

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-521150  
(P2023-521150A)

(43)公表日 令和5年5月23日(2023.5.23)

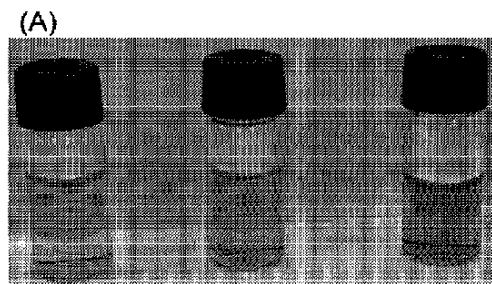
(51)国際特許分類		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 K	33/38 (2006.01)	A 6 1 K	33/38	4 C 0 7 6
A 6 1 P	31/12 (2006.01)	A 6 1 P	31/12	4 C 0 8 6
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 K	9/16 (2006.01)	A 6 1 K	9/16	
A 6 1 P	31/16 (2006.01)	A 6 1 P	31/16	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全27頁) 最終頁に続く				
(21)出願番号	特願2022-561651(P2022-561651)	(71)出願人	522394487	
(86)(22)出願日	令和3年4月6日(2021.4.6)		アガーワル, アンキット	
(85)翻訳文提出日	令和4年12月6日(2022.12.6)		アメリカ合衆国, 5 3 7 1 1 ウィスコ	
(86)国際出願番号	PCT/US2021/025942		ンシン州, マディソン, ノベル ドライブ	
(87)国際公開番号	WO2021/207178		5 5 2 0, スイート 1 0 0	
(87)国際公開日	令和3年10月14日(2021.10.14)	(74)代理人	110000338	
(31)優先権主張番号	63/005,727		弁理士法人 HARAKENZO WOR	
(32)優先日	令和2年4月6日(2020.4.6)		LD PATENT & TRADEMA	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		RK	
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA	(72)発明者	アガーワル, アンキット	
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(		アメリカ合衆国, 5 3 7 1 1 ウィスコ	
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A		ンシン州, マディソン, ノベル ドライブ	
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR		5 5 2 0, スイート 1 0 0	
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,	F ターム(参考)	4C076 AA22 AA24 AA31 AA93	
	最終頁に続く		BB25 CC15 CC35 EE38Q	
			最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 コロナウイルス感染の阻害および処置に使用するための銀ナノ粒子

(57)【要約】

本発明は、コロナウイルス感染、特にSARS - CoV - 2 (重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2) によって引き起こされる感染を阻害または処置するためのシアル酸を含む組成物の使用に関する。

FIG. 1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ヒトまたは動物対象における、呼吸器ウイルスによる感染を処置または阻害するための方法であって、

前記呼吸器ウイルスによる感染が阻害または処置される条件下で、有効濃度の銀ナノ粒子を前記対象に投与する工程を含む、方法。

## 【請求項 2】

ヒトまたは動物対象における、呼吸器ウイルスによる感染の予防のための方法であって、

前記呼吸器ウイルスによる感染が阻害される条件下で、有効濃度の銀ナノ粒子を前記対象に投与する工程を含む、方法。 10

## 【請求項 3】

ヒトまたは動物対象における、呼吸器ウイルスによる感染を処置または阻害するために使用される、銀ナノ粒子。

## 【請求項 4】

ヒトまたは動物対象における、呼吸器ウイルス感染の予防において使用される、銀ナノ粒子。

## 【請求項 5】

前記呼吸器ウイルスが、インフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、パラインフルエンザウイルス、メタニューモウイルス、ライノウイルス、コロナウイルス、アデノウイルス、およびボカウイルスからなる群から選択される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法または使用。 20

## 【請求項 6】

前記コロナウイルスが SARS-CoV-2 (重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2) である、請求項 5 に記載の方法または使用。

## 【請求項 7】

前記銀ナノ粒子が 1 ~ 100 nm のサイズである、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法または使用。

## 【請求項 8】

前記銀ナノ粒子を製剤中に提供し、 30

前記製剤中の前記ナノ粒子の平均サイズが 1 ~ 50 nm のサイズである、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法または使用。

## 【請求項 9】

前記製剤中の前記ナノ粒子の平均サイズが 1 ~ 10 nm のサイズである、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法または使用。

## 【請求項 10】

前記銀ナノ粒子を水性懸濁液中で製剤化する、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法または使用。

## 【請求項 11】

前記懸濁液が吸入懸濁液である、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法または使用。 40

## 【請求項 12】

前記懸濁液中の銀ナノ粒子の濃度が 0.01 ~ 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  である、請求項 11 に記載の方法または使用。

## 【請求項 13】

前記懸濁液中の銀ナノ粒子の濃度が 0.1 ~ 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  である、請求項 11 に記載の方法または使用。

## 【請求項 14】

前記懸濁液中の銀ナノ粒子の濃度が 0.01 ~ 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  である、請求項 11 に記載の方法または使用。 50

## 【請求項 15】

前記銀ナノ粒子を鼻腔内投与のために製剤化する、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法または使用。

## 【請求項 16】

前記銀ナノ粒子を 1 つ以上の生理学的に許容し得る担体と共に製剤化する、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法または使用。

## 【請求項 17】

凝集を防止するために前記銀ナノ粒子を安定化させる、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法または使用。

## 【請求項 18】

前記銀ナノ粒子を、噴霧器または霧化器において使用するための懸濁液中で製剤化する、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法または使用。

10

## 【請求項 19】

前記銀ナノ粒子を、吸入を介して対象の肺に送達する、請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法または使用。

## 【請求項 20】

前記吸入が連続噴霧器を介する、請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法または使用。

## 【請求項 21】

前記銀ナノ粒子を、エアロゾルとして使用するための懸濁液中で製剤化する、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法または使用。

20

## 【請求項 22】

前記銀ナノ粒子を経鼻スプレーとして製剤化する、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法または使用。

## 【請求項 23】

チキソトロップ剤を使用して前記銀ナノ粒子を製剤化する、請求項 18 に記載の方法または使用。

## 【請求項 24】

前記銀ナノ粒子を、鼻腔内投与を介して対象の肺に送達する、請求項 21 ~ 23 のいずれか一項に記載の方法または使用。

30

## 【請求項 25】

前記銀ナノ粒子の懸濁液が、400 ~ 420 nm の表面プラズモンピークを有する、請求項 1 ~ 24 のいずれか一項に記載の方法または使用。

## 【請求項 26】

前記対象が、SARS-CoV-2 による感染のリスクがある、請求項 1 ~ 25 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 27】

前記対象が COVID-19 を有する、請求項 1 ~ 25 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 28】

吸入のための投薬量が、10 ~ 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の銀ナノ粒子の水性懸濁液 0.5 ml ~ 10 ml である、請求項 1 ~ 27 のいずれか一項に記載の方法または使用。

40

## 【請求項 29】

前記投薬量を 1 日 1 ~ 5 回投与する、請求項 28 に記載の方法または使用。

## 【請求項 30】

前記投薬量を 1 日 3 回投与する、請求項 28 ~ 29 のいずれか一項に記載の方法または使用。

## 【請求項 31】

前記投薬量を 5 ~ 20 日間投与する、請求項 28 ~ 30 のいずれか一項に記載の方法または使用。

## 【請求項 32】

50

前記銀ナノ粒子をデンプンによって安定化させる、請求項 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の方法または使用。

【請求項 3 3】

硝酸銀塩をタンニン酸によって還元することによって、前記銀ナノ粒子を調製する、請求項 1 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の方法または使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

〔関連出願の相互参照〕

本出願は、2020年4月6日に出願された米国仮出願第63/005,727号の優先権を主張し、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0002】

〔技術分野〕

本発明は、コロナウイルス感染、特にSARS-CoV-2（重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2）によって引き起こされる感染、を阻害または処置するための銀ナノ粒子の使用に関する。

【0003】

〔背景技術〕

コロナウイルスは、感冒、重症急性呼吸器症候群（SARS）および中東呼吸器症候群（MERS）などの疾患を引き起こし得るウイルスのファミリーである。2019年には、中国起源の疾病発生の原因として新たなコロナウイルスが同定された。このウイルスは、現在、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2（SARS-CoV-2）として知られている。当該ウイルスが引き起こす疾患は、新型コロナウイルス感染症（COVID-19、coronavirus disease 2019）と呼ばれる。COVID-19の症例は世界中で報告されており、WHOは2020年3月にグローバルパンデミックを宣言した。

20

【0004】

COVID-19の徴候および症状は曝露の2~14日後に現れることがあり、発熱、咳、および息切れまたは呼吸困難を含み得る。他の症状には、疲労、痛み、鼻水、および咽頭痛が含まれ得る。COVID-19症状の重症度は、非常に軽度から重度の範囲であり得る。症状がない人もいる。高齢者、あるいは、心臓もしくは肺の病気または糖尿病などの慢性的な病状がある人は、重篤な病気になるリスクが高くなる。

30

【0005】

当該技術分野において必要とされていることは、SARS-CoV-2による感染を阻害または処置するための安全な組成物である。

【0006】

〔発明の概要〕

本発明は、呼吸器ウイルス感染症、特にSARS-CoV-2（重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2）によって引き起こされる感染症、を阻害または処置するための銀ナノ粒子の使用に関する。

【0007】

したがって、いくつかの好ましい実施形態において、本発明は、ヒトまたは動物対象における、呼吸器ウイルスによる感染を処置または阻害するための方法であって、前記呼吸器ウイルスによる感染が阻害または処置される条件下で、有効濃度の銀ナノ粒子を前記対象に投与する工程を含む、方法を提供する。いくつかの好ましい実施形態において、本発明は、ヒトまたは動物対象における、呼吸器ウイルスによる感染の予防のための方法であって、前記呼吸器ウイルスによる感染が阻害される条件下で、有効濃度の銀ナノ粒子を前記対象に投与する工程を含む、方法を提供する。いくつかの好ましい実施形態において、本発明は、ヒトまたは動物対象における、呼吸器ウイルスによる感染を処置または阻害するために使用される、銀ナノ粒子を提供する。いくつかの好ましい実施形態において、本発明は、ヒトまたは動物対象における、呼吸器ウイルス感染の予防において使用される、銀ナノ粒子を提供する。いくつかの好ましい実施形態において、呼吸器ウイルスは、インフル

40

50

エンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、パラインフルエンザウイルス、ヘルペスウイルス、メタニューモウイルス、ライノウイルス、コロナウイルス、アデノウイルス、およびボカウイルスからなる群から選択される。いくつかの好ましい実施形態において、コロナウイルスはSARS-CoV-2（重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2）である。いくつかの好ましい実施形態において、対象はSARS-CoV-2による感染のリスクがある。いくつかの好ましい実施形態において、対象はCOVID-19を有する。処置または阻害してもよい他のウイルスには、ヒト免疫不全ウイルス（HIV-1）が含まれる。

#### 【0008】

いくつかの好ましい実施形態において、銀ナノ粒子のサイズは1~100nmである。いくつかの好ましい実施形態において、銀ナノ粒子は製剤中に提供され、製剤中のナノ粒子の平均サイズは1~50nmのサイズである。いくつかの好ましい実施形態において、製剤中のナノ粒子の平均サイズは1~10nmのサイズである。いくつかの好ましい実施形態において、銀ナノ粒子は懸濁液中で製剤化される。いくつかの好ましい実施形態において、懸濁液は吸入懸濁液である。いくつかの好ましい実施形態において、懸濁液中の銀ナノ粒子の濃度は0.01~200μg/mlである。いくつかの好ましい実施形態において、懸濁液中の銀ナノ粒子の濃度は0.1~100μg/mlである。いくつかの好ましい実施形態において、懸濁液中の銀ナノ粒子の濃度は0.01~5μg/mlである。32. いくつかの好ましい実施形態において、銀ナノ粒子はデンプンによって安定化される。いくつかの好ましい実施形態において、硝酸銀塩をタンニン酸で還元することによって銀ナノ粒子が調製される。

10

20

#### 【0009】

いくつかの好ましい実施形態において、銀ナノ粒子は鼻腔内投与のために製剤化される。いくつかの好ましい実施形態において、銀ナノ粒子は1つ以上の生理学的に許容される担体と共に製剤化される。いくつかの好ましい実施形態において、凝集を防止するために銀ナノ粒子が安定化される。いくつかの好ましい実施形態において、銀ナノ粒子が噴霧器または霧化器で使用するための水性懸濁液中で製剤化される。いくつかの好ましい実施形態において、吸入を介して銀ナノ粒子が対象の肺に送達される。いくつかの好ましい実施形態において、吸入は連続噴霧器を介する。いくつかの好ましい実施形態において、銀ナノ粒子は、エアロゾルとして使用するための水性懸濁液中で製剤化される。いくつかの好ましい実施形態において、銀ナノ粒子は経鼻スプレーとして製剤化される。いくつかの好ましい実施形態において、チキソトロップ剤を使用して銀ナノ粒子が製剤化される。いくつかの好ましい実施形態において、銀ナノ粒子は、鼻腔内投与を介して対象の肺に送達される。いくつかの好ましい実施形態において、銀ナノ粒子の水性懸濁液は、400~420nmの表面プラズモンピークを有する。いくつかの好ましい実施形態において、吸入のための投薬量は、10~200μg/mlの銀ナノ粒子の水性懸濁液0.5ml~10mlである。いくつかの好ましい実施形態において、上記投薬量は1日1~5回投与される。いくつかの好ましい実施形態において、上記投薬量は1日3回投与される。いくつかの好ましい実施形態において、上記投薬量は5~20日間投与される。

30

#### 【0010】

いくつかの好ましい実施形態において、本発明は、ヒトまたは動物対象における、SARS-CoV-2（重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2）による感染を処置または阻害するための方法であって、SARS-CoV-2による感染が阻害または処置される条件下で、有効濃度の銀ナノ粒子を対象に投与する工程を含む、方法を提供する。

40

#### 【0011】

いくつかの好ましい実施形態において、本発明は、ヒトまたは動物対象における、SARS-CoV-2（重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2）による感染の予防のための方法であって、SARS-CoV-2による感染が阻害される条件下で、有効濃度の銀ナノ粒子を対象に投与する工程を含む、方法を提供する。

#### 【0012】

50

いくつかの好ましい実施形態において、本発明は、ヒトまたは動物対象における、SARS-CoV-2（重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2）による感染を処置または阻害するために使用される、銀ナノ粒子を提供する。

【0013】

いくつかの好ましい実施形態において、本発明は、ヒトまたは動物対象における、SARS-CoV-2（重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2）感染の予防において使用される、銀ナノ粒子を提供する。

【0014】

いくつかの好ましい実施形態において、銀ナノ粒子のサイズは2～100nmである。いくつかの好ましい実施形態において、銀ナノ粒子が製剤中に提供され、製剤中のナノ粒子の平均サイズは2～50nmのサイズである。いくつかの好ましい実施形態において、製剤中のナノ粒子の平均サイズは5～15nmのサイズである。いくつかの好ましい実施形態において、製剤中のナノ粒子の平均サイズは1～10nmのサイズである。いくつかの好ましい実施形態において、製剤中のナノ粒子の平均サイズは1～5nmのサイズである。いくつかの好ましい実施形態において、製剤中のナノ粒子の平均サイズは2～10nmのサイズである。いくつかの好ましい実施形態において、製剤中のナノ粒子の平均サイズは2～5nmのサイズである。いくつかの好ましい実施形態において、銀ナノ粒子は懸濁液中で製剤化される。いくつかの好ましい実施形態において、懸濁液中の銀ナノ粒子の濃度は1～200μg/mlである。いくつかの好ましい実施形態において、懸濁液中の銀ナノ粒子の濃度は1～100μg/mlである。いくつかの好ましい実施形態において、懸濁液中の銀ナノ粒子の濃度は5～50μg/mlである。いくつかの好ましい実施形態において、懸濁液中の銀ナノ粒子の濃度は0.01～200μg/mlである。いくつかの好ましい実施形態において、懸濁液中の銀ナノ粒子の濃度は0.01～100μg/mlである。いくつかの好ましい実施形態において、懸濁液中の銀ナノ粒子の濃度は0.01～10μg/mlである。いくつかの好ましい実施形態において、懸濁液中の銀ナノ粒子の濃度は0.1～200μg/mlである。いくつかの好ましい実施形態において、懸濁液中の銀ナノ粒子の濃度は0.1～100μg/mlである。いくつかの好ましい実施形態において、懸濁液中の銀ナノ粒子の濃度は、0.1～10μg/mlである。いくつかの好ましい実施形態において、懸濁液中の銀ナノ粒子の濃度は、0.1～5μg/mlである。

【0015】

いくつかの好ましい実施形態において、銀ナノ粒子組成物の投与は、COVID-19の1つ以上の症状を軽減または改善するのに十分である。軽減または改善される症状には、疲労、嗅覚および味覚の喪失、息切れ、咳、関節痛、胸痛、思考および集中の困難（「脳霧」と呼ばれることもある）、うつ病、頭痛、心動悸、心筋の炎症、発疹、脱毛、睡眠障害、肺機能の喪失ならびに記憶の喪失のうち1つ以上が含まれる。いくつかの好ましい実施形態において、銀ナノ粒子組成物の投与は、COVIDの後遺症の患者における以下の症状の1つ以上を改善または緩和する：疲労、嗅覚および味覚の喪失、息切れ、咳、関節痛、胸痛、思考および集中の困難（「脳霧」と呼ばれることがある）、うつ病、頭痛、心動悸、心筋の炎症、発疹、脱毛、睡眠障害、肺機能の喪失ならびに記憶の喪失。

【0016】

いくつかの好ましい実施形態において、銀ナノ粒子は鼻腔内投与のために製剤化される。いくつかの好ましい実施形態において、銀ナノ粒子は、1つ以上の生理学的に許容される担体と共に製剤化される。いくつかの好ましい実施形態において、凝集を防止するために銀ナノ粒子が安定化される。いくつかの好ましい実施形態において、銀ナノ粒子は経鼻スプレーとして製剤化される。いくつかの好ましい実施形態において、チキソトロップ剤を使用して銀ナノ粒子が製剤化される。いくつかの好ましい実施形態において、銀ナノ粒子は、噴霧器または霧化器において使用するための懸濁液中で製剤化される。いくつかの好ましい実施形態において、銀ナノ粒子は、エアロゾルとして使用するための懸濁液中で

製剤化される。いくつかの好ましい実施形態において、銀ナノ粒子は、経鼻噴霧デバイスにおいて使用するための懸濁液中で製剤化される。いくつかの好ましい実施形態において、銀ナノ粒子は、鼻腔内投与を介して対象の肺に送達される。いくつかの好ましい実施形態において、銀ナノ粒子の水性懸濁液のミストは、噴霧器を介して対象の肺に吸入される。いくつかの好ましい実施形態において、対象はSARS-CoV-2による感染のリスクがある。いくつかの好ましい実施形態において、対象はCOVID-19を有する。いくつかの好ましい実施形態において、銀ナノ粒子はデンプンによって安定化される。いくつかの好ましい実施形態において、硝酸銀塩をタンニン酸で還元することによって、銀ナノ粒子が調製される。

【0017】

10

〔図面の簡単な説明〕

図1は、本発明の銀ナノ粒子懸濁液の懸濁液に関するデータを提供する。図1(A)は、安定化されたAgNPの透明な暗褐色懸濁液である。図1(B)は、AgNP懸濁液のUV-Visスペクトルである。図1(C)は、2~10nmの直径のAgNPを示すTEM画像である。スケールバーは10nmである。図1(D)は、TEM画像におけるAgNPのサイズ分布である。

【0018】

〔定義〕

本明細書で使用される場合、用語「SARS-CoV-2（重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2）」は、SARS-CoV-2レファレンスゲノム配列の変異体を含む、SARS-CoV-2であると同定されたコロナウイルスの任意の株を含む。

20

【0019】

本明細書で使用される場合、用語「銀ナノ粒子」は、少なくとも1つの寸法が1~100nmの範囲にある銀のナノ粒子を指す。

【0020】

本明細書で使用される場合、SARS-CoV-2による感染に関して使用するとき、用語「阻害する(inhibit)」は、SARS-CoV-2に曝露された対象における感染の減少を指す。

【0021】

「患者」、「対象」、または「個体」は、互換的に使用され、ヒトまたは非ヒト動物のいずれかを指す。これらの用語には、ヒト、霊長類、家畜動物(ウシ、ブタなどを含む)、コンパニオンアニマル(例えば、イヌ、ネコなど)ならびにげっ歯類(例えば、ラットおよびネズミ)などの哺乳動物が含まれる。

30

【0022】

対象への物質、化合物または薬剤の「投与(administering)」または「投与(administration)」は、当業者に公知の種々の方法の1つを使用して実施することができる。例えば、銀ナノ粒子を鼻腔内に投与し、銀ナノ粒子の水性懸濁液のミストを、手持ち式の連続噴霧器を使用して肺内に吸入させることができる。また、化合物または薬剤は、化合物または薬剤の持続放出、遅延放出または制御放出を提供する、再充填可能または生分解性ポリマーデバイスまたは他のデバイス(例えば、貼付剤およびポンプ、または製剤)によって適切に導入することができる。投与は、例えば、1回、複数回、および/または1つ以上の長期間にわたって実施することもできる。いくつかの態様において、投与は、自己投与を含む直接投与、および薬物を処方する行為を含む間接投与の両方を含む。例えば、本明細書で使用される場合、薬物を自己投与するように患者に指示する医師、もしくは別の医師によって薬物が投与されるように患者に指示する医師、および/または薬物の処方箋を患者に提供する医師は、薬物を患者に投与する。

40

【0023】

銀ナノ粒子などの薬物または薬剤の「治療有効量」または「治療有効用量」は、対象に投与された場合に意図される治療効果を有する薬物または薬剤の量である。完全な治療効果は、必ずしも1回の用量の投与によって生じるわけではなく、一連の用量の投与後にの

50

み生じ得る。したがって、治療有効量は、1回以上の投与で投与することができる。対象に必要とされる正確な有効量は、例えば、対象の大きさ、健康および年齢、C O V I D - 19などの治療される状態の症候の性質および程度に依存する。当業者は、所定の状況に対する有効量を日常的な実験によって容易に決定することができる。

【0024】

銀ナノ粒子などの薬物または薬剤の「予防有効量」または「予防有効用量」は、対象に投与されたときに意図される予防効果を有する薬物または薬剤の量である。完全な予防効果は、必ずしも1回の用量の投与によって生じるわけではなく、一連の用量の投与後にのみ生じてもよい。したがって、予防有効量は、1回以上の投与で投与してもよい。対象に必要とされる正確な有効量は、例えば、対象の大きさ、健康および年齢、S A R S - C o V - 2感染症などの処置される状態の症状の性質および程度に依存する。当業者は、所定の状況に対する有効量を日常的な実験によって容易に決定することができる。

10

【0025】

状態または患者を「処置する」とは、臨床結果を含む有益なまたは所望の結果を得るためのステップをとることを指す。有益なまたは所望の臨床結果にはC O V I D - 19に関連する1つ以上の症状の緩和、改善、または進行の遅延が含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、処置は、S A R S - C o V - 2による感染の防止などのための予防であってもよい。

【0026】

〔発明の詳細な説明〕

本発明は、呼吸器ウイルス感染、特にS A R S - C o V - 2（重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2）によって引き起こされる感染、を阻害または処置するための銀ナノ粒子の使用に関する。

20

【0027】

今日まで、呼吸器感染症を引き起こすウイルスは、毎年世界人口の約9%に影響を与え、毎年最大500,000人を死亡させることによって、ヒトの健康に対する世界的な脅威となっている。Clayville, L.R., Influenza update: a review of currently available vaccines. P T, 2011. 36(10): p. 659-84; Renukaradhya, G.J., B. Narasimhan, and S.K. Mallapragada, Respiratory nanoparticle-based vaccines and challenges associated with animal models and translation. J Control Release, 2015. 219: p. 622-631を参照されたい。これらのウイルスには、インフルエンザウイルス（H1N1、H3N2など）、呼吸器合胞体ウイルス（RSV）、重症急性呼吸器症候群（SARS）、中東呼吸器症候群（MERS）、および重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2（SARS-CoV2）などの新興株が含まれる。Morris, D., et al., Antiviral and Immunomodulatory Activity of Silver Nanoparticles in Experimental RSV Infection. Viruses, 2019. 11(8)を参照されたい。これらのウイルスのほとんどは、高度に伝染性であり、重度の罹患率および死亡率の原因である。Xiang, D., et al., Inhibition of A/Human/Hubei/3/2005 (H3N2) influenza virus infection by silver nanoparticles in vitro and in vivo. Int J Nanomedicine, 2013. 8: p. 4103-13; Alghair, Z.K., D.G. Fernig, and B. Ebrahimi, Enhanced inhibition of influenza virus infection by peptide-noble-metal nanoparticle conjugates. Beilstein J Nanotechnol, 2019. 10: p. 1038-1047を参照されたい。

30

40

【0028】

気道から人体に侵入すると、粘膜層に付着して感染を開始し、上気道の上皮に感染し、細胞内伝達により速やかに下気道に伝播する。一般に、感染症の症状は低熱から重度の気管支炎、または肺炎までの範囲であり、これは、主に感染した患者の死亡につながる。世界中の研究者はこれらのパンデミック疾患を克服するためのワクチンを作り出すことを試みてきたが、これらのワクチンは人々の処置を開始する前に、十分な時間と最適化を要する。一方、多くの研究者は隣接細胞へのウイルスの伝播を制限するために、モノクローナ

50

ル抗体 ( M A B )、プロテアーゼなどの抗ウイルス薬の創製に取り組んでいる。しかしながら、これらの抗ウイルス薬は重度の副作用を生じ、多くの人々へのこれらの薬物の使用を制限する。

#### 【 0 0 2 9 】

本発明は、任意の特定の呼吸器ウイルスの感染の処置または抑制のための銀ナノ粒子の使用に限定されない。実際に、本発明は、インフルエンザウイルス ( 例えば、H 1 N 1 および H 3 N 2 )、呼吸器合胞体ウイルス ( R S V )、パラインフルエンザウイルス、メタニューモウイルス、ヘルペスウイルス ( 例えば、単純ヘルペスウイルス 2 )、ライノウイルス、コロナウイルス ( 例えば、S A R S C o V 1 および S A R S C o V 2 )、アデノウイルス、およびボカウイルスを含むが、これらに限定されない種々の呼吸器ウイルスの感染の抑制の処置を企図した。処置または阻害されてもよい他のウイルスには、ヒト免疫不全ウイルス ( H I V - 1 ) が含まれる。

10

#### 【 0 0 3 0 】

化学的相互作用によってウイルスを死滅させる他の抗ウイルス薬とは異なり、銀ナノ粒子は、物理的相互作用によってこれらのウイルスに影響を及ぼす。銀ナノ粒子は、最初に、外側ウイルス ( outer virus ) のカプシド上に位置する表面糖タンパク質の硫黄保持残基に結合し、したがって、外側ウイルスの付着および宿主細胞への侵入を防止する。次いで、銀ナノ粒子は、ウイルスタンパク質の適切な集合に必要な細胞因子を遮断する。Xiang, D.X., et al., Inhibitory effects of silver nanoparticles on H1N1 influenza A virus in vitro. J Virol Methods, 2011. 178(1-2): p. 137-42を参照されたい。Xiang et al. ( 2 0 1 1 年および 2 0 1 3 年 ) は、ヒト M a d i n - D a r b y イヌ腎臓 ( M D C K ) 細胞での A g N P のインピトロでの有益な効果、および、8 ~ 1 0 週齢の雌 B A L B / c マウスに A g N P を鼻腔内送達することによる A g N P のインピボでの有益な効果を調査した。Xiang et al. は、濃度 5 0 μ g / m l の A g N P がインフルエンザウイルスの H 1 N 1 および H 3 N 2 株の両方を阻害し、M D C K 細胞のアポトーシスを有意に減少させることを示した。また、鼻腔内に送達された A g N P は、インフルエンザウイルスに予め感染させたマウスの生存率を有意に増加させることも Xiang et al. は実証した。Morris et al. ( 2 0 1 9 年 ) による最近発表された別の研究では、A g N P を鼻腔内に送達することによって R S V に感染した B A L B / c マウスが処置された。これは、R S V に対する A g N P の抗ウイルス特性を実証した最初のインピボでの実験であった。Morris et al. は、A g N P で処置した R S V 感染マウスにおける炎症誘発性サイトカイン ( すなわち、I L - 1 、 I L - 6 、 T N F - ) および炎症誘発性ケモカイン ( すなわち、C C L 2 、 C C L 3 、 C C L 5 ) の有意な減少が示された。

20

30

#### 【 0 0 3 1 】

研究者らは、ヒトの健康に対する A g N P の毒性についていくつかの懸念を示している。しかしながら、多くの研究は、げっ歯類モデルにおいて鼻腔内送達される A g N P の毒性効果を徹底的に調査している。それらは A g N P が粘膜層のわずかな肥厚および細胞浸潤 ( 主に好中球 ) を引き起こすが、2 8 日間の連続曝露後でさえ、生理学的肺機能に大きな変化を引き起こさないことを示した。これらの研究は、アデノウイルス、パラインフルエンザ、およびインフルエンザなどの呼吸器病原体に対する銀ナノ粒子 ( A g N P ) の広

40

#### 【 0 0 3 2 】

本発明は、S A R S - C o V - 2 を含む広スペクトルである呼吸器ウイルスを阻害し、ウイルスに感染したヒトにおけるウイルス伝播の進行を防止するために、銀ナノ粒子 ( A g N P ) を鼻腔内送達する安定な抗ウイルス組成物 ( 好ましくは懸濁液 ) を提供する。銀ナノ粒子は上気道および / または下気道におけるウイルスを阻害し、感染した人々の生存の可能性を増加させることが企図される。科学的前提は、吸入された銀ナノ粒子が上気道および下気道に留まる呼吸器ウイルスに付着し、ウイルスの形態学的構造を破壊し、スパ

50

イクタンパク質が宿主細胞の受容体に結合することを遮断し、ウイルス感染および複製を阻害することである。

【0033】

物理学的方法、化学的方法および生物学的方法を使用した、安定化された銀ナノ粒子のコロイド懸濁液を合成するための多くの方法が存在し、それらの特性および多機能生物医学的用途と共に他の箇所で詳細に概説されている。Zhang X-F, Liu Z-G, Shen W, Gurunathan S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(9)を参照されたい、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0034】

銀ナノ粒子は、物理的および化学的プロセスによって合成することができる。銀ナノ材料は、いわゆる「トップダウン」方法および「ボトムアップ」方法の両方によって得ることができる。トップダウン法は、バルク金属の機械的粉碎と、コロイド保護剤の添加により得られたナノサイズ金属粒子のその後の安定化とを含む。一方、ボトムアップ法には、金属の還元、電気化学的方法、および超音波組成が含まれる。

【0035】

いくつかの実施形態において、水中での  $\text{NaBH}_4$  による金属塩  $\text{AgBF}_4$  の還元の化学的方法によって銀ナノ粒子が合成される。例えば、3 ~ 40 nm の大きさのナノ粒子を、この製法により製造してもよい。ナノ粒子の品質は、透過型電子顕微鏡 (TEM) および/または UV - 可視 (UV - vis) 吸収分光法で評価してもよい。いくつかの好ましい実施形態において、本発明の銀ナノ粒子組成物または製剤は、100 nm 以下の少なくとも1つの寸法を有する組成物中の銀粒子の割合によって特徴付けられる。いくつかの好ましい実施形態において、製剤または組成物中の銀粒子の少なくとも80%は、100 nm 未満の直径などの少なくとも1つの寸法を有する。より好ましい実施形態において、製剤または組成物中の銀粒子の少なくとも90%は、100 nm 未満の直径などの少なくとも1つの寸法を有する。いくつかのさらにより好ましい実施形態において、製剤または組成物中の銀粒子の少なくとも95%は、100 nm 未満の直径などの少なくとも1つの寸法を有する。

20

【0036】

他の実施形態において、銀ナノ粒子は、ポリエチレングリコールの存在下、水溶液中での  $\text{AgNO}_3$  の電気還元を含む電気化学法によって製造される。このようにして製造されたナノ粒子は、TEM、X線回折、および UV - vis 吸収分光法によって特徴付けることができる。他の好ましい実施形態において、銀ナノ粒子を製造するためにソノ分解 (sonodecomposition) を使用し、キャピテーションを誘導するための超音波の使用を伴い、この現象は超音波が水溶液を通過すると、膨張し最終的には破裂する微小気泡を生じる現象である。銀ナノ粒子の合成は、アルゴン - 水素の雰囲気中での硝酸銀水溶液の超音波による化学的還元を含む。銀ナノ粒子は、TEM、X線回折、吸収分光法、示差走査熱量測定法、および/または EPR 分光法によって特徴付けることができる。他の好ましい実施形態において、銀ナノ粒子のマイクロ波合成を利用し、これは可変周波数マイクロ波放射を使用して銀ナノ粒子を還元することを含む。銀ナノ粒子を製造するための他の好ましい方法には、有機溶媒中での熱分解、逆ミセル中での化学的還元および光還元、火花放電、ならびに低温化学合成が含まれる。

30

40

【0037】

いくつかの好ましい実施形態において、本発明は、ナノスケールデンブンプン鑄型内の銀イオンの還元による銀ナノ粒子の合成を使用する。Lomeli-Marroquin D, Medina Cruz D, Nieto-Arguello A, Vernet Crua A, Chen J, Torres-Castro A, et al. Starch-mediated synthesis of mono- and bimetallic silver/gold nanoparticles as antimicrobial and anticancer agents. *International journal of nanomedicine*. 2019;14:2171-90; Mohan S, Oluwafemi OS, George SC, Jayac

50

handran VP, Lewu FB, Songca SP, et al. Completely green synthesis of dextrose reduced silver nanoparticles, its antimicrobial and sensing properties. Carbohydrate Polymers. 2014;106:469-74 ; Raveendran P, Fu J, Wallen SL. Completely "Green" Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles. Journal of the American Chemical Society. 2003;125(46):13940-1 ; Yakout SM, Mostafa AA. A novel green synthesis of silver nanoparticles using soluble starch and its antibacterial activity. International journal of clinical and experimental medicine. 2015;8(3):3538-44を参照されたい、それぞれの全体が参照により本明細書に組み込まれる。デンプンのヒドロキシル基は、これらの鑄型の内部に形成されたナノ粒子の安定化のためのパッシベーション  
10

#### 【0038】

ナノ粒子の調製は、溶液中または高温ガス環境中での金属イオンの還元を含む。ナノ粒子の高い表面エネルギーは、ナノ粒子を極めて反応性にする。ほとんどの系は、それらの表面を保護またはパッシベーションすることなく、凝集を受ける。Freeman RG, Grabar KC, Allison KJ, Bright RM, Davis JA, Guthrie AP, et al. Science. 1995;267:1629 ; Ullman A. Chem Rev. 1996;96:1533; Zhao M, Sun L, Crooks RM. J Am Chem Soc. 1998;120:4877 ; Wang R, Yang J, Zheng Z, Carducci MD, Jiao J, Seraphin S. Angew Chem, Int Ed. 2001;40:549 ; Zheng J, Stevenson MS, Hikida RS, Patten PGV. J Phys Chem B. 2002;106:1252を参照  
20

されたい、それぞれの全体が参照により本明細書に組み込まれる。表面パッシベーションのために一般的に使用される方法には、自己組織化単分子層による保護、最も一般的なものはチオール官能化有機物、逆マイクロエマルジョンのH<sub>2</sub>Oプール中におけるカプセル化、および高分子マトリックス中への分散が含まれる。Petit C, Lixon P, Pileni M. J Phys Chem B. 1993;97:12974 ; Suslick KS, Fang M, Hyeon T. J Am Chem Soc. 1996;118:11960を参照されたい、それぞれの全体が参照により本明細書に組み込まれる。さらに、これらの方法の大部分は、ヒドラジン、水素化ホウ素ナトリウム、およびジメチルホルムアミドなどの強力な還元剤を使用する。これらは、生物学的リスクをもたらす反応性の高い化学物質である。

#### 【0039】

いくつかの好ましい実施形態において、還元糖、 $\alpha$ -D-グルコースが還元剤として使用される。上述のRaveendran et alを参照されたい。 $\alpha$ -D-グルコースは、温和で、再生可能な、非毒性の還元剤である。ナノ粒子表面を保護およびパッシベーションするために、使用されるキャッピング材料はデンプンである。キャッピング材料の選択は、標的とする用途におけるナノ粒子の所望のサイズおよび形態に依存する。直鎖状および樹枝状ポリマーは、ナノ粒子合成に首尾よく使用されている。Suslick KS, Fang M, Hyeon T. J Am Chem Soc. 1996;118:11960、および、Zhao M, Sun L, Crooks RM. J Am Chem Soc. 1998;120:4245を参照されたい、それぞれの全体が参照により本明細書に組み込まれる。デンプン、特にアミロースは、分子マトリックスへの銀イオンの錯体形成を促進する多数のヒドロキシル基を有する。次に、銀イオンは、デンプン分子間の超分子組織化を導くこともできる。  
40

#### 【0040】

デンプンを保護剤として使用することの重要な利点は、デンプンが完全に水溶性であり、したがって有機溶媒の使用を必要とせず、生物医学的用途に容易に利用可能であることである。さらに、デンプンと金属ナノ粒子との間の結合は、チオール系保護基と比較して比較的弱い。これは、保護が比較的高温で容易に可逆的であるべきであり、これらの粒子の分離を可能にすることを意味する。さらに、ナノ粒子を官能化するために、位置交換反応(place exchange reaction)を使用することができる。Templeton AC, Chen S, Cross SM, Murray RW. Langmuir. 1999;15:66を参照されたい、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。  
50

## 【0041】

本発明は、銀ナノ粒子を調製する特定の方法には限定されない。例示的な実施形態として、硝酸銀の0.1M溶液および可溶性デンプンの0.17重量%水溶液を調製する。硝酸銀溶液の100 $\mu$ Lアリコートに6mLデンプン溶液に添加する。完全に溶解した後、D-グルコースの0.1M水溶液の150 $\mu$ Lアリコートを攪拌しながら添加する。混合物を40℃に加熱し、この温度で20時間維持する。すべての溶液成分は好ましくは使用前にアルゴンでパージされ、酸素を除去するためにアルゴンの存在下で還元を進行させる。溶液は一般に、1時間後に黄色に変わり、銀ナノ粒子の形成を示す。20時間後の試料のUV-vis吸収スペクトルは、419nmにおいて最大波長を有するこれらのAg(0)粒子の表面プラズモン吸収を示す。予想される粒子径分布は5.3 + / - 2.6 nm

10

## 【0042】

いくつかの好ましい実施形態において、デンプン中に銀ナノ粒子が分散された懸濁液は高度に安定であり、2か月の保存後に凝集の徴候を示さない。還元剤および保護剤のための環境に優しい材料の使用は、生物学的に関連する系への容易な組み込みを提供する。

## 【0043】

いくつかの好ましい実施形態において、硝酸銀塩、重炭酸ナトリウムおよびタンニン酸の水溶液を、pHを7.4に調整しながら混合し、次いで、攪拌しながら1時間還流させて、酸化還元反応を完了させる。最終懸濁液は、AgNPの証拠である透明な暗褐色懸濁液である。予想される粒子径分布は、主に2~5nmである。

20

## 【0044】

いくつかの好ましい実施形態において、銀ナノ粒子の懸濁液のピーク表面プラズモン吸収は400~420nm、最も好ましくは約411nmである。いくつかの好ましい実施形態において、粒子が1~10ナノメートル(NM)の平均直径、最も好ましくは2~10nmの平均直径、さらにより好ましくは3~5nmの平均直径を有する。

## 【0045】

本発明の銀ナノ粒子は、任意の好適な形態で送達してもよい。いくつかの実施形態において、本発明は、SARS-CoV-2による感染を処置、緩和、改善、もしくは阻害する方法、または、SARS-CoV-2による感染に関連する症状もしくは大発生を低減する方法、または、必要とする対象におけるCOVID-19を処置する方法であって、有効濃度の銀ナノ粒子を投与する工程を含む方法を提供する。いくつかの好ましい実施形態において、SARS-CoV-2による感染またはSARS-CoV-2に関連する症状を処置、緩和、改善、低減または阻害するための、銀ナノ粒子の有効濃度は例えば、本明細書に記載される水性懸濁液または他の製剤などの懸濁液中で、約1~200 $\mu$ g/ml、より好ましくは1~100 $\mu$ g/ml、最も好ましくは5~50 $\mu$ g/mlである。他の好ましい実施形態において、懸濁液中の銀ナノ粒子の濃度は、0.01~200 $\mu$ g/mlである。いくつかの好ましい実施形態において、懸濁液中の銀ナノ粒子の濃度が0.01~100 $\mu$ g/mlである。いくつかの好ましい実施形態において、懸濁液中の銀ナノ粒子の濃度が0.01~10 $\mu$ g/mlである。いくつかの好ましい実施形態において、懸濁液中の銀ナノ粒子の濃度が0.01~5 $\mu$ g/mlである。いくつかの好ましい実施形態において、懸濁液中の銀ナノ粒子の濃度が0.1~200 $\mu$ g/mlである。いくつかの好ましい実施形態において、懸濁液中の銀ナノ粒子の濃度が0.1~100 $\mu$ g/mlである。いくつかの好ましい実施形態において、懸濁液中の銀ナノ粒子の濃度は、0.1~10 $\mu$ g/mlである。いくつかの好ましい実施形態において、懸濁液中の銀ナノ粒子の濃度は、0.1~5 $\mu$ g/mlである。

30

40

## 【0046】

いくつかの好ましい実施形態において、吸入のための投薬量は、10~200 $\mu$ g/mlの銀ナノ粒子の水性懸濁液の0.5ml~10mlである。いくつかの好ましい実施形態において、吸入のための投薬量は、50~200 $\mu$ g/mlの銀ナノ粒子の水性懸濁液の1.0ml~5.0mlである。いくつかの好ましい実施形態において、吸入のための

50

投薬量は、75～100 μg/mlの銀ナノ粒子の水性懸濁液の2.0 ml～4.0 mlである。いくつかの好ましい実施形態において、吸入のための投薬量は、約100 μg/mlの銀ナノ粒子の水性懸濁液の約3.0である。いくつかの好ましい実施形態において、投薬量は1日1～5回投与される。いくつかの好ましい実施形態において、投薬量は1日3回投与される。いくつかの好ましい実施形態において、投薬量は5～20日間投与される。いくつかの好ましい実施形態において、投薬量は約7～14日間投与される。

#### 【0047】

いくつかの好ましい実施形態において、銀ナノ粒子組成物の投与が、対象におけるCOVID-19の1つ以上の症状を軽減または改善するのに十分である。軽減または改善される症状には、疲労、嗅覚および味覚の喪失、息切れ、咳、関節痛、胸痛、思考および集中の困難（「脳霧」と呼ばれることもある）、うつ病、頭痛、心動悸、心筋の炎症、発疹、脱毛、睡眠障害、肺機能の喪失ならびに記憶の喪失のうち1つ以上が含まれる。いくつかの好ましい実施形態において、銀ナノ粒子組成物の投与は、COVIDの後遺症の患者における以下の症状の1つ以上を改善または緩和する：疲労、嗅覚および味覚の喪失、息切れ、咳、関節痛、胸痛、思考および集中の困難（「脳霧」と呼ばれることがある）、うつ病、頭痛、心動悸、心筋の炎症、発疹、脱毛、睡眠障害、肺機能の喪失ならびに記憶の喪失。

10

#### 【0048】

いくつかの実施形態において、銀ナノ粒子は、スプレーまたはミストとしての使用に適したゲルを含む水性懸濁液中に提供される。いくつかの実施形態において、水性銀ナノ粒子懸濁液は、細かいミストまたはスプレーとして鼻、口または肺に送達するために、予圧ポンプなどのポンプスプレー容器、または噴霧器もしくは低温ミストシステムなどのデバイスに組み込まれる。

20

#### 【0049】

いくつかの好ましい実施形態において、本発明は、上記の組成物のいずれかを含む、動物またはヒトの鼻への経鼻スプレーの適用のために構成されたスプレーボトルを提供する。いくつかの実施形態において、本発明の銀ナノ粒子製剤は、銀ナノ粒子を含む医薬の固体粒子のチキソトロピー懸濁液を形成するのに効果的である薬学的に許容される賦形剤を含み、前記賦形剤は、例えば、米国特許第7,122,206号に記載されている。前記賦形剤は好ましくは、非使用中および鼻腔内への組成物の噴霧中に、組成物中に懸濁される医薬粒子を維持する量で存在し、また、組成物が鼻腔の粘膜表面または鼻腔内もしくは体内の他の場所の内皮表面上に堆積する場合にも存在する。いくつかの実施形態において、静止時の組成物の粘性は比較的高く、例えば、約400～約1000 cpである。組成物がせん断力を受ける、例えば、噴霧に先立って攪拌される際の力に供されると、組成物の粘度は低下し（例えば、約50～約200 cp）、噴霧デバイスを通して容易に流れ、そこから、鼻の少なくとも以下の部分の粘膜面上に浸潤および堆積する微細ブルームの形態で放出される：鼻の前部領域（前頭鼻腔）；前頭洞；上顎洞；および鼻腔の凹所を覆う鼻甲介。したがって、いくつかの好ましい実施形態において、本発明の銀ナノ粒子製剤は、自由に流動できる液剤、および噴霧形態で、所望の粘膜への進路を見出しその上に堆積する微細ミストを含む。堆積した比較的応力のかかっていない形態において、組成物の粘度が増加し、その中に懸濁された医薬粒子を含み、鼻腔内に存在する固有の粘膜線毛力によって鼻腔から除去されることに抵抗するゲル様形態をとる。

30

40

#### 【0050】

組成物中に実質的に均一に分散された医薬固体粒子を維持し、組成物に所望のチキソトロピー特性を付与することができる任意の薬学的に許容される材料を使用することができる。このような材料は、「懸濁剤」と称される。懸濁剤の例には、カルボキシメチルセルロース、ビーガム、トラガント、ベントナイト、メチルセルロース、およびポリエチレングリコールが含まれる。好ましい懸濁剤は、微結晶性セルロースとカルボキシメチルセルロースとの混合物であり、前者が大量に存在することが好ましく、最も好ましくは約85～約95重量%の量で存在し、後者の成分は、混合物の約5～約15重量%を含む。

50

## 【0051】

組成物を含む懸濁剤の量は、使用される特定の医薬および量、使用される特定の懸濁剤、組成物を含む他の成分の性質および量、ならびに所望される特定の粘度値に応じて変化する。一般的に言えば、最も広く使用される組成物は、約1～約5重量%の懸濁化剤を含むと考えられる。

## 【0052】

本発明の銀ナノ粒子製剤は、好ましくは、組成物に所望の特性を付与する他の成分を含むことができる。いくつかの実施形態において、分散剤または湿潤剤を利用する。粒子を湿潤させるのに有効であり、薬学的に許容される任意の分散剤を使用することができる。使用することができる分散剤の例は、脂肪族アルコール、エステル、およびエーテルであり、たとえば、Pluronic、Tergitol、Span、およびTweenという商標で販売されているものを含む。親水性の非イオン性界面活性剤を使用することが好ましい。優れた結果は、Polysorbate 80の商標で入手可能なソルビタンモノオレエートポリオキシエチレンを利用して達成されている。

10

## 【0053】

いくつかの実施形態において、組成物は抗酸化剤を含む。組成物中で使用することができる薬学的に許容される抗酸化剤の例としては、アスコルビン酸、アスコルビン酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、8-ヒドロキシキノリン、およびN-アセチルシステインが含まれる。組成物は、約0.001～約0.01重量%の抗酸化剤を含むことが推奨される。

20

## 【0054】

また、安定性の目的のために、銀ナノ粒子製剤は、微生物汚染および増殖から保護されるべきである。組成物中で使用することができる薬学的に許容される抗菌剤の例としては、第四級アンモニウム化合物（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、セトリミド、および塩化セチルピリジニウム）；水銀剤（例えば、硝酸フェニル水銀、酢酸フェニル水銀、およびチメロサル）；アルコール剤（例えば、クロロブタノール、フェニルエチルアルコール、およびベンジルアルコール）；抗菌性エステル（例えば、パラヒドロキシ安息香酸のエステル）；ならびに、他の抗菌剤（例えば、クロルヘキシジン、クロロクレゾール、およびポリミキシン）が含まれる。組成物は、約0.001～約1重量%の抗菌剤を含むことが推奨される。

30

## 【0055】

本発明の製剤は、好ましくは、組成物による鼻粘膜の刺激を防止するために機能する等浸透圧剤を含む。無水形態のデキストロースは、好ましい等浸透圧剤である。使用することができる他の薬学的に許容される等浸透圧剤の例としては、塩化ナトリウム、デキストロースおよび塩化カルシウムが含まれる。組成物は、約5重量%までの等浸透圧剤を含むことが推奨される。

## 【0056】

本発明の銀ナノ粒子製剤は、任意の好適な方法で調製することができる。好ましい形態において、医薬および分散剤の固体粒子の水性懸濁液を形成し、懸濁剤を含む水性懸濁液と組み合わせる。前者は、好ましくは分散剤の水溶液に医薬を添加し、十分に混合することによって調製する。後者は、懸濁剤を添加する前に水（pH約4.7～約5.3）を酸性化することによって調製する。特に好ましい形態において、第4の化合物（抗菌剤）の水溶液を医薬の水性懸濁液に添加し、他の成分（例えば、等浸透圧剤、抗酸化剤またはキレート剤）をチキソトロピー懸濁液に添加する。上述の組成物の各バッチは、組み合わせる前に完全に混合される。組成物のバッチを組み合わせる好ましい手段は、バッチの1つ（好ましくは「医薬」バッチ）を、例えば、他のバッチを通してバッチを上方にポンプ輸送することによって、他のバッチの底部に導入することである。組み合わせたバッチを含む組成物を完全に混合する。好ましい調製方法の使用は、組成物の中に実質的に均一に分散された医薬の固形粒子を有する組成物を製剤化するための効率的および効果的な方法を提供し、その一方で、水系医薬組成物の調製に一般的に関連する課題（例えば、過剰な発

40

50

泡および粒子分散の不均一性)を回避する。

【0057】

鼻腔のそれぞれに適用される銀ナノ粒子製剤の量は、処置される状態の性質および処置される個体の性質に応じて変化する。いくつかの好ましい実施形態において、銀ナノ粒子製剤の1日の投薬量は1日当たり1~8回の投与で送達される。したがって、本発明は、鼻腔などの体腔内に送達するための銀ナノ粒子製剤をその中に有するスプレーボトルを含む製品を提供する。スプレーボトルは、好ましくは、銀ナノ粒子製剤をボトルから放出するためのポンプシステム、例えば、圧縮ポンプ、噴霧ポンプ、または予圧ポンプを含んでいてもよい。

【0058】

いくつかの実施形態において、銀ナノ粒子は、ミストなどによる大気処理に使用することができる流体中で提供される。いくつかの実施形態において、本発明は、リザーバ、ポンプ、およびノズルを含むデバイスを提供し、リザーバは、銀ナノ粒子を含むミストを提供するために、ノズルを通してポンプを介して放出されることができる銀ナノ粒子を含む液体(例えば、懸濁液)を含む。いくつかの実施形態において、デバイスは噴霧器であるが、他の実施形態においてはデバイスが自動ミストディスペンサーである。

【0059】

いくつかの実施形態において、銀ナノ粒子は、適切なエアロゾル噴霧分配デバイス内のエアロゾルスプレーとして提供される。したがって、いくつかの実施形態において、本発明は、銀ナノ粒子およびエアロゾル噴射剤を含むデバイスまたは組成物を提供する。噴射剤としては、揮発性炭化水素の混合物、典型的にはプロパン、n-ブタンおよびイソブテン、ジメチルエーテル(DME)、メチルエチルエーテル、亜酸化窒素、二酸化炭素およびヒドロフルオロアルカン(HFA): HFA 134a(1, 1, 1, 2, -テトラフルオロエタン)もしくはHFA 227(1, 1, 1, 2, 3, 3, 3-ヘptaフルオロプロパン)のいずれか、またはこれら2つの組合せが含まれるが、これらに限定されない。典型的には、銀ナノ粒子懸濁液は噴射剤と混和性がある。

【0060】

いくつかの好ましい実施形態において、本発明のエアロゾルは、種々の公知の噴霧技術を使用してナノ粒子含有懸濁液を噴霧することによって作製される。おそらく最も単純なシステムは、液体噴射剤中の有効成分(本件の場合には銀ナノ粒子)の溶液または懸濁液からなる「wo-phase」システムである。液相および気相の両方が加圧容器中に存在し、容器上のバルブが開かれると、ナノ粒子分散液を含有する液体噴射剤が放出される。成分の性質およびバルブ機構の性質に応じて、微細エアロゾルミストまたはエアロゾル湿式スプレーが生成される。

【0061】

小容量噴霧器を含む、本発明のエアロゾルを生成するために利用可能な種々の噴霧器が存在する。圧縮機駆動噴霧器はジェット技術を組み込み、圧縮空気を使用してエアロゾルを生成する。市販のデバイスは、Healthdyne Technologies Inc.; Invacare Inc.; Mountain Medical Equipment Inc.; Pari Respiratory Inc.; Mada Mediacal Inc.; Puritan-Bennet; Schuco Inc.; Omron Healthcare Inc.; DeVilbiss Health Care Inc.; および Hospitak Inc から入手可能である。超音波噴霧器は薬物を高い出力で送達し、重度の喘息、または他の重度の呼吸関連疾患に罹患している患者によって使用される。これらの種々のタイプの噴霧器は、銀ナノ粒子のための送達デバイスとして使用してもよい。

【0062】

他の実施形態において、銀ナノ粒子が経鼻スプレーで提供される。いくつかの好ましい実施形態において、経鼻スプレーは、緩衝剤、可溶化剤、保存剤、抗酸化剤、保湿剤、界面活性剤、生体接着性ポリマー、および浸透促進剤から選択される1つ以上の賦形剤を含む。本発明の経鼻スプレーに有用な緩衝剤の例には、リン酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、およびクエン酸が含まれる。経鼻スプレーに有用な可溶化剤の例には、グリコール

10

20

30

40

50

、アルコール、トランスクトール (Transcutol、ジエチレングリコールモノエチルエーテル)、中鎖グリセリド、ラブラソール (Labrasol、飽和ポリグリコール化 C 8 ~ C 10 グリセリド) およびシクロデキストリンなどの溶媒または共溶媒が含まれる。本発明の経鼻スプレーにおいて有用な保存剤の例には、パラベン、フェニルエチルアルコール、ベンザルコニウムクロリド、EDTA およびベンゾイルアルコールが含まれる。本発明の経鼻スプレーにおいて有用な抗酸化剤の例には、重亜硫酸ナトリウム、ブチル化ヒドロキシトルエン、メタ重亜硫酸ナトリウムおよびトコフェロールが含まれる。本発明の経鼻スプレーにおいて有用な保湿剤の例には、グリセリン、ソルビトールおよびマンニトールが含まれる。本発明の経鼻スプレーに有用な界面活性剤の例には、ポリソルベートおよび本明細書の他の箇所に記載される界面活性剤が含まれる。

10

## 【0063】

いくつかの好ましい実施形態において、本発明の P B P を含む経鼻スプレーの pH は pH 5.0 ~ 6.5 である。いくつかの好ましい実施形態において、本発明の P B P を含む経鼻スプレーの浸透圧は、100 m O s m o l / K g から、または、600 m O s m o l / K g である。

## 【0064】

いくつかの実施形態において、P B P 組成物を含む経鼻スプレーは、定量噴霧ポンプで提供される。本発明の定量噴霧ポンプは、好ましくはスプレー当たり 100  $\mu$  l (25 ~ 200  $\mu$  l) を送達する。いくつかの好ましい実施形態において、デバイスは鼻腔内に挿入可能なノズルを含む。

20

## 【0065】

〔実施例〕

(実施例 1)

銀ナノ粒子を調製するために、硝酸銀の 0.1 M 溶液および 0.17 重量%の可溶性デンプンの水溶液を調製する。硝酸銀溶液の 100  $\mu$  l アリコートに 6 mL デンプン溶液に添加する。完全に溶解した後、D-グルコースの 0.1 M 水溶液の 150  $\mu$  l アリコートを攪拌しながら添加する。混合物を 40 に加熱し、この温度で 20 時間維持する。すべての溶液成分は、好ましくは使用前にアルゴンでパージし、酸素を除去するためにアルゴンの存在下で還元を進行させる。懸濁液は 1 時間後に黄色に変わり、これは銀ナノ粒子の形成を示す。20 時間後の試料の UV-vis 吸収スペクトルは、419 nm で最大波長を有するこれらの Ag (0) 粒子の表面プラズモン吸収を示すと予想される。予想される粒子径分布は 5.3 + / - 2.6 nm である。

30

## 【0066】

(実施例 2)

<インビトロ試験：インビトロでのウイルス感染の阻害における Ag NP の抗ウイルス特性の研究>

A 549 細胞、ヒト肺胞 II 型様上皮細胞株、および HEp-2 細胞を、それぞれ、10% (v o l / v o l) F B S、10 mM グルタミン、100 IU / m L ペニシリン、および 100  $\mu$  g / m L ストレプトマイシンが補充された F 12 K および MEM 中で培養する。コンフルエントな単層をウイルスに感染させ、種々の用量の Ag NP (0、10、25 または 50  $\mu$  g / m L) と共に、振盪しながら室温で 1 時間インキュベートした後、プレーティングする。A 549 細胞および HEp-2 細胞を、感染多重度 (MOI) 1 において 24 時間、および MOI 0.01 において 48 時間、それぞれ感染させる。感染後、上清を等分し、80 で保存する。ウイルス力価を評価するために、感染上清の連続 5 倍希釈を、メチルセルロースオーバーレイ下でのブランクアッセイによって決定する。5 日後にブランクを可視化し、ウイルス力価を PFU / m L として算出する。乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) 細胞傷害性アッセイを、細胞傷害を測定するために上清に対して実施する。

40

## 【0067】

(実施例 3)

50

< インビボ試験：インビボでのウイルス感染の阻害における AgNP の抗ウイルス特性の研究 >

10 ~ 12 週齢の BALB / c 雌マウスを Jackson Laboratory から購入し、動物研究施設において病原体を含まない条件下で飼育する。ケタミン (90 ~ 150 mg / kg) とキシラジン (7.5 ~ 16 mg / kg) との混合物を、麻酔および安楽死のために腹腔内 (IP) 注入によって投与する。AgNP の投薬量は、動物の体重に基づいて算出する。すべての接種物を、接種前に室温で 1 時間振盪しながらインキュベートする。浅い麻酔下で、模倣接種物として 100  $\mu$ L の無菌 PBS (陰性対照 1) ; PBS で希釈した AgNP (2 mg / kg または 4 mg / kg) (陰性対照 2) ; 5 x 10<sup>6</sup> PFU の用量である、PBS で希釈したウイルス (陽性対照) ; PBS で希釈した、AgNP と混合したウイルス (2 mg / kg または 4 mg / kg) (処置) をマウスに鼻腔内接種した。すべての群の動物について、体重減少、疾患スコア、および呼吸器症状の存在について毎日評価する。体重変化の割合を経時的にプロットする。臨床疾患スコアは、標準化された 0 ~ 5 の等級付けシステム (0 - 疾患なし、1 - わずかに波打った毛、2 - 完全に波打った毛、3 - 波打った毛および湾曲した背中、4 - 波打った毛、湾曲した背中および活動していない、ならびに 5 - 死) を使用して、2 人の研究者によって視覚的に決定される。これらのパラメータは、マウスの実験的感染における肺病理と密接に相関することが示されている。

#### 【0068】

サイトカイン、ケモカイン、インターフェロン、およびエラストラーゼはすべて、感染後 (p.i.) 1 日目および 5 日目に回収された気管支肺胞洗浄液 (BALF) を使用して測定される。総タンパク質は、感染後 1 日目および 5 日目に回収された BALF を使用して測定される。BALF 中のサイトカインおよびケモカインの量は、Bio-Plex Pro Mouse Group 1 23-plex パネル (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) を使用して決定する。インターフェロン (IFN) - および IFN - は、製造業者のプロトコール (PBL Biomedical Laboratories, Piscataway, NJ, USA) に従って、ELISA によって測定される。総タンパク質濃度は、ブラッドフォード法 (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) を使用して決定する。好中球エラストラーゼは、好中球エラストラーゼ ELISA キット (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を使用して測定する。すべてのマイクロプレートアッセイについての吸光度は、マイクロプレートリーダーで測定される。

#### 【0069】

(実施例 4)

< マウス研究：ウイルスによる死亡率、ならびに、肺におけるウイルス感染および複製の阻害における銀ナノ粒子の有効性の試験 >

8 ~ 10 週齢の BALB / c 雌マウスを 36 匹、Jackson Laboratory から購入し、動物研究施設において病原体を含まない条件下で飼育する。ケタミン (90 ~ 150 mg / kg) とキシラジン (7.5 ~ 16 mg / kg) との混合物を、麻酔のために腹腔内 (IP) 注入によって投与する。浅い麻酔下で、マウスに 20  $\mu$ L のウイルス力価を鼻腔内接種する。マウスを、4 つの群 (N = 9 / 各グループ) に分ける：(1) ウイルスのみ (陽性対照) ; (2) 模倣接種物としての無菌 PBS (陰性対照 1) ; (3) PBS で希釈した AgNP で処理 (処理) ; および (4) オセルタミビル (インフルエンザに対して広く使用される ノイラミニダーゼ阻害剤ベースの抗ウイルス剤) で処理。ウイルスによる 24 時間の感染後、AgNP および オセルタミビル をそれぞれ、5 mg / kg および 20 mg / kg マウス体重の濃度で、鼻腔内投与による吸収を介して麻酔したマウスに投与する。抗ウイルス処理は、次の 2 日間、毎日繰り返される。臨床的徴候、体重の変化、および死亡率を、14 日目まで毎日記録する。

#### 【0070】

マウスを 殺した後、3 匹のマウスを無作為に選択し、それらの肺を秤量して次の式を使用して肺指数を算出する：(肺の重量 / マウスの重量) x 100%。肺ホモジネートを

10,000gで10分間遠心分離し、その後、上清を、標準的な血球凝集素アッセイによるウイルス力価の決定のために回収する。

【0071】

肺組織学のために、各マウスから右肺の中葉を取り出し、10%ホルムアルデヒド溶液中で24~48時間固定する。組織を段階的に連続でエタノールによって脱水し、パラフィンに包埋する。切片をワックス中に包埋し、ヘマトキシリンおよびエオシン(H&E)染色のために5μmの切片に切り出し、病理学的変化を光学顕微鏡により研究する。特に、組織病理スライドは、肺胞の構造、リンパ球浸潤、および肺胞壁壊死の変化について観察する。

【0072】

本実験は、第1の実験においてマウスから回収された肺ホモジネートから回収されたウイルス力価を使用して繰り返される。臨床的徴候、体重の変化、および死亡率を、14日目まで毎日記録する。簡単に記載すると、第1の実験の6日目に、各群からの3匹のマウスをイソフルランの過剰投与によって安楽死させる。肺を抽出し、2mMエチレンジアミン四酢酸(EDTA)リン酸緩衝生理食塩水中で洗浄し、さらなる実験まで-80に保つ。肺組織の一部をホモジナイズし、マウス感染の2回目の継代のために鼻腔内投与する。

【0073】

(実施例5)

安定化されたAgNP(銀ナノ粒子)のコロイド溶液は、以下のように調製してもよい。硝酸銀塩(2mL、100mM)、重炭酸ナトリウム(0.4mL、120mM)およびタンニン酸(2mL、5.8mM)の水溶液を、pHを7.4に調整しながら混合し、次いで攪拌しながら1時間還流させて、酸化還元反応を完了させる。最終懸濁液は、AgNPの証拠である透明な暗褐色懸濁液である(図1a参照)。

【0074】

前記懸濁液をいくつかのCMCコントロールを通して試験する(図1参照)。前記懸濁液のUV-vis吸収スペクトルは、~411nmの波長で狭い単一表面プラズモンピークを有し、前記懸濁液中の球状AgNPの非常に狭いサイズ分布を示唆した。(図1b参照)。

【0075】

動的光散乱および透過型電子顕微鏡法(TEM)を使用して、さらなる特性評価を行う。AgNPは、TEM画像において、球形および主に3~5nmのサイズであり(図1c参照)、狭いサイズ分布である(図1d参照)ことが確認される。AgNP懸濁液は、室温において暗所で保存され、粒子沈殿がなく室温で6か月にわたって安定であることが実証されている。

【0076】

(実施例6)

本実施例は、免疫蛍光に基づくアッセイを使用して、SARS-CoV2に対する銀ナノ粒子の抗ウイルス性および細胞毒性に関連するデータを提供する。本実施例で使用される銀ナノ粒子は、実施例5に従って製造された。

【0077】

銀ナノ粒子の抗ウイルス活性を決定するために、2つの手順に従った。銀ナノ粒子を、細胞に添加する2時間前にSARS-CoV2と混合するか、または、感染2時間後にペロ細胞に添加した。感染を1時間実施し、ウイルスを洗浄により除去し、細胞を分析前に24時間インキュベートした。銀ナノ粒子を、40μg/ml~0μg/mlの範囲の複数の希釈において試験した。抗ウイルス活性を、免疫蛍光に基づくアッセイを使用して24時間で決定した。細胞毒性は、同じ濃度のナノ粒子によって処理した非感染細胞に対するMTTアッセイを使用して決定した。レムデシビルをアッセイ対照として含めた。

【0078】

感染24時間後の免疫蛍光に基づくアッセイを使用し、銀ナノ粒子はSARS-CoV

10

20

30

40

50

2に対する抗ウイルス活性を示し、EC50は0.1 µg/ml(感染前投与時)と2.3 µg/ml(感染後投与時)との間であり、選択性指数はそれぞれ54.8または4.5であった。対応するEC90およびSI90値は、3.4 µg/mlおよび2.5 µg/ml(EC90)ならびに17.1および16.9(SI90)であった。細胞毒性は5 µg/ml超の濃度において観察された。

【0079】

銀ナノ粒子はSARS-CoV2に対して抗ウイルス活性を示し、EC50およびEC90値は、低いマイクログラム/mlの範囲である。細胞毒性は5 µg/ml超の濃度で観察された。

【0080】

(実験手順)

7つの希釈物の銀ナノ粒子の抗ウイルス活性を、次の2つの投与様式で調査した：感染前のウイルスとのインキュベーション(感染前)；およびSARS-CoV2による感染後の細胞とのインキュベーション(感染後)。細胞をウイルスに1時間感染させ、洗浄し、細胞を24時間培養した。同じ範囲の濃度の銀ナノ粒子の細胞毒性をMTTアッセイによって決定した。

【0081】

(細胞プレーティング)

細胞を完全培地(5%FBSが補充されたM199培地)中で培養した。細胞を分離し、SOP-RA 003およびSOP-RA 004に従って計数した。カウントは、Cell Count Logbook, Volume 1, 27/Jan/2021に記録した。細胞は、2つのプレートで、8,000個の細胞/100 µl/ウェルで完全培地に播種した：1つは細胞毒性アッセイ用であり、もう1つは感染アッセイ用である。播種後、プレートを室温で5分間、さらなる分配のためにインキュベートし、次いで翌日まで37、5%CO<sub>2</sub>にてインキュベートした。

【0082】

(ウイルス希釈)

ウイルスストックを $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/mlの濃度に希釈した。2 µlの希釈されたウイルスを5000 µlの補充された0.4%BSA培地(MOI0.002、レムデシビル用)に移した。20 µlの希釈されたウイルスを、5000 µlの補充された0.1%BSA培地(MOI0.02、ナノ粒子用)に移した。培地を細胞から除去し、50 µlのウイルス(MOI0.02)をカラム1~6に使用した。培地を細胞から除去し、50 µlのウイルス(MOI0.002)をカラム7~10(レムデシビル7~9および感染対照10)に使用した。第11列(非感染対照)。

【0083】

(銀ナノ粒子希釈)

初期ストック1600 µg/mlを以下のように水で希釈した。

【0084】

60 µlの銀ナノ粒子を0 µlのH<sub>2</sub>Oおよび1140 µlの補充培地(0.1%BSA)に添加して、80 µg/mlの濃度を達成した；

30 µlの銀ナノ粒子を30 µlのH<sub>2</sub>Oおよび1140 µlの補充培地(0.1%BSA)に加えて、40 µg/mlの濃度を達成した；

15 µlの銀ナノ粒子を45 µlのH<sub>2</sub>Oおよび1140 µlの補充培地(0.1%BSA)に加えて、20 µg/mlの濃度を達成した；

7.5 µlの銀ナノ粒子を52.5 µlのH<sub>2</sub>Oおよび1140 µlの補充培地(0.1%BSA)に添加して、10 µg/mlの濃度を達成した；

3.76 µlの銀ナノ粒子を56.24 µlのH<sub>2</sub>Oおよび1140 µlの補充培地(0.1%BSA)に添加して、5 µg/mlの濃度を達成した；

1.88 µlの銀ナノ粒子を58.12 µlのH<sub>2</sub>Oおよび1140 µlの補充培地(0.1%BSA)に添加して、2.5 µg/mlの濃度を達成した；

10

20

30

40

50

0  $\mu$  l の銀ナノ粒子を 60  $\mu$  l の H<sub>2</sub>O および 1140  $\mu$  l の補充培地 (0.1% BSA) に添加して、0  $\mu$  g / ml の濃度を達成した。

【0085】

(レムデシビル希釈)

初期ストック 10 mM を以下のように希釈した：3  $\mu$  l の初期ストックを 747  $\mu$  l の補充培地 (0.4% BSA) で希釈して、40  $\mu$  M の使用溶液 (working solution) を得た。

【0086】

(細胞処理)

(感染前)

それぞれの濃度の銀ナノ粒子を、ウイルス (感染性アッセイ) または 0.1% BSA を補充した培地 (細胞毒性アッセイ) と 1 : 1 で、37 °C で 2 時間、3 連で混合した。インキュベーション後、細胞を補充培地 (0.1% BSA) で洗浄し、カラム 1、2、および 3 に、100  $\mu$  l のウイルス (MOI 0.02) (免疫蛍光) または培地 (細胞毒性) + 銀ナノ粒子ブレインキュベートサンプルを、37 °C で 1 時間、細胞に移した。インキュベーションの最後に、細胞を補充培地 (0.1% BSA) で洗浄し、37 °C で 24 時間培養した。

【0087】

(感染後)

補充培地 (0.1% BSA) をウイルス (MOI 0.02) と 1 : 1 で混合し、100  $\mu$  l をカラム 4、5 および 6 の細胞に、37 °C で 1 時間添加した。感染後、各濃度の銀ナノ粒子を、補充培地 (0.1% BSA) と 1 : 1 で、3 連で混合した。細胞を補充培地 (0.1% BSA) で洗浄してウイルスを除去し、100  $\mu$  l の銀ナノ粒子を 37 °C で 2 時間、細胞に添加した。インキュベーションの最後に、細胞を補充培地 (0.1% BSA) で洗浄し、感染から 24 時間、37 °C にて培養した。

【0088】

(対照)

レムデシビル (40  $\mu$  M 使用溶液) を、8 段階希釈系列のために 3 倍連続希釈した。希釈したレムデシビルを、ウイルス (感染性アッセイ) または補充培地 (0.4% BSA、細胞毒性アッセイ) と 1 : 1 で、3 連で混合した。細胞を補充培地 (0.4% BSA) で洗浄し、カラム 7、8、および 9 では、100  $\mu$  l のレムデシビル + ウイルス (MOI 0.002、感染性アッセイ) または補充培地 (細胞毒性アッセイ) を、37 °C で 24 時間細胞に移した。未処理の感染した対照および未処理かつ未感染の対照を、それぞれカラム 10 および 11 に含めた。

【0089】

(固定および展開)

24 時間後、1 つのプレートが PBS によって洗浄し、4% ホルムアルデヒドによって 30 分間固定した。PBS で再度洗浄し、染色するまで 4 °C で PBS 中に保存した。細胞毒性プレートを MTT によって処理して、細胞生存率を決定した。

【0090】

(感染性の読み取り)

細胞を SOP - RA 005 に従って免疫染色した。簡潔に述べると、残留ホルムアルデヒドを 50 mM 塩化アンモニウムでクエンチし、その後、細胞を透過処理し (0.1% Triton X100)、SARS-CoV2 スパイクトタンパク質を認識する抗体 (GeneTex GTX632604) で染色した。一次抗体を Alexa-488 コンジュゲート二次抗体 (Life Technologies、A11001) で検出し、核を Hoechst で染色した。10 $\times$  対物レンズを使用して、CellInsight 高含有量共焦点顕微鏡 (サーモフィッシャー) で画像を取得し、HCS studio (感染細胞 / 全細胞  $\times$  100) を使用して感染率を算出した。

【0091】

10

20

30

40

50

(細胞毒性の読み取り)

細胞毒性は、SOP-RA 006に従ったMTTアッセイによって検出した。簡潔に述べると、MTT試薬(Sigma、M5655)を37℃、5%CO<sub>2</sub>で2時間、細胞に添加し、その後、培地を除去し、沈殿物をイソプロパノール:DMSO(1:1)の混合物で20分間可溶化させた。上清を洗浄プレートに移し、570nmでシグナルを読み取った。

【0092】

(EC50濃度の決定 - IFアッセイ)

正規化した阻害率は、以下の式を使用して計算した：

【0093】

【数1】

$$\text{正規化した阻害\%} = 100 \times \left( 1 - \frac{\text{感染\% 試料} - \text{感染\% 未感染対照}}{\text{感染\% 感染対照} - \text{感染\% 未感染対照}} \right)$$

10

【0094】

EC50値を、GraphPad Prism(バージョン9)を使用して、化合物濃度対正規化した阻害率の対数の最良適合(非線形回帰分析、可変勾配)を表す曲線から外挿した。

【0095】

(TC50濃度の決定)

細胞毒性の割合は、以下の式を使用して計算した：

【0096】

【数2】

$$\text{細胞毒性(\%)} = 100 - \left( 100 \times \frac{\text{吸光度 試料}}{\text{吸光度 未処理対照}} \right)$$

20

【0097】

TC50値は、GraphPad Prism(バージョン9)を使用して、化合物濃度対正規化した細胞毒性の割合の対数の最良適合(非線形回帰分析、可変勾配)を表す曲線から外挿した。

30

【0098】

(結果)

表1は、銀ナノ粒子(MOI0.02)およびレムデシビル対照(MOI0.002)についてのEC50、EC90、TC50、TC90ならびに選択性指数(SI)50およびSI90を示す。

【0099】

表2は、銀ナノ粒子またはレムデシビル(アッセイ対照)と24時間インキュベートした後のSARS-CoV2に感染したVero細胞の割合を示す。7つの希釈物を表に示すように試験した。3回の技術的繰り返しを行った。未処理の感染対照および未処理の未感染対照を含めた。

40

【0100】

SARS-CoV2感染の阻害は、銀ナノ粒子で処理した細胞において観察され、EC50は0.1μg/ml(感染前)および2.3μg/ml(感染後)であった。同じ実験条件に対するEC90は、それぞれ3.4μg/mlおよび2.5μg/mlであった。感染前の様式については、試験した濃度が追加の希釈を超える阻害効果の漸進的な低下を観察することを可能にできなかったため、EC50値を外挿する。

【0101】

5μg/ml以上の濃度で高細胞毒性が観察され、TC50値は6.1μg/ml(感染前)および10.3μg/ml(感染後)であった。同じ実験条件に対するTC90は

50

、それぞれ 58.3 μg/ml および 42.2 μg/ml であった。SI50 は 54.8 (感染前) および 4.5 (感染後) であり、SI90 は 17.1 (感染前) および 16.9 (感染後) であった。

【0102】

【表1】

試験項目	EC50 (μg/ml)	TC50 (μg/ml)	SI50	EC90 (μg/ml)	TC90 (μg/ml)	SI90
銀ナノ粒子-感染前	0.1114	6.185	54.803	3.412	59.372	17.108
銀ナノ粒子-感染後	2.284	10.27	4.496	2.495	42.153	16.895
試験項目	EC50 (μM)	TC50 (μM)	SI50	EC90 (μM)	TC90 (μM)	SI90
レムデシビル-感染を伴う	0.6599	777541304	420360852	1.687	3.44E+16	2.04E+16

10

表1. 各試験化合物のEC50、TC50、EC90、TC90、およびSI50 (=TC50/EC50) およびSI90 (=TC90/EC590) の値

【0103】

【表2】

試験化合物 (μg/ml)	感染前 0.02			感染後 0.02		
40	0.00	0.00	0.38	2.54	2.05	1.76
20	0.81	0.70	1.58	5.26	1.90	2.02
10	0.78	0.48	1.12	0.29	0.42	1.19
5	3.40	2.90	1.39	0.27	0.29	0.32
2.5	1.68	1.43	0.72	2.44	1.92	1.91
1.25	3.52	2.25	4.28	28.82	20.44	15.81
0	14.60	14.02	72.02	31.43	17.58	11.31

20

レムデシビル (μM)	レムデシビル 0.002			感染	未感染
20.00	0.78	0.24	0.27	28.65	0.09
6.67	0.34	0.27	0.23	12.56	0.39
2.22	2.04	1.54	1.69	13.81	0.11
0.74	10.55	6.40	14.40	31.82	0.42
0.25	8.05	17.17	39.50	18.84	0.19
0.08	37.97	32.40	10.00	10.12	0.29
0.03	20.60	10.69	23.44	28.05	0.11
0.01	17.52	14.77	19.44	41.80	0.10

30

表2. 24時間における感染割合

【0104】

(結論)

試験した条件下で、銀ナノ粒子は感染後 24 時間で SARS-CoV-2 に対して抗ウイルス活性を示し、EC50 値は 0.1 ~ 2.3 μg/ml (SI50 は 54.8 ~ 4.5) および EC90 値は 3.4 ~ 2.5 μg/ml (SI90 は 17.1 ~ 16.9) であった。5 μg/ml 以上の濃度において有意な細胞毒性が観察された。銀ナノ粒子はウイルスの感染前に添加されたときにより強力であった。しかしながら、これはまた、より高い細胞毒性を伴った。感染後に銀ナノ粒子を添加すると、EC50 値よりわずかに高い濃度でのみ、感染阻害率 90% に達する。

40

【0105】

(実施例7)

本発明の処置方法は SARS-CoV-2 (すなわち、COVID-19 疾患の処置) を含むが、これに限定されず、呼吸器ウイルスによる感染症の処置のために、連続噴霧器

50

を介した安定化された AgNP の水性懸濁液の肺内へのエアロゾル化を企図する。このようにして吸入された AgNP は、上気道および下気道に留まった呼吸器ウイルスに付着し、ウイルスの形態学的構造を破壊し、宿主細胞の受容体へのスパイクタンパク質の結合を遮断し、ウイルス感染および複製を阻害することが企図される。

【0106】

噴霧薬物送達は、経口摂取または IV 注入と比較して多数の利点を提供する。エアロゾル化された薬物製剤は、上気道および下気道との即時の接触を提供する。これは、肺の種々の領域の標的化を成功させるための非侵襲的技術である。この技術は、従来の薬物療法と比較して、有害な薬物反応を減少させる。

【0107】

いくつかの公開された研究のレビューに基づいて、インビトロでの抗ウイルス AgNP の最小阻害濃度 (MIC) は約  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  である。気管支樹の層 (lining) の粘液量は約  $1 \text{ mL}$  である [24]。したがって、目標は、気管支樹を含む肺領域に  $10 \mu\text{g}$  の AgNP を送達することである。

【0108】

呼吸器感染症は、肺領域の粘液産生を 3 倍増加させる。結果として、抗生物質臨床吸入療法において一般的であるように [19]、気管支樹における堆積目的用量は MIC の 3 倍、すなわち、約  $30 \mu\text{g}$  の AgNP であるべきである。

【0109】

一般的に利用可能な手持ち式連続噴霧器は  $5 \mu\text{m}$  サイズの水滴をエアロゾル化する。当該噴霧器は、肺の気管支肺胞領域を標的とするのに有効である。 $5 \mu\text{m}$  のエアロゾル小滴の経口呼吸下で、気管支樹における堆積量は約 30% である。したがって、吸入された送達投薬量は、気管支樹粘液層において目標用量に達するために、3.33 倍の  $100 \mu\text{g}$  の AgNP に調整すべきである。

【0110】

吸入送達のために薬物の  $3 \text{ mL}$  懸濁液を噴霧することは、一般的な慣例である。この量は、忍容性が良好な量である。したがって、 $3 \text{ mL}$  の溶液にて  $100 \mu\text{g}$  の AgNP を吸入するためには、コロイド懸濁液は  $33.33 \mu\text{g}/\text{mL}$  であるべきである。しかしながら、連続噴霧器を使用するとき、吸入は呼吸サイクルの 3 分の 1 のみであるので、投薬量の 3 分の 1 のみが吸入される。したがって、水性懸濁液の濃度は、3 倍の  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  に調整される。

【0111】

これらの算出に基づいて、 $3 \text{ mL}$  である、抗ウイルス性 AgNP の  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  水性懸濁液を噴霧することが好ましい。連続噴霧器を使用して投薬量の 3 分の 1 のみが吸入されるので、各用量において約  $100 \mu\text{g}$  の AgNP の吸入がもたらされる。典型的な抗生物質吸入の処置計画として、抗ウイルス療法のために、1 日当たり 3 用量の AgNP を 10 ~ 14 日間にわたって噴霧することがさらに好ましい。これは、10 ~ 14 日間連続して、約  $300 \mu\text{g}$  の AgNP を毎日吸入することになる。

【0112】

上記明細書に記載されている出版物および特許は、すべて参照により本明細書に組み込まれる。本発明の範囲および精神から逸脱することなく、記載された本発明の方法およびシステムの種々の改変および変形することは、当業者であれば自明のことであろう。本発明を、特定の好ましい実施形態との関連において説明してきたが、請求項に記載の本発明がそのような特定の実施形態に限定されるべきでないことは、当然に理解されるべきである。実際、関連技術分野の当業者に明らかである、本発明を実施するための記載された態様の種々の改変は、以下の特許請求の範囲内であることが意図される。

【図面の簡単な説明】

【0113】

【図 1】本発明の銀ナノ粒子懸濁液の懸濁液に関するデータである。

10

20

30

40

50



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2021/025942

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

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

- 1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: 10
  
- 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.: 7-33  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). 20

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. 30
- 2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 40

- 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

International application No.  
PCT/US2021/025942

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC(8) - A61K 9/08; A61K 33/38; A61P 31/12; A61P 31/16 (2021.01)  
CPC - A61K 9/08; A61K 33/38; A61P 31/12; A61P 31/16 (2021.05)

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

10

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
see Search History document

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

20

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 102579490 A (DALIAN UNIVERSITY) 18 July 2012 (18.07.2012) see machine translation	1-5
Y		6
Y	CANDANOSA, Here's How Nanoparticles Could Help Us Get Closer To A Treatment For Covid-19, News @ Northeastern, 04 March 2020 [retrieved on 26 May 2021]. Retrieved from the Internet: <URL: <a href="https://news.northeastern.edu/2020/03/04/heres-how-nanoparticles-could-help-us-get-closer-to-a-treatment-for-covid-19/">https://news.northeastern.edu/2020/03/04/heres-how-nanoparticles-could-help-us-get-closer-to-a-treatment-for-covid-19/</a> >, entire document	6
A	US 2018/0368417 A1 (ATTOSTAT INC) 27 December 2018 (27.12.2018) entire document	1-6
P, X	JEREMIAH et al., Potent antiviral effect of silver nanoparticles on SARS-CoV-2, Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 533, Iss. 1, 26 November 2020 [retrieved on 27 May 2021]. Retrieved from the Internet: <URL: <a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006291X20317575?via%3DiHub">https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006291X20317575?via%3DiHub</a> >, see abstract	1-6

30

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"D" document cited by the applicant in the international application	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"&" document member of the same patent family
"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	

40

Date of the actual completion of the international search 28 May 2021	Date of mailing of the international search report JUL 01 2021
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Harry Kim Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

50

## フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 P 31/14	
A 6 1 P 11/16 (2006.01)	A 6 1 P 11/16	
A 6 1 K 9/10 (2006.01)	A 6 1 K 9/10	
A 6 1 K 9/72 (2006.01)	A 6 1 K 9/72	
A 6 1 K 9/12 (2006.01)	A 6 1 K 9/12	
A 6 1 K 47/36 (2006.01)	A 6 1 K 47/36	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N  
E,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,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K  
E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N  
G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,  
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T R I T O N

Fターム (参考)

FF16 FF36 FF43

4C086 AA01 AA02 HA01 MA02 MA05 MA23 MA41 MA59 NA03 NA05

NA14 ZA59 ZA60 ZB33