少なくとも10%減少させる能力を有する。より好ましくは、エキノカンディンコクリエートは、CFUを少なくとも25%、さらに好ましくは50%、75%、85%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%、または100%減少させることができる。これらの範囲および値の間に入るすべての個々の値および範囲は本発明の範囲に包含される。コロニー形成単位の減少は、*in vivo*または*in vitro*であり得る。真菌感染の宿主はヒトまたは非ヒト動物であり得る。

#### 【0166】

上記の方法は、他の治療をおこなわずに、または他の治療と組み合わせて使用することができる。そのような治療は本発明の組成物の投与の前に、同時に、または後に開始することができる。したがって、本発明の方法はさらに、第2の治療、例えば疾患または障害のための第2の治療または他の治療の副作用を改善するための第2の治療を投与する過程を含む。このような第2の治療としては、例えば、放射線、化学療法、輸血、手術(例えば、腫瘍を取り除くための切除)、および遺伝子療法を挙げることができる。それに加えて、またはそれに代えて、さらなる治療は、疾患をさらに治療するため、または疾患もしくは他の治療の副作用を治療するため(例えば、制吐薬)の薬物の投与を含み得る。

#### 【0167】

10

20

30

40

50

治療の予防的および治療的方法に関して、このような治療は、薬理ゲノミクスの分野から得られる知識に基づいて、特別に適合させるか、改変することができる。本明細書において使用される場合、「薬理ゲノミクス」は、臨床開発中および市場の薬物に対する、遺伝子配列決定、統計遺伝学、および遺伝子発現解析などのゲノミクス技術の適用を指す。

#### 【0168】

より特定的には、前記用語は、患者の遺伝子が患者の薬物に対する反応をいかにして決定するか(例えば、患者の「薬物反応表現型」、または「薬物反応遺伝子型」)の研究を指す。そこで、本発明の別の態様は、個人の薬物反応遺伝子型に応じて個人の予防または治療処置を適合させるための方法を提供する。薬理ゲノミクスにより、医師がその治療により最も利益を得るであろう患者に対して予防または治療処置を集中させ、毒性の薬物関連副作用を経験するであろう患者の治療を避けることが可能になる。

10

#### 【0169】

用語「治療的有効量」は、所望の生理的反応を引き出すのに必要なまたは十分な量である。有効量は、被験体の大きさおよび体重などの要因または特定の化合物に依存して変化し得る。有効量は、細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手法、例えば、LD<sub>50</sub>(集団の50%が死亡する用量)およびED<sub>50</sub>(集団の50%に治療効果がある用量)を決定するための薬学的手法により、化合物の毒性および治療的有効性を考慮して決定することができる。毒性と治療効果との間の用量比が治療指数であり、それは比LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>として表される。大きい治療指数を示す化合物が好ましい。毒性の副作用を示す化合物も使用することができるが、病気に冒されていない細胞に対する損傷の可能性を最小にして、それにより副作用を減少させるために、前記化合物を病気に冒された組織の部位に標的化する送達系を設計するための配慮を払わなければならない。

20

#### 【0170】

細胞培養アッセイおよび動物実験から得られたデータを、ヒトにおける使用のための投与量の範囲を処方するために使用することができる。前記化合物の投与量は、好ましくは、ED<sub>50</sub>を含み、毒性がほとんどまたは全くない血中濃度の範囲内である。投与量は、この範囲内で、使用される剤形および利用される投与経路に依存して変化し得る。本発明の方法において使用される任意の組成物に関して、治療的有効用量は最初に細胞培養アッセイから見積もることができる。動物モデルにおいて、細胞培養において決定されたED<sub>50</sub>(すなわち、最大反応の半分を達成する試験化合物の濃度)を含む循環血漿濃度範囲を達成するように用量を処方することができる。このような情報を使用して、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定することができる。例えば、高速液体クロマトグラフィーにより血漿中のレベルを測定することができる。

30

#### 【0171】

#### IV. 医薬組成物

本発明は、本明細書に記載される予防的および治療的処置への本発明のコクリエート組成物の使用に関する。したがって、本発明の化合物は、投与に好適な医薬組成物中に組み入れることができる。このような組成物は、典型的には本発明の組成物および製薬上許容される担体を含む。本明細書において使用される場合、用語「製薬上許容される担体」は、薬物投与に適合する任意のおよびすべての溶媒、分散媒体、コーティング、抗細菌剤および抗真菌剤、等張化剤および吸収遅延剤等を含むことが意図される。医薬活性物質に対するそのような媒体および薬剤の使用は当業者に周知である。

40

#### 【0172】

ラウリル硫酸ナトリウムおよびステアリン酸マグネシウムなどの湿潤剤、乳化剤および滑沢剤、ならびに着色剤、放出剤、甘味剤、香味剤および芳香剤、保存剤および抗酸化剤も組成物中に存在してよい。

#### 【0173】

本発明の治療化合物の製剤中に存在してもよい製薬上許容される抗酸化剤の例としては、アスコルビン酸、システイン塩酸塩、硫酸水素ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム等などの水溶性抗酸化剤；アスコルビルパルミテート、ブチル化ヒドロ

50

キシアニソール(BHA)、ブチル化ヒドロキシトルエン(BHT)、レシチン、没食子酸プロピル、アルファ-トコフェロール等などの油溶性抗酸化剤；およびクエン酸、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ソルビトール、酒石酸、リン酸等などの金属キレート剤が挙げられる。

【0174】

さらに、本発明は、水、抗微生物剤、可塑剤、香味剤、界面活性剤、安定剤、乳化剤、増粘剤、結合剤、着色剤、甘味剤、芳香剤等を含む、さらに1種以上の追加の薬剤を含むことができる。

【0175】

好適な抗微生物剤としては、トリクロサン(triclosan)、塩化セチルピリジウム、臭化ドミフェン(domiphen bromide)、第四級アンモニウム塩、亜鉛化合物、サンギナリン(sanguinarine)、フッ化物、アレキシジン(alexidine)、オクトニジン(octonidine)、EDTA、ならびにチモール、サリチル酸メチル、メントールおよびユーカリプトール(eucalyptol)などの精油が挙げられる。

【0176】

好適な可塑剤としては、例えば、糖類、糖アルコール、またはポリエチレングリコール(PEG)などのポリオール、尿素；グリコール、プロピレングリコール、トリエチルシートレート、ジブチルまたはジメチルフタレート、モノアセチン、ジアセチンまたはトリアセチンが挙げられる。

【0177】

好適な界面活性剤としては、プルロニック酸、ラウリル硫酸ナトリウム、脂肪酸のモノおよびジグリセリドならびにAtmos 300およびPolysorbate 80などのポリオキシエチレンソルビトールエステルが挙げられる。好適な安定剤としては、キサンタンガム、ローカストビーンガム、グーガム、およびカラギーナンが挙げられる。好適な乳化剤としては、トリエタノールアミンステアレート、第四級アンモニウム化合物、アラビアガム、ゼラチン、レシチン、ベントナイト、ビーガム(veegum)等が挙げられる。好適な増粘剤としては、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース等が挙げられる。好適な結合剤としては、デンプンが挙げられる。

【0178】

含有することができる好適な甘味剤は、天然および人工甘味剤の両方を含む当業者に公知のものである。好適な甘味剤としては、単糖、二糖および多糖などの水溶性甘味剤；可溶性サッカリン塩、シクラメート塩、またはサッカリンの遊離酸型等などの水溶性人工甘味剤；L-アスパラギン酸由来の甘味剤などのジペプチド系甘味剤；通常の砂糖(スクロース)の塩素化誘導体(スクラロースの製品説明で知られる)などの天然の水溶性甘味剤に由来する水溶性甘味剤；ならびにタウマトコウス・ダニエリ(thaumatooccus danielli)(タウマチン(Thaumatin)IおよびII)などのタンパク質系甘味剤が挙げられる。

【0179】

一般に、特定の組成物に望まれるレベルの甘さを提供するために有効量の補助的甘味剤を利用するが、この量は選択される甘味剤により変化する。この量は、容易に抽出可能な甘味剤を使用する場合には、通常、組成物の0.01重量%～約10重量%であろう。

【0180】

使用することができる香味剤には、天然および人工香味剤などの当業者に公知のものが含まれる。これらの香味剤は、合成香味油および香味芳香油、および／または植物、葉、花、果実等に由来する油、含油樹脂および抽出物、ならびにそれらの組合せより選択され得る。代表的な香味油としては、スペアミント油、ケイヒ油、ペパーミント油、チョウジ油、ベイ油、タイム油、ニオイヒバ油、ナツメグ油、セージ油、およびクヘントウ油が挙げられる。バニラ、チョコレート、コーヒー、ココアおよび柑橘油、および果実エッセンスなどの人工、天然または合成果実香味も有用である。これらの香味剤は個々にまたは混合物として使用することができる。シンナミルアセテート、シンナムアルデヒド、シトラール、ジエチルアセタール、ジヒドロカルビルアセテート、オイゲニルホルムエート、p-メチルアニソールなどを含むアルデヒドおよびエステルなどの香味剤も使用することができます。

10

20

30

40

50

る。一般に、Chemicals Used in Food Processing, publication 1274 by the National Academy of Sciences, pages 63-258に記載されるものなどの香味剤または食品添加物を使用することができる。

#### 【0181】

使用される香味剤の量は、通常、香味のタイプ、個々の香味、所望の強度などの要因に関する好みの問題である。したがって、量は、最終製品において所望の結果を得るために変化し得る。このような変化は、当業者が過度の実験をすることなく実施することが可能な範囲に含まれる。

#### 【0182】

本発明の組成物はまた、着色剤または色素を含有することができる。着色剤は所望の色を作るために有効な量で使用される。本発明に有用な着色剤としては、二酸化チタンなどの顔料が挙げられ、それらは約5 wt%以下、好ましくは約1 wt%未満の量で組み込まれる。色素には、食品、薬物および化粧品への応用に適した天然の食品着色剤および染料が含まれる。これらの色素は、FD&C染料およびレーキとして知られている。すべてのFD&CおよびD&C染料およびそれらの化学構造は、Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, Volume 5, Pages 857-884に完全に列挙されており、この文献は参照により本明細書に組み込まれる。

10

#### 【0183】

本発明の製剤には、経口、経鼻、局所、経皮、口腔、舌下、直腸、腔内または非経口投与に適したもののが含まれる。製剤は単位剤形で便利に提供することができ、調剤の技術分野において周知の任意の方法により調製することができる。1つの剤形を製造するために担体材料と組み合わされる活性成分の量は、一般に治療効果が得られる組成物の量である。一般に、100%中、この量は約1%～約99%、好ましくは約5%～約70%、最も好ましくは約10%～約30%の活性成分の範囲である。

20

#### 【0184】

これらの製剤または組成物を調製する方法は、本発明の組成物を担体および場合により1種以上の補助成分と混合する工程を含む。一般に、製剤は、本発明の組成物を、液体の担体または微細に粉碎した固体の担体、またはその両方と均一および緊密に混合した後、必要に応じて、製品を成形することにより調製される。

#### 【0185】

30

経口投与に好適な本発明の製剤は、カプセル剤、カシェ剤、丸剤、錠剤、ゲルキャップ剤、結晶物質、ロゼンジ剤（香味を付けた基剤、通常スクロースおよびアカシアまたはトラガカントを用いる）、粉剤、顆粒剤、ゲル剤、部分液体、スプレー剤、噴霧剤、ミスト剤、噴霧された蒸気、エアロゾル、チンキ剤の形態、または水性もしくは非水性液体中の溶液または懸濁液、または水中油型もしくは油中水型エマルション、またはエリキシル剤もしくはシロップ剤、またはトローチ剤（ゼラチンおよびグリセリン、またはスクロースおよびアカシアなどの不活性基剤を用いる）、またはマウスウォッシュ等であってよく、それぞれ活性成分としてあらかじめ決定された量の本発明の組成物を含有する。本発明の組成物はボーラス剤、舐剤、またはペースト剤として投与してもよい。

#### 【0186】

40

経口投与のための本発明の固体剤形（カプセル剤、錠剤、丸剤、糖衣錠、粉剤、顆粒剤等）において、活性成分は、クエン酸ナトリウムまたはリン酸二カルシウムなどの1種以上の製薬上許容される担体、または以下の任意のもの：デンプン、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール、またはケイ酸などのフィラーまたは增量剤；例えばカルボキシメチルセルロース、アルギン酸塩、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロースまたはアカシアなどの結合剤；グリセリンなどの保湿剤；寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモまたはタピオカデンプン、アルギン酸、ある種のケイ酸塩、および炭酸ナトリウムなどの崩壊剤；パラフィンなどの溶解遅延剤；第四級アンモニウム化合物などの吸収促進剤；例えばセチルアルコールおよびグリセリンモノステアレートなどの湿潤剤；カオリンおよびベントナイト粘土などの吸収剤；タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マ

50

グネシウム、固体のポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム、およびそれらの混合物などの滑沢剤；および着色剤と混合される。

【0187】

カプセル剤、錠剤および丸剤の場合、医薬組成物は緩衝剤も含み得る。同じタイプの固体組成物は、ラクトースまたは乳糖、ならびに高分子量ポリエチレングリコール等などの賦形剤を用いる軟および硬充填ゼラチンカプセルにおいてフィラーとしても使用し得る。

【0188】

錠剤は、場合により1種以上の補助成分を加えて圧縮または成形により作ることができる。圧縮錠剤は、結合剤（例えば、ゼラチンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース）、滑沢剤、不活性希釈剤、保存剤、崩壊剤（例えば、デンブングリコール酸ナトリウムまたは架橋カルボキシメチルセルロースナトリウム）、界面活性剤または分散剤を用いて調製することができる。成形錠剤は、不活性液体希釈剤により湿らせた粉末の組成物の混合物を好適な機械を用いて成形することにより作ることができる。

【0189】

本発明の医薬組成物の錠剤、および糖衣錠、カプセル剤、丸剤および顆粒剤などの他の固体の剤形は、場合により刻印を付けるか、腸溶錠または製剤の技術分野において公知の他のコーティングなどのコーティングおよびシェルを付けて調製されてもよい。それらはまた、例えば、所望の放出プロファイルを提供するためのさまざまな割合のヒドロキシプロピルメチルセルロース、他のポリマー・マトリクス、リポソームまたはミクロスフェアを用いて、含有される活性成分の遅延放出または制御放出を提供するように製剤することもできる。

【0190】

それらは、例えば細菌を保持するフィルターによる濾過により、または滅菌剤を組み入れることにより滅菌して、滅菌固体組成物の形態とすることができます、それを使用の直前に滅菌水または他の無菌の注射媒体に溶解することができる。

【0191】

これらの組成物は、場合により不透明化剤を含有してよく、また、胃腸管のある部分においてのみ、または胃腸管のある部分において優先的に、場合により遅延方式で活性成分を放出する組成物であってよい。使用し得る埋め込み組成物の例としては、ポリマー物質およびワックスが挙げられる。活性成分は、適切な場合には1種以上の上記の賦形剤と共に、マイクロカプセル化された形態であってもよい。

【0192】

本発明の化合物の経口投与のための液体の剤形としては、製薬上許容されるエマルション、マイクロエマルション、溶液、懸濁液、シロップ剤およびエリキシル剤が挙げられる。活性成分に加えて、液体剤形は、例えば水または他の溶媒などの当技術分野において広く使用される不活性希釈剤、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、油（特に、綿実油、落花生油、コーン油、胚芽油、オリーブ油、ひまし油およびゴマ油）、グリセリン、テトラヒドロフリルアルコール、ポリエチレングリコールおよびソルビタンの脂肪酸エステル、ならびにそれらの混合物などの可溶化剤および乳化剤を含有し得る。不活性希釈剤の他に、経口組成物は、湿潤剤、乳化剤および懸濁剤、甘味剤、香味剤、着色剤、芳香剤および保存剤などの補助剤も含み得る。

【0193】

懸濁液は、活性化合物に加えて、例えば、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトールおよびソルビタンエステル、微結晶セルロース、アルミニウムメタヒドロキシド、ベントナイト、寒天およびトラガカント、ならびにそれらの混合物などの懸濁剤を含有し得る。

【0194】

直腸または膣内投与のための本発明の医薬組成物の製剤は、液体もしくはエアロゾルの形態で、または坐剤として提供することができる。坐剤は、例えばココアバター、ポリエ

10

20

30

40

50

チレングリコール、坐剤ワックスまたはサリチル酸エステルを含み、室温では固体であるが、体温では液体であり、そのため直腸または膣腔内で融解し活性化合物を放出する1種以上の好適な被刺激性の賦形剤または担体と、1種以上の本発明の化合物を混合することにより調製することができる。液体またはエアロゾルの形態としては、ゲル剤、ペースト剤、軟膏、膏薬、クリーム剤、溶液、懸濁液、部分液体、スプレー剤、噴霧剤、ミスト剤、噴霧された蒸気およびチンキ剤が挙げられるが、これらに限定されない。また、膣内投与に好適な本発明の製剤としては、適切であることが当業者に公知の担体を含有するペッサリー、タンポン、クリーム、ゲル、ペースト、泡またはスプレー製剤が挙げられる。

【0195】

鼻内投与のための本発明の医薬組成物の製剤は、固体、液体またはエアロゾルの形態（10 例えば、粉剤、結晶物質、ゲル剤、ペースト剤、軟膏、膏薬、クリーム剤、溶液、懸濁液、部分液体、スプレー剤、噴霧剤、灌注液、洗浄剤、ミスト剤、噴霧された蒸気またはチンキ剤）であり得る。

【0196】

本発明の組成物の局所または経皮投与のための剤形としては、粉剤、スプレー剤、軟膏、ペースト剤、クリーム剤、ローション剤、ゲル剤、溶液、パッチ剤および吸入剤が挙げられる。組成物は、無菌条件下で製薬上許容される担体、および必要な場合には保存剤、緩衝剤、または推進剤と混合される。

【0197】

軟膏、ペースト剤、クリーム剤およびゲル剤は、本発明の組成物に加えて、動物性および植物性脂肪、油、ワックス、パラフィン、デンプン、トラガカント、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコーン、ベントナイト、ケイ酸、タルクおよび酸化亜鉛、またはそれらの混合物などの賦形剤を含有し得る。

【0198】

粉剤およびスプレー剤は、本発明の組成物に加えて、ラクトース、タルク、ケイ酸、水酸化アルミニウム、ケイ酸カルシウムおよびポリアミド粉末、またはこれらの物質の混合物などの賦形剤を含有し得る。スプレー剤はさらに、クロロフルオロ炭化水素ならびにブタンおよびプロパンなどの揮発性の無置換炭化水素などの通常の推進剤を含有し得る。

【0199】

経皮パッチ剤は、本発明の組成物の体への制御送達を提供するという追加の利点を有する。このような剤形は組成物を適切な媒体に溶解または分散することにより作ることができる。組成物の皮膚を通した流れを増加させるために吸収促進剤を使用してもよい。このような流れの速度は、速度制御膜を提供すること、または組成物をポリマーマトリクスもしくはゲル中に分散することのいずれかにより制御することができる。

【0200】

眼科用製剤、眼軟膏、粉剤、溶液等も本発明の範囲に包含される。

【0201】

非経口投与に好適な本発明の医薬組成物は、本発明のコクリエートまたはコクリエート組成物を、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、製剤を意図される受容者の血液と等張にするための溶質または懸濁剤もしくは増粘剤を含有し得る1種以上の製薬上許容される無菌の、等張の、水性または非水性溶液、分散物、懸濁液もしくはエマルション、または無菌の粉末（使用の直前に無菌の注射溶液または分散物に再構成される）と組み合わせて含む。

【0202】

本発明の医薬組成物に使用し得る好適な水性および非水性担体の例としては、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等）、およびそれらの好適な混合物、オリーブ油などの植物油、およびオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルが挙げられる。例えば、レシチンなどのコーティング材料を使用することにより、分散物の場合には要求される粒径を維持することにより、および界面活性剤を使用することにより、適切な流動性を維持し得る。

【0203】

10

20

30

40

50

これらの組成物は保存剤、湿潤剤、乳化剤および分散剤などの補助剤を含有してもよい。微生物の作用の防止は、さまざまな抗細菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸等を加えることにより保証され得る。糖類、塩化ナトリウム等などの等張化剤を組成物に加えることも望ましい。さらに、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなどの吸収を遅くする薬剤を加えることにより、注射用剤形の持続性吸収をもたらすことができる。

【0204】

いくつかの実施形態において、このような補助剤は、免疫反応を刺激するために本発明の組成物に加えることができる免疫調節物質であり得る。免疫調節物質は、ヒトまたは動物ウイルスに由来するエンベロープタンパク質、オリゴヌクレオチド、例えばCpGオリゴヌクレオチドを含むものであってもよく、または本質的に化学物質であってもよい。特定の化学的免疫調節物質としては、インターフェロンアルファ、インターフェロンガンマ、およびインターロイキン12を含むがこれらに限定されないサイトカイン、ケモカインおよびリンホカインが挙げられるが、これらに限定されない。エンベロープタンパク質の供給源として好適な動物ウイルスの例としては、以下の科：アレナウイルス科(Arenaviridae)、ブニヤウイルス科(Bunyaviridae)、コロナウイルス科(Coronaviridae)、デルタウイルス科(Deltaviridae)、フラビウイルス科(Flaviviridae)、ヘルペスウイルス科(Herpesviridae)、ラブドウイルス科(Rhabdoviridae)、レトロウイルス科(Retroviridae)、ポックスウイルス科(Poxviridae)、パラミクソウイルス科(Paramyxoviridae)、オルトミクソウイルス科(Orthomyxoviridae)、およびトガウイルス科(Togaviridae)に属するウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。インフルエンザウイルス、ニューカッスル病ウイルス、およびワクシニアウイルス、およびセンダイウイルスから得たエンベロープタンパク質も本発明に包含される。

10

【0205】

いくつかの場合に、薬物の効果を持続させるために、皮下または筋肉内注射からの薬物の吸収を遅くすることが望ましい。これは、水溶性の乏しい結晶またはアモルファス材料の液体懸濁液を使用することにより達成することができる。薬物の吸収速度はその溶解速度に依存し、溶解速度は、結晶の大きさおよび結晶形に依存し得る。あるいは、非経口投与薬物剤形の遅延吸収は、薬物を油ビヒクル中に溶解または懸濁することにより達成される。

20

【0206】

注射への使用に好適な医薬組成物としては、無菌の水溶液（水溶性の場合）または水性分散物、および無菌の注射溶液または分散物のその場での調製のための無菌の粉末が挙げられる。静脈内投与に好適な担体としては、生理食塩水、殺菌水、Cremophor EL(商標)(BASF, Parsippany, N.J.)またはリン酸緩衝食塩水(PBS)が挙げられる。組成物は無菌でなければならず、また、容易に注射できる程度の流動性がなければならない。組成物は製造および貯蔵の条件下で安定でなければならず、細菌および真菌などの微生物の汚染作用から保護されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセリン、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコール等）、およびそれらの好適な混合物を含有する溶媒または分散媒体であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング材料を使用することにより、分散物の場合には要求される粒径を維持することにより、および界面活性剤を使用することにより、維持することができる。微生物の作用の防止は、さまざまな抗細菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサール等により達成することができる。多くの場合、等張化剤、例えば、糖類、マンニトール、ソルビトールなどのポリアルコール、および塩化ナトリウムを組成物に加えることが好ましい。吸収を遅くする薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物に加えることにより、注射用組成物の持続性吸収をもたらすことができる。

30

【0207】

無菌の注射溶液は、適切な溶媒中の所望の量の本発明の組成物を、必要に応じて上に列

40

50

挙した1種の成分または成分の組合せに組み入れた後、濾過滅菌をおこなうことにより調製することができる。一般に、分散物は、基本的分散媒体および上に列挙されたもののうちの必要な他の成分を含有する無菌のビヒクル中に組成物を組み入れることにより調製される。無菌の注射溶液を調製するための無菌の粉末の場合には、調製の好ましい方法は、あらかじめ滅菌濾過した本発明の組成物とさらなる所望の成分の溶液を真空乾燥および凍結乾燥して、本発明の組成物とさらなる所望の成分とを含む粉末を得ることである。

【0208】

注射用デポ製剤は、ポリラクチド-ポリグリコリドなどの生物分解性ポリマー中に本発明の化合物のマイクロカプセル化マトリクスを形成することにより作られる。薬物のポリマーに対する比および使用される特定のポリマーの性質に依存して、薬物放出速度を制御することができる。他の生物分解性ポリマーの例としては、ポリ(オルトエステル)およびポリ(酸無水物)が挙げられる。注射用デポ製剤は、薬物を生体組織に適合性のリポソームまたはマイクロエマルション中に封入することによっても調製される。

10

【0209】

一般に、経口組成物は不活性希釈剤または食用担体を含む。それらはゼラチンカプセルに封入するか、錠剤に圧縮することができる。治療のための経口投与の目的で、組成物を賦形剤と混合して錠剤、トローチ、またはカプセルの形態で使用することができる。経口組成物はマウスウォッシュとして使用するために液体の担体を用いて調製することもでき、液体担体中の組成物を口腔に適用し、口の中で回して、吐き出すか、または飲み込む。製薬上適合性の結合剤、および/または補助材料を組成物の一部として加えることができる。錠剤、丸剤、カプセル、トローチ等は、以下の任意の成分または同じ性質の化合物：微結晶セルロース、トラガカントガムまたはゼラチンなどの結合剤；デンプンまたはラクトースなどの賦形剤、アルギン酸、プリモゲル(primogel)、またはコーンスタークなどの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムまたはステロート(sterotes)などの滑沢剤；コロイド二酸化ケイ素などの滑剤；スクロースまたはサッカリンなどの甘味剤；またはペパーミント、サリチル酸メチル、またはオレンジフレーバーなどの香味剤を含有することができる。

20

【0210】

吸入による投与のために、化合物は、好適な推進剤、例えば二酸化炭素などの気体を含む加圧容器またはディスペンサー、またはネブライザーからのエアロゾルスプレーの形態で送達される。

30

【0211】

全身投与は、経粘膜または経皮手段によっておこなうこともできる。経粘膜または経皮投与のために、透過すべき障壁に適切な浸透剤を製剤に使用する。このような浸透剤は一般に当業者に公知であり、例えば、経粘膜投与のための、界面活性剤、胆汁酸塩、およびフシジン酸誘導体が挙げられる。経粘膜投与は、スプレー式点鼻薬または坐剤の使用により達成することができる。経皮投与のために、活性化合物は、一般に当業者に公知の、軟膏、膏薬、ゲル剤、またはクリーム剤に製剤される。

【0212】

本発明の組成物はまた、直腸送達のために、坐剤(例えば、ココアバターおよび他のグリセリドなどの従来の坐剤基剤を用いて)または保持浣腸剤の形態に調製することができる。

40

【0213】

一実施形態において、本発明の組成物は、植込みおよびマイクロカプセル化送達系を含む制御放出製剤のように、体からの急速な排出から組成物を保護する担体を用いて調製される。エチレンビニルアセテート、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸などの生物分解性、生体適合性ポリマーを使用することができる。このような製剤の調製方法は当業者には明らかであろう。また、材料は、Alza CorporationおよびNova Pharmaceuticals, Incから市販されている。リポソーム懸濁液(ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体により感染した細胞に標的化されたリポソ-

50

ムを含む)も製薬上許容される担体として使用することができる。これらは、当業者に公知の方法、例えば、米国特許第4,522,811号に記載される方法により調製することができる。

#### 【0214】

投与の容易さおよび投与量の均一性のために、経口または非経口組成物を投与単位剤形に製剤することが特に有利である。本明細書において使用される場合、投与単位剤形は、治療される被験体に対する単位投与量として好適な物理的に分離した単位を指す。それぞれの単位は、必要な医薬担体と組み合わせて、所望の治療効果を生み出すために計算されたあらかじめ決められた量の組成物を含有する。本発明の投与単位剤形の仕様は、組成物特有の性質および達成すべき特定の治療効果、ならびに個人の治療のためのこのような組成物の調剤の技術分野に固有の制限により規定され、それらに直接依存する。

10

#### 【0215】

医薬組成物は、投与の説明書と一緒に、容器、包装、またはディスペンサー中に入れることができる。

#### 【0216】

医薬組成物は、1種以上のさらなる化合物または組成物および使用説明書と共に容器に入れることができる。例えば、本発明はまた、それを必要とする被験体に投与された場合にそれぞれが治療効果を及ぼす2種の薬剤を含有する包装された医薬品を提供する。医薬組成物は第3の薬剤、またはさらにそれ以上の薬剤を含んでもよく、第3(および第4、等)の薬剤は、癌治療(例えば抗癌剤および/または化学療法)またはHIVカクテルなどの、障害に対する別の薬剤であり得る。いくつかの場合において、個々の薬剤は、販売または消費者への送達のために別々の容器に包装される。本発明の薬剤は適切な溶媒を用いた溶液として、または溶液を含まない(例えば、凍結乾燥された)形態として供給され得る。さらなる成分としては、酸、塩基、緩衝剤、無機塩、溶媒、抗酸化剤、保存剤、または金属キレート剤が挙げられる。さらなるキット構成要素は、純粋な組成物として、または1種以上のさらなるキット構成要素を組み入れる水溶液または有機溶液として提供される。キット構成要素の一部または全部は場合によりさらに緩衝剤を含む。

20

#### 【0217】

本発明はまた、第2の薬剤と組み合わされた(例えば、混合された)第1の薬剤を含む包装された医薬品を含む。本発明はまた、第2の薬剤の存在下で第1の薬剤を使用するための説明書または本発明の方法における第1の薬剤の使用の説明書と共に包装された第1の薬剤を含む医薬品を含む。本発明はまた、第1の薬剤の存在下で第2の薬剤もしくはさらなる薬剤を使用するための説明書または本発明の方法における第2の薬剤もしくはさらなる薬剤の使用の説明書と共に包装された、第2の薬剤もしくはさらなる薬剤を含む医薬品を含む。あるいは、包装された医薬品は、薬剤の少なくとも1種を含み、その医薬品は第2の薬剤と共に使用することを奨励される。

30

#### 【0218】

さらに別の態様において、本発明は、本発明のコクリエートおよび/またはコクリエート組成物の製品を提供する。製品は、包装材料および包装材料の中に入っている脂質を含む。包装材料は、本発明のコクリエートまたはコクリエート組成物を形成するための脂質の使用を指示するラベルまたは添付文書を含む。製品はさらに、本発明のコクリエートまたはコクリエート組成物の形成(例えば、生体関連分子を溶媒と混合して脂質の溶液中に滴下すること)のための説明書または指針を含む。場合により、製品は、溶媒、生体関連分子、多価カチオン(例えば、カルシウムおよび/またはマグネシウム)、対照の生体関連分子、および/またはキレート剤(例えば、EDTA)を含んでもよい。製品はさらに、本発明の組成物を製造するために使用し得る他の成分または器具を含んでもよい。

40

#### 【0219】

説明書および/または指針は、一般に、以下の記述の1つ以上を含み得る。

#### 【0220】

1. 本発明の適切な脂質を水または緩衝液中で激しく攪拌することによりリポソーム懸濁

50

液を調製すること。

【0221】

2. 脂質濃度をモニターすること：低濃度は適切な量の最終製品を製剤するために大量の緩衝液を必要とし、高濃度はカルシウムを加えた際に大きいコクリエート凝集物を生成し得る。

【0222】

3. 水と緩衝溶液のどちらを使用するかを実験的に決定すること：塩の存在および懸濁液のpHが、生体関連分子の特性に依存して生体関連分子-リポソーム中間体の形成に影響を与える。

【0223】

4. 場合により、決められた粒径のリポソームを調製するためおよび／または懸濁液を滅菌するために、濾過または他の標準的手段をおこなうこと。

【0224】

5. 適切な溶媒を用いて生体関連分子溶液を調製すること：多くの溶媒、例えばDMSOがこの工程に使用可能である。

【0225】

6. 生体関連分子-溶媒溶液を、激しく攪拌したリポソーム懸濁液に、好ましくは滴下して加えること。

【0226】

7. 最適な添加速度および攪拌速度を実験的に決定すること：光学顕微鏡により見た時にコクリエート化されていない生体関連分子が本質的に存在しない生体関連分子-リポソームの懸濁液を製造しなければならない。

【0227】

8. 脂質2モルあたり1モルのカルシウムと仮定することにより加えるべきカルシウムの量を計算し、緩衝液が2~6 mMの間になるように余分のカルシウムを加えること。

【0228】

9. カルシウム塩を加えることによりコクリエート形成を誘導すること。塩は、溶液、例えば0.1 M塩化カルシウム溶液として加えてもよく、または固体のカルシウム塩、例えば塩化カルシウムとして、激しく攪拌しながらゆっくりと加えててもよい。

【0229】

10. 緩衝液中の溶媒の存在が望ましくない場合、場合により生体関連分子-コクリエートを、例えば遠心分離または濾過により回収して、それらを適切な媒体に再懸濁すること。カルシウムイオンとPSとの結合は容易に逆転し得るので、損なわれることなくそれらの結晶状態を保持するために、コクリエート製剤は少なくとも1~2 mMのカルシウムイオンを含有する媒体に再懸濁し得る。

【0230】

11. 場合により、コクリエート製剤の品質を評価すること。十分なカルシウムイオンの存在がコクリエート構造を開始し、維持する。コクリエート製剤の品質を評価する1つの方法は、コクリエート結晶からカルシウムイオンを除去した際に作られるリポソームの視覚化である。これは、光学顕微鏡を用いて実施することができる。生体関連分子-コクリエート懸濁液の一定量を倍率1000 $\times$ の位相差顕微鏡により可視化することができる。少量のキレート剤、例えばEDTAの濃縮溶液をカバーガラスの縁に加えることにより、毛管作用によりサンプルに達する。高品質のコクリエート製品はカルシウムキレート剤と接触すると、開いて無損傷のリポソームになる。キレート剤としてEDTAを使用する場合、EDTA溶液のpHは約pH 9.5にしなければならない。6.5未満のpHでは、コクリエートはリポソームに変換しない。pH 7.4のEDTA溶液を使用する場合、キレート剤のアセテート基にカルシウムが結合すると水素イオンが放出されて、溶液のpHが下がり、コクリエートのリポソームへの変換を阻害する。

【0231】

溶媒および他の材料、最適な滴下速度、混合速度、カルシウムの量等の選択は、当業者

10

20

30

40

50

が本明細書に提供される教示を使用して容易に決定することができる。

【0232】

さらに、当業者は、本発明の範囲を逸脱することなく、上に記載したものに対して、要素および／または工程を導入、改変および／または削除することができる。例えば、リボソーム懸濁液は既に調製されたものが提供されてもよく、溶媒の組合せを使用してもよく、カルシウムの計算の必要性をなくすために過剰のカルシウムを使用してもよく、別のある場合は追加のカチオンを使用してもよい等である。

【実施例】

【0233】

実施例1. 経口送達および投与のためのアミノグリコシド製剤

10

トリ型結核菌(*Mycobacterium avium*)(Ma)による感染は、免疫無防備状態の患者および慢性肺疾患を有する個人においてよく見られる。Ma感染の有効な治療はごくわずかの化合物に限られており、アミカシン(amikacin)の使用は投与経路(静脈内または筋肉内)および毒性により制限される。

【0234】

コクリエートは、ホスファチジルセリン(PS)およびカルシウム(Ca)から構成される安定な、結晶性の、無水の沈殿であって、渦巻き状に巻かれた、または積み重なったシート状の、大きい、連続的な、固体の、脂質二重層シートからなる、独特の多層構造を有する。コクリエートは薬物の毒性を低減し、現在は注射用製剤としてのみ利用可能である薬物の経口送達を仲介する。

20

【0235】

アミカシンコクリエート(Amkcch)製剤を、使用するPSのタイプ、PS:薬物の比、PS:Caの比、およびNaCl濃度を変化させることにより、アミカシンのコクリエート化効率および粒径に関して最適化した。細胞内Ma感染に対するAmkcchの有効性を、トリ型結核菌株MAC 101またはMAC 109に感染したマウス腹膜マクロファージを用いてin vitroで評価した。マウス腹膜マクロファージ(Mo)Raw 264.7細胞を、 $10^5$ 細胞/ウェルで播種した。Mo単分子膜を1:10の比で1時間感染させて、細胞外細菌を除去した。単分子膜を遊離アミカシンおよび／またはコクリエート調製物により4日間処理して、細胞内細菌の数を測定した。アッセイを3回繰り返した。

【0236】

30

未処理の対照Ma株は、Mo内で $3.8 \times 10^5 \sim 4.9 \times 10^6$ に増殖した。遊離アミカシン(10および20  $\mu$ g/ml)により処理されたMo内のMaは、それぞれ6.1および $3.4 \times 10^4$ 細菌まで死滅した。最適化されたAmkcch(10および20  $\mu$ g/ml)は、Mo内の細菌数を3.9および $1.7 \times 10^3$ 細菌に減少させて、10倍以上増強された有効性を示した(遊離アミカシンと比較してp<0.05)。

【0237】

アミカシンのコクリエート調製物はマクロファージ中のMa株に対して有意のかつ増強された活性を示し、コクリエートが遊離アミカシンと比較してより長時間に渡ってより高い細胞内濃度を達成したことを示唆している。動物実験は進行中である。

【0238】

40

特に、経口投与できる少なくとも1つの現存するアミノグリコシドの製剤を開発することが望まれていた。アミノグリコシドであるアミカシンを選択して、アミカシンコクリエートを調製した。

【0239】

コクリエート送達ビヒクルは、ホスファチジルセリンおよびカルシウムなどの、単純な天然材料からなる、安定な結晶性リン脂質-カチオン沈殿物である。それらは、内部の水空間を持たない、渦巻き状に巻かれたまたは積み重なったシート状の、大きい、連続的な、固体の脂質二重層シートからなる独特の多層構造を有する。この独特の構造が、一体となった「コクリエート化された」分子を分解から保護する。コクリエート構造全体が一連の固体層であるので、コクリエート構造の内部にある成分は、コクリエートの外層が苛酷な環境条件または酵素に曝された場合でさえも、損なわれないままである。in vivoの血

50

清および粘膜分泌物中の2価カチオン濃度は、コクリエート構造が維持されるものである。それ故、コクリエートと一体となった分子の大部分が固体の、安定な、不浸透性の構造の内層に存在する。ところが、細胞の内部に入ると、カルシウム濃度が低いためにコクリエート結晶が開き、コクリエートの中に製剤されていた分子が放出される。

【0240】

改善されたアミカシンの経口製剤がトリ型結核菌に対して有効であるかどうかを決定するため、コクリエート送達ビヒクルを利用してアミカシンコクリエートを調製した。以前の研究に基づいて、コクリエート中に製剤された分子は細胞内送達に効果的である。

【0241】

トリ型結核菌感染は、免疫無防備状態の患者および慢性肺疾患を有する個人においてよく見られる。トリ型結核菌感染の有効な治療は少数の化合物に限られており、アミノグリコシドであるアミカシンの使用は投与経路（静脈内または筋肉内）および毒性により制限される。アミノグリコシドの広範な使用は、それらの毒性（腎毒性および聴器毒性）および不便な投与経路（静脈内または筋肉内）のために制限されてきた。アミノグリコシドであるアミカシンの非効率的な細胞内送達は、高い血漿薬物レベルに関連する多様な有害作用の原因の一部である。さらに、第一選択治療としてのアミカシンの使用は、低い経口吸収性、短い半減期、および重大な腎臓および聴覚器毒性（そのため、血漿レベルが狭い治療濃度域の中に入っていることを確認するために同時に薬物レベルをモニターしながらの、頻繁な静脈内投与が必要になる）のために制限される。

【0242】

粒子を掃除する細胞である食細胞には、マクロファージ、好中球、および樹状細胞が含まれるが、これらは、微生物感染に対する防御の主要な第一線を代表するものである。トリ型結核菌を含む多くの病原体は、これらの微生物による食細胞の生理機能の破壊または利用さえも可能にして、増殖し、病気を引き起こすという戦略を進化させてきた。細胞内微生物の有効な治療における主要な課題は、感染した細胞の形質膜を通して抗微生物剤を高い効率で送達することの困難さである。

【0243】

a. さまざまな脂質対薬物の比およびさまざまな塩濃度を含む、コクリエート製剤の調製

アミカシンコクリエート(Amkcch)製剤を、使用するPSのタイプ、PS：薬物の比、PS:Caの比、およびNaCl濃度を変化させることにより、アミカシンのコクリエート化効率および粒径に関して最適化した（図1）。

【0244】

0 M NaClで、約10:1の脂質：薬物の比を有するアミカシンの結晶コクリエートの濃縮懸濁液を作るために、200 mgのアミカシンを20 mlのD.D（2回蒸留した）水と混合し、0.22  $\mu$ mのフィルターにより濾過し、200mlの滅菌水中の2000 mgの50%ダイズPSリポソームと混合して（最初にPSリポソームを5、0.8、および0.45  $\mu$ mのフィルターにより濾過する）、アミカシンを含有するリポソームを形成した。次に、得られた混合物に、添加の間激しく混合（攪拌）しながら、17mlの0.1 M塩化カルシウムを加えて、コクリエートを形成した。次に、アミカシンコクリエートを凍結乾燥した。乾燥した粉末アミカシンコクリエートに滅菌水を加えて、約10:1の脂質：アミカシンの比を有する約6.7mgアミカシン/ml(1.0 mg/150  $\mu$ l)の懸濁液を調製した。

【0245】

0.66 MのNaClで、約10:1の脂質：薬物の比および小さい粒径を有するアミカシンの結晶コクリエートの濃縮懸濁液を作るために、200mgのアミカシンを20mlのD.D（2回蒸留した）水中に加えて、0.22  $\mu$ mのフィルターにより濾過し、200mlの滅菌水中の2000 mgの50%ダイズPSリポソームと混合して（最初にPSリポソームを5、0.8、および0.45  $\mu$ mのフィルターにより濾過する）、アミカシンを含有するリポソームを形成する。次に、得られた混合物に、添加の間激しく混合（攪拌）しながら、17mlの0.1 M塩化カルシウムを加えて、コクリエートを形成した。コクリエート結晶の凝集サイズを小さくするために、次に3.88 mlの滅菌水中の1125.2 mgの塩化ナトリウムをコクリエートの混合物に加えた。次に、アミ

10

20

30

40

50

カシンコクリエートを凍結乾燥した。乾燥した粉末アミカシンコクリエートに滅菌水を加えて、約10:1の脂質：アミカシンの比および高いNaCl濃度(0.66M)を有する約6.7mgアミカシン/ml(1.0 mg/150 μl)の懸濁液を調製した。

【0246】

表1に、凍結乾燥および滅菌水による再構成の前および後のアミカシンコクリエート懸濁液から得られた上清におけるアミカシンの量を報告する。アミカシンはニンヒドリン比色アッセイを用いて測定した。

【0247】

表1:ペレット化コクリエートと共に残存するアミカシンのパーセンテージ

【表1】

10

ダイズPS:薬物の比	0 NaCl アミカシン コクリエート (凍結乾燥前)	0 NaCl アミカシン コクリエート (凍結乾燥後)	高 NaCl アミカシン コクリエート (凍結乾燥前)	高 NaCl アミカシン コクリエート (凍結乾燥後)
コクリエート 上清	10:1	33.3%	36.2%	38.8%
コクリエート に取り込まれたAMK	10:1	66.7%	63.8%	61.2%

20

【0248】

下に記載される研究において試験された製剤は、in vitroおよびin vivoのいずれの研究のためにも洗浄していない。投与されたアミカシンの量は、出発製剤における最初のアミカシンの量に基づいて計算する。投与量はアミカシンのコクリエート化効率に依存しない。同じ方法によりゲンタマイシン(Gentamicin)コクリエート(Gecch)を調製した。

【0249】

b. コクリエート調製物の生物学的評価: in vitroマクロファージアッセイ

細胞内Ma感染に対するAmkcchの有効性を、トリ型結核菌株MAC 101またはMAC 109に感染したマウス腹膜マクロファージを用いてin vitroで評価した。マウス腹膜マクロファージ(Mo)Raw 264.7細胞を、 $10^5$ 細胞/ウェルで播種した。Mo単分子膜を1:10の比で1時間感染させて、細胞外細菌を除去した。単分子膜を遊離アミカシンおよび/またはコクリエート調製物により4日間処理して、細胞内細菌の数を測定した。アッセイを3回繰り返した。

30

【0250】

in vitroでのトリ型結核菌に対する生物活性を評価するために使用したコクリエート調製物は以下の通りである: 1. 2.0 ml/バイアルの0 M NaClアミカシン製剤(0.5mg/ml); 2. 2.0 ml/バイアルの0.066M NaClアミカシン製剤(0.5mg/ml); 3. 2.0 ml/バイアルの0.33M NaClアミカシン製剤(0.5mg/ml); 4. 2.0 ml/バイアルの0.66M NaClアミカシン製剤(0.5mg/ml); 5. 2.0 ml/バイアルの0 M NaCl プラセボ製剤(5mg PS/ml); 6. 2.0 ml/バイアルのプラセボ製剤プラスアミカシン(0.5mg/ml); および7. 2.0 ml/バイアルの水中の遊離アミカシン(0.5mg/ml)。

40

【0251】

表2~3にそれぞれの実験から得た細菌数を示す。データを図2A~2Bにグラフとして表す。未処理の対照Ma株は、Moの中で $3.8 \times 10^5$ ~ $4.9 \times 10^6$ に増殖した。遊離アミカシン(10および20 μg/ml)により処理されたMoの中のMaは、それぞれ $4.9 \times 10^4$ および $3.8 \times 10^4$ 細菌にまで死滅した。最適化されたAmkcch(10および20 μg/ml)は、10倍以上増強された有効性を示し、Mo内の細菌数を3.9および $1.7 \times 10^3$ 細菌にまで減少させた(遊離アミカシンと比較してp<0.05)。ゲンタマイシンコクリエート調製物を用いておこなった実験から同様の結果が得られた(表4)。特に、最も高いNaCl濃度において、ゲンタマイシンコクリエートを用いて得られた結果は、遊離ゲンタマイシンと比較して少なくとも1 log優れていた。

50

## 【0252】

表2：トリ型結核菌101感染マクロファージのAmkcch処理後の細菌数

## 【表2】

治療	#細菌 第4日	p 値
細胞内種菌	3.8 ± 0.4 × 10 <sup>5</sup>	
未治療の対照(4日間)	4.9 ± 0.5 × 10 <sup>6</sup>	
		10
0 NaCl アミカシン 20 μg/1	3.3 ± 0.6 × 10 <sup>5</sup>	(2)
0 NaCl アミカシン 10 μg/1	5.8 ± 0.4 × 10 <sup>5</sup>	(2)
0.066 NaCl アミカシン 20 μg/1	5.3 ± 0.3 × 10 <sup>4</sup>	(1)
0.066 NaCl アミカシン 10 μg/1	7.1 ± 0.4 × 10 <sup>4</sup>	(2)
		20
0.33 NaCl アミカシン 20 μg/1	4.1 ± 0.4 × 10 <sup>3</sup>	(1) (3)
0.33 NaCl アミカシン 10 μg/1	8.8 ± 0.3 × 10 <sup>3</sup>	(1)
		30
0.66 NaCl アミカシン 20 μg/1	1.7 ± 0.6 × 10 <sup>3</sup>	(1)
0.66 NaCl アミカシン 10 μg/1	3.9 ± 0.4 × 10 <sup>3</sup>	(1)
		40
プラセボ + アミカシン 20 μg/1	3.4 ± 0.4 × 10 <sup>4</sup>	(1)
プラセボ + アミカシン 10 μg/1	6.1 ± 0.4 × 10 <sup>4</sup>	(1)
プラセボ	1.9 ± 0.5 × 10 <sup>6</sup>	
プラセボ	2.3 ± 0.4 × 10 <sup>6</sup>	
		40
遊離アミカシン 20 μg/1	3.8 ± 0.5 × 10 <sup>4</sup>	(1)
遊離アミカシン 10 μg/1	4.9 ± 0.3 × 10 <sup>4</sup>	(1)

## 【0253】

(1) 細胞内種菌と比較してp &lt; 0.05

(2) 未処理の対照(4日)と比較してp &lt; 0.05

(3) アミカシン / コクリエートプラセボまたは遊離アミカシンと比較してp &lt; 0.05

表3：トリ型結核菌109感染マクロファージのAmkcch処理後の細菌数

【表3】

治療	#細菌 第4日	p 値	
細胞内種菌	2.4 ± 0.3 × 10 <sup>5</sup>		
未治療の対照(4日間)	3.1 ± 0.6 × 10 <sup>6</sup>		
0 NaCl アミカシン 20 μg/l	2.0 ± 0.6 × 10 <sup>5</sup>	(2)	10
0 NaCl アミカシン 10 μg/l	4.1 ± 0.4 × 10 <sup>5</sup>	(2)	
0.066 NaCl アミカシン 20 μg/l	1.6 ± 0.5 × 10 <sup>4</sup>	(1)	
0.066 NaCl アミカシン 10 μg/l	3.2 ± 0.3 × 10 <sup>4</sup>	(1)	
0.33 NaCl アミカシン 20 μg/l	5.3 ± 0.3 × 10 <sup>3</sup>	(1) (3)	
0.33 NaCl アミカシン 10 μg/l	9.3 ± 0.5 × 10 <sup>3</sup>	(1)	20
0.66 NaCl アミカシン 20 μg/l	2.6 ± 0.4 × 10 <sup>3</sup>	(1) (3)	
0.66 NaCl アミカシン 10 μg/l	9.6 ± 0.5 × 10 <sup>3</sup>	(1)	
プラセボ + アミカシン 20 μg/l	2.5 ± 0.5 × 10 <sup>4</sup>	(1)	
プラセボ + アミカシン 10 μg/l	4.4 ± 0.3 × 10 <sup>4</sup>	(1)	
プラセボ	2.5 ± 0.5 × 10 <sup>6</sup>		30
プラセボ	4.4 ± 0.3 × 10 <sup>6</sup>		
遊離アミカシン 20 μg/l	2.9 ± 0.4 × 10 <sup>4</sup>	(1)	
遊離アミカシン 10 μg/l	5.0 ± 0.3 × 10 <sup>4</sup>	(1)	

【0254】

40

(1) 細胞内種菌と比較してp &lt; 0.05

(2) 未処理の対照(4日)と比較してp &lt; 0.05

(3) アミカシン / コクリエートプラセボまたは遊離アミカシンと比較してp &lt; 0.05

表4：トリ型結核菌101感染マクロファージのGecch処理後の細菌数

【表4】

	Day 0	#細菌	第4日	p 値
細胞内種菌(時間0)	3.9 ± 0.5 × 10 <sup>5</sup>	—	—	—
未治療の対照(4日間)		6.4 ± 0.5 × 10 <sup>6</sup>	—	
0 NaCl ゲンタマイシン 30 μg/ml		6.1 ± 0.4 × 10 <sup>5</sup>	(2)	
0.066 NaCl ゲンタマイシン 30 μg/ml		8.9 ± 0.3 × 10 <sup>4</sup>	(1) (2)	10
0.33 NaCl ゲンタマイシン 30 μg/ml		5.1 ± 0.6 × 10 <sup>4</sup>	(1) (2) (3)	
0.66 NaCl ゲンタマイシン 30 μg/ml		2.2 ± 0.3 × 10 <sup>4</sup>	(1) (2) (3)	
リン酸/低カルシウムゲンタマイシン 30 μg/ml		1.2 ± 0.3 × 10 <sup>5</sup>	(1) (2)	
リン酸/高カルシウムゲンタマイシン 30 μg/ml		1.6 ± 0.4 × 10 <sup>5</sup>	(1) (2)	
プラセボ + ゲンタマイシン 30 μg/ml		2.7 ± 0.5 × 10 <sup>5</sup>	(2)	20
プラセボ		5.9 ± 0.3 × 10 <sup>6</sup>		
遊離ゲンタマイシン 30 μg/ml		1.9 ± 0.3 × 10 <sup>5</sup>	(2)	

## 【0255】

- (1) 細胞内種菌と比較してp < 0.05  
 (2) 未処理の対照(4日)と比較してp < 0.05  
 (3) ゲンタマイシン / コクリエート対照または遊離ゲンタマイシンと比較してp < 0.05

## c. コクリエート調製物の生物学的評価 : In vivo C57/BL/6マウス実験

トリ型結核菌複合体に対するアミカシンコクリエートのin vivo有効性を、C57BL/6黒色マウスを用いて評価した。12個体/群のマウスを、尾静脈注射によりトリ型結核菌101(8.1 × 10<sup>7</sup>細菌/マウス)に感染させた。7日後、6個体のマウスを回収し、脾臓中のMACの数を定量して細菌負荷のベースライン(時間0)を確立した。マウスをさまざまなアミカシン調製物(下に示す)により、1 mgアミカシン/マウス/日で2週間治療した。第3週および2日後(2週間の治療の後)に回収して、脾臓をホモジナイズして7H10寒天に塗布した。プレート上のコロニーをカウントして、データを分析した。

## 【0256】

マウス群には以下のものが含まれる:群1- 1週間感染させた対照;群2- 3週間無治療の感染した対照;群3- 高塩濃度のコクリエートAMK、経口1 mg/マウス/日;群4- 高塩濃度のコクリエートAMK、I.P. 1 mg/マウス/日;群5- 塩を含まないコクリエートAMK、経口1 mg/マウス/日;群6- 塩を含まないコクリエートAMK、I.P. 1 mg/マウス/日;群7- 遊離アミカシン、経口1 mg/マウス/日;群8- 遊離アミカシン、I.P. 1 mg/マウス/日;群9- プラセボコクリエート、経口;および群10- プラセボコクリエート、I.P.

## 【0257】

2週間の治療後のC57BL/6マウスの脾臓における細菌数を表5に示す。in vivo有効性の結果を図3に図示する。結果として、コクリエート調製物は、I.P.投与または経口投与のいずれも活性であり、脾臓における細菌負荷の数を減少させた。さらに、経口投与された高塩濃度のアミカシンコクリエート調製物は、遊離アミカシンと比較して有意に活性が高かった。また、研究に使用したアミカシンの用量は耐量よりも低かった。より高い用量を使用するとさらに高い効果が得られる可能性がある。最終的に、結果は、有効な抗トリ型結

30

40

50

核菌濃度でアミカシンを経口送達するためのコクリエート調製物の可能性を示している。

【0258】

表5：2週間の治療後のトリ型結核菌101に感染したC57BL/6マウスにおける脾臓細菌数(CFU)

【表5】

実験群	投与経路	CFU/脾臓	p 値
1週間(対照)	---	2.1 ± 0.4 × 10 <sup>6</sup>	---
3週間 (感染した対照)	---	7.8 ± 0.4 × 10 <sup>7</sup>	---
AmK コクリエート	経口	5.5 ± 0.3 × 10 <sup>7</sup>	NS
AmK コクリエート	I.P.	8.1 ± 0.4 × 10 <sup>6</sup>	(1) (2)
高 NaCl AmK コクリエート	経口	3.4 ± 0.2 × 10 <sup>7</sup>	(1) (3)
高 NaCl AmK コクリエート	I.P.	1.1 ± 0.5 × 10 <sup>7</sup>	(1)
プラセボコクリエート	経口	7.5 ± 0.5 × 10 <sup>7</sup>	NS
プラセボコクリエート	I.P.	7.8 ± 0.3 × 10 <sup>7</sup>	NS
遊離 AmK	経口	6.9 ± 0.3 × 10 <sup>7</sup>	NS
遊離 AmK	I.P.	9.3 ± 0.4 × 10 <sup>6</sup>	(1)

【0259】

(1) 2週間の対照と比較してp < 0.05

(2) コクリエート調製物のI.P./経口投与と比較してp < 0.05

(3) 同じ経路で投与された遊離アミカシンと比較してp < 0.05

30

結果として、データは、アミカシンコクリエートが、有効な抗トリ型結核菌濃度で経口投与するためのアミノグリコシドの有望な製剤であることを証明している。

【0260】

実施例2. 経口送達および投与のためのアンホテリシンB製剤

アンホテリシンB(AmB；図4)は60年に渡って使用された後でも依然として最も有効な抗真菌剤の1つであるが、市販の製剤は静脈内送達に制限され、また、この分子は高い毒性を有する。コクリエート技術を用いる開発中の先行する製品はアンホテリシンB-コクリエート(CAMB；Bioral(商標)アンホテリシンBとしても知られる)であり、これは両親媒性または疎水性薬物のコクリエート化のモデルとなっている。図5に、CAMBを作るための製造戦略の略図を示す。以下の結果は、全身性カンジダ症およびアスペルギルス症のマウスモデルにおいて、CAMBの経口投与が、同等の注射用量の先行するAmB製剤(ファンギゾン(Fungizone))と同じ有効性を有することを証明する。ファンギゾンは直径がおよそ5~10 nmであるのに対して、CAMBは直径がおよそ200~300 nmである。また、CAMBが、存在する市販のAmB製品よりも実質的に低い毒性を有することを証明する。さらに、CAMBはラットおよびイヌにおける7および28日の毒性研究において優れた安全性を示した。

40

【0261】

a. in vitroマクロファージ内のカンジダの増殖の阻害

図6に示される結果は、in vitroでのマクロファージへのカンジダ・アルビカンス感染の阻害において、CAMBがファンギゾン(DAMB)よりも効果が高いことを証明している。特に、すべての濃度のCAMB(アンホテリシンBコクリエート)は、マクロファージが存在しな

50

い場合のカンジダ培養物の増殖の阻害に対してDAMB(ファンギゾン)と同程度に有効である。しかしながら、カンジダに感染したマクロファージの存在下では、CAMBはDAMBよりも有意に有効性が高く、0.01 μg/mlまでほぼ0のCFUを示すのに対して、DAMBはこの濃度でほぼ300のCFUを示す。結果は、CAMBがファンギゾンよりも効果的にAmBをマクロファージの中に送達することを証明している。

#### 【0262】

##### b. in vivoでのアスペルギルス・フミガティス(*Aspergillus fumigatus*)感染の阻害

図7は、マウスの全身アスペルギルス感染ならびにその後の経口アンホテリシンB-コクリエート(CAMB)およびファンギゾン(DAMB)による治療の生存率の評価および組織負荷分析のための概略プロトコールを示す。簡単に述べると、CAMB製剤の最初の評価は、播種性アスペルギルス症のマウスモデルにおいておこなった。マウスをシクロホスファミドによる一時的免疫抑制により、アスペルギルス・フミガタス(*A. fumigatus*)により感染されやすくした。マウス(20~25 g)をシクロホスファミド(200 mg/kg、側部尾静脈からのiv)により処理して、3日後に、尾静脈を10<sup>5~6</sup>アスペルギルス・フミガタス胞子により感染させた。感染の直後に、0~40 mg/kg/日のCAMBの経口投与により治療を開始して10日間続けた。ファンギゾンは正の対照として用いて、4 mg/kg/日のIP投与をおこなった。これは典型的には50~80%の生存率をもたらした。未処理のマウスは8~10日間に100%の死亡率を示した。それぞれの動物から腎臓、肝臓および肺を収集して、組織ホモジネートの段階希釈およびプレーティングにより真菌負荷を評価する。死亡率データはKaplan-Meier分析の後にWilcoxon試験をおこなうことにより統計的に評価した。P<0.05のp値を統計的に有意な差であると見なした。異なる治療群間のコロニー数の比較は、複数の比較によるKruskal-Wallis試験によりおこなった。<0.05のP値を統計的に有意であると見なした。すべての統計的分析をソフトウェアパッケージGBSTAT(Dynamic Microsystems, Inc., Silver Spring, MD.)によりおこなった。

#### 【0263】

CAMBは、用量に依存してマウスの生存率を増加させることが証明された(図8)。4 mg/kgのDAMBはコホートの20%の中程度の保護のみを示したが、より高い用量のDAMBは動物に対して毒性であった。それに対して、20 mg/kgのCAMBにより治療した場合には60%のマウスが生存し、40 mg/kgのCAMBにより治療した場合には70%のマウスが生存した。

#### 【0264】

マウスの生存率に対するCAMBの効果は、標的器官の組織真菌負荷の減少を伴う。特に、10 mg/kg/日のCAMB(経口；p.o.)において、組織グラムあたりのCFUの2~3 logの減少が観察された(図9)。20 mg/kg/日よりも高い用量ではアスペルギルス感染はほぼ根絶され、これは2.0 mg/kg/日のDAMBの腹腔内投与にはほぼ匹敵する。腎臓組織負荷分析は、CAMBが、1 mg/kg/日のファンギゾン(Fungizone)(登録商標)(DAMB)よりも効力が高く、10 mg/kg/日のAmBisome(登録商標)(LAMB)と同等であったことを示した。

#### 【0265】

##### c. 動物モデルによる in vivoのCAMB薬物動態データ

AmB-コクリエートに対する治験薬(IND)研究が開始され、動物において観察された安全性、動物における有効性、保存安定性、再現性のあるGMP製造方法、および対費用効果に基づいて、第I相ヒト臨床試験が順調に開始された。

#### 【0266】

ラットおよびイヌにおいてCAMBの毎日の経口投与の後の可能性のある有毒作用、毒性の標的器官、および無毒性量(NOAEL)を決定するために28日間毒性研究を実施した。5 mg/mLのAmB濃度を用いるこれらの28日間の研究のために、CAMBおよびプラセボ(AmBを含まないコクリエートビヒクリル)の大スケールGLPパッチを調製した。CAMBは、強制経口投与による単回投与として、群あたり10個体のイヌ(雄5、雌5)に対して15、30、および45 mg/kgの用量で、ならびに48個体のラット(雄24、雌24)に対して30、45、および90 mg/kgの用量で毎日投与した。イヌにおける心血管パラメーターを、前研究および第4週において評価した。ラットにおいて、用量群あたり18個体(雄9、雌9)をTKサンプル(薬物分析のための血

10

20

30

40

50

液、尿、および便サンプル)のための衛星群として使用した。第29日または第42日、最後の投与の2週間後に動物を殺した。TK血液(第1日および第28日(イヌ)および第23日(ラット))、尿および便(第1週および第4週)、および組織サンプル(剖検時)を収集して、検証されたLC-MS法によりAmBの定量をおこなった。臨床病理学、血清化学試験、尿検査、および組織病理学分析をすべての動物に対しておこなった。

#### 【0267】

CAMBがラットおよびイヌにおいて、すべての用量で死亡例がなく、いずれの種においても組織学的対照との比較に基づいて臨床的異常が見いだされず、良好な耐容性を示すことが測定された。第1日のイヌにおける薬物動態データは以前の7日間の研究と同等であった。イヌにおける最大血漿AmB濃度( $C_{max}$ )の増加は、7日間研究において第7日に観察されたものと同様に、28日後に用量依存性ではなかった。イヌにおいて、腎臓はすべての用量において定量可能なAmB濃度を有したが、肝臓、肺、および脾臓は、3つの用量すべてで検出可能なAmB濃度を有した。ラットにおいて、定量可能なAmB濃度が肝臓、肺、および腎臓において見いだされたが、脾臓においては見いだされなかった。さらなる分析的および組織病理学的分析をイヌおよびラットにおいて実施する予定である。

10

#### 【0268】

死亡率/疾病率および臨床的観察に関して、高用量群の2個体の雌のイヌを除いて、すべての動物がその予定された剖検まで生存した。顕微鏡による評価により、2個体のイヌの死亡は試験物とは関係なく、強制投与の失敗に関係するものであったことが確認された。毒物学的に有意な臨床的变化は対照またはCAMB治療群において見いだされなかった。対照とCAMB処理群との間に体重および体重増加の意味のある差異は観察されなかった。対照と治療群の間で統計的に有意な食物摂取の変化は存在しなかった。体温の変化(処理群の雌、第28日)は正常の範囲内であった。血清化学および凝固に関して、前研究および投与後におけるすべての変化は散発的で、わずかであり、それらそれぞれの正常な基準範囲内であり、治療に関連するとは考えられなかった。重要なことは、ラットおよびイヌにおいて、クレアチニンおよび血中尿素窒素が正常の範囲内であった。尿検査に基づいて、対照とCAMB治療群の間に差異は観察されなかった。CAMBの経口投与に関連する心電図上の異常または血圧の変化は存在しなかった。研究の終了まで生存したイヌの顕微鏡的知見はいずれもビヒクリ(対照)またはCAMBの投与とは無関係であると見なされた。知見は自然に起ころる疾患または状態、または剖検作業に関連する手順に関連すると見なされた。イヌにおいて、AmBの血漿レベルは、低容量(15 mg/kg)の投与の後の複数の時点において、特に第1日において、定量の下限(LLQ)である20 ng/mL未満であった。全体として、CAMBの3つの用量すべてにおいて、第28日の血漿薬物レベルは第1日のそれよりも高かった。すべての尿濃度はLLQである20 ng/mLよりも高かった。第1日および第28日の24時間尿中排泄は、血漿とは異なって、尿における薬物蓄積の明白な傾向を示さなかった。尿におけるAmB排泄は、投与された用量の0.02~0.05%の範囲で、無視できる程度であった。

20

#### 【0269】

毒物動態学的(TK)分析に関して、すべての用量群からの平均 $t_{max}$ 値は、第1日で7.2~17.6時間、および第28日で3.6~8.4時間の範囲であった。第28日における $C_{max}$ および $AUC_{last}$ 値が第1日の対応する値と比較して増加していることにより示される通り、繰り返される投与によるAmBの蓄積が存在するようであった。第28日の平均 $C_{max}$ 値は、第1日に得られたものよりも約1.1~2.3倍高かった。同様に、第28日の平均 $AUC_{last}$ 推定値は、第1日について推定されたものよりも約1.9~7.5倍高かった。血漿 $t_{1/2}$ は、生物分析アッセイのLLQ未満であった $t_{max}$ 後の限られた数の血漿濃度のため、または終末排泄相における最良適合の良い適合( $r < 0.8$ )が存在しなかったために、数個体の動物では、特に最も低い用量および第1日において、評価することができなかった。両方の血液採取の日において、雄と雌の間でAmBの血漿毒物動態における大きい差異は存在しないようであった。

30

#### 【0270】

結果に基づいて、この研究は、28日間に渡って投与されたCAMBの1日1回経口投与が、ラットおよびイヌのすべての用量群において良い耐容性を示すことを証明している。雄およ

40

50

び雌に対するNOAELは、少なくとも、イヌに対して45 mg/kgおよびラットに対して90 mg/kgであると見なされた。イヌおよびラットの腎臓ならびにラットの肝臓および肺において定量可能な濃度のAmBが測定された。15、30、または45 mg/kg/日での雄および雌のビーグル犬ならびに30、45、または90 mg/kg/日での雄および雌のラットへのCAMBの毎日の経口投与は、明白な有害作用をもたらさなかった。連続した28日間の毎日のCAMB経口投与で、NOAELは、少なくとも、イヌにおいて45 mg/kg/日であり、ラットにおいて90 mg/kg/日である。試験物に関する作用は、以下のパラメーター：臨床観察、体重、食物摂取、体温、臨床病理学（血液学、血清化学および凝固）、尿検査、眼科学、心臓学、器官の重さ、肉眼および顕微鏡による評価において見られなかった。毒物動態学的分析により、 $C_{max}$ および $AUC_{last}$ の増加により示される通り、繰り返して投与した後の第28日に3つの用量群のすべてにおいて、AmBの蓄積が示された。薬物の尿中排泄は、投与された実際の用量と比較すると無視できる程度であった。研究された用量レベルにおいて、雄と雌のイヌの間で薬物の配置に大きな差は存在しなかった。最後に、組織AmB分析により、イヌの腎臓において定量可能な濃度が示されたが、肝臓、肺、および脾臓においては検出可能なレベルのみであった。ラットにおいて、肝臓、肺、および腎臓が定量可能なAmB濃度を示したが、脾臓においては示されなかった。

#### 【0271】

##### d. ヒト被験体のin vivoでのCAMB薬物動態データ

各コホート（12 CAMB、4プラセボ（薬物を含まないコクリエートビヒクル））に16人のヒト被験体を採用した。CAMBまたは同じ体積のBioralプラセボ（アンホテリシンBを含まない送達媒体）を二重盲検方式で、一晩絶食した後に経口投与した。それぞれの被験体に1回投与をおこなった。安全性および薬物動態学的評価を投与後2週間に渡って実施した。被験体を、200、400、および800 mgの段階的に増加する用量を与えられる3コホートに採用した。これは、健康な志願者による、アンホテリシンBの安全性、耐容性、およびPKプロファイルを決定し、他のアンホテリシン製剤との相互研究比較による相対的バイオアベイラビリティを評価するために設計された、1回投与、二重盲検、用量漸増、薬物動態学的（PK）研究であった。合計で48人の被験体が、治療コホートあたり16人の3コホートで、この研究に参加することが計画された。それぞれの治療コホート内で、12人の被験体が活性薬物を投与され、4人がプラセボを投与された。被験体は第0日に病院に入院し、活性治療（コホートにより200、400、または800 mgのCAMB）またはプラセボにランダム化された。PK分析のための血液サンプルを投与前（0時間）、および第0日の投与後（1、2、4、8、および12時間）および第1日（24時間）に収集した。すべての計画された手順が終了した時に被験体は病院を退院した。さらなる血液サンプルを、通院により第2、3、4、8、9、および14日（48、72、96、192、216、および336時間）に収集した。有害作用（AE）のモニター、同時におこなわれる投薬、健康診断および病歴、ならびに臨床検査室およびバイタルサイン測定により安全性を評価した。

#### 【0272】

例えば、図10は、イヌおよびヒトへの投与から得たCAMBの薬物動態データの結果を示す。結果は、ラットおよびイヌにおけるCAMBの血漿レベルが、治療的CAMB組織レベルと関連することを証明している。特に、CAMBは、200および400 mgの単回経口投与で良い耐容性を示した。アンホテリシンの血漿濃度がこの経口投与剤形から得られ、以前の動物における毒性学研究の結果と同等である。図10、ならびに表6は、さらに、イヌとヒトとのCAMB血漿レベルが非常に類似していることを証明している。有害事象はコホート全体の16人の被験体に報告された。胃腸管有害事象が200、400および800 mgの用量においてそれぞれ6%、38%および56%の被験体に見られ、200および400 mgの用量ではすべて軽度であった。最も良く見られるAEは吐き気であり、200 mgを投与された被験体の6%および400 mgを投与された被験体の19%に見られ、これらの用量レベルにおけるすべての事例において軽度であった。1人の被験体が妊娠して選択的中絶をおこなった。血液または尿の臨床試験において異常は存在しなかった。アンホテリシンの薬物動態学的評価をおこなった。その結果、重大な有害事象および有害事象による中止は存在しなかった。腎機能に関するものを含む

10

20

30

40

50

、臨床検査または他の安全性試験における異常は観察されなかった。

【0273】

表6：CAMB単回投与の薬物動態学的分析

【表6】

イヌとヒトとの比較

種	用量	HED (ヒト同等用量)	C <sub>max</sub> ng/ml	T <sub>max</sub> 時間	AUC <sub>0-24</sub> ng·hr/ml
ヒト	~3 mg/kg - 4 mg/kg		平均 70.3	8 - 12	1231
イヌ*	15 mg/kg	8.1 mg/kg	48.5	12	833
イヌ*	30 mg/kg	16.2 mg/kg	67.2	12	1400
イヌ*	45 mg/kg	24.3 mg/kg	80.2	6	1653

【0274】

\* イヌのデータは2008年の28日間GLP研究の第1日より

AmB-コクリエートの商業的に実行可能な、対費用効果の高い製造方法が開発され、スケールアップしたAmB-コクリエートの100リットルGMPバッチが製造された。

【0275】

実施例3：経口送達および投与のための予定されるアミカシン-コクリエート製剤

薬品安全性試験実施基準(GLP)スケールアップ法をアミカシン-コクリエート製剤のために開発することができる。これは1 L、5 L、および20 L、またはより大きいバッチを調製することによりAmB-コクリエートと同様にして調製することができる。調製したすべてのバッチについてAmkcchの物理的および化学的特性を測定する。これらの測定には、アミカシンのコクリエート化効率、脂質：薬物比、および粒径が含まれる。ロット間の製品の再現性も測定する。

【0276】

a. HPLCによるアミカシン濃度の測定

液体および組織中の、アミカシンを含むアミノグリコシドの定量のための多くの方法が開発され、報告されている(PaPP, E, Knupp, C., and Barbhaiya, R.H., J. Chromatography, 574: 93 -99, 1992; Soltes, L. Biomedical Chromatography 13: 3-10, 1999)。定量的アミカシンHPLCアッセイを設計することができる。

【0277】

b. マイクロタイター-プレートに基づくアッセイによるアミカシン活性の測定

また、アミカシン活性は、例えば大腸菌(E. Coli)を用いるマイクロタイター-プレートに基づくアッセイを用いて測定することができる。例えば、大腸菌参考株ATCC 25922(American Type Culture Collection)の増殖に対する異なる濃度のアミカシンの影響を、Jose A. Rufian-Henares, Francisco J. Morales (Food Chemistry, 111: 1069-1074, 2008)により記載されたマイクロタイタープレート法により測定した。大腸菌の一晩懸濁液は、250 rpmの速度の振盪器に入れたLBプロス中、37 °Cで24時間成長させたものである(New Brunswick Scientific mode: INNOVA 40R)。細菌増殖培地であるLBプロスはLife Technologiesにより供給された。低蒸発蓋無菌プレートを有する平底の透明なポリスチレン製96ウェル細胞培養クラスターはFisher distributorにより供給された。

【0278】

大腸菌株の種菌の初期濃度を確定するために予備実験をおこなった。一晩培養物からLBプロスの2倍段階希釈を作った。次に、250 μlの細菌細胞懸濁液および250 μlのLBプロスを滅菌した96マイクロプレートに加えた(プランク用LBプロス)。次に、96マイクロプレートをMolecular Devicesチャンバーに入れ、600nmでエンドポイント法によりODを読み取って光学濃度を得た。ODから適切な大腸菌密度の濃度が得られた後、細菌の培養物を新しいLBプロスにより適切な希釈係数に希釈した。大腸菌の通例の成長特性に基づいて、600n

10

20

30

40

50

mの波長でのMolecular Devices SPECRAmax 340マイクロプレートリーダーを用いる成長実験の間、細菌株を採用された光学濃度(OD)の値に希釈した。

【0279】

静菌活性の正の対照として、遊離アミカシンのLBプロスによる2倍段階希釈を用いた。プラセボおよびアミカシンコクリエートの一定量の適切な懸濁液を15mlの滅菌された管に入れた後、サンプルを2800 rpmおよび4 (SORVALL RT 6000B) でおよそ30分間遠心分離した。上清を収集して滅菌された管に入れ、後のマイクロタイター活性アッセイのために4で保存した。プラセボおよびアミカシンコクリエートペレットを2mMの塩化カルシウム溶液により再懸濁した後、サンプルを上と同じ条件で再度遠心分離した。上清を除去し、10プラセボおよびアミカシンのペレットを2 mMの塩化カルシウム溶液に再懸濁した後、上と同じ条件で再度遠心分離した。プラセボおよびアミカシンコクリエートペレットを2mMの塩化カルシウム溶液に再懸濁して、元の体積にした。

【0280】

マイクロタイタープレート活性アッセイは非常に高感度である。標準曲線の範囲でのアッセイを可能にするために、上記のすべてのサンプルの2倍希釈が必要となるであろう。LBプロス中のアミカシンの標準対照曲線を、濃度を1~40  $\mu$ g/mlに増加させることにより製造した。2mM塩化カルシウム溶液の対照ブランクも製造した。次に、50  $\mu$ lのサンプル、LBプロス溶液、2mM塩化カルシウム溶液および標準サンプルを96マイクロプレートに注意深く分配し、200  $\mu$ lの細菌細胞懸濁液を96マイクロプレートに入れ、250  $\mu$ lのLBプロス溶液(ブランク)、250  $\mu$ l細菌細胞懸濁液(正の対照)を96マイクロプレートに入れた。時間200の読み取りを得るために、マイクロプレートをカバーをせずにプレートリーダーチャンバーの中に置いた後、波長600nmでエンドポイント法により最初の読み取りを開始した。37でのMolecular Device Micro-plates reader(SPECTRA max 340)による微生物成長速度記録アッセイに切り替えた。均質な懸濁液を達成するために、96ウェルマイクロプレートを、最初の読み取りの前に10秒間、それぞれの読み取りの間に10秒間、マイクロプレートリーダーにより攪拌した。5分間隔および19秒の最小間隔で、合計37回の読み取りをおこなった。3時間、5時間、および22時間の時点でも、サンプルを波長600nmでエンドポイント法により読み取った。標準曲線は、softmax Pro 3.1.2ソフトウェアにより計算した。それぞれの実験を3回繰り返した。

【0281】

c. リン脂質のリンの測定

Bartlettアッセイ(Bartlett, G.R., and (1959) J. Bio. Chem. 224, 466)の修正法によりリン脂質サンプルにおけるリン酸濃度を測定する。このアッセイは、リン脂質が製剤中で唯一のリン酸を含む化合物である場合に、コクリエート製剤中のリン脂質濃度を測定するために好適である。薬物を含有するリン脂質コクリエート製剤または薬物を含まない対照のリン脂質コクリエート製剤における総リン脂質濃度を測定する。製剤の薬物濃度を製剤のリン脂質濃度で割って、製剤の薬物対リン脂質の比を決定する。

【0282】

この方法はコクリエート製剤中のリン脂質濃度を測定するために使用される。この方法は、無機リン酸濃度を測定するBartlettリン酸アッセイ(Bartlett, G.R., (1959) J. Bio. Chem. 224, 466)の修正法である。この方法は、ホスファチジルセリン、ホスファチジルコリン、ホスファチジン酸、およびホスファチジルエタノールアミンなどの任意のリン酸含有脂質の濃度を測定するために使用することができる。通常のリン脂質はリン脂質あたり1個のリン酸基を有する。アッセイは異なるリン脂質を区別しない。アッセイは、さまざまなリン脂質に起因する合計リン酸モル濃度を測定する。方法がリン酸濃度を検出するので、製剤中の何らかの他のリン酸源、例えば薬物、リン酸を含有する緩衝液、または他の賦形剤がアッセイに干渉する。この方法による正確なリン脂質測定には、製剤中の他のリン酸源を除去するか、計算に入れることが要求される。まず、サンプルをドラフト内で硫酸の存在下、200 で1時間加熱して脂質を分解する。次に、過酸化水素を加えて、すべての炭化した物質を脱色する。次に、サンプルをアスコルビン酸 / モリブデン酸アンモニ

10

20

30

30

40

50

## ウム溶液

と45 で20分間反応させる。これらの条件下で、リン酸はモリブデン酸と反応して青色のモリブデン化合物を形成する。アッセイの標準曲線を作成するために1.00 mMリン酸ナトリウム溶液を使用する。分光光度計を用いて820 nmで標準およびサンプルのO.D.を測定することによりリン酸濃度を測定する。サンプルのリン酸濃度は、それぞれのサンプル製剤についてN=3で測定される。平均mMリン酸濃度および標準偏差を計算する。このアッセイに使用するすべての水が十分に脱イオン化されていることおよびガラス製品が洗剤または他の供給源からの外来性のリン酸により汚染されていないことを確認するために注意を払わなければならない。さらに、多くの他のBartlettを基礎としたリン酸アッセイとは異なり、この方法は過塩素酸加熱工程を使用しない。過塩素酸蒸気は爆発性の塩を付着させる。サンプルを硫酸と共に加熱することが全く同じ作用をして、はるかに安全である。

10

## 【0283】

### d. コクリエート製品の粒径の測定

回折に基づく光散乱によりコクリエート製剤の粒子径体積重量分布を測定する。最終的な結果は、分布のプロット、それぞれの微分ピークの最大粒子径(  $\mu\text{m}$  )、総体積の50%未満の粒子径(  $\mu\text{m}$  )、1  $\mu\text{m}$  未満の粒子径を有する体積のパーセンテージ、および総体積の99%未満の粒子径(  $\mu\text{m}$  )を含む。

## 【0284】

回折に基づく光散乱測定は、0.04  $\mu\text{m}$  ~ 2000  $\mu\text{m}$  の範囲の粒径分布を測定することができる。この技術は1  $\mu\text{m}$  よりも大きい粒径分布を測定するのに特に適している。1  $\mu\text{m}$  よりも小さい粒径は、光子相関分光法(PCS)により、より正確に測定される。アンホテリシンBホスファチジルセリンコクリエートおよびホスファチジルセリンコクリエートの粒径分布は、「小体積モジュールプラス」サンプルアタッチメントを付けたCoulter LS230粒径を用いて、回折に基づく光散乱により測定される。偏光散乱強度差計測(Polarization Intensity Differential Scattering)(PIDS)データも含まれる。装置は測定の前に2時間暖機運転される。サンプルチャンバーを2倍の体積の蒸留水および1倍の体積の2 mM  $\text{CaCl}_2$  により洗浄する。次に、サンプルチャンバーに2 mM  $\text{CaCl}_2$  を満たす。ポンプ脱泡プログラムを作動させて2 mM  $\text{CaCl}_2$  を脱ガスする。ポンプを速度(%)50で作動させる。ホスファチジルセリンコクリエート懸濁液を、PIDSオプスキュレーションのパーセンテージが45 ~ 55%の間になるまで加える。3回の連続する180秒のブロックでデータを収集および保存し、フラウンホーファー光学モデルを用いて加工する。結果を、差分体積(differential volume)(%)対log粒子径および<累積体積(%)対log粒子径を用いる対数正規分布としてプロットする。粒子径分布の統計を演算統計により計算する。粒子径分布を解析するために使用する値には、体積分布モード、メジアン、算術平均および算術S.D( 標準偏差 )が含まれる。分布の形は、C.V. ( 変動係数 ) 値および算術歪度値により定義される。分布は1  $\mu\text{m}$  未満の直径を有する体積のパーセンテージおよび体積の10、50、および99%未満に相当する直径によつても特徴付けられる。

20

## 【0285】

### e. コクリエート製品の安定性の測定

スケールアップ法の間に調製されたアミカシン-コクリエート製品を、懸濁液および乾燥粉末(凍結乾燥後)として4 、 25 および40 で保存する。アミカシン含有量(HPLC)および活性(大腸菌マイクロタイタープレートアッセイ)を6か月間に渡って毎月測定する。

30

## 【0286】

### f. コクリエート製品の経口有効性の測定

アミカシン-コクリエート製品の経口有効性の研究は、トリ型結核菌感染マウスモデルを用いて測定する。これらの研究は、用量範囲および最大耐量の研究を含む。第2の薬物を併用した場合のアミカシン-コクリエート製品の経口有効性の研究は、トリ型結核菌感染マウスモデルを用いて測定する。これらの研究は、用量範囲および最大耐量の研究を含む。経口アミカシン-コクリエートを遊離アミカシンIPと比較する。感染していないおよ

40

50

び感染した動物の両方を研究する。経口アミカシン-コクリエートを遊離アミカシンIPと比較する。感染していないおよび感染した動物の両方を研究する。クレアチニンおよび血液尿素窒素(腎毒性)について血清を測定し、腎臓(腎毒性)および内耳(聴器毒性)を入手して組織病理学的試験をおこなう。

【0287】

最適用量を評価する。AKの有効な非経口用量は、マウスの体重で50～100 mg/Kg/日の範囲である。コクリエート調製物として経口投与される10、25、50および100 mg/Kg/日の効果を評価する。治療は4週間に渡っておこなわれ、その後マウスを殺して脾臓および肝臓において細菌負荷を測定する。器官を入手して、ホモジナイズし、段階希釈して、CFUのためにオレイン酸、アルブミン、デキストロースおよびカタラーゼ(OADC)を加えたMiddle 10 brook 7H11寒天プレート上に塗布する。C57/BL6黒色マウスを、 $10^7$ のトリ型結核菌株101(マウスにおいて毒性を有する株)を含有する0.1 mlの懸濁液により静脈内(尾静脈)に感染させる(Bermudez LE, et al., AAC 45: 2210, 2001)。感染の1週間後に8個体のマウスの群を殺して、感染種菌を確立するために、肝臓および脾臓において細菌コロニー形成単位(CFU)を測定する。残りのマウス(12マウス/実験群)に以下の群の治療をおこなう:a. 感染、無治療;b. 感染、10 mg/Kg/日、経口;c. 感染、25 mg/Kg/日、経口;d. 感染、50 mg/kg/日、経口;e. 感染、100 mg/Kg/日、経口;f. 感染、遊離アミカシン、100 mg/Kg/日、経口;g. 感染、薬剤を含まないコクリエート;およびh. 感染、遊離アミカシン、100 mg/Kg/日、腹腔内、Gold-Standard;合計104個体のマウス。

【0288】

マウスを4週間治療した後、殺す。肝臓および脾臓において細菌負荷を測定して4週間と治療開始前の0週間のCFU/器官を比較する。マウスを治療に伴う副作用に関してモニターする。データを比較に基づいて解釈する。4週間治療した後の実験群の間の器官負荷を比較する場合、無治療の対照と比較したCFU/器官の減少は、投薬が静菌効果を有することを意味する。時間0のCFU/器官と比較したCFU/器官の減少は殺菌活性を意味する。結果および比較は、スチューデントT検定(Student's T test)およびANOVAを用いて解析される。群あたり12個体のマウスは、実験に0.90の力を与える。

【0289】

g. トリ型結核菌感染の肺モデルにおけるAmkcchの有効性の測定

トリ型結核菌は2つの異なる経路を用いて宿主に感染する。一方は胃腸経路であり、そこから細菌は播種するか、または/およびリンパ節感染を引き起こす可能性がある。他方は呼吸器系路であり、それにより細菌は慢性の肺病態(気管支拡張、肺気腫、囊胞性線維症)を有する個体に感染を引き起こす。後者の感染経路は潜在的肺疾患を有する個体においてよく見られるので、また肺感染は生物膜の形成を伴うので(Carter G, et al, AAC 48:4907, 2004; Yamazaki Y, et al Cell Microbiol, 8: 808. 2006)、トリ型結核菌肺疾患の動物モデルにおけるコクリエートAK調製物の試験は重要である。

【0290】

実験は以前に報告された通りに実施する(Yamazaki et al, Cell Microbiol 8: 808, 2006; Bermudez LE et al. J Infect Dis 2007)。簡単に述べると、 $10^8$ のトリ型結核菌細菌の0.1 mlの懸濁液をC57BL/6マウスの鼻孔に送達して、2週間に渡り感染を確立させる。8個体のマウスの群を殺して、肺における最初の種菌を測定する。次に、以下の実験群による治療を開始する:a. 感染、無治療;b. 感染、遊離アミカシン、100 mg/kg/日、腹腔内。Gold Standard;c. 感染、コクリエートAK、100 mg/Kg/日(または上記の実験において決定される他の有効用量);およびd. 感染、薬物を含まないコクリエート;合計56個体のマウス。

【0291】

マウスを4週間治療した後、殺す。肺入手して、ホモジナイズし、段階希釈してOADCを有するMiddlebrook 7H11寒天プレートに塗布して細菌負荷を測定する。細菌の増殖は10～15日の間に起こる。肝臓および脾臓において細菌負荷を測定して4週間と治療開始前の0週間のCFU/器官を比較する。マウスを毒性の証拠および副作用に関して毎日モニターする

10

20

30

40

50

。データを比較に基づいて解釈する。4週間治療した後の実験群の間の器官負荷を比較する場合、無治療の対照と比較したCFU/器官の減少は、投薬が静菌効果を有することを意味する。時間0のCFU/器官と比較したCFU/器官の減少は殺菌活性を意味する。結果および比較は、スチューデントT検定およびANOVAを用いて解析される。群あたり12個体のマウスは、実験に0.90の力を与える。

【0292】

h. Amkcchに対する耐性の測定

C57BL/6マウスに、以下の群の通りにトリ型結核菌株101を静脈内感染させる：a. 感染、無治療；b. 感染、コクリエートAK、合計数 =  $70 \times 2$ 群 + 8または148個体のマウス。感染の第7日までに、8個体のマウスを採取して、感染負荷のベースライン、およびアミカシンに対する耐性の頻度を確立する。次に、マウスをコクリエートAKの経口投与により12週間治療する。対照動物は治療を受けない。トリ型結核菌のアミカシンに対する耐性の頻度を第0、2、4、6、8、10および12週に測定する。脾臓を採取し、アミカシンを含む7H11寒天およびアミカシンを含まない7H11寒天の両方にホモジネートを塗布する。

10

【0293】

マウス(10マウス/時点)を数週間治療した後、殺す。脾臓において細菌負荷を測定する。研究設計(Study Design)に説明される通りに耐性の頻度を測定する。アミカシンプレートで増殖するコロニーを先に報告された通りにアミカシンのMICに関して試験する(Bermudez et al. J Infect Dis 174: 1218, 1996)。データを、アミカシンを含む培地およびアミカシンを含まない培地に塗布した器官の間の比較により解釈する。アミカシンのカットオフ濃度を含有する培地でのコロニーの出現は耐性コロニーの存在を意味する。耐性CFUの数を、治療前の脾臓から得られた細菌における耐性CFUの数ならびに同じ時点の脾臓から得られた細菌と比較する。遊離アミカシンの耐性の頻度は $10^{-11}$ である。結果および比較はANOVAを用いて解析する。時点あたり10個体のマウスを使用する。実験はコクリエートAKの経口調製物の耐性の頻度を測定する。それは遊離アミカシンの耐性の頻度と同じである可能性が非常に高いが、腸による吸収が血清濃度に影響を与える可能性があるので、耐性の頻度を試験することは重要である。

20

【0294】

i. クラリスロマイシン(clarithromycin)およびエタンブトール(ethambutol)との併用におけるAmkcchの評価

30

播種性または肺の両方のトリ型結核菌の治療は、クラリスロマイシン(またはアジスロマイシン(azithromycin) )およびエタンブトールのような少数の薬物の活性に頼っている。マクロライドは有効な経口レジメンにとって極めて重要であるが(Chaisson R, et al. Ann Intern Med 121: 905, 1994)、エタンブトールの添加が相乗効果をもたらし、クラリスロマイシンに対する耐性の出現を減少させる(Bermudez LE, et al. J Infect. Dis 174: 1218, 1996)。

【0295】

コクリエートAKを、クラリスロマイシン、エタンブトールまたはその両方と組み合わせて投与する。C57BL/6マウスを以下の群の通りに静脈内感染させる：a. 感染、無治療；b. 感染、薬物を含まないコクリエート；c. 感染、クラリスロマイシン、100 mg/Kg/日；d. 感染、エタンブトール、100 mg/Kg/日；e. 感染、コクリエートAK、用量を決定する；f. 感染、クラリスロマイシン + エタンブトール；g. 感染、クラリスロマイシン + コクリエートAK；h. 感染、エタンブトール + コクリエートAK；およびi. 感染、クラリスロマイシン + エタンブトール + コクリエートAK；合計で116個体のマウス。

40

【0296】

7日後、8個体のマウスを採取して、肝臓および脾臓における感染負荷のベースラインを確立する。治療を開始し、4週間投与する。その後、マウスを殺して、Middlebrook 7H11寒天上に塗布することにより、脾臓、肝臓および肺における細菌負荷を定量する。実験群あたり12個体のマウスを使用する。肝臓および脾臓において細菌負荷を測定して、4週および治療の開始前の0週のCFU/器官を比較する。マウスを副作用および毒性に関して毎日

50

モニターする。データを比較に基づいて解釈する。4週間治療した後の実験群の間の器官負荷を比較する場合、無治療の対照と比較したCFU/器官の減少は、投薬が静菌効果を有することを意味する。時間0のCFU/器官と比較したCFU/器官の減少は殺菌活性を意味する。結果および比較は、スチューデントT検定およびANOVAを用いて解析される。群あたり12個体のマウスは、実験に0.90の力を与える。実験は、コクリエートAKの経口調製物が、トリ型結核菌感染を治療するために通常使用される化合物のいずれかと相乗作用および/または相加作用を有するかを決定する。

## 【0297】

j. クラリスロマイシン耐性株に対するAmkcchの活性の測定

トリ型結核菌のクラリスロマイシンまたはアジスロマイシン耐性株は、病態の治療における主要な問題である。マクロライドは非常に効力が高く、治療の重要な構成要素である。マクロライド耐性株により引き起こされる疾患は治療における課題である。クラリスロマイシン耐性(MAC184株、A<sub>2275</sub> ~ C<sub>2275</sub>における突然変異を有する、MIC 64 mcg/ml)および8 mcg/mlのエタンブトールに対するMIC (MAC101などの感受性のトリ型結核菌株の4 mcg/mlのMICと比較して)を有する臨床的分離株を用いて、以下の群の通りにC57BL/6黒色マウスを静脈内感染させる：a. 感染、無治療；b. 感染、クラリスロマイシン、100 mg/Kg/日；c. 感染、エタンブトール、100 mg/Kg/日；d. 感染、コクリエートAK、用量を決定する；e. 感染、エタンブトール+コクリエートAK；f. 感染、エタンブトール+遊離アミカシン(IM)；およびg. 感染、薬剤を用いないコクリエート；合計92個体のマウス。

## 【0298】

7日後、治療の前に、8個体のマウスを採取して、脾臓、肝臓および肺における細菌負荷を測定する。次に、治療を開始する。マウス(12個体/実験群)を4週間治療した後、殺す。肝臓、脾臓および肺において細菌負荷を測定して、4週および治療の開始前の0週のCFU/器官を比較する。マウスを副作用および毒性に関して毎日モニターする。データを比較に基づいて解釈する。4週間治療した後の実験群の間の器官負荷を比較した時に、無治療の対照と比較したCFU/器官の減少は、投薬が静菌効果を有することを意味する。時間0のCFU/器官と比較したCFU/器官の減少は殺菌活性を意味する。結果および比較は、スチューデントT検定およびANOVAを用いて解析される。群あたり12個体のマウスは、実験に0.90の力を与える。

## 【0299】

実験は、コクリエートAKの経口調製物が、クラリスロマイシン(およびアジスロマイシン)耐性トリ型結核菌に対して活性であるかどうかを決定する。この結果は、コクリエートAKがクラリスロマイシン耐性株に対して活性を有するかどうか、およびコクリエート調製物の活性が同じ用量の遊離アミカシンと同等であるかどうかを決定するので、重要である。

## 【0300】

k. コクリエートAK調製物の毒性ならびに組織および血清濃度の評価

感染した(全身性)および感染していないマウスに、以下の群の通りに遊離アミカシンおよび100 mg/Kg/日の経口コクリエートによる治療をおこなう：a. 未感染、腹腔内遊離アミカシン、4週間；b. 未感染、経口コクリエートAK、4週間；c. 感染、腹腔内遊離アミカシン、4週間；d. 感染、経口コクリエートAK、4週間；および毒性研究のための感染、無治療マウス；合計50個体のマウス。

## 【0301】

アミカシンの分布および毒性を組織病理学により評価し、血清および組織レベルをHPLCにより測定する。それぞれの実験群は10個体のマウスを有する。薬物レベルを測定するために、血清、肺および脾臓を入手する。毒性の評価のために、腎臓および内耳を入手して組織病理学的試験をおこなう。

## 【0302】

l. 非結核性抗酸菌(NTM)の治療に対するAmkcchの評価

非結核性抗酸菌(NTM)は、土壤ならびに環境水および飲用水中によく見られる生物体で

10

20

30

40

50

あり、選択された患者群における肺疾患と関連している。治療は、特に重い疾患有する患者または以前の治療の試みに失敗した患者において、低い耐容性および低い有効性を有する可能性がある長期の多剤レジメンを必要とする。現在の治療の推奨を支持する臨床試験は非常に少なく、何年もの間この疾患のための新規の薬物の評価はおこなわれなかった。アミカシンはさまざまなNTMに対して有効な確立された薬物である。しかしながら、その使用は、静脈内投与する必要ならびに聴覚、バランス、および腎機能への毒性により制限されている。ナノコクリエートアミカシンは、経口バイオアベイラビリティおよび低下した毒性の可能性の両方を提供する新規の製剤である。前臨床研究は、トリ型結核菌複合体に対して、既製のアミカシンと比較して大きい有効性を示唆している。

【0303】

10

トリ型結核菌複合体(MAC)またはマイコバクテリウム・アブセサス(*Mycobacterium abscessus*)に起因する肺感染を有し、標準的な指針に基づく治療レジメンに反応しなかった34人(30人の評価 + 12%脱落)の成人の患者において、ナノコクリエートアミカシンの安全性および有効性を評価するための研究を実施することができる。持続的な正の培養を有する、少なくとも3か月間安定したマイコバクテリア薬物レジメンを受けてきた参加者にスクリーニング評価をおこなう。次に、彼らを囊胞性線維症があるかないかに基づいて階層化し、84日の経口ナノコクリエートアミカシンまたは84日の経口プラセボのいずれかを投与されるように2:1の比でランダム化する。次に、84日間の非盲検期間において、すべての患者がナノコクリエートアミカシンの投与を毎日受ける。参加者は、さらに、彼らが研究の開始前に受けていたものと同じ抗マイコバクテリア薬治療を続ける。スクリーニング訪問は研究の第1日の前14日以内におこなう。すべての被験体を研究薬の最後の投与の後28日間追跡する。研究期間中におこなわれるベースラインおよび28日の追跡訪問は、ナノコクリエートアミカシンの定性的および定量的安全性および耐容性を決定するために、臨床検査パラメーター、聴能学試験、臨床的有害事象、および肺機能を評価する。喀痰を収集してマイコバクテリアの塗沫標本および培養状態における変化を測定する。胸部のコンピューター断層撮影をベースラインおよび投与の第84日および第168日におこなう。訪問の度に、6分間の距離歩行、酸素飽和度、および肺活量を測定して、肺症状重篤度スコア(Pulmonary Symptom Severity Score)を用いて症状を評価し、セントジョージ呼吸器質問票(St. George's Respiratory Questionnaire)(SGRQ)を用いて肺の生活の質を評価する。痰、血液、および尿の試料を収集して薬物濃度を評価する。研究の主目標は、1)ナノコクリエートアミカシンとプラセボと比較した84日間の投与の安全性および耐容性の評価；2)不応性NTM肺疾患に対するナノコクリエートアミカシンとプラセボとの84日間の有効性の評価である。副次的目標は、1)ナノコクリエートアミカシンの84日投与と168日投与とを比較した安全性および有効性の評価；2)ナノコクリエートアミカシンの薬物動態(PK)の評価；および3)ナノコクリエートアミカシンの長期間安全性(168日)の評価である。この研究の主要な結果は、1)毎日投与による84日間の治療に関連する有害事象の頻度；特にこれは次の発生を含む：a. 研究投薬の永続的な中止につながる有害事象；b. 聴覚前庭(Audiovestibular)の有害事象；c. 腎臓の有害事象；d. 84日間の薬物投与研究を通しての重大な有害事象；ならびに2)プラセボと比較して第84日に痰マイコバクテリア培養の増殖の減少を達成するナノコクリエートアミカシンを投与された患者の割合である。副次的結果には、1) プラセボと比較してナノコクリエートアミカシンにおける第84日に痰マイコバクテリア塗沫標本に見られる生物体の減少を達成するナノコクリエートアミカシンを投与された患者の割合；2)84日のプラセボと比較して、ナノコクリエートアミカシンの84日および168日に培養が負に変換する割合；3)痰におけるマイコバクテリア培養物の増殖の減少までの時間；4)抗マイコバクテリア薬の「救出」に必要な時間；5)気管支拡張症の急性細菌性増悪の治療までの時間および治療期間；6)84日および168日のコンピューター断層撮影スキャンの異常における変化；7)84日および168日のセントジョージ呼吸器質問票を用いる生活の質における変化；8)84日および168日の肺症状重篤度スコアにおける変化；9)84日および168日の6分間の距離歩行および酸素飽和度における変化が含まれる。

【0304】

20

30

40

50

m. 生体防御に対する経口アミノグリコシドクリエート製剤の評価

野兎病およびブルセラ病は、それぞれ野兎病菌(*Francisella tularensis*)およびブルセラ菌(*Brucella abortus*)の感染により引き起こされる重大なヒトの病気である。このような微生物による感染は、それらの先天性免疫反応を回避する能力および食細胞の中で複製する能力のために治療が困難である。アミカシンおよびゲンタマイシンなどのアミノグリコシドはこれらの微生物の増殖を *in vitro* で効果的に阻害するが、変更できないIV送達経路、かなりの毒性、および治療的細胞内濃度を達成する能力が限定的であるために、治療上の使用が限定されてきた。アミノグリコシド-クリエート製剤は、アミノグリコシドに経口バイオアベイラビリティ、低毒性および治療指數の増加を付与し得る。これは、野兎病菌およびブルセラ菌、ならびに潜在的なさらなる細胞内細菌感染の治療におけるアミノグリコシドの有用性を実質的に向上させる可能性がある。

【0305】

アミカシンクリエートおよびゲンタマイシンクリエートの第1世代の製剤は既に製造されている。例えば、ダイズ由来のホスファチジルセリン(SPS)リポソームの水中の懸濁液(10 mg脂質/ml)は、乾燥した粉末SPSを水に加えて15分間混合することにより形成される。次に、リポソーム懸濁液を5 fmフィルターにより濾過して、すべての不溶性物質を除去し、より均一なリポソームの集団を製造する。アミノグリコシドの水溶液を調製する(通常、所望の最終濃度の約10倍)。10分の1の体積のアミノグリコシド溶液をリポソームの懸濁液に滴下して加える。脂質：薬物の最終的な比は5:1～20:1の間で変化する。アミノグリコシド-リポソーム懸濁液を10分間混合させる。クリエートを形成するために、CaCl<sub>2</sub>の0.1 M溶液をアミノグリコシド-リポソーム懸濁液に混合しながら滴下して加える。最終懸濁液を10～15分間混合する。最終製剤は、微細な、白色の微粒子懸濁液の外観を有する。1,000×の光学顕微鏡において可視化すると、製剤は小さいクリエートの凝集物から構成される。クリエートの中への薬物ローディングの効率を、クリエートをペレット化してペレットおよび上清中のアミノグリコシドの量をニンヒドリンに基づく比色アッセイを用いて定量することにより測定する。

【0306】

広く使用される細胞系であるマウス腹膜マクロファージ細胞系(Raw 246.7)、およびヒトマクロファージ細胞系のTHP-1を実験に使用することができる。細胞を、それぞれ、5%熱不活性化ウシ胎仔血清を補足した、DMEMおよびRPMI-1640中で培養する。24ウェル組織培養プレートに10<sup>5</sup>のマクロファージを加えることにより、マクロファージ単分子膜を確立する。THP-1マクロファージによる単分子膜は、成熟およびプラスチックへの付着を誘導するためにホルボールエステルにより処理する必要がある。24時間後、単分子膜を10<sup>5</sup>の野兎病菌またはブルセラ菌のいずれかにより感染させる。1時間に渡って感染を起させた後、洗浄により細胞外細菌を除去する。いくつかのウェル内容物を溶解させ、Middle brook 7H10寒天プレート上に塗布して、細菌の細胞内種菌を測定する。残りのウェルに、5日間に渡って毎日次の処理をおこなう：1- 遊離ゲンタマイシン；または2- 遊離アミカシン；または3- ゲンタマイシンクリエート調製物；または4- 以下の群のアミカシンクリエート調製物：1. 対照、24時間で回収；2. 対照、第5日に回収；3. 遊離アミカシン；4. クリエートアミカシン；5. 遊離ゲンタマイシン；6. クリエートゲンタマイシン；7. 薬物を含まないクリエート；および8. 遊離ドキシサイクリン(ブルセラ菌用)。治療の後、細胞単分子膜を溶解し、ライセートを7H10寒天に塗布して、細胞内負荷を定量する。

【0307】

アッセイは3回繰り返す。結果は、マクロファージライセートのコロニー形成単位(CFU)/mlとして得られる。治療前(時間0)に溶解した単分子膜における細菌数と5日間の治療後に溶解した単分子膜における細菌負荷との比較をおこなう。結果は、治療された実験群における細菌数が時間0における細胞内細菌数よりも小さい場合に殺菌活性があると解釈され、5日間の治療後の細菌数が同じ時点の無治療の対照よりも小さいが、時間0における細菌数よりも大きい場合に静菌活性があると解釈される。

【0308】

10

20

30

40

50

野兎病菌は非常に感染性が高い。少数(10~50程度の生物体)が病気を引き起こし得る。野兎病菌が武器として使用された場合、細菌は空気伝達されて吸入により曝されると思われる。感染性エアロゾルを吸入した人々は、治療されなかった場合には、一般に、生命に関わる肺炎および全身感染を含む重篤な呼吸疾患を経験するであろう。CDCの定義によれば、野兎病菌はカテゴリーAの病原体と見なされ、ブルセラ属はカテゴリーBの病原体と見なされる。そのため、野兎病菌およびブルセラ菌を用いる実験は、バイオセーフティーレベル3(BSL-3)の実験室で実施される。

### 【0309】

予備実験を次のプロトコールに従っておこなった: 1. Raw 246.7マクロファージ、単分子膜あたり $10^5$ ; 2. 野兎病菌LVS:  $5 \times 10^5$ 細菌/単分子膜; 3. 1時間感染を起こさせる; 4. ウェルを洗浄してマクロファージに摂取されなかった細菌を除去する; 5. 治療の開始前にいくつかのウェル/単分子膜を溶解して、細胞内細菌数を確立する; 6. 化合物による単分子膜の治療を開始する; 7. 4日後、治療を止める; 8. ウェルに治療を与えずに1日置く; 9. 水により単分子膜を溶解する; 10. 段階希釈する; および11. ライセートをチョコレート寒天プレートに塗布して、細胞内CFUの数(CFU/ml)を測定する。結果を表7に示す。

### 【0310】

表7: 野兎病菌LVS感染マクロファージをGecchにより治療した後の細菌数

【表7】

治療群	第0日	第4日	p値
1時間対照(無治療)	$2 \pm 0.4 \times 10^4$	-	-
ゲンタマイシン(0 M NaCl)2 $\mu$ g/ml	-	$1.5 \pm 0.5 \times 10^3$	(1)(2)(3)
ゲンタマイシン(0.066 M NaCl)2 $\mu$ g/ml	-	$8.6 \pm 0.4 \times 10^2$	(1)(2)(3)
ゲンタマイシン(0.33 M NaCl)2 $\mu$ g/ml	-	$6.9 \pm 0.2 \times 10^2$	(1)(2)(3)(4)
ゲンタマイシン(0.6 M NaCl)2 $\mu$ g/ml	-	$5.1 \pm 0.3 \times 10^2$	(1)(2)(3)(4)
ゲンタマイシン(遊離)2 $\mu$ g/ml	-	$9.3 \pm 0.3 \times 10^2$	(1)(2)(3)
アミカシン(0 M NaCl)4 $\mu$ g/ml	-	$8.9 \pm 0.4 \times 10^2$	(1)(2)(3)
アミカシン(0.066 M NaCl)4 $\mu$ g/ml	-	$6.4 \pm 0.5 \times 10^2$	(1)(2)(3)
アミカシン(0.33 M NaCl)4 $\mu$ g/ml	-	$4.7 \pm 0.3 \times 10^2$	(1)(2)(3)(4)
アミカシン(0.66 M NaCl)4 $\mu$ g/ml	-	$2.4 \pm 0.2 \times 10^2$	(1)(2)(3)(4)
アミカシン(遊離)4 $\mu$ g/ml	-	$7.6 \pm 0.3 \times 10^2$	(1)(2)(3)
対照、薬物を含まないコクリエート	-	$2.7 \pm 0.5 \times 10^6$	(1)(2)(3)
対照、無治療	-	$3.0 \pm 0.3 \times 10^6$	(1)(2)(3)

10

20

30

### 【0311】

- (1) 1時間対照と比較してp < 0.05
- (2) 第4日の無治療の対照と比較してp < 0.05
- (3) 薬物を含まないコクリエートと比較してp < 0.05
- (4) 遊離薬物と比較してp < 0.05

40

### 実施例4: 免疫反応の増強および微生物感染からの保護のためのコクリエート製剤

コクリエートは、ホスファチジルセリンとカルシウムとの相互作用により自発的に形成する、無水の、安定な、多層の脂質結晶である。コクリエート製剤は、粘膜分泌物、血漿および胃腸液を含む生理的液体中で損なわれない。そのため、コクリエートは、経口、粘膜および静脈内を含む多くの投与経路による生物活性化合物の送達を仲介するために使用することができる。

### 【0312】

コクリエート製剤は、APIをホスファチジルセリンリポソームの懸濁液と混合した後、CaCl<sub>2</sub>溶液を滴下して加えることにより調製した。APIの特性(疎水性または電荷)をリポソーム-API中間体を形成するために使用する。報告されたすべての研究はマウスモデルに

50

おけるものであった。結晶懸濁液であるコクリエートAPI製剤の経口投与は強制経口投与によるものであった（通常0.1 ml）。

【0313】

誘発された免疫反応：HAおよびNAタンパク質を含有するインフルエンザビリオンエンベロープを抽出して、これらのタンパク質をコクリエートマトリックスの中に組み入れることにより、インフルエンザタンパク質コクリエートを調製した。インフルエンザタンパク質コクリエートを筋肉内経路または経口経路のいずれかにより投与した。インフルエンザウイルスに対する循環抗体およびウイルスの攻撃からの保護を測定した。図11および12は、経口投与が全身免疫反応を誘導すること、および中和抗体の検出が、損なわれていない構造のインフルエンザタンパク質が免疫系に提供され、コクリエートにより送達されたことを示すことを証明する。

10

【0314】

さらに、インフルエンザウイルスのエンベローペタンパク質を含有するタンパク質-コクリエートの経口投与は、高力価の中和抗体を含む強力な全身性の細胞性および体液性免疫、ならびに鼻腔内ウイルス攻撃からの保護をもたらした。HIVウイルスのenv、tatおよびrev遺伝子を発現するプラスミドを含有するDNA-コクリエートの経口投与は、gp160に対する強力な全身性の細胞性および体液性免疫をもたらした。

【0315】

微生物感染からの保護：インフルエンザウイルスを標的とするsiRNA-コクリエートの単回投与は、肺におけるウイルス価の200倍（鼻腔内投与）および20倍（静脈内投与）の減少をもたらした。アミカシン-コクリエートの経口投与はトリ型結核菌感染からの保護をもたらした。アンホテリシンB-コクリエートの経口投与はアスペルギルス感染およびカンジダ感染の両方からの保護をもたらした。

20

【0316】

結果は、タンパク質およびDNAプラスミドのコクリエート製剤の経口投与が全身性の体液性および細胞性免疫反応をもたらすことを示しており、コクリエートがこれらの分子を胃腸管における消化から保護し、細胞内送達を仲介することを証明している。小分子薬のコクリエート製剤の経口送達は、治療的な全身送達をもたらす。これらのデータは、治療タンパク質およびオリゴヌクレオチドの経口送達のためのコクリエートの使用の研究に対して実験による強い理論的根拠を提供する。

30

【0317】

実施例5：親水性分子のコクリエート化を増大させるためのコクリエート製剤

コクリエートは、ホスファチジルセリンとカルシウムとの相互作用により自発的に形成する、無水の、安定な、多層の脂質結晶である。コクリエート製剤は、粘膜分泌物、血漿および胃腸液を含む生理的液体中で損なわれず、それにより、経口、粘膜および静脈内を含む多くの投与経路による生物活性化合物の送達を仲介する。最初に、コクリエートは疎水性薬物を製剤するために使用された。例えば、コクリエート化されたアンホテリシンB(AmB)の経口製剤がヒト臨床試験に入った。しかしながら、親水性分子または親水性領域を有する大分子を認め得る程度にコクリエート化することは困難であった。

【0318】

40

特に、コクリエート製剤は伝統的に、APIをホスファチジルセリンベシクルの懸濁液と混合した後、 $\text{CaCl}_2$ 溶液を滴下して加えることにより調製されてきた。AmBは典型的な疎水性薬物を代表して使用されたが、アミカシンおよびゲンタマイシンは親水性薬物である。本発明において、カルシウムと相互作用せず、損なわれずにコクリエート結晶マトリックス内部に埋め込まれた状態を保つ「いかだ」のように作用する脂質領域とAPIとを結びつけることにより、親水性分子または親水性領域を有する大分子をコクリエート中に製剤することができることが発見された（図13A～13B）。

【0319】

例えば、99.9%純粋なジオレオイルPS、99.9%純粋なダイズPS、75%ダイズPSおよび50%ダイズPSと組み合わせて組み込まれるホスファチジルセリン(PS)を使用してコクリエートを

50

製造した。99.9%純粋なPSの脂質組成を、スフィンゴミエリン、ホスファチジルコリンおよび/またはコレステロールの添加により改変した。コクリエート化効率は、遠心分離後に上清における薬物濃度をアッセイすることにより測定した。

【0320】

AmBのコクリエート化効率は85%よりも大きく、PSベシクルの脂質組成とは無関係であった。それに対して、アミカシンおよびゲンタマイシンのカプセル化効率はどちらも、99.9%純粋なPSを使用した場合には15%~20%のみであったのに対して、50%ダイズPSを使用した場合には60%~65%であった。純粋なPSベシクルにスフィンゴミエリン、および/またはホスファチジルコリンを添加すると、コクリエート化効率が増加して50%ダイズPSに近づいた。結果を図14に示す。

10

【0321】

要約すると、PSベシクルへのCa<sup>2+</sup>の添加は、高度に規則正しい結晶性アシル鎖および非常に高い転移温度を有する近接して並置された膜の「無水」複合体であるコクリエートの形成を誘導する。アシル鎖二重層の中に挿入することができる疎水性分子のコクリエート化効率は、広い範囲内であり、PSベシクルの組成と無関係である。親水性分子は、カルシウムと相互作用せず、流動性で、損なわれずにカルシウム-PS結晶マトリックス内部に埋め込まれた状態を保つ「いかだ」のように作用する脂質領域とAPIとを結びつけることにより、コクリエート中に製剤することができる。

【0322】

参照による組込み

20

本明細書において言及されるすべての出版物、特許、および特許出願は、それぞれの出版物、特許または特許出願が参照により組み込まれることが明確におよび個々に指示されたのと同じ程度に、参照によりその全文が本明細書に組み込まれる。対立する場合には、定義を含め、本出願が支配する。

【0323】

The Institute for Genomic Research (TIGR) (ワールドワイドウェブ: tigr.org) および/またはthe National Center for Biotechnology Information (NCBI) (ワールドワイドウェブ: ncbi.nlm.nih.gov) により維持されるものなどの、公開データベースの登録に関する受入番号を参照するポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列も、同様に参照によりその全体が組み込まれる。

30

【0324】

同等物

当業者は、本明細書に記載される本発明の特定の実施形態の多くの同等物を、認識するであろうし、または通常の実験を用いて確認することができるであろう。このような同等物は、以下の特許請求の範囲に包含されることが意図される。

本発明の実施形態として例えば以下を挙げることができる。

[実施形態1]

コクリエートの集団を含むコクリエート組成物であって、コクリエートが、

- a) 負に荷電した第1の脂質；
- b) 2価カチオンまたはより高い価数のカチオンである、カチオン；
- c) カチオンと相互作用するアニオン性官能基を持たない第2の脂質；および
- d) さらなる生体関連分子

を含む、前記コクリエート組成物。

40

[実施形態2]

コクリエートの集団を含むコクリエート組成物であって、コクリエートが、

- a) 負に荷電した第1の脂質；
- b) 2価カチオンまたはより高い価数のカチオンである、カチオン；
- c) カチオンとイオン的に相互作用するカチオン性官能基を有する両親媒性の第2の脂質；および
- d) さらなる生体関連分子

50

を含む、前記コクリエート組成物。

[実施形態3]

第2の脂質が中性またはカチオン性脂質またはステロールである、実施形態1または2に記載のコクリエート組成物。

[実施形態4]

第2の脂質がホスファチジルコリンおよびスフィンゴミエリンからなる群より選択される、実施形態3に記載のコクリエート組成物。

[実施形態5]

第2の脂質が、生体関連分子と水素結合を形成することが可能な脂質を含む、実施形態1または2に記載のコクリエート組成物。

10

[実施形態6]

第2の脂質が負に荷電した第1の脂質の中に埋め込まれている、実施形態1または2に記載のコクリエート組成物。

[実施形態7]

第2の脂質が、コクリエートの総脂質含有量の50%までを構成する、実施形態1または2に記載のコクリエート組成物。

[実施形態8]

コクリエートの平均粒径が1ミクロン未満である、実施形態1または2に記載のコクリエート組成物。

20

[実施形態9]

コクリエートの平均粒径が300ミクロン未満である、実施形態1または2に記載のコクリエート組成物。

[実施形態10]

負に荷電した脂質が、ホスファチジルセリン、ジオレオイルPS(DOPS)、およびダイズ由来ホスファチジルセリン(ダイズPS)を含む、実施形態1または2に記載のコクリエート組成物。

[実施形態11]

コクリエートが少量の第3の脂質をさらに含む、実施形態1または2に記載のコクリエート組成物。

30

[実施形態12]

第3の脂質が、双性イオン性脂質、PEG化脂質、カチオン性脂質、またはポリカチオン性脂質からなる群より選択される、実施形態11に記載のコクリエート組成物。

[実施形態13]

2価またはより高い価数のカチオンが金属イオンである、実施形態1または2に記載のコクリエート組成物。

[実施形態14]

2価またはより高い価数の金属カチオンが、カルシウム、亜鉛、バリウム、およびマグネシウムカチオンからなる群より選択される、実施形態13に記載のコクリエート組成物。

[実施形態15]

生体関連分子が親水性である、実施形態1または2に記載のコクリエート組成物。

40

[実施形態16]

生体関連分子が正または負に荷電している、実施形態1または2に記載のコクリエート組成物。

[実施形態17]

生体関連分子が両親媒性である、実施形態1または2に記載のコクリエート組成物。

[実施形態18]

生体関連分子が疎水性である、実施形態1または2に記載のコクリエート組成物。

[実施形態19]

生体関連分子が、薬物、ビタミン、ミネラル、脂肪酸、アミノ酸、糖類、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗原、栄養素および香味物質からなる群より選択される少なくとも

50

1つのメンバーである、実施形態1または2に記載のコクリエート組成物。

[実施形態20]

薬物が、抗真菌剤；非ステロイド抗炎症剤；抗癌剤；抗ウイルス剤、麻酔剤、または抗感染剤、免疫抑制剤、ステロイド抗炎症剤、精神安定剤、または血管拡張剤である、実施形態19に記載のコクリエート組成物。

[実施形態21]

薬物が、アンホテリシンBおよびゲンタマイシンからなる群より選択される、実施形態19に記載のコクリエート組成物。

[実施形態22]

薬物がアミノグリコシドである、実施形態19に記載のコクリエート組成物。

10

[実施形態23]

アミノグリコシドがアミカシンである、実施形態22に記載のコクリエート組成物。

[実施形態24]

ポリヌクレオチドがデオキシリボ核酸(DNA)分子である、実施形態19に記載のコクリエート組成物。

[実施形態25]

DNAが転写されてリボ核酸を生成する、実施形態24に記載のコクリエート組成物。

[実施形態26]

ポリヌクレオチドがリボ核酸(RNA)分子である、実施形態19に記載のコクリエート組成物。

20

[実施形態27]

リボ核酸が翻訳されて生物活性ポリペプチドを生成する、実施形態26に記載のコクリエート組成物。

[実施形態28]

ポリヌクレオチドがプラスミドまたはリボザイムである、実施形態7に記載のコクリエート組成物。

[実施形態29]

ポリヌクレオチドが、アンチセンス、siRNA、shRNA、成熟miRNA、プレmiRNA、プリmiRNA、miRNA\*、またはアンチmiRNA分子である、実施形態19に記載のコクリエート組成物。

[実施形態30]

30

さらに凝集阻害剤を含む、実施形態1または2に記載のコクリエート組成物。

[実施形態31]

凝集阻害剤が塩化ナトリウムである、実施形態31に記載のコクリエート組成物。

[実施形態32]

有効量の実施形態1または2に記載のコクリエート組成物および製薬上許容される担体を含む医薬組成物。

[実施形態33]

a) 生体関連分子を第1および第2の脂質を含むリポソームと混合すること；および  
b) 2価カチオンまたはより高い価数のカチオンであるカチオンを加えて、コクリエート組成物を製造すること

40

を含む、実施形態1または2に記載のコクリエート組成物を製造する方法。

[実施形態34]

総脂質の生体関連分子に対する比が少なくとも4:1である、実施形態33に記載の方法。

[実施形態35]

第2の脂質が、コクリエートの総脂質成分の50%までを構成する、実施形態33に記載の方法。

[実施形態36]

第1の脂質の第2の脂質に対する比が、総脂質の1~60%の間である、実施形態33に記載の方法。

[実施形態37]

50

2価またはより高い価数のカチオンが金属イオンである、実施形態33に記載の方法。

[実施形態38]

2価またはより高い価数の金属カチオンが、カルシウム、亜鉛、バリウム、およびマグネシウムカチオンからなる群より選択される、実施形態37に記載の方法。

[実施形態39]

カルシウムカチオンが塩化カルシウムから供給される、実施形態38に記載の方法。

[実施形態40]

混合物の塩化カルシウム濃度が2 mM～10 mMである、実施形態39に記載の方法。

[実施形態41]

さらに、リポソームと混合する前に生体関連分子を濾過または精製することを含む、実施形態33に記載の方法。 10

[実施形態42]

さらに、凝集阻害剤をコクリエート組成物と混合する工程c)を含む、実施形態33に記載の方法。

[実施形態43]

凝集阻害剤が塩化ナトリウムである、実施形態42に記載の方法。

[実施形態44]

混合物の塩化ナトリウム濃度が1 mM～1 Mである、実施形態43に記載の方法。

[実施形態45]

さらに、コクリエート組成物を凍結乾燥により乾燥する工程c)を含む、実施形態33に記載の方法。 20

[実施形態46]

さらに、コクリエート組成物を凍結乾燥により乾燥する工程d)を含む、実施形態42に記載の方法。

[実施形態47]

それを必要とする宿主に、薬学的に有効な量の実施形態1または2に記載の組成物を投与することを含む治療方法であって、宿主が細胞、細胞培養物、器官、組織、または動物からなる群より選択される、前記治療方法。

[実施形態48]

投与が粘膜または全身経路によるものである、実施形態47に記載の治療方法。

30

[実施形態49]

投与が、経口、鼻腔内、眼内、肛門内、腔内、および肺内からなる群より選択される粘膜経路によるものである、実施形態48に記載の治療方法。

[実施形態50]

投与が、静脈内、筋肉内、皮下、経皮および皮内からなる群より選択される全身経路によるものである、実施形態48に記載の治療方法。

[実施形態51]

コクリエートの集団を含むアミノグリコシド-コクリエート組成物であって、コクリエートが、

a) 負に荷電した脂質；

40

b) 2価カチオンまたはより高い価数のカチオンである、カチオン；および

c) アミノグリコシド

を含む、前記アミノグリコシド-コクリエート組成物。

[実施形態52]

アミノグリコシド-コクリエート組成物を製造するために使用されるアミノグリコシドの少なくとも5%が、アミノグリコシド-コクリエート組成物の中に組み込まれる、実施形態51に記載のコクリエート組成物。

[実施形態53]

コクリエートの平均粒径が1ミクロン未満である、実施形態51に記載のコクリエート組成物。

50

[実施形態 5 4]

負に荷電した脂質が、ホスファチジルセリン、ジオレオイルPS(DOPS)、およびダイズ由来ホスファチジルセリン(ダイズPS)を含む、実施形態51に記載のコクリエート組成物。

[実施形態 5 5]

コクリエートがさらに少量の第2の脂質を含む、実施形態51に記載のコクリエート組成物。

[実施形態 5 6]

第2の脂質が、双性イオン性脂質、PEG化脂質、カチオン性脂質、またはポリカチオン性脂質からなる群より選択される、実施形態55に記載のコクリエート組成物。

[実施形態 5 7]

2価またはより高い価数のカチオンが金属イオンである、実施形態51に記載のコクリエート組成物。

[実施形態 5 8]

2価またはより高い価数の金属カチオンが、カルシウム、亜鉛、バリウム、およびマグネシウムカチオンからなる群より選択される、実施形態57に記載のコクリエート組成物。

[実施形態 5 9]

アミノグリコシドがアミカシンまたはゲンタマイシンである、実施形態51に記載のコクリエート組成物。

[実施形態 6 0]

さらに凝集阻害剤を含む、実施形態51に記載のコクリエート組成物。

[実施形態 6 1]

凝集阻害剤が塩化ナトリウムである、実施形態51に記載のコクリエート組成物。

[実施形態 6 2]

有効量の実施形態51に記載のコクリエート組成物および製薬上許容される担体を含む医薬組成物。

[実施形態 6 3]

a) アミノグリコシドを脂質を含むリポソームと混合すること；および

b) 2価カチオンまたはより高い価数のカチオンであるカチオンを加えて、コクリエート組成物を製造すること

を含む、実施形態51に記載のコクリエート組成物を製造する方法。

[実施形態 6 4]

総脂質のアミノグリコシドに対する比が少なくとも10:1である、実施形態63に記載の方法。

[実施形態 6 5]

第2の脂質が、コクリエートの総脂質成分の50%までを構成する、実施形態63に記載の方法。

[実施形態 6 6]

2価またはより高い価数のカチオンが金属イオンである、実施形態63に記載の方法。

[実施形態 6 7]

2価またはより高い価数の金属カチオンが、カルシウム、亜鉛、バリウム、およびマグネシウムカチオンからなる群より選択される、実施形態66に記載の方法。

[実施形態 6 8]

カルシウムカチオンが塩化カルシウムから供給される、実施形態67に記載の方法。

[実施形態 6 9]

混合物の塩化カルシウム濃度が2 mM～10 mMである、実施形態68に記載の方法。

[実施形態 7 0]

さらに、リポソームと混合する前に生体関連分子を濾過または精製することを含む、実施形態63に記載の方法。

[実施形態 7 1]

さらに、凝集阻害剤をコクリエート組成物と混合する工程c)を含む、実施形態63に記載

10

20

30

40

50

の方法。

[実施形態72]

凝集阻害剤が塩化ナトリウムである、実施形態71に記載の方法。

[実施形態73]

混合物の塩化ナトリウム濃度が1 mM ~ 1 Mである、実施形態72に記載の方法。

[実施形態74]

さらに、コクリエート組成物を凍結乾燥により乾燥する工程c)を含む、実施形態63に記載の方法。

[実施形態75]

さらに、コクリエート組成物を凍結乾燥により乾燥する工程d)を含む、実施形態71に記載の方法。

10

[実施形態76]

それを必要とする宿主に、薬学的に有効な量の実施形態1に記載の医薬組成物を投与することを含む治療方法であって、宿主が細胞、細胞培養物、器官、組織、または動物からなる群より選択される、前記治療方法。

[実施形態77]

投与が粘膜または全身経路によるものである、実施形態76に記載の治療方法。

[実施形態78]

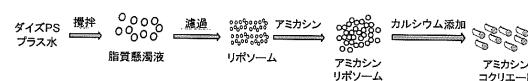
投与が、経口、鼻腔内、眼内、肛門内、腔内、および肺内からなる群より選択される粘膜経路によるものである、実施形態77に記載の治療方法。

20

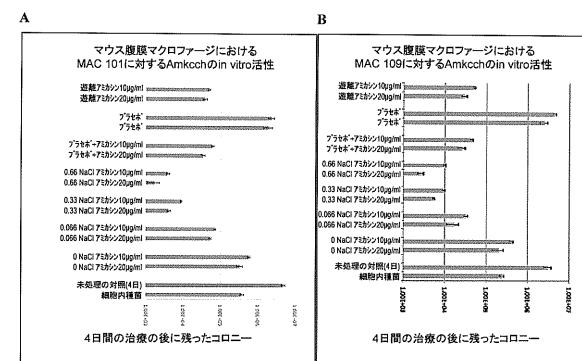
[実施形態79]

投与が、静脈内、筋肉内、皮下、経皮および皮内からなる群より選択される全身経路によるものである、実施形態77に記載の治療方法。

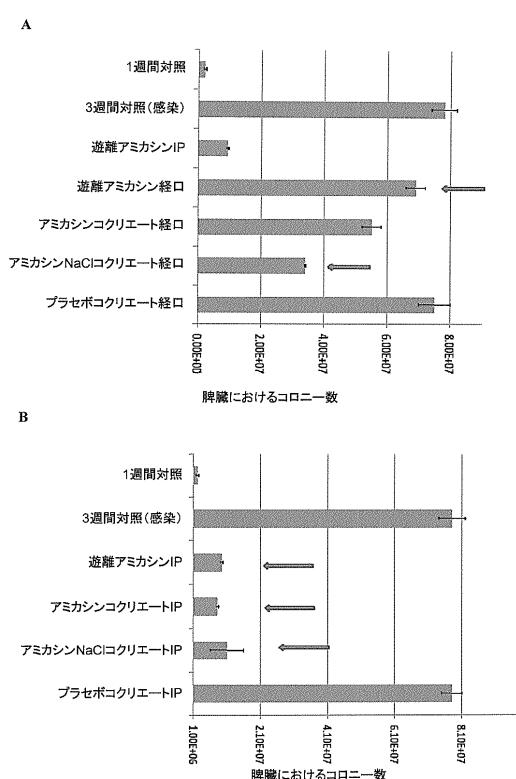
【図1】



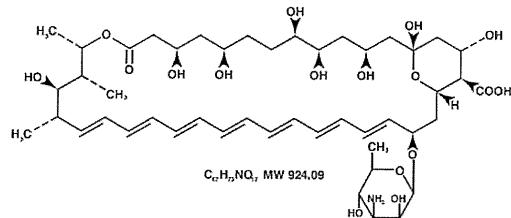
【図2A-2B】



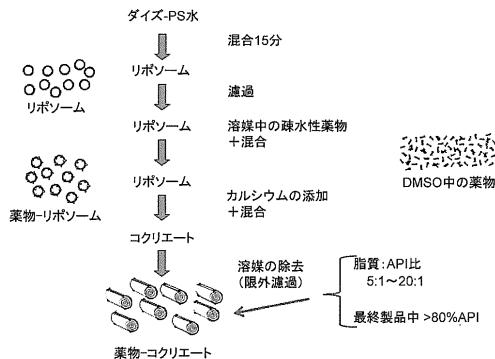
【図3A-3B】



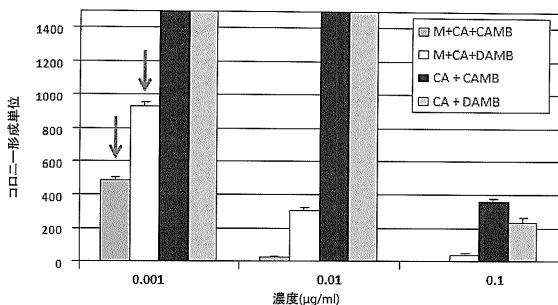
【図4】



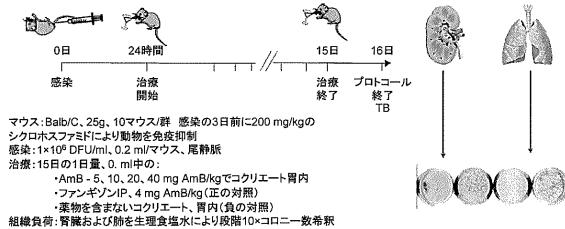
【図5】



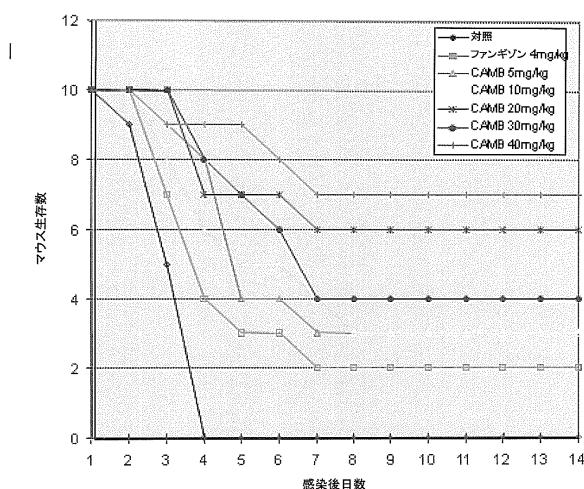
【図6】



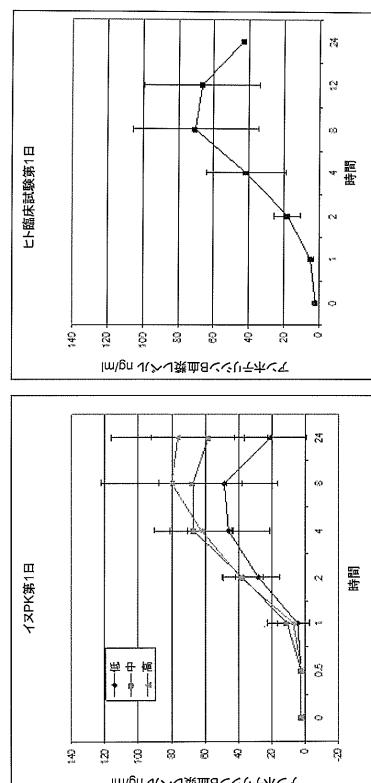
【図7】



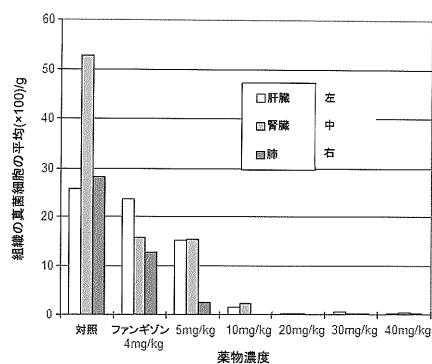
【図8】



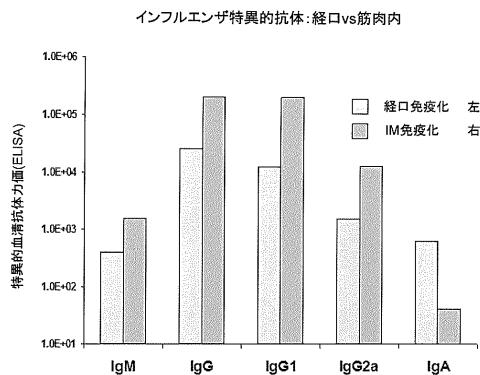
【図10】



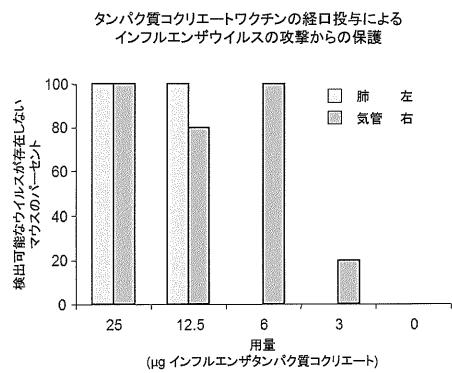
【図9】



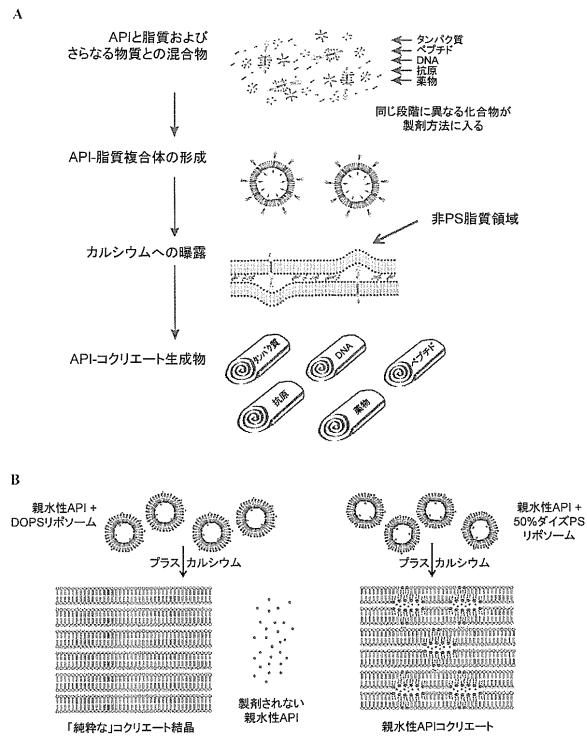
【図11】



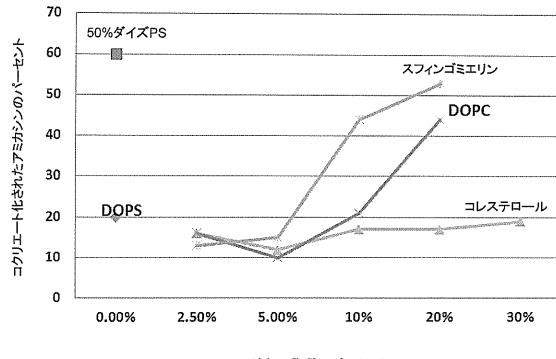
【図12】



【図13A-13B】



【図14】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04
A 6 1 P 31/10 (2006.01)	A 6 1 P 31/10
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12

(31)優先権主張番号 61/608,272  
 (32)優先日 平成24年3月8日(2012.3.8)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 61/636,793  
 (32)優先日 平成24年4月23日(2012.4.23)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 61/620,656  
 (32)優先日 平成24年4月5日(2012.4.5)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 61/570,067  
 (32)優先日 平成23年12月13日(2011.12.13)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 61/590,531  
 (32)優先日 平成24年1月25日(2012.1.25)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 61/534,075  
 (32)優先日 平成23年9月13日(2011.9.13)  
 (33)優先権主張国 米国(US)

## 前置審査

(74)代理人 100118773  
 弁理士 藤田 節  
 (74)代理人 100111741  
 弁理士 田中 夏夫  
 (74)代理人 100169971  
 弁理士 菊田 尚子  
 (72)発明者 ル, ルイング  
 アメリカ合衆国 07974 ニュージャージー州, ニュー プロヴィデンス, ニューカム ドラ  
 イヴ 47  
 (72)発明者 マンニーノ, ラファエル  
 アメリカ合衆国 08826 ニュージャージー州, グレン ガードナー, ラノン レーン 51  
 8

審査官 鈴木 理文

(56)参考文献 特開2007-197465(JP, A)  
 特表2003-529557(JP, A)  
 特表2002-535267(JP, A)  
 特表2005-529086(JP, A)  
 特表2008-528696(JP, A)  
 特表2007-532573(JP, A)  
 特表2008-544990(JP, A)

特表2009-518411 (JP, A)  
国際公開第2008/024389 (WO, A1)  
J. Liposome Res., 2004年, Vol.14 Nos.1&2, pp.87-109  
Int. J. Pharm. Sci. Res., 2010年, Vol.1 Iss.2, pp.1-12  
Database REGISTRY on STN, RN 59865-13-3

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 61 K 31 / 7036  
A 61 K 9 / 127  
A 61 K 47 / 02  
A 61 K 47 / 24  
A 61 K 47 / 28  
A 61 P 31 / 04  
A 61 P 31 / 10  
A 61 P 31 / 12

JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS / REGISTRY / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)