

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 3 部門第 2 区分

【発行日】平成 29 年 8 月 10 日 (2017.8.10)

【公表番号】特表 2016-525143 (P2016-525143A)

【公表日】平成 28 年 8 月 22 日 (2016.8.22)

【年通号数】公開・登録公報 2016-050

【出願番号】特願 2016-528592 (P2016-528592)

【国際特許分類】

A 6 1 K 9/127 (2006.01)

A 6 1 K 9/107 (2006.01)

A 6 1 K 47/14 (2006.01)

A 6 1 K 47/24 (2006.01)

A 6 1 K 47/10 (2006.01)

A 6 1 K 47/42 (2017.01)

A 6 1 K 47/36 (2006.01)

【F I】

A 6 1 K 9/127

A 6 1 K 9/107

A 6 1 K 47/14

A 6 1 K 47/24

A 6 1 K 47/10

A 6 1 K 47/42

A 6 1 K 47/36

【手続補正書】

【提出日】平成 29 年 6 月 28 日 (2017.6.28)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

平均直径が 10 ～ 500 nm であるマルチコンパートメント脂質ナノ粒子であって、リン脂質二重層によって区切られた第 2 の親水性コンパートメントによって部分的に囲まれた第 1 の親油性コンパートメントを含み、前記第 1 のコンパートメントが前記第 2 のコンパートメントに部分的に固定されていることを特徴とするマルチコンパートメント脂質ナノ粒子。

【請求項 2】

多分散指数が 5 ～ 15 % である請求項 1 に記載のナノ粒子。

【請求項 3】

前記平均直径が 100 ～ 250 nm である請求項 1 又は 2 に記載のナノ粒子。

【請求項 4】

前記親油性コンパートメントが、25 で液体状態又は半固体状態である脂質から成る請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載のナノ粒子。

【請求項 5】

前記親油性コンパートメントが、グリセリドが混合されていてもよい脂肪酸エステルを含む請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載のナノ粒子。

【請求項 6】

前記脂肪酸エステルが、親水部のモル質量が  $100 \sim 700 \text{ g/mol}$  の範囲であるポリエチレングリコールモノエステル及びポリエチレングリコールジエステルの混合物からなる群から選択される請求項 5 に記載のナノ粒子。

【請求項 7】

前記グリセリドが、25 で液体又は固体であるグリセロールモノエステル、グリセロールジエステル、及びグリセロールトリエステルの混合物からなる群から選択される請求項 5 又は 6 に記載のナノ粒子。

【請求項 8】

前記リン脂質二重層が、少なくとも 1 つのリン脂質及び 1 つの親水性非イオン性界面活性剤を含む請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載のナノ粒子。

【請求項 9】

前記リン脂質が、双性イオン性のリン脂質の混合物からなる群から選択される請求項 8 に記載のナノ粒子。

【請求項 10】

前記親水性非イオン性界面活性剤が、ポリオキシルグリセリド、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、及びポリオキシエチレンアルキルエーテルからなる群から選択される請求項 8 又は 9 に記載のナノ粒子。

【請求項 11】

少なくとも 1 つの対象となる分子をさらに含む請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載のナノ粒子。

【請求項 12】

前記対象となる分子が、核酸、タンパク質、多糖類、及び  $40 \sim 2000 \text{ Da}$  の分子から選択される請求項 11 に記載のナノ粒子。

【請求項 13】

薬剤的に許容可能な賦形剤中に請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載のナノ粒子の懸濁液を含む医薬組成物。

【請求項 14】

以下の工程を含むマルチコンパートメント脂質ナノ粒子を調製する方法：

- 少なくとも 1 つの脂質、1 つのリン脂質、1 つの親水性非イオン性界面活性剤を含み、少なくとも 1 つの対象となる分子を含んでいてもよい、油／水エマルションを調製する工程；
- 高圧下で前記エマルションをホモジナイゼーションする工程。

【請求項 15】

前記エマルションをホモジナイゼーションする前に  $30 \sim 80$  の温度に加熱する工程をさらに含む請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記脂質が、親水部のモル質量が  $100 \sim 700 \text{ g/mol}$  の範囲であるポリエチレングリコールモノエステル及びポリエチレングリコールジエステルの混合物からなる群から選択される請求項 14 又は 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記リン脂質が双性イオン性のリン脂質の混合物からなる群から選択される請求項 14 ～ 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記親水性非イオン性界面活性剤が、ポリオキシルグリセリド、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、及びポリオキシエチレンアルキルエーテルからなる群から選択される請求項 14 ～ 17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

前記油／水エマルションが

- 5 ～ 30 質量％の脂質；
- 0.5 ～ 5 質量％のリン脂質；

- 0.5 ~ 5 質量%のポリオキシシルグリセリド、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル又はポリオキシエチレンアルキルエーテルを含む請求項 14 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

前記脂質が、ラブラフィル（登録商標）M 2 1 2 5 C S 又は M 1 9 4 4 C S である請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記リン脂質が、ホスフォリボン 9 0 G（登録商標）である請求項 19 または 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記ポリオキシシルグリセリド又は前記ポリオキシエチレン脂肪酸エステルが、ゲルシア（登録商標）5 0 / 1 3 又はポリオキシエチレン（4 0）ステアレートである請求項 19 ~ 21 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載のナノ粒子を含む、対象となる分子を投与するための担体。

【請求項 24】

請求項 11 又は 12 に記載のナノ粒子を含む医薬品。

【請求項 25】

前記医薬品は、注射、経口、経皮又は経鼻で投与される医薬品である請求項 24 に記載の医薬品。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0017

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0017】

さらに、暗くて電子で密な外層の厚さの測定は、リン脂質二重層（二重層）によって区切られた第2の親水性コンパートメントによって部分的に囲まれた第1の親油性コンパートメント（脂質マトリックス又はコア）を強く示唆する。そのうえ、本発明のセリソームの構造の研究によって、上記のものなどの好適な非イオン性界面活性剤の使用に起因して、前記第1のコンパートメントが前記第2のコンパートメントに部分的に固定されていることがわかった。この説明によって制限されないが、本発明のセリソームの構築上の要石は、「疎水性 - 親水性 - 疎水性」型の3つのセグメント（three-segment）誘導体を少なくとも1つ含有する親水性非イオン性界面活性剤混合物の使用に基づいているようである。疎水性セグメントは、脂肪族アルコール、脂肪酸、グリセリド、コレステロール、又はリン脂質膜に親和性をもつ他の基から成ることができる。親水部は、ポリオキシエチレン、ポリプロピレン、多糖類型のポリマー、又は疎水性セグメントと併せて、HLB値が11を超える界面活性剤を生成できる任意の型のポリマーから成ることになる。HLB値はグリフィンによって記載された尺度に従って本明細書で定義される。例えば、これらの界面活性剤は、ポリオキシシルグリセリド若しくはマクロゴールグリセリド、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、又はポリオキシエチレンアルキルエーテルのファミリーに属することがあり、好ましくはゲルシア（登録商標）50 / 13 又はポリオキシエチレン（40）ステアレートであることになる。ポリオキシエチレン脂肪酸エステルは、親水性ポリ（オキシエチレングリコール）鎖でエステル化された脂肪酸の混合物であり、脂肪酸 - PEG 型（モノエステル）の2つのブロックが並んだ誘導体及び脂肪酸 - PEG - 脂肪酸型（ジエステル）の3つのブロックが並んだ誘導体のさまざまな割合での混合物を含有する。また、マクロゴールグリセリドはグリセリドを含有する。特に、ゲルシア（登録商標）50 / 13 は、グリセリドと1500 g / mol の親水性ポリ（オキシエチレングリコール）鎖でエステル化された脂肪酸の混合物であり、脂肪酸 - PEG - 脂肪酸型（図4A）の3

つのブロックが並んだ誘導体を約40%含む。提案された系では、ジエステル部分は、間違いなく二重層と脂質部の間の固定位置(anchor point)である(図4B)。実際に、リン脂質の脂質粒子型製剤への組み込みが、一般に2つのタイプの物体、ナノ粒子及びリポソームを含有する不均一な製剤を生じることが当該技術分野において公知である。グリフィンHLB値が11を超える「疎水性-親水性-疎水性」型の非イオン性界面活性剤が非存在の場合に本発明の実験プロトコルを適用することによって同じ結果が得られた(データ示さず)。提案された系では、これらの界面活性剤部分は、間違いなく二重層と脂質部の間の固定位置である(図4B)。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0034

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0034】

好ましくは、前記親水性非イオン性界面活性剤は、ポリオキシグリセリド若しくはマクロゴールグリセリド、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、又はポリオキシエチレンアルキルエーテルのファミリー、好ましくはゲルシア(登録商標)50/13又はポリオキシエチレン(40)ステアレートからなる群から選択される。

好ましくは、本発明の方法の油/水エマルションは以下を含む：

- 5～30%の脂質、好ましくは、ラブラフィル(登録商標)M2125CS又はM1944CS；
- 0.5～5%のリン脂質、好ましくはホスホリボン90G(登録商標)；
- 0.5～5%のマクロゴールグリセリド又はポリオキシエチレン脂肪酸エステル、好ましくはゲルシア(登録商標)50/13又はポリオキシエチレン(40)ステアレート；
- 水、適量 100g。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0039

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0039】

【図1】図1は、さまざまな操作条件下で得られた「ハンドバッグ」と呼ばれる構造の電子顕微鏡画像を示す。いずれの条件でも、「ハンドバッグ」は少ない割合にとどまる。

【図2】図2は、リポソーム(A)及び脂質粒子(B)の模式的な説明並びにクライオ透過電子顕微鏡(クライオ-TEM)画像を示す。

【図3】図3は、本発明のマルチコンパートメント脂質ナノ粒子のクライオ-TEM画像を示す。

【図4A】図4は、ゲルシア(登録商標)50/13の成分(A)及び本発明のマルチコンパートメント脂質ナノ粒子の膜超構造の模式図(B)を示す。

【図4B】図4は、ゲルシア(登録商標)50/13の成分(A)及び本発明のマルチコンパートメント脂質ナノ粒子の膜超構造の模式図(B)を示す。

【図5】図5は、本発明のマルチコンパートメント脂質ナノ粒子の調製の模式図を示す。

【図6】図6は、ラブラフィル(登録商標)M2125CSについて、マルチコンパートメント脂質ナノ粒子のサイズ及びその多分散性の20箇月にわたるモニターリングを示す。

【図7A】図7は、水性媒体に溶かしたケルセチンの安定性試験[室温H<sub>2</sub>O；室温、pH7.4の水性媒体；室温模擬胃液(SGF)；37℃模擬胃液(SGF)；室温模擬腸液(SIF)](A)並びに本発明のマルチコンパートメント脂質ナノ粒子封入ケルセチンのさまざまな濃度(1、2、3、4、及び5%)の化学的安定性試験(B、右)を

示す。粒子の物理的安定性は図 7 B の左に示される。

【図 7 B】図 7 は、水性媒体に溶かしたケルセチンの安定性試験 [ 室温  $H_2O$  ; 室温、 $pH 7.4$  の水性媒体 ; 室温模擬胃液 (SGF) ; 37 模擬胃液 (SGF) ; 室温模擬腸液 (SIF) ] (A) 並びに本発明のマルチコンパートメント脂質ナノ粒子封入ケルセチンのさまざまな濃度 (1、2、3、4、及び 5 %) の化学的安定性試験 (B、右) を示す。粒子の物理的安定性は図 7 B の左に示される。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0045

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0045】

#### 組成物

上記調製方法によって得られたマルチコンパートメント脂質ナノ粒子は例えば以下を含む。

脂質 (ラブラフィル (登録商標))	5 ~ 20 %
リン脂質 (ホスホリボン 90 G)	1 %
マクロゴールグリセリド (ゲルシア (登録商標) 50 / 13)	2 %
水 (適量)	100 g

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0051

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0051】

懸濁液中の有効成分の最大搭載量は約 1 % (又はその水への溶解度の  $5 \times 10^3$  倍) であり、最適条件下での封入収率は約 96 % である。

【手続補正 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0064

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0064】

#### 組成物

上記調製方法によって得られたマルチコンパートメント脂質ナノ粒子は以下を含む (質量 %) :

ラブラフィル (登録商標) M2125CS	20 %
ホスホリボン 90 G	1 %
ゲルシア (登録商標) 50 / 13	2 %
水 (適量)	10 g

【手続補正 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0081

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0081】

#### 組成物

上記調製方法によって得られたマルチコンパートメント脂質ナノ粒子は以下を含む (質量 %) :

ラブラフィル (登録商標) M2125CS	20 %
-----------------------	------

(6)

JP 2016-525143 A5 2017.8.10

ホスフォリボン 9 0 G

1 %

ゲルシア（登録商標）5 0 / 1 3

2 %

水（適量）

1 k g