

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6534660号
(P6534660)

(45) 発行日 令和1年6月26日(2019.6.26)

(24) 登録日 令和1年6月7日(2019.6.7)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 33/26 (2006.01)	A 6 1 K 33/26
A 6 1 N 2/08 (2006.01)	A 6 1 N 2/08 Z
A 6 1 K 41/00 (2006.01)	A 6 1 K 41/00
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 K 9/10 (2006.01)	A 6 1 K 9/10

請求項の数 16 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-524845 (P2016-524845)	(73) 特許権者	516008914 ブロッセル, レミー
(86) (22) 出願日	平成26年7月11日 (2014.7.11)		フランス国, エフ-13280 ラフェル
(65) 公表番号	特表2016-532674 (P2016-532674A)		レ アルル, チェミン ドウ ラ ポテ
(43) 公表日	平成28年10月20日 (2016.10.20)		リエ, ル マ 1' ヘルミテ 331
(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/064995	(74) 代理人	100114775 弁理士 高岡 亮一
(87) 国際公開番号	W02015/004285	(74) 代理人	100121511 弁理士 小田 直
(87) 国際公開日	平成27年1月15日 (2015.1.15)	(74) 代理人	100202751 弁理士 岩堀 明代
審査請求日	平成29年6月8日 (2017.6.8)	(74) 代理人	100191086 弁理士 高橋 香元
(31) 優先権主張番号	13176364.1		
(32) 優先日	平成25年7月12日 (2013.7.12)		
(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】 拘束場を生成するシステムおよびそれを実装する医療装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(1) 注射可能かつ磁化可能なナノ粒子およびそれを注射するための手段と、(2) 注射後に、注射されたナノ粒子のうちの少なくとも25~60%が腫瘍血管新生網内に保持される、血管新生網に関連する腫瘍に機械的な拘束を与えるための磁場勾配を放出する発生器と、

を備える医療システムであって、

前記システムは、細胞構築物でも埋め込み物でもなく、

前記システムは、薬物ターゲティングまたは温熱療法によって腫瘍を治療するために使用されず、

前記ナノ粒子は、薬物担体または造影剤として使用されず、

前記磁場勾配は、0.001~10 T/cmの範囲である、

医療システム。

【請求項 2】

前記ナノ粒子は、酸化鉄、フェルモキシデスまたはそれらの混合物からなる、請求項1に記載の医療システム。

【請求項 3】

前記ナノ粒子は、非医薬組成物で被覆されている、請求項1または請求項2に記載の医療システム。

【請求項 4】

前記ナノ粒子は、磁鉄鉱 (Fe_3O_4)、磁赤鉄鉱 ($[] - Fe_2O_3$) またはそれらの混合物からなる、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の医療システム。

【請求項 5】

前記ナノ粒子は、親水性被覆物で被覆されている、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の医療システム。

【請求項 6】

前記ナノ粒子は、デキストランで被覆されている、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の医療システム。

【請求項 7】

前記ナノ粒子は、30 ~ 1000 nm の範囲の平均直径を有する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の医療システム。 10

【請求項 8】

前記ナノ粒子は、コロイド状または非コロイド状の媒体に懸濁されている、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の医療システム。

【請求項 9】

機械的な手段によって腫瘍を治療する方法において使用するための組成物であって、前記組成物は、磁化可能なナノ粒子を含み、前記方法は、

前記組成物を注射する工程と、

生体内で腫瘍に機械的な非接触拘束を与えるための、腫瘍領域に向けられた磁場勾配を適用する工程と、 20

を含み、前記磁場勾配は、0.001 ~ 10 T/cm の範囲であり、

注射されたナノ粒子のうちの少なくとも 25 ~ 60 % が腫瘍血管新生網内に保持され、

前記方法は、薬物ターゲティングまたは温熱療法によって腫瘍を治療する方法ではない

組成物。

【請求項 10】

注射されるナノ粒子の量は、100 μ g ~ 10 g の範囲である、請求項 9 に記載の組成物。 30

【請求項 11】

注射されるナノ粒子の量は、500 μ g ~ 2 g の範囲である、請求項 9 または 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記腫瘍は悪性上皮性腫瘍である、請求項 9 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 13】

前記腫瘍は、膵臓癌腫瘍または乳癌腫瘍である、請求項 9 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 14】

腫瘍細胞の腫瘍体積および/または表面積を減少させるための方法において使用するための組成物であって、 40

前記組成物は、磁化可能なナノ粒子を含み、

前記方法は、

前記組成物を注射する工程と、

前記腫瘍細胞に対して機械的な非接触拘束を与えるために、腫瘍領域に向けられた磁場勾配を実行する工程と、 50

を含み、前記磁場勾配は、0.001 ~ 10 T/cm の範囲であり、

注射されたナノ粒子のうちの少なくとも 25 ~ 60 % が腫瘍血管新生網内に保持され、

前記方法は、薬物ターゲティングまたは温熱療法によって腫瘍を治療する方法ではない

、
組成物。

【請求項 15】

前記磁場は、一定磁場である、請求項 9 または 14 に記載の組成物。

【請求項 16】

前記磁化可能なナノ粒子は、鉄を主成分とするナノ粒子または鉄のナノ粒子である、請求項 9 または 14 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、物理学の分野に関する。特に、本発明は、ナノ粒子と、腫瘍領域に磁場勾配を遠隔から印加する手段とを備えたシステムに関する。本発明によれば、腫瘍を有する対象の静脈内にナノ粒子を注射する。ナノ粒子を注射し、移行後に、腫瘍領域に位置づける。ナノ粒子が位置づけられる腫瘍領域に磁場勾配を印加すると、腫瘍周囲に拘束場が生成され、腫瘍体積および組織表面積を減少させることができる。

【背景技術】

【0002】

医薬において埋め込み可能なナノ粒子を用いることは良く知られており、多くの参考文献に、薬物の磁気ターゲティングのためのナノ粒子の使用が記載されている。例えば、欧州特許第 2508171 号には、ナノ粒子の表面に被覆された医薬組成物を標的組織に誘導および蓄積させるためにナノ粒子を使用することについて記載されている。米国特許出願公開第 2011223255 号 (Mag Force 社) には、特に腫瘍の外科的除去後の後療法としての温熱治療のための、ナノ粒子を含有する埋め込み可能な製品および医薬におけるその使用について記載されている。

20

【0003】

癌の治療では、腫瘍を治療するための新しい医薬的戦略、特に物理的戦略が明らかに必要とされており、癌細胞によって示される急速な細胞分裂を妨害するために交番電場を用いる新規な癌治療法が試みられてきた。1つのシステムが Novocure 社によって開発され、悪性脳腫瘍の一種である再発性多形性膠芽腫の治療のために 2011 年 4 月 15

30

【発明の概要】

【0004】

本発明は、注射可能かつ磁化可能なナノ粒子と、腫瘍周囲に拘束場を生成するための磁場勾配と、任意に磁石とを備えた注射装置を実装する、新しい医療システムおよび腫瘍の治療方法を提案する。本発明の方法では、それを必要としている対象に、多くの磁化可能なナノ粒子を注射し、ナノ粒子が保持される腫瘍領域に外部磁場勾配を印加する。

【0005】

本出願人は、ナノ粒子を静脈内に注射すると、それらが血管新生網によって保持されることに気づいた。腫瘍を取り囲む血管新生網における注射したナノ粒子の無作為化分布により、驚くべきことに、ある種の中空かつ不連続的な球体が形成されることに気づいた。このようにして、腫瘍は、前記球体内に位置づけられる。

40

【0006】

腫瘍を取り囲む血管新生網における注射したナノ粒子のこのような構成により、腫瘍領域に磁場勾配を印加すると、この印加によって拘束場が生じ、さらに、細胞に拘束が与えられ、この拘束により、腫瘍細胞の表現型の正常または部分的に正常な細胞表現型への変化が生じるといった条件が生成される。特に、この物理的および/または機械的な拘束は、腫瘍体積を減少させることができ、かつ、外部磁場勾配に曝露される腫瘍の 2 つの組織表面に作用する。

【0007】

50

言い換えると、腫瘍細胞に与えられる物理的および/または機械的な拘束によって生物学的効果が得られ、前記拘束は、拘束場により生じ、拘束場自体は、腫瘍を取り囲む血管新生網内に分散されたナノ粒子に磁場勾配を印加することにより生じる。

【0008】

一実施形態では、本発明は、(1)注射可能かつ磁化可能なナノ粒子およびそれを注射するための手段と、(2)注射後にその粒子が保持される血管新生網に関連する腫瘍に物理的および/または機械的な拘束を与えるための手段であって、磁場勾配を放出する発生器である手段とを備え、

本システムは、細胞構築物でも埋め込み物でもなく、

本システムは、薬物ターゲティングなどの医薬手段または温熱療法によって腫瘍を治療するために使用されず、

当該粒子は、薬物担体または造影剤などとして使用されないことを特徴とする、医療システムに関する。

【0009】

一実施形態では、本発明は、細胞に与えられる拘束により行われ、この拘束が機械的な拘束である治療方法にも関する。一実施形態では、本発明は、細胞に与えられる拘束により行われ、この拘束が非接触拘束である治療方法に関する。本発明の独自のアプローチにより、機械的な拘束が腫瘍領域内に位置するナノ粒子によって局所的に加えられる力による生じることが分かる。磁場勾配は、拘束場を球体の内部すなわち腫瘍細胞に導く。本発明では、粒子の移動は観察されない。

【0010】

特に、本発明は、物理的および/または機械的な手段による腫瘍の治療方法に関する。

【0011】

一実施形態では、本発明の方法は、医薬品をさらに含む。一実施形態では、本発明の方法は、医薬品を含まない。一実施形態では、本発明の方法は、医薬的方法ではない。

【0012】

定義

本発明では、以下の用語は、以下の意味を有する。

【0013】

数字の前の「約」は、その数字が前記数字の値の $\pm 10\%$ を意味することを表わす。

【0014】

「表現型」とは、生物の観察可能な特性(構造的および機能的特性)を指す。癌腫学では、悪性腫瘍の細胞または組織表現型は、対応する正常な細胞または組織と比較して乱されている観察可能な特性である。細胞表現型では、前記観察可能な特性は、限定されるものではないが、増殖、細胞分裂、アポトーシス、細胞死、遊走能力などであってもよい。

【0015】

「血管新生網」とは、腫瘍の近位領域において発生する新しい血管を指す。腫瘍細胞から放出される血管新生促進分子は、新しい血管形成を誘発することができる。

【0016】

「勾配」は、空間における物理的量の変動または変化を示すベクトルである。本発明の意味では、磁場勾配は、広がりのある場の強度の変化率である。磁場勾配は、静止および移動している磁化可能な粒子の両方に並進力を与える量子物理学で使用される力である。これは、磁化可能な粒子にゼロの力を与える双極磁石などからの均一な磁場とは対照的なものである。力/勾配の関係は、式 $F = \nabla P$ (式中、 F は力であり、 ∇ はベクトル量としての勾配であり、 P は磁位である)によって表される。勾配は、 T/mm で測定する。

【0017】

「拘束場」は、機械的な力を印加する場である。

【0018】

「拘束」とは、表面積で割った力を指し、従って、圧力と同種であり、パスカル(Pa)で測定する。固体の異なる部分に関わる応力すなわち内力の状態は、応力テンソルによ

10

20

30

40

50

って定められる（コーシー、1822年）。これらの作用力は、固体の各点で定められ、応力場または、より一般的にはテンソル場と呼ばれる。連続媒体の物理的特性では、場は、時空の各点では、物理量の値である。この量は、スカラー（圧力）、ベクター（磁場）またはテンソルであってもよい。

【0019】

「悪性腫瘍」とは、癌性腫瘍を指す。

【0020】

「機械的な」とは、物体または対象に対する物理作用を指し、特に、物体または対象に伝達される物質的環境における物理信号の伝播を指す。

【0021】

「ナノ粒子」とは、球形状を有し、かつ直径が0.1～1000nmの範囲のナノ球体を指す。本発明によれば、ナノ粒子は、中空の球体ではなく、中実の球体である。

【0022】

「粒子」とは、単一のナノ粒子または多くのナノ粒子の形態の磁気ビーズを指し、前記粒子は、0.1～1000nmの範囲の直径を有し、好ましくは、その直径は、100nmを超える。

【0023】

「物理的手段」とは、非化学的手段を指す。

【0024】

「間質」とは、器官の構造を形成する組織を指す。

【0025】

「腫瘍領域」とは、腫瘍、細胞外マトリックスおよび/または間質、および腫瘍を取り囲む新血管の周辺網（血管新生網）を指す。

【0026】

「組織」とは、同じ表現型を示す一貫した細胞の集合体を指す。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】腫瘍に対する本発明の一般的な原理を示す。

【図2】鉄のナノ粒子1とMDA-MB-231（由来：ヒトの乳癌）細胞との混合物が皮下14に移植されたヌードマウス10を示す模式図である。

【図3】D0～D80の移植された腫瘍の個々の増殖曲線を示す。図3は、対照と比較した実験後の癌細胞の増殖限界も示す。

【図4】写真4Aおよび模式図4Bに概念の証拠を示す。

【図5】マウスの腫瘍の両側に対する2つの磁石の位置決めを示す模式図である。

【図6】治療群（G1'）と3種類の対照群（G2'、G3'またはG4'）との間で、全てのマウスの腫瘍体積の比較を示す。

【図7】治療群（G1'）と3種類の対照群（G2'、G3'またはG4'）との間で、腫瘍の西側（図7A）または東側（図7B）について全てのマウスの組織表面積の比較を示す。

【図8】治療群（G1'）の対照群（G2'、G3'またはG4'）に対する平均的な生体内腫瘍体積の漸進的変化を示す。

【0028】

参照符号の一覧

- 1 粒子またはナノ粒子
- 2 磁場勾配
- 3 コラーゲン
- 4 血管新生網
- 5 間質
- 6 腫瘍細胞
- 7 新血管

10

20

30

40

50

8 癌細胞

9 磁石

10 移植されたマウス

11 西側における腫瘍の活性部分の増加

12 筋肉側における腫瘍の活性部分の減少

13 壊死

14 皮下に移植された腫瘍の生存部分

15 筋肉

16 皮膚

【発明を実施するための形態】

10

【0029】

本発明は、(i)注射可能かつ磁化可能なナノ粒子1およびそれを注射するための手段を備えた注射装置と、(ii)注射後に粒子1が保持される血管新生網に関連する腫瘍に物理的および/または機械的な拘束を与えるための手段7とを備えた医療システムに関する。

【0030】

定義上、血管新生網とは、腫瘍の近位領域で発達する新しい血管と解釈され、間質とは、器官の構造を形成する組織を指す。間質は、血管新生網を表わさない。従って、間質は血管新生網ではない。

【0031】

20

従って、本発明は、特に血管新生網内に保持される磁気粒子を含む物理的および/または機械的な手段によって、腫瘍細胞を治療するための医療システムに関する。

【0032】

一実施形態では、本医療システムは、細胞構築物でも埋め込み物でもない。

【0033】

一実施形態では、本医療システムは、腫瘍を治療するための医薬品を含まず、特に、当該ナノ粒子は、薬物担体として使用されない。

【0034】

一実施形態では、本医療システムは、画像化または造影システムとして使用されない。

【0035】

30

腫瘍

一実施形態では、腫瘍は、血管新生網7に関連している。別の実施形態では、腫瘍は、局所的に進行した腫瘍である。一実施形態では、腫瘍は、悪性の上皮性腫瘍である。一実施形態では、悪性腫瘍は膵臓癌である。一実施形態では、悪性腫瘍は肝癌である。別の実施形態では、悪性腫瘍は乳癌である。一実施形態では、腫瘍は、動物またはヒトの体内にある。

【0036】

機械的および/または物理的な拘束を与えるための手段

一実施形態では、機械的および/または物理的な拘束を与えるための手段は、磁場勾配2を放出する発生器である。一実施形態では、磁場発生器は、磁場勾配2を発生するように制御される。一実施形態では、本発生器は、電磁石9を備える。別の実施形態では、本発生器は、コイル、好ましくは可動コイル、より好ましくはタンブル構成のヘルムホルツコイルである。

40

【0037】

一実施形態では、機械的および/または物理的な拘束を与えるための手段は、少なくとも1つの磁石、永久磁石および/または電磁石をさらに備え、好ましくは、前記手段は、2つ以上の外部磁石、永久磁石および/または電磁石をさらに備え、より好ましくは、2つ以上の外部磁石、永久磁石および/または電磁石を、腫瘍の様々な好ましくは両側に局在化させる。

【0038】

50

非常に好ましい実施形態では、機械的および/または物理的な拘束を与える手段（例えば外部磁石など）を腫瘍の外側に位置づけ、好ましくは対象の体外に位置づける。一実施形態では、本手段は可動性であり、好ましくは腫瘍領域の周りを回転する。一実施形態では、本手段を、0.1 ~ 100 mm、好ましくは1 ~ 10 mmの範囲で腫瘍から離して位置づける。

【0039】

一実施形態では、磁場は、0.1 Hz ~ 1 THz、好ましくは1 Hz ~ 1 MHz、より好ましくは10 Hz ~ 500 kHzの範囲で異なるかそのような範囲の周波数を有する、可変または一定の外部場である。

【0040】

一実施形態では、磁場は、0.1 μ T ~ 50 T、好ましくは0.01 mT ~ 5 T、より好ましくは0.1 mT ~ 700 mTの範囲である。

【0041】

一実施形態では、磁場は可動性であり、好ましくは腫瘍領域の周りを回転する。

【0042】

一実施形態では、磁場は交番磁場ではない。一実施形態では、磁場は交番電場ではない。

【0043】

一実施形態では、磁場勾配2は、強度、周波数および/または方向が変わる。腫瘍に対する拘束が、強度、方向および周波数において変化するような方法で、磁場勾配2を印加すると有利である。当業者であれば、腫瘍の位置およびその大きさ、場合により他の生物学的データに応じて、磁場勾配の強度、周波数および/または方向を変更するであろう。

【0044】

一実施形態では、磁場勾配2は、0.001 ~ 10 T/cm、好ましくは0.01 ~ 1 T/cm、より好ましくは0.1 ~ 0.5 T/cmの範囲であり、さらにより好ましくは約0.4 T/cmである。

【0045】

一実施形態では、細胞骨格および/または細胞壁および/または周囲の軟組織および/または硬組織の共鳴周波数またはその倍音を有する拘束場を探し出し、それに到達するように、磁場勾配2の周波数を変えてもよい。有利なことに、拘束場により、腫瘍内の腫瘍細胞成分によって形成される連続的な集合体の共鳴周波数を誘発するように、磁場勾配の周波数を変化させてもよい。

【0046】

一実施形態では、本システムは、磁場を方向付けるために、磁場の方向または本発生源の方向を変えるための手段を備える。

【0047】

磁化可能なナノ粒子

一実施形態では、粒子またはナノ粒子1は、任意の磁化可能な材料、好ましくは、酸化鉄またはマンガン、より好ましくは磁鉄鉱 (Fe_3O_4)、磁赤鉄鉱 ($[\quad] - \text{Fe}_2\text{O}_3$) またはフェルモキシデスすなわちデキストランで被覆されたコロイド状酸化鉄、またはそれらの混合物を含むか、それらで構成されているか、それらからなる。

【0048】

粒子とは、本発明では、単一の粒子またはナノ粒子の集合体と理解される。

【0049】

一実施形態では、粒子またはナノ粒子1は、腫瘍細胞が取り込むことができないような大きさまたは流体力学的体積を有する。

【0050】

一実施形態では、粒子またはナノ粒子1は、腫瘍を取り囲む血管新生網7によって保持され、かつ腫瘍または腫瘍細胞の中に進入することなく腫瘍の周辺に残留するような大きさまたは流体力学的体積を有する。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 1 】

一実施形態では、粒子またはナノ粒子 1 は、30 ~ 1000 nm、好ましくは40 ~ 800 nm、より好ましくは60 ~ 300 nmの範囲の平均直径を有する。

【 0 0 5 2 】

非常に好ましい実施形態では、当該粒子またはナノ粒子は、細胞腫瘍および/または器官による取り込みを回避するために、100 nmを超える平均直径を有し、好ましくは約200 nmの平均直径を有する。

【 0 0 5 3 】

一実施形態では、体に投与される粒子またはナノ粒子 1 の量は、0.1 mg ~ 1000 mg、好ましくは1 ~ 10の範囲であり、より好ましくは約5 mgである。

10

【 0 0 5 4 】

一実施形態では、粒子またはナノ粒子 1 は被覆されていない。

【 0 0 5 5 】

一実施形態では、粒子またはナノ粒子 1 は、非医薬組成物で被覆されており、好ましくは、前記ナノ粒子 1 は、親水性被覆物、より好ましくはデキストランで被覆されている。

【 0 0 5 6 】

別の実施形態では、粒子またはナノ粒子 1 は、医薬組成物で被覆されている。

【 0 0 5 7 】

別の実施形態では、粒子またはナノ粒子 1 は、少なくとも1種の生化学的製剤、好ましくはペプチド、より好ましくは、アルギニルグリシルアスパラギン酸 (R G D) で被覆されている。

20

【 0 0 5 8 】

別の実施形態では、粒子またはナノ粒子 1 を、例えば、注射前にナノ粒子 1 に塗布される特定の被覆剤により、腫瘍領域へのそれらの移行を支援してもよい。

【 0 0 5 9 】

一実施形態では、粒子またはナノ粒子 1 を懸濁液内で製剤化し、ここでは、粒子またはナノ粒子 1 を、コロイド状または非コロイド状媒体に懸濁させる。本実施形態では、本発明に包含される注射装置は、上記磁化可能な粒子またはナノ粒子 1 を含有する懸濁液を含む。

【 0 0 6 0 】

一実施形態では、粒子またはナノ粒子 1 を乳濁液内で製剤化し、ここでは、粒子またはナノ粒子 1 は乳濁液の中にある。本実施形態では、本発明に包含される注射装置は、上記磁化可能な粒子またはナノ粒子 1 を含有する乳濁液を含む。

30

【 0 0 6 1 】

本発明は、

- 30 ~ 1000 nm、好ましくは40 ~ 800 nm、より好ましくは60 ~ 300 nmの範囲の平均直径を有する粒子またはナノ粒子 1、好ましくは磁化可能な粒子またはナノ粒子、より好ましくは鉄を主成分とするか鉄の粒子またはナノ粒子を含有する組成物、好ましくは懸濁液または乳濁液を注射する工程と、

- 任意に、血管新生網 7 内に保持される粒子またはナノ粒子の濃度を検出するために画像化装置を用いて画像化を行う工程と、

40

- 生体内で腫瘍に対して非接触拘束を与えるための物理的および/または機械的な手段を適用する工程であって、前記物理的および/または機械的な手段は、磁場勾配 2 であり、その印加は、腫瘍領域に向けられる工程と、

を含む、物理的および/または機械的な手段による腫瘍、特に血管新生網 7 に関連する腫瘍の治療方法にも関する。

【 0 0 6 2 】

本発明の方法で使用されるナノ粒子 1 は、上記のとおりである。本発明によれば、少なくとも注射された粒子またはナノ粒子 1 の 25 ~ 60 % が、腫瘍血管新生網 7 内に保持される。理論に縛られたくはないが、本出願人は、本発明のシステムの粒子またはナノ粒子

50

1 は、注射した場合、血管新生網 7 に関して周知の血管透過性・滞留性亢進 (EPR) 効果、好ましくは主に滞留性亢進効果から利益を享受すると考える傾向にある。EPR 効果は、ある大きさの粒子またはナノ粒子 1 が、それらが正常組織内にある場合よりも多く腫瘍領域内に蓄積する傾向にあるという特性である。EPR 効果は、粒子またはナノ粒子 1 を腫瘍領域に導くのを支援する。但し、本発明の粒子 1 の性質および大きさにより、粒子またはナノ粒子 1 は、腫瘍細胞に進入したり接触したりすることができず、腫瘍を取り囲む血管新生網 7 内に保持される。

【0063】

一実施形態では、本発明の粒子またはナノ粒子 1 の EPR 比、すなわち血管新生網 7 に到達する注射された粒子またはナノ粒子 1 の量は、25% ~ 60% の範囲である。別の実施形態では、EPR 比は、注射された粒子 1 の 30% ~ 40% の範囲である。EPR 比は、粒子またはナノ粒子 1 の大きさおよび / または腫瘍領域の位置および / または腫瘍の組織学的性質によって異なってもよい。

10

【0064】

粒子またはナノ粒子 1 は、腫瘍を取り囲む血管新生網 7 によって保持され、一実施形態では、粒子またはナノ粒子 1 の分布により、中空かつ不連続的な球体が形成される。

【0065】

本発明によれば、粒子またはナノ粒子は、間質によって、あるいは間質内に保持されない。

【0066】

本発明によれば、粒子またはナノ粒子 1 は、腫瘍細胞に接触することができない。一実施形態では、腫瘍細胞と粒子またはナノ粒子 1 との距離は、少なくとも 1 ミクロン、好ましくは 5 ~ 100 μm である。

20

【0067】

一実施形態では、注射される粒子またはナノ粒子 1 の量は、100 μg ~ 10 g、好ましくは 500 μg ~ 2 g の範囲である。

【0068】

非接触拘束を与えるための手段は、上記外部発生器である。外部とは、磁場勾配 2 の発生が腫瘍の外側にあり、好ましくは対象の体外にあることを意味する。一実施形態では、磁場勾配 2 は、1 分 ~ 48 時間、好ましくは 15 分 ~ 5 時間の範囲の期間にわたって印加され、この期間は、数週間にわたって繰り返される。

30

【0069】

一実施形態では、対象は、ヒトを含む動物である。対象は、雄または雌であってもよい。この対象は、その体内の血管新生網 7 に関連する腫瘍を包含する。一実施形態では、腫瘍は、局所的に進行した腫瘍である。一実施形態では、腫瘍は悪性上皮性腫瘍である。一実施形態では、悪性腫瘍は膵臓癌腫瘍である。別の実施形態では、悪性腫瘍は乳癌腫瘍である。

【0070】

本発明は、

- 粒子またはナノ粒子 1 が腫瘍を取り囲む血管新生網 7 によって保持されるように上記粒子またはナノ粒子 1 を含有する組成物、好ましくは懸濁液または乳濁液を注射する工程であって、好ましくは、上記注射を静脈内で行い、粒子またはナノ粒子 1 は、自然発生的に腫瘍の血管新生網 7 に移行する工程と、
 - 任意に、血管新生網 7 内に保持される粒子またはナノ粒子 1 の濃度を腫瘍の周辺で検出するために、画像化装置を用いて画像化を行う工程と、
 - 腫瘍細胞に、例えば非接触圧力などの非接触拘束を与えるために、磁場勾配 2 の外部源から生体内で粒子またはナノ粒子 1 に印加される磁場勾配 2 を含むかそれからなる物理的および / または機械的な手段を実行する工程と、
- を含む、標的領域内の癌細胞の癌表現型を正常な細胞に変更するための方法にも関する。

40

【0071】

50

特に、本発明は、

- 粒子またはナノ粒子 1 が腫瘍を取り囲む血管新生網 7 によって保持されるように上記粒子またはナノ粒子 1 を含有する組成物、好ましくは懸濁液または乳濁液を注射する工程であって、好ましくは、上記注射を静脈内で行い、粒子またはナノ粒子 1 は、自然発生的に腫瘍の血管新生網 7 に移行する工程と、
 - 任意に、血管新生網 7 内に保持されるナノ粒子の濃度 1 を腫瘍の周辺で検出するために、画像化装置を用いて画像化を行う工程と、
 - 腫瘍細胞に、例えば非接触圧力などの非接触拘束を与えるために、磁場勾配 2 の外部源から生体内で粒子またはナノ粒子 1 に印加される磁場勾配 2 を含むかそれからなる物理的および/または機械的な手段を実行する工程と、
- を含む、標的領域内の腫瘍細胞の体積および表面積を減少させる方法にも関する。

10

【実施例】

【0072】

以下の実施例により、本発明をさらに説明する。

【0073】

図 1 は、その周辺の血管新生網 7 内に、本明細書に記載されているナノ粒子 1 を含む腫瘍を示す。

【0074】

図 2 では、ヌードマウス 10 の皮下 14 に、鉄のナノ粒子 1 と MDA - MB - 231 (由来: ヒトの乳癌) 細胞との混合物が移植されている。図 2 に示すように、マウス 10 を 2 つの磁石 9 の間に配置する。図 2 の例では、1 つの磁石は、腫瘍に可能な限り近くにあり、反対側の磁石は、腫瘍の周辺から距離 d だけ離れており、この距離 d は、腫瘍の直径に対応している。

20

【0075】

実施例 1 : 実現可能性調査

【0076】

目的

本調査の目的は、マウスの皮下に移植された 10 個のヒトの腫瘍 (MDA - MB - 231、乳癌細胞株) を分析することであり、

- 皮下に移植された腫瘍の顕微鏡的特徴 (HES 染色)
 - 腫瘍細胞の鉄の蓄積 (HES 染色 / ペルルス特別染色)
- を調べる。

30

【0077】

要約

5 匹のマウス 10 の皮膚 (西側) 16 と筋肉 (東側) 15 との間に、細胞株 MDA - MB - 231 のヒトの細胞 (1 匹のマウスにつき 2 つの異種移植片) を皮下に移植した。本調査の終了時に、全ての腫瘍を回収し、4 %ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋した。腫瘍の組織病理学的特徴を評価するために、各マウス 10 からの 2 つの異種移植片のうちの 1 つを処理した (HES 染色)。腫瘍細胞の鉄の蓄積を評価するために、各マウスからの両方の異種移植片試料を処理した (ペルルス特別染色)。本調査では、10 個の評価した MDA - MB - 231 異種移植片は、類似した組織学的特徴を示し、未分化癌として現れた。全ての腫瘍の中央部分に壊死性領域 13 が認められた。それらは、腫瘍表面積の 60 % から 80 % まで様々であった。鉄の沈着は、腫瘍領域の周囲に位置していた。それらは、HES 染色した側では褐色の顆粒状沈着物として現われ、ペルルス染色された側ではダークブルーの顆粒状沈着物として現われた。どの群のどの腫瘍の腫瘍細胞にも、鉄の沈着は特定されなかった。

40

【0078】

マクロファージの細胞質および壊死性領域 13 には、最小の沈着物が観察された。

【0079】

結果

50

腫瘍の組織病理学検査 (H E S 染色)

【0080】

H E S 染色した側では、腫瘍の顕微鏡的特徴を評価した。

【0081】

本調査では、評価した M D A - M B - 2 3 1 異種移植片は、類似した組織学的特徴を示し、腺様分化を伴わない未分化癌として現れた。これらの腫瘍は、高密度な細胞からなり、非常に境界が明確であって、粗い結節性であり、隣接する皮下組織、特に神経において浸潤性増殖が生じていた。

【0082】

腫瘍周囲の線維性間質には非常に数多くの炎症性細胞が認められ、隣接する組織 (脂肪組織、骨格筋、皮膚) には、より少ない量の炎症性細胞が認められた。これらの細胞は主として、顔料を多く有するマクロファージに存在し、若干の小リンパ球と、時には顆粒球にも存在していた。僅かな腫瘍内間質にも、顔料を多く有するマクロファージを含む少ない数の同様の炎症性細胞が観察された。これらの細胞は主に、腫瘍の周辺部分で観察され、恐らく腫瘍周囲の間質から拡散したものである。顔料を多く有するマクロファージは、中型から大型の細胞であり、多量の褐色の顆粒状顔料を含有し、多くの場合、丸い核を覆うか隠す大きな細胞質を示した。そのような顔料は、顆粒状顔料の破片として腫瘍周囲および腫瘍内間質に時折認められた。

10

【0083】

腫瘍細胞の鉄の蓄積 (ペルルス特別染色)

20

ペルルスの酸 / フェロシアン化物反応により、ダークブルーの標識を介して鉄化合物が現れた。各腫瘍について、3つの連続した箇所を評価した。これらの3つの全ての箇所が類似した特徴を示した。

【0084】

どの群のどの腫瘍の腫瘍細胞にも、青色に染色された鉄の沈着は特定されなかった。

【0085】

結論

粒子1は、腫瘍の周囲に分散しており、驚くべきことに、中空かつ不連続的な球体を形成していた。

30

【0086】

腫瘍に拘束を与えるための条件が集まっているように見える。

【0087】

実施例2: 動物における拘束により癌表現型を正常に変更するための能力

【0088】

手順

本調査の目的は、皮下に M D A - M B - 2 3 1 ヒト乳房腫瘍を有するマウスモデルにおいて、磁場によって活性化されたナノ粒子の抗腫瘍効率を調べることにある。

【0089】

試験物質

【表1】

40

ナノ粒子:	流体MAG-D
ロット番号:	2202/12
貯蔵条件:	+4°C
供給量:	100mL (100mg/mL)

【0090】

治療用量 - 薬物投与経路

細胞と共に注射した鉄の量は5mgである。腫瘍細胞と共に、ナノ粒子を B a l b / c ノードマウスに投与する (腫瘍細胞の注射時)。ナノ粒子の注射体積は、300µL / マウス / 注射である。

50

【0091】

動物

受け取り時に6～7週齢で体重が16～20gの45匹の雌のBalb/cヌードマウスを、Charles River社(フランス)から入手した。治療前に、特定病原体不在(SPF)動物の管理団体で動物を少なくとも7日間観察する。この動物管理団体は、フランスの農業/研究省によって認可されている(認可番号:A21231011EA)。動物実験の倫理指針および腫瘍実験における動物の福祉のための英語ガイドライン(English guidelines for welfare of animals in experimental neoplasia)に従って、動物実験を行う。動物に関する全ての手順を医薬大学(ディジョン)の動物実験委員会に提出する。

【0092】

動物の磁場への曝露

磁石を備えた装置を用いて磁場に曝露する際に、動物に麻酔(イソフルラン)をかけ、赤外線ランプによりマウスの体温を生理的レベルの範囲内に維持する。

【0093】

治療群(すなわち、後で説明する右の腫瘍G3)において、腫瘍が約1cmの腫瘍に到達したら、マウス10を斥力モードの2つの磁石9の間隙に配置した(図2を参照)。

【0094】

次いで、磁場勾配2を印加した。印加した勾配は、3mmの深さで約0.4テスラ/cmである。

【0095】

癌細胞株

使用した細胞株を、以下の表に詳細に記載する。

【表2】

細胞株	種類	種	供給元
MDA-MB-231	ヒトの乳房腺癌	ヒト	ATCC

【0096】

雌のBalb/cヌードマウスへのMDA-MB-231腫瘍の導入

5mgのナノ粒子を含有するかナノ粒子を含有しない0.3mLの体積のRPMI1640媒体に再懸濁した1000万個のDA-MB-231腫瘍細胞を、45匹の雌のヌードマウスの側腹部に皮下接種し、24～72時間後に、放射線を照射した(全身照射法、2Gy、60Co、BioMEP Sarl社、フランスのBreteniere)。

【0097】

45匹の全てのマウスの左腹部に、ナノ粒子を含まない腫瘍細胞を注射する。

【0098】

45匹の全てのマウスの右腹部に、ナノ粒子を含む腫瘍細胞を注射する。

【0099】

腫瘍細胞注射の当日を0日目(D0)とみなす。

【0100】

治療スケジュール

【0101】

以下の式により、腫瘍体積を推定する。

$$\text{腫瘍体積} = 1/2 \times \text{長さ} \times \text{幅}^2$$

【0102】

平均腫瘍体積が約100～200mm³に到達したら、36匹の腫瘍を有する雌のBalb/cヌードマウスを、それらの個々の腫瘍体積に従って、3つの群(8匹のマウスからなる1つの群と14匹のマウスからなる2つの群)に無作為化する。以下のように治療スケジュールを選択した。

・1群: 8匹のマウスの左腹部の腫瘍(ナノ粒子を含有しない)を、連続した21日間で1日1回2時間連続して磁場に曝露する

10

20

30

40

50

- ・ 2 群：14 匹のマウスの左腹部の腫瘍（ナノ粒子を含有しない）および右腹部の腫瘍（ナノ粒子を含有する）を磁場に曝露しない
- ・ 3 群：14 匹のマウスの右腹部の腫瘍（ナノ粒子を含有する）を、連続した 21 日間で 1 日 1 回 2 時間連続して磁場に曝露する

【0103】

無作為化の後に治療（すなわち、磁場への曝露）を開始する。以下の表 1 は、治療スケジュールをまとめたものである。

【表 3】

群	マウスの数	ナノ粒子		磁場への曝露		
		左の腫瘍	右の腫瘍	左の腫瘍	右の腫瘍	期間
1	8	無	有	有	無	21 日間毎日 2 時間
2	14	無	有	無	無	-
3	14	無	有	無	有	21 日間毎日 2 時間

10

表 1：皮下にMDA-MB-231 ヒト乳房腫瘍を有するマウスのための治療スケジュール

【0104】

このようにして、治療群（3 群：右の腫瘍）を 3 種類の対照群と比較した。

20

- ・ ナノ粒子 1 を含み、勾配場 2 を有しない群：1 群（右の腫瘍）および 2 群（右の腫瘍）
- ・ ナノ粒子 1 を含まず、勾配場 2 を有する群：1 群（左の腫瘍）
- ・ ナノ粒子 1 を含まず、勾配場 2 を有しない群：2 群（左の腫瘍）および 3 群（左の腫瘍）

【0105】

腫瘍試料の回収

腫瘍を切除し、切断して 2 つの断片にする。この 2 つの断片を 10% 中性緩衝ホルマリンで固定する。

【0106】

結果

30

治療群（ナノ粒子 1 を含み、勾配場 2 を有する、すなわち右の腫瘍 G3）を 3 種類の対照群と比較した。2 つの統計的に有意な変化があった ($p < 0.05$)。

【0107】

一方、3 種類の対照群と比較した場合、治療群の総腫瘍増殖率 11/12 は、より低かった（図 3 を参照）。治療した腫瘍のより詳細な分析を使用して、西側および東側を比較した。対照群と比較した場合、治療した腫瘍（ナノ粒子および磁場勾配を有する）において、西側 11 の腫瘍の活性部分の厚さが増加し、東側 12 の腫瘍の活性部分が減少した。

【0108】

移植後 59 日目（D59）に、右の腫瘍 G3 群（7 匹のマウス）の腫瘍体積は、全ての対照群（33 匹のマウス）よりも非常に小さかった。治療群の中央値は 529.4 mm^3 であり、対照群の中央値は 1334 mm^3 である ($p = 0.014 < 0.05$)。

40

【0109】

腫瘍に関する結果を図 4 A に示し、図 5 B に図式化している。

【0110】

本出願人の知識の範囲では、それは、腫瘍増殖に対して磁場勾配により生成される物理的な拘束の生体内作用の第 1 の証拠である。

【0111】

実施例 3：動物における物理的および/または機械的な拘束による腫瘍の体積および表面積を変更する能力

【0112】

50

目的

本調査の目的は、皮下にMDA-MB-231ヒト乳房腫瘍を有するマウスモデルにおける磁場勾配により活性化されたナノ粒子による腫瘍の体積および表面積の減少を調べることにある。

【0113】

要約

マウスの皮膚と筋肉との間に、細胞株MDA-MB-231のヒトの細胞を皮下移植した。治療群において腫瘍が約1cmの腫瘍に到達したら、マウスを、図2に示すような特定の幾何学的形状を有する斥力モードの2つの磁石の間隙に配置した。

【0114】

実験群

1cmの大きさの腫瘍を有する79匹のマウスを4群に割り振った。

- G1' (治療群) : 粒子をマウスに注射し、次いで、マウスを磁場勾配下に置く実験
- G2' (対照群) : 粒子をマウスに注射するが、マウスを磁場勾配下に置かない実験
- G3' (対照群) : マウスを磁場勾配下に置くが、粒子をマウスに注射しない実験
- G4' (対照群) : 粒子をマウスに注射せず、磁場勾配を使用しない群

【0115】

腫瘍細胞の注射当日を0日目(D0)とみなす。体積を mm^3 で計算する。

【0116】

結果

腫瘍体積 - 生体内実験

【0117】

G1'と全未治療群との比較

治療群(G1')をG2'、G3'およびG4'を含む全未治療群と比較した。以下の表2および図8には、皮下移植された全てのマウスについて59日後に得られた結果をまとめてある。

【表4】

群	平均	中央値
治療群 (G1')	646.5	529.4
未治療群 (G2'、G3' およびG4')	1250	1334.0

表2：皮下移植されたマウスの治療群(G1')と未治療群(G2'、G3' およびG4')との統計結果

【0118】

p値

治療群(G1')と他の群(未治療)との間で中央値を比較するためのウィルコクソン検定により、0.0146 (< 0.05)のp値が得られた。

【0119】

このように、磁場勾配下での磁気粒子による乳房腫瘍細胞の治療により、未治療群(G2'、G3'またはG4')と比較して腫瘍体積が顕著に減少している。

【0120】

G1'と各未治療群との比較

次いで、治療群(G1')を各未治療群(G2'、G3'またはG4')と比較した。以下の表3および図6には、各群の皮下移植された全てのマウスについて60日後に得られた結果がまとめてある。

【表 5】

群	平均	中央値
1'	382.862	246.010
2'	1085.634	1334.170
3'	564.826	595.840
4'	635.110	387.640

表 3 : 皮下移植された全てのマウスについて 59 日後の治療群 (G 1') と各対照群 (G 2', G 3' または G 4') との腫瘍体積の比較

【 0 1 2 1 】

10

治療群 (G 1') は、より小さい腫瘍体積が得られる唯一の群であることは明らかである。

【 0 1 2 2 】

このように、本実施例により、注射可能なナノ粒子および磁場勾配を含む本医療システムは、機械的および/または物理的手段によって腫瘍体積を減少させる最良の方法であることが分かる。

【 0 1 2 3 】

西側および東側の表面積 - 生体外実験

腫瘍のより細かい分析により、西側および東側を比較することができた。総表面積の測定値は、51 個の腫瘍について入手可能であり、その結果を表 4 および図 7 に示す。

20

【表 6】

変数	群	平均	中央値
西側の表面積	1'	10.937	5.582
	2'	20.594	20.795
	3'	17.320	16.456
	4'	17.084	14.784
東側の表面積	1'	7.727	4.714
	2'	23.108	24.993
	3'	21.431	17.952
	4'	18.650	12.521

30

表 4 : 皮下移植された全てのマウスについて 59 日後の治療群 (G 1') と対照群 (G 2', G 3' または G 4') との西側および東側表面積の比較

【 0 1 2 4 】

p 値

治療群 (G 1') および対照群 (G 2' ~ G 4') の両方を包含する群に対して、対数変換を用いて、西側および東側の表面積の一元配置分散分析を行った。

【表 7】

西側の表面積 - 全てのマウスに対して - 全体的効果	
効果	有意性 (p 値)
群	有意 (p = 0.021)
東側の表面積 - 全てのマウスに対して - 全体的効果	
効果	有意性 (p 値)
群	有意 (p = 0.004)

40

【 0 1 2 5 】

これらの最初の結果から、当該群が、腫瘍の西側および東側の表面積の両方に対して有

50

意な全体的効果を有することが分かる。

【0126】

未治療群間でのp値の比較

未治療群間でのチューキーの調整を用いた一対比較（一元配置分散分析）により、表5に示す結果が得られた。

【表8】

西側の表面積—全てのマウスに対して—未治療群の比較		
比較	推定値	有意性 (p値) (チューキーの調整)
G 2' 対 G 3'	0. 0 3 7	有意でない (p = 0. 9 7 3)
G 2' 対 G 4'	0. 1 4 1	有意でない (p = 0. 3 7 2)
G 3' 対 G 4'	0. 1 0 4	有意でない (p = 0. 7 9 9)
東側の表面積—全てのマウスに対して—未治療群の比較		
比較	推定値	有意性 (p値) (チューキーの調整)
G 2' 対 G 3'	-0. 0 2 8	有意でない (p = 0. 9 8 8)
G 2' 対 G 4'	0. 1 5 9	有意でない (p = 0. 3 7 7)
G 3' 対 G 4'	0. 1 8 7	有意でない (p = 0. 5 7 1)

表5：皮下移植された全てのマウスについて59日後の対照群（G 2'、G 3' またはG 4'）のp値の比較

【0127】

全てのp値が0. 05よりも高かったため、予想した通り、3つの未治療群間に有意差はない。

【0128】

治療群（G 1'）と未治療群とのp値の比較

最後に、この3群の混合を実現させ、表6に示す対比オブションを用いて、一元配置分散分析を行う。

【表9】

西側の表面積—全てのマウスに対して—未治療群の比較		
比較	推定値	有意性 (p値) (チューキーの調整)
G 1' 対 (1/3 * G 2' + 1/3 * G 3' + 1/3 * G 4')	-0. 3 4 4	有意 (p = 0. 0 0 5)
東側の表面積—全てのマウスに対して—未治療群の比較		
比較	推定値	有意性 (p値) (チューキーの調整)
G 1' 対 (1/3 * G 2' + 1/3 * G 3' + 1/3 * G 4')	-0. 4 8 5	有意 (p = 0. 0 0 1)

表6：皮下移植された全てのマウスについて59日後にG 2'、G 3' およびG 4' の一部を含む未治療群と比較した治療群（G 1'）のp値

【0129】

驚くべきことに、これらの結果から、治療群の表面積が未治療群（混合されたもの）とは有意に異なることが分かる。治療群の表面積は、未治療群の表面積よりも小さい（差の推定値は、西側では - 0. 3 4 4 対数、東側では - 0. 4 8 5 である）。

【0130】

結論

これらの結果から、本出願人が、腫瘍細胞の表現型に作用し、注射可能な粒子および外部磁場勾配によって実行される、機械的および/または物理的な拘束に曝露される腫瘍の体積および表面積を減少させることができる医療システムを発見したことが実証される。

【 図 1 】

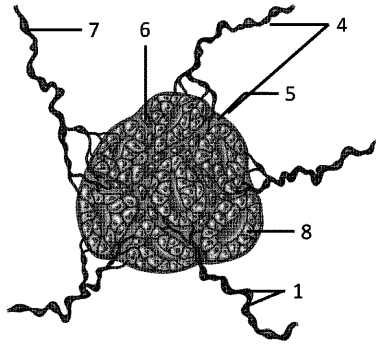


FIG. 1

【 図 2 】

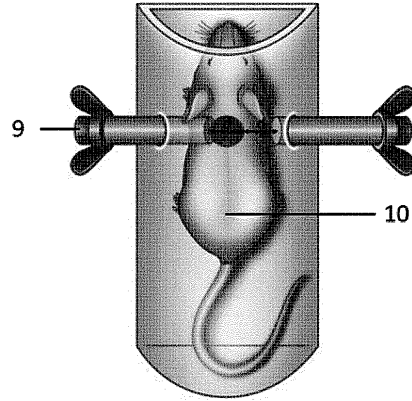
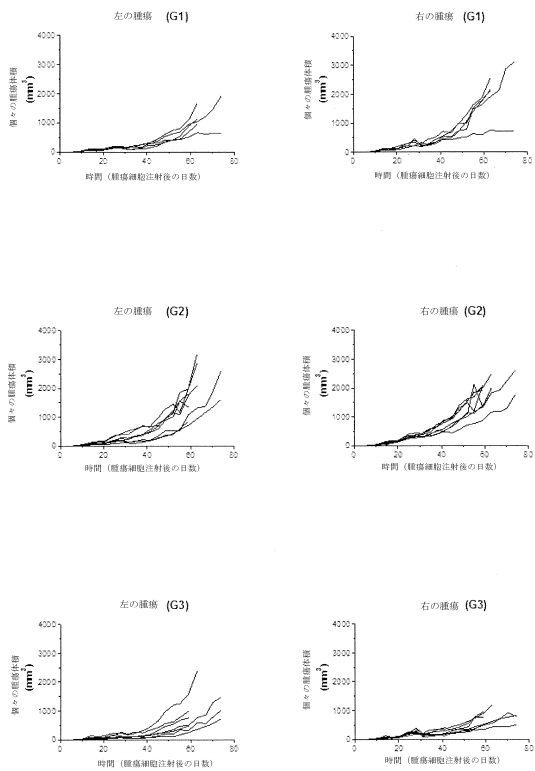


FIG. 2

【 図 3 】



【 図 4 A 】



FIG. 4A

【 図 4 B 】

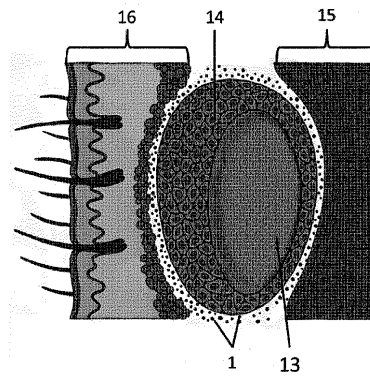
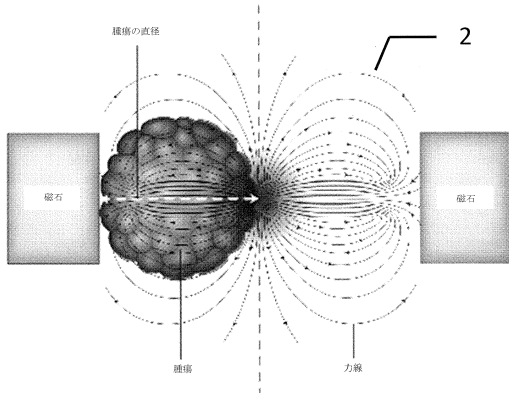
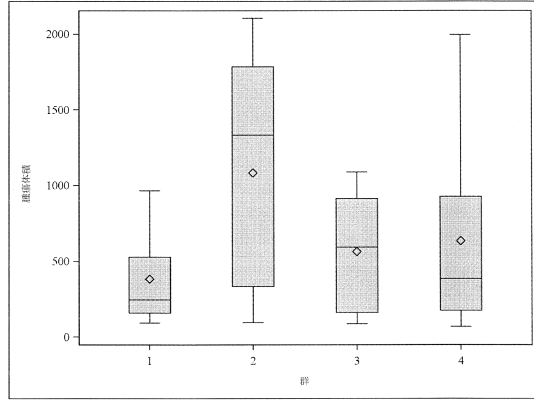


FIG. 4B

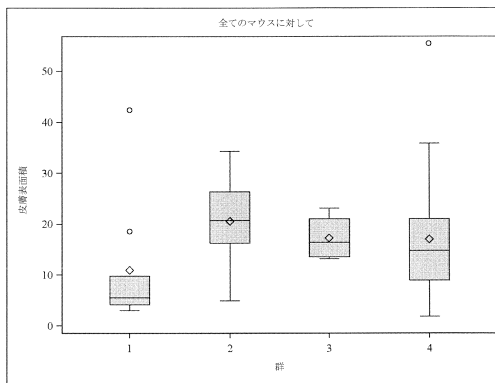
【図5】



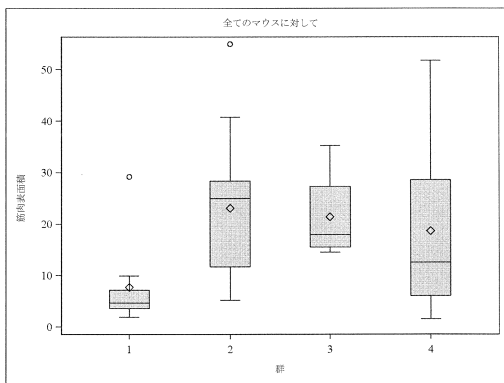
【図6】



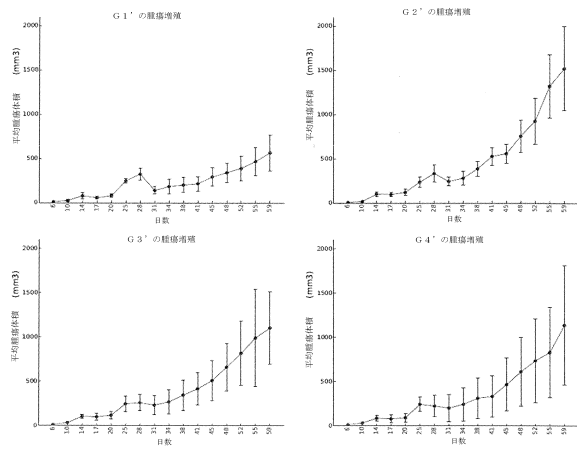
【図7A】



【図7B】



【図8】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 K 9/14 (2006.01) A 6 1 K 9/14
A 6 1 K 47/36 (2006.01) A 6 1 K 47/36

(72)発明者 ブロッセル, レミー
フランス国, エフ - 1 3 2 8 0 ラフェル レ アルル, チェミン ドゥ ラ ポテリエ, ル マ
1 'ヘルミテ 3 3 1

審査官 高橋 樹理

(56)参考文献 特開2009 - 1 1 4 0 6 6 (J P , A)
特表2009 - 5 3 4 3 5 0 (J P , A)
米国特許出願公開第2011 / 0 0 5 4 2 3 7 (U S , A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B名)
A 6 1 K 3 3 / 2 6
A 6 1 K 4 1 / 0 0
A 6 1 N 2 / 0 8