

(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2015-502400

(P2015-502400A)

(43) 公表日 平成27年1月22日 (2015.1.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 9/127 (2006.01)</b>	A 6 1 K 9/127	4 C 0 7 6
<b>A 6 1 K 33/08 (2006.01)</b>	A 6 1 K 33/08	4 C 0 8 6
<b>A 6 1 K 33/20 (2006.01)</b>	A 6 1 K 33/20	
<b>A 6 1 K 47/24 (2006.01)</b>	A 6 1 K 47/24	
<b>A 6 1 K 47/28 (2006.01)</b>	A 6 1 K 47/28	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 83 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2014-548324 (P2014-548324)  
 (86) (22) 出願日 平成24年12月21日 (2012.12.21)  
 (85) 翻訳文提出日 平成26年8月25日 (2014.8.25)  
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2012/057645  
 (87) 国際公開番号 W02013/093891  
 (87) 国際公開日 平成25年6月27日 (2013.6.27)  
 (31) 優先権主張番号 61/579,326  
 (32) 優先日 平成23年12月22日 (2011.12.22)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 514159483  
 ヌーボ リサーチ ゲイムベーパー  
 ドイツ連邦共和国 04103 ライプツ  
 イヒ, ドイチャー ブラッツ 5 ツェー  
 (74) 代理人 100124327  
 弁理士 吉村 勝博  
 (72) 発明者 マーティン, レイナー  
 ドイツ連邦共和国 デー 68753 ワ  
 ーグホイゼル, ムルクシェトラーセ 8  
 (72) 発明者 アルンホルト, ユルゲン  
 ドイツ連邦共和国 04159 ライプツ  
 イヒ, クノップシェトラーセ 19

最終頁に続く

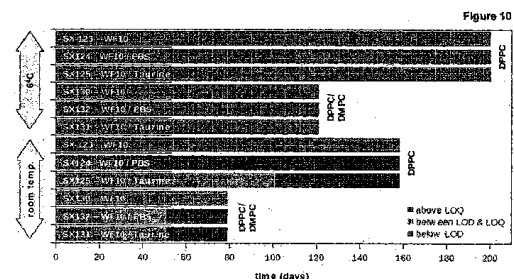
(54) 【発明の名称】 リボソームの亜塩素酸塩または塩素酸塩組成物

## (57) 【要約】

【課題】本出願は、亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物を含んでいるリボソーム組成物、ならびにそれらの調製および使用のための方法の提供を目的とする。

【解決手段】この目的を達成するため、リボソームおよびリボソーム組成物であって、リボソームコアの内側に捕捉された亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物を含んでいる、リボソームおよびリボソーム組成物を採用する。そして、同時にリボソームの内側にカプセル化された亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物を調製する新たなリボソームおよびリボソーム組成物の調製方法、及び、当該リボソームおよびリボソーム組成物を主に医薬として用いるときの使用方法を提供する。

【選択図】図10



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

リボソーム組成物であって、少なくとも 1 つの脂質二重層を有しているリボソーム、および前記リボソームの内側にカプセル化された亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物を含んでおり、前記脂質二重層が、1 つ以上の適切な脂質から構成されている、リボソーム組成物。

**【請求項 2】**

前記組成物が、亜塩素酸塩を含み、前記亜塩素酸塩が、安定化された亜塩素酸塩である、請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 3】**

前記組成物が亜塩素酸塩を含み、前記亜塩素酸塩が O X O - K 9 9 3 である、請求項 2 に記載の組成物。

**【請求項 4】**

前記安定化された亜塩素酸塩が、1 ~ 1 0 %、1 0 ~ 2 0 %、2 0 ~ 3 0 %、3 0 ~ 5 0 % または 5 0 ~ 9 0 ( w / v ) % の O X O - K 9 9 3 を含む、請求項 2 に記載の組成物。

**【請求項 5】**

前記組成物が、前記組成物のカプセル化された総イオン含量に基づいて、約 0 . 0 1 ( w / w ) % ~ 約 5 0 ( w / w ) %、約 0 . 1 ( w / w ) % ~ 約 2 0 ( w / w ) %、約 0 . 5 ( w / w ) % ~ 約 1 0 ( w / w ) %、約 0 . 3 ( w / w ) % ~ 約 3 ( w / w ) % または約 1 . 0 ( w / w ) % のカプセル化された亜塩素酸塩を含む、請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 6】**

前記組成物が、前記組成物のカプセル化された総イオン含量に基づいて、約 0 . 0 1 ( w / w ) % ~ 約 5 0 ( w / w ) %、約 0 . 1 ( w / w ) % ~ 約 2 0 ( w / w ) %、約 0 . 5 ( w / w ) % ~ 約 1 0 ( w / w ) %、約 0 . 3 ( w / w ) % ~ 約 3 ( w / w ) % または約 1 . 0 % のカプセル化された塩素酸塩を含む、請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 7】**

前記組成物が、前記組成物のカプセル化された総イオン含量に基づいて、約 0 . 0 1 ( w / w ) % ~ 約 5 0 ( w / w ) %、約 0 . 1 ( w / w ) % ~ 約 2 0 ( w / w ) %、約 0 . 5 ( w / w ) % ~ 約 1 0 ( w / w ) %、約 0 . 3 ( w / w ) % ~ 約 3 ( w / w ) % または約 1 . 0 % のカプセル化された亜塩素酸塩および塩素酸塩の混合物を含む、請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 8】**

前記カプセル化された亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物が、約 5 を超える、約 6 を超える、約 8 を超える、または約 1 0 を超える p H を有する、請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 9】**

前記カプセル化された亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物が、約 5 ~ 約 1 4、約 6 ~ 約 1 3、約 8 ~ 約 1 2 . 5、または約 1 0 ~ 約 1 2 である p H を有する請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 1 0】**

前記リボソーム中に含まれる前記脂質が、約 5 ~ 約 1 4、約 6 ~ 約 1 3、約 8 ~ 約 1 2 . 5、または約 1 0 ~ 約 1 2 の p H を有している、亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物の取り込みに適切である、請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 1 1】**

前記適切な脂質が、リン脂質、スフィンゴ脂質、およびそれらの混合物からなる群より選択される、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の組成物。

**【請求項 1 2】**

前記リン脂質が、十分な長さの飽和または不飽和の脂肪アシル鎖を含んでいる、ホスファチジルコリン ( P C ) であり、前記スフィンゴ脂質がスフィンゴミエリン ( S M ) である、請求項 1 1 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

## 【請求項 13】

前記適切な脂質が、約 5 ～ 約 50 の範囲内におさまる保管温度で許容可能な期間にわたって安定なままであるリボソームを形成する脂質から選択される、請求項 1 ～ 12 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 14】

前記前記適切な脂質が、約 5 の温度でイオンの漏出に対して不浸透性であるリボソームを形成する脂質から選択される、請求項 13 に記載の組成物。

## 【請求項 15】

前記リボソームが、2 種類以上の適切な脂質を含む、請求項 1 ～ 14 のいずれか 1 項に記載の組成物。

10

## 【請求項 16】

前記リボソームが、2 種類の適切な脂質を含み、かつ前記脂質が、20 : 1 ～ 1 : 1、15 : 1 ～ 5 : 1 または 10 : 1 ～ 9 : 1 というモル比で存在する、請求項 15 に記載の組成物。

## 【請求項 17】

剛性を増強し、および / または脂質二重層（単数または複数）の透過性を低減する少なくとも 1 つの追加の構成要素をさらに含んでいる、請求項 1 ～ 16 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 18】

前記少なくとも 1 つの追加の構成要素が、前記総脂質含量の約 0.1 ～ 約 50 %、約 1 ～ 約 30 %、約 5 ～ 約 25 % または約 10 ～ 約 20 % の量で存在する、請求項 17 に記載の組成物。

20

## 【請求項 19】

前記少なくとも 1 つの追加の構成要素が、コレステロールおよびコレステロール硫酸から選択される、請求項 17 または 18 に記載の組成物。

## 【請求項 20】

リボソームの凝集を低減するゼータ電位を有するリボソームを提供する、少なくとも 1 つの追加の構成要素をさらに含んでいる、請求項 1 ～ 19 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 21】

前記リボソームの凝集を低減する前記ゼータ電位が、少なくとも +5 mV よりも正であるか、または -5 mV よりも負である、請求項 20 に記載の組成物。

30

## 【請求項 22】

リボソームの凝集を低減するゼータ電位を有するリボソームを提供する、前記少なくとも 1 つの追加の構成要素が荷電された脂質である、請求項 20 または 21 に記載の組成物。

## 【請求項 23】

前記荷電された脂質が負に荷電された脂質である、請求項 22 に記載の組成物。

## 【請求項 24】

前記負に荷電された脂質が、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、またはホスファチジン酸である、請求項 23 に記載の組成物。

40

## 【請求項 25】

請求項 24 に記載の組成物であって、前記負に荷電された脂質が、1, 2, -ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホグリセロール (DPG)、1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホグリセロール (DMPG)、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホグリセロール (DOPG)、1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホグリセロール (DSPG)、1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (DSPE)、または 1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - メチル - ポリエチレングリコール (MPEG - DSPE)、およびそれらの混合物の塩から選択される組成物。

## 【請求項 26】

50

請求項 25 に記載の組成物であって、前記負に荷電された脂質が、1, 2, - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホグリセロール (DPG)、1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホグリセロール (DMPG)、1, 2, - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホグリセロール (DSPG) およびそれらの混合物から選択される、組成物。

【請求項 27】

請求項 22 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の組成物であって、前記荷電された脂質が、20 : 1 ~ 1 : 1、15 : 1 ~ 5 : 1 または 10 : 1 ~ 9 : 1 という非荷電脂質 : 荷電脂質の比をもたらす量で存在する、組成物。

【請求項 28】

請求項 1 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の組成物であって、前記 1 つ以上の適切な脂質が、1, 2 - ジパルミトイル - 2 - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DPPC)、1, 2 - ジミリストイル - 2 - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DMPC)、1 - ミリストイル - 2 - ステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (MSPC)、1 - パルミトイル - 2 - ミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (PMPC)、1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DSPC)、水素添加卵 PC (HEPC)、1 - パルミトイル - 2 - ステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (PSPC)、1 - ステアロイル - 2 - ミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (SMP C)、1 - ステアロイル - 2 - オレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (SOPC)、1 - ステアロイル - 2 - パルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (SPPC)、ジアラキドイルホスファチジルコリン (DAPC)、1, 2 - ジベヘノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DBPC)、1, 2 - ジエルコイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DEPC)、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DOPC)、水素添加大豆リン脂質、卵黄リン脂質、スフィンゴミエリン (SM)、ミルクスフィンゴミエリンおよびそれらの混合物から選択される、組成物。

【請求項 29】

請求項 1 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の組成物であって、前記 1 つ以上の適切な脂質が、1, 2 - ジパルミトイル - 2 - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DPPC)、1, 2 - ジミリストイル - 2 - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DMPC)、水素添加大豆リン脂質、卵黄リン脂質、およびそれらの混合物から選択される、組成物。

【請求項 30】

請求項 23 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の組成物であって、前記 1 つ以上の適切な脂質が、1, 2 - ジパルミトイル - 2 - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DPPC) および 1, 2 - ジミリストイル - 2 - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DMPC) が、9 : 1 というモル比；1, 2 - ジパルミトイル - 2 - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DPPC) および 1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホグリセロール (DMPG) が 9 : 1 というモル比；1, 2 - ジパルミトイル - 2 - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DPPC) および 1, 2, - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホグリセロール (DPG) が 9 : 1 というモル比または DPPC である、組成物。

【請求項 31】

前記脂質二重層が、親水性を増大する分子で修飾された表面である、請求項 1 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 32】

前記脂質二重層が、特定の細胞または組織型との会合を促進するためにその表面に対して細胞特異的標的部分を結合することによって修飾される、請求項 1 ~ 31 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 33】

リボソームであって、少なくとも 1 つの脂質二重層、ならびに前記リボソームの内側に捕捉された亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物を含んでおり、前記脂質二重層が、1 つ以上の適切な脂質から構成されている、リボソーム。

**【請求項 3 4】**

請求項 3 3 に記載のリボソームであって、約 80 nm ~ 約 300 nm、約 90 nm ~ 約 200 nm、約 100 nm ~ 約 140 nm、約 80 nm ~ 約 15 ミクロン、約 300 nm ~ 約 12 ミクロンまたは約 7 ミクロン ~ 約 10 ミクロンの平均直径を有している、リボソーム。

**【請求項 3 5】**

請求項 3 3 または 3 4 に記載のリボソームであって、前記亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物が、1% ~ 約 50%、約 2% ~ 約 25% または約 5% ~ 約 15% という効率または封入率で捕捉される、リボソーム。

**【請求項 3 6】**

少なくとも 1 つの脂質二重層を有しているリボソーム、および前記リボソームの内側にカプセル化された亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物を調製する方法であって、前記脂質二重層が、1 つ以上の適切な脂質から構成され、前記方法が以下：

(a) 内側表面の少なくとも一部の上に 1 つ以上の脂質のフィルムを有する容器へ亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物の水溶液を添加することと；

(b) 前記内面から前記フィルムを全体的にまたは部分的に除去するために十分な条件下で前記容器を攪拌して、前記亜塩素酸塩 - 捕捉、および / または塩素酸塩 - 捕捉のリボソームを含んでいる混濁溶液を得ることと；

(c) 前記混濁溶液を処理して、前記リボソームの平均直径を所望の値まで下げることと；

(d) 必要に応じて前記リボソームを処理して、前記リボソームに対して外側の溶液から亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物を除去することと；

を包含する、方法。

**【請求項 3 7】**

請求項 3 6 に記載の方法であって、(a) における前記亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物に対する前記 1 つ以上の適切な脂質のモル比が、約 0.01 : 1 ~ 約 1000 : 1、約 0.1 : 1 ~ 約 5000 : 1、約 0.5 : 1 ~ 約 2500 : 1、約 1 : 1 ~ 約 1000 : 1、または約 0.1 : 1 ~ 約 100 : 1 である、方法。

**【請求項 3 8】**

少なくとも 1 つの脂質二重層を有しているリボソーム、および前記リボソームの内側にカプセル化された亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物を調製するための方法であって、前記脂質二重層が、1 つ以上の適切な脂質から構成され、前記方法が、エタノール注入方法である、方法。

**【請求項 3 9】**

前記エタノール注入方法が、直交流技術を用いて行われる、請求項 3 8 に記載の方法。

**【請求項 4 0】**

請求項 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載のリボソーム組成物、または請求項 3 3 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載のリボソームを含んでおり、少なくとも 1 つの生理学的に許容される担体または賦形剤と混合される、薬学的組成物。

**【請求項 4 1】**

請求項 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載のリボソーム組成物、請求項 3 3 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載のリボソーム、または請求項 4 0 に記載の薬学的組成物の医薬としての使用。

**【請求項 4 2】**

医薬としての使用のための、請求項 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載のリボソーム組成物、請求項 3 3 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載のリボソーム、または請求項 4 0 に記載の薬学的組成物。

**【請求項 4 3】**

亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物の投与が有益である疾患、障害または状態を処置するための方法であって、有効量の請求項 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載のリボソーム組成物、請求項 3 3 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載のリボソーム、または請求項 4 0 に記

10

20

30

40

50

載の薬学的組成物を、それを必要とする被験体に対して投与することを包含する、方法。

【請求項 4 4】

マクロファージ機能を調節するための方法であって、有効量の請求項 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載のリボソーム組成物、請求項 3 3 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載のリボソーム、または請求項 4 0 に記載の薬学的組成物を、それを必要とする被験体に投与することを包含する、方法。

【請求項 4 5】

マクロファージ機能を調節することが、不適切な免疫応答の結果として慢性炎症の症状を生じる疾患の処置となる、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物の投与が有益である疾患、障害または状態が、自己免疫疾患、不適切な免疫応答によって生じる疾患、創傷治癒、放射線症候群および環境有害物質に対する暴露から選択される、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記疾患、障害または状態が、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス、血清病、糖尿病、関節リウマチ、若年性慢性関節リウマチ、リウマチ熱、シェーグレン症候群、全身性硬化症、脊椎関節症、ライム病、サルコイドーシス、自己免疫性溶血、自己免疫性肝炎、自己免疫性好中球減少、自己免疫性多腺病、自己免疫性甲状腺疾患、多発性硬化症、炎症性腸疾患、大腸炎、クローン病、慢性疲労症候群、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、移植片拒絶、移植片対宿主病、アレルギー性喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、組織損傷に対する不適切な反応、B型肝炎、C型肝炎、慢性肝炎、閉塞性気管支炎、気腫、腫瘍性障害（癌）、HIV感染症、AIDS、神経変性疾患、AIDS関連の痴呆、微生物感染症、および他のウイルス感染から選択される、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記疾患、障害または状態が、アレルギー性喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、腫瘍性障害、脊髄病理学、HIV感染およびAIDSから選択される、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記腫瘍性障害が、消化管、頭部、首、胸部または膵臓の癌である、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】

請求項 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載のリボソーム組成物、請求項 3 3 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載のリボソーム、または請求項 4 0 に記載の薬学的組成物を、使用者に提供すること、および前記使用者に特定の安全性または臨床効果を情報提供することを包含する、方法。

【請求項 5 1】

請求項 3 2 のいずれか 1 項に記載のリボソーム組成物、請求項 3 3 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載のリボソーム、または請求項 4 0 に記載の薬学的組成物を使用者に提供すること、および前記使用者に対して、前記リボソーム組成物が、同様の治療効果を与えるか、または与えると期待される非リボソーム組成物よりも安定、標的特異的または治療上有効であることを情報提供することを包含する、方法。

【請求項 5 2】

前記使用者が、公開された材料によって情報提供される、請求項 5 0 または 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記公開された材料が、ラベルまたは添付文書である、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

リボソーム組成物であって、1つ以上の内側コア相および外側連続相を含んでおり、前記内側コア相が、亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物を含んでおり、かつ複数のリボソームベシクル中に含まれており、ここで前記ベシクルの壁は、少なくとも1つの脂質

10

20

30

40

50

二重層を含み、前記リボソーム組成物の前記外側連続相は実質的に亜塩素酸塩および塩素酸塩を含まない、リボソーム組成物。

【請求項 55】

前記外側連続相が塩化ナトリウムを含む、請求項 54 に記載の組成物。

【請求項 56】

前記外側連続相が約 5 ~ 8 という pH を有する、請求項 54 に記載の組成物。

【請求項 57】

前記内側コア相が約 8 ~ 13 という pH を有する、請求項 54 ~ 56 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 58】

前記内側コア相と外側連続相との間の pH の相違が約 1 ~ 約 7 である、請求項 54 に記載の組成物。

【請求項 59】

前記リボソーム組成物が、約 3 ~ 48 カ月の間薬学的に許容される安定性を示す、請求項 54 に記載の組成物。

【請求項 60】

前記薬学的に許容される安定性が、約 5 ~ 約 50 の温度での組成物の保管で達成される、請求項 59 に記載の方法。

【請求項 61】

前記組成物が、分解産物を実質的に含まない、請求項 59 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、その内容が、その全体が参照によって本明細書に援用される、2011年12月22日出願の、同時係属の米国特許仮出願第 61 / 579 , 326 号の優先権の恩典を主張する。

【0002】

本出願の分野

本出願は、亜塩素酸塩、塩素酸塩、またはそれらの混合物を含んでいるリボソーム組成物、それらの調製のための方法および例えば医薬としてのそれらの使用のための方法に関する。

【背景技術】

【0003】

本出願の背景

[リボソーム]

リボソームは、薬物送達のためのベシクル（小胞）として広く研究されている。薬物およびワクチンの送達のためのリボソームの有効な使用が報告されている（Gregoriadis, G. T I B T E C H , 1995, 13: 527 ~ 537, およびそこに引用される引用文献）。例えば、リボソームベースの薬物送達システムは、Doxil および Myocet として市販される、ドキソルビシン HCl のような薬物を投与するための、静脈内の抗癌化学療法に広く用いられている（Abrahamら、Methods Enzymol. 2005, 391: 71 ~ 97）。またリボソームは、吸入されたエアロゾル薬物、例えば：i) インスリン（Huangら、J Control Release, 2006, 113: 9 - 14）；ii) 抗生物質、特に肺胞マクロファージ中の結核感染を標的する（Vyasら、Int J Pharm. 2005, 296: 12 - 25）；iii) 抗癌化学療法薬物（Verschraegenら、Clin Cancer Res. 2004, 10: 2319 ~ 2326）；および iv) その他（米国特許第 5, 049, 388 号を参照のこと）、を送達するためにも用いられ得る。

【0004】

これは、リボソームに組み込まれるべき特定のサイズの有機分子についてさらに一般的

10

20

30

40

50

である。より小さい分子、例えば、エタノール、グルコース、アンモニア、および酢酸塩は、リボソームの脂質二重層を通じて透過することが公知である。この挙動は、漏出として公知である。

【0005】

薬物送達システムとしての、リボソームの首尾よい使用の例があるが、多くの適用について満たすべき課題がさらに存在する。化学的および物理的な安定性、クリアランス、取り込み効率および標的化は、特により小さい分子を取り込むべき場合、最も大きい課題のうちのいくつかである。

【0006】

[ 亜塩素酸塩、塩素酸塩およびそれらの混合物 ]

亜塩素酸塩イオン、 $\text{ClO}_2^-$ （本明細書においては、亜塩素酸塩と呼ばれる）は、種々の状況で用いられている。亜塩素酸ナトリウムは、強力な酸化剤であり、水の精製、消毒、ならびに漂白および脱臭で用いられている。酸性条件下では、亜塩素酸ナトリウムは、極めて毒性の二酸化塩素ガスを生じ、従って、使用される水溶液は通常は、極めて塩基性（約 pH 13）の溶液として提供され、pH は、水酸化ナトリウムのような塩基性剤を用いて調節される。

【0007】

また、塩素酸塩は、種々の状況で用いられている。塩素酸塩イオン、 $\text{ClO}_3^-$ （本明細書においては塩素酸塩と呼ぶ）は、強力な酸化剤であり、かつ花火製造、消毒および殺虫薬に用いられている。さらに、塩素酸塩は、皮膚疾患の処置のための抗菌剤として用いられ（United States Patent 5,427,801）、*Chlamydia trachomatis* の感染した細胞でプロテオグリカン硫酸化を可逆的に阻害することが見出されている（J Med Microbiol February 2004 第53巻、2号 93~95）。

【0008】

また、亜塩素酸塩および塩素酸塩の混合物を含んでいる組成物は種々の状況で、例えば、種々の疾患または状態を処置するために用いられた。安定化された亜塩素酸塩は、このような組成物の非限定的な例である。例えば、米国特許第4,725,437号、同第4,507,285号および同第4,851,222号は、創傷および感染を処置するため、ならびに骨髄の再生を生じるための安定化された亜塩素酸塩の使用を開示する。抗原特異的免疫応答を阻害するための安定化された亜塩素酸塩の使用は、米国特許出願公開第2011/0076344号に記載されている。PCT特許出願公開番号2001/017030は、安定化された亜塩素酸塩のような酸化剤の投与を通じた広範なマクロファージ関連障害の処置を開示する。米国特許第7,105,183号は、マクロファージ関連神経変性疾患を処置するための安定化された亜塩素酸塩の使用を記載する。米国特許第5,877,222号は、AIDS 関連痴呆を処置するための安定化された亜塩素酸塩の使用を記載している。PCT特許出願番号2008/145376は、アレルギー性喘息、アレルギー性鼻炎およびアトピー性皮膚炎を処置するための安定化された亜塩素酸塩の使用を報告する。PCT特許出願公開番号2007/009245は、癌の処置のためのフルオロピリミジンと組み合わされた安定化された亜塩素酸塩の使用を開示している。PCT特許出願公開番号2001/012205は、マクロファージ機能を調節することによって影響される、癌および他の状態を処置するための安定化された亜塩素酸塩の使用を開示する。欧州特許出願番号255145は、眼科での安定化された亜塩素酸塩の使用を開示する。遅発性出血性放射線膀胱炎および直腸炎を有する患者の処置における安定化された亜塩素酸塩の使用を評価する第II相試験が報告された（Veerasarn, V.ら、Gynecologic Oncology, 2006, 100:179-184）。安定化された亜塩素酸塩は、げっ歯類心臓モデルにおいて（Hansen, A.ら、Pharmacology & Toxicology, 2001, 89:92-95）、および他の研究において（Kemp, E.ら、Transplantation Proceedings, 2000, 32:1018-1019）、異種移植片生存を延長すること

10

20

30

40

50



が示された。安定化された亜塩素酸塩の抗菌効果も報告されている (Stoll, P.ら、Zeitschrift fuer Antimikrobielle und Antineoplastische Chemotherapie, 1993, 11:15-20; Stoll, P.ら、Chemotherapy, 1993, 39:40-47; Hollfelder, K.ら、Reakt. Sauerstoffspezies Med. 1987, 253-262; Adamczyk, R.ら、Reakt. Sauerstoffspezies Med. 1987, 247-252; Gillissen, G.ら、Arzneimittel-Forschung, 1986, 36:1778-1782; Ullmann, U.ら、Infection, 1985, 13:S236-S240; Ullmann, U.ら、Infection, 1984, 12:225-229)。近年の研究では、安定化された亜塩素酸塩は、安定化された亜塩素酸塩が腫瘍細胞に対する免疫を増強する能力に関連する悪性細胞に対してナチュラルキラー (NK) 細胞の細胞毒性を刺激できることが示された (Kuhne, L.ら、J. Biomedicine and Biotechnology, 2011, p. 436587)。

#### 【0009】

上記の刊行物では、亜塩素酸塩は、Oxovasin (商標) (局所処方物) または WF10 (静脈内投与のための薬物) として公知の、安定化された亜塩素酸塩の市販の処方物の形態である。Oxovasin (商標) および WF10 は、OXO-K993 (それ自体が水溶液) の希釈物である。もともと OXO-K993 は、テトラクロロデカオキシゲン (TCDO) と呼ばれる化合物を活性成分として含む溶液であると考えられ、テトラクロロデカオキシゲン、テトラクロロデカオキシドおよび TCDO という用語が、WF10 および オキシフェリン (Oxoferin) 中で活性であるとされて、より古い文献では用いられる場合が多い。しかし、その後の分析試験によって、OXO-K993 が TCDO を含まず、それよりも陽イオンとしてナトリウムを含む、亜塩素酸塩、塩化物、素酸塩、および硫酸イオンの水溶液であることが確認された。従って、ある患者への WF10 の静脈内投与または Oxoferin (商標) の局所適用によって、イオンの混合物の送達を引き起こされる。OXO-K993 は、Nuvo Manufacturing GmbH (ドイツ、ヴァンツレーベン) から入手可能である。OXO-K993 およびその調製は、米国特許第 4,507,285 号に記載される。その時点で公知のこの物質の種々の用途を記述する、OXO-K993 および WF10 を記載している概説文献が記載されている (Drugs in R&D, 2004, 5:242-244; McGrath ら、Current Opinion in Investigational Drugs, 2002, 3:365-373)。

#### 【0010】

##### カプセル化方法

米国特許第 5,269,979 は、パッセンジャー分子をカプセル化するための溶媒希釈マイクロキャリア (solvent dilution microcarrier) (SDMC) と呼ばれるベシクルを形成する方法を開示している。このカプセル化ベシクルは、最初が「形成された溶液」の調製、続いて「形成された溶液」から SDMC の創出につながる組織化工程を包含する多段階の方法を用いて形成される。この「形成された溶液」は、有機溶媒中に両親媒性物質およびパッセンジャー分子を溶解することによって、続いて、水を添加して、混濁溶液を得て、次いでより有機性の溶媒を添加して、清浄な「形成された溶液」を得る。この形成された溶液は、直ちに用いられてもよいし、または保管されてもよい。SDMC は、インサイチュで水系、エアロゾル化、または再水和へ「形成された溶液」を希釈することを包含し得る組織化工程を用いて調製される。SDMC では、パッセンジャー分子は、球状の二重層によって創出される空間の内側ではなく、二重層自体の中に、または二重層の構成要素と会合して組み込まれる。なかでも、SDMC 中にカプセル化された担体分子は、テトラクロロデカオキシド (TCDO) であった。本出願に記載されるプロセスは、「精製」工程を含まず、その結果 SDMC の調製に用いられる全ての物質が、試験に用いられる最終溶液に残っていることが注目される。

## 【 0 0 1 1 】

カナダ特許出願第 2 , 6 3 6 , 8 1 2 号は、水性媒体中に包み込まれた薬剤を放出するための被覆膜を開示している。一例では、この包み込まれた薬剤は、酸化性の塩素 - 酸素化合物、特に、TCDOである。被覆膜は、不溶性であり、かつ天然の水培地には水透過性であり、一般には陽イオンおよび/または陰イオンの水不溶性ポリマーからできている。本出願で調製された組成物は、脂質のおよび基板表面の消毒および精製のために、ならびに水の消毒のために有用である。

## 【 0 0 1 2 】

韓国特許出願公開番号KR2003/072766は、亜塩素酸塩、特に亜塩素酸ナトリウム、およびリボソーム中にカプセル化された亜鉛イオンを含んでいる経口の衛生組成物を開示する。この組成物はさらに、担体または賦形剤をさらに含んでもよく、二重または単一の相構造、および7~8.5のpHを有してもよい。ある例では、リボソームは、レシチンから調製される。

10

## 【 0 0 1 3 】

PCT特許出願公開番号WO00/19981は、ペルオキシ化合物（例えば、過酸化水素）と組み合わせた亜塩素酸塩を含む抗菌調製物、および物体または表面の消毒のためにこれらの調製物を用いるための方法を開示する。この調製は、リボソームとして処方され、6.8~7.8のpHを有してもよい。亜塩素酸塩およびペルオキシ化合物の両方とも、微生物活性に必要である。とりわけ、実際のリボソーム処方物は、本出願で調製された。

20

## 【 0 0 1 4 】

米国特許出願公開第2007/0145328号は、亜塩素酸塩、例えば、亜塩素酸ナトリウム、非経口、全身または静脈内投与のための処方物（亜塩素酸塩およびpH調整剤を含んでいる）を開示している。このpH調整剤は、処方物のpHを、約7~約11.5の範囲であるように調節する。この処方物は、WF10よりも毒性が低いことが教示される。

## 【 0 0 1 5 】

Panasenkoら(Membr Cell Biol, 1997; 11(2): 253~8)は、次亜塩素酸ナトリウム(NaClO)、亜塩素酸ナトリウム(NaClO<sub>2</sub>)、塩素酸ナトリウム(NaClO<sub>3</sub>)および過塩素酸ナトリウム(NaClO<sub>4</sub>)が脂質過酸化を開始する能力を開示する。リボソームは、単純なNaClおよび緩衝液中で7.4のpHで卵ホスファチジルコリンから調製される。オキソ塩素酸塩のみを、外側相に添加する。亜塩素酸塩または塩素酸塩を含むベシクルをロードするため、または外側相からオキソ塩素酸塩を除去するための工程はとらない。

30

## 【 0 0 1 6 】

米国特許出願公開第2011/0052655号は、原生動物栄養型および嚢胞を水系中で制御するためのマイクロまたはナノカプセル（リボソームを含む）中の殺生物剤のカプセル化を記載している。

## 【 0 0 1 7 】

米国特許出願公開第2011/0177147号は、工業用水を含む系においてバイオフィッシングを除去するための少なくとも1つの安定化剤と組み合わせた抗菌組成物のカプセル化を記載する。抗菌組成物は、非酸化の殺生物化合物、例えば、イソチアゾリンであってもよく、その安定化剤は、塩素酸塩を含む緩衝液であってもよい。

40

## 【 発明の概要 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

## 【 0 0 1 8 】

## 本出願の要旨

本出願は、亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物を含んでいるリボソーム組成物、ならびにそれらの調製および使用のための方法に関する。

## 【 課題を解決するための手段 】

50

## 【0019】

従って、本出願は、少なくとも1つの脂質二重層を有しているリポソーム、およびそのリポソームの内側にカプセル化された亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物を含んでいるリポソーム組成物を包含し、ここで、この脂質二重層は、1つ以上の適切な脂質から構成される。典型的には、複数の分けられたリポソーム（ベシクル（小胞）と呼ばれる）が組成物中に存在する。典型的には、このベシクルは、水相中に分散され、1つ以上の水性組成物をカプセル化する。従って、1つの実施形態によれば、亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物は、複数のベシクル（その壁が1つ以上の脂質二重層を含んでいる）中にカプセル化される。また、本出願は、少なくとも1つの脂質二重層を含んでいるリポソーム、およびそのリポソームの内側に捕捉された亜塩素酸塩もしくは塩素酸塩またはそれらの混合物を包含し、ここでこの脂質二重層は、1つ以上の適切な脂質からなる。

10

## 【0020】

本出願はさらに、カプセル化した、およびカプセル化していない亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物を含んでいるリポソーム組成物を包含し、ここではこのカプセル化された亜塩素酸塩、塩素酸塩、またはそれらの混合物は、組成物の内側相にあり、およびカプセル化されていない亜塩素酸塩、塩素酸塩、またはそれらの混合物は、組成物の外側相にある。あるいは、この外側相は、別の治療剤または塩化ナトリウムのように、亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物以外の物質を含んでもよい。一実施形態では、この内側相および外側相のpHは、同じである。別の実施形態では、この内側相および外側相のpHは異なり、例えば、内側相のpHは、約5～約14、約6～約13、約8～約12.5、または約10～約12のpHであってもよく、この外側相のpHは、約6～8のようにほぼ中性であってもよい。本発明の一実施形態では、この内側層および外側相のpHは、例えば、炭酸塩緩衝液のような緩衝液によって調節される。

20

## 【0021】

さらなる実施形態では、リポソームは、約5～約14、約8～約13、約9～約12.5、または約10～約12のpHを有する亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物の捕捉のために適切な脂質から構成される。ある実施形態では、この脂質は、約5以上で亜塩素酸塩および/または塩素酸塩イオンの漏出に対して不浸透性であるリポソームを形成するものから選択される。このような脂質としては、例えば、リン脂質、例えば、ホスファチジルコリン（十分な長さの飽和および/または不飽和の脂肪酸鎖を有する）、および/またはスフィンゴ脂質、例えば、スフィンゴミエリン、あるいは所望の挙動を示すこのような脂質の適切な混合物が挙げられる。

30

## 【0022】

別の実施形態では、亜塩素酸塩は、安定化された亜塩素酸塩組成物、例えば、OXO-K993、または1～10%、10～20%、20～30%、30～50%もしくは50～90（w/v）%のOXO-K993を含む組成物である。さらなる実施形態では、安定化された亜塩素酸塩は、10（w/v）%のOXO-K993（この方式で希釈されたOXO-K993はWF10として公知）を含む。

## 【0023】

ある実施形態では、安定化された亜塩素酸塩は、2（w/v）%のOXO-K993を含む。さらなる実施形態では、安定化された亜塩素酸塩は、約2（w/v）%のOXO-K993、約2（w/v）%のグリセロール、および約96（w/v）%の水を含む。このような相互作用は、Oxovasin（商標）またはOxoferin（商標）（Nuvo Manufacturing GmbH, ドイツ、ヴァンツレーベン）として市販されている。

40

## 【0024】

さらなる実施形態では、リポソーム組成物は、組成物のカプセル化された総イオン含量の約0.01（w/w）%～約50（w/w）%、約0.1（w/w）%～約20（w/w）%または約0.5（w/w）%～約10（w/w）%の量で存在する、カプセル化された亜塩素酸塩を含む。

50

## 【0025】

なおさらなる実施形態では、このリボソーム組成物は、組成物のカプセル化された総イオン含量の約0.01(w/w)%~約50(w/w)%、約0.1(w/w)%~約20(w/w)%または約0.5(w/w)%~約10(w/w)%の量で存在するカプセル化された塩素酸塩を含む。

## 【0026】

なおさらなる実施形態では、このリボソーム組成物は、組成物のカプセル化された総イオン含量の約0.01(w/w)%~約50(w/w)%、約0.1(w/w)%~約20(w/w)%または約0.5(w/w)%~約10(w/w)%の量で存在する塩素酸塩および亜塩素酸塩イオンのカプセル化された混合物を含む。また、亜塩素酸塩および/または塩素酸塩イオンを含んでいる物質の任意の組成物は、電荷を中性に保持するために少なくとも1つの対イオンを有してもよい。従って、本出願の一実施形態によれば、リボソーム組成物は、1つ以上の陽イオンを含む。可能な陽イオンの非限定的な例としては、アルカリ金属陽イオン(例えば、ナトリウムまたは $\text{Na}^+$ )およびアルカリ土類陽イオンが挙げられる。別の実施形態では、亜塩素酸塩イオン、塩素酸塩イオンまたはそれらの混合物を含んでいるリボソーム組成物は、さらに、ナトリウムおよび/またはカリウムの対イオンを含む。さらなる実施形態では、リボソーム組成物は、被験体の体液に対して等張性である。これに関して等張性を決定することは、当業者の知識の十分に範囲内である。

## 【0027】

また、本出願は、少なくとも1つの脂質二重層を有しているリボソーム、およびこのリボソームの内側にカプセル化された亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物を調製する方法を包含し、ここでこの脂質二重層は、天然の、半合成のまたは合成の供給源由来であつてもよい1つ以上の適切な脂質から構成される。一実施形態では、この方法は、

(a) 亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物の水溶液を、内面の少なくとも一部に対して1つ以上の脂質のフィルムを有する容器に添加することと；

(b) この内面からこのフィルムを全体的にまたは部分的に除去するために十分な条件下でこの容器を攪拌して、亜塩素酸塩 - 捕捉、および/または塩素酸塩 - 捕捉のリボソームを含んでいる混濁溶液を得ることと；

(c) この混濁溶液を処理して、リボソームの平均直径を所望の値まで下げることと；

(d) 必要に応じて、このリボソームを処理して、このリボソームに対して外側の溶液から亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物を除去することと；

を包含する。

## 【0028】

本出願の方法によれば、ある実施形態では、本発明のリボソームにおける亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物の封入の率は、約0.1%~約50%、約0.5%~約25%、約1%~約15%、約1%~約10%、または約1%~約5%である。

## 【0029】

別の実施形態では、本出願のリボソームは、エタノール注入方法を用いて調製される。さらなる実施形態では、このリボソームは、直交流技術を含むエタノール注入方法を用いて調製される。

## 【0030】

また、本出願は、少なくとも1つの薬学的に許容される担体または賦形剤を含むリボソームを含んでいる薬学的組成物を包含する。

## 【0031】

また、本出願は、医薬としての本出願の組成物の使用を包含する。本出願の組成物は、それらの意図される用途に応じて無菌であつてもよいし、無菌でなくてもよい。また、本発明の組成物は、発熱物質を含まない場合がある。

## 【0032】

本出願はさらに、亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物の投与が有益である疾患、障害または状態を処置するための方法であつて、その必要な被験体に対して有効量の本

10

20

30

40

50

出願の組成物を投与することを包含する方法を包含する。

【0033】

本出願はさらに、亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物の投与が有益である疾患、障害または状態を処置するための本出願の組成物の使用を包含する。

【0034】

一実施形態では、この組成物を用いる方法は、特定の安全性または臨床効果を使用者に情報提供することを包含する。例えば、使用者は、このリボソーム組成物が、同様の治療効果をもたらすか、またはもたらすと予想される非リボソーム組成物よりも安定、標的特異的または治療有効性であることを情報提供され得る。また、使用者は、この組成物が、同様の治療効果をもたらすか、またはもたらすと予想される非リボソーム組成物よりも、1つ以上の観点で、安全であることも情報提供され得る。例えば、リボソーム組成物での処置は、生じる副作用が低く、例えば、血管刺激（静脈炎）が低い場合があり、それによって患者の耐性およびコンプライアンスが増大し得る。使用者は、さらに、リボソーム組成物がより高速で投与されてもよく（例えば、IVプッシュ対希釈液注入）、または同様の治療効果をもたらすか、またはもたらすと予想される非リボソーム処方物に比較して少ない容積で投与されてもよいと情報提供される場合もある。また、使用者はこのリボソーム組成物が、活性成分のより長期の、制御されたまたは遅延性の放出を提供することも情報提供される場合がある。さらに、使用者は、この延長されたまたは遅延された放出が、リボソーム中の脂質の同一性、および使用者による治療処置に必要なタイミング次第で、カスタマイズされても、調整されてもよいことを情報提供される場合がある。使用者は、ラベルまたは添付文書のような刊行物によって情報提供されてもよい。

10

20

【0035】

本出願の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明から明らかになる。しかし、この詳細な説明および特定の実施例は、本出願の実施形態を示す一方で、例示の目的で示されるに過ぎないことが理解されるべきである。なぜなら本出願の趣旨および範囲内の種々の変化および改変は、この詳細な説明から当業者には明らかであるからである。

【0036】

本出願の実施形態は、添付の図面を参照してここで詳細に記載される。

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1】図1は、サンプル中の亜塩素酸塩 / 塩素酸塩の検出のための実施例7のc - トルディン法Bにおける特定の逆希釈係数に対する亜塩素酸塩 / 塩素酸塩の測定された吸光度に関して用いられるWF10の希釈曲線を示す。この逆希釈係数を、447nmで測定した吸光度に対してプロットする。左側のプロットは、全体的なデータセットを示すが、右側のプロットは、非線形のドメインのみを示す。上下の線は、それぞれ、このデータセットの線形および非線形部分上のフィットに相当する。両方のうち最初の交差位置は、2つのドメインの間の移行を印す。

30

【図2】図2は、1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - sn - 3 - グリセロ - 3 - ホスホコリン (POPC) から調製され、5、23 および37 で保管されたりボソームからの亜塩素酸塩および塩素酸塩の漏出を示しているグラフである。

40

【図3】図3は、スフィンゴミエリン (SM) から調製され、5、23 および37 で保管されたりボソームからの亜塩素酸塩および塩素酸塩の漏出を示しているグラフである。ほぼ522時間におけるグラフの末端の一団のデータポイントは、温度が37 まで意図的に上昇された後の測定である。

【図4】図4は、POPC : POPG (1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ (1' - rac - グリセロール) から3 : 1の比で調製され、5、23 および37 で保管されたりボソームからの亜塩素酸塩および塩素酸塩の漏出を示しているグラフである。

【図5】図5は、POPC : POPGから2 : 1の比で調製され、5、23 および37 で保管されたりボソームからの亜塩素酸塩および塩素酸塩の漏出を示しているグラフ

50

である。

【図 6】図 6 は、P O P C : P O P G から 1 : 1 の比で調製され、5、23 および 37 で保管されたりボソームからの亜塩素酸塩および塩素酸塩の漏出を示しているグラフである。

【図 7】図 7 は、1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン ( D M P C ) から調製され、5、23 および 37 で、1、5 および 7 日間、保管されたりボソームからの亜塩素酸塩および塩素酸塩の漏出を示しているグラフである。

【図 8】図 8 は、スフィンゴミエリン S M から調製されたりボソームからの亜塩素酸塩および塩素酸塩の漏出を示しているグラフである。保管は、5 ( 青 )、および 23 ( 赤 ) で、続いて温度は、37 に上げられ、これによって直ちに漏出がもたらされた。

【図 9】図 9 は、D P P C および D P P C / D M P C から調製し、22 および 38 度で保管されたりボソームからの亜塩素酸塩および塩素酸塩の漏出を示しているグラフである。

【図 10】図 10 は、D P P C および D P P C / D M P C リボソームでの長期安定性研究の概要を示す。各々のバーは、部屋の温度 ( 約 22 ) および冷蔵庫の温度 ( 約 6 ) でのサンプルの漏出実験の転帰を示す。x 軸は、時間 ( 日数 ) である。中央の灰色は、リボソームを印しており、ここでは、外側培地中の W F 10 の含量は、L O D 未満であることが見出された。明るい灰色は、外側培地中の W F 10 の含量が、L O Q 未満であった期間を印す。最も濃い灰色は、W F 10 含量が L O Q を超えることを示す。

【図 11】図 11 は、実施例 12 に記載の 2011 年 12 月 12 日に S X 122 で行った高解像度漏出 ( H i g h R e s o l u t i o n L e a k a g e ) ( H R L ) 実験の結果を示す。両方のサンプルのグラフがわかる。温度曲線は、右側の y 軸を参照のこと。漏出した物質の量は、総サンプル容積の画分として示される。実験を用いて、漏出が 2 ~ 3 時間内に開始する温度を決定した。

【図 12】図 12 は、実施例 12 に記載の 2012 年 1 月 6 日に S X 122 で行った H R L 実験の結果を示す。両方のサンプルのグラフがわかる。温度曲線は、右側の y 軸を参照のこと。漏出した物質の量は、総サンプル容積の画分として示される。この実験は、38 での漏出挙動を検査する。この実験を数日間行い、この温度での極めて低い漏出を示している。

【図 13】図 13 は、実施例 12 に記載の 2012 年 1 月 26 日に S X 126 で行った H R L 実験の結果を示す。両方のサンプルのグラフがわかる。温度曲線は、右側の y 軸を参照のこと。漏出した物質の量は、総サンプル容積の画分として示される。部分的な漏出がグラフでわかる。

【図 14】図 14 は、実施例 12 に記載の 2012 年 2 月 22 日に S X 126 で行った H R L 実験の結果を示す。両方のサンプルのグラフがわかる。温度曲線は、右側の y 軸を参照のこと。漏出した物質の量は、総サンプル容積の画分として示される。

【図 15】図 15 は、実施例 12 に記載の 2012 年 1 月 25 日に S X 126 で行った H R L 実験の結果を示す。両方のサンプルのグラフがわかる。温度曲線は、右側の y 軸を参照のこと。漏出した物質の量は、総サンプル容積の画分として示される。

【図 16】図 16 は、実施例 14 に報告された実験について時間に対してプロットした、総サンプル容積の画分として放出された物質の量を示しているグラフである。大きいグラフは、全体的な実験、および漏出の上限を示しており、ここで包み込まれている W F 10 は、完全に放出された。これは全サンプル容積の約 7.5 % であり、従って、またリボソームのカプセル能力も示している。小さい方のグラフは、ある程度の漏出が生じる期間をさらに詳細にカバーする。

【図 17】図 17 は、本出願の一実施形態におけるエタノール注入法を用いるリボソームの調製の模式図を示す。スチールチャンバを出ていくリボソームは、W F 10 をカプセル化して、W F 10 を含んでいる外側相中に分散される。

【図 18】図 18 は、エタノール注入法を用いてリボソームを含んでいる W F 10 を調製するためのダイアフィルトレーションプロセスの間に濾液中に収集される亜塩素酸塩の量を示しているグラフである。

10

20

30

40

50

【図 19】図 19 は、エタノール注入法を用いてリボソームを含んでいる WF 10 を調製するためのダイアフィルトレーションプロセスの間に濾液中に収集される亜塩素酸塩の量を示しているグラフである（図 18 で報告される実験の繰り返し）。

【図 20】図 20 は、エタノール注入法を用いてリボソームを含んでいる WF 10 を調製するためのダイアフィルトレーションプロセスの間に濾液中に収集される亜塩素酸塩の量を示しているグラフである。このリボソームは、図 18 および 19 で報告した実験と比較して二倍の濃度の WF 10 を用いて調製した。

【図 21】図 21 は、コラーゲン誘発性関節炎（CIA）の誘導後の、WF 10、WF 10 のリボソーム型または NaCl（i.p.）を投与されたマウスの CIA スコアを示しているグラフである。

【図 22】図 22 は、WF 10、WF 10 のリボソーム型または NaCl（i.p.）を投与されたマウスの 16 日目の CIA スコアを示している棒グラフである。

【発明を実施するための形態】

【0038】

本出願の詳細な説明

I. 定義

別段示さない限り、ここでおよび他のセクションに記載される定義および実施形態は、当業者によって理解されるように、本明細書に記載される適用（それらが適切である）の全ての実施形態および態様に適用可能であるものとする。

【0039】

本明細書において用いる場合、「ある、1つの（aまたはan：不定冠詞）」または「この、その（the：定冠詞）」という用語は、1つのメンバーによる態様を包含するだけでなく、2つ以上のメンバーを有する態様も包含する。例えば、「リン脂質」を含む実施形態は、1つのリン脂質または2つ以上の追加のリン脂質を有する特定の態様に相当することが理解されるべきである。

【0040】

「追加」または「第二の」構成要素を含んでいる組成物では、本明細書において用いられるような第二の構成要素は、他の構成要素または第一の構成要素とは化学的に異なる。「第三」構成要素は、他の、第一および第二の構成要素とは異なり、さらに列挙されるか、または「追加の」構成要素は同様に異なる。

【0041】

本明細書において用いる場合、「薬剤、因子（agent）」という用語は、ある組成物に添加された場合、その組成物の特性に対して特定の効果を生じる傾向の化合物または化合物の混合物を指す。

【0042】

「亜塩素酸塩」という用語は本明細書において用いる場合、陰イオン「 $\text{ClO}_2^-$ 」を指す。陰イオン種は典型的には、水溶液中に解離型で存在するが、陰イオンは、陰イオンおよび陽イオンを含有している親の塩に由来する場合が多い。

【0043】

「塩素酸塩」という用語は、本明細書において用いる場合、陰イオン「 $\text{ClO}_3^-$ 」を指す。陰イオン種は典型的には、水溶液中に解離型で存在するが、陰イオンは、陰イオンおよび陽イオンを含有している親の塩に由来する場合が多い。

【0044】

「安定化された亜塩素酸塩」という用語は、本明細書において用いる場合、亜塩素酸塩イオン（ $\text{ClO}_2^-$ ）を含んでおり、亜塩素酸塩イオンの濃度、pHおよび/または活性が、使用前の許容できる期間にわたって安定なままである、組成物または物質を指す。安定化された亜塩素酸塩では、亜塩素酸塩イオンは、実質的に分解せず、亜塩素酸塩イオンの活性は、実質的に使用前に維持される。安定化された亜塩素酸塩は、緩衝液、例えば、炭酸ナトリウム/水酸化ナトリウム緩衝液系を含んでもよく、これは、処方物のアルカリのpHを維持する。亜塩素酸塩イオンの濃度は、例えば、高速液体クロマトグラフィー（

10

20

30

40

50

HPLC)によってモニターされ得る。

【0045】

「WF10」とは本明細書において用いる場合、イオン亜塩素酸塩4.25%、塩素酸塩(1.5%)、塩素イオン(2.0%)、硫酸塩(0.7%)およびナトリウム(4.0%)を含んでいる溶液として分析的に特徴付けられる薬物OXO-K993の10(w/v)%希釈水溶液を指す。

【0046】

「許容期間」という用語は、本明細書において用いる場合、少なくとも約1日、少なくとも約1週、少なくとも約30日、少なくとも約6カ月、少なくとも約1年、少なくとも約2年、または少なくとも調製と使用との間のおよその時間を意味する。

10

【0047】

「リボソーム」という用語は、本明細書において用いる場合、内側コアの周囲を囲む少なくとも1つの脂質二重層から構成される人工的に調製された小胞(ベシクル)を指す。内側相(inner phase)、内部相(internal phase)または内側コア(inner core)(本明細書において交換可能に用いられる)は、亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物のような物質を含む。小胞(ベシクル)を用いて、この物質を、例えば、局所的にまたは身体内に送達してもよい。3種類のリボソーム-MLV(多重層ベシクル(multilamellar vesicles))、SUV(小単層ベシクル-直径25~300nm)およびLUV(大単層ベシクル->直径300nm)がある。ベシクルの外側の物質の容積は、外部相、外側相または連続相と呼ばれてもよい。これらの用語は、本明細書において交換可能に用いられる。リボソーム組成物は、複数の個々の別々のリボソームを含み、内側相および外側相は通常水を含む。

20

【0048】

スフィンゴ脂質は、種々の頭部基に結合されたスフィンゴシン(2-アミノ-4-オクタデカン-1,3-ジオール)を骨格として含んでいるクラスの脂質である。

【0049】

スフィンゴミエリン(SM)とは、動物の細胞膜に、特にいくつかの神経細胞軸を囲む膜ミエリン鞘に見出される種類のスフィンゴ脂質を指す。スフィンゴミエリンは、セラミドコア(アミド結合を介して脂肪酸に結合されたスフィンゴシン)および極性の頭部基(ホスホコリンまたはホスホエタノールアミンのいずれかである)を有する。

30

【0050】

「カプセル化された」または「捕捉された」という用語は、本明細書において用いる場合、言及される薬剤が、リボソームの内側に、または内部相に、またはコアに位置することを意味する。その剤は、外部、外側、または連続相に位置することも可能である。

【0051】

「封入率」という用語は、本明細書において用いる場合、製造過程の間、出発材料に対するリボソームベシクルへカプセル化された材料または溶液のパーセンテージを指す。

【0052】

「薬学的組成物」とは、薬学的な使用のための物質の組成を指す。「薬学的組成物」および「処方物」という用語は、交換可能に用いられる。

40

【0053】

「多分散性指数」または「PdI」とは、溶液中の粒子のサイズ分布に関連する大きさのない数値である。PdIは、動的光散乱として公知の技術で測定した相関データの分析によって得ることができる。この係数は、相関データに対する単純な2つのパラメーターフィットから算出される数値である(キュムラント分析)。PdIは、大きさがなく、0.05未満の値が、高度に単分散の標準以外でまれにみられるように、見積もられる。0.7を超える値は、このサンプルが極めて広範なサイズ分布を有し、動的光散乱(DLS)技術によるサイズ分布測定におそらく適切でないことを示す。種々のサイズ分布アルゴリズムは、これらの2つの最後の手段の間におさまるデータと連携する。これらのパラメーターの算出は、ISO標準書13321:1996EおよびISO22412:200

50



8に規定される。

【0054】

「公表物、公開資料 (published material)」とは、情報を提供する媒体を意味し、これには、印刷、音声、視覚または電氣的な媒体、例えば、チラシ、広告、添付文書、印字ラベル、インターネットのウェブサイト、インターネットのウェブページ、インターネットのポップアップウィンドウ、ラジオまたはテレビ放送、コンパクトディスク、DVD、ポットキャスト、音響記録、または他の記録もしくは電氣的媒体を意味する。

【0055】

「安全性」とは、患者関連の要因に関連する有害効果を含む、組成物の投与に関連する有害事象の頻度または重篤度を意味する。

10

【0056】

「有効量」という用語は、本明細書において用いる場合、所望の結果を達成するために十分な量を意味し、従って、成分とその所望の結果とに依存する。それにもかかわらず、一旦所望の効果が知られば、有効量は、当業者の技術の範囲内である。

【0057】

「水」という用語は、本出願の組成物中の成分として本明細書において用いる場合、薬学的に許容される水を指す。

【0058】

「水溶液」という用語は、本明細書において用いる場合、溶媒が主に水であるが、少量の、例えば、10、9、8、7、6、5、4、3、2または1 (v/v) %未満の非水性の溶媒が存在してもよい溶液を意味する。

20

【0059】

「w/v」という用語は、本明細書において用いる場合、100 mLの溶液中の溶質のグラム数を意味する。

【0060】

「w/w」という用語は、本明細書において用いる場合、100 gの溶液中の溶質のグラム数を意味する。

【0061】

「混濁液」という用語は、個々に一般的には裸眼に対して不可視である、個々の粒子または懸濁固体の存在に起因して外見上、濁ってまたはぼんやりしている溶液を指す。

30

【0062】

「相転移温度」という用語は、本明細書において用いる場合、秩序的なゲル相からの液体の物理的状态の変化を誘導するのに必要な温度を指し、ここでは炭化水素鎖は、完全に伸長されて、秩序付けされた液晶相に対して緊密に充填され、ここでは炭化水素鎖は液体中にランダムに位置する。

【0063】

一般には、グラフ上の「エラーバー」は、平均値の標準誤差に相当するが、塗りつぶした、影付きのバーの頂部は、単一のデータ値に相当し、これは、データ値の分布の平均値である。

40

【0064】

「薬学的に許容される」という用語は、動物、特にヒトの処置と適合することを意味する。

【0065】

「処置する」または「処置」という用語は、本明細書において用いる場合、そして当該分野で十分理解されるとおり、有益、または所望の結果 (臨床の結果を含む) を得るためのアプローチを意味する。有益な、または所望の臨床結果としては、限定するものではないが、1つ以上の症状または状態の改善または寛解、疾患の程度の軽減、疾患の状態の安定化 (すなわち、悪化しないこと)、疾患の伝播の予防、疾患の進行の遅延または緩徐化、疾患状態の完解または緩和、疾患の再発の軽減、および緩解 (部分的または全体的) (

50

分離可能でも分離不能でも)が挙げられる。また「処置する」または「処置」とは、処置を受けていない場合に予想される生存に比較して長期の生存を意味し得る。また、「処置する」または「処置」とは本明細書において用いる場合、予防的な処置を包含する。処置の方法は、被験体に対して治療上有効な量の活性剤を投与することを包含し、これは必要に応じて、単回投与からなるか、あるいは、一連の適応を包含する。処置期間の長さは、種々の要因、例えば、状態の重篤度、患者の年齢、活性剤または薬剤の濃度、本明細書に記載の組成物の活性、および/またはそれらの組み合わせに依存する。また、処置期間は、1サイクルの処置を構成するための、サイクル、例えば、約2~7日間毎日1回の投与、続いて約1~20日間の休止期間を含んでもよい。患者は、2回以上のサイクル、例えば、少なくとも2、3、4または5回のサイクルで処置されてもよい。処置または予防に用いられる薬剤の有効用量は、特定の処置または予防の計画の経過にわたって増大してもまたは減少してもよい。投薬量の変化が生じてもよく、当該分野で公知の標準の診断アッセイによって明らかになり得る。ある場合には、慢性投与が必要であり得る。例えば、この組成物は、ある量で、およびその患者の処置に十分なある期間、被験体に投与される。

10

#### 【0066】

本明細書において用いる場合、「被験体」という用語は、哺乳動物を含む動物界の全ての構成要因を包含し、適切はヒトを指す。

#### 【0067】

「使用者」とは、患者、医療従事者、または薬剤供給業者などの対象者を意味する。

20

#### 【0068】

「ゼータ電位」とは、液体中の粒子の表面荷電に関する量であって、液体に分散された固体または液体に分散された液体の潜在的な安定性の指標となる。懸濁物中の全ての粒子が、大きい負のまたは正のゼータ電位を有するならば、それらは、お互いを打ち消す傾向であり、凝集する傾向はない。しかし、粒子が低いゼータ電位値を有するならば、粒子が一緒になることを妨げる力は小さくなる傾向であり、この粒子は、凝集する傾向が大きくなる場合がある。ゼータ電位に関するさらなる情報は、Hunter, R. J. (1988) Zeta Potential In Colloid Science: Principles And Applications, Academic Press, UK.に見ることができる。

30

#### 【0069】

本出願の組成物の処置および使用の方法に関して用いる場合、「その必要な」被験体とは、処置されるべき状態を有すると疑われるか、その状態と診断されたか、または以前にその状態について処置された被験体である場合もある。

#### 【0070】

本開示の範囲を理解するには、「含んでいる」という用語、およびその誘導型は、本明細書において用いる場合、言及される特徴、要素、構成要素、群、整数および/または工程の存在を特定するが、他の述べていない特徴、要素、構成要素、群、整数および/または工程の存在を排除しない、無制限の用語であるものとする。前述はまた、同様の意味を有する言語、例えば、「包含する、含む(including)」、「有する、備える(having)」という用語およびそれらの誘導型などの同様の意味を有する言葉にも当てはまる。「~からなる」という用語およびその誘導型は、本明細書において用いる場合、言及される特徴、要素、構成要素、群、整数および/または工程の存在を特定するが、他の述べていない特徴、要素、構成要素、群、整数および/または工程の存在を排除しない、閉じた用語であるものとする。「本質的に~からなる(consisting essentially of)」という用語は、本明細書において用いる場合、言及される特徴、要素、構成要素、群、整数および/または工程の存在、ならびに特徴、要素、構成要素、群、整数および/または工程の基本的かつ新規な特徴(単数または複数)に物質的に影響しないものを特定するものとする。

40

#### 【0071】

程度用语、例えば、「実質的に」、「約」および「ほぼ」とは本明細書において用い

50

る場合、最終の結果が有意に変化されないように修飾された用語の偏差の誘導型の合理的な量を意味する。程度のこれらの用語は、修飾された用語の少なくとも±5%の偏差を含むと解釈されるべきである（この偏差が、その用語が修飾する単語の意味を否定しない場合は）。

#### 【0072】

##### II. リボソーム組成物

本出願は、亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物を含んでいるリボソーム組成物、ならびにその調製および使用のための方法に関する。

#### 【0073】

従って、本出願は、少なくとも1つの脂質二重層を有しているリボソーム、およびこのリボソームの内側にカプセル化された亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物を含んでいるリボソーム組成物を包含する（ここでこの脂質二重層は、1つ以上の適切な脂質から構成される）。このリボソーム組成物は、複数のリボソームを含み、これが次に、二重層にカプセル化された、亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物を含む。このリボソームは、適切な脂質、例えば、例としては、リン脂質、例えば、ホスファチジルコリン（十分な長さの飽和および/または不飽和の脂肪酸鎖を有する）、および/またはスフィンゴ脂質、例えば、スフィンゴミエリン、あるいは所望の挙動を示すこのような脂質の適切な混合物を含む。これらの脂質は、天然の供給源、半合成の供給源、または合成の供給源のものであってもよい。このリボソームはさらに、二重層（単数または複数）および/または荷電された脂質の剛性を向上し、透過性を軽減して、リボソームの安定性を増強するための追加の構成要素、例えば、コレステロールまたはコレステロール硫酸を含んでもよい。

10

20

#### 【0074】

本出願の適用はまた、少なくとも1つの脂質二重層を含んでいるリボソーム、およびそのリボソームの内側に捕捉された亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物を含んでいるリボソームを包含し、ここでこの脂質二重層は、1つ以上の適切な脂質からなる。

#### 【0075】

本出願はさらに、カプセル化されたおよびカプセル化されていない亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物を含んでいるリボソーム組成物であって、ここでこのカプセル化された亜塩素酸塩、塩素酸塩、またはそれらの混合物がリボソームの内側相にあり、かつカプセル化されていない亜塩素酸塩、塩素酸塩、またはそれらの混合物がリボソームの外側相にある、リボソーム組成物を包含する。別の実施形態では、少なくとも1つの脂質二重層内にカプセル化され、外部相に存在する亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物の比は、約100:1~約1:100、または約90:10~10:90である。あるいは、この外部相は、亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物以外の物質、例えば、別の治療剤および/または塩化ナトリウムを含んでもよい。

30

#### 【0076】

本出願のある実施形態では、この内部相および外部相のpHは同じである。別の実施形態では、この内部相および外部相のpHは異なり、例えば、内側相のpHは、約6~約13、約8~約12.5、または約10~約12であってもよく、この外部相のpHは、ほぼ天然、例えば、約6~8であってもよい。別の実施形態では、リボソーム組成物は、内側コア相と外側連続相との間で、約1~約7、約1~約5または約1~約3というpHの相違を有する。

40

#### 【0077】

本出願の別の実施形態では、このリボソームの内部相および外部相は、等浸透性であるか、または同じ浸透性を示す。すなわち、内部相および外部相の浸透性は、お互いの1、2、3、4、5、6または7%内である。ある実施形態では、リボソームの内側溶液および外側溶液が同じまたは同様の浸透圧であることによって、リボソームの内外への物質の漏出の量が減少される。さらなる実施形態では、リボソーム組成物は、被験体の体液に関して等張性であるか、または等浸透性である。

50

## 【0078】

あるいは、一実施形態では、リボソームの内部相および外部相の浸透性は、異なる。例えば、内部相と外部相との間の浸透性の相違は、約8、10、15、20、25、50、100または200%であってもよい。

## 【0079】

ある実施形態では、本出願のリボソーム組成物は、約3～48カ月の間、薬学的に許容される安定性を示す。さらに別の実施形態では、この薬学的に許容される安定性は、約5～約50 または約5～約30 という温度での組成物の保管で達成される。

## 【0080】

さらなる実施形態では、このリボソーム組成物は、凍結乾燥されてもよい。リボソーム凍結乾燥のための技術は、周知であり、例えば、Chenら(J. Control Release 2010 Mar 19; 142(3): 299-311)は、凍結乾燥されたリボソームの溶解保護効果を決定する重要な要因をまとめている。

## 【0081】

さらなる実施形態では、リボソーム組成物は、約80nm～約300nm、約90nm～約200nmまたは約100nm～約140nmという平均直径を有する単層および/または多重層のベシクルであるリボソームを含む。別の実施形態では、リボソーム組成物は、約80nm～約15ミクロン、約300nm～約12ミクロンまたは約7ミクロン～約10ミクロンという平均直径を有する単層および/または多重層のベシクルであるリボソームを含む。粒子サイズ分布の性質は、単峰性であっても、多峰性であってもよく、多分散係数は、当業者に公知のように製造方法によって制御され、所望の送達経路に基づいて決定され得る。

## 【0082】

投与経路次第で、特定の直径のベシクルを投与することが所望され得る。例えば、約80nm～約300nmの直径を有するベシクルは、静脈投与に有用であり得るが、約80nm～約10ミクロンの直径を有するベシクルは、肺、気管または経鼻経路のような吸引を介した投与に有用であり得る。

## 【0083】

さらなる実施形態では、リボソーム組成物は、滅菌されてもよい。適切な滅菌技術の非限定的な例としては、濾過、オートクレーブ、ガンマ線照射、および凍結乾燥(フリーズドライ)が挙げられる。一実施形態では、滅菌は、220nmのフィルターを用いて濾過によって行う。

## 【0084】

驚くべきことに、亜塩素酸塩および塩素酸塩がそれぞれ3または4個の原子しか含まない場合、リボソームベシクルを形成する脂質二重層が実質的に亜塩素酸塩および/または塩素酸塩に対して不浸透性である(すなわち、このベシクルがイオンタイト(ion-tight)である)リボソームを開発することが可能であることが発見された。これは、エタノール、グルコース、アンモニアおよび酢酸塩のような他の分子がリボソームの脂質二重層を通じて浸透することが公知であるという事実にかかわらない。従って、本出願の一実施形態では、脂質二重層は実質的に、亜塩素酸塩に対して不浸透性である。本出願の別の実施形態では、この脂質二重層は実質的に、塩素酸塩に対して不浸透性である。さらなる実施形態では、この脂質二重層は実質的に、亜塩素酸塩および塩素酸塩に対して不浸透性である。

## 【0085】

本出願のイオンタイト(ion-tight)リボソームは、単一壁リボソームベシクルで達成され得るイオンで達成され得る。本出願の一実施形態では、イオンタイトリボソームは、市販の許容される保存期間を超える安定性を示す(例えば、室温または冷蔵温度で、約3～48カ月)。別の実施形態では、イオンタイトリボソームベシクルが分散される外部(または外側相)は、カプセル化された内部(内側)相とは異なる組成物を含むように操作されてもよい。例えば、内側相および外側相は、異なる濃度の亜塩素酸塩を含ん

10

20

30

40

50

でもよいし、あるいは、いずれの相も、実質的に亜塩素酸塩を含まなくてもよい。別の例では、内側相および外側相は、異なる濃度の塩素酸塩を含んでもよいし、あるいは、いずれかの相も実質的に塩素酸塩を含まなくてもよい。本出願の一実施形態では、イオンタイトリポソーム処方物の内側相および外側相のpHは異なる。外部相は、例えば、生理食塩水を含んでもよいし、内部相（亜塩素酸塩および／または塩素酸塩を含んでもよい）とは実質的に異なるpHを有してもよい。一実施形態では、この外部相は、塩化ナトリウムを含んでもよく、実質的に亜塩素酸塩および／または塩素酸塩を含まなくてもよく、かつ適切な天然のpHを有してもよいが、この内部相は、亜塩素酸塩を含むか、および／または外部相より高いpHを有する。従って、リポソームベシクルを形成する脂質二重層はさらに、実質的に $H^+$ および $OH^-$ に対して不浸透性であってもよい。理論上、 $^{13}C-NMR$ ベースの方法を用いてリポソーム中のpHを測定することが可能である。本出願のイオンタイトリポソーム組成物は、実質的に塩素酸塩を含まなくてもよく、または外部相とは異なる濃度の塩素酸塩を含んでいるリポソームベシクルを含んでもよい。本出願の別の実施形態では、リポソーム組成物を含んでいるイオンタイトベシクルの直径の分布は、ある範囲の値を有する。別の実施形態では、内部相、外部相または両方とも、複数の物質を含む。さらに他の実施形態では、リポソーム分散中の異なるリポソーム中に捕捉された材料の組成中には変動がある。

#### 【0086】

ある実施形態では、本出願のリポソーム組成物は、過酸化水素、イソチアゾリンおよび／または亜鉛イオンを含まない。別の実施形態では、このリポソーム組成物は、レシチンから調製されたリポソームを含まない。さらなる実施形態では、このリポソーム組成物は、脂質二重層の2つの脂質の間に単に亜塩素酸塩および／または亜塩素酸塩が捕捉されたリポソームを含まない。さらに別の実施形態では、このリポソーム組成物は、実質的に分解産物を含まない。

#### 【0087】

さらなる実施形態では、本出願のリポソームは、安定であり、すなわち、亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物は、例えば、食品医薬品局（FDA）または他の政府の規制機関が承認する製品の仕様で規定されたような、許容される保存期間にわたって、そのリポソームの内側から漏出しない。一実施形態では、リポソームは、約30、25、20、15、10、9、8、7または6より下の温度で、意図される目的の間のそれらの使用を可能にするのに十分な期間安定である。例えば、1分～1時間、1時間～24時間、1日～30日、30日～200日、6カ月～1年またはそれ以上の期間にわたる。

#### 【0088】

##### A．亜塩素酸塩、塩素酸塩およびそれらの混合物

本出願のリポソーム組成物は、亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物を含む。一実施形態では、このリポソーム組成物は、亜塩素酸塩を含む。一実施形態では、このリポソーム組成物は、安定化された亜塩素酸塩を含む。一実施形態では、このリポソーム組成物は、塩素酸塩を含む。一実施形態では、このリポソーム組成物は、亜塩素酸塩および塩素酸塩を含む。一実施形態では、このリポソーム組成物は、亜塩素酸塩を含み、かつ実質的に塩素酸塩を含まない。一実施形態では、このリポソーム組成物は、塩素酸塩を含み、かつ実質的に亜塩素酸塩を含まない。一実施形態では、このリポソーム組成物は、塩素酸塩なしの組成物である。別の実施形態では、このリポソーム組成物は、亜塩素酸塩なしの組成物である。

#### 【0089】

別の実施形態では、このリポソーム組成物は、安定化された亜塩素酸塩を含む。安定化された亜塩素酸塩ベースの組成物の非限定的な例としては、その各々の内容が、全体として参照によって援用される、米国特許第6,350,438号、同第6,251,372号、同第6,235,269号、同第6,132,702号、同第6,077,502号、および同第4,574,084号に記載の組成物が挙げられる。

#### 【0090】

10

20

30

40

50

別の実施形態では、安定化された亜塩素酸塩は、OXO-K993（これは、亜塩素酸塩および塩素酸塩の両方を含む）のような、亜塩素酸塩を含んでいる組成物、または約1～10%、10～20%、20～30%、30～50%または50～90（w/v）%のOXO-K993を含んでいる組成物である。さらなる実施形態では、この安定化された亜塩素酸塩は、WF10を含んでいる組成物であるか、またはWF10である。

#### 【0091】

ある実施形態では、安定化された亜塩素酸塩は、約2（w/v）%のOXO-K993を含んでいる組成物である。さらなる実施形態では、安定化された亜塩素酸塩は、約2（w/v）%のOXO-K993、約2（w/v）%のグリセロールおよび約96（w/v）%の水を含んでいる組成物である。このような組成物は、Oxovasin（商標）およびOxoferin（商標）（Nuvo Manufacturing, ドイツ、ヴァンツレーベン）の名称で市販されており、ここで1mlのOxovasin（商標）は、約0.85mg（または約0.085%（w/v））の亜塩素酸塩を1.0mlの水の中に含む。Oxovasin（商標）のpHは、10.75～11.90である。

10

#### 【0092】

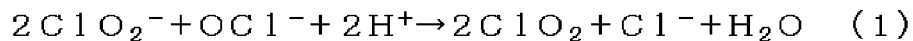
本出願のある実施形態では、OXO-K993は、以下の方法を用いて調製される：

#### 【0093】

亜塩素酸ナトリウム（NaClO<sub>2</sub>）および次亜塩素酸ナトリウム（NaOCl）を、注射用水（WFI）中で4.8対1のモル比で混合する。この溶液のpHは、pH11.0よりも大きくなければならない。この混合物への、触媒、クロリルスルフリック酸[ClO<sub>2</sub><sup>+</sup>][HSO<sub>4</sub><sup>-</sup>]の添加後、以下の反応が観察され得る：

20

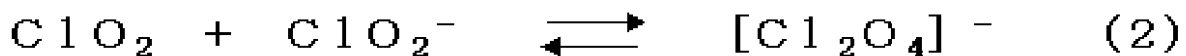
#### 【化1】



溶液のpHは低下する。亜塩素酸塩の一部は、式（1）で記載される酸化還元過程において二酸化塩素（ClO<sub>2</sub>）に酸化される。平衡反応では、発生する二酸化塩素は、式（2）に示されるように、過剰の未酸化の亜塩素酸塩との濃い褐色の荷電移行複合体を形成する：

#### 【化2】

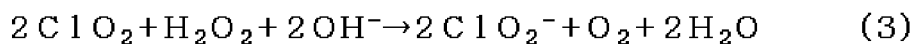
30



#### 【0094】

次いで、9.65ミリモル（反応溶液1kgあたり）の炭酸ナトリウム過酸化水素化物（2Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>・3H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>）を、溶液に添加する。炭酸ナトリウム過酸化水素化物の添加の際、二酸化塩素の一部を亜塩素酸塩に還元して、同時に酸素を形成する：

#### 【化3】

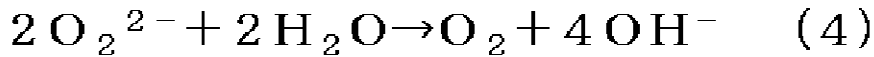


40

#### 【0095】

適切な時間、例えば15分後、102ミリモル（反応溶液1kgあたり）の過酸化ナトリウム（Na<sub>2</sub>O<sub>2</sub>）をこの溶液に添加して、これは、残留する二酸化塩素が完全に亜塩素酸塩に還元されるので、完全に脱色される。過酸化ナトリウムから、酸素は緩徐な過程で発生して、これは典型的には少なくとも4週間を要する（式4）。同時に、ヒドロキシルイオンが形成されて、高いpH値（pH>13）の溶液が生じ、これによって活性な物質である亜塩素酸塩が安定化される。

## 【化 4】



この合成から生じる最終反応生成物 O X O - K 9 9 3 は、安定な水溶液であり、この溶液は、陰イオンである亜塩素酸塩（4.25%）、塩素イオン（2.0%）、塩素酸塩（1.5%）、および硫酸塩（0.7%）、およびナトリウムを陽イオンとして、ならびに処方物のアルカリの pH を維持する炭酸ナトリウム / 水酸化ナトリウム緩衝液系を含む。

## 【0096】

当業者は、任意の化学的に安定化された亜塩素酸塩溶液（O X O - K 9 9 3、W F 1 0、O x o v a s i n（商標）の誘導体または他の亜塩素酸塩ベースの、もしくは塩素酸塩ベースの溶液およびそれらの誘導体を含む）が、十分に本出願の範囲内であることを認識する。これらの溶液は、本出願の組成物、方法および使用で用いられてもよく、従って、本出願の範囲は、本明細書に記載される生成物の使用に必ずしも限定されない。

## 【0097】

また、O X O - K 9 9 3 およびその誘導体（W F 1 0、O x o f e r i n、O x o v a s i n）は、イオンの混合物を含んでいる組成物の例である。なぜなら、この処方物は、亜塩素酸塩、塩素イオン、塩素酸塩、硫酸塩およびナトリウムイオンの組み合わせを含むからである。本出願の一実施形態では、イオンの混合物を含んでいる組成物は、少なくとも2つの異なる種類のアニオン（塩素酸塩および亜塩素酸塩）を含んでいる組成物である。本出願の別の実施形態では、この組成物は、少なくとも3つの異なる種類の陰イオンを含んでもよい。本出願のさらなる実施形態では、この組成物は、少なくとも4つ、少なくとも5つまたは少なくとも6つの異なる種類の陰イオンを含んでもよい。

## 【0098】

さらなる実施形態では、このリポソーム組成物は、組成物のカプセル化された総イオン含量の約 0.01 (w/w)% ~ 約 50 (w/w)%、約 0.1 (w/w)% ~ 約 20 (w/w)%、または約 0.5 (w/w)% ~ 約 10 (w/w)% の量で存在するカプセル化された亜塩素酸塩を含む。

## 【0099】

なおさらなる実施形態では、このリポソーム組成物は、組成物のカプセル化された総イオン含量の約 0.01 (w/w)% ~ 約 50 (w/w)%、約 0.1 (w/w)% ~ 約 20 (w/w)% または約 0.5 (w/w)% ~ 約 10 (w/w)% の量で存在するカプセル化された塩素酸塩を含む。

## 【0100】

なおさらなる実施形態では、このリポソーム組成物は、この組成物のカプセル化された総イオン含量の約 0.01 (w/w)% ~ 約 50 (w/w)%、約 0.1 (w/w)% ~ 約 20 (w/w)% または約 0.5 (w/w)% ~ 約 10 (w/w)% の量で存在する塩素酸塩および亜塩素酸塩イオンのカプセル化された混合物を含む。また、亜塩素酸塩および / または塩素酸塩イオンを含有する物質の任意の組成物は、少なくとも1つの対イオンを有して、電荷の中立性を維持する。従って、本出願の一実施形態によれば、このリポソーム組成物は、1つ以上の陽イオンを含む。可能性のある陽イオンの非限定的な例としては、アルカリ金属陽イオン（例えば、ナトリウムまたは  $\text{Na}^+$ ）およびアルカリ土類陽イオンが挙げられる。別の実施形態では、亜塩素酸塩イオン、塩素酸塩イオンまたはそれらの混合物を含んでいるリポソーム組成物は、さらにナトリウムおよび / またはカリウム対イオンを含む。

## 【0101】

さらなる実施形態では、このリポソーム組成物は、組成物のカプセル化された総陰イオン含量の約 0.1 (w/w)% ~ 約 100 (w/w)%、約 1 (w/w)% ~ 約 90 (w/w)%、約 2 (w/w)% ~ 約 80 (w/w)%、約 3 (w/w)% ~ 約 70 (w/w)

10

20

30

40

50

）％、約 4（w/w）％～約 60（w/w）％または約 5（w/w）％～約 50（w/w）％の量で存在するカプセル化された亜塩素酸塩を含む。

【0102】

なおさらなる実施形態では、このリボソーム組成物は、組成物のカプセル化された総陰イオン含量の約 0.1（w/w）％～約 100（w/w）％、約 1（w/w）％～約 90（w/w）％、約 2（w/w）％～約 80（w/w）％、約 3（w/w）％～約 70（w/w）％、約 4（w/w）％～約 60（w/w）％または約 5（w/w）％～約 50（w/w）％の量で存在する、カプセル化された塩素酸塩を含む。

【0103】

なおさらなる実施形態では、このリボソーム組成物は、組成物のカプセル化された総陰イオン含量の約 0.1（w/w）％～約 100（w/w）％、約 1（w/w）％～約 90（w/w）％、約 2（w/w）％～約 80（w/w）％、約 3（w/w）％～約 70（w/w）％、約 4（w/w）％～約 60（w/w）％または約 5（w/w）％～約 50（w/w）％の量で存在する塩素酸塩および亜塩素酸塩イオンのカプセル化された混合物を含む。

10

【0104】

当業者は、リボソーム組成物中の陰イオンの比が、その意図される用途に基づいて定性的にまたは定量的に調節されてもよいことを認識する。例えば、組成物中の陰イオンの比は、特定の疾患、障害または状態の処置のために調節されてもよい。一実施形態では、第二種の陰イオンに対する第一種の陰イオンの比は、約 100：1～約 1：100、約 90：10～10：90、約 1：1～約 3：1（w/w）または約 2：1（w/w）である。ある実施形態では、第一種の陰イオンとは、亜塩素酸塩であり、および第二種の陰イオンとは塩素酸塩である。

20

【0105】

ある実施形態では、亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物の pH は約 8 より大きい、約 9 より大きい、または約 10 より大きい。ある実施形態では、この pH は約 8～約 14、約 8～約 13、約 9～約 12.5、または約 10～約 12 である。

【0106】

別の実施形態では、亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物の pH は、約 8 未満、約 7 未満、または約 6 未満である。ある実施形態では、pH は約 5～約 8、約 6～約 7、または約 7～約 7.5 である。

30

【0107】

さらなる実施形態では、このリボソーム組成物は、2つの pH 値を含む場合があり、この第一の値は、内側、内部またはカプセル化された相の pH に関し、この第二の値は、外側または外部相の pH に関する。例えば、リボソーム組成物の内部相の pH は、約 6～13 であってもよいが、リボソーム組成物の外部相の pH は、約 6～8 であってもよい。従って、一実施形態では、内部相と外部相との間の pH の相違は、約 1～7、約 1～6、約 1～5、約 1～4、約 1～3、約 1～2 または約 1 である。

【0108】

本出願における使用のための亜塩素酸塩および塩素酸塩は、任意の利用可能な供給源から得られてもよく、市販されている。ある実施形態では、亜塩素酸塩または塩素酸塩は、ナトリウム塩であるが、当業者は、他の金属塩が用いられてもよいことを理解する。

40

【0109】

本出願のリボソーム組成物中の亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物の量は典型的には、調製方法を用いてリボソーム中に捕捉され得る最大量である。ある実施形態では、この亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物は、約 1％～約 50％、約 2％～約 25％または約 5％～約 15％という効率性または封入率で捕捉される。

【0110】

B. 脂質

本出願のリボソーム中に含まれる脂質は、約 5～約 14、約 6～約 13、約 8～約 12

50



・ 5、または約 10 ~ 約 12 という pH を有する、イオンの捕捉に適切である脂質から選択される。本出願のリポソームを調製するための脂質の適切性を決定する要因としては以下が挙げられる：(1) 水性媒体中で脂質二重層を形成する能力；(2) 適切な量のイオンをカプセル化する能力；(3) 亜塩素酸塩および / または塩素酸塩イオンの漏出に対して形成されたリポソームが不浸透性であること；(4) アルカリ環境での加水分解に対する形成されたリポソームの抵抗性（例えば、内側 pH が 8 以上である場合）；および / または(5) 形成されたリポソームが、約 5 ~ 約 50 の範囲内に収まる保管温度で許容可能な期間安定なままである能力。

#### 【0111】

本明細書に示される実施例は、全ての脂質が、塩素酸塩または亜塩素酸塩のようなイオンの捕捉に適切なリポソームを調製するために適切なわけではないことを実証する。驚くべきことに、本出願の教示を通じて、一実施形態では、適切な脂質は、リン脂質およびスフィンゴ脂質から選択されることが見出された。別の実施形態では、適切なリン脂質は、十分な長さ、例えば、12 を超える、13 を超える、または 14 個を超える炭素原子の飽和または不飽和の脂肪アシル鎖を含むホスファチジルコリン (PC) から選択され、そして適切なスフィンゴ脂質は、スフィンゴミエリン (SM) から選択される。別の実施形態では、この適切な脂質は、スフィンゴミエリン (SM)、1, 2 - ジパルミトイル - 2 - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DPPC)、1, 2 - ジミリストイル - 2 - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DMP C)、水素添加大豆リン脂質または卵黄リン脂質およびそれらの混合物から選択される。さらなる実施形態では、適切な脂質は、約 5 以上、約 23 以上、約 37 以上、または約 50 以上でイオンの漏出に対して不浸透性であるリポソームを形成する脂質から選択される。別の実施形態では、本出願のリポソームは、それらが形成される脂質の相転移温度 (PPT) で、またはその付近で不浸透性であっても不浸透性でなくてもよい。種々の脂質の PPT、例えば、1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - sn - 3 - グリセロ - 3 - ホスホコリン (-2)、1, 2 - ジミリストイル - 2 - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (23)、スフィンゴミエリン (37)、1, 2 - ジパルミトイル - 2 - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (41)、および水素添加大豆リン脂質または卵黄リン脂質（例えば、水素添加大豆リン脂質について 50）の PPT は公知である。

#### 【0112】

本出願のリポソームは、2 種類以上の適切な脂質を含んでもよい。リポソームが 2 種類の適切な脂質を含む場合、この脂質は、20 : 1 ~ 1 : 1、15 : 1 ~ 5 : 1 または 10 : 1 ~ 9 : 1 のモル比で存在してもよい。一実施形態では、2 種類の適切な脂質は、スフィンゴミエリン (SM)、1, 2 - ジパルミトイル - 2 - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DPPC)、1, 2 - ジミリストイル - 2 - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DMP C)、および水素添加大豆リン脂質または卵黄リン脂質から選択される。

#### 【0113】

本出願の組成物は、脂質二重層（単数または複数）の剛性を増強するか、および / または透過性を低減するための、少なくとも 1 つの追加の構成要素、例えば、コレステロールまたはコレステロール硫酸をさらに含んでもよい。少なくとも 1 つの追加の構成要素が、総脂質含量の約 0.1 ~ 約 50 %、約 1 ~ 約 30 %、約 5 ~ 約 25 % または約 10 ~ 約 20 % の量で存在してもよい。

#### 【0114】

本出願の組成物は、約 + 0.5 mV よりも少なくともさらに正であるか、または約 - 0.5 mV よりも負であるゼータ電位のような、リポソームの凝集を低減するゼータ電位を有するリポソームを提供する少なくとも 1 つの追加の構成要素をさらに含んでいることが別の実施形態である。ある実施形態では、ゼータ電位は、約 + 1 mV ~ + 50 mV、約 + 10 mV ~ + 40 mV または約 + 15 mV ~ + 30 mV である。別の実施形態では、ゼータ電位は、約 - 1 mV ~ - 50 mV、約 - 10 mV ~ - 40 mV または約 - 15 mV ~ - 30 mV である。さらなる実施形態では、リポソームの凝集を低減するゼータ電位を有す

るリボソームを提供する少なくとも1つの追加の構成要素は、荷電された脂質である。別の実施形態では、本出願のリボソームを調製するために用いられる脂質としては、少なくとも1つの荷電された脂質が挙げられる。理論によって限定されることは望まないが、荷電された脂質の存在は、それらがお互いに近づくにつれて、隣接するリボソームと反発して、リボソームの間の接触の量を減少し、従って、サイズの増大を生じるリボソームの融合または凝集の量を減少する。従って、それらがお互いを反発することを可能にするゼータ電位（例えば、+1 mV、+5 mV、+10 mV、+15 mV、+25 mV、+35 mVもしくは+45 mVよりも少なくとも正、または-1 mV、-5 mV、-10 mV、-15 mV、-25 mV、-35 mVもしくは-45 mVよりも負）を提供する荷電された脂質をリボソームが含むことが、本出願のある実施形態である。

10

#### 【0115】

ある実施形態では、荷電された脂質は、負に荷電された脂質、例えば、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、またはホスファチジン酸である。しかし、荷電された脂質は、リン脂質またはスフィンゴ脂質である必要はない。

#### 【0116】

負に荷電された脂質が、本出願のリボソームを調製するために好ましいが、本出願のリボソームは、正に荷電された脂質の使用を排除しない。従って、一実施形態では、本出願のリボソームは、少なくとも1つの正に荷電された脂質を含んでもよい。例えば、1, 2 - ジラウロイル - sn - グリセロ - 3 - エチルホスホコリン塩素塩 EPC（塩素塩）、N - [1 - (2, 3 - ジオレイロイクス (dioleylox)) プロピル] - N - N - N - トリメチルアンモニウムクロライド (DOTMA)、ジメチルジオクタデシルアンモニウムプロミド塩 (DDAB) および他の pH - 感受性陽イオン性リン脂質。しかし、この荷電された脂質は、リン脂質またはスフィンゴ脂質である必要はない。例えば、他の荷電された脂質、例えば、N - [1 - (2, 3 - ジオレイロイルオキシ) プロピル] - N, N, N - トリメチルアンモニウムメチル - 硫酸塩 (DOTAP) が、本出願のリボソームを調製するために用いられてもよい。

20

#### 【0117】

一実施形態では、荷電された脂質は、20 : 1 ~ 1 : 1、15 : 1 ~ 5 : 1または10 : 1 ~ 9 : 1という非荷電：荷電脂質のモル比を提供する量で存在する。さらなる実施形態では、リボソーム中の荷電された脂質の存在は、得られたリボソームの安定性を、特に、荷電された脂質を欠いている、それ以外は同一のリボソームと比較して改善する。

30

#### 【0118】

ある実施形態では、本出願のリボソーム中に含まれる適切な脂質は、表1に列挙される脂質から選択される。

#### 【0119】

ある実施形態では、適切な脂質は、1, 2 - ジパルミトイル - 2 - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DPPC)、1, 2 - ジミリストイル - 2 - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DMPC)、1 - ミリストイル - 2 - ステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (MSPC)、1 - パルミトイル - 2 - ミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (PMPC)、1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DSPC)、水素添加卵 (egg) PC (HEPC)、1 - パルミトイル - 2 - ステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (PSPC)、1 - ステアロイル - 2 - ミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (SMPC)、1 - ステアロイル - 2 - オレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (SOPC)、1 - ステアロイル - 2 - パルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (SPPC)、ジアラキドイルホスファチジルコリン (DAPC)、1, 2 - ジベヘノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DBPC)、1, 2 - ジエルコイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DEPC)、1, 2 - ジオレイロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DOPC)、水素添加大豆リン脂質または卵黄リン脂質、およびそれらの混合物から選択される。別の実施形態

40

50

では、この脂質はスフィンゴミエリン ( S M ) またはミルクスフィンゴミエリンである。さらなる実施形態では、この脂質は、水素添加大豆リン脂質または卵黄リン脂質である。別の実施形態では、この適切な脂質は、1, 2 - ジパルミトイル - 2 - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン ( D P P C )、1, 2 - ジミリストイル - 2 - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン ( D M P C )、水素添加大豆リン脂質または卵黄リン脂質、およびそれらの混合物から、荷電された脂質または別の脂質と組み合わせて選択される。さらなる実施形態では、この荷電された脂質は、負に荷電されたリン脂質である。なお別の実施形態では、負に荷電されたリン脂質は、ホスファチジルグリセロール、例えば、1, 2, - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホグリセロール ( D P P G )、1, 2 - ジミリストイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホグリセロール ( D M P G )、1, 2 - ジオレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホグリセロール ( D O P G )、または1, 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホグリセロール ( D S P G )、ホスファチジルエタノールアミンの塩、例えば、1, 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン ( D S P E )、または1, 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - メチル - ポリエチレングリコール ( M P E G - D S P E ) の塩、またはそれらの混合物である。さらなる実施形態では、このホスファチジルグリセロールは、D P P G もしくはD S P G またはそれらの混合物である。

10

20

30

40

50

#### 【0120】

脂質の混合物がリボソーム中で用いられる場合、大量に存在する脂質は、約5 ~ 約30 より大きいP T Tを有する脂質であることが本出願のある実施形態である。このような脂質は、例えば、12を超える連続炭素原子を含む炭素鎖を含んでいる脂質である。

#### 【0121】

本出願の一実施形態では、脂質の特定の比が望ましい。別の実施形態では、この脂質は、1 : 9というモル比で、1, 2 - ジパルミトイル - 2 - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン ( D P P C ) および1, 2 - ジミリストイル - 2 - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン ( D M P C ) から選択される。さらなる実施形態では、この脂質は、1 : 9というモル比で、1, 2 - ジパルミトイル - 2 - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン ( D P P C ) および1, 2 - ジミリストイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホグリセロール ( D M P G ) から選択される。さらに別の実施形態では、この脂質は、1 : 9というモル比で、1, 2 - ジパルミトイル - 2 - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン ( D P P C ) および1, 2, - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホグリセロール ( D P P G ) から選択される。さらに別の実施形態では、この適切な脂質は純粋なD P P Cである。

#### 【0122】

また特定のP P Tを有する脂質は、本出願のリボソーム組成物の調製のために選択され得る。従って、リボソームが動物の体温を超えるP P Tを有する脂質を含むことが本出願のある実施形態である。このリボソームが、動物の体温未満であるP P Tを有する脂質を含むことは、本出願の別の実施形態である。

#### 【0123】

このような材料は、例えば、Avanti Polar Lipids, (Alabaster, Alabama USA), LIPOID GmbH (ドイツ) から市販されているか、または当該分野で公知の方法を用いて調製されてもよい。

#### 【0124】

#### C. リボソーム表面修飾剤

本出願のリボソームの循環時間を延長するために、ある実施形態では、リボソーム、または脂質二重層の表面を、親水性を向上する分子で、例えば、親水性ポリマーで修飾することがある。

#### 【0125】

ある実施形態では、親水性ポリマーは、ポリ - (エチレングリコール) ( P E G ) である。リボソームの表面上のP E Gの存在は、血液循環時間を延長する一方で単球食細胞系 ( M P S ) 取り込みを低減することが示された。

## 【0126】

P E Gによるリボソームの表面修飾は、いくつかの方法で達成され得る：ベシクルの表面上にポリマーを物理的に吸着することによって、リボソーム調製の際にP E G脂質複合体を取り込むことによって、または事前に形成されたリボソームの表面上に反応性基を共有結合することによって。

## 【0127】

リボソーム上へのP E Gをグラフトすることで、いくつかの生物学的および技術的な利点が示された。P E G化したベシクルの最も重要な特性は、それらの強力に減少したM P S取り込み、およびそれらの血液循環の延長であり、従って、灌流組織の分布の改善である。さらに、リボソーム表面上のP E G鎖は、ベシクルの凝集を回避し、それらの安定性を改善する。また、P E G修飾したリボソームは、「シールドされた (shielded)」リボソームと呼ばれる場合が多い。D o x i l (商標) (ドキシソルビシンH C l リボソーム注射) は、網内系 (R E S) および長期の薬物循環時間を回避するために利用される付加ポリエチレングリコール (P E G) を伴う、リボソーム封入ドキシソルビシンである (V a i l D M, A m a n t e a M A, C o l b e r n G T, ら、「P e g y l a t e d L i p o s o m a l D o x o r u b i c i n . P r o o f o f P r i n c i p l e U s i n g P r e c l i n i c a l A n i m a l M o d e l s a n d P h a r m a c o k i n e t i c S t u d i e s .」S e m i n O n c o l . (2004) 31 (補遺13) : 16 - 35を参照のこと)。

10

20

## 【0128】

リン脂質およびコレステロールから構成されるリボソームでは、P E Gがベシクルの循環寿命を増大する能力は、グラフト化されたP E Gの量およびポリマーの長さまたは分子量の両方に依存することが見出された (A l l e n T M, ら、B i o c h i m B i o p h y s A c t a . 1989, 981 : 27 - 35)。ほとんどの場合、P E Gの鎖が長ければ、血液残留時間の改善が最大になる。ある実施形態では、P E Gは、約1500 ~ 約5000の分子量を有する。

## 【0129】

本出願のリボソームを表面修飾するために用いられ得る、他の親水性ポリマーとしては、水溶性、親水性のポリマーが挙げられ、可塑性の主鎖および生体適合性を有する。ある実施形態では、親水性ポリマーは、P E G、ポリ (ビニルピロリドン) (P V P)、ポリ (アクリルアミド) (P A A)、ホスファチジルポリグリセロール、ポリ [N - (2 - ヒドロキシプロピル) メタクリルアミド]、L - アミノ酸ベースの生分解性ポリマー、ポリビニルアルコール (例えば、約20,000のMWを有するP V A)、ポリ (2 - メチル - 2 - オキサゾリン)、ポリ (2 - エチル - 2 - オキサゾリン) およびそれらの混合物から選択される。

30

## 【0130】

別の実施形態では、リボソームの表面は、ガングリオシドおよび/またはシアル酸誘導体、例えば、モノシアロガングリオシド (G M 1) で修飾される。いくつかの糖脂質は、i v注入後のリボソームのM P S取り込みの研究で試験された：糖脂質G M 1 (脳組織由来モノシアロガングリオシド) は、リボソーム表面上に組み込まれた場合、M P S取り込みを有意に減少し、処方物は、数時間にわたって血液循環中で保持された。90 ~ 200 nmの範囲の直径を有するG M 1グラフトしたリボソームは、血液保持が長く、このサイズ範囲以外のリボソームよりも、結果的に腫瘍組織で蓄積を伴う。G Mコーティングしたリボソームは、経口投与および脳への送達に有用であり得る。具体的には、経口の薬物担体として用いられるリボソーム処方物のうちでも、G M 1およびG M I I I型を含有する処方物は、胃腸管を通じて生存する可能性が高いことが示唆された (T a i r a M C, ら、D r u g D e l i v . 2004; 11 : 123 - 8)。さらに、両方の脳半球の皮質、脳幹神経節および中脳におけるコントロールのリボソームについてよりもG M 1リボソームについて脳のトレーサーによる取り込みが高かった；逆に、トレーサーの肝臓取り込みでも血液濃度でも有意な変化は観察されなかった (M o r a M, ら、P h a r m

40

50

Res. 2002; 19: 1430 - 8)。

【0131】

PEG修飾リボソームに加えて、研究者らは、種々の他の誘導体化された脂質を開発した。また、これらの誘導体化された脂質は、リボソームに組み込まれてもよい。例えば：国際特許出願WO93/01828; Park Y S, Maruyama K, Huang L. 「いくつかの負に荷電されたリン脂質誘導体は、インビボにおいてリボソーム循環を延長する (Some negatively charged phospholipids derivatives prolong the liposome circulation in vivo)」Biochimica et Biophysica Acta (1992) 1108: 257 - 260; Ahlら、Biochimica Biophys. Acta (1997) 1329: 370 - 382を参照。

10

【0132】

D. 標的化部分

所望の組織中でのリボソーム薬物蓄積を増大するために、より高くかつより選択的な治療活性を生じ、本出願のリボソームは、それらの表面に対して細胞特異的標的部分を結合して、特定の細胞または組織型とのそれらの会合を容易にすることによって修飾されることがある実施形態である。標的部分としては、例えば、モノクローナル抗体 (MAb) または、それらのフラグメント、ペプチド、成長因子、糖タンパク質、炭水化物もしくはレセプターリガンド、またはそれらの混合物が挙げられる。例示的な標的部分としては、限定するものではないが、トランスフェリン、葉酸、葉酸塩、ヒアルロン酸、糖鎖 (例えば、ガラクトース、マンノースなど)、モノクローナル抗体のフラグメント、アシアロ糖タンパク質など、ならびに当業者に公知の他の標的因子、およびそれらの混合物が挙げられる。特定の実施形態では、標的因子は、タンパク質、ペプチド、または細胞表面レセプターに向けられる他の分子 (例えば、トランスフェリン、葉酸塩、葉酸、アシアロ糖タンパク質など) である。

20

【0133】

標的因子を含む脂質組成物の例としては、米国特許第5,049,390号;同第5,780,052号;同第5,786,214号;同第6,316,024号;同第6,056,973号;同第6,245,427号;同第6,524,613号;同第6,749,863号;同第6,177,059号;および同第6,530,944号;米国特許出願公開第2004/0022842;2003/0224037;2003/143742;2003/0228285;2002/0198164;2003/02220284;2003/0165934;および2003/0027779;国際公開WO95/33841;WO95/19434;WO2001037807;WO96/33698;WO2001/49266;WO9940789;WO9925320;WO9104014;WO92/07959;欧州特許第1369132号;および特開2001002592号に開示される組成物;ならびにIinuma H,ら、Int J Cancer, 2002, 99: 130 - 137;Ishida O,ら、Pharmaceutical Research, 2001, 18: 1042 - 1048;Holmbergら、Biochem. Biophys. Res. Comm. 1989, 165 (3): 1272 - 1278;Namら、J. Biochem. Mol. Biol. 1998, 31 (1): 95 - 100;and Nagら、J. Drug Target. 1999, 6 (6): 427 - 438に開示される組成物が挙げられる。

30

40

【0134】

具体的には、Iinumaら、(同書)は、リボソームの表面に結合されたトランスフェリン (Tf) を有する、Tf-PEG-リボソームを開発し、これによってより多くのリボソームが腫瘍細胞の表面に結合され、PEGリボソームに比べてTf-PEG-リボソームについては腫瘍細胞によるリボソームの取り込みが大きかったことが示された (Iinumaら、同書;Ishidaら、同書)。

【0135】

50

特定の標的化部分およびそれらの治療標的の例は以下のとおりである：抗 - H E R 2 (トラスツズマブ) - 乳癌 / 卵巣癌；抗 - E G F - 固形腫瘍；抗 - C D 1 9 - リンパ腫；抗 - C D 2 2 - B - 細胞リンパ腫；抗 - 1 インテグリン - 癌細胞；抗 - G D 2 - 神経芽細胞腫；抗 - G A H - 胃癌、結腸癌および乳癌；葉酸 - 癌細胞；トランスフェリン - 癌細胞；アニサミド - 乳癌、黒色腫および脾臓癌；血管作動性腸管ペプチド 2 8 - マー - 乳癌細胞の画像化；R G D - 神経芽細胞腫、黒色腫および結腸癌；血管形成ホーミングペプチド - 黒色腫、肉腫および結腸癌。

#### 【 0 1 3 6 】

ある実施形態では、本出願のリボソーム組成物を、被験体に注入して、ベシクル含量の標的化送達を可能にするために関連の身体部分に熱を加える。これは体温で安定なりボソームに特に有用である。癌の温熱療法のような公知の方法は、本出願の組成物の標的送達の利点を受ける場合がある。

10

#### 【 0 1 3 7 】

ある実施形態では、本出願のリボソームは、表面修飾の親水性ペプチドおよび標的化部分を含む。別の実施形態では、これらのリボソームは、P E G 鎖の末端でマレイミド基を含んでいる適切な脂質の P E G 誘導体をリボソーム処方物中に混合することによって調製される。リボソーム調製後、求核性の N、O、および / または S 原子を含んでいる標的化部分は例えば、表面結合を介して、上述の P E G - リボソームのマレイミド基に結合されて、安定な結合が得られる。あるいは、商業上、事前にロードされた長循環性のリボソームは、標的化部分の事後挿入によって修飾される。

20

#### 【 0 1 3 8 】

##### E . 他の構成要素

本出願のさらなる実施形態では、本出願のリボソーム組成物およびリボソームはさらに、特定の適用について所望される他の添加物または薬剤を含む。このような添加物または剤としては限定するものではないが、保湿剤、溶媒、抗生物質、色素、芳香剤、香料などが挙げられる。一実施形態では、この組成物は、抗酸化剤を含む。ある実施形態では、本出願における使用のための抗酸化剤としては、ブチル化ヒドロキシトルエン、ブチル化ヒドロキシアニソール、リノール酸アスコルビル、ジパルミチン酸アスコルビル、マレイン酸アスコルビルトコフェロール、アスコルビン酸カルシウム、カロテノイド、コウジ酸およびその薬学的に許容される塩、チオグリコール酸およびその薬学的に許容される塩（例えば、アンモニウム）、トコフェロール、酢酸トコフェロール、トコフェレス ( t o c o p h e r e t h ) - 5、トコフェレス - 1 2、トコフェレス - 1 8、もしくはトコフェレス - 8 0、またはそれらの混合物が挙げられる。

30

#### 【 0 1 3 9 】

##### I I I . 調製の方法

本出願のリボソームは、リボソームの調製のための任意の方法、例えば、薄膜方法、超音波、押し出し成形、高圧 / ホモジナイゼーション、マイクロフルイダイゼーション、界面活性剤透析、エタノール注入法、交差流技術を含むエタノール注入法、小リボソームベシクルのカルシウム誘導性融合およびエーテル注入法を用いて調製してもよい。このような方法は、当該分野で周知である（例えば、「L i p o s o m e T e c h n o l o g y」, G . G r e d o r i a d i s ( 編集 ) , 1 9 9 1 , C R C P r e s s : B o c a R a t o n , F l a . ; D . D e a m e r および A . D . B a n g h a m , B i o c h i m . B i o p h y s . A c t a , 1 9 7 6 , 4 4 3 : 6 2 9 - 6 3 4 ; F r a l e y ら , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 1 9 7 9 , 7 6 : 3 3 4 8 - 3 3 5 2 ; F . S z o k a ら , A n n . R e v . B i o p h y s . B i o e n g . , 1 9 8 0 , 9 : 4 6 7 - 5 0 8 ; H o p e ら , B i o c h i m . B i o p h y s . A c t a , 1 9 8 5 , 8 1 2 : 5 5 - 6 5 ; L . D . M a y e r ら , B i o c h i m . B i o p h y s . A c t a , 1 9 8 6 , 8 5 8 : 1 6 1 - 1 6 8 ; H o p e ら , C h e m . P h y s . L i p . , 1 9 8 6 , 4 0 : 8 9 - 1 - 7 ; K . J . W i l l i a m s ら , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . , 1 9 8 8 , 8 5 : 2 4 2 - 2 4 6 ; W a g n e r および V o r a u

40

50

er - Uhl , Journal of Drug Delivery , 2011 , pp . 1 - 9 ; Wagnerら , Journal of Liposome Research , 2002 , 12 ( 3 ) : 259 - 270 ; Wagnerら , European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics , 2002 , 54 : 213 - 219、ならびに米国特許第 , 4 , 217 , 344号 ; 同第4 , 235 , 871号 ; 同第4 , 241 , 046号 ; 同第4 , 356 , 167号 ; 同第4 , 485 , 054号 ; 同第4 , 551 , 288号 ; 同第4 , 663 , 161号 ; 同第4 , 737 , 323号 ; 同第4 , 752 , 425号 ; 同第4 , 774 , 085号 ; 同第4 , 781 , 871号 ; 同第4 , 877 , 561号 ; 同第4 , 927 , 637号 ; 同第4 , 946 , 787号 ; 同第5 , 190 , 822号 ; 同第5 , 206 , 027号 ; 同第5 , 498 , 420号 ; 同第5 , 556 , 580号および同第5 , 700 , 482号を参照のこと。

10

#### 【0140】

一実施形態では、リボソームは、伝統的な薄膜法を用いて調製される。この方法では、この二重層形成構成要素を、揮発性の有機溶媒または溶媒混合物（例えば、クロロホルム、エーテル、メタノール、エタノール、ブタノール、シクロヘキサンなど）と混合する。次いで、溶媒をエバポレートして（例えば、ロータリーエバポレーター、乾燥室素もしくはアルゴンの蒸気、または他の手段を用いて）、乾燥した脂質フィルムを形成する。次いで、このフィルムを、亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物を含有している水性媒体で水和する。用いられる水和工程は、形成されるリボソームの種類に影響する（例えば、二重層の数、ベシクルの大きさおよび捕捉容積）。この水和された脂質薄膜は、攪拌の間に剥離して、自分で閉じて、異なる大きさの、大型の多重層のベシクル（multilamellar vesicle）（MLV）を形成する。得られた多重層ベシクルのサイズ分布は、より活発な攪拌条件下で脂質を水和することによって、またはデオキシコレートのような可溶化活性剤を添加することによって、さらに小さい大きさに向かって偏向され得る。あるいは、またはさらに、ベシクルのサイズは、超音波、凍結／融解または押出成形によって小さくされてもよい（下を参照のこと）。

20

#### 【0141】

大型の単層ベシクル（Large Unilamellar vesicle）（LUV）は、任意の種々の方法を用いてMLVから調製できる。例えば、フィルターを通じたMLVの押し出しが、LUV（そのサイズは、用いられるフィルター細孔サイズに依存する）を提供し得る。このような方法では（例えば、米国特許第5 , 008 , 050号に記載）、MLVリボソーム懸濁物は、押出デバイスを繰り返し通過されて、均一なサイズ分布のLUVの集団が生じる。環境温度を超える液晶転移温度へゲルを有する脂質を使用する場合、加熱されたパレル（またはサーモジャケット）を有する押し出し機を使用してもよい。LUVは、Mayerら、（Biochim. Biophys. Acta , 1985 , 817 : 193 - 196）に記載されるような押出手順の前に少なくとも1回の凍結解凍サイクルに曝してもよい。

30

#### 【0142】

単層ベシクルの調製のための他の方法は、リボソームの水性分散に対する剪断力の適用に依拠する。このような方法は、超音波およびホモジナイゼーションを含む。浴またはプローブ超音波処理のいずれかを用いるリボソーム懸濁物の超音波処理は、大きさが50 mm未満の小さい単層ベシクルへの累進的なサイズの減少をもたらす。リボソームベシクルの大きさは、準弾性光散乱（QEL）（V. A. Bloomfield , Ann. Rev. Biophys. Bioeng. , 1981 , 10 : 421 - 450）によって決定され得る。典型的なホモジナイゼーション手順では、多重層ベシクルは、選択されたりリボソームの大きさ、典型的には約100 ~ 500 nmが観察されるまで、3 , 000 ~ 14 , 000 psi、好ましくは10 , 000 ~ 14 , 000 psiの圧力で、かつ最高Tcを有する脂質のゲル - 液晶転移温度に相当する温度で、標準的なエマルジョンホモジナイザーを通じて繰り返し循環される。

40

50

## 【0143】

LUVを調製するための他の技術としては、逆相エバポレーション（米国特許第4,235,871号）および封入手順、および界面活性剤希釈が挙げられる。例えば、単層ベシクルは、クロロホルムまたはエタノール中に脂質を溶解すること、次いで、脂質を緩衝液に注入し、この脂質を自然に凝集させて、単層ベシクルを形成することによって生成され得る。あるいは、リン脂質は、界面活性剤（例えば、コール酸塩、Triton-X、またはn-アルキルグルコシド）中へ溶解され得る。溶解された脂質-界面活性剤ミセルの形成後、界面活性剤を、透析、ゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィー、遠心分離、限外濾過、または任意の他の適切な方法によって除去する。

## 【0144】

一実施形態では、本出願は、少なくとも1つの脂質二重層内に捕捉された亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物を含むリボソームであって、ここで脂質二重層が、1つ以上の適切な脂質から構成されているリボソームを調製する方法を包含し、この方法は：

（a）内側表面の少なくとも一部の上に1つ以上の脂質のフィルムを有する容器へ亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物の水溶液を添加することと；

（b）この内面からフィルムを全体的にまたは部分的に除去するために十分な条件下でこの容器を撈拌して、亜塩素酸塩-捕捉、および/または塩素酸塩-捕捉のリボソームを含んでいる混濁溶液を得ることと；

（c）この混濁溶液を処理して、リボソームの平均直径を所望の値、例えば、約50nmおよび約300nmまで下げることと；

（d）必要に応じてこのリボソームを処理して、このリボソームに対して外側の溶液から亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物を除去することと；

## 【0145】

別の実施形態では、本出願のリボソームは、例えば、WagnerおよびVoraue r-Uhl, Journal of Drug Delivery, 2011, pp. 1-9（その関連部分は、参照によって本明細書に援用される）に記載のように、エタノール注入方法を用いて調製される。さらなる実施形態では、リボソームは、例えば、Wagnerら, Journal of Liposome Research, 2002, 12（3）：259～270（その関連部分は、参照によって本明細書に援用される）に記載のように、直交流技術によるエタノール注入方法を用いて調製される。

## 【0146】

ある実施形態では、（a）における亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物に対する1つ以上の適切な脂質のモル比は、約0.01：1～約10000：1、約0.1：1～約5000：1、約0.5：1～約2500：1、約1：1～約1000：1、または約0.1：1～約100：1である。

## 【0147】

本出願のリボソームの調製のために用いられる脂質は、溶液として、特にAvanti Lipidsから購入してもよい。LIPOID AGは、固体状態で未希釈の脂質を送達する。特定の実施形態では、溶液の濃度は、溶液の1ミリリットルあたり約10mg～約100mgの脂質である。リボソームの調製のために用いられるこの溶液の量は、必要な脂質の量次第で変化し、必要な脂質の量は、所望のサンプル容積に依存する。純粋な、未希釈の脂質が用いられなければならない、それらは、適切な容積のクロロホルムまたは別の適切な有機溶媒に溶解される。

## 【0148】

内面の少なくとも一部の上に1つ以上の脂質のフィルムを有する容器を得るために、ある実施形態では、この容器を、撈拌しながら、減圧下で、かつ1つ以上の脂質の全ての相転移温度（PPT）付近またはそれを超える温度で処理して、溶媒を除去する。エバポレーション工程でPPTを超えたままである必要はないことに注意のこと。クロロホルム溶液については、DPPCのPPT（41）および水素添加大豆リン脂質のPPT（50

10

20

30

40

50



）よりも下である 37 の水浴を適用してもよい。ある実施形態では、溶媒は、1つ以上の脂質の全ての脂質相転移温度を超える温度で維持されている容器でのロータリーエバポレーターを用いて除去される。

#### 【0149】

水溶液をこの容器に添加して、この容器を、容器の内面からフィルムを除去するのに十分な条件下で攪拌して、混濁溶液/分散物（リボソームを含んでいる）を得る。ある実施形態では、フィルムを除去するために十分な条件は、容器を振盪すること、および容器を1つ以上の脂質の全ての脂質相転移温度を超える温度まで加熱することを包含する。別の実施形態では、この条件はさらに、1つ以上の脂質の全ての脂質相転移温度を超える温度で、約1分～約2時間、または約5分～約1時間振盪することを包含する。この工程では、1つ以上の脂質の再水和は、リボソームの形成と、亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物溶液の捕捉とともに生じる。これらの、いわゆる、一次リボソームは、大型の多重層ベシクル（LMV）であって、リボソームの内側（内側相）および外側（外側相）の両方に溶液がある。この段階では、このサンプルは、濁った、乳白色の溶液/分散液である。

10

#### 【0150】

約50nm～約300nmまでリボソームの平均直径を低下するように混濁溶液を処置することは、リボソームのサイズを低下するための任意の公知の手段を用いて行うことができる。本出願のある実施形態では、凍結解凍サイクルの組み合わせおよび押出方法を用いる。別の実施形態では、押出方法のみを用いる。

20

#### 【0151】

凍結解凍サイクルに関しては、ある実施形態では、このサンプルは、適切な容器（必要な場合）、例えば、冷凍管、および液体窒素に浸漬された容器に移され、引き続き、1つ以上の脂質の全ての脂質相転移温度を超える水浴中で解凍される。ある実施形態では、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、または10サイクルが行われる。理論で束縛されることは望まないが、凍結は、一次リボソームの破壊を生じ、および1つ以上の脂質の全ての脂質相転移温度を超える解凍は、より小さい平均直径を有するリボソームの自然な再形成を生じる。しかし、凍結解凍方法は、任意である。

#### 【0152】

本出願のある実施形態では、押し出し方法は、少なくとも1つの約50nm～約200nmのフィルターディスクを通してリボソームサンプルを絞り出すことによって行われる。ある実施形態では、絞り出しは、適切なフィルターを備えている押し出し機に圧力を加えることによって行われる。さらなる実施形態では、押し出しは、1つ以上の脂質の全ての脂質相転移温度を超える温度で行い、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、または10回繰り返す。

30

#### 【0153】

ある実施形態では、押し出し方法の使用は、約50nm～約150nmまたは約100nmの平均直径を有する単層リボソームを提供するに過ぎない。別の実施形態では、超音波処理方法を用いて、粒子サイズを低下させるか、またはMLVをLUV/SUVに変換してもよい。

40

#### 【0154】

別の実施形態では、本出願の方法は、例えば、MALDI-TOFによってモニターした場合、分解生成物を実質的に含まないリボソーム組成物を提供する。さらなる実施形態では、本出願の方法は、FDAまたは他の規制機関によって承認されたガイドラインを満たす分解生成物レベルを含むリボソーム組成物を提供する。

#### 【0155】

この段階では、このサンプルは、亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物溶液中に分散されたイオン充填リボソームを含む。ある実施形態では、この溶液を含んでいる外部相は、例えば、生理食塩水と、任意の透析処置を用いて置き換えられる。ある実施形態では、このサンプルを、透析チャンバに充填して、1つ以上の脂質の全てのPPTより下の

50

温度で生理食塩水溶液中に入れる。1時間後、攪拌しながら、過剰の媒体を交換して、その手順を少なくとも1、2、3または4回繰り返す。ある実施形態では、この手順を、亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物の濃度が、o-トリジン方法の検出限界未満になるまで繰り返す。亜塩素酸塩/塩素酸塩分析の方法は、亜塩素酸塩および塩素酸塩（それぞれ、 $\text{ClO}_2^-$  および  $\text{ClO}_3^-$ ）が、強力な塩酸溶液中でオルト-トリジン（o-トリジン）と反応して、その溶液中に存在する  $\text{ClO}_2^-$  および  $\text{ClO}_3^-$  の量に大きく依存した色の変化を生じるという事実に基づく。この方法は、別々に両方の種を検出するための2段階のアプローチを提供する。しかし、WF10中の塩素酸塩に対する亜塩素酸塩の一定比に起因して、1つの工程のみを用いる必要がある（両方の構成要素が色の変化に寄与した）。o-トリジン法を行うための方法は、実施例7に記載される。

10

#### 【0156】

本出願のある実施形態では、亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物を含んでいるリポソーム、およびこれらのリポソームを含んでいる組成物は、約10、9、8、7、または6より下、適切には約6未満の温度で保管される。

#### 【0157】

さらなる実施形態では、リポソーム組成物は、滅菌されてもよい。適切な滅菌技術の非限定的な例としては、ろ過、オートクレーブ、線照射および凍結乾燥（フリーズドライ）が挙げられる。一実施形態では、滅菌は、220nmのフィルターを用いてろ過によって行われる。

20

#### 【0158】

#### IV. 治療適用

亜塩素酸塩および塩素酸塩は、強力な酸化剤であることが周知である。これらの物質の酸化力は、pH低下につれて増大する傾向である。従って、医学用途のための市販の安定化された亜塩素酸塩処方物、例えば、WF10およびOxoferin（慢性の創傷の処置）は、一般に、高いpHの水溶液として提供され、この水溶液は、亜塩素酸塩と反応するか、または高いpH環境のせいで分解する（例えば、エステル基の加水分解に起因する）かのいずれかであり得る有機物質をほとんど、または全く含まない。この戦略は、この製品が商業上許容できる保存期間を有することを確実にするために使用され得るが、製品の副作用に関して不利であり、開発できる製品の種類を制限する場合がある。

30

#### 【0159】

例えば、WF10のような、極めて塩基性の溶液を、静脈内注入によって投与することは、その注入が緩徐に行われる限り、そしてWF10が約250~500mLの生理食塩水を用いて希釈された後にのみ、静脈炎（静脈の炎症）を生じる場合がある。このため、WF10注入は、典型的には、1.5時間などの期間にまたがって投与される場合があり、その結果、患者は、不自由でかつ医療資源の利用が大きくなる。同様に、Oxoferinは、創傷の処置について数か国で承認されており、驚くべきことに、そのpHが高いことを想定すれば、最も頻繁に観察される有害反応の1つは疼痛である（Hinz J, Hautzinger H, Stahl KW. Rationale for and results from a randomised, double-blind trial of tetrachlorodecaoxygen anion complex in wound healing. Lancet. 1986 Apr 12; 1(8485): 825-8）。また、これによって、WF10およびOxoferinの高い塩基性の性質によって、肺送達方式で標的される肺胞の繊細な上皮などに対する投与の他の部位についてWF10およびOxoferinは不適切になることも予測され得る。

40

#### 【0160】

また、亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物と多くの有機物質とを同時に製剤化することが難しいことで、望ましくない限界が生じ得るということも、薬剤の剤形開発の当業者には理解される。例えば、いくつかの被覆材料は、Oxoferinで含浸された場合、長期の安定性を示さず、オキシフェリンを事前ロードされている、個々にパウチに

50

された創傷治癒被覆などの製品を開発することが困難になる。また、これは、2つ以上の活性な薬物成分を含んでいる薬剤を開発するためには一般的な慣習であり、多くの行動は、亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物を含む溶液と混合された場合、商業上許容できる安定性を示さないことが予想される。

#### 【0161】

WF10は、その治療効果を、マクロファージに対する作用によって発揮すると考えられる(McGrath, Kodolja, V. Balanced macrophage activation hypothesis: a biological model for development of drugs targeted at macrophage functional states. Pathobiology, 67, 277-281 (1999))。WF10のさらなる態様は、毒性の副作用が生じ得る限界にかなり近い用量で投与される場合が多いものである。例えば、進行したAIDSの患者に対するWF10のトライアルでは、0.1mL/kg~1.5mL/kgの範囲の用量を用いた以前の用量設定トライアルでは、0.5mL/kgを超えて投与された患者で、静脈炎、メトヘモグロビン値増大、赤血球(RBC)のグルタチオンレダクターゼ値の低下が示され、従って、0.5mL/kgが、最大耐容用量とみなされたため、0.5mL/kgというWF10用量を使用した(Raffanti, S.P., Schaffner, W., Federspiel, C.F., Blackwell, R.B., Ah Ching, O., Kuhne, F.W. Randomized, double blind, placebo-controlled trial of the immune modulator WF10 in patients with advanced AIDS. Infection, Vol. 26, 4, 201-206 (1998)を参照のこと)。

#### 【0162】

また、OXO-K993(WF10の形態)の効果を、進行した頸部癌を有する患者に対する放射線療法によって生じる合併症の治癒および予防に対しても研究した(Rattka, P., Hinz, J. Influence of TCDO on the results of radiotherapy in advanced colloid carcinoma stage IIIB. Abstract: Int. Symp. on Tissue Repair, Pattaya, Thailand, Dec. 6-8 (1990): Highlights - International Symposium on Tissue Repair, 30-31 (1990)を参照のこと)。この研究では、WF10を、処置アームにおいて患者に対する照射の1.5時間前に投与して、この文献の著者は、照射前に行ったWF10処置が照射の間の腫瘍組織に対する生物学的効果を有意に増大するという印象を示した。このような処置に関しては、腫瘍組織に対して安定化された亜塩素酸塩処方物を標的する手段を有することが望ましいが、不幸にも、これは、静脈内に投与されたWF10のような安定化された亜塩素酸塩の溶液処方物では困難である。

#### 【0163】

亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物を処方物中のリポソームにカプセル化する能力(ここで外部相は実質的にこれらの薬剤を含まない)は、多数の利点を有する。例えば、リポソームを含んでいる組成物の外部相は、亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物、例としては、例えば、特定の活性な薬学的成分および賦形剤と適合しない有機物質などの物質も含んでよい。また、リポソーム処方物は固体マトリックス(そうでなければ、創傷への適用のための被覆物質などのような、これらの剤と容易に適合しない)中に分散されてもよい。同様に、適切な中性のpHの亜塩素酸塩なし、または塩素酸塩なしの外部相を創出する能力は、高いpH溶液が身体に静脈内にまたは局所に投与され、亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物が肺経路などの新しい投与方式で送達されることを可能にする時に観察された、静脈炎および疼痛のような副作用の出現を減少するために有利に利用され得る。

## 【0164】

リポソーム構造は、亜塩素酸塩または塩素酸塩ベースの薬物の作用部位であると考えられる、マクロファージによって循環から優先的に除去されるように設計され得ることも理解される。例えば、リポソームは、所定の処置効果を達成するために必要な亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物の用量を低下し得、薬剤の安全性の限界を改善し得る。あるいは、このリポソームは、許容できない毒性を誘発することなく、亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物の薬理学的な影響を増大するために用いられ得る。

## 【0165】

あるいは、リポソームは、マクロファージ以外の標的へ送達されるように設計され得る。例えば、化学療法薬物 Doxil (ドキシソルビシン HCl リポソーム注射物、Centocor Ortho Biotech Products LP) などのような技術を使用して、患者の身体の腫瘍を標的してもよい。このような標的化は、放射線療法の前の感作物質として、亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物を用いることが所望される場合、有益に使用され得る。

10

## 【0166】

従って、本出願はさらに、これらを含んでいる本明細書に記載のリポソームおよび組成物の全ての使用、ならびにこれらを含む方法を包含する。特定の実施形態では、本出願のリポソームまたは組成物の医薬としての使用が包含される。

## 【0167】

活性剤の利点は、リポソームへの組み込みによって改善され得る。リポソーム組成物の改善の特徴としては、例えば、亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物の薬物動態の変更、体内分布および/または保護が挙げられる。徐放性処方物を提供することによって、この薬剤の投与の頻度を低減すること、またはより急速な注入速度を得ることも可能である。肺のマクロファージへまたは炎症性組織への亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物の標的化送達は、本出願のリポソーム組成物でも可能である。標的部位への送達を標的することによって、例えば、約1～約1000の係数まで投薬を減少することが可能である。また利点としては、高いpHの亜塩素酸塩溶液が身体に静脈内にまたは局所に投与され、薬剤が肺経路またはボラス注射(例えば、短期間に、例えば、30分未満、15分未満、5分未満でI.V.で送達される組成物)などの新しい投与方式で送達されることを可能にする時に(典型的には低い用量の容積を要する)観察された、静脈炎および疼痛のような副作用の出現を減少することを挙げることができる。

20

30

## 【0168】

本出願のリポソームの1つの特定の利点は、脂質膜の組成を変えることによってカプセル化された薬剤の放出のタイミングを調節する能力である。従って、カプセル化された薬剤(単数または複数)の放出のタイミングは、所望の温度放出プロフィールを有する脂質の組み合わせを選択することによって制御され得る。例えば、創傷治癒の適用では、脂質は放出温度が皮膚温度かその付近になるように、そして、皮膚へのリポソームの投与が、組成物が皮膚温度に達した際(この時点でこの剤バルクが放出される)の最小の放出または徐々の放出を生じるように選択され得る。

## 【0169】

従って、本出願はさらに、亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物の投与が有益である、疾患、障害または状態を処置するための方法であって、その必要な被験体に対して有効量の本出願の組成物を投与することを包含する方法を包含する。

40

## 【0170】

本出願はさらに、亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物の投与が有益である、疾患、障害または状態を処置するための本出願の組成物の使用、および亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物の投与が有益である、疾患、障害または状態を処置するための使用のための本出願の組成物を包含する。

## 【0171】

一実施形態では、本出願は、マクロファージの機能を調節するための方法であって、そ

50

の必要な被験体に対して本出願の組成物の有効量を投与することを包含する方法を包含する。本出願はさらに、マクロファージの機能を調節するための本出願の組成物の使用およびマクロファージの機能を調節するための使用のための本出願の組成物を包含する。

#### 【0172】

理論で束縛されることはないが、マクロファージ機能の調整は、不適切な免疫応答の結果として慢性炎症の症状を生じる疾患の処置と関連していた（例えば、米国特許出願公開第2011/0076344を参照のこと）。従って、ある実施形態では、亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物の投与が有益である、疾患、障害または状態は、抗原特異的免疫応答、例としては、例えば、自己免疫疾患、不適切な免疫応答によって生じる疾患、例えば、重傷筋無力症、全身エリテマトーデス、血清病、糖尿病、慢性関節リウマチ、若年性慢性関節リウマチ、リウマチ熱、シェーグレン症候群、全身性硬化症、脊椎関節症、ライム病、サルコイドーシス、自己免疫溶血、自己免疫肝炎、自己免疫好中球減少、自己免疫性多腺病、自己免疫性甲状腺疾患、多発性硬化症、炎症性腸疾患、大腸炎、クローン病、慢性疲労症候群、などから誘導されるものから選択される。また、慢性閉塞性肺疾患（COPD）は、少なくとも数例の患者では、いくつかの自己免疫病因論を有し得る。自己免疫応答では、患者の身体は、多すぎる細胞傷害性Tリンパ球（CTL）または他のサイトカインを生じ、これが次に身体の健康な細胞と敵対して、それらを破壊する。移植または移植片の患者では、免疫系が移植された臓器または移植片の抗原を外来と認識し、それらを破壊するので、不適切な免疫応答が生じる。これによって、移植片拒絶が生じる。同様に、移植および移植片患者は、宿主対移植片応答を生じ得、ここでは移植された臓器または移植片の免疫系は宿主の抗原を外来と認識して、それらを破壊する。この結果として、宿主対移植片病が生じる。他の不適切な免疫応答がアレルギー喘息、アレルギー性鼻炎、およびアトピー性皮膚炎で観察される。さらに、慢性の炎症の症状を生じる疾患はまた、過剰なマクロファージ活性化によって特徴づけられる不適切な免疫応答を生じる。例えば、組織損傷に対する健康な応答、身体的創傷、細菌またはウイルスのような病原性の生物体による浸潤は、マクロファージの活性化（「従来の」炎症促進経路を介する）に関与し、炎症性の応答をもたらす。しかし、この応答は、不適切な方式では「オーバーシュート」である場合があり、炎症促進性の免疫応答が抑制できない場合、慢性の炎症を生じる。疾患、例えば、B型肝炎、およびC型肝炎、慢性肝炎、ならびにCOPDの顕在化、例えば、閉塞性気管支炎、および肺気腫（非特異的な気管支炎および肺の刺激物に対する長期暴露によって明らかに生じる）は、過剰なマクロファージ活性化によって誘導される慢性炎症（肝炎の肝臓の、およびCOPDの肺組織の）によって特徴づけられる。

#### 【0173】

亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物の投与が有益である、他の疾患、障害または状態は、腫瘍性障害（癌）、HIV感染症、AIDS、神経変性疾患、AIDS関連の痴呆、発作、脊髄病理学、微生物感染症、および他のウイルス感染から選択される。

#### 【0174】

神経変性疾患の例としては、例えば、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、アルツハイマー病（AD）、パーキンソン病（PD）、および多発性硬化症（MS）が挙げられる。この癌は、限定するものではないが、副腎皮質性癌、肛門癌、無形成性貧血、胆管癌、膀胱癌、骨癌、骨転移、中枢神経系（CNS）癌、末梢神経系（PNS）癌、乳癌、キャスルマン病、子宮頸癌、幼児期非ホジキンリンパ腫、結腸および直腸癌、子宮内膜癌、食道癌、ユーイングファミリーの腫瘍（例えば、ユーイングの肉腫）、眼癌、胆嚢癌、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍、妊娠性絨毛性疾患、ヘアリー細胞白血病、ホジキン病、カボジ肉腫、腎臓癌、喉頭癌および下咽頭癌、急性リンパ性白血病、急性脊髄性白血病、小児白血病、慢性リンパ性白血病、慢性脊髄性白血病、肝癌、肺癌、肺カルチノイド腫瘍、非ホジキンリンパ腫、男性の乳癌、悪性中皮腫、多発性骨髄腫、脊髄形成異常症候群、脊髄増殖性障害、鼻腔および副鼻腔の癌、鼻咽頭癌、神経芽細胞腫、口腔および口咽頭の癌、骨肉腫、卵巣癌、膀胱癌、陰茎癌、下垂体性腫瘍、前立腺癌、網膜芽腫、横紋筋肉腫、唾液腺癌、肉腫（成人軟部組織癌）、黒色腫皮膚癌、非黒色腫皮膚癌、胃癌、精巣癌、

胸腺癌、甲状腺癌、子宮癌（例えば、子宮肉腫）、膣の癌、陰門癌およびワルデンストレームのマクログロブリン血症であり得る。

【0175】

ある実施形態では、亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物の投与が有益である、疾患、障害または状態は、アレルギー性喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、新生物性の障害、HIV感染症、およびAIDSから選択される。ある実施形態では、この新生物の障害または癌は、消化管、頭部、頸部、乳房または膵臓の癌である。

【0176】

亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物の投与が有益である、他の治療適用としては、放射線症候群に罹患しているか、または環境有害物質に対する暴露を受けている患者の処置が挙げられる。放射線症候群としては、急性の放射線症候群、あるいは放射線療法、または、例えば、戦争もしくはテロリストの攻撃で用いられる核兵器によって生じる放射線暴露の遅延効果が挙げられる。創傷治癒のための治療適用、例としては、圧力、術後または外傷後の創傷治癒、または慢性創傷治癒、糖尿病性潰瘍、静脈潰瘍、動脈潰瘍または褥瘡性潰瘍の治癒などにおける慢性創傷治癒も考慮される。

10

【0177】

本出願の組成物、およびその処方物は、任意の適切な経路、例えば、静脈内投与、動脈内投与、筋肉内投与、腹腔内投与、皮下投与、皮内投与、関節内投与、くも膜下腔内投与、脳室内投与、直腸投与、眼内投与、経鼻スプレーとして、肺吸入を介して、および経口投与、ならびに当業者に公知の他の適切な投与経路を用いて被験体に投与されてもよい。本出願の方法および使用を用いて処置できる組織としては、限定するものではないが、鼻、肺、肝臓、骨、膵臓、生殖器、軟部組織、筋肉、副腎組織および乳房が挙げられる。処置できる組織としては、癌組織、処置がなければ疾病状態または損なわれた組織、ならびに必要に応じて健全な組織の両方が挙げられる。

20

【0178】

もっと確実にするために、「本出願の組成物（単数または複数）」とは、調製されたままであるか、または追加の担体および／もしくは他の成分と組み合わせられた、本明細書に記載のリポソーム組成物を指す。

【0179】

本出願の組成物およびその処方物は、単独で、または他の処置方式（例えば、補助的な癌治療、複合撮画処置）と組み合わせて（例えば、前に、同時に、または後に）用いられる。例えば、他の治療剤（例えば、本明細書に記載のおよび当業者に公知の癌の化学療法剤（例えば、アルキル化剤、代謝拮抗剤、タキサン類、代謝拮抗物質、抗腫瘍抗生物質、植物アルカロイド、ホルモン療法薬物、分子標的薬物など）、手術および／または放射線療法と組み合わせて。処置されている状態が癌である場合、本明細書に記載の組成物およびその処方物は、本明細書に記載のようなおよび当該分野で公知のような、1つ以上の他の抗癌剤または細胞毒性化合物、有害反応の出現および／もしくは重篤度、ならびに／またはその臨床的な出現を減らす1つ以上の追加の薬剤、手術（例えば、腫瘍またはリンパ節を除去する）、あるいは放射線照射と組み合わせて投与されてもよい。1つ以上の手術または放射線は、処置計画の一部である場合、組成物またはその処方物は、放射線療法または手術の前に、同時に、または後に投与されてもよい。同様に、この組成物および処方物は、本明細書に記載のように、1つ以上の抗癌剤の投与の前に、同時に、または後に投与されてもよい。本明細書に記載の組成物およびその処方物はまた、状態または処置計画と関連する症状を緩和するための薬物（例えば、嘔吐、毛髪の喪失、免疫抑制、下痢、発赤、感覚障害、貧血、疲労、口内炎、手足症候群などを軽減する薬物）と組み合わせて（例えば、前に、同時に、または後に）投与されてもよい。この組成物は、2段階以上の（例としては、全体にわたる）処置計画で投与されてもよい（例えば、手術後、および放射線療法と組み合わせて、その後など）。一実施形態では、本出願のこの組成物またはその処方物は、5-フルオロウラシルおよびそのプロドラッグ、例えば、カペシタピンのうちの一方または両方と組み合わせて投与される。

30

40

50

## 【0180】

本出願のさらなる実施形態では、この組成物およびその処方物を、アレルギー性喘息、またはアレルギー性鼻炎、または他の肺もしくは呼吸器の疾患、障害または状態を処置するために用いる場合、それらは正常には、静脈内経路によって、または経粘膜的に、さらに具体的には、経鼻的に、眼に、または肺に投与される。例えば、本出願の組成物は、経鼻スプレー、経鼻点滴剤および/または点眼剤によって投与される。本出願の組成物を、微細ミストとして、肺へ噴霧によって、任意の電気式または空気式のネブライザーを用いて、投与することも可能である。経鼻投与のためには、水性リボソーム組成物のスプレーを生成するために適切な任意の最先端デバイスを用いてもよい。本出願の組成物および処方物は、単独で、またはアレルギー性喘息もしくはアレルギー性鼻炎のための他の処置様式と組み合わせて（例えば、前に、同時に、または後に）用いられる。例えば、当業者に公知の他の治療剤（例えば、ステロイドおよび抗ヒスタミン剤）と組み合わせて。また、本出願の組成物は、使用前に、例えば、適切な希釈液（例えば、生理食塩水）を用いて、静脈注入による投与の前に、緩衝化または希釈されてもよい。

10

## 【0181】

本出願のさらなる実施形態では、この組成物およびその処方物を、アトピー性皮膚炎、または他の皮膚の疾患、障害または状態を処置するために用いる場合、それらは正常には、局所的にまたは経皮的に、例えば、ローション、塗布薬、ゼリー、軟膏（*ointment*）、クリーム、ペースト、ゲル、ヒドロゲル、エアロゾル、スプレー、粉末、顆粒（*granules*、*granulates*）、トローチ剤（*lozenge*）、坐剤、軟膏（*salve*）、チューイングガム、トローチ（*pastille*）、小袋（*sachet*）、口腔洗浄液、錠剤、デンタルフロス、絆創膏、包帯、シート、泡状物、フィルム、スポンジ、被覆材、ドレンチ（*drenche*）、生体吸着性パッチ、スティックなどの形態で投与される。本出願の組成物およびその処方物は、単独で用いられるか、または、アトピー性皮膚炎の他の処置方式と組み合わせて（例えば、前、同時、または後に）用いられる。例えば、当業者に公知の他の治療剤と組み合わせて。

20

## 【0182】

## V. 処方物および投薬

以前に注記されたように、本出願の組成物および薬学的処方物は、本明細書に記載の使用の方法と組み合わせて、本明細書に記載のような状態を処置するために、その必要な被験体に投与される。

30

## 【0183】

リボソーム組成物を、そのまま、または薬学的な組成物もしくは処方物として投与してもよい。従って、また、本出願は、少なくとも1つの薬学的に許容される担体または賦形剤と混合された亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物を、カプセル化されたりリボソームを含んでいる薬学的組成物に包含する。一実施形態では、この薬学的組成物は、徐放性の亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物を提供し、これによって、徐放性の処方物を含む。

## 【0184】

上記で注記されるとおり、リボソーム組成物または薬学的組成物またはそれらの処方物は、任意の適切な経路、例えば、静脈内投与、動脈内投与、筋肉内投与、腹腔内投与、皮下投与、皮内投与、経皮投与、経皮投与、関節内投与、くも膜下腔内投与、脳室内投与、経鼻スプレーとして、肺吸入を介して、および経口投与、ならびに当業者に公知の他の適切な投与経路を用いて被験体に投与され、適宜処方される。

40

## 【0185】

投与の方式次第で、薬学的組成物は、液体、固体または半固体の投薬調製物の形態であってもよい。例えば、組成物は、溶液、分散物、懸濁物、エマルジョン、混合物、ローション、塗布薬、ゼリー、軟膏（*ointment*）、クリーム、ペースト（歯磨きペーストを含む）、ゲル、ヒドロゲル、エアロゾル、スプレー（口腔スプレーを含む）、粉末（歯磨き粉を含む）、顆粒（*granules*、*granulates*）、トローチ剤（*l*

50

ozenge)、軟膏(salve)、チューイングガム、トローチ(pastille)、小袋(sachet)、口腔洗浄液、錠剤、デンタルフロス、絆創膏、包帯、シート、泡状物、フィルム、スポンジ、被覆材、ドレンチ(drenche)、生体吸着性パッチ、スティック、錠剤、パッカル錠、トローチ(troch)、カプセル、エリキシル、懸濁物、シロップ、ウェーハ、放出調節錠剤などとして処方されてもよい。

#### 【0186】

本出願の薬学的組成物は、一般的な薬務に従って処方してもよい(例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences(2000 - 第20版)および米国薬局方(The United States Pharmacopeia): 国民医薬品集(The National Formulary)(USP 34 NF 19)を参照のこと)。

10

#### 【0187】

本出願の薬学的組成物での使用のための生理学的に許容される担体または賦形剤は、当業者によって用いられる特定の用途のための慣用的に選択され得る。これらとしては限定するものではないが、溶媒、緩衝化剤、不活性な希釈液または充填剤、懸濁剤、分散剤または湿潤剤、防腐剤、安定化剤、キレート剤、乳化剤、消泡剤、ゲル形成剤、軟膏基剤、浸透促進剤、保湿剤、エモリエントおよび皮膚保護剤が挙げられる。

#### 【0188】

溶媒の例は、水、アルコール、植物油、海洋油および鉱油、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、グリセロール、および液体ポリアルキルシロキサンである。不活性な希釈液または充填剤は、スクロース、ソルビトール、糖、マンニトール、微結晶性セルロース、デンプン、炭酸カルシウム、塩化ナトリウム、ラクトース、リン酸カルシウム、硫酸カルシウム、またはリン酸ナトリウムであり得る。緩衝化剤の例としては、クエン酸、酢酸、乳酸、リン酸水素(hydrogenophosphoric acid)、およびジエチルアミンが挙げられる。適切な懸濁剤は、例えば、天然に存在するガム(例えば、アカシア、アラビック、キサンタンおよびトラガカントガム)、セルロース(例えば、カルボキシメチル-、ヒドロキシエチル-、ヒドロキシプロピル-、およびヒドロキシプロピルメチル-セルロース)、アルギン酸塩およびキトサンである。分散剤または湿潤剤の例は天然に存在するホスファチド(例えば、レシチンまたは大豆レシチン)、脂肪鎖とのまたは長鎖脂肪族アルコールとのエチレンオキシドの縮合生成物(例えば、ステアリン酸ポリオキシエチレン、ポリオキシエチレンソルビトールモノオレエート、およびポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート)である。

20

30

#### 【0189】

防腐剤は、処方物の安定性に影響し、かつ患者の感染を生じ得る、微生物汚染を防ぐために本出願の薬学的組成物に添加してもよい。防腐剤の適切な例としては、パラベン(例えば、メチル、エチル、プロピル、p-ヒドロキシベンゾエート、ブチル、イソブチル、およびイソプロピルパラベン)、ソルビン酸カリウム、ソルビン酸、安息香酸、安息香酸メチル、フェノキシエタノール、プロノポール、ボロニドックス、MDMヒダントイン、ヨードプロピニルブチルカルバメート、塩化ベンザルコニウム、セトリミド、およびベンジルアルコールが挙げられる。キレート剤の例としては、ナトリウムEDTAおよびクエン酸が挙げられる。

40

#### 【0190】

乳化剤の例は、天然に存在するガム、天然に存在するホスファチド(例えば、大豆レシチン; ソルビタンオモオレエート誘導体)、ソルビタンエステル、モノグリセリド、脂肪アルコール、および脂肪酸エステル(例えば、脂肪酸のトリグリセリド)である。消泡剤は通常は、製造を容易にし、それらは、空気-液体の界面を不安定にすることによって泡を消し、液体が空気のポケットから排出されることを可能にする。消泡剤の例としては、シメチコン、ジメチコン、エタノールおよびエーテルが挙げられる。

#### 【0191】

ゲル基剤または増粘剤の例は、流動パラフィン、ポリエチレン、脂肪油、コロイド状シ

50



リカ、またはアルミニウム、グリセロール、プロピレングリコール、カルボキシビニルポリマー、ケイ酸アルミニウムマグネシウム、親水性ポリマー（例えば、デンプン、またはセルロース誘導体など）、水膨潤性親水コロイド、カラギーナン、ヒアルロン酸塩およびアルギン酸塩である。本出願の組成物での使用に適切な軟膏基剤は、疎水性であっても、または親水性であってもよく、そしてパラフィン、ラノリン、液体ポリアルキルシロキサン、セタノール、セチルパルミテート、植物油、脂肪酸のソルビタンエステル、ポリエチレングリコール、ならびに脂肪酸のソルビタンエステル、エチレンオキシド（例えば、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート）、およびポリソルベートの間の縮合生成物が挙げられる。

【0192】

10

保湿剤の例は、エタノール、イソプロパノールグリセリン、プロピレングリコール、ソルビトール、乳酸および尿素である。適切なエモリエントとしては、コレステロールおよびグリセロールが挙げられる。皮膚保護剤の例としては、ビタミンE、アラトイン、グリセリン、酸化亜鉛、ビタミンおよび日焼け止めが挙げられる。

【0193】

ある実施形態では、本出願の組成物は、約10、9、8、7、または6 未満の温度、適切には約6 未満の温度で保管される。

【0194】

さらなる実施形態では、本出願の組成物は、凍結乾燥またはフリーズドライされる。リポソーム凍結乾燥の技術は周知であり、例えば、Chenら、(J. Control Release 2010 Mar 19; 142(3): 299-311)は、フリーズドライリポソームの溶解保護(lyoprotective)効果を決定する重要な要因をまとめている。

20

【0195】

本出願の組成物は一般には、意図した結果を達成するのに有効な量で、例えば、処置されている特定の状態、疾患または障害を処置または予防するために有効な量で用いられる。本出願の組成物およびリポソームを用いて被験体に投与される、亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物の用量および/または比は当業者によって容易に決定される。一実施形態では、疾患または障害を処置するためにリポソーム処方物中にカプセル化された有効量の亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物の投与は、同じ疾患または障害を処置するために、標準的な投薬計画を用いて投与される、有効量の亜塩素酸塩、塩素酸塩またはそれらの混合物と比較して約1～約1000倍の係数まで減少される。

30

【0196】

一実施形態では、本出願の組成物またはその処方物は、長期間にまたがって、例えば、約1分から数時間、例えば、2、3、4、6、24時間以上にまたがって、静脈内に投与される。

【0197】

一実施形態では、この処置は、1日1回施される。別の実施形態では、この処置は、1日2回施される。さらに別の実施形態では、この処置は、1日に3回施される。なお別の実施形態では、この処置は、1日に4回施される。さらなる実施形態では、この処置は、1、2、3、4、5、6または7日間にわたって1日に1～2回施される。なおさらなる実施形態では、この処置は、長期間、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または12週間にわたって1日に少なくとも1回施される。なおさらなる実施形態では、この処置は、その状態が、さらなる処置が不必要に改善されるまで1日に少なくとも1回施される。別の実施形態では、この処置は、活性剤の処方性の放出をもたらし、投与の頻度は少なくともよく、例えば、週に1回、月に1回、6カ月に1回、毎年1回、2年ごとに1回、または5年ごとに1回。別の実施形態では、この疾患または障害の持続性は、リポソーム組成物の投与後一定期間にわたって、例えば、6カ月、1年または2年の間、低減する。

40

【0198】

50

別の実施形態では、この処置は、週に少なくとも1回施される。別の実施形態では、この処置は、週に2回施される。なお別の実施形態では、この処置は週に3回施される。さらに別の実施形態では、この処置は週に4回施される。なお別の実施形態では、この処置は週に5回施される。さらに別の実施形態では、この処置は週に6回施される。さらなる実施形態では、この処置は、1週、2週、3週、4週、5週、6週または7週の間に1週あたり1～6回施される。なおさらなる実施形態では、この処置は、より長期間、例えば、1週、2週、3週、4週、5週、6週、7週、8週、9週、10週、11週または12週の間に1週あたり少なくとも1回施される。なおさらなる実施形態では、この処置は、さらに処置が不要になるまで状態が改善されるまで、週に少なくとも1回施される。

【0199】

別の実施形態では、この処置は、インフュージョンポンプを用いて、連続、間欠または患者制御の注入として施され得る。一実施形態では、注入ポンプ（インフュージョンポンプ）を用いて、処置を静脈内に施す。

【0200】

VI. 実施例

[ 実施例1：スフィンゴミエリン/WF10リボソーム調製 ]

2700  $\mu$ l のスフィンゴミエリン（鶏卵SM（MW 703.3），Avanti Polar Lipids，Alabama，USA）溶液（25mg/mL溶液がクロロホルム=67.5mg中に、0.095ミリモルのSM）を、丸底フラスコ（通常は25mL）に添加し、1/3をクロロホルムで満たした。その溶液をエバポレートして乾燥し、フラスコの内面上で薄い透明な可視の脂質フィルムを得る。

【0201】

4800  $\mu$ L のWF10（0.095ミリモル/4.8mL）を添加して、フラスコを、ボルテックスミキサー中で、ほぼ45（脂質の相転移温度を超える）で振盪した。このボルテックスは、フィルムが見えなくなったとき停止した。この工程での脂質の再水合によって、大型の多重層ベシクル（LMV）であるリボソームの形成が生じる。WF10は、リボソームの両側（内側相）およびリボソームの外側（外側相）の両方にある。

【0202】

一次リボソームの大きさを小さくするために、混合物を繰り返し凍結して、解凍した。凍結/解凍のサイクルは10回繰り返し、冷却材として液体窒素を用い、約30～40分という全体的な期間、45で、水浴中で解凍した。凍結の結果として、一次リボソームが破壊される。解凍は、相転移温度より上で行った。この場合、一次リボソームより小さいリボソームは、再度自然に形成される。全てのサンプルは、所定の温度スキーム（-180°/45）のせいで、約20分にわたって室温をかなり超えた。

【0203】

次いで、上記の混合物（約5mL）を100nmの細孔幅を有する（同じもの）ディスクフィルターを繰り返し通して押し出した。加熱ジャケットと100nmのディスクフィルターとを二重に備える（ただし単一のフィルターのみを用いることもできる）ステンレス鋼チャンバを用いた。作業温度は、SMに関しては45であった。加圧は、30barで窒素を用いて達成し、押出は、10回繰り返し、これでは、比較的均一な直径の単層ベシクルが得られることが公知である。封入率は、約2～3%；理論上は、7%が可能であった。

【0204】

押し出された混合物（外側相：WF10，内側相：WF10）を、3つの透析チャンバに分けた。そのチャンバを、0.9%の塩化ナトリウム溶液中に浮かべておいた。その透析チャンバは、「Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes，20K MWCO」であって、最大20kDaまでを透過する3mLの最大容積を有した。リボソーム混合物（1mL）を、内側チャンバに入れて、NaCl 0.9%（生理食塩水、1L）が外側媒体であった。その過程を新鮮な生理食塩水を用いて4回繰り返した。リボソーム混合物の残り（透析された約5mL～3×1mL）を、リン酸塩決定およ

10

20

30

40

50

び DSC (Differential Scanning Calorimetry 相転移温度の決定) に用いた。

【0205】

透析段階の終わりに、リポソーム調製物の外相は、0.9% 塩化ナトリウム溶液 (= 生理食塩水) から構成された。この目的は、定量に用いられる方法の検出限界未満の外相中の亜塩素酸塩および塩素酸塩の濃度を得ることであった。これを行うことによって、リポソームの漏出挙動は、これらのイオンの再出現をモニターすることによって試験できる。

【0206】

[ 実施例 2 : POPC / WF10 リポソームの調製 ]

実施例 1 に記載の手順、および室温 (加熱ジャケットは接続しない) の押し出し工程のための作業温度を用いて、POPC からできており、WF10 を含んでいるリポソームを調製した。

【0207】

[ 実施例 3 : POPC : POPG / WF10 リポソーム調製 ]

実施例 1 に記載の手順、ならびに凍結 / 35 の解凍のため、および 23 の押し出し工程のための作業温度を用いて、1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - sn - 3 - グリセロ - 3 - ホスホコリン (POPC) および 1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ (1' - rac - グリセロール) (POPG) (3 : 1、2 : 1 および 1 : 1) からできており、WF10 を含んでいるリポソームを調製した。POPG は、Avanti Polar Lipids, Alabama, USA から入手した。

【0208】

[ 実施例 4 : DPPC / WF10 リポソームの調製 ]

実施例 1 に記載の手順、および 45 の押し出し工程のための作業温度を用いて、1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DPPC) からできており、WF10 を含んでいるリポソームを調製した。DPPC は、Avanti Polar Lipids, Alabama, USA から入手した。

【0209】

[ 実施例 5 : DMPC / WF10 リポソームの調製 ]

実施例 1 に記載の手順、および 30 の押し出し工程のための作業温度を用いて、1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DMPC) からできており、WF10 を含んでいるリポソームを調製した。DMPC は、Avanti Polar Lipids, Alabama, USA から入手した。

【0210】

[ 実施例 6 : 追加の調製方法 ]

(a) 脂質のエバポレーション

クロロホルム中に溶解された脂質を、100 mL の丸底フラスコに添加した。ほとんどの場合、脂質は既に、約 25 mg / mL という典型的な濃度で、溶液中で販売されていた。粉末として送達される脂質は、通常、フラスコへの添加の前に溶解され、同様の濃度になる。次いで、添加された脂質の総量を、容積で制御した。典型的な質量は、40 mM のサンプルの 14 mL について 300 ~ 400 mg であった。その後、フラスコを、Buchhi「Rotavapor (商標) R-210」回転エバポレーターに装着して、37 の水浴中で 15 rpm で回転しながら排出させた。フラスコの圧力は、操作の間に約 5 ~ 15 mbar の値まで下がった。エバポレーションは、全ての溶媒が除去され、クロロホルムの臭いがフラスコで嗅げなくなったときに、終了とみなした。この段階の結果は、ボトルの壁の上で可視の脂質フィルムであり、(脂質の量に依存して) さらに、フラスコの底でフワフワした粉末を蓄積した。

【0211】

(b) 水和

水和手順の間、脂質を水性媒体に懸濁し、これを後で、最終のリポソーム中に捕捉した。公知のとおり、このプロセスの間、多重層ベシクル (MLV) が形成される。まず、必

10

20

30

40

50

須の量のWF10媒体を、丸底フラスコに加えた。その容積は、所望の総サンプル溶液に等しかった（通常は約8～14mL）。その結果は、大きい脂質凝集物を含んでいる混濁溶液であった。次いで、水浴を、脂質の脂質相転移温度（PTT）を5K超える温度で調製し、この間に、フラスコをわずかに振盪した。フラスコ中の温度が一旦、PTTに達すれば、懸濁物は、均一な乳白色の液体になった。PTTより上の温度で約5分後、脂質フィルムを、フラスコの壁から外して、底には脂質粉末は残らなかった。最後に、フラスコをボルテックスミキサーを用いて2～3秒間振盪した。蒸気加熱したサンプルを直ちに、押出デバイスを通して次の調製工程を開始するか、または次の調製工程を行うまで冷蔵温度で保管した。

#### 【0212】

10

##### （c）押し出し

押し出し過程の間、サンプルを繰り返し、220nmのフィルターディスクを通して絞り出した。これによって、大きいベシクルの再構成、および層が少なく小さい構造の形成が強要された。一般には、これは、単層ベシクルだが、比較的大きい細孔サイズ、例えば220nmについて生じ、これは、やはり多重層ベシクルを得る可能性はあるが、ただしこれはわずか2～3の層しかない。押し出し工程の前に、押し出し機には、3つ重なった220nmのフィルターディスク（Millipore GPWP, 直径25mm）を装備し、LPTTより5K上で加熱した。押し出しチャンバ中へ脂質懸濁物を充填した後、25バールの圧力をこのチャンバに加えて、サンプルを、フィルターを通して押し出した。この圧力は、圧縮窒素で加えた。サンプルを、押し出し機の外側で収集した。まるとの押し出しは、少なくとも10回行った。

20

#### 【0213】

##### （d）透析

この段階で、リボソームは、それらの最終状態であったが、WF10溶液中に懸濁されたままであった。外側のWF10媒体を、0.9%の生理食塩水溶液で置き換えるために、一連の連続透析工程を行った。このサンプルを最初に、Thermo Scientific Slide-A-Lyzer（商標）透析フレームに導入した。このフレームの膜は、20,000Daという分子量カットオフ、および3～12mLの容量を有する。6mLより大きいサンプル容積については、サンプルを分けて、2つのこのようなフレームに分け、両方とも同じビーカーに入れた。透析設定は、磁気攪拌デバイス上に配置した0.9%の生理食塩水溶液を含む1Lのガラスビーカーを備えた。生理食塩水溶液は通常、脱イオン水および標準の実験用NaCl（最低純度99%）からできており、容積は約900～950mLであった。そのフレームを、約1時間の間、透析媒体に浸し、次いでその媒体を、次の工程のための新鮮な媒体で置き換えた。典型的には、透析媒体の小さいサンプルを、通常のo-トリジン分析手順と同様の「o-トリジンのクイックチェック」のためにとった。サンプルが、濃い黄色を呈した場合、媒体は早期に交換した。このようなクイックチェックはまた、透析シリーズの終わりにも決定した。2つの連続透析工程が、試験の間および1時間の透析期間の後に色の視認できる変化を示さなかった時に、透析は完了したとみなした。各々の透析工程の後に、少なくとも5工程が行われるまで、透析媒体を交換した。最終工程の後、サンプルをさらに使用するために約6で保管した。

30

40

#### 【0214】

##### 〔実施例7：亜塩素酸塩および塩素酸塩の検出のためのo-トリジン法〕

方法A： このo-トリジン方法は、200mLの水および67mLの12Mの塩酸の混合物中の155mgのo-トリジンの50μLの溶液を200μLの過剰の媒体に添加した。この混合物を2回調製した。それぞれ、250μLの4.8Mまたは12Mの塩酸を、添加して、その混合物を5～10分間インキュベートした。低濃度の塩酸を用いて、亜塩素酸塩のみの検出を可能にしたが、高濃度を用いれば、さらに、塩素酸塩の検出が可能になった。試験溶液の吸収は、それぞれ442nm（4.8MのHCl）または445nm（12MのHCl）で測定した。校正曲線は、未処理のWF10から調製した標準希釈液を用いて確立した。

50

## 【0215】

方法B： 方法Bは、亜塩素酸塩および塩素酸塩の両方の検出を可能にするという点で方法Aの改善である。この方法は、114mgのo-トリジンを150mLの水に溶解すること、および50mLの塩酸(37%)を添加して、o-トリジン溶液を調製することを包含する。o-トリジン溶液は、最初の適用の少なくとも24時間前に調製し、2~3ヵ月間6で保管してもよい。分析混合物の調製の直後に生じる漂白の影響を回避するために、分析手順の開始後、全てのサンプルを同時に測定するように注意を払った。分析スキームは、最大96個のサンプルを同時に分析するように設計し、時間は、それらの能力を保証するように選択した。分析手順の開始の際に、分析すべき400μLのサンプルを、標準の2mLの反応容器に充填した。t<sub>0</sub>の時点で、100μLのo-トリジン溶液を各々の反応容器に添加した。10分後(t<sub>0</sub>+10分)、500μLの塩酸(37%)を添加した。さらに10分後(t<sub>0</sub>+20分)、各々の容器由来の200μLのサンプルを、447nmの波長での吸光度測定のために標準の96ウェルプレートに移した。それらの測定は、TECAN Infinite 200PRO(商標)マイクロプレートリーダーで行い、15分後(t<sub>0</sub>+35分)に開始した。

10

## 【0216】

計算では、保管媒体中のWF10の濃度は、逆希釈係数dで表した。この量は、保管媒体の容積あたり未希釈のWF10の容積に相当した。従って、これは、未希釈のWF10についてはd=1で大きさを示した。

20

## 【0217】

特定の逆希釈係数に対して測定した吸光度値を関連付けるために、WF10希釈曲線を記録した。その曲線は、図1に示す。このデータによって、約 $6 \times 10^{-5}$ を超えるdの値についての強力な一次従属が示され、対応する式

$$d(A) = mA + n \quad (1)$$

のパラメーターは、 $m = (3.87 \pm 0.02) \times 10^{-4}$  および  $n = (7 \pm 2) \times 10^{-6}$  であることが判明した。述べた値未満の濃度についての非線形ドメインは、以下の式

$$d(A) = \frac{A - A_0}{P} \quad (2)$$

を用いてフィットされた。

## 【0218】

ここで、 $A_0 = 0.0787 \pm 0.0007$ 、 $P = (3.36 \pm 0.05) \times 10^{-4}$  であり、かつ  $p = 0.631 \pm 0.009$  であった。両方の場合とも、フィットは、データポイントの不確実性に対して重み付けされた。吸光度値の比較的大きい不確実性を考慮するために、逆のデータセットに対するヒットを、逆関数を用いて同様に行った。示されたパラメーターは、両方の結果についての算術平均であった。

30

## 【0219】

保管媒体中で決定された逆WF10希釈係数dから、リボソーム内部から放出されたWF10の量である $x_{WF10}$ を算出した。サンプルの容積 $V_{sample}$ 、および保管媒体 $V_{storage}$ の容積を考慮して、dの値を、以下の式を用いて算出した

## 【0220】

## 【数1】

40

$$d = \frac{x_{WF10}}{V_{sample} + V_{storage}} \quad (3)$$

従って

$$x_{WF10} = d (V_{sample} + V_{storage}) \quad (4)$$

## 【0221】

当然ながら、これは、漏出した物質がサンプル媒体および保管媒体と完全に混合された後にのみ成り立つ。実験によって、これは、適切な設定が選択された場合は、比較的短時

50

間で生じたことが示される。漏出した物質が、実験の設定から取り出された場合に、問題が生じ、これは、保管媒体の画分が分析のために採取されるとき、常に生じる。しかし、この抜き取りを考慮するために、全ての事前の測定を、現行の希釈係数の算出において考慮する必要がある。このようなインプリシットな決定において、全ての誤差および不確実性は、あらゆる新しい濃度決定とともに蓄積し、その結果、単一の悪いデータポイントが、実験の全ての引き続く測定を変更する。従って、エキスプリシットなアプローチを用いて、ここでは、現行の分析工程の  $d$  および  $V_{storage}$  のみを考慮して、前の分析工程で抜き取った物質は無視した。しかし、無視できた最大の可能な量を、不確実性に加えた。インプリシットな方法由来のこの単純なエキスプリシットなアプローチの偏差は、通常、他の要因から生じる不確実性と比較して小さかった。それにもかかわらず、あらゆる評価プロセスの経過における別の計算を行って、各々の場合について別々に使用方法を変更する。

10

#### 【0222】

方法C： この方法は、亜塩素酸塩の検出は可能にするが、塩素酸塩はできないという意味で、方法Aの別の改善である。o-トリジン溶液を、その適用の前に少なくとも24時間調製した。暗所で、6で保管して、これは数か月安定であった。最初に、一次HCl溶液を、50mLの濃縮(37%)塩酸を150mLの $H_2O$ (高純水をこの段階では用いた)に添加することによって調製した。次に、58mgのo-トリジン(二塩酸塩、 $H_2O$ 含量1.5mol/mol、285.2g/mol, SIGMA Prod. No. : T-6269)を、100mL測定のフラスコに、一時的HCl-溶液を用いてフラッシュした。そのフラスコを完全に濾過した(100mL)。この溶液を振盪した後、褐色のガラス瓶に充填した。24時間後、その溶液は無色で、ある程度の沈殿がフラスコの底で見られた。

20

#### 【0223】

4.8Mの塩酸を、測定の直前に調製した。これは、40mLの濃塩酸(37%)を60mLの $H_2O$ に添加することによって調製した。

#### 【0224】

この反応は、吸光度測定によって検出できるサンプルの色の変化を生じる。しかし、退色は、反応発生後ただちに開始し、その結果、この手順では時間が重要なパラメーターである。最大96個のサンプルの分析を一度に可能とする時間スケジュールに従った。開始時点で、各々400 $\mu$ Lのサンプルを、1.5mLの反応容器に充填した。その後で、100 $\mu$ Lのo-トリジン溶液をこの容器に添加した。o-トリジン添加開始15分後、500 $\mu$ Lの4.8Mの塩酸を各々の容器に加えた。次いで、350 $\mu$ Lの各々のサンプルを反応容器から、透明な96ウェルプレート(カバーなし)の空洞に移した。さらに25分後、サンプルの光度計測定を、442nmの吸光度を記録することによって開始した。

30

#### 【0225】

記録された吸光度値を、同じ条件下で記録した公知の濃度の標準曲線と比較した。亜塩素酸塩濃度の吸光度の依存性は、2 $\mu$ M~60 $\mu$ Mの亜塩素酸塩濃度について直線である。

#### 【0226】

40

#### 漏出モニタリング

全ての漏出モニタリング実験の基本的な目的は、リボソームの内側から放出された物質の検出であった。このような実験の一般的なアプローチは、実施例6(d)に記載の透析手順と同様であった。サンプル中のリボソームから放出された物質は、周囲のサンプル媒体に通過して、透析膜を容易に通過可能であり、その結果、透析フレーム周囲の保管媒体は、漏出した物質を特定の濃度で含んだ。漏出した亜塩素酸塩/塩素酸塩については、上記のo-トリジン方法を用いて、漏出を定量的にまたは定性的に決定する。この濃度から、下に記載の計算を用いて、漏出した物質の総量を決定できた。この濃度は、保管溶液の容積の増大につれて低下し、従って、保管溶液は、比較的小さくなるように選択されたことが明らかである。しかし、漏出された物質の濃度を決定するために、1mLの保管媒体

50

が、典型的には、必要であり、従って、少なくとも10または20ミリリットルの保管容積が所望された。

#### 【0227】

[実施例8：実施例1～5由来のリボソームの安定性]

リボソームが調製された後、サンプルを、透析フレーム中に残し、次にこれを保管のために120mLの生理食塩水溶液中に入れた。1～3日の間隔で、1mLの過剰の媒体を採取して、o-トリジン方法Aを用いて分析した(実施例7)。

#### 【0228】

漏出は、全ての温度(5、23および37)でPOPCリボソームから検出した(図2を参照のこと)。SMリボソームの場合、漏出は、37でのみ検出された(図3を参照のこと)。さらなる漏出実験を、POPC/POPGリボソーム、および純粋なDMPCリボソームで行った。POPC/POPG混合物(3:1、2:1および1:1)は、純粋なPOPCサンプルと同様に挙動して、短時間後に完全な漏出を示した(それぞれ、図4、5および6を参照のこと)。DMPCは、5および23で保管したサンプルから1、5および7日にとった分光計の読み取りで示されるように、その相転移温度(23)付近で漏出した(図7を参照のこと)。

10

#### 【0229】

さらに、SM実験を繰り返して、上記されるのと同じ結果を得た(図8を参照のこと)。実験の終わりに、全てのサンプルを、37において、イオンの漏出をモニターした。37に置いた後に、大きい漏出が約2時間で開始し、37に置いた後4時間で完了したことが見出された。

20

#### 【0230】

[実施例9：DPPC、DPPC/DMPC、S\_\_PC3およびS\_\_PC3/DMPC WF10リボソームの調製]

実施例1に記載の手順の変化版を用いて(凍結/解凍工程は省略；220nmの細孔サイズの膜)、リボソームは、DPPC、DPPC/DMPC、水素添加大豆リン脂質(S\_\_PC3)およびS\_\_PC3/DMPCからできていた。成分および押し出し温度を、表2に示す。DPPCは、Avanti Polar Lipids, Alabama, USAから入手したが、S\_\_PC3およびDMPCは、LIPOID AGから入手した。

30

#### 【0231】

漏出は、DPPCについて41という相転移温度でDPPCリボソームから検出された(図9を参照のこと)。DPPCの相転移温度(41)より3下の38で、リボソームはタイトであった。DPPC:DMPCの9:1は、DPPCについての相転移温度(PTT)より下の38で漏出した。さらなる漏出実験を、S\_\_PC3リボソーム、およびS\_\_PC3:DMPCで、3:5で行い、漏出は、S\_\_PC3リボソームから60で検出された(表2)。

#### 【0232】

[実施例10：あり得る分解生成物を見出すためのMALDI-TOF MS測定]

調製および実験 - サンプル

3つのサンプルを、実施例6に記載の方法を用いて調製した。全てのサンプルについて、1,2-ジアパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DPPC)を用いた。このサンプルを、以下のように命名した：

40

SX123：通常のWF10

SX124：PBSで緩衝化したWF10

SX125：タウリンで緩衝化したWF10

#### 【0233】

SX123：

9:2mLの25mg/mL DPPC-クロロホルム溶液を、丸底フラスコに添加した。これは、233mgの脂質重量に相当する。DPPCは、Avanti Polar Lipidsから購入した(製品番号：850355C)。水和は、OXO-K993

50

25.03 g (OXO-K993が250 mL溶液の中)から調製した7.92 mLのWF10で行った。水和過程の間、サンプルを46で5分間加熱した。押出は、50で行い、19分続けた。10回連続の通過を行った。サンプルを冷蔵庫で、6で一晩保管した。透析工程は、5000 mLの溶液あたり45:001 gのNaClで調製した900 mLの生理食塩水溶液で行った。22、40、47、61および71分におよぶ5連続工程を行い、6番目の工程は、6の冷蔵庫で一晩行った。

#### 【0234】

SX124

「WF10/PBS」の調製：10 gのOXO-K993を、注射用水(WFI)を用いて80 gに希釈した。pHは、リン酸二水素ナトリウム一水和物(4.31 g/25 mL)の水溶液を添加することによって、7.36のpHに調節した。この混合物は、WFIを用いて100 gにして、塩素イオン、亜塩素酸塩、塩素酸塩および硫酸塩を、WF10中に存在する濃度を含んだ。

10

#### 【0235】

9.2 mLの25 mg/mLのDPPC-クロロホルム溶液を、丸底フラスコに添加した。これは、233 mgの脂質重量に相当する。DPPCは、Avanti Polar Lipidsから購入した(製品番号:850355C)。水和は、7.92 mLのWF10/PBSで行った(使用時pH7.63)。水和過程の間、サンプルを50まで2分間加熱した。押し出しは、50で行い、7分続け、連続通過を行った。サンプルを、冷蔵庫中で、6で一晩保管した。透析工程は、5000 mLの溶液あたり45.001 gのNaClを用いて調製した、900 mLの生理食塩水溶液で行った。22、40、47、61および71分におよぶ5連続工程を行い、6番目の工程は、6の冷蔵庫で一晩行った。

20

#### 【0236】

SX125

「WF10/タウリン」の調製：10 gのOXO-K993を、WFIを用いて80 gまで希釈した。pHは、タウリンの水溶液(3.91 g/50 mL)を用いて8.49付近のpHに調節した。この混合物は、WFIを用いて100 gにして、塩素イオン、亜塩素酸塩、塩素酸塩および硫酸塩を、WF10中に存在する濃度を含んだ。

30

#### 【0237】

9.2 mLの25 mg/mLのDPPC-クロロホルム溶液を、丸底フラスコに添加した。これは、233 mgの脂質重量に相当する。DPPCは、Avanti Polar Lipidsから購入した(製品番号:850355C)。水和は、7.92 mLのWF10/タウリンで行った(使用時pH8.47)。水和過程の間、サンプルを50まで4分間加熱した。押し出しは、50で行い、7分続け、10連続通過を行った。その後、サンプルを、冷蔵庫中で、6で一晩保管した。透析工程は、5000 mLの溶液あたり44.998 gのNaClを用いて調製した900 mLの生理食塩水溶液で行った。22、40、47、61および71分におよぶ5連続工程を行い、6番目の工程は、6の冷蔵庫で一晩行った。

40

#### 【0238】

保管実験

2011年12月16日に、サンプルを、透析フレームから取り出して、2011年12月19日まで6で保管した。この日に、2 mLの各々のサンプルを、別の容器中に6で保管するために取り出した。別の2 mLを同じ方法で、室温(約22)で保管した。サンプルの残りを異なる目的に用いた。2011年12月19日、2012年1月6日、および2012年2月1日に、0.2 mLのサンプルを、各々の容器から取り出して、後のMALDI-TOF測定のために-80の冷蔵庫中に置いた。

#### 【0239】

MALDI-TOF MS

全部で18のサンプルを、以下の手順を用いて、MALDI-TOF MS測定のため

50



に調製した（3サンプル種類、各々は2つの温度で、3つの異なる日の全てで保管した）：

サンプルを、560  $\mu$ Lの0.9%生理食塩水溶液および40  $\mu$ Lのもののサンプルを用いて調製前に希釈して、-80 で保管した。その後に、脂質抽出手順に従った。従って、100  $\mu$ Lの事前希釈サンプルを、200  $\mu$ Lのクロロホルム/メタノール-混合物（1：1）と混合した。次いで、得られた混合物を、800 gで5分間遠心分離して、可視の相分離を得る。50  $\mu$ Lの低い方の相をさらなる調製のために採取した。この容積に、3.7  $\mu$ Lの25 mg/mLのDMPC-クロロホルム溶液および2.5  $\mu$ Lの25 mg/mLの14：0-Lys-PC-クロロホルム溶液を標準として添加した。その後に、全ての溶媒を真空遠心分離中で除去した。次いで、100  $\mu$ LのDHB-Matrix（156 mgのジヒドロキシ安息香酸，1998  $\mu$ L，2  $\mu$ Lトリフルオロ酢酸）および100  $\mu$ Lのクロロホルムを、エバポレートされたサンプルに添加した、最後に、1  $\mu$ Lの調製されたサンプルを、温かい空気の流れの下で金コーティング標的に置いた。

#### 【0240】

MALDI-TOF MS測定は、Bruker Daltonics, Leipzigによって、autoflex LRF MS分光計で行った。

#### 【0241】

##### 結果および考察

18の例全てにおいて、記録されたスペクトルは、リゾ（lyso）生成物の兆候を全く示さなかった。「リゾ（lyso）」という用語は、リン脂質を指して用いられ、ここでは、2つのO-アシル鎖のうちの1つが、除去された。2つの追加された標準のシグナルおよびリボソーム調製物に用いられる脂質は、明らかに同一であった。他のシグナルは、スペクトルでは見出されなかった。

#### 【0242】

従って、加水分解および/または他の分解過程は、6 でも室温でも、通常のWF10の高いpHでも、または別の緩衝化バージョンの低いpH値でも生じなかった。

#### 【0243】

[実施例11：DPPCおよびDPPC/DMPCリボソームに対する長期安定性試験] サンプル

6つのリボソームサンプルをアッセイした。最初の3つのサンプルは、実施例10に記載のように調製されたDPPCベースのリボソームサンプルSX123、SX124およびSX125であった。残りの3つのサンプル（サンプルSX130、SX131およびSX132）は、下に記載のように、DPPCおよびDMPCの9：1（モル比）混合物で調製されたリボソームを含んだ。

#### 【0244】

SX130：通常のWF10

3.14 mLの84.3 mg/mLのDPPC-クロロホルム溶液および2.00 mLの13.4 mg/mLのDMPC-クロロホルム溶液を、丸底フラスコに添加した。これは、それぞれ、264 mgおよび27 mgの脂質重量に相当する。水和は、10.00 mLのWF10で行われた。水和過程の間、サンプルを46  $\pm$  1 で4分間加熱した。10連続の押し出し通過は、46  $\pm$  1 に従い、全部で20分持続した。その後にサンプルを冷蔵庫中で、6で一晩保管した。透析工程は、5000 mLの溶液あたり45.008 gで調製した、900 mLの生理食塩水溶液中で行った。46、65、75および174分におよぶ4連続工程を行い、5番目の工程は、一晩行った。

#### 【0245】

SX131：タウリンで緩衝化したWF10

3.14 mLの84.3 mg/mLのDPPC-クロロホルム溶液および2.00 mLの13.4 mg/mL DMPC-クロロホルム溶液を、丸底フラスコに添加した。これは、それぞれ、264 mgおよび27 mgの脂質重量に相当する。水和は、10.00 mLのタウリン緩衝化WF10で行った。水和過程の間、サンプルを46 まで4分間加熱

した。10連続の押し出し通過は46 にして、全部で13分続けた。その後に、サンプルを、冷蔵庫の中で、6 で一晩保管した。透析工程は、5000mLの溶液あたり45.010gのNaClで調製した、900mLの生理食塩水溶液中で行った。46、65、75および174分続く、4回の引き続く工程を行い、5番目の工程を一晩行なった。

#### 【0246】

SX132:PBSで緩衝化したWF10

3.14mLの84.3mg/mLのDPPC-クロロホルム溶液および2.00mLの13.4mg/mLのDMPC-クロロホルム溶液を、丸底フラスコに添加した。これは、それぞれ、264mgおよび27mgの脂質重量に相当する。水和は、実施例10で記載されるように調製した、10.00mLのPBS緩衝化WF10で行った。水和過程の間、サンプルを46 まで4分間加熱した。10連続の押し出し通過は46 にして、全部で11分続けた。その後に、サンプルを、冷蔵庫の中で、6 で一晩保管した。透析工程は、5000mLの溶液あたり45.015gのNaClで調製した、900mLの生理食塩水溶液中で行った。46、65、75および174分続く4回の引き続く工程を行い、5番目の工程を一晩行なった。

10

#### 【0247】

長期安定性(LTS)実験

LTS実験を確立して、数週間または数か月にわたってリボソーム漏出をモニターした。従って、この設定は、並行して行う多重の実験を可能にするような方法で設計した。この目的のために、透析フレームを完全に浸すのに比較的小容積の貯蔵媒体が必要であるように、ほぼ(75×110×25)mm<sup>3</sup>という寸法の市販のゲル染色トレイを用いた。目的の適切な条件下でトレイを保管したまま、トレイを緊密にシールするためにカバーを備えた。通常のLTS設定は、貯蔵媒体として120mLの0.9%生理食塩水溶液中に浸漬した1mLのサンプルを含んでいるSlide-A-Lyzer(商標)透析フレームを備えた。この透析フレームは、透析の間に用いられるものと同様である(実施例6(d))が、わずか0.5~3.0mLの容量しか有さない。

20

#### 【0248】

貯蔵実験

透析手順の後、サンプルを、透析フレームから取り出して、6 で一晩保管した。LTS実験は、Slide-A-Lyzer透析カセット(Thermo Scientific, 0.5~3.0mL, 20K MWCO)および120mLの0.9%生理食塩水溶液を標準のポリプロピレンゲル染色トレイ中で用いて、上記のとおり準備した。各々のサンプルについては、各々が1mLのサンプル容積を有する、4つの別々のLTS設定を準備した。それらの設定のうち2つ、これらは室温で保管し、一方で他の2つは6 で冷蔵庫中に置いた。他の媒体中でのWF10濃度を、従って、リボソームから漏出した、塩素酸塩および亜塩素酸塩の量を分析するために、400μLの外側生理食塩水媒体を、実施例7の方法Bに記載のように、o-トリジン方法でのさらなる分析のために取り出した。以下の表は、分析サンプルを取り出した日を示す。

30

#### 【0249】

## 【表 1】

日付	サンプル	
2011-12-19	SX123, SX124 および SX125 (出発)	
2012-01-06	SX123, SX124 および SX125 (分析)	
2012-01-16	SX123, SX124 および SX125 (分析)	
2012-03-07	SX130, SX131 および SX132 (出発)	10
	SX123, SX124 および SX125 (分析)	
2012-03-29	全てのサンプルの分析	
2012-04-27	全てのサンプルの分析	
2012-05-25	全てのサンプルの分析	
2012-07-06	全ての 6°C のサンプルの分析	20

## 【0250】

## 評価

記録した吸光度データの評価は、吸光度のWF 10 希釈係数への変換に関して、実施例 7、方法 B に記載の手順に従って行った。提示の目的のために、WF 10 希釈係数を、さらに都合の良い量に変換した。総サンプルの容積分としての漏出されたWF 10 の量。従って、1 mL のサンプル中の 2 % 漏出という値は、全部で 20  $\mu$  L のWF 10 が、リボソーム内側から放出されたことを意味する。この検出および定量の限界は、下の小区分で規定する。貯蔵容積から生じる不確実性についての考察も下に示される。

## 【0251】

30

## 検出限界 (LOD)

測定値は、検出の限界と規定された。この値は、媒体中の亜塩素酸塩 / 塩素酸塩 WF 10 の存在が変化するとみなすことができる値より上であるように規定される。ゼロ値の不確実性の範囲をわずかに上回る 0.095 という吸光度値を用いた。このエクスプリシット値は、実施例 7、方法 B によって行われる測定のためにのみ有効である。

## 【0252】

## 定量限界

サンプル溶液の画分として漏出されたWF 10 の量を算出する場合、LOD に近い処理データポイントは、不確実性を伴う結果を生じる場合が多い。従って、第二の限界 (定量限界 (LOQ)) を規定し、これは、最終の結果の算出に寄与する全てのパラメーター (例えば、サンプルおよび外側透析媒体の容積) を考慮した。これらのパラメーターは、実験全体にわたって一定に保持され、従って、単一の LOQ を生じ、これは、最終結果の全体の相対的な不確実性が、その値の 50 % 未満におさまるポイントを示す。本研究では、サンプル容積の 0.61 容積 % に等しい、漏出したWF 10 の量を LOQ と規定した。

40

## 【0253】

## 結果

全ての結果を、図 10 の概観的なバーチャートにまとめる。

## 【0254】

## 6 で保管したサンプル

冷蔵庫のサンプルは、全部で DPPC リボソームについては 200 日、および DPPC

50

/ D M P C リボソームについては 1 2 1 日保管した。両方のリボソーム種類とも、亜塩素酸塩 / 塩素酸塩は、保管媒体中では検出されなかった。

#### 【 0 2 5 5 】

##### 室温のサンプル

室温サンプルは、全部で D P P C リボソームについては 1 5 8 日間および D P P C / D M P C リボソームについては 7 9 日間保管した。全ての場合において、亜塩素酸塩 / 塩素酸塩が、保管媒体中では検出され、経時的に連続して増大した。

#### 【 0 2 5 6 】

##### D P P C リボソーム

この結果は、それぞれ、S X 1 2 3、S X 1 2 4 および S X 1 2 5 について少なくとも 1 0 1、2 8 および 7 9 日間 L O D の下で維持された。第二測定と第三測定 ( 2 8 日および 7 9 日 ) との間の期間は、比較的長く、その結果、S X 1 2 4 は、この期間に L O D を越え、同様に L O Q も超えた。S X 1 2 3 は決して L O Q を超えることはなかったが、S X 1 2 5 は、貯蔵の 7 7 日目と 1 0 1 日目との間で超えた。

10

#### 【 0 2 5 7 】

##### D P P C / D M P C リボソーム

純粋な W F 1 0 カプセル化リボソーム ( S X 1 3 0 ) についての結果は、少なくとも 5 1 日間 L O D より下に維持された。読み取りは、決して L O Q を越えなかった。S X 1 3 2 ( P B S ) および S X 1 3 1 ( タウリン ) については、L O D は、2 2 日と 5 1 日との間で超えて、続いて、5 1 日と 7 9 日との間の L O Q のオーバーランが続いた。

20

#### 【 0 2 5 8 】

##### 考察および結論

これらの L T S 実験によって、W F 1 0 リボソームの長期挙動の概要を得ること、および少なくとも 2 0 0 日間にわたって有意な漏出なしに 6 で D P P C リボソームが保管できることを示すことが可能になった。同じことが、1 2 1 日間に D P P C / D M P C リボソームについても当てはまった。室温では、サンプルは、8 0 日後に漏出を呈した。

#### 【 0 2 5 9 】

##### [ 実施例 1 2 : D P P C リボソームの漏出挙動の特徴付け ]

脂質相転移温度 ( L P T T ) は、リボソームカプセル化された材料が長期保存される場合の考慮事項である。この温度に関する漏出過程についての情報は、亜塩素酸塩および / または塩素酸塩をカプセル化するための処方物を設計する場合に有用である。この実施例では、純粋な D P P C リボソームに対する漏出研究の結果を記録する。

30

#### 【 0 2 6 0 】

##### 調製および実験

##### サンプル

2 つの同様のサンプルを、1, 2 - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリンから、実施例 6 に記載の調製手順に従って調製した。このサンプルは、S X 1 2 2 および S X 1 2 6 であり、かつ約 4 0 m M という脂質濃度を有する。詳細なパラメーターは以下に示す。

#### 【 0 2 6 1 】

##### S X 1 2 2

1 2 . 0 m L の 2 5 m g / m L の D P P C - クロロホルム溶液を丸底フラスコに添加した。これは、3 0 0 m g という脂質重量に相当する。D P P C は、A v a n t i P o l a r L i p i d s から購入した ( 製品番号 : 8 5 0 3 5 5 C ) 。水和は、O X O - K 9 9 3 2 5 . 0 3 g ( O X O - K 9 9 3 が 2 5 0 m L 溶液の中 ) から調製した 1 0 . 2 2 m L の W F 1 0 で行った。水和過程の間、サンプルは 4 2 へ 5 分間加熱した。押出は、4 5 . 4 で行い、2 0 分続けた。1 0 連続の通過を行い、そのサンプルを冷蔵庫中で、6 で保管した。透析工程は、5 0 0 0 m L の溶液あたり 4 5 . 0 0 4 g の N a C l で調製した、9 0 0 m L の生理食塩水溶液で行った。7 4、7 3、3 8、3 9 および 6 9 分続く 5 回の引き続く工程を行った。その後、サンプルを後の使用のために 6 で保管し

40

50

た。

#### 【0262】

SX126

14 mLの25 mg/mLのDPPC - クロロホルム溶液を、丸底フラスコに添加した。これは、350 mgの脂質質量に相当する。DPPCは、Avanti Polar Lipidsから購入した（製品番号：850355C）。水和は、OXO-K993 25.03 g（OXO-K993が250 mL溶液の中）から調製した11.9 mLのWF10で行った。OXO-K993は、Nuvo Research GmbHから入手した。水和過程の間、サンプルは $46 \pm 3$ へ4分間加熱した。押出は、 $46 \pm 1$ で行い、12分続けた。10連続の通過を行った。その後、サンプルを、週末をまたいで冷蔵庫中で、6で保管した。透析工程は、5000 mLの溶液あたり45.08 gのNaClから調製した、900 mLの生理食塩水溶液（0.9%）中で行った。78、68、68、85および51分続く5回の引き続く工程を行った。その後に、サンプルを後の使用のために6で保管した。

10

#### 【0263】

HRL実験

HRL実験では、2～3時間から最大で2～3日間の範囲にまたがってリボソーム漏出をモニターするように設計した。5分を超える時間分解能で漏出挙動の変化が理解できた。さらに、目的の温度は、0.1 Kの工程で室温から60の間で正確に調節できた。

20

#### 【0264】

HRL設定は、温度の正確な制御、および保管媒体を攪拌する能力を含んだ。保管容器として、500 mLメスシリンダーを用いて、保管媒体として200 mLの0.9%生理食塩水溶液を満たした。サンプルを、Slide-A-Lyzer（商標）透析フレームに導入して、LTS設定（実施例11）で行ったように行い、次にこれを保管溶液中に浸漬した。このフレームを、透析の間にこれも行われたとおり、泡状オートブイ（foam o a t b u o y）で保持した。磁気スターラーは、保管溶液を一定して攪拌した。メスシリンダーを、Julabo U3/Bの熱浴に入れて、これによって、温度を、約0.1 Kという正確性で12時間未満の期間、および0.3 Kという正確性で12時間を超える期間、制御した。温度は、約0.1 Kという正確性の公式に校正したサーモメーターでモニターした。この設定によって、別々の保管シリンダー中の2つのサンプルのモニタリングが可能になった。通常は、2つの同一のサンプルを観察して、信頼できるデータを得た。

30

#### 【0265】

以下のHRL実験を行った：

#### 【0266】

#### 【表2】

日付	サンプル	種類
2011年12月12日	SX122	温度、スキャン
2011年12月13日	SX122	HRL(41°Cで)
2012年1月6日	SX122	HRL(38°Cで)
2012年1月11日	SX122	HRL(39°Cで)
2012年1月25日	SX126	HRL(41°Cで)
2012年1月26日	SX126	HRL(39°Cで)
2012年2月22日	SX126	HRL(40°Cで)

40

#### 【0267】

結果および考察

実験の結果を、図11～15に示す。ここで、WF10の漏出された量を、実験の開始

50

から経過した時間に対してプロットする。また、この温度は、右側の y 軸上にも示す。漏出された W F 1 0 の量を、総サンプル容積の画分として示し、すなわち、1 m L のサンプルについての 2 % という値は、例えば、サンプルのリボソームからの全体で 2 0  $\mu$  L の放出に相当する。

【 0 2 6 8 】

前に述べたとおり、あらゆる実験は、通常、2 つの別の同一のサンプルを同時に用いて行った。このサンプルは、グラフでは、「サンプル A 」および「サンプル B 」と呼ぶ。

【 0 2 6 9 】

3 9 での漏出開始

2 ~ 3 時間のスケールでは、3 8 を超える温度で有意な漏出が開始する。図 1 1 は、温度スキャンの結果を示す。温度は、3 8 で約 3 時間、外側媒体中の W F 1 0 の濃度の測定可能な変化なしで保持した。次に、温度を 1 K ずつ上昇して、わずか 2 ~ 3 分内でリボソームから W F 1 0 の漏出を誘導した。約 5 0 へのさらなる加熱によって漏出の速度が増大した。

10

【 0 2 7 0 】

しかし、図 1 2 は、5 日間にまたがる 3 8 での H R L 実験の結果を示しており、これは、約 2 . 5 % という総サンプル容積のわずかな漏出を示す。このサンプルの最大能力 ( S X 1 2 2 ) は 8 ~ 9 % の範囲であって、その結果、封入された量のわずか三分の一しかこの時点で放出されなかった。

【 0 2 7 1 】

20

3 9 での部分的な漏出

図 1 3 は、3 9 での H R L 実験を示す。これによって、W F 1 0 は、総サンプル容積のうち約 2 % という容積で約 4 時間後に放出されたことが理解できた。さらに、漏出は、3 9 で一晩おいておいた実験設定の後でさえ、出現しなかった。さらなる加熱後にのみ、サンプル容積のうち約 6 ~ 7 % の容積が放出されるまで、封入された W F 1 0 の漏出が残った。

【 0 2 7 2 】

3 9 を超えての漏出

図 1 4 および図 1 5 は、それぞれ 4 0 および 4 1 での H R L 実験の結果を図示する。封入された物質の全量は、約 4 時間の期間にわたって放出された。

30

【 0 2 7 3 】

封入された容積

S X 1 2 2 中のリボソームによって封入される容積は、サンプル容積の約 8 ~ 9 % であることが見出された。S X 1 2 6 については、これは 6 ~ 7 % であって、従って、低かった。サンプルが、ほぼ同一のパラメーターで同じ調製手順を通された場合でさえ、相違は無視できなかった。

【 0 2 7 4 】

安定性

両方のサンプルについて、調製と最後の実験との間の期間は、約 1 か月であって、その間に、漏出は、6 の保管容器中では生じなかった。従って、D P P C リボソームは、一定の冷却下で少なくとも一か月間安定であると結論できる。

40

【 0 2 7 5 】

[ 実施例 1 3 : 4 週の安定性研究 ]

( a ) 溶液の製造および特徴付け

【 0 2 7 6 】

## 【表 3】

材料	
亜塩素酸ナトリウム（固体）	Clariant
亜塩素酸ナトリウム（液体，25%）	Merck
塩化ナトリウム	Merck
塩素酸ナトリウム	Sigma-Aldrich, A.C.S.,
無水硫酸ナトリウム	Sigma-Aldrich, A.C.S.,
無水炭酸ナトリウム	Merck
1 N の水酸化ナトリウム	Merck, TitriPur (商標),
無水リン酸水素二ナトリウム	Merck
リン酸二水素ナトリウム一水和物	Merck
注射用水（WFI）	Fresenius

10

## 【0277】

## 浸透圧ストレスの考慮

20

理想的でない挙動のせいで、塩溶液の「実際の」（実験の）浸透圧は、必要な正確性ではモル濃度から算出できない。従って、溶液の浸透圧（オスモル濃度）の実験値は、約 - 5 ~ - 10 % ずつ理論値（オスモル濃度）から逸脱すると予想される。生理食塩水（0.9 % 塩化ナトリウム）のオスモル濃度について報告される典型的な理論値は、 $308 \text{ mosmol/L}$  である。これは、 $310.8 \text{ mosmol/kg}$  のオスモル濃度に相当するはずである。これは、「実際の」値であることが通常仮定される。

## 【0278】

WF10 の特定のオスモル濃度は、実験値として  $290 \sim 330 \text{ mosmol/kg}$  である（平均：310）。これは、みかけ上、生理食塩水の値に適合し、 $308 \text{ mosmol/L}$ （オスモル濃度）または  $310.8 \text{ mosmol/kg}$ （オスモル濃度）である。しかし、生理食塩水について、実際の値は、 $287 \text{ mosmol/kg}$ （ $290$ ； $287$ ； $284$  から平均）であることが実験的に確認された。

30

## 【0279】

浸透圧ストレスを回避するために、製造すべき溶液のオスモル濃度を、理想的な WF10 の値（ $310 \text{ mosmol/kg}$  であった）に近くなるように設計して、生理食塩水の値（ $287 \text{ mosmol/kg}$  である）からの相違を最小にするようにした。これは、過度の実験作業によってのみ可能になった。

## 【0280】

サンプル 1： 亜塩素酸塩なしの等張性 WF10（このサンプルで呼ばれる TCDO は、OXO-K993 であったことに注意）

40

## 【0281】

【表 4】

出発濃度：亜塩素酸塩なしのTCDO (y TCDO)

塩	重量 [ g ]
亜塩素酸ナトリウム (固体)	0
塩化ナトリウム	1.649
塩素酸ナトリウム	0.957
硫酸ナトリウム*	0.518
炭酸ナトリウム*	0.353
1 Nの水酸化ナトリウム	6.0 mL
水 <sup>#</sup> 総量にするため	50.0

\*無水；<sup>#</sup>注射用水

【0282】

7.84 gのy TCDOを、注射用水に希釈して、50.0 mLの最終容積にした。

【0283】

サンプル2： 塩素酸塩なしの等張性WF10（このサンプル中で呼ばれるTCDOはOXO-K993であったことに注意）

【0284】

【表 5】

出発濃度：塩素酸塩なしのTCDO (z TCDO)

塩	重量 [ g ]
亜塩素酸ナトリウム (固体)	3.540
塩化ナトリウム	1.295
塩素酸ナトリウム	0
硫酸ナトリウム*	0.394
炭酸ナトリウム*	0.141
1 Nの水酸化ナトリウム	6.0 mL
水 <sup>#</sup> 総量にするため	50.0

\*無水；<sup>#</sup>注射用水

【0285】

5.44 gのz TCDOを注射用水に希釈して、50.0 mLの最終容積にした。

【0286】

サンプル3：等張性非緩衝化塩素酸塩ClO<sub>3</sub><sup>-</sup>

883 mgのナトリウム塩素酸塩（662.2 mgの塩素酸塩に等価である）を50 gの注射用水に溶解した。

10

20

30

40

50



【0287】

サンプル4：pH7.4まで緩衝化した等張性亜塩素酸塩

(i)リン酸塩緩衝液pH7.2

【0288】

溶液1：2.84gのリン酸水素二ナトリウム( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ，無水)を、100gの注射用水に溶解した。

【0289】

溶液2：2.76gのリン酸二水素ナトリウム( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )を、100gの注射用水に溶解した。

【0290】

緩衝液pH7.2：ガラス電極の制御下、溶液2を、pHが7.21に達するまで溶液1に添加した。

【0291】

オスモル濃度：403mosmol/kg(400；406から平均)。

【0292】

(ii)亜塩素酸ナトリウム溶液

【0293】

9.0gの市販の亜塩素酸ナトリウム溶液25(wt/wt)%を、93gの注射用水で希釈した。

【0294】

オスモル濃度：506.5mosmol/kg(504；509から平均)

【0295】

(iii)等張性リン酸塩緩衝液pH7.2

【0296】

(a)由来の38.0gのリン酸塩緩衝液(pH7.2)は、最大50.0gまでの注射用水でできていた。

【0297】

オスモル濃度：310mosmol/kg(309；310；311から平均)。

【0298】

(iv)等張性亜塩素酸ナトリウム溶液

【0299】

(ii)由来の30.3gの亜塩素酸ナトリウム溶液は、50.0gの注射用水でできていた。

【0300】

オスモル濃度：294.7mosmol/kg(293；295；296から平均)

【0301】

(v)pH7.4で緩衝化した等張性亜塩素酸塩溶液緩衝液

【0302】

ガラス電極の制御下で、(iii)由来の等張性リン酸塩緩衝液pH7.2を、pHが7.39に達するまで、(iv)由来の等張性亜塩素酸ナトリウム溶液(50g)に添加した。

【0303】

調製された溶液の分析的な特徴付けは、表3に報告する。

【0304】

(b)調製された溶液をカプセル化するリボソームの調製

リボソームサンプルは、以下のリン脂質のうちの1つまたは2つを用いて調製した：

・1,2-ジミリスチル-sn-グリセロ-3-ホスホコリンDMP(粉末としてLipoid GmbHから購入(LIPOID PC 14:0/14:0))、その801mgを60mLのクロロホルム(13.35mg/mL)に溶解した

・1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン DPPC(粉末として

10

20

30

40

50

、Lipoid GmbHから購入（LIPOID PC 16:0/16:0）、その10.617gを、126mLのクロロホルム（84.26mg/mL）中に溶解した・水素添加ホスファチジルコリン（ダイズ）Hydro Soy PC（粉末としてLipoid GmbH（LIPOID S PC-3）から購入）、その1,208mgを25mLのクロロホルムに溶解した（48.32mg/mL）。

#### 【0305】

サンプル1～4を、上述の脂質中にカプセル化した。浸透圧ストレス（内側対外側）を回避するために、これらの溶液は、等張性にした（約300mosmol/kg）。さらに、1つのサンプルについては、WF10のi.v.溶液（Immunokine（商標））（Pharma Hameln, Germanyが製造）を用いた。また、0.9%の生理食塩水溶液を塩化ナトリウムおよび脱イオン水から調製した（NaClは、VWR, GPR Rectapure）。

10

#### 【0306】

13のリボソームサンプルを、実験のために調製し、以下のように特定した：

#### 【0307】

#### 【表6】

名称	内容	脂質
サンプル5	サンプル2	DPPC
サンプル6	サンプル3	DPPC
サンプル7	サンプル1	DPPC
サンプル8	サンプル4	DPPC
サンプル9	サンプル2	DPPC/DMPC(9 mol/1 mol)
サンプル10	サンプル3	DPPC/DMPC(9 mol/1 mol)
サンプル11	サンプル1	DPPC/DMPC(9 mol/1 mol)
サンプル12	サンプル4	DPPC/DMPC(9 mol/1 mol)
サンプル13	サンプル2	Hydro Soy PC(S PC-3)
サンプル14	サンプル3	Hydro Soy PC(S PC-3)
サンプル15	サンプル1	Hydro Soy PC(S PC-3)
サンプル16	サンプル4	Hydro Soy PC(S PC-3)
サンプル17	WF10	Hydro Soy PC(S PC-3)

20

30

#### 【0308】

##### サンプル調製物

サンプルは、実施例6に一般的に記載される手順を（ある程度改変して）用いて、調製した。正確なパラメーターを下の小区分に示す。

#### 【0309】

##### 調製の時系列

以下は、全体のサンプル調製の順序を示す：

2012年9月5日、サンプル5、6、7、9、10および11についてエバポレーション、水和および押し出し

2012年9月6日、サンプル8、12、13、14、15、16および17についてエバポレーション、水和および押し出し

40

2012年9月10日、サンプル5～8の透析

2012年9月11日、サンプル9～12の透析

2012年9月12日、サンプル13～17の透析

2012年9月14日、サンプル17の透析

#### 【0310】

全てのサンプルまたは部分的に仕上げたサンプルを、それぞれ調製の終わりの時点で、または種々の調製工程の間に、冷蔵庫（1～4）に保管した。

#### 【0311】

エバポレーションおよび水和

50

D P P C サンプルについて、2 0 0 0  $\mu$  L の D P P C - クロロホルム溶液 ( 8 4 . 2 6 m g / m L ) をエバポレートして、5 7 4  $\mu$  L の対応するイオン - 混合物で水和した。

【 0 3 1 2 】

D P P C / D M P C サンプルを、1 3 0 0  $\mu$  L の D P P C - クロロホルム溶液および 2 0 0 0  $\mu$  L の D M P C - クロロホルム溶液 ( 1 3 . 3 5 m g / m L ) をエバポレートすることによって調製した。6 3 9 0  $\mu$  L の対応するイオン - 混合物を、水和のために用いた。

【 0 3 1 3 】

両方の場合とも、水和は 4 7 で行い、5 分未満継続した。

【 0 3 1 4 】

ヒドロ・ソイ ( h y d r o s o y ) P C サンプルについて、水和温度は 6 0 に設定したが、その手順の期間は 5 分未満であり、同様に、4 0 0 0  $\mu$  L の脂質 - クロロホルム溶液 ( 4 8 . 3 2 m g / m L ) を水和の前にエバポレートして、水和は 6 1 7 0  $\mu$  L の対応するイオン - 混合物で行った。

【 0 3 1 5 】

押し出し

押し出しは、D P P C および D P P C / D M P C サンプルについては 4 7 、ならびにヒドロ・ソイ ( h y d r o s o y ) P C サンプルについては 6 0 の温度で行った。1 0 連続の押し出し工程を全てのサンプルについて適用したが、ただしサンプル 1 7 では、9 連続工程を適用した。これらの工程の全体的な期間は、全てのサンプルについて 1 5 分未満であったが、ただしサンプル 1 3 、1 4 、および 1 6 では、2 5 分未満であった。

【 0 3 1 6 】

透析

透析媒体は、5 0 0 0 m L のメスフラスコに 4 5 . 0 g の N a C l を添加することによって調製した 0 . 9 % の生理食塩水溶液であって、次にこれを、脱イオン水を用いて最終容積にした。

【 0 3 1 7 】

全てのサンプルは、3 ~ 1 2 m L の透析フレーム中で透析した。5 連続の工程を行った ( 各々、9 0 0 m L の透析媒体および少なくとも 4 5 分の期間を使用 ) 。微小透析を利用する新しい透析方法 ( R o t h M i n i - D i a l y z e r ) が利用可能であることに注意のこと。これには、わずか 1 0 0  $\mu$  L の範囲のサンプル容積 ( すなわち、リボソーム調製物 ) および 1 ~ 2 m L の範囲の透析容積 ( すなわち、生理食塩水 ) しか必要としない。この方法を用いることで、以前の方法に比較して約 1 0 倍の係数で定量限界の増強が得られる。

【 0 3 1 8 】

4 週保管

実施例 1 1 に記載のような L T S - 設定を、以下の一般的な方法によって置き換えた : 透析後、サンプルを、透析フレームから取り出して、適切であると思われるバイアルには何にでも保管した。リボソームをそれらの外側媒体から分離することは、試験日に行われ、ここではサンプルの画分を取り出して、微小透析に供し、続いて透析液中で可能性として漏出された構成要素をモニターした。詳細は以下に示す。

【 0 3 1 9 】

2 0 1 2 年 9 月 1 7 日に、各々のサンプルの 4 m L を、等しく、4 つの 1 . 5 m L の容器に分けた ( 各々 1 m L ) 。これらの容器のうち 2 つ ( これは次に 1 ~ 4 で冷蔵庫に保管し ) 、一方で他の 2 つは、室温に残しておいた。同じ温度で保管した全ての容器を、適切に表示して、5 分ごとに温度を記録するようにプログラムした温度自動記録装置と一緒に同じ容器に入れた。その後、その容器を密閉して、それぞれの温度で保管した。この自動記録装置のデータは、冷蔵庫のサンプルについて 1 ~ 4 と、室温で保管したサンプルについての 2 1 ~ 2 3 との間の一定温度を記録した。

【 0 3 2 0 】

10

20

30

40

50

実験開始の時点で全てのサンプルが完全であることを確実にするために、次のセクションに記載のように、 $100\mu\text{L}$ のサンプル容積を取り出して、外側媒体を分けた。次いで、これらのサンプルを、 $-25$  で保管して、実験の後に他のサンプルとともに $\alpha$ -トリジン - 分析を行った。

#### 【0321】

容器は、2012年10月24日に再度開けて、 $100\text{mL}$ のサンプルを各々の容器から取り出して、外側サンプル媒体の $\alpha$ -トリジン - 分析を行った。その手順は以下の小区分に記載する。

#### 【0322】

##### 外側媒体の分離および分析

前に述べたように、かつ実施例8および11に記載のLTS設定とは対照的に、サンプルは、LTS実験の間、透析チャンバには保管せず、適切な容器に保管した。従って、漏出された物質が外側媒体で検出される前に、それらの外側媒体からリボソームを分離することが必要であった。この分離のために、最大容積が $100\mu\text{L}$ である小さい透析ユニットを用いた (ZelluTrans/Roth Mini-Dialyzer, MWCO 12000, Carl Roth, 製品番号: 4775.1)。この透析は、透析媒体として $1500\mu\text{L}$ の $0.9\%$ 生理食塩水溶液に対して行い、閉じた $2\text{mL}$ の反応容器で行った。現行の実験については、 $100\mu\text{L}$ の各々のサンプルを、2012年の10月24日に透析ユニットに満たして、対応する温度 (室温または $1\sim 4$  のいずれか) に、2012年10月29日までおいておいた。この日に、透析ユニットを、別の $2\text{mL}$ の反応容器に移して、 $1500\mu\text{L}$ の $0.9\%$ 生理食塩水溶液を満たした。「古い方」の $2\text{mL}$ 容器は、次に $1\sim 4$  で一晩保管した。「新しい方」の設定は、 $60$  に加熱して一晩おいて、完全に漏出させた。

#### 【0323】

最初のサンプルは、2012年9月17日に採取し、この日に一晩の分離手順に供した。翌日、透析ユニットを取り出して、分離した外側媒体を含むバイアルを、他のサンプルとともに分析するために、 $-25$  で保管した。

#### 【0324】

2012年10月30日に、透析媒体の $\alpha$ -トリジン - 分析を、実施例7、方法Bの $\alpha$ -トリジン - 手順の説明に従って、3つ全ての事例で行った (最初の完全性試験、真ん中の保管後、ならびに真ん中の保管および加熱後)。

#### 【0325】

構成要素の濃度は、算出されず、代わりに、漏出したか、しなかったかを決定するために絶対値をモニタリングすることに手順を制限した。これは、全ての定量方法が純粋なWF10 (ほとんどのカプセル化された物質とは異なる亜塩素酸塩/塩素酸塩含量を有する) を参照するという事実に起因する。強制された完全な漏出の前後の測定からの吸収のデータを比較することによって、漏出の程度のおおまかな推測が得られる。

#### 【0326】

##### 結果および分析

吸光度の値は、お互いの中で比較可能であったが、 $1\text{cm}$ という標準の光学経路長に対しては正規化しなかった。吸収の測定のためには、実施例14で規定した検出限界 (LOD) ( $0.095$ ) を用いた。吸光度の値がLODより低い場合、漏出は、検出するには低すぎるか、または、まったく生じなかった。表4は、吸収の測定の数値を示す。

#### 【0327】

各々のサンプルの値は、2つの別々に保管された容器の平均であった。強制した漏出による結果が含まれ、これは、全ての他のシグナルと比較して巨大なシグナルを示しており、このことは、全てのサンプルが適切に充填されたりリボソームを含んでいたことを示している。全ての最初の測定からのシグナルは、LODより低く、従って既に含まれているサンプルは、外側媒体に物質を漏出しなかったことが例示される。個々の結果に関して、以下の3つの視点を考慮しなければならない: 保管温度、脂質構成要素、および封入された

物質。

#### 【0328】

保管温度による結果

保管温度は、サンプルの漏出挙動に対して最強の影響を有した。全ての漏出は、1例を除いて、室温で保管したサンプルで生じ、唯一の漏出している冷蔵庫のサンプルの場合（サンプル8）、室温でのその漏出は、試験した全てのサンプルのうち最強のシグナルを示した。

#### 【0329】

封入された物質による結果

L O Dを超えるシグナルを示した全てのリボソームを、亜塩素酸塩または塩素酸塩で充填した。全ての室温シナリオで漏出した塩素酸塩を充填されたサンプル、および冷蔵庫の温度の1サンプル（サンプル8）でさえL O Dをわずかに超えていた。亜塩素酸塩については、1つ（サンプル14）を除いて室温サンプルの全てが超えていた。

10

#### 【0330】

脂質による結果

漏出は、D P P C（41）およびD M P C（23）よりも高いP T T（55）を有するヒドロ・ソイ（hydro soy）P C（S P C - 3）でできたサンプルではかなり弱かった。D P P C / D M P C混合物の場合、P T Tは、完全には規定されておらず、D P P CのP T TとD M P CのP T Tとの間の温度範囲にまたがる。

20

#### 【0331】

[ 実施例14：W F 10カプセル化リボソームに対するオスモル濃度効果 ]

脂質膜は、特定の程度まで、水のような低分子に透過性であるが、大きい分子および荷電された分子は、このような膜を通過できないか、通過はかなり低い率であることが公知である。浸透圧はこの効果の直接的な結果である。種々の濃度の浸透圧粒子（例えば、より大きい分子）を含む2つの水性リザーバの間に半透過性の境界が存在するようである。このシステムは、両方の濃度を平衡にする傾向であり、これは、低い濃度のリザーバから水分子で高い濃度の方のリザーバを希釈することによってのみ可能である。溶解した粒子を低濃度リザーバに移動することは、粒子が境界を通過できないせいで、不可能な濃度まで上昇させる。「侵入する」水分子の結果によって、高濃度の方のリザーバの容積が増大し、これが、リザーバの壁に対する圧力をもたらす。最終的に、この圧力は、壁が耐えるには高すぎる圧力となり、壁が破裂する。

30

#### 【0332】

リボソームの二重層の外皮（h u l l）は、半透過性膜であり、従って、浸透圧の効果を受け易い。当業者は、浸透圧の勾配が、リボソームの漏出を誘導し得るか、またはリボソームを破裂さえし得ると示唆する。簡易な実験では、W F 10充填のリボソームの漏出挙動が研究され、ここでは濃縮されたW F 10を用いて、周囲の生理食塩水媒体に対して内側のオスモル濃度を増大した。

#### 【0333】

本研究の目的は、浸透圧効果のもとでの漏出パラメーターについて詳細な情報を得ることではなく、このような条件下での漏出の一般的な傾向を見出すことであった。

40

#### 【0334】

サンプル

以下の方法でN u v o R e s e a r c h G m b Hから提供されたO K O - K 9 3 3溶液（ロット4053）で調製した2×濃縮または3×濃縮のW F 10を用いて、2つのサンプルを調製した：

2×W F 10：10 gのO X O - K 9 9 3であって、水を用いて50 mLにした

3×W F 10：15 gのO X O - K 9 9 3であって、水を用いて50 mLにした

#### 【0335】

サンプル調製は、2012年7月4日に開始して、通常の手順に従って行った（実施例6）。2.1 mLの84.26 mg / mLのD P P C - クロロホルム溶液を丸底フラスコ

50

に添加した。これは、177mgという脂質重量に相当する。DPPCは、LIPOID GmbHから購入した。水和は、上記のように調製した6.0mLのそれぞれのWF10濃縮物(2×または3×)を用いて行った。水和過程の間、サンプルを約5分間、46±3℃まで加熱した。押し出しは、50±3で行い、約20分続け、これには全部で10連続の通過を含んだ。その後に、サンプルを冷蔵庫の中で、6で一晩保管した。透析工程は、5000mLの溶液あたり90.034gのNaCl(2×WF10)および135.063gのNaCl(3×WF10)を用いて調製した、900mLの生理食塩水溶液中で行った。95、80、80、60および80分続く5連続工程を行った。その後に、サンプルを透析フレームから取り出して、6で保管した。

#### 【0336】

##### HRL漏出

HRL漏出試験は、5000mLの溶液あたり45.016gのNaClを有する0.9%の生理食塩水溶液中で50分の透析工程で2012年7月6日に開始して、リボソームの高濃縮された保管媒体を取り出した。その後に、この手順は、室温22で行うように、熱浴を用いることなく、実施例12に記載のように行った。通常どおり、両方のサンプルを、実験の前に分けて、2つの並行したメスシリンダーに処理して、その結果、各々のサンプルについて、2つのデータセットが利用可能となり、結果のセクションにプロットした。

#### 【0337】

##### 封入された容積の決定

サンプル中に封入されたWF10の容積を決定するために、完全な漏出を、上記のHRL設定を60まで数時間加熱することによって誘導した。次いで、周囲の生理食塩水媒体のo-トリジン-分析を用いてWF10含量を評価した。

#### 【0338】

##### 結果&評価

実験の間に採取した媒体サンプルの評価は、実施例7(方法B)に記載のとおり行った。実際、WF10濃度は、保管媒体中で決定されたWF10濃度から放出されたWF10量を算出した場合、通常よりも2または3倍高いと考えられた。図16は、サンプル全体の容積に関して漏出したWF10に関する結果を図示する。漏出は1~2時間後に検出されたことがわかる。全実験期間の間、封入された二倍の濃縮のWF10のうちおよそ5%および三倍濃縮のWF10のうちおよそ18%が放出された。全ての漏出したWF10のほとんどが、漏出の開始の最初の6時間の間に、放出された。その後の4日の間に、変化は小さく、漏出が停止されるか、または極めて低速で続けられるかについては言及できない。

#### 【0339】

##### [実施例15:エタノール注入法を用いるリボソームの調製]

リボソームを含有するWF10を、以下の脂質組成を含む直交流エタノール注入方法を用いて調製した: 1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DPPC)、DPPCと、1, 2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DMPC)の10%画分、DPPCと、1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホグリセロール(DPPG)の10%画分、およびDPPCと、1, 2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホグリセロール(DMPG)の10%画分。荷電された脂質(DPPGおよびDMPG)を、処理および保管の間にリボソームの凝集を防ぐために添加した。

#### 【0340】

図17は、エタノール注入法を用いるリボソームの調製の模式図を示す。この方法によって、許容されるサイズ分布を有しており、所望のサイズの小型の単層リボソームの直接形成が生じる。

#### 【0341】

適用される直交流エタノール注入方法の特徴としては以下が挙げられる

10

20

30

40

50

バッチサイズが、サンプル容器の容積によって、決定される（限定されない）  
得られたリポソームは、ただちに制御されたサイズおよびサイズ分布のものである。  
最小の熱ストレス

外側相は、交換されなければならない、かつ残りのエタノールは除去されなければならない：

限外濾過を行って、一次生成物を濃縮する

ダイアフィルトレーションは

生理食塩水で外側相（WF 10）を交換する

外側相から、および封入されたWF 10 / エタノール混合物からエタノールを除去する

10

#### 【0342】

材料および方法

DPPC、DMPC、DMPGおよびDPPGは、Lipoid GmbH（ドイツ）から供給された。リポソーム構成要素を溶解するための96%の欧州薬局方の等級のエタノールは、Merck KGaA（ドイツ）から購入した。

#### 【0343】

ベシクル調製のための水相は、WF 10 溶液（Nuvo Manufacturing GmbHの指示による、活性成分OXO-K 993の水の中の10%希釈）であった。0.154 M（生理学的）NaCl 溶液を、希釈のための水相として用いた。全ての試薬は、最高の純度で、かつ必要ならばUSPまたは欧州薬局方の等級で購入した。

20

#### 【0344】

リポソームは、Wagnerら, Journal of Liposome Research, 2002, 12(3): 259-270に記載のように、Polymunのリポソーム技術（直交流注入技術）を用いて、生成した。超/ダイアフィルトレーション（小規模）を、Sartocoon Slice Cassette 100kD UF膜（Sartorius Stedim Biotech GmbH, ドイツ）を用いて行った。

#### 【0345】

リポソームサイズの決定のための測定は、Dynamic-Laser-Light-Scatteringによって、Malvern Nano ZSを用いて行った。このシステムは、633 nmの波長の4 mW Helium/Neon Laserを装備しており、171°の検出角度で非侵襲的な後方散乱技術でリポソームサンプルを測定する。リポソームを水相中で最適のリポソーム濃度に達するまで希釈して、実験を25℃で行った。結果は、リポソームの均一性を決定するための多分散性指数とともに、リポソーム懸濁物の平均直径（z-平均の平均）で示す。さらに、ゼータ電位の決定はまた、Malvern Nano ZSで行った。従って、サンプルは、0.154 MのNaCl 溶液で希釈した。

30

#### 【0346】

DPPCの定量は、逆相HPLCで行った。

#### 【0347】

WF 10の定量は、442 nmで吸光度を測定する、o-トリジン方法で行った（実施例7, 方法Bを参照）。

40

#### 【0348】

実験および結果

全ての実験は、Polymunのリポソーム技術で行った。全ての実験に用いた注入モジュールは、350 μmの注入穴直径があった。発達の経過中に、純粋なDPPCおよびDPPC / DMPCリポソームは、小さいゼータ電位を示した。従って、2つのさらなる脂質処方物（DPPC / DMPG, DPPC / DPPG）を用いた。いくつかの処理パラメーターを変化させて、リポソーム特性の効果を研究し、最終製品の要件を満たすように処理パラメーターを最適化した。

50

## 【 0 3 4 9 】

純粋な D P P C および D P P C / D M P C リボソームのためのプロセス開発の出発条件は以下であった：

水相の温度：40

脂質 - エタノール溶液の温度：40

ベシクル調製用の水相：W F 10 溶液

希釈用の水相：0 . 1 5 4 M ( 生理学的 ) N a C l

エタノール相 ( 脂質 - エタノール溶液 ) : 1 0 0 0 m L の水相について 7 5 m L ( 総生成容積 : 1 0 7 5 m L )

W F 10 濃度 ( 中間容積 ) : 7 9 . 1  $\mu$  g / m L

10

## 【 0 3 5 0 】

D P P C / D M P G および D P P C / D P P G リボソームのためのプロセス開発の出発条件は以下であった：

水相の温度：55

脂質 - エタノール溶液の温度：55

ベシクル調製用の水相：W F 10 溶液

希釈用の水相：0 . 1 5 4 M ( 生理学的 ) N a C l

エタノール相 ( 脂質 - エタノール溶液 ) : 1 0 0 0 m L の水相について 7 5 m L ( 総生成容積 : 1 0 7 5 m L )

W F 10 濃度 ( 中間容積 ) : 7 9 . 1  $\mu$  g / m L

20

## 【 0 3 5 1 】

表 5 は、エタノール注入方法を用いて調製された種々の W F 10 - カプセル化リボソームについてのデータを示しており、これには、リボソームのサイズ、多分散性指数 ( P d I )、D P P C 定量および亜塩素酸塩定量が含まれる。表 6 は、表 5 で報告された実験の繰り返しの実行について同じ結果を示す。図 18 および図 19 は、それぞれ表 5 および 6 で報告された実験についてのダイアフィルトレーション過程の間に濾液中に収集された亜塩素酸塩の量を示す。表 7 は、エタノール注入方法を用いて調製され、表 5 および 6 について調製されたリボソームと比較して W F 10 の 2 x の濃度を含んでいる種々の W F 10 カプセル化リボソームについてのデータを示し、このデータとしては、リボソームのサイズ、多分散性指数 ( P d I )、D P P C 定量および亜塩素酸塩定量が挙げられ、図 20 は、同じ 2 x の W F 10 リボソームについてのダイアフィルトレーション過程の間に濾液中に収集された亜塩素酸塩の量を示す。

30

## 【 0 3 5 2 】

表 8 は、表 6 および 7 で報告されるサンプルで行った長期安定性研究の結果を示す。

## 【 0 3 5 3 】

[ 実施例 16 : コラーゲン誘発性動脈炎 ( C I A ) 動物モデル研究 ]

雌性 D B A / 1 マウスを、0 日目にコラーゲン I I 溶液で感作して、21 日目にブーストした。動物を、コラーゲン誘発性動脈炎 ( C I A ) の臨床兆候について 17 日目からスコア付けした。評価されたスコアが 5 の値を超えた場合、C I A が樹立されたとみなした。免疫後最初の 35 日以内に C I A を発症した動物を本研究に含んだ。この時点より後に C I A を発症した動物は除外した。C I A 発症の日から動物を、W F 10 ( 0 . 2 5 m l / k g )、リボソーム型の W F 10 ( L i p o W F 10 )、または N a C l で処置した。スコアリングは、C I A 発症後全部で 21 日間行った。この期間後、動物を屠殺した。

40

## 【 0 3 5 4 】

研究場所：

Medizinisch - Experimentelles Zentrum der  
Medizinischen Fakultät Leipzig, Liebigstr.  
26a, 04103 Leipzig; Max - Buerger - Forschungszentrum (MBZ),  
Johannisallee 30, 04103 Leipzig

50



## 【0355】

方法：

雌性DAB / 1マウス (Janvier) , 7 ~ 8週齢 (体重約17g (±2)) を、移送後4週間、施設に順応させた。動物は、専門的で資格条件を満たした施設 (Medizinisch - Experimentelles Zentrum (MEZ) Universität Leipzig, Medizinische Fakultät) で飼育した。動物は耳のマーキングで特定した。

## 【0356】

全てのマウスは、0日目に100 µlのコラーゲン - CFA - エマルジョンの皮内注射によって免疫した (CFAは、完全フロイントアジュバンド (complete Freund's adjuvant) を表す)。21日目に、CIAを、100 µlのコラーゲン - IFA - エマルジョン (不完全フロイントアジュバンドのIFA標準) を注射することによってブーストした。

## 【0357】

動物が5のスコア閾値を超えた時、CIAが確立されたとみなした。その日に薬理的処置を開始して、種々の時間間隔にわたって行った。8匹のマウスが、CIAの発現から1、3および5日目に体重あたり0.25 ml / kgの投薬量で100 µlのi.v.のWF10を与えられた。11匹のマウスが、100 µlのi.v.のS\_\_PC - 3 - LipowF10を投与されて、体重あたり約0.25 ml / kgというWF10投薬量を与えられ、12匹のマウスは、100 µlのi.v.のS\_\_PC - 3 - LipowF10 (1 : 10希釈) を投与されて、体重あたり約0.025 ml / kgのWF10投薬量を与えられた。コントロールの群は、200 µlのNaClを投与された10匹のマウスから構成された。全ての投薬は、CIAの発現の1、3および5日目に行われた。リボソーム調製物「S\_\_PC - 3 - LipowF10」は、WF10を内部相として、および生理食塩水を外側相として、および水素添加大豆リン脂質を脂質として含んだ (実施例9を参照のこと)。リボソームは、5%というWF10の封入率を有し、これによって100 µlの調製物中で5 µlのWF10というおよその容積が得られる。S\_\_PC - 3 - LipowF10 (1 : 10希釈) は、もとのリボソーム調製物の倍数10の希釈であって、結果として、WF10の絶対量は減少したが、リボソームベシクルは本質的に純粋なWF10を含み続けると予想される。免疫後最初の35日以内にCIAを発症した動物は、この研究に含んだ。この時点より後にCIAを発症した動物は排除した。

## 【0358】

最初のコラーゲン注射から測定して17日目に開始して、全てのマウスを毎日スコア付した。動物のスコアを評価した人は、薬理的な処置に関しては盲検であった。全ての四肢を赤みと腫脹について検査した。1つの脚あたりの最大スコアは、15 / 日であって、1匹の動物あたりの最大スコアは、トータルで60 / 日であった。これらのシグナルの値から、平均値を各々の群について算出した。

## 【0359】

結果

最初の免疫後17日目に開始して、動物をコラーゲン誘発性動脈炎 (CIA) の兆候についてスコア付けした。動物のスコアが5の値を超えた場合、CIAが誘発されたとみなし、この日をこの動物のd1とした。同様に、CIAの発現のn日後を、各々の動物についてdnとした。図21は、d0 (CIAの発現の1日前) からd22までの実験の間のCIAスコアの平均値を示す。

## 【0360】

CIA実験では、処置の効果は通常、d12あたりで始まり、分離はd15 ~ d17あたりで最強である。その後、疾患スコアは、モデルに起因して下がる。図22は、d16についての平均値スコアを示す。

## 【0361】

全ての刊行物、特許および特許出願の関連部分は本明細書において、各々の個々の刊行

10

20

30

40

50

物、特許または特許出願が、参照によって組み込まれるように専門的かつ個々に示されるのと同じ程度まで参照によって本明細書に援用される。本出願における用語が、参照によって本明細書に援用される文献中で異なった定義で見出される場合、本明細書に示される定義がその用語についての定義として機能するものとする。

【 0 3 6 2 】

【 表 7 】

表 1

略称	C A S <sup>1</sup>	名称	種類
<u>DDPC</u>	3436-44-0	1, 2-ジデカノイル- <i>s n</i> -グリセロ-3-ホスホコリン	<u>ホスファチジルコリン</u>
<u>DEPA-NA</u>	80724-31-8	1, 2-ジエルコイル- <i>s n</i> -グリセロ-3-リン酸塩 (ナトリウム塩)	<u>ホスファチジン酸</u>
<u>DEPC</u>	56649-39-9	1, 2-ジエルコイル- <i>s n</i> -グリセロ-3-ホスホコリン	<u>ホスファチジルコリン</u>
<u>DEPE</u>	988-07-2	1, 2-ジエルコイル- <i>s n</i> -グリセロ-3-ホスホエタノールアミン	<u>ホスファチジルエタノールアミン</u>
<u>DEPG-NA</u>		1, 2-ジエルコイル- <i>s n</i> -グリセロ-3 [ホスホ <i>r a c</i> - (1-グリセロール...) (ナトリウム塩)]	<u>ホスファチジルグリセロール</u>
<u>DLOPC</u>	998-06-1	1, 2-ジリノレオイル- <i>s n</i> -グリセロ-3-ホスホコリン	<u>ホスファチジルコリン</u>
<u>DLPA-NA</u>		1, 2-ジラウロイル- <i>s n</i> -グリセロ-3-リン酸塩 (ナトリウム塩)	<u>ホスファチジン酸</u>
<u>DLPC</u>	18194-25-7	1, 2-ジラウロイル- <i>s n</i> -グリセロ-3-ホスホコリン	<u>ホスファチジルコリン</u>
<u>DLPE</u>		1, 2-ジラウロイル- <i>s n</i> -グリセロ-3-ホスホエタノールアミン	<u>ホスファチジルエタノールアミン</u>
<u>DLPG-NA</u>		1, 2-ジラウロイル- <i>s n</i> -グリセロ-3 [ホスホ <i>r a c</i> - (1-グリセロール...) (ナトリウム塩)]	<u>ホスファチジルグリセロール</u>
<u>DLPG-NH</u> <u>4</u>		1, 2-ジラウロイル- <i>s n</i> -グリセロ-3 [ホスホ <i>r a c</i> - (1-グリセロール...) (アンモニウム塩)]	<u>ホスファチジルグリセロール</u>
<u>DLPS-NA</u>		1, 2-ジラウロイル- <i>s n</i> -グリセロ-3-ホスホセリン (ナトリウム塩)	<u>ホスファチジルセリン</u>
<u>DMPA-NA</u>	80724-3	1, 2-ジミリストイル- <i>s n</i> -グリセロ-3-リン酸塩 (ナトリウム塩)	<u>ホスファチジン酸</u>
<u>DMPC</u>	18194-24-6	1, 2-ジミリストイル- <i>s n</i> -グリセロ-3-ホスホコリン	<u>ホスファチジルコリン</u>
<u>DMPE</u>	988-07-2	1, 2-ジミリストイル- <i>s n</i> -グリセロ-3-ホスホエタノールアミン	<u>ホスファチジルエタノールアミン</u>
<u>DMPG-NA</u>	67232-80-8	1, 2-ジミリストイル- <i>s n</i> -グリセロ-3 [ホスホ <i>r a c</i> - (1-グリセロール...) (ナトリウム塩)]	<u>ホスファチジルグリセロール</u>
<u>DMPG-NH</u> <u>4</u>		1, 2-ジミリストイル- <i>s n</i> -グリセロ-3 [ホスホ <i>r a c</i> - (1-グリセロール...) (アンモニウム塩)]	<u>ホスファチジルグリセロール</u>
<u>DSPG-NH</u> <u>4</u>	108347-80-4	1, 2-ジステアロイル- <i>s n</i> -グリセロ-3 [ホスホ <i>r a c</i> - (1-グリセロール...) (アンモニウム塩)]	<u>ホスファチジルグリセロール</u>

10

20

30

40

【 0 3 6 3 】

## 【表 8】

表 1 (続き)

略称	C A S <sup>1</sup>	名称	種類
<u>DMPG-NH</u> <u>4/NA</u>		1, 2-ジミリスチール-s n-グリセロール 3 [ホスホ r a c- (1-グリセロール...) (S o d i u m/アンモニウム塩)]	<u>ホスファチジルグリセ</u> <u>ロール</u>
<u>DMPS-NA</u>		1, 2-ジミリスチール-s n-グリセロール 3-ホスホセリン (ナトリウム塩)	<u>ホスファチジルセリン</u>
<u>DOPA-NA</u>		1, 2-ジオレオイル-s n-グリセロール 3-リン酸塩 (ナトリウム塩)	<u>ホスファチジン酸</u>
<u>DOPC</u>	4235-95-4	1, 2-ジオレオイル-s n-グリセロール 3-ホスホコリン	<u>ホスファチジルコリン</u>
<u>DOPE</u>	4004-5-1-	1, 2-ジオレオイル-s n-グリセロール 3-ホスホエタノールアミン	<u>ホスファチジルエタノ</u> <u>ールアミン</u>
<u>DOPG-NA</u>	62700-69-0	1, 2-ジオレオイル-s n-グリセロール 3 [ホスホ r a c- (1-グリセロール...) (ナトリウム塩)]	<u>ホスファチジルグリセ</u> <u>ロール</u>
<u>DOPS-NA</u>	70614-14-1	1, 2-ジオレオイル-s n-グリセロール 3-ホスホセリン (ナトリウム塩)	<u>ホスファチジルセリン</u>
<u>DPPA-NA</u>	71065-87-7	1, 2-ジパルミトイル-s n-グリセロール 3-リン酸塩 (ナトリウム塩)	<u>ホスファチジン酸</u>
<u>DPPC</u>	63-89-8	1, 2-ジパルミトイル-s n-グリセロール 3-ホスホコリン	<u>ホスファチジルコリン</u>
<u>DPPE</u>	923-61-5	1, 2-ジパルミトイル-s n-グリセロール 3-ホスホエタノールアミン	<u>ホスファチジルエタノ</u> <u>ールアミン</u>
<u>DPPG-NA</u>	67232-81-9	1, 2-ジパルミトイル-s n-グリセロール 3 [ホスホ r a c- (1-グリセロール...) (ナトリウム塩)]	<u>ホスファチジルグリセ</u> <u>ロール</u>
<u>DPPG-NH</u> <u>4</u>	73548-70-6	1, 2-ジパルミトイル-s n-グリセロール 3 [ホスホ r a c- (1-グリセロール...) (アンモニウム塩)]	<u>ホスファチジルグリセ</u> <u>ロール</u>
<u>DPPS-NA</u>		1, 2-ジパルミトイル-s n-グリセロール 3-ホスホセリン (ナトリウム塩)	<u>ホスファチジルセリン</u>
<u>DSPA-NA</u>	108321-18-2	1, 2-ジステアロイル-s n-グリセロール 3-リン酸塩 (ナトリウム塩)	<u>ホスファチジン酸</u>
<u>DSPC</u>	816-94-4	1, 2-ジステアロイル-s n-グリセロール 3-ホスホコリン	<u>ホスファチジルコリン</u>
<u>DSPE</u>	1069-79-0	1, 2-ジステアロイル-s n-グリセロール 3-ホスホエタノールアミン	<u>ホスファチジルエタノ</u> <u>ールアミン</u>
<u>DSPG-NA</u>	67232-82-0	1, 2-ジステアロイル-s n-グリセロール 3 [ホスホ r a c- (1-グリセロール...) (ナトリウム塩)]	<u>ホスファチジルグリセ</u> <u>ロール</u>

10

20

30

【表 9】

表 1 (続き)

略称	CAS <sup>1</sup>	名称	種類
DSPS-NA		1, 2-ジステアロイル-s n-グリセ ロ-3-ホスホセリン (ナトリウム塩)	ホスファチジルセ リン
Egg Sphingomyelin empty リボソー ム			
EPC		卵-PC	ホスファチジルコ リン
HEPC		水素添加卵PC	ホスファチジルコ リン
HSPC		高純度水素添加ダイズPC	ホスファチジルコ リン
HSPC		水素添加ダイズPC	ホスファチジルコ リン
LYSOPC MYRISTIC	18194-24-6	1-ミリストイル-s n-グリセロ-3 -ホスホコリン	リゾホスファチジ ルコリン
LYSOPC PALMITIC	17364-16-8	1-パルミトイル-s n-グリセロ-3 -ホスホコリン	リゾホスファチジ ルコリン
LYSOPC STEARIC	19420-57-6	1-ステアロイル-s n-グリセロ-3 -ホスホコリン	リゾホスファチジ ルコリン
Milk Sphingomyelin MPPC		1-ミリストイル-2-パルミトイル- s n-グリセロ-3-ホスホコリン	ホスファチジルコ リン
MSPC		1-ミリストイル-2-ステアロイル- s n-グリセロ-3-ホスホコリン	ホスファチジルコ リン
PMPC		1-パルミトイル-2-ミリストイル- s n-グリセロ-3-ホスホコリン	ホスファチジルコ リン
POPC	26853-31-6	1-パルミトイル-2-オレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン	ホスファチジルコ リン
POPE		1-パルミトイル-2-オレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールア ミン	ホスファチジルエ タノールアミン
POPG-NA	81490-05-3	1-パルミトイル-2-オレオイル-s n-グリセロ-3 [ホスホラセ- (1 -グリセロール)...] (ナトリウム塩)	ホスファチジルグ リセロール
PSPC		1-パルミトイル-2-ステアロイル- s n-グリセロ-3-ホスホコリン	ホスファチジルコ リン
SMPC		1-ステアロイル-2-ミリストイル- s n-グリセロ-3-ホスホコリン	ホスファチジルコ リン
SOPC		1-ステアロイル-2-オレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン	ホスファチジルコ リン
SPPC		1-ステアロイル-2-パルミトイル- s n-グリセロ-3-ホスホコリン	ホスファチジルコ リン

<sup>1</sup> 化学情報検索サービス機関 (CAS) 番号

## 【表 10】

表 2 : DPPC、DPPC/DMPC、水素添加大豆リン脂質 (3-PC3) および 3-PC3/DMPC から調製した WF10 リポソーム

調製	脂質量	WF10 量	押し出し温度 [°C]	タイトな温度	それ以上で漏出する温度 [°C]
DPPC	394mg	13500 $\mu$ L	45°C	38	41
DPPC/DMPC 9:1	143mg/ 15mg	5400 $\mu$ L	45°C	22	38
S-PC3	78mg	2500 $\mu$ L	60°C	50	60
S-PC3/DMPC 3:5	82mg/ 42mg	4184 $\mu$ L	60°C		
S-PC3/DMPC 5:3	25mg/ 42mg	2500 $\mu$ L	60°C		

10

## 【0366】

## 【表 11】

表 3 : 実施例 15 から製造した溶液の分析的特徴付け

サンプル 番号	オスモル濃度 * [mosmol/kg]	活性物質の濃度
1	305(303;307)	
2	301(300;302)	亜塩素酸塩 : 4773 ppm (UV による) (WF10 {4250 ppm} と比較して 1.12 倍)
3	300.5(299;302)	塩素酸塩 : 13844 ppm (計算値) (WF10 {1500 ppm} と比較して 9.23 倍)
4	304(303;303;306)	亜塩素酸塩 : 5887 ppm (UV による) (WF10 {4250 ppm} と比較して 1.39 倍)

20

30

## 【0367】

## 【表 1 2】

表 4：実施例 1 5 からの吸収の測定

サンプル 番号	最初の 試験	冷蔵庫 保管	室内 保管	漏出の 強制
5	< LOD	< LOD	< LOD	3.7623
6	< LOD	< LOD	0.1816	3.7970
7	< LOD	< LOD	< LOD	3.1831
8	< LOD	0.1243	1.1388	3.8322
9	< LOD	< LOD	< LOD	3.6707
10	< LOD	< LOD	0.4243	3.7630
11	< LOD	< LOD	< LOD	3.3011
12	< LOD	< LOD	1.0170	3.8020
13	< LOD	< LOD	< LOD	3.5692
14	< LOD	< LOD	< LOD	3.5893
15	< LOD	< LOD	< LOD	3.5574
16	< LOD	< LOD	0.2286	3.7784
17	< LOD	< LOD	< LOD	3.8766

10

20

## 【 0 3 6 8 】

## 【表 1 3】

表 5

脂質処方物	リポソーム サイズ <sup>*</sup> (nm)	PdI	DPPC 回 収 (%)	亜塩素酸塩 カプセル化率 (%)	亜塩素酸 塩回収 (カプセル化) %	亜塩素酸塩 回収 (カプセル化)* %
DPPC(Int)	308.8	0.375				
DPPC(Ret)	5042	1.000	83.0	93.6	6.4	7.7
DPPC/DMPC(Int)	111.1	0.314				
DPPC/DMPC(Ret)	117.4	0.381	76.1	92.3	4.4	5.8
DPPC/DPPG(Int)	145.8	0.303				
DPPC/DPPG(Ret)	141.6	0.295	65.3	97.6	2.5	3.9
DPPC/DMPG(Int)	128.9	0.306				
DPPC/DMPG (Ret)	129.0	0.277	73.7	97.0	2.5	3.5

I n t = 中間生成物

R e t = 残留 (超/ダイアフィльтраーション後)

\* 100%のDPPC回収と仮定したカプセル化された亜塩素酸塩の理論的回収

10

20

## 【0369】

30

【表 1 4】

表 6

脂質処方物	リポソームサイズ* (nm)	PdI	DPPC 回収 (%)	亜塩素酸塩 カプセル化率 (%)	亜塩素酸塩 回収 (カプセル化) %	亜塩素酸塩 回収 (カプセル化)* %
DPPC (Int)	125.2	0.283				
DPPC (Ret)	309.3	0.466	74.0	94.8	8.8	11.9
DPPC/DMPC (Int)	127.8	0.341				
DPPC/DMPC (Ret)	123.8	0.346	75.5	90.5	4.1	5.4
DPPC/DPPG (Int)	—	—				
DPPC/DPPG (Ret)	147.5	0.258	73.1	95.8	2.1	2.9
DPPC/DMPG (Int)	316.6	0.362				
DPPC/DMPG (Ret)	327.3	0.520	56.9	82.3	2.5	4.4

10

20

I n t = 中間生成物

R e t = 残留 (超／ダイアフィルトレーション後)

\* 100%のDPPC回収と仮定したカプセル化された亜塩素酸塩の理論的回収

【 0 3 7 0 】



## 【表 15】

表7

脂質処方物	リポソーム サイズ (nm)	PdI	DPPC 回収 (%)	亜塩素酸塩 カプセル化率 (%)	亜塩素酸 塩回収 (カプセル化) %	亜塩素酸塩 回収 (カプセル化)* %
DPPC(Int)	124.2	0.317				
DPPC(Ret)	117.7	0.285	66.8	91.6	5.6	8.4
DPPC/DMPC(Int)	118.2	0.283				
DPPC/DMPC(Ret)	118.5	0.319	70.7	53.0	0.7	1.0
DPPC/DPPG(Int)	133.2	0.239				
DPPC/DPPG(Ret)	132.3	0.236	70.0	74.1	1.6	2.3
DPPC/DMPG(Int)	123.5	0.310				
DPPC/DMPG (Ret)	145.2	0.241	71.3	39.4	0.6	0.9

I n t = 中間生成物

R e t = 残留 (超/ダイアフィльтраーション後)

\* 100%のDPPC回収と仮定したカプセル化された亜塩素酸塩の理論的回収

## 【0371】

10

20

30

【表 16】

表 8

WF10 <sup>a</sup> の濃度	脂質（単数または複数）	o-トリジン試験での吸収	保管の期間（日数）	保管の期間（週数）
WF10（1x）	DPPC	<LOD	65	9
WF10（1x）	DPPC, DMPC	<LOD <sup>b</sup>	92	13
WF10（1x）	DPPC, DPPG	<LOD	86	12
WF10（1x）	DPPC, DMPG	<LOD	86	12
WF10（2x）	DPPC	0.170599997	71	10
WF10（2x）	DPPC, DMPC	0.226199995	71	10
WF10（2x）	DPPC, DPPG	<LOD	70	10
WF10（2x）	DPPC, DMPG	0.1307000071	70	10

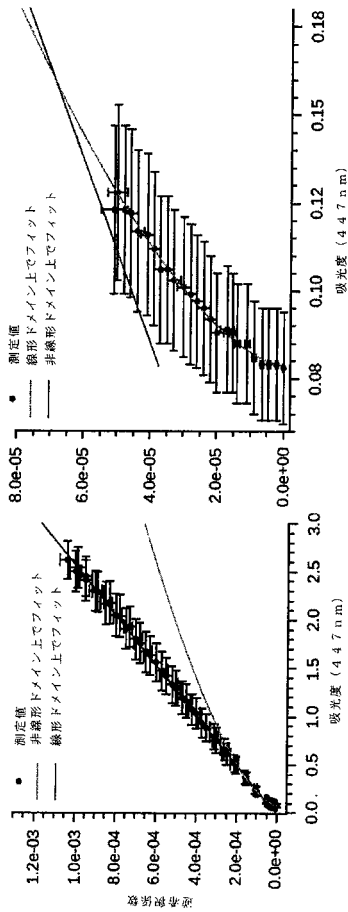
<sup>a</sup> WF10（1x）は、リポソームがWF10を正常な濃度で含んだことを示す。これによって、外側相としての生理食塩水に対する浸透圧の有意な差が回避される。WF10（2x）は、リポソームが2倍の濃度のWF10を含み、外側相の生理食塩水に対して浸透圧ストレスを生じることを示す。

<sup>b</sup> LODは、0.095という吸収の値として確定された。

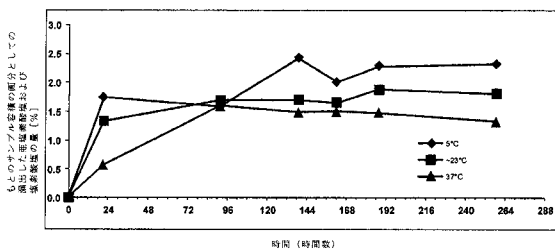
10

20

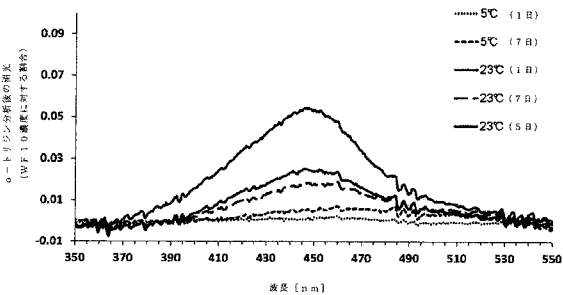
【図 1】



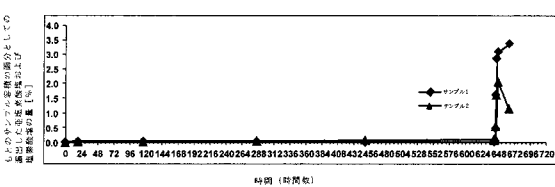
【図 6】



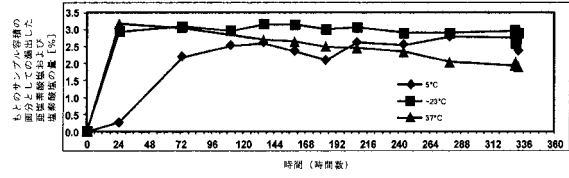
【図 7】



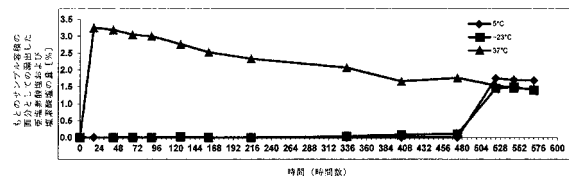
【図 8】



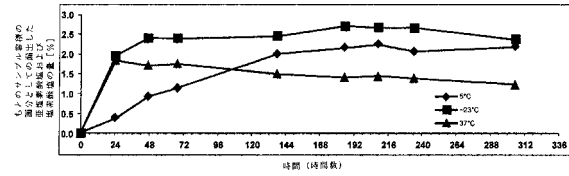
【図 2】



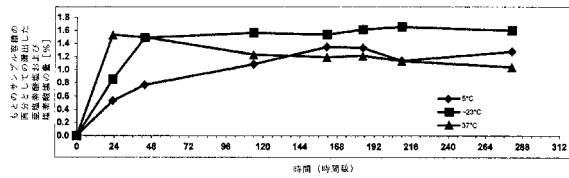
【図 3】



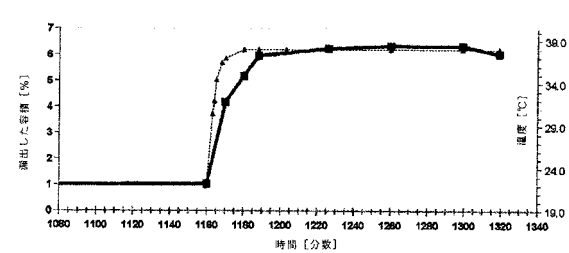
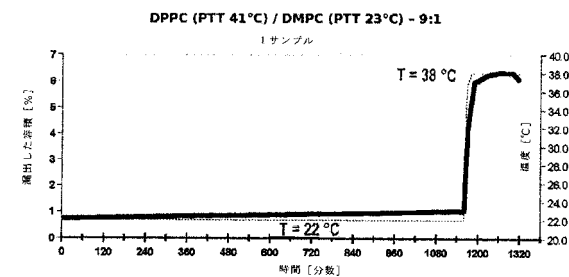
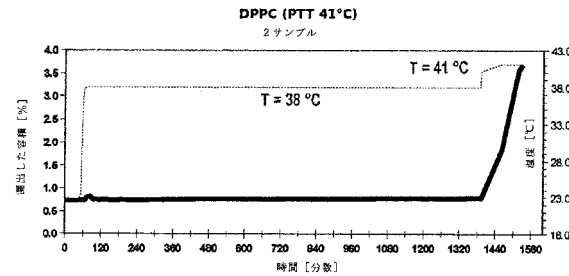
【図 4】



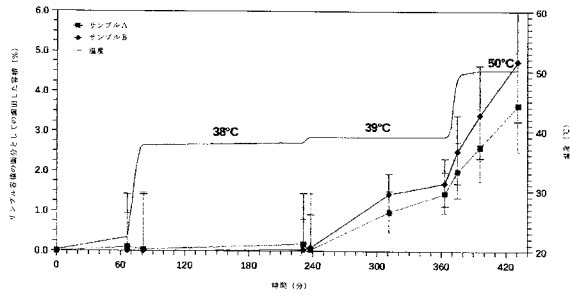
【図 5】



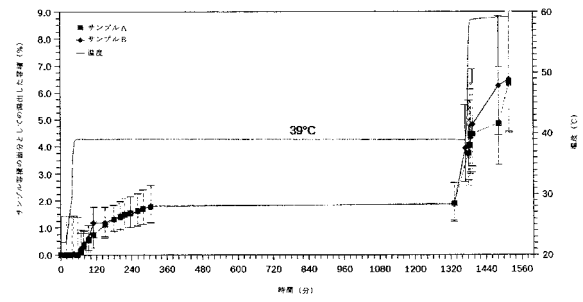
【図 9】



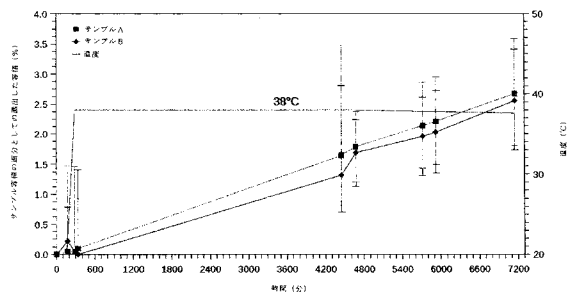
【図 1 1】



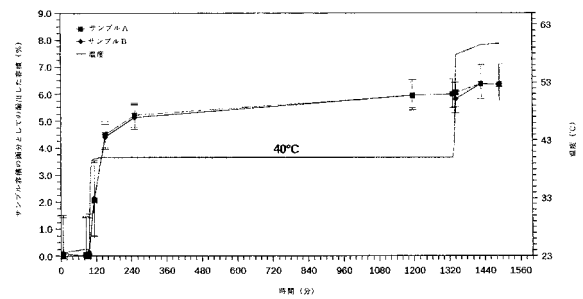
【図 1 3】



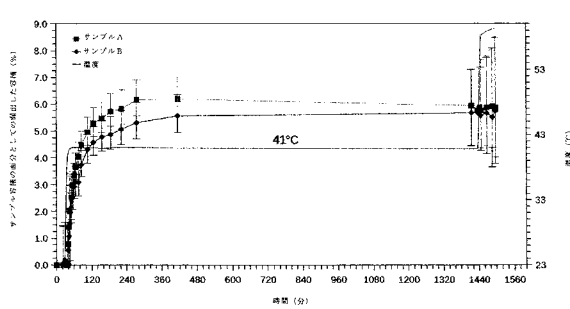
【図 1 2】



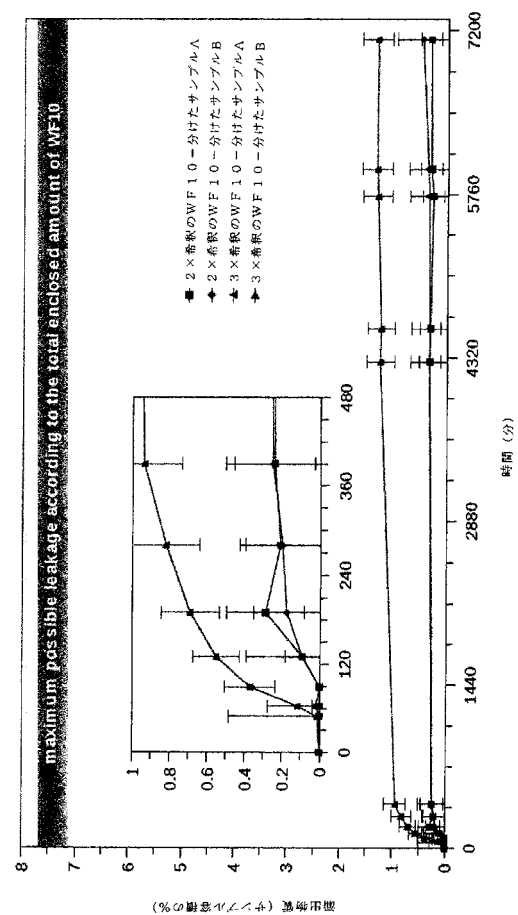
【図 1 4】



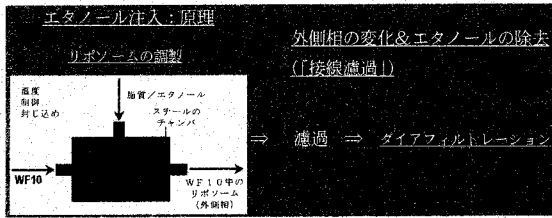
【図 1 5】



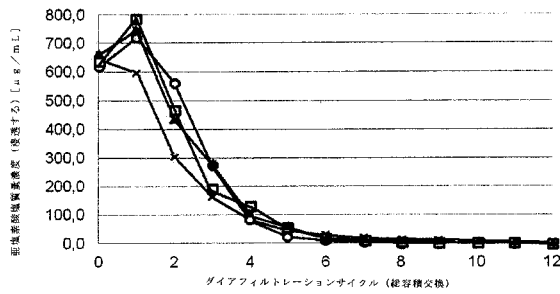
【図 1 6】



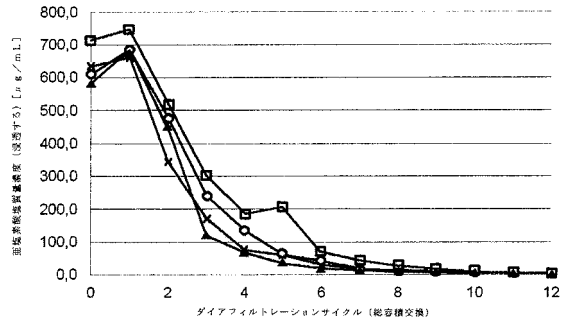
【図 17】



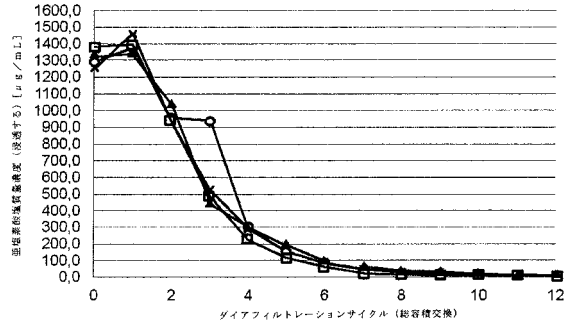
【図 18】



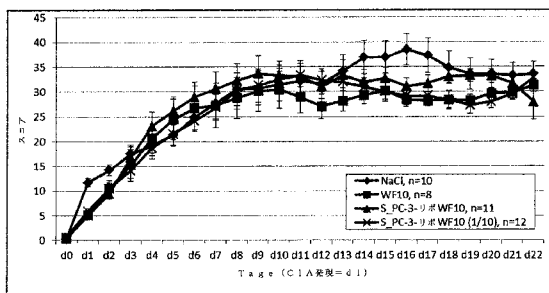
【図 19】



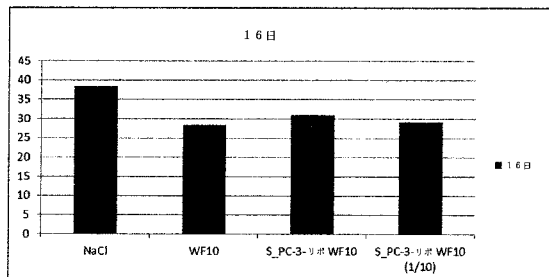
【図 20】



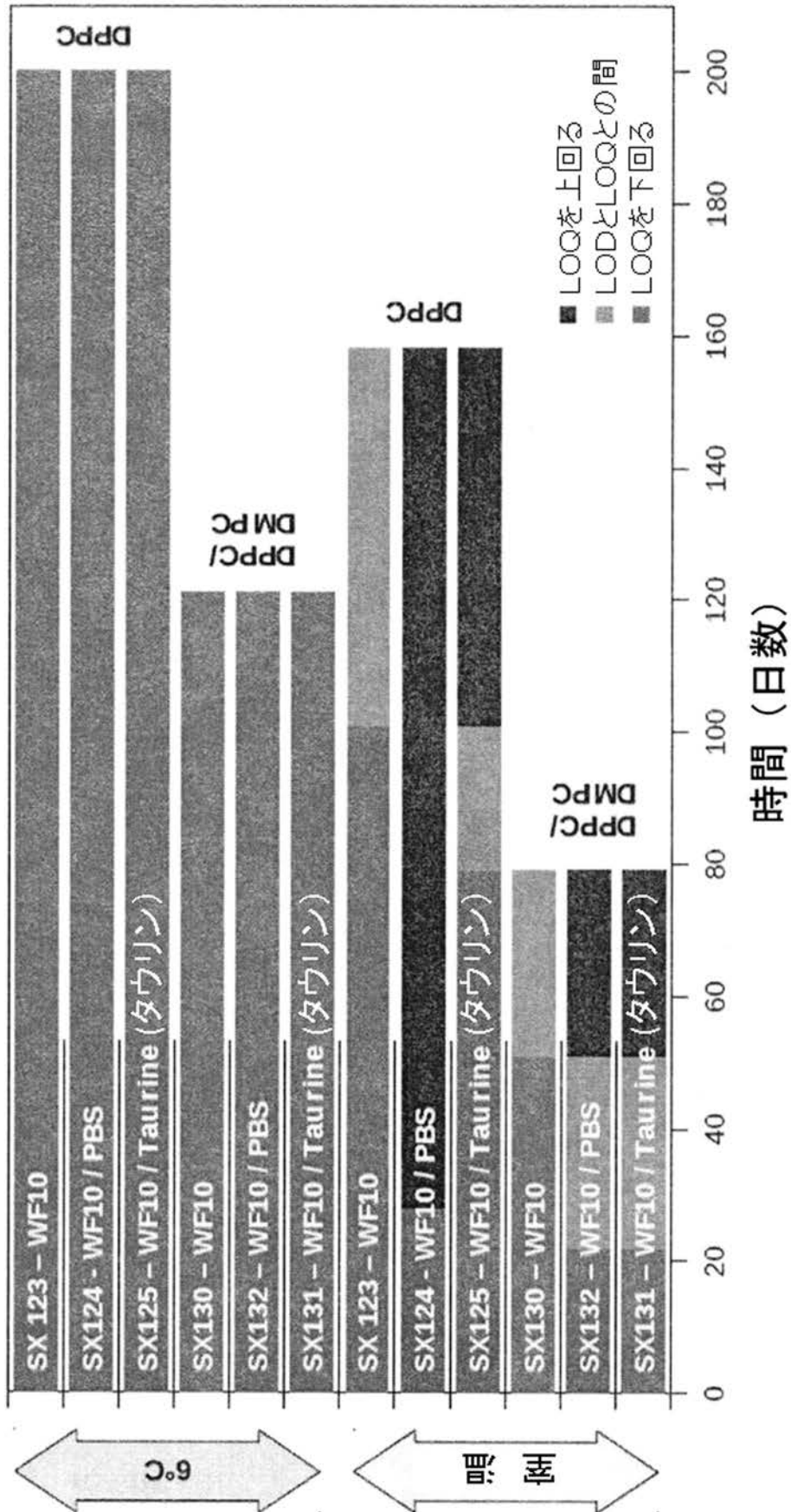
【図 21】



【図 22】



【図 10】



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/IB2012/057645

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K9/127 A61K33/20  
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2007/104798 A1 (KARAGOEZIAN HAMPAR L [US]) 10 May 2007 (2007-05-10)  Formula 1-3 paragraphs [0070], [0085] - [0090] claims 46,72	1,2, 5-43, 46-49, 54-61
X	WO 00/19981 A1 (KARAGOEZIAN HAMPAR L [US]) 13 April 2000 (2000-04-13) cited in the application  page 13, lines 15-24 Formulae 1-3 page 17, lines 14-26  ----- -/--	1,2, 5-43, 46-49, 54-61

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 March 2013

Date of mailing of the international search report

28/03/2013

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Villa Riva, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/IB2012/057645

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 2003 0072766 A (INTER COMMERCE CO LTD [KR]) 19 September 2003 (2003-09-19) cited in the application  abstract	1,2, 5-43, 46-49, 54-61
A	----- US 2008/119559 A1 (WEISSBACH HERBERT [US] ET AL) 22 May 2008 (2008-05-22) paragraphs [0095], [0123], [0124], [0153] paragraphs [0166], [0170], [0175] pages 14,21 -----	1-49, 54-61



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/IB2012/057645

## 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.: 50-53  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Rule 39.1(v) PCT - Presentation of information
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:

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 fee, 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 SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2012/057645

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2007104798 A1	10-05-2007	CN 101600348 A	09-12-2009
		EP 2099296 A1	16-09-2009
		JP 2010511707 A	15-04-2010
		US 2007104798 A1	10-05-2007
		US 2011008420 A1	13-01-2011
		US 2011014276 A1	20-01-2011
		WO 2008070063 A1	12-06-2008
WO 0019981 A1	13-04-2000	AT 289804 T	15-03-2005
		AU 6416999 A	26-04-2000
		DE 69923987 D1	07-04-2005
		DE 69923987 T2	02-11-2006
		EP 1119347 A1	01-08-2001
		US 6488965 B1	03-12-2002
		WO 0019981 A1	13-04-2000
KR 20030072766 A	19-09-2003	NONE	
US 2008119559 A1	22-05-2008	NONE	

## 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 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 39/00 (2006.01)	A 6 1 P 39/00	
A 6 1 P 21/04 (2006.01)	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 11/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 11/02	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
	A 6 1 P 31/12	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, 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, PA, 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

(72)発明者 ザイフェルト ロベルト  
ドイツ連邦共和国 0 4 2 9 9 ライプツィヒ, プレスラウアー シュトラーセ 3 3 アー

(72)発明者 キングースミス, ドミニク  
アメリカ合衆国 9 2 1 0 3 カルフォルニア州, サンディエゴ, ジャックダウ ストリート 3  
4 2 7

(72)発明者 デサイ, テージャス  
カナダ国 エル5 エム 0 ケイ7 オンタリオ, ミシサガ, フレッシュウォーター ドライブ 5  
4 8 3

(72)発明者 ワグナー, アンドレアス  
オーストリア国 アー - 1 1 3 0 ウィーン, ヒエッツィンガー カイ 1 9 9 / 2 3

F ターム(参考) 4C076 AA19 CC01 CC05 CC07 CC10 CC11 CC14 CC15 CC16 CC19  
CC21 CC27 CC31 CC35 DD23 DD63H DD70H FF21 FF36 GG41  
4C086 AA01 AA02 HA02 HA09 HA21 HA24 MA02 MA03 MA05 MA24  
NA10 NA14 ZA02 ZA16 ZA34 ZA51 ZA59 ZA68 ZA75 ZA89  
ZA94 ZB07 ZB08 ZB11 ZB13 ZB15 ZB26 ZB32 ZB33 ZC35  
ZC37 ZC55