

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-193550

(P2017-193550A)

(43) 公開日 平成29年10月26日(2017.10.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 9/127 (2006.01)	A 6 1 K 9/127	4 C 0 7 6
A 6 1 K 47/02 (2006.01)	A 6 1 K 47/02	4 C 0 8 5
A 6 1 K 47/24 (2006.01)	A 6 1 K 47/24	4 C 0 8 6
A 6 1 K 47/28 (2006.01)	A 6 1 K 47/28	
A 6 1 K 47/66 (2017.01)	A 6 1 K 47/66	

審査請求 有 請求項の数 15 O L 外国語出願 (全 65 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-93099 (P2017-93099)	(71) 出願人	506377178 ナノバイオティックス
(22) 出願日	平成29年5月9日 (2017.5.9)		NANOBIOTIX
(62) 分割の表示	特願2013-550905 (P2013-550905) の分割		フランス、エフ-75012パリ、リュ・ ドゥ・ワッティニー60番
原出願日	平成24年1月31日 (2012.1.31)	(74) 代理人	100100158 弁理士 鮫島 睦
(31) 優先権主張番号	11305096.7	(74) 代理人	100138900 弁理士 新田 昌宏
(32) 優先日	平成23年1月31日 (2011.1.31)	(74) 代理人	100176474 弁理士 秋山 信彦
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(72) 発明者	アニエス・ポティエ フランス、エフ-75006パリ、リュ・ ノートル・ダム・デ・シャン77番
(31) 優先権主張番号	61/437,817		
(32) 優先日	平成23年1月31日 (2011.1.31)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ナノ粒子デリバリーシステム、その製造および使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】人体の深部構造中で外部活性型ナノ粒子の送達および放出を可能にする、ナノ粒子の安全なin vivo送達、および制御された効率的放出を可能にする系を提供。

【解決手段】 T_m または T_m 以上で破壊される熱感受性リポソームであって、該リポソームがナノ粒子を封入する熱感受性脂質膜を含み、生理学的pH(6~8)の水性溶媒中で測定したときにナノ粒子の「表面静電気」が-20mV以下または+20mV以上にする物質でコートされており、該ナノ粒子が治療薬または診断薬として用いることができる、該リポソームを提供。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ゲル - 液晶相転移温度 (T_m) または T_m 以上で破壊される熱感受性リポソームであって、該リポソームがナノ粒子を封入する熱感受性脂質膜を含み、該ナノ粒子が治療薬または診断薬として用いることができ、

各ナノ粒子が、i) 最大寸法が約100nm未満の無機コアを含み、ii) 該ナノ粒子の表面に -20mV以下または +20mV以上の静電気が存在する原因となる物質で完全にコートされており、該静電気を、0.2~8g/Lで変動するサスペンション中のナノ粒子の濃度についてpH6~8の水性媒質中でゼータ電位測定により測定する、熱感受性リポソーム。

【請求項 2】

該熱感受性脂質膜が少なくともホスファチジルコリンを含む、請求項 1 記載の熱感受性リポソーム。

【請求項 3】

該熱感受性脂質膜がさらにコレステロールを含む請求項 2 記載の熱感受性リポソーム。

【請求項 4】

該熱感受性脂質膜が、ジパルミトイルホスファチジルコリン、水素添加ダイズホスファチジルコリン、コレステロール、およびジステアシルホスファチジルエタノールアミン - メトキシポリエチレングリコールを含む請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の熱感受性リポソーム。

【請求項 5】

該熱感受性脂質膜が、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジステアシルホスファチジルエタノールアミン - メトキシポリエチレングリコール、およびモノパルミトイルホスファチジルコリンもしくはモノステアシルホスファチジルコリンを含む、請求項 2 記載の熱感受性リポソーム。

【請求項 6】

該ナノ粒子の表面に静電気が存在する原因となる物質が、2つの基RおよびXを有する有機分子であり、Rが、アミン、ホスフェート、およびカルボキシレートから選ばれ、Xが、カルボキシレート、シラン、ホスホニック、ホスホリック、ホスフェート、およびチオールから選ばれる、先の請求項のいずれかに記載の熱感受性リポソーム。

【請求項 7】

該ナノ粒子が、さらにスクシンイミジルエステルおよびマレイミド基から選ばれるカップリング基を含む請求項 6 記載の熱感受性リポソーム。

【請求項 8】

該ナノ粒子が、さらに、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド、タンパク質、核酸、ホルモン、ビタミン、酵素、腫瘍抗原のリガンド、ホルモンレセプター、サイトカインレセプター、および成長因子レセプターから選ばれるターゲティング基を含む、先の請求項のいずれかに記載の熱感受性リポソーム。

【請求項 9】

該リポソームの最大サイズが50~500nm、好ましくは50~250nmである、先の請求項のいずれかに記載の熱感受性リポソーム。

【請求項 10】

該リポソームの破壊が該荷電ナノ粒子の放出をもたらす、先の請求項のいずれかに記載の熱感受性リポソーム。

【請求項 11】

T_m が39 ~ 45 である、先の請求項のいずれかに記載の熱感受性リポソーム。

【請求項 12】

ナノ粒子を治療薬として用いるときの、各ナノ粒子のコアの最大寸法が5nm~100nm、好ましくは10nm~50nmである、先の請求項のいずれかに記載の熱感受性リポソーム。

【請求項 13】

ナノ粒子を診断薬として用いるときの、各ナノ粒子のコアの最大寸法が2~10nmである

10

20

30

40

50

、先の請求項のいずれかに記載の熱感受性リポソーム。

【請求項14】

請求項1～13のいずれかに記載の熱感受性リポソームおよび医薬的に許容される担体を含む治療用または診断用組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、健康部門、特にヒトの健康において用いることができる、制御放出を可能にするナノ粒子デリバリーシステム、特に T_m (ゲル-液晶相転移温度)または T_m 以上で破壊される熱感受性リポソームに関する。

本発明の熱感受性リポソームは、生理学的 pH の水性媒質中で測定した時に、表面静電気が好都合には -20mV 以下または +20mV 以上であるナノ粒子を封入する熱感受性脂質膜を含む。該封入されたナノ粒子は治療薬または診断薬として用いることができる。

本発明は、先に記載のナノ粒子デリバリーシステムを含む医薬組成物および診断用組成物、およびその使用にも関する。

【背景技術】

【0002】

治療薬または診断薬を用いる伝統的医学的治療の限界は特異性がないことである。特に、ほとんどの場合、治療薬または診断薬の投与した用量のほんの一部だけが目的とする部位に達するが、残りの薬剤は身体全体に分散する。健康な器官と組織へのこの避けられない分散は、患者に投与することができる薬剤量を制限し、この薬剤が可能な治療または診断効果をあげるのを妨げる。

目的部位に達する薬剤量を増加し、身体の他の健康な部分に送達される量も減少させる部位特異的薬剤送達ベークルの必要性が、特に毒性化学療法剤について永きにわたり認識されてきた。副作用を減少させるかまたは排除することができるそのようなベークルは、該治療を著しくより低毒性かつより有効にするだろう。リポソームは、治療薬または診断薬のためのナノスケールの送達ベークルとして10年におよび臨床的存在であった。

あらゆる薬剤送達ベークルが直面する最大の問題は、疾患部位に特異的に制御可能な速度で該ベークルからの封入した薬剤の完全な放出を可能にすることである。

【0003】

さらに、ナノ粒子のための送達ベークルとしてのリポソームの使用は、特に外部活性化型ナノ粒子との関連で、まだ前臨床開発段階である(Al-Jamal W.T. et al. Nanomedicine, 2007; 2: 85-98)。

【0004】

エンドソーム膜の不安定化を促進し、量子ドット(QD)細胞質放出に有利に作用する融合性またはpH感受性脂質を含むPEG-脂質を用いて構築するリポソームの製造はin vitroで記載されている(Sigot et al. Bioconjugate Chem. 2010; 21: 1465-1472)。リポソームからのPEG-脂質の解離は、リポソームからの二重層への数分間以内での移動を促進する短アシル鎖を有する融合性PEG-脂質を組み込むことにより促進することができる。あるいはまた、PEG-脂質は、ある種のエンドソームコンパートメントの酸性環境に暴露するとポリマー部分がリポソーム表面から開裂される、開裂可能なpH感受性PEG類似体を加えることにより細胞内に放出可能である。そのような「自発的」放出は、局所環境にのみ依存するので、(特に遠隔転移の治療に)好都合でありうるが、リポソーム内容の放出は、依然遅くなり得るし、環境が最適でなければ全く起きないかもしれない。したがって、リポソーム内容の放出の正確な制御はそのようなリポソームでは不可能である。

【0005】

光感作物質を含むリポソームの製造がさらに記載されている(US 2010/0233224)。光感作物質は、脂質鎖の過酸化を介して光および酸素に暴露するとリポソーム膜の不飽和リン脂質を酸化させることができる。リポソームの光酸化は、オンデマンドで外部光刺激を介して急速にその充填物の放出を引き起こすことができる。酸化は、リポソーム膜不全およ

10

20

30

40

50

びそれに続くリポソーム内容の放出に關与する。しかしながら、そのような光供給源は、標的組織が表面的に接近可能な場合にのみ用いることができる。より深い組織に取り込まれたリポソームは、光で刺激することができない。したがって、光感作物質を含むリポソームは、人体の深部器官または構造にナノ粒子を送達するのに用いることができない。

【0006】

レーザー活性型中空金属ナノ構造物も、過去に、それが薬剤の選択的放出を可能にするために封入されたリポソーム膜の透過化を引き起こす手段として用いられた(WO 2009/097480)。

【0007】

US 2009004258は、常磁性酸化鉄ナノ粒子および薬剤封入熱感受性リポソームを開示しており、この常磁性酸化鉄ナノ粒子は交番磁場による活性下、標的環境中の薬剤の特異的または選択的放出を可能にする。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明者らは、対象にナノ粒子の安全な *in vivo* 送達、および制御された効率的放出を可能にする好都合な系を提供する。

特に、これらの系は、人体の深部構造中で外部活性型ナノ粒子の送達および放出を可能にする。診断および/または治療的手段として用いることができる効率的活性型ナノ粒子の例は、WO2007/118884、WO2009/147214、およびWO2011/003999に本発明者らが記載した

20

【課題を解決するための手段】

【0009】

(発明の要約)

本発明者らは、 T_m または T_m 以上で破壊される熱感受性リポソームであって、該リポソームがナノ粒子を封入する熱感受性脂質膜を含み、生理学的pH(6~8)の水性溶媒中で測定したときにナノ粒子の「表面静電気」(本明細書では「荷電」または「表面荷電」ともいう)が-20mV以下または+20mV以上であり、該ナノ粒子が治療薬または診断薬として用いることができる、該リポソームを提供する。

【0010】

さらに、本発明者らは、本発明の熱感受性リポソームおよび医薬的に許容される担体を含む治療用および診断用組成物を提供する。

30

【0011】

別の局面において、本発明は、本明細書に記載の生成物のいずれか一つまたはそれ以上、すなわち、熱感受性リポソームおよび組成物を、該生成物を用いるための指示を与える注意書きラベルと共に含むキットを提供する。

【0012】

本発明の熱感受性リポソームは、生理学的環境、特に、本明細書において細網内皮系(RES)ともいう単核食細胞系による早期捕捉またはオプソニン化からナノ粒子を好都合に保護することができる。

40

【0013】

したがって、本発明のリポソームは、熱活性化により完全なナノ粒子を送達および放出することができる(熱活性化は、温度の生理学的増加によるか、または例えば、電離放射線または高密度焦点式超音波を用いる外部活性化により達成することができる)。目的部位で放出されると、該ナノ粒子は、さらに下記で説明するように、所望により外部活性化を介して治療薬または診断薬として機能することができる。

【0014】

本明細書に記載の熱感受性リポソームは、さらに、血管経路を介して対象の身体の目的部位、特に深部部位または構造にナノ粒子を好都合に送達することができる。

ナノ粒子放出の正確で効率的な制御も(送達に加えて)今や可能である。本明細書に記

50

載の熱感受性リポソームからのナノ粒子の放出は、 T_m と等しいかまたは T_m 以上の温度 T_r で本発明者らにより証明された。リポソーム膜破壊(膜の物理的崩壊、断裂、または破壊)の原因となるナノ粒子と脂質二重層の相互作用は、この驚くべき結果を説明しうる(図4E、黒矢印参照)。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】ホスファチジルコリン分子の模式的構造。グリセロールバックボーン周辺のリン脂質分子構造を示し、sn-1およびsn-2鎖は、アシル基上で長炭化水素鎖により置換されており(R1およびR2は少なくとも9炭素原子を含む)、sn-3鎖は、コリン基($N(CH_3)_3^+$)およびホスフェート基(PO_4^-)を有し、該分子に両性イオン特性をもたらす極性頭部を含む。

10

【図2】酸化鉄ナノ粒子の透過型電子顕微鏡(TEM)画像。2A. 5nmサイズの酸化鉄ナノ粒子のTEM観察を示す(実施例1参照)(スケールバー=200nm)。2B. 30nmサイズの酸化鉄ナノ粒子TEM観察を示す(実施例2)(スケールバー=200nm)。

【図3】酸化鉄含有リポソームについて得られた典型的溶出プロフィール。第一鉄イオンとフェナントロリンの比色反応を介する紫外・可視分光法(Cary 100 Varian分光計)による磁気ナノ粒子の定量により測定した酸化鉄含有リポソームの溶出プロフィールを示す。リポソーム含有分画を回収する。リポソーム中の酸化鉄濃度は1~2.5g/Lの範囲である。

【図4】ナノ粒子含有リポソームの低温TEM観察。矢印1は、低温TEMグリッドホルダーの制限を示す。矢印2および3は、それぞれリポソーム膜および酸化鉄ナノ粒子を示す。

20

4Aは、室温熟成した酸化鉄ナノ粒子充填非熱感受性リポソームを示す(実施例4.2)。

4Bは、60℃で熟成した酸化鉄ナノ粒子充填非熱感受性リポソームを示す(実施例4.2)。
4Cは、室温熟成した酸化鉄ナノ粒子充填熱感受性リポソームを示す(実施例4.1)。

4Dは、43℃(T_m)で熟成後の熱感受性リポソームから放出された酸化鉄ナノ粒子を示す(実施例4.1)。
4Eは、48℃(T_m 以上)で熟成後の熱感受性リポソームから放出された酸化鉄ナノ粒子を示す(実施例4.1)。
4Fは、室温熟成した酸化鉄ナノ粒子充填熱感受性リポソームを示す(実施例4.3)。
4Gは、43℃(T_m)熟成した酸化鉄ナノ粒子充填熱感受性リポソームを示す(実施例4.3)。

【発明を実施するための形態】

【0016】

30

(本発明の詳細な説明)

本明細書において本発明者らは、 T_m (ゲル-液晶相転移温度)または T_m 以上で破壊される熱感受性リポソームを提供する。このリポソームは、対象に治療薬または診断薬として用いることができるナノ粒子を封入する熱感受性脂質膜を含む。

【0017】

本発明者らは、驚くべきことに、生理学的pH(典型的にはpH6~pH8)の水性媒質中で測定したときにナノ粒子の表面静電気が-20mV以下または+20mV以上のとき、 T_m または T_m 以上で熱感受性リポソームの破壊を観察した。このリポソーム膜の破壊は、封入された荷電ナノ粒子の放出を可能にする。

【0018】

40

本明細書で用いている用語「対象」は、あらゆる生物を意味する。該用語は、対象の一例であるヒトを排他的に表わす必要はなく、動物、特に温血脊椎動物、典型的には哺乳動物、およびさらに細胞培養も表しうる。

【0019】

リポソーム

用語「リポソーム」は、小胞内媒質を外部媒質から分離する膜を形成する両親媒性分子の少なくとも1の二重層からなる球状小胞を表す。小胞内媒質は、該リポソームの内部水性コアを構成する。親水性分子または成分は、当業者に知られ、さらに本明細書で以下に記載の能動封入法を介してリポソームの内部水性コア内に封入することができる。疎水性分子または成分は、該膜の内側に取り込むことができる。

50

該二重層を構成する両親媒性分子は、脂質、より具体的にはリン脂質である。リン脂質分子の両親媒性特性は、リン酸基およびグリセロール基で構成される親水性頭部と1または2の脂肪酸で構成される疎水性尾部の存在による(図1参照)。

【0020】

水性媒質において、リン脂質は、脂肪アシル鎖と水の接触を最小限にするために自己会合(self-assembly)する傾向があり、その化学構造にしたがって種々のタイプの会合体(ミセル、ラメラ相など)をとる傾向がある。より具体的には、ホスファチジルコリンは、「自発」屈曲を受け、最終的に小胞を形成する積層二重層からなるラメラ相を形成することが知られている(Lasic D.D. et al. Adv. Colloid. Interf. Sci. 2001; 89-90: 337-349)。リン脂質ラメラ相は、サーモトロピック液晶を構成する。これは、両親媒性分子の秩序化(ordering)度は、温度に依存することを意味する。実際に、リン脂質二重層は、「ゲル様」ラメラ相 L_{α} から「液状」ラメラ相 L_{β} への遷移に対応する主相遷移温度 T_m (「融解」温度)を示す。「ゲル」相において、脂肪酸の炭酸鎖間の強い疎水性相互作用がリン脂質分子の結晶秩序化を引き起こし、該二重層は小イオンに対してのみ透過性である。「液」相において、疎水性尾部は、リン脂質分子の秩序化の損失を引き起こし、「液晶」相をもたらす熱運動により移動し、該二重層は薬剤などの分子に対して透過性になる。

10

【0021】

「ゲル-液晶」相遷移温度 T_m は、リン脂質分子の化学構造：炭化水素鎖長、不飽和、不斉、および脂肪酸の分岐、鎖-グリセロール結合の種類(エステル、エーテル、アミド)、グリセロールバックボーンに対する鎖の結合位置(1,2-対1,3-)、および頭部基修飾に依存する。

20

【0022】

ホスファチジルコリンの場合は、脂肪アシル鎖の構造および立体配座は特に関連がある(Koynova et al., Biochim. Biophys. Acta 1998; 1376: 91-145)。

脂肪酸の鎖長の増加は、主相遷移温度を増加させる。例えば、炭素数9~24の範囲の鎖長を有する飽和ジアシルホスファチジルコリンについては、 T_m は、 $1/n$ (n は、脂肪アシル鎖中の炭素原子数である)に直線的に依存し、 T_m は、 $n=16$ の41 から $n=24$ の80 に増加する。

【0023】

主ゲル-液晶相転移温度に対する不飽和の影響は、立体配座(cisまたはtrans型)、脂肪アシル鎖中の位置、および二重結合数に依存する。例えば、18個の炭素を含むホスファチジルコリンのsn-2鎖のみおよび両方の鎖にcis型の単一不飽和部位を導入することで、鎖の融解遷移温度をそれぞれ50 (54.5 から3.8 に)および75 (54.5 から-21 に)低下させる効果がありうる。対照的に、二重鎖がtrans型である場合は、該効果は、かなり小さくなる。さらに、 T_m は、cis-二重結合の位置に決定的に依存する。具体的には、 T_m は、二重結合が炭化水素鎖の幾何学的中心近くに位置する時に最小化し、二重結合が該鎖のいずれかの末端に向かって移動するにつれて次第に増加する。これらの依存性は、二重結合がホスファチジルコリンのsn-2鎖のみまたは両方の鎖に存在する場合に当てはまる。二重結合数の影響に関して、cis-不飽和数の増加により T_m が低下することが示された。例えば、2または3個のcis-不飽和部位を18個の炭素を含むホスファチジルコリンの両アシル鎖に導入すると、該鎖の融解遷移温度は、それぞれ109 (54.5 から-55.1 に)および116 (54.5 から-61.5 に)大きく低下する(Koynova et al., Biochim. Biophys. Acta 1998; 1376: 91-145)。

30

40

【0024】

混合鎖ホスファチジルコリンは、sn-1およびsn-2位に異なる炭化水素鎖長が存在する。経験式は、特定構造の関連ホスファチジルコリンの遷移温度の正確な予測を可能にするよう導き出した。正規化鎖-長非等価性パラメータ C/CL が記載された(ここで、 $C=|n_1 - n_2 + 1.5|$)は有効鎖-長差であり、 n_1 および n_2 は、それぞれグリセロールバックボーンのsn-1およびsn-2位における炭素数である。CLは、2本の鎖の長い方の有効長である。2本の鎖を構成する総炭素原子が同数であること($n_1 + n_2 = \text{一定}$)を示すホスファチジルコ

50

リンについては、鎖の融解温度は、鎖長非等価性パラメータ C/CL が約0.4に増加するとモノテカルに (monotonically) 低下する。 C/CL が約0.4以上になると、アシル鎖のメチル末端によって生じるパッキング変動 (perturbation) は、不斉ホスファチジルコリン分子が混合指状構造 (interdigitation) と呼ばれる新パッキング配置をとるように圧倒するようになる。この再配置により鎖長は非対称となり、 T_m は増加する。

【0025】

薬剤送達のために、ステロール成分は、該リポソームに適切な物理化学的および生物学的挙動をもたらすために含まれる。そのようなステロール成分は、コレステロールまたはその誘導体、例えば、エルゴステロールまたはコレステロールヘミスクシネートから選ぶことができるが、コレステロールが好ましい。

10

【0026】

コレステロールは、リポソームの脂質製剤に用いられることが多いが、それは、一般的には、コレステロールの存在は、その透過性を低下させ、血漿または血清タンパク質の不安定化効果からリポソームを保護すると一般的に認識されているからである。

【0027】

コレステロール分子は、以下の3つの充分区別される領域を含む：小極性ヒドロキシル基、剛性板状ステロイド環、およびアルキル鎖尾部。コレステロールが膜中に挿入されると、その極性ヒドロキシル基はホスファチジルコリン分子のグリセロールバックボーン領域の中間近くに位置した (Kepczynski M. et al., Chemistry and Physics of Lipids, 2008 ; 155 : 7 - 15)。修飾因子のコレステロールとしての脂質二重層への取り込みは、リポソーム膜の構造または物理特性、例えば、その統合、自由体積、厚さ、流動性 (粘性)、および極性 (疎水性) を大きく変化させる。

20

【0028】

二重層の粘性は、膜の自由体積に影響する該二重層内のコレステロールの位置および温度に依存する。該二重層の微小粘度に対するコレステロールの影響はかなり複雑である。コレステロールが液相にある膜の見かけの微小粘度を増加させることはよく知られている (Cournia et al., J.Phys.Chem.B, 2007 ; 111 : 1786 - 1801)。

【0029】

Papahadjopoulos et al. は、リポソームに対するコレステロールの保護作用が、血清または血漿と接触したときの脂質膜の物理的状態、すなわち、「ゲル」または「液体」に依存することを示した。ゲル状態では、コレステロールの存在は、該二重層内のリン脂質アシル鎖の秩序化パラメータに影響を及ぼし、取り込まれた分子の放出を増強する。液体状態では、コレステロールは、リポソームを安定化し、取り込まれた物質の漏出を防ぐ (Papahadjopoulos et al., Pharm. Research, 1995 ; 12(10) : 1407 - 1416)。25モルパーセント (mol %) 以上の濃度でコレステロールを加えると、ゲル - 液晶脂質 - 相遷移に顕著な影響がある。液不秩序 (液) 相と固体秩序 (ゲル) 相が共存する新規熱力学的安定領域が開示されている：液秩序相 (Cournia et al., J. Phys. Chem. B, 2007 ; 111 : 1786 - 1801 ; Polozov et al., Biophysical Journal, 2006 ; 90 : 2051 - 2061)。この新規相は、純粋な脂質により形成されるゲル相の流動性と液相の流動性の中間の流動性を特徴とする。近年、コレステロールが飽和高融点脂質、例えばジバルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) およびスフィンゴミエリンと結合すると、液秩序相が形成され、モデル膜、いわゆる「脂質 - ラフト」における動的複合体が生成されることが提唱された。コレステロールは、モデル膜における相分離を促進し、高コレステロールおよび低コレステロールマイクロドメインが形成される (Radhakrishnan et al. Proc. Natl. Acad. Sci., 2000 ; 97 : 12422 - 12427 ; Mc Connell et al. Biochim. Biophys. Acta, 2003 ; 1610 : 159 - 173)。実際に、Gaber et al. (Pharm. Research, 1995 ; 12(10) : 1407 - 1416) は、33 mol % のコレステロールジバルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、水素添加ダイズホスファチジルコリン (HSPC)、およびコレステロールをそれぞれ100 : 50 : 75および50 : 50 : 50のモル比で含む2つの脂質製剤が、示差走査熱量測定法により30 ~ 65 の相遷移温度を示さないことを示した。そのような製剤のリポソームは「非熱感受性」リポソームと呼ばれる。

30

40

50

【0030】

本発明の文脈において用いることができる典型的「熱感受性」リポソーム(すなわち、典型的には39 ~ 55、好ましくは39 ~ 50、さらにより好ましくは39 ~ 45を含む主相遷移温度 T_m を有するリポソーム)は、少なくともホスファチジルコリンを含む。

該ホスファチジルコリンは、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、ジステアシルホスファチジルコリン(DSPC)、水素添加ダイズホスファチジルコリン(HSPC)、モノパルミトイルホスファチジルコリン(MPPC)、モノステアシルホスファチジルコリン(MSPC)、およびそのあらゆる混合物から選ぶことができる。

【0031】

好ましい態様において、熱感受性リポソームは、さらにジステアシル - ホスファチジルエタノールアミン(DSPE)、ジステアシルホスファチジルエタノールアミン(DSPE) - メトキシポリエチレングリコール(PEG)(DSPE - PEG)を含む。

好ましい態様において、コレステロールは、25 mol%より少ないモル比で加える。

【0032】

好ましい熱感受性脂質膜は、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、水素添加ダイズホスファチジルコリン(HSPC)、コレステロール、およびジステアシルホスファチジルエタノールアミン(DSPE) - メトキシポリエチレングリコール(PEG)、例えばPEG2000(DSPE - PEG2000)を含む。

特定の態様において、前記化合物のモル比は、好ましくは100 : 50 : 30 : 6または100 : 33 : 27 : 7である。

【0033】

別の好ましい熱感受性脂質膜は、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、モノパルミトイルホスファチジルコリン(MPPC)、およびジステアシルホスファチジルエタノールアミン(DSPE) - メトキシポリエチレングリコール(PEG)、例えばメトキシポリエチレングリコール - 2000(DSPE - PEG2000)を含む。

特定の態様において、前記化合物のモル比は、好ましくは100 : 12 : 5である。

【0034】

別の好ましい熱感受性脂質膜は、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、モノステアシルホスファチジルコリン(MSPC)、およびジステアシルホスファチジルエタノールアミン(DSPE) - メトキシポリエチレングリコール(PEG)、例えばメトキシポリエチレングリコール - 2000(DSPE - PEG2000)を含む。

特定の態様において、前記化合物のモル比は、好ましくは100 : 12 : 5である。

【0035】

製造方法に応じて、該小胞のサイズおよびラメラ度の程度を調整することができる。単層脂質小胞を製造する種々の方法、例えば、逆相蒸発(Szoka et al., PNAS, 1978 ; 75(9) : 4191 - 4198)、エタノール注射(Pons et al., International Journal of Pharmaceutics, 1993 ; 95(1 - 3) : 51 - 56)、加熱法(Mozafari et al., Journal of Biotechnology, 2007 ; 129 : 604 - 613)が文献に記載されているが、最も簡単なのは脂質フィルム水和法(Banham et al., J. Mol. Bio., 1965 ; 13 : 238 - 252)である。簡単には、脂質フィルム水和法において、脂質をクロロホルムなどの有機溶媒に可溶化する。該溶液をホモゲナイズした後、有機溶媒を窒素流下で蒸発させる。次に、得られた乾燥脂質フィルムを主相遷移温度 T_m 以上の温度で水性媒質により水和して100 ~ 800nmのサイズの多層小胞を形成させる(Mills J.K. et al. Methods in Enzymology 2004 ; 387 : 82 - 113)。それぞれ溶液を凍結(液体窒素中で)および解凍(T_m 以上の温度で)することによる脱水および再水和の周期は、単層小胞を形成することにより水性内部容量の増加をもたらす。次に、小胞サイズの較正方法を適用して均質なサイズ分布を得る。超音波処理により20 ~ 50nmのサイズ範囲の小単層小胞(SUV)を得、フィルター膜による抽出法では、フィルターポアのサイズに応じて50 ~ 500nmのサイズ範囲の大単層小胞(LUV)を得た。超音波処理および抽出法の両方法は、 T_m 以上の温度で行う必要がある。

【0036】

本発明の熱感受性リポソームの最大サイズは、典型的には50～500nm、好ましくは50～250nm、例えば約50nm～約150nmを含む。

【0037】

本発明に用いる熱感受性リポソームは、好ましくは、その生体適合性と特異的生体内分布を保証または改善するための生体適合性コーティングを含む。該生体適合性コーティングは、生体適合性サスペンション、例えば生理液（血液、血漿、血清など）、あらゆる等張媒質、または生理媒質、例えば医薬の投与に必要なグルコース(5%)および/またはNaCl(0.9%)を含む媒質中のリポソーム安定性を可能にするか、またはそれに有利に働く。

そのような生体適合性コーティングは、リポソームを表面処理剤で処理することにより得られる。

【0038】

安定性は、生体適合性サスペンション中のリポソームの動的光散乱測定により確認することができる。

該コーティングは、好都合にはin vivoでのリポソームの完全性を維持し、その任意の機能化を促進する（例えばスパーサー分子、生体適合性ポリマー、ターゲティング剤、タンパク質などによる）。

【0039】

該コーティングは、非生分解性または生分解性でありうる。両選択肢を本発明の文脈で用いることができる。

非生分解性コーティングの例には、糖（例えばアガロース）、飽和炭素ポリマー（例えばポリエチレンオキシド）（網状または非網状、修飾または非修飾（例えばポリメタクリレートまたはポリスチレン））、およびその組み合わせからなる群から選ばれる1またはそれ以上の物質もしくは表面処理剤がある。

【0040】

生分解性コーティングの例には、例えば生体分子（修飾または非修飾、天然または非天然）、および生体ポリマー（修飾または非修飾、天然形または非天然形）からなる群から選ばれる1またはそれ以上の物質または表面処理剤がある。生体ポリマーは、糖類、オリゴ糖類、または多糖類（ポリ硫酸化または非ポリ硫酸化、例えばデキストラン）でありうる。

【0041】

前記物質、化合物、または表面処理剤は、単独または組み合わせて、混合物または会合体、複合物または非複合物、共有（結合）または非共有で（所望により他の化合物と組み合わせて）用いることができる。

【0042】

本発明の熱感受性リポソームは、さらに、生物組織または細胞の特異的ターゲティングを可能にする表面成分を含むことができる。そのような表面成分は、好ましくは、標的生物学構造上に存在する認識エレメントとのリポソームの相互作用を可能にするターゲティング剤である。

【0043】

そのようなターゲティング剤は、リポソームが腫瘍中に蓄積される時にのみ作用しうる。

ターゲティング剤の立体配座はその標的との相互作用に関与するので、該ターゲティング剤の密度は、当業者に知られた方法で注意深く調節すべきである。実際に、それが高密度であれば、ターゲティング剤の立体配座を混乱させ、その結果、標的細胞による認識を混乱させうる（例えば、J A Reddy et al. Gene therapy 2002 ; 9 : 1542 ; Ketan B. Ghaghada et al. Journal of Controlled Release 2005 ; 104 : 113参照）。さらに、高標的剤密度は、血管系を循環中に細網内皮系（RES）によるリポソームクリアランスに有利に働きうる。

【0044】

該コーティングは、あらゆる目的分子をリポソーム表面に結合させる種々の官能基（ま

10

20

30

40

50

たはリンカー部分)、例えば生物組織または細胞の特異的ターゲッティングを可能にする表面抗原も含み得る。

【0045】

ナノ粒子

本発明の生成物および組成物は、多くの分野、特にヒトの医療および獣医学に用いることができる。

封入ナノ粒子は、熱感受性リポソームから放出されると治療薬または診断薬として用いることができ、その構造はその意図する機能に直接依存するだろう。

【0046】

用語「ナノ粒子」は、コア(中心コア)およびコーティングを含み、該コアの最大寸法が約100nm以下である、粒子または粒子の凝集物を表す。典型的には、ナノ粒子のコアの最大寸法は、丸または球形のナノ粒子の直径、または卵または楕円形のナノ粒子の最大長である。

10

【0047】

本明細書で用いている用語「ナノ粒子のサイズ」および「ナノ粒子の最大サイズ」は、「ナノ粒子のコアの最大寸法」を表す。

「コア」は、単一粒子(クリスタルまたは晶子)または粒子の凝集物(クリスタルまたは晶子の凝集物)を表しうる。

【0048】

透過型電子顕微鏡(TEM)または低温TEMは、特に該コアが単一粒子からなる場合にナノ粒子のコアのサイズを測定するのに好都合に用いることができる(図2参照)。同様に、動的光散乱(DLS)は、コアが粒子または粒子の凝集物からなる場合に溶液中のナノ粒子のコアの流体力学的直径を測定するのに用いることができる。これら2つの方法は、さらに互いのサイズ測定値を比較し、該サイズを確認するために用いることができる。

20

【0049】

ナノ粒子の中心コアは、典型的には、治療的または診断的物質、好ましくは活性型または興奮性物質から製造される。該物質は、無機物質、有機物質、またはその混合物でありうる。該物質は、好ましくは無機物質である。

【0050】

ナノ粒子の電子表面荷電が、ナノ粒子をpH6~8の水性媒質に懸濁させた0.2~8g/Lの異なる濃度のナノ粒子サスペンションを用いてゼータ電位測定により測定したときに、-15mV以下または+15mV以上、例えば-15mV~-20mV、または+15mV~+20mV、典型的には-20mV以下または+20mV以上であるかぎり、あらゆる種類のナノ粒子を本発明の熱感受性リポソームに封入することができる。

30

【0051】

ナノ粒子の形状は、例えば丸、平面、細長、球状、卵形、または楕円形などでありうる。該形状は、製造方法により決定または調節し、目的とする適用に応じて当業者が適合させることができる。

粒子の形状は標的部位に送達されるとその「生体適合性」が影響をうけるので、全く均質な形状を有する粒子が好ましい。薬物動態的理由により、本質的に球状、丸、または卵形のナノ粒子が好ましい。球状または丸形が特に好ましい。

40

【0052】

ナノ粒子の最大サイズ、すなわち、本発明の文脈において用いるナノ粒子のコアの最大寸法は典型的には1~100nmに含まれる。

ナノ粒子を治療薬として用いる場合は、該サイズは、約5nm~約100nm、例えば約5nm~80nm、例えば約10nm~約80nm、好都合には約10nmまたは20nm~約70nm、好ましくは約15~約60nm、または約10nmまたは15nm~約50nmに含まれる。

ナノ粒子を診断薬として用いる場合は、該サイズは、好都合には、約2nm~約10nm、例えば約4nm~約8nmに含まれる。

【0053】

50

本発明の文脈で用いるナノ粒子は、コアおよびコーティングを含み、該コーティングは、生理学的pHの水性媒質中で測定したときに-20mV以下または+20mV以上の表面静電気の存在に關与する。

【0054】

静電コーティングは、好都合には「フルコーティング」（完全単層）である。これは、ナノ粒子の全表面上に適切な荷電を生じる非常に高密度の生体適合性分子の存在を意味する。そのようなフルコーティングは、 T_m または T_m 以上で熱感受性リポソームの膜を破壊するのに好都合であろう。

【0055】

コアを構成する無機物質は、磁性物質であり得る。

磁性物質には、例えば、好ましくはオキシド、ヒドロキシド、または金属の形の、鉄、ニッケル、コバルト、ガドリニウム、サマリウム、ネオジミウム、およびそのあらゆる混合物が含まれる。

具体例において、コアを形成する物質は、酸化第一鉄および酸化第二鉄からなる群から選ばれる。本発明の好ましい態様において、オキシドナノ粒子は磁鉄鉱または磁赤鉄鉱でできている。

混合物質を用いて磁場とナノ粒子の相互作用を最適化することもできる。固体溶液形（種々の物質の無作為混合物として当業者に周知である）、例えば CoFe_2O_4 を混合物質として用いることができる。さらに、分離（demixed）相の固体溶液、例えば $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Co}$ を用いることができる。磁性物質を治療用物質として用いる場合は、強磁性物質が好ましい。

磁性物質を診断用物質として用いる場合は、超常磁性物質が好ましい。

【0056】

コアを構成する無機物質は、少なくとも50、好ましくは少なくとも60または61、より好ましくは少なくとも65、66、67、または68の原子番号（Z）を有する金属元素により構成される高電子密度物質でありうる。

原子番号（陽子数としても知られる）は、原子核中にみられる陽子の数である。原子番号は、伝統的に記号Zにより表される。原子番号は、化学元素を一意的に同定する。中性荷電の原子において、原子番号は電子数に等しい。

Zは、ナノ粒子の流入放射線吸収能に關与する。

【0057】

コアを構成する無機物質は、以下からなる酸化物でありうる：酸化セリウム(IV)(CeO_2)、酸化ネオジニウム(III)(Nd_2O_3)、酸化サマリウム(III)(Sm_2O_3)、酸化ユーロピウム(III)(Eu_2O_3)、酸化ガドリニウム(III)(Gd_2O_3)、酸化テルビウム(III)(Tb_2O_3)、酸化ジスプロシウム(III)(Dy_2O_3)、酸化ホルミウム(Ho_2O_3)、酸化エルビウム(Er_2O_3)、酸化ツリウム(III)(Tm_2O_3)、酸化イッテルビウム(Yb_2O_3)、酸化ルテチウム(Lu_2O_3)、酸化ハフニウム(IV)(HfO_2)、酸化タンタルム(V)(Ta_2O_5)、酸化レニウム(IV)(ReO_2)。

本発明の文脈において、無機酸化物の混合物も可能である。

【0058】

コアを構成する無機物質は、好ましくは原子数（Z）が少なくとも40または50、好ましくは少なくとも60または70の金属でありうる。

該金属は、以下から選ばれうる：金(Au - Z = 79)、銀(Ag - Z = 47)、プラチナ(Pt - Z = 78)、パラジウム(Pd - Z = 46)、スズ(Sn - Z = 50)、タンタルム(Ta - Z = 73)、イッテルビウム(Yb - Z = 70)、ジルコニウム(Zr - Z = 40)、ハフニウム(Hf - Z = 72)、テルビウム(Tb - Z = 65)、ツリウム(T_m - Z = 69)、セリウム(Ce - Z = 58)、ジスプロシウム(Dy - Z = 66)、エルビウム(Er - Z = 68)、ユーロピウム(Eu - Z = 63)、ホルミウム(Ho - Z = 67)、ランタヌム(La - Z = 57)、ネオニジウム(Nd - Z = 60)、プラセオジニウム(Pr - Z = 59)、およびそのあらゆる混合物。

【0059】

本発明の好ましい態様において、ナノ粒子のコアは金で構成される。

本発明の文脈において、ナノ粒子のコアは、無機酸化物および金属の混合物で構成され

10

20

30

40

50

うる。

生理学的pHの水性媒質中で測定したときに、ナノ粒子の-20mV以下または+20mV以上の表面静電気の存在に關与するコーティングは、無機または有機表面コーティングでありうる。

【0060】

無機の場合、該コーティングは、オキシド、ヒドロキシド、およびオキシヒドロキシドからなる群から選ばれうる。無機コーティングは、例えばシリシウム、アルミニウム、カルシウム、および/またはマグネシウムを含みうる。

例えば、マグネシウムおよびカルシウムからなる群から選ばれる無機物質は、pH7のナノ粒子表面に正荷電(+20mV以上)をもたらすだろう。

別の態様において、シリシウム基は、pH7のナノ粒子表面に負荷電(-20mV以下)をもたらすのに用いることができる。

【0061】

有機の場合、該コーティングは、ナノ粒子表面と共有結合または静電結合により相互作用することができ、該ナノ粒子に表面特性を与えることができる分子を用いて調製される。

表面をコーティングする有機分子は、2つの基RおよびXを有する。Xの機能は、ナノ粒子表面と相互作用することであり、Rの機能はナノ粒子表面にその特異的特性を与えることである。

Xは、例えば、カルボキシレート($R-COO^-$)、シラン($R-Si(OR)_3$)、ホスホニック($R-PO(OH)_2$)、ホスホリック($R-O-PO(OH)_2$)、ホスフェート($R-PO_4^{3-}$)、およびチオール($R-SH$)基から選ぶことができる。

Rは、生理学的pHの水性サスペンション中のナノ粒子に少なくとも電子表面荷電をもたらす。

Rがナノ粒子表面に正荷電をもたらす場合は、Rはアミン(NH_2-X)でありうる。Rがナノ粒子表面に負荷電をもたらす場合は、Rはホスフェート($PO_4^{3-}-X$)またはカルボキシレート($COO^- - X$)でありうる。

【0062】

ナノ粒子表面に正荷電(+20mV以上)をもたらす有機コーティングは、例えば、アミノプロピルトリエトキシシラン、ポリリシン、または2-アミノエタンチオールから選ばれうる。

ナノ粒子表面に負荷電(-20mV以下)をもたらす有機コーティングは、例えば、ポリホスフェート、メタホスフェート、ピロホスフェートなどからか、または、例えば、クエン酸またはジカルボン酸(特にコハク酸)から選ばれうる。

また、静電コーティングは好都合に「フルコーティング」である。

【0063】

さらに、この静電コーティング、特にアミノまたはカルボン酸部分を用いて、ナノ粒子表面上のあらゆる基を結合させることができる。例えば、静電コーティングを用いて、例えばカルボジイミドのようなリンカーを用いてナノ粒子表面上に本明細書に記載のターゲッティング基またはカップリング基を結合することができる。

【0064】

所望により、ナノ粒子表面は、ナノ粒子が熱感受性リポソームから放出されて、それと共有結合を形成する場合は、タンパク質と直接相互作用することができる基(「カップリング基」)を用いて機能化することができる。

Rは、タンパク質上に存在するアミン、カルボキシル、またはチオール基と共有結合的に相互作用することができる反応基、例えば、スクシンイミジルエステル基(アミン基と反応する)および/またはマレイミド基(カルボキシル基と反応する)でありうる。

【0065】

所望により、ナノ粒子表面は、特定の生物組織または細胞をターゲッティングすることができる基(「ターゲッティング基」)を用いて機能化することができる。該ターゲッテ

10

20

30

40

50

ィング基は、人体または動物体に存在する分子に対する親和性を示すあらゆる生物学的構造または化学構造でありうる。

そのようなターゲッティング基は、典型的には、ナノ粒子が標的部に蓄積し、 T_m または T_m 以上の温度で熱活性化するとリポソームから放出されると作用する。

【0066】

ターゲッティング基は、抗原、スパーサー分子、生体適合性ポリマーから選ぶことができる。ターゲッティング基は、人体または動物体に存在する分子に対して親和性を示すあらゆる生物学的構造または化学構造でありうる。例えば、該ターゲッティング基は、ペプチド、オリゴペプチドもしくはポリペプチド、タンパク質、核酸(DNA、RNA、SiRNA、tRNA、miRNA、etc.)、ホルモン、ビタミン、酵素など、および一般的には、分子のあらゆるリガンド(例えばレセプター、マーカー、抗原など)でありうる。病的細胞により発現される分子のリガンド、特に腫瘍抗原のリガンド、ホルモンレセプター、サイトカインレセプター、または成長因子レセプター。該標的とされる基は、LHRH、EGF、葉酸塩(folate)、抗B-FN抗体、E-セレクトリン/P-セレクトリン、抗IL-2R抗体、GHRHなどからなる群から選ぶことができる。

10

【0067】

本明細書に記載の静電コーティングおよび/またはカップリング基を用いて、ナノ粒子表面上のあらゆる基を結合することができる。例えば、該基は、ナノ粒子表面にターゲッティング基を移植するためのリンカーとして用いることができる。

【0068】

本明細書に記載の具体的目的は、 -20mV 以下または $+20\text{mV}$ 以上の表面静電気の存在に関する物質で共有結合的または静電的にコートされたナノ粒子封入熱感受性リポソームである。この物質は、好ましくは、2つの基RおよびX(ここで、Rは、アミン、ホスフェート、およびカルボキシレートから選ばれ、Xは、カルボキシレート、シラン、ホスホニック、ホスホリック、およびチオールから選ばれる)を有する有機分子である。

20

ナノ粒子は、さらに、スクシンイミジルエステルおよびマレイミド基から選ばれるカップリング基、および/またはペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド、タンパク質、核酸、ホルモン、ビタミン、酵素、腫瘍抗原のリガンド、ホルモンレセプター、サイトカインレセプター、および成長因子レセプターから選ばれるターゲッティング基を含むことができる。

30

【0069】

所望により、ナノ粒子表面は、立体保護基を用いて機能化することができる。そのような基は、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、生体高分子、またはポリサッカライド、例えばデキストラン、キシラン、セルロース、コラーゲン、および両性イオン化合物、例えば、ポリスルホベタインなどから選ぶことができる。

【0070】

この立体保護基は、生体適合性サスペンション、例えば生理液(血液、血漿、血清など)、あらゆる等張媒質または生理学的媒質、例えばグルコース(5%)および/またはNaCl(0.9%)を含む媒質中のナノ粒子安定性を増大させる。

40

【0071】

本発明の開示から、当業者は、本発明の精神から逸脱することなくナノ粒子を修飾することができることを認識するだろう。

【0072】

本発明の文脈において用いることができるナノ粒子またはナノ粒子凝集物の典型的製造方法は、例えば、WO2007/118884、WO2009/147214、US 6,514,481 B1、WO2011/003999、およびLiu et al., Journal of Magnetism and Magnetic Materials 270(2004) 1-6 「Preparation and characterization of amino-silane modified superparamagnetic silica nanospheres」に記載されている。

50

【 0 0 7 3 】

治療的使用

ナノ粒子が標的細胞に取り込まれるかまたは接触すると、治療的ナノ粒子の効率は増大する。この目的を達成するために、典型的には、ナノ粒子表面特性を、標的細胞と相互作用するのに有利に働くように修飾する。例えば、ナノ粒子表面の電子荷電を修飾するか、または該表面を本明細書に記載のターゲッティング基またはターゲッティング剤と結合させることができる。

【 0 0 7 4 】

特異的結合相互作用は、ナノ粒子が細胞膜上の相補的分子またはレセプターと特異的に相互作用するのを可能にする表面リガンド（本明細書ではターゲッティング基という）の相互作用である。この相互作用は、レセプター介在エンドサイトーシスを誘導する。ナノ粒子の表面に結合したターゲッティングリガンドは、レセプター、膜タンパク質、標的細胞上に発現した表面抗原を認識して結合し、エンドサイトーシスおよび細胞内送達を引き起こすことができる。

10

【 0 0 7 5 】

細胞接触および粒子取り込みを促進する非特異的引力は、固有のナノ粒子特性、例えば表面荷電から生じる。

しかしながら、ほとんどの場合、そのような修飾は、ナノ粒子の生体内分布に有害である。

【 0 0 7 6 】

本明細書に記載の熱感受性リポソームは、この問題を克服し、先に記載のごとく、対象の身体における治療的ナノ粒子の効率的生体内分布(送達)および制御放出を可能にする。該リポソームは、標的部位上の、ナノ粒子、特に修飾表面特性を示すナノ粒子の濃度に遊離に働く。

20

【 0 0 7 7 】

ナノ粒子の制御（空間的および時間的）放出が今や可能であり、該ナノ粒子は、その治療的活性がその細胞との相互作用（ナノ粒子は細胞と接触し、および/または細胞内に取り込まれる）に依存する場合に、それが必要とされる場所および時に送達される。

【 0 0 7 8 】

ナノ粒子を治療的手段として用いる場合は、そのコアは、外部活性型物質、例えば外部エネルギー供給源により活性化することができる物質でありうる治療的物質を用いて製造される。特定の態様において、治療的物質は、標的細胞、組織、または器官を機能的に阻害し、変化させ、または破壊することができる。

30

【 0 0 7 9 】

治療的物質は、先に記載の高電子密度物質および磁性物質から選ぶことができる。

【 0 0 8 0 】

活性供給源は、コアが高電子密度物質、例えばHfO₂またはAuを用いて製造されるナノ粒子のための電離放射線供給源でありうる。

電離放射線は、典型的には5KeV～約25000KeV、具体的には約5KeV～約6000KeV(LINAC供給源)、または約5KeV～約1500KeV(例えばコバルト60供給源)でありうる。X線供給源を用いる特に好ましい電離放射線は、典型的には約50KeV～約12000KeV、例えば約50KeV～約6000KeVである。

40

【 0 0 8 1 】

電離放射線の必要線量は、in vitro適用では、好ましくは、約0.05Gray（グレイ）～約16Gray、好ましくは約0.05Gray～約6Grayを含む線量である。

線量は、特に局所、ex vivoまたはin vivo適用では、約0.05Gray以上および約16もしくは30Gray以下を含む。

総電離放射線は、現在の慣例に従ってヒトにおいて、約1.5Grayから約85Gray以下である。約40Grayのさらなる照射ブーストを現在の慣例に従ってヒトに与えることもできる。

【 0 0 8 2 】

50

供給される放射線の総線量は、種々のスケジュール、例えば単回線量、分割線量、超分割 (hyperfractionated) 線量などに従って与えることができる。

【0083】

一般的におよび非制限的方法で、以下のX線をナノ粒子を活性化するための種々の場合に適用することができる：

- 表面標的組織に対して特に有効な50～150keVのX線；
- 6cmの組織圧を透過することができる200～500keVのX線（慣用電圧）；
- 1000keV～25,000keVのX線（メガボルト）。例えば、前立腺癌治療のためのナノ粒子の電離（イオン化）は、エネルギー15,000keVの5焦点X線により行うことができる。

【0084】

あるいはまた、放射性同位元素を電離放射線供給源として用いることができる（キュリー療法または小線源治療という）。特に、ヨウ素 I^{125} ($t^{1/2}=60.1$ 日間)、パラジウム Pd^{103} ($t^{1/2}=17$ 日間)、セシウム Cs^{137} 、およびイリジウム Ir^{192} を好都合に用いることができる。

【0085】

免疫放射核種（または免疫放射標識リガンド）は、放射免疫療法の文脈で電離放射線供給源として用いることもできる。放射免疫療法に適した放射核種は、例えば ^{131}I 、 ^{186}Re 、 ^{177}Lu 、または ^{90}Y から選ぶことができる。

【0086】

荷電粒子、例えば陽子線、イオン線、例えば炭素、特に高エネルギーイオン線も電離放射線供給源として用いることができる。

【0087】

電子線も、4MeV～25MeVを含むエネルギーの電離放射線供給源として用いることができる。

【0088】

特異的単色照射供給源を、ナノ粒子の原子の望むX線吸収エッジに近いまたはそれに対応するエネルギーのX線を選択的に生じるために用いることができた。

【0089】

優先的に、電離放射線の供給源は、線型粒子加速装置(LINAC)、コバルト60、および小線源治療供給源から選ぶことができる。

【0090】

量（総照射線量の範囲）およびスケジュール（単回線量、または分割もしくは超分割プロトコールなどの文脈における照射の計画および送達）は、あらゆる疾患/解剖学的部位/病期、患者の状況/患者の年齢（子供、成人、高齢患者）について定義され、あらゆる特定の状況に対する治療の標準を構成する。該照射は、放射線療法の現在利用可能なあらゆる系を用いて、1回またはそれ以上、ナノ粒子の放出後いつでも適用することができる。

【0091】

特定の態様において、治療的物質は、磁性酸化物(磁鉄鉱または磁赤鉄鉱)、特に強磁性物質であり、活性供給源は磁場供給源である。

【0092】

好ましくは非振動または安定である磁場を、あらゆる磁場供給源を用いることにより、1回またはそれ以上、ナノ粒子の放出後絶えず適用することができる。磁場供給源は、好ましくは均一および一方向磁場供給源であり、あらゆる天然磁石、電気磁石、および磁気共鳴画像法(MRI)装置から選ぶことができる。

適切な非振動または安定磁場は、典型的には0.5～5Teslaの範囲の磁場を有する標準的MRI装置において利用可能である。

磁場に暴露する場合は、暴露の持続時間に応じて、磁性ナノ粒子は、細胞または組織破壊を可能にする（持続時間：数分間、例えば2または5分間～120分間）。

【0093】

本発明のナノ粒子またはナノ粒子凝集物および組成物は、磁場にかけると癌細胞または

10

20

30

40

50

癌細胞であろうと疑われる細胞を溶解させるために好都合に用いることができる。

【0094】

本明細書において本発明者らは、必要とする対象を治療するための医薬組成物を製造するための、本明細書に記載のナノ粒子、または本明細書に記載の同じまたは異なるナノ粒子のポピュレーションの使用を開示する。

【0095】

用語「治療（処置）」は、異常な機能を正し、疾患を予防し、病的兆候を改善し、例えば特に異常組織、特に腫瘍のサイズまたは増殖の減少；異常細胞または組織のサイズもしくは増殖の制御、抑制、または破壊；疾患進行の鈍化；癌進行の遅延による疾患の安定化；転移形成の減少；疾患の退行；または完全寛解（例えば癌の文脈において）などを行うためのあらゆる行為を表す。

10

【0096】

医薬組成物は、標的細胞を活性供給源に暴露すると、必要とする対象における標的細胞を障害し、阻害し、変化させ、または破壊するための組成物でありうる。

【0097】

本発明の目的は、標的細胞を活性供給源に暴露すると、標的細胞を障害し、阻害し、変化させ、または破壊するための、例えば本明細書で先に記載し、および/または本明細書に記載の方法により得ることができる熱感受性リポソームである。

【0098】

本発明の具体的熱感受性リポソームは、対象の癌を予防または治療し、または癌の症状を軽減するためのリポソームである。

20

【0099】

本明細書に記載の具体的方法は、以下を含む対象の細胞の障害、溶解、アポトーシス、または破壊を誘導し、または生じる方法である：a)対象にナノ粒子を含む熱感受性リポソーム（本明細書で先に記載の）を投与し、b)ナノ粒子を局所的に放出させ、次いで細胞、特に標的細胞と相互作用させるために熱感受性リポソームを T_m または T_m 以上に加熱し、次いで所望により、c)該細胞を活性供給源、典型的には例えば本明細書に記載の外部活性供給源に暴露し、該暴露がナノ粒子を活性化し、次いで細胞の障害、溶解、アポトーシス、または破壊を誘導し、または引き起こす。

【0100】

本発明の熱感受性リポソームは、種々の経路、例えば局所（例えば腫瘍内（IT））、皮下、静脈内（IV）、皮内、動脈内、気道（吸入）、腹腔内、筋肉内、および経口経路（経口）により投与することができる。本発明の熱感受性リポソームは、さらに、腫瘍摘出術後の腫瘍ベッドの仮想空洞（virtual cavity）に投与することができる。好ましい投与経路は静脈内経路である。

30

【0101】

熱感受性リポソームを静脈内経路で注射して一定時間後の、透過および保持増強（「EPR」）効果は、腫瘍塊中に熱感受性リポソームが受動的に蓄積するのに関与する。実際に、腫瘍の血管は、正常毛細血管とは全く異なり、その血管の「血管漏出」が正常組織では通常ではないリポソームの選択的血管外遊出を促すことが観察された。有効な腫瘍リンパ廃液の欠如は、浸透リポソームのクリアランスを防ぎ、その蓄積を促す。

40

【0102】

すなわち、本発明のナノ粒子は、静脈内投与した熱感受性リポソームから放出されると原発腫瘍および転移腫瘍を有効にターゲティングすることができる。

【0103】

標的細胞は、あらゆる病的細胞、すなわち、病的メカニズムが関与する細胞、例えば増殖性細胞、例えば腫瘍細胞、狭窄（stenosing）細胞（繊維芽細胞/平滑筋細胞）、または免疫系細胞（病的細胞クローン）でありうる。好ましい適用は、悪性細胞または組織の治療（例えば破壊または機能的変化）に基づく。

【0104】

50

本発明の別の目的は、以下を含む、対象または患者における、疾患、特に癌の予防または治療方法、または疾患の症状の軽減方法に関する：a) 疾患に罹患した患者に熱感受性リポソーム、または例えば熱感受性リポソームを含む本明細書に記載の組成物を投与し、b) ナノ粒子を局所放出させ、次いで細胞、特に標的細胞と相互作用させるために熱感受性リポソームを T_m または T_m 以上に加熱し、c) 次いで、本明細書に記載の活性供給源に対象を暴露することにより対象を治療し、該暴露が患者の異常細胞の変化、障害、または機能的破壊をもたらすことにより、該疾患を予防または治療する。

【0105】

伝統的癌管理は、系統的に、集学的治療（例えば放射線療法および化学療法の組み合わせ）の共同作用を意味する。

【0106】

例えば、放射線療法の文脈において、活性供給源に暴露した本明細書に記載のナノ粒子は、種々の癌療法プロトコールと組み合わせて用いることができる。そのようなプロトコールは、外科、放射線外科、化学療法、細胞増殖抑制剤、細胞毒性薬の投与を含む治療、ターゲティング療法、ワクチン、および癌を治療するためのあらゆる他の生物学的または無機生成物からなる群から選ぶことができる。本発明の熱感受性リポソームは、本明細書に記載のナノ粒子と共に、目的とするあらゆる治療的分子、特に癌を治療するためのあらゆる既知の生物学的または無機生成物を封入することができる。

【0107】

本明細書に記載のナノ粒子は、さらに放射線療法のための文脈で用いることができる。観察された治療効果の増大は、一部、本発明の熱感受性リポソームによるその輸送、次いでその放出制御によって可能となる標的部位上の有効なナノ粒子の濃度の増加による。

【0108】

本発明を用いて、あらゆる種類の悪性腫瘍、例えば血液学的腫瘍もしくは悪性腫瘍、および特に上皮、神経外胚葉、もしくは間葉起源の固形腫瘍を治療することができる。さらに、本明細書に記載のリポソームを用いて、放射線療法が伝統的に使用および/または適用される前癌状態の病変または特定の良性疾患を治療することができる。

【0109】

該腫瘍または癌は、放射線療法が伝統的治療である癌でありうる。そのような癌は、特に皮膚癌（AIDS関連悪性新生物、メラノーマを含む）；中枢神経系腫瘍（脳、幹脳、小脳、下垂体、脊柱管、眼、および眼窩を含む）；頭部および頸部腫瘍；肺癌；乳癌；消化管腫瘍、例えば肝癌および肝胆道癌、結腸癌、直腸癌、および肛門癌、胃癌、膵臓癌、食道癌；男性の泌尿生殖器腫瘍、例えば、前立腺癌、精巣癌、陰茎癌、および尿道癌；婦人科の癌、例えば、子宮頸癌、子宮内膜癌、卵巣癌、卵管癌、膣癌、および外陰癌；副腎腫瘍および後腹膜膿瘍；局在性に関わらず骨および軟部組織の肉腫；リンパ腫；骨髄腫；白血病；および小児腫瘍、例えばウィルムス腫瘍、神経芽細胞腫、中枢神経系腫瘍、ユーイング肉腫などからなる群から選ばれうる。

【0110】

本発明は、治療の文脈において、原発腫瘍もしくは二次的侵襲、局所もしくは遠隔転移に、また、予防の文脈において、二次的悪性中枢神経系合併症、例えばメラノーマ、肺癌、腎臓癌、乳癌などから観察される侵襲（転移）を避けるために適用することができる。

【0111】

熱感受性リポソームは、抗癌治療期間を通していつでも用いることができる。熱感受性リポソームは、例えば、ネオアジュバント（癌を切除するための外科的介入前）またはアジュバント（外科手術後）として投与することができる。

熱感受性リポソームは、外科的に除去することができない進行腫瘍に用いることもできる。

【0112】

熱感受性リポソームの反復注射または投与は適宜行うことができる。

【0113】

10

20

30

40

50

診断的使用

ナノ粒子の制御送達は、*in vivo*画像化および/または診断目的にも望ましく、今や該ナノ粒子を本発明にしたがって熱感受性リポソームに封入することにより可能である。

【0114】

本明細書において本発明者らは、好ましくは対象をエネルギーの外部供給源に暴露したときに、対象中の異常組織もしくは細胞、特に腫瘍細胞の存在を検出するための診断用組成物を製造するための、本発明の熱感受性リポソーム、特に本明細書に記載のナノ粒子または本明細書に記載の同じまたは異なるナノ粒子のポピュレーションを含む熱感受性リポソームの使用を開示する。

【0115】

本発明の目的は、対象をエネルギーの外部供給源に暴露したときに、対象の異常細胞を検出または可視化するための、例えば本明細書に記載のおよび/または本明細書に記載の方法により得ることができる熱感受性リポソームである。

【0116】

診断用物質は、先に記載の高電子密度物質および磁性物質から選ぶことができる。

ナノ粒子を異常組織または細胞を検出または可視化するための診断薬として用いる場合は、そのコアは好都合には画像化物質からなる。

そのような画像化物質は、好都合には、あらゆる磁性物質、例えば先に記載の酸化第一鉄および酸化第二鉄から選ぶことができる。例えば、本発明に用いるナノ粒子は、MRIで可視的な $\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (磁赤鉄鉱) または Fe_3O_4 (磁鉄鉱) でできたコアを有する。

画像化物質も、断層像影装置 (CTスキャナー) 下で可視的なあらゆる高電子密度物質、例えば HfO_2 または Au から選ぶことができる。

【0117】

画像化目的では、先に記載のターゲッティング基のナノ粒子への付加が好ましい。

【0118】

本発明の別の目的は、以下を含む、対象または疾患に罹っていることが疑われる患者において標的細胞を検出または可視化する方法 (疾患、特に癌の診断を可能にする) に関する: a) 疾患に罹患した患者に熱感受性リポソームまたは該熱感受性リポソームを含む例えば本明細書に記載の組成物を投与し、b) ナノ粒子を局所放出させ、次いで細胞、特に標的細胞との相互作用を可能にするために、目的とする領域を T_m または T_m 以上に加熱し、c) 次いで、該対象を、本明細書に記載の活性化供給源に暴露し、該暴露は、患者の標的細胞の検出または可視化を可能にする。

【0119】

特定の態様において、本明細書に記載の熱感受性リポソームは、細網内皮系 (RES) により認識されるのを避けながら、血流中に標的ナノ粒子 (特に、腫瘍細胞を特異的に認識することができるナノ粒子) を輸送することができる。

【0120】

腫瘍塊が存在する場合は、 T_m または T_m 以上で熱感受性リポソームから放出されたナノ粒子は、腫瘍に入り、標的癌細胞と相互作用する。ナノ粒子の蓄積は、磁性ナノ粒子についてMRIで可視的なシグナル変動 (perturbation) を引き起こすか、または高密度ナノ粒子を用いるとCTスキャナーシグナルが増加する。

腫瘍塊がなければ、ナノ粒子は、腎臓を介して血流から排除され、シグナル増加や変動は検出または可視化されないだろう。

【0121】

さらに本明細書において本発明者らは、対象の標的部位、特に腫瘍およびその微小環境から標的部位の表現型検査に用いることができるタンパク質を回収するための診断用組成物を製造するための、本発明の熱感受性リポソーム、特に、本明細書に記載のナノ粒子または本明細書に記載の同じまたは異なるナノ粒子のポピュレーションを含む熱感受性リポソームの使用を開示する。

【0122】

10

20

30

40

50

本発明の別の目的は、以下を含む、対象または患者における標的部位から（特に該標的部位の表現型検査を可能にする）タンパク質を回収する方法に関する：a)疾患に罹っている患者に熱感受性リポソームまたは該熱感受性リポソームを含む例えば本明細書に記載の組成物を投与し、b)標的部位でのナノ粒子の放出、次いで該標的部位とその相互作用を可能にするために熱感受性リポソームを T_m または T_m 以上に加熱し、c)次いで、該標的部位のタンパク質で被われたナノ粒子を回収する。

【0123】

先の方法は、さらに、血中へのナノ粒子の放出を可能にするために熱感受性リポソームを T_m または T_m 以上に加熱する工程、および血液タンパク質と標的部位由来のタンパク質を比較するために血液タンパク質で被われたナノ粒子を回収する工程を含むことができる。

10

このアプローチは、伝統的バイオプシーに比べて好都合な非侵襲性技術を構成する。

【0124】

本明細書に記載の熱感受性リポソームは、特定患者の癌病期に関する情報を提供し、癌専門医が、この患者のための最も適切な治療を選択し、特定の治療の効果を追跡するのを助けることができるので、個別療法に用いることができる診断手段である。

本明細書に記載の熱感受性リポソームは、さらに、特定の治療に対する腫瘍の反応を評価し、患者の臨床的結果（進行無しの生存）を予測する情報を提供することができる。

【0125】

この特定の適用のために、上記のあらゆるナノ粒子を用いることができる。ナノ粒子は、優先的に先に記載の磁性コア（例えば Fe_2O_3 または Fe_3O_4 ）できている。

20

【0126】

腫瘍を表現型検査するには、カップリング基とともにコーティングを含むナノ粒子を用いるのが好ましい。そのようなカップリング基は、スクシンイミジルエステル、マレイミド、およびそのあらゆる混合物から好都合に選ぶことができる。この基は、タンパク質上に通常存在するアミノ基およびカルボキシル基と共有結合を生じるだろう。

【0127】

具体的態様において、本明細書に記載の熱感受性リポソームは、細網内皮系 (RES) による認識を避けながら、血液循環中にカップリング基と共にコーティングを含むナノ粒子を輸送することができる。

T_m または T_m 以上で熱感受性リポソームから放出されるナノ粒子は、標的部位のタンパク質と相互作用する。該タンパク質のポピュレーションで被われたナノ粒子は、尿中に回収することができる。次に、尿試料を処理してナノ粒子を濃縮し、次いで、タンパク質の酵素的消化およびペプチド断片の分析後に例えば質量分析を用いてタンパク質ポピュレーションを分析することができる。あるいはまた、磁性ナノ粒子を例えば磁気回収装置を用いて標的部位から回収することができる。

30

【0128】

本発明の別の目的は、例えば本明細書で先に記載の、および/または本明細書に記載の方法により行うことができる熱感受性リポソームを、好ましくは医薬的に許容される賦形剤、ピークル、または担体と共に含む治療用または診断用組成物である。

【0129】

診断用組成物は、特に診断と治療を同時に行う場合は、医薬組成物と組み合わせるか、または医薬組成物と同化させることができる。後者の状況では、一般的に、同じナノ粒子を治療薬および診断薬として用いる。

40

【0130】

該組成物は、液体（サスペンション中の粒子）、ゲル、ペーストなどの形でありうる。好ましい組成物は、好ましくは液体形の注射可能製剤の形である。

【0131】

用いる賦形剤、ピークル、または担体は、この種の適用のためのあらゆる伝統的支持体、例えば生理食塩水、等張、無菌緩衝溶液などでありうる。組成物は、安定化剤、甘味料、界面活性剤なども含むことができる。組成物は、既知の医薬製剤技術を用いて、例えば

50

、アンプル、ボトル、フラスコとして製剤化することができる。

【0132】

本発明の組成物中のナノ粒子の濃度は、特に、意図する用途、患者対象、標的細胞の性質、および選択した投与経路に応じて当業者が容易に調整するだろう。

【0133】

医薬組成物は、さらに、疾患、例えば癌を治療することも意図したさらなる治療的化合物（本明細書に記載のナノ粒子またはナノ粒子のポピュレーションと異なる）を含むことができる。このさらなる治療的化合物は、ナノ粒子とともにリポソームに封入することができる。

【0134】

本発明は、さらに、あらゆる1またはそれ以上の本明細書に記載の熱感受性リポソームまたは組成物を含むキットを提供する。典型的には、該キットは、本発明の少なくとも1の熱感受性リポソームまたは熱感受性リポソームのポピュレーションを含む。一般的には、該キットは、本発明の医薬用または診断用組成物の1またはそれ以上の成分を充填した1またはそれ以上の容器も含む。そのような容器に付随して、該生成物を用いるための指示を与える注意書きラベルを、本発明の方法に従って熱感受性リポソーム、熱感受性リポソームのポピュレーション、または組成物を用いるために提供することができる。

【0135】

本発明の他の局面および利点は、例示目的であって限定のためではない下記実施例において明らかになるだろう。

【実施例】

【0136】

実施例1：5nmサイズのナノ粒子の製造

中心サイズ分布が5nmの酸化鉄ナノ粒子を、第一鉄および第二鉄イオンの共沈殿により合成する（出典：US4329241；Bacri et al., J. Magn. Magn. Mat., 1986；62：36 - 46）。

簡単には、イオン強度が制御された反応媒質は、pH12に維持した硝酸ナトリウム3Mの溶液からなる。Fe(III)/Fe(II)のモル比が2に等しい第一鉄および第二鉄イオンの3M硝酸ナトリウム溶液を調製し、混合下で反応媒質に徐々に加えると、急速に黒色になる。次に、全溶液を混合下、周囲温度で一夜熟成させる。

【0137】

次に、フェライトナノ粒子を磁石上で沈殿させ、反応媒質を排除するために上清を除去する。次に、ナノ粒子表面のペプチゼーション（酸性化）および酸化を、活発な混合下、室温で硝酸HNO₃ 2M溶液中でペレットを希釈することにより行う。

【0138】

ナノ粒子のコアの酸化は、活発な混合下、上昇した温度（>90℃）で硝酸第二鉄の溶液中で該ペレットをインキュベーションすることにより行う。次に、ナノ粒子を遠心分離して洗浄する。

【0139】

酸化鉄が150g/Lの濃度に達するように、ペレットを最終的に酸性水で希釈する。該溶液を超音波処理してホモゲナイズし、次いでpHをpH₂に調整する。

【0140】

ナノ粒子の形態（サイズおよび形状）を透過型電子顕微鏡で観察した（図2A）。酸化鉄ナノ粒子の結晶構造をX線回折分析により確認した。

実施例2：30nmサイズの酸化鉄ナノ粒子の製造

【0141】

中心サイズ分布が30nmの酸化鉄ナノ粒子を、第一鉄イオンの沈殿、次いで沈殿物の酸化により合成する。

【0142】

水性反応媒質を、室素流の連続的パブリング下、pH8で維持した。塩化第一鉄溶液と水酸化ナトリウム溶液を調製し、反応媒質に同時に加えた。該溶液は緑色になり、顕著に混

10

20

30

40

50

濁（「白濁」）した。

【0143】

酸化工程を H_2O_2 溶液を加えて行った。該溶液は黒色になり、フェライト物質の形成を示した。 H_2O_2 添加完結後、窒素流を除去した。次に、フェライトナノ粒子を攪拌下、2時間熟成させた。

フェライトナノ粒子を磁石で沈殿させ、上清を除去した。ナノ粒子表面の過塩素酸($HClO_4$)によるペプチゼーションは、 $HClO_4$ 1M溶液でペレットを希釈することにより行った。

【0144】

最終的に、ペプチゼーションしたナノ粒子を蒸留水に懸濁し、180g/LおよびpH2の磁性液を得た。

【0145】

得られた酸化鉄ナノ粒子のサイズと形状を透過型電子顕微鏡で観察した（図2B）。酸化鉄ナノ粒子の結晶構造をX線回折分析で確認した。

実施例3：ナノ粒子の表面処理

【0146】

3.1 ヘキサメタリン酸ナトリウム(HMP)によるナノ粒子の機能化

ヘキサメタリン酸ナトリウムのサスペンションを実施例1から得られる酸化鉄ナノ粒子のサスペンションに加え（加えたヘキサメタリン酸ナトリウムの量はLD50/5以下である）、該サスペンションのpHを6~8を含むpHに調整する。電子表面荷電（ $< -20mV$ ）を、6~8を含むpHの水性媒質中にナノ粒子を懸濁した0.2~2g/Lの濃度のナノ粒子サスペンションを用い、633nm HeNeレーザーを用いるZetasizer NanoZS(Malvern Instruments)によるゼータ電位測定により測定する。

【0147】

3.2 シリカによるナノ粒子の機能化

第一シリカ飽和（注入）を粒子溶液にケイ酸ナトリウムを加えて行う（240mL蒸留水中、実施例2由来の粒子1gを780 μ L）。残ったケイ酸ナトリウムを水に対して遠心分離して除去する。粒子125mgを、0.6mモルのテトラオルトシリケートを含む水/エタノール(1/4)溶液に分散させる。シリカ前駆体の加水分解および凝縮をバルクにアンモニウム溶液を加えて促進する。溶液を一夜インキュベーションし、次いで粒子を蒸留水中で遠心分離して洗浄する。コートした粒子を水中に保つ（pHを約7.4に調整する）。

電子表面荷電（ $< -20mV$ ）を6~8を含むpHの水性媒質中にナノ粒子を懸濁した0.2~2g/Lの濃度のナノ粒子サスペンションを用い、633nm HeNeレーザーを用いるZetasizer NanoZS(Malvern Instruments)によるゼータ電位測定により測定する。

【0148】

3.3 2-[メトキシ(ポリエチレンオキシ)プロピル]トリメトキシシラン；90% 6-9 PE-単位(PEO-シラン)によるナノ粒子の機能化

酸性媒質中で触媒された加水分解-縮合プロセスの結果、PEO-シランを、酸化鉄ナノ粒子表面（実施例1のナノ粒子）上に共有結合グラフトさせる。PEO-シランのサスペンションを、実施例1で得られる酸化鉄ナノ粒子に加える。典型的には、PEO-シラン(92% wt)溶液246 μ Lを、酸化鉄、75g/Lのナノ粒子溶液2mLに加える。次に、該溶液のpHを6~8を含むpHに調整する。

電子表面荷電（ $+8mV$ ）を6~8を含むpHの水性媒質中にナノ粒子を懸濁した0.2~2g/Lの濃度のナノ粒子サスペンションを用い、633nm HeNeレーザーを用いるZetasizer NanoZS(Malvern Instruments)によるゼータ電位測定により測定する。

実施例4：ナノ粒子を含むリポソームの製造

【0149】

4.1 荷電が $-20mV$ 以下であるナノ粒子を含む「熱感受性リポソーム」(TSL)

ナノ粒子含有リポソームを、脂質フィルム再水和法を用いて製造する(Bangham et al., J. Mol. Bio., 1965; 13: 238 - 252; Martina et al., J. Am. Chem. Soc., 2005; 127: 10676 - 10685)：

10

20

30

40

50

a) 脂質をクロロホルム中で可溶化する。最後にクロロホルムを窒素流下で蒸発させる。脂質フィルムの再水和を実施例3.1に記載の酸化鉄溶液2mLを用いて55℃で行い、脂質濃度を50mMとする。

以下の脂質組成物を用いる：ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、水素添加ダイズホスファチジルコリン(HSPC)、コレステロール(Chol)、およびペグ化ジステアリルホスファチジエタノールアミン(DSPE - PEG2000) (モル比100 : 33 : 27 : 7(DPPC : HSPC : Chol : DSPE - PEG2000))。

b) 試料を液体窒素および55℃に調節した水浴に連続的に入れることにより凍結 - 解凍サイクルを20回行う。

c) サーモバレル押出機(thermobarrel extruder)(LIPEX(登録商標) Extruder、Northern Lipids)を用いて、制御温度および圧下でナノ粒子含有リポソームのサイズを校正した。すべての場合で、押出は、2~20barの範囲の圧下、55℃で行った。

d) 非封入粒子の分離は、Sephacryl S1000ろ過ゲルを用いるサイズ排除クロマトグラフィにより行う。

e) 溶出プロフィールは、第一鉄イオン/フェナントロリン比色反応(出典：Che et al., Journal of Chromatography B, 1995 ; 669 : 45 - 51、およびNigo et al., Talanta, 1981 ; 28 : 669 - 674)を介するUV可視分光法(Cary 100 Varian分光計)により磁性ナノ粒子を定量することにより決定する。リポソーム含有分画を回収する(図3、第一ピーク)。リポソーム中の酸化鉄濃度は1~2.5g/Lの範囲である。

そのような組成物の T_m は43℃である。

【0150】

4.2 荷電が -20mV以下であるナノ粒子を含む「非熱感受性リポソーム」(NTSL)

工程a)で以下の脂質組成物を用いる以外は先に記載の方法に従った：水素添加ダイズホスファチジルコリン(HSPC)、コレステロール(Chol)、およびペグ化ジステアリルホスファチジエタノールアミン(DSPE - PEG2000) (モル比100 : 65 : 7(HSPC : Chol : DSPE - PEG2000))。

工程a)、b)、およびc)において、脂質フィルムの再水和、解凍サイクル、および押出プロセスは62℃で行う。

【0151】

4.3 荷電が15mV以下のナノ粒子を含む「熱感受性リポソーム」(TSL)

実施例3.3から得られるナノ粒子を用いる以外は先に実施例4.1に記載の方法に従った。

実施例5：ナノ粒子の放出

【0152】

リポソームに封入されたナノ粒子の放出を可視化するため、実施例4.1および4.2で製造したナノ粒子含有リポソームの溶液30μLを水浴中で加熱した。

【0153】

次に、低温TEM観察のため、5μLの各溶液を穴開き炭素コーティング銅グリッド上に沈着させ；過剰な液を濾紙で吸い取り、グリッドを液体窒素で冷却した液体エタン浴中に入れた。試料を約 -170℃の温度に維持し、観察した。

【0154】

図4Aおよび4Bは、水浴中で60℃に加熱する前と加熱後の、球状で230nmサイズの酸化鉄ナノ粒子含有「非熱感受性」リポソーム(NTSL)を示す。

【0155】

図4Cおよび4Dは、水浴中で43℃(T_m)に加熱する前と加熱後の、球状で200nmサイズの酸化鉄ナノ粒子含有「熱感受性」リポソーム(TSL)を示す。

【0156】

図4Eは、水浴中で48℃(T_m 以上)に加熱後の、球状で200nmサイズの酸化鉄ナノ粒子含有「熱感受性」リポソーム(TSL)を示す。

【0157】

図4Fは、室温で熟成後の酸化鉄ナノ粒子(実施例4.3)充填熱感受性リポソームを示す。

【 0 1 5 8 】

図4Gは、43 (T_m)で熟成後の酸化鉄ナノ粒子(実施例4.3)充填熱感受性リポソームを示す。

【 0 1 5 9 】

「非熱感受性」リポソーム(NTSL)では、加熱前後の両方に完全な230nmサイズのリポソームがみられる(図4Aおよび4B)。

【 0 1 6 0 】

「熱感受性」リポソーム(TSL)では、図4Cの加熱前に完全な200nmサイズのリポソームがみられる。

【 0 1 6 1 】

それに対して、図4Dの $T_r=43$ および図4Eの $T_r=48$ で加熱後、200nmサイズのリポソームは、修飾された形状(図4E、白矢印)、および二重層の破壊を示し;脂質二重層のいくらかの断片もみることができる。いくつかの写真は、加熱後にもはや完全な脂質膜がみられない小胞を示し、酸化鉄ナノ粒子は脂質小胞周囲に局在している(図4D)。遊離酸化鉄ナノ粒子は、しばしばグリッド上にみられる。ナノ粒子の放出は、温度 $T_r = T_m = 43$ または温度 T_m 以上(48)でみられる。荷電ナノ粒子と脂質二重層の相互作用(図4E、黒矢印)は、この驚くべき結果を説明することができた。

10

【 図 1 】

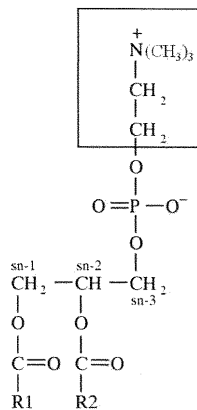


FIGURE 1

【 図 2 】

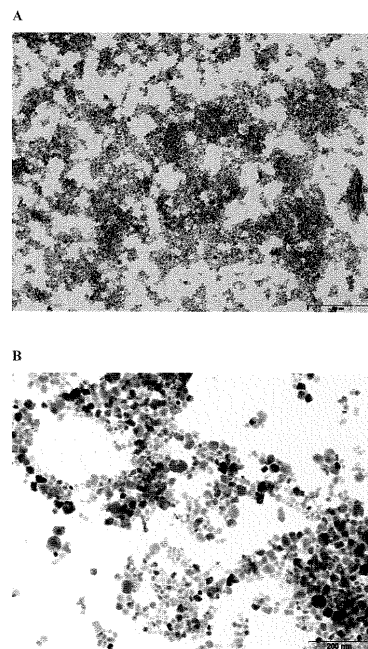


FIGURE 2

【 図 3 】

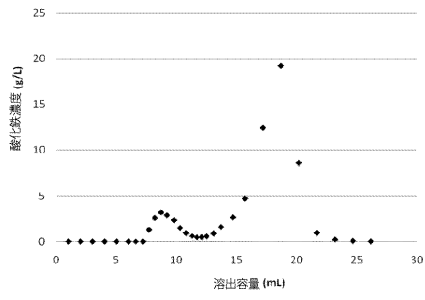
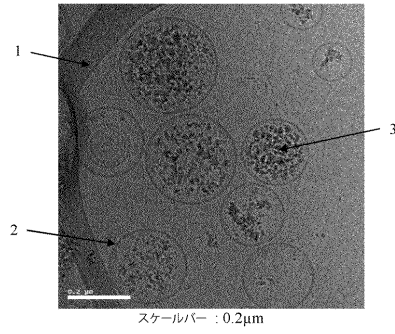


FIGURE 3

【 図 4 - 1 】

A



B

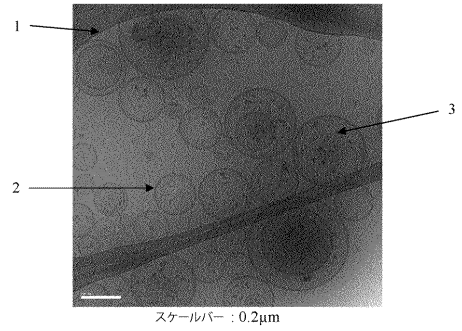
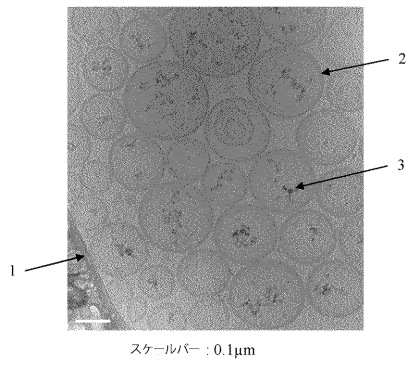


FIGURE 4

【 図 4 - 2 】

C



D

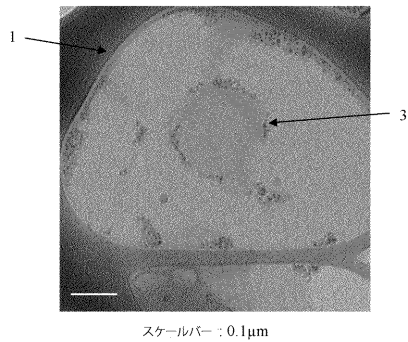
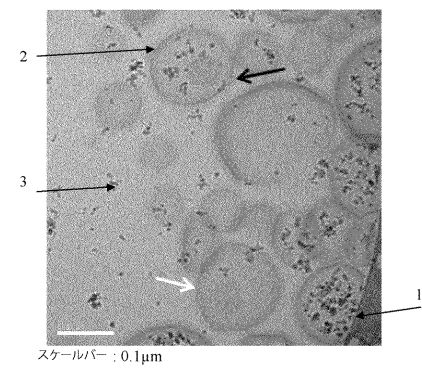


FIGURE 4 (続き)

【 図 4 - 3 】

E



F

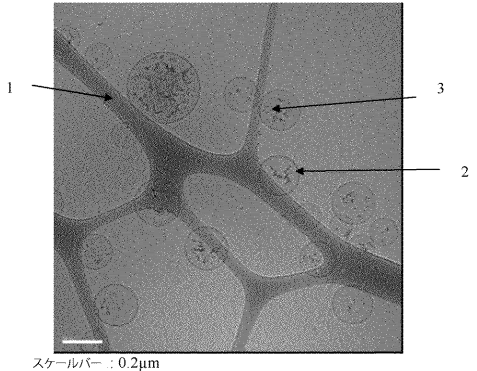


FIGURE 4 (続き)

【図 4 - 4】

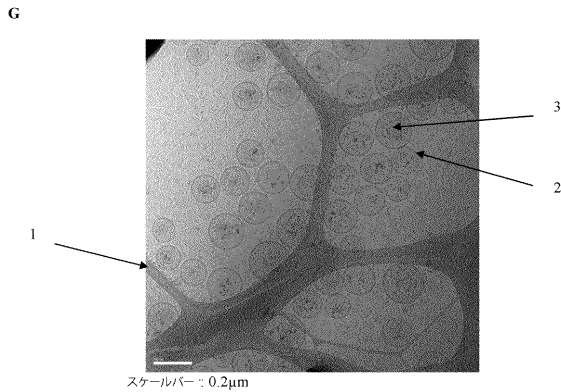


FIGURE 4 (続き)

【手続補正書】

【提出日】平成29年5月9日(2017.5.9)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ゲル - 液晶相転移温度(T_m)または T_m 以上で破壊される熱感受性リポソームであって、該リポソームが少なくともホスファチジルコリンを含む熱感受性脂質膜を含み、該熱感受性脂質膜がナノ粒子を封入し、該ナノ粒子が治療薬または診断薬として用いることができ、

各ナノ粒子が、i)最大寸法が100nm未満の無機コアを含み、ii)該ナノ粒子の表面に - 20 mV以下または + 20mV以上の静電気が存在する原因となる物質で完全にコートされており、

無機コアが、オキシドまたはオキシドの混合物で構成される場合、該物質が、オキシド、ヒドロキシド、およびオキシヒドロキシドから選ばれる無機コーティング、または2つの基RおよびXを有する有機分子(ここで、Rは、ホスフェートおよびカルボキシレートから選ばれ、Xは、カルボキシレート、シラン、ホスホニック、ホスホリックおよびホスフェートから選ばれる)のいずれかであり、

無機コアが、金属で構成される場合、該物質が、オキシド、ヒドロキシド、およびオキシヒドロキシドから選ばれる無機コーティングまたは2つの基RおよびXを有する有機分子(ここで、Rは、アミンおよびカルボキシレートから選ばれ、Xは、チオールである)のいずれかであり、該静電気が、サスペンション中のナノ粒子の濃度が0.2~8g/Lである場合にpH6~8の水性媒質中でゼータ電位測定により測定される、熱感受性リポソーム。

【請求項 2】

金属が、金または銀である、請求項 1 に記載の熱感受性リボソーム。

【請求項 3】

該熱感受性脂質膜がさらにコレステロールを含む請求項 1 または 2 に記載の熱感受性リボソーム。

【請求項 4】

該熱感受性脂質膜が、ジパルミトイルホスファチジルコリン、水素添加ダイズホスファチジルコリン、コレステロール、およびジステアリルホスファチジエタノールアミン - メトキシポリエチレングリコールを含む請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 つに記載の熱感受性リボソーム。

【請求項 5】

該熱感受性脂質膜が、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジステアリルホスファチジエタノールアミン - メトキシポリエチレングリコール、およびモノパルミトイルホスファチジルコリンもしくはモノステアリルホスファチジルコリンを含む、請求項 1 に記載の熱感受性リボソーム。

【請求項 6】

該ナノ粒子が、さらにスクシンイミジルエステルおよびマレイミド基から選ばれるカップリング基を含む請求項 1 に記載の熱感受性リボソーム。

【請求項 7】

該ナノ粒子が、さらに、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド、タンパク質、核酸、ホルモン、ビタミン、酵素、腫瘍抗原のリガンド、ホルモンレセプター、サイトカインレセプター、および成長因子レセプターから選ばれるターゲティング基を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 つに記載の熱感受性リボソーム。

【請求項 8】

該リボソームの最大サイズが 50 ~ 500nm である、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 つに記載の熱感受性リボソーム。

【請求項 9】

該リボソームの最大サイズが 50 ~ 250nm である、請求項 8 に記載の熱感受性リボソーム。

【請求項 10】

該リボソームの破壊が該荷電ナノ粒子の放出をもたらす、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 つに記載の熱感受性リボソーム。

【請求項 11】

T_m が 39 ~ 45 である、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 つに記載の熱感受性リボソーム。

【請求項 12】

ナノ粒子を治療薬として用いるときの、各ナノ粒子のコアの最大寸法が 5nm ~ 100nm である、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 つに記載の熱感受性リボソーム。

【請求項 13】

ナノ粒子を治療薬として用いるときの、各ナノ粒子のコアの最大寸法が 10nm ~ 50nm である、請求項 12 に記載の熱感受性リボソーム。

【請求項 14】

ナノ粒子を診断薬として用いるときの、各ナノ粒子のコアの最大寸法が 2nm ~ 10nm である、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 つに記載の熱感受性リボソーム。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 つに記載の熱感受性リボソームおよび医薬的に許容される担体を含む治療または診断用組成物。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K	47/64 (2017.01)	A 6 1 K	47/64
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 K	47/68
A 6 1 K	47/59 (2017.01)	A 6 1 K	47/59
A 6 1 K	49/00 (2006.01)	A 6 1 K	49/00
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 K	33/24 (2006.01)	A 6 1 K	33/24
A 6 1 K	33/38 (2006.01)	A 6 1 K	33/38
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02
A 6 1 K	47/04 (2006.01)	A 6 1 K	47/04
B 8 2 Y	5/00 (2011.01)	B 8 2 Y	5/00

(72)発明者 ローラン・レヴィ
フランス7 5 0 1 4パリ、ブルヴァール・ラスパイユ2 4 6番

(72)発明者 マリー - エディス・メール
フランス、エフ - 7 5 0 1 2パリ、ブルヴァール・スール6 5番

(72)発明者 マテュー・ジェルマン
フランス、エフ - 9 4 5 0 0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番
、パティマン4

Fターム(参考) 4C076 AA19 AA95 CC27 DD06 DD21 DD25H DD26H DD27H DD29 DD41H
DD49H DD56H DD63 DD70 EE23 EE30 EE41 EE59 EE60 FF16
4C085 HH03 HH05 JJ05 KB01 KB02 KB07 KB08 LL18
4C086 AA01 AA02 AA10 HA01 HA11 MA03 MA05 MA24 NA13 ZB26
ZB27 ZC75

【 外国語明細書 】

WO 2012/104275

1

PCT/EP2012/051507

NANOPARTICLES DELIVERY SYSTEMS, PREPARATION AND USES THEREOF.**FIELD OF THE INVENTION**

The present application relates to nanoparticles delivery systems allowing their
5 controlled release, in particular to thermosensitive liposomes disrupting at T_m (gel-to-liquid
crystalline phase transition temperature) or above T_m , which can be used in the health sector,
in particular in human health.

The thermosensitive liposomes of the invention comprise a thermosensitive lipidic membrane
encapsulating nanoparticles the electrostatic surface charge of which is advantageously below
10 -20 mV or above + 20 mV when measured in an aqueous medium at physiological pH. The
encapsulated nanoparticles can be used as a therapeutic or as a diagnostic agent.

The invention also relates to pharmaceutical and diagnostic compositions comprising
nanoparticles delivery systems as defined previously, as well as to their uses.

15 BACKGROUND

Limitation of traditional medical treatment using therapeutic or diagnostic agent is the lack of
specificity. Indeed, in most cases, only a small fraction of the administered dose of
therapeutic or diagnostic agent reaches the site of interest, whilst the rest of the agent is
20 distributed throughout the body. This unavoidable distribution into healthy organs and tissue
limit the agent's amount that can be administered to a patient, and in turn prevents this agent
from achieving the therapeutic or diagnostic effect it is capable of.

The need of site specific agent delivery vehicles that would not only increase the amount of
agent reaching the intended site but would also decrease the amount being delivered to other
25 healthy parts of the body has been recognized for a long time, in particular for toxic
chemotherapeutic drugs. Such vehicles capable of reducing or even eliminating side effects
would make the treatment considerably less toxic and more effective. Liposomes have a
decade-long clinical presence as nanoscale delivery vehicles for therapeutic and diagnostic
agents.

30 The biggest challenge facing any agent delivery vehicles is to allow the complete release of
the encapsulated agents from the vehicle specifically at the diseased site and at controllable
rate.

WO 2012/104275

2

PCT/EP2012/051507

Moreover, the use of liposomes as delivery vehicles for nanoparticles is still in the preclinical development stages, in particular in the context of externally activable nanoparticles (Al-Jamal W.T. et al. *Nanomedicine*, 2007; 2:85-98).

- 5 The preparation of liposomes formulated with PEG-lipids containing either a fusogenic or a pH sensitive lipid to promote destabilization of endosomal membranes and favour quantum dots (QD) cytoplasmic release has been described *in vitro* (Sigot et al. *Bioconjugate Chem.* 2010; 21:1465-1472). PEG-lipid dissociation from the liposome can be facilitated by incorporating fusogenic PEG-lipids with a short acyl chain promoting transfer from the
10 liposome to the bilayer within minutes. Alternatively, PEG-lipid can be intracellularly released by adding a cleavable, pH-sensitive PEG analogue in which the polymer moiety is cleaved from the liposome surface upon exposure to the acidic environment of certain endosomal compartments. Whilst such 'spontaneous' release can be advantageous (especially for the treatment of distant metastases), since it relies solely on the local environment,
15 liposome content release can still be slow and may not occur at all if the environment is not optimal. The precise control of the liposome's content release is therefore not possible with such liposomes.

- The preparation of liposomes comprising a photosensitizer has further been described (US
20 2010/0233224). The photosensitizer is capable of oxidizing the unsaturated phospholipids of the liposome's membrane when exposed to light and oxygen through peroxidation of lipid chains. Photo-oxidation of liposomes can be triggered to release their load on-demand and rapidly through an external light stimulus. The oxidation is responsible for the liposome's membrane failure and for the subsequent release of the liposome's content. However, such a
25 light source can only be used where the targeted tissue is superficially accessible. Liposomes incorporated into deeper tissues cannot be stimulated by light. Liposomes comprising a photosensitizer can therefore not be used to deliver nanoparticles to deep organs or structures of the human body.

- 30 Laser activable hollow metal nanostructures have also been used in the past as a means to trigger the permeabilization of the liposome's membrane into which they were encapsulated in order to allow the selective release of a drug (WO 2009/097480).

WO 2012/104275

3

PCT/EP2012/051507

US 2009004258 describes thermosensitive liposomes encapsulating paramagnetic iron oxide nanoparticles and drugs, the paramagnetic iron oxide nanoparticles allowing the specific or selective release of drugs in a targeted environment under activation by an alternative magnetic field. These liposomes however are not permeable to the encapsulated
5 nanoparticles.

Inventors now herein provide advantageous systems allowing the safe *in vivo* delivery, and controlled and efficient release, of nanoparticles in a subject.

These systems in particular allow the delivery and release of externally activable
10 nanoparticles in deep structures of the human body. Examples of efficient activable nanoparticles, usable as diagnostic and/or as therapeutic tools, were described by inventors in WO2007/118884, WO 2009/147214 and WO2011/003999.

SUMMARY OF THE INVENTION

15

Inventors herein provide a thermosensitive liposome disrupting at T_m or above T_m , wherein the liposome comprises a thermosensitive lipidic membrane encapsulating nanoparticles, the “electrostatic surface charge” (also herein identified as “charge” or “surface charge”) of nanoparticles being below -20 mV or above + 20 mV when measured in an aqueous medium
20 at physiological pH (between 6 and 8), and the nanoparticles being usable as a therapeutic or as a diagnostic agent.

Inventors further herein provide therapeutic and diagnostic compositions comprising a thermosensitive liposome according to the present invention and a pharmaceutically
25 acceptable carrier.

In another aspect, the present disclosure provides kits comprising any one or more of the herein-described products, i.e., thermosensitive liposomes and compositions, together with a labeling notice providing instructions for using the product(s).
30

The thermosensitive liposomes according to the present invention are advantageously capable of protecting nanoparticles from their biological environment and in particular from a premature capture or opsonization by the mononuclear phagocyte system also herein identified as reticulo endothelial system (RES).

WO 2012/104275

4

PCT/EP2012/051507

The liposomes according to the present invention therefore allow the delivery and release of intact nanoparticles upon thermal activation (thermal activation may be reached via a temperature physiological increase or through external activation using for example ionizing radiations or High Intensity Focused Ultrasounds). Once released on the desired site, the nanoparticles may function as a therapeutic or as a diagnostic agent, optionally through external activation, as will be further explained below.

The herein described thermosensitive liposomes are further advantageously capable of delivering nanoparticles to desired sites, in particular to deep sites or structures, of the subject's body through the vascular route.

A precise and efficient control of the nanoparticles release is (in addition to delivery) now also possible. The release of nanoparticles from the herein described thermosensitive liposomes has been demonstrated by inventors for a temperature T_r equal to T_m or above T_m . Interactions between nanoparticles and the lipidic bilayer, responsible for the liposome membrane disruption (membrane physical breakdown, rupture or failure), could explain this surprising result (see Figure 4E, black arrow).

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1: Schematic structure of a phosphatidylcholine molecule.

Figure 1 shows the phospholipid molecule structured around the glycerol backbone: *sn-1* and *sn-2* chains being substituted on the acyl group by long hydrocarbon chains (R1 and R2, comprising at least 9 carbon atoms), and *sn-3* chain comprising a polar head with a choline group ($N(CH_3)_3^+$) and a phosphate group (PO_4^-), conferring a zwitterionic character to the molecule.

Figures 2A and 2B: Transmission electron microscopy (TEM) images of iron oxide nanoparticles.

Figure 2A shows TEM observations of 5 nm-sized iron oxide nanoparticles (see example 1) (scale bar = 200 nm).

Figure 2B shows TEM observations of 30 nm-sized iron oxide nanoparticles (see example 2) (scale bar = 200 nm).

WO 2012/104275

5

PCT/EP2012/051507

Figure 3: Typical elution profile obtained for iron oxide-containing liposomes.

Figure 3 shows elution profile for iron oxide-containing liposomes determined by quantification of magnetic nanoparticles by UV-visible spectroscopy (Cary 100 Varian spectrometer) via colorimetric reaction between ferrous ions and phenanthroline. Liposomes-
5 containing fractions are collected. The concentration of iron oxide in liposomes ranges from 1 to 2.5 g/L.

Figures 4: Cryo-TEM observations of nanoparticles-containing liposomes.

Arrow 1 shows the limitation of the cryo-TEM grid holes.

10 Arrows 2 and 3 respectively shows the liposome membrane and the iron oxide nanoparticles.

Figure 4A shows non thermosensitive liposomes loaded with iron oxide nanoparticles (example 4.2) aged at room temperature

Figure 4B shows non thermosensitive liposomes loaded with iron oxide nanoparticles (example 4.2) aged at 60°C.

15 Figure 4C shows thermosensitive liposomes loaded with iron oxide nanoparticles (example 4.1) aged at room temperature.

Figure 4D shows iron oxide nanoparticles released from thermosensitive liposomes after aging at 43°C (T_m) (example 4.1).

20 Figure 4E shows iron oxide nanoparticles released from thermosensitive liposomes after aging at 48°C (above T_m) (example 4.1).

Figure 4F shows shows thermosensitive liposomes loaded with iron oxide nanoparticles (example 4.3) aged at room temperature.

Figure 4G further shows thermosensitive liposomes loaded with iron oxide nanoparticles (example 4.3) aged at 43°C (T_m).

25

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Inventors herein provide a thermosensitive liposome disrupting at T_m (gel-to-liquid crystalline phase transition temperature) or above T_m. This liposome comprises a
30 thermosensitive lipidic membrane encapsulating nanoparticles usable, in a subject, as a therapeutic or as a diagnostic agent.

Inventors surprisingly observed a disruption of the thermosensitive liposome at T_m or above T_m when the electrostatic surface charge of nanoparticles is below -20 mV or above + 20 mV

WO 2012/104275

6

PCT/EP2012/051507

when measured in an aqueous medium at physiological pH (typically between pH 6 and pH 8). This disruption of the liposome membrane allows the release of the encapsulated charged nanoparticles.

- 5 As used herein, the term "subject" means any organism. The term need not refer exclusively to human being, which is one example of a subject, but can also refer to animals, in particular warm-blooded vertebrates, typically mammals, and even tissue cultures.

LIPOSOMES

10

The term "liposome" refers to a spherical vesicle composed of at least one bilayer of amphipathic molecules which forms a membrane separating an intravesicular medium from an external medium. The intravesicular medium constitutes the internal aqueous core of the liposome. Hydrophilic molecules or components can be encapsulated inside the internal
15 aqueous core of the liposome via active methods of encapsulation known by the skilled person and further herein below described. Hydrophobic molecules or components can be entrapped inside the membrane.

The amphipathic molecules constituting the bilayer are lipids, more particularly phospholipids. The amphipathic characteristic of phospholipid molecules lies in the presence
20 of a hydrophilic head, constituted of a phosphate group and of a glycerol group, and a hydrophobic tail, constituted of one or two fatty acids (see figure 1).

In an aqueous medium, phospholipids tend to self-assemble to minimize contact of the fatty acyl chains with water, and they tend to adopt different types of assembly (micelles, lamellar
25 phase, etc) according to their chemical structure. More particularly, phosphatidylcholines are known to form a lamellar phase consisting in stacked bilayers undergoing a "spontaneous" curvature and finally forming vesicles (Lasic D.D. et al. Adv. Colloid. Interf. Sci. 2001;89-90:337-349). The phospholipidic lamellar phase constitutes a thermotropic liquid crystal. This means that the ordering degree of the amphipathic molecules depends on the temperature.
30 Indeed, a phospholipidic bilayer demonstrates a main phase transition temperature T_m (for temperature of "melting"), corresponding to a transition between the "gel-like" lamellar phase L_β to the "fluid-like" lamellar phase L_α . In the "gel" phase, strong hydrophobic interactions between the carbonated chains of the fatty acids provoke a crystalline ordering of phospholipid molecules: the bilayer is only permeable to small ions. In the "fluid" phase, the

WO 2012/104275

7

PCT/EP2012/051507

hydrophobic tails are moving due to the thermal motion which causes a loss of ordering of the phospholipid molecules and leads to a “liquid crystalline” phase: the bilayer becomes permeable to molecules such as a drug.

5 The “gel-to-liquid crystalline” phase transition temperature T_m depends on the chemical structure of the phospholipid molecule: hydrocarbon chain length, unsaturation, asymmetry and branching of fatty acids, type of chain-glycerol linkage (ester, ether, amide), position of chain attachment to the glycerol backbone (1,2- vs 1,3-) and head group modification.

In the case of phosphatidylcholines, the structure and conformation of fatty acyl chains is of particular relevance (Koynova et al., Biochim. Biophys. Acta 1998;1376:91–145).

10 Increasing the chain length of fatty acids increases the main phase transition temperature. For example, it was shown that for saturated diacyl phosphatidylcholines with chain lengths ranging from 9 to 24 carbon atoms, T_m is linearly dependent on $1/n$ (n being the number of carbon atoms in the fatty acyl chains), with T_m increasing from i.e. 41°C for $n=16$ to 80°C for $n=24$.

15 The effect of unsaturation on the main gel-to-liquid crystalline phase transition temperature depends on the conformation (*cis* or *trans* type), the position in the fatty acyl chains and the number of double bonds. For example, introducing a single site of unsaturation of the *cis* type on the *sn*-2 chain only and in both chains of a phosphatidylcholine comprising 18-carbons can have the effect of lowering the chain melting transition temperature by 50°C (from 54.5°C to 3.8°C) and 75°C (from 54.5°C to -21°C), respectively. In contrast, when the double bond is of *trans* type, the effect is considerably lessened. Further, T_m depends critically on the position of the *cis*-double bond. Specifically, T_m is minimized when the double bond is located near the geometric center of the hydrocarbon chain, and progressively increases as the double bond migrates toward either end of the chain. These dependencies apply when the double bond is present in the *sn*-2 chain only or in both chains of phosphatidylcholine. Concerning the influence of the number of double bonds, it was shown that by increasing the number of *cis*-unsaturation T_m is decreased. For example, when two or three sites of *cis*-unsaturation are introduced into both acyl chains of a phosphatidylcholine comprising 18-carbons, the chain melting transition temperature is lowered by an impressive 109°C (from 54.5°C to -55.1°C) and 116°C (from 54.5°C to -61.5°C), respectively (Koynova et al., Biochim. Biophys. Acta 1998;1376:91–145).

Mixed-chain phosphatidylcholines present different hydrocarbon chains lengths at the *sn*-1 and *sn*-2 positions. Empirical equations have been derived that allow for accurate prediction

WO 2012/104275

8

PCT/EP2012/051507

of the transition temperatures of related phosphatidylcholines of defined structure. A normalized chain-length inequivalence parameter, $\Delta C/CL$, has been described, where ΔC ($=|n_1-n_2+1.5|$) is the effective chain-length difference, and n_1 and n_2 are the number of carbons in the chains at the *sn-1* and *sn-2* positions of the glycerol backbone, respectively. CL is the effective length of the longer of the two chains. For phosphatidylcholines demonstrating the same number of total carbon atoms constituting the two chains ($n_1+n_2=\text{constant}$), the chain melting temperature decreases monotonically when the chain length inequivalence parameter $\Delta C/CL$ is increased to about 0.4. When $\Delta C/CL$ goes above ca. 0.4, packing perturbation, caused by the methyl ends of the acyl chains, becomes so overwhelming that the asymmetric phosphatidylcholine molecules adopt a new packing arrangement referred to as mixed interdigitation. Upon this rearrangement, T_m increases with chain length asymmetry.

For drug delivery purposes, a sterol component may be included to confer the liposome suitable physicochemical and biological behavior. Such a sterol component may be selected from cholesterol or its derivative e.g., ergosterol or cholesterolhemisuccinate, but it is preferably cholesterol.

Cholesterol is often used in lipidic formulation of liposomes because it is generally recognized that the presence of cholesterol decreases their permeability and protects them from the destabilizing effect of plasma or serum proteins.

The cholesterol molecule contains three well-distinguished regions: a small polar hydroxyl group, a rigid plate-like steroid ring, and an alkyl chain tail. When cholesterol intercalates into the membrane, its polar hydroxyl groups positioned near the middle of the glycerol backbone region of the phosphatidylcholine molecule (Kepczynski M. et al., *Chemistry and Physics of Lipids*, 2008;155:7-15). Incorporation of modifiers as cholesterol into the lipid bilayers changes greatly the structural or physical properties of the liposomal membrane such as its organization, free volume, thickness, fluidity (viscosity) and polarity (hydrophobicity).

The bilayer's viscosity depends on the position of cholesterol within the bilayer which influences the free volume of the membrane and on the temperature. The effect of cholesterol on the bilayer's microviscosity is rather complex. It is well-known that cholesterol increases the apparent microviscosities (reduces fluidity) of membranes being in liquid phase (Cournia et al., *J.Phys.Chem.B*, 2007;111:1786-1801).

Papahadjopoulos *et al.* showed that the protective effect of cholesterol for liposomes depends on the physical state, i.e. "gel" or "fluid", of the lipidic membrane when in contact with

WO 2012/104275

9

PCT/EP2012/051507

serum or plasma. In the gel state, the presence of cholesterol affects the ordering parameter of the phospholipid acyl chains within the bilayer and enhances the release of entrapped molecule. In the fluid state, cholesterol stabilizes the liposomes and prevents leakage of encapsulated material (Papahadjopoulos et al., *Pharm. Research*, 1995;12(10):1407-1416).

- 5 Upon addition of cholesterol in a concentration above 25 molar percentage (mol %), there is a dramatic influence on the gel-to-liquid crystal lipid-phase transition. A new thermodynamically stable region of coexistence between the liquid-disordered (fluid) and solid-ordered (gel) phase is described: the liquid-ordered phase (Cournia et al., *J. Phys. Chem. B*, 2007;111:1786-1801; Polozov et al., *Biophysical Journal*, 2006;90:2051-2061).
- 10 This new phase is characterized by a fluidity which is intermediate between the fluidity of the gel phase and the fluidity of the fluid phase formed by the pure lipids. Recently, it has been proposed that the liquid-ordered phase is formed when cholesterol associates with saturated, high-melting lipids, such as dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and sphingomyelin, to create dynamic complexes in model membranes, so-called "lipid-rafts". Cholesterol promotes
- 15 a phase separation in model membranes where cholesterol-rich and cholesterol-poor microdomains are formed (Radhakrishnan et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2000;97:12422-12427; Mc Connell et al. *Biochim. Biophys. Acta*, 2003;1610:159-173). Indeed, Gaber et al. (*Pharm. Research*, 1995;12(10):1407-1416) showed that two lipidic formulations containing
- 20 33 mol % of cholesterol dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), hydrogenated soybean phosphatidylcholine (HSPC) and cholesterol, in the molar ratio of 100:50:75 and 50:50:50 respectively, do not present a phase transition temperature between 30°C and 65°C ,as demonstrated by differential scanning calorimetry measurements. Liposomes with such a formulation are called « non-thermosensitive » liposomes.
- 25 Typical "thermosensitive" liposomes usable in the context of the present invention (i.e. liposomes with a main phase transition temperature T_m typically comprised between 39°C and 55°C, preferably between 39°C and 50°C, even more preferably between 39°C and 45°C) comprises at least a phosphatidylcholine.
- The phosphatidylcholine may be selected from dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC),
- 30 distearylphosphatidylcholine (DSPC), hydrogenated soybean phosphatidylcholine (HSPC), monopalmitoylphosphatidylcholine (MPPC), monostearylphosphatidylcholine (MSPC) and any mixture thereof.

WO 2012/104275

10

PCT/EP2012/051507

In a preferred embodiment the thermosensitive liposome further comprises distearylphosphatidylethanolamine (DSPE), distearylphosphatidylethanolamine(DSPE)-methoxypolyethylene glycol (PEG) (DSPE-PEG).

In a preferred embodiment, cholesterol is added in a molar ratio inferior to 25 mol %.

5

A preferred thermosensitive lipidic membrane comprises dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), hydrogenated soybean phosphatidylcholine (HSPC), cholesterol and distearylphosphatidylethanolamine(DSPE)-methoxypolyethylene glycol (PEG), for example PEG2000 (DSPE-PEG2000).

10 In a particular embodiment, the molar ratio of the previously identified compounds is preferably 100:50:30:6 or 100:33:27:7.

Another preferred thermosensitive lipidic membrane comprises dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), monopalmitoylphosphatidylcholin (MPPC) and
15 distearylphosphatidylethanolamine(DSPE)-methoxypolyethylene glycol (PEG), for example methoxypolyethylene glycol-2000 (DSPE-PEG2000).

In a particular embodiment, the molar ratio of the previously identified compounds is preferably 100:12:5.

20 Another preferred thermosensitive lipidic membrane comprises dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), monostearylphosphatidylcholine (MSPC), and distearylphosphatidylethanolamine(DSPE)-methoxypolyethylene glycol (PEG), for example methoxypolyethylene glycol-2000 (DSPE-PEG2000).

25 In a particular embodiment, the molar ratio of the previously identified compounds is preferably 100:12:5.

Depending on the mode of preparation, the size and the degree of lamellarity of the vesicles can be tuned. Several methods for preparing unilamellar lipidic vesicles have been described in the literature: reverse phase evaporation (Szoka et al., PNAS, 1978;75(9):4191-4198),
30 ethanol injection (Pons et al., International Journal of Pharmaceutics, 1993;95(1-3):51-56), heating method (Mozafari et al., Journal of Biotechnology, 2007; 129: 604-613), but the most simple is the lipid film hydration method (Bangham et al., J. Mol. Bio., 1965;13:238-252).

Briefly, in the lipid film hydration method, lipids are solubilized in an organic solvent such as chloroform. After homogenization of the solution, the organic solvent is evaporated under a

WO 2012/104275

11

PCT/EP2012/051507

nitrogen stream. The as-obtained dried lipid film is then hydrated by an aqueous medium at a temperature above the main phase transition temperature T_m , leading to the formation of multilamellar vesicles with sizes ranging from 100 to 800 nm (Mills J.K. et al. Methods in Enzymology 2004;387:82-113). Cycles of dehydration and rehydration, by respectively
5 freezing (in liquid nitrogen) and thawing the solution (at a temperature above T_m), allow increasing the aqueous internal volume by forming unilamellar vesicles. A process allowing vesicles size calibration is then applied to obtain a homogeneous size distribution. Sonication produces Small Unilamellar Vesicles (SUV) with size ranging from 20 to 50 nm, whereas extrusion process through a filter membrane produces Large Unilamellar Vesicles (LUV)
10 with size ranging from 50 to 500 nm depending on the size of the filter pores. Both processes, sonication and extrusion, have to be performed at a temperature above T_m .

The largest size of the thermosensitive liposomes according to the present invention is typically comprised between 50 and 500 nm, preferably between 50 and 250 nm, for example
15 between about 50 nm and about 150 nm.

Thermosensitive liposomes used in the present invention preferably comprise a biocompatible coating to ensure or improve their biocompatibility and specific biodistribution.

The biocompatible coating allows or favours the liposomes stability in a biocompatible
20 suspension, such as a physiological fluid (blood, plasma, serum, etc.), any isotonic media or physiologic medium, for example media comprising glucose (5%) and/or NaCl (0.9 %), which is required for a pharmaceutical administration.

Such a biocompatible coating is obtained by treating the liposome with a surface treating agent.

25 Stability may be confirmed by dynamic light scattering measurements of the liposomes in biocompatible suspension.

Said coating advantageously preserves the integrity of the liposome *in vivo*, ensures or improves its biocompatibility, and facilitates its optional functionalization (for example with spacer molecules, biocompatible polymers, targeting agents, proteins, etc.).
30

The coating can be non-biodegradable or biodegradable. Both options can be used in the context of the present invention.

Examples of non-biodegradable coatings are one or more materials or surface treating agents selected in the group consisting of sugar (agarose for example), saturated carbon polymers

WO 2012/104275

12

PCT/EP2012/051507

(polyethylene oxide for example), reticulated or not, modified or not (polymethacrylate or polystyrene for example), as well as combinations thereof.

5 Examples of biodegradable coatings are for example one or more materials or surface treating agents selected from the group consisting of a biological molecule, modified or not, natural or not and a biological polymer; modified or not, of natural shape or not. The biological polymer may be a saccharide, an oligosaccharide or a polysaccharide, polysulfated or not, for example dextran.

10 The aforementioned materials, compounds or surface treating agents can be used alone or in combinations, mixtures or assemblies, composite or not, covalent or not, optionally in combination with other compounds.

15 Thermosensitive liposomes according to the present invention can further comprise a surface component enabling specific targeting of biological tissues or cells. Such a surface component is preferably a targeting agent allowing the liposome interaction with a recognition element present on the target biological structure.

Such targeting agents can act only once the liposomes are accumulated in the tumor.

20 As the conformation of the targeting agent will be responsible for its interaction with the target, the density of said targeting agent is to be controlled carefully according to methods known by the skilled person. A high density thereof can indeed perturb the targeting agent conformation and in consequence its recognition by the target cell (see for example J A Reddy et al. Gene therapy 2002;9:1542; Ketan B. Ghaghada et al. Journal of Controlled
25 Release 2005;104:113). In addition, a high target agent density may favour liposomes clearance by the Reticulo Endothelial System (RES) during circulation in the vasculature.

The coating can also contain different functional groups (or linker segments), allowing any molecule of interest to bind to the surface of the liposome, such as a surface component
30 enabling specific targeting of biological tissues or cells.

WO 2012/104275

13

PCT/EP2012/051507

NANOPARTICLES

The products and compositions of the invention can be used in many fields, in particular in human and veterinary medicine.

- 5 The encapsulated nanoparticle may be used, once released from the thermosensitive liposome, as a therapeutic or as a diagnostic agent and its structure will directly depend from its intended function.

10 The term “nanoparticle” refers to a particle or aggregate of particles, said nanoparticle comprising a core (or central core) and a coating, the largest dimension of the core being less than about 100 nm. Typically, the largest dimension of the core of the nanoparticle is the diameter of a nanoparticle of round or spherical shape, or the longest length of a nanoparticle of ovoid or oval shape.

15 The terms “size of the nanoparticle” and “largest size of the nanoparticle” herein refers to the “largest dimension of the core of the nanoparticle”.

The “core” can designate a single particle (crystal or crystallite) or an aggregate of particles (aggregate of crystal or crystallites).

20 Transmission Electron Microscopy (TEM) or cryoTEM can be advantageously used to measure the size of the core of the nanoparticle especially when the core consists in a single particle (see Figure 2). As well, Dynamic Light Scattering (DLS) can be used to measure the hydrodynamic diameter of the core of the nanoparticle in solution when said core consists in a particle or in an aggregate of particles. These two methods may further be used one after each other to compare size measures and confirm said size.

25 The central core of the nanoparticle is typically prepared from a therapeutic or diagnostic material, which is preferably an activable or excitable material. The material can be an inorganic material, an organic material or a mixture thereof. The material is preferably an inorganic material.

30 Any kind of nanoparticle may be encapsulated in the thermosensitive liposome of the present invention so long as its electronic surface charge is below -15 mV or above $+15$ mV, for example between -15 mV and -20 mV or between $+15$ mV and $+20$ mV, typically below -20 mV or above $+20$ mV, when determined by zeta potential measurements, performed on

WO 2012/104275

14

PCT/EP2012/051507

nanoparticles suspensions with concentration varying between 0.2 and 8 g/L, nanoparticles being suspended in aqueous medium at pH comprised between 6 and 8.

5 The nanoparticle's shape can be for example round, flat, elongated, spherical, ovoid or oval, and the like. The shape can be determined or controlled by the method of production, and adapted by the person of the art according to the desired applications.

As the shape of the particles can influence their "biocompatibility" once delivered on the targeted site, particles having a quite homogeneous shape are preferred. For pharmacokinetic reasons, nanoparticles being essentially spherical, round or ovoid in shape are thus preferred.

10 Spherical or round shape is particularly preferred.

The largest size of the nanoparticles, i.e. the largest dimension of the core of the nanoparticles, used in the context of the present invention is typically comprised between 1 and 100 nm.

15 It is advantageously comprised, when nanoparticles are used as a therapeutic agent, between about 5 nm and about 100 nm, for example between about 5 nm and 80 nm, for example between about 10 nm and about 80 nm, advantageously between about 10 or 20 nm and about 70 nm, preferably between about 15 nm and about 60 nm or between about 10 nm or 15 nm and about 50 nm.

20 It is advantageously comprised, when nanoparticles are used as a diagnostic agent, between about 2 nm and about 10 nm, for example between about 4 nm and about 8 nm.

The nanoparticle used in the context of the present invention comprise a core and a coating, said coating being responsible for the presence of an electrostatic surface charge below - 20 mV or above + 20 mV when measured in an aqueous medium at physiological pH.

25 The electrostatic coating is advantageously a "full coating" (complete monolayer). This implies the presence of a very high density of biocompatible molecules creating an appropriate charge on the all surface of the nanoparticle. Such a full coating will favour the disruption of the membrane of the thermosensitive liposome at T_m or above T_m .

The inorganic material constituting the core may be a magnetic material.

WO 2012/104275

15

PCT/EP2012/051507

Magnetic materials include for example iron, nickel, cobalt, gadolinium, samarium, neodymium, preferably in the form of an oxide, an hydroxide or a metal, and any mixture thereof.

In specific examples, the material forming the core is selected from the group consisting of
5 ferrous oxide and ferric oxide. In a preferred embodiment of the present invention, the oxide nanoparticles are made of magnetite or maghemite.

Mixed material can also be used to optimize interactions between a magnetic field and nanoparticles. Solid solution forms (well known by the man skilled in the art as random mixtures of several materials) such as CoFe_2O_4 for example can be used as a mixed material.

10 Solid solution form in demixed phases, such as Fe_2O_3 / Co for example, can further be used.

When the magnetic material is used as a therapeutic material, it is preferably a ferromagnetic material.

When the magnetic material is used as a diagnostic material, it is preferably a superparamagnetic material.

15

The inorganic material constituting the core may be a high electronic density material constituted by a metallic element having an atomic number (Z) of at least 50, preferably at least 60 or 61, more preferably at least 65, 66, 67 or even 68.

The atomic number (also known as the proton number) is the number of protons found in the
20 nucleus of an atom. It is traditionally represented by the symbol Z. The atomic number uniquely identifies a chemical element. In an atom of neutral charge, atomic number is equal to the number of electrons.

Z participates to the incoming radiations absorption capacity of nanoparticles.

25 The inorganic material constituting the core may be an oxide selected from Cerium (IV) oxide (CeO_2), Neodymium (III) oxide (Nd_2O_3), Samarium (III) oxide (Sm_2O_3), Europium (III) oxide (Eu_2O_3), Gadolinium (III) oxide (Gd_2O_3), Terbium (III) oxide (Tb_2O_3), Dysprosium (III) oxide (Dy_2O_3), Holmium oxide (Ho_2O_3), Erbium oxide (Er_2O_3), Thullium (III) oxide (Tm_2O_3), Ytterbium oxide (Yb_2O_3), Lutetium oxide (Lu_2O_3), Hafnium (IV) oxide (HfO_2),
30 Tantalum (V) oxide (Ta_2O_5), Rhenium (IV) oxide (ReO_2).

In the context of the present invention, mixture of inorganic oxide is also possible.

WO 2012/104275

16

PCT/EP2012/051507

The inorganic material constituting the core may be a metal, the metal having preferably an atomic number (Z) of at least 40 or 50, more preferably at least 60 or 70.

The metal may be selected from gold (Au - Z = 79), silver (Ag - Z = 47), platinum (Pt - Z = 78), palladium (Pd - Z = 46), tin (Sn - Z = 50), tantalum (Ta - Z = 73), ytterbium (Yb - Z = 70), zirconium (Zr - Z = 40), hafnium (Hf - Z = 72), terbium (Tb - Z = 65), thulium (Tm - Z = 69), cerium (Ce - Z = 58), dysprosium (Dy - Z = 66), erbium (Er - Z = 68), europium (Eu - Z = 63), holmium (Ho - Z = 67), lanthanum (La - Z = 57), neodymium (Nd - Z = 60), praseodymium (Pr - Z = 59), and any mixture thereof.

10 In a preferred embodiment of the present invention, the core of the nanoparticle consists in gold.

In the context of the present invention, the core of the nanoparticle may consist in a mixture of an inorganic oxide and a metal.

15 The coating responsible for the presence of an electrostatic surface charge below -20 mV or above $+20$ mV of the nanoparticle when measured in an aqueous medium at physiological pH can be an inorganic or organic surface coating.

20 When inorganic, the coating may be selected from the group consisting of an oxide, an hydroxide, and an oxyhydroxide. The inorganic coating may comprise for example silicium, aluminium, calcium and/or magnesium.

An inorganic agent selected from the group consisting of, for example magnesium and calcium, will bring a positive charge (above $+20$ mV) to the surface of the nanoparticle at pH 7.

25 In another embodiment, a silicium group may be used to bring a negative charge (below -20 mV) to the surface of the nanoparticle at pH 7.

When organic, the coating is prepared with a molecule capable of interacting, through covalent binding or electrostatic binding, with the nanoparticle surface and of giving surface properties to said nanoparticle.

30 The surface coating organic molecule has two groups, R and X. The function of X is to interact with the nanoparticle surface and the function of R is to give the nanoparticle's surface its specific properties.

WO 2012/104275

17

PCT/EP2012/051507

X may be selected for example from a carboxylate (R-COO^-), a silane (R-Si(OR)_3), a phosphonic (R-PO(OH)_2), a phosphoric (R-O-PO(OH)_2), a phosphate (R-PO_4^{3-}) and a thiol (R-SH) group.

5 R brings at least the electronic surface charge to the nanoparticle in aqueous suspension at a physiological pH.

When R brings a positive charge to the nanoparticle's surface, R may be an amine ($\text{NH}_2\text{-X}$).

When R brings a negative charge to the nanoparticle's surface, R may be phosphate ($\text{PO}_4^{3-}\text{-X}$) or a carboxylate ($\text{COO}^-\text{-X}$).

10 Organic coating conferring a positive charge (above +20 mV) to the nanoparticles surface may be selected from for example aminopropyltriethoxysilane, polylysine or 2-aminoethanethiol.

Organic coating conferring a negative charge (below -20 mV) to the nanoparticles surface may be selected from for example a polyphosphate, a metaphosphate, a pyrophosphate, etc.,
15 or for example from citrate or dicarboxylic acid, in particular succinic acid.

Again, the electrostatic coating is advantageously a "full coating".

This electrostatic coating and especially amino or carboxylic moieties can further be used to link any group on the nanoparticle's surface. For example, it may be used to link a targeting
20 group or a coupling group as herein described on the nanoparticle's surface using for example a linker such as a carbodiimide.

Optionally, the nanoparticle surface can be functionalized using a group able to interact ("coupling group") directly with proteins when nanoparticles are released from the
25 thermosensitive liposomes and form with them a covalent bond.

R may be made of a reactive group capable of covalently interacting with amine, carboxyl or thiol groups present on proteins such as a succinimidyl ester group (which react with amine group) and/or a maleimide group (which react with carboxylic group).

30 Optionally, the nanoparticle surface can be functionalized using a group able to target ("targeting group") a specific biological tissue or cell. The targeting group can be any biological or chemical structure displaying affinity for a molecule present in the human or animal body.

WO 2012/104275

18

PCT/EP2012/051507

Such a targeting group typically acts once the nanoparticles are accumulated on the target site and released from the liposome upon thermal activation at T_m or above T_m .

5 The targeting group may be selected from an antigen, a spacer molecule, a biocompatible polymer. The targeting group can be any biological or chemical structure displaying affinity for molecules present in the human or animal body. For instance it can be a peptide, oligopeptide or polypeptide, a protein, a nucleic acid (DNA, RNA, siRNA, tRNA, miRNA, etc.), a hormone, a vitamin, an enzyme and the like and in general any ligand of molecules (for example receptors, markers, antigens, etc.). Ligands of molecules expressed by
10 pathological cells, in particular ligands of tumor antigens, hormone receptors, cytokine receptors or growth factor receptors. Said targeted groups can be selected for example in the group consisting in LHRH, EGF, a folate, anti-B-FN antibody, E-selectin/P-selectin, anti-IL-2R α antibody, GHRH, etc.

15 Electrostatic coating and/or coupling groups as herein described can be used to link any group on the nanoparticle's surface. For example, they may be used as linkers to graft a targeting group on the nanoparticle's surface.

A particular object herein described is thus a thermosensitive liposome encapsulating
20 nanoparticles which are covalently or electrostatically coated with an agent responsible for the presence of the electrostatic surface charge below -20 mV or above $+20$ mV.

This agent is preferably an organic molecule having two groups, R and X, R being selected from an amine, a phosphate and a carboxylate and X being selected from a carboxylate, a silane, a phosphonic, a phosphoric, and a thiol.

25 The nanoparticle can further comprise a coupling group selected from a succinimidyl ester and a maleimide group and/or a targeting group selected from a peptide, an oligopeptide, a polypeptide, a protein, a nucleic acid, a hormone, a vitamin, an enzyme, a ligand of a tumor antigen, an hormone receptor, a cytokine receptor and a growth factor receptor.

30 Optionally, the nanoparticle surface can be functionalized using a steric group. Such a group may be selected from polyethylene glycol (PEG), polyethylenoxide, Polyvinylalcohol, Polyacrylate, Polyacrylamide (poly(N-isopropylacrylamide)), Polycarbamide, a biopolymer or polysaccharide such as Dextran, Xylan, cellulose, collagene, and a switterionic compound such as polysulfobetain, etc.

WO 2012/104275

19

PCT/EP2012/051507

This steric group increases the nanoparticles stability in a biocompatible suspension, such as a physiological fluid (blood, plasma, serum, etc.), any isotonic media or physiological media, for example media comprising glucose (5%) and/or NaCl (0.9%).

- 5 From the teachings of the present invention, those skilled in the art will recognize that the nanoparticles may be modified without departing from the spirit of the invention.

Typical methods for the production of nanoparticles or nanoparticles aggregates usable in the context of the present invention are described for example in WO2007/118884, WO
10 2009/147214, US 6,514,481 B1, WO2011/003999, and in Liu et al., Journal of Magnetism and Magnetic Materials 270 (2004) 1–6 "*Preparation and characterization of amino-silane modified superparamagnetic silica nanospheres*".

15 THERAPEUTIC USES

15

The therapeutic nanoparticles efficiency is increased if nanoparticles are internalized by target cells or are in contact with them. To reach this aim, the nanoparticles surface properties are typically modified to favour an interaction with the target cell. For example, the electric charge of the nanoparticle surface may be modified or the surface may be linked to a
20 targeting group or agent such as herein described.

Specific binding interactions are those of surface ligands (targeting groups as herein described) which allow the nanoparticle to specifically interact with complementary molecules or receptors on the cell membrane. These interactions induce a receptor-mediated endocytosis. A targeting ligand conjugated to the surface of nanoparticles can recognize and
25 bind receptors, membrane proteins, surface antigens expressed on the target cell thereby triggering endocytosis and intracellular delivery.

Non specific attractive forces that promote cellular contact and particle uptake result from intrinsic nanoparticles characteristics such as surface charge.

However, most of time, such modifications are detrimental to the nanoparticles
30 biodistribution.

The herein described thermosensitive liposomes overcome this problem and allow, as explained previously, the efficient biodistribution (delivery) and controlled release of therapeutic nanoparticles in the subject's body. These liposomes favour the concentration of

WO 2012/104275

20

PCT/EP2012/051507

nanoparticles, in particular of nanoparticles exhibiting modified surface properties, on the target site.

5 A controlled (spatial and time) release of nanoparticles is now possible, i.e. the nanoparticle is delivered where and at the moment it is needed when its therapeutic activity depends on its interaction with cells (nanoparticle in contact with cells and/or internalized within cells)

10 When the nanoparticle is used as a therapeutic tool, its core is prepared with a therapeutic material which may be an externally activable material, i.e., a material which may be activated by an external energy source. In a particular embodiment, the therapeutic material is capable of functionally disturbing, altering or destructing a target cell, tissue or organ.

15 The therapeutic material may be selected from a high electronic density material and a magnetic material as described previously.

The activation source can be an ionizing radiation source for nanoparticle the core of which is prepared with a high electronic density material such as HfO₂ or Au.

20 Ionizing radiations are typically of about 5 KeV to about 25 000 KeV, in particular of about 5 KeV to about 6000 KeV (LINAC source), or of about 5 KeV to about 1500 KeV (such as a cobalt 60 source). Using a X-Rays source, particularly preferred ionizing radiations are typically of about 50 KeV to about 12 000 KeV, for example of about 50 KeV to about 6000 KeV.

25 The required doses of ionizing radiations are preferably doses comprised between about 0.05 Gray and about 16 Grays, preferably between about 0.05 Gray and about 6 Grays, for applications performed *in vitro*.

Doses are comprised between more than about 0.05 Gray and less than about 16 or 30 Grays for applications performed, in particular locally, *ex vivo* or *in vivo*.

30 Total ionizing radiations range from about 1.5 Gray up to about 85 Grays in the human according to the current practice. Additional irradiation boost of about 40 Gray may also be provided in the human, according to the current practice.

The total dose of radiations delivered can be given following different schedules such as single dose, fractionated doses, hyperfractionated doses, etc.

WO 2012/104275

21

PCT/EP2012/051507

In general and in a non-restrictive manner, the following X-Rays can be applied in different cases to activate the nanoparticles :

- X-Rays of 50 to 150 keV which are particularly efficient for a superficial target tissue;
- 5 - X-Rays (ortho voltage) of 200 to 500 keV which can penetrate a tissue thickness of 6 cm;
- X-Rays (mega voltage) of 1000 keV to 25,000 keV. For example the ionization of nanoparticles for the treatment of prostate cancer can be carried out via five focused X-Rays with an energy of 15,000 keV.

10

Radioactive isotopes can alternatively be used as a ionizing radiation source (named as curietherapy or brachytherapy). In particular, Iodine I¹²⁵ (t_{1/2} = 60.1 days), Palladium Pd¹⁰³ (t_{1/2} = 17 days), Cesium Cs¹³⁷ and Iridium Ir¹⁹² can advantageously be used.

- 15 Immunoradionuclide (or immunoradiolabelled ligand) can also be used as a ionizing radiation source in the context of radioimmunotherapy. Suitable radionuclides for radioimmunotherapy may be, for example, selected from ¹³¹I, ¹⁸⁶Re, ¹⁷⁷Lu or ⁹⁰Y.

- 20 Charged particles such as proton beams, ions beams such as carbon, in particular high energy ion beams, can also be used as a ionizing radiation source.

Electron beams may also be used as a ionizing radiation source with energy comprised between 4 MeV and 25 Mev.

- 25 Specific monochromatic irradiation source could be used in order to selectively generate X-rays with an energy close to or corresponding to the desired X-ray absorption edge of the atom(s) of the nanoparticle.

- 30 Preferentially sources of ionizing radiations may be selected from Linear Accelerator (LINAC), Cobalt 60 and brachytherapy sources.

Amounts (range of total dose of irradiation) and schedules (planning and delivery of irradiations in a single dose, or in the context of a fractioned or hyperfractioned protocol, etc.)

WO 2012/104275

22

PCT/EP2012/051507

is defined for any disease/anatomical site/disease stage patient setting/patient age (children, adult, elderly patient), and constitutes the standard of care for any specific situation.

The irradiation can be applied at any time after release of the nanoparticles, on one or more occasions, by using any currently available system of radiotherapy.

5

In a particular embodiment, the therapeutic material is a magnetic oxide (magnetite or maghemite), in particular a ferromagnetic material and the activation source is a magnetic field source.

10 The magnetic field, which is preferably non-oscillating or stable, can be applied constantly after the release of nanoparticles, in one or more times, by using any magnetic field source.

The magnetic field source is preferably a uniform and unidirectional magnetic field source and may be selected from any permanent magnet, electromagnet and Magnetic Resonance Imaging (MRI) equipment.

15 A suitable non-oscillating or stable magnetic field is available in standard MRI equipment which typically has a magnetic field in the range of 0.5 to 5 Tesla.

When exposed to a magnetic field, and depending on the duration of the exposure, magnetic nanoparticles allow the cell or tissue destruction (duration of several minutes, for example from 2 or 5 minutes to 120 minutes).

20

The nanoparticles or nanoparticle aggregates and compositions of the present invention can be advantageously used for lysis of cancer cells or cells suspected to be the same, when subjected to a magnetic field.

25 Inventors herein disclose the use of a nanoparticle as herein described, or of a population of identical or different nanoparticles as herein described, to prepare a pharmaceutical composition intended to treat a subject in need thereof.

30 The term "treatment" denotes any action performed to correct abnormal functions, to prevent diseases, to improve pathological signs, such as in particular a reduction in the size or growth of an abnormal tissue, in particular of a tumor, a control of said size or growth, a suppression or destruction of abnormal cells or tissues, a slowing of disease progression, a disease stabilization with delay of cancer progression, a reduction in the formation of metastases, a regression of a disease or a complete remission (in the context of cancer for example), etc.

WO 2012/104275

23

PCT/EP2012/051507

The pharmaceutical composition may be a composition intended to perturb, disturb, alter or destroy target cells, in a subject in need thereof, when said cells are exposed to an activation source.

5

An object of the invention is a thermosensitive liposome, such as defined hereinabove and/or which can be obtained by the methods herein described, for perturbing, disturbing, altering or destroying target cells when said cells are exposed to an activation source.

10 A particular thermosensitive liposome according to the present invention is a liposome for preventing or treating a cancer or for alleviating the symptoms of a cancer in a subject.

A particular method herein described is a method for inducing or causing the perturbation, lysis, apoptosis or destruction of cells in a subject, comprising a) administering
15 thermosensitive liposomes (as described hereinabove) containing nanoparticles to the subject, b) heating the thermosensitive liposomes at T_m or above T_m in order to allow the local release of nanoparticles and their subsequent interaction with cells, in particular target cells, and, optionally, c) exposing the cells to an activation source, typically an external activation source such as herein described, said exposure activating the nanoparticles which in turn
20 induce or cause the perturbation, lysis, apoptosis or destruction of the cells.

The thermosensitive liposomes according to the present invention can be administered by different routes such as local (intra-tumoral (IT) for example), subcutaneous, intra venous (IV), intra-dermic, intra-arterial, airways (inhalation), intra peritoneal, intra muscular and oral
25 route (*per os*). The thermosensitive liposomes according to the present invention can further be administered in the virtual cavity of tumor bed after tumorectomy. A preferred administration route is the intravenous route.

After a given time following injection by the intravenous route of the thermosensitive liposomes, the Enhanced Permeation and Retention ("EPR") effect is responsible for the
30 passive accumulation of the thermosensitive liposomes into the tumor mass. It has indeed been observed that the tumor vessels are quite distinct from normal capillaries and that their vascular "leakiness" encourages selective extravasation of liposomes not usual in normal tissues. The lack of effective tumour lymphatic drainage prevents clearance of the penetrant liposomes and promotes their accumulation.

WO 2012/104275

24

PCT/EP2012/051507

The present nanoparticles are thus able to successfully target primary as well as metastatic tumors once released from the intravenously administered thermosensitive liposomes.

5 The target cells can be any pathological cells, that is to say, cells involved in a pathological mechanism, for example proliferative cells, such as tumor cells, stenosing cells (fibroblast/smooth muscle cells), or immune system cells (pathological cell clones). A preferred application is based on the treatment (for example the destruction or functional alteration) of malignant cells or tissue.

10 Another object of the invention relates to a method for preventing or treating a disorder, in particular a cancer, or alleviating the symptoms of the disorder, in a subject or patient, comprising a) administering thermosensitive liposomes to the patient suffering from the disorder or a composition such as herein described comprising such thermosensitive liposomes, b) heating the thermosensitive liposomes at T_m or above T_m in order to allow the
15 local release of nanoparticles and their subsequent interaction with cells, in particular target cells, and, c) subsequently treating the subject by exposing said subject to a source of activation as herein described, such exposition leading to an alteration, disturbance or functional destruction of the patient's abnormal cells, thereby preventing or treating the disorder.

20

Classical cancer management systematically implies the concurrence of multimodality treatments (combination of radiotherapy and chemotherapy for example).

The herein described nanoparticles exposed to an activation source, for example in the context of radiotherapy, can be used in association with a different cancer therapy protocol.

25 Such a protocol can be selected from the group consisting of surgery, radiosurgery, chemotherapy, a treatment comprising administration of cytostatic(s), cytotoxic(s), a targeted therapy, a vaccine, and any other biological or inorganic product intended to treat cancer.

The thermosensitive liposomes according to the present invention may encapsulate together with the nanoparticles herein described any therapeutic molecule of interest, in particular any
30 known biological or inorganic product intended to treat cancer.

The herein described nanoparticles can further be used in the context of radiotherapy alone. The increased observed therapeutic efficacy is partly due to the increased concentration of

WO 2012/104275

25

PCT/EP2012/051507

efficient nanoparticles on the target site allowed by their transport via the thermosensitive liposomes of the invention and by their subsequent controlled release.

5 The invention can be used to treat any type of malignant tumor such as haematological tumors or malignancies, and solid tumors, in particular of epithelial, neuroectodermal or mesenchymal origin. In addition, the herein described liposomes can be used to treat a premalignant lesion or a specific benign disease where radiation therapy is classically used and/or indicated.

10 The tumor or cancer may be a cancer where radiotherapy is a classical treatment. Such a cancer may be selected in particular from the group consisting of skin cancer, including malignant neoplasms associated to AIDS, melanoma; central nervous system tumors including brain, stem brain, cerebellum, pituitary, spinal canal, eye and orbit; head and neck tumors; lung cancers; breast cancers; gastrointestinal tumors such as liver and hepatobiliary tract cancers, colon, rectum and anal cancers, stomach, pancreas, oesophagus cancer; male
15 genitourinary tumors such as prostate, testis, penis and urethra cancers; gynecologic tumors such as uterine cervix, endometrium, ovary, fallopian tube, vagina and vulvar cancers; adrenal and retroperitoneal tumors; sarcomas of bone and soft tissue regardless the localization; lymphoma; myeloma; leukemia; and pediatric tumors such as Wilm's tumor,
20 neuroblastoma, central nervous system tumors, Ewing's sarcoma, etc.

The invention is applicable, in the context of therapy, to primary tumors, or secondary invasions, loco-regional or distant metastases, and in the context of prophylaxis, in order to avoid secondary malignant central nervous system involvement such as the observed
25 invasions (metastasis) from melanoma, lung cancer, kidney cancer, breast cancer, etc.

The thermosensitive liposomes can be used at any time throughout the anticancer treatment period. They can be administered for example as a neoadjuvant (before surgical intervention for cancer exeresis) or as an adjuvant (after surgery).

30 The thermosensitive liposomes can also be used for advanced tumors which can not be surgically removed.

Repeated injections or administrations of thermosensitive liposomes can be performed, when appropriate.

WO 2012/104275

26

PCT/EP2012/051507

DIAGNOSTIC USES

5 The controlled delivery of nanoparticles is also desired for *in vivo* imaging and/or diagnostic purposes and is now possible when said nanoparticles are encapsulated in the thermosensitive liposomes according to the present invention.

10 Inventors herein disclose the use of a thermosensitive liposome according to the present invention, in particular of a thermosensitive liposome comprising a nanoparticle as herein described, or of a population of identical or different nanoparticles as herein described, to prepare a diagnostic composition intended to detect the presence of abnormal tissue or cells, in particular of tumor cells in a subject, preferably when said subject is exposed to an external source of energy.

15 An object of the invention is a thermosensitive liposome, such as defined hereinabove and/or which can be obtained by the methods herein described, for detecting or visualizing an abnormal cell of a subject when said subject is exposed to an external source of energy.

20 The diagnostic material may be selected from a high electronic density material and a magnetic material as described previously.

When the nanoparticle is used as a diagnostic agent intended to detect or visualize an abnormal tissue or cell, its core advantageously consist in an imaging material.

Such an imaging material may advantageously be selected from any magnetic material such as ferrous oxide and ferric oxide as previously defined. For example, the nanoparticles used
25 in the present invention have a core made of γ - Fe_2O_3 (maghemite) or Fe_3O_4 (magnetite) visible in MRI.

The imaging material may be also selected from any high electronic density material visible under computed tomography scanner (CT scanner), such as HfO_2 or Au.

30 For imaging purpose, the adjunction to nanoparticles of a targeting group as previously described is preferred.

Another object of the invention relates to a method for detecting or visualizing target cells (allowing in particular the diagnosis of a disorder, in particular of a cancer), in a subject or

WO 2012/104275

27

PCT/EP2012/051507

patient suspected to suffer of a disorder, comprising a) administering thermosensitive liposomes to the patient suffering from the disorder or a composition such as herein described comprising such thermosensitive liposomes, b) heating the area of interest at T_m or above T_m in order to allow the local release of nanoparticles and their subsequent interaction with cells, in particular target cells, and, c) subsequently exposing the subject to a source of activation as herein described, such exposition allowing the detection or visualization of the patient's target cells.

In a particular embodiment, the thermosensitive liposomes herein described are able to vehicle targeted nanoparticles (in particular nanoparticles capable of specifically recognizing tumor cells) in blood circulation while avoiding recognition by the reticulo endothelial system (RES).

If a tumor mass is present, nanoparticles, released from the thermosensitive liposomes at T_m or above T_m , will enter the tumor and interact with the targeted cancer cells. Nanoparticles accumulation provokes a signal perturbation visible in MRI for magnetic nanoparticles or a CT scanner signal increase if high density nanoparticles are used.

If there is no tumor mass, nanoparticles will be eliminated from blood circulation via kidneys and no signal increase or perturbation will be detected or visualized.

Inventors further herein disclose the use of a thermosensitive liposome according to the present invention, in particular of a thermosensitive liposome comprising a nanoparticle as herein described, or of a population of identical or different nanoparticles as herein described, to prepare a diagnostic composition intended to collect proteins from a target site of a subject, in particular a tumor and its microenvironment, usable to phenotype the target site.

Another object of the invention relates to a method for collecting proteins from a target site (allowing in particular the phenotyping of said target site), in a subject or patient, comprising a) administering thermosensitive liposomes to the patient suffering from the disorder or a composition such as herein described comprising such thermosensitive liposomes, b) heating the thermosensitive liposomes at T_m or above T_m in order to allow the release of nanoparticles on the target site and their subsequent interaction with said target site, and, c) subsequently collecting the nanoparticles covered with the proteins of said target site.

WO 2012/104275

28

PCT/EP2012/051507

The previous method can further comprise a step of heating the thermosensitive liposomes at T_m or above T_m in order to allow the release of nanoparticles in blood and a step of collecting the nanoparticles covered with blood proteins in order to compare blood proteins to proteins from the target site.

- 5 This approach constitutes an advantageous non invasive technique when compared to classical biopsies.

The herein described thermosensitive liposomes are a diagnostic tool usable in personalized therapy as they can provide information regarding the cancer stage of a particular patient, and
10 may help the oncologist to select the most appropriate treatment for this patient or follow the efficiency of a particular treatment.

The herein described thermosensitive liposomes can further provide information to assess a tumor response to a particular therapy and predict the clinical outcome (Progression Free Survival) of the patient.

15

For this specific application any nanoparticles as above described may be used. Nanoparticles are preferentially made of a magnetic core as defined previously (e.g. Fe_2O_3 or Fe_3O_4).

For phenotyping the tumor, the use of nanoparticles comprising a coating together with a
20 coupling group is preferred. Such a coupling group can advantageously be selected from succinimidyl ester, maleimide and any mixture thereof. This group will create a covalent link with amino and carboxylic groups usually present on proteins.

In a particular embodiment, the thermosensitive liposomes herein described are able to
25 vehicle nanoparticles comprising a coating together with a coupling group in blood circulation while avoiding recognition by the reticulo endothelial system (RES).

Nanoparticles, released from the thermosensitive liposomes at T_m or above T_m , will interact with proteins of the target site. The nanoparticles covered with a population of said proteins can be collected in urine. The urine sample may be subsequently treated in order to
30 concentrate nanoparticles before analysis of the protein population using for example mass spectrometry after enzymatic digestion of the proteins and analyses of peptidic fragments.

Magnetic nanoparticles can otherwise be collected from the target site using for example a magnetic collector.

WO 2012/104275

29

PCT/EP2012/051507

Another object of the invention is a therapeutic or diagnostic composition comprising thermosensitive liposomes such as defined hereinabove and/or which can be obtained by the methods herein described, preferably together with a pharmaceutically acceptable excipient, vehicle or carrier.

5

The diagnostic composition may be combined with the pharmaceutical composition or assimilated to the pharmaceutical composition in particular when the diagnostic and the treatment are performed simultaneously. In the latter situation, the same nanoparticles are generally used as a therapeutic and as a diagnostic agent.

10

The compositions can be in the form of a liquid (particles in suspension), gel, paste, and the like. Preferred compositions are in the form of an injectable formulation, preferably in a liquid form.

15 The excipient, vehicle or carrier which is employed can be any classical support for this type of application, such as for example saline, isotonic, sterile, buffered solutions, and the like. Compositions can also comprise stabilizers, sweeteners, surfactants, and the like. Compositions can be formulated for example as ampoules, bottles, flasks, by using known techniques of pharmaceutical formulation.

20

The concentration of nanoparticles in a composition of the invention will be easily adjusted by the skilled person depending, in particular, on the intended use, the patient subject, the nature of the target cells and the selected route of administration.

25 The pharmaceutical composition can further comprises an additional therapeutic compound (distinct of a nanoparticle or of a population of nanoparticles as herein described) also intended to treat a disease, for example a cancer. This additional therapeutic compound can be encapsulated in the liposome together with nanoparticles,

30 The present disclosure further provides kits comprising any one or more of the herein-described thermosensitive liposomes or compositions. Typically, the kit comprises at least one thermosensitive liposome or population of thermosensitive liposomes according to the present invention. Generally, the kit also comprises one or more containers filled with one or more of the ingredients of the pharmaceutical or diagnostic compositions of the invention.

WO 2012/104275

30

PCT/EP2012/051507

Associated with such container(s), a labelling notice providing instructions for using the products can be provided for using the thermosensitive liposome, population of thermosensitive liposomes, or compositions according to the present methods.

- 5 Other aspects and advantages of the invention will become apparent in the following examples, which are given for purposes of illustration and not by way of limitation.

EXPERIMENTAL SECTION

10

EXAMPLE 1: Preparation of 5 nm-sized nanoparticles

Iron oxide nanoparticles with a size distribution centered on 5 nm are synthesized by coprecipitation of ferrous and ferric ions adapted from (US4329241; Bacri et al., *J. Magn. Magn. Mat.*, 1986;62:36-46).

15 Briefly, the reacting medium, with controlled ionic strength, consists in a solution of sodium nitrate 3M maintained at pH 12. A 3M sodium nitrate solution of ferrous and ferric ions in a molar ratio Fe(III)/Fe(II) equal 2 is prepared and slowly added to the reacting medium under mixing. It rapidly turns black. The whole solution is then aged during one night at ambient
20 temperature under mixing.

Ferrite nanoparticles are then sedimented on a magnet and the supernatant is removed in order to eliminate the reacting medium. Then peptization (acidification) and oxidation of the nanoparticles surface is performed by diluting the pellet in a solution of nitric acid HNO₃ 2M at room temperature under vigorous mixing.

25 Oxidation of the nanoparticles core is performed by incubation of the pellet in a solution of ferric nitrate at elevated temperature (>90°C) under vigorous mixing.

The nanoparticles are then washed by centrifugation.

The pellet is finally diluted in acidic water in order to reach a concentration of 150 g/L in iron oxide. The solution is homogenized by sonication and pH is then adjusted to pH 2.

30 The morphology (size and shape) of nanoparticles was observed by Transmission Electron Microscopy (Figure 2A). The crystalline structure of iron oxide nanoparticles was confirmed by X-ray diffraction analysis.

WO 2012/104275

31

PCT/EP2012/051507

EXAMPLE 2: Preparation of 30 nm-sized iron oxide nanoparticles

Iron oxide nanoparticles with a size distribution centered on 30 nm are synthesized by precipitation of ferrous ions followed by oxidation of the precipitate.

- 5 The aqueous reacting medium was maintained at pH 8 under continuous bubbling of nitrogen flow. A solution of ferrous chloride and a solution of sodium hydroxide were prepared and added simultaneously to the reacting medium. The solution turned green and highly turbid (“milky”).

- Oxidation step was performed by adding H₂O₂ solution. The solution turned black indicating the formation of the ferrite material. The nitrogen flow was removed after complete addition
10 of H₂O₂. The ferrite nanoparticles were then aged during 2h under stirring.

The ferrite nanoparticles were sedimented on a magnet to remove the supernatant. Peptization of the nanoparticles surface with perchloric acid (HClO₄) was performed by diluting the pellet in a solution of HClO₄ 1M.

- 15 Finally, peptized nanoparticles were suspended in distilled water in order to obtain a magnetic fluid at 180g/L and pH 2.

Size and shape of the as-obtained iron oxide nanoparticles were observed by Transmission Electron Microscopy (Figure 2B). The crystalline structure of iron oxide nanoparticles was confirmed by X-ray diffraction analysis.

20

EXAMPLE 3: Surface treatment of nanoparticles**3.1 Functionalization of nanoparticles with sodium hexametaphosphate (HMP)**

- Suspension of sodium hexametaphosphate is added to the suspension of iron oxide
25 nanoparticles from example 1 (the amount of sodium hexametaphosphate added being below LD50/5) and the pH of the suspension is adjusted to a pH comprised between 6 and 8

- Electronic surface charge (< -20 mV) is determined by zeta potential measurements on a Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments), using a 633nm HeNe laser, performed on
nanoparticles suspensions with concentrations varying between 0.2 and 2 g/L, nanoparticles
30 being suspended in aqueous medium at pH comprised between 6 and 8.

3.2 Functionalization of nanoparticles with silica

A first silica impregnation is performed by addition of sodium silicate in particles solution (780μL for 1g particles from example 2 in 240 mL distilled water). Remaining sodium

WO 2012/104275

32

PCT/EP2012/051507

silicate is removed by a centrifugation against water. 125 mg particles are dispersed in water/ethanol (1/4) solution containing 0.6 mmoles of tetraorthosilicate. Silica precursor hydrolyzation and condensation are enhanced by addition of ammonium solution in the bulk. Solution is incubated overnight before particles washing by centrifugation in distilled water.

5 Coated particles are kept in water (pH is adjusted at about 7.4).

Electronic surface charge (< -20 mV) is determined by zeta potential measurements on a Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments), using a 633nm HeNe laser, performed on nanoparticles suspensions with concentrations varying between 0.2 and 2 g/L, nanoparticles being suspended in aqueous medium at pH comprised between 6 and 8.

10

3.3 Functionalization of nanoparticles with 2-[Methoxy(polyethyleneoxy)propyl]trimethoxysilane; 90% 6-9 PE-units (PEO-silane)

PEO-silane is covalently grafted onto the iron oxide nanoparticles surface (nanoparticles from example 1) thanks to a hydrolysis-condensation process catalyzed in acidic medium.

15 Suspension of PEO-silane is added to the suspension of iron oxide nanoparticles from example 1. Typically a volume of 246 μ L of a solution of PEO-silane (92%wt) is added to 2mL of nanoparticles solution at 75 g/L in iron oxide. The pH of the solution is then adjusted to a pH comprised between 6 and 8.

20 Electronic surface charge (+8 mV) is determined by zeta potential measurements on a Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments), using a 633nm HeNe laser, performed on nanoparticles suspensions with concentrations varying between 0.2 and 2 g/L, nanoparticles being suspended in aqueous medium at pH comprised between 6 and 8.

EXAMPLE 4: Preparation of liposomes containing nanoparticles

25

4.1 "thermosensitive liposomes" (TSL) containing nanoparticles the charge of which is below -20 mV:

30 The nanoparticles-containing liposomes are prepared using the lipidic film re-hydration method (Bangham et al., J. Mol. Bio., 1965;13:238-252; Martina et al., J. Am. Chem. Soc., 2005;127:10676-10685):

a) Lipids are solubilized in chloroform. Chloroform is finally evaporated under a nitrogen flow. Re-hydration of the lipidic film is performed at 55°C with 2mL of the iron oxide solution described in Example 3.1, so that the lipidic concentration is 50mM.

WO 2012/104275

33

PCT/EP2012/051507

The following lipidic composition was used: dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), hydrogenated soybean phosphatidylcholine (HSPC), cholesterol (Chol) and pegylated distearylphosphatidylethanolamine (DSPE-PEG2000) in the molar ratio 100:33:27:7 (DPPC:HSPC:Chol:DSPE-PEG2000).

- 5 b) Freeze-thaws cycles are then performed 20 times, by successively plunging the sample into liquid nitrogen and into a water bath regulated at 55°C.
- c) A thermobarrel extruder (LIPEX™ Extruder, Northern Lipids) was used to calibrate the size of the nanoparticles-containing liposomes under controlled temperature and pressure. In all cases, extrusion was performed at 55°C, under a pressure ranging from 2 to 20 bars.
- 10 d) Separation of non-encapsulated particles is performed by size exclusion chromatography on a Sephacryl S1000 filtration gel.
- e) Elution profile is determined by quantification of magnetic nanoparticles by UV-visible spectroscopy (Cary 100 Varian spectrometer) via a ferrous ions/phenanthroline colorimetric reaction adapted from Che et al., Journal of Chromatography B, 1995;669:45-51, and Nigo et al., Talanta, 1981;28:669-674. Liposomes-containing fractions are collected (Figure 3, first peak). The concentration of iron oxide in liposomes ranges from 1 to 2.5 g/L.
- 15 Such a composition has a T_m of 43°C.

20 4.2 “Non-thermosensitive liposomes” (NTSL) containing nanoparticles the charge of which is below -20 mV:

The previously described procedure was followed except that, in step a) the following lipidic composition was used: hydrogenated soybean phosphatidylcholine (HSPC), cholesterol (Chol) and pegylated distearylphosphatidylethanolamine (DSPE-PEG2000) in the molar ratio 100:65:7 (HSPC:Chol:DSPE-PEG2000).

- 25 In steps a), b) and c), re-hydration of the lipidic film, thaw cycles and extrusion process are performed at 62°C.

4.3 “thermosensitive liposomes” (TSL) containing nanoparticles the charge of which is below 15 mV:

- 30 The previously described procedure of example 4.1 was followed except that nanoparticles from example 3.3 were used.

EXAMPLE 5: nanoparticles release

In order to visualize the release of nanoparticles entrapped in liposomes, 30 μ L of the solutions of nanoparticles-containing liposomes as prepared in Example 4.1 and 4.2 were heated in a water bath.

For cryoTEM observations, 5 μ L of each solution was then deposited on a holey carbon coated copper grid; the excess was blotted with a filter paper, and the grid was plunged into a liquid ethane bath cooled with liquid nitrogen. Samples were maintained and observed at a temperature of approximately -170°C.

Figures 4A and 4B show spherical, 230nm-sized “non-thermosensitive” liposomes (NTSL) containing iron oxide nanoparticles, prior and after heating at 60°C in a water bath.

Figures 4C and 4D show spherical, 200 nm-sized “thermosensitive” liposomes (TSL) containing iron oxide nanoparticles, prior and after heating in a water bath at 43°C (T_m).

Figures 4E shows spherical, 200 nm-sized “thermosensitive” liposomes (TSL) containing iron oxide nanoparticles, after heating in a water bath at 48°C (above T_m).

Figure 4F shows thermosensitive liposomes loaded with iron oxide nanoparticles (example 4.3) aged at room temperature.

Figure 4G further shows thermosensitive liposomes loaded with iron oxide nanoparticles (example 4.3) aged at 43°C (T_m).

Concerning “non-thermosensitive” liposomes (NTSL), intact, 230 nm-sized liposomes are seen both before and after heating (Figure 4A and 4B).

Concerning “thermosensitive” liposomes (TSL), intact, 200 nm-sized liposomes are seen before heating on Figure 4C.

On the contrary, after heating at $T_r=43^\circ\text{C}$ on figure 4D, and $T_r=48^\circ\text{C}$ on figure 4E, 200 nm-sized liposomes present a modified shape (Figure 4E, white arrow) and disruption of the bilayer; some fragments of lipidic bilayer can also be seen. Some pictures show vesicles for which intact lipidic membranes are not observed anymore after heating and iron oxide nanoparticles are localized around the lipidic vesicles (Figure 4D). Free iron oxide nanoparticles are frequently observed on the grid. The release of nanoparticles is demonstrated for a temperature $T_r = T_m = 43^\circ\text{C}$ or for a temperature above T_m (48°C). Interactions between charged nanoparticles and the lipidic bilayer (Figure 4E, black arrow) could explain this surprising result.

WO 2012/104275

35

PCT/EP2012/051507

CLAIMS

1. A thermosensitive liposome disrupting at gel-to-liquid crystalline phase transition temperature (T_m) or above T_m , wherein the liposome comprises a thermosensitive lipidic membrane encapsulating nanoparticles, the nanoparticles being usable as a therapeutic or as a diagnostic agent, each nanoparticle i) comprising an inorganic core the largest dimension of which is less than about 100 nm, and ii) being fully coated with an agent responsible for the presence of an electrostatic charge below -20 mV or above + 20 mV at the surface of the nanoparticle, the electrostatic charge being determined by zeta potential measurements in an aqueous medium between pH 6 and 8, for a concentration of nanoparticles in suspension varying between 0.2 and 8 g/L.
2. The thermosensitive liposome according to claim 1, wherein the thermosensitive lipidic membrane comprises at least a phosphatidylcholine.
3. The thermosensitive liposome according to claim 2, wherein the thermosensitive lipidic membrane further comprises cholesterol.
4. The thermosensitive liposome according to anyone of claims 1 to 3, wherein the thermosensitive lipidic membrane comprises dipalmitoylphosphatidylcholine, hydrogenated soybean phosphatidylcholine, cholesterol and distearylphosphatidylethanolamine- methoxypolyethyleneglycol.
5. The thermosensitive liposome according to claim 2, wherein the thermosensitive lipidic membrane comprises dipalmitoylphosphatidylcholine, distearylphosphatidylethanolamine- methoxypolyethyleneglycol and either monopalmitoylphosphatidylcholine or monostearylphosphatidylcholine.
6. The thermosensitive liposome according to anyone of the preceding claims, wherein the agent responsible for the presence of the electrostatic charge at the surface of the nanoparticle is an organic molecule having two groups, R and X, R being selected from an amine, a phosphate and a carboxylate and X being selected from a carboxylate, a silane, a phosphonic, a phosphoric, a phosphate, and a thiol.

WO 2012/104275

36

PCT/EP2012/051507

7. The thermosensitive liposome according to claim 6, wherein the nanoparticle further comprises a coupling group selected from a succinimidyl ester and a maleimide group.
8. The thermosensitive liposome according to anyone of preceding claims, wherein the nanoparticles further comprise a targeting group selected from a peptide, an oligopeptide, a polypeptide, a protein, a nucleic acid, a hormone, a vitamin, an enzyme, a ligand of a tumor antigen, an hormone receptor, a cytokine receptor and a growth factor receptor.
9. The thermosensitive liposome according to anyone of the preceding claims, wherein the largest size of the liposome is between 50 and 500 nm, preferably between 50 and 250 nm.
10. The thermosensitive liposome according to anyone of the preceding claims, wherein the disruption of the liposome allows the release of the charged nanoparticles.
11. The thermosensitive liposome according to anyone of the preceding claims, wherein T_m is between 39°C and 45°C.
12. The thermosensitive liposome according to anyone of the preceding claims, wherein, when nanoparticles are used as a therapeutic agent, the largest dimension of the core of each nanoparticle is between 5 nm and 100 nm, preferably between 10 nm and 50 nm.
13. The thermosensitive liposome according to anyone of the preceding claims, wherein, when nanoparticles are used as a diagnostic agent, the largest dimension of the core of each nanoparticle is between 2 and 10 nm.
14. A therapeutic or diagnostic composition comprising a thermosensitive liposome according to anyone of claims 1 to 13 and a pharmaceutically acceptable carrier.

(57) Abstract: The present application relates to thermosensitive liposomes encapsulating nanoparticles which can be used in the health sector, in particular in human health. The invention also relates to pharmaceutical and diagnostic compositions comprising thermosensitive liposomes as defined previously, as well as to their uses.

WO 2012/104275

PCT/EP2012/051507

1/7

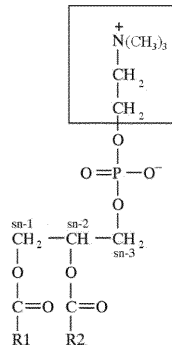


FIGURE 1

WO 2012/104275

PCT/EP2012/051507

2/7

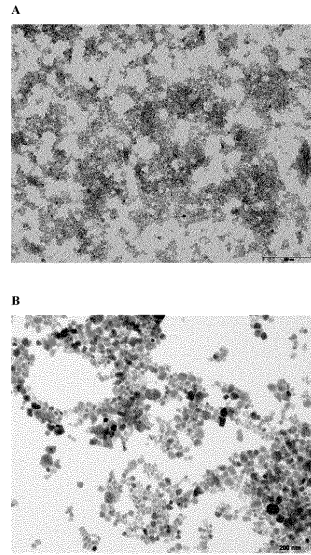


FIGURE 2

WO 2012/104275

PCT/EP2012/051507

3/7

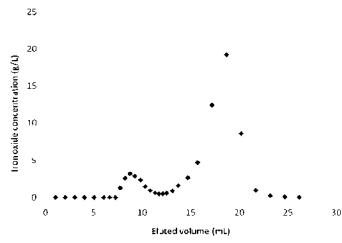


FIGURE 3

WO 2012/104275

PCT/EP2012/051507

4/7

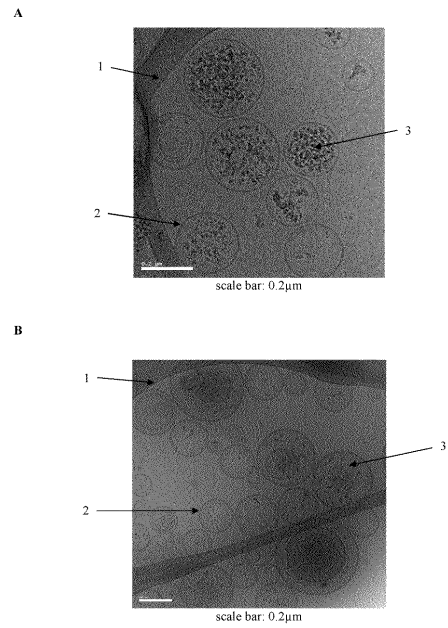


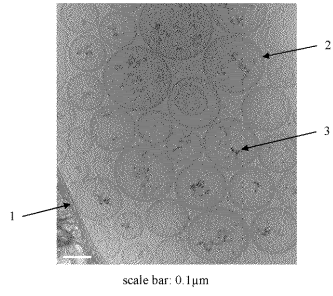
FIGURE 4

WO 2012/104275

PCT/EP2012/051507

5/7

C



D

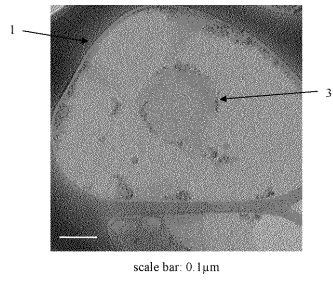


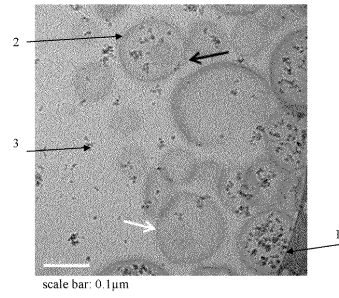
FIGURE 4 (Cont.)

WO 2012/104275

PCT/EP2012/051507

6/7

E



F

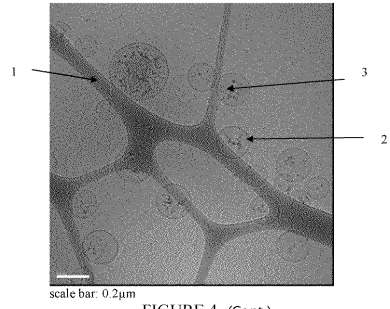


FIGURE 4 (Cont.)

WO 2012/104275

PCT/EP2012/051507

7/7

G

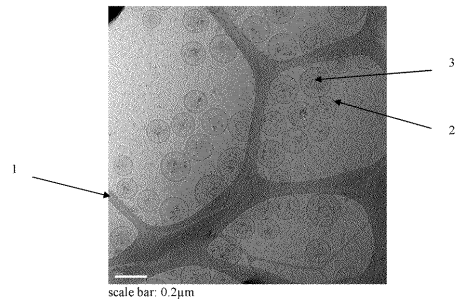


FIGURE 4 (Cont.)