

(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2008-546842  
(P2008-546842A)

(43) 公表日 平成20年12月25日(2008.12.25)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
<b>A61K 33/08</b> (2006.01)	A 61 K 33/08	4 C 076
<b>A61P 39/06</b> (2006.01)	A 61 P 39/06	4 C 083
<b>A61P 17/18</b> (2006.01)	A 61 P 17/18	4 C 086
<b>A61P 25/00</b> (2006.01)	A 61 P 25/00	
<b>A61P 25/28</b> (2006.01)	A 61 P 25/28	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2008-519483 (P2008-519483)	(71) 出願人	507422493 エドワード ヴィア バージニア カレッジ オブ オステオパシック メディスン アメリカ合衆国 24060 バージニア 州 ブラックスブルク クラフト ドライブ 2265
(86) (22) 出願日	平成18年6月27日 (2006.6.27)	(74) 代理人	100083806 弁理士 三好 秀和
(85) 翻訳文提出日	平成20年2月26日 (2008.2.26)	(74) 代理人	100095500 弁理士 伊藤 正和
(86) 國際出願番号	PCT/US2006/024963	(74) 代理人	100111235 弁理士 原 裕子
(87) 國際公開番号	W02007/002662		
(87) 國際公開日	平成19年1月4日 (2007.1.4)		
(31) 優先権主張番号	60/693, 930		
(32) 優先日	平成17年6月27日 (2005.6.27)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

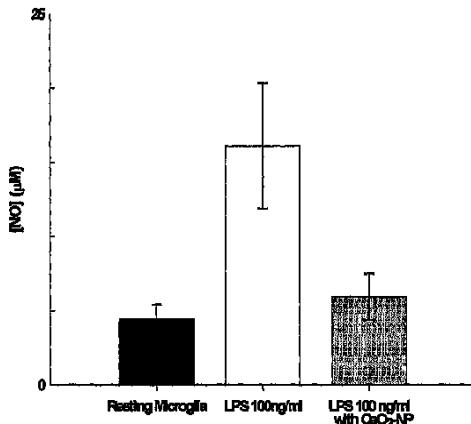
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】酸化セリウムナノ粒子の抗炎症性、放射線防護性および寿命促進能

## (57) 【要約】

本発明は、生体内での治療用組成物と試験管内での研究調査の両方に利用される酸化セリウムナノ粒子を提供するものである。この酸化セリウムナノ粒子は、再現可能で有益な生物学的特性を有する周知のサイズ範囲内のものである。処置方法と同様に製剤組成物および他の組成物も提供される。

【選択図】図7

CeO<sub>2</sub>-NP decrease NO release  
from LPS-stimulated MG

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

細胞の寿命を延長させる方法であって、  
細胞の寿命を延長させるのに十分な量で、11nmから約500nmのサイズの酸化セリウムナノ粒子に細胞を接触させること、  
を含む方法。

**【請求項 2】**

前記方法が、前記細胞内でのフリーラジカル損傷を低減する方法である、請求項1に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記酸化セリウムナノ粒子が、ゾル・ゲル法以外の工程で生成されるものである、請求項1に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記方法が、フリーラジカル損傷に関連した疾患、機能障害または機能不全に罹患している被検体を処置する方法であるか、被検体がフリーラジカル損傷に関連した疾患、機能障害または機能不全になるのを防止または遅らせるための方法である、請求項1に記載の方法。

**【請求項 5】**

接触させることが、疾患または機能障害を処置するのに十分な量の前記酸化セリウムナノ粒子を前記被検体に投与することを含む、請求項4に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記酸化セリウムナノ粒子がリポソームによって送達される、請求項5に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記酸化セリウムナノ粒子がアルブミンと一緒に投与される、請求項5に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記方法が、被検体の細胞の老化を防止する方法である、請求項1に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記方法が、化粧品用または老化防止用クリームの形で局所投与を利用するものである、請求項8に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記酸化セリウムナノ粒子の前記サイズが11nmから約50nmである、請求項1に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記酸化セリウムナノ粒子の前記サイズが40nmから約500nmである、請求項1に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記酸化セリウム粒子が約20nmのサイズである、請求項1に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記酸化セリウム粒子の95%以上が約15nmから約25nmのサイズである、請求項1に記載の方法。

**【請求項 14】**

約0.01ngから約1gの前記酸化セリウムナノ粒子を含む最低1回用量で、前記酸化セリウムナノ粒子を被検体に投与する、請求項1に記載の方法。

**【請求項 15】**

前記最低1回用量が、被検体の体重1kgあたり1ngから100mgである、請求項14に記載の方法。

**【請求項 16】**

前記最低1回用量が、血液または細胞内液の酸化セリウムナノ粒子の濃度が10nMから1μMである、請求項14に記載の方法。

**【請求項 17】**

10

20

30

40

50

複数回用量を投与し、各用量を数ヶ月間または数年間の間隔をあけて投与する、請求項14に記載の方法。

【請求項18】

前記方法がヒトを処置する方法である、請求項1に記載の方法。

【請求項19】

前記方法が非ヒト動物を処置する方法である、請求項1に記載の方法。

【請求項20】

接触させることが投与を含み、前記投与が、経口摂取、注射、注入、局所投与、吸入、舌下吸収、直腸または膣送達による投与またはこれらの任意の組み合わせである、請求項1に記載の方法。

10

【請求項21】

脳疾患、脊髄疾患または他の神経外傷を予防または処置する方法である、請求項1に記載の方法。

【請求項22】

神経変性障害を予防または処置する方法である、請求項1に記載の方法。

【請求項23】

アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、多発性硬化症、毒素による損傷または発作を予防または処置する方法である、請求項1に記載の方法。

20

【請求項24】

関節炎または関節疾患を予防または処置する方法である、請求項1に記載の方法。

【請求項25】

アテローム性動脈硬化症を予防または処置する方法である、請求項1に記載の方法。

【請求項26】

循環器疾患を予防または処置する方法である、請求項1に記載の方法。

【請求項27】

糖尿病を予防または処置する方法である、請求項1に記載の方法。

【請求項28】

網膜の疾患を予防または処置する方法である、請求項1に記載の方法。

【請求項29】

アレルギー性疾患または自己免疫疾患を予防または処置する方法である、請求項1に記載の方法。

30

【請求項30】

前記疾患が、アレルギー、喘息、慢性閉塞性肺疾患、呼吸器の機能不全または自己免疫疾患である、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

炎症を予防または処置する方法である、請求項1に記載の方法。

【請求項32】

前記炎症が創傷部位におけるものである、請求項31に記載の方法。

【請求項33】

試験管内での方法である、請求項1に記載の方法。

40

【請求項34】

少なくとも1個の細胞を多細胞生物体から除去し、前記酸化セリウムナノ粒子で処理した後、前記生物体に戻す生体外での方法である、請求項1に記載の方法。

【請求項35】

生物体からの前記血液を前記酸化セリウムナノ粒子に曝露した後、前記生物体に戻す、請求項34に記載の方法。

【請求項36】

癌の治療計画の際に放射線に曝露される細胞の放射線防護方法である、請求項1に記載の方法。

50

**【請求項 3 7】**

少なくとも 1 個の細胞を酸化セリウムナノ粒子で処理する生体内の方法であって、前記細胞内でのフリー・ラジカル損傷を低減できるだけの十分な量で、約 1 nm 未満から約 500 nm のサイズの酸化セリウムナノ粒子に前記細胞を接触させること、を含む方法。

**【請求項 3 8】**

接触させることが、最小 1 回用量の前記酸化セリウムナノ粒子を被検体に投与することを含む、請求項 3 7 に記載の方法。

**【請求項 3 9】**

前記酸化セリウムナノ粒子の前記サイズが 11 nm から約 50 nm である、請求項 3 7 に記載の方法。

**【請求項 4 0】**

前記酸化セリウムナノ粒子の前記サイズが 40 nm から約 500 nm であり、前記ナノ粒子の大多数が、前記細胞に拡散可能なフリー・ラジカルの濃度を低減させることで前記細胞の外からその影響をおよぼすものである、請求項 3 7 に記載の方法。

**【請求項 4 1】**

前記酸化セリウム粒子が約 20 nm のサイズである、請求項 3 7 に記載の方法。

**【請求項 4 2】**

前記酸化セリウム粒子の 95 % 以上が約 15 nm から約 25 nm のサイズである、請求項 3 7 に記載の方法。

**【請求項 4 3】**

約 0.01 ng から約 1 g の前記酸化セリウムナノ粒子を含む最小 1 回用量で、前記酸化セリウムナノ粒子を被検体に投与する、請求項 3 7 に記載の方法。

**【請求項 4 4】**

前記最小 1 回用量が被検体の体重 1 kg あたり 1 ng から 100 mg である、請求項 4 3 に記載のナノ粒子。

**【請求項 4 5】**

前記最小 1 回用量が、血液または細胞内液の酸化セリウムナノ粒子の濃度が 10 nM から 1 μM である、請求項 4 3 に記載のナノ粒子。

**【請求項 4 6】**

複数回用量の投与し、各用量を数ヶ月間または数年間の間隔をあけて投与する、請求項 4 3 に記載の方法。

**【請求項 4 7】**

前記方法がヒトを処置する方法である、請求項 3 7 に記載の方法。

**【請求項 4 8】**

前記方法が非ヒト動物を処置する方法である、請求項 3 7 に記載の方法。

**【請求項 4 9】**

接触させることが投与を含み、前記投与が、経口摂取、皮下注射、注射、注入、局所投与、吸入、舌下吸収、直腸または膣送達による投与またはこれらの任意の組み合わせである、請求項 3 7 に記載の方法。

**【請求項 5 0】**

脳疾患、脊髄疾患または他の神経外傷を予防または処置する方法である、請求項 3 7 に記載の方法。

**【請求項 5 1】**

神経変性障害を予防または処置する方法である、請求項 3 7 に記載の方法。

**【請求項 5 2】**

アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 、多発性硬化症、毒素による損傷または発作を予防または処置する方法である、請求項 3 7 に記載の方法。

**【請求項 5 3】**

10

20

30

40

50

関節炎または関節疾患を予防または処置する方法である、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 5 4】

アテローム性動脈硬化症を予防または処置する方法である、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 5 5】

循環器疾患を予防または処置する方法である、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 5 6】

糖尿病を予防または処置する方法である、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 5 7】

網膜の疾患を予防または処置する方法である、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 5 8】

アレルギー性疾患または自己免疫疾患を予防または処置する方法である、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記機能障害が、アレルギー、喘息、慢性閉塞性肺疾患、呼吸器の機能不全または自己免疫疾患である、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 0】

炎症を予防または処置する方法である、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記炎症が創傷部位におけるものである、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 2】

癌の治療計画の際に放射線に曝露される細胞の放射線防護方法である、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 6 3】

大規模細胞培養物で増殖される細胞の寿命を延長させる方法である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記細胞培養物が酵母培養物である、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記細胞培養物が消費財を生成するものである、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記細胞培養物が哺乳動物培養物である、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記細胞培養物が植物培養物である、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 8】

細胞内におけるフリーラジカル生成に対する 1 以上の環境刺激の影響を判断する方法であって、

少なくとも 1 1 nm のサイズの酸化セリウムナノ粒子に少なくとも 1 個の細胞を接触させ、処理済みの細胞を提供すること、

任意に、同一の細胞であるが、酸化セリウムナノ粒子には接触されていない細胞を対照細胞として提供すること、

前記処理済みの細胞と、場合により提供された対照細胞とについて、フリーラジカルレベルの検出可能な変化を観察すること、

任意に、前記フリーラジカルレベルを前記処理済みの細胞と対照細胞とで比較すること、  
を含む方法。

【請求項 6 9】

前記環境刺激が 1 以上の化学物質である、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 0】

サイズ範囲が 1 1 nm から 5 0 0 nm の酸化セリウムナノ粒子。

【請求項 7 1】

10

20

30

40

50

前記ナノ粒子が凝集を避けるために超音波処理されたものである、請求項70に記載のナノ粒子。

【請求項72】

1以上の生物学的に許容される物質をさらに含む、請求項70に記載のナノ粒子を含む組成物。

【請求項73】

前記生物学的に許容される物質が、水、塩、リン酸緩衝生理食塩水、脂質またはこれらの任意の組み合わせである、請求項72に記載の組成物。

【請求項74】

動物細胞内でのフリーラジカルによる損傷が原因の病態の低減もしくは解消のために、またはこののような病態を防止するために、動物に対し粒子の単回投与量を提供するのに十分な量である、サイズ範囲が1nm未満から約500nmの酸化セリウムナノ粒子。

【請求項75】

前記単回投与量が、被検体の体重1kgあたり1ngから100mgである、請求項74に記載のナノ粒子。

【請求項76】

前記単回投与量が、血液または細胞内液の酸化セリウムナノ粒子の濃度が10nMから1μMである、請求項74に記載のナノ粒子。

【請求項77】

薬学的に好適な物質と請求項74に記載の酸化セリウムナノ粒子とを含む、組成物。

【請求項78】

前記動物の治療用の製剤組成物である、請求項77に記載の組成物。

【請求項79】

前記動物がヒトである、請求項74に記載のナノ粒子。

【請求項80】

請求項74に記載の酸化セリウムナノ粒子を含み、動物の食餌または栄養に有益な影響を与える1以上の物質をさらに含む、組成物。

【請求項81】

前記動物用の栄養補給剤である、請求項80に記載の組成物。

【請求項82】

前記動物用の栄養補助食品である、請求項80に記載の組成物。

【請求項83】

前記動物がヒトである、請求項80に記載の組成物。

【請求項84】

サイズ範囲が11nm以上500nm以下の酸化セリウムナノ粒子を含む容器。

【請求項85】

請求項84に記載の容器を含むキット。

【請求項86】

2以上の容器を含む、請求項85に記載のキット。

【請求項87】

前記ナノ粒子用に1以上の溶媒または担体をさらに含む、請求項85に記載のキット。

【請求項88】

動物細胞内でのフリーラジカルによる損傷が原因の病態の低減もしくは解消のために、あるいはこののような病態を防止するために、動物の治療用の1回用量を提供するのに十分な量である、サイズ範囲が約1nm未満から約500nm以下の酸化セリウムナノ粒子を含む容器。

【請求項89】

請求項88に記載の容器を含むキット。

【請求項90】

前記キットが2以上の容器を含む、請求項89に記載のキット。

10

20

30

40

50

**【請求項 9 1】**

各容器が独立して、一定量のナノ粒子を含み、これが 1 以上の他の容器と同じであっても異なっていてもよい、請求項 9 0 に記載のキット。

**【請求項 9 2】**

前記ナノ粒子用の 1 以上の溶媒または担体をさらに含む、請求項 9 0 に記載のキット。

**【請求項 9 3】**

被検体の炎症を低減できるだけの十分な量での、少なくとも約 1 nm から 5 0 0 nm のサイズの酸化セリウムナノ粒子を被覆または含有する関節置換物または関節付加材から作製される医療用人工器官。

**【発明の詳細な説明】**

10

**【技術分野】****【0 0 0 1】**

特許に係る政府の権利

本発明は、契約書番号 N S 4 0 4 9 0 ( 国立神経疾患・脳卒中研究所 ) および A G 0 2 2 6 1 7 ( 国立老化研究所 ) に基づき、一部が米国国立衛生研究所から米国政府の助成を受けてなされたものである。米国政府は、本発明において一定の権利を保有する。

**【0 0 0 2】**

本発明は、医薬品ならびに、医学関連の疾患、機能障害、さらには負傷や炎症、老化に伴う合併症の処置の分野に関する。特に本発明は、ナノ粒子を利用して、さまざまな疾患、機能障害、さらには負傷や炎症、放射線曝露、老化が原因の合併症を患っている被検体を処置することに関する。

20

**【背景技術】****【0 0 0 3】**

酸素ラジカルなどのフリーラジカルが原因の細胞の損傷または細胞死が主な要素である疾患、機能障害および医学的に重要な他の症状を、治療的または予防的に処置する目的で、多くの手法が取られている。こうした手法の中には、数例をあげると、ビタミン E ならびにその関連化合物、ビタミン C ならびにその関連化合物、メラトニンなどのフリーラジカルスカベンジャーを使用することがあった。これらの化合物のおよぼす有益な作用が指摘されてはいるが、研究者らや臨床医らは、さらに活性が高く半減期の長い化合物を探し続けている。

30

**【0 0 0 4】**

本願発明者らと同僚らが行った初期の実験では、ゾル - ゲル法で調製した酸化セリウムナノ粒子を細胞の寿命亢進に利用していた。酸化セリウムナノ粒子は、観察された結果からフリーラジカルスカベンジャーとして作用するとされていた。しかしながら、ゾル - ゲル法には、いくつか難点があった。たとえば、報告されている 2 ~ 1 0 nm の範囲内に粒度がうまく制御されず、バッチ間のばらつきが大きくなつた。すなわち、この方法は、フリーラジカル消去活性のあるナノ粒子を生成する場合には十分であるが、特定サイズ範囲の粒子が再現可能な形で得られるものではなかった。このため、粒子のバッチを各々試験して、サイズ範囲とバッチが使用するのに適したものであるかどうかとを確認する必要があった。さらに、この方法では、使用する界面活性剤が最終製品に混入するテーリング ( tailoring ) が発生した。このような界面活性剤が存在すると、主に生成物中の界面活性剤の毒性が原因で、使用時に生物学的な問題点が生じた。また、界面活性剤のテーリング量を制御できないがゆえに、ナノ粒子を生体培地中に置いたときに凝集の問題が起つた。これらの問題点が原因で、粒子の有効性と生物学的な送達性が低下した。ゾル - ゲル合成後に界面活性剤を除去すると、生体培地内で凝集する傾向が見られ、なおかつ生物学的効果に欠ける粒子が得られた。さらに、これらの粒子に関連したセリウムの原子価状態が変化し、特に粒子を生体培地中に置いた時に、セリウムの原子価状態の比 ( + 3 / + 4 ) が時間とともに変動するという問題点に直面した。ナノ粒子における原子価状態の + 3 / + 4 比次第で、フリーラジカルの除去および細胞送達 ( 生体内での送達を含む ) が変化する可能性もある。

40

50

## 【0005】

このように、ナノ粒子をフリー・ラジカル・スカベンジャーとして用いるという従来の対応策は効果的ではあったが、バッチごとに極めて変化が大きかった。したがって、改良されたナノ粒子ならびに、これらの粒子を使用して、酸素ラジカルや他のラジカルの生成を伴うさまざまな疾患および機能障害を処置する方法に対して、当該技術分野における需要が依然として存在する。

## 【発明の開示】

## 【0006】

本発明は、酸化セリウムナノ粒子を保健衛生に用いる方法を提供することで、当該技術分野におけるこうした需要に応えるものである。一般論として、本方法では、細胞を酸化セリウムナノ粒子に曝露することで生細胞の寿命を延ばす。この曝露によって、内在性および外因性のフリー・ラジカルによって生じる細胞の損傷は減少するか、あるいは全くなくなる。酸化セリウムナノ粒子については、フリー・ラジカルの損傷前、損傷時、あるいは損傷後に細胞に曝露させることが可能である。

10

## 【0007】

概して、本発明は、少なくとも1個の細胞を酸化セリウム粒子で処置する方法を提供するものである。本方法は主に、少なくとも1個の細胞を、フリー・ラジカルによって生じる損傷を低減またはなくす量の酸化セリウムナノ粒子と接触させることを含む。本方法は、フリー・ラジカルが関与する疾患または機能障害を処置する治療法として、あるいはフリー・ラジカル損傷を防止する予防的な方法として、生体内 (in vivo) で実施可能なものである。同様に、本方法は、フリー・ラジカルが細胞にどのように影響するのか、あるいはナノ粒子と薬剤との併用が細胞にどのように影響するのかを研究するための研究道具として、試験管内 (インビトロ; in vitro) で実施可能なものである。好ましい実施形態では、ゾル・ゲル法以外の方法で作製したサイズ限定の酸化セリウムナノ粒子を用いて、上記の方法を実施する。また、この方法を、治療目的または研究調査目的で、生体外 (ex vivo) または試験管内で実施することも可能である。

20

## 【0008】

本発明は、酸素ラジカルなどのフリー・ラジカルが関与する疾患または機能障害に罹患しているか、罹患している疑いのある個体を処置する方法を提供するものである。同様に、本発明は、酸素ラジカルなどのフリー・ラジカルに起因するか、酸素ラジカルなどのフリー・ラジカルの発生につながる負傷に伴う合併症に罹患しているか、罹患している疑いのある個体を処置する方法を提供するものである。概して、本発明の方法は、フリー・ラジカルによって個体に生じる、細胞、組織または臓器の損傷を低減するか、これをなくすのに十分な量の酸化セリウムナノ粒子を、個体（本願明細書では「被検体」および「患者」と同義に用いる）に投与することを含む。よって、本発明は、細胞および生物体の寿命を促進し、炎症および炎症性機能障害を低減し、炎症性機能障害による組織の損傷を低減し、放射線傷害を低減するのに、酸化セリウムナノ粒子を使用することを包含する。

30

## 【0009】

さらに別の態様では、酸化セリウムナノ粒子と、酸化セリウムナノ粒子を含む組成物とが得られる。酸化セリウムナノ粒子は、サイズが限定されており、フリー・ラジカルが関与する疾患または機能障害の処置が必要であるか、必要になる疑いのある被検体に、単回投与または複数回投与できるだけの十分な量で提供される。組成物には、本発明の酸化セリウム粒子を、一般に細胞を殺すことなく生細胞に曝露できるという点で生物学的に許容される物質である、1種または複数種の他の物質と一緒に含んでもよい。実施形態では、この他の物質は薬学的に許容される物質である。

40

## 【0010】

本発明の特定の態様は、酸素フリー・ラジカルなどのフリー・ラジカルに関連のある疾患および機能障害の処置に、酸化セリウムナノ粒子を使用しようとするものである。使用は、特に、細胞をフリー・ラジカル損傷から保護する生体内での治療法または予防的な方法に向けられている。本発明の他の特定の態様は、製薬または治療用組成物などの医療用途向け

50

の組成物の調製に、酸化セリウムナノ粒子を使用しようとするものである。

【0011】

本発明の他の態様は、酸化セリウムナノ粒子を含む容器を提供するものである。概して、本発明による容器には、ゾル・ゲル法以外の方法で作製されたサイズ限定の酸化セリウムナノ粒子が、酸素ラジカルなどのフリーラジカルが関与する疾患または機能障害に罹患している、あるいは罹患する危険性のある被検体に、酸化セリウムを少なくとも単回投与できるだけの十分な量で入っている。特定の実施形態では、この容器は、物質を被検体に送達する際に用いられる1個以上の他の容器および/または1個以上の製品または装置（注射器、注射針、消毒綿球など）と一緒にパッケージで提供される。いくつかの実施形態では、1個以上の容器を含むキットが得られる。キットによっては、単回投与の量の酸化セリウム粒子が得られる。いくつかの実施形態では、1回量が被検体の体重1kgあたり1ngから100mgである。

10

【0012】

添付図面は、本願明細書に組み込まれて本願明細書の一部をなすものであり、本発明のいくつかの実施形態を示すとともに、ここに記載の説明と相まって本発明の原理を説明する役目を果たすものである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

以下、本発明のさまざまな例示的実施形態（その数例を添付の図面に示してある）を詳細に参照する。以下の詳細な説明は、本発明の特定の実施形態についての詳細な内容を示すためのものであり、本発明の包括的範囲を限定するものと理解されるべきではない。

20

【0014】

本願発明者ならびに同僚らは、さまざまな疾患および機能障害を処置するための酸化セリウムナノ粒子をすでに開発しており、その内容が米国仮特許出願第60/408,275号明細書および2003年9月4日に代理人整理番号UCF-375で出願された米国通常出願（両方の開示内容全体を本願明細書に援用する）に開示されている。フリーラジカルによって生じる損傷を処置するのに用いる酸化セリウムナノ粒子の開発における従来の試行の欠点に対処するために、別のナノ粒子合成方法と、これに伴い別のナノ粒子について調査研究を行った。既存の製造工程で作製される市販の酸化セリウムナノ粒子の生物学的有効性を検討することに尽力がなされた。こうした粒子には、ナノフェーズ・テクノロジーズ・コーポレーション（Nanophase Technologies Corporation）（イリノイ州ロメオビル）、アドバンスト・パウダー・テクノロジー・ペティワイ・リミテッド（Advanced Powder Technology Pty Ltd.）（西オーストラリア、ウェルシュプール）、ナノスケール・マテリアルズ・インコーポレイテッド（NanoScale Materials Inc.）（カンザス州マンハッタン）から入手可能な酸化セリウムナノ粒子などがあった。要約すれば、一連の実験では、特許化された特定の合成機構を用いた、ナノフェーズ・テクノロジー・コーポレーション製の酸化セリウムナノ粒子であれば、一貫して高いレベルの生物活性を呈する、再現可能にサイズ調整されたナノ粒子が得られるということが明らかになった。20nm以下のサイズでは、粒子は容易に細胞内に侵入し、フリー・ラジカルによる損傷を低減した。これらの粒子の合成については、以下の特許に記載されており、そのすべての開示内容全体を本願明細書に援用する：米国特許第6,669,823号明細書、米国特許第5,460,701号明細書、米国特許第5,514,349号明細書、米国特許第5,874,684号明細書、日本国特許第2980987号明細書および同第3383608号明細書、欧州特許第0711217B1号明細書、獨国特許第69426886号明細書、仏国特許第94922757号明細書、英國特許第94922757号明細書、オーストラリア国特許第068582882号明細書。

30

【0015】

驚くべきことに、発明者の過去の発明での原料と比較した場合に、新たな酸化セリウムナノ粒子の原料を用いたほうがバッチごとの活性の再現性が優れており、哺乳動物細胞に

40

50

対する毒性が低いことが見いだされた。本発明で用いる酸化セリウムナノ粒子は、本発明の方法で被検体を処置する際の特徴の改善に大幅に寄与した要因である、品質およびサイズ分布の点で、従来のナノ粒子とは異なると判断された。本発明を開発するにあたり、原料とは無関係に、サイズが小さく、サイズ分布が狭く、凝集率の低い酸化セリウム粒子が最も好都合であると判断された。また、送達のためには、ナノ粒子は非凝集形態であると都合がよい。これを実現するために、超高純度水（16メガオーム）または超高純度水を用いて調製した生理食塩水中で、約10重量%のストック溶液を超音波処理した。これらのナノ粒子は、フリー・ラジカルによって生じる損傷の処置ならびに、こうした損傷からの保護用に過去に開発された酸化セリウムナノ粒子よりも優れている。このような新しく有用な改良によって、生体内ならびに試験管内で細胞の寿命を延ばすのに酸化セリウムナノ粒子を利用できるようになる。特に、本願明細書では、サイズの範囲と分布が規定され、ゾル・ゲル合成以外の方法で作製される酸化セリウムナノ粒子を用いると、生物体の細胞などの細胞の寿命が長くなるという新規な所見が示されている。また、酸化セリウムナノ粒子が、培養物中および生体内で哺乳動物細胞の寿命を促進し、強力なフリー・ラジカルスカベンジャーとして機能し、生体内で顕著な抗炎症性および放射線防護特性を有することも示されている。

10

## 【0016】

ひとつの作用の形だけに限るつもりはないが、酸化セリウムナノ粒子には特有の酸化物格子および原子価構造があり、それゆえに細胞内フリー・ラジカルを除去（解毒）する機能が発揮され、よってその抗炎症性、放射線防護性、寿命促進特性がもたらされるのではないかと考えられる。さらに、本願発明者らが入手して本願明細書に示すデータから、その原子価および酸素格子構造がゆえに、酸化セリウムナノ粒子には、フリー・ラジカル除去イベント後に活性マトリックスを生物学的に再生する機能がもたらされるのではないかと思われる。このため、修復性の生物学的効果を生みつつ、少ない単回投与量のナノ粒子が細胞内で長期間にわたって活性状態に維持される。対照的に、ビタミンE、ニトロソーネ（nitrosone）化合物、ビタミンCなどの最も一般的に入手可能なフリー・ラジカルスカベンジャーは、1つのフリー・ラジカルを除去した後に化学構造が変動して不活性化されてしまう。このように構造が失われるため、その薬理学的な有効性には限りがあり、高度な投与計画が必要になる。

20

## 【0017】

酸化セリウムナノ粒子の再生活性は、酸化セリウムが1つの化合物から他の化合物への電子（またはフリー・ラジカル）の振動を容易にするよう機能する、ベローソフ・ジャボチンスキ（B-Z）反応として知られる周知の振動化学現象に左右される場合があるよう見える。ナノ粒子中のセリウムは、+3と+4の二通りの原子価状態で存在する。B-Zが適切に伝搬するに、ナノ粒子中のCe+3と+4とが特定の比になる必要がある。組成物が変化して+3セリウムが増えすぎると、この反応は伝搬しない。研究調査の結果、酸化セリウムナノ粒子のサイズが30nmから3nmまで小さくなり、ナノ粒子の格子ひずみが原因でさらに多くのセリウムが+3状態になることが分かっている。現時点では、この機序については、試験管での研究しかなされていないが、この作用機序が生体内にも当てはまる可能性があり、もっと大きなサイズの酸化セリウムナノ粒子を使うことに大きな利点が得られるであろう。

30

## 【0018】

概して、本発明は、少なくとも1個の細胞を酸化セリウム粒子で処置する方法を提供するものである。この方法は主に、少なくとも1個の細胞を、一酸化窒素、超酸化物、ヒドロキシルラジカル、ペルオキシトリルなどの不安定で反応性の高い分子や、上記から形成される他の不安定で反応性の化合物である、フリー・ラジカルによって生じる損傷を低減またはなくす量の酸化セリウムナノ粒子と接触させることを含む。これらの物質は、体内の他の分子から電子を抜き取ること、すなわち細胞または酸化的損傷を生じる工程によって、老化やさまざまな疾患を引き起こす。本願明細書において使用する場合、細胞または酸化的損傷は、酸化的ストレスと同じ意味である。

40

50

## 【0019】

「接触させる」とは、少なくとも1個の酸化セリウムナノ粒子を少なくとも1個の細胞と物理的に接触させることにつながる行動を意味する。よって、これには、少なくとも1個の酸化セリウムナノ粒子を少なくとも1個の細胞と接触させることができるだけの十分な量の酸化セリウムナノ粒子に、細胞を曝露することを含む場合がある。本方法は、生体内で実施することが可能なものであり、その場合は「接触させる」とは被検体の少なくとも1個の細胞を少なくとも1個の酸化セリウムナノ粒子に曝露することを意味する。したがって、本発明によれば、「接触させる」とは、たとえば任意の好適な経路で酸化セリウム粒子を被検体に投与することで、少なくとも1個の細胞を少なくとも1個の酸化セリウム粒子に曝露することを含む場合もある。また、培養皿または試験管などの制御された環境に、酸化セリウム粒子と細胞を導入、好ましくはそこで混合することによって、細胞を試験管内または生体外にて曝露することを含む場合もある。任意に、試験管内または生体外にて実施する場合、たとえば好適な媒質、緩衝液、水などの中で細胞を洗浄することで、細胞に取り込まれなかったり吸着しなかったりした酸化セリウム粒子の一部または全部を除去する。本発明の「接触させる」ことには、接触対象となる細胞から離れた部位で酸化セリウム粒子を導入、曝露して、被検体の身体機能または流体の自然な（拡散など）またはヒトが誘発した（渦流など）動きによってナノ粒子（と細胞と）を接触させることなどを含む場合がある。生体外にて実施する場合、細胞を被検体（好ましくは、もともとその細胞を得た被検体）に再導入してもよい。一実施形態では、このことには、拡散を制限するゲルまたは他のパケットに粒子を入れた後、それを膝関節などの身体部分に移植することが含まれる。

10

20

30

## 【0020】

本発明の方法によれば、被検体、個体または患者は、酸化セリウムナノ粒子が投与されるどのような生物体であってもよい。よって、被検体は、ヒトまたは齧歯類（マウス、ラット、ウサギなど）、イヌ科の動物（イヌなど）、ネコ科の動物（ネコなど）、ウマ科の動物（ウマなど）、ヒツジ（ovine）（ヒツジなど）、ブタ（orcine）（ブタなど）、あるいはウシ亜科の動物（雌ウシまたは去勢ウシなど）を含む、他の哺乳動物などの非ヒト動物であってもよいが、これに限定されるものではない。被検体は、鳥、爬虫類、両棲類などの他のどのような動物であってもよく、ペットや農業用動物などであってもよい。

40

## 【0021】

上述の方法は、フリーラジカルが関与する疾患または機能障害を処置する治療法として、あるいはフリーラジカル損傷を防止する予防的な方法として、生体内にて実施可能なものである。この方法が処置する方法（すなわち治療法）の実施形態では、量は、被検体において生成されているか、過去に生成されたフリーラジカルによる細胞死または機能不全または組織や臓器の損傷を低減するか、これをなくすのに効果的な量である。被検体、個体または患者は、フリーラジカルに関連した疾患または機能障害に対する処置をすぐに必要としている、あるいは明らかに必要としているか、必要としている疑いがある人の場合もあれば、フリーラジカルの発生に起因するか、その発生につながることが知られている負傷または他の外傷に対する処置をすぐに必要としている、あるいは明らかに必要としているか、必要としている疑いがある人の場合もある。フリーラジカルによる細胞、組織または臓器の損傷に関わりのある既存の症状が明らかであるか、疑われるような状況では、本方法は治療法である。たとえば、被検体が発作を患っているのであれば、酸化セリウムナノ粒子で被検体を処置して発作の影響を低減すると有益な場合がある。

## 【0022】

さらに、本発明の方法によれば、被検体、個体または患者が、既存の疾患、機能障害または負傷または外傷の処置を必要としないか、必要としている疑いのない人の場合もある。このような状況では、本方法は予防的な方法である。予防的な方法は、被検体が現在、負傷または外傷につながりかねない1以上の活動に従事しているか、間もなく従事することになるような状況で有用である。また、これらは、フリーラジカルによる細胞、組織ま

50

たは臓器の損傷に関連した疾患または機能障害が発症する見込みがあるような状況でも有用である。よって、本方法は、疾患または機能障害のある患者の処置に有用であるだけでなく、疾患または機能障害の素因があると疑われる患者の処置にも有用である。たとえば、被検体の家族に特定の神経変性疾患の傾向があることが明らかになった場合、被検体に酸化セリウムナノ粒子を与えてその疾患による影響を回避または低減することができる。同様に、核エネルギー産業または武器産業での労働者など、あるいは高レベルの太陽光とそのUV成分を浴びることになる休暇に行こうとしている人など、被検体が高レベルの放射線を浴びる疑いがある場合には、本発明の酸化セリウムナノ粒子で処置できる。もうひとつ別の例では、衣服やヘルメットをはじめとする軍服を、酸化セリウムナノ粒子を含有させて製造し、放射線を浴びる可能性のある部隊用に遊離電子とガンマ線照射を除去することが可能である。

10

## 【0023】

予防的な方法および治療法に匹敵するもうひとつの例として、上記の方法が予防的な方法の実施形態では、量は、将来的に被検体で生成されるかもしれないフリーラジカルによる細胞死または機能不全または組織や臓器の損傷を低減するか、これを遮断するのに効果的な量である。たとえば治療法では、頭部への負傷後に、患者に酸化セリウムナノ粒子を投与して負傷に伴う脳の損傷を低減すればよい。これに対し、予防的な方法では、自動車レースまたは他の高速で行われる活動など、頭部への負傷の見込みがある活動に従事する前に被検体に酸化セリウムナノ粒子を投与すればよい。

20

## 【0024】

酸化セリウムナノ粒子を投与する行為には、粒子が意図した目的で機能できるように酸化セリウムナノ粒子を被検体に与える、どのような行為も可能である。たとえば、注射または注入によって投与することが可能である。よって、筋肉内注射、腹腔内(*intraperitoneal*)注射、皮下注射またはくも膜下腔内注射、あるいは低速点滴またはボーラス注入が可能である。投与方法の他の非限定的な例として、多くの場合は無傷の皮膚に対してあるが、開放創、病変または患部の上でもよく、ローション、軟膏または包帯などによる局所投与があげられる。さらに他の非限定的な例として、乾燥粒子または粒子を含む噴霧の吸入による鼻腔内投与などによる粘膜経由での投与、経口摂取、舌下吸収、皮下的な手段によるもの、直腸送達または腔送達があげられる。送達の賦形剤は、好適な形態であればどのような形態であってもよく、たとえば、経口液剤、ゲル、錠剤、カプセル、粉末、坐薬、不溶解性のもの(*infusible*)、薬用ドロップ(*loosening*)、クリーム、ローション、軟膏、吸入抗原または注射の形態などである。

30

## 【0025】

この方法の実施形態によれば、この方法は、酸化セリウムナノ粒子を接触させる行為(投与など)を繰り返すことを含み得る。被検体への酸化セリウムの投与に関する実施形態では、投与を繰り返すことには、最初の投与に加えてさらに1回以上投与することを含み得る。各被検体に投与される量は、患者の体重、全体的な健康、代謝活性などの製薬の用量に関して考慮される通常の要因によって異なる。同様に、投与されるナノ粒子の用量あたりの適量を判断する上で、投与モード(注射、経口投与など)も考慮されることになる。

40

## 【0026】

一般に、所望の治療効果または予防効果を得る上で、投与1回あたりあるいは投与1回あたりの体重1kgあたり約0.05ng、0.1ng、0.5ng、1ng、10ng、50ng、100ng、500ng、1000ng、1μg、5μg、10μg、50μg、100μg、500μgまたは1gなど、約0.01ngから約1gの投薬量が有効であろう。もちろん、注射量または注入量であれば上記の範囲の下限になることが多く、経口投与の量は上限になることが多い。現段階での結果から判断すると、20nmの酸化セリウムナノ粒子での最適な用量は、血中濃度および細胞内液濃度で10nMから1μMである。しかしながら、粒子の作用は他の可変要因に対する依存性が極めて高いため、これらの量は、表面積、被検体の種、投与理由などによって変わってくるであろう。上記の方法を試験管

50

内または生体外にて実施するのであれば、洗浄などによって余分な粒子をいつでも簡単に取り除くことができるため、より多い量にしてもよい。

#### 【0027】

この方法は、哺乳動物細胞、ショウジョウバエ、マウスにおいて低い毒性を示しているため、他の動物細胞でも低い毒性を示すと思われる点に注意されたい。こうして新しく有用な改良がなされたことで、以前の発明よりも低い毒性で本発明の方法を被検体に用いることができる。この本発明の重要な特徴は、広範囲にわたる用途に酸化セリウムナノ粒子を利用可能なことを意味する。好ましい実施形態では、酸化セリウムナノ粒子は、組織培養物で毒性を生じることが明らかになっているドクサートナトリウム (docusate sodium) を含有しない。また、好ましい実施形態では、細胞に対して毒性となる他の汚染イオン、金属または他の物質も 1% (w/w または w/v) 未満である。

10

#### 【0028】

酸化セリウムナノ粒子は極めて低い毒性を示しているが、場合によっては、少用量の粒子を複数回個体に与えるのが望ましいこともある。このような事例では、上記の方法で、最終的に投与される量が有効量であるような、全有効量未満を 2 回以上投与するようにしてもよい。同様に、2 回目またはそれ以降の投与を最初の投与から十分に間隔を置いて行う有効用量の複数回投与が望ましいこともある。すなわち、酸化セリウムナノ粒子は極めて安定しているため、投与後であっても、数ヶ月間または数年間後などかなり期間をあけても有効用量の繰り返し投与がなされると想定される。

20

#### 【0029】

さらに、複数回投与を行う場合、異なる投与方法を利用してもよい。たとえば、2 回用量を投与するのであれば、一方を注射で、他方を経口とすることが可能である。さらに、3 回用量以上を投与するのであれば、2 以上を同じモードで行い、残りを 1 以上の異なる方法にして、それをどのような数と順序で組み合わせてもよい。もちろん、複数回投与を用いる場合、投与ごとに異なるモードで行ってもよい。投与方法、その繰り返し回数、投与方法の順番については、さまざまな条件を考慮して当業者が選択すればよく、このような選択は十分に当業者の能力の範囲内である。

20

#### 【0030】

また、上記の方法は、試験管内でも実施可能なものである。これは、少なくとも 1 個の細胞と少なくとも 1 個の酸化セリウムナノ粒子との接触を、ペトリ皿、試験管、IV 管 (IV tube) または接触に適用可能な他の任意の容器で行い得ることを意味する。試験管内にて実施する場合、これは、生体内での治療計画に有用なパラメータを特定する方法であってもよい。この方法を実施して、ナノ粒子と薬剤との併用が細胞に対しておよぼす影響について研究することができる。たとえば、酸化セリウムナノ粒子を、ビタミン E (Vit E)、n-アセチルシステイン (AC) またはメラトニン (Mel) などの他の周知の酸化防止剤と併用することが可能である。また、酸化セリウムナノ粒子を特定疾患用の薬剤と併用してもよい。さらに、試験管内での方法には、フリーラジカルが細胞におよぼす影響を観察したり、細胞のタンパク質発現、細胞形態学または関心のある他の任意の特徴の変化を観察したりするための研究道具として、酸化セリウムナノ粒子を用いることを含めることができる。

30

#### 【0031】

好ましい実施形態では、ゾル-ゲル法以外の方法で作製したサイズ限定の酸化セリウムナノ粒子を用いて上記の方法を実施する。本発明において有用なナノ粒子は、一定範囲内にしっかりと集まつた、あらかじめ規定されたサイズのものである。概して、粒子のサイズは約 1 nm 以下から約 500 nm である。実施形態では、粒子は 11 nm 以上である。粒子を細胞内部に取り込む実施形態では、細胞に取り込まれる粒子の好ましい範囲は、約 20 nm など約 11 nm から約 50 nm である。細胞の外から粒子がその影響を細胞におよぼす実施形態では、細胞外の粒子の好ましい範囲は約 11 nm から約 500 nm である。実施形態では、粒子は約 40 nm から約 500 nm である。他の実施形態では、粒子は、約 11 nm から約 20 nm、約 15 nm から約 20 nm、約 11 nm から約 15 nm ま

40

50

たは約30nmから40nmなど、約11nmから約40nmである。もちろん、これらの大まかなサイズ内であれば、どのような特定のサイズ範囲でも可能であり、サイズについては任意の数のパラメータに基づいて施術者が選択する。本発明の、「約」という用語は、粒子の統計的に有意な部分に対する10%の誤差を示すのに用いられる。このため、サイズ20nmの粒子とは、粒子の大部分が18nmから22nmの範囲におさまる粒子のことである。実施形態では、酸化セリウムナノ粒子の95%が約15nmから約25nmの間のサイズである。実施形態では、酸化セリウムナノ粒子の95%が20nmの5%以内である。他の実施形態では、酸化セリウムナノ粒子の90%が約18nmから約22nmの間のサイズである。

#### 【0032】

本発明は、酸素ラジカルなどのフリーラジカルが関与する疾患または機能障害に罹患しているか、罹患している疑いのある個体を処置する方法を提供するものである。同様に、本発明は、酸素ラジカルなどのフリーラジカルに起因するか、酸素ラジカルなどのフリーラジカルの発生につながる負傷に伴う合併症に罹患しているか、罹患している疑いのある個体を処置する方法を提供するものである。概して、本発明の方法は、フリーラジカルによって個体に生じる、細胞、組織または臓器の損傷を低減するか、これをなくすのに十分な量の酸化セリウムナノ粒子を、個体（本願明細書では「被検体」および「患者」と同義に用いる）に投与することを含む。よって、本発明は、細胞および生物体の寿命を促進し、炎症および炎症性機能障害を低減し、炎症性機能障害による組織の損傷を低減し、放射線障害を低減するのに、酸化セリウムナノ粒子を使用することを包含する。

#### 【0033】

上記の開示では試験管内の投与について論じているが、本発明には生体外での投与も包含する旨を認識することが重要である。このため、本発明による方法は、少なくとも1個の細胞を生物体から除去し、その細胞に酸化セリウムナノ粒子を投与した後、細胞を元の環境（患者の体内など）に戻すことを含み得る。このような状況では、投与する行為が、たとえば培養皿または管の中でナノ粒子を細胞に曝露させるだけであってもよい。特定の一実施形態では、生体外での投与方法は、患者から血液を採取し、この血液を酸化セリウムナノ粒子に曝露し、処理済みの血液を患者に戻すことを含む。この方法には、血液を患者に戻す前にその血液から酸化セリウムナノ粒子を分離することを含むことが可能である。

#### 【0034】

本発明の方法の一実施形態では、酸化セリウムナノ粒子を用いて原核生物細胞の寿命を延ばすことができる。たとえば、過発現タンパク質を長時間にわたって生成できるよう大規模な大腸菌細胞培養物に酸化セリウムナノ粒子を加えると、それまでよりも効率的かつコスト効率のよい生成が可能になる場合がある。過発現されることがある関連のヒトタンパク質には、抗体フラグメント、シングルドメイン抗体、さらには現段階で製薬業界において「生物学的」であるとされているタンパク質をはじめとするヒトの健康にとって重要な他の任意のタンパク質があげられる。

#### 【0035】

もうひとつの実施形態では、酸化セリウムナノ粒子を用いて真核細胞の寿命を延ばすことができる。一例では、ナノ粒子を利用して、ヒトタンパク質を生成する酵母細胞培養物の寿命を延長させることができる。具体的には、炭疽菌保護抗原、肝炎ワクチン、マラリア抗原などのヒトの健康にとって重要なヒトタンパク質を生成する酵母培養物を、それまでよりも長期間にわたって増殖させることができる。ビールなどの消費財や他の製品の製造に固定化酵母細胞バイオリアクター系を用いる連続発酵でも、酸化セリウムナノ粒子を加えた後に酵母細胞の寿命を延長させると利益が得られる場合がある。これと同じ酸化セリウムナノ粒子の効果を、ヒトワクチン抗原または他のヒトタンパク質を生成する培養物などの植物細胞培養物に利用できる。さらに、組換えヒト抗体およびヒトの健康にとって重要な他のタンパク質を生成する哺乳動物の細胞培養物でも、酸化セリウムナノ粒子の添加による寿命の延長から利益を享受できる。

10

20

30

40

50

## 【0036】

もうひとつの実施形態では、本発明を利用して、予防的または治療的に、生物体における細胞の寿命に影響を与える。これらの方法では、予防的または治療的に、フリーラジカルに関連する疾患または機能障害、あるいはフリーラジカルによる細胞死または組織や臓器の損傷を処置またはこれに影響を与える。概して、この方法は、被検体においてフリーラジカルによって引き起こされる細胞、組織または臓器の損傷を低減するか、これなくすか、あるいは遮断できるだけの十分な量の酸化セリウムナノ粒子を被検体に投与することを含む。

## 【0037】

一実施形態では、酸化セリウムナノ粒子を細胞に取り込むことが可能である。この場合、粒子は細胞内のフリーラジカルを低減するか、これをなくすよう作用することができる。この方法を、脳疾患、脊髄疾患または他の神経外傷の予防または処置の目的で用いることが可能である。また、この方法を、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、多発性硬化症、毒素による損傷または発作などの神経変性障害の処置または予防に用いることも可能である。この方法を、循環器疾患、糖尿病、網膜の疾患、喘息、呼吸器の機能不全、さらには慢性閉塞性肺疾患および狼瘍などの自己免疫疾患またはアレルギー疾患の処置または予防に用いてもよい。上述した疾患は一例にすぎず、いずれにしろ本発明を限定するものではないことは理解できよう。

10

## 【0038】

もうひとつの実施形態では、酸化セリウムナノ粒子は細胞に有意な量で取り込まれることはないが、血管内または間質腔に送られる。この実施形態では、ナノ粒子が、細胞の外でフリーラジカルを低減するか、これをなくすよう作用できる。これによって、炎症および炎症性機能障害を低減することが可能である。酸化セリウムナノ粒子は、炎症を全身的に（被検体の体全体で）または局所的に（炎症細胞の部位で）低減できる。ナノ粒子は、子癇前症につながる炎症または創傷によって生じる炎症を低減するか、これをなくすことができる。また、被検体への医療用人工器官挿入による炎症を低減するか、これをなくすこともできる。溶解性または多孔性マトリックスなどの組成物にナノ粒子を含有させることで、特定の部位にナノ粒子を保持すなわち、少なくとも一定の期間実質的に保持してもよい。

20

## 【0039】

さらに、酸化セリウムナノ粒子を被検体の皮膚表面に接触させ、その皮膚表面で細胞および生物体の寿命を延長させることも可能である。皮膚の老化と皮膚の炎症は密接に関連している。炎症では、細胞の酸化状態の変化に関与する好中球の活性が増す。炎症の化学的メディエータを付活するフリーラジカルが生成される。皮膚の老化では、正常な代謝、UV照射、他の環境要因によってフリーラジカルが形成される。皮膚表面で酸化セリウムナノ粒子を用いると、皮膚の老化を防止し、すでに皮膚に負った損傷を低減することができる。この実施形態を化粧用または老化防止用のローションに利用してもよい。これは、クリーム、ローション、ゲル、固形スティック、粉末または当該技術分野において周知の許容可能な他の任意の組成物の形態などであればよい。

30

## 【0040】

さらに、酸化セリウムナノ粒子を、UV照射などのタイプの放射線に対する保護に用いることも可能である。大きな酸化セリウム分子ならびに、酸化亜鉛などの他の酸化物分子には、太陽光線によって生じるUV照射から被検体の皮膚を保護する作用があることが当該技術分野において周知である。しかしながら、細胞に入り込む酸化セリウムナノ粒子に細胞内で放射線に対する保護性があることは、今まで明らかにされていない。本願明細書に示すデータから、酸化セリウムナノ粒子がUV線やガンマ線などのタイプの放射線に対する保護性を発揮できるということが明らかである。本発明は、ベータ線やX線放射などの他のタイプの放射線からも保護するための方法を提供するものである。本発明のセリウム粒子の作用機序は、これよりも大きな当該技術分野において周知の粒子がUV光を細胞に入らないように遮断、反射するなど作用するのに対し、本発明のナノ粒子は生化学的

40

50

レベルで細胞内でのUV光の影響を弱めるよう作用するという点で、大きな粒子の作用機序とは異なる点に注意されたい。

【0041】

本発明のもうひとつの実施形態は、被検体の予防的放射線防護である。たとえば、被検体が癌のために放射線治療を必要とする場合、癌性細胞周囲の正常かつ健康な細胞もいくつか放射線に曝露されることになる。本発明は、放射線治療の前に酸化セリウムナノ粒子に曝露させることで、正常かつ健康な細胞を保護するための方法を提供することによって、この問題に対処するものである。他の例では、放射線曝露率が高い作業環境または軍やバイオテロリズムの用途などでの放射線防護目的で被検体を酸化セリウムナノ粒子に曝露することが可能である。

10

【0042】

さらに別の態様では、酸化セリウムナノ粒子と、酸化セリウムナノ粒子を含む組成物とが得られる。酸化セリウムナノ粒子は、サイズが限定されており、フリーラジカルが関与する疾患または機能障害の処置が必要であるか、必要になる疑いのある被検体に、単回投与または複数回投与できるだけの十分な量で提供される。組成物には、本発明の酸化セリウム粒子を、一般に細胞を殺すことなく生細胞に曝露できるという点で生物学的に許容される物質である、一種または複数種の他の物質と一緒に含んでもよい。実施形態では、この他の物質は薬学的に許容される物質である。本願明細書において使用する場合、「薬学的に許容される物質」とは、溶媒、コーティング、抗菌薬および抗真菌薬、さらには生物学的に許容される他の任意の成分を含むことを意図している。このような担体の例として、水、生理食塩水、デキストロース溶液、ヒト血清アルブミン、リポソーム、ヒドロゲル(hydrogel)があげられるが、これに限定されるものではない。このような媒質および薬剤を薬学的に活性な物質に用いることは当該技術分野において周知であるため、各々を有効濃度で組成物に取り入れる実例と方法について、本願明細書でさらに論じることはしない。

20

【0043】

本発明の特定の態様は、酸素フリーラジカルなどのフリーラジカルに関連のある疾患および機能障害の処置に、酸化セリウムナノ粒子を使用しようとするものである。この使い方は、特に、細胞をフリーラジカル損傷から保護する生体内での治療法または予防的な方法に向けられている。本発明の他の特定の態様は、製薬または治療用組成物などの医療用途向けの組成物の調製に、酸化セリウムナノ粒子を使用しようとするものである。概して、粒子の使用は、これを他の物質と併用して医療用組成物を製造することである。

30

【0044】

本発明の他の態様は、酸化セリウムナノ粒子を含む容器を提供するものである。概して、本発明による容器には、ゾル-ゲル法以外の方法で作製されたサイズ限定の酸化セリウムナノ粒子が、酸素ラジカルなどのフリーラジカルが関与する疾患または機能障害に罹患している、あるいは罹患する危険性のある被検体に、酸化セリウムを少なくとも単回投与できるだけの十分な量で入っている。たとえば、この容器には、ヒトまたは非ヒト動物被検体への1回投与に十分な酸化セリウムナノ粒子と、任意に、1種以上の他の生物学的に許容される物質とを入れることができる。特定の実施形態では、この容器は、物質を被検体に送達する際に用いられる1個以上の他の容器および/または1個以上の製品または装置(注射器、注射針、消毒綿球、滅菌生理食塩水溶液など)と一緒にパッケージで提供される。いくつかの実施形態では、1個以上の容器を含むキットが得られる。

40

【0045】

単独で提供するか、組成物の一部またはキットの一部として提供するかとは関係なく、酸化セリウムナノ粒子は、どのような好適な物理形態で提供されるものであってもよい。したがって、乾燥粒子として、あるいは液体組成物の一部として提供してもよい。液体組成物の一部である場合は、この組成物は一般に、水またはリン酸緩衝生理食塩水(PBS)または他の塩緩衝液などの水性緩衝液を含む。一般に、細胞毒性などの悪影響を伴うことなく生体への導入または生細胞との接触を行うには液体組成物が好適であるのが好まし

50

い。これは一般論として好ましいということであるため、細胞への曝露時に生細胞に曝露される際、成分が非毒性の形態または非中毒濃度で存在するのであれば、液体組成物に有毒成分を含有させられることは理解できよう。乾燥ナノ粒子を投与する実施形態では、このナノ粒子は精製状態であってもよく、1種以上の他の成分を含む組成物中に含まれてもよい。他の成分は非毒性であるか、有毒な場合も、投与されると全体としては細胞または被検体にとって有害ではない量で存在するのが好ましい。非有毒成分の例としては、塩（リン酸ナトリウムまたは塩化ナトリウムなどのナトリウム塩など）、糖（ブドウ糖、スクロースなど）、保存剤ならびに、抗生物質、抗炎症剤、アルブミン、脂質または他の薬剤があげられるが、これに限定されるものではない。送達の賦形剤は、経口液剤、ゲル、錠剤、カプセル、粉末、坐薬、不溶解性のもの、薬用ドロップ、クリーム、軟膏、吸入または注射の形態とすることができます。

10

#### 【0046】

一般に、この粒子またはこの粒子を含む組成物は無菌になるか、被検体への投与または他の使用の前に滅菌されている。粒子の滅菌については、加熱滅菌、濾過、光線照射を含むがこれに限定されるものではない、当該技術分野において周知の好適な任意の手法で行えればよい。このため、実施形態では、本発明の方法は、無菌または滅菌された酸化セリウムナノ粒子を提供することをさらに含むか、あるいは、被検体への投与前にナノ粒子を滅菌することをさらに含む。

#### 【0047】

本発明は、酸化セリウムナノ粒子を含む組成物を提供するものである。この組成物は、薬学的に好適なキャリア、栄養補給剤または栄養補助食品を含み得る。そのように限定されるわけではないが、一般に、この組成物はナノ粒子以外の1種または複数種の他の物質を含み、この他の物質は生物学的に許容される（すなわち、非毒性であるか、非毒性の量で存在する）。このような物質の例は当業者間で周知であり、糖、塩、脂質、薬剤、賦形剤（excipients）、担体、香味剤（flavorant）、注入剤（filler）、バインダー、ガム、着色剤、水、緩衝液、洗浄剤、生物学的に活性な化合物などを含むがこれに限定されるものではない。

20

#### 【0048】

また、本発明はキットも提供するものである。概して、このキットは、少なくとも1名の患者を少なくとも1回処置して、細胞、組織または臓器の損傷を引き起こし得るフリーラジカルを低減するか、これをなくすことができるだけの十分な量で酸化セリウムナノ粒子を含む。一般に、このキットのナノ粒子は、1個以上の容器に入れて提供され、少なくとも患者の1回の投薬に十分な量のナノ粒子が各容器に入っている。キットには、本発明の方法を実施するのに必要ないくつかの成分または全成分など、他の成分を含めることも可能である。たとえば、キットの実施形態では、別成分またはナノ粒子を含む組成物の一部として、アルブミンが含まれる。アルブミンは、たとえば5～20Hzで2分間の超音波処理によるナノ粒子の破壊（これは、送達用の特定の配合を得るのに必要になる場合がある）の使用や量を減らすためのものである。キットには、一定用量のナノ粒子を投与するための注射器を入れてもよい。また、このキットには、送達前に粒子を滅菌するためのフィルタを入れてもよい。しかしながら、キットに入れる前に粒子を滅菌するか、あるいは、全成分を入れた後にキット全体を滅菌するのが好ましい。同様に、患者への粒子の投与前に乾燥ナノ粒子を再水和または再構築するための滅菌水または緩衝液を含めてよい。実施形態では、全部を1つの容器（バイアルなど）に入れるか、あるいは2個以上の容器に分けて、複数回投与量のナノ粒子をキットに含めておく。本発明はリポソーム中のナノ粒子を投与または送達する（本願明細書では同義語として用いる）ことを企図しているため、本発明によるキットには、リポソーム、特にナノ粒子を持たせたリポソームを含めてもよい。

30

#### 【実施例】

#### 【0049】

以下の実施例を参照して本発明についてさらに説明するが、これらの実施例は単に本発

40

50

明を例示することを意図したものであり、決して本発明を限定するものとみなされるべきものではない。

【0050】

実施例1：細胞および生物体の寿命の延長

10 nMの単回投与量の酸化セリウムナノ粒子を用いることで、培養したラット脳細胞（ニューロン、星状膠細胞、ミクログリア）の寿命が28日から182日（6ヶ月間）まで延長された。送達のために、ナノ粒子を非凝集形態としておいた。これを実現するため10  
10に、超高純度水（16メガオーム）または超高純度水を用いて調製した生理食塩水中で、約10重量%のストック溶液を超音波処理した。ストック溶液の超音波処理は、プローブソニケータを用いて3分間行った。10 mMから開始して、100 nM以下まで落として希釈物を生成した。リン酸緩衝液や他のイオン性緩衝液は、凝集性を高めることが分かっているため使用しなかった。使用前またはさらに希釈する前に、連続希釈物をすべて3分間超音波処理した。重要なことに、老化したニューロンおよび星状膠細胞は、若くて（younger）未処理のものと機能的に同等であった。酸化セリウムナノ粒子処理後の老化培養物中のグルタミン酸塩、GABA、アセチルコリンに応答した神経伝達も、若い培養対照の場合と同様であった。さらに、同様の用量の酸化セリウムナノ粒子を経口的に（餌に入れて）投与したところ、ショウジョウバエであるキイロショウジョウバエ（Dr  
osophia melanogaster）の寿命が延長された。

【0051】

図1は、ナノ粒子が培養物中の器官型脳細胞の最大寿命にどのように影響するのかを判断するための実験結果を示す。ラットの大脳皮質から得た混合脳細胞培養物を試験管内にて10日目に10 nMの酸化セリウムナノ粒子で処理した。対照には賦形剤単独（生理食塩水）を与えた。この図から、ナノ粒子が細胞の寿命に劇的な影響をおよぼすことが分かる。D I V = 試験管内での日数  
20

【0052】

図2は、ナノ粒子がキイロショウジョウバエの寿命にどのように影響するのかを判断するための実験結果を示す。これらの結果から、ハエの寿命が有意に増したことが分かる。酸化セリウムナノ粒子を使用する場合と使用しない場合とで、キイロショウジョウバエ（Oregon R菌株）に指示濃度で標準的なハエ用の混合餌を筐体から与えた。ここで、最大寿命が長くなるだけでなく、ナノ粒子処理対照（点線）では50%の個体群が死ぬまでの時間も長くなることに注意されたい。ハエには、生存期間のあいだを通して、指示濃度の酸化セリウムナノ粒子を含有する餌を筐体から与えた。酸化セリウムナノ粒子のストック溶液濃縮物を上述したようにして（超音波処理法）調製し、調製時（すなわちハエの餌が液体状のままのうち）にハエの餌（ジャズミックス）に加えた。粒子を加えた後5分間餌を超音波処理し、餌の媒質中にナノ粒子が凝集せずに確実に懸濁するようにした。バイアル1つあたりハエ20匹と餌媒質5mlの入ったバイアルで、標準的な条件下でハエを成長させた。死んだハエの数を1～2日ごとに数えた。  
30

【0053】

実施例2：酸化セリウムナノ粒子のフリーラジカル除去能

酸化セリウムナノ粒子の構造を考慮して、本願発明者らは、酸化セリウムナノ粒子がフリーラジカルスカベンジャーとして作用することで細胞の寿命を促すのではないかと仮定した。この仮説を検証するために、本願発明者らは、致死量および致死未満量のフリーラジカル生成剤、過酸化水素、UV光に、培養した脳細胞を曝露した。酸化セリウムナノ粒子に曝露することで、これら両方のフリーラジカル生成剤に対する有意な保護が得られ、細胞死が60%を超えて減少した。UVおよび過酸化水素による損傷に対する保護は、培養物中にて10日目に酸化セリウムナノ粒子で処理した3ヶ月経過培養物でも保たれた。このように、酸化セリウムナノ粒子による作用は、単回投与後でも長期間継続する。  
40

【0054】

従来のフリーラジカルスカベンジャーであるビタミンE、メラトニン、N-アセチル-システインとの間で酸化セリウムナノ粒子の影響を比較する研究によって、酸化セリウム  
50

ナノ粒子だけが寿命を促進できることが示された。さらに、従来のフリーラジカルスカルベンジャーの単回投与および複数回投与の場合よりも、酸化セリウムナノ粒子はフリーラジカルによる損傷に対する保護性が優れていた。

#### 【0055】

酸化セリウムナノ粒子がフリーラジカル消去機序で作用するという本願発明者らの仮説をさらに裏付けるために、本願発明者らは、フリーラジカルでの負荷試験時に、酸化セリウムナノ粒子を与えた細胞ならびに酸化セリウムナノ粒子溶液の励起スペクトルに新たなシフトを検出した。細胞および酸化セリウムナノ粒子溶液では、励起スキャンによって、還元(reduced)(+4)原子価状態での酸化セリウムナノ粒子のピーク励起451が明らかになる。フリーラジカルでの負荷試験時、励起極大が356nmにシフトすることから、セリウムが+3原子価状態に変化したのではないかと思われる。5~20分後、励起スペクトルがピーク極大451で励起する通常の休眠状態に戻ることから、元の酸化セリウム格子構造が再生したのではないかと思われる。

10

#### 【0056】

図3は、細胞内酸化セリウムナノ粒子の励起スペクトルを示し、フリーラジカル消去イベントの際にスペクトルが変化することを示している。図で示す実験では、試験管内にて10日目に10nMの酸化セリウムナノ粒子で星状膠細胞を処理し、18日目に蛍光分析的に調べた。細胞培養物を洗浄し、リン酸緩衝生理食塩水中に入れ、図示のように励起スペクトルスキャンをほどこした。510nmより上で放出が測定された。100μMのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>をフリーラジカル生成剤として加えている間、高速デルタラム(DeltaRam)スキャナを用いて励起スキャンを0.01msecごとに集めた。対照(未処理)細胞では図示の範囲と大きさでは蛍光放出は認められなかった。図3に示すように、セリウムの励起スペクトルのシフトから、酸化物格子またはセリウム原子で電子の入れ換えイベントが明らかになる。これらの結果から、酸化セリウムナノ粒子を含む細胞で同様の励起スペクトルシフトが起こるが、これはH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によって生成されるものなどのフリーラジカルとの反応時に発生することを示している。重要なことに、456nmの励起極大に戻ることから、酸化セリウムナノ粒子が細胞中で自らのフリーラジカル消去能を再生可能なのではないかと思われる。

20

#### 【0057】

##### 実施例3：毒性および生体内分布

30

電子顕微鏡検査、顕微分光測光法および誘導結合プラズマ質量分析を利用して、本願発明者らは、20nm未満のサイズの酸化セリウムナノ粒子が培養細胞ならびに生きた生物体の細胞に容易に入り込むことを見いだした。さらに、細胞培養物の寿命を延長させる用量の100倍と多い用量で、ショウジョウバエでの明白な毒性は認められなかった。0.3~3mMをマウスに1回尾静脈注射した場合も、臓器または拳動の明白な異常は発生しなかった。酸化セリウムナノ粒子は、6ヶ月の期間にわたってほとんど排出されず、脳、心臓、肺に優先的に蓄積することが明らかになった。0.3mMの用量で、組織セリウム濃度がほぼ倍になった(バックグラウンドとの比較)が、ppbの範囲にとどまっていた。

40

#### 【0058】

図4は、ナノ粒子で処理したマウスの組織セリウム測定結果を示す。具体的には、各々に300ナノモルの酸化セリウムナノ粒子を含有させて5~10μlをBalb/cマウスに尾静脈注射で投与した。3ヶ月後、マウスを安楽死させ、臓器を回収した。誘導結合プラズマ質量分析で組織セリウムを測定した。組織セリウム濃度が最も上昇したのは、体内で最も酸化的な臓器である脳、心臓、肺であった点が興味深い。

#### 【0059】

##### 実施例4：外傷からの保護

広く公開されているヒトの頭部の負傷を表現した試験管内モデルを利用して、本願発明者らは、外傷に応答した脳細胞の損傷と、損傷によって誘発されるフリーラジカルの生成とがある程度は関連しているかもしれないことを示した。10日目に試験管内にて酸化セ

50

リウムナノ粒子で処理した脳細胞培養物では、15～18目に試験管内にて外傷に投与すると細胞の損傷が60～70%減少した。さらに、損傷後3時間までの間に酸化セリウムナノ粒子を送達すると、損傷の度合いに応じて神経細胞死が40～50%減少した。このように、酸化セリウムナノ粒子は、外傷およびフリーラジカル損傷に関連する他の形態の神経変性の処置をなすものである。

#### 【0060】

脳の外傷では、持続性の神経脱落を引き起こす神経機能障害が頻繁に認められる。ここで、本願発明者らは、こうしたヒトの頭部の負傷と試験管内モデルとの関連性を示す。本願発明者らは、損傷前または損傷後にナノ粒子を送達させることで、星状膠細胞とニューロンの両方で神経伝達物質刺激カルシウムシグナリングによって測定した場合の神経機能障害が有意に低減されることを見いたしました。10

#### 【0061】

図5は、外傷を受けた脳細胞にナノ粒子がどのように影響するのかを示している。混合器官型脳細胞培養物に、すでに説明がなされている (Zhang, Rzignalinskiら、Science 274: 1921～1923、1997) ようにして試験管内にて外傷を与えた。10日目に試験管内にて、あるいは損傷の3時間後に培養物に酸化セリウムナノ粒子 (10nM) を送達させ、損傷後24時間の時点でヨウ化プロピジウム染色によって神経細胞死を評価した。細胞に対する好影響が明白である。

#### 【0062】

図6は、外傷を受けた脳細胞にナノ粒子がどのように影響するのかをさらに示している。上述したようにして、混合器官型脳細胞に試験管内にて外傷を与えた。酸化セリウム (10nM) ナノ粒子を損傷の3時間後に送達させ、損傷後24時間の時点でFura-2顕微分光測光法を用いてニューロン細胞内の遊離カルシウム ( $[Ca^{2+}]_i$ ) シグナリングを判定した。損傷のないニューロン (黒い実線) は、しっかりとニューロン間シグナリングを表す規則的な細胞内遊離カルシウムの振動を示した。グルタミン酸塩は、 $[Ca^{2+}]_i$  を262nMまで上昇させた後、基底に戻した。損傷した未処理の培養物 (鎖線)  $[Ca^{2+}]_i$  ではシグナリングが乱れている。ニューロンは、グルタミン酸塩に対する応答なしで基底  $[Ca^{2+}]_i$  の劇的な上昇を誘発したか、興奮毒性を示唆させるグルタミン酸塩に対する応答を劇的に強めた。酸化セリウムナノ粒子で処理済みの損傷した培養物では、正常な基底  $[Ca^{2+}]_i$  、振動およびグルタミン酸塩シグナリングが保たれた (淡灰色の線)。図示の結果は、90を超えるニューロンを含む12回の異なる実験を代表するものである。2030

#### 【0063】

##### 実施例5：ナノ粒子の抗炎症特性

フリーラジカル生成およびこれに関連する細胞損傷は、関節炎、アルツハイマー病、多発性硬化症、アテローム性動脈硬化症、ALS、パーキンソン病、自己免疫疾患、アレルギー性機能障害をはじめとする多くの炎症性機能障害の要素である。本願発明者らは、酸化セリウムナノ粒子が、炎症および炎症性の細胞損傷に対する強力な阻害剤であることを見いたしました。本願発明者らの研究から、酸化セリウムナノ粒子を用いることで、脳ミクログリア (MG) での炎症反応が低減され、活性化された炎症性の脳MGによって誘発される神経細胞死が減少し、さらには脳MGでのインターロイキン1- $\alpha$  ならびにアラキドン酸カスケードの炎症性メディエータの放出量が減ることが分かる。また、本願発明者らは、酸化セリウムナノ粒子が、ヒト好中球およびマクロファージ様細胞系HL-60およびU937の炎症性の活性状態を低減し、ヒト好中球およびマクロファージ様細胞系 (HL-60 & U937) でヒスタミン、細菌リポ多糖 (LPS) およびfMLP (f-met-1- $\epsilon$ u-phe、遊走ペプチド) によって開始される炎症反応を減らすことも見いたした。したがって、酸化セリウムナノ粒子は、炎症性機能障害ならびに免疫機能障害に対する新規な処置となる。40

#### 【0064】

図7は、酸化セリウムナノ粒子が、リポ多糖 (LPS) によって開始される炎症反応を50

低減することを示している。実験から、炎症性細胞としてのミクログリア (M G) は、「活性化」として知られる炎症性の機能を上方制御することで、外傷性の脳負傷に応答することが明らかになっている。「活性化される」と、M G は損傷したニューロンまたは異常機能しているニューロンを取り除くのに不可欠になる。M G は、フリー・ラジカルの大量放出によって健康なバイスタンダー (b y s t a n d e r) ニューロンに破壊的な力を与え、これが周囲のニューロンを損傷すると仮定する。本願発明者らの過去の研究では、強力なフリー・ラジカルスカベンジャーである酸化セリウムナノ粒子で処理すると、外傷的に損傷した器官型脳細胞培養物で神経細胞死が減ることが明らかになっている。損傷したときに M G によって放出されるフリー・ラジカルのうちのひとつに一酸化窒素 (N O) がある。M G を 10 nM の Ce O<sub>2</sub> - N P で 24 時間かけて 1 回処理し、ナノ粒子を取り込むようにした。洗浄および培地の交換後、M G を 100 ng / ml の L P S で処理して炎症反応を誘発した。形態と N O 放出を調べた。100 ng / ml の L P S に 24 時間曝露した M G では、16.1 mM の N O が放出された。曝露前に 10 nM の Ce O<sub>2</sub> - N P で 24 時間処理すると、N O 放出量が 62.0 % 減少したことから、Ce O<sub>2</sub> - N P が神経細胞死を亢進しかねない炎症性メディエータの放出量を減らすことが示された。

10

20

30

40

#### 【0065】

図 8 A に示すように、休眠状態の M G は、長い突起のあるコンパクトな細胞体を有する。図 8 B では、M G を L P S で刺激した。休眠状態 (8 A) に比して劇的な形態変化があることに注意されたい。L P S に誘発される形態変化は、8 C に示すように Ce O<sub>2</sub> - N P によってブロックされた。

#### 【0066】

#### 実施例 6：ナノ粒子の放射線防護作用

放射線傷害は、細胞性 D N A、R N A、タンパク質のフリー・ラジカルによる損傷によって細胞死を誘発する。酸化セリウムナノ粒子を用いると、1、3、5 グレイに関連する脳細胞死が、それぞれ 78、62、48 % 低減された。これらの実験では、試験管内にて 10 日目に 10 nM の単回投与量のナノ粒子を投与し、12 ~ 15 日目に培養物に照射した。さらに、照射後 3 時間まで粒子を投与した場合ですら、損傷の低減が観察された。これらの結果から、酸化セリウムナノ粒子には有意な放射線防護特性があり、軍や抗バイオテロリズムの用途での放射線保護に利用できるのではないかと考えられる。さらに、ナノ粒子には、非癌性「バイスタンダー」細胞を放射線傷害から保護することで、癌治療に用いられる可能性もある。

#### 【0067】

図 9 および図 10 は、酸化セリウムナノ粒子での前処理が放射線への曝露にどのように影響するのかを示している。すでに説明がなされている (Zhangら、Science、274、1921 ~ 1923、1996) ようにして、ラットの新生仔および培養物から混合器官型ラット脳細胞を得た。10 日目に試験管内にて、損傷後 24 時間に組織培養液を送達させた後、規則的な培地交換を行って、培養物を + 10 nM の Ce O<sub>2</sub> - N P で処理した。D I V 14 ~ 16 日後、5 分ごとまたは 15 分ごとに紫外線に曝露してフリー・ラジカル損傷を評価した後、ヨウ化プロピジウム (P r I) で細胞死を測定した。ガンマ線照射研究のために、細胞を 1.5 または 5 グレイの放射線に 1 分間曝露した。さらに、Ce O<sub>2</sub> - N P を用いて処理した老化培養物 (68 D I V) にも、UV およびガンマ照射を行って、Ce O<sub>2</sub> - N P の保護作用が老化した培養物中でも維持されるかを判定した。

#### 【0068】

図 9 の実験では、10 D I V に混合脳細胞培養物を Ce O<sub>2</sub> - N P で処理し、16 または 68 D I V に UV 光に曝露した。68 D I V の未処理対照がない点に注意されたい。これは、未処理の混合脳細胞培養物はそこまで長く生存しないためである。Ce O<sub>2</sub> - N P 処理によって、フリー・ラジカル生成による細胞死を誘発することが知られている UV 曝露 5 分後と 15 分後の生存率が劇的に高まった。さらに、これらの細胞の延長された寿命の間、10 nM の単回投与量の Ce O<sub>2</sub> - N P の保護作用が維持された。

#### 【0069】

50

図10の実験では、混合脳細胞培養物を第2のフリーラジカル生成源であるガンマ線照射に曝露した。培養物をCeO<sub>2</sub>-NPで処理し、上述したようにして照射に曝露した。10nMの単回投与量のCeO<sub>2</sub>-NPを10DIVに送達させたところ、ガンマ照射に對して有意な保護が得られ、これも培養物の延長された寿命の間維持された。

【0070】

図11および図12は、ビタミンE、n-アセチルシステインまたはメラトニンを単回投与量または複数回投与量で用いた場合に比して、酸化セリウムナノ粒子のほうがフリーラジカルによる損傷に対する保護性が高いことを示している。これらの実験では、6ウェルのプレートで細胞を培養した。3つのウェルを対照として用い、他の3つを10DIVに以下の薬剤のうちの1つで処理した：10nMの酸化セリウムナノ粒子、100mMのビタミンE、1mMのn-アセチルシステインまたは1mMのメラトニン。薬剤を組織培地に直接送達させ、培地中に24時間放置した後、培地を交換した。ナノ粒子については、10DIVに1回送達しただけであった。他の薬剤は、表記のように単回投与量または複数回投与量で送達させた。14～16DIV後、5分ごとまたは15分ごとに紫外線に曝露してフリーラジカル損傷を評価した後、ヨウ化プロピジウム(PrI)で細胞死を測定した。

10

【0071】

図11の実験では、酸化セリウムナノ粒子または他のフリーラジカルスカベンジャーをDIV10に組織培養液に送達させた。48時間後に培地を交換した後、2～3日ごとに規則的な培地交換を行った。DIV14にUV曝露を実施した。酸化セリウムナノ粒子を用いることで、5分または15分の曝露24時間後にUV光により誘発される細胞死が58%減少した。MLEでも短時間(5分)のUV曝露に関連する細胞死が同程度に低減されたが、長時間(15分)の曝露後にはそれほど効果的ではなかった。ビタミンEを用いると適度の保護程度となった。

20

【0072】

図12の実験では、DIV10に酸化セリウムナノ粒子を10nMの単回投与量で送達したものとの酸化防止剤の複数回投与量の場合と比較した。ビタミンE、n-アセチルシステインおよびメラトニンをDIV10に投与し、DIV12に再度投与した。UVによる細胞損傷を減らすと、ビタミンE、n-アセチルシステインまたはメラトニンの複数回投与量の場合よりも酸化セリウムナノ粒子のほうが効率的であった。

30

【0073】

実施例7：細胞および生物体の寿命の延長に対するさらなる実験

図13および図14は、酸化セリウムナノ粒子をハエに与えると、雄雌どちらのショウジョウバエのライフスパンも長くなることを示している。これらの寿命研究については、10nMのCeO<sub>2</sub>-NPを直接ハエの餌に加えて実施した。フリーラジカルでの負荷試験後にCeO<sub>2</sub>-NPが生存にどのように影響するかを判断するために、10nMのCeO<sub>2</sub>-NPを含有するハエの餌の上に封入した日から、雄雌のハエを連続的に培養した。35日目、5%スクロース溶液中20mMのパラコートで24時間飽和させた濾紙にハエを曝露した。パラコートは、フリーラジカル生成によってハエの死を誘発することが知られているレドックスサイクリング殺虫剤である。死んだハエの数を一定間隔で数えた。24時間を超えて生存しているハエを、対照の餌または適切なCeO<sub>2</sub>-NP濃度で処理した餌の入ったバイアルに戻した。生存しているハエを毎日モニターし続けた。細胞培養物を用いた場合に試験管内で同様の結果が得られ、1nM、10nMおよび1μMの酸化セリウムナノ粒子で、0.1mM、0.5mMおよび1mMのパラコートの存在下で細胞が死から保護された(データ図示せず)。

40

【0074】

図15は、組織培養物中の神経特異エノラーゼ(NSE)の量を示している。培養物中でニューロンが死に絶えていく際、ニューロンは特徴的な酵素であるNSEを放出する。この実験は、組織培養液中のNSE量を、培養物中に残った全量に対する百分率で示している。20～26日目に、ニューロンが死んで溶解される際に培地でNSE放出が劇的に

50

増加する。30日目では、すべてのニューロンが死んでしまう。酸化セリウム処理群（三角形）では、培地中のNSEは上昇せず、基底レベルのままであることから、すべてのニューロンが依然として生きていることが分かる。

【0075】

図16は、丈夫なニューロンおよび星状膠細胞を持って生存している組織培養物の百分率を示している。この実験は、75の対照と酸化セリウム処理培養物でのデータをまとめたものである。各培養物を10日目に試験管内にて単回投与量の10nMの酸化セリウムナノ粒子で処理した。この実験は、酸化セリウムナノ粒子が培養物の寿命を延長させることを表している。

【0076】

図17～20は、ショウジョウバエを酸化的ストレス誘発物質であるパラコートに導入したときに、10nMの酸化セリウムナノ粒子が、雄雌のショウジョウバエの平均寿命と最大寿命を有意に延長させることを示している。この実験では、本願発明者らは、キイロショウジョウバエで酸化セリウムナノ粒子がフリーラジカルスカベンジャーとして作用するという仮説を検証した。酸化的ストレスを誘発するために、本願発明者らはパラコート（メチルビオロゲン）を利用した。文献には、パラコートが、10mMのLD50で超酸化物イオンの生成によってショウジョウバエに重篤な酸化的ストレスを誘発する旨が報告されている。このため、パラコートを日常的に使用し、パラコート負荷試験後の生存を調べることで、酸化的ストレスの減少に対するさまざまな生化学的薬剤の影響を試験する。この研究では、10nMおよび1μMの酸化セリウムを含有するハエの餌の上に封入した日から、雄雌のハエ100匹を連続して培養した。35日目で、ハエに3時間餌を与えた後、5%スクロース溶液中20mMのパラコートで24時間飽和させた濾紙に曝露した。死んだハエの数を一定間隔で数えた。24時間を超えて生存しているハエを、対照の餌または適切なナノ粒子濃度で処理した餌の入ったバイアルに戻した。生存しているハエを毎日モニターし続けた。

10

20

30

40

50

【0077】

実施例8：外傷からの保護を示しているさらなる実験

図21および図22は、酸化セリウムナノ粒子を用いると、単回投与量の他の酸化防止剤に比して、外傷前（図21）または外傷後（図22）に与えた場合に外傷性傷害に対する保護性が高まることを示している。外傷性の脳の負傷についての試験管内モデル（Elliottら、J. Neurotrauma、12、325～339、1995）を利用して、本願発明者らは、混合脳細胞培養物の外傷性傷害が、ある程度はフリーラジカルの生成によって細胞死を引き起こす（Hoffmannら、Lambら、J. Neurochem；68、1904～1910、1997）ことを過去に示している。混合脳細胞培養物を、軽度（5.5mm）、中度（6.5mm）、重度（7.5mm）レベルで損傷させ、PRIを用いて損傷の24時間後に細胞死を評価した。

【0078】

図23から図26は、酸化セリウムナノ粒子が脳ミクログリアからのNO放出量を減らすことを示している。試験管内での外傷についての十分に特徴づけられたモデルを用いて星状膠細胞の純粋な培養物を損傷させた。本願発明者らは、外傷的に損傷した星状膠細胞によって調整した培地への曝露によって、ミクログリアの活性化が誘発されることを過去に示している。このように活性化されたMGは神経細胞死を誘発する。これらの実験では、軽度、中度または重度に損傷した星状膠細胞で調整した培地への24時間の曝露によってミクログリアを活性化させた。また、損傷のない星状膠細胞で調整した培地に曝露したミクログリアを対照とした。これらの実験では、正の対照としてLPSを利用した。内毒素として作用しているLPSは、ミクログリア上のレセプターと結合し、炎症性サイトカインの分泌を引き起こし、NOの放出を促進する。対照のミクログリアまたはナノ処理したミクログリアを100ng/mlのLPSに24時間曝露した後、図5に示すように培地に放出されたNOを測定した。オキシスインターナショナル（Oxis International）およびカルバイオケム（Calbiochem）から提供されているキ

ットを用いて、グリース反応によってNOを測定した。BiTek ELx800自動プレートリーダーで540nmでの吸光度を読み取った。

【0079】

損傷した星状膠細胞で調整した培地への曝露によってMGが活性化されるため、本願発明者らはまず、図23に示すように損傷期間後1時間および3時間の星状膠細胞からのNO放出量を判定した。中度と重度に損傷した星状膠細胞から損傷の1時間後に有意なNO放出があることから、星状膠細胞が脳での酸化的ストレスに重要な役割を果たしていると思われる。

【0080】

図24および図25では、星状膠細胞で調整した培地にMGを1時間または3時間曝露すると、損傷とは関係なく、NO放出量が増えたことから、星状膠細胞が脳MGの炎症ポテンシャルを調節すると思われる。MGを10nMの酸化セリウムナノ粒子で処理すると、いずれの場合もNO放出量が減少した。軽度、中度および重度に損傷した星状膠細胞で調整した培地への1時間の曝露で活性化されたMGでは、酸化セリウムナノ粒子によってNO放出量がそれぞれ29、44、70%減少した。軽度、中度および重度に損傷した星状膠細胞で調整した培地への3時間の曝露で活性化されたMGでは、酸化セリウムナノ粒子によるNO放出量の減少が一層控えめであった。

【0081】

図26では、100ng/mlのLPSに24時間曝露したMGでは、16.1mMのNOが放出された。曝露前に10nMの酸化セリウムナノ粒子で24時間処理すると、NO放出量が62.0%減少したことから、酸化セリウムナノ粒子が神経細胞死を亢進しかねない炎症性メディエータの放出量を減らすことが示された。

【0082】

図27に示すように、休眠状態のMGは長い突起のあるコンパクトな細胞体を有する。重度に損傷した星状膠細胞で調整した培地への曝露によって活性化されたMGは、縮んで短い突起と高度に粒状化かつ空胞化した細胞質のある、なお一層アーバー状の形になる。酸化セリウムナノ粒子での前処置が、MG活性化の際に観察される形態変化をいくつか防止する。また、MGはLPSでも刺激された。休眠状態に比して劇的な形態変化に注意されたい。LPSで誘発される形態変化は酸化セリウムナノ粒子によってブロックされる。

【0083】

本発明を実施するにあたって、本発明の範囲または趣旨から逸脱することなくさまざまな改変および変更をほどこし得ることは、当業者であれば明らかであろう。本発明の明細書および実施を考慮すれば、本発明の他の実施形態も当業者であれば明らかであろう。明細書ならびに実施例は単に例示的なものとみなされることを意図しており、本発明の真の範囲および趣旨は以下の特許請求の範囲によって示される。

【図面の簡単な説明】

【0084】

【図1】酸化セリウムナノ粒子が培養物中の混合ニューロン細胞の最大寿命にどのように影響するのかを示す。

【図2】酸化セリウムナノ粒子がキイロショウジョウバエ(D. melanogaster)の寿命にどのように影響するのかを示す。

【図3】フリーラジカル消去時の細胞内酸化セリウムナノ粒子の励起スペクトルを示す。

【図4】誘導結合プラズマ質量分析で分析して得られた、ナノ粒子注入後のBALB/cマウスでの組織セリウム含有量の薬剤分布グラフを示す。

【図5】ヨウ化プロピジウム染色によって評価した、ナノ粒子で処理した脳細胞培養物(神経細胞死)の応答を示している。

【図6】ナノ粒子で処理した脳細胞培養物(神経細胞死)の応答を示している。

【図7】ナノ粒子で処理した脳細胞培養物の応答を、一酸化窒素放出量の関数として表す。

10

20

30

40

50

【図 8】酸化セリウムナノ粒子が脳ミクログリアにおよぼす形態的な影響を示している。  
【図 9】酸化セリウムナノ粒子での前処理がUV光線への曝露にどのように影響するのかを示している。

【図 10】酸化セリウムナノ粒子での前処理がガンマ線照射への曝露にどのように影響するのかを表す。

【図 11】フリーラジカルによる損傷に対して単回投与量の酸化セリウムナノ粒子で前処理した場合の影響を、単回投与量のビタミンE、n-アセチルシステインまたはメラトニンの場合との比較で示している。

【図 12】フリーラジカルによる損傷に対して単回投与量の酸化セリウムナノ粒子で前処理した場合の影響を、複数回投与量のビタミンE、n-アセチルシステインまたはメラトニンの場合との比較で示している。

【図 13】酸化セリウムナノ粒子を雌のショウジョウバエに与えたときに、ハエの寿命がどのように変化するのかを示している。

【図 14】酸化セリウムナノ粒子を雄のショウジョウバエに与えたときに、ハエの寿命がどのように変化するのかを表す。

【図 15】組織培養液中の神経特異エノラーゼ(NSE)の量を示している。

【図 16】酸化セリウムナノ粒子が組織培養物の寿命にどのように影響するのかを示している。

【図 17】パラコートが10nMの酸化セリウムナノ粒子を与えた雌のショウジョウバエにどのように影響するのかを表す。

【図 18】パラコートが1μMの酸化セリウムナノ粒子を与えた雌のショウジョウバエにどのように影響するのかを表す。

【図 19】パラコートが10nMの酸化セリウムナノ粒子を与えた雄のショウジョウバエにどのように影響するのかを表す。

【図 20】パラコートが1μMの酸化セリウムナノ粒子を与えた雄のショウジョウバエにどのように影響するのかを表す。

【図 21】外傷性傷害に対する酸化セリウムナノ粒子の影響を、損傷前に与えた単回投与量の他の酸化防止剤との比較で示している。

【図 22】外傷性傷害に対する酸化セリウムナノ粒子の影響を、損傷後に与えた単回投与量の他の酸化防止剤との比較で示している。

【図 23】休眠状態と損傷した状態の両方での星状膠細胞によるNO放出量を表す。

【図 24】酸化セリウムナノ粒子が、損傷した星状膠細胞で1時間調整した培地を用いて刺激したミクログリアからのNOの放出量にどのように影響するのかを示している。

【図 25】酸化セリウムナノ粒子が、損傷した星状膠細胞で3時間調整した培地を用いて刺激したミクログリアからのNOの放出量にどのように影響するのかを示している。

【図 26】酸化セリウムナノ粒子が、LPS刺激ミクログリアからのNOの放出量にどのように影響するのかを示している。

【図 27】酸化セリウムナノ粒子を用いた場合と用いない場合について、損傷またはLPSへの曝露後のミクログリアの形態を表す。

【図1】

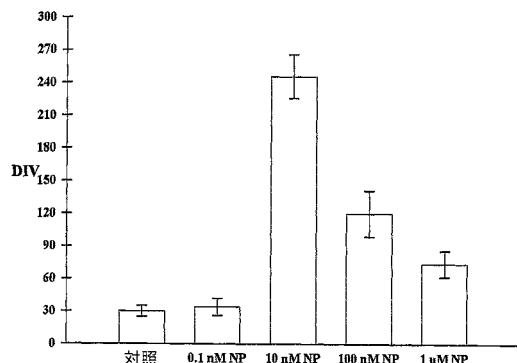


図1

【図2】

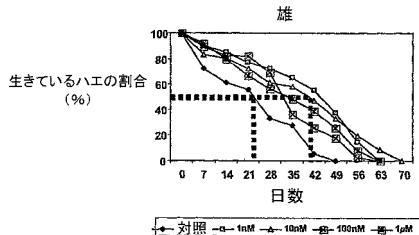


図2

【図3】

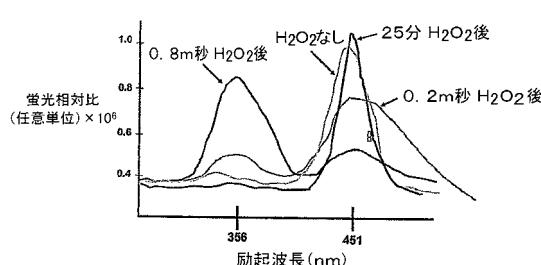


図3

【図4】

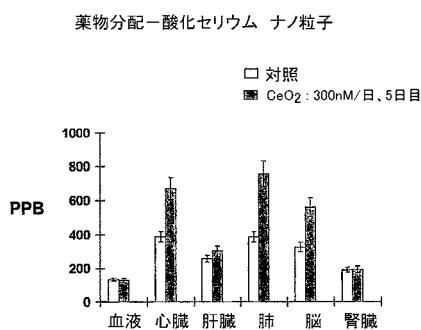


図4

【図6】

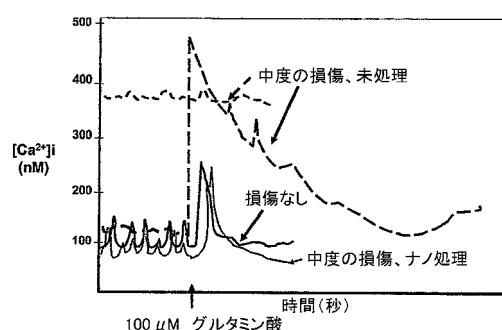


図6

【図5】

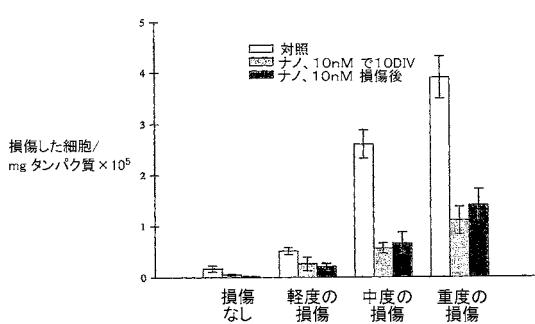


図5

【図7】

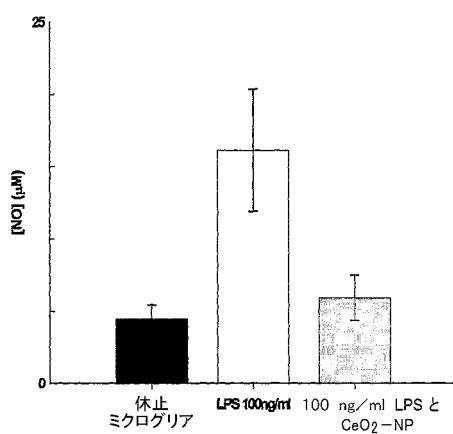
CeO<sub>2</sub>-NPはLPS刺激MGからのNO放出を減少する

図7

【図8】

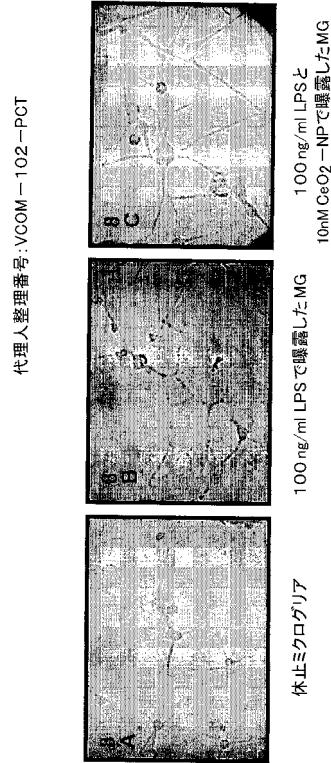


図8

【図9】

代理人整理番号:VCOM-102-PCT

\* 著しく未処理群と違う、p<0.01

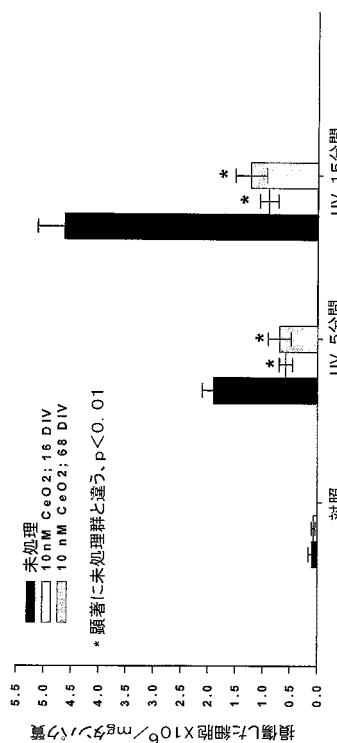


図9

【図10】

代理人整理番号:VCOM-102-PCT

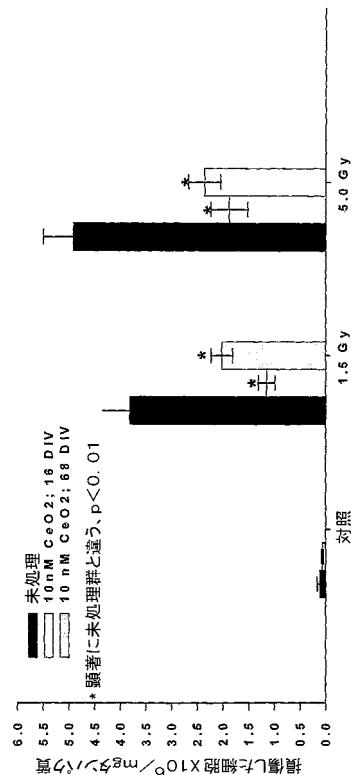


図10

【図 1 1】

代理人整理番号:VCOM-102-PCT

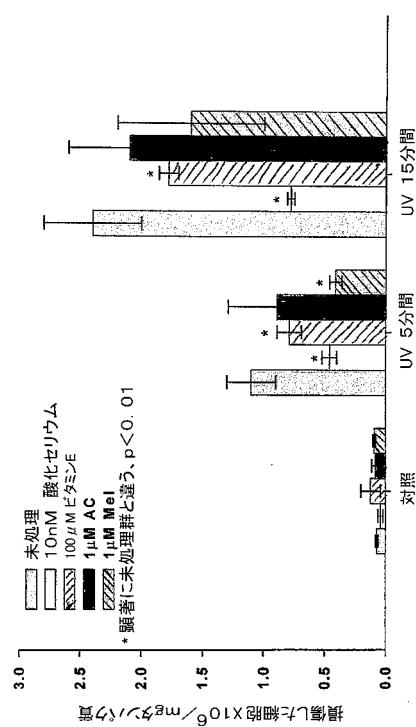


図11

【図 1 2】

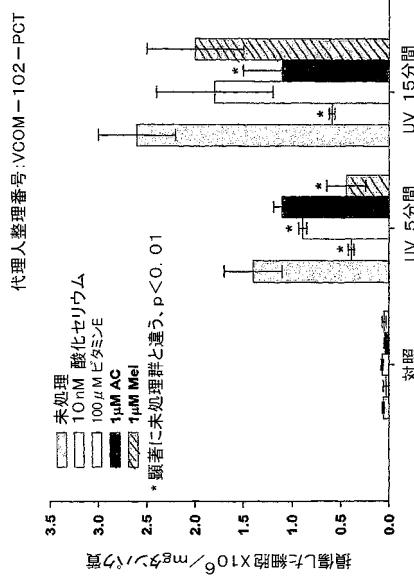


図12

【図 1 3】

代理人整理番号:VCOM-102-PCT

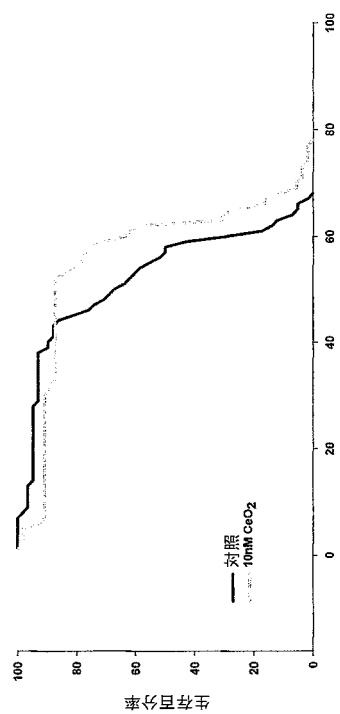


図13

【図 1 4】

代理人整理番号:VCOM-102-PCT

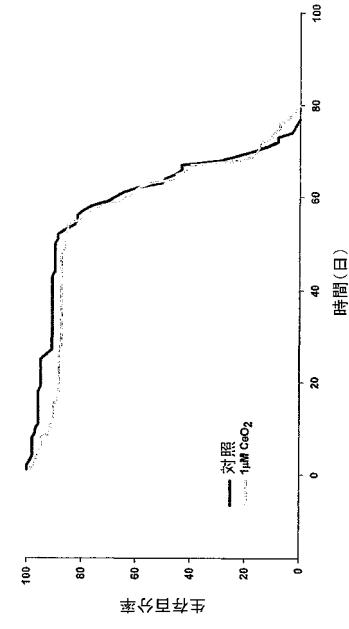


図14

【図 15】

代理人整理番号:VCOM-102-PCT

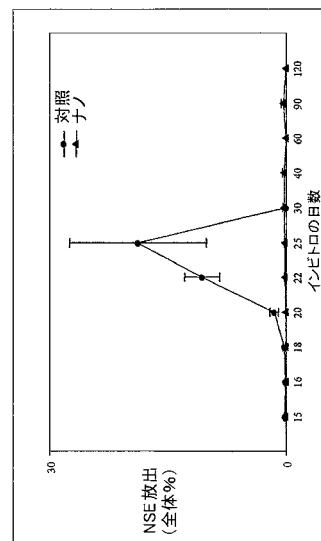


図15

【図 16】

代理人整理番号:VCOM-102-PCT

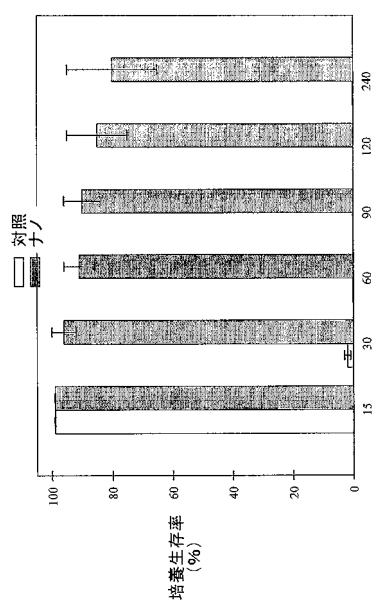


図16

【図 17】

代理人整理番号:VCOM-102-PCT

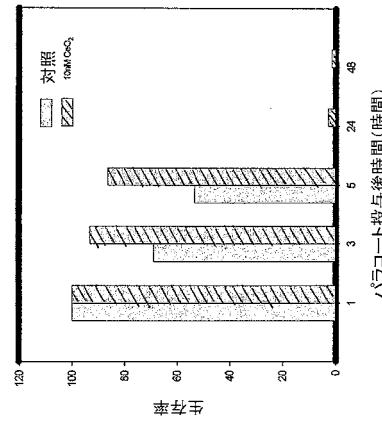
10 mM CeO<sub>2</sub>ナノ粒子を摂食した懸滴ショウジョウバエのバラコートの影響

図17

【図 18】

代理人整理番号:VCOM-102-PCT

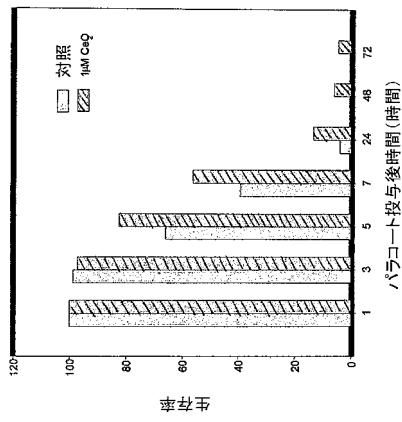


図18

【図 19】

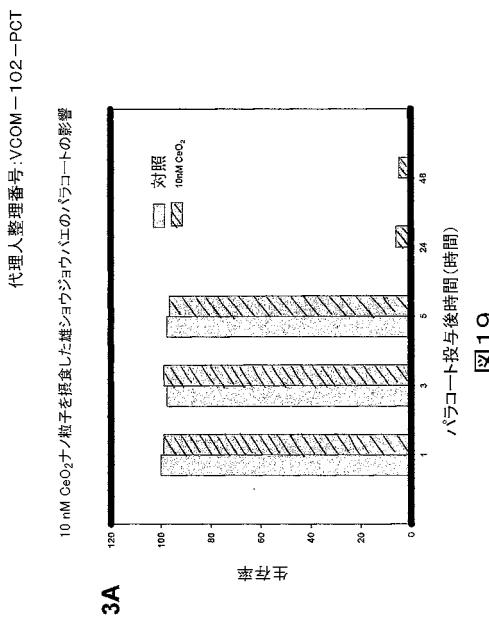


図19

【図 20】

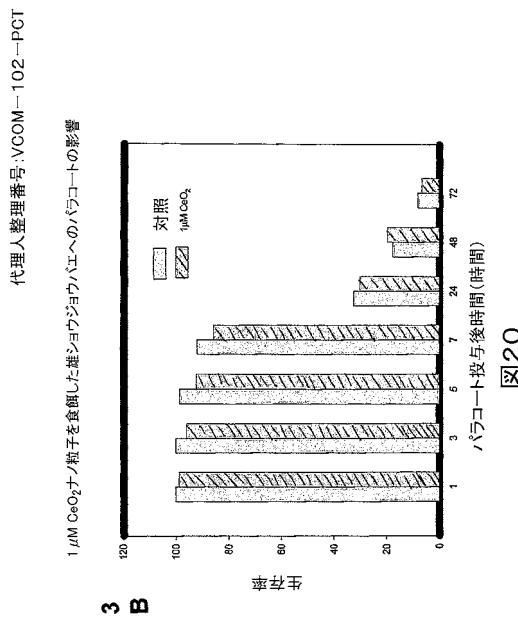
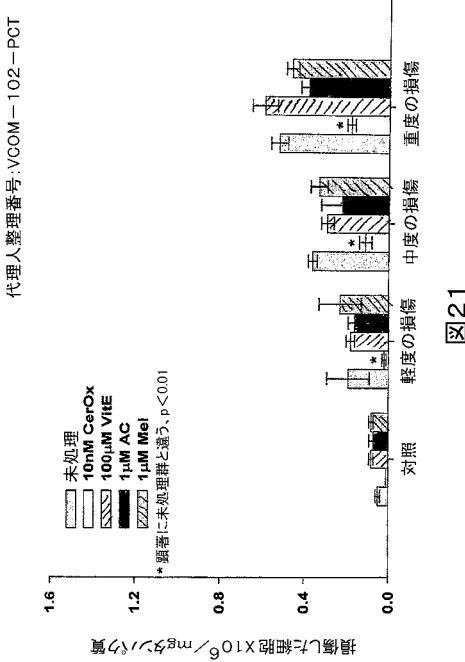


図20

【図 21】



【図 22】

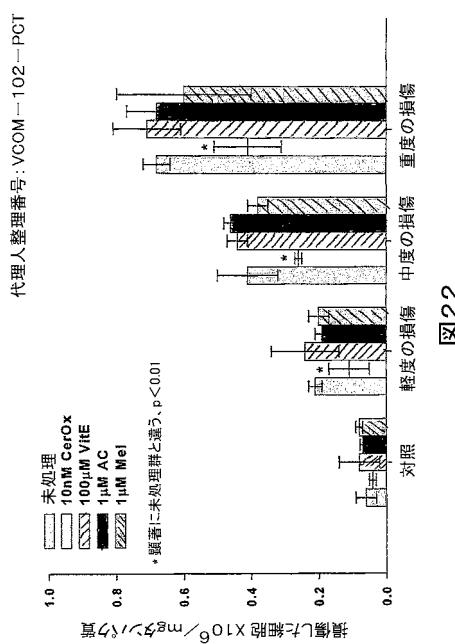


図22

【図 2 3】

代理人整理番号:VCOM-102-PCT

酸化セリウムナノ粒子は損傷した星状膠細胞で3時間調整した培地で刺激したMGからのNO放出を減少する

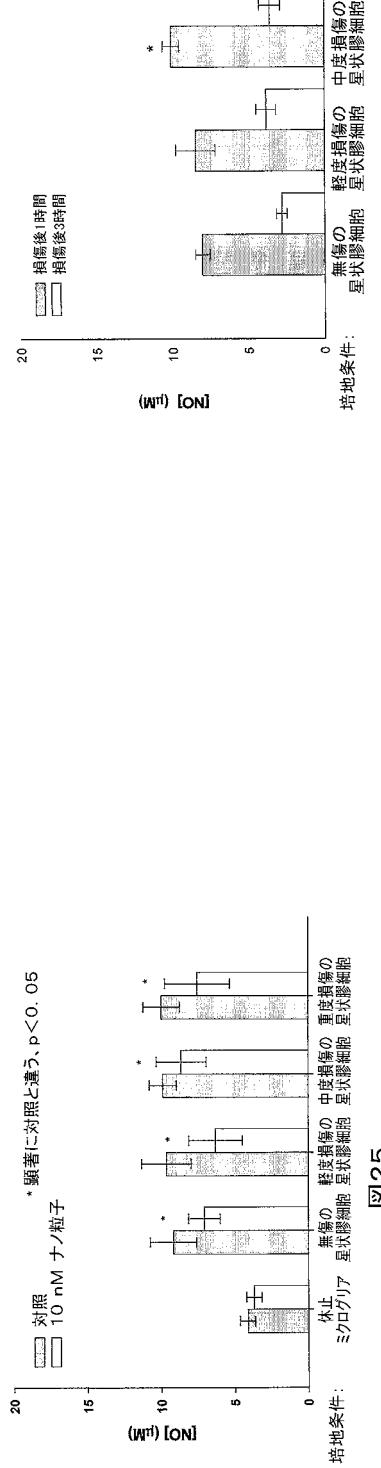
■ 対照 ■ 10 nM ナノ粒子 \* 著しく対照と違う、 $p < 0.05$ 

図25

【図 2 6】

代理人整理番号:VCOM-102-PCT

酸化セリウムナノ粒子はLPS刺激したMGからのNO放出を減少する

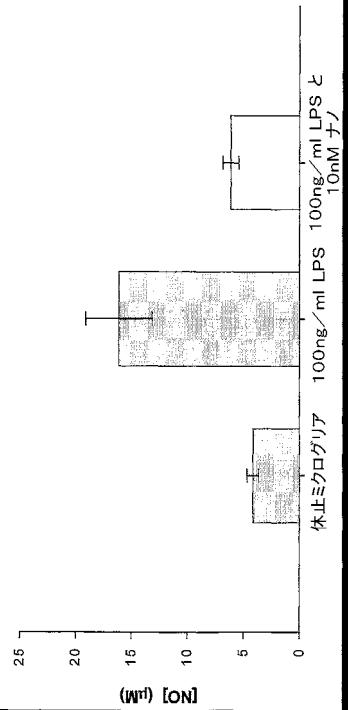


図26

【図 2 5】

代理人整理番号:VCOM-102-PCT

休止および損傷時両方での星状膠細胞のNO放出

■ 損傷後1時間 ■ 損傷後3時間

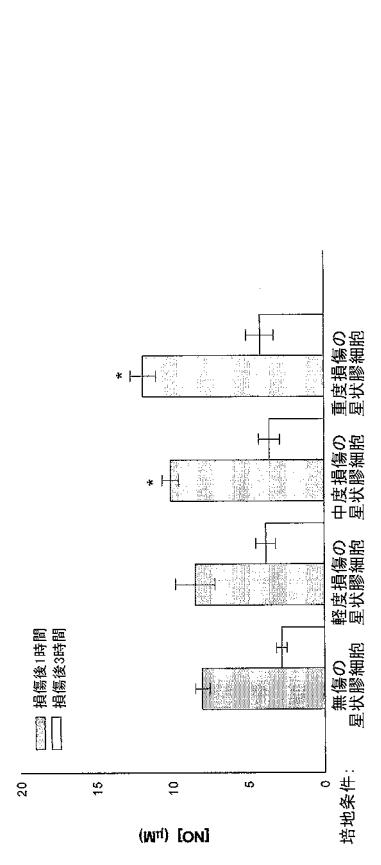


図23

【図 2 4】

代理人整理番号:VCOM-102-PCT

酸化セリウムナノ粒子は損傷した星状膠細胞で1時間調整した培地で刺激したMGからのNO放出を減少する

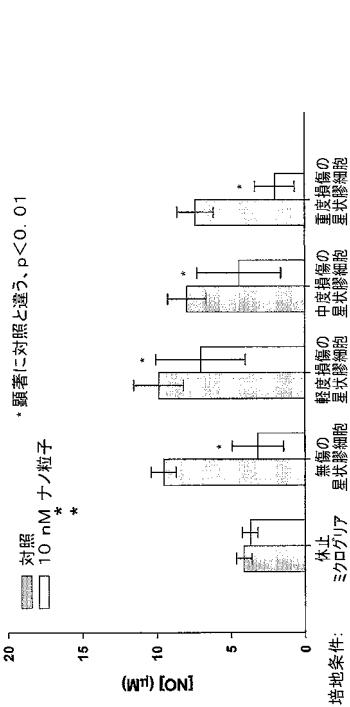
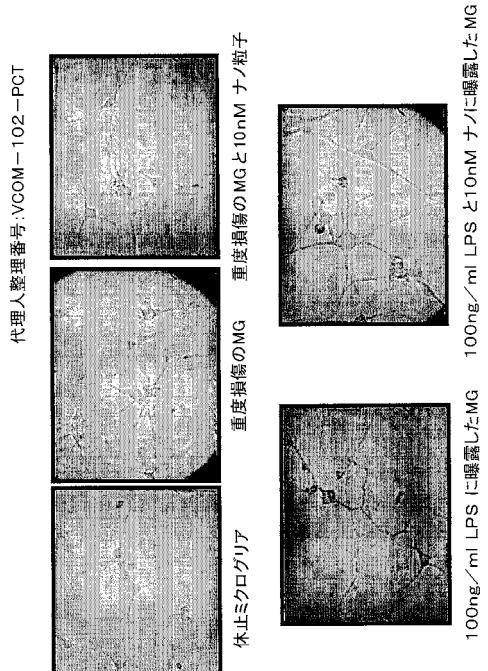
■ 対照 ■ 10 nM ナノ粒子 \* 著しく対照と違う、 $p < 0.01$ 

図24

【図 27】



## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 06/24963
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61K 33/24 (2007.01) USPC - 424/617; 977/904 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) 424/617; 977/904		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 424/617; 977/904 (text search)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB); Google; PubMed Search terms: cerium oxide, nanoparticles, nm, size, diameter, cell, rzigalinski		
<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 -- Y	RZIGALINSKI, B.A. ET AL. Cerium oxide nanoparticles increase the lifespan of cultured brain cells and protect against free radical and mechanical trauma (Abstract #377.24). 2003 Experimental Biology meeting abstracts [online]. 2003 [retrieved on 10.08.2007]. Retrieved from the internet: <URL: http://select.biosis.org/faseb/eb2003_data/FASEB004771.html>.	37-38, 74-83, and 88-92 — 1-36 and 39-69
Y	US 2003/0231992 A1 (SARKAS, HW. ET AL.) 18 December 2003 (18.12.2003) para [0026]-[0038]; claims 29-31.	1-36 and 39-69
X, E	US 2006/0246152 A1 (MCGINNIS, J.F.) 02 November 2006 (02.11.2006)	1-69, 74-83, and 88-92
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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		
Date of the actual completion of the international search  14 August 2007 (14.08.2007)	Date of mailing of the international search report  01 OCT 2007	
Name and mailing address of the ISA/US  Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer:  Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 06/24963
<b>Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)</b>		
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 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:</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>		
<b>Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)</b>		
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <p>Group I: Claims 1-69, 74-83 and 88-92 Group II: Claims 70-73 and 84-87 Group III: Claim 93</p> <p>The Searching Authority finds that the application lacks unity as there are three inventions present in the application, as specified by the above groupings. Due to the fact that cerium oxide nanoparticles were known in the art at the time of filing of the application, the presence of cerium oxide nanoparticles alone in an invention cannot be considered a common innovative technical element. Thus the above groupings, which relate to a method of increasing longevity of cell or group of cells by reduction of free radicals in a cell by contacting the cell with cerium oxide nanoparticles; cerium oxide nanoparticles per se, and a prosthesis comprising cerium oxide nanoparticles, respectively, constitute separate inventions.</p> <p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 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.:</p> <p>4. <input checked="" type="checkbox"/> 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.: 1-69, 74-83 and 88-92</p>		
<p><b>Remark on Protest</b></p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</p> <p><input type="checkbox"/> 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.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>		

## フロントページの続き

(51) Int.CI.	F	I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/16	(2006.01)	A 6 1 P	25/16
A 6 1 P 19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02
A 6 1 P 9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10 1 0 1
A 6 1 P 9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00
A 6 1 P 3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10
A 6 1 P 37/08	(2006.01)	A 6 1 P	9/10
A 6 1 P 9/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/08
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/06
A 6 1 P 17/02	(2006.01)	A 6 1 P	29/00
A 6 1 P 37/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/02
A 6 1 P 39/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/00
A 6 1 K 9/127	(2006.01)	A 6 1 P	39/00
A 6 1 K 47/42	(2006.01)	A 6 1 K	9/127
A 6 1 K 8/19	(2006.01)	A 6 1 K	47/42
A 6 1 Q 19/08	(2006.01)	A 6 1 K	8/19
		A 6 1 Q	19/08

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

(72)発明者 リジガリンスキー、ベヴァリー エイ.

アメリカ合衆国 2 4 0 6 0 バージニア州 ブラックスブルク クラフト ドライブ 2 2 6 5

(72)発明者 クラーク、アリアン エム.

アメリカ合衆国 24060 バージニア州 ブラックスブルク クラフト ドライブ 2265

F ターム(参考) 4C076 AA19 AA65 BB01 BB11 BB29 BB30 BB31 EE41A

4C083	AB211	CC01	CC02	EE12							
4C086	AA01	AA02	HA02	MA01	MA04	MA05	MA24	MA38	MA52	MA60	
			MA63	NA14	ZA02	ZA15	ZA16	ZA36	ZA45	ZA89	ZA96
			ZB11	ZB13	ZB15	ZC35	ZC37				ZB07