

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6349304号  
(P6349304)

(45) 発行日 平成30年6月27日 (2018. 6. 27)

(24) 登録日 平成30年6月8日 (2018. 6. 8)

(51) Int. Cl.	F I
<b>A 6 1 K 31/713 (2006. 01)</b>	A 6 1 K 31/713
<b>A 6 1 K 47/36 (2006. 01)</b>	A 6 1 K 47/36
<b>A 6 1 K 47/38 (2006. 01)</b>	A 6 1 K 47/38
<b>A 6 1 K 47/24 (2006. 01)</b>	A 6 1 K 47/24
<b>A 6 1 K 9/16 (2006. 01)</b>	A 6 1 K 9/16

請求項の数 40 (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-509432 (P2015-509432)	(73) 特許権者	510020022
(86) (22) 出願日	平成25年5月2日 (2013. 5. 2)		ヤンセン・サイエンシズ・アイルランド・ユーシー
(65) 公表番号	特表2015-515968 (P2015-515968A)		アイルランド国コーク州リトル・アイランド、イーストゲート、イーストゲート・ビレッジ
(43) 公表日	平成27年6月4日 (2015. 6. 4)	(74) 代理人	100092783
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/059079		弁理士 小林 浩
(87) 国際公開番号	W02013/164380	(74) 代理人	100120134
(87) 国際公開日	平成25年11月7日 (2013. 11. 7)		弁理士 大森 規雄
審査請求日	平成28年4月28日 (2016. 4. 28)	(74) 代理人	100104282
(31) 優先権主張番号	12166595. 4		弁理士 鈴木 康仁
(32) 優先日	平成24年5月3日 (2012. 5. 3)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 上気道感染症の処置のためのポリイノシン-ポリシチジル酸 (ポリ (I : C)) 製剤

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ポリイノシン酸、ポリシチジル酸、水およびキャリアポリマーからなるマイクロ粒子であって、前記キャリアポリマーが、デンプン、アルギネート、カルボキシメチルセルロースおよびジパルミトイルホスファチジルコリンから選択される、マイクロ粒子。

## 【請求項 2】

前記ポリイノシン酸およびポリシチジル酸の平均鎖長が、およそ 3 0 0 塩基 ~ 6 , 0 0 0 塩基である、請求項 1 に記載のマイクロ粒子。

## 【請求項 3】

結合したポリイノシン酸およびポリシチジル酸の平均分子量が、およそ 1 8 0 k D a ~ 3 , 6 0 0 k D a である、請求項 1 または 2 に記載のマイクロ粒子。

## 【請求項 4】

前記ポリイノシン酸およびポリシチジル酸が、ナトリウム塩として存在する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のマイクロ粒子。

## 【請求項 5】

前記キャリアポリマーが、デンプンである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のマイクロ粒子。

## 【請求項 6】

前記デンプンキャリアポリマーが、部分アルファ化デンプンである、請求項 5 に記載のマイクロ粒子。

## 【請求項 7】

前記デンプンキャリアポリマーが、トウモロコシデンプン、ジャガイモデンプンまたはキャッサバデンプンである、請求項 5 に記載のマイクロ粒子。

## 【請求項 8】

前記デンプンが、部分アルファ化トウモロコシデンプンである、請求項 5 に記載のマイクロ粒子。

## 【請求項 9】

前記キャリアポリマーがアルギネートであり、かつ、前記アルギネートがアルギン酸ナトリウムである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のマイクロ粒子。

## 【請求項 10】

前記キャリアポリマーが、ジパルミトイルホスファチジルコリンである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のマイクロ粒子。

## 【請求項 11】

前記マイクロ粒子中のキャリアポリマーに対するポリイノシン酸およびポリシチジル酸の組み合わせの比が、 $1/200 (w/w) \sim 10/1 (w/w)$  である、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載のマイクロ粒子。

## 【請求項 12】

前記マイクロ粒子中のキャリアポリマーに対するポリイノシン酸およびポリシチジル酸の組み合わせの比が、 $1/100 (w/w) \sim 1/1 (w/w)$  である、請求項 11 に記載のマイクロ粒子。

## 【請求項 13】

前記マイクロ粒子中のキャリアポリマーに対するポリイノシン酸およびポリシチジル酸の組み合わせの比が、 $1/100 (w/w) \sim 1/5 (w/w)$  である、請求項 12 に記載のマイクロ粒子。

## 【請求項 14】

前記マイクロ粒子中のキャリアポリマーに対するポリイノシン酸およびポリシチジル酸の組み合わせの比が、 $1/12 (w/w) \sim 1/9 (w/w)$  である、請求項 13 に記載のマイクロ粒子。

## 【請求項 15】

請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の複数のマイクロ粒子を含む、組成物。

## 【請求項 16】

前記組成物のマイクロ粒子が、 $0.1 \mu m \sim 100 \mu m$  の間の平均粒径を有する、請求項 15 に記載の組成物。

## 【請求項 17】

前記組成物のマイクロ粒子が、 $0.1 \mu m \sim 200 \mu m$  の  $D_{v,50}$  を有する、請求項 15 または 16 に記載の組成物。

## 【請求項 18】

前記組成物のマイクロ粒子が、 $1 \mu m \sim 50 \mu m$  の  $D_{v,50}$  を有する、請求項 17 に記載の組成物。

## 【請求項 19】

前記組成物のマイクロ粒子が、 $2 \mu m \sim 40 \mu m$  の  $D_{v,50}$  を有する、請求項 18 に記載の組成物。

## 【請求項 20】

前記組成物のマイクロ粒子が、 $2 \mu m \sim 20 \mu m$  の  $D_{v,50}$  を有する、請求項 19 に記載の組成物。

## 【請求項 21】

前記組成物のマイクロ粒子が、 $10 \mu m \sim 20 \mu m$  の  $D_{v,50}$  を有する、請求項 20 に記載の組成物。

## 【請求項 22】

前記組成物が、液体である、請求項 15 ~ 21 のいずれか一項に記載の組成物。

10

20

30

40

50

## 【請求項 2 3】

前記組成物が、有機溶媒を含む、請求項 1 5 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 2 4】

前記有機溶媒が、グリセロール、エタノールまたはそれらの組み合わせである、請求項 2 3 に記載の組成物。

## 【請求項 2 5】

前記組成物が、リン酸緩衝食塩水を含む、請求項 1 5 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 2 6】

前記組成物が、乾燥粉末である、請求項 1 5 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の組成物。

10

## 【請求項 2 7】

前記マイクロ粒子が、1カ月の室温での貯蔵の間安定である、請求項 2 6 に記載の組成物

。

## 【請求項 2 8】

上気道のウイルス感染症を予防する方法において使用するための請求項 1 5 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の組成物であって、前記方法は、患者に前記組成物を投与する工程を含む、組成物。

## 【請求項 2 9】

前記ウイルス感染症が、ヒトライノウイルス感染症またはインフルエンザウイルス感染症である、請求項 2 8 に記載の組成物。

20

## 【請求項 3 0】

前記ウイルス感染が、ピコルナウイルス、ヒト呼吸器合胞体ウイルス、アデノウイルス、エンテロウイルスおよびメタニューモウイルスから選択される、請求項 2 9 に記載の組成物。

## 【請求項 3 1】

前記患者が、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) を有する、請求項 2 8 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 3 2】

対象における上気道のウイルス感染症の予防において使用するための組成物であって、ここで、

30

前記組成物は、マイクロ粒子を含み、前記マイクロ粒子は、ポリイノシン酸、ポリシチジル酸、水およびキャリアポリマーからなり、前記キャリアポリマーは、デンブン、アルギネート、カルボキシメチルセルロースおよびジパルミトイルホスファチジルコリンから選択される、組成物。

## 【請求項 3 3】

対象が、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) を有する、請求項 3 2 に記載の組成物。

## 【請求項 3 4】

経鼻投与用の、請求項 2 8 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 3 5】

請求項 1 5 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の組成物を含む、経鼻送達系。

40

## 【請求項 3 6】

マイクロ粒子を含む組成物を含む、経鼻送達系であって、前記マイクロ粒子が、ポリイノシン酸、ポリシチジル酸、水およびキャリアポリマーからなり、前記キャリアポリマーは、デンブン、アルギネート、カルボキシメチルセルロースおよびジパルミトイルホスファチジルコリンから選択される、経鼻送達系。

## 【請求項 3 7】

上気道感染症の予防および/または処置のための医薬の製造のための、請求項 1 5 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の組成物の使用。

## 【請求項 3 8】

上気道感染症の予防および/または処置のための医薬の製造のための、マイクロ粒子を含

50

む組成物の使用であって、前記マイクロ粒子は、ポリイノシン酸、ポリシチジル酸、水およびキャリアポリマーからなり、前記キャリアポリマーは、デンプン、アルギネート、カルボキシメチルセルロースおよびジパルミトイルホスファチジルコリンから選択される、使用。

【請求項 39】

請求項 15 ~ 34 のいずれか一項に記載の組成物を含む、デバイス。

【請求項 40】

マイクロ粒子を含む組成物を含む、デバイスであって、前記マイクロ粒子が、ポリイノシン酸、ポリシチジル酸、水およびキャリアポリマーからなり、前記キャリアポリマーは、デンプン、アルギネート、カルボキシメチルセルロースおよびジパルミトイルホスファチジルコリンから選択される、デバイス。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、感染症または風邪の処置および/または予防における使用のための、ポリイノシン - ポリシチジル酸 (ポリ (I : C)) と、デンプン、アルギネート、プラノース (blanose) または DPPC (ジパルミトイルホスファチジルコリン) から選択されるキャリアポリマーとのマイクロ粒子を含む組成物、ならびに感染症または風邪の予防および/または処置を必要とする患者による使用のための、前記組成物を含むデバイス、好ましくは経鼻送達系に関する。

20

【背景技術】

【0002】

風邪 (鼻咽腔炎、急性ウイルス性鼻咽頭炎、急性コリザ、または感冒としても知られる) は、主としてウイルスによって引き起こされる、上気道系のウイルス感染性疾患である。

【0003】

ウイルス

風邪は、上気道のウイルス感染症である。最も一般的に関係するウイルスは、99種類の血清型が知られているピコルナウイルス科のウイルスの1種である、ライノウイルス (30 ~ 50%) である。他のものとしては、コロナウイルス (10 ~ 15%)、インフルエンザ (5 ~ 15%)、ヒトパラインフルエンザウイルス、ヒト呼吸器合胞体ウイルス、アデノウイルス、エンテロウイルス、およびメタニューモウイルスが挙げられる。

30

【0004】

全部で200種類を超える血清学的に異なるウイルス型が感冒の原因となる。コロナウイルスが成人の感冒に特に関係している。30種類を超えるコロナウイルスのうち3または4種類がヒトにおける感染症の原因となるが、それらを研究室で増殖させることは困難であり、そのため、それらの重要性はそれほど十分に理解されているわけではない。多くの異なるウイルス型がありかつそれらは連続的に変異する傾向があるため、風邪に対する完全な免疫を獲得することは不可能である。

【0005】

臨床的徴候および症状

上気道ウイルスの初期兆候は、多くの場合、喉の痛みまたはチクチク感である。他の一般的な症状は、鼻水、充血、およびくしゃみである。これらは、場合によっては、結膜炎 (ピンクアイ)、筋肉痛、疲労、倦怠感、頭痛、衰弱、または食欲減退を伴う。咳および熱は、一般に、上気道ウイルスというよりもインフルエンザの徴候であり、陽性的中率は約80%である。症状は、乳幼児および低年齢小児においてより深刻であり得、これらの場合においては、症状には熱および蕁麻疹が含まれ得る。上気道ウイルスは、喫煙者においてもより深刻であり得る。

40

【0006】

ウイルス複製は、最初の接触から2 ~ 6時間後に始まる。症状は、通常最初の感染から

50

2～5日後に始まるが、時折10時間という少ない時間で発生する。症状は、症状発症から2～3日後にピークに達するが、インフルエンザの症状発症は、一定かつ迅速である。持続期間を短縮する既知の処置は現在のところ存在しない。しかしながら、症状は通常7～10日で自然治癒するが、一部の症状はことによると3週間までにわたって続く。小児においては、咳が、35～40%の症例で10日より長く続き、10%の症例で25日より長く継続する。風邪はヒトにおける最も頻度の高い感染性疾患であり、平均的な成人は年間2～4回感染症に罹り、平均的な小児は6～12歳の間の小児で年間数回感染症に罹る。米国では、感冒の発生率は、落葉季(秋季)および冬季により高く、ほとんどの感染症が9月～4月の間に起こる。こうした季節性は、学年度の開始のため、または人々がより多くの時間を室内で(互いにより近い距離に極めて接近して)過ごすためであり得、ウイルス伝播の機会が増大する。

10

#### 【0007】

##### 感染性期間

風邪は、症状の最初の2～3日の間が最も感染性であるが、風邪は、症状の発症までの数日間もまた感染性であり、症状が完全に治癒してしまうまで依然としていくらか感染性であり得る。

#### 【0008】

##### ヒトライノウイルス

ヒトライノウイルスは、ピコルナウイルス(*Picornaviridae*)科に属するエンテロウイルス属のメンバーである。HRV粒子は、4つのポリペプチド(VP1、VP2、VP3、およびVP4)からなる27～30nmの無エンベロープカプシドで構成されている。ウイルスカプシドは、およそ7200塩基の一本鎖RNAゲノムを含有する。ウイルスにコードされるタンパク質(VPg)が、RNAゲノムの5'末端に共有結合で結合している。ヒトライノウイルス(*human rhinovirus*: HRV)への感染の臨床的経過は十分に特徴付けられている。HRVは上気道および下気道、鼻粘膜、副鼻腔ならびに中耳に感染し得、感染症は「風邪」の症状を示す(上記参照)。感染症は自己限定性であり、典型的には上気道に局限される。末梢白血球数が、感染の最初の2～3日の間に上昇し得る。HRV感染はまた、下気道の感染、中耳炎(特に低年齢小児において)、および副鼻腔炎にも繋がり得る。ライノウイルス感染からの重篤な合併症(例えば、肺炎)は稀であるが、乳幼児および低年齢小児、特に、気管支肺異形成症、先天性心疾患、未熟、および神経学的状態などの基礎状態に罹っているもの、ならびに免疫抑制された(骨髄移植受容者)成人において生じることが報告されている。ピコルナウイルス(*Picornaviridae*)科の他のメンバーは中枢神経系に感染し得る(すなわち、ポリオウイルス、エンテロウイルス)が、HRVへのヒト中枢神経系の感染は報告されていない。

20

30

#### 【0009】

##### 処置

ライノウイルス感染症の処置または風邪の予防のための市販の抗ウイルス剤は存在しない。ライノウイルスによって引き起こされる上気道感染の処置は、典型的には一般市販薬の抗ヒスタミン薬、アスピリン、鎮咳薬、および鼻充血除去薬を用いての、症状(くしゃみ、鼻充血、鼻漏、眼の刺激、咽喉痛、咳、頭痛、熱、悪寒)の管理に基づく。HRV感染のより重篤な合併症(例えば、肺炎)は、医学的に適切な医療基準を用いて管理される。

40

#### 【0010】

##### 費用および医学的必要性

世界保健機関のデータによれば、10億件より多くの風邪の症例が、昨年米国で報告された。米国では、風邪は、1年に7500万～1億件の医師訪問に繋がり、その費用は控えめに見積もっても年間77億ドルである。米国人は、症状緩和のために29億ドルを一般用医薬品に費やし、さらに4億ドルを処方薬に費やす。1年に約2200万～1億8900万日の授業日が、感冒のため欠席される。その結果、親らは、1億2600万日の仕

50

事日を欠勤して、自分の子供を看病するために家にいる。被雇用者が感冒を患って欠勤する1億5000万日の仕事日に加えると、感冒関連の労働損失の経済的影響は、全部で年間200億ドルを超える。これは、仕事から失われた時間の40%を占める。

#### 【0011】

気道上皮細胞が、ライノウイルスおよびコロナウイルスのような上気道 (upper respiratory tract: URT) 感染性因子の主要な標的である。これらのウイルスへの感染は、感染した細胞の免疫系クリアランスを反映する症状発症の前に起こるので、直接的な抗ウイルス治療介入は、それほど有効にはなりそうにない。加えて、鼻粘膜中で直接的抗ウイルス化合物の活性レベルを実現および維持することは、鼻粘膜の高代謝回転のため非常に困難である。これに対し、身体自体の防御を利用し、鼻上皮細胞における抗ウイルス状態を誘導することによる予防は、その後のウイルス攻撃に対する著しい保護を結果としてもたらすこと、および疾患関連の症状を弱めることが、既に示されている。

10

#### 【0012】

感冒は1週間または2週間しか続かないことがあり得るが、重篤な感冒は1ヶ月までにわたって続き得る。感冒は、年齢および曝露に依存して、成人では平均して年間2~3回、小児では6~10回である。何百種という異なる血清型の感冒ウイルスが存在しており、このことにより、それらの全てに対して有効であるであろう一般的なワクチン予防を開発することが不可能になっている。対症療法は、一般に、睡眠誘導性経口抗ヒスタミンおよび/または刺激性副作用を有する血管収縮性充血除去薬を用いることを含む。これは、ほんの僅かに有効であるにすぎず、こうした副作用は、多くの場合、感染自体と同じように消耗性である。予防は理想的な解決法であるであろうが、上で言及した理由から、全ての異なる血清型に対する広範に有効なワクチンの見込みは、近い将来においてはとてもありそうにない。したがって、隔離なしでは、人々は、定期的に、とりわけ「寒季 (cold season)」の間に、こうした感染性因子に曝露されるので、広範に有効で、好都合な、副作用のない予防薬は、公衆衛生および職場における生産性に大きな影響力を有するであろう。

20

#### 【0013】

先天性 (innate) 免疫応答、すなわち身体のための「早期警告系」を標的化すれば、上述の問題を解決するであろう。鼻上皮細胞に存在するこの系は、一旦適切に刺激されると、細胞にそれらがウイルスに攻撃されていると思わせ、抗ウイルス防御応答を誘発する。一旦これが生じると、細胞は、その後のウイルス攻撃に免疫性となる。いくらかの初期の研究は1980年代末期には行われていたのであるが、先天性免疫応答を誘発するための免疫刺激性分子 (例えば、インターフェロン) の使用の場合を見てみると、製造は高価であり、それらの作用を制御することが困難であった。

30

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0014】

現研究の目的は、測定可能かつ制御可能な様式で (例えば、数日おきにまたはさらには1週間に1度) 使用されて、先天性免疫系に抗原刺激をし、ウイルス感染に対する保護を提供し得る、誘発性分子 (ポリ (I:C)) の製剤を開発することであった。以下に概説したアプローチは、有効性を示しはしたが実用的でない既存の薬剤ポリ (I:C) を使用し、製剤科学を用いてそれを好都合かつ有効にする。

40

#### 【0015】

Toll様受容体3 (Toll-like receptor 3: TLR3) は、ヒトにおいてTLR3遺伝子によってコードされるタンパク質である。TLR3は、先天性免疫系のパターン認識受容体のToll様受容体ファミリーのメンバーであり、病原体認識および先天性免疫の活性化において重要な役割を果たす。TLRは、ショウジョウバエ属からヒトまで高度に保存されており、構造的および機能的類似性を共有している。TLRは、感染性因子上に発現される病原体関連分子パターン (pathogen-associated

50

ciated molecular pattern: PAMP)を認識し、有効な免疫の発達のために必要なサイトカインの産生を媒介する。種々のTLRは、異なる発現パターンを示す。このTLR3受容体は、気道上皮細胞によっても発現され、白血球の樹状亜集団に限局される。

【0016】

TLR3は、二本鎖RNA(double-stranded RNA: dsRNA)を認識する。二本鎖RNAは、ウイルス複製サイクルの間に形成され得る2本の相補的な鎖を有するRNAである。認識すると、TLR3は、NF- $\kappa$ Bおよびインターフェロン調節因子3(Interferon Regulatory Factor 3: IRF3)のような転写因子の活性化を誘導して、他の細胞にそれらの抗ウイルス防御を高めるように合図するI型インターフェロンの産生を増加させる。

10

【0017】

TLR3の構造は、隣接した馬蹄に接した大きな馬蹄形を形成し、2つの馬蹄の「ダイマー」を形成している。TLR3タンパク質表面の大部分が糖分子で覆われており、これによりこれは糖タンパク質となっているのであるが、一方の面(2つの馬蹄の間の既述の界面を含む)に、大きな糖非含有表面が存在する。この表面はまた、正に荷電したアミノ酸が豊富な2つの別個のパッチを含有しており、それらは負に荷電した二本鎖RNAのための結合部位であり得る。

【0018】

ポリイノシン-ポリシチジル酸(ポリ(I:C))は、1,000,000ダルトンまでのMW分布を有する二本鎖RNA分子である。ポリ(I:C)は、ウイルスRNAを模倣するToll様受容体3(TLR3)リガンドであり、先天性免疫応答の公知の刺激薬である。経鼻的に投与されると、ポリ(I:C)は、鼻上皮におけるインターフェロンおよびのような抗ウイルスタンパク質の発現を誘導する。ポリ(I:C)は、ライノウイルス感染症の回数および重症度を低減することが示されている。

20

【0019】

ポリ(I:C)は、水溶液中の不安定な分子である。現在のところ、有効な治療効果または予防効果を達成するためには、ポリ(I:C)は、使用直前に再溶解され、2時間おきに投与される必要がある。患者コンプライアンスを改善するためおよび投与頻度を低減するために、安定であり、かつ向上した有効性を示す、新規の製剤を開発した。

30

【0020】

ポリ(I:C)を、鼻上皮上での滞留時間を延長し得、先天性免疫系のより有効かつ制御可能な刺激を提供し得る、数種の生体接着性ポリマーと共に製剤化した。

【課題を解決するための手段】

【0021】

本発明は、室温でほぼ無期限に貯蔵され得るであろう、かつその先天性免疫系刺激活性を保持する、特異な製剤の特定を提供する。

【0022】

さらに、製剤は、ポリ(I:C)の有効性を向上させ、はるかに少ない頻度の投与を一層大きなTLR3刺激活性を伴って可能にする。

40

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1-1】ポリ(I:C)およびポリ(I:C)-キャリア混合物の生体(インターフェロン)刺激能。GFP-レポーター構築物がインターフェロン- $\gamma$ -プロモーター下において発現されたポリ(I:C)応答性細胞を、24時間にわたりポリ(I:C)-キャリア混合物と共に(1:5比で)インキュベートし、続いてGFP発現について分析した。Y軸上の数字は、試料中の総生細胞に対するGFP+細胞の百分率を示す。X軸上の数字は、混合物中のポリ(I:C)の濃度を示す。2つの実験を代表する結果が示されている。

【図1-2】ポリ(I:C)およびポリ(I:C)-キャリア混合物の生体(インターフ

50

エロン) 刺激能。GFP - レポーター構築物がインターフェロン -  $\gamma$  - プロモーター下において発現されたポリ (I : C) 応答性細胞を、24 時間にわたりポリ (I : C) - キャリア混合物と共に (1 : 5 比で) インキュベートし、続いて GFP 発現について分析した。Y 軸上の数字は、試料中の総生細胞に対する GFP + 細胞の百分率を示す。X 軸上の数字は、混合物中のポリ (I : C) の濃度を示す。2 つの実験を代表する結果が示されている。

【図 2】噴霧乾燥された部分アルファ化トウモロコシデンブン - ポリ (I : C) ミクロ粒子の走査型電子顕微鏡写真。

【図 3】室温での 1 ヶ月の貯蔵後のポリ (I : C) 概念の安定性。GFP - レポーター構築物を有するポリ (I : C) 応答性細胞を、24 時間にわたりポリ (I : C) - キャリア混合物と共にインキュベートし、続いて GFP 発現について分析した。Y 軸上の数字は、試料中の総生細胞に対する GFP + 細胞の百分率を示す。X 軸上の数字は、混合物中のポリ (I : C) の濃度を示す。2 つの実験を代表する結果が示されている。

【発明を実施するための形態】

【0024】

したがって、本発明は、ポリイノシン - ポリシチジル酸 (ポリ (I : C)) と、デンブン、アルギネート、ブラノースまたは DPPC (ジパルミトイルホスファチジルコリン) から選択されるキャリアポリマーとのミクロ粒子を含む組成物に関する。ミクロ粒子は、0.1  $\mu\text{m}$  ~ 100  $\mu\text{m}$  の間の平均粒径を有する粒子である。好ましくは、キャリアポリマーは、トウモロコシ、ジャガイモまたはキャッサバから得られるデンブンである。

【0025】

組成物に含まれるポリ (I : C) - キャリアポリマー微小球 (または所謂ミクロ粒子とも) は、噴霧乾燥処理などの粒子形成処理によって製造される。

【0026】

本発明に従うポリ (I : C) / デンブン比は、1 / 200 (w / w) ~ 1 / 0.1 (w / w) の範囲であるが、好ましくは 1 / 100 (w / w) ~ 1 / 1 (w / w)、さらにより好ましくは 1 / 100 (w / w) ~ 1 / 5 (w / w) の範囲であり、さらに、1 / 12 ~ 1 / 9 (w / w) の間のポリ (I : C) / デンブン比が最も好ましい。

【0027】

本発明に従う組成物中のミクロ粒子の  $D_v 50$  (= 粒子の体積に基づく 50% 累積網下) は、0.1 マイクロメートル ~ 200 マイクロメートル、好ましくは 1 マイクロメートル ~ 50 マイクロメートル、より好ましくは 2 マイクロメートル ~ 40 マイクロメートル、さらにより好ましくは 2 マイクロメートル ~ 20 マイクロメートル、最も好ましくは 10 マイクロメートル ~ 20 マイクロメートルの範囲である。

【0028】

本発明の組成物はまた、有機溶媒を含む液体組成物であり得、ここで、有機溶媒は、グリセロールまたはエタノールまたはそれらの組み合わせをベースとするものである。

【0029】

本発明の組成物は、医療において、好ましくは上気道のウイルス感染症 (例えば、「風邪」と呼ばれるもの) の予防および / または処置における使用のために使用され得る。

【0030】

本発明の組成物は、喘息および / または COPD (慢性閉塞性肺疾患) を患っている患者によって、やがて起こる風邪の症状を潜在的に予防および / または処置するために使用され得る。

【0031】

上気道感染症を予防および / または処置するための好ましい方法は、経鼻投与によって行われる。

【0032】

ポリイノシン - ポリシチジル酸 (ポリ (I : C)) と、デンブン、アルギネート、ブラノースまたは DPPC (ジパルミトイルホスファチジルコリン) から選択されるキャリア

10

20

30

40

50

ポリマーとのマイクロ粒子を含む本発明の組成物は、(ウイルス)感染症または風邪の処置および/または予防のために使用され得、ここで、組成物は、1日~1ヶ月の範囲内、より好ましくは数日おきからの範囲内、またはさらには1週間に1度からの範囲内の時間間隔で、経鼻適用によって投与される。

【0033】

0.1マイクロメートル~200マイクロメートル、好ましくは1マイクロメートル~50マイクロメートル、より好ましくは2マイクロメートル~40マイクロメートル、さらにより好ましくは2マイクロメートル~20マイクロメートル、最も好ましくは10マイクロメートル~20マイクロメートルの範囲である組成物中のマイクロ粒子径と組み合わせ、ポリ(I:C)/デンブン比が1/200(w/w)~1/0.1(w/w)の範囲であるが、好ましくは1/100(w/w)~1/1(w/w)、さらにより好ましくは1/100(w/w)~1/5(w/w)の範囲であり、さらに、1/12~1/9(w/w)の間のポリ(I:C)/デンブン比が最も好ましい上述の組成物が、(ウイルス)感染症または風邪の処置および/または予防のために使用され得、ここで、前記組成物は、1日~1ヶ月の範囲内、より好ましくは数日おきからの範囲内、またはさらには1週間に1度からの範囲内の時間間隔で、経鼻適用によって投与される。

10

【0034】

本発明に従う組成物を含むデバイス、特に経鼻送達系もまた、本発明の一部である。

【0035】

本発明によれば、ポリ(I:C)は、経鼻投与のための乾燥粉末として製剤化される。安定性を改善するために、ポリ(I:C)は、ドラム乾燥された蠟質トウモロコシデンブンとポリ(I:C)とを含有する水性混合物から噴霧乾燥される。

20

【0036】

デンブンは、次の2つの機能を有すると考えられる。(1)鼻内で生体接着剤として機能すること。(2)蠟質トウモロコシデンブン中に高濃度で存在するアミロペクチンが、鼻内でアミラーゼにより分解されてポリ(I:C)を放出する。

【0037】

経鼻投与は、好ましくは、単回用量経鼻粉末デバイス(Aptar Pharma Germanyから供給される単位用量デバイス)を用いて達成される。単位用量デバイスは、能動的送達系であり、これは、患者が吸入する必要がなく、性能が患者によって左右されないということを意味する。投与は駆動によって行われ、この駆動は過圧によって制御される。一吹き当たりの用量は、噴霧乾燥粉末中のポリ(I:C)の濃度および放出される粉末重量によって決まる。この粉末は、各外鼻孔内に一吹き毎に新しいデバイスを用いて投与されるであろう。

30

【0038】

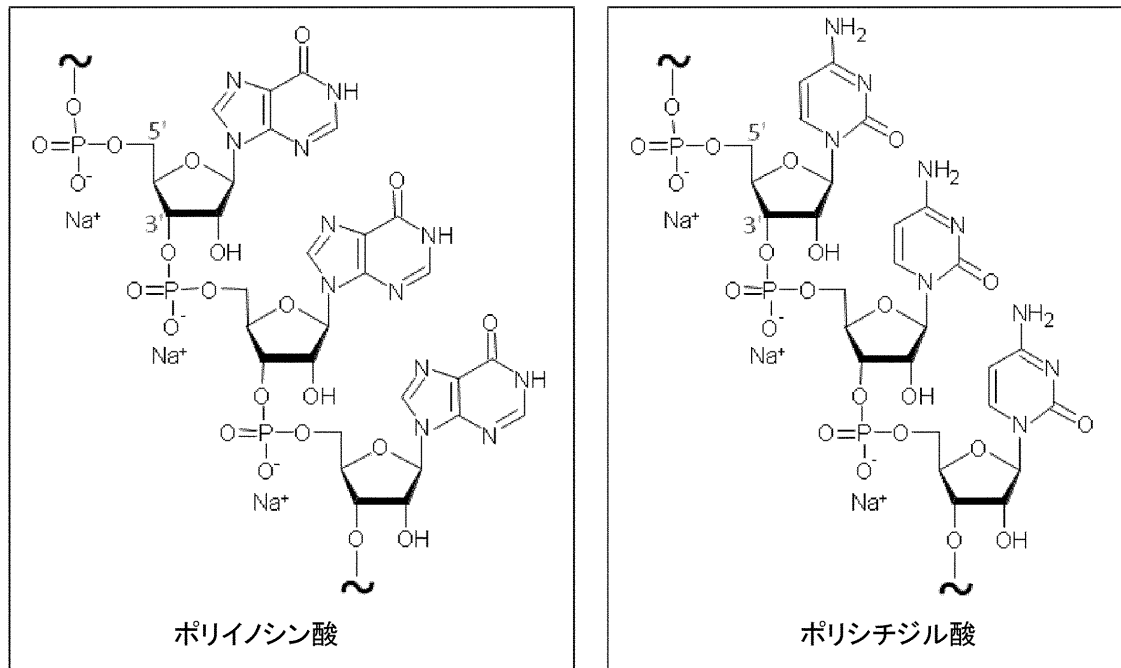
上述のように、ポリ(I:C)は、イノシン酸およびシチジル酸のナトリウム塩の反平行ポリヌクレオチド鎖からなる合成二本鎖RNAである。これらの鎖は、イノシン塩基とシトシン塩基との間に形成される水素結合によって非共有結合で結合している。

【0039】

ポリ(I:C)についての平均鎖長は、300~6,000塩基対の間の範囲であり、これは、およそ180,000~3,600,000ダルトンに相当する。分子式は、 $(C_{10}H_{10}N_4NaO_7P)_x \cdot (C_9H_{11}NaN_3O_7P)_x$  である。

40

## 【化 1】



10

20

## 【 0 0 4 0 】

上記のポリ ( I : C ) は購入できるが、任意選択で、社内で例えば以下の手順を用いて作製することもできる。

## 【 0 0 4 1 】

二重鎖生成物ポリ ( I : C ) は、ポリイノシン ( I ) およびポリシチジン ( C ) の個々のホモポリマーから製造される。ポリ I およびポリ C は、ポリヌクレオチドホスホリラーゼ ( PNPアーゼ ) の存在下においてヌクレオシドジホスフェートのイノシンおよびシチジンを個々に重合させることにより合成される。各ヌクレオシドジホスフェートは、結果として生じるリボ核酸ポリマーの長さを制御するために、個々に 20 ~ 24 時間にわたり、PNPアーゼによって重合される。次いで、酵素プロテインキナーゼを、重合反応を停止させるために添加する。結果として生じるホモポリマー ( すなわち、一本鎖 RNA 分子 ) は、各ポリマー生成物の分子量範囲を特定の範囲内に制御するために加水分解される。加水分解された生成物は、溶液から一本鎖 RNA 分子 ( *single stranded RNA* : *ssRNA* ) を沈殿させるために、エタノールで処理される。沈殿物は上清から分離され、水に溶解される。次いで、*ssRNA* の溶液は、微粒子を除去するために濾過され、低分子量汚染物質を除去するために限外濾過され、次いで凍結乾燥される。凍結乾燥された *ssRNA* 生成物は、確実に生成物が規格の範囲内にあるようにするために、個々に純度、分子量、および他の品質特性について試験される。

30

## 【 0 0 4 2 】

個々の一本鎖ホモポリマー ( ポリ I およびポリ C ) は、個々に 0 . 0 1 5 M 塩化ナトリウムに溶解され、次いで、二本鎖の二重鎖生成物 ( ポリ I : ポリ C ) を構成するそれらの鎖をアニリングするために合わされる。混合後、結果として生じる溶液は濾過される。濾液が、低分子量汚染物質を除去するために限外濾過される。次いで、限外濾過された生成物は凍結乾燥される。結果として生じる二重鎖生成物は、 $-20^{\circ}\text{C}$  で貯蔵される。凍結乾燥された *dsRNA* 生成物は、確実に生成物が規格の範囲内にあるようにするために、純度、分子量、および他の品質特性について試験される。

40

## 【実施例】

## 【 0 0 4 3 】

材料および方法

ポリイノシン - ポリシチジル酸ナトリウム塩 ( ポリ ( I : C ) , *Midland Ce*

50

rtified Reagent Company Inc (Texas, USA), ロット020905、部分アルファ化トウモロコシデンブン, Stada AG (Bad Vilbel, Germany), ロット93301-9628、カルボキシメチルセルロースナトリウム (Blanose 7MF), Ashland Aqualon (Wilmington, DE, USA) ロット3-30172、ジパルミトイルホスファチジルコリン (Lipoid PC 16:0/16:0), Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany), ロット563098-01/049、ラクトース水合物 (#316 Fast Flo), Foremost (Banaboo, WI, USA), ロット8509052261、アルギン酸ナトリウム (Protanal LF10/60LS), FMC Biopolymer (Drammen, Norway), ロットS19616、無水エタノール Chem-Lab (Zedelgem, Belgium), ロット17.2712904.400。

10

## 【0044】

ポリ(I:C)のインビトロ生物活性

グリーン蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein: GFP) および Renilla ルシフェラーゼ構築物 (B1L-GAR5構築物) に連結された長い IFN- $\beta$  プロモーター (位置 21069463 ~ 21067869 の第9染色体) を含有するベクターに、ポリ(I:C) 感受性 A549 細胞 (癌ヒト肺胞上皮細胞) を感染させた。ポリ(I:C) で刺激すると、IFN経路が活性化され、その結果、B1L-GAR5 レポーター構築物の活性化ならびに GFP および ルシフェラーゼ レポーター遺伝子の発現がもたらされる。極めて応答性の高い細胞クローンを得るために、ポリ(I:C) 刺激細胞を、FACS Aria フローサイトメーター (Becton Dickinson) を用いて高 GFP 発現について選別し、 $>200$  クローンのうちから、ポリ(I:C) 応答性細胞の%に基づき H10 クローンを選択した。A549-B1L-GAR5-H10 細胞を、組織培養フラスコが細胞で集密的となるまで増殖させ、その後、培地を新しくし、細胞をさらに4日間培養した。次いで、細胞を標準的なトリプシン処理を用いて採取し、計数し、96 ウェル平底プレートに1ウェル当たり50,000細胞で播種し、100  $\mu$ l ずつのインターフェロン ( $75 \text{ U/ml}$ ) で一晩刺激した。翌日、100  $\mu$ l のポリ(I:C) - キャリアポリマー混合物を、ポリ(I:C) : ポリマー = 1 : 5 の比で細胞に添加して200  $\mu$ l の最終体積を結果としてもたらし、細胞をさらに24時間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を(トリプシンを介した分離によって) 採取し、BD-Calibur フローサイトメーターを用いて分析した。

20

30

## 【0045】

ポリ(I:C)のキャリアポリマーとの噴霧乾燥

アルギネート、CMC (Blanose) および部分アルファ化トウモロコシデンブンの噴霧乾燥処理を、B90 ナノ噴霧乾燥器および Buchi B290 ミニ噴霧乾燥器 (Buchi, Flawil, Switzerland) を用いて行った。概して、B90 ナノ噴霧乾燥器を用いた噴霧乾燥実験は、溶液の高い粘度のため乏しい収率を結果としてもたらし、脱塩水を、0.2 ミクロン酢酸セルロースフィルター (Whatman FFP30/0.2 CAS) を用いて濾過し、ガラスビーカーに加えた。磁気攪拌機を用いて攪拌しながら賦形剤を添加した。完全に溶解した時に、ポリ(I:C) を溶液に添加した。0.5% (w/w) の総固形分濃度およびポリ(I:C) / 賦形剤の比 1/9 (w/w) を、全ての概念に適用した。供給材料溶液の組成を、表1Aに列挙する。

40

## 【0046】

## 【表1】

表1A:アルギネート、CMCおよび部分アルファ化トウモロコシデンブンの供給材料組成

材料	量(g)			10
	アルギネート	CMC	部分アルファ化 トウモロコシ デンブ	
Na-アルギネート (Protanal LF 10/60LS)	1.35			
Na-CMC (Blanose 7 MF)		1.35		
DDWM			1.35	
ポリ(I:C)	0.15	0.15	0.15	
脱塩水	300	300	300	

## 【0047】

DPPC - ポリ(I:C) 概念については、異なるエタノール/水混合物へのDPPC (ジパルミトイルホスファチジルコリン) の溶解度を測定した。純粋なDPPCを噴霧乾燥した場合、得られた収率は約25%で低かった。したがって、キャリア材料の添加を検討した。Na-CMC、Na-アルギネート、蠟質トウモロコシデンブおよびマルトデキストリンはエタノールを添加すると沈殿するため、ラクトースを、ポリ(I:C)のDPPCとの噴霧乾燥のためのキャリアとして選択した。脱塩水を、0.2ミクロン酢酸セルロースフィルター(Whatman FP30/0.2 CA-S)を用いて濾過し、ガラスビーカーに加えた。磁気攪拌機を用いて攪拌しながらラクトースを添加した。溶解すると、両方の溶液を混合し、60℃まで加熱した。完全に溶解した時に、溶液を室温まで冷却し、ポリI:Cを添加した。0.28%(w/w)の総固形分濃度およびポリ(I:C)/ラクトース/DPPCの比1/2.25/6.75(w/w/w)を適用した。供給材料溶液の組成を、表1Bに示す。

## 【0048】

## 【表2】

表1B: DPPC概念の供給材料組成

材料	量(g)	40
	DPPC	
DPPC (Lipoid PC 16:0/16:0)	1.35	
無水エタノール	430.80	
ラクトース一水和物 (#316 Fast Flo)	0.45	
ポリ(I:C)	0.20	
脱塩水	287.20	

## 【0049】

これらの溶液の噴霧乾燥を、実験室規模の噴霧乾燥器 B 290 型不活性ループ (B u c h i , F l a w i l , S w i t z e r l a n d ) で行った。溶液を、蠕動ポンプ 520 U 型 (W a t s o n M a r l o w , C o r n w a l l , U K ) によって、噴霧乾燥器の上部にある二流体ノズル (直径: 0.7 mm) に供給した。噴霧乾燥器は、補助流窒素フローモードで運転した。噴霧乾燥された粒子を、サイクロンに取り付けられたレザバ中に収集した。粒子の収集後、サイクロンを室温まで冷却した。収集された粉末を、バイオハザードキャビネット中の琥珀色のガラスバイアルに移した。このバイアルを窒素でフラッシュし、密閉し、5 で貯蔵した。処理パラメータを、表 2 に列挙する。

## 【0050】

10

## 【表 3】

表 2: 処理条件

処理パラメータ	目標値			
	アルギネート	CMC	部分アルファ化 トウモロコシデ ンブン	DPPC
入口乾燥用窒素温度(°C)	150	150	150	100
出口乾燥用窒素温度(°C)	70	70	70	50
供給量 (g/分)	4.0	4.1	4.0	5.3
冷却器温度 (°C)	NA	NA	NA	10
乾燥用窒素アスピレーター (%)	100	100	100	100
噴霧窒素圧力低下 (バル)	0.3	0.3	0.3	0.3
酸素濃度 (%)	<6	<6	<6	<6

20

## 【0051】

さらなるポリ (I : C) - 部分アルファ化トウモロコシデンブンの概念の噴霧乾燥

噴霧乾燥処理を、B u c h i B 290 ミニ噴霧乾燥器 (B u c h i , F l a w i l , S w i t z e r l a n d ) を用いて行った。ヌクレアーゼ非含有水をガラスビーカーに加え、部分アルファ化トウモロコシデンブンを U l t r a T u r a x T 25 (J a n k e & K u n k e l ) を用いてデンブunが完全に分散するまで混合しながら添加する。ポリ (I : C) を、ヌクレアーゼ非含有水に溶解させ、ポリ (I : C) が完全に溶解するまで磁気攪拌機を用いて攪拌した。溶解させたポリ (I : C) を、分散させたデンブunに添加して、室温で攪拌し、噴霧乾燥の直前にポリ (I : C) 溶液を調製する。10% (w / w) または 0.45% の総固形分濃度およびポリ (I : C) / デンブunの比 1 / 200 - 1 / 100 - 1 / 50 - 1 / 24 - 1 / 9 (w / w) を適用した。これらの製剤の供給材料組成を、表 3 A に示す。

30

## 【0052】

40

## 【表4】

表3A:部分アルファ化トウモロコシデンプン概念の供給材料組成:

材料	量(g)					
	1/200 10%	1/100 10%	1/50 10%	1/24 10%	1/9 10%	1/9 0.45%
部分アルファ化 トウモロコシデンプン (g)	50.25	25.25	25.5	12.5	9	4.5
ポリ(I:C) (g)	0.25	0.25	0.500	0.500	1	0.5
ヌクレアーゼ非含有水(g)	454.5	229.5	234	117	90	1106

10

## 【0053】

溶液を、蠕動ポンプによって、噴霧乾燥器の上部にある二流体ノズル（直径：0.7 mm）に供給した。噴霧乾燥器は、補助流窒素フローモードで運転した。噴霧乾燥された粒子を、サイクロンに取り付けられたレザバ中に収集した。粒子の収集後、ガラスシリンダーおよびサイクロンを室温まで冷却した。収集された粉末を、琥珀色のガラス瓶に移した。この瓶を、アルミニウムのペーパーロックバッグに入れる。このバイアルを室温で貯蔵した。処理パラメータを、表3Bに列挙する。

20

## 【0054】

## 【表5】

表3B: 処理条件

処理パラメータ	200/1 - 100/1 - 50/1 - 24/1 -	9/1
	9/1	10% w/w
入口乾燥用窒素温度(°C)	180	150
出口乾燥用窒素温度(°C)	95-112	75-95
供給量 (g/分)	6-9	5-6
冷却器温度 (°C)	10	10
乾燥用窒素アスピレーター (%)	100	100
噴霧窒素圧力低下 (パール)	0.3	0.4
酸素濃度 (%)	<6	<6

30

## 【0055】

## 走査型電子顕微鏡法

試料を、直径 + / - 30 ~ 50 nm を有する金粒子でスパッタした。画像を、Everhart Thornley 検出器を備えた FEI 走査型電子顕微鏡 - Quanta 200F 型を用いて生成した。

## 【0056】

## 含水量 - カールフィッシャー滴定

概念の含水量を、直接容量カールフィッシャー滴定によって測定した。KF TITRATOR V30 を使用する (Mettler Toledo, US)。粉末 (50 ~ 1

50

00 mg) を、Hydranal (登録商標) メタノールドライ (Sigma Aldrich) を含有する滴定容器に移し、300 秒間攪拌した。5 ml ビュレットを用いて、2 mg/ml の濃度の Hydranal (登録商標) コンボジット 2 (Sigma Aldrich) で滴定を行った。終点については、15 µg/分のストップドリフトを適用した。三重反復試験で試料を分析した。

【0057】

粒径の測定

単に目的の生成物の体積分布に基づいて、粒径分布データを評価する傾向が存在する。それについて、評価は、多くの場合、 $D_v 10$ 、 $D_v 50$  および  $D_v 90$  累積網下の比較に限られている。

【0058】

しかしながら、 $d_v \times$  累積網下を比較することは、異なる技術および計器が容易に異なる結果に繋がるという事実から、必ずしも簡単なことではあり得ない。

【0059】

さらに、粒径 (または形状) 分布データから、それらのデータを異なる観点から見る (すなわち、他のパラメータを用いる) ことによってより多くの情報が得られ得る。

【0060】

粒径分布の測定については、レーザー回析試験法を用いた。

【0061】

Hydro 2000 S 湿式分散モジュール (または同等の系) を備えた Malvern Mastersizer 2000 レーザー回析計を用いて分析を行った。20 nm ~ 2 mm のサイズ範囲において、青色光 ON 検出モードでこの計器を使用する。

【0062】

インフルエンザマウスモデルにおける製剤のインビボ試験

全ての動物研究が、倫理委員会によって承認され、国内および国際ガイドラインに従って行われた。8 ~ 12 週齢の雌 Swiss マウス (Janvier) を使用した。全ての鼻腔内処置を、イソフルラン麻酔下において行った。ある量の液体を投与するために、小滴を鼻孔の上に直接適用し、口を閉じることによって、その液滴が鼻孔を介して鼻腔内に入ることを可能にした。噴霧乾燥されたポリ (I : C) - キャリア粉末を、各実験の直前に新たに調製し、15 µl の液体として投与した。製剤化されていないポリ (I : C) を、リン酸緩衝食塩水 (PBS) 中 1 mg/ml の濃度で投与した。典型的に、攻撃前の 2 または 3 日目に、前処置を行った。0 日目に、25 µl の  $10 \times LD_{90}$  マウス適合 H1N1 PR (FLU PR 1600517) (高容量攻撃) で、または 15 µl の  $1 \times LD_{90}$  (低容量攻撃) で、マウスを攻撃した。攻撃に続き、体重および挙動を評価することにより、マウスを 14 日間毎日モニタリングし、体重減少が攻撃の日と比べて > 20 % となった場合、またはマウスの挙動が疾病の重篤な徴候を示した場合は、マウスを安楽死させた。

【0063】

結果

キャリアポリマーの選択

鼻風邪の予防のための成功する概念の必要条件は、ポリ (I : C) の生物活性が、最終製剤において保持されていなければならないことである。したがって、噴霧乾燥処理のためのキャリアポリマーの選択における第 1 の工程は、ポリ (I : C) のインターフェロン刺激能を阻害しないポリマーを特定することであった。この点に関して、数多くのキャリアポリマーを、5 : 1 比 (w : w) でポリ (I : C) と混合し、滴定量で、ポリ (I : C) 応答性のインターフェロンプロモーター - GFP - レポーター (A549 - IFN - GAR5、クローン H10) 細胞株 (詳細については材料および方法参照) に添加した。この細胞を 24 時間にわたり 37 °C および 5 %  $CO_2$  でインキュベートし、その後、フローサイトメーターを用いて GFP<sup>+</sup> 細胞の百分率を測定した。ポリ (I : C) の濃度を高めると、より高い百分率の GFP<sup>+</sup> 細胞を結果としてもたらすので、我々は、このインビト

10

20

30

40

50

ロモデルをポリ ( I : C ) - キャリア混合物の生物活性を評価するために用いることができる ( 図 1 ) 。試験した種々のキャリアのうち、Na - アルギネート、部分アルファ化トウモロコシデンプン、DPPC およびブラノースは、ポリ ( I : C ) のインターフェロン刺激能を阻害しなかった。それに対して、カーボポール ( carbopol ) 、 - カラゲナン、キトサン、およびポリエチルアミンは、ポリ ( I : C ) のインターフェロン刺激能を阻害または完全に抑制した。これらの結果に基づき、ポリ ( I : C ) に影響を及ぼさないキャリアである Na - アルギネート ( Protanal LF10/60LS , FMC Biopolymer ) 、ドラム乾燥蠟質トウモロコシデンプン ( Cargill , Stada を介して ) 、DPPC ( Lipoid PC 16 : 0 / 16 : 0 , Lipoid ) 、および Na - CMC ( Blanose 7MF ) を、次の製剤開発工程のために

10

【 0064 】

Na - アルギネートは、マンヌロン酸 ( M ) ブロックおよびグルロン ( G ) ブロックからなるゲル形成性多糖である。ゲルの強度および柔軟性は、G / M 比によって規定される。Na - CMC は、カルボキシメチル基を有するセルロース誘導體である。これは、経鼻製剤において多く用いられている。部分アルファ化トウモロコシデンプンは、粘膜組織に対して非刺激性の、アミロペクチンベースのデンプンである。Na - アルギネート、Na - CMC および部分アルファ化トウモロコシデンプンの 3 つの賦形剤は、良好な生体接着剤特性を示す。DPPC は、リン脂質であり、肺サーファクタントの主成分である。DPPC は、経鼻吸収を向上させ得る。

20

【 0065 】

噴霧乾燥処理ならびに概念の生物活性および安定性

噴霧乾燥処理を、B90 ナノ噴霧乾燥器および Buchi B290 ミニ噴霧乾燥器 ( Buchi , Flawil , Switzerland ) を用いて行った。概して、B90 ナノ噴霧乾燥器を用いた噴霧乾燥実験は、溶液の高い粘度のため乏しい収率を結果としてもたらした。

【 0066 】

各処理後に、収率を、レザバ中に収集された粉末の量を供給材料の調製のために計量した粉末の理論量で除した値として計算した。結果を表 4 に列挙する。概念 4 についてのより低い収率は、サイクロン内への粉末付着の観察によって説明され得、この粉末付着は恐らくは、噴霧乾燥の間のサイクロン内の局所温度における DPPC の粘着性によって引き起こされるものである。

30

【 0067 】

【 表 6 】

表 4: 収率 (理論重量に対する収集された粉末の重量)

	概念			
	アルギネート(1)	CMC(2)	部分アルファ化 トウモロコシ デンプン (3)	DPPC(4)
処理収率 % w/w)	77.7	74.1	86.2	52.0

40

【 0068 】

走査型電子顕微鏡法

噴霧乾燥粉末の SEM 画像を図 2 に示す。

【 0069 】

概念 3 ( 部分アルファ化トウモロコシデンプン ) の粉末は、凹んだ球体からなっていた。対応するプラセボ粉末に対するレーザー回折測定は、4 . 5 マイクロメートルの D<sub>v</sub> 5

50

0 を有する粒径を結果としてもたらした。

【0070】

含水量

噴霧乾燥粉末の含水量を測定した。残留水は、環境からの水吸収および噴霧乾燥処理のために用いられた水に由来する。

【0071】

【表7】

表5: 噴霧乾燥後の概念の含水量

	概念			
	アルギネート(1)	CMC(2)	部分アルファ化 トウモロコシ デンプン(3)	DPPC(4)
含水量 (% w/w)	8.2	7.48	7.38	3.61

10

【0072】

部分アルファ化トウモロコシデンプン、NaCMCおよびNa-アルギネートは吸湿性の賦形剤であり、これは、膨張およびゲル形成を通しての生体接着性に必要とされる性質である。このことは、表5に列挙された結果に反映されている。概念4については、含水量は、概念1~3の含水量よりも低いことが分かったが、これは、概念4からの粉末がエタノール/水混合物から噴霧乾燥されたからである可能性が最も高い。さらに、ラクトースは吸湿性ではなく、この概念におけるDPPCの親油性のために水の吸収が制限される。

20

【0073】

室温におけるポリ(I:C)概念の安定性

抗風邪製剤についての1つの重要な性質は、その概念が、貯蔵を容易にするためおよび生成物の有効成分の活性を保証するために、室温(room temperature: RT)において安定であるべきであることである。しかしながら、ポリ(I:C)は、加水分解によって、またはRNアーゼ酵素によって分解されるので、水含有溶媒に溶解される場合、ポリ(I:C)は非常に不安定である。特にRNアーゼ酵素は遍在的に存在することが知られており、RNアーゼ汚染はポリ(I:C)RNA分子の急速な分解を結果としてもたらすであろう。

30

【0074】

安定性を試験するために、4つの概念を室温で貯蔵した。RTでまたは-20で貯蔵されたPBS中のポリ(I:C)を、コントロールとして使用した。1ヶ月の貯蔵後に、これらの概念およびコントロールの生物活性を、ポリ(I:C)応答性細胞株についてこれらの概念のインターフェロン-レポーター応答を測定することによって評価した。全ての噴霧乾燥されたポリ(I:C)概念が、ポリ(I:C)感受性細胞株に対して、-20貯蔵ポリ(I:C)と比べて変わらない活性を示した(図3)。それに対して、PBS中のRT貯蔵ポリ(I:C)は、そのインターフェロン刺激活性を完全に喪失した。これらの結果は、噴霧乾燥製剤が、水含有液体中のポリ(I:C)とは異なり、室温で貯蔵された場合に非常に安定であることを示している。

40

【0075】

マウスインフルエンザ攻撃モデルを用いてのインビボ予防

ポリ(I:C)は、その抗ウイルス作用について文献で知られている。しかしながら、マウスインフルエンザモデルにおけるインビボ有効性を示すためには、ポリ(I:C)は

50

、毎日または水ノリポソーム製剤中で与えられなければならなかった。去る1972年には、ポリ(I:C)がヒト試験において抗ウイルス予防処置剤として有効であることが示されており、この試験では、ボランティアがヒトライノウイルス(HRV)またはインフルエンザウイルスで攻撃された。しかしながら、この研究においては、ポリ(I:C)は、2時間おきに与えられなければならなかった。我々の噴霧乾燥概念がPBS中のポリ(I:C)と比べて同様のインビトロ生物活性および増大したRT安定性を示したので、我々は、種々の概念の抗ウイルス活性を試験するために、インビボ試験に従事した。この目的のために、0日目の高容量(25 µl)インフルエンザ攻撃の数日前に、単回鼻腔内用量の(噴霧乾燥された)ポリ(I:C)製剤でマウスを処理した。噴霧乾燥概念は、粒子の解離を防ぐために、小体積(15 µl)の有機キャリア溶媒(エタノールまたはエタノール/グリセロール 1/1 w/w)を用いて適用した。体重減少(0日目を基準とする)、一般挙動および生存を、14日間にわたってモニタリングした(さらなる詳細については材料および方法参照)。興味深いことに、我々は、PBS中のポリ(I:C)およびPBS中の噴霧乾燥された部分アルファ化トウモロコシデンブン-ポリ(I:C)による単回処置は、体重減少および生存に関して有意でないマウスの保護によって示されたように、インフルエンザ攻撃に対して非常に小さな予防効果しか有さなかったことを観察した(表6)。これについての1つの説明は、噴霧乾燥された部分アルファ化トウモロコシデンブン(I:C)がPBSに溶解し、したがって、ポリ(I:C)と同様の応答をもたらしたというものである。PBS中のポリ(I:C)は、2日続けて与えられた場合の方が僅かにより有効であったが、プラセボコントロールマウスとの差は有意ではなかった。驚くべきことに、エタノール中の部分アルファ化トウモロコシデンブン-ポリ(I:C)概念は、インフルエンザ攻撃に対する有意な保護を与えて優れた生存を結果としてもたすために、単回の処置しか必要としなかった。明らかに、部分アルファ化トウモロコシデンブン-ポリ(I:C)の微小球粒子形態が、インフルエンザに対する優れた保護を結果としてもたす作用機序の重大な部分である。

10

20

【0076】

【表8】

表6: (製剤化された)ポリ(I:C)で処置されたインフルエンザ攻撃マウスの生存

30

処置群*	詳細			
	溶媒	マウス1匹		プラセボに対するP値
		当たりの総ポリ(I:C) (µg)	% 生存マウス	
プラセボ	PBS	0	0	-
ポリ(I:C) -2日目	PBS	40	0	N.S.
ポリ(I:C) -2, -1日目	PBS	80	20	N.S.
部分アルファ化トウモロコシデンブン-ポリ(I:C)	PBS	40	0	N.S.
部分アルファ化トウモロコシデンブン-ポリ(I:C)	エタノール	40	60	0.04

40

\*= 1群当たり5匹のマウス, 2つの実験を代表する結果が示されており, P値はカプラン・マイヤーログランク統計を用いて算出されたものである。 N.S. = 有意性なし

【0077】

50

次の実験において、我々は、キャリア溶媒としてのエタノールがインフルエンザ攻撃の重症度に対して何らかの影響を有していたか否か比較した。表7に、PBSプラセボ処置マウスと比べたエタノール処置マウスの結果を示す。この実験において、インフルエンザ攻撃は、インフルエンザ攻撃後の生存に対するエタノール前処置の正または負の影響を我々が観察することができた表6の実験において用いられた攻撃と比べると、少し攻撃力が小さかった。我々は、エタノール処置マウスがPBS前処置マウスと比べて、インフルエンザ攻撃に対して非常に類似した感受性を経験したことを観察した。したがって、我々は、エタノールが抗ウイルス作用に積極的には寄与しておらず、したがって、概念の微小球粒子形態を保持する鼻腔内投与用キャリア溶媒として使用され得ると結論付ける。注目すべきは、製剤化されていないポリ(I:C)は、ポリ(I:C)がエタノール中で沈殿し、したがってポリ(I:C)の制御された適用を妨げたので、エタノール中では適用され得なかった。

【0078】

【表9】

表7:インフルエンザ攻撃後のエタノールプラセボ処置マウスおよびPBSプラセボ処置マウスの生存

		詳細		
処置群*	溶媒	マウス1匹		
		当たりの総ポリ(I:C) (μg)	% 生存マウス	プラセボに対するP値
プラセボ	PBS	0	33	-
エタノールプラセボ	エタノール	0	33	N.S.

\*= 1群当たり6匹のマウス, P値はカプラン・メイヤーログランク統計を用いて算出されたものである。N.S. = 有意性なし

【0079】

次の工程で、我々は、部分アルファ化トウモロコシデンブ - ポリ(I:C)の粒子を生成するための概念の噴霧乾燥または成分の単なる混合が、抗ウイルス作用を観察するために必要とされるか否か/十分であるか否かという疑問に取り組んだ。この点に関して、我々は、乾燥粉末ポリ(I:C)を乾燥粉末デンブと混合し(混合ポリ(I:C) - デンブ)、これを、噴霧乾燥されたデンブ - ポリ(I:C)およびプラセボと比較した。我々は、この場合もまたインフルエンザ攻撃に対する優れたかつ有意な保護を結果としてもたらした部分アルファ化トウモロコシデンブ - ポリ(I:C)の噴霧乾燥製剤とは異なり、混合された部分アルファ化トウモロコシデンブ - ポリ(I:C)は、インフルエンザ攻撃に対して有意な保護効果を有していなかったことを観察した(表8)。

【0080】

## 【表 10】

表8: インフルエンザ攻撃後の噴霧乾燥部分アルファ化トウモロコシデンブ-ポリ(I:C)処置マウスと比較した混合部分アルファ化トウモロコシデンブ-ポリ(I:C)処置マウスの生存

処置群*	溶媒	詳細		
		マウス1匹 当たりの 総ポリ (I:C) (μg)	% 生存 マウス	プラセボに 対するP値
プラセボ	PBS	0	0	-
混合された部分アルファ化トウモロコシ デンブ-ポリ(I:C)**	エタノール	10	25	N.S.
噴霧乾燥された部分アルファ化トウモロコシ デンブ-ポリ(I:C)	エタノール	10	60	0.03

\*= 1群当たり6匹のマウス, \*\*=4匹のマウス, P値はカプラン・メイヤーログランク統計を用いて算出されたものである。 N.S. = 有意性なし

## 【 0 0 8 1 】

噴霧乾燥ミクロ粒子が他の有機溶媒中でも投与され得るか否かを試験するために、我々は、ポリ ( I : C ) ミクロ粒子のためのキャリア溶媒としてのグリセロールの使用を試験した。このキャリアの使用もまた可能であり、有意な保護を結果としてもたらしたが、グリセロールの高い粘度によって、点鼻薬を鼻腔内に適用することがやや困難になることが分かった。したがって、我々は、ミクロ粒子を適用するために、エタノール/グリセロールの 1 / 1 混合物を試験した。この実験の結果は表 9 に示されており、エタノール/グリセロール中のミクロ粒子の単回投与が、プラセボ ( エタノール/グリセロールのみ ) と比較して、インフルエンザ攻撃からの有意な改善された生存を結果としてもたらすということ

## 【 0 0 8 2 】

## 【表 11】

表9: エタノール/グリセロールをキャリア溶媒として用いての噴霧乾燥部分アルファ化トウモロコシデンブ-ポリ(I:C)処置マウスの生存

処置群*	溶媒	詳細		
		マウス1匹 当たりの 総ポリ (I:C) (μg)	% 生存 マウス	プラセボに 対するP値
プラセボ 噴霧乾燥された	エタノール/ グリセロール	0	0	-
部分アルファ化トウモロコシ デンブ- ポリ(I:C)	エタノール/ グリセロール	10	78	<0.01

\*= 1群当たり9匹のマウス, P値はカプラン・メイヤーログランク統計を用いて算出されたものである。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 3 】

次の工程で、我々は、ポリ（ I : C ）の噴霧乾燥製剤における異なるキャリアポリマーの使用を試験した。この点に関して、我々は、プラセボ処置マウスを、ポリ（ I : C ）処置マウスと、および噴霧乾燥された部分アルファ化トウモロコシデンブ - ポリ（ I : C ）または噴霧乾燥された Na - アルギネート - ポリ（ I : C ）のいずれかと比較した。我々は、ポリ（ I : C ）の噴霧乾燥マイクロ粒子のみが、その後のインフルエンザによる攻撃が原因で起こる重篤な体重減少からマウスを保護したことを観察した（表 1 0 参照）。ポリ（ I : C ）単独は、体重減少に対して保護しなかった。これらの結果は、噴霧乾燥マイクロ粒子中のポリ（ I : C ）とキャリアポリマーとの組み合わせが、ウイルス病原体に対する十分な保護を与えるために必要とされるということを示している。キャリアポリマーの性質は、マイクロ粒子構造が保持される限りにおいてそれほど重要ではない（表 6 参照、噴霧乾燥された部分アルファ化トウモロコシデンブ - ポリ（ I : C ）は、 P B S に溶解された場合は有効ではない）。

10

【 0 0 8 4 】

【表 1 2】

表10: 噴霧乾燥部分アルファ化トウモロコシデンブ-ポリ(I:C)処置マウスおよび噴霧乾燥 Na-アルギネート-ポリ(I:C)処置マウスの体重減少

処置群*	溶媒	詳細		
		マウス1匹 当たりの 総ポリ (I:C) (μg)	% 4日目に 保持されて いた体重	プラセボに 対するP値
プラセボ	エタノール/グリセロール	0	85.99	-
ポリ(I:C)	PBS	10	87.04	N.S.
噴霧乾燥された部分アルファ化 トウモロコシデンブ-ポリ(I:C)	エタノール/グリセロール	10	92.82	0.006
噴霧乾燥されたNa-アルギネート- ポリ(I:C)	エタノール/グリセロール	10	90.91	0.007

20

30

\*= 1群当たり12匹のマウス, P値は対応のない両側T検定統計を用いて算出されたものである。

N.S. = 有意性なし

【 0 0 8 5 】

最後に、我々は、製剤中で必要とされるポリ（ I : C ）の濃度、および製剤中で必要とされるマイクロ粒子径を特定するために、異なる部分アルファ化トウモロコシデンブ - ポリ（ I : C ）製剤を互いに、および P B S 中の製剤化されていないポリ（ I : C ）と比較した。この点に関して、我々は、 5 0 / 1 および 1 0 0 / 1 および 2 0 0 / 1 の比でさらなる噴霧乾燥された部分アルファ化トウモロコシデンブ / ポリ（ I : C ）を、ならびにそれぞれ ( D <sub>v</sub> 5 0 ) 9 μ m ( 1 / 9 , 0 . 4 5 % ) および ( D <sub>v</sub> 5 0 ) 1 7 μ m ( 1 / 9 , 1 0 % ) の粒径を有する部分アルファ化トウモロコシデンブ / ポリ（ I : C ）を製造した。これらの製剤と製剤化されていないポリ（ I : C ）との比較の結果を表 1 1 に示す。我々は、 1 / 1 0 0 ~ 1 / 9 の間のポリ（ I : C ）の濃度がインフルエンザに対する良好な保護を結果としてもたらすことを観察した。ポリ（ I : C ）をデンブでさらに希釈することは、それほど効率的でない、有意でない保護を結果としてもたらした。さらに、我々は、異なる粒径の 2 つのバッチにおいて目立った相違を観察しなかったのであるが、このことは、 9 μ m ~ 1 8 μ m の間の粒径 ( D <sub>v</sub> 5 0 ) がポリ（ I : C ）マイクロ粒子に

40

50

よって有効な保護を与えるのに十分であるということを示している。

【 0 0 8 6 】

【 表 1 3 】

表11:噴霧乾燥された部分アルファ化トウモロコシデンブ- ポリ(I:C)のさらなる概念で処置されたインフルエンザ攻撃マウスの体重減少

処置群*	詳細			
	溶媒	マウス1匹当たりの 総ポリ (I:C) (μg)	% 4日目に 保持されて いた体重	ポリ(I:C) (PBS)に 対するP値
ポリ(I:C)	PBS	10	82.9	-
噴霧乾燥された部分アルファ化 トウモロコシデンブ /ポリ(I:C) (50/1)	エタノール/グリ セロール	10	103.5	<0.02
噴霧乾燥された部分アルファ化 トウモロコシデンブ /ポリ(I:C) (100/1)	エタノール/グリ セロール	10	97.2	<0.02
噴霧乾燥された部分アルファ化 トウモロコシデンブ /ポリ(I:C) (200/1)	エタノール/グリ セロール	10	90.71	NS
噴霧乾燥された部分アルファ化 トウモロコシデンブ /ポリ(I:C) (9/1, 0.45%)	エタノール/グリ セロール	10	99.62	<0.02
噴霧乾燥された部分アルファ化 トウモロコシデンブ /ポリ(I:C) (9/1, 10%)	エタノール/グリ セロール	10	99.56	<0.02

\*= 1群当たり8匹のマウス, P値は対応のない両側T検定統計を用いて算出されたものである。

N.S. = 有意性なし

【 0 0 8 7 】

結論

ポリ ( I : C ) の経鼻送達のために、4つの粉末概念を、噴霧乾燥によって製造した。Na - アルギネート ( 概念 1 )、Na - CMC ( 概念 2 )、部分アルファ化トウモロコシデンブ ( 概念 3 ) および DPPC ( 概念 4 ) を用いた概念を、生物活性スクリーンおよび加工性に基づいて選択した。4つの概念を全て、製剤中のポリ ( I : C ) の生物活性および安定性を測定するために、インビトロで試験した。我々の結果は、噴霧乾燥処理が、ポリ ( I : C ) の生物活性に対して負の影響を有さないということを示している。さらに、これらの製剤は、PBSに溶解されたポリ ( I : C ) とは異なり、室温において安定である。

【 0 0 8 8 】

次の工程で、我々は、マウスインフルエンザ攻撃モデルを用いてのインフルエンザの予防において、概念 1 および 3 を試験した。文献に基づき、実験を、概念 1 および 3 が製剤化されていないポリ ( I : C ) ( PBS 中 ) と同様の保護効果を有するはずであるという意図で開始した。驚くべきことに、概念 1 および 3 が、その後のインフルエンザによる攻撃に対してマウスを保護することにおいてポリ ( I : C ) よりも優れているということを見出した。単回用量の製剤化されていないポリ ( I : C ) はマウスを保護することにおい

てあまり効率的でないようであったが、より有効であるためにはポリ ( I : C ) は数回投与される必要があるようであった。しかしながら、製剤化されたポリ ( I : C ) ( 概念 1 および 3 ) の単回投与は、有意にマウスを保護した。さらに、( P B S 溶解マイクロ粒子はインビボでは活性を失った ( 表 6 ) がインビトロでは失わなかった ( 図 1 および 2 ) ので ) ミクロ粒子構造が極めて重要であることが示された。粒径を保持するために、我々は、エタノールキャリア溶媒中、またはエタノール/グリセロールキャリア溶媒中でマイクロ粒子を投与した。9 マイクロメートル ~ 17 マイクロメートルの間の粒径 (  $D_v 50$  ) が有効であった。ポリ ( I : C ) は、100 / 1 ~ 9 / 1 ( デンプン / ポリ ( I : C ) ) の希釈において有効であった。

【 0 0 8 9 】

結論として、我々は、単回用量鼻腔内ポリ ( I : C ) 投与のインビボ有効性を改善してその後のインフルエンザの致死攻撃に対する予防的保護を与える新規の概念を特定した。

【 0 0 9 0 】

噴霧乾燥マイクロ粒子が他の有機溶媒中でも投与され得るか否かを試験するために、我々は、ポリ ( I : C ) ミクロ粒子のためのキャリア溶媒としてのグリセロールの使用を試験した。このキャリアの使用もまた可能であり、有意な保護を結果としてもたらしたが、グリセロールの高い粘度によって、点鼻薬を鼻腔内に適用することがやや困難になることが分かった。したがって、我々は、マイクロ粒子を適用するために、エタノール/グリセロールの 1 / 1 混合物を試験した。この実験の結果は表 9 に示されており、エタノール/グリセロール中のマイクロ粒子の単回投与が、プラセボ ( エタノール/グリセロールのみ ) と比較して、インフルエンザ攻撃からの有意な改善された生存を結果としてもたらすということを確認している。

【 0 0 9 1 】

【 表 1 4 】

表9: エタノール/グリセロールをキャリア溶媒として用いての噴霧乾燥部分アルファ化トウモロコシデンプン-ポリ(I:C)処置マウスの生存

処置群*	溶媒	詳細		
		マウス1匹 当たりの総ポリ (I:C) (µg)	% 生存 マウス	プラセボに 対するP値
プラセボ	エタノール/ グリセロール	0	0	-
噴霧乾燥された 部分アルファ化トウモロコシ デンプン- ポリ(I:C)	エタノール/ グリセロール	10	78	<0.01

\*= 1群当たり9匹のマウス, P値はカプラン・メイヤーログランク統計を用いて算出されたものである。

【 0 0 9 2 】

次の工程で、我々は、ポリ ( I : C ) の噴霧乾燥製剤における異なるキャリアポリマーの使用を試験した。この点に関して、我々は、プラセボ処置マウスを、ポリ ( I : C ) 処置マウスと、および噴霧乾燥された部分アルファ化トウモロコシデンプン - ポリ ( I : C ) または噴霧乾燥された Na - アルギネート - ポリ ( I : C ) のいずれかと比較した。我々は、ポリ ( I : C ) の噴霧乾燥マイクロ粒子のみが、その後のインフルエンザによる攻撃が原因で起こる重篤な体重減少からマウスを保護したことを観察した ( 表 10 参照 ) 。ポリ ( I : C ) 単独は、体重減少に対して保護しなかった。これらの結果は、噴霧乾燥ミク

口粒子中のポリ ( I : C ) とキャリアポリマーとの組み合わせが、ウイルス病原体に対する十分な保護を与えるために必要とされるということを示している。キャリアポリマーの性質は、ミクロ粒子構造が保持される限りにおいてそれほど重要ではない ( 表 6 参照、噴霧乾燥された部分アルファ化トウモロコシデンブ - ポリ ( I : C ) は、 P B S に溶解された場合は有効ではない ) 。

【 0 0 9 3 】

【 表 1 5 】

表10: 噴霧乾燥部分アルファ化トウモロコシデンブ-ポリ(I:C)処置マウスおよび噴霧乾燥 Na-アルギネート-ポリ(I:C)処置マウスの体重減少

処置群*	溶媒	詳細		
		マウス1匹 当たりの総 ポリ(I:C) ( $\mu\text{g}$ )	% 4日目に 保持されて いた体重	プラセボ に対するP 値
プラセボ	エタノール/グリセロール	0	85.99	-
ポリ(I:C)	PBS	10	87.04	N.S.
噴霧乾燥された部分アルファ化 トウモロコシデンブ-	エタノール/グリセロール	10	92.82	0.006
ポリ(I:C)				
噴霧乾燥されたNa-アルギネート-	エタノール/グリセロール	10	90.91	0.007
ポリ(I:C)				

\* = 1群当たり12匹のマウス, P値は対応のない両側T検定統計を用いて算出されたものである。

N.S. = 有意性なし

【 0 0 9 4 】

最後に、我々は、製剤中で必要とされるポリ ( I : C ) の濃度、および製剤中で必要とされるミクロ粒子径を特定するために、異なる部分アルファ化トウモロコシデンブ - ポリ ( I : C ) 製剤を互いに、および P B S 中の製剤化されていないポリ ( I : C ) と比較した。この点に関して、我々は、 5 0 / 1 および 1 0 0 / 1 および 2 0 0 / 1 の比でさらなる噴霧乾燥された部分アルファ化トウモロコシデンブ / ポリ ( I : C ) を、ならびにそれぞれ (  $D_v 50$  ) 9  $\mu\text{m}$  ( 1 / 9 , 0 . 4 5 % ) および (  $D_v 50$  ) 1 7  $\mu\text{m}$  ( 1 / 9 , 1 0 % ) の粒径を有する部分アルファ化トウモロコシデンブ / ポリ ( I : C ) を製造した。これらの製剤と製剤化されていないポリ ( I : C ) との比較の結果を表 1 1 に示す。我々は、 1 / 1 0 0 ~ 1 / 9 の間のポリ ( I : C ) の濃度がインフルエンザに対する良好な保護を結果としてもたらすことを観察した。ポリ ( I : C ) をデンブでさらに希釈することは、それほど効率的でない、有意でない保護を結果としてもたらした。さらに、我々は、異なる粒径の 2 つのバッチにおいて目立った相違を観察しなかったのであるが、このことは、 9  $\mu\text{m}$  ~ 1 8  $\mu\text{m}$  の間の粒径 (  $D_v 50$  ) がポリ ( I : C ) ミクロ粒子によって有効な保護を与えるのに十分であるということを示している。

【 0 0 9 5 】

10

20

30

40

【表 16】

表11:噴霧乾燥された部分アルファ化トウモロコシデンブ- ポリ(I:C)のさらなる概念で処置されたインフルエンザ攻撃マウスの体重減少

処置群*	溶媒	詳細			
		マウス1匹 当たりの総 ポリ(I:C) ( $\mu\text{g}$ )	% 4日目 に保持さ れていた 体重	ポリ(I:C) (PBS)に 対するP値	
ポリ(I:C)	PBS	10	82.9	-	10
噴霧乾燥された部分アルファ化 トウモロコシデンブ /ポリ(I:C) (50/1)	エタノール/グリセ ロール	10	103.5	<0.02	
噴霧乾燥された部分アルファ化 トウモロコシデンブ /ポリ(I:C) (100/1)	エタノール/グリセ ロール	10	97.2	<0.02	20
噴霧乾燥された部分アルファ化 トウモロコシデンブ /ポリ(I:C) (200/1)	エタノール/グリセ ロール	10	90.71	NS	30
噴霧乾燥された部分アルファ化 トウモロコシデンブ /ポリ(I:C) (9/1, 0.45%)	エタノール/グリセ ロール	10	99.62	<0.02	
噴霧乾燥された部分アルファ化 トウモロコシデンブ /ポリ(I:C) (9/1, 10%)	エタノール/グリセ ロール	10	99.56	<0.02	

\*= 1群当たり8匹のマウス, P値は対応のない両側T検定統計を用いて算出されたものである。

N.S. = 有意性なし

## 【0096】

## 結論

ポリ(I:C)の経鼻送達のために、4つの粉末概念を、噴霧乾燥によって製造した。Na-アルギネート(概念1)、Na-CMC(概念2)、部分アルファ化トウモロコシデンブ(概念3)およびDPPC(概念4)を用いた概念を、生物活性スクリーンおよび加工性に基づいて選択した。4つの概念を全て、製剤中のポリ(I:C)の生物活性および安定性を測定するために、インピトロで試験した。我々の結果は、噴霧乾燥処理が、ポリ(I:C)の生物活性に対して負の影響を有さないことを示している。さらに、これらの製剤は、PBSに溶解されたポリ(I:C)とは異なり、室温において安定である。

## 【0097】

次の工程で、我々は、マウスインフルエンザ攻撃モデルを用いてのインフルエンザの予

40

50

防において、概念1および3を試験した。文献に基づき、実験を、概念1および3が製剤化されていないポリ(I:C)(PBS中)と同様の保護効果を有するはずであるという意図で開始した。驚くべきことに、概念1および3が、その後のインフルエンザによる攻撃に対してマウスを保護することにおいてポリ(I:C)よりも優れているということを見出した。単回用量の製剤化されていないポリ(I:C)はマウスを保護することにおいてあまり効率的でないようであったが、より有効であるためにはポリ(I:C)は数回投与される必要があるようであった。しかしながら、製剤化されたポリ(I:C)(概念1および3)の単回投与は、有意にマウスを保護した。さらに、(PBS溶解マイクロ粒子はインビボでは活性を失った(表6)がインビトロでは失わなかった(図1および2)ので)マイクロ粒子構造が極めて重要であることが示された。粒径を保持するために、我々は、エタノールキャリア溶媒中、またはエタノール/グリセロールキャリア溶媒中でマイクロ粒子を投与した。9マイクロメートル~17マイクロメートルの間の粒径( $D_v 50$ )が有効であった。ポリ(I:C)は、100/1~9/1(デンプン/ポリ(I:C))の希釈において有効であった。

【0098】

結論として、我々は、単回用量鼻腔内ポリ(I:C)投与のインビボ有効性を改善してその後のインフルエンザの致命的攻撃に対する予防的保護を与える新規の概念を特定した。

本発明は、以下の態様を包含し得る。

[1]

ポリイノシン-ポリシチジル酸(ポリ(I:C))と、デンプン、アルギネート、ブラスノスまたはジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)から選択されるキャリアポリマーとのマイクロ粒子を含む組成物。

[2]

前記キャリアポリマーが、デンプンである、上記[1]に記載の組成物。

[3]

ポリ(I:C)-キャリアポリマーマイクロ粒子が、噴霧乾燥処理などの粒子形成処理によって製造される、上記[1]または[2]に記載の組成物。

[4]

ポリ(I:C)/デンプン比が、1/200(w/w)~1/0.1(w/w)の範囲である、上記[1]~[3]のいずれか一項に記載の組成物。

[5]

前記ポリ(I:C)/デンプン比が、1/12(w/w)~1/9(w/w)の間である、上記[4]に記載の組成物。

[6]

前記マイクロ粒子の $D_v 50$ が、0.1マイクロメートル~200マイクロメートルの範囲である、上記[3]~[5]のいずれか一項に記載の組成物。

[7]

前記組成物が、有機溶媒を含む液体組成物である、上記[1]~[6]のいずれか一項に記載の組成物。

[8]

前記有機溶媒が、グリセロールまたはエタノールまたはそれらの組み合わせをベースとするものである、上記[7]に記載の組成物。

[9]

医療における使用のための、上記[1]~[8]のいずれか一項に記載の組成物。

[10]

感染症または風邪の処置および/または予防における使用のための、上記[1]~[8]のいずれか一項に記載の組成物。

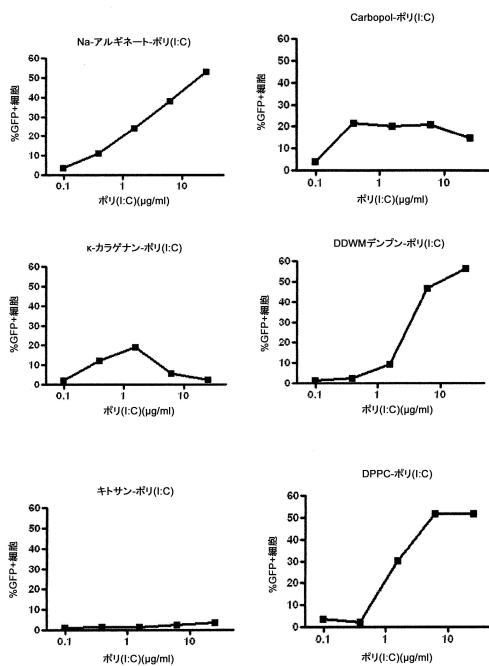
[11]

経鼻投与による上気道感染症の予防および/または処置のための医薬の製造のための、  
上記 [ 1 ] ~ [ 8 ] のいずれか一項に記載の組成物の使用。

[ 1 2 ]

上記 [ 1 ] ~ [ 8 ] のいずれか一項に記載の組成物を含むデバイス、特に経鼻送達系。

【 図 1 - 1 】



【 図 1 - 2 】

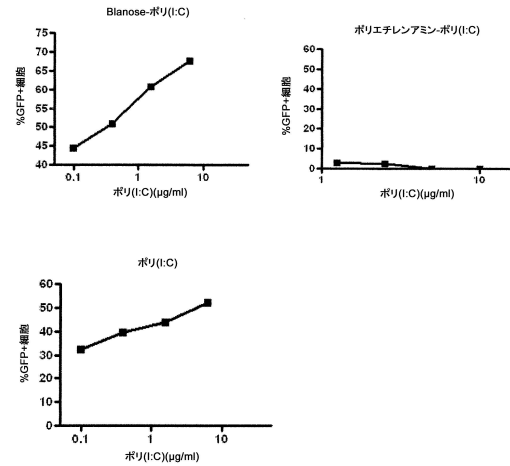


図1(続き)

図1

【 図 2 】

概念3

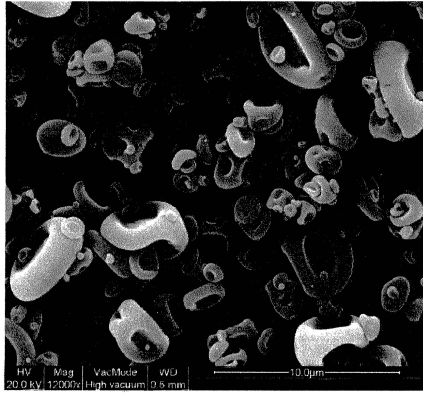


図2

【 図 3 】

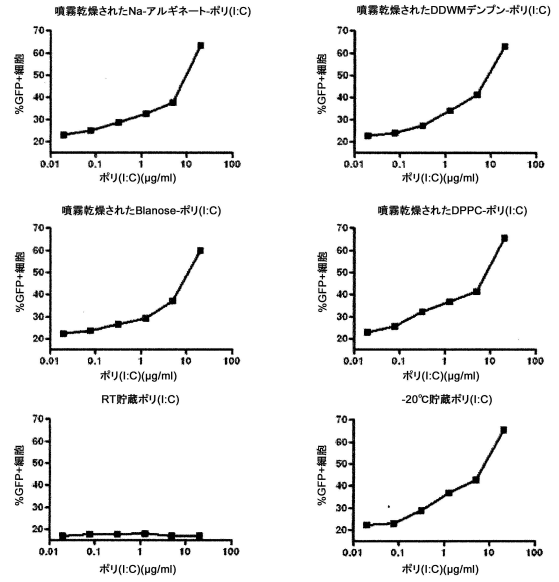


図3

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K	9/08 (2006.01)	A 6 1 K 9/08
A 6 1 P	31/16 (2006.01)	A 6 1 P 31/16
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00

(72)発明者 マルコム, ブルース アルバート  
 アメリカ合衆国 ニュー ジャージー州 07081, スプリングフィールド, エス. スプリング  
 フィールド アベニュー 955, ユニット シー 213

(72)発明者 ストミュラー, ロジャー パウルス マリア  
 ベルギー国 ビー - 2820 ボンハイデン, オーデ パーン 123

(72)発明者 パート, リーベン エルビア コレット  
 ベルギー国 ビー - 8200 ブリュージュ 2, ジョゼフ ヴァン ウアレゲムシュトラート  
 11

審査官 今村 明子

(56)参考文献 特表2007-517774(JP, A)  
 米国特許出願公開第2004/0248837(US, A1)  
 中国特許出願公開第101757018(CN, A)  
 特開2009-209086(JP, A)  
 PNAS, 2011年 9月20日, Vol.108, No.38, p.15745-15750  
 International Journal of Pharmaceutics, 2009年, Vol.365, p.61-68

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 9/00 - 9/72  
 A 6 1 K 31/00 - 31/80  
 A 6 1 K 33/00 - 33/44  
 A 6 1 K 47/00 - 47/69  
 A 6 1 P 1/00 - 43/00  
 C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )