

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-532674

(P2016-532674A)

(43) 公表日 平成28年10月20日(2016.10.20)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 33/26 (2006.01)	A 6 1 K 33/26	4 C 0 7 6
A 6 1 N 2/10 (2006.01)	A 6 1 N 2/10	4 C 0 8 4
A 6 1 K 41/00 (2006.01)	A 6 1 K 41/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 6
A 6 1 K 9/10 (2006.01)	A 6 1 K 9/10	4 C 1 0 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-524845 (P2016-524845)  
 (86) (22) 出願日 平成26年7月11日 (2014.7.11)  
 (85) 翻訳文提出日 平成28年2月15日 (2016.2.15)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2014/064995  
 (87) 国際公開番号 W02015/004285  
 (87) 国際公開日 平成27年1月15日 (2015.1.15)  
 (31) 優先権主張番号 13176364.1  
 (32) 優先日 平成25年7月12日 (2013.7.12)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 516008914  
 ブロッセル, レミー  
 フランス国, エフ-13280 ラフェル  
 レアルル, チェミン ドウ ラ ポテ  
 リエ, ル マ 1' ヘルミテ 331  
 (74) 代理人 100114775  
 弁理士 高岡 亮一  
 (74) 代理人 100121511  
 弁理士 小田 直  
 (74) 代理人 100202751  
 弁理士 岩堀 明代  
 (74) 代理人 100191086  
 弁理士 高橋 香元

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 拘束場を生成するシステムおよびそれを実装する医療装置

(57) 【要約】

本発明は、(1) 注射可能かつ磁化可能なナノ粒子およびそれを注射するための手段を備えた注射装置と、(2) 注射後に粒子が保持される血管新生網に関連する腫瘍に物理的および/または機械的手段によって拘束を与える手段と備えたシステムに関し、本発明は、磁化可能なナノ粒子を含む組成物を注射する工程と、任意に、血管新生網内に保持されるナノ粒子の濃度を検出するために、画像化装置を用いて画像化を行う工程と、生体内で腫瘍に非接触拘束を与えるための手段を適用する工程であって、前記手段は磁場勾配であり、この印加は前記腫瘍領域に向けられる工程とを含む、腫瘍、特に血管新生網に関連する腫瘍の治療方法にも関する。

【選択図】 図5

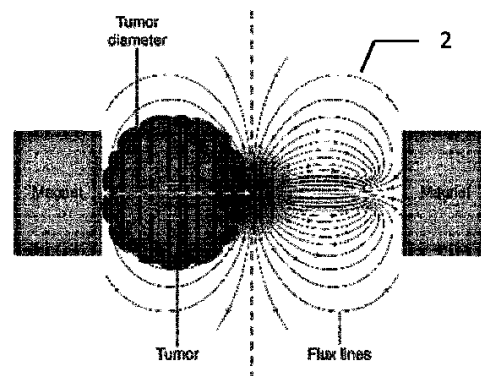


FIG. 5

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

(1) 注射可能かつ磁化可能なナノ粒子およびそれを注射するための手段と、(2) 注射後に前記粒子が保持される血管新生網に関連する腫瘍に物理的および/または機械的な拘束を与えるための手段であって、前記物理的および/または機械的な拘束を与えるための手段は、磁場勾配を放出する発生器である手段と、  
を備え、

前記システムは、細胞構築物でも埋め込み物でもなく、

前記システムは、薬物ターゲティングまたは温熱療法などの医薬手段によって腫瘍を治療するために使用されず、

前記粒子は、薬物担体または造影剤などとして使用されないことを特徴とする、医療システム。

**【請求項 2】**

前記ナノ粒子は、酸化鉄、好ましくは磁鉄鉱 ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )、磁赤鉄鉱 ( $[\ ] - \text{Fe}_2\text{O}_3$ )、フェルモキシデスまたはそれらの混合物からなる、請求項 1 に記載の医療システム。

**【請求項 3】**

前記ナノ粒子は、非医薬組成物で被覆されており、前記ナノ粒子は、好ましくは親水性被覆物で、より好ましくはデキストランで被覆されている、請求項 1 または請求項 2 に記載の医療システム。

**【請求項 4】**

前記ナノ粒子は、30 ~ 1000 nm、好ましくは 40 ~ 800 nm、より好ましくは 60 ~ 300 nm の範囲の平均直径を有する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の医療システム。

**【請求項 5】**

前記ナノ粒子は、コロイド状または非コロイド状の媒体に懸濁されている、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の医療システム。

**【請求項 6】**

30 ~ 1000 nm、好ましくは 40 ~ 800 nm、より好ましくは 60 ~ 300 nm の範囲の平均直径を有するナノ粒子、好ましくは磁化可能なナノ粒子、より好ましくは鉄を主成分とするか鉄のナノ粒子を含有する組成物、好ましくは懸濁液または乳濁液を注射する工程と、

任意に、血管新生網内に保持されるナノ粒子の濃度を検出するために、画像化装置を用いて画像化を行う工程と、

生体内で腫瘍に非接触拘束を与えるための物理的および/または機械的な手段を適用する工程であって、前記物理的および/または機械的な手段は磁場勾配であり、前記印加は前記腫瘍領域に向けられる工程と、

を含み、

腫瘍を治療するための前記方法は医薬的方法ではないことを特徴とする、物理的および/または機械的な手段による腫瘍、特に血管新生網に関連する腫瘍の治療方法。

**【請求項 7】**

注射されるナノ粒子の量は、100  $\mu\text{g}$  ~ 10 g、好ましくは 500  $\mu\text{g}$  ~ 2 g の範囲である、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記注射される粒子の少なくとも 25 ~ 60 % は、前記腫瘍血管新生網内に保持される、請求項 6 または請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記腫瘍は悪性上皮性腫瘍である、請求項 6 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記腫瘍は、膵臓癌腫瘍または乳癌腫瘍である、請求項 6 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の

10

20

30

40

50

方法。

【請求項 1 1】

ナノ粒子が腫瘍を取り囲む血管新生網によって保持されるように、前記ナノ粒子を含有する組成物、好ましくは懸濁液または乳濁液を注射する工程であって、好ましくは、前記注射を静脈内に行い、かつ前記ナノ粒子は前記腫瘍の前記血管新生網に自然発生的に移行する工程と、

任意に、前記腫瘍の周辺において前記血管新生網内に保持されるナノ粒子の濃度を検出するために、画像化装置を用いて画像化を行う工程と、

前記腫瘍細胞に対して例えば非接触圧力などの非接触拘束を与えるために、磁場勾配の外部源から生体内で前記ナノ粒子に印加される磁場勾配を含むかそれからなる物理的および/または機械的な手段を実行する工程と、

を含み、

医薬的方法ではないことを特徴とする、腫瘍領域内の癌細胞の癌表現型を正常な細胞に変更するための方法。

【請求項 1 2】

前記変更された癌表現型は、前記腫瘍細胞の腫瘍体積および/または表面積の減少に関する、請求項 1 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、物理科学の分野に関する。特に、本発明は、ナノ粒子と、腫瘍領域に磁場勾配を遠隔から印加する手段とを備えたシステムに関する。本発明によれば、腫瘍を有する対象の静脈内にナノ粒子を注射する。ナノ粒子を注射し、移行後に、腫瘍領域に位置づける。ナノ粒子が位置づけられる腫瘍領域に磁場勾配を印加すると、腫瘍周囲に拘束場が生成され、腫瘍体積および組織表面積を減少させることができる。

【背景技術】

【0002】

医薬において埋め込み可能なナノ粒子を用いることは良く知られており、多くの参考文献に、薬物の磁気ターゲティングのためのナノ粒子の使用が記載されている。例えば、欧州特許第 2 5 0 8 1 7 1 号には、ナノ粒子の表面に被覆された医薬組成物を標的組織に誘導および蓄積させるためにナノ粒子を使用することについて記載されている。米国特許出願公開第 2 0 1 1 2 2 3 2 5 5 号 (Mag Force 社) には、特に腫瘍の外科的除去後の後療法としての温熱治療のための、ナノ粒子を含有する埋め込み可能な製品および医薬におけるその使用について記載されている。

【0003】

癌の治療では、腫瘍を治療するための新しい医薬的戦略、特に物理的戦略が明らかに必要とされており、癌細胞によって示される急速な細胞分裂を妨害するために交番電場を用いる新規な癌治療法が試みられてきた。1つのシステムが Novocure 社によって開発され、悪性脳腫瘍の一種である再発性多形性膠芽腫の治療のために 2 0 1 1 年 4 月 1 5 日に米国 FDA によって認可された。

【発明の概要】

【0004】

本発明は、注射可能かつ磁化可能なナノ粒子と、腫瘍周囲に拘束場を生成するための磁場勾配と、任意に磁石とを備えた注射装置を実装する、新しい医療システムおよび腫瘍の治療方法を提案する。本発明の方法では、それを必要としている対象に、多くの磁化可能なナノ粒子を注射し、ナノ粒子が保持される腫瘍領域に外部磁場勾配を印加する。

【0005】

本出願人は、ナノ粒子を静脈内に注射すると、それらが血管新生網によって保持されることに気づいた。腫瘍を取り囲む血管新生網における注射したナノ粒子の無作為化分布により、驚くべきことに、ある種の中空かつ不連続的な球体が形成されることに気づいた。

10

20

30

40

50

このようにして、腫瘍は、前記球体内に位置づけられる。

【0006】

腫瘍を取り囲む血管新生網における注射したナノ粒子のこのような構成により、腫瘍領域に磁場勾配を印加すると、この印加によって拘束場が生じ、さらに、細胞に拘束が与えられ、この拘束により、腫瘍細胞の表現型の正常または部分的に正常な細胞表現型への変化が生じるといった条件が生成される。特に、この物理的および/または機械的な拘束は、腫瘍体積を減少させることができ、かつ、外部磁場勾配に曝露される腫瘍の2つの組織表面に作用する。

【0007】

言い換えると、腫瘍細胞に与えられる物理的および/または機械的な拘束によって生物学的効果が得られ、前記拘束は、拘束場により生じ、拘束場自体は、腫瘍を取り囲む血管新生網内に分散されたナノ粒子に磁場勾配を印加することにより生じる。

10

【0008】

一実施形態では、本発明は、(1)注射可能かつ磁化可能なナノ粒子およびそれを注射するための手段と、(2)注射後にその粒子が保持される血管新生網に関連する腫瘍に物理的および/または機械的な拘束を与えるための手段であって、磁場勾配を放出する発生器である手段とを備え、

本システムは、細胞構築物でも埋め込み物でもなく、

本システムは、薬物ターゲティングなどの医薬手段または温熱療法によって腫瘍を治療するために使用されず、

20

当該粒子は、薬物担体または造影剤などとして使用されないことを特徴とする、医療システムに関する。

【0009】

一実施形態では、本発明は、細胞に与えられる拘束により行われ、この拘束が機械的な拘束である治療方法にも関する。一実施形態では、本発明は、細胞に与えられる拘束により行われ、この拘束が非接触拘束である治療方法に関する。本発明の独自のアプローチにより、機械的な拘束が腫瘍領域内に位置するナノ粒子によって局所的に加えられる力による生じることが分かる。磁場勾配は、拘束場を球体の内部すなわち腫瘍細胞に導く。本発明では、粒子の移動は観察されない。

【0010】

特に、本発明は、物理的および/または機械的な手段による腫瘍の治療方法に関する。

30

【0011】

一実施形態では、本発明の方法は、医薬品をさらに含む。一実施形態では、本発明の方法は、医薬品を含まない。一実施形態では、本発明の方法は、医薬的方法ではない。

【0012】

定義

本発明では、以下の用語は、以下の意味を有する。

【0013】

数字の前の「約」は、その数字が前記数字の値の $\pm 10\%$ を意味することを表わす。

【0014】

「表現型」とは、生物の観察可能な特性(構造的および機能的特性)を指す。癌腫学では、悪性腫瘍の細胞または組織表現型は、対応する正常な細胞または組織と比較して乱されている観察可能な特性である。細胞表現型では、前記観察可能な特性は、限定されるものではないが、増殖、細胞分裂、アポトーシス、細胞死、遊走能力などであってもよい。

40

【0015】

「血管新生網」とは、腫瘍の近位領域において発生する新しい血管を指す。腫瘍細胞から放出される血管新生促進分子は、新しい血管形成を誘発することができる。

【0016】

「勾配」は、空間における物理的量の変動または変化を示すベクトルである。本発明の意味では、磁場勾配は、広がりのある場の強度の変化率である。磁場勾配は、静止および

50

移動している磁化可能な粒子の両方に並進力を与える量子物理学で使用される力である。これは、磁化可能な粒子にゼロの力を与える双極磁石などからの均一な磁場とは対照的なものである。力/勾配の関係は、式  $F = \nabla P$  (式中、 $F$  は力であり、 $\nabla$  はベクター量としての勾配であり、 $P$  は磁位である) によって表される。勾配は、 $T/mm$  で測定する。

【0017】

「拘束場」は、機械的な力を印加する場である。

【0018】

「拘束」とは、表面積で割った力を指し、従って、圧力と同種であり、パスカル (Pa) で測定する。固体の異なる部分に関わる応力すなわち内力の状態は、応力テンソルによって定められる (コーシー、1822年)。これらの作用力は、固体の各点で定められ、  
10 応力場または、より一般的にはテンソル場と呼ばれる。連続媒体の物理的特性では、場は、時空の各点では、物理量の値である。この量は、スカラー (圧力)、ベクター (磁場) またはテンソルであってもよい。

【0019】

「悪性腫瘍」とは、癌性腫瘍を指す。

【0020】

「機械的な」とは、物体または対象に対する物理作用を指し、特に、物体または対象に  
伝達される物質的環境における物理信号の伝播を指す。

【0021】

「ナノ粒子」とは、球形状を有し、かつ直径が  $0.1 \sim 1000$  nm の範囲のナノ球体  
20 を指す。本発明によれば、ナノ粒子は、中空の球体ではなく、中実の球体である。

【0022】

「粒子」とは、単一のナノ粒子または多くのナノ粒子の形態の磁気ビーズを指し、前記  
粒子は、 $0.1 \sim 1000$  nm の範囲の直径を有し、好ましくは、その直径は、 $100$  nm  
を超える。

【0023】

「物理的手段」とは、非化学的手段を指す。

【0024】

「間質」とは、器官の構造を形成する組織を指す。

【0025】

「腫瘍領域」とは、腫瘍、細胞外マトリックスおよび/または間質、および腫瘍を取り  
30 囲む新血管の周辺網 (血管新生網) を指す。

【0026】

「組織」とは、同じ表現型を示す一貫した細胞の集合体を指す。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】腫瘍に対する本発明の一般的な原理を示す。

【図2】鉄のナノ粒子1とMDA-MB-231 (由来: ヒトの乳癌) 細胞との混合物が  
皮下14に移植されたヌードマウス10を示す模式図である。

【図3】D0~D80の移植された腫瘍の個々の増殖曲線を示す。図3は、対照と比較し  
40 た実験後の癌細胞の増殖限界も示す。

【図4】写真4Aおよび模式図4Bに概念の証拠を示す。

【図5】マウスの腫瘍の両側に対する2つの磁石の位置決めを示す模式図である。

【図6】治療群 (G1') と3種類の対照群 (G2'、G3' または G4') との間で、  
全てのマウスの腫瘍体積の比較を示す。

【図7】治療群 (G1') と3種類の対照群 (G2'、G3' または G4') との間で、  
腫瘍の西側 (図7A) または東側 (図7B) について全てのマウスの組織表面積の比較を  
示す。

【図8】治療群 (G1') の対照群 (G2'、G3' または G4') に対する平均的な生  
体内腫瘍体積の漸進的变化を示す。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 2 8 】

参照符号の一覧

1 粒子またはナノ粒子

2 磁場勾配

3 コラーゲン

4 血管新生網

5 間質

6 腫瘍細胞

7 新血管

8 癌細胞

9 磁石

10 移植されたマウス

11 西側における腫瘍の活性部分の増加

12 筋肉側における腫瘍の活性部分の減少

13 壊死

14 皮下に移植された腫瘍の生存部分

15 筋肉

16 皮膚

【 発明を実施するための形態 】

## 【 0 0 2 9 】

本発明は、( i ) 注射可能かつ磁化可能なナノ粒子 1 およびそれを注射するための手段を備えた注射装置と、( i i ) 注射後に粒子 1 が保持される血管新生網に関連する腫瘍に物理的および / または機械的な拘束を与えるための手段 7 とを備えた医療システムに関する。

## 【 0 0 3 0 】

定義上、血管新生網とは、腫瘍の近位領域で発達する新しい血管と解釈され、間質とは、器官の構造を形成する組織を指す。間質は、血管新生網を表わさない。従って、間質は血管新生網ではない。

## 【 0 0 3 1 】

従って、本発明は、特に血管新生網内に保持される磁気粒子を含む物理的および / または機械的な手段によって、腫瘍細胞を治療するための医療システムに関する。

## 【 0 0 3 2 】

一実施形態では、本医療システムは、細胞構築物でも埋め込み物でもない。

## 【 0 0 3 3 】

一実施形態では、本医療システムは、腫瘍を治療するための医薬品を含まず、特に、当該ナノ粒子は、薬物担体として使用されない。

## 【 0 0 3 4 】

一実施形態では、本医療システムは、画像化または造影システムとして使用されない。

## 【 0 0 3 5 】

腫瘍

一実施形態では、腫瘍は、血管新生網 7 に関連している。別の実施形態では、腫瘍は、局所的に進行した腫瘍である。一実施形態では、腫瘍は、悪性の上皮性腫瘍である。一実施形態では、悪性腫瘍は膵臓癌である。一実施形態では、悪性腫瘍は肝癌である。別の実施形態では、悪性腫瘍は乳癌である。一実施形態では、腫瘍は、動物またはヒトの体内にある。

## 【 0 0 3 6 】

機械的および / または物理的な拘束を与えるための手段

一実施形態では、機械的および / または物理的な拘束を与えるための手段は、磁場勾配 2 を放出する発生器である。一実施形態では、磁場発生器は、磁場勾配 2 を発生するように制御される。一実施形態では、本発生器は、電磁石 9 を備える。別の実施形態では、本

10

20

30

40

50

発生器は、コイル、好ましくは可動コイル、より好ましくはタンブル構成のヘルムホルツコイルである。

【0037】

一実施形態では、機械的および/または物理的な拘束を与えるための手段は、少なくとも1つの磁石、永久磁石および/または電磁石をさらに備え、好ましくは、前記手段は、2つ以上の外部磁石、永久磁石および/または電磁石をさらに備え、より好ましくは、2つ以上の外部磁石、永久磁石および/または電磁石を、腫瘍の様々な好ましくは両側に局在化させる。

【0038】

非常に好ましい実施形態では、機械的および/または物理的な拘束を与える手段(例えば外部磁石など)を腫瘍の外側に位置づけ、好ましくは対象の体外に位置づける。一実施形態では、本手段は可動性であり、好ましくは腫瘍領域の周りを回転する。一実施形態では、本手段を、0.1~100mm、好ましくは1~10mmの範囲で腫瘍から離して位置づける。

10

【0039】

一実施形態では、磁場は、0.1Hz~1THz、好ましくは1Hz~1MHz、より好ましくは10Hz~500kHzの範囲で異なるかそのような範囲の周波数を有する、可変または一定の外部場である。

【0040】

一実施形態では、磁場は、0.1μT~50T、好ましくは0.01mT~5T、より好ましくは0.1mT~700mTの範囲である。

20

【0041】

一実施形態では、磁場は可動性であり、好ましくは腫瘍領域の周りを回転する。

【0042】

一実施形態では、磁場は交番磁場ではない。一実施形態では、磁場は交番電場ではない。

【0043】

一実施形態では、磁場勾配2は、強度、周波数および/または方向が変わる。腫瘍に対する拘束が、強度、方向および周波数において変化するような方法で、磁場勾配2を印加すると有利である。当業者であれば、腫瘍の位置およびその大きさ、場合により他の生物学的データに応じて、磁場勾配の強度、周波数および/または方向を変更するであろう。

30

【0044】

一実施形態では、磁場勾配2は、0.001~10T/cm、好ましくは0.01~1T/cm、より好ましくは0.1~0.5T/cmの範囲であり、さらにより好ましくは約0.4T/cmである。

【0045】

一実施形態では、細胞骨格および/または細胞壁および/または周囲の軟組織および/または硬組織の共鳴周波数またはその倍音を有する拘束場を探し出し、それに到達するように、磁場勾配2の周波数を変えてもよい。有利なことに、拘束場により、腫瘍内の腫瘍細胞成分によって形成される連続的な集合体の共鳴周波数を誘発するように、磁場勾配の周波数を変化させてもよい。

40

【0046】

一実施形態では、本システムは、磁場を方向付けるために、磁場の方向または本発生器の方向を変えるための手段を備える。

【0047】

磁化可能なナノ粒子

一実施形態では、粒子またはナノ粒子1は、任意の磁化可能な材料、好ましくは、酸化鉄またはマンガン、より好ましくは磁鉄鉱( $Fe_3O_4$ )、磁赤鉄鉱( $[ ] - Fe_2O_3$ )またはフェルモキシデスすなわちデキストランで被覆されたコロイド状酸化鉄、またはそれらの混合物を含むか、それらで構成されているか、それらからなる。

50

## 【0048】

粒子とは、本発明では、単一の粒子またはナノ粒子の集合体と理解される。

## 【0049】

一実施形態では、粒子またはナノ粒子1は、腫瘍細胞が取り込むことができないような大きさまたは流体力学的体積を有する。

## 【0050】

一実施形態では、粒子またはナノ粒子1は、腫瘍を取り囲む血管新生網7によって保持され、かつ腫瘍または腫瘍細胞の中に進入することなく腫瘍の周辺に残留するような大きさまたは流体力学的体積を有する。

## 【0051】

一実施形態では、粒子またはナノ粒子1は、30～1000nm、好ましくは40～800nm、より好ましくは60～300nmの範囲の平均直径を有する。

## 【0052】

非常に好ましい実施形態では、当該粒子またはナノ粒子は、細胞腫瘍および/または器官による取り込みを回避するために、100nmを超える平均直径を有し、好ましくは約200nmの平均直径を有する。

## 【0053】

一実施形態では、体に投与される粒子またはナノ粒子1の量は、0.1mg～1000mg、好ましくは1～10の範囲であり、より好ましくは約5mgである。

## 【0054】

一実施形態では、粒子またはナノ粒子1は被覆されていない。

## 【0055】

一実施形態では、粒子またはナノ粒子1は、非医薬組成物で被覆されており、好ましくは、前記ナノ粒子1は、親水性被覆物、より好ましくはデキストランで被覆されている。

## 【0056】

別の実施形態では、粒子またはナノ粒子1は、医薬組成物で被覆されている。

## 【0057】

別の実施形態では、粒子またはナノ粒子1は、少なくとも1種の生化学的製剤、好ましくはペプチド、より好ましくは、アルギニルグリシルアスパラギン酸(RGD)で被覆されている。

## 【0058】

別の実施形態では、粒子またはナノ粒子1を、例えば、注射前にナノ粒子1に塗布される特定の被覆剤により、腫瘍領域へのそれらの移行を支援してもよい。

## 【0059】

一実施形態では、粒子またはナノ粒子1を懸濁液内で製剤化し、ここでは、粒子またはナノ粒子1を、コロイド状または非コロイド状媒体に懸濁させる。本実施形態では、本発明に包含される注射装置は、上記磁化可能な粒子またはナノ粒子1を含有する懸濁液を含む。

## 【0060】

一実施形態では、粒子またはナノ粒子1を乳濁液内で製剤化し、ここでは、粒子またはナノ粒子1は乳濁液の中にある。本実施形態では、本発明に包含される注射装置は、上記磁化可能な粒子またはナノ粒子1を含有する乳濁液を含む。

## 【0061】

本発明は、

- 30～1000nm、好ましくは40～800nm、より好ましくは60～300nmの範囲の平均直径を有する粒子またはナノ粒子1、好ましくは磁化可能な粒子またはナノ粒子、より好ましくは鉄を主成分とするか鉄の粒子またはナノ粒子を含有する組成物、好ましくは懸濁液または乳濁液を注射する工程と、
- 任意に、血管新生網7内に保持される粒子またはナノ粒子の濃度を検出するために画像化装置を用いて画像化を行う工程と、

10

20

30

40

50



- 生体内で腫瘍に対して非接触拘束を与えるための物理的および/または機械的な手段を適用する工程であって、前記物理的および/または機械的な手段は、磁場勾配2であり、その印加は、腫瘍領域に向けられる工程と、を含む、物理的および/または機械的な手段による腫瘍、特に血管新生網7に関連する腫瘍の治療方法にも関する。

【0062】

本発明の方法で使用されるナノ粒子1は、上記のとおりである。本発明によれば、少なくとも注射された粒子またはナノ粒子1の25~60%が、腫瘍血管新生網7内に保持される。理論に縛られたくはないが、本出願人は、本発明のシステムの粒子またはナノ粒子1は、注射した場合、血管新生網7に関して周知の血管透過性・滞留性亢進(EPR)効果、好ましくは主に滞留性亢進効果から利益を享受すると考える傾向にある。EPR効果は、ある大きさの粒子またはナノ粒子1が、それらが正常組織内にある場合よりも多く腫瘍領域内に蓄積する傾向にあるという特性である。EPR効果は、粒子またはナノ粒子1を腫瘍領域に導くのを支援する。但し、本発明の粒子1の性質および大きさにより、粒子またはナノ粒子1は、腫瘍細胞に進入したり接触したりすることができず、腫瘍を取り囲む血管新生網7内に保持される。

10

【0063】

一実施形態では、本発明の粒子またはナノ粒子1のEPR比、すなわち血管新生網7に到達する注射された粒子またはナノ粒子1の量は、25%~60%の範囲である。別の実施形態では、EPR比は、注射された粒子1の30%~40%の範囲である。EPR比は、粒子またはナノ粒子1の大きさおよび/または腫瘍領域の位置および/または腫瘍の組織学的性質によって異なってもよい。

20

【0064】

粒子またはナノ粒子1は、腫瘍を取り囲む血管新生網7によって保持され、一実施形態では、粒子またはナノ粒子1の分布により、中空かつ不連続的な球体が形成される。

【0065】

本発明によれば、粒子またはナノ粒子は、間質によって、あるいは間質内に保持されない。

【0066】

本発明によれば、粒子またはナノ粒子1は、腫瘍細胞に接触することができない。一実施形態では、腫瘍細胞と粒子またはナノ粒子1との距離は、少なくとも1ミクロン、好ましくは5~100 $\mu$ mである。

30

【0067】

一実施形態では、注射される粒子またはナノ粒子1の量は、100 $\mu$ g~10g、好ましくは500 $\mu$ g~2gの範囲である。

【0068】

非接触拘束を与えるための手段は、上記外部発生器である。外部とは、磁場勾配2の発生が腫瘍の外側にあり、好ましくは対象の体外にあることを意味する。一実施形態では、磁場勾配2は、1分~48時間、好ましくは15分~5時間の範囲の期間にわたって印加され、この期間は、数週間にわたって繰り返される。

40

【0069】

一実施形態では、対象は、ヒトを含む動物である。対象は、雄または雌であってもよい。この対象は、その体内の血管新生網7に関連する腫瘍を包含する。一実施形態では、腫瘍は、局所的に進行した腫瘍である。一実施形態では、腫瘍は悪性上皮性腫瘍である。一実施形態では、悪性腫瘍は膵臓癌腫瘍である。別の実施形態では、悪性腫瘍は乳癌腫瘍である。

【0070】

本発明は、  
- 粒子またはナノ粒子1が腫瘍を取り囲む血管新生網7によって保持されるように上記粒子またはナノ粒子1を含有する組成物、好ましくは懸濁液または乳濁液を注射する工程

50

であって、好ましくは、上記注射を静脈内で行い、粒子またはナノ粒子 1 は、自然発生的に腫瘍の血管新生網 7 に移行する工程と、

- 任意に、血管新生網 7 内に保持される粒子またはナノ粒子 1 の濃度を腫瘍の周辺で検出するために、画像化装置を用いて画像化を行う工程と、

- 腫瘍細胞に、例えば非接触圧力などの非接触拘束を与えるために、磁場勾配 2 の外部源から生体内で粒子またはナノ粒子 1 に印加される磁場勾配 2 を含むかそれからなる物理的および/または機械的な手段を実行する工程と、

を含む、標的領域内の癌細胞の癌表現型を正常な細胞に変更するための方法にも関する。

#### 【0071】

特に、本発明は、

- 粒子またはナノ粒子 1 が腫瘍を取り囲む血管新生網 7 によって保持されるように上記粒子またはナノ粒子 1 を含有する組成物、好ましくは懸濁液または乳濁液を注射する工程であって、好ましくは、上記注射を静脈内で行い、粒子またはナノ粒子 1 は、自然発生的に腫瘍の血管新生網 7 に移行する工程と、

- 任意に、血管新生網 7 内に保持されるナノ粒子の濃度 1 を腫瘍の周辺で検出するために、画像化装置を用いて画像化を行う工程と、

- 腫瘍細胞に、例えば非接触圧力などの非接触拘束を与えるために、磁場勾配 2 の外部源から生体内で粒子またはナノ粒子 1 に印加される磁場勾配 2 を含むかそれからなる物理的および/または機械的な手段を実行する工程と、

を含む、標的領域内の腫瘍細胞の体積および表面積を減少させる方法にも関する。

#### 【実施例】

#### 【0072】

以下の実施例により、本発明をさらに説明する。

#### 【0073】

図 1 は、その周辺の血管新生網 7 内に、本明細書に記載されているナノ粒子 1 を含む腫瘍を示す。

#### 【0074】

図 2 では、ヌードマウス 10 の皮下 14 に、鉄のナノ粒子 1 と MDA - MB - 231 (由来: ヒトの乳癌) 細胞との混合物が移植されている。図 2 に示すように、マウス 10 を 2 つの磁石 9 の間隙に配置する。図 2 の例では、1 つの磁石は、腫瘍に可能な限り近くにあり、反対側の磁石は、腫瘍の周辺から距離 d だけ離れており、この距離 d は、腫瘍の直径に対応している。

#### 【0075】

実施例 1 : 実現可能性調査

#### 【0076】

目的

本調査の目的は、マウスの皮下に移植された 10 個のヒトの腫瘍 (MDA - MB - 231、乳癌細胞株) を分析することであり、

- 皮下に移植された腫瘍の顕微鏡的特徴 (HES 染色)  
- 腫瘍細胞の鉄の蓄積 (HES 染色 / ペルルス特別染色)

を調べる。

#### 【0077】

要約

5 匹のマウス 10 の皮膚 (西側) 16 と筋肉 (東側) 15 との間に、細胞株 MDA - MB - 231 のヒトの細胞 (1 匹のマウスにつき 2 つの異種移植片) を皮下に移植した。本調査の終了時に、全ての腫瘍を回収し、4 %ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋した。腫瘍の組織病理学的特徴を評価するために、各マウス 10 からの 2 つの異種移植片のうちの一つを処理した (HES 染色)。腫瘍細胞の鉄の蓄積を評価するために、各マウスからの両方の異種移植片試料を処理した (ペルルス特別染色)。本調査では、10 個の評価した MDA - MB - 231 異種移植片は、類似した組織学的特徴を示し、未分化癌として

10

20

30

40

50

現れた。全ての腫瘍の中央部分に壊死性領域 13 が認められた。それらは、腫瘍表面積の 60% から 80% まで様々であった。鉄の沈着は、腫瘍領域の周囲に位置していた。それらは、HES 染色した側では褐色の顆粒状沈着物として現われ、ペルルス染色された側ではダークブルーの顆粒状沈着物として現われた。どの群のどの腫瘍の腫瘍細胞にも、鉄の沈着は特定されなかった。

【0078】

マクロファージの細胞質および壊死性領域 13 には、最小の沈着物が観察された。

【0079】

結果

腫瘍の組織病理学検査 (HES 染色)

10

【0080】

HES 染色した側では、腫瘍の顕微鏡的特徴を評価した。

【0081】

本調査では、評価した MDA - MB - 231 異種移植片は、類似した組織学的特徴を示し、腺様分化を伴わない未分化癌として現れた。これらの腫瘍は、高密度な細胞からなり、非常に境界が明確であって、粗い結節性であり、隣接する皮下組織、特に神経において浸潤性増殖が生じていた。

【0082】

腫瘍周囲の線維性間質には非常に数多くの炎症性細胞が認められ、隣接する組織 (脂肪組織、骨格筋、皮膚) には、より少ない量の炎症性細胞が認められた。これらの細胞は主として、顔料を多く有するマクロファージに存在し、若干の小リンパ球と、時には顆粒球にも存在していた。僅かな腫瘍内間質にも、顔料を多く有するマクロファージを含む少ない数の同様の炎症性細胞が観察された。これらの細胞は主に、腫瘍の周辺部分で観察され、恐らく腫瘍周囲の間質から拡散したものである。顔料を多く有するマクロファージは、中型から大型の細胞であり、多量の褐色の顆粒状顔料を含有し、多くの場合、丸い核を覆うか隠す大きな細胞質を示した。そのような顔料は、顆粒状顔料の破片として腫瘍周囲および腫瘍内間質に時折認められた。

20

【0083】

腫瘍細胞の鉄の蓄積 (ペルルス特別染色)

ペルルスの酸 / フェロシアン化物反応により、ダークブルーの標識を介して鉄化合物が現れた。各腫瘍について、3つの連続した箇所を評価した。これらの3つの全ての箇所が類似した特徴を示した。

30

【0084】

どの群のどの腫瘍の腫瘍細胞にも、青色に染色された鉄の沈着は特定されなかった。

【0085】

結論

粒子 1 は、腫瘍の周囲に分散しており、驚くべきことに、中空かつ不連続的な球体を形成していた。

【0086】

腫瘍に拘束を与えるための条件が集まっているように見える。

40

【0087】

実施例 2 : 動物における拘束により癌表現型を正常に変更するための能力

【0088】

手順

本調査の目的は、皮下に MDA - MB - 231 ヒト乳房腫瘍を有するマウスモデルにおいて、磁場によって活性化されたナノ粒子の抗腫瘍効率を調べることにある。

【0089】

試験物質

【表 1】

ナノ粒子：	流体MAG-D
ロット番号：	2202/12
貯蔵条件：	+4℃
供給量：	100mL (100mg/mL)

## 【0090】

## 治療用量 - 薬物投与経路

細胞と共に注射した鉄の量は5mgである。腫瘍細胞と共に、ナノ粒子をBalb/cヌードマウスに投与する（腫瘍細胞の注射時）。ナノ粒子の注射体積は、300μL/マウス/注射である。

10

## 【0091】

## 動物

受け取り時に6～7週齢で体重が16～20gの45匹の雌のBalb/cヌードマウスを、Charles River社（フランス）から入手した。治療前に、特定病原体不在（SPF）動物の管理団体で動物を少なくとも7日間観察する。この動物管理団体は、フランスの農業/研究省によって認可されている（認可番号：A21231011EA）。動物実験の倫理指針および腫瘍実験における動物の福祉のための英語ガイドライン（English guidelines for welfare of animals in experimental neoplasia）に従って、動物実験を行う。動物に関する全ての手順を医薬大学（ディジョン）の動物実験委員会に提出する。

20

## 【0092】

## 動物の磁場への曝露

磁石を備えた装置を用いて磁場に曝露する際に、動物に麻酔（イソフルラン）をかけ、赤外線ランプによりマウスの体温を生理的レベルの範囲内に維持する。

## 【0093】

治療群（すなわち、後で説明する右の腫瘍G3）において、腫瘍が約1cmの腫瘍に到達したら、マウス10を斥力モードの2つの磁石9の間隙に配置した（図2を参照）。

## 【0094】

次いで、磁場勾配2を印加した。印加した勾配は、3mmの深さで約0.4テスラ/cmである。

30

## 【0095】

## 癌細胞株

使用した細胞株を、以下の表に詳細に記載する。

## 【表 2】

細胞株	種類	種	供給元
MDA-MB-231	ヒトの乳房腺癌	ヒト	ATCC

## 【0096】

## 雌のBalb/cヌードマウスへのMDA-MB-231腫瘍の導入

5mgのナノ粒子を含有するかナノ粒子を含有しない0.3mLの体積のRPMI1640媒体に再懸濁した1000万個のMDA-MB-231腫瘍細胞を、45匹の雌のヌードマウスの側腹部に皮下接種し、24～72時間後に、源を照射した（全身照射法、2Gy、60Co、BioMEP Sarl社、フランスのBreteniere）。

40

## 【0097】

45匹の全てのマウスの左腹部に、ナノ粒子を含まない腫瘍細胞を注射する。

## 【0098】

45匹の全てのマウスの右腹部に、ナノ粒子を含む腫瘍細胞を注射する。

## 【0099】

腫瘍細胞注射の当日を0日目（D0）とみなす。

## 【0100】

50

治療スケジュール

【0101】

以下の式により、腫瘍体積を推定する。

$$\text{腫瘍体積} = 1 / 2 \times \text{長さ} \times \text{幅}^2$$

【0102】

平均腫瘍体積が約100~200mm<sup>3</sup>に到達したら、36匹の腫瘍を有する雌のBalb/cヌードマウスを、それらの個々の腫瘍体積に従って、3つの群(8匹のマウスからなる1つの群と14匹のマウスからなる2つの群)に無作為化する。以下のように治療スケジュールを選択した。

- ・1群：8匹のマウスの左腹部の腫瘍(ナノ粒子を含有しない)を、連続した21日間で1日1回2時間連続して磁場に曝露する
- ・2群：14匹のマウスの左腹部の腫瘍(ナノ粒子を含有しない)および右腹部の腫瘍(ナノ粒子を含有する)を磁場に曝露しない
- ・3群：14匹のマウスの右腹部の腫瘍(ナノ粒子を含有する)を、連続した21日間で1日1回2時間連続して磁場に曝露する

10

【0103】

無作為化の後に治療(すなわち、磁場への曝露)を開始する。以下の表1は、治療スケジュールをまとめたものである。

【表3】

群	マウスの数	ナノ粒子		磁場への曝露		
		左の腫瘍	右の腫瘍	左の腫瘍	右の腫瘍	期間
1	8	無	有	有	無	21日間毎日2時間
2	14	無	有	無	無	-
3	14	無	有	無	有	21日間毎日2時間

20

表1：皮下にMDA-MB-231ヒト乳房腫瘍を有するマウスのための治療スケジュール

【0104】

このようにして、治療群(3群：右の腫瘍)を3種類の対照群と比較した。

- ・ナノ粒子1を含み、勾配場2を有しない群：1群(右の腫瘍)および2群(右の腫瘍)
- ・ナノ粒子1を含まず、勾配場2を有する群：1群(左の腫瘍)
- ・ナノ粒子1を含まず、勾配場2を有しない群：2群(左の腫瘍)および3群(左の腫瘍)

30

【0105】

腫瘍試料の回収

腫瘍を切除し、切断して2つの断片にする。この2つの断片を10%中性緩衝ホルマリンドで固定する。

【0106】

結果

治療群(ナノ粒子1を含み、勾配場2を有する、すなわち右の腫瘍G3)を3種類の対照群と比較した。2つの統計的に有意な変化があった(p<0.05)。

40

【0107】

一方、3種類の対照群と比較した場合、治療群の総腫瘍増殖率11/12は、より低かった(図3を参照)。治療した腫瘍のより詳細な分析を使用して、西側および東側を比較した。対照群と比較した場合、治療した腫瘍(ナノ粒子および磁場勾配を有する)において、西側11の腫瘍の活性部分の厚さが増加し、東側12の腫瘍の活性部分が減少した。

【0108】

移植後59日目(D59)に、右の腫瘍G3群(7匹のマウス)の腫瘍体積は、全ての

50

対照群（33匹のマウス）よりも非常に小さかった。治療群の中央値は529.4 mm<sup>3</sup>であり、対照群の中央値は1334 mm<sup>3</sup>である（ $p = 0.014 < 0.05$ ）。

【0109】

腫瘍に関する結果を図4Aに示し、図5Bに図式化している。

【0110】

本出願人の知識の範囲では、それは、腫瘍増殖に対して磁場勾配により生成される物理的な拘束の生体内作用の第1の証拠である。

【0111】

実施例3：動物における物理的および/または機械的な拘束による腫瘍の体積および表面積を変更する能力

【0112】

目的

本調査の目的は、皮下にMDA-MB-231ヒト乳房腫瘍を有するマウスモデルにおける磁場勾配により活性化されたナノ粒子による腫瘍の体積および表面積の減少を調べることにある。

【0113】

要約

マウスの皮膚と筋肉との間に、細胞株MDA-MB-231のヒトの細胞を皮下移植した。治療群において腫瘍が約1cmの腫瘍に到達したら、マウスを、図2に示すような特定の幾何学的形状を有する斥力モードの2つの磁石の間隙に配置した。

【0114】

実験群

1cmの大きさの腫瘍を有する79匹のマウスを4群に割り振った。

- G1'（治療群）：粒子をマウスに注射し、次いで、マウスを磁場勾配下に置く実験
- G2'（対照群）：粒子をマウスに注射するが、マウスを磁場勾配下に置かない実験
- G3'（対照群）：マウスを磁場勾配下に置くが、粒子をマウスに注射しない実験
- G4'（対照群）：粒子をマウスに注射せず、磁場勾配を使用しない群

【0115】

腫瘍細胞の注射当日を0日目（D0）とみなす。体積をmm<sup>3</sup>で計算する。

【0116】

結果

腫瘍体積 - 生体内実験

【0117】

G1'と全未治療群との比較

治療群（G1'）をG2'、G3'およびG4'を含む全未治療群と比較した。以下の表2および図8には、皮下移植された全てのマウスについて59日後に得られた結果をまとめてある。

【表4】

群	平均	中央値
治療群（G1'）	646.5	529.4
未治療群（G2'、G3' およびG4'）	1250	1334.0

表2：皮下移植されたマウスの治療群（G1'）と未治療群（G2'、G3' およびG4'）との統計結果

【0118】

p値

治療群（G1'）と他の群（未治療）との間で中央値を比較するためのウィルコクソン検定により、0.0146（ $< 0.05$ ）のp値が得られた。

【0119】

このように、磁場勾配下での磁気粒子による乳房腫瘍細胞の治療により、未治療群（G

10

20

30

40

50

2'、G3'またはG4')と比較して腫瘍体積が顕著に減少している。

【0120】

G1'と各未治療群との比較

次いで、治療群(G1')を各未治療群(G2'、G3'またはG4')と比較した。以下の表3および図6には、各群の皮下移植された全てのマウスについて60日後に得られた結果がまとめてある。

【表5】

群	平均	中央値
1'	382.862	246.010
2'	1085.634	1334.170
3'	564.826	595.840
4'	635.110	387.640

10

表3：皮下移植された全てのマウスについて59日後の治療群(G1')と各対照群(G2'、G3'またはG4')との腫瘍体積の比較

【0121】

治療群(G1')は、より小さい腫瘍体積が得られる唯一の群であることは明らかである。

【0122】

このように、本実施例により、注射可能なナノ粒子および磁場勾配を含む本医療システムは、機械的および/または物理的手段によって腫瘍体積を減少させる最良の方法であることが分かる。

20

【0123】

西側および東側の表面積 - 生体外実験

腫瘍のより細かい分析により、西側および東側を比較することができた。総表面積の測定値は、51個の腫瘍について入手可能であり、その結果を表4および図7に示す。

【表6】

変数	群	平均	中央値
西側の表面積	1'	10.937	5.582
	2'	20.594	20.795
	3'	17.320	16.456
	4'	17.084	14.784
東側の表面積	1'	7.727	4.714
	2'	23.108	24.993
	3'	21.431	17.952
	4'	18.650	12.521

30

表4：皮下移植された全てのマウスについて59日後の治療群(G1')と対照群(G2'、G3'またはG4')との西側および東側表面積の比較

40

【0124】

p値

治療群(G1')および対照群(G2'~G4')の両方を包含する群に対して、対数変換を用いて、西側および東側の表面積の一元配置分散分析を行った。

【表 7】

西側の表面積－全てのマウスに対して－全体的効果	
効果	有意性 (p 値)
群	有意 (p = 0. 0 2 1)
東側の表面積－全てのマウスに対して－全体的効果	
効果	有意性 (p 値)
群	有意 (p = 0. 0 0 4)

10

## 【 0 1 2 5 】

これらの最初の結果から、当該群が、腫瘍の西側および東側の表面積の両方に対して有意な全体的効果を有することが分かる。

## 【 0 1 2 6 】

未治療群間での p 値の比較

未治療群間でのチューキーの調整を用いた一対比較（一元配置分散分析）により、表 5 に示す結果が得られた。

【表 8】

西側の表面積－全てのマウスに対して－未治療群の比較		
比較	推定値	有意性 (p 値) (チューキーの調整)
G 2' 対 G 3'	0. 0 3 7	有意でない (p = 0. 9 7 3)
G 2' 対 G 4'	0. 1 4 1	有意でない (p = 0. 3 7 2)
G 3' 対 G 4'	0. 1 0 4	有意でない (p = 0. 7 9 9)
東側の表面積－全てのマウスに対して－未治療群の比較		
比較	推定値	有意性 (p 値) (チューキーの調整)
G 2' 対 G 3'	-0. 0 2 8	有意でない (p = 0. 9 8 8)
G 2' 対 G 4'	0. 1 5 9	有意でない (p = 0. 3 7 7)
G 3' 対 G 4'	0. 1 8 7	有意でない (p = 0. 5 7 1)

20

表 5：皮下移植された全てのマウスについて 59 日後の対照群 (G 2'、G 3' または G 4') の p 値の比較

30

## 【 0 1 2 7 】

全ての p 値が 0. 0 5 よりも高かったため、予想した通り、3つの未治療群間に有意差はない。

## 【 0 1 2 8 】

治療群 (G 1') と未治療群との p 値の比較

最後に、この 3 群の混合を実現させ、表 6 に示す対比オプションを用いて、一元配置分散分析を行う。



【表 9】

西側の表面積-全てのマウスに対して-未治療群の比較		
比較	推定値	有意性 (p 値) (チューキーの調整)
G 1' 対 (1/3 * G 2' + 1/3 * G 3' + 1/3 * G 4')	-0.344	有意 (p = 0.005)
東側の表面積-全てのマウスに対して-未治療群の比較		
比較	推定値	有意性 (p 値) (チューキーの調整)
G 1' 対 (1/3 * G 2' + 1/3 * G 3' + 1/3 * G 4')	-0.485	有意 (p = 0.001)

10

表 6 : 皮下移植された全てのマウスについて 59 日後に G 2'、G 3' および G 4' の一部を含む未治療群と比較した治療群 (G 1') の p 値

【 0 1 2 9 】

驚くべきことに、これらの結果から、治療群の表面積が未治療群 (混合されたもの) とは有意に異なることが分かる。治療群の表面積は、未治療群の表面積よりも小さい (差の推定値は、西側では - 0 . 3 4 4 対数、東側では - 0 . 4 8 5 である)。

【 0 1 3 0 】

結論

これらの結果から、本出願人が、腫瘍細胞の表現型に作用し、注射可能な粒子および外部磁場勾配によって実行される、機械的および / または物理的な拘束に曝露される腫瘍の体積および表面積を減少させることができる医療システムを発見したことが実証される。

20

【 図 1 】

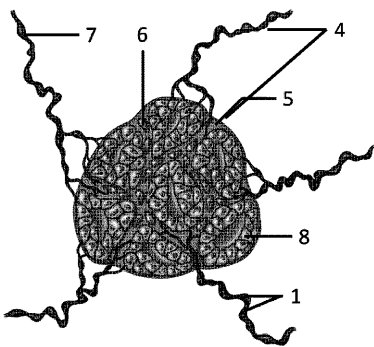


FIG. 1

【 図 2 】

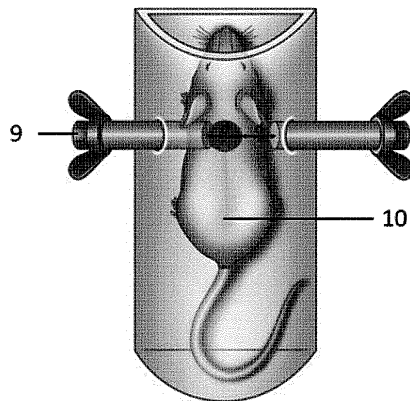
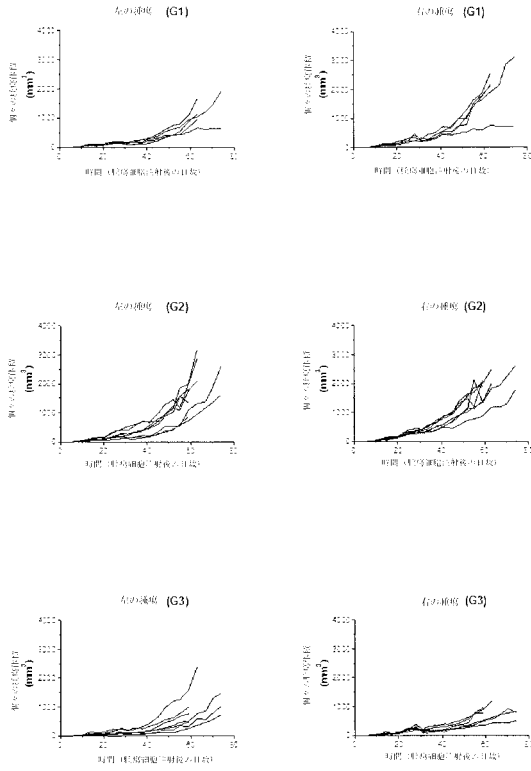


FIG. 2

【図3】



【図4A】



FIG. 4A

【図4B】

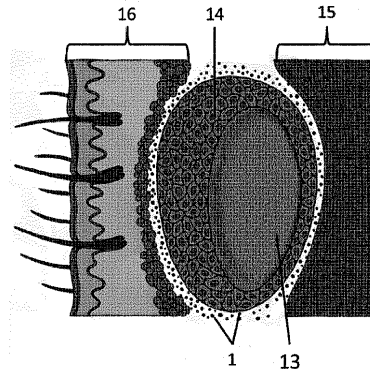
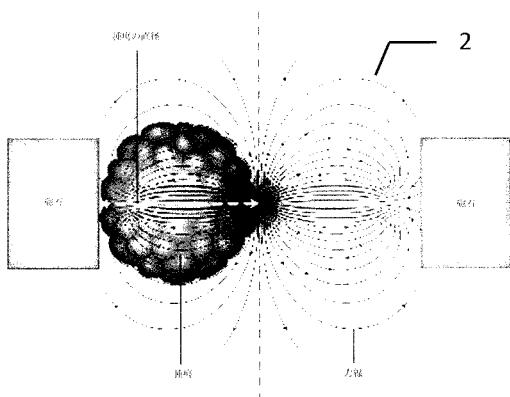
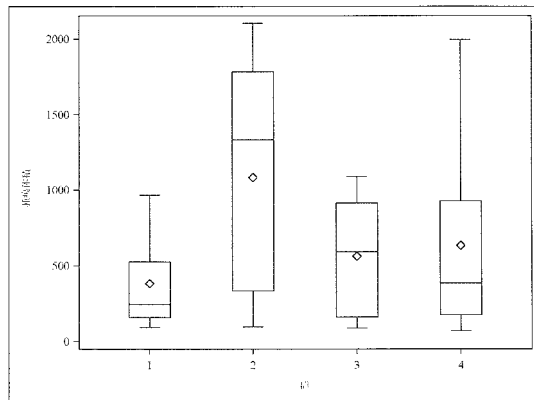


FIG. 4B

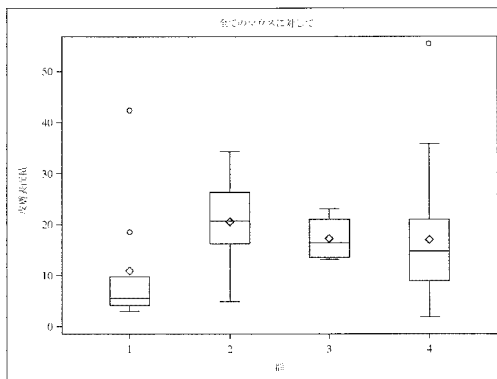
【図5】



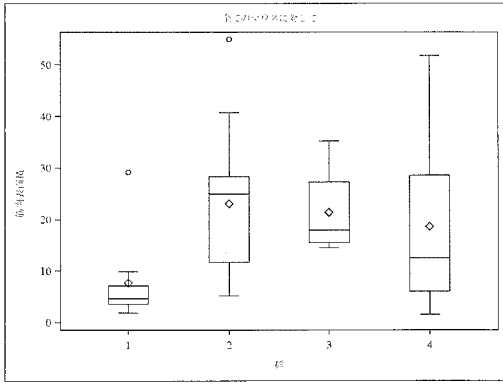
【図6】



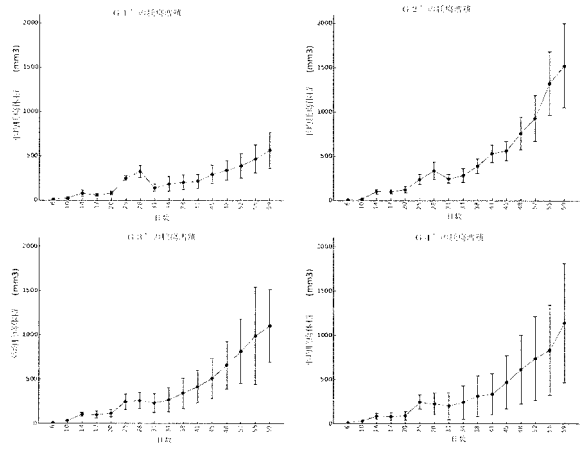
【図7A】



【 図 7 B 】



【 図 8 】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2014/064995
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. A61N1/40      A61K41/00      A61K49/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K A61N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/132214 A1 (BROSSEL REMY [FR]) 6 November 2008 (2008-11-06) example 2 figures 2-4 page 4, line 31 - page 5, line 4 page 8, line 31 - page 9, line 33 -----	1-12
X	EP 2 508 171 A1 (UNIVERSITAETSKLINIKUM ERLANGEN [DE]; UNIV FRIEDRICH ALEXANDER ER [DE]) 10 October 2012 (2012-10-10) cited in the application page 5, lines 42-47 paragraphs [0050], [0055], [0056], [0059], [0060], [0082], [0095] claims 1-3,8,12-15,21 ----- -/--	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
3 September 2014		17/09/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Vázquez Lantes, M

1

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No  
PCT/EP2014/064995

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2011/223255 A1 (THIESEN BURGHARD [DE] ET AL) 15 September 2011 (2011-09-15) cited in the application paragraphs [0048], [0049], [0128], [0194] claims 12,22  -----	1-12

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/064995

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008132214 A1	06-11-2008	EP 1988156 A1	05-11-2008
		EP 2155858 A1	24-02-2010
		US 2010204753 A1	12-08-2010
		WO 2008132214 A1	06-11-2008
-----			
EP 2508171 A1	10-10-2012	EP 2508171 A1	10-10-2012
		ES 2483124 T3	05-08-2014
-----			
US 2011223255 A1	15-09-2011	AU 2009214533 A1	20-08-2009
		CA 2712832 A1	20-08-2009
		CN 101938993 A	05-01-2011
		DE 102008008522 A1	13-08-2009
		DE 112009000905 A5	20-01-2011
		EP 2249804 A2	17-11-2010
		JP 2011511684 A	14-04-2011
		KR 20100117602 A	03-11-2010
		RU 2010136311 A	20-03-2012
		SG 188146 A1	28-03-2013
		US 2011223255 A1	15-09-2011
		WO 2009100716 A2	20-08-2009
-----			

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K	49/00 (2006.01)	A 6 1 K	49/00
A 6 1 N	2/02 (2006.01)	A 6 1 N	2/02
A 6 1 K	9/14 (2006.01)	A 6 1 K	9/14
A 6 1 K	47/36 (2006.01)	A 6 1 K	47/36

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72) 発明者 ブロッセル, レミー

フランス国, エフ - 1 3 2 8 0 ラフェル レ アルル, チェミン ドゥ ラ ポテリエ, ル マ  
1 ' ヘルミテ 3 3 1

F ターム(参考) 4C076 AA16 AA22 BB13 CC26  
4C084 AA11 MA21 MA23 MA66 NA14 ZB261 ZC781  
4C085 HH07 JJ03 KA28 KB08 LL18  
4C086 AA01 AA02 HA11 MA01 MA04 MA66 NA14 ZB26 ZC78  
4C106 AA01 AA04 BB01 BB21 CC03 EE14