

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6770524号
(P6770524)

(45) 発行日 令和2年10月14日 (2020. 10. 14)

(24) 登録日 令和2年9月29日 (2020. 9. 29)

(51) Int. Cl.	F I	
A 6 1 K 47/24 (2006. 01)	A 6 1 K 47/24	
A 6 1 K 47/14 (2006. 01)	A 6 1 K 47/14	
A 6 1 K 47/28 (2006. 01)	A 6 1 K 47/28	
A 6 1 K 48/00 (2006. 01)	A 6 1 K 48/00	Z N A
A 6 1 K 47/04 (2006. 01)	A 6 1 K 47/04	

請求項の数 12 (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-546149 (P2017-546149)	(73) 特許権者	516026321
(86) (22) 出願日	平成28年3月3日 (2016. 3. 3)		マティナス バイオファーマ ナノテクノ
(65) 公表番号	特表2018-508523 (P2018-508523A)		ロジーズ, インコーポレーテッド
(43) 公表日	平成30年3月29日 (2018. 3. 29)		アメリカ合衆国 07921 ニュージャ
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/020722		ージー州, ベドミンスター, スイート 3
(87) 国際公開番号	W02016/141203		02, ルート 206 サウス 1545
(87) 国際公開日	平成28年9月9日 (2016. 9. 9)	(74) 代理人	110000796
審査請求日	平成31年2月14日 (2019. 2. 14)		特許業務法人三枝国際特許事務所
(31) 優先権主張番号	62/163, 212	(72) 発明者	マンニーノ ラファエル ジェイ.
(32) 優先日	平成27年5月18日 (2015. 5. 18)		アメリカ合衆国 08826 ニュージャ
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		ージー グレン ガードナー ラノン レ
(31) 優先権主張番号	62/239, 675		ーン 518
(32) 優先日	平成27年10月9日 (2015. 10. 9)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コクリエート、及び薬理活性物質の組織透過性を高めるためにそれを使用する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

コクリエート組成物であって、少なくとも1つの負に帯電したリン脂質と、多価カチオンと、サイズ調整剤を含む複数のコクリエートを含む、コクリエート組成物であり、前記サイズ調整剤が脂質アンカーポリヌクレオチドであり、

前記脂質アンカーポリヌクレオチドが、炭素原子数12～28の飽和又は不飽和脂肪酸、ステロール、及びビタミンから選択される脂質アンカーに共有結合したポリヌクレオチドであり；かつ

前記脂質アンカーが、共有結合によって前記ポリヌクレオチドに直接連結する、又は直鎖分子を含む共有結合スパーサーによって前記ポリヌクレオチドに間接的に連結する、コクリエート組成物。

【請求項 2】

前記複数のコクリエートの平均粒子サイズが10ミクロン未満である、請求項1に記載のコクリエート組成物。

【請求項 3】

前記複数のコクリエートの平均粒子サイズが1ミクロン未満である、請求項2に記載のコクリエート組成物。

【請求項 4】

前記複数のコクリエートの平均粒子サイズが400nm～800nmである、請求項3に記載のコクリエート組成物。

【請求項 5】

前記複数のコクリエートの平均粒子サイズが、前記サイズ調整剤を用いずに作製したコクリエートの平均粒子サイズの2分の1～3分の1である、請求項1～4のいずれか一項に記載のコクリエート組成物。

【請求項 6】

前記ポリヌクレオチドが s i R N A、i R N A、アンチセンス療法又は遺伝子療法用ポリヌクレオチドからなる群から選択される、請求項1～5のいずれかに記載のコクリエート組成物。

【請求項 7】

前記多価カチオンがカルシウム、亜鉛、マグネシウム又はバリウム等の二価金属カチオンである、請求項1～6のいずれか一項に記載のコクリエート組成物。

【請求項 8】

前記二価金属カチオンがカルシウムである、請求項7に記載のコクリエート組成物。

【請求項 9】

前記少なくとも1つの負に帯電したリン脂質が、前記コクリエート組成物の全リン脂質含量の約20%～80%、或いは30%～70%、或いは40%～60%、或いは45%～55%の量で存在する、請求項1～8のいずれか一項に記載のコクリエート組成物。

【請求項 10】

治療を必要とする被験体を治療するための、請求項1～9のいずれかに記載のコクリエート組成物。

【請求項 11】

前記共有結合スペーサーが、ポリカーボン、又はポリエチレングリコール鎖を含む、請求項1～10のいずれか一項に記載のコクリエート組成物。

【請求項 12】

前記共有結合スペーサーが、ポリエチレングリコール鎖を含む、請求項11に記載のコクリエート組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2015年3月3日付で出願された米国仮特許出願第62/127,799号、2015年3月15日付で出願された米国仮特許出願第62/162,425号、2015年5月18日付で出願された米国仮特許出願第62/163,212号、2015年10月9日付で出願された米国仮特許出願第62/239,675号、2015年10月28日付で出願された米国仮特許出願第62/247,641号及び2015年12月7日付で出願された米国仮特許出願第62/264,164号の利益を主張し、その出願日に依拠し、その開示全体が引用することにより本明細書の一部をなすものとする。

【0002】

配列表

本出願は、ASCIIフォーマットで電子的に提出された配列表を含み、その全体が引用することにより本明細書の一部をなすものとする。2016年3月3日付けで作製された上記ASCIIコピーの名前は0200.0002-PC T__SL. t x tであり、993バイトのサイズである。

【0003】

本願は概して、コクリエート、及び薬理活性物質を標的化組織へと迅速に送達するためにそれを投与方法に関する。

【背景技術】

【0004】

現代の薬理学の多くは、初回通過肝臓代謝をもたらす腸の上部における血流中への直接的な治療物質の吸収に基づく。かかる初回通過代謝により投与された薬理物質の多くが除

10

20

30

40

50

去又は変更されるため、有用用量が低減するか、又は副作用を引き起こし得る代謝産物が生じることで治療効果が減少する可能性がある。

【0005】

血流中に吸収される多くの薬理物質は、最終的に身体の他の部分の組織を標的化する。多くの場合、血流中への吸収は、薬理物質を体中に分散させ、標的組織へと拡散させる方法である。このアプローチは或る特定の治療用途では非常に奏功し得るが、非効率性及び有害作用を生じることが多い。例えば、多くの抗感染症剤は、最終的に標的器官（肺、鼻腔又は膀胱壁等）を透過するためには相当な血中レベルに達する必要がある。同時に、薬理物質の摂取は、抗生物質による腸内細菌叢の死滅、嘔気、嘔吐、下痢、肝臓毒性（初回通過又はその後の代謝による）、腎臓毒性（血液中を循環する毒性の薬剤又はそれらの代謝産物による）、又は非ステロイド性抗炎症薬（NSAID）による胃及び腸の潰瘍形成等の非標的化組織における大きな副作用を引き起こす可能性がある。

10

【0006】

結果として、血流中への胃腸吸収又は注射／注入による薬理物質の分散は通例、組織及び器官内レベルに対してより高い薬剤の血液／血清／血漿中レベルをもたらす。また、薬理物質が薬理学的に適切なレベルまで組織及び器官を透過するには多大な時間がかかることが多い。

【発明の概要】

【0007】

本開示は、コクリエート組成物であって、少なくとも1つのリン脂質（好ましくは少なくとも1つの負に帯電したリン脂質）と、多価カチオン（好ましくはカルシウム、亜鉛、マグネシウム及びバリウム等の二価金属カチオン）と、薬理活性物質と、脂質アンカーポリヌクレオチド、脂質アンカー糖、脂質アンカーポリペプチド又は胆汁酸塩（オキシコール酸塩又はデオキシコール酸塩）からなる群から選択されるサイズ調整剤とを含む複数のコクリエートを含む、コクリエート組成物を提供する。

20

【0008】

或る特定の実施の形態では、複数のコクリエートの平均粒子サイズは10ミクロン未満、或いは1ミクロン未満である。或る特定の実施の形態では、複数のコクリエートの平均粒子サイズは、サイズ調整剤を用いずに作製したコクリエート平均粒子サイズの2分の1～10分の1、或いは2分の1～3分の1である。

30

【0009】

別の態様では、本開示は、コクリエート組成物であって、少なくとも1つのリン脂質（好ましくは少なくとも1つの負に帯電したリン脂質）と、多価カチオン（好ましくはカルシウム、亜鉛、マグネシウム及びバリウム等の二価金属カチオン）と、薬理活性物質とを含む複数のコクリエートを含み、感染組織又は炎症組織を有する哺乳動物への該コクリエート組成物の投与（好ましくは経口投与）が、感染組織又は炎症組織において、血漿中の薬理活性物質のレベルに比べてより高い薬理活性物質のレベルをもたらす、コクリエート組成物を提供する。

【0010】

コクリエート組成物であって、少なくとも1つのリン脂質（好ましくは少なくとも1つの負に帯電したリン脂質）と、多価カチオン（好ましくはカルシウム、亜鉛、マグネシウム及びバリウム等の二価金属カチオン）と、薬理活性物質とを含む複数のコクリエートを含み、被験体への投与（好ましくは経口投与）の24時間後の感染組織又は炎症組織における薬理活性物質の組織内レベルが、健常被験体への投与（好ましくは経口）の24時間後の該薬理活性物質の組織内レベルより少なくとも1.5倍高い、コクリエート組成物も提供する。

40

【0011】

別の態様は、治療を必要とする被験体を治療する方法であって、本明細書に記載のコクリエート組成物を被験体に投与することを含む、方法に関する。

【0012】

50

更に別の態様は、感染組織内の薬理活性物質の濃度を血漿中の薬理活性物質の濃度に比べて増大させる方法であって、本明細書に記載のコクリエート組成物を、感染組織を有する被験体に投与（好ましくは経口投与）することを含み、被験体へのコクリエート組成物の投与（好ましくは経口投与）の24時間（或いは48時間又は72時間）後の感染組織内の薬理活性物質の濃度が血漿中の薬理活性物質の濃度より少なくとも25%高い（1.25倍）、或いは少なくとも50%高い（1.5倍）、或いは少なくとも100%高い（2倍）、或いは少なくとも150%高い、或いは少なくとも200%高い、或いは少なくとも250%高い、或いは少なくとも300%高い、或いは少なくとも350%高い、或いは少なくとも400%高い、或いは少なくとも500%高い、或いは少なくとも600%高い、或いは少なくとも700%高い、或いは少なくとも800%高い、或いは少なくとも1000%高い（11倍）、方法に関する。

10

【0013】

引用することにより本明細書の一部をなす添付の図面は、幾つかの実施形態を解説し、本明細書と共に本明細書に開示される組成物及び方法の幾つかの原理を説明するのに役立つ。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】両親媒性部分と負に帯電した部分とを有する脂質アンカーポリヌクレオチドを示す図である。コクリエートの作製に使用することができるホスファチジルセリン分子も示す。ホスファチジルセリン分子も両親媒性部分と負に帯電した部分とを有する。

20

【図2】脂質アンカーポリヌクレオチドを含有するコクリエートを作製する方法の概略図である。

【図3】作製及び試験した様々な脂質アンカーポリヌクレオチドを示す図である。図3に示すポリヌクレオチドは、高感度緑色蛍光タンパク質（EGFP）に特異的な二本鎖 siRNA である。siRNA のセンス鎖は配列 ACCCUGAAGUUC AUCUGCAC C（配列番号1）を有し、アンチセンス鎖は配列 ACUGGGACUUC AAGUAGACGU（配列番号2）を有する。

【図4】カンジダ・アルビカンズ（*Candida albicans*）を感染させ、腹腔内投与される 2 mg / kg の標準治療アムホテリシン B デオキシコール酸塩（ファンギゾンとしても知られる）又は経口投与される 10 mg / kg のコクリエート化（*enochleated*）アムホテリシン B（CAMB）のいずれかで治療したマウスの肝臓組織におけるアムホテリシン B の濃度の経時変化を示す図である。

30

【図5】カンジダ・アルビカンズを感染させ、腹腔内投与される 2 mg / kg の標準治療アムホテリシン B デオキシコール酸塩（ファンギゾンとしても知られる）又は経口投与される 10 mg / kg のコクリエート化アムホテリシン B（CAMB）のいずれかで治療したマウスの肺組織におけるアムホテリシン B の濃度の経時変化を示す図である。

【図6】カンジダ・アルビカンズを感染させ、腹腔内投与される 2 mg / kg の標準治療アムホテリシン B デオキシコール酸塩（ファンギゾンとしても知られる）又は経口投与される 10 mg / kg のコクリエート化アムホテリシン B（CAMB）のいずれかで治療したマウスの腎臓組織におけるアムホテリシン B の濃度の経時変化を示す図である。

40

【図7】2 mg / kg 又は 1 mg / kg のファンギゾン（「既存のAMB」）の静脈内投与に対する 0.5 mg / kg のコクリエート化アムホテリシン B の経口投与の有効性を示す図である。

【図8】アムホテリシン B コクリエート（15 mg / kg）を投与した健常動物、又はアムホテリシン B コクリエート（10 mg / kg）で治療したカンジダ感染マウスの血漿、尿、肝臓、肺及び腎臓において検出されたアムホテリシン B のレベルを示す図である。アムホテリシン B コクリエートのレベルは、健常動物では28日目、感染動物では15日目に検出した。BLDは検出レベル未満を表す。

【図9】ニューモシスチス・ムリナ（*P. murina*）を感染させ、強制経口投与により投与量 100 mg / kg のコクリエート化 ATQ（eATQ）で治療したマウスの血漿及び肺

50

における A T Q の濃度の経時変化を示す図である。

【図 1 0】図 1 0 A ~ 図 1 0 F は、ニューモシスチス・ムリナを感染させ、1) A T Q を含まないビヒクル (コクリエート) 対照 (C / S)、2) トリメトプリム / スルファメトキサゾール (T / S)、3) 非コクリエート化 A T Q (A T Q)、4) 強制経口投与による 1 0 0 m g / k g のコクリエート化 A T Q (e A T Q h i)、又は 5) 強制経口投与による 5 0 m g / k g のコクリエート化 A T Q (e A T Q l o) で治療したマウスにおける 7 日後 (図 1 0 A 及び図 1 0 B)、1 4 日後 (図 1 0 C 及び図 1 0 D) 及び 2 1 日後 (図 1 0 E 及び図 1 0 F) の平均核数及び平均子囊数を示す図である。

【図 1 1】図 1 1 A ~ 図 1 1 C は、ニューモシスチス・ムリナを感染させ、1) A T Q を含まないビヒクル (コクリエート) 対照 (C / S)、2) トリメトプリム / スルファメトキサゾール (T / S)、3) 非コクリエート化 A T Q (A T Q)、4) 強制経口投与による 1 0 0 m g / k g のコクリエート化 A T Q、又は 5) 強制経口投与による 5 0 m g / k g のコクリエート化 A T Q で治療したマウスにおける 7 日後 (図 1 1 A)、1 4 日後 (図 1 1 B) 及び 2 1 日後 (図 1 1 C) の生存曲線を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0 0 1 5】

ここで、様々な例示的な実施形態を詳細に参照し、実施形態の例を、添付の図面において図示するとともに、以下の発明を実施するための形態において論じる。以下の発明を実施するための形態は読者に本発明の幾つかの実施形態、特徴及び態様の詳細のより十分な理解をもたらすために提示され、本発明の範囲を限定するものと解釈すべきではないことを理解されたい。

【0 0 1 6】

コクリエートは、カルシウム等の多価カチオンをホスファチジルセリン等のリン脂質に添加することで、電荷 - 電荷相互作用 (重合ではない) により自然に形成される。この結果、内部水性空間を有しない、らせん状に又は積層シートとして巻き上げられた大きな連続固体の脂質二重層シートを有する多層構造の安定した結晶性リン脂質 - カルシウム沈殿物が生じる。この独自の構造により、会合した「コクリエート化」分子が分解から保護される。コクリエート構造全体が一連の固体層であるため、コクリエートの外層が過酷な環境条件又は酵素に曝露され得るにもかかわらず、コクリエート構造の内部の構成要素 (例えば薬理活性物質) は無傷のままである。i n v i v o での血清及び粘膜分泌物中の二価カルシウム濃度は、コクリエート構造が維持されるようなものである。したがって、コクリエート会合分子の大部分は、固体の安定した不浸透性構造の内層に存在する。経口投与の後、コクリエートは胃腸管内での細胞外分解を切り抜け、循環系、組織及び活性化 / 感染細胞に入る。

【0 0 1 7】

しかしながら、細胞内部に入ると、低い細胞内カルシウム濃度のためにコクリエートが開き、封入されていた活性薬理物質が放出される (「トロイの木馬効果」)。このため、コクリエートへの配合は、感染細胞への細胞内薬物送達を高める主に単球 / マクロファージ系列の細胞内標的化をもたらす、注射薬物を遊離薬物の循環レベル、ひいては低毒性で有効な経口配合物へと変換する。

【0 0 1 8】

サイズ調整剤を用いてコクリエートのサイズを制御することが可能である。コクリエートの吸収速度 (吸収効率) 及び組織を透過するそれらの能力は、結晶又はジオード (geode) コクリエート粒子のサイズによって軽減する。コクリエート粒子のサイズは、個々のコクリエート脂質結晶のサイズ、並びにそれらの凝集速度及び凝集体の安定性によって決まる。未修飾コクリエート粒子は、比較的疎水性の表面を有し、水性コクリエート調製環境ではコクリエート粒子は通例、互いに固着し、直径が数マイクロメートルを超え、1 0 マイクロメートルを超えることが多く、場合によっては更に 5 0 マイクロメートルを超える粒子へと凝集する。より大きなコクリエート粒子は、小さな粒子ほど良好には吸収されず、食細胞 (phagocytotic cells) により飲み込まれない。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 9 】

驚くべきことに、個々のコクリエート結晶のサイズ及びより大きな粒子へと凝集するそれらの能力を脂質アンカーポリヌクレオチド、脂質アンカー糖（糖脂質）、又は脂質アンカーポリペプチド、又は胆汁酸塩（オキシコール酸塩又はデオキシコール酸塩等）等の1つ以上のサイズ調整剤を添加することによって調整することができることが見出された。

【 0 0 2 0 】

脂質結晶又はジオード（ジオデートとしても知られる）コクリエート粒子中の薬理活性物質のナノカプセル化は、胃腸管から血流への薬理活性物質（又はその初回通過代謝産物又は他の代謝産物）の吸収を顕著に制限し、それにより組織曝露（胃、腸、肝臓、腎臓等）による有害作用、又は遊離薬理活性物質及び／又はその初回通過代謝産物若しくは他の代謝産物による有害作用が低減又は回避される。血流吸収の欠如は、非コクリエート化形態の同じ薬剤の投与と比較して、コクリエート配合物として経口投与した場合の薬理活性物質又はその代謝産物の比較的低い血漿中濃度によって実証される。

10

【 0 0 2 1 】

コクリエートジオード又は脂質結晶ナノ粒子は胃腸管内で安定し、血流中に吸収されにくい。いかなる理論にも束縛されることを意図するものではないが、コクリエートは主としてリンパ系に吸収され则认为られる。リンパ系吸収は、 α -3 脂肪酸等の脂肪の T_{max} と一致する、殆どの小分子薬剤（又はそれらの代謝産物）についての約8時間～12時間という一貫した T_{max} によって裏付けられる。

【 0 0 2 2 】

これらの非常に小さなコクリエートジオード又は脂質結晶ナノ粒子のリンパ系への吸収により、これらの粒子はパイエル板及び腸内の他の位置でマクロファージ及び他の食細胞に曝露される。コクリエート粒子のサイズ及び表面特徴は、コクリエートが腸及びリンパ系に吸収される速度／効率、並びにコクリエートが食細胞によって吸収される速度／効率に影響を及ぼす。

20

【 0 0 2 3 】

リンパ系内での循環及び走化性のために、これらのマクロファージ及び他の食細胞は、コクリエート粒子をそれらの医薬ペイロード（薬理活性物質）と共にリンパ系を介して感染組織又は炎症組織へと運搬する。多くの病的状態（感染又は外傷等）が関心の組織／器官における局所炎症と関連する。

30

【 0 0 2 4 】

感染又は炎症を起こした標的組織内でのコクリエートの堆積の後、薬理活性物質（又はその代謝産物）が血流中に浸出する。驚くべきことに、薬理活性物質の非コクリエート化送達とは対照的に、コクリエート送達による薬理活性物質（又はその代謝産物）の組織内レベルが、薬理活性物質（又はその代謝産物）の血液／血漿中レベルと比較して投与後に急速に増大することが見出された。

【 0 0 2 5 】

1. サイズ調整剤

サイズ調整剤は、本明細書で使用される場合、コクリエートの粒子サイズを低減する作用物質を指す。本明細書で使用される場合、「粒子サイズ」という用語は粒径を指すか、又は粒子が球状でない場合、粒子の一方向の最大伸長を指す。コクリエートの粒子サイズは、サブミクロン粒子サイズ分析装置等の従来の方法を用いて測定することができる。

40

【 0 0 2 6 】

或る特定の実施形態では、サイズ調整剤は脂質アンカーポリヌクレオチド、脂質アンカー糖（糖脂質）又は脂質アンカーポリペプチドである。他の実施形態では、サイズ調整剤は、オキシコール酸塩又はデオキシコール酸塩等の胆汁酸塩である。胆汁酸塩はカチオン、通常はナトリウムと化合した胆汁酸である。胆汁酸は主に哺乳動物の胆汁中に見られるステロイド酸であり、市販されている。或る特定の実施形態では、脂質アンカーポリヌクレオチド、脂質アンカー糖又は脂質アンカーポリペプチドは、例えばポリヌクレオチドが標的遺伝子の発現を阻害することが可能な二本鎖RNAである場合に、含まれる薬理活性

50

物質でもある。

【 0 0 2 7 】

脂質アンカーポリヌクレオチドは脂肪酸、リン脂質、又はコクリエートのリン脂質二重層の疎水性尾部内でアンカーに対して十分に疎水性のドメインを有する別の化合物に共有結合したポリヌクレオチドである。脂質アンカー糖は脂肪酸、リン脂質、又はコクリエートのリン脂質二重層の疎水性尾部内でアンカーに対して十分に疎水性のドメインを有する別の化合物に共有結合した糖である。脂質アンカーポリペプチドは脂肪酸、リン脂質、又はコクリエートのリン脂質二重層の疎水性尾部内でアンカーに対して十分に疎水性のドメインを有する別の化合物に共有結合したポリペプチドである。或る特定の実施形態では、脂質アンカーはパルミチン酸塩等の炭素原子数 12 ~ 38 の飽和又は不飽和脂肪酸、コレステロール又はラノステロール等のステロール、及びビタミン E 又はビタミン K 等のビタミンからなる群から選択される。幾つかの実施形態では、脂質アンカーは共有結合によってポリヌクレオチド、ポリペプチド又は糖に直接連結する。他の実施形態では、脂質アンカーはポリカーボン (polycarbon)、又はヘキサ - エチレングリコール等のポリ - エチレングリコール鎖を含むが、これらに限定されない直鎖分子を含む共有結合スパーサーによってポリヌクレオチド、ポリペプチド又は糖に間接的に連結する。スパーサーはエステル結合、アミド結合、エーテル結合又はアジド結合によってポリヌクレオチド、ポリペプチド又は糖に連結することができる。

10

【 0 0 2 8 】

幾つかの実施形態では、コクリエート粒子サイズは、アンカー - 脂質に結合したポリヌクレオチドの長さを制御することによって最適化される。或る特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは 15 ~ 20 ヌクレオチド、或いは 15 ~ 30 ヌクレオチド、或いは 20 ~ 25 ヌクレオチド、或いは 30 ~ 50 ヌクレオチド長である。或る特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは正味の負電荷を有する。オリゴヌクレオチドは RNA 又は DNA とすることができ、RNA 又は DNA は一本鎖又は二本鎖とすることができる (例えば、標的遺伝子の発現を阻害することが可能な二本鎖 RNA)。

20

【 0 0 2 9 】

他の実施形態では、コクリエート粒子サイズは、アンカー - 脂質に結合した特定の多糖又はポリペプチドの長さ又は選択肢を制御することによって最適化される。例えば、或る特定の実施形態では、ポリペプチドは 10 ~ 15、或いは 10 ~ 20、或いは 15 ~ 20、或いは 25 ~ 30、或いは 30 ~ 50、或いは 20 ~ 30 アミノ酸長である。或る特定の実施形態では、ポリペプチド又は糖は正味の負電荷を有する。コクリエート粒子サイズは、オキシコール酸塩又はデオキシコール酸塩等の特定の胆汁酸塩の選択肢を制御することによっても最適化することができる。

30

【 0 0 3 0 】

一実施形態では、サイズ調整剤を用いて形成されたコクリエートの少なくとも 50 % (全コクリエート体積の 50 % 又は薬理活性物質含有コクリエート粒子の 50 %) が 1 ミクロン未満、或いは 2 ミクロン未満、或いは 5 ミクロン未満、或いは 10 ミクロン未満、或いは 20 ミクロン未満、或いは 25 ミクロン未満、或いは 50 ミクロン未満サイズの粒子サイズを有する。別の実施形態では、サイズ調整剤を用いて形成されたコクリエート粒子の少なくとも 50 % が 200 nm ~ 400 nm、200 nm ~ 600 nm、200 nm ~ 800 nm、300 nm ~ 500 nm、300 nm ~ 700 nm、300 nm ~ 900 nm、400 nm ~ 500 nm、400 nm ~ 600 nm、400 nm ~ 700 nm、400 nm ~ 800 nm、400 nm ~ 900 nm、500 nm ~ 600 nm、500 nm ~ 700 nm、500 nm ~ 800 nm、500 nm ~ 900 nm、600 nm ~ 700 nm、600 nm ~ 800 nm、600 nm ~ 900 nm、700 nm ~ 800 nm 又は 700 nm ~ 900 nm、好ましくは 400 nm ~ 800 nm の粒子サイズを有する。

40

【 0 0 3 1 】

別の実施形態では、サイズ調整剤を用いて形成されたコクリエートの少なくとも 75 % が 1 ミクロン未満、或いは 2 ミクロン未満、或いは 5 ミクロン未満、或いは 10 ミクロン

50

未満、或いは20ミクロン未満、或いは25ミクロン未満、或いは50ミクロン未満サイズの粒子サイズを有する。別の実施形態では、サイズ調整剤を用いて形成されたコクリエートの少なくとも75%が200nm~400nm、200nm~600nm、200nm~800nm、300nm~500nm、300nm~700nm、300nm~900nm、400nm~500nm、400nm~600nm、400nm~700nm、400nm~800nm、400nm~900nm、500nm~600nm、500nm~700nm、500nm~800nm、500nm~900nm、600nm~700nm、600nm~800nm、600nm~900nm、700nm~800nm又は700nm~900nm、好ましくは400nm~800nmの粒子サイズを有する。

【0032】

別の実施形態では、サイズ調整剤を用いて形成されたコクリエートの少なくとも90%が1ミクロン未満、或いは2ミクロン未満、或いは5ミクロン未満、或いは10ミクロン未満、或いは20ミクロン未満、或いは25ミクロン未満、或いは50ミクロン未満サイズの粒子サイズを有する。別の実施形態では、サイズ調整剤を用いて形成されたコクリエートの少なくとも90%が200nm~400nm、200nm~600nm、200nm~800nm、300nm~500nm、300nm~700nm、300nm~900nm、400nm~500nm、400nm~600nm、400nm~700nm、400nm~800nm、400nm~900nm、500nm~600nm、500nm~700nm、500nm~800nm、500nm~900nm、600nm~700nm、600nm~800nm、600nm~900nm、700nm~800nm又は700nm~900nm、好ましくは400nm~800nmの粒子サイズを有する。

【0033】

一実施形態では、コクリエートの中央粒子サイズが1ミクロン未満、或いは2ミクロン未満、或いは5ミクロン未満、或いは10ミクロン未満、或いは20ミクロン未満、或いは25ミクロン未満、或いは50ミクロン未満のサイズである。別の実施形態では、コクリエートの中央粒子サイズが200nm~400nm、200nm~600nm、200nm~800nm、300nm~500nm、300nm~700nm、300nm~900nm、400nm~500nm、400nm~600nm、400nm~700nm、400nm~800nm、400nm~900nm、500nm~600nm、500nm~700nm、500nm~800nm、500nm~900nm、600nm~700nm、600nm~800nm、600nm~900nm、700nm~800nm又は700nm~900nm、好ましくは400nm~800nmである。

【0034】

別の実施形態では、コクリエートの平均粒子サイズが1ミクロン未満、或いは2ミクロン未満、或いは5ミクロン未満、或いは10ミクロン未満、或いは20ミクロン未満、或いは25ミクロン未満、或いは50ミクロン未満のサイズである。別の実施形態では、コクリエートの平均粒子サイズが200nm~400nm、200nm~600nm、200nm~800nm、300nm~500nm、300nm~700nm、300nm~900nm、400nm~500nm、400nm~600nm、400nm~700nm、400nm~800nm、400nm~900nm、500nm~600nm、500nm~700nm、500nm~800nm、500nm~900nm、600nm~700nm、600nm~800nm、600nm~900nm、700nm~800nm又は700nm~900nm、好ましくは400nm~800nmである。

【0035】

更に別の実施形態では、サイズ減少剤(size reducing agent)を用いたコクリエートの平均粒子サイズは、サイズ減少剤を用いない同じコクリエートの平均粒子サイズの1/5分の1~2分の1、或いは2分の1~3分の1、或いは3分の1~5分の1、或いは2分の1~10分の1、或いは5分の1~10分の1、或いは10分の1未満である。別の実施形態では、サイズ減少剤を用いたコクリエートの平均粒子サイズは、サイズ減少剤を用いない同じコクリエートの平均粒子サイズより少なくとも140%、少なくとも120

10

20

30

40

50

%、少なくとも100%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも40%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%又は少なくとも10%小さい。

【0036】

リポソーム懸濁液の形成前に脂質に添加するか、又はコクリエート化の前にリポソーム懸濁液に添加するサイズ調整剤の量は、コクリエート粒子のサイズに影響を及ぼし得る。或る特定の実施形態では、サイズ調整剤の量は全コクリエート重量の0.1重量%未満、或いは0.1重量%~0.7重量%、或いは0.7重量%~1.5重量%、或いは1.5重量%~2.5重量%、或いは2.5重量%~5重量%、或いは5重量%~15重量%、或いは15重量%~25重量%、或いは25重量%~50重量%である。一実施形態では、サイズ調整剤の量は全コクリエート重量の5重量%未満である。

10

【0037】

2. コクリエートを作製する方法

コクリエートは、米国特許第5,994,318号及び同第6,153,217号(これらの開示全体が引用することにより本明細書の一部をなすものとする)に記載のものを含むが、これらに限定されない既知の方法を用いて作製することができる。一実施形態では、この方法は概して、薬理活性物質と脂質(好ましくは、ホスファチジルセリン等の負に帯電したリン脂質)とを溶媒の存在下で合わせることと、水溶液を添加してリポソームを形成することと、多価カチオンを用いて沈殿させてコクリエートを形成することとを含む。別の実施形態では、この方法は概して、薬理活性物質がリポソームと会合するように薬理活性物質とリポソームとを溶媒の存在下で合わせることと、多価カチオンを用いて沈殿させて薬理活性物質含有コクリエートを形成することとを含む。

20

【0038】

好ましい実施形態では、多価カチオンはカルシウム、亜鉛、マグネシウム及びバリウム等の二価金属カチオンである。好ましい実施形態では、二価金属カチオンはカルシウムである。

【0039】

薬理活性物質をリポソームに溶媒の存在下で導入する工程は、様々な方法で達成することができる。一実施形態では、溶媒と薬理活性物質との溶液をリポソームに導入することによって薬理活性物質を導入する。好ましくは、リポソームはリポソーム懸濁液、好ましくは水性リポソーム懸濁液である。好ましい実施形態では、溶液の滴加によって溶液をリポソームに導入する。他の実施形態では、溶液は連続流によって又はボーラスとして添加することができる。加えて、溶液は水を溶液の前、溶液の後又は溶液と共に添加しながら乾燥脂質に導入することができる。

30

【0040】

別の実施形態では、薬理活性物質を溶媒の前又は溶媒の後にリポソームに導入する。例えば、薬理活性物質は溶媒を含むリポソーム懸濁液に導入することができる。次いで、混合物の攪拌、混合、バルテックス等によって、薬理活性物質とリポソームとの会合を促進することができる。導入される薬理活性物質は、粉末形態又は液体形態とすることができる。

40

【0041】

酸化防止剤(例えばビタミンE)をコクリエートの作製に使用してもよい。酸化防止剤は、薬理活性物質又はリポソームと共に導入することができる。酸化防止剤をリポソーム懸濁液又は薬理活性物質と溶媒との溶液に組み込むのが好ましい。

【0042】

リポソームは、リポソームを調製する任意の既知の方法によって調製することができる。このため、リポソームは例えば溶媒注入、脂質水和、逆蒸発、反復凍結融解による凍結乾燥によって調製することができる。リポソームは、小単層ベシクル(small unilamellar vesicles)(SUV)を含む多重膜(MLV)又は単層(ULV)とすることができる。これらのリポソーム溶液中の脂質の濃度は、約0.1mg/ml~500mg/mlと

50

することができる。好ましくは、脂質の濃度は約 0.5 mg/ml ~ 約 50 mg/ml 、より好ましくは約 1 mg/ml ~ 約 25 mg/ml である。

【0043】

リポソームは、例えば透析、カラムクロマトグラフィー、バイオビーズSM-2を用いた界面活性剤除去、逆相蒸発(REV)、又は高圧押出による中間サイズ単層ベシクルの形成によって調製される大単層ベシクル(large unilamellar vesicles)(LUV)、安定プルリラメラベシクル(stable plurilamellar vesicles)(SPLV)又はオリゴラメラベシクル(oligolamellar vesicles)(OLV)であってもよい。Methods in Biochemical Analysis, 33:337 (1988)を参照されたい。

【0044】

任意の好適な溶媒をこれらの方法に使用することができる。当業者は所与の用途に好適な溶媒を容易に特定することができる。溶媒はFDAに認可され得る溶媒であるのが好ましい。溶媒は有機溶媒又は無機溶媒とすることができる。一実施形態では、溶媒は水混和性溶媒である。別の実施形態では、溶媒は水又は水性緩衝液である。他の好適な溶媒としては、ジメチルスルホキシド(DMSO)、メチルピロリドン、N-メチルピロリドン(NMP)、アセトニトリル、アルコール、例えばエタノール(EtOH)、ジメチルホルムアミド(DMF)、テトラヒドロフラン(THF)及びそれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない。概して、溶媒における薬理活性物質濃度は約 0.01 mg/ml ~ 200 mg/ml である。好ましくは、薬理活性物質濃度は約 0.05 mg/ml ~ 約 100 mg/ml 、より好ましくは約 0.1 mg/ml ~ 20 mg/ml である。

【0045】

溶媒は、例えばリポソーム段階のリポソームの形成前及び/又はコクリエートの形成後に任意に除去することができる。任意の既知の溶媒除去法を用いることができる。例えば、溶媒はリポソーム懸濁液からタンジェンシャルフロー及び/又は濾過及び/又は透析によって、又はコクリエートから洗浄、濾過、遠心分離及び/又は透析によって除去することができる。コクリエートは、例えば最適にはカルシウム又は別のカチオンを含む緩衝液又は水を用いて洗浄することができる。

【0046】

上述のように、サイズ調整剤はコクリエートを作製する方法中に導入することができる。或る特定の実施形態では、サイズ調整剤を沈殿コクリエートの形成前に脂質又はリポソームに添加する。例えば、一実施形態では、サイズ調整剤をリポソーム懸濁液に導入し、続いてコクリエートをそれから形成する(例えば、カチオンの添加又は透析による)。代替的には、サイズ調整剤を薬理活性物質の添加前又は添加後に脂質溶液に導入することができる。

【0047】

任意の好適な脂質をコクリエートの作製に使用することができる。一実施形態では、脂質は1つ以上の負に帯電した脂質を含む。本明細書で 사용되는場合、「負に帯電した脂質」という用語には、酸性、塩基性又は生理的pHの水溶液中で形式負電荷を有する頭部基を有する脂質が含まれ、双性イオン頭部基を有する脂質も含まれる。

【0048】

コクリエートは、負に帯電していない脂質(例えば、陽性及び/又は中性脂質)を含んでいてもよい。コクリエートは相当量の負に帯電した脂質を含むのが好ましい。或る特定の実施形態では、脂質の大部分が負に帯電している。一実施形態では、脂質は少なくとも50%の負に帯電した脂質を含む脂質の混合物である。別の実施形態では、脂質は少なくとも75%の負に帯電した脂質を含む。他の実施形態では、脂質は少なくとも85%、90%、95%又は98%の負に帯電した脂質を含む。更に他の実施形態では、脂質は35%~70%、40%~70%、45%~65%、40%~60%、45%~55%又は45%~50%の負に帯電した脂質を含む。

【0049】

負に帯電した脂質として、ダイズ由来の脂質、他のマメ科植物由来の脂質、卵由来の脂

10

20

30

40

50

質、ウシ由来の脂質又はブタ由来の脂質を挙げることができる。脂質がダイズ由来のリン脂質等のリン脂質を含むのが好ましい。負に帯電した脂質として、ホスファチジルセリン (P S)、ジオレオイルホスファチジルセリン (D O P S)、ホスファチジン酸 (P A)、ホスファチジルイノシトール (P I) 及び / 又はホスファチジルグリセロール (P G)、及び / 又はこれらの脂質の 1 つ以上と他の脂質との混合物を挙げることができる。付加的又は代替的には、脂質として、ホスファチジルコリン (P C)、ホスファチジルエタノールアミン (P E)、ジホスファチジルグリセロール (D P G)、ジオレオイルホスファチジン酸 (D O P A)、ジステアロイルホスファチジルセリン (D S P S)、ジミリストイルホスファチジルセリン (D M P S)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール (D P P G) 等を挙げることができる。

10

【 0 0 5 0 】

3 . 薬理活性物質

コクリエートを薬理活性物質と会合させるか、又はコクリエートに薬理活性物質を装填するのが好ましい。例えば、薬理活性物質は以下の種類の 1 つから選択することができる：抗真菌薬、 β -ラクタマーゼ阻害剤を含むが、これに限定されない抗菌薬、抗ウイルス薬、駆虫薬、抗原虫薬又は抗蠕虫薬、ワクチン、抗炎症剤、s i R N A、i R N A を含むが、これらに限定されないポリヌクレオチド、アンチセンス療法用ポリヌクレオチド (R N A 又は D N A、一本鎖又は二本鎖) 又は遺伝子療法用ポリヌクレオチド (組み込み D N A 又は D N A プラスミド)、免疫療法薬、抗癌剤 (抗新生物剤を含む)、抗脂質異常症剤、抗認知症剤、栄養補給剤、ハーブ製品又はビタミン。

20

【 0 0 5 1 】

或る特定の実施形態では、脂質アンカーポリヌクレオチド、脂質アンカー糖、又は脂質アンカーポリペプチドは、例えばポリヌクレオチドが標的遺伝子の発現を阻害することが可能な二本鎖 R N A である場合に、含まれる薬理活性物質でもある。

【 0 0 5 2 】

例えば、抗真菌剤として下記の 1 つ以上を挙げることができるが、これらに限定されない：ポリエン系抗真菌薬 (ナイスタチン、ナタマイシン、S P A - S - 8 4 3、S P A - S - 7 5 2、S P A - S - 7 5 3、又はパルトリシン A 若しくはパルトリシン B 等)、エキノカンジン (アニデュラファンギン、カスポファンギン、ミカファンギン、又はピアファンギン (b i a f u n g i n) 等)、アゾール系抗真菌薬 (フルコナゾール、ケトコナゾール、ポリコナゾール、ボサコナゾール、イサブコナゾール、ビホナゾール、ブトコナゾール、クロトリマゾール、エコナゾール、フェンチコナゾール、イソコナゾール、ルリコナゾール、ミコナゾール、オモコナゾール、オキシコナゾール、セルタコナゾール、スルコナゾール、チオコナゾール、アルバコナゾール、エフィナコナゾール、エボキシコナゾール、イトラコナゾール、プロピコナゾール、ラブコナゾール、テルコナゾール、又はアバファンギン等)、ナフトキノ (アトパコン等)、1 , 3 D グルカン合成阻害剤 (エンフマファンギン又はその誘導体 (M K - 3 1 1 8 又は S C Y - 0 7 8) 等)、1 4 - デメチラーゼ阻害剤、又はエルゴステロール産生阻害剤 (アゾール系抗真菌薬、又は V T - 1 1 6 1、V T - 1 1 2 9、V T - 1 5 9 8 のような金属酵素である真菌 C Y P 5 1 の阻害剤等)。

30

【 0 0 5 3 】

例えば、抗菌剤として下記の 1 つ以上を挙げることができるが、これらに限定されない：タンパク質合成阻害剤；3 0 S 開始阻害剤、例えばアミノグリコシド系抗生物質 (ストレプトマイシン、ジヒドロストレプトマイシン、ネオマイシン、フラミセチン、パロモマイシン、リボスタマイシン、カナマイシン、アミカシン、アルベカシン、ベカナマイシン、ジベカシン、トブラマイシン、スペクチノマイシン、ヒグロマイシン B、パロモマイシン、ゲンタマイシン、ネチルマイシン、シソマイシン、イセパマイシン、ベルダマイシン、及びアストロマイシンを含む)；3 0 S t R N A 結合抗生物質、例えばテトラサイクリン、グリシルサイクリン、又はフルオロサイクリン (ドキシサイクリン、クロルテトラサイクリン、クロモサイクリン、デメクロサイクリン、リメクロサイクリン、メクロサイクリン、メタサイクリン、ミノサイクリン、オキシテトラサイクリン、ペニメピサイクリン、

40

50

ン、ロリテトラサイクリン、テトラサイクリン、チゲサイクリン、又はエラバサイクリンを含む)；50S開始阻害剤、例えばオキサゾリジノン系抗生物質(エペレゾリド、リネゾリド、ボシゾリド、ラデゾリド、ランベゾリド、ステゾリド、及びテジゾリドを含む)；ペプチジルトランスフェラーゼ、例えばアンフェニコール又はプロイロムチリン(クロラムフェニコール、アジダムフェニコール、チアムフェニコール、フロルフエニコール、レタパムリン、チアムリン、及びバルネムリンを含む)；ペプチド転移/転位抗生物質、例えばマイクライド、ケトライド、フルオロケトライド、リンコサミド又はストレプトグラミン(アジスロマイシン、クラリスロマイシン、ジリスロマイシン、エリスロマイシン、フルリスロマイシン、ジョサマイシン、ミデカマイシン、ミオカマイシン、オレアンドマイシン、オキタマイシン(okitamicin)、ロキシスロマイシン、スピラマイシン、トロレアンドマイシン、タイロシン、テリスロマイシン、セスロマイシン、ソリスロマイシン、フィダキソマイシン、カルボマイシンA、クタサマイシン、クリンダマイシン、リンコマイシン、ピルリマイシン、プリスチナマイシン、キヌプリスチン、ダルホプリスチン、及びバージニアマイシンを含む)；伸長因子阻害剤、例えばステロイド系抗菌薬(フシジン酸を含む)；ペプチドグリカン合成/トランスペプチダーゼ阻害剤、例えばペニシリン(天然ペニシリンであるペニシリンG及びペニシリンV； - ラクタマーゼ耐性ペニシリンであるメチシリン、ナフシリン、オキサシリン、クロキサシリン及びジクロキサシリン)；アミノペニシリンであるアンピシリン、アモキシシリン、ピバンピシリン、ヘタシリン、バカンピシリン、メタンピシリン、タランピシリン及びエピシリン；カルボキシペニシリンであるカルベニシリン及びチカルシリン；ウレイドペニシリンであるメズロシリン及びピペラシリンを含む)、又はセファロスポリン(セファセトリル、セファドロキシル(cefadroxyl)、セファレキシン、セファログリシン、セファロニウム、セファロラジン(cephaloradine)、セファロチン、セファピリン、セファトリジン、セファザフルール、セファゼドン、セファゾリン、セフラジン、セフロキサジン、セフテゾール、セファクロル、セフォニシド、セフプロジル、セフロキシム、セフゾナム、セフメタゾール、セフォテタン、セフォキシチン、ロラカルベフ、セフペラゾン、セフメタゾール、セフミノックス、セフォテタン、セフォキシチン、セフォチアム、セフカペン、セフダロキシム、セフジニル、セフジトレン、セフェタメット、セフィキシム、セフメノキシム、セフォジジム、セフォタキシム、セフォベシン、セフピミゾール、セフポドキシム、セフテラム、セフタメレ(ceftamere)、セフチブテン、セフチオフル、セフチオレン、セフチゾキシム、セフトリアゾン、セフォペラゾン、セフタジジム、ラタモキセフ、セフクリジン、セフェピム、セフルプレナム、セフォセリス、セフォゾプラン、セフピロム、セフキノム、フロモキセフ、セフトピブロール、セフタロリン、セフトロザン、セファロラム、セファパロール、セフカネル、セフェドロロール、セフェムピドン、セフェトリゾール、セフィトリル、セフマチレン、セフメピジウム、セフォキサゾール、セフロチル、セフスミド、セフチオキシド、セフラセチム、及びニトロセフィンを含む)；ペネム又はカルバペネム(ファロペネム、エルタペネム、ドリペネム、イミペネム、メロペネム、ピアペネム、及びパニペネムを含む)；モノバクタム(アズトレオナム、チゲモナム、カルモナム、ノカルジシンAを含む)；糖ペプチド系抗生物質(バンコマイシン、オリタバンシン、テラバンシン、テイコプラニン、ダルババンシン、及びラモプラニンを含む)； - ラクタマーゼ阻害剤(クラブラン酸塩、スルバクタム、タゾバクタム、及びアピバクタムを含む)、他の抗生物質(ホスホマイシン、シクロセリン、バシトラシン、コリスチン、ポリミキシンB、ダブトマイシン、リゾチーム、グラミシジン、イソニアジド、又はテイクソバクチンを含む)。

【0054】

例えば、抗ウイルス剤として下記の1つ以上を挙げることができるが、これらに限定されない：DNAポリメラーゼ阻害剤(アシクロビル、ファムシクロビル、H2G、バルシクロビル、ガンシクロビル、シドホビル、又はプリンシドホビル等)；脱殻阻害剤(アマンタジン及びリマンタジン等)、ウイルス侵入阻害剤(エンフビルチド等)、免疫応答調節剤(イミキモド、レシキモド、又はラルジキモド(rardiquimod)等)、ヌクレオシド

10

20

30

40

50

逆転写酵素阻害剤（ジドブジン又はラミブジン等）、又は下記の１つ：ソホスブビル、レジパスビル、シメプレビル、オムビタスビル、パリタプレビル、リトナビル、アバカビル、ドルテグラビル、テノホビル、エムトリシタビン、エルビテグラビル、マラビロック、エファビレンツ、リルピピリン、コピシスタット、ホスアンプレナビル、ネルフィナビル、デラビルジン、インジナビル、ラルテグラビル、インターフェロン、リバビリン、ボセプレビル、エファビレンツ、エンテカビル、ダクラタビル、アタザナビル。抗ウイルス剤は、任意のＨＩＶ抗ウイルス剤であってもよい。

【 ０ ０ ５ ５ 】

例えば、駆虫剤、抗原虫剤又は抗蠕虫剤として下記の１つ以上を挙げることができるが、これらに限定されない：ベンズイミダゾール誘導体（アルベンダゾール、メベンダゾール、チアベンダゾール、フェンベンダゾール、トリクラベンダゾール、又はフルベンダゾール等）、アベルメクチン類似体又は誘導体（アベルメクチン、アバメクチン、又はイベルメクチン等）、ジエチルカルバマジン、スラミン、パモ酸ピランテル、プログアニル、レバミゾール、サリチルアニリド（ニコロサミド又はオキシクロザニド等）、プラジカンテル、オクタデプシペプチド（エモデプシド等）、ナフトキノ（アトバコン等）、アミノアセトニトリル誘導体（モネパンテル等）、スピロインドール（デルキナンデル（derququantel）等）、又は硫酸ベレチエリン。

【 ０ ０ ５ ６ 】

例えば、一実施形態において、抗炎症剤として下記の１つ以上を挙げることができるが、これらに限定されない：以下の種類の１つ以上に属するＮＳＡＩＤを含むＮＳＡＩＤ：サリチル酸塩（アスピリン〔アセチルサリチル酸〕、ジフルニサル、サルサレート又はサリチル酸及び他のサリチル酸塩等）、プロピオン酸誘導体（イブプロフェン、デキシブプロフェン、ナプロキセン、フェノプロフェン、ケトプロフェン、デクスケトプロフェン、フルルビプロフェン、オキサプロジン、又はロキソプロフェン等）、酢酸誘導体（インドメタシン、トルメチン、スリンダク、エトドラク、ケトロラック、ジクロフェナク、アセクロフェナク、又はナブメトン等）、エノール酸（-オキシカム）誘導体（ピロキシカム、メロキシカム、テノキシカム、ドロキシカム、ロルノキシカム、イソキシカム、又はフェニルブタゾン等）、アントラニル酸誘導体（例えば、メフェナム酸、メクロフェナム酸、フルフェナム酸、又はトルフェナム酸等のフェナメート）、選択的ＣＯＸ-２阻害剤（セレコキシブ、ロフェコキシブ、バルデコキシブ、パレコキシブ、ルミラコキシブ、エトリコキシブ、又はフィロコキシブ等）、スルホンアニリド（ニメスリド等）、又はその他（クロニキシン、リコフェロン又はＨ-ハルパギド等）。

【 ０ ０ ５ ７ 】

例えば、別の実施形態において、抗炎症剤として下記の１つ以上を挙げることができるが、これらに限定されない：コルチコステロイド（ヒドロコルチゾン、酢酸ヒドロコルチゾン、酢酸コルチゾン、ピバル酸チキソコルトール、プレドニゾン、メチルプレドニゾン、プレドニゾン、酢酸トリアムシノロン、トリアムシノロンアルコール、モメタゾン、アムシノニド、ブデソニド、デソニド、フルオシノニド、フルオシノロンアセトニド、ハルシノニド、ベタメタゾン、リン酸ベタメタゾンナトリウム、デキサメタゾン、リン酸デキサメタゾンナトリウム、フルオコルトロン、ヒドロコルチゾン-１７-バレレート、ハロメタゾン、アルクロメタゾンジプロピオネート、吉草酸ベタメタゾン、ベタメタゾンジプロピオネート、プレドニカルベート、クロベタゾン-１７-ブチレート、クロベタゾン-１７-プロピオネート、カブロン酸ブルオコルトロン、ピバル酸フルオコルトロン、酢酸フルプレドニデン、ヒドロコルチゾン-１７-ブチレート、ヒドロコルチゾン-１７-アセボネート、ヒドロコルチゾン-１７-ブテプレート、シクレソニド、プレドニカルベート、フルニソリド、フロ酸フルチカゾン、プロピオン酸フルチカゾン、トリアムシノロンアセトニド、ベクロメタゾンジプロピオネート、及びブデソニド等）、ＤＭＡＲＤ（メトトレキサート、アザチオプリン、シクロスポリン、ペニシラミン、オーラノフィン、金チオリンゴ酸塩、ミノサイクリン、ヒドロキシクロロキン、クロロキン、スルファサラジン、レフルノミド、テリフルノミド、メサラミン、又はシクロホスファミド等）、ア

10

20

30

40

50

セトアミノフェン、抗TNF剤（アダリムマブ、インフリキシマブ、エタネルセプト、セルトリズマブペゴル等）、マイクライドカルシニューリン阻害剤（シロリムス又はタクロリムス等）、JAK阻害剤（トファシチニブ、ルキソリチニブ、バリシチニブ（LY3009104、INCB28050）、CYT387、フィルゴチニブ（GLPG0634）、GSK2586184、レスタウルチニブ、パクリチニブ（SB1518）、TG101348、JSI-124、又はCHZ868等）、IL-6アンタゴニスト（トシリズマブ又はアトリズマブ等）、抗CD20剤（リツキシマブ、オビヌツズマブ、イブリツモマブチウキセタン、トシツモマブ、オファツムマブ、オクレリズマブ、TRU-015、又はIMMU-106〔ベルツズマブ〕等）、CD52アンタゴニスト（アレムツズマブ等）、-4インテグリンアンタゴニスト（ナタリズマブ等）、II型トポイソメラーゼ阻害剤（ミトキサントロン等）、スフィンゴシン-1-リン酸受容体調節剤（フィンゴリモド、ラキニモド、オザニモド、又はボネシモド等）、-インターフェロン、又は下記の作用物質の1つ若しくはそれらの機能的類似体：酢酸グラチラマー若しくはフマル酸ジメチル。

10

【0058】

4. 医薬組成物

本明細書に記載のコクリエートは、医薬組成物として調製することができる。本明細書に開示される医薬組成物の好適な調製形態としては、例えば錠剤、カプセル、軟カプセル、顆粒、粉末、懸濁液、エマルション、マイクロエマルション、ナノエマルション、単位投薬形態、リング、フィルム、坐剤、溶液、クリーム、シロップ、経皮パッチ、軟膏及びゲルが挙げられる。

20

【0059】

医薬組成物は他の薬学的に許容可能な賦形剤、例えば様々なpH及びイオン強度の緩衝液（例えばトリス-HCl、酢酸、リン酸）、表面への吸収を阻止するアルブミン又はゼラチン等の添加剤、プロテアーゼ阻害剤、透過促進剤、可溶化剤（例えばグリセロール、ポリエチレングリセロール）、酸化防止剤（例えばアスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム、ブチルヒドロキシアニソール）、安定剤（例えばヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース）、増粘剤（例えばカルボマー、コロイド状二酸化ケイ素、エチルセルロース、グアーガム）、甘味料（例えばアスパルテーム、クエン酸）、保存料（例えばチメロサル、ベンジルアルコール、パラベン）、流動助剤（例えばコロイド状二酸化ケイ素）、可塑剤（例えばフタル酸ジエチル、クエン酸トリエチル）、乳化剤（例えばカルボマー、ヒドロキシプロピルセルロース、ラウリル硫酸ナトリウム）、ポリマーコーティング（例えば、ポロキサマー又はポロキサミン、ヒプロメロース酢酸エステルコハク酸エステル）、コーティング及びフィルム形成剤（例えば、エチルセルロース、アクリレート、ポリメタクリレート、ヒプロメロース酢酸エステルコハク酸エステル）、アジュバント、液体配合物の薬学的に許容可能な担体、例えば水性（生理食塩水及び緩衝媒体を含む水、アルコール溶液／水溶液、エマルション又は懸濁液）又は非水性（例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、及びオレイン酸エチル等の注射用有機エステル）溶液、懸濁液、エマルション又は油、並びに塩化ナトリウム溶液、リンガーデキストロース、デキストロース及び塩化ナトリウム、乳酸加リンガー液及び固定油を含むが、これらに限定されない非経口ビヒクル（皮下注射、静脈内注射、動脈内注射又は筋肉内注射用）を含み得る。

30

40

【0060】

これらの賦形剤は例として提示され、本明細書に挙げられるものと同じ化学的特徴をもたらし得る他の又は異なる賦形剤が存在することが当業者には既知である。

【0061】

5. 投与量及び投与

本明細書に開示されるコクリエートを含む医薬組成物は、その意図する投与経路に適合するように配合される。投与を達成する方法は当業者には既知である。この方法としては、例えば静脈内、血管内、動脈内、皮下、筋肉内、腹腔内、脳室内、硬膜外（intraepidura

50

1) 等の非経口経路による注射、及び経口、経鼻、眼、直腸又は局所経路が挙げられる。

【0062】

一実施形態では、コクリエートを例えば懸濁液、錠剤、カプセル、ソフトジェル又は他の経口投薬形態を投与することによって経口投与する。他の実施形態では、コクリエート化薬剤を血流、眼、腹腔腔、筋肉又は皮下への注入又は注射によって非経口的に投与する。更に他の実施形態では、コクリエート化薬剤を例えば眼、耳への滴下、又はパッチ（層又はリザーバ）、クリーム、軟膏若しくは懸濁液等の様々な形態での皮膚、足指／手指の爪若しくは生殖器部への適用、又は肛門用坐剤により局所的に投与する。

【0063】

本明細書に記載のコクリエートによってもたらされる顕著に高められた組織透過性により、薬理活性物質の1日投与量を減少させた上で、依然として薬学的に効果的な薬理活性物質のレベルを達成することが今回可能である。

【0064】

コクリエート化薬剤の標的化送達では、血流中への吸収が顕著に制限され、同じ薬剤の非コクリエート化形態の経口投与又は更にはかかる薬剤の注射形態と比較して、投与したコクリエート化薬剤の標的化組織（典型的には炎症を起こした、感染した、外傷を受けた又は急速に増殖する／癌性の組織）への驚くほど急速な透過がもたらされる。

【0065】

幾つかの実施形態では、コクリエートによって送達される薬理活性物質（又はその代謝産物）の組織内レベルは、同じ被験体又は被験体群において決定される薬理活性物質（又はその代謝産物）の血液／血漿／血清中レベルよりも高い。実施形態では、コクリエート組成物の経口投与後の薬理活性物質の組織内レベルは、血漿中レベルの少なくとも50%、或いは少なくとも60%、或いは少なくとも70%、或いは少なくとも75%、或いは少なくとも80%、或いは少なくとも90%、或いは少なくとも100%、或いは少なくとも110%、或いは少なくとも120%、或いは少なくとも125%、或いは少なくとも130%、或いは少なくとも140%、或いは少なくとも150%、或いは少なくとも200%、或いは少なくとも500%、或いは少なくとも600%、或いは少なくとも750%、或いは少なくとも1000%である。一実施形態では、コクリエート組成物の経口投与後の薬理活性物質の組織内レベルは、薬理活性物質の血漿中レベルより2倍高い。別の実施形態では、薬理活性物質からアムホテリシンBが特に除外される。

【0066】

幾つかの実施形態では、コクリエートによって送達される薬理活性物質（又はその代謝産物）の組織内レベルは、同じ薬理活性物質（又はその代謝産物）の非コクリエート化送達による組織内レベルよりも高い。このため、幾つかの実施形態では、コクリエート化薬剤によって同じ薬剤の非コクリエート化型よりも早く医学的状態が解消される。

【0067】

非コクリエート化薬剤の伝播は主として、健常な被験体と病気の被験体とで概して同様の吸収、消散、移動、代謝及び排出プロセスの結果になることが多いが、これは概してコクリエート化薬剤については当てはまらない。結果として、コクリエート化薬剤で治療した場合の組織内レベル及びクリアランスプロセスは、健常な被験体では病気の被験体（医学的状態の被験体）と比較して異なって展開する。

【0068】

幾つかの実施形態では、医学的状態の被験体へのコクリエートによって送達される薬理活性物質（又はその代謝産物）の組織内レベルは、同じコクリエート化薬剤の投与時の健常被験体の比較組織における薬理活性物質（又はその代謝産物）のレベルよりも高い。或る特定の実施形態では、医学的状態の被験体へのコクリエートによる投与の24時間後の薬理活性物質（又はその代謝産物）の組織内レベルは、健常被験体へのコクリエートによる投与の24時間（或いは48時間又は72時間）後の薬理活性物質（又はその代謝産物）の組織内レベルと比較して少なくとも25%高い、或いは少なくとも50%高い、或いは少なくとも100%高い、或いは少なくとも150%高い、或いは少なくとも200%

10

20

30

40

50

高い、或いは少なくとも250%高い、或いは少なくとも300%高い、或いは少なくとも350%高い、或いは少なくとも400%高い、或いは少なくとも500%高い、或いは少なくとも600%高い、或いは少なくとも700%高い、或いは少なくとも800%高い、或いは少なくとも1000%高い。一実施形態では、薬理活性物質からアムホテリシンBが特に除外される。

【0069】

他の実施形態では、同じコクリエート化薬剤で治療した場合に、医学的状態の被験体（単数又は複数）における該薬剤の血液／血漿／血清中レベルは健常被験体よりも低い。更に他の実施形態では、同じコクリエート化薬剤で治療した場合に、医学的状態の被験体（単数又は複数）における該薬剤の尿中レベルは健常被験体よりも低い。

10

【0070】

このため、標的化組織（例えば、感染組織又は炎症組織）におけるコクリエート化薬剤のレベルは、健常被験体の血漿中のコクリエート化薬剤若しくは組織内のコクリエート化薬剤のレベル、又は非コクリエート化薬剤の組織内レベルと比較すると異なって高い。

【0071】

薬理活性物質の組織内レベルは、様々な形態の腎臓、肺、痰、肝臓、脳、脊椎、髄液、神経、脾臓、心臓、胸腺、リンパ節、動脈壁、脾臓、胆嚢、前立腺、卵巣、子宮、女性の乳房、睾丸、甲状腺、副腎、視床下部、脳下垂体、眼、耳、腸、膀胱、尿、筋肉、皮膚、白血球、骨、軟骨、関節組織、滑液、脂肪組織、又は腫瘍及び癌性／腫瘍性組織を含むが、これらに限定されない様々な組織、器官及び体液において決定することができる。

20

【0072】

或る特定の実施形態では、薬理活性物質（又はその代謝産物）の組織透過性及び組織内レベルは、或る特定の時点での組織内濃度、最大組織内濃度（ C_{max} ）及び／又は規定の時間にわたる累積組織内濃度（AUC）に基づいて決定される。或る特定の実施形態では、異なってより高い組織内レベルが投与後1日目に観察され、投与したコクリエート化薬剤の標的化組織への急速な透過が実証される。他の実施形態では、これらのより高い組織内レベルが投与後2日以内、或いは3日以内、或いは投与後5日以内、或いは投与後7日以内、或いは投与後10日以内、或いは投与後15日以内、或いは投与後30日以内に観察される。更に他の実施形態では、より高い組織内レベルが1日目、或いは2日目、3日目、4日目、5日目、6日目、7日目、8日目、9日目、10日目、11日目、12日目、14日目、15日目、20日目、25日目又は30日目に観察される。一実施形態では、薬理活性物質からアムホテリシンBが特に除外される。

30

【0073】

コクリエート化薬剤は治療周期の早い段階でより急速に標的組織を透過し、薬理学的介入の初期段階においてより高い組織内レベル、結果として治療される医学的状態の早期の回復をもたらすが、組織内レベルは非コクリエート化薬剤を用いた比較治療よりも早く低下する。幾つかの実施形態では、コクリエート化薬剤を用いた治療の後期段階におけるより低い組織内レベルは、感受性器官及び組織のより低い毒性及びより良好な機能性をもたらす、それにより治療される被験体の生存見込み及び健康を改善する。

【0074】

幾つかの実施形態では、医学的状態の回復の始まりと関連するこのように低い組織内レベルは、該薬剤の非コクリエート化型を用いた治療と比較して、コクリエート化薬剤を用いた治療の開始後3日以内に明らかとなる。代替的には、他の実施形態では、医学的状態の回復の始まりと関連するこのように低い組織内レベルは、該薬剤の非コクリエート化型を用いた治療と比較して、コクリエート化薬剤を用いた治療の開始後5日以内、或いは7日以内、或いは10日以内、或いは15日以内、或いは20日以内、或いは30日以内、或いは50日以内に明らかとなる。一実施形態では、薬理活性物質からアムホテリシンBが特に除外される。

40

【0075】

6. 治療の方法

50

本明細書に記載のコクリエートは、薬理活性物質で治療することができる障害のリスクがある（又は障害に罹りやすい）又は障害を有する被験体を治療する方法に使用することができる。薬学活性物質から利益を得る任意の治療適応症（therapeutic indication：治療指標）を、本明細書に記載のコクリエートを用いて治療することができる。治療適応症としては、細菌、真菌、ウイルス若しくは寄生虫の感染、自己免疫状態若しくは他の病態と関連する炎症、外傷の回復、又は癌及び腫瘍性病態の寛解が挙げられるが、これらに限定されない。

【0076】

或る特定の実施形態では、本方法は薬理活性物質とサイズ減少剤とを含むコクリエートを被験体に投与することを含む。本発明のコクリエート及びコクリエート組成物は経口的、経鼻的、局所的、静脈内、経皮的、口腔内、舌下、直腸内、経腔的又は非経口的に投与することができる。好ましい実施形態では、コクリエートを経口投与する。被験体はヒト、又はイヌ、ネコ及び家畜等の非ヒト動物である。好ましい実施形態では、被験体はヒトである。

【実施例】

【0077】

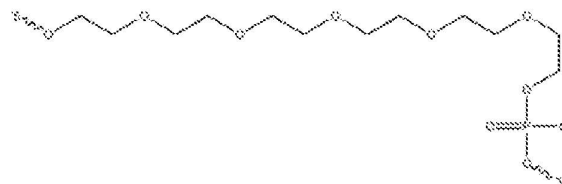
上記に提示した例は単に例示を目的とするものである。当業者は、本明細書に記載の好適な固体分散体形態を生成するために適切な方法及び装置を容易に決定することが可能である。

【0078】

実施例1：脂質アンカーポリヌクレオチドを含むコクリエートの粒子サイズの調整

siRNAを脂質アンカーに共有結合した。siRNAは、各3'末端に2つのヌクレオチドオーバーハングを有する21ヌクレオチドの二本鎖RNA分子とした。siRNAは高感度緑色蛍光タンパク質（EGFP）に特異的である。センス鎖は配列ACCCUGAAGUUC AUCUGCAC C（配列番号1）を有し、アンチセンス鎖は配列ACUGGGACUUC AAGUAGACGU（配列番号2）を有する。siRNAを、S18を含む若しくは含まないパルミチン酸塩、S18を含む若しくは含まないコレステロール、S18を含む若しくは含まないビタミンE（ラセミ体）、又はS18を含む若しくは含まないビタミンEL（ビタミンEのL-異性体）を含む様々な脂質アンカーに共有結合した。S18は、以下の式を有する原子数18のヘキサ-エチレングリコールスペーサーである：

【化1】



【0079】

脂質アンカー-siRNAは、蛍光Cy3染料を含むものでもあった。水溶液中の脂質アンカー-siRNAをリポソームの懸濁液に添加し、続いてカルシウムをsiRNA-リポソーム複合体に添加して、コクリエートを形成した。リポソームは、DOPS（ジオレイルホスファチジルセリン、純度99.9%）又はDOPS+10%（wt：wt）コレステロールから構成されるものであった。位相差及び蛍光顕微鏡検査を用いてリポソーム、コクリエート及び「開放コクリエート」（EDTA添加後）段階でのsiRNA-コクリエート配合物の形態を評価した。

【0080】

コクリエートの粒子サイズを、光子相関分光法サブミクロン粒子サイズ分析装置を用いて測定した。サンプルを角度90度、22℃、ランタイム200秒間で分析装置にかけた。希釈剤は4mMカルシウムを含有する水溶液とした。

【0081】

素コクリエートは、それらの疎水性表面のために水溶液中で凝集する。このため、s i R N Aを含有しない対照コクリエートは、カルシウムの添加後に大きなコクリエート凝集体を形成した（データは示さない）。脂質アンカーポリヌクレオチドを含有しない対照コクリエートの平均粒子サイズは約85 μm ~ 115 μmであった。種々の脂質アンカーポリヌクレオチドを用いて形成したコクリエートの平均粒子サイズは、下記表に記載のように対照コクリエートのおよそ100分の1 ~ 200分の1であった。

【0082】

【表1】

脂質アンカーポリヌクレオチド	平均サイズ (nm)	平均SD (nm)
E G F P - V E L	714.8	465.6
E G F P - V E L + C H	759.8	331.3
E G F P - V E L + S 1 8	449.7	327.6
E G F P - V E L + S 1 8 + C H	443.9	336.0
E G F P - V E	496.0	335.9
E G F P - V E + C H	667.7	389.2
E G F P - V E + S 1 8	399.9	284.7
E G F P - V E + S 1 8 + C H	1453.1	1077.1
P M A 1 - 1 I + C H	3000.0	173.0
E G F P - 1 P a l + C H	758.3	216.6

【0083】

C Hは、脂質二重層にコレステロールを用いてコクリエートを作製したことを表す。

【0084】

実施例2：デオキシコール酸塩を用いて作製されるアムホテリシンBコクリエートの粒子サイズの低減

アムホテリシンBを含有するコクリエート（C A m B）及び種々の量のデオキシコール酸塩を調製した。最終生成物中に0.45 mg/mlのデオキシコール酸塩を含有するC A m Bを調製するために、0.5 mlの50 mM N a O H溶液中の20 mgのアムホテリシンBを、10 mlの50 mMリン酸緩衝液中の100 mgの50%ダイズホスファチジルセリンリポソーム（ダイズP Sリポソームを5 μm、0.8 μm及び0.45 μmのフィルターに通して濾過した）と合わせて、アムホテリシンBを含有するリポソームを形成した。1.2 μlのアルコール中の120 μgのビタミンEを、A m Bリポソームに添加した。次いで、アムホテリシンBコクリエート結晶の粒子サイズを小さくするために、83 μlの滅菌水中の5.0 mgのデオキシコール酸塩をアムホテリシンBリポソームの混合物に添加した。次いで、得られた混合物に0.378 mlの1 M塩化カルシウム溶液を激しく混合しながら添加して、アムホテリシンBコクリエートを形成した。コクリエート中の脂質とアムホテリシンBとの比率は5 : 1であり、最終生成物中に0.45 mg/mlのデオキシコール酸塩を含有していた。

【0085】

最終生成物中に0.9 mg/mlのデオキシコール酸塩を含有するC A m Bを調製するために、0.5 mlの50 mM N a O H溶液中の20 mgのアムホテリシンBを、10 mlの50 mMリン酸緩衝液中の100 mgの50%ダイズP Sリポソーム（ダイズP Sリポソームを5 μm、0.8 μm及び0.45 μmのフィルターに通して濾過した）と合わせ、アムホテリシンBを含有するリポソームを形成した。1.2 μlのアルコール中の120 μgのビタミンEをA m Bリポソームに添加した。次いで、アムホテリシンBコクリエート結晶の粒子サイズを小さくするために、167 μlの滅菌水中の10 mgのデオキシコール酸塩をアムホテリシンBリポソームの混合物に添加した。次いで、得られた混合物に0.378 mlの1 M塩化カルシウム溶液を激しく混合しながら添加して、アムホテリシンBコクリエートを形成した。コクリエート中の脂質とアムホテリシンBとの比率は5 : 1であり、最終生成物中に0.9 mg/mlのデオキシコール酸塩を含有していた

。

【0086】

最終生成物中に1.79mg/mlのデオキシコール酸塩を含有するC A m Bを調製するために、0.5mlの50mM NaOH溶液中の20mgのアムホテリシンBを、10mlの50mMリン酸緩衝液中の100mgの50%ダイズPSリポソーム（ダイズPSリポソームを5μm、0.8μm及び0.45μmのフィルターに通して濾過した）と合わせ、アムホテリシンBを含有するリポソームを形成した。1.2μlのアルコール中の120μgのビタミンEをA m Bリポソームに添加した。次いで、アムホテリシンBコクリエート結晶の粒子サイズを小さくするために、0.33mlの滅菌水中の20mgのデオキシコール酸塩をアムホテリシンBリポソームの混合物に添加した。次いで、得られた混合物に0.378mlの1M塩化カルシウム溶液を激しく混合しながら添加して、アムホテリシンBコクリエートを形成した。コクリエート中の脂質とアムホテリシンBとの比率は5：1であり、最終生成物中に1.79mg/mlのデオキシコール酸塩を含有していた。

10

【0087】

最終生成物中に2.5mg/mlのデオキシコール酸塩を含有するC A m Bを調製するために、0.5mlの50mM NaOH溶液中の20mgのアムホテリシンBを、10mlの50mMリン酸緩衝液中の100mgの50%ダイズPSリポソーム（ダイズPSリポソームを5μm、0.8μm及び0.45μmのフィルターに通して濾過した）と合わせ、アムホテリシンBを含有するリポソームを形成した。1.2μlのアルコール中の120μgのビタミンEをA m Bリポソームに添加した。次いで、アムホテリシンBコクリエート結晶の粒子サイズを小さくするために、0.5mlの滅菌水中の30mgのデオキシコール酸塩をアムホテリシンBリポソームの混合物に添加した。次いで、得られた混合物に0.378mlの1M塩化カルシウム溶液を激しく混合しながら添加して、アムホテリシンBコクリエートを形成した。コクリエート中の脂質とアムホテリシンBとの比率は5：1であり、最終生成物中に2.5mg/mlのデオキシコール酸塩を含有していた。

20

【0088】

最終生成物中に3.4mg/mlのデオキシコール酸塩を含有するC A m Bを調製するために、0.5mlの50mM NaOH溶液中の20mgのアムホテリシンBを、10mlの50mMリン酸緩衝液中の100mgの50%ダイズPSリポソーム（ダイズPSリポソームを5μm、0.8μm及び0.45μmのフィルターに通して濾過した）と合わせ、アムホテリシンBを含有するリポソームを形成した。1.2μlのアルコール中の120μgのビタミンEをA m Bリポソームに添加した。次いで、アムホテリシンBコクリエート結晶の粒子サイズを小さくするために、0.67mlの滅菌水中の40mgのデオキシコール酸塩をアムホテリシンBリポソームの混合物に添加した。次いで、得られた混合物に0.378mlの1M塩化カルシウム溶液を激しく混合しながら添加して、アムホテリシンBコクリエートを形成した。コクリエート中の脂質とアムホテリシンBとの比率は5：1であり、最終生成物中に3.4mg/mlのデオキシコール酸塩を含有していた。

30

40

【0089】

最終生成物中に4.3mg/mlのデオキシコール酸塩を含有するC A m Bを調製するために、0.5mlの50mM NaOH溶液中の20mgのアムホテリシンBを、10mlの50mMリン酸緩衝液中の100mgの50%ダイズPSリポソーム（ダイズPSリポソームを5μm、0.8μm及び0.45μmのフィルターに通して濾過した）と合わせ、アムホテリシンBを含有するリポソームを形成した。1.2μlのアルコール中の120μgのビタミンEをA m Bリポソームに添加した。次いで、アムホテリシンBコクリエート結晶の粒子サイズを小さくするために、0.83mlの滅菌水中の50mgのデオキシコール酸塩をアムホテリシンBリポソームの混合物に添加した。次いで、得られた混合物に0.378mlの1M塩化カルシウム溶液を激しく混合しながら添加して、アム

50

ホテリシン B コクリエートを形成した。コクリエート中の脂質とアムホテリシン B との比率は 5 : 1 であり、最終生成物中に 4 . 3 m g / m l のデオキシコール酸塩を含有していた。

【 0 0 9 0 】

最終生成物中に 5 m g / m l のデオキシコール酸塩を含有する C A m B を調製するために、0 . 5 m l の 5 0 m M N a O H 溶液中の 2 0 m g のアムホテリシン B を、1 0 m l の 5 0 m M リン酸緩衝液中の 1 0 0 m g の 5 0 % ダイズ P S リボソーム (ダイズ P S リボソームを 5 μ m 、0 . 8 μ m 及び 0 . 4 5 μ m のフィルターに通して濾過した) と合わせ、アムホテリシン B を含有するリボソームを形成した。1 . 2 μ l のアルコール中の 1 2 0 μ g のビタミン E を A m B リボソームに添加した。次いで、アムホテリシン B コクリエート結晶の粒子サイズを小さくするために、1 . 0 m l の滅菌水中の 6 0 m g のデオキシコール酸塩をアムホテリシン B リボソームの混合物に添加した。次いで、得られた混合物に 0 . 3 7 8 m l の 1 M 塩化カルシウム溶液を激しく混合しながら添加して、アムホテリシン B コクリエートを形成した。コクリエート中の脂質とアムホテリシン B との比率は 5 : 1 であり、最終生成物中に 5 m g / m l のデオキシコール酸塩を含有していた。

【 0 0 9 1 】

最終生成物中にデオキシコール酸塩を含有しない C A m B を調製するために、0 . 5 m l の 5 0 m M N a O H 溶液中の 2 0 m g のアムホテリシン B を、1 0 m l の 5 0 m M リン酸緩衝液中の 1 0 0 m g の 5 0 % ダイズ P S リボソーム (ダイズ P S リボソームを 5 μ m 、0 . 8 μ m 及び 0 . 4 5 μ m のフィルターに通して濾過した) と合わせ、アムホテリシン B を含有するリボソームを形成した。1 . 2 μ l のアルコール中の 1 2 0 μ g のビタミン E を A m B リボソームに添加した。次いで、得られた混合物に 0 . 3 7 8 m l の 1 M 塩化カルシウム溶液を激しく混合しながら添加して、アムホテリシン B コクリエートを形成した。コクリエート中の脂質とアムホテリシン B との比率は 5 : 1 であった。

【 0 0 9 2 】

コクリエートの粒子サイズを、サブミクロン粒子サイズ分析装置を用いて測定した。驚くべきことに、アムホテリシン B を含むコクリエートの作製にデオキシコール酸塩を使用した場合、粒子サイズを、デオキシコール酸塩を用いずに作製したアムホテリシン B コクリエートの約 2 分の 1 ~ 3 分の 1 である 8 . 7 μ m (平均) 又は 7 . 8 μ m (中央) まで低減することが可能であった。これは、デオキシコール酸塩を用いて作製したアミカシンコクリエートの粒子サイズの 1 0 分の 1 未満でもある (実施例 3 を参照されたい) 。

【 0 0 9 3 】

【表 2】

コクリエート配合物	サイズ 1 0 % 未 満	2 5 %	5 0 %	7 5 %	9 0 %	平均	中央
デオキシコール酸塩を用いない C a m B	7 . 5 μ m	1 2 . 5 μ m	1 9 . 2 μ m	2 6 . 3 μ m	3 2 . 7 μ m	1 9 . 2 μ m	1 9 . 7 μ m
0 . 4 5 m g / m l のデオキシ コール酸塩を用いた C a m B	4 . 9 μ m	7 . 2 μ m	1 0 . 9 μ m	1 5 . 7 μ m	2 2 μ m	1 3 μ m	1 0 . 9 μ m
0 . 9 m g / m l のデオキシコ ール酸塩を用いた C a m B	4 . 3 μ m	6 . 4 μ m	9 . 8 μ m	1 5 μ m	2 7 . 8 μ m	1 2 . 8 μ m	9 . 8 μ m
1 . 8 m g / m l のデオキシコ ール酸塩を用いた C a m B	2 . 7 μ m	4 . 8 μ m	7 . 8 μ m	1 1 . 7 μ m	1 5 . 9 μ m	8 . 8 μ m	7 . 8 μ m
2 . 5 m g / m l のデオキシコ ール酸塩を用いた C a m B	2 . 5 μ m	4 . 8 μ m	8 . 1 μ m	1 2 . 2 μ m	1 5 . 8 μ m	8 . 7 μ m	8 . 1 μ m
3 . 4 m g / m l のデオキシコ ール酸塩を用いた C a m B	2 . 7 μ m	5 . 3 μ m	8 . 8 μ m	1 3 . 2 μ m	1 8 μ m	9 . 8 μ m	8 . 8 μ m
4 . 5 m g / m l のデオキシコ ール酸塩を用いた C a m B	3 . 3 μ m	5 . 4 μ m	8 . 4 μ m	1 1 . 9 μ m	1 5 . 2 μ m	8 . 8 μ m	8 . 4 μ m
5 m g / m l のデオキシコ ール酸塩を用いた C a m B	4 . 4 μ m	7 . 2 μ m	1 0 . 2 μ m	1 3 . 3 μ m	1 6 . 3 μ m	1 0 . 3 μ m	1 0 . 2 μ m

【 0 0 9 4 】

実施例 3：デオキシコール酸塩を用いて作製したアミカシンコクリエートの粒子サイズ分析

アミカシンコクリエートを調製するために、0.2 ml の滅菌水中の 2 mg のアミカシンを 0.22 μ m フィルターに通して濾過し、2.0 ml の滅菌水中の 20 mg の 50 % ダイズ P S リポソーム（ダイズ P S リポソーム懸濁液を初めに 5 μ m、0.8 μ m 及び 0.45 μ m のフィルターに通して濾過した）と合わせ、アミカシンを含有するリポソームを形成した。デオキシコール酸塩を、下記表に示すようにコクリエートを作製するプロセス中の種々の時点：アミカシンの添加前、カルシウムの添加前、カルシウムの添加後又は各工程で添加した。次いで、得られた混合物に 0.159 ml の 0.1 M 塩化カルシウムを激しく混合しながら添加して、アミカシンコクリエートを形成した。アミカシンを含有しない対照コクリエート（ブラシーボ）も調製し、デオキシコール酸塩をカルシウムの前に添加した。アミカシンを含み、デオキシコール酸塩を含まない、又はアミカシン及びデオキシコール酸塩を含まない他の対照コクリエートを調製した。コクリエートの粒子サイズを、サブミクロン粒子サイズ分析装置を用いて測定した。

10

【 0 0 9 5 】

【表 3】

サンプルの情報	サイズ 10%未満	25%	50%	75%	90%	平均	中央
C A m K-デオキシコール酸塩 を A m k の前に添加する	43.8 μm	64 μm	85.6 μm	110 μm	134.8 μm	87 μm	85.6 μm
C A m K-デオキシコール酸塩 を C a ++ の前に添加する	45.2 μm	90.1 μm	121.7 μm	152 μm	178.3 μm	117.7 μm	121.7 μm
C A m K-デオキシコール酸塩 を C a ++ の後に添加する	43.2 μm	65 μm	85.8 μm	107.4 μm	127.5 μm	84.9 μm	85.8 μm
C A m K-デオキシコール酸塩 を各工程で添加する	46.5 μm	70 μm	91.1 μm	113.8 μm	135.6 μm	90.5 μm	91.1 μm
ブラシーボーデオキシコール酸 塩を C a ++ の前に添加する	16.2 μm	69.6 μm	110.9 μm	156.9 μm	198.2 μm	110.6 μm	110.9 μm
4 : 1 C A m K-1 m l 当 たり 10 m g の P S 最終 p H 5 . 0 (デオキシコール酸塩を含 まない)	27 μm	53.2 μm	75.7 μm	98.9 μm	121.3 μm	75.5 μm	75.7 μm
4 : 1 C A m K-1 m l 当 たり 10 m g の P S 最終 p H 7 . 0 (デオキシコール酸塩を含 まない)	17.5 μm	35.2 μm	51.3 μm	71.3 μm	95.1 μm	54.7 μm	51.3 μm
4 : 1 C A m K-1 m l 当 たり 20 m g の P S 最終 p H 5 . 0 (デオキシコール酸塩を含 まない)	24.1 μm	49 μm	77.2 μm	111.8 μm	145.9 μm	82 μm	77.2 μm
4 : 1 C A m K-1 m l 当 たり 20 m g の P S 最終 p H 7 . 0 (デオキシコール酸塩を含 まない)	33.1 μm	52.1 μm	72.2 μm	95.5 μm	118.9 μm	73.8 μm	72.2 μm
10 : 1 C A m K-1 m l 当 たり 10 m g の P S 最終 p H 5 . 0 (デオキシコール酸塩を 含まない)	16.7 μm	40.1 μm	61.8 μm	84.5 μm	106.5 μm	62.7 μm	61.8 μm
10 : 1 C A m K-1 m l 当 たり 10 m g の P S 最終 p H 7 . 0 (デオキシコール酸塩を 含まない)	13.6 μm	37.1 μm	64.6 μm	90.6 μm	115.1 μm	65.2 μm	64.6 μm
ブラシーボー 1 m l 当 たり 10 m g の P S 最終 p H 5 . 0 (デオキシコール酸塩を 含まない)	13.4 μm	30.5 μm	94.4 μm	197.4 μm	278.3 μm	122.9 μm	94.4 μm
ブラシーボー 1 m l 当 たり 20 m g の P S 最終 p H 5 . 0 (デオキシコール酸塩を 含まない)	15.3 μm	57.2 μm	119.6 μm	173.1 μm	221.7 μm	119.7 μm	119.6 μm

【0096】

アミカシンコクリエートは、脂質とアミカシンとの比率及び最終 pH に応じて、デオキシコール酸塩の添加なしに平均約 50 μm ~ 80 μm のサイズの大きな凝集体を形成する。驚くべきことに、大きなアミカシンコクリエートへのデオキシコール酸塩の添加によってそれらのサイズは低減せず、実際にそれらのサイズはデオキシコール酸塩を添加した時点に応じて平均約 85 μm ~ 117 μm まで増大した。上述のように、デオキシコール酸塩を用いて作製したアムホテリシン B コクリエートの粒子サイズは、デオキシコール酸塩を用いて作製したアミカシンコクリエートの粒子サイズの少なくとも約 10 分の 1 であった。

【0097】

実施例 4 : 全身性カンジダ症のマウスにおけるコクリエート化アムホテリシン B (C A m

10

20

30

40

50

B) の経口投薬後の薬物動態 (PK) 及び生体内分布 (BD)

アムホテリシン B デオキシコール酸塩 (DAmB) は、その広範な活性及び限られた耐性のために抗真菌薬治療において「黄金律」とみなされている。しかしながら、DAmB 及びその誘導体の使用は大きな毒性及び静脈内投与により制限されている。CAmB は、関連毒性のない感染組織へのアムホテリシン B (AmB) の標的化経口送達のために設計された脂質結晶ナノ粒子配合物である。

【0098】

65匹のBALB/cマウスに、0日目に 5×10^5 細胞のカンジダ・アルビカンスを感染させた。感染の24時間後に、マウスを対照、DAmB 2mg/kg (腹腔内) 又はCAmB 10mg/kg (経口) で最大14日間治療した。未治療及び非感染のマウス群をブランク対照として使用した。各治療群から5匹のマウスを1日目、3日目、5日目、7日目、11日目及び15日目に屠殺した。血漿及び組織をAmB濃度の分析のために採取した。

【0099】

血漿中のAmBの濃度は、CAmBサンプルの61%及びDAmBサンプルの44%で検出不可能であり、群間で血漿中レベルに有意差は見られなかった。しかしながら、組織 (肝臓、肺、腎臓) 内では定量可能なAmBレベルが全サンプルで見られ (図4～図6)、CAmBは24時間以内に $0.25 \mu\text{g/ml}$ の最小発育阻止濃度 (MIC) に達したが、DAmBはMICに達するまでに3日～5日を要する。有効用量では、CAmBの組織内レベルはMICの2倍～3倍に留まり、DAmBは治療の2週目に組織内レベルをMICの4倍～40倍に増大させる。

【0100】

カンジダ感染マウスでは、経口投与したCAmBは急速に胃腸管から取り込まれ、24時間より前にMICレベルを上回る組織内濃度をもたらす。それに反して、腹腔内投与した標準治療DAmBはMICに達するまでに約72時間を要する。さらに、DAmBの腹腔内投与後のAmBの組織内濃度は、投与の2週間後であってもMICをはるかに上回るレベルまで上昇し続け、毒性の懸念が高まる。対照的に、経口CAmBは、治療の最初の数日間で組織内に急速に蓄積した後、治療の2週目には高レベルまで段階的に上昇することなく横ばいになり、望ましくない副作用及び毒性が軽減する。

【0101】

カンジダ感染マウスを、より低用量 (0.5 mg/kg) のコクリエート化アムホテリシンBでも経口治療し、DAmBを 1 mg/kg 及び 2 mg/kg で腹腔内投与した感染マウスと比較した。顕著に低い用量のコクリエート化アムホテリシンBは、 1 mg/kg 及び 2 mg/kg のDAmBと比較して有効性の改善を示した (研究期間中に100%の生存率)。

【0102】

実施例5：健常動物と感染動物との組織内レベルの比較

健常なSprague-Dawleyラット及びイヌにおけるアムホテリシンBコクリエートの毒性研究を、 15 mg/kg を含む様々な用量で28日間行った。28日目にこれらのラット及びイヌの組織内レベル (肺、腎臓、肝臓)、血漿中レベル及び尿中レベルを決定し、実施例4において14日間アムホテリシンBコクリエートで治療したマウスと比較した。

【0103】

感染マウスの肺、肝臓及び腎臓におけるアムホテリシンBのレベルは、健常なラット及びイヌのこれらの同じ組織におけるアムホテリシンBレベル (全てカンジダ・アルビカンズ (C. albicans) のMICレベルをはるかに下回る) より少なくとも5倍～10倍高かった (カンジダ・アルビカンズ感染の治療に必要なMICレベルを上回る) (図8)。対照的に、感染マウスにおけるアムホテリシンBの尿中レベル及び血漿中レベルは検出レベル未満 (BLD) であったが、健常なラット及びイヌにおける血漿中レベル、及び特に尿中レベルは測定可能であり、はるかに高かった (図8)。このため、感染被験体における

アムホテリシン B 等のコクリエート化薬物の薬物動態は、健常被験体におけるアムホテリシン B 等のコクリエート化薬物の薬物動態とは全く異なっており、コクリエート化薬物は感染組織においてはるかに高いレベルで濃縮されていたが、健常動物ではそうではなかった。

【0104】

実施例 6：ニューモシスチスのネズミモデルにおけるコクリエート化アトバコン（eATQ）の薬物動態及び有効性

アトバコン（ATQ）は、ニューモシスチス肺炎（PCP）及びトキソプラズマ症の予防及び治療のための代替薬である。小分子アトバコンは低い患者忍容性、可飽和吸収及び非線形薬物動態という臨床的な制限を受ける。ATQコクリエートを調製し、ニューモシスチス・ムリナを感染させた免疫不全マウスにおけるコクリエート化ATQの生体内分布、薬物動態（PK）及び有効性を研究した。

10

【0105】

マウスをデキサメサゾンにより免疫不全状態にし、ニューモシスチス・ムリナを感染させた。PK研究では、マウスを100mg/kgのeATQで強制経口投与により治療し、続いて屠殺し、血液及び肺組織を投薬の0時間後（ベースライン）、2時間後、4時間後、8時間後、10時間後、12時間後、24時間後、48時間後、72時間後及び96時間に採取した（n=30、各時点で3匹）。治療研究では、マウスを各々以下のうち1つを用いて強制経口投与により7日間、14日間及び21日間にわたって毎日治療した：eATQ 50mg/kg、eATQ 100mg/kg、アトバコン懸濁液 100mg/kg、スルファメトキサゾール/トリメトプリム 3/100mg/kg、又はビヒクル対照（n=138、1群当たり8匹～10匹）。マウスを屠殺し、肺をニューモシスチスの子嚢及び核の顕微鏡計数のために処理した。

20

【0106】

最大濃度（Cmax）及び曲線下面積（AUC）の幾何平均は、血漿中よりも肺においてそれぞれ18%及び44%高かった（図9）。半減期は血漿中で10時間～12時間、肺では15時間～17時間であり、Tmaxはどちらも12時間であった（図9）。100mg/kg及び50mg/kg用量のどちらについても、3つ全ての時点でビヒクル対照（C/S）に対して、50mg/kg群のC/Sに対する7日目の核数を除く核数及び子嚢数の両方で顕著な低減が見られた（図10A～図10F）。全時点で2つの用量間に一貫した用量応答が見られた（図10A～図10F）。全治療群が、14日目及び21日目の時点でビヒクル対照（C/S）に対して生存の顕著な改善を示した（図11A～図11C）。研究の過程で明白な毒性は観察されなかった。

30

【0107】

コクリエート化ATQによりマウスにおけるPCPが首尾よく治療され、PCPの治療について市販のアトバコン配合物よりも顕著に良好に働くことが示された。

【0108】

本発明を、特に、その好ましい実施形態に関連して示し、記載したが、添付の特許請求の範囲により包含される本発明の範囲を逸脱することなく、形態及び詳細における様々な変更を、本発明内でなすことができることが当業者に理解されるであろう。

40

【図 1】

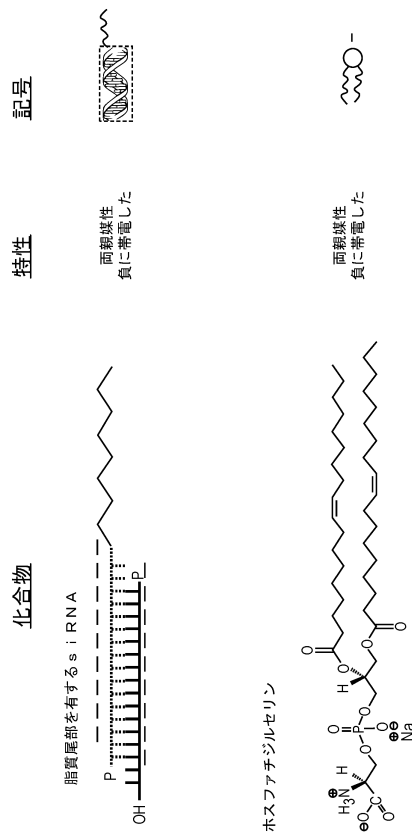


FIG. 1

【図 2】

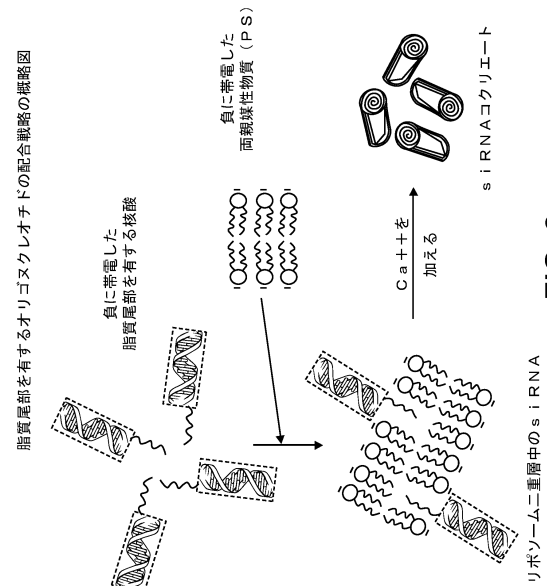


FIG. 2

【図 3】

EGFP Pal+S
 ACCCUGAAGUUCaucugcacc-Cy3-S18-パルミチン酸塩
 ACUGGGACUUCaAGUAGACGU

EGFP Pal
 ACCCUGAAGUUCaucugcacc-Cy3-パルミチン酸塩
 ACUGGGACUUCaAGUAGACGU

EGFP Chol+S
 ACCCUGAAGUUCaucugcacc-Cy3-S18-コレステロール
 ACUGGGACUUCaAGUAGACGU

EGFP Chol
 ACCCUGAAGUUCaucugcacc-Cy3-コレステロール
 ACUGGGACUUCaAGUAGACGU

EGFP VE+S
 VitE-S18-Cy3-ACCCUGAAGUUCaucugcacc
 ACUGGGACUUCaAGUAGACGU

EGFP VE
 VitE-Cy3-ACCCUGAAGUUCaucugcacc
 ACUGGGACUUCaAGUAGACGU

EGFP VEL+S
 VitEL-S18-Cy3-ACCCUGAAGUUCaucugcacc
 ACUGGGACUUCaAGUAGACGU

EGFP VEL
 VitEL-Cy3-ACCCUGAAGUUCaucugcacc
 ACUGGGACUUCaAGUAGACGU

FIG. 3

【図 4】

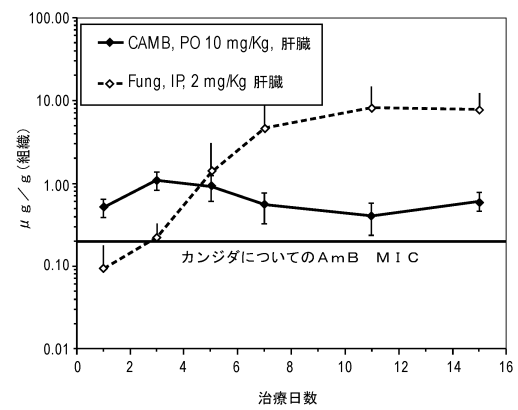


FIG. 4

【図 5】

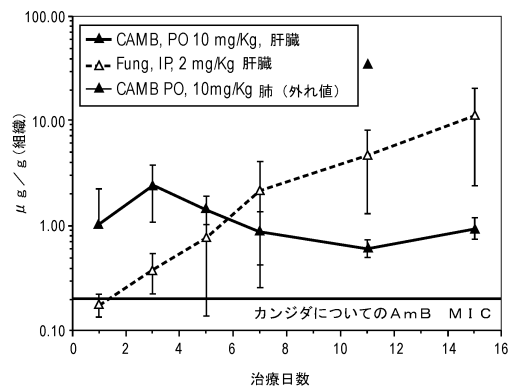


FIG. 5

【図 6】

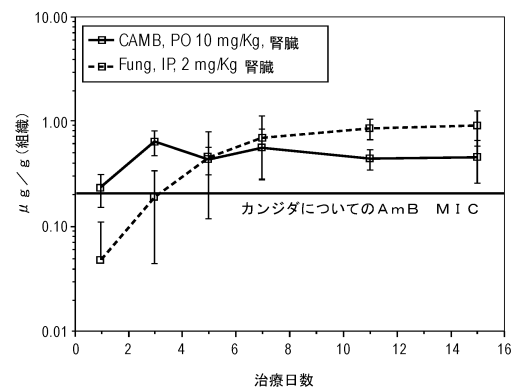


FIG. 6

【図 7】

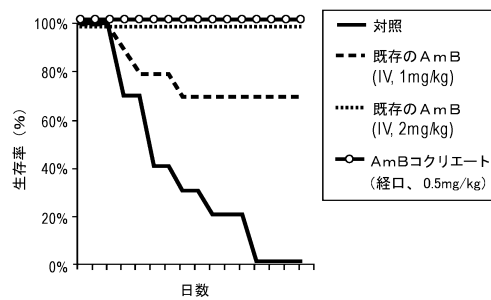


FIG. 7

【図 8】

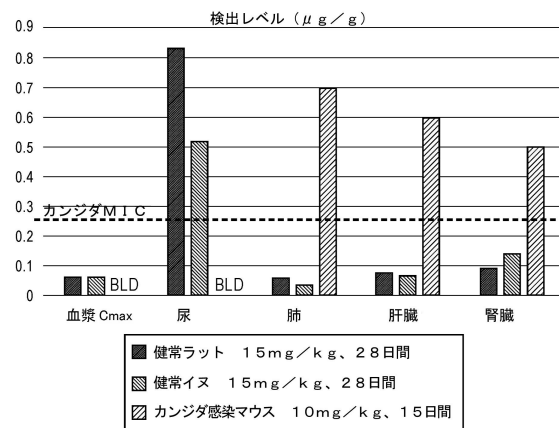
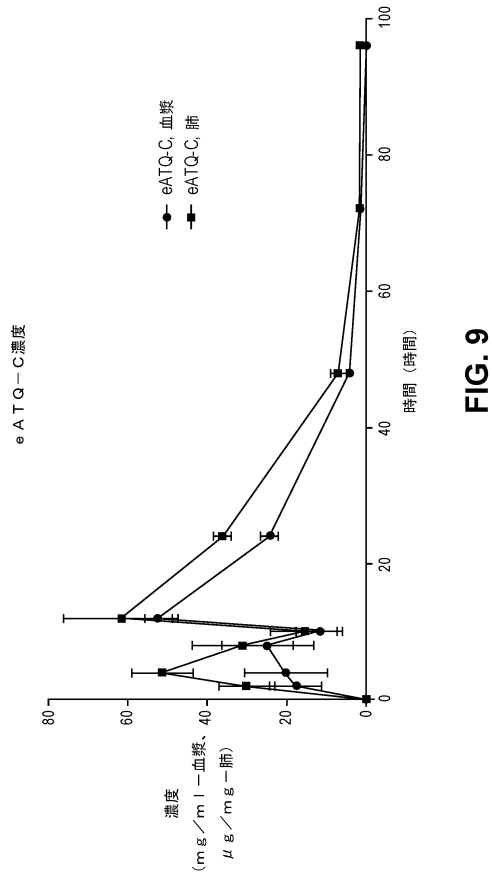
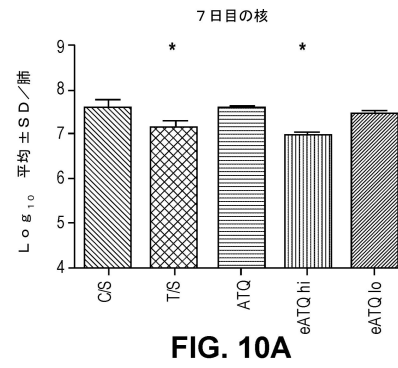


FIG. 8

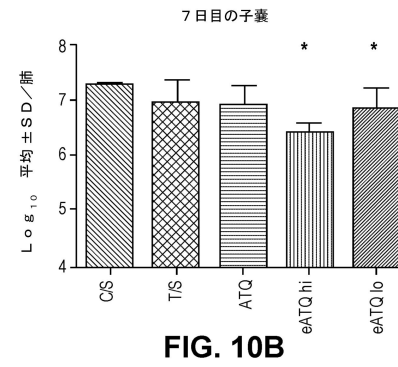
【図 9】



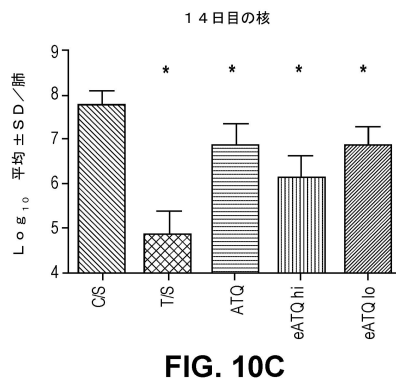
【図 10 A】



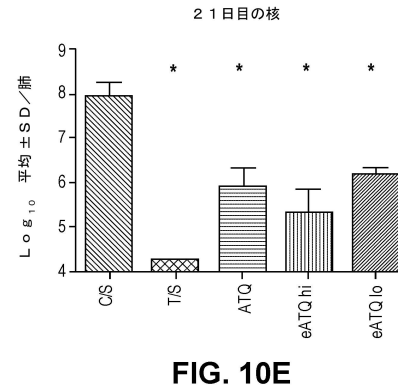
【図 10 B】



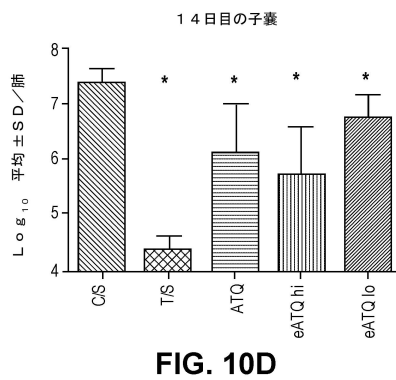
【図 10 C】



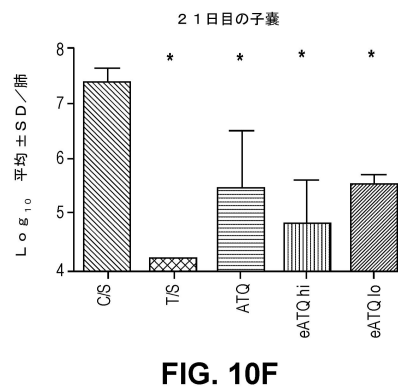
【図 10 E】



【図 10 D】



【図 10 F】



【図 1 1 A】

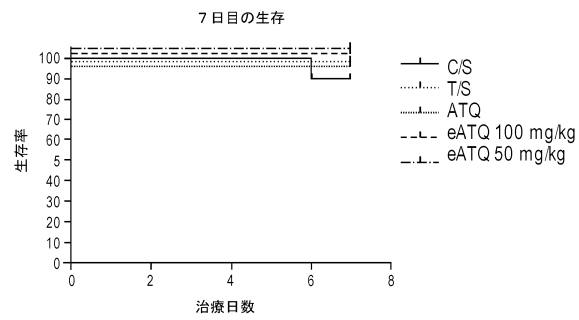


FIG. 11A

【図 1 1 C】

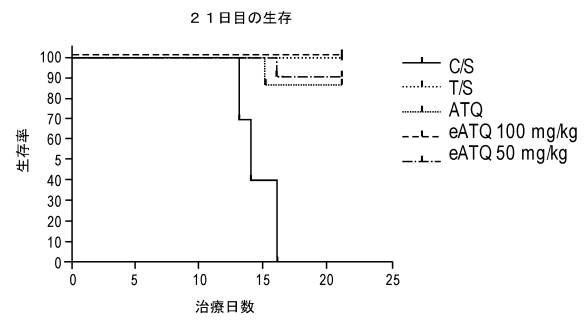


FIG. 11C

【図 1 1 B】

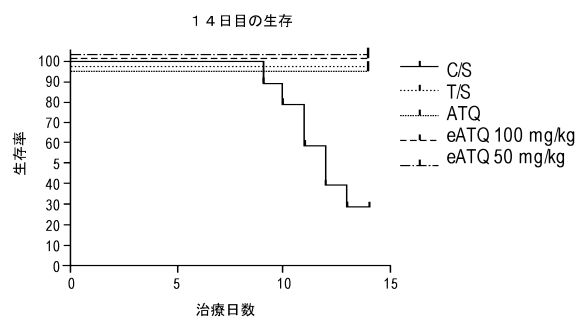


FIG. 11B

【配列表】

0006770524000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K 47/02	(2006.01)	A 6 1 K 47/02
A 6 1 K 47/34	(2017.01)	A 6 1 K 47/34

(31)優先権主張番号 62/127,799
 (32)優先日 平成27年3月3日(2015.3.3)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)

(31)優先権主張番号 62/162,425
 (32)優先日 平成27年5月15日(2015.5.15)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)

(31)優先権主張番号 62/264,164
 (32)優先日 平成27年12月7日(2015.12.7)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)

(31)優先権主張番号 62/247,641
 (32)優先日 平成27年10月28日(2015.10.28)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)

前置審査

(72)発明者 ルー ルーイン
 アメリカ合衆国 0 7 9 7 4 ニュージャージー ニュー プロビデンス ニューカム ドライブ
 4 7

審査官 菊池 美香

(56)参考文献 特表2007-532573(JP,A)
 特表2014-513135(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 4 7 / 2 4
 A 6 1 K 4 7 / 0 2
 A 6 1 K 4 7 / 0 4
 A 6 1 K 4 7 / 1 4
 A 6 1 K 4 7 / 2 8
 A 6 1 K 4 7 / 3 4
 A 6 1 K 4 8 / 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 / W P I D S (S T N)