

(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2014-508796

(P2014-508796A)

(43) 公表日 平成26年4月10日(2014.4.10)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
A61K 31/573 (2006.01)	A 61 K 31/573	4 C 076
A61K 31/58 (2006.01)	A 61 K 31/58	4 C 086
A61K 9/51 (2006.01)	A 61 K 9/51	
A61K 47/14 (2006.01)	A 61 K 47/14	
A61K 47/10 (2006.01)	A 61 K 47/10	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-500411 (P2014-500411)	(71) 出願人	508069752 レオ ファーマ アクティーゼルスカブ デンマーク国 デイケー 2750 バレ ラツブ インダストリパークエン 55
(86) (22) 出願日	平成24年3月23日 (2012.3.23)	(74) 代理人	100062144 弁理士 青山 葉
(85) 翻訳文提出日	平成25年11月20日 (2013.11.20)	(74) 代理人	100101454 弁理士 山田 卓二
(86) 國際出願番号	PCT/EP2012/055222	(74) 代理人	100106518 弁理士 松谷 道子
(87) 國際公開番号	W02012/127037	(74) 代理人	100156144 弁理士 落合 康
(87) 國際公開日	平成24年9月27日 (2012.9.27)		
(31) 優先権主張番号	61/467,192		
(32) 優先日	平成23年3月24日 (2011.3.24)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】脂質ナノ粒子とコルチコステロイドまたはビタミンD誘導体とを含む組成物

## (57) 【要約】

医薬組成物は、治療上の有効成分として、固体溶液または分散液として脂質ナノ粒子に取り込まれた、コルチコステロイドおよび/またはビタミンD誘導体を含み、該脂質ナノ粒子は環境温度で固体であり、融点が体温より高い第一の脂質を含み、かかる第一の脂質は、C<sub>12</sub>~<sub>24</sub>アルコールとC<sub>12</sub>~<sub>24</sub>脂肪酸のエステル、C<sub>12</sub>~<sub>24</sub>脂肪酸のグリセリルモノ-、ジ-もしくはトリエステル、C<sub>12</sub>~<sub>24</sub>脂肪アルコールおよびコレステロールからなる群から選択されるワックスであり、該脂質ナノ粒子は、環境温度で油であり第一の脂質と混和性である第二の脂質を含んでよく、そして、薬学的に許容される界面活性剤を含む。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

治療上の有効成分として、固体溶液または分散液として、脂質ナノ粒子に取り込まれたコルチコステロイドを含む医薬組成物であって、該脂質ナノ粒子は環境温度で固体であり、融点が体温より高い第一の脂質を約 60 ~ 92 重量% 含み、かかる第一の脂質は、C<sub>12</sub> ~ C<sub>24</sub> アルコールと C<sub>12</sub> ~ C<sub>24</sub> 脂肪酸のエステル、C<sub>12</sub> ~ C<sub>24</sub> 脂肪酸のグリセリルモノ-、ジ-、もしくはトリエステル、C<sub>12</sub> ~ C<sub>24</sub> 脂肪アルコールおよびコレステロールからなる群から選択されるワックスであり、該脂質ナノ粒子はさらに約 2 ~ 25 重量% の薬学的に許容される界面活性剤を含む、医薬組成物。

**【請求項 2】**

第一の脂質を脂質ナノ粒子の約 65 ~ 92 重量% または約 70 ~ 90 重量% または約 75 ~ 85 重量% または約 80 重量% 含み、界面活性剤を組成物の約 8 ~ 22 重量%、例えば約 10 ~ 20 重量% 含む、請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 3】**

第一の脂質が、パルミチン酸セチル、蜜蠟、パルミチン酸ステアリル、ベヘン酸ステアリル、モノステアリン酸グリセロール、ジステアリン酸グリセロール、ジベヘン酸グリセロール、トリミリスチン酸グリセリロール、トリパルミチン酸グリセロール、トリステアリン酸グリセロール、ベヘノール、ステアリン酸、水添パーム油、水添ココグリセリル、水素化ヒマシ油およびセトステアリルアルコールからなる群から選択される、

請求項 1 または 2 に記載の組成物。

**【請求項 4】**

界面活性剤が、ポロキサマー、ポリソルベート、糖エステル、エトキシリ化した脂肪アルコールまたはリン脂質からなる群から選択される、請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 5】**

環境温度で油であり、第一の脂質と混和性である、第二の脂質または親油性の乳化剤もしくは皮膚軟化薬を、脂質ナノ粒子の約 1 ~ 40 %、例えば約 10 ~ 30 重量% または約 15 ~ 25 重量% または約 20 重量% さらに含む、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の組成物。

**【請求項 6】**

第二の脂質が、C<sub>6</sub> ~ C<sub>10</sub> モノグリセリド、C<sub>6</sub> ~ C<sub>10</sub> ジグリセリド、ミリスチン酸イソプロピルもしくはパルミチン酸イソプロピル、中鎖トリグリセリド、例えばトリ(カプリル酸/カプリン酸)グリセリル、または、植物油、例えばヒマシ油、ヒマワリ油、サフラン油、メマツヨイグサ油、ボラージオイル、ゴマ油、トウモロコシ油、パーム核油、オリーブ油、アボカド油、なたね油、ココナッツ油、綿実油、ピーナツ油、大豆油、麦芽油、ブドウ種子油またはホホバ油を含む長鎖トリグリセリドからなる群から選択される、請求項 5 に記載の組成物。

**【請求項 7】**

第一の脂質を脂質ナノ粒子の約 75 ~ 85 重量%、第二の脂質を脂質ナノ粒子の約 15 ~ 25 重量% および、界面活性剤を脂質ナノ粒子の約 2 ~ 5 重量% 含む、

請求項 5 または 6 に記載の組成物。

**【請求項 8】**

コルチコステロイドがアムシノニド、ベタメタゾン、ブデノシド、クロベタゾール、クロベタゾン、コルチゾン、デソニド、デスオキシコルチゾン、デスオキシメタゾン、デキサメタゾン、ジフルコルトロン、ジフロラゾン、フルコルチゾン、フルメタゾン、フルニソリド、フルオシノニド、フルオシノロン、フルオロメトロン、フルプレドニソロン、フルランドレノリド、フルチカゾン、ハルシノニド、ハロベタゾール、ヒドロコルチゾン、メプレドニゾン、メチルプレドニゾン、モメタゾン、パラメタゾン、プレドニカルベート、プレドニゾン、プレドニゾロンおよびトリアムシノロンからなる群から選択されるか、またはその薬学的に許容されるエステルもしくはアセトニドである、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の組成物。

10

20

30

40

50

**【請求項 9】**

コルチコステロイドが、17-吉草酸ベタメタゾンまたは17,21-ジプロピオン酸ベタメタゾンのような、ベタメタゾンまたはそのエステルである、請求項8に記載の組成物。

**【請求項 10】**

脂質ナノ粒子が平均粒子サイズ／直径が約10～800nm、特に約50～600nm、例えば100～500nmの範囲内である、請求項1～9のいずれかに記載の組成物。

**【請求項 11】**

脂質ナノ粒子が組成物の約1～40重量%、例えば約5～30重量%、または約10～20重量%の量で存在する、請求項1～10のいずれかに記載の組成物。

10

**【請求項 12】**

さらに水相を含む、請求項1～11のいずれかに記載の組成物。

**【請求項 13】**

水相が増粘剤を含む、請求項12に記載の組成物。

**【請求項 14】**

増粘剤が、カルボマー、セルロース誘導体、例えば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、ヒドロキシエチルセルロース、ヒアルロン酸、アルギン酸、デキストランからなる群から選択されるか、またはその誘導体である、請求項13に記載の組成物。

20

**【請求項 15】**

増粘剤が、組成物の約0.1～5重量%、例えば約0.5重量%の量で存在する、請求項13または14に記載の組成物。

**【請求項 16】**

請求項1～15のいずれかに記載の組成物を製造する方法であって、

(a) コルチコステロイドを、融点が体温より高い第一の脂質を約60～92重量%含む脂質相に、溶解または分散させ、かかる第一の脂質は、C<sub>12～24</sub>アルコールとC<sub>12～24</sub>脂肪酸のエステル、C<sub>12～24</sub>脂肪酸のグリセリルジ-またはトリエステル、C<sub>12～24</sub>脂肪アルコールおよびコレステロールからなる群から選択されるワックスであり、かかる第一の脂質は溶解した状態であり、該脂質相は、約1～40重量%の、環境温度で油であり第一の脂質と混和性である、第二の脂質、または親油性の乳化剤もしくは皮膚軟化薬を含んでよく；

30

(b) 工程(a)で得られた脂質相を、ポロキサマー、ポリソルベート、糖エステルまたはエトキシリ化した脂肪アルコールからなる群から選択される、薬学的に許容される界面活性剤を0.2～10重量%含む水相に分散させ、乳化剤を形成させ、

(c) 工程(b)で得られた乳化剤を、高圧ホモジナイザーを用いてホモジナイズし、コルチコステロイドを含む脂質相のナノ粒子を形成させ、そして

(d) 工程(c)で得られた、ホモジナイズした乳化剤を冷却し、ナノ粒子を凝固させる、工程を含む、製造方法。

30

**【請求項 17】**

炎症性または過剰増殖性の皮膚疾患、例えば乾癬、湿疹、アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎、皮膚老化、光老化、ざ瘡、蕁麻疹またはそう痒症を予防または処置するための、請求項1～15のいずれかに記載の組成物。

40

**【請求項 18】**

治療上の有効成分として、脂質ナノ粒子に固体溶液または分散液として取り込まれたビタミンD誘導体を含む、局所用医薬組成物であって、該脂質ナノ粒子は環境温度で固体であり、融点が体温より高い第一の脂質を約60～92重量%含み、かかる第一の脂質は、C<sub>12～24</sub>アルコールとC<sub>12～24</sub>脂肪酸のエステル、酸価0.1以下のC<sub>12～24</sub>脂肪酸のグリセリルトリエステル、C<sub>12～24</sub>脂肪アルコールおよびコレステロールからなる群から選択されるワックスであり、該脂質ナノ粒子はさらにポロキサマーおよびエトキシリ化した脂肪アルコールから選択される、薬学的に許容される界面活性剤を約2

50

~ 22重量%含む、医薬組成物。

【請求項19】

第一の脂質を、脂質ナノ粒子の約65~90重量%、または約70~85重量%、または約75~80重量%含む、請求項18に記載の組成物。

【請求項20】

かかる第一の脂質が、パルミチン酸セチル、C<sub>14</sub>~<sub>28</sub>脂肪アルコール、水添バーム油および酸価0.1以下のトリグリセリドからなる群から選択される、請求項18または19に記載の組成物。

【請求項21】

環境温度で油であり、第一の脂質と混和性である、第二の脂質を、脂質ナノ粒子の約1~40重量%、または約10~35重量%、または約15~30重量%、または約20~25重量%さらに含む、請求項18~20のいずれかに記載の組成物。 10

【請求項22】

かかる第二の脂質が、ミリスチン酸イソプロピルまたはパルミチン酸イソプロピル、中鎖トリグリセリド、例えばトリ(カプリル酸/カプリン酸)グリセリル、または長鎖トリグリセリド、例えばヒマシ油からなる群から選択される、請求項18~21のいずれかに記載の組成物。

【請求項23】

脂質ナノ粒子が、該脂質ナノ粒子の約80~85重量%の第一の脂質、15~20重量%のかかる第二の脂質、および約2~5%の界面活性剤を含む、請求項18~22のいずれかに記載の組成物。 20

【請求項24】

かかる第一の脂質がパルミチン酸セチルであり、かかる第二の脂質がトリ(カプリル酸/カプリン酸)グリセリルである、請求項23に記載の組成物。

【請求項25】

ビタミンD誘導体がカルシポトリオール、カルシトリオール、マキサカルシトールまたはタカルシトールから選択される、請求項18~24のいずれかに記載の組成物。

【請求項26】

ビタミンD誘導体がルシポトリオールまたはカルシポトリオールー水和物である、請求項25に記載の組成物。 30

【請求項27】

脂質ナノ粒子の平均粒子サイズ/直径が約10~800nm、具体的には約50~600nm、例えば約100~500nmの範囲内である、請求項18~26のいずれかに記載の組成物。

【請求項28】

脂質ナノ粒子が組成物の1~40重量%、例えば約5~30重量%または約10~20重量%の量で存在する、請求項18~27のいずれかに記載の組成物。

【請求項29】

さらに、組成物のpHが7.5以上になるようにアルカリ性緩衝剤を含む、請求項18~28のいずれかに記載の組成物。 40

【請求項30】

該アルカリ性緩衝剤が脂質アンカーを含むアミンである、請求項31に記載の組成物。

【請求項31】

該アミンが、トリエタノールアミン、トロメタモール、モノエタノールアミンまたはジエタノールアミンから選択される、請求項30に記載の組成物。

【請求項32】

さらに水相を含む、請求項18~31のいずれかに記載の組成物。

【請求項33】

水相がさらに、シリコーン油、流動パラフィンまたはコレステロールのような皮膚軟化薬を含む、請求項12~32のいずれかに記載の組成物。 50

**【請求項 3 4】**

該皮膚軟化薬が、組成物の約 10 ~ 50 重量%、または約 20 ~ 40 重量%、または約 30 重量% の量で含まれる、請求項 3 3 に記載の組成物。

**【請求項 3 5】**

増粘剤をさらに含む、請求項 1 8 ~ 3 4 のいずれかに記載の組成物。

**【請求項 3 6】**

該増粘剤が、カルボマーまたはセルロース誘導体、例えば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、ヒドロキシエチルセルロースである、請求項 3 5 に記載の組成物。

**【請求項 3 7】**

増粘剤が、組成物の 0.1 ~ 5 重量%、具体的に約 0.5 重量% である、請求項 3 5 または 3 6 に記載の組成物。

**【請求項 3 8】**

請求項 1 8 ~ 3 7 のいずれかに記載の組成物の製造方法であって、

(a) ビタミン D 誘導体を、融点が体温より高い第一の脂質を約 60 ~ 92 重量% 含む脂質相に、融解または分散させ、かかる第一の脂質は、C<sub>12~24</sub> アルコールと C<sub>12~24</sub> 脂肪酸のエステル、酸価 0.1 以下の、C<sub>12~24</sub> 脂肪酸のグリセリルトリエステル、C<sub>12~24</sub> 脂肪アルコール、およびコレステロールからなる群から選択されるワックスであり、環境温度で油であり第一の脂質と混和性である、第二の脂質を約 1 ~ 40 重量% 含んでよく、かかる第一の脂質は融解した状態であり、

(b) 工程 (a) で得られた脂質相を、ポロキサマーまたはエトキシリ化した脂肪アルコールから選択される、薬学的に許容される界面活性剤を 0.2 ~ 10 重量% 含む水相に分散させ、

(c) 工程 (b) で得られた乳化剤を、高圧ホモジナイザーを用いてホモジナイズして、ビタミン D 誘導体を含む脂質相のナノ粒子を形成させ、そして、

(d) 工程 (c) で得られた、ホモジナイズした乳化剤を冷却して、ナノ粒子を凝固させる、

工程を含む、方法。

**【請求項 3 9】**

炎症性または過剰増殖性の皮膚症状、例えば、乾癬、脂漏性乾癬 (seborrheic dermatitis)、手掌足底膿疱症、皮膚炎、魚鱗癬、酒さ、ざ瘡または日光角化症の予防または処置のための、請求項 1 8 ~ 3 7 のいずれかに記載の組成物。

**【請求項 4 0】**

ビタミン D 誘導体の標的を毛包の脂腺とする方法であって、かかる処置を必要としている患者の皮膚領域に、請求項 1 8 ~ 3 7 のいずれかに記載の脂質ナノ粒子組成物を治療上有効量適用することを含む、方法。

**【請求項 4 1】**

処置を必要としている患者の皮膚領域が、ざ瘡または酒さに伴う、面皰、膿疱、丘疹または囊胞を含む、請求項 4 0 に記載の方法。

**【請求項 4 2】**

ビタミン D 誘導体が、カルシポトリオールまたはカルシポトリオール水和物である、請求項 4 0 または 4 1 に記載の方法。

**【請求項 4 3】**

請求項 1 ~ 1 7 および 1 8 ~ 3 7 のいずれかに記載の脂質ナノ粒子の、薬学的に許容される水性媒体中の混合物を含む、医薬組成物。

**【請求項 4 4】**

抗酸化剤をさらに含む、請求項 4 3 に記載の組成物。

**【請求項 4 5】**

該抗酸化剤が、BHA および BHT の群から選択されるか、BHA と BHT の混合物である、請求項 4 4 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、脂質ナノ粒子と、有効成分としてコルチコステロイドおよび／またはビタミンD類似体を含む組成物、該脂質ナノ粒子を製造する方法、および該組成物の、皮膚疾患および症状の処置における使用に関する。

**【背景技術】****【0002】**

アトピー性皮膚炎（A D）は、全ての子供の10～20%で発症する、乳児期で罹患率の高い、慢性的に再発性の炎症性皮膚疾患である（非特許文献1）。該疾患は、そう痒、紅斑、苔癬化、丘疹および上皮バリアの損傷を伴う皮膚乾燥および、皮膚感染のおこりやすさを特徴とする（非特許文献2）。A Dの病因は、多くは免疫異常によるとされている。しかしながら、近年のいくつかの研究結果から、A Dにおいて、皮膚バリアの欠損が、炎症プロセスならびに、皮膚内の免疫細胞に、抗原が近づくのを引き起こすのに重要であることが示されている。A Dと遺伝的なフィラグリンの欠損は有意に関係があり、皮膚バリアの破損はA Dの発病に決定的なものであることが示されている（非特許文献3）。

10

**【0003】**

現在、第一に選択されるA Dの処置は、保湿剤との組み合わせで、広い抗炎症作用および免疫抑制作用を示す、コルチコステロイドの局所適用であり、この処置は、皮膚乾燥を軽減し、バリアを回復するのを助けることができる（非特許文献2）。油の含有量が高い軟膏剤またはクリーム剤は、皮膚を水分補給した状態に保つにより効果的であり、適用する薬剤物質の浸透を促進しうるため、皮膚科医に好まれることがしばしばである（非特許文献4；非特許文献2）。しかし、これらのタイプの製剤は美容面であまり受け入れられておらず、A D患者におけるコンプライアンスの低さはこれを反映している（非特許文献5）。さらに、軟膏剤やクリーム剤といった慣用の媒体からの薬剤物質の放出や、その後の皮膚浸透は、きわめて限られており、非特異的な送達を含み、例えば、ある患者では、薬剤レベルが治療効果を誘発できない程に低い一方で、別の患者では、副作用を誘発するか、全身に浸透するようがありうる（非特許文献6）。A Dにおいて、皮膚バリアが損傷していることによって、薬剤を皮膚に標的化して送達することがさらに困難になっているが、これはバリアの状態が、皮膚内に浸透し、皮膚を通って透過する薬剤物質の量にとって重要なためである（非特許文献7；非特許文献8；非特許文献9；非特許文献10）。

20

**【0004】**

皮膚の薬剤送達を最適化する方法の一は、ナノ粒子担体を用いることである。特に、脂質からなる粒子性の担体（脂質ナノ粒子、リポソーム、マイクロおよびナノ乳化剤）は、遮蔽性の性質、皮膚浸透促進および標的化の性質を有しうるために有望である（非特許文献6）。固体脂質ナノ粒子（S L N）は、40～1000nmで、原則的にo/w型乳化剤に匹敵するが、液体油は融点が体温よりも上である脂質に置きかえられている（非特許文献11）。S L Nは、固体状態であり、サイズが小さいため、強い接着性を持ち、これは、皮膚への適用時に遮蔽性を誘発しうるものであり、また、美容的に、軟膏剤より受け入れられる（非特許文献12；非特許文献13；非特許文献14）。遮蔽性は、A Dのような皮膚疾患において、経表皮水分喪失（T E W L）を減少させ、また、皮膚バリアを物理的に回復するのに有用でありうる（非特許文献15）。

30

40

**【先行技術文献】****【非特許文献】****【0005】**

【非特許文献1】Kato, J. Dermatol. 36, 2009, pp. 367-376

【非特許文献2】Reitamo et al., Textbook of Atopic Dermatitis, 1st Ed., Informa Healthcare, London, 2008

【非特許文献3】Palmer et al., Nat. Genet. 38, 2006, pp. 441-446; Weidinger et a

50

I., J. Allergy Clin. Immunol. 118, 2006, pp. 214-219

【非特許文献 4】Wiedersberg et al., Eur. J. Pharm. Biopharm. 68, 2008, pp. 453-466

【非特許文献 5】Yentzer et al., J. Drugs Dermatol. 9, 2010, pp. 324-329

【非特許文献 6】Kortting and Schaefer-Kortting, Handbook Exp. Pharmacol., 2010, 43 5-468

【非特許文献 7】Bronaugh and Stewart, J. Pharm. Sci. 74, 1985, pp. 1062-1066

【非特許文献 8】Moon and Maibach, Exogenous Dermatoses. Environmental Dermatitis (Menne and Maibach, Eds.), CRC, Boca Raton, 1991, pp. 217-226

【非特許文献 9】Simonsen and Fullerton, Skin Pharmacol. Physiol. 20, 2007, pp. 10 230-236

【非特許文献 10】Wilhelm et al., J. Invest. Dermatol. 97, 1991, pp. 927-932

【非特許文献 11】Muller et al., Adv. Drug Del. Review 54, Suppl. 1, 2002, S131-S155

【非特許文献 12】Jenning et al., Int. J. Pharm. 199, 2000, pp. 167-177

【非特許文献 13】Santos et al., J. Drug Target., 2002, pp. 489-495

【非特許文献 14】Wissing and Muller, Eur. J. Pharm. Biophar. 56, 2003, pp. 67-72

【非特許文献 15】Keck and Schwabe, J. Biomed. Nanotechnol. 5, 2009, pp. 428-436

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0006】

乾癬は、過角化症に起因する紅斑状の乾燥した鱗屑斑として顕在化する、慢性の炎症性皮膚疾患である。鱗屑斑は肘、膝および頭皮に最もよく見られるが、身体の他の部位、特に腰仙部に、より広範囲な病変が現れる。軽度から中程度の乾癬の最も一般的な処置は、有効成分としてコルチコステロイドを含む組成物の局所適用を含む。コルチコステロイドの適用は、有効ではあるが、皮膚萎縮、皮膚線条、ざ瘡様発疹、口囲皮膚炎、皮膚真菌および細菌の過成長、有色皮膚の色素脱落および酒さのような多くの副作用があるという不利益がある。

#### 【0007】

しかしながら、長年、乾癬の有利な非ステロイド性処置には、カルシポトリオールが溶液中に存在する軟膏組成物 (LEO PharmaのDaivonex (登録商標) またはDovonex (登録商標) 軟膏として販売) またはクリーム組成物 (LEO PharmaのDaivonex (登録商標) またはDovonex (登録商標) クリームとして販売) として製剤された、ビタミンD類似体化合物であるカルシポトリオールでの局所処置があった。軟膏組成物の溶媒は、皮膚への有効成分の浸透性を高め、効果の増強をもたらすとの利点を有するが、また皮膚刺激物としても作用することが知られているプロピレンジコールである。それ故に、局所製剤において、プロピレンジコールの含有は、頻繁に患者に接触性皮膚炎を起こし (ある研究により、12.5%のプロピレンジコールに対する、多くの刺激反応が報告された、M. Hannuk sela et al., Contact Dermatitis 1, 1975, pp. 112-116参照)、プロピレンジコールを高濃度で使用した場合、刺激反応の数は増加する (J. Catanzaro and J. Graham Smith, J. Am. Acad. Dermatol. 24, 1991, pp. 90-95により概説) ことが報告されている。とりわけプロピレンジコールの存在により生じる、カルシポトリオールの皮膚への浸透が上昇しているために、Daivonex (登録商標) 軟膏は、Daivonex (登録商標) クリームよりも乾癬病変の処置に有効であることはわかっているが、また相当な割合の乾癬患者に、皮膚刺激をもたらす。

#### 【0008】

ヒトの皮膚、特に外層である角質層は、微生物の病原体および有毒化学物質の浸透に対する有効なバリアを提供する。皮膚のこの特性は一般に有益であるが、皮膚疾患を有する患者の皮膚に適用した有効成分が、大部分ではないにしても、相当量が、活性を発揮する

20

30

40

50

場所である、皮膚の生きた層(viable layers of the skin)に浸透しえない点で、医薬の経皮投与を複雑にしている。真皮および表皮への有効成分が適切に浸透することを確実にするために、典型的にアルコール、例えばエタノールまたはジオール、例えばプロピレングリコールの形の溶媒の存在下で、有効成分を溶解された状態で含むことが一般的には好ましい。上述したように、プロピレングリコールはよく知られた浸透促進剤、すなわち、角質層に浸透することができ、媒体中の治療有効成分のような低分子成分を、表皮中へ「引き込む」物質である。プロピレングリコールは、それ自体が顕著な皮膚刺激を起こす可能性があり、また、媒体中の低分子で刺激物である可能性のある成分を表皮に「引き込む」ことができ、プロピレングリコールを含む慣用の媒体の、全体的な刺激作用を誘発する。このため、炎症性皮膚疾患の処置を意図した組成物中に、溶媒としてプロピレングリコールが含まれていると、炎症反応を悪化させことがある。

10

#### 【課題を解決するための手段】

##### 【0009】

本発明の目的は、皮膚への浸透が改善され、局所用の組成物に有効成分として含まれるコルチコステロイドまたはビタミンD類似体の生物学的活性が、例えば、潜在的な刺激物質である、プロピレングリコールや他の賦形剤といった慣用的な浸透促進剤の非存在下で、市販の軟膏剤に比べて改善されている組成物を提供することである。他の目的は、遮蔽性を有するが、美容的な性質は改善されている、すなわち、軟膏よりも脂っこさが少なく、より受け入れやすい「皮膚感触」を有している組成物を提供することである。

20

##### 【0010】

ざ瘡は、毛囊脂腺濾胞に発症する、多因子性の疾患であって、皮脂産生と、皮脂腺からの皮脂の放出の増加、面皰(濾胞管中の固体化した皮脂プラグ)の形成につながる、毛囊脂腺濾胞管における過剰量の皮脂が存在することを特徴とする、皮膚の症状である。さらに、管を閉じることにより、膿疱、丘疹または囊胞が形成されるが、これらはしばしばバクテリア、特にざ瘡菌(*Propionibacterium acnes*)のコロニー形成および、局在化した炎症にさらされる。尋常性ざ瘡は10代の間で最も共通の皮膚障害であるが、20~40歳のかなりの数の大人も、ざ瘡を発症している。ざ瘡の処置のため、現在入手可能な薬剤は、過酸化ベンゾイル、アゼライン酸、局所用および全身用の抗生物質、例えばFucidin(登録商標)、クリンダマイシン、エリスロマイシンおよびテトラサイクリン、レチノイド、例えばアダパレン、トレチノイン、イソトレチノインおよびホルモン、例えばエストロゲンを含む。しかし、これらの薬物療法には、催奇性、皮膚刺激、光感作などの深刻な弱点がある。

30

##### 【0011】

発症した個人の心理社会面における否定的な結果および、ざ瘡の局所処置用の、入手可能な薬剤の数が比較的限られていること、ならびにこれらの薬剤について知られている副作用が重度のものであることから、ざ瘡の適切な治療のための新しい薬剤を提供することは非常に重要なことである。

##### 【0012】

したがって、組成物中に含有される有効成分を皮膚中の毛包に標的化することができる組成物を提供することは、本発明のさらなる目的である。ざ瘡および、酒さのような関連する障害の処置を意図している組成物の場合、濾胞に標的化することは特に興味深いことである。作用部位を有効成分の直接の標的とすることは、現在市販されている処置用の選択肢よりも、より許容性を示す、ざ瘡の治療を提供するために、皮膚刺激のような、副作用を減少させるという利点を加えうる。

40

##### 【0013】

皮膚で局所的に用いることを意図した薬剤物質の皮膚浸透は、主に3つの、以下の工程：1)該物質の媒体からの放出、2)角質層への浸透、および3)角質層から、生表皮および真皮中の標的部位への分配、を含む複雑な過程である。第一の過程は、薬剤と媒体の物理化学的な性質に依存するが、これは加工により最適化されうる。第二および第三の過程はより複雑である。薬剤物質の物理化学的な性質および媒体中の薬剤の飽和度はまた、

50

媒体と皮膚間の、薬剤物質の分配に重要であり、媒体の最適化によって影響を受けうる。しかし、さらに、皮膚への浸透の主な生物学的バリア - 角質層の状態は、皮膚疾患により影響を受ける。本発明に至る研究において、バリア損傷皮膚への局所的薬剤送達システムとしての性質について、脂質ナノ粒子を評価した。脂質ナノ粒子を、親油性化合物の皮膚への送達に適しており、遮蔽性を有する慣用的な軟膏製剤と比較した。

#### 【0014】

近年、バリア損傷皮膚を用いた試験管内試験により、SLNは軟膏剤と比較して、皮膚中に有意に高いレベルのコルチコステロイドを維持できるということが示された。この貯蔵効果は試験管内において、無傷の皮膚(intact skin)およびバリア損傷皮膚の両方で見られ、薬剤は角質層に特徴的に局在した。薬剤含有SLNの適用後における、薬剤物質の皮膚上層への特異的な局在、皮膚での貯蔵効果と、皮膚に適用した薬剤の治療上の効果の相関は十分に示されていない。脂質ナノ粒子が皮膚を遮蔽し、バリア損傷皮膚との相互作用を上昇させることによって、薬剤の有効性が上昇した組成物を提供することは、本発明の目的である。

10

#### 【0015】

したがって、本発明は、固体溶液もしくは分散液として脂質ナノ粒子内に取り込まれたコルチコステロイドを治療上の有効成分として含む、局所用の医薬組成物であって、該脂質ナノ粒子は環境温度で固体であり、融点が体温より高い、第一の脂質を約60～92重量%含み、かかる第一の脂質は、C<sub>12～24</sub>アルコールとC<sub>12～24</sub>脂肪酸のエステル、C<sub>12～24</sub>脂肪酸のグリセリルモノ-、ジ-またはトリエステル、C<sub>12～24</sub>脂肪アルコール、およびコレステロールからなる群から選択されるワックスであり、該脂質ナノ粒子はさらに、薬学的に許容される界面活性剤を約2～25重量%含む、医薬組成物に関する。

20

#### 【0016】

他の局面において、本発明は、固体溶液もしくは分散液として脂質ナノ粒子に取り込まれたビタミンD誘導体を治療上の有効成分として含む局所用医薬組成物であって、該脂質ナノ粒子は環境温度で固体であり、融点が体温より高い第一の脂質を、約60～92重量%含み、かかる第一の脂質はC<sub>12～24</sub>アルコールとC<sub>12～24</sub>脂肪酸のエステル、酸価が0.1以下であるC<sub>12～24</sub>脂肪酸のグリセリルモノ-、ジ-またはトリエステルと、C<sub>12～24</sub>脂肪アルコールおよびコレステロールからなる群から選択されるワックスであり、該脂質ナノ粒子はさらに、ポロキサマーまたはエトキシル化脂肪アルコールからなる群から選択される、薬学的に許容される界面活性剤を約2～25重量%含む、医薬組成物に関する。

30

#### 【0017】

本発明はさらに、付加した図面に記載されている。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0018】

【図1a】無傷の皮膚に、軟膏剤および3つの異なるSLNで、それぞれBMVを24時間適用した後の、皮膚の異なる層に浸透している、<sup>3</sup>H-BMVの相対量を示す。結果は回収したBMVの総量に対する相対量である。平均±SD(n=8)。

40

【図1b】バリア損傷皮膚に、軟膏剤および3つの異なるSLNで、それぞれBMVを24時間適用した後の、皮膚の異なる層に浸透している、<sup>3</sup>H-BMVの相対量を示す。結果は回収したBMVの総量に対する相対量である。平均±SD(n=8)。

【図2a】無傷の皮膚に、軟膏剤およびジステアレートSLN中で、それぞれBMVを6、16または24時間適用した後の、皮膚およびレセプター媒体へ浸透した<sup>3</sup>H-BMVの相対量を示す。結果は回収したBMVの総量に対する相対量である。平均±SD(n=6)。

【図2b】バリア損傷皮膚に、軟膏剤およびジステアレートSLN中で、それぞれBMVを6、16または24時間適用した後の、皮膚およびレセプター媒体へ浸透した<sup>3</sup>H-BMVの相対量を示す。結果は回収したBMVの総量に対する相対量である。平均±SD(

50

$n = 6$  )。

【図3 a】ジステアレートと軟膏剤でそれぞれ、24時間適用した後の、皮膚中の<sup>3</sup>H BMVの相対量を示す。SLNを曝露した皮膚はいくつかの場合には、SLNの適用後に遮蔽した。結果は回収した<sup>3</sup>H BMVの総量に対する相対量である。平均±SD ( $n = 8$ )。

【図3 b】ジステアレートと軟膏剤でそれぞれ、24時間適用した後の、レセプター媒体中の<sup>3</sup>H BMVの相対量を示す。SLNを曝露した皮膚はいくつかの場合には、SLNの適用後に遮蔽した。結果は回収した<sup>3</sup>H BMVの総量に対する相対量である。平均±SD ( $n = 8$ )。

【図4】ジステアリン酸グリセロールからなるSLN中のBDPで処理した無毛ラットの皮膚における、BDPの皮膚濃度を軟膏剤中のBDP処理と比較して示す。SLNの組成は実施例1に示す。

【図5 a】SLN中で投与したBMVの効果を、軟膏剤中のBMVと比較した試験における、耳の厚みのAUCを示す。平均±SEM ( $n = 10$ )。全ての動物は、AD表現型を誘導するために、実施例3に記載した処理スキームにしたがって、オキサゾロンで処理した。

【図5 b】用量設定試験における、耳の厚みのAUCを示す。平均±SEM ( $n = 8$ )。全ての動物は、AD表現型を誘導するために、実施例3に記載した処理スキームにしたがって、オキサゾロンで処理した。

【図6 a】感作させたマウスにおけるIL-4のレベルを示す。全ての動物は、AD表現型を誘導するために、実施例3に記載した処理スキームにしたがって、オキサゾロンで処理した。平均±SEM ( $n = 4 \sim 10$ )。

【図6 b】感作させたマウスにおけるIL-1 のレベルを示す。全ての動物は、AD表現型を誘導するために、実施例3に記載した処理スキームにしたがって、オキサゾロンで処理した。平均±SEM ( $n = 4 \sim 10$ )。

【図7 a】BMV含有脂質ナノ粒子を、オキサゾロン処理マウスの耳に適用したことにより、BMV含有軟膏剤の適用に比べて、経皮水分喪失量(TEWL)が減少したことを示すグラフ。軟膏剤との比較を示す。

【図7 b】BMV含有脂質ナノ粒子を、オキサゾロン処理マウスの耳に適用したことにより、BMV含有軟膏剤の適用に比べて、経皮水分喪失量(TEWL)が減少したことを示すグラフ。用量設定試験によるTEWLの値を示す。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0019】

###### 定義

用語「脂質ナノ粒子」は、固体脂質ナノ粒子(SLN)またはナノ構造の脂質担体(NLC)のいずれかをさすことを意図している。SLNは環境温度で固体である脂質(例えば、長鎖トリグリセリド、脂肪酸およびワックス)および界面活性剤から製造されるナノ径の粒子であり、ここに、有効成分が溶解または分散していてよい。NLCは、環境温度で固体である脂質と、環境温度で液体である脂質(油)および界面活性剤から製造されるナノ径の粒子であり、ここに有効成分は溶解または分散していてよい。脂質ナノ粒子の、粒子の大きさは、約10~800nm、例えば50~600nmまたは100~500nmであってよい。

##### 【0020】

用語「有効成分」は、ビタミンD誘導体または類似体と、コルチコステロイドから選択される治療上有効な薬剤物質をさすことを意図している。

##### 【0021】

用語「ビタミンD誘導体」は、カルシトリオールのような、ビタミンD<sub>3</sub>の生物学的に活性な代謝物またはアルファカルシドールのような、かかる代謝物質の前駆体を示すことが意図される。

##### 【0022】

10

20

30

40

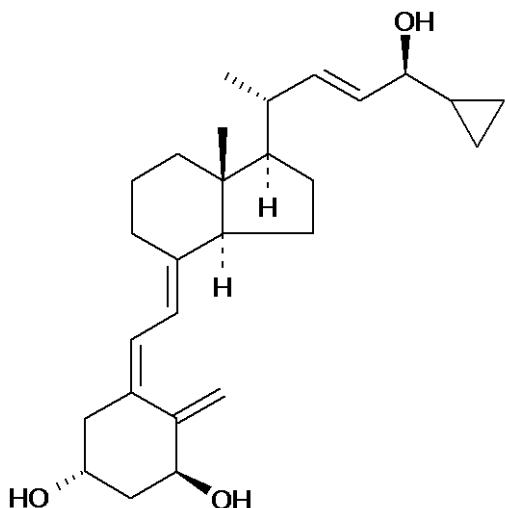
50

用語「ビタミンD類似体」は、側鎖修飾および/または骨格自体の修飾を有するビタミンD骨格を含む合成化合物を示すことが意図される。該類似体は、ビタミンDレセプターに対して、天然に存在するビタミンD化合物に匹敵する生物活性を示す。

【0023】

「カルシポトリオール」は、式

【化1】



10

20

で表される、ビタミンD類似体である。

【0024】

カルシポトリオールは、2つの結晶形態、すなわち無水物および一水和物で存在することが判明している。カルシポトリオールー水和物およびその製造はWO94/15912に開示されている。

【0025】

用語「コルチコステロイド」は、コレステロールまたはその誘導体、具体的には抗炎症効果を発揮するような誘導体から、副腎皮質において合成されるステロイド化合物をさすことを意図している。コルチコステロイドの例は、アムシノニド、ベタメタゾン、ブデノシド、クロベタゾール、クロベタゾン、コルチゾン、デソニド、デスオキシコルチゾン、デスオキシメタゾン、デキサメタゾン、ジフルコルトロン、ジフロラゾン、フルコルチゾン、フルメタゾン、フルニソリド、フルオシノニド、フルオシノロン、フルオロメトロン、フルプレドニソロン、フルランドレノリド、フルチカゾン、ハルシノニド、ハロベタゾール、ヒドロコルチゾン、メプレドニゾン、メチルプレドニゾン、モメタゾン、パラメタゾン、プレドニカルベート、プレドニゾン、プレドニゾロンおよびトリアムシノロンまたはその薬学的に許容されるエステルまたはアセトニドであるが、これらに限定されない。現在好まれるコルチコステロイドの例は、ベタメタゾンおよびそのエステル、例えば17-バレレートまたは17,21-ジプロピオネート、または17-プロピオン酸クロベタゾールである。

30

【0026】

用語「貯蔵安定性」または「貯蔵が安定である」は、組成物が、少なくとも12ヶ月、特に少なくとも18ヶ月および好ましくは少なくとも2年といったような、該組成物に商業的価値があるとするに十分な期間、冷蔵で、好ましくは室温で組成物の貯蔵を可能にする化学的および物理的安定性特性を表すことを示すことが意図される。

40

【0027】

用語「化学的安定性」または「化学的に安定している」は、典型的に2年の製品の貯蔵寿命中に分解される有効成分が、10%以下、好ましくは6%以下であることを意味することが意図される。室温での化学的安定性の近似値は、組成物を40で加速安定性試験に付することにより得られる。該試験では、組成物を40の加熱棚に置き、1ヶ月および3ヶ月時点で試料を採取し、HPLCによって、分解産物が存在するかどうか試験する

50

。40で3ヶ月時点での分解が、該物質の約10%未満であるとき、これは通常、室温で2年の貯蔵寿命に対応すると解釈される。該組成物に含まれる有効成分がカルシポトリオールである場合、「化学的安定性」は通常、カルシポトリオールが、最終医薬品において24-エピカルシポトリオールまたは他の分解産物に経時的に有意に分解しないことを示すことを意図する。

#### 【0028】

用語「物理的安定性」または「物理的に安定である」は、有効成分が、噴霧剤または媒体相から、該組成物の貯蔵寿命を通じて沈殿しないことを意味することを意図している。

#### 【0029】

用語「実質的に無水である」は、軟膏組成物中の遊離の水の含有量が該組成物の約2重量%を超えない、好ましくは約1重量%を超えないことを意味することを意図している。

#### 【0030】

用語「中鎖トリグリセリド」は、6~12個の炭素原子の鎖長の脂肪酸のトリグリセリドエステルを示すのに用いられる。かかる中鎖トリグリセリドの現在好ましい例は、例えば、商品名Miglyol 812ので入手可能なカプリル酸(C<sub>8</sub>)およびカプリン酸(C<sub>10</sub>)トリグリセリドの混合物である。

#### 【0031】

用語「半固体」は、粘弾性の挙動を示し、非ニュートン性である、すなわち、低い剪断応力下では流れないが、高剪断応力下では、室温で、可塑性、擬塑性または懶変性の流動を示す組成物または賦形剤を意味するのに用いられる。半固体組成物の典型例は、軟膏剤およびクリーム剤である。

#### 【0032】

用語「遮蔽性」は、皮膚の表面に、経表皮水分喪失を減少させ、皮膚の水分補給を引き起こすのに十分な水分補給バリアを形成する、脂質層を提供することをさすことを意図している。

#### 【0033】

用語「皮膚浸透」は、種々の皮膚の層、すなわち角質層、表皮、真皮への有効成分の拡散を意味することを意図している。

#### 【0034】

用語「皮膚透過」は、皮膚を介する全身循環へ、または下の実施例2に記載する試験管内試験の場合には、実験で用いるフランツセル装置のレセプター液への、有効成分の流動を意味することが意図される。

#### 【0035】

##### 態様

本発明の組成物において、第一の脂質は脂質ナノ粒子の約65~92重量%、もしくは約70~90重量%、もしくは約75~85重量%、もしくは約80重量%、界面活性剤は、脂質ナノ粒子の約8~22重量%、例えば約10~20重量%含んでいてよい。第一の脂質は、好ましくは、パルミチン酸セチル、蜜蠟、パルミチン酸ステアリル、ベヘン酸ステアリル、モノステアリン酸グリセロール、ジステアリン酸グリセロール、ジベヘン酸グリセロール、トリミリスチン酸グリセロール、トリパルミチン酸グリセロール、トリステアリン酸グリセロール、ベヘノール(behenol)、ステアリン酸、水添パーム油、水添ココグリセリド、水素化ヒマシ油またはセトステアリルアルコールから選択されてよい。

#### 【0036】

本発明の組成物において、界面活性剤は、親水性界面活性剤であってよく、好ましくはポロキサマー、例えばポロキサマー-188またはポロキサマー-407、ポリソルベート、例えばポリソルベート80、糖エステル(例えばステアリン酸スクロースまたはパルミチン酸スクロース)、エトキシル化脂肪アルコール、例えばポリオキシエチレンヒマシ油誘導体から選択されてよいか、または、リン脂質、例えば大豆ホスファチジルコリンまたは卵レシチンのような親油性界面活性剤であってよい。

#### 【0037】

10

20

30

40

50

さらに、脂質ナノ粒子は、約 1 ~ 40 %、例えば約 10 ~ 30 重量% または約 15 ~ 15 重量% または約 20 重量% の、環境温度で油であり第一の脂質と混和性である、第二の脂質または親油性の乳化剤（例えばポリオキシプロピレン脂肪アシルエーテル）もしくは皮膚軟化薬を含んでよい。かかる第二の脂質は、C<sub>6</sub> ~ 10 モノグリセリド、C<sub>6</sub> ~ 10 デグリセリド、ミリスチン酸イソプロピルもしくはパルミチン酸イソプロピル、中鎖トリグリセリドまたは、植物油、例えば、ヒマシ油、ヒマワリ油、サフラワー油、メマツヨイグサ油、ボラージオイル、ゴマ油、トウモロコシ油、パーム核油、オリーブ油、アボカド油、アーモンド油、なたね油、ココナッツ油、綿実油、落花生油、大豆油、麦芽油、ブドウ核油またはホホバ油を含む、長鎖トリグリセリドから選択されてよい。

## 【0038】

10

本発明の組成物は、クリーム剤（水中油型の乳化剤）、ローション剤、噴霧可能な製剤または水性ゲルであってよく、ここで、脂質ナノ粒子は典型的に、組成物の約 1 ~ 40 重量%、例えば 5 ~ 30 重量% または約 10 ~ 20 重量% 存在する。該組成物はさらに水相を含み、ここで、脂質は、特定の環境下において、組成物のゲル化を引き起こすために網状物を形成するか、または、増粘剤をここに含んでいてよい。増粘剤は、カルボマー、セルロース誘導体、例えば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、ヒドロキシエチルセルロース、ヒアルロン酸、アルギン酸、デキストランまたはその誘導体から選択されてよい。増粘剤は、典型的に、該組成物の約 0.1 ~ 5 重量%、例えば、約 0.5 重量% 存在している。該組成物はさらに、シリコーン油、流動パラフィンおよびコレステロールまたはグリセリン、アラントイン、パンテノール、ポリグリセリンまたはポリグリセリンエステルからなる群から選択されてよい、皮膚軟化薬を含んでいてよい。該皮膚軟化薬は、組成物の約 10 ~ 50 重量%、または約 20 ~ 40 重量%、約 30 重量% の量で含まれていてよい。

20

## 【0039】

有効成分は、組成物中に様々な形態で存在しててよい、すなわち、水相に溶解もしくは分散、表層の脂質 / 水相に溶解もしくは分散、または脂質ナノ粒子の、表面かコアのいずれかに、溶解もしくは分散しててよい。有効成分は脂質表面と最も結合しやすく、コアには効率良くは取り込まれないために、6 時間後での、ゼロ次の放出プロファイルおよび特異的な皮膚標的化の欠損が引き起こされることが以前にわかっている [L.B. Jensen et al., Int. J. Pharm. 390 (1), 2010, pp. 53-60]。これは、有効成分の大部分が、脂質表面に取り込まれるか、または結合する一方で、少なくともパルミチン酸セチルおよびトリパルミテート脂質ナノ粒子において、有効成分のうちのいくらかが水相に溶解もしくは分散しているという本発明の知見と一致している。脂質組成物における高い溶解度および有効成分のより効率的なカプセル化は、極性の少ない脂質に比べ、より極性を持つ脂質により達成されると、一般的に考えられている [J. Zhang および E. Smith, J. Pharm. Sci. DOI 10.1002/jps.22329, 2010]。したがって、吉草酸ベタメタゾン (B M V、モデル有効成分) の融解脂質中の溶解度試験により、脂質の極性と媒体中の溶解度との相関が示されているが、これは様々な量のモノグリセリドを含有する脂質についての、以前の知見に相当する [L.B. Jensen et al., 上記; V.V. Kumar et al., Int. J. Pharm. 335 (1-2), 2007, pp. 167-175]。様々な極性を持つ異なる脂質を用いて行った、試験管内放出試験において、脂質の極性は B M V の放出を調節することが示された [L.B. Jensen et al., 上記]。

30

## 【0040】

40

脂質の極性による効果は、脂質ナノ粒子中に製剤した有効成分の皮膚浸透にも関連があつてよく、これは、脂質ナノ粒子と皮膚脂質の相互作用が変化した結果でありうる。皮膚に近い溶解パラメーターを有する構成要素は、皮膚とよく混和する性質を持ち得、脂質溶解パラメーターをえることは、有効成分の脂質ナノ粒子からの放出を調節し、皮膚内に分配する方法でありうる [K.B. Sloan et al., J. Invest. Dermatol. 87 (2), 986 pp. 244-252]。例として、B M V の溶解パラメーターは 1.2 であり [L.B. Jensen et al., 上記]、ブタの皮膚については約 1.0 である [Z. Liron and S. Cohen, J. Pharm. Sci. 73 (

50

4), 1984, pp. 538-542]と評価されている。用いた脂質は8.7~9.5の溶解パラメーターを有していた。皮膚に最も近い、9.5の溶解パラメーターを持つ、ジステアレートからなる脂質ナノ粒子は、それ故、トリパルミテートおよびパルミチン酸セチルの脂質ナノ粒子よりも皮膚脂質とより混和する性質を持つことが期待される。B M Vはこの脂質に可溶であり、ジステアレート脂質ナノ粒子は、適用したその他の脂質ナノ粒子よりもサイズが小さく；直径が $150.9 \pm 0.12\text{ nm}$ であった。このことにより、B M Vをジステアレート脂質ナノ粒子で適用した後では、トリパルミテートおよびパルミチン酸セチル脂質ナノ粒子に比べて、皮膚中、および特に角質層におけるB M Vの量が多いことを説明しうる（参考 実施例2）。

## 【0041】

10

大きさの違いにより生じる浸透プロファイルの違いをいずれも最小化するため、脂質粒子はその平均直径において有意に異なるべきではないと意図された。平均直径は、粒子の表面面積と相関し、脂質ナノ粒子の皮膚との相互作用および皮膚への浸透ならびに遮蔽性について重要なパラメーターであると考えられる[S. Wissing et al., J. Cosmet. Sci. 52(5), 2001, pp. 313-324; R.H. Muller et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 54, Suppl. 1, 2002, S131-S155]。したがって、本発明の組成物において、脂質ナノ粒子は、10~800nm、具体的には約50~600nm、例えば100~500nmの範囲の平均直径を有してよい。例示したB M V脂質ナノ粒子（参照：実施例1）の平均直径は150~212nmの範囲内であり、P d Iは0.24より小さかった。10nmを超える粒子は、無傷の皮膚には浸透しないが、疾患にかかった皮膚は、バリアが損傷しているため、より大きなサイズの粒子（直径500~700nm）でも浸透しうると一般的に考えられている。粒子サイズの測定により、バリアが損傷した皮膚は粒子を浸透させやすいが、該粒子は無傷の皮膚には浸透できないことを示唆している。パルミチン酸セチルから作った脂質ナノ粒子は、他のタイプの脂質よりも、単分散性であったが、これはパルミチン酸セチルが異なる結晶構造を持つワックスタイプの脂質であるためである。このタイプの脂質は、物理的に優れた安定性を持つ、均一でサイズの小さな粒子をもたらすことが以前示されている [V. Jenning and S. Gohla, Int. J. Pharm. 196(2), 2000, pp. 219-222]。

20

## 【0042】

30

S L Nは無傷の皮膚に浸透することはできないが、バリア損傷皮膚については、粒子の浸透は可能であることが、サイズの測定によって示唆された。後述する実施例2で論じる、 $^{14}\text{C}$ -標識した脂質粒子および $^3\text{H}$ -標識したB M Vを用いた試験により、B M V/脂質の比は、皮膚の深層で増加し、レセプター媒体中で最大に達した。この理由により、B M Vは皮膚の深層部中の標的細胞には脂質ナノ粒子によっては送達されず、該脂質ナノ粒子はむしろ、皮膚の上層で薬剤物質の薬剤貯蔵部として働いていると結論づけられた。脂質の $^{14}\text{C}$ -標識により、脂質粒子は、無傷の皮膚およびバリア損傷皮膚の両方で、主に皮膚表面および角質にとどまることが示された。したがって、有効成分は粒子から放出されて、さらに皮膚内に拡散し、生表皮および真皮内の標的細胞に達しなければならない。

## 【0043】

40

本明細書中で、テープストリップした皮膚で示すように、バリアが強く損傷していても、脂質ナノ粒子が皮膚を透過できないのは、利点のあることであると考えられる。脂質粒子が皮膚の表面にとどまることによって、脂質ナノ粒子が皮膚の水分補給を改善するとともに、物理的にバリアを強化しうる可能性が高くなる。これは、A Dのような皮膚疾患の処置に関連性の高い性質であり、ここで、皮膚バリアの物理的な状態は、A Dの病因と関連性が高いが、これは、免疫性の皮膚バリアと相互作用するためである。

## 【0044】

50

脂質ナノ粒子は、皮膚中の多量の薬剤物質を達成できるという点で軟膏剤よりも優れていた。これは、図3の結果より明らかに見ることができる。有効成分の大部分は、無傷の皮膚およびバリア損傷皮膚の上層に見られたが、これは、脂質ナノ粒子の表面積が大きいことおよび接着性の性質によく相関がありそうなことである。さらに、該脂質ナノ粒子お

よび有効成分は、それらがそこから薬剤貯蔵物質として作用しうる場所である、毛包および皮膚小溝に浸透しうる。トリパルミテートおよびパルミチン酸セチルに比べて、ジステアレート脂質ナノ粒子を無傷の皮膚およびバリア損傷皮膚に適用した後では、角質層および表皮に、より多量の有効成分が存在したが、これは脂質の極性および粒子のサイズに関連していると考えられる(図1)。したがって、皮膚との密接な相互作用、皮膚脂質との融合および薬剤物質の制御された形での放出は、前に見られた脂質ナノ粒子の遮蔽効果に加え、浸透・促進性の性質の機構でありうる[上記R.H. Muller et al.]。

#### 【0045】

パルミチン酸セチルSLNの適用時に、無傷の皮膚の表皮ならびに、無傷の皮膚およびバリア損傷皮膚のレセプター媒体に、BMVが多量存在することは、脂質の構造が異なること、極性が低いことおよびBMV溶解度が低いことに起因しうる[上記J. Zhang and E. Smith.、上記V. Jenning and S. Gohla.]。このことにより、BMVはSLN媒体からより容易に離れ、皮膚に分配しうる。

10

#### 【0046】

B MVはバリアが無傷のとき、非常に効率よく皮膚中に維持される(図1a)が、バリアが損傷すると、軟膏剤と同様に透過する(図1b)。しかしながら、軟膏剤に比べて、バリアが損傷した皮膚中に、有効成分が多量存在することがわかった。被験脂質ナノ粒子(参照、実施例2)の最も好ましい浸透プロファイルは、ジステアレート脂質ナノ粒子により得られ、かかる脂質ナノ粒子は、最も高い有効成分の溶解度をもたらし、皮膚中に多量の、レセプター媒体に少量の有効成分を維持する上で優れていた。皮膚中の有効成分のレベルは、無傷の皮膚とバリア損傷皮膚で同等であり、このことは、かかる脂質ナノ粒子が無傷の皮膚の表面に、バリア損傷皮膚と同様に効率的に接着していたことを示唆している。

20

#### 【0047】

ジステアレートSLNを適用した6、16および24時間の間、軟膏剤に比べて、多量の有効成分が、無傷の皮膚ならびに損傷した皮膚で、皮膚内に維持される、ということわかった(図2)。24時間の間で、レセプター媒体における増加が最も小さかったことは、製剤、すなわち、皮膚内への浸透に用いられる有効成分の量が表面で枯渇していくことによって説明しうる。該有効成分は、一部は粒子内に、一部は粒子の表層に取り込まれると考えられている。この構造は、突発的な放出の後に、制御された放出が見られることに反映されていることが以前示された[E.B. Souto et al., Int. J. Pharm 278 (1), 2004, pp. 71-77; V. Jenning et al., J. Control. Release 66 (2-3), 2000, pp. 115-126]。突発的な放出によって表層が枯渇すると、粒子から皮膚へと拡散しうる有効成分の量は減少し、放出速度は低下する。かかるプロファイルが見られるもう一つの理由は、皮膚または毛包が、特にSLNに取り込まれたBMVまたは任意のBMV結晶のいずれかにより飽和するためであり、これらはそれぞれ、パルミチン酸セチルおよびトリパルミテートからなるSLN内に存在していた。毛包および汗管を通った、一過的な短絡拡散が最初に見られた後、SCを通って、定常状態で拡散しうる(R. J. Scheuplein, Mechanism of percutaneous absorption. II. Transient diffusion and the relative importance of various routes of skin penetration, J Invest Dermatol 48 (1) (1967) 79-88)。この効果は、これらの研究で見られるBMVのレベルが一定で有ることに相当しうる。したがって、該脂質ナノ粒子は、皮膚内ならびに毛包内で、貯蔵部を形成し、吸収に使用しうる有効成分を一定量維持するのに用いられる。しかし、粒子と皮膚の間の交換速度は、薬剤の取り込みのため、適用する時間により変化しうる。時間プロファイルおよびレセプター媒体中の薬剤物質の量は、薬剤物質が粒子の表層に見されることを示唆している。したがって、皮膚に適用した場合、脂質ナノ粒子は有効成分を二層性に送達する能力を有する、- すなわち、粒子の表面および水相からの突発的な放出によってはじまり、その後、脂質粒子により密接に結合する薬剤物質の角質層での貯蔵効果が見られる。

30

#### 【0048】

バリア損傷皮膚の遮蔽に伴って、BMVの浸透が有意に増加するのには、様々な理由が

40

50

あってよい。第一に、遮蔽により、角質層の水分含有量が増加することおよび脂質バリアの妨害によって、拡散係数が上昇するため、ほとんど常に皮膚に吸収される薬剤物質の量がほとんど常に増加している[J.A. Bouwstra et al., J. Recept. Signal Transduct. Res. 21(2-3), 2001, pp. 259-286]。さらに、遮蔽によって、脂質ナノ粒子中に存在する界面活性剤の、皮膚バリアへの浸透増大効果が促進しうる。遮蔽により、適用後に水が蒸発しないため、組成物と皮膚の間の薬剤の交換が影響を受けうる。バリア損傷皮膚では、遮蔽時にレセプター媒体に透過する薬剤の量が非常に多いため、これらの結果はまた、有効成分が固体粒子のコアにカプセル化されているよりも、粒子表面により結合しているということを支持している。

## 【0049】

10

別の試験において、SLN中に取り込まれたジプロピオン酸ベタメタゾン(BDP)を無毛ラットの皮膚に適用し、SLNがコルチコステロイドの皮膚への維持能を有することが示された。軟膏剤と比較すると、製剤の適用から1日後と3日後ではそれぞれ、有意に多量のBDPが皮膚内に存在し、7日後では、薬剤物質は、軟膏剤で投与した場合は全く検出できなかつたが、SLNで投与した場合はまだ検出が可能であった。

## 【0050】

20

上述したかかる型の脂質ナノ粒子は、

(a) コルチコステロイドを、融点が体温より高い第一の脂質を約60～92重量%含む脂質相に、溶解または分散させ、かかる第一の脂質は、C<sub>12～24</sub>アルコールとC<sub>12～24</sub>脂肪酸のエステル、C<sub>12～24</sub>脂肪酸のグリセリルジ-もしくはトリ-エステル、C<sub>12～24</sub>脂肪アルコールおよびコレステロールからなる群から選択されるワックスであり、かかる第一の脂質は融解した状態であり、該脂質相は、約1～40重量%の、環境温度で油であり第一の脂質と混合しうる、第二の脂質または親油性の乳化剤もしくは皮膚軟化薬を含んでよく；

(b) 工程(a)で得られた脂質相を、ポロキサマー、ポリソルベートおよびエトキシリ化した脂肪アルコールからなる群から選択される、薬学的に許容される界面活性剤を0.2～10重量%含む水相に分散させ、乳化剤を形成させ；

(c) 工程(b)で得られた乳化剤を、高圧ホモジナイザーを用いてホモジナイズし、コルチコステロイドを含む脂質相のナノ粒子を形成させ；そして

(d) 工程(c)で得られた、ホモジナイズした乳化剤を冷却し、ナノ粒子を凝固させる、

30

工程を含む方法によって製造しうる。

40

## 【0051】

この方法により製造した脂質ナノ粒子は、約100～500nmの範囲内と測定された。

## 【0052】

あるいは、脂質ナノ粒子は、

(a) コルチコステロイドを、融点が体温より高い第一の脂質を約60～92重量%含む脂質相に、溶解または分散させ、かかる第一の脂質はC<sub>12～24</sub>アルコールとC<sub>12～24</sub>脂肪酸のエステル、C<sub>12～24</sub>脂肪酸のグリセリルジ-もしくはトリ-エステル、C<sub>12～24</sub>脂肪アルコールおよびコレステロールからなる群から選択されるワックスであり、かかる第一の脂質は融解した状態であり、該脂質相は、約1～40重量%の、環境温度で油であり、第一の脂質と混合できる第二の脂質または親油性の乳化剤もしくは皮膚軟化薬を含んでよく；

40

(b) 工程(a)で得られた脂質相を、液体窒素内もしくはドライアイス上で凝固させ；

(c) 凝固させた脂質相を、約50～100μmの粒子サイズに製粉し；

(d) 工程(c)で得られた粉末を、界面活性剤を約0.2～10重量%含有する、冷却した水相内に分散させ；そして

50

(e) 工程(d)で得られた該分散液を、高圧ホモジナイザーを用いて室温あるいは室温よりも下の温度でホモジナイズし、脂質ナノ粒子を得る、

工程を含む方法により製造されうる。

## 【0053】

コルチコステロイドを含む脂質ナノ粒子組成物は、好ましくは、炎症性皮膚疾患または障害、例えば、湿疹、アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎、乾癬、皮膚老化、光老化、ざ瘡、尋麻疹またはそう痒症の処置に用いられる。

## 【0054】

他の態様において、脂質ナノ粒子はさらに、環境温度で油であり、第一の脂質と混和性である、第二の脂質または、親油性の乳化剤もしくは皮膚軟化薬を含む。第二の脂質の量は脂質ナノ粒子の約1～40重量%、例えば約10～35重量%、または約15～30重量%、または約20～25重量%である。より具体的には、脂質ナノ粒子は、約80～85重量%の第一の脂質と約15～20重量%の第二の脂質を含んでよい。10

## 【0055】

この態様において、第二の脂質は、C<sub>6</sub>～<sub>10</sub>モノグリセリド、C<sub>6</sub>～<sub>10</sub>ジグリセリド、中鎖トリグリセリド、例えばトリ(カプリル酸/カプリン酸)グリセリル、長鎖トリグリセリド、例えばヒマシ油、ミリスチン酸イソプロピルまたはパルミチン酸イソプロピルからなる群から有利に選択されてよい。

## 【0056】

ビタミンD誘導体もしくは類似体を有効成分として含む態様の一において、かかる第一の脂質は、好ましくは、パルミチン酸セチル、C<sub>14</sub>～<sub>28</sub>脂肪アルコール、水添バーム油および、酸価0.1以下のトリグリセリドからなる群から選択されてよく、このことは、ビタミンD誘導体が酸感受性であることがよく知られているため、ビタミンD誘導体の化学的安定性に対して有害な、遊離の脂肪酸の含有量が低いことを示唆している。該態様において、第一の脂質および第二の脂質を含む脂質ナノ粒子は、組成物の水相内の有害成分による分解に、薬剤化合物がさらされにくい脂質ナノ粒子に、薬剤化合物を取り込ませるため、ビタミンD誘導体の製剤化に特に好ましいことがわかっている。第一および第二の脂質を用いることで、脂質ナノ粒子に充填される薬剤が増加し、有効成分が水相に存在するのを防ぐことができる。さらに、脂質ナノ粒子が、貯蔵の間に多形変換をおこし、その結果、薬剤の排出および水相への分配を引き起こしがちでない構造を有する場合、安定性はさらに上昇する。第二の脂質は、好ましくは、ミリスチン酸イソプロピル、パルミチン酸イソプロピル、中鎖トリグリセリド、例えばトリ(カプリル酸/カプリン酸)グリセリル、または長鎖トリグリセリド、例えば、ヒマシ油から選択される。現在好ましい態様において、かかる第一の脂質はパルミチン酸セチルであり、かかる第二の脂質はトリ(カプリル酸/カプリン酸)グリセリルである。ビタミンD誘導体は、カルシポトリオール、カルシトリオール、マキサカルシトール、タカルシトールから選択されてよく、これら全ては皮膚適用についてよく知られている。20

## 【0057】

毛包を標的とすることを意図した、薬剤含有脂質ナノ粒子を含む組成物は、毛包の毛囊脂腺に存在する皮脂に近い溶解パラメーターを有する脂質を有利に含んでよい。したがって、脂質ナノ粒子内に存在する第一および/または第二の脂質の、皮脂の豊富な領域、例えば毛包への有効成分の送達に対する影響は、Hildebrand溶解係数によって決定される、賦形剤の溶解性によって説明できると考えられる (JH Hildebrand and RL Scott, *The Solubility of Non-Electrolytes*, Reinhold, New York, 1949)。モデル皮脂組成物についてのHildebrand係数 (溶解パラメーター) は、皮質が、約7.5～8 (cal/cm<sup>3</sup>)<sup>1/2</sup> のHildebrand係数を有する、全体的に無極性な、油性の物質であることを示している (参照 *Topical Drug Delivery Formulations*, Vol. 42, 1990 (*Drugs and the Pharmaceutical Science*) 中の、DW Osborne et al., 「The Influence of Skin Surface Lipids on Topical Formulations」)。皮質のHildebrand係数の、±2単位の範囲内のHildebrand係数を有する脂質は、皮質と混和性であり、それゆえに、毛囊脂腺ユニットへ送達するために、有効成分を可溶化するという目的に適していることがわかっている。他の影響要因は、脂質の融点であるが、これは、薬剤物質の放出が、溶解ならびに、皮脂と皮膚の脂質の融合によって開始しうるためである。皮脂に近い溶解パラメーターを有する脂質は、パ4050

ルミチン酸セチル、パルミチン酸ステアリルおよびベヘン酸ステアリルを含んでよい。

【0058】

カルシポトリオールは、カルシポトリオールの急速分解に関する酸性条件（水性組成物において約7.0より下のpH、または非水性の組成物において酸性の反応物質の存在下）に極めて感受性を示す物質であることが知られている。組成物の貯蔵寿命を通して物質の適切な化学的安定性を保証するために、組成物の賦形剤の1つ以上に存在し得、カルシポトリオールの化学的安定性に有害な酸性不純物を中和することができる、化合物を加えておくことが望ましいことがある。酸を中和する化合物は、好ましくはリン酸緩衝液のような緩衝剤であって、該組成物のpHが7.5以上になるように、組成物の約0.025～0.1重量%の量で含まれうる緩衝剤から選択されてよい。10 酸中和化合物は、また、脂質アンカー、すなわち、水相と脂質ナノ粒子の界面に係留される長鎖脂質鎖を有するアミンである。かかるアミンの例は、例えば、トリエタノールアミン、トロメタモール、モノエタノールアミンまたはジエタノールアミンのような第三級アミンであり、組成物中に約0.1～2重量%の量で含まれうる。

【0059】

本発明の組成物のこの態様において、脂質ナノ粒子は、組成物の約1～40重量%、例えば約5～30重量%または約10～20重量%の量で存在してよい。かかる組成物は、クリーム剤（水中油型）、ローション剤、スプレー可能な製剤または水性ゲルであってよく、該組成物はさらに水相を含む。かかる水相は、さらに脂質、例えば、シリコーン油、流動パラフィンまたはコレステロールおよび/または増粘剤を含んでよい。かかる増粘剤は、カルボマーまたはセルロース誘導体、例えば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、ヒドロキシエチルセルロースから選択されてよい。該増粘剤は、典型的には、該組成物の0.1～5重量%、具体的には0.5重量%の量で存在する。該組成物は、さらに、シリコーン油、流動パラフィンおよびコレステロールからなる群から選択されてよい、皮膚軟化薬を含んでよい。かかる皮膚軟化薬は、該組成物の約10～50重量%、または約20～40重量%、または約30重量%の量で含まれてよい。20

【0060】

この態様の組成物は、

(a) ビタミンD誘導体を、融点が体温より高い第一の脂質を約60～92重量%含む脂質相に、溶解または分散させ、かかる第一の脂質は、C<sub>12</sub>～<sub>24</sub>アルコールとC<sub>12</sub>～<sub>24</sub>脂肪酸のエステル、酸価0.1以下のC<sub>12</sub>～<sub>24</sub>脂肪酸のグリセリルトリエステル、C<sub>12</sub>～<sub>24</sub>脂肪アルコールおよびコレステロールから選択されるワックスであり、室温で油であり第一の脂質と混和性である、第二の脂質を約1～40重量%含んでよく、該第一の脂質は融解した状態であり。30

(b) 工程(a)で得られた脂質相を、ポロキサマーまたはエトキシル化した脂肪アルコールから選択される、薬学的に許容される界面活性剤を約0.2～10重量%含む水相に分散させ、

(c) 工程(b)で得られた乳化剤を、高圧ホモジナイザーを用いてホモジナイズし、ビタミンD誘導体を含む脂質相のナノ粒子を形成し、そして

(d) 工程(c)で得られた、ホモジナイズした乳化剤を冷却して、ナノ粒子を凝固させる40  
、

工程を含む方法によって製造されうる。

【0061】

この方法で製造した脂質ナノ粒子の粒子サイズは、約100～500nmの範囲内と測定された。

【0062】

あるいは、該組成物は、

(a) ビタミンD誘導体を、融点が体温より高い第一の脂質を約60～92重量%含む脂質相に、溶解または分散させ、かかる第一の脂質は、C<sub>12</sub>～<sub>24</sub>アルコールとC<sub>12</sub>～<sub>24</sub>脂肪酸のエステル、酸価0.1以下のC<sub>12</sub>～<sub>24</sub>脂肪酸のグリセリルトリエステル50

、C<sub>12</sub>～<sub>24</sub>脂肪アルコールおよびコレステロールから選択されるワックスであり、室温で油であり第一の脂質と混和性である、第二の脂質を約1～40重量%含んでよく、かかる第一の脂質は融解した状態であり、

- (b) 工程(a)で得られた脂質相を、液体窒素内またはドライアイス上で凝固させ；
  - (c) 凝固した脂質相を約50～100μmの粒子サイズに製粉し；
  - (d) 工程(c)で得られた粉末を、界面活性剤を約0.2～1.0重量%含む、冷却した水相に分散させ、そして
  - (e) 工程(d)で得られた分散液を、高圧ホモジナイザーを用いて、室温でもしくは室温より低い温度で、ホモジナイズして、脂質ナノ粒子を得る、
- 工程を含む方法により製造されうる。

10

#### 【0063】

ビタミンD誘導体または類似体を含む脂質ナノ粒子組成物は、炎症性または過剰増殖性の皮膚の症状、例えば、乾癬、脂漏性乾癬(seborrheic dermatitis)、手掌足底膿疱症、皮膚炎、魚鱗癬(ichthyosis)、酒さ、ざ瘡または日光角化症の予防または処置に使用しうる。

#### 【0064】

文献では、脂腺細胞がビタミンD受容体(VDR)を発現すること、ならびに、VDRの発現は生物学的に活性なビタミンD代謝物である1,25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>(カルシトリオール)処理によって誘導されることが記載されている。参考：C. Kramer et al, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 113, 2009, pp. 9-16。培養脂腺細胞をカルシトリオールとともにインキュベートした結果、炎症促進性のサイトカインIL-6およびIL-8の分泌が減少した。したがって、毛包を標的とすれば、ビタミンD誘導体は、ざ瘡のような脂腺の障害に治療上の効果を及ぼしうると仮定できる。さらに、ビタミンD誘導体は、ケラチノサイトの過剰増殖を減少させることが知られており、濾胞管(follicular duct)のケラチノサイトにも同様に効果をもたらすことが期待されうる。

20

#### 【0065】

カルシポトリオールのようなビタミンD類似体は、ざ瘡の処置に用いうることが以前から提唱されてきたが(参考、WO 91/12807)、該先行文献に記載されている組成物は、かかる処置には有効でないことが続いて示されていた。先行技術の組成物に有効性が見られないのは、有効成分が作用部位を標的としていないことによると考えられており、そして、現在では、ビタミンD類似体が毛包を標的とした場合、ざ瘡の処置における効力は改善されうると考えられている。

30

#### 【0066】

したがって、本発明はさらに、カルシポトリオールのようなビタミンD誘導体の標的を、毛包の脂腺とする方法であって、かかる処置を必要とする患者の皮膚領域に、上述のナノ粒子組成物を治療上有効量適用することを含む、方法に関する。より具体的には、処置を必要とする皮膚領域は、ざ瘡もしくは、関連疾患、例えば酒さに伴う面皰、膿疱、丘疹または囊胞を含む。ビタミンD誘導体は、好ましくは、カルシポトリオールまたはカルシポトリオールー水和物である。

30

#### 【0067】

さらに、コルチコステロイドとビタミンD誘導体もしくは類似体の両方を有効成分として、薬学的に許容される水性媒体内に含む、脂質ナノ粒子組成物を製剤することも期待されている。この態様において、かかる組成物は、BHAおよびBHTの群から選択されるか、BHAとBHTの混合物であつてよい、抗酸化剤を添加することにより安定化しうる。

40

#### 【実施例】

#### 【0068】

#### 実施例1

本発明の組成物

## 【表1】

17-吉草酸ベタメタゾン(BMV)を含有する固体脂質ナノ粒子

成分	組成物A (mg/g)	組成物B (mg/g)	組成物C (mg/g)	組成物D (mg/g)	組成物E (mg/g)	組成物F (mg/g)
BMV	1	1	1	0.12	0.12	1.2
ジステアリン酸 グリセロール	100	—	—	100	25	100
パルミチン酸 セチル	—	100	—	—	—	—
トリパルミチン酸 グリセロール	—	—	100	—	—	—
ポリソルベート80	25	25	25	25	4	25
水	適宜 1g					

10

20

30

## 【表2】

ジプロピオン酸ベタメタゾン(BDP)を含有する固体脂質ナノ粒子

組成物G

賦形剤(mg/g)

ユニット	mg
ジプロピオン酸ベタメタゾン	0.643
ジステアリン酸グリセロール	100
ポリソルベート80	20
リン酸二ナトリウム二水和物	10
水酸化ナトリウム(塩酸)	適量、pH 6.0
精製水	適宜 1 g

## 【0069】

カルシポトリオール水和物を含有する脂質ナノ粒子

【表3】

	組成物H	mg/g
1	カルシポトリオールー水和物	0.0522
2	パルミチン酸セチル	160
3	MCT	40
4	ポロキサマー 407	48
6	ジアゾリジニル尿素	5
7	リン酸二ナトリウム二水和物	20
8	BHA-BHT (50:50)	3
9	水酸化ナトリウム(塩酸)	適量 pH/8.0/8.5
10	精製水	適宜1g

10

20

30

【表4】

	組成物I	Mg/g
1	カルシポトリオールー水和物	0.0522
2	パルミチン酸セチル	200
3	ポロキサマー 407	48
4	ジアゾリジニル尿素	10
5	リン酸二ナトリウム二水和物	20
6	BHA-BHT (50:50)	3
7	水酸化ナトリウム(塩酸)	適量、pH 8.5
8	精製水	適宜 1 g

【表5】

	組成物J	mg/g
1	カルシポトリオールー水和物	0.0522
2	パルミチン酸セチル	160
3	MCT	40
4	カルボマー 974 P	10
5	ポロキサマー 407	48
6	ジアゾリジニル尿素	5
7	リン酸二ナトリウム二水和物	20
8	BHA-BHT (50:50)	3
9	水酸化ナトリウム (塩酸)	適量 pH /8.0/8.5
10	精製水	適宜 1 g

10

20

【表6】

	組成物K	mg/g
1	カルシポトリオールー水和物	0.0522
2	パルミチン酸セチル	200
3	ポロキサマー 407	48
5	カルボマー 974P	10
5	ジアゾリジニル尿素	10
6	リン酸二ナトリウム二水和物	20
7	BHA-BHT (50:50)	3
8	水酸化ナトリウム (塩酸)	適量、pH 8.0/8.5
9	精製水	適宜 1 g

30

【表7】

	組成物L	mg/g
1	カルシポトリオール一水和物	0,0522
2	トリステアリン酸グリセロール	80
3	ヒマシ油	20
4	ポロキサマー 407	24
5	カルボマー 974P	10
6	ジアゾリジニル尿素	5
7	リン酸二ナトリウム二水和物	20
8	BHA-BHT (50:50)	3
9	水酸化ナトリウム (塩酸)	適量、pH 8.5
10	精製水	適宜 1 g

10

【0070】

【表8】

20

	組成物M	mg/g
1	カルシポトリオール	0.0522
2	ジナサン P60	80
3	ミグリオール 812 または 分画したココナッツ油	20
4	ポロキサマー 407	24
5	カルボマー 974P	10
6	ジアゾリジニル尿素	5
7	リン酸二ナトリウム二水和物	20
8	BHA-BHT (50:50)	3
9	水酸化ナトリウム (塩酸)	適量、pH 8.5
10	精製水	適宜 1 g

30

【表9】

	組成物N	mg/g
1	カルシポトリオール一水和物	0.0522
2	ベヘノール	80
4	ポロキサマー 407	24
5	カルボマー 974P	10
6	ジアゾリジニル尿素	5
7	リン酸二ナトリウム二水和物	20
8	BHA-BHT (50:50)	3
9	水酸化ナトリウム (塩酸)	適量、pH 8.5
10	精製水	適宜 1 g

10

【0071】

カルシポトリオール一水和物とジプロピオン酸ベタメタゾンを含有する脂質ナノ粒子

【表10】

20

	組成物O	mg/g
1.	カルシポトリオール	0.0522
2.	ジプロピオン酸ベタメタゾン	0.643
3.	ジナサン 118	80
4.	ミグリオール 812	20
5.	ポロキサマー 188	20
6.	カルボマー 974P	5
7.	ジアゾリジニル尿素	5
8.	リン酸二ナトリウム二水和物	14
9.	BHA-BHT (50:50)	3
10.	水酸化ナトリウム	適量、pH 6.6
11.	精製水	適宜 1 g

30

【表11】

組成物P	mg/g
カルシポトリオール	0.0522
ジプロピオン酸ベタメタゾン	0.643
トリステアレート	100
ポロキサマー 188	10
カルボマー 974P	5
ジアゾリジニル尿素	5
リン酸二ナトリウム二水和物	14
BHA-BHT (50:50)	3
水酸化ナトリウム	適量、pH 6.6
精製水	適宜 1 g

10

20

30

【表12】

組成物Q	mg/g
カルシポトリオール	0.0522
ジプロピオン酸ベタメタゾン	0.643
ジナサン 118	80
ヒマシ油	20
ポロキサマー 188	20
カルボマー 974P	5
ジアゾリジニル尿素	5
リン酸二ナトリウム二水和物	14
BHA-BHT (50:50)	3
水酸化ナトリウム	適量、pH 6.6
精製水	適宜 1 g

40

【0072】

脂質ナノ粒子に取り込まれたカルシポトリオール（組成物H～L）は、40で3ヶ月間保存した後で、化学的に安定である（>90%）と測定された。

脂質ナノ粒子に取り込まれたカルシポトリオール（組成物H～M）は25で18ヶ月間保存した後で、化学的に安定である（>90%）と測定された。

ジプロピオン酸ベタメタゾンは、25で6ヶ月間保存した組成物Gにおいて、化学的に安定である（>90%）と測定された。

組成物Nの、25での安定性評価は現在進行中である。

脂質ナノ粒子に取り込まれたカルシポトリオールおよびジプロピオン酸ベタメタゾン（組成物O～Q）は、25で6ヶ月間保存したSLN中で、化学的に安定である（>90%）と測定された。

【0073】

製剤の調製

50

S L N の調製は、E P 6 0 5 4 9 7 に記載されているように、高熱高圧ホモジナイズによりおこなった。

端的には、B M V およびB D P を含むS L Nについて、脂質を8 0 で融解し、B M V またはB D P を、融解した脂質に、攪拌しながら溶解した。同じ温度のポリソルベート 8 0 水溶液を該脂質混合物に添加し、該混合物を、Silverson Machines Ltd. (Chesham, United Kingdom) のSilverson High Speed Mixer L4RTを用いて、6 0 0 0 rpmで2分間おだやかにホモジナイズし、粗製乳化剤を製造した。該乳化剤をAvestin Inc. (Ottawa, ON, Canada) のEmulsiFlex C5を用いて、該ホモジナイザーをJulabo TW 20ウォーターバス (Seelbach, Germany) 内に置いて温度を8 0 に保ちながら、高圧ホモジナイズした。ホモジナイズサイクルを、4サイクル適用して、該粗製乳化剤を6 0 0 barで加工した。これらの加工パラメーターは、平均粒子サイズが小さく( 2 0 0 nm )、多分散性が低いS L Nをもたらした、予備試験から選択した。S L N分散液を光から保護しながら室温で冷却し、次に、p Hを5 . 0 に調整した。  
10

B M Vを含む軟膏剤は、9 9 % ( w / w ) の白色ワセリンと1 % ( w / w ) の流動パラフィンからなり、乳鉢を用いて、B M V結晶を軟膏剤に懸濁することにより調製した。B M Vを含む全ての製剤は、使用時まで光から保護しながら、5 で保存した。

#### 【 0 0 7 4 】

カルシポトリオールを含む固体脂質ナノ粒子および、ナノ構造脂質担体の製造を、同様の方法で行った。カルシポトリオールを、高温の油の中に溶解し(N L Cの場合)、該混合物を、融解した脂質に添加した。S L Nについては、カルシポトリオールを融解した脂質に溶解し、攪拌しながら温度を8 0 に保った。ポロキサマー/水の溶液をp H 8 . 0 に調整し、温度を8 0 に加熱し、融解した脂質・薬剤混合物に添加した。プレ・乳化剤をSilverson Machines Ltd. (Chesham, United Kingdom) のSilverson High Speed Mixer L4RTを用いて調製した。次に、Avestin Inc. (Ottawa, ON, Canada) のEmulsiFlex C5を用いて、該ホモジナイザーをJulabo TW 20ウォーターバス (Seelbach, Germany) 内に置いて温度を8 0 に保ちながら、5 0 0 ~ 8 0 0 barにて高圧ホモジナイズを3サイクル行うことによって、S L N分散液を製造した。冷却しながら、S L Nを緩衝剤、保存剤および安定剤と混合し、p Hを8 . 0 または8 . 5 に調整した。製剤をカルボマーで増粘した場合は、冷却しながら、Silverson Machines Ltd. (Chesham, United Kingdom) のSilverson High Speed Mixer L4RTを用いて、段階的にカルボマーを添加することによって行い、その後、最終工程としてp Hを調整した。  
20

#### 【 0 0 7 5 】

##### 製剤の性質決定

性質決定は、製造日から0 ~ 3日後に行い、生体内試験は製造後から1週間に開始した。

#### 【 0 0 7 6 】

##### 動的光散乱法(D L S)

S L Nの粒子サイズの分析は、6 3 3 nmレーザーおよび1 7 3 ° 検出オプティクスを備えた、Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) を用いて、D L Sによって行った。測定は、測定前に、精製水で適切に希釈したサンプル ( n = 3 ) について、2 5 で行った。すなわち、水の粘度を測定に用いた。データの取得および分析には、Malvern DTS v5.10ソフトウェアを適用した。粒子サイズの分布は、多分散指数(P d I)および平均流体力学的径(Z - 平均)によって記載した。  
40

#### 【 0 0 7 7 】

##### 顕微鏡観察

B M Vの脂質への溶解度ならびに最終製剤の外見を、S L Nおよび軟膏剤の両方について、どちらもDFA Instruments (Glostrup, Denmark) の、Linkam PE94ヒーターを備えた、Nikon Eclipse 80i顕微鏡を用いて、顕微鏡的に評価した。データ取得に用いたソフトウェアは、Image Pro Plus (登録商標) である。

#### 【 0 0 7 8 】

10

20

30

40

50

## 高压液体クロマトグラフィー( H P L C )

S L N および軟膏剤を、 B M V 、 B D P およびカルシポトリオールの含有量について、それぞれ H P L C によって定量的に分析した。

### 【 0 0 7 9 】

#### S L N および軟膏剤の性質決定

D L S 分析によって、用量設定試験で試験した、4つの異なる S L N ( B M V の含有量においてのみ異なる)の平均直径は、179.9 ~ 193.6 nm で、 P d I が 0.179 ~ 0.216 であることが示された。小さい平均粒子サイズおよび低い P d I を保ちながら皮膚刺激性を低下させるために、界面活性剤と脂質の濃度を最適化することは、2.5% (w/w) ジアステレートおよび 0.4% (w/w) ポリソルベート 80 の組成物で可能であることが示された。この組成の S L N の Z - 平均は、205.4 nm で P d I は 0.228 であった。Z- 平均および P d I の値はいずれも、界面活性剤と脂質の濃度に依存していた。どちらの脂質濃度についても、界面活性剤の濃度を上昇させることにより、界面活性剤が一定のレベルになるまでは Z - 平均および P d I は低下したが、それ以降、粒子サイズがさらに低下することはなかった。

最終製剤では、 B M V は S L N 中の脂質中に溶解しており、薬剤結晶は顕微鏡観察では全く検出されなかった。軟膏剤では、 B M V 結晶 (< 25 μm) が、媒体を通じて均一に分布していた。H P L C 分析によって、 S L N 中および軟膏中の B M V の濃度が、相対標準偏差が 1.4% よりも小さい、期待値であることが示された ( 相対標準偏差が 10.3% であった、 0.003 mg/g S L N は除く ) 。このことは、 B M V が両方の型の製剤において均一に分布しており、化学的に安定であることを示している。

### 【 0 0 8 0 】

#### 実施例 2

##### 皮膚浸透試験

##### 皮膚試料の準備

ブタの耳を、 Danish Meat Trade College ( Roskilde, Denmark ) から、新しく屠殺したブタより得た。耳を -20 °C で保存し、ゆっくりと 4 °C で融解させ、剪毛し、メスを用いて耳の後ろから全層の皮膚を取り除いた。皮下組織を注意深くメスで取り除き、皮膚を適当な小片に切り、使用するまで -20 °C で冷凍した ( 14 日以内 ) 。それぞれの耳から、2つの皮膚小片を得、無傷の皮膚およびバリア損傷皮膚について、これらを比較した。

### 【 0 0 8 1 】

皮膚バリアの損傷は、 D-Squame ( 登録商標 ) tape disc ( Cuderm Corp., Dallas, USA ) を適用して、テープストリッピングを連続して 25 回行うことにより誘導した。 D-Squame ( 登録商標 ) テープ貼り付け装置 ( Cuderm Corp., Dallas, USA ) を用いて、テープに 225 g/cm<sup>2</sup> の圧力を 5 秒間かけた。皮膚をコルク板の上に小さいピンを用いてのせ、テープストリッピングを行うときに皮膚小溝の問題を克服できるように、伸ばした。この方法は、 A D の皮膚のバリアの性質をシミュレートする皮膚モデルを作った、 Simonsen らの方法から適用したものである [L. Simonsen and A Fullerton, Skin Pharmacol. Physiol. 20 (5), 2007, pp. 230-236] 。最初の試験で、新鮮な皮膚と融解した皮膚 ( n = 6 ) を、テープストリッピングを 0 、 5 、 15 、 25 および 40 回行って比較することで、新鮮な皮膚と、凍結融解した皮膚でのテープストリッピングの効果を評価した。パンチ生検を採取し、 10% (w/w) ホルマリンで固定し、次に、ヘマトキシリノン - エオシンで染色した後、顕微鏡試験を行った。

### 【 0 0 8 2 】

##### 皮膚浸透および透過試験

B M V および脂質の浸透プロファイルを評価した。<sup>3</sup> H - 標識した B M V および <sup>14</sup> C - 標識した脂質を、 B M V および脂質粒子 ( ジアステレートおよびトリパルミテート ) の無傷およびバリア損傷皮膚への浸透を試験するのに用いた。

### 【 0 0 8 3 】

フランツ型拡散セルに、真皮側がレセプター媒体 ( 拡散面積 3.14 cm<sup>2</sup> 、レシピエン

10

20

30

40

50

ト体積 1 0 ml、常に攪拌しており、温度は 3 2 ℃ に維持)に面するように皮膚をのせた。等張酢酸塩緩衝液 (pH 5.5、15 mM 酢酸ナトリウム、100 mM 塩化ナトリウム) 中のメチル - - シクロデキストリンの 1% (w/w) 溶液をレセプター媒体として用いた。皮膚を等張塩化ナトリウム溶液で 30 分間、レセプター媒体で 60 分間平衡化した後、レセプター媒体を新しくし、スパチュラを用いて、製剤 20 mg (6.4 mg 製剤/cm<sup>2</sup>) を皮膚表面に均等に適用した。適用した製剤の正確な量は、スパチュラの重さを適用の前後で量ることによって測定した。インキュベートが完了した後、皮膚を分離して分析した。全ての試験を、無傷の皮膚またはバリア損傷皮膚について行い、製剤の適用時間は、6、16 および 24 時間の間で変わった。遮蔽状態が完全なものであることを確認するために、ガラスプラグを皮膚の上にのせることで遮蔽状態を作った。適用時間が終わった後、綿パッドで皮膚をぬぐうことで、余剰の製剤を取り除いた。綿パッドおよびドナーコンパートメントの蓋から、BMV および脂質を抽出するのに、酢酸エチル 10 ml を用いた。軟膏剤から BMV を抽出するには、ヘプタン : エタノール (30 : 70) を用いた。D-Squame (登録商標) tape discs (Cuderm Corp., Dallas, USA) を用いて、皮膚損傷を誘導する場合と同じ方法で、テープストリッピングを無傷の皮膚には最大で 15 回行うことにより、角質層を除去した。バリア損傷皮膚については、テープストリッピングを最大で 3 回のみ行った。いずれの場合も、1 回目のテープストリッピングは、余剰の製剤に含んだ。角質層を除去する方法は、様々な製剤を用いた予備試験および製剤への曝露から 24 時間後における、様々な回数のテープストリッピングを用いた試験結果により確立した。しかし、それぞれ 15 回もしくは 3 回よりも少ないテープストリッピングで表皮がほぐれはじめた場合、テープストリッピングをやめ、最後の 1 回を表皮のカウントに含んだ。表皮と真皮を熱 (60℃、高湿度で 5 分間インキュベート) により分離した。適用領域の周辺の皮膚 (非適用皮膚とよぶ) を小片に切り分け、同様に、側方浸透を含んでいるか、ならびに完全な回収率を達成しているか調べるために分析した。Soluene (登録商標) 350 をテープストリップおよび皮膚試料に添加し、組織を可溶化し、薬剤物質および脂質を抽出した。50 で 24 時間インキュベートした後、Hionic-Fluor 10 ml を Soluene (登録商標) 350 試料に添加し、Packard Instrument Company (Meriden, USA) の Tri-Carb 2100 TR Liquid Scintillation Analyzer で、液体シンチレーションにより分析した。蓋および綿パッドからの抽出物およびレセプター媒体の内容物は、そのうちの 1 ml を Hionic-Fluor 10 ml に混合し、シンチレーション計測を行うことによって分析した。適当な液体 (すなわち、Hionic-Fluor と混合した、酢酸エチル、レセプター媒体、ヘプタン : エタノール (30 : 70) および Soluene (登録商標) 350) を測定のバックグラウンドとして用いた。

#### 【0084】

6、16 および 24 時間で比較する場合、24 時間の間に皮膚構造が変化することを考慮にいれて、様々な皮膚層内の BMV の量をプールした。そのため、分離方法の効率もまた変わりうる。

#### 【0085】

試験管内浸透試験は、無傷およびバリア損傷したブタの皮膚について、フランツ型拡散セル内で、SLN がどのように薬剤物質の皮膚内および皮膚を通過しての浸透プロファイルに影響を及ぼすかを評価するため、SLN 脂質組成、適用時間、遮蔽状態の有無を変化させて行った。

#### 【0086】

BMV : ジステアレートの比は、皮膚の深さに伴って上昇する、すなわち、BMV は脂質よりも多くの量が皮膚に浸透することが明らかになった。余剰の製剤中のかかる比は、約 1 であった。角質層では、かかる比は低下して 1 より小さくなり、続いて、表皮および真皮を通過すると上昇して、レセプター媒体では 3.6 の比に到達した。ジステアレートと比較すると、トリパルミテートのプロファイルはわずかに異なっており、真皮内で、脂質に対する BMV の比の減少が見られており、レセプター媒体中での比は 2.7 であり、ジステアレートの比よりも低かった。BMV / 脂質の比が皮膚の深さとともに上昇することは、脂質粒子が主に皮膚の表面または上層にとどまり、BMV が粒子から放出されて皮

10

20

30

40

50

膚内に浸透したことを示唆している。表3では、皮膚の様々な層およびレセプター媒体への、脂質の浸透データを示している。無傷の皮膚およびバリア損傷皮膚の両方において、ジアステレートの方が、トリパルミテートよりも多く表皮に到達するという傾向が見られた。皮膚がテープストリッピングによってバリアを損傷していた場合、表皮、真皮およびレセプター媒体に到達する脂質の量に増加が見られた。脂質浸透の増加(~3から7倍)は、BMVの浸透の増加(~3から60倍)に比べると非常に低く、BMVがナノ粒子から放出され、皮膚を通って個々に分散していることを強調していた。

#### 【0087】

皮膚適用後24時間時点で、SLNと軟膏剤の間で見られる主な違いは、SLNは、無傷およびバリア損傷皮膚の両方において、有意に高い量のBMVの、皮膚中の残存を引き起こしたということである(図1)。バリアが無傷の場合、SLN中で投与したBMVの大部分は、角質層に見られ、レセプター媒体内には少なかった(図1a)。SLNは、BMVを皮膚の上層に高程度で局在させ、そこからBMVを皮膚深層に分散させることができ、そして、SLNは、軟膏剤と比べて、無傷の皮膚の角質層中のより深くに、有意に多くのBMVを浸透させたと考えられる( $p < 0.05$ )。パルミチン酸セチルSLNでは、より多くのBMVが表皮に到達していた。SLNを無傷の皮膚に適用すると、無視できる量のBMV( $< 0.9\%$ )しかレセプター媒体に透過していなかったのに対し、軟膏剤を使った後では、有意に多くの( $8.4 \pm 4.0\%$ )BMVが無傷の皮膚を透過していた(図1a)。SLNまたは軟膏剤の適用の前に皮膚をテープストリッピングするに伴って、全ての製剤から、レセプター媒体へのBMVの透過が大きく上昇した(13.8~21.8%) (図3b)。軟膏剤と比較すると、SLNの適用時には、有意に多くのBMVがバリア損傷皮膚に残っていたが( $p < 0.05$ )、レセプター媒体に透過したBMVの量は同じぐらいであった(図1b)。ジステアレートSLN中でBMVを投与した後では、トリパルミテートSLNおよびパルミチン酸セチルSLNと比較して、無傷およびバリア損傷皮膚の両方において、より多くのBMVが、角質層に残存しているという傾向が見られた(図1)。

10

20

30

40

#### 【0088】

適用後24時間で得られた結果をよりよく理解するために、さらに2つのタイムポイントを試験に含めた、すなわち、6時間、16時間の時点である。これらの試験には、BMVの溶解度が高いことから、ジステアレートを選択した。適用後それぞれ6、16および24時間後で、軟膏剤を使った場合は、全てのタイムポイントにおいて、皮膚中に存在するBMVの量が有意に低く(図2)、ジステアレートSLNの適用により、皮膚中のBMVの量が恒常的および有意に増加したことが示された。バリア損傷皮膚について、レセプター媒体に透過するBMVの量はSLNで投与した場合は、24時間でごく低い程度でしか増加しなかった(図2b)。

#### 【0089】

皮膚がSLNの適用後すぐに、24時間遮蔽状態にされた場合、遮蔽状態にしなかった場合に比べて、レセプター媒体に透過したBMVの量は有意に上昇し、皮膚中の量は減少した(図3)。バリア損傷皮膚については、遮蔽に伴って、無傷の皮膚とは対照的に、レセプター媒体に透過したBMVの増加はきわめて高かった；ジステアレートSLNを適用した場合、 $65.6 \pm 15.2\%$ (図3b)。

#### 【0090】

無毛ラットにおけるジプロピオン酸ベタメタゾンの生体内経皮送達

イソフルラン麻酔下で、製剤 $100\mu\text{l}$ をラットの背中の面積 $4 \times 3\text{cm}$ に適用した。ラットを2分間そのままにし(製剤を乾燥させるため)、「バイオフィルム」として、Optiskinフィルム( $5.3 \times 7.2\text{cm}$ , URGO laboratories, France)をその領域の上に適用し、その上にFixomull strech(BSN medical, Germany)を貼った。

#### 【0091】

ラットを、投与後様々な時間間隔で死なせ、その時点で皮膚生検および血液試料を採取した。舌下の血液試料は、死なせる前に各動物から回収した。ラットは $\text{CO}_2$ で安楽死さ

50

せた。皮膚生検は適用した皮膚領域から採取した。該皮膚は、99.9%エタノールに浸したティッシュペーパーで優しく洗浄した。生検材料は重さを量り、定量分析を行うまで-80で保存した。定量分析はLC-MS/MSによって行った。

#### 【0092】

図4は、無毛ラットにSLNによって投与すると、軟膏剤に比べて、皮膚中で、高いレベルのジプロピオン酸ベタメタゾン(BDP)およびその代謝物のベタメタゾン(BOP)ならびにモノプロピオン酸ベタメタゾン(BMP)が、より長期間にわたって得られるということを示している。3日目には、皮膚中の薬剤物質のレベルが安定して高く、7日目には、軟膏剤で投与した場合には検出されなかったのに対し、薬剤物質が未だ皮膚中にある程度維持されていた。これらのデータより、SLN中でコルチコステロイドBMVを無傷およびバリア損傷したブタの皮膚に適用した場合、試験管内で見られた貯蔵効果があることが確実になった。

10

#### 【0093】

##### 実施例3

マウスアトピー性皮膚炎モデルにおける皮膚送達システムとしての、BMV含有脂質ナノ粒子の評価

##### A D 誘導

ADの表現型は、オキサゾロンに繰り返し曝露させることによって誘導した(Man et al., J. Invest. Dermatol. 128, 2008, pp. 79-86)。右耳の片側に0.8%(w/v)アセトン中オキサゾロン10μlを適用することで、マウスを感作させた(-7日目とする)。対照群は、右耳と左耳の両側をアセトン10μlで処理した。感作から7日後(0日目とする)、マウスを1回目の0.4%(w/v)アセトン中オキサゾロンに曝露した。より具体的には、マウスの右耳の片側に、0日目から21日目まで1日おきに、0.4%(w/v)オキサゾロンを10μl投与した。オキサゾロンを適用したのと同じ日に、対照群のマウスには、左耳および右耳の片側のみに、それぞれアセトン10μlを投与した。1日に一度処置するスキームを含む処理は、10日目にはじまり、試験が21日目に終わるまで続いた。以下の情報；耳の厚み、TEWL、サイトカイン分析、耳の皮膚の組織評価、耳組織および血清中のBMVの定量分析を測定した。

20

#### 【0094】

##### SLN中で投与されるBMVの用量設定

30

SLN中のBMVについての用量応答関係を明らかにし、SLNの効果を軟膏剤と比較する場合に用いる用量を確立するための最初の試験を行った。この試験では、3つの異なる濃度の、SLN中のBMVを適用した。マウス(全体で52匹)を、4~8匹の動物からなる8つの群に分け、その中に、ADを誘導せず、1日に1度、右耳および左耳の片側にアセトン10μlか、または、1日に1度、右耳の片側にプラシーボSLN5μlのいずれかで処理する、アセトン対照のマウス群(n=4)2つを含む。その他の群は、オキサゾロンでADを誘導し、1日に1度右耳の片側を、アセトン10μl(n=7)か、3.0μg/耳/日のアセトン中BMV10μl(n=6)、プラシーボSLN5μl(n=7)、0.030μg/耳/日のSLN中BMV5μl(n=8)、1.20μg/耳/日のSLN中BMV5μl(n=8)のいずれかで処理した。左耳は処理を受けなかった。

40

#### 【0095】

##### SLNおよび軟膏剤の刺激および効果

SLNの組成は、SLN媒体の、マウスの耳の皮膚への刺激作用を評価した試験において、最適化した。具体的には、界面活性剤であるポリソルベート80を評価した。様々なプラシーボ製剤を製造し、約200nmの平均粒子サイズと低い粒子多分散性(<0.25)をもたらすような至適な界面活性剤と脂質のレベルを明らかにした。さらには、この組成物の粒子は健康なマウスの耳の皮膚において何ら刺激作用をもたらすべきでなく、脂質混合物中で、十分なBMV溶解度(>0.012%(w/w))を提供するべきである。これらの判断基準を満たすSLN媒体の組成は、脂質2.5%(w/w)とポリソルベ

50

ート 80 0.4% (w/w) であるとわかった（表1）。このSLN組成物の効果を慣用的なパラフィン軟膏と比較し、健康なマウスの耳の皮膚にとって全く刺激性でないことも示された。

#### 【0096】

BMVの送達についてSLNを軟膏剤と比較するために、69匹のマウスを4~10匹の動物からなる8の群に分け、そのうちの1つの群はADを誘導していないアセトン対照群であった（n=4）。その他の群のマウスは、全てオキサゾロンでADを誘導しており、1日に1度右耳の片側を、アセトン10μl (n=8)、3.0μg/耳/日のアセトン中BMV10μl (n=8)、1.20μg/耳/日のアセトン中BMV10μl (n=10)、1.20μg/耳/日のSLN中BMV5μl (n=10)、1.20μg/耳/日の軟膏剤中BMV6μg (n=10)、プラシーボSLN5μl (n=10)およびプラシーボ軟膏剤6μg (n=9)で処理した。処理のスキームは、それ以外の点では、用量設定試験と同様のものだった。SLNはピペットで適用し、軟膏剤は、粘性が高いためスパチュラを用いた。被験製剤の組成は、表1に示す通りである。

10

#### 【0097】

##### 耳の厚み

皮膚炎症の程度をはかる尺度として右耳および左耳の厚みを、未処理の耳の厚みを内部対照として、Mitutoyo Americ Co. (Aurora, IL, USA) のデジタルマイクロメーターを用いて測定した。全ての測定は、個人による測定の変わりやすさを最小限にするために、試験を通じて同じ人物が行った。10、12、14、17、19および21日目では、処理を適用する前に測定を行った。

20

#### 【0098】

##### 経表皮水分喪失 (TEWL)

TEWLはDelfin Technologies Ltd. (Kuopio, Finland) のVapometerを用いて、皮膚バリア状態の指標として用いた。TEWLは、直径4.5mmのネイルアダプターを用いて、マウスの右耳で、20秒間で測定した（マウス1匹につき1回）。測定は、用量設定試験では、-7、10、14および20日目に、SLNを軟膏剤と比較した試験では、-7、10、13、17および20日目に、処理を適用する前に行つた。研究室内の環境相対湿度および温度は、各TEWL測定時に測定した。

30

#### 【0099】

##### エンドポイントでのサンプリング

21日目、最後の製剤適用から2時間後に、血液および右耳を全ての動物から採取した。アセトン対照の群では、両方の耳を採取した。動物はイソフルランで安樂死させ、毛細管チューブを用いて、眼から血液を採取した。血液を2.5mlのVacutainer（登録商標）バイアル内に満たし、室温で30分間静置し、その後、4°、1000Gで10分間遠心した。上清を1.4mlの非標識u-底バルクMicronics tubeに移し、定量薬剤分析を行うまで、-80°で保存した。血液を採取した後、動物を屠殺し、メスを用いて右耳を切り取った。Stiefel（登録商標）biopsy punch (Offenbach am Main, Germany) を用いて、耳の真ん中から、組織分析のために8mmの生検試料を単離し、ここから3mmの生検試料を採り、10% (v/v) の中性に緩衝したホルムアルデヒド中に保存した。8mmの生検試料をそこから取って、残っている耳組織を半分に切り、片方をテープストリッピングして薬剤濃度を分析し、もう片方はサイトカイン分析に用いた。これら両方を液体窒素で急冷し、分析を行うまで-80°で保存した。

40

#### 【0100】

##### 耳組織内のサイトカインレベル

耳組織を、Bertin Technologies (Montigny-le-Bretonneux, France) の、Cryolys冷却ユニットを備えたPrecellys（登録商標）24 tissue homogenizerを用いて、可溶化バッファー200μl中でホモジナイズした。該可溶化バッファーは、1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、0.4% (v/v) ノニルフェノキシポリエトキシルエタノール (NP40) およびRoche Diagnostics (Mannheim, Germany) のプロテアーゼ阻害剤Complete<sup>TM</sup>をPBSに溶解したも

50

のからなる。ホモジナイズの後、試料を氷上に15～30分間静置し、その後、Ole Dich Instrument makers (Hvidovre, Denmark) のMicrocentrifuge 157 MPを用いて、4、15000Gで15分間遠心した。上清をMSD(登録商標)サイトカインアッセイを行うまで-80で保存した。サイトカインの定量を行う前に、試料濃度を標準化するため、全蛋白質濃度を定量した。この定量は、Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA) のPierce(登録商標)BCA Protein Assay kitを用いて行った。プレートは、Perkin Elmer (Skovlunde, Danmark) のVICTOR<sup>TM</sup> X3 Multilabel Plate Readerを用いて読み取った。サイトカイン IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-8、IL-10、IL-12全量および耳組織内のTNF- $\alpha$ のレベルを特異的にMSD(登録商標)mouse TH1/TH2 9-plexのmulti-spot(登録商標)96-well 10 spot plateで、MSD(登録商標)Sector Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, USA) を用いて測定した。MSD(登録商標)アッセイは組織での使用に最適化した。したがって、プレートを1時間、MSD calibrator blend 150  $\mu$ lでブロックし、その後、0.05% (v/v) ポリソルベート 20 150  $\mu$ lで3回洗浄した。希釈した組織上清試料 25  $\mu$ lをプレートに添加した後、室温で2時間振盪した。その後、SULFO-TAG<sup>TM</sup>検出抗体溶液 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, USA) 25  $\mu$ lを添加し、室温で2時間インキュベートした。0.05% (v/v) ポリソルベート 20 での洗浄を3回繰り返し、最後に、MilliQ水で1:2に希釈したリードバッファー 150  $\mu$ lを添加し、プレートをMSD(登録商標)Sector Imager 6000で読みとった。

#### 【0101】

##### 耳組織および血清中のBMVの定量分析

血清および組織中のBMVの定量分析を質量分析(MS)によって行った。5 mg/ml プロティナーゼK溶液 300  $\mu$ lおよび消化緩衝液 pH 8.5 (1.58% トリス塩酸 (trizma hydrochloride)、0.029% EDTA、0.20% ドデシル硫酸ナトリウム、0.117% 塩化ナトリウム) 1700  $\mu$ lを、耳組織試料に添加し、その後、試料を20分間超音波処理して、ホモジナイズした。試料の50  $\mu$ Lをディープウェルプレートに移し、内部標準 E01271 (20 nM) を含有するメタノール 150  $\mu$ Lを添加して、沈殿化を誘導した。4000 rpm、10 で30分間遠心した後、試料を分析した。血清試料内で蛋白質を沈殿化させるため、アセトニトリル中の内部標準 100  $\mu$ lを添加した。試料および標準をそれぞれ 20  $\mu$ l、ディープウェルプレートに移した。優しく振盪した後、プレートを 10 にて、4000 rpm で30分間遠心した。試料を Waters (Milford MA, USA) のUPLCおよびApplied Biosystems (Carlsbad, CA, USA) のAPI5000 Mass Spectrometerを用いてLC-MS/MS系で分析した。Analyst (API 5000) およびWaters Acquity softwareをデータ取得および分析のために用いた。温度は 60 で、流速は 0.5 ml/分であった。2.3 分の間に移動相をメタノール:1M 酢酸アンモニウム:ギ酸:水 (900:2:0.75:100) およびメタノール:1M 酢酸アンモニウム:ギ酸:水 (50:2:0.75:95) を 0~100% で変化させて、流速勾配法を用いた。検出の限界は、皮膚試料については 11.1 ng/mg、血清試料については 0.001 ng/ml と測定された。

#### 【0102】

##### データ分析

全てのデータはMicrosoft ExcelまたはGraph Pad Prism 5.0でプロットした。統計分析はGraph Pad Prism 5.0で行った。一元配置分散分析 ( $p < 0.05$ ) の後、ニューマンケウルスもしくはダネット多重比較試験により、平均値の比較を行った。

#### 【0103】

##### ADモデル検証

慢性オキサゾロンモデルはADについての、よく検証され、許容されているモデルである (Man et al., 上記)。実際、我々の動物実験においても、AD表現型がよく誘導されていた。アセトンのみで処理した耳については、厚みに何の変化も見られなかった一方、オキサゾロンで処理した耳では、耳の厚みは増加した。予期した通り、アセトン中のBMVで処理したことにより、オキサゾロンで感作したマウスの耳の厚みは有意に減少した。

10

20

30

40

50

さらに、T E W L 値は耳の厚みと相関しており、皮膚炎症およびバリア損傷があることが確認された。したがって、T E W L 値は、オキサゾロン処理の10日の間に、 $10\text{ g/m}^2$   
 \* 時間から、 $30 \sim 35\text{ g/m}^2$  \* 時間に上昇した。サイトカイン発現は、オキサゾロンで感作した群では上昇したが、その一方、アセトンのみで処理したマウスでは影響が見られなかった。オキサゾロンで感作したマウスでは、アセトン中のB M V の処理によってサイトカインレベルが低下し、このことにより、コルチコステロイドの局所処置の効果が確認された。オキサゾロンで感作したマウスでは、組織評価によても、耳組織で顕著な炎症反応を示した。これは、アセトンのみで処理したマウスからの皮膚試料では、炎症反応の徴候を全く示さなかったとの対照的であり、またその一方で、B M V で処理したマウスは軽度の炎症の徴候のみを示したが、これは薬剤処理の有効性に相関している（データは示さない）。

10

## 【0104】

S L N および軟膏剤中のB M V による、耳の厚みの同様の減少

耳の厚みは、皮膚炎症の程度を測る尺度としても用いられるため、エンドポイントの1つとして選択した（Patrick et al., Toxicol. Appl. Pharmacol. 81, 1985, pp. 476-490; Young et al., J. Invest. Dermatol. 82, 1984, pp. 367-371）。

20

耳の厚みの計測結果から、B M V を含むS L N と軟膏剤は、耳の厚みについて同様の有意な減少を示し（ $P < 0.05$ ）、その効果は、アセトン中のB M V 対照の $1.20\text{ }\mu\text{g}/\text{耳}/\text{日}$ と同じ範囲内であることが示された（図5a）。このことは、B M V がS L N 媒体から放出され、皮膚内に浸透し、軟膏剤およびアセトン中で投与したB M V に匹敵する効果をもたらす量で、標的細胞に到達することを強く示唆している。試験管内では、S L N 中のB M V をブタの皮膚に適用すると、皮膚中、特に角質層に残存している薬剤物質の総量は、B M V を軟膏剤で投与した場合に比べて有意に高いことが、前に示された（参照；実施例2）。しかしながら、薬剤物質は、効果を発揮するためには、S L N から放出され、角質層に浸透することが必須であり、このことは、本明細書中の生体内試験において確認されている。

20

## 【0105】

用量設定試験において、耳の厚みには、顕著な用量応答効果がみられ、これは、B M V を含むS L N を、 $1.20\text{ }\mu\text{g}/\text{耳}/\text{日}$ および、 $12.0\text{ }\mu\text{g}/\text{耳}/\text{日}$ で適用すると、未処理の動物ならびにS L N プラシーボ群と比較して、耳の厚みが有意に減少している（ $P < 0.05$ ）という形で反映された（図5b）。B M V を、S L N 中、 $0.03\text{ }\mu\text{g}/\text{耳}/\text{日}$ で処理した場合には、何の効果も見られなかった。

30

## 【0106】

サイトカインレベルは、S L N および軟膏剤中のB M V において同様の効果を示す

オキサゾロンへの複数回の曝露により、皮膚炎症の、T h 1 優位な応答から、T h 2 優位な応答へのシフトが引き起こされたことが、サイトカインの発現に反映されており、これは、ヒトA Dにおいて一般的に見られることである（Kitagaki et al., J. Invest. Dermatol. 105, 1995, pp. 749-755; Kitagaki et al., J. Immunol. 159, 1997, pp. 2484-2491; Matsumoto et al., Skin Res. Technol. 10, 2004, pp. 122-129）。

40

## 【0107】

サイトカインを産生するT h 1 およびT h 2 を、ともにこの試験で評価した。用量設定試験において、S L N 中のB M V には、明確な用量応答効果が見られた、すなわち、S L N 中で適用したB M V の用量に比例して、I L - 1 、I L - 4 、I L - 8 、I L - 10 およびI L - 12 のレベルは低下した（データは示さない）。不運なことに、I L - 5 およびT N F - の濃度は、B M V 処理時に、検出できる限界を下回っていたため、これらをデータ分析に含めることはできない。オキサゾロンで感作させていないマウスにプラシーボS L N を適用すると、その後、アセトン対照と比較して、I L - 8 およびI L - 12 レベルが有意に上昇したが、これは、S L N 媒体から刺激があることを示唆している。

## 【0108】

S L N 中のB M V と、軟膏剤中のB M V を比較すると、どちらの製剤においても、B M

50

Vは、用量設定試験でも見られたように、IL-1、IL-4、IL-8、IL-10およびIL-12のレベルを低下させた。このことは、サイトカインIL-4およびIL-1の低下を示している、図6aおよび6bに例示されている。サイトカインの調節に関しては、製剤による有意な違いはなく、このことは、2つの製剤が、この点については同様に効果的であったことを示している。しかしながら、プラシーボ軟膏剤の適用後では、プラシーボSLNの適用後よりも、サイトカインのレベルが一般的に高かったことは注目すべきことであり、このことは、軟膏剤の媒体は、SLNよりも刺激が大きかったことを示唆している。

#### 【0109】

TEWLはSLNまたは軟膏剤中のBMVの投与により低下する

10

TEWLは、皮膚バリアの性質の指標として (Levin and Maibach, J. Contr. Rel. 103, 2005, pp. 291-299; Proksch et al., J. Dermatol. Sci. 43, 2006, pp. 159-169; Werner and Lindberg, Acta Derm. Venereol. 65, 1985, pp. 102-105)、また、皮膚に適用した媒体の遮蔽性を評価するのに (Loden, Acta Derm. Venereol. 72, 1992, pp. 327-330)、用いることができる。1.20 µg BMV /耳/日を適用して、SLNを軟膏剤と比較すると、いずれの製剤で処理しても、TEWL値は、対照と比較できるレベルに低下することが示された (図7a)。用量設定試験では、1.2 µg /耳/日の、SLN中のBMVのみの処理により、TEWL値の有意な低下が引き起こされた ( $P < 0.05$ ) (図7b)。皮膚にSLNを適用した以前の結果と対照的に (Jenning et al., Int. J. Pharm. 199, 2000, pp. 167-177; Santos et al., J. Drug Target. 10, 2002, pp. 489-495; Wissing and Muller, Eur. J. Pharm. Biopharm. 56, 2003, pp. 67-72)、TEWLは、プラシーボSLNまたはプラシーボ軟膏剤のいずれからも、遮蔽性の効果が見られるることは何ら示唆しなかった。TEWLは、BMVを含む製剤によってのみ低下した。遮蔽効果が現れなかったのは、測定を、製剤を適用した次の日に行ったためとも考えられる。とりわけ、マウスは連続して耳にひっかき傷をつくり、洗浄していたために、このときまでに、製剤が、遮蔽性を誘導できるだけの量で皮膚中に存在しなくなっていた可能性がある。したがって、BMVを含有する製剤の投与後で、TEWLが低下したのは、BMVの治療上の効果、特に、皮膚表面からの水分の蒸発を減少させうる血管収縮性の効果に関連していると考えられる (Kolbe et al., Skin Re. Technol. 7, 2001, pp. 73-77)。

20

#### 【0110】

SLNは皮膚中のBMVの量を増加させる

30

21日目の最後の適用から2時間後に、皮膚および血清中のBMVの濃度を分析した。SLNと軟膏剤の比較から、SLNの適用後では、軟膏中のBMVの適用後よりも、BMVの皮膚濃度は有意に高かった (5倍)。血清中のBMVの濃度は、1.20 µg /耳/日のSLN、軟膏剤およびアセトン対照について同じぐらいであった (図8)。用量設定試験により、血清中のBMVのレベルは、12.0 µg /耳/日の、BMV含有SLNと、3.0 µg /耳/日のアセトン中のBMVの適用で、同等のものであった (図8)。しかしながら、皮膚中のレベルは、12 µg /耳/日のBMV含有SLNが、3.0 µg /耳/日のアセトン中のBMVよりも高かった。0.03 µg /耳/日のSLNでは、血清中で測定ができず、皮膚中には非常に低いレベルのBMVが存在していた。このことにより、この製剤ではどちらにも何の効果もなかったことが説明される。

40

#### 【0111】

耳の厚み、TEWLおよび耳組織のサイトカインレベルは、対照を含む、適用した様々な製剤により達成される皮膚濃度とともに、BMVが経皮的に浸透し、局所的に効果を発揮したことを示唆している。しかしながら、血清濃度を解釈する際に、マウスの耳にひっかき傷をつくり、洗浄している際に、マウスがBMVを経口で摂取しているという可能性を除外することはできない。

SLNの適用後に、皮膚中により多くのBMVが見られたことは、SLNが軟膏剤に比べてより強力に皮膚に接着し、皮膚貯蔵部をつくりだすことができるることを示唆しうる。この効果は、試験管内においても、BMV含有SLNを軟膏剤と比較した際に見られた (

50

参考：実施例2）。本試験では、残っている角質層および／または生表皮に残存している薬剤物質の量の増加を引き起こすのに加え、薬剤物質が、SLNから、慣用的な製剤およびアセトン対照と同様の効果をもたらす程度で、標的部位に到達したことも示された。マウスADモデルにおいて、シクロスボリンAをSLNまたは油のどちらかで適用して効果を比較した、別の生体内試験においても、同様の結果が見られた。SLN中のシクロスボリンAは、油よりも効果的であったこと、ならびに、皮膚の角質層中の薬剤物質の量がSLNの使用によって有意に増加したことが示された（Kim et al., Pharmazie 64, 2009, pp. 510-514）。湿疹患者で行われた別の試験によって、SLN内に取り込まれたプロピオニ酸クロベタゾールは、皮膚貯蔵効果をもたらし、市販のクリーム剤に比べて効力が優れていることが示された（Kalariya et al., Indian J. Exp. Biol., 2005, pp. 233-240）。

10

## 【0112】

## 実施例4

ブタの耳の皮膚は無傷のもののみを用いたこと、ならびに、レセプター媒体を4%BSAで置きかえたこと以外は、実施例2に記載したように組成物H、L、J、M、Nを用いて、皮膚浸透および透過試験を行った。これらの試験から得られた結果により、脂質ナノ粒子は、クリーム剤と比較して、角質層および、特に生皮膚（viable skin）中に維持されることが示された。さらに、脂質ナノ粒子を適用した場合、皮膚を通じてレセプター媒体まで透過した薬剤物質はごく少量であった。

【図1a】

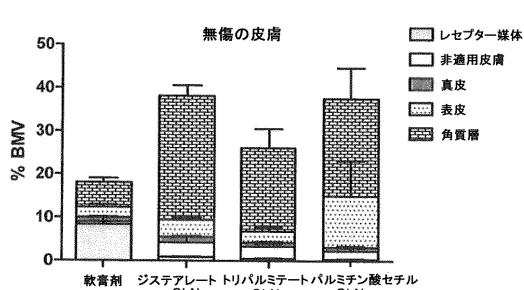


Figure 1a

【図1b】

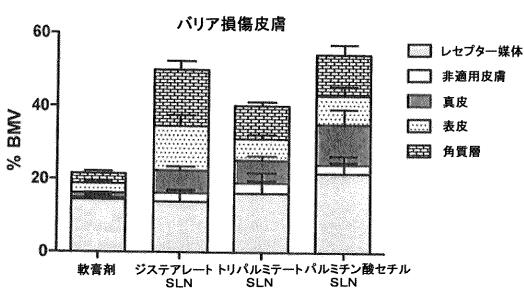


Figure 1b

【図2a】

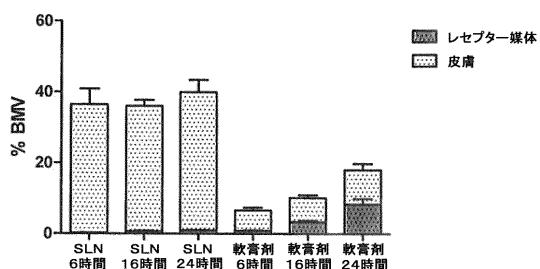


Figure 2a

【図2b】

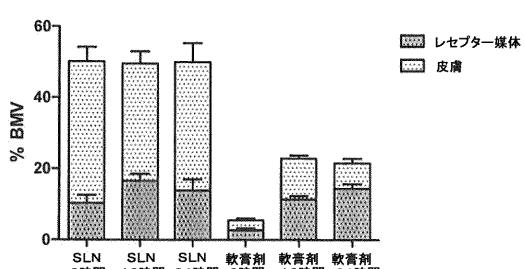


Figure 2b

【図3a】

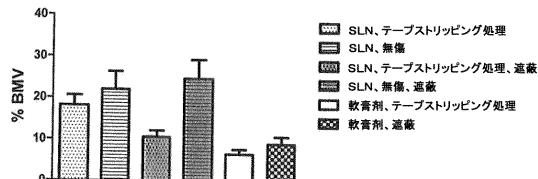


Figure 3a

【図3b】

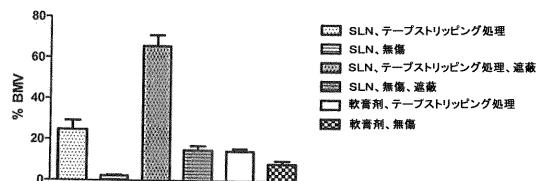


Figure 3b

【図4】

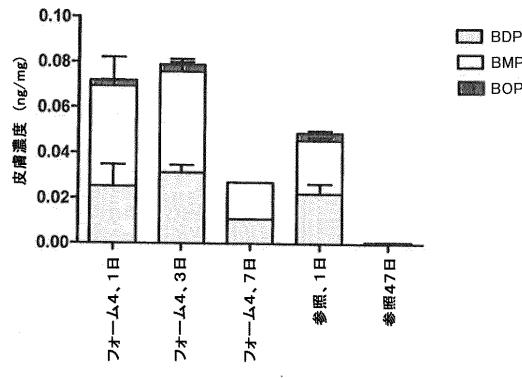


Figure 4

【図5a】

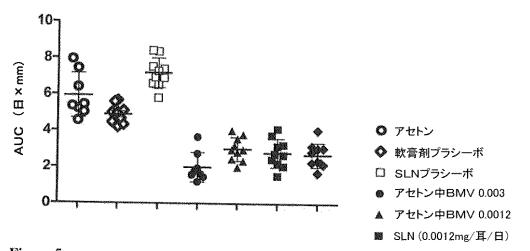


Figure 5a

【図5b】

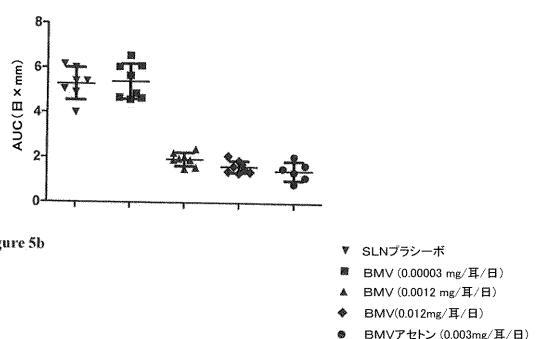


Figure 5b

【図6b】

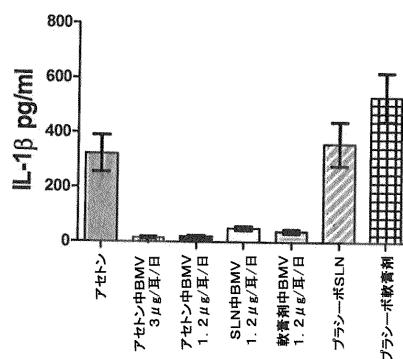


Figure 6b

【図6a】

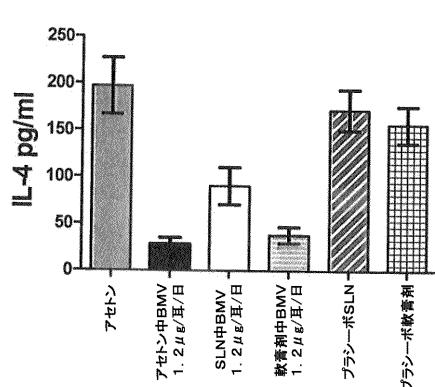


Figure 6a

【図7a】

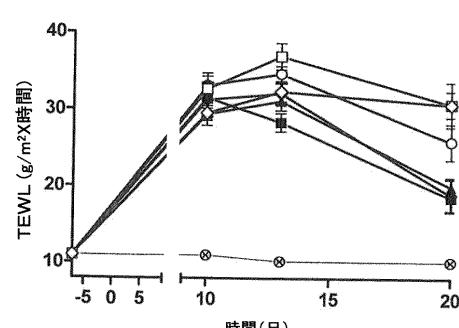


Figure 7a

SLNを軟膏剤と比較する試験中のTEWL値  
 ○ アセトン(AD誘導なし), ○ アセトン(AD誘導あり)  
 ▲ アセトン中BMV1.2μg/耳/日, ■ SLN中BMV1.2μg/耳/日, ◇ 軟膏剤中BMV1.2μg/耳/日,  
 □ SLNブラシーポ, ◇ 軟膏剤ブラシーポ 平均±SEM (n=4~10)

【図 7 b】

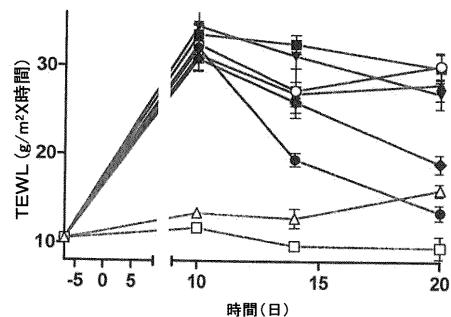


Figure 7b

用量設定試験におけるTEWL値。▼ SLNブリシーボ、○アセトン、■ SLN中BMV0.03 μg/耳/日、▲ SLN中BMV1.2 μg/耳/日、◆SLN中BMV12 μg/耳/日、●アセトン中BMV3 μg/耳/日、△ SLN(AD誘導なし)、○アセトン(AD誘導なし) 平均±SEM(n=4~8)

【図 8】

21日目において、処理を適用してから2時間後の皮膚および血清のBMV濃度。  
濃度は平均±SEMで表す。

試験	媒体	動物数	適用したBMV μg/耳/日	皮膚濃度 μM	血清濃度 μM
用量設定	アセトン	6	3.0	11.02 ± 2.06	0.015 ± 0.002
用量設定	SLN	8	0.03	0.11 ± 0.01	-
用量設定	SLN	8	1.2	1.84 ± 0.31	0.003 ± 0.001
用量設定	SLN	8	12.0	45.16 ± 3.78	0.017 ± 0.005
効果	アセトン	8	3.0	34.84 ± 2.91	0.035 ± 0.029
効果	アセトン	10	1.2	11.17 ± 0.98	0.016 ± 0.001
効果	SLN	10	1.2	16.47 ± 0.88	0.022 ± 0.007
効果	軟膏剤	10	1.2	3.00 ± 0.37	0.011 ± 0.001

Figure 8

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				
				International application No PCT/EP2012/055222
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. A61K9/51 A61K9/06 A61K31/573 A61K31/593 A61P17/00 A61P3/02 A61K9/00 <b>ADD.</b> <small>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</small>				
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> <small>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)</small> <b>A61K</b>				
<small>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</small>				
<small>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)</small> <b>EPO-Internal, WPI Data</b>				
<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	SIVARAMAKRISHNAN R ET AL: "Glucocorticoid entrapment into lipid carriers - characterisation by parelectric spectroscopy and influence on dermal uptake", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 97, no. 3, 7 July 2004 (2004-07-07), pages 493-502, XP004519513, ISSN: 0168-3659, DOI: 10.1016/J.JCONREL.2004.04.001 the whole document -----	1-17, 43-45		
X	US 2009/298801 A1 (WILLCOX NATHALIE [FR] ET AL) 3 December 2009 (2009-12-03) claims 1-17 -----	18-42		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<small>* Special categories of cited documents :</small> *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				
<small>*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</small> <small>*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</small> <small>*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</small> <small>*&amp;* document member of the same patent family</small>				
Date of the actual completion of the international search  30 October 2012		Date of mailing of the international search report  07/11/2012		
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Schneider, Aurore		

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/EP2012/055222

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
  
  
  
2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
  
  
  
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
  
  
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP2012/ 055222

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-17(completely); 43-45(partially)

A pharmaceutical composition comprising, as a therapeutically active ingredient, a corticosteroid incorporated as a solid solution or dispersion in lipid nanoparticles, said lipid nanoparticles being solid at ambient temperature and comprising about 60-92% by weight of a first lipid with a melting point above body temperature, said first lipid being a wax selected from the group consisting of esters of C12-24 alcohols and C12-24 fatty acids, glyceryl mono-, di- or triesters of C12-24 fatty acids, C

---

2. claims: 18-42(completely); 43-45(partially)

A topical pharmaceutical composition comprising, as a therapeutically active ingredient, a vitamin D derivative incorporated as a solid solution or dispersion in lipid nanoparticles, said lipid nanoparticles being solid at ambient temperature and comprising about 60-92% by weight of a first lipid with a melting point above body temperature, said first lipid being a wax selected from the group consisting of esters of C12-24 alcohols and C12-24 fatty acids, glyceryl triesters of C12-24 fatty acids with an acid value of 0.1 or less, C12-24 fatty alcohols, and cholesterol, said lipid nanoparticles further comprising about 2-22% by weight of a pharmaceutically acceptable surfactant selected from the group consisting of poloxamers and ethoxylated fatty alcohols, and a method of preparing the composition.

---

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/055222

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2009298801	A1 03-12-2009	AR 064077 A1	11-03-2009
		AU 2007327368 A1	05-06-2008
		CA 2670601 A1	05-06-2008
		CN 101541304 A	23-09-2009
		EP 2101726 A2	23-09-2009
		FR 2909284 A1	06-06-2008
		JP 2011504870 A	17-02-2011
		KR 20090084898 A	05-08-2009
		RU 2009124913 A	10-01-2011
		US 2009298801 A1	03-12-2009
		WO 2008065316 A2	05-06-2008

## 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 47/28 (2006.01)	A 6 1 K 47/28	
A 6 1 K 47/44 (2006.01)	A 6 1 K 47/44	
A 6 1 K 47/36 (2006.01)	A 6 1 K 47/36	
A 6 1 K 47/34 (2006.01)	A 6 1 K 47/34	
A 6 1 K 47/24 (2006.01)	A 6 1 K 47/24	
A 6 1 K 47/32 (2006.01)	A 6 1 K 47/32	
A 6 1 K 47/38 (2006.01)	A 6 1 K 47/38	
A 6 1 K 31/592 (2006.01)	A 6 1 K 31/592	
A 6 1 K 47/18 (2006.01)	A 6 1 K 47/18	
A 6 1 K 47/06 (2006.01)	A 6 1 K 47/06	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	1 0 1
A 6 1 P 17/08 (2006.01)	A 6 1 P 17/08	
A 6 1 K 9/127 (2006.01)	A 6 1 K 9/127	

(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, MD, RU, T J, 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, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, 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, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(72) 発明者 ルイーズ・バストルム・イエンセン

デンマーク、デーコー - 2750パレラップ、インダストリパーケン55番、レオ・ファーマ・ア  
クティーゼルスカブ内

(72) 発明者 カルステン・ペーターソン

デンマーク、デーコー - 2750パレラップ、インダストリパーケン55番、レオ・ファーマ・ア  
クティーゼルスカブ内

F ターム(参考) 4C076 AA19 AA66 CC18 DD08F DD09F DD15F DD34A DD37 DD37S DD41  
DD45 DD46 DD50Z DD63F DD68F DD68Z DD70A EE09G EE11G EE23F  
EE27A EE31G EE36G EE37G EE38G EE58 FF70 GG50  
4C086 AA01 AA02 DA10 DA12 DA16 MA03 MA05 MA24 MA38 NA11  
ZA89