

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6835733号
(P6835733)

(45) 発行日 令和3年2月24日(2021.2.24)

(24) 登録日 令和3年2月8日(2021.2.8)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 47/22 (2006.01)	A 6 1 K 47/22
A 6 1 K 31/337 (2006.01)	A 6 1 K 31/337
A 6 1 K 31/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/00
A 6 1 K 47/26 (2006.01)	A 6 1 K 47/26
A 6 1 K 47/42 (2017.01)	A 6 1 K 47/42

請求項の数 16 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-546032 (P2017-546032)
(86) (22) 出願日	平成27年11月24日(2015.11.24)
(65) 公表番号	特表2017-536419 (P2017-536419A)
(43) 公表日	平成29年12月7日(2017.12.7)
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/077441
(87) 国際公開番号	W02016/083338
(87) 国際公開日	平成28年6月2日(2016.6.2)
審査請求日	平成30年11月16日(2018.11.16)
(31) 優先権主張番号	14306876.5
(32) 優先日	平成26年11月25日(2014.11.25)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者	520061804 キュラディグム・エスアエス CURADIGM SAS フランス国、エフー75012 パリ、リ ュ・ドゥ・ワティニー 60
(74) 代理人	110001508 特許業務法人 津国
(72) 発明者	ポティエ, アニエス フランス国、エフー75006 パリ、リ ュ・サントーバーヴ 6
(72) 発明者	ジェルマン, マチュー フランス国、エフー94500 シャンピ ニー・シュル・マルヌ、アヴニユ・マルク ス・ドルモワ 3、アントレ・4

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 医薬組成物、その調製法及び使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(i) ヒトCYP酵素の阻害剤としてフラノクマリン又はフラボノイドから選択される少なくとも1種の天然化合物を含む少なくとも1種の生体適合性ナノ粒子であって、該少なくとも1種の生体適合性ナノ粒子の最長寸法が動的光散乱(DLS)によって測定された少なくとも4nmかつ100nm未満であるナノ粒子と、(ii) 前記ヒトCYP酵素の基質である少なくとも1種の医薬化合物との組合せを特徴とする治療又は予防方法のための医薬であって、ここで、前記治療又は予防方法は、被験体に該少なくとも1種の医薬化合物を投与する段階と、該少なくとも1種の生体適合性ナノ粒子を投与する別の段階とを含み、ここで、該少なくとも1種の生体適合性ナノ粒子は、前記被験体に別個に、該少なくとも1種の医薬化合物の少なくとも5分前と約72時間前の間に投与され、そしてここで、該少なくとも1種の生体適合性ナノ粒子は、治療化合物又は予防化合物として使用されない、医薬。

【請求項2】

少なくとも1種の生体適合性ナノ粒子、及び少なくとも1種の医薬化合物が、両方とも、静脈内(IV)、皮下、経口又は経腸経路である、同じ経路を介して被験体に投与される、請求項1記載の医薬。

【請求項3】

組合せが、ヒトCYP酵素の阻害剤である少なくとも1種の天然化合物を含むか、又はそれからなる、第2の生体適合性ナノ粒子を更に含み、該第2の生体適合性ナノ粒子の最

長寸法が、少なくとも4 nmかつ100 nm未満である、請求項1又は2記載の医薬。

【請求項4】

少なくとも1種の及び/又は第2の生体適合性ナノ粒子が、フラノクマリン又はフラボノイドを含み、そして該フラノクマリン又は該フラボノイドが、該少なくとも1種の及び/又は該第2の生体適合性ナノ粒子に、封入されるか、捕捉されるか、吸収されるか、吸着されるか、結び付けられるか、接合されるか、付着されるか、又は結合されている、請求項3記載の医薬。

【請求項5】

第1の及び第2の生体適合性ナノ粒子が、少なくとも1種の医薬化合物を必要とする被験体に、追加の別の段階において別個に、又は同時に、かつ該少なくとも1種の医薬化合物の5時間超前と約72時間前との間に投与される、請求項3又は4記載の医薬。

10

【請求項6】

第1の及び第2の生体適合性ナノ粒子の一方のみが、医薬化合物と同じ経路である経口又は経腸経路を介して被験体に投与され、残りの生体適合性ナノ粒子が、IV、皮下、経口又は経腸経路から選択される、異なる経路を介して投与される、請求項3～5のいずれか一項記載の医薬。

【請求項7】

第1の及び/又は第2の生体適合性ナノ粒子の少なくとも1種のフラノクマリンが、ベルガモチン、6',7'-ジヒドロキシベルガモチン(DHB)及び6',7'-エポキシベルガモチンから選択される、請求項4～6のいずれか一項記載の医薬。

20

【請求項8】

第1の及び/又は第2の生体適合性ナノ粒子の少なくとも1種のフラノクマリンが、フラノクマリンモノマー、ダイマー又はオリゴマーである、請求項4～7のいずれか一項記載の医薬。

【請求項9】

少なくとも1種のフラノクマリンダイマーが、パラジシンである、請求項8記載の医薬。

【請求項10】

フラボノイドが、アカセチン、ナリングニン、アピゲニン及びケルセチンから選択される、請求項4～6のいずれか一項記載の医薬。

30

【請求項11】

少なくとも1種の及び/又は第2の生体適合性ナノ粒子のそれぞれが、生体適合性コーティングで更に覆われている、請求項3～10のいずれか一項記載の医薬。

【請求項12】

生体適合性ナノ粒子が、経口又は経腸経路を介して投与される場合、少なくとも1種の及び/又は第2の生体適合性ナノ粒子が、腸細胞及び/又は肝細胞によるナノ粒子の認識を増強する薬剤として糖類、レクチン又はビタミンを含む、請求項3～11のいずれか一項記載の医薬。

【請求項13】

生体適合性ナノ粒子が、IV又は皮下経路を介して投与される場合、肝細胞によるナノ粒子の認識を増強する薬剤は、ガラクトース、N-アセチルガラクトサミン又はN-アセチル-グルコサミンを含むか、又はそれからなり、そして生体適合性ナノ粒子が、経口又は経腸経路を介して投与される場合、腸細胞及び/又は肝細胞によるナノ粒子の認識を増強する薬剤は、マンノース、レクチン又はビタミンを含むか、又はそれからなる、請求項12記載の医薬。

40

【請求項14】

生体適合性ナノ粒子及び少なくとも1種の医薬化合物の併用投与が、該少なくとも1種の医薬化合物の標準的な治療用量と比較した場合に、同じ生物学的利用能を維持しながら、投与される該少なくとも1種の医薬化合物の治療用量の少なくとも20%の低減が可能になる、請求項1～13のいずれか一項記載の医薬。

50

【請求項 15】

少なくとも1種の生体適合性ナノ粒子が、請求項1記載の少なくとも1種の医薬化合物を必要とする被験体へのその投与後の1時間と6週間との間にそれが投与された前記被験体から除去される、請求項1～14のいずれか一項記載の医薬。

【請求項 16】

少なくとも1種の医薬化合物が、CYP1A2、CYP2A6、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1及びCYP3A4から選択されるCYP450酵素の基質である、請求項1～15のいずれか一項記載の医薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本開示は一般に、医薬の分野に関する。本発明は、より具体的には、(i)少なくとも1種の天然化合物、典型的にはヒトCYP酵素の阻害剤であるフラノクマリンのような少なくとも1種の天然化合物、又はその合成類似体を含むか、又はそれからなる、少なくとも1種の生体適合性ナノ粒子であって、該ナノ粒子の最長寸法が少なくとも4nmかつ100nm未満であるナノ粒子と、(ii)少なくとも1種の目的化合物、典型的には少なくとも1種の医薬化合物であって、このような少なくとも1種の目的化合物を必要とする被験体に投与される化合物との組合せを含む医薬組成物であって、この少なくとも1種の生体適合性ナノ粒子と少なくとも1種の目的化合物との組合せが、少なくとも1種の目的化合物の生物学的利用能を増強する、医薬組成物に関する。好ましくは、少なくとも1種の生体適合性ナノ粒子は、それ自体は治療化合物又は予防化合物として使用されない。

20

【0002】

少なくとも1種の生体適合性ナノ粒子は、少なくとも1種の目的化合物とは別個に(好ましくは前に)、典型的には、少なくとも約5分(好ましくは約5分超)と約72時間との間の間隔をあけて被験体に投与される。

【0003】

本開示は更に、治療領域におけるこの医薬組成物の使用に関する。本発明の医薬組成物は、典型的には、該医薬化合物の各々の標準的な医薬用量と比較した場合、投与化合物の医薬用量の少なくとも約20%の低減を可能にする。

【背景技術】

30

【0004】

安全性及び有効性を保証するために、治療化合物は、それを必要とする被験体において最適な速度でその標的部位に選択的に送達されることが要求される。

薬物動態(pK)は、生物に外部から投与される物質の運命決定に取り組む薬理学の一分野である。この決定は、十分長い期間にわたって、好ましくは化合物の排泄まで、全ての主要組織における化合物濃度を測定する工程を含む。薬物動態は、その生体内でのその吸収及び分布の機序並びにその化学変化を含む、インビボでの化合物の挙動を効率的に記述するのに必要とされる。血中のpKプロフィールは、体が化合物をどのように取り扱うかを定量的に記述する重要なpKパラメーターを得るために、種々のプログラムを用いて適合させることができる。重要なパラメーターには、最大濃度(C_{max})、半減期(t_{1/2})、クリアランス、曲線下面積(AUC)、及び平均滞留時間(MRT)、即ち、ある化合物が生物内に留まる平均時間が含まれる。pKデータは、最小限の副作用で治療薬の効率を改善するために、望ましい血中濃度を維持するための最適用量及び投薬計画を決定する際にしばしば使用される。更に、当業者には周知であるとおり、化合物の血中濃度は、大抵の場合、典型的には遊離薬物について、その効力及び毒性の両方と相関する。

40

【0005】

患者間の薬物反応の差はよく有ることであり、しばしば個々の患者のための投薬計画の最適化における課題をもたらす。大部分の主要な薬剤は、患者のわずか25～60%に有効であり、そして米国では死亡100,000例を含めて毎年200万症例を超える薬物有害反応が発生している[Drug metabolism and variability among patients in drug r

50

esponse. Wilkinson G R. The New England Journal of Medicine. 352;21 May 26, 2005, 2211-21]。このような患者間の薬物反応の変動性は、所与の薬物の体内動態（吸収、分布、代謝、及び排泄）に影響する環境、遺伝及び疾患決定因子を含めて多因子的である。これらの因子の相互作用は、薬物に対する経時的な血漿中濃度のプロファイルを決め、よって、標的との相互作用の部位におけるその誘発薬理作用を決定する。

【 0 0 0 6 】

チトクロム P - 4 5 0 酵素 (C Y P) は、肝臓及び腸で発現される酵素のファミリーである。これらは、食べ物や環境に存在する多くの化学物質を、更には薬物を代謝する。チトクロム P - 4 5 0 酵素は、多くの薬物の薬理活性を低下又は変化させて、その排除を容易にする。

10

【 0 0 0 7 】

肝臓はチトクロム P - 4 5 0 介在性代謝の主要部位であるが、小腸上皮の腸細胞も重要な部位である可能性がある。よって、薬物の経口投与後、腸及び肝臓に位置するチトクロム P - 4 5 0 酵素は、全身循環に到達する用量の割り当て（即ち、生物学的利用能）を低下させ、続いて薬物の効果 / 効率に影響を与えるかもしれない（初回通過代謝と呼ばれる現象）。

【 0 0 0 8 】

更に、関与する酵素の阻害又は誘導のいずれかをもたらす薬物相互作用は、生物学的利用能を顕著に変化させる可能性がある。C Y P 3 A は、小腸上皮及び肝臓の両方に豊富に存在するため、全ての薬物代謝酵素の中で恐らく最重要である。薬物相互作用は、C Y P 3 A 活性を阻害するか又は低下させるか、あるいは逆に C Y P 3 A 代謝活性を誘導するか又は増加させるかもしれない。このような相互作用は、血中薬物レベルの変動性の範囲を約 4 0 0 倍に拡大することができる。この薬物レベルの変動性は、認識及び理解されなければ、投薬量最適化において重大な治療上の問題を提示する可能性がある。

20

【 0 0 0 9 】

患者への投与量を維持しながら、好ましくは低下させながら、薬物の生物学的利用能を高める（即ち、薬物の初回通過代謝を減少させる）必要性は、長い間解決されていない。また、個々の患者のための投薬計画を最適化するために、血中薬物レベルの変動性を低下させる必要性も長く解決されていない。

【 0 0 1 0 】

詳細な説明

30

本発明は今や、治療及び / 又は予防に関連してその / それらの意図された用途が何であれ、目的化合物（本明細書では単に「化合物」としても特定される）又は幾つかの目的化合物の組合せの生物学的利用能の最適化を可能にする。（ i ）少なくとも 1 種の生体適合性ナノ粒子と、（ ii ）少なくとも 1 種の目的化合物、典型的には少なくとも 1 種の医薬化合物との組合せである、本明細書に記載の組成物は、被験体における少なくとも 1 種の目的化合物の生物学的利用能を最適化する。好ましくは、この少なくとも 1 種の生体適合性ナノ粒子は、それ自体は治療化合物又は予防化合物として使用されない。こうして被験体における治療効果及び / 又は予防効果を得るために必要とされる目的化合物の用量が低減され、それによって該被験体の健康関連の生活の質が改善される。典型的には、（少なくとも 1 種の）生体適合性ナノ粒子と目的化合物との間の比は、0 . 1 / 1 ~ 1 0 0 0 / 1 又は 0 . 5 / 1 ~ 1 0 0 0 / 1 の間、好ましくは 0 . 5 / 1 ~ 5 0 0 / 1 の間、更に好ましくは 0 . 5 / 1 ~ 3 0 0 / 1 の間である。本発明はまた、経済的影響が大きい疾患に関連する費用を低減する。

40

【 0 0 1 1 】

少なくとも 1 種の生体適合性ナノ粒子は、典型的には、ヒト C Y P 酵素の阻害剤である、少なくとも 1 種の天然化合物（即ち、天然に見出される）、典型的には、好ましくはフラノクマリン（ベルガモチン、6' , 7' - ジヒドロキシベルガモチン (D H B)、6' , 7' - エポキシベルガモチン、ベルガプトル、パラジシン A、パラジシン B、又はパラジシン C など）、フラボノイド（アカセチン、ナリンゲニン、アピゲニン又はケルセチ

50

ンなど)、脂肪酸(アラキドン酸など)、ビタミン(ビタミンA、特にレチノールなど)から選択される少なくとも1種の化合物を含むか、又はそれからなる。また本発明には、天然に見出される化合物と同一の合成(人工)化合物も含まれる。少なくとも1種の生体適合性ナノ粒子の最長寸法は、典型的には少なくとも4nmと100nm未満との間である。

【0012】

例えば、ナノ粒子のサイズ又は時間間隔のような値に関連する場合、「約」及び「大体」という用語は、当業者によってわずかな変化として認識される表示値に伴う変化が、関連する主題の特性に実質的に影響を及ぼさないこと、及び該主題が、特許請求される発明の本質内に留まることを示す。

【0013】

本発明の典型的な組成物(本明細書では一般に「医薬組成物」として特定される)は、(i)ヒトCYP酵素の阻害剤である少なくとも1種の天然化合物又はその合成型若しくは合成類似体を含むか、又はそれからなる少なくとも1種の生体適合性ナノ粒子であって、該ナノ粒子の最長寸法は少なくとも4nmでありかつ100nm未満であるナノ粒子と、(ii)少なくとも1種の目的化合物、典型的には少なくとも1種の医薬化合物との組合せを含む組成物である。本発明の医薬組成物は、少なくとも1種の目的化合物を、それを必要とする被験体に投与するために使用するためのものである。本発明に関連して、少なくとも1種のナノ粒子及び少なくとも1種の化合物(「目的化合物」)は、有利には、化合物の医薬としての有効性を最適化するために、該少なくとも1種の目的化合物を必要とする被験体に連続して、典型的には互いに少なくとも(又はそれ以上)約5分間と約72時間との間で、好ましくは少なくとも(又はそれ以上)約5時間と約72時間との間で、更に好ましくは少なくとも(又はそれ以上)約5時間と約24時間との間で投与されるべきである。好ましくは、目的化合物の前にナノ粒子が投与される。

【0014】

本明細書はまた、「第1の」少なくとも1種の生体適合性ナノ粒子に加えて、「第2の」生体適合性ナノ粒子を含む、前述の組成物に関する。この「第2の」生体適合性ナノ粒子はまた、少なくとも1種の天然化合物又はその合成類似体を含むか、又はそれからなる。この「第2の」生体適合性ナノ粒子の最長寸法は、典型的には少なくとも4nmと100nm未満との間である。

【0015】

この「第2の」生体適合性ナノ粒子は、「第1の」生体適合性ナノ粒子と同一であっても異なってもよい。同一である場合、これらは、好ましくは、所与の被験体に連続して投与されるか、かつ/又は該被験体に異なる経路を介して投与される。異なっている場合、これらを、所与の被験体に同時に又は連続して、そして同一か又は異なる経路を介して投与することができる。

【0016】

少なくとも「第1の」及び「第2の」生体適合性ナノ粒子は、少なくとも1種の医薬化合物を必要とする被験体に、そして好ましくは少なくとも1種の医薬化合物の前に、別個に又は同時に投与される。典型的には、少なくとも「第1の」及び「第2の」生体適合性ナノ粒子は、医薬化合物の少なくとも約5分(好ましくは約5分超)前と約72時間前との間に、好ましくは医薬化合物の5時間超前と約72時間前との間に投与される。

【0017】

特定の実施態様では、少なくとも1種の天然化合物又はその合成類似体を含むか、又はそれからなる、少なくとも1種の生体適合性ナノ粒子、及び少なくとも1種の医薬化合物は両方とも、典型的には静脈内(IV)経路、皮下経路、経口経路、又は経腸経路のいずれかである、同じ経路を介して被験体に投与される。

【0018】

好ましい実施態様では、「第1の」及び「第2の」生体適合性ナノ粒子の一方のみが、経口又は経腸経路である、目的化合物と同じ経路を介して被験体に投与され、残りの「第1の」又は「第2の」生体適合性ナノ粒子は、IV、皮下、経口又は経腸経路から選択さ

10

20

30

40

50

れる、異なる経路を介して有利には投与される。

【0019】

ナノ粒子の選択されたサイズは、効率的な細胞取り込みを可能にする。更に、それを必要とする被験体にIV又は皮下投与される場合、ナノ粒子の選択されたサイズは、その肝臓への溢出を可能にする。したがって、本発明の生体適合性ナノ粒子及び目的化合物を連続して投与することによって、2種の化合物（即ち、生体適合性ナノ粒子及び目的化合物）の同時循環が無くなるか又は限定的な同時循環が実現される。したがって、生体適合性ナノ粒子のサイズは、目的化合物の安全な使用を可能にするが、一方、被験体において治療効果及び/又は予防効果を得るために必要とされる目的化合物の用量は、こうして低減され、それによって該被験体の健康関連の生活の質を改善し、経済的影響が大きい疾患に関連する費用を低減する。

10

【0020】

生体適合性ナノ粒子は、典型的には、ヒトCYP酵素の阻害剤である少なくとも1種の天然化合物又はその合成類似体を含むか、又はそれからなる。

生体適合性ナノ粒子（少なくとも1種の生体適合性ナノ粒子又は任意の追加の生体適合性ナノ粒子）が、少なくとも1種の天然化合物を含むか、又はそれからなる場合、この天然化合物は、典型的には、フラボノイド（アカセチン、ナリンゲニン、アピゲニン又はケルセチンなど）、フラノクマリン、脂肪酸（アラキドン酸など）、及びビタミン（ビタミンA、特にレチノールなど）から選択することができる。また本発明には、天然に見出すことができる、以前に同定された化合物（本明細書では「天然化合物」又は「天然産物」としても特定される）と同一の合成（又は人工）化合物も含まれる。

20

【0021】

好ましい実施形態では、少なくとも1種の生体適合性ナノ粒子は、典型的には、少なくとも1種のフラノクマリン又はその合成類似体を含むか、又はそれからなる。

【0022】

本発明に関連して、「フラノクマリン」という用語は、フラノクマリンモノマー、ダイマー、トリマー又はオリゴマー、更にはこれらの混合物を意味する（図1参照）。

【0023】

特定の実施態様では、少なくとも1種の生体適合性ナノ粒子は、少なくとも2種、好ましくは10、15又は20を超えるフラノクマリン類（又はその合成類似体）のモノマー又はダイマーからなる。

30

【0024】

よって「第1の」及び/又は「第2の」生体適合性ナノ粒子の少なくとも1種のフラノクマリンは、典型的にはフラノクマリンモノマー、ダイマー又はオリゴマーである。

フラノクマリンがモノマーである場合、これは例えば、ベルガモチン、6',7'-ジヒドロキシベルガモチン(DHB)、6',7'-エポキシベルガモチン、ベルガプトル及びこれらの任意の混合物から選択され得る。フラノクマリンがダイマーである場合、これは例えば、パラジシンA、パラジシンB、又はパラジシンCのようなパラジシンであってよい。

【0025】

ヒトCYP酵素の阻害剤である天然化合物、例えば、少なくとも1種のフラノクマリン又はフラボノイドを含む限り、本発明に関連して使用されるナノ粒子は、有機又は無機のいずれかであってよい。更に有機及び無機ナノ粒子の混合物を使用することができる。

40

【0026】

ヒトCYP酵素の阻害剤である天然化合物、例えば、フラノクマリン又はフラボノイドは、生体適合性ナノ粒子に、封入されるか、捕捉されるか、吸収されるか、吸着されるか、結び付けられるか、接合されるか、付着されるか、又は結合されてよい。ナノ粒子とヒトCYP酵素の阻害剤である天然化合物との間の相互作用は、水素結合、静電相互作用、複合体化、共有結合又は疎水性相互作用によって遂行することができる。ナノ粒子とヒトCYP酵素の阻害剤である天然化合物との間の直接的な相互作用を達成することができる

50

か、又はリンカーを使用することができる。

【0027】

有機物の場合、このナノ粒子は、固体脂質ナノ粒子のような脂質系ナノ粒子（グリセロ脂質、リン脂質、ステロール脂質など）、本明細書では「タンパク質 - ナノ粒子」としても特定されるタンパク質系ナノ粒子（例えば、アルブミン）、ポリマー系ナノ粒子（「ポリマー性ナノ粒子」）、コポリマー系ナノ粒子（「コポリマー性ナノ粒子」）、炭素系ナノ粒子、ウイルス様ナノ粒子（例えば、ウイルスベクター）であってよい。

【0028】

有機ナノ粒子は、ナノスフェア（単純ナノ粒子）であっても、又はリポソーム、ゲル、ヒドロゲル、ミセル、デンドリマーなどのようなナノカプセル（中空ナノ粒子）であって

10

もよい。本明細書に記載の有機ナノ粒子の混合物もまた使用することができる。

ポリマー又はコポリマーは、天然起源であっても、合成起源であってもよい。

【0029】

有機ナノ粒子を調製するために本発明に関連して使用可能な合成（人工）及び天然ポリマー又はコポリマーの例は、ポリ乳酸（PLA）、ポリ（ラクチド - c o - グリコール酸）（PLGA）、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリグラクチン、ポリラクチド、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、ポリプロピレングリコール、ポリソルベート（ポリソルベート20又はポリソルベート80など）、クレモフォールEL、ポリビニルアルコール、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、ポリメタクリル酸アルキル、ポリシアノアクリル酸アルキル、ポリ乳酸 - c o - グリコール酸、ポリ（アミドアミン）、ポリ（エチレンイミン）、ポリ（ - カプロラクトン）（PCL）、ポリ（ビニルピリジン）、アルギン酸塩、キトサン、セルロース及びセルロース誘導体ポリマー、コラーゲン、ヒアルロン酸、ポリグルタミン酸（PGA）、アクチン、多糖、及びゼラチンから選択することができる。有機ナノ粒子はまた、シクロデキストリンナノ粒子であってもよい。

20

【0030】

無機物の場合、及びその最長寸法が典型的には約10nm未満、例えば、約8nm未満、約7nm未満である場合、典型的には約7nmと約4nmとの間、例えば、約6nm未満、約5nm未満又は約4nm未満からなる場合、ナノ粒子は、任意の無機材料で作られていてよい。無機材料は、例えば、ランタニドを含む、メンデレーエフの周期表の第3、4、5、6周期からの金属元素を含んでよい。ナノ粒子の最長寸法が典型的には約10nm未満である場合、

30

ナノ粒子は、集合してより大きな構造になることができる。より大きな構造になるナノ粒子の集合は、典型的には、ナノ粒子と生体適合性ポリマー、タンパク質などとの間の相互作用によって誘発される。より大きな構造はまた、担体、典型的にはゼラチン構造（本明細書では「ゼラチンナノ粒子」としても特定される）のような単純担体又はリポソームのような中空担体にナノ粒子を捕捉することにより得られる。インビボでの投与後、これらのより大きな構造は、更にナノ粒子を放出することができる。

【0031】

無機物の場合、及び該ナノ粒子の最長寸法が典型的には少なくとも10nm、典型的には10nmと100nm未満との間である場合、ナノ粒子は、（i）例えば、Mg、Ca、Ba及びSrから選択される1種以上の二価金属元素、（ii）例えば、Fe及びAlから選択

40

される1種以上の三価金属元素、並びに（iii）Siを含む1種以上の四価金属元素の少なくとも1種を含むか、又はこれらからなってもよい。

【0032】

特定の実施態様において、ナノ粒子の無機材料は、（i）例えば、Mg、Ca、Ba及びSrから選択される1種以上の二価金属元素、（ii）例えば、Fe及びAlから選択される1種以上の三価金属元素、並びに（iii）Siを含む1種以上の四価金属元素から選択される。

【0033】

更なる特定の実施態様において、ナノ粒子の無機材料は、炭酸カルシウム（CaCO₃）、炭酸マグネシウム（MgCO₃）、水酸化マグネシウム（Mg（OH）₂）、水酸化

50

鉄 ($\text{Fe}(\text{OH})_2$)、オキシ水酸化鉄 (FeOOH)、酸化鉄 (Fe_3O_4 又は Fe_2O_3)、酸化アルミニウム (Al_2O_3)、水酸化アルミニウム ($\text{Al}(\text{OH})_3$)、オキシ水酸化アルミニウム (AlOOH) 及び酸化ケイ素 (SiO_2) から選択される。

【0034】

本明細書に記載の組成物に使用されるナノ粒子は、生体適合性、即ち、生体組織と適合性があるものでなければならない。その組成によって必要とされる場合、ナノ粒子は生体適合性材料でコーティングされて使用可能となる。本発明の特定の実施態様において、本明細書に言及されるナノ粒子は、こうして生体適合性コーティングで覆われている。

【0035】

生体適合性材料は、生物学的標的との相互作用を可能にする薬剤であってよい。このような薬剤は、典型的には、ナノ粒子の表面上に正又は負の電荷をもたらす。

10

【0036】

ナノ粒子の表面上に正電荷を形成する薬剤は、例えば、アミノプロピルトリエトキシシラン及びポリリシンから選択することができる。ナノ粒子表面上に負電荷を形成する薬剤は、例えば、リン酸塩（例えば、ポリリン酸塩、メタリン酸塩、ピロリン酸塩など）、カルボン酸塩（例えば、クエン酸塩又はジカルボン酸、特にコハク酸）及び硫酸塩から選択することができる。

【0037】

ナノ粒子は、立体基を示す薬剤から選択される生体適合性材料でコーティングすることができる。このような基は、例えば、ポリエチレングリコール (PEG)；ポリエチレンオキシド；ポリビニルアルコール；ポリアクリレート；ポリアクリルアミド（ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)）；ポリカルバミド；バイオポリマー；デキストラン、キシラン、ヒアルロン酸及びセルロースのような多糖類；コラーゲン；並びにポリスルホタインのような両性イオン化合物から選択することができる。

20

【0038】

生体適合性コーティングは、有利には「完全コーティング」（完全な単層）であってもよい。これは、非常に高密度の生体適合性分子の存在が、ナノ粒子の表面全体に適切な電荷を生成することを意味する。

【0039】

生体適合性コーティングは、ナノ粒子の可視化を可能にする当業者に公知の標識剤、例えば、標準的な画像化装置を使用するときに検出可能な有色薬剤を更に含んでもよい。

30

【0040】

本明細書に記載のナノ粒子のいずれもが、特定の細胞による、特に腸細胞及び/又は肝細胞による、その認識を増強する薬剤で更に被覆することができる。このような薬剤は、典型的には炭水化物である。生体適合性ナノ粒子が静脈内 (IV) 経路を介して投与される場合、肝細胞によるナノ粒子の認識を増強する薬剤は、有利には、ガラクトース、N-アセチルガラクトサミン、N-アセチル-グルコサミン若しくはこれらの混合物のような糖類を含むか、又はそれからなる。生体適合性ナノ粒子が、経口経路又は経腸経路を介して投与される場合、腸細胞及び/又は肝細胞によるナノ粒子の認識を増強する薬剤は、有利には、マンノースのような糖類、レクチン若しくはビタミンを含むか、又はそれからなる。

40

【0041】

粒子の形状がその「生体適合性」に影響を及ぼすことがあるため、かなり均質な形状を有する粒子が本明細書において好ましい。薬物動態の理由から、本質的に形状が球形/円形又は卵形であるナノ粒子が好ましい。このような形状はまた、細胞とのナノ粒子相互作用又は細胞によるナノ粒子取り込みにも有利である。球形/丸形が特に好ましい。

【0042】

本発明の本質において、「ナノ粒子」という用語は、ナノメートル範囲のサイズ、典型的には少なくとも 4 nm かつ 100 nm 未満のサイズの生成物、特に合成生成物のことをいう。

50

【0043】

本明細書における「ナノ粒子のサイズ」、「ナノ粒子の最大サイズ」及び「ナノ粒子の最長サイズ」という用語は、形状が球形／丸形又は卵形である場合、典型的には「ナノ粒子の最長又は最大寸法」又は「ナノ粒子の直径」のことをいう。

【0044】

組成物が「第1の」及び「第2の」生体適合性ナノ粒子であって、該ナノ粒子のそれぞれが、少なくとも1種の天然化合物又はその合成類似体を含むか、又はそれからなるナノ粒子を含む特定の実施形態において、「第2の」ナノ粒子の最長寸法は、好ましくは「第1の」ナノ粒子の最長寸法より長い。「第2の」ナノ粒子及び「第1の」ナノ粒子の最長寸法の比は、典型的には約5に等しく、例えば、約4、3、2及び1.5に等しい。

10

【0045】

「第1の」生体適合性ナノ粒子及び場合により「第2の」生体適合性ナノ粒子のサイズは、好ましくは少なくとも4 nmかつ100 nm未満、例えば、約10 nm、15 nm又は20 nmと約90又は95 nmとの間である。

【0046】

透過電子顕微鏡(TEM)又はCryo-TEMを使用して、ナノ粒子のサイズを測定することができる。同様に、動的光散乱(DLS)を使用して、溶液中のナノ粒子の流体力学直径を測定することができる。これらの2つの方法は更に、DLSによって測定されたナノ粒子の流体力学直径と、TEM又はCryo-TEMによって測定されたナノ粒子のサイズとを比較して、該サイズを確認するために、交互に使用することができる。好ましい方法はDLS(Ref. International Standard ISO22412 Particle Size Analysis - Dynamic Light Scattering, International Organisation for Standardisation (ISO) 2008)である。

20

【0047】

本発明の生体適合性ナノ粒子と目的化合物との、又は医薬(即ち、治療用又は予防用)組成物との被験体への併用投与は、該化合物の標準的な医薬用量と比較した場合に、被験体におけるその均等な生物学的利用能のために、典型的には、被験体に投与される医薬化合物の用量の少なくとも約20%、好ましくは少なくとも約25%、より好ましくは少なくとも約30%の低減、例えば少なくとも約40%の低減が可能になる。この有利な効果は、少なくとも1種のナノ粒子が、目的化合物を必要とする被験体に、該目的化合物とは別個に、典型的には少なくとも約5分と約72時間との間の間隔をあけて投与される場合に、典型的には得られる。

30

【0048】

上述の少なくとも1種の生体適合性ナノ粒子と組合せて投与される、少なくとも1種の目的化合物として、典型的には少なくとも1種の医薬の目的化合物として、本教示により様々な分子又は薬剤を使用することができる。この化合物は、好ましくは、先に説明された治療化合物又は予防化合物から選択される。特定の実施態様において、ナノ粒子は、幾つかの目的化合物と共に、典型的には少なくとも2種の目的化合物と共に投与される。

【0049】

好ましい医薬の目的化合物は、それを必要とする被験体に投与された場合、生物学的利用能が低い化合物(即ち、「初回通過代謝」又は吸収後即時クリアランスを受ける化合物)である。これらは、典型的には、ヒトチトクロムP450(CYP)酵素の基質である化合物である。これらの化合物/基質は、典型的には、CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1及びCYP3A4から、例えば、CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2A6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A4から、好ましくはCYP1A2、CYP2A6、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A4から選択される少なくとも1種の酵素によって触媒されるか又は代謝される(即ち、物理的及び機能的に分解される、例えば、切断又は酸化される)。医薬の目的化合物の例としては数

40

50

ある中 [“ Summary of information on human CYP enzymes ” : Human P450 metabolism data. Rendic S. Drug metabolism reviews, 34(1&2), 83-448 (2002)において、及び “ Review of Therapeutics; Update: Clinically Significant Cytochromes P-450 drug interactions ” . Landrum Michalets E. Pharmacotherapy Volume 18 Number 1, 1998において特定されるものなど] で、プロトンポンプ阻害薬 (例えば、オメプラゾール、パントプラゾール及びラベプラゾール)、スタチン類 (例えば、フルバスタチン、シンバスタチン、ロバスタチン及びアトルバスタチン)、ドキシソルピシン、ドセタキセル、エトポシド、タモキシフェン、ワルファリン、エファビレンツ、テストステロン (例えば、テストジェル、アンドロジェル、アキシロン (axiron))、エストロゲン、プロゲステロン、パクリタキセル、リファンピン、アブレピタント、ボルテゾミブ、ブデソニド、ブスピロン、コニバプタン、ダリフェナシン、ダルナビル、ダサチニブ、ドロネダロン、エレトリプタン、エブレレノン、エベロリムス、フェロジピン、イマチニブ、インジナビル、フルチカゾン、ロピナビル、ロバスタチン、ルラシドン、マラビロク、ミダゾラム、ニロチニブ、ニソルジピン、クエチアピン、サキナビル、シルデナフィル、シンバスタチン、シロリムス、トルバプタン、チプラナビル、トリアゾラム、バルデナフィル、アトモキセチン、デシプラミン、デキストロメトルファン、メトプロロール、ネビボロール、ペルフェナジン、トルテロジン、ベンラファキシン、アロセトロン、デュロキセチン、メラトニン、ラメルテオン、タクリン、チザニジンなどである。

10

【 0 0 5 0 】

医薬化合物の CYP 1 A 2、CYP 2 D 6 及び CYP 3 A 4 の基質の例は、表 1 [目的物質、ヒト CYP 酵素の基質の例 (Summary of information on human CYP enzymes: Human P450 metabolism data. Rendic S. Drug metabolism reviews, 34(1&2), 83-448 (2002))] 及び表 2 [チトクロム 3 A 4、2 D 6 及び 1 A 2 アイソザイム基質の非網羅的リスト (Review of Therapeutics; Update: Clinically Significant Cytochromes P-450 drug interactions. Landrum Michalets E. Pharmacotherapy Volume 18 Number 1, 1998) ; 及び www.FDA.gov] に列挙される。

20

【 0 0 5 1 】

【表 1】

表 1:

酵素	ドキシソルビ シン	ドセタキセ ル	タモキシ フェン	ワルファ リン	エファビレ ンツ	パクリタ キセル	リファン ピン
CYP1A			基質				
CYP1A1				基質			
CYP1A2				基質			
CYP1B1		基質 阻害剤	阻害剤				
CYP2A6			基質				
CYP2B6					基質 阻害剤		誘導剤
CYP2C8			阻害剤	基質			
CYP2C9					阻害剤		誘導剤 誘導剤 基質
CYP2C18				基質			誘導剤
CYP2C19					阻害剤		
CYP2D6	阻害剤		基質		阻害剤		
CYP2E1							
CYP2F1							
CYP3A4	基質 阻害剤	基質	基質	基質	基質 誘導剤 阻害剤	基質 阻害剤	誘導剤
CYP3A5							
CYP3A7							
CYP4A11							
CYP19			阻害剤				

【 0 0 5 2 】

10

20

30

40

【表 2】

表 2:

CYP3A4	CYP2D6	CYP1A2
ドキソルビシン パクリタキセル アプレピタント、 ブデソニド、 ブスピロン、 コニバプタン、 ダリフェナシン、 ダルナビル、 ダサチニブ、 ドロネダロン、 エレトリプタン、 エプレレノン、 エベロリムス、 フェロジピン、 イマチニブ インジナビル、 フルチカゾン、 ロピナビル、 ロバスタチン、 ルラシドン、 マラビロク、 ミダゾラム、 ニロチニブ ニソルジピン、 クエチアピン、 サキナビル、 シルデナフィル、 シンバスタチン、 シロリムス、 トルバプタン、 チプラナビル、 トリアゾラム、 バルデナフィル	アトモキセチン、 デシプラミン、 デキストロメトルファン、 メトプロロール、 ネビボロール、 ペルフェナジン、 トルテロジン、 ベンラファキシン	アロセトロン、 デュロキセチン、 メラトニン、 ラメルテオン、 タクリン、 チザニジン

10

20

30

40

よってCYP3A4の好ましい基質（即ち、CYP3A4により代謝される目的化合物）は、例えば、好ましくは以下から選択される：

- 例えば、イマチニブ、ニロチニブ、ソラフェニブ、クリゾチニブ及びスニチニブから選択されるチロシキナーゼ阻害剤；
- シンバスタチン、ロバスタチン又はアトルバスタチンのようなスタチン
- 例えば、エルロチニブ及びラパチニブから選択されるEGFR阻害剤；
- ボルテゾミブのようなプロテアソーム阻害剤；並びに
- エトポシド、パクリタキセル又はドセタキセルのような細胞傷害性物質。

【0054】

本明細書に記載される目的化合物との生体適合性ナノ粒子の併用投与は、標準的な医薬用量、典型的には治療量の該化合物により誘発される医薬的な有益性及び毒性に比較すると、投与された低減用量で目的化合物の医薬的（即ち、治療的、予防的）、典型的には治療的な有益性を維持している。

10

【0055】

ナノ粒子は、目的化合物を投与された、目的化合物を必要とする被験体から、被験体への目的化合物の投与後の典型的には1時間と6週間との間に、例えば、1ヶ月（4週間）以内に、1時間と1ヶ月との間に、例えば、1時間と3週間との間に、1時間と2週間との間に、又は1時間と1週間との間に有利には除去される。

【0056】

ナノ粒子を構成する材料（存在する場合、その生体適合性コーティングを含む）は、ナノ粒子の生体内持続性を決定する上で重要である。ナノ粒子は、生分解性（例えば、PLGA又はPLAのような生分解性ポリマーによって構成されている場合）、溶解性（例えば、酸化鉄）又は非生分解性及び非溶解性であると考えられる。生分解性及び溶解性ナノ粒子は、被験体からの迅速なナノ粒子のクリアランス達成を容易にする。

20

【0057】

本発明の医薬組成物（本明細書に記載の少なくとも1種の目的化合物と少なくとも1種の生体適合性ナノ粒子との特許請求された組合せによって定義される）は、多くの分野、特にヒトの医療及び獣医学において使用することができる。この組成物は、典型的には、動物、好ましくは哺乳動物（例えば、獣医学に関連して）、更に好ましくはヒト、典型的にはヒト患者において、その年齢や性別に関係なく使用される。

30

【0058】

本発明の医薬組成物は、心血管疾患、中枢神経系（CNS）疾患、胃腸疾患、遺伝病、血液疾患、ホルモン障害、免疫障害、感染症、代謝異常、筋骨格障害、癌、呼吸器疾患、中毒などの予防又は処置のために使用することができる。好ましい実施態様において、本医薬組成物は、心血管疾患、CNS疾患、癌、感染症又は代謝異常に関連して使用される。

【0059】

また本明細書に記載されるのは、本明細書中に言及されるような疾患を患っている被験体を処置する方法であって、本発明の医薬組成物、典型的には本明細書に記載される少なくとも1種の生体適合性ナノ粒子及び少なくとも1種の目的化合物を該被験体に投与することを含む方法である。該少なくとも1種のナノ粒子又は該少なくとも1種の目的化合物のいずれかの投与は、それぞれの単回投与、それぞれの反復投与、例えば、それぞれの数回の連続投与であってよい。少なくとも1種の生体適合性ナノ粒子は、1回投与され、そして少なくとも1種の目的化合物は、2回以上投与されてもよく、逆もまた同様である。

40

【0060】

以下の実施例は本発明を説明するものであり、その範囲を限定するものではない。

【図面の簡単な説明】

【0061】

【図1】フラノクマリン

【図2】水中での自己集合によるフラノクマリン（例えば、ベルガモチン、DHB、6'

50

、7'-エポキシベルガモチン、パラジシンなど)からなる、ヒアルロナン被覆ナノ粒子の合成スキーム(実施例2参照)。

【図3】水中での自己集合によるフラノクマリン(例えば、ベルガモチン、DHB、6'、7'-エポキシベルガモチン、パラジシンなど)からなる、ヒアルロナン被覆ナノ粒子の合成スキーム(実施例3参照)。

【図4】溶媒除去によるフラノクマリン(例えば、ベルガモチン、DHB、6'、7'-エポキシベルガモチン、パラジシンなど)からなる、ヒアルロナン被覆ナノ粒子の合成スキーム(実施例4参照)。

【図5】フラノクマリンからなるか、又はそれを含むナノ粒子の概略図：a. フラノクマリンのナノ粒子 b. 単純ナノ粒子(有機物又は無機物；場合により接合されている)に捕捉されたフラノクマリンナノ粒子 c. 単純ナノ粒子(有機物又は無機物)中に分散されたフラノクマリン d. 中空ナノ粒子の水性空洞に捕捉されたフラノクマリン e. 中空ナノ粒子の層に捕捉されたフラノクマリン f. 単純ナノ粒子(有機物又は無機物)又は中空ナノ粒子の表面に吸着又は接合されたフラノクマリン(表面とフラノクマリンとの間に直接、又は異なるサイズのリンカーを介して、接合を形成することができる)。

【図6】「対照」試料(ドセタキセル)、「代謝」試料(ドセタキセルで処置したHe p a R G細胞)及び「阻害」試料(DHBミセル(実施例6)及びドセタキセルで連続して処置したHe p a R G細胞)のHPLC-UV注入の3Dクロマトグラム出力。 - 「対照」試料クロマトグラムにおいて、黒色の矢印はドセタキセルのピークに対応する； - 「阻害」試料クロマトグラムにおいて、黒色の矢印はドセタキセルのピークに対応する； - 「代謝」試料クロマトグラムにおいて、点線の矢印(保持時間 12.25分)はドセタキセルの代謝物に対応し、黒色の矢印はドセタキセルのピークに対応する。

【図7】MRIヌードマウスに異種移植されたHT-29腫瘍モデルにおける生体適合性ナノ粒子(DHBミセル)及びドセタキセルの投与スケジュール。

【図8】第1群(対照群：NaCl)、第2群(対照群：DHBミセル 0.93g/L、5mg/kg)、第3群(処置群：ドセタキセル 2g/L、10mg/kg)及び第4群(処置群：(i) DHBミセル 0.93g/L、5mg/kg注射、次に24時間後(ii)ドセタキセル 2g/L、10mg/kg)を含む医薬組成物)に関するKaplan-Meier曲線： - 第1群：D1、D2、D3、D6、D9、D10に生理食塩水(NaCl 0.9%)； - 第2群：D1、D3、D9にDHBミセル； - 第3群：D2、D6、D10にドセタキセル(2g/L) 10mg/kg； - 第4群：D1、D3、D9に(i) DHBミセル(0.93g/L) 5mg/kg、及び(ii) D2、D6、D10にドセタキセル(2g/L) 10mg/kg。矢印：注射(透明の矢印：DHBミセル及び暗色の矢印：ドセタキセル)。

【実施例】

【0062】

[実施例1]

フラノクマリン(ベルガモチン、DHB、6'、7'-エポキシベルガモチン及び/又はパラジシンなど)からなるナノ粒子(又はナノ結晶)の調製。

所望の形状及びサイズのナノ粒子を生成するために種々の選択肢がある[Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. Junghanns J-U A H, Muller R H. International Journal of Nanomedicine, 2008:3(3) 295-309]。

基本的には、沈殿法、粉碎法及び均質化法の3つの原理、並びにこれらの任意の組合せを用いることができる。

沈殿法：

フラノクマリンを溶媒に溶解し、続いて非溶媒に加えると、微細分散したフラノクマリンナノ粒子の沈殿に至る。あるいは、場合により超音波処理を用いることにより、フラノクマリンを水に直接添加することができ、疎水性相互作用によって自己集合が引き起こされる。

粉碎法：

粉碎媒体(ボールミルなど)、フラノクマリン及び分散媒体(水など)を粉碎チャンバ

10

20

30

40

50

ーに仕込む。粉碎媒体の動きによって生じる衝撃の剪断力は、粒径の減少をもたらす。

均質化法：

典型的には、この方法は、最大1700バールの圧力下で2つの流体流の正面衝突によって小粒子を生成することができるマイクロフルイダイザー技術を必要とする。

注目すべきことに、超臨界流体法を用いてナノ粒子を生じさせることもできる。

【0063】

[実施例2]

水中での自己集合による、フラノクマリンからなるヒアルロナン被覆ナノ粒子の調製（図2参照）。

フラノクマリンからなるナノ粒子は、典型的には、フラノクマリン（ベルガモチン、DHB、6' , 7' - エポキシベルガモチン及びノ又はパラジシンなど）を水に直接添加し、次いでこの混合物が、超音波処理に付されることによって得られる。続いて、得られた懸濁液にヒアルロン酸ポリマーを添加する。ヒアルロン酸のポリマー層がナノ粒子の表面上に形成される。

10

【0064】

[実施例3]

水中での自己集合による、フラノクマリンからなるヒアルロナン被覆ナノ粒子の調製（図3参照）。

ヒアルロン酸ポリマーを、先ず水に溶解する。続いてフラノクマリン（ベルガモチン、DHB、6' , 7' - エポキシベルガモチン及びノ又はパラジシンなど）を溶液に加え、次いで該溶液を超音波処理に付す。ヒアルロン酸のポリマー層がナノ粒子の表面上に形成される。

20

【0065】

[実施例4]

溶媒除去による、フラノクマリンからなるヒアルロナン被覆ナノ粒子の調製（図4参照）。

フラノクマリン（ベルガモチン、DHB、6' , 7' - エポキシベルガモチン及びノ又はパラジシンなど）をアセトン溶液に添加する。続いて、水に溶解したヒアルロン酸ポリマーを、フラノクマリン溶液に添加する。65℃超での蒸発によりアセトンを除去する。ヒアルロン酸のポリマー層が、フラノクマリンナノ粒子の表面上に形成される。

30

【0066】

注目すべきことに、上記の実施例2、3及び4において、ヒアルロン酸ポリマーを水中で更に架橋させることができる。

注目すべきことに、上記の実施例2、3及び4において、キトサンポリマー、PLGA-ヒアルロン酸コポリマー、PLGA-PEGコポリマー、又は本明細書中に上記の任意の水溶性ポリマー若しくはコポリマーは、部分的に又は完全にヒアルロン酸ポリマーを置き換えることができる。

注目すべきことに、上記の実施例2、3及び4において、ポリマーは、フラノクマリンモノマー又はダイマーと形式的に接合させることができる。

【0067】

[実施例5]

フラノクマリン類はヒトCYP酵素を阻害する。

以下の表3は、ヒトCYP酵素のインヒビターとしてのフラノクマリン類及び他の天然の目的化合物又はその合成類似体の役割を要約している（Summary of information on human CYP enzymes: Human P450 metabolism data. Rendic S. Drug metabolism reviews, 34(1&2), 83-448 (2002) 参照）：

40

【0068】

【表 3】

酵素	フラノクマリン	フラボノ イド アカセチ ン	フラボノイ ド ナリングニ ン	ビタミン A レチノ ール	フラボノ イド アピゲニ ン	フラボノ イド ケルセチ ン	脂肪酸 アラキドン酸
CYP1A		阻害剤					
CYP1A1				阻害剤	阻害剤	阻害剤	阻害剤
CYP1A2	阻害剤: DHB ベルガモチン フラノクマリン 抽出物				阻害剤	阻害剤	基質 阻害剤
CYP1B1			阻害剤				阻害剤
CYP2A6	阻害剤: ベルガモチン						基質
CYP2B6				阻害剤			
CYP2C8				阻害剤 基質		阻害剤	基質
CYP2C9	阻害剤: ベルガモチン フラノクマリン 抽出物						阻害剤 基質
CYP2C18							
CYP2C19	阻害剤: ベルガモチン						基質
CYP2D6	阻害剤: ベルガモチン フラノクマリ ン抽出物			基質			阻害剤
CYP2E1	阻害剤: ベルガモチン						阻害剤
CYP2F1							

10

20

30

CYP3A4	阻害剤： - ベルガモチン - フラノクマリ ンダイマー、抽 出物又はトリマ ー		阻害剤			阻害剤	阻害剤 基質
CYP3A5							
CYP3A7							
CYP4A11							基質
CYP4B1							基質
CYP4F2							基質
CYP4F8							基質
CYP4F12							基質
CYP11B1			阻害剤			阻害剤	
CYP19			阻害剤			阻害剤	

10

【 0 0 6 9 】

20

フラノクマリン類は、特に以下のヒトCYP酵素：CYP1A2、CYP2A6、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1及びCYP3A4を阻害する。

【 0 0 7 0 】

[実施例 6]

6', 7'-ジヒドロキシベルガモチン(DHB)を封入するミセル(即ち、DHBミセル= 詳細な説明中で本明細書上記と同義の生体適合性ナノ粒子)の合成及び特性評価。

水溶液に界面活性剤-エタノール溶液を溶解することにより、自己集合によって6', 7'-ジヒドロキシベルガモチン(DHB)のミセル(即ち、DHBミセル)が形成された。界面活性剤(ポリソルベート80)及び無水エタノールを1:1(v/v)混合することにより、ポリソルベート80-エタノール溶液を形成させた。

30

次にDHBを秤量し、ポリソルベート80-エタノール(1:1, v/v)溶液に溶解限界までの濃度で溶解させた。続いてDHB粉末を完全に溶解させるために15分間の強いボルテックスを行った。

DHBの溶解が完了したら、DHBを含むポリソルベート80-エタノール(1:1, v/v)溶液に水溶液(水が生理食塩水のいずれか)を添加することによって、ミセルを形成させた。典型的には、NaCl 1%(w/w)を含む生理食塩水を、DHBを含むポリソルベート80-エタノール溶液に10:1に等しい比(生理食塩水:ポリソルベート80-エタノール, v:v)で添加した。これらの条件下で、得られるミセル溶液中のDHBの最終濃度は2.5mMであった。

【 0 0 7 1 】

40

a) 粒径の特性評価:

生理食塩水(1%w/w NaCl)中のDHBミセルを、動的光散乱法により測定した。ミセルの流体学直径は11.6nm(強度による分布)に等しく、多分散指数(PdI)は0.089に等しかった。

【 0 0 7 2 】

b) DHBミセルによる医薬化合物(ここではドセタキセル)のインビトロのチトクロムP450阻害

「対照」試料: ドセタキセル 1µM

ドセタキセル 1µMに対応する「対照」試料を、高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)測定に使用した。ドセタキセル粉末をポリソルベート80-エタノール(1:1、

50

v : v) 溶液に溶解した。続いて生理食塩水を 1 : 9 の比 (ポリソルベート 80 - エタノール : 生理食塩水、v : v) で添加した。得られた懸濁液を、1 μM のドセタキセルの濃度まで細胞培養液で希釈した。次いで、インキュベーション培地を回収して、アセトニトリルを培地に添加することにより、タンパク質を沈殿させた (1 : 1、v/v)。

「代謝」試料：ドセタキセル 1 μM - 4 時間の H e p a R G 細胞上でのインキュベーション

ドセタキセル粉末をポリソルベート 80 - エタノール (1 : 1、v : v) 溶液に溶解した。次いで生理食塩水を 1 : 9 の比 (ポリソルベート 80 - エタノール : 生理食塩水、v : v) で添加した。得られた懸濁液を、誘導 H e p a R G 細胞 (H e p a R G は、製造業者のプロトコールにより培養及び誘導された、肝前駆細胞のヒト肝細胞株である) 上で、1 μM の非毒性濃度で 4 時間インキュベートした。次に、インキュベーション培地を回収して、アセトニトリルを培地に添加することにより、タンパク質を沈殿させた (1 : 1、v/v)。

「阻害」試料：(1) D H B ミセル 10 μM - 1 時間及び (2) ドセタキセル 1 μM - 4 時間の H e p a R G 細胞上での連続インキュベーション

6' , 7' - ジヒドロキシベルガモチンを添加したポリソルベート 80 - エタノールミセル (即ち、D H B ミセル) 10 μM を誘導 H e p a R G 細胞上で 1 時間インキュベートした。次いで、細胞を P B S で濯ぎ、医薬の目的化合物 (ここでは C Y P 3 A 4 の基質であることが知られているドセタキセル) とインキュベートした。ドセタキセルを 1 μM の非毒性濃度で 4 時間インキュベートした。次に、インキュベーション培地を回収して、アセトニトリルを培地に添加することにより、タンパク質を沈殿させた (1 : 1、v/v)。

3 つの試料 (「対照」、 「代謝」 及び 「阻害」 試料) を 30 秒間ボルテックスして、3000 g で 30 分間遠心分離した。これらの上清を酢酸エチル (1 : 1、v/v) と混合することにより、有機相を水相から分離した。各上清の有機相を Rotavapor で 60 ° で乾燥させ、メタノールに再懸濁した。得られたメタノール溶液を自動注入器で H P L C - U V (Thermo Fisher Scientific Inc.) に注入した。試料 20 μL を、30 % アセトニトリル及び 70 % 酸性水 (0.1 % ギ酸) で開始して 25 分でアセトニトリル 100 % までの溶離液の勾配中で、C18 3 μm、150 mm × 4.6 mm カラム (Advanced Chromatography Technologies Ltd.) 上で分離させた。得られたクロマトグラムを 230 nm の U V 発光波長で抽出した。

図 6 は、H e p a R G 細胞上での D H B ミセル及びドセタキセル化合物の連続処置 (即ち、ドセタキセルの処置の 1 時間前に D H B ミセルの処置) がドセタキセルの代謝を阻害すること、即ち、ドセタキセル単独で処置した細胞と比較して、細胞を D H B ミセル及びドセタキセルの連続投与で処置した場合、ドセタキセル代謝物に対応するピークがもはや存在しないことを示す。

【 0 0 7 3 】

c) D H B ミセルによる医薬化合物のインビボのチトクロム P 4 5 0 阻害

この研究は、N M R I ヌードマウスに異種移植された H T - 2 9 腫瘍モデルにおいて、(i) D H B ミセル (生体適合性ナノ粒子) と (ii) 医薬の目的化合物としてのドセタキセルとの組合せを含む医薬組成物の有効性を調べるために行った。

ヒト結腸直腸腺癌 H T - 2 9 細胞株を A T C C で購入した。この細胞を、10 % ウシ胎仔血清を補足した McCoy's 5a 培地で培養した。

6 ~ 7 週齢の N M R I 雌性ヌードマウス (N M R I - F o x 1 n u / F o x n 1 n u) は、Junvier Labs (フランス) から注文された。マウスに H T - 2 9 細胞を異種移植した：5 百万個の細胞を 50 μL にして右下横腹に皮下注射した。腫瘍体積 (m m ³) は、デジタルノギスを用いて測定し、下記式：

【 0 0 7 4 】

【 数 1 】

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = \frac{\text{長さ (mm)} \times \text{幅}^2\text{ (mm}^2\text{)}}{2}$$

10

20

30

40

50

により算出した。

マウスをランダム化して別々のケージに入れ、平均腫瘍体積が 90 mm^3 (標準偏差 25%) に達したら、異種移植の 2 週間後に数 (ポーンのタトゥー) により識別した。群はマウス 5 匹 [マウス 3 匹の対照の食塩水 (NaCl 0.9%) 群を除く] から作られた (投与スケジュールについては図 7 を参照) :

第 1 群 : NaCl (対照群)。マウス 3 匹に、D 1 (1 日目、処置の初日に相当する)、D 2、D 3、D 6、D 9、D 10 に生理食塩水 (NaCl 0.9%) を尾静脈に静注した。

第 2 群 : ポリソルベート 80 - エタノール中の 6', 7' - ジヒドロキシベルガモチンミセル (DHB ミセル) (対照群)。生理食塩水 (NaCl 1% w/w) 中の DHB ミセル 2.5 mM (0.93 g/L) を、D 1、D 3 及び D 9 に 5 mg/kg の用量で尾静脈に静注した。

第 3 群 : ドセタキセル 10 mg/kg (処置群)。ドセタキセル (ドセタキセル無水物、Sigma Aldrich、欧州薬局方) をポリソルベート 80 - エタノール 1 : 1 (v/v) に 20 g/L で溶解した。注射に先立ち、ドセタキセル化合物を含むポリソルベート 80 - エタノール溶液に生理食塩水 (NaCl 1% w/w) を添加して、2 g/L のドセタキセル濃度まで下げた。得られたドセタキセル懸濁液を、D 2、D 6 及び D 10 に 10 mg/kg の用量で尾静脈から静脈内投与した。

第 4 群 : DHB ミセル及びドセタキセル 10 mg/kg の連続投与 (医薬組成物群)。第 4 群は以下のように処置した :

- ・ D 1、D 3 及び D 9 に 5 mg/kg の用量で DHB ミセル 2.5 mM を尾静脈から静注 ;
- ・ D 2、D 6 及び D 10 に 10 mg/kg の用量で、上記の第 3 群のように調製したドセタキセル懸濁液 (2 g/L) を尾静脈から静注。

【0075】

臨床徴候、体重及び腫瘍サイズについて、少なくとも週に 2 回、マウスを追跡調査した。腫瘍体積は、デジタルノギスを用いた二次元腫瘍体積測定法から下記式 :

【0076】

【数 2】

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = \frac{\text{長さ (mm)} \times \text{幅}^2 \text{ (mm}^2\text{)}}{2}$$

を使用して推定された。

Kaplan-Meyer 曲線を用いて全動物の全生存率を追跡した。図 8 に示されるように、医薬組成物により処置した群 (第 4 群) の動物の 40% は、ドセタキセル 10 mg/kg 単独で処置した群 (第 3 群) より少なくとも 15 日間長く生存している。

これらの結果は、ドセタキセル単独と比較した場合、本発明の医薬組成物を使用する時の有利な全生存率を示した。

【0077】

[実施例 7]

ベルガモチンを封入するミセル (ベルガモチンミセル) の合成。

界面活性剤 - エタノール溶液を水溶液に溶解することにより、自己集合によってベルガモチンのミセル (即ち、ベルガモチンミセル) が形成された。界面活性剤 (ポリソルベート 80) 及び無水エタノールを 1 : 1 (v/v) 混合することにより、界面活性剤 - エタノール溶液を形成させる。

次いで、ベルガモチンを秤量して、ポリソルベート 80 - エタノール (1 : 1、v/v) 溶液に溶解限界までの濃度で溶解させた。続いてベルガモチン粉末を完全に溶解させるために、15 分間の強いボルテックスを行った。

ベルガモチンの溶解が完了したら、ベルガモチンを含むポリソルベート 80 - エタノール (1 : 1、v/v) 溶液に水溶液 (水か生理食塩水のいずれか) を添加することによって

、ミセルを形成させた。典型的には、NaCl 1% (w/w) を含む生理食塩水を、ベルガモチンを含むポリソルベート80 - エタノール溶液に10 : 1に等しい比(生理食塩水 : ポリソルベート80 - エタノール、v : v)で添加した。これらの条件下で、得られるミセル溶液中のベルガモチンの最終濃度は2.5 mMであった。

粒径の特性評価：

生理食塩水(1% w/w NaCl)中のベルガモチンミセルを、動的光散乱法により測定した。ミセルの流体力学直径は13.26 nm(強度による分布)に等しく、多分散指数(PdI)は0.108に等しかった。

【0078】

[実施例8]

6', 7'-ジヒドロキシベルガモチン(DHB)を含む、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)及びN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)で架橋されたヒアルロン酸(HA)ナノ粒子の合成。

HAポリマーの水溶液を、100 mLビーカー中でHAポリマーを水に混合(2.5 g/L、5.4 mL)することによって調製した。次に、アセトン 17.0 mLをフラスコに加え、機械的攪拌下で20分間(320 rpm)攪拌した。水中のEDC溶液(50 mg/mL) 0.125 mLをフラスコに加えて、5分後に水中のNHS溶液(27.5 mg/mL) 0.35 mLを加えた。溶液を5分間混合した後、アセトン 21.5 mLをアセトン中のDHB(10 g/L) 0.125 mLと一緒に溶液に加えて、攪拌を15時間30分間続けた(HA濃度 ~ 0.30 g/L)。次に、透析膜(再生セルロース(Regenerated Cellulose)(RC)、MWCO 12 ~ 14 kDa)を用いて逆浸透水に対する溶液の透析により反応を停止させた(最短 2 x 4 時間)。

粒径の特性評価

ナノ粒子の流体力学直径は、DLSにより測定した(流体力学直径(強度による分布) = NaCl(150 mM)中92 nm及びPdI = 0.148)。最後に、Amicon(登録商標)システム(Biomax(登録商標); 50 kDa; d = 2.5 mm; PES)を用いてナノ粒子溶液を濃縮して、4 で保存した(最終HA濃度 ~ 4.00 g/L)。

【0079】

[実施例9]

6', 7'-ジヒドロキシベルガモチン(DHB)を含む、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)及びN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)で架橋されたヒアルロン酸(HA) - エチレンジアミン(EDA)ナノ粒子の合成。

HAポリマーの水溶液を、100 mLビーカー中でHAポリマーを水に混合(2.5 g/L、5.3 mL)することによって調製した。次に、アセトン 17.0 mLをフラスコに加え、機械的攪拌下で34分間(320 rpm)攪拌した。水中のEDCの溶液(50 mg/mL) 0.125 mLをフラスコに加えて、5分後に水中のNHS溶液(27.5 mg/mL) 0.35 mL及び水中のEDA溶液(15 mg/mL) 0.125 mLを加えた。溶液を15分間混合した後、アセトン 21.5 mLをアセトン中のDHB(10 g/L) 0.180 mLと一緒に溶液に加えて、攪拌を20分間続けた(HA濃度 ~ 0.30 g/L)。次に、透析膜(再生セルロース(RC)、MWCO 12 ~ 14 kDa)を用いて逆浸透水に対する溶液の透析により反応を停止させた(最短 2 x 4 時間)。

粒径の特性評価

ナノ粒子の流体力学直径は、DLSにより測定した(流体力学直径(強度による分布) = NaCl(150 mM)中95 nm及びPdI = 0.136)。最後に、Amicon(登録商標)システム(Biomax(登録商標); 50 kDa; d = 2.5 mm; PES)を用いてナノ粒子溶液を濃縮して、4 で保存した(最終HA濃度 ~ 4.00 g/L)。

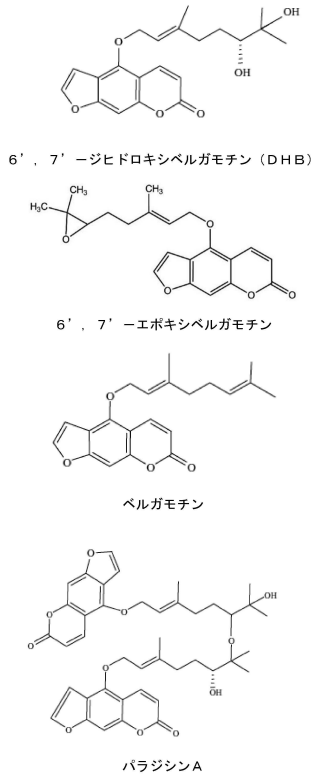
10

20

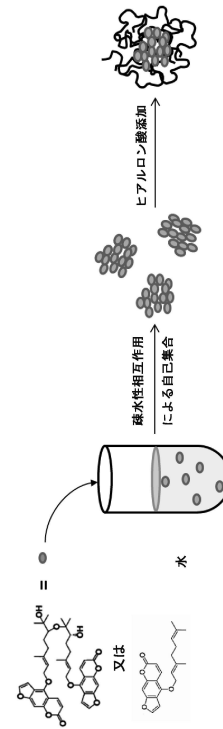
30

40

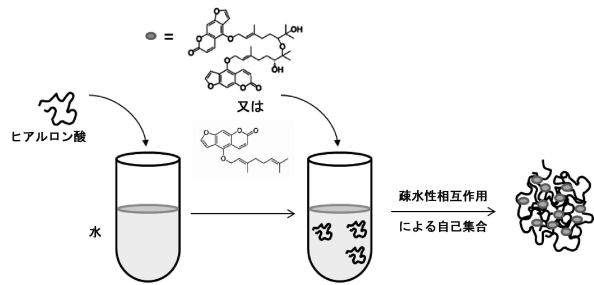
【 図 1 】



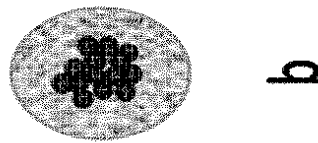
【 図 2 】



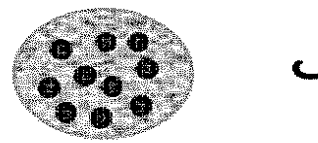
【 図 3 】



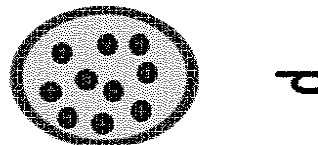
【 図 5 b 】



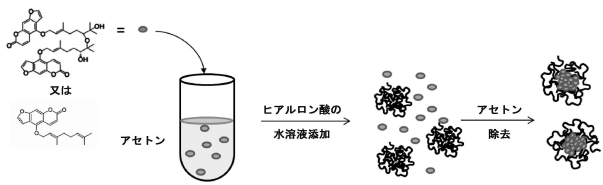
【 図 5 c 】



【 図 5 d 】



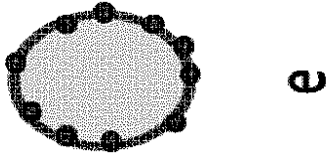
【 図 4 】



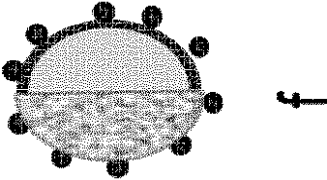
【 図 5 a 】



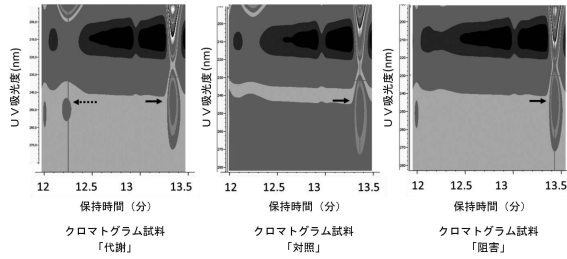
【図 5 e】



【図 5 f】



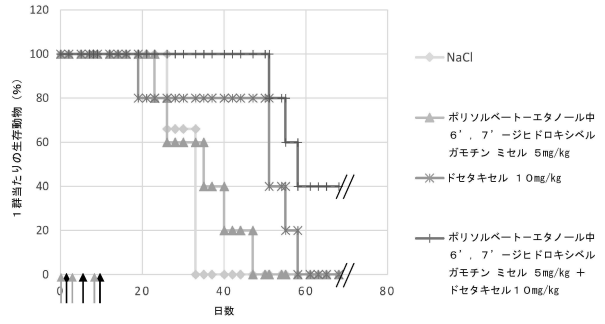
【図 6】



【図 7】



【図 8】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1
A 6 1 K 45/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 K 47/12	(2006.01)	A 6 1 K 47/12
A 6 1 K 47/10	(2006.01)	A 6 1 K 47/10
A 6 1 K 9/16	(2006.01)	A 6 1 K 9/16
A 6 1 K 9/127	(2006.01)	A 6 1 K 9/127
A 6 1 K 9/51	(2006.01)	A 6 1 K 9/51
B 8 2 Y 5/00	(2011.01)	B 8 2 Y 5/00

- (72)発明者 ポール, ロランス
フランス国、エフ - 7 5 0 1 2 パリ、リュ・ドゥ・リヨン 4 7
- (72)発明者 パオリーニ, マリオン
フランス国、エフ - 9 2 2 0 0 ヌイイ・シュル・セーヌ、リュ・ペロネ 2 2
- (72)発明者 メール, マリー - エディット
フランス国、エフ - 9 4 1 6 0 サン・マンデ、スクワール・ニュンジェセ 3

審査官 渡邊 潤也

- (56)参考文献 特表2003 - 522143 (JP, A)
国際公開第2009 / 105774 (WO, A2)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
- A 6 1 K 4 7 / 0 0
A 6 1 K 9 / 0 0
A 6 1 K 3 1 / 0 0
A 6 1 K 4 5 / 0 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)