

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-518192

(P2023-518192A)

(43)公表日 令和5年4月28日(2023.4.28)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 9/19 (2006.01)	A 6 1 K 9/19	4 C 0 7 6
A 6 1 K 47/18 (2017.01)	A 6 1 K 47/18	4 C 0 8 5
A 6 1 K 47/26 (2006.01)	A 6 1 K 47/26	4 C 0 8 6
A 6 1 K 9/51 (2006.01)	A 6 1 K 9/51	
A 6 1 K 31/436(2006.01)	A 6 1 K 31/436	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全47頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2022-554953(P2022-554953)	(71)出願人	511254321 セレクト バイオサイエンス インコーポレーテッド SELECTA BIOSCIENCE S, INC. アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02472、ウォータータウン、グローブストリート 65 65 Grove Street, Watertown, MA 02472, United States of America
(86)(22)出願日	令和3年3月11日(2021.3.11)	(74)代理人	100102842 弁理士 葛和 清司
(85)翻訳文提出日	令和4年11月11日(2022.11.11)	(72)発明者	ジョンストン, ロイド
(86)国際出願番号	PCT/US2021/021939		
(87)国際公開番号	WO2021/183781		
(87)国際公開日	令和3年9月16日(2021.9.16)		
(31)優先権主張番号	62/988,347		
(32)優先日	令和2年3月11日(2020.3.11)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 合成ナノキャリアに関連する方法および組成物

(57)【要約】

本発明は、合成ナノキャリアに、ならびに関連する組成物および方法であって、ここで合成ナノキャリア組成物が凍結乾燥可能である、凍結乾燥形態である、またはその再構成組成物であることを含む、前記組成物および方法に関する。

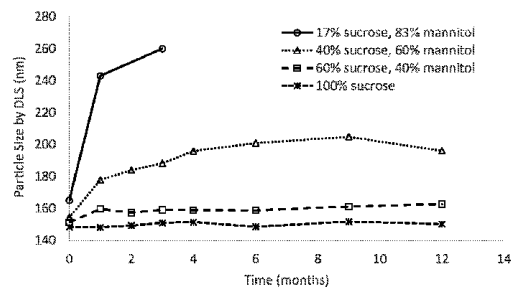


FIG. 1

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下：疎水性担体材料および免疫抑制剤

を含む合成ナノキャリアを含む、組成物であって；

ここで、組成物は、凍結乾燥可能であり、凍結乾燥粉末形態などの凍結乾燥形態であるが、またはその再構成バージョンである、前記組成物。

## 【請求項 2】

合成ナノキャリアが、本明細書に記載の合成ナノキャリアのいずれか 1 つである、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 3】

組成物が、再構成時に、肉眼で見えるような目に見える凝集体を有さず；再構成時に、少なくとも 12 ヶ月間は 10 % 以内などの安定した平均粒子径を有し；凍結乾燥後、少なくとも 12 ~ 36 ヶ月間は 2 ~ 8 で保管可能であり；凍結乾燥後、少なくとも 12 ヶ月間は 20 ~ 30 で保管可能であり；および/または、中性または中性に近い pH (例えば、2.5 で pH 7.3) を溶液中で有する、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

## 【請求項 4】

組成物が、リン酸緩衝液またはリン酸界面活性剤を含まない、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 5】

組成物が、非リン酸緩衝液などの緩衝液を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 6】

組成物が、凍結乾燥保護剤を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 7】

組成物が、非リン酸緩衝液などの緩衝液、および凍結乾燥保護剤を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 8】

緩衝液が、トリス緩衝液である、請求項 5 ~ 7 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 9】

トリス緩衝液が、10 mM の濃度である、請求項 8 に記載の組成物。

## 【請求項 10】

トリス緩衝液が、トリス HCl およびトロメタミンを含む、請求項 8 または 9 に記載の組成物。

## 【請求項 11】

凍結乾燥保護剤が、スクロースまたはスクロース/マンニトール混合物を含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 12】

凍結乾燥保護剤が、スクロースを含む、請求項 11 に記載の組成物。

## 【請求項 13】

組成物が、トロメタミン、トリス HCl、およびスクロースのうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 14】

組成物が、トロメタミン、トリス HCl、およびスクロースを含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 15】

トロメタミンが、1.3 mM の濃度である、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 16】

トリス HCl が、8.7 mM の濃度である、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の組成物。

10

20

30

40

50

- 【請求項 17】  
スクロースが、4～9.6wt%である、請求項1～16のいずれか一項に記載の組成物。
- 【請求項 18】  
スクロースが、9.6wt%である、請求項17に記載の組成物。
- 【請求項 19】  
組成物が、25でpH7.3の溶液中にある、請求項1～18のいずれか一項に記載の組成物。
- 【請求項 20】  
組成物が、ガラス製バイアル（例えば、任意に20mmストッパーをさらに含む、20mLのガラス製バイアル）内に保管される、請求項1～19のいずれか一項に記載の組成物。 10
- 【請求項 21】  
組成物が、2～8で（例えば、凍結乾燥形態で）保管される、請求項1～20のいずれか一項に記載の組成物。
- 【請求項 22】  
組成物が、凍結乾燥されようとしている、請求項1～21のいずれか一項に記載の組成物。
- 【請求項 23】  
組成物が、再構成されている、請求項1～22のいずれか一項に記載の組成物。 20
- 【請求項 24】  
組成物が、凍結乾燥されている、請求項1～23のいずれか一項に記載の組成物。
- 【請求項 25】  
組成物が、凍結乾燥粉末として凍結乾燥される、請求項24に記載の組成物。
- 【請求項 26】  
免疫抑制剤が、ラバログである、請求項1～25のいずれか一項に記載の組成物。
- 【請求項 27】  
ラバログが、ラバマイシンである、請求項26に記載の組成物。
- 【請求項 28】  
ラバログまたはラバマイシンが、2mg/mLの濃度である、請求項26または27に記載の組成物。 30
- 【請求項 29】  
免疫抑制剤が、合成ナノキャリアにカプセル化されている、請求項1～28のいずれか一項に記載の組成物。
- 【請求項 30】  
免疫抑制剤が合成ナノキャリア中に、50重量%未満のラバマイシン/疎水性担体材料という安定な過飽和量で存在する、請求項1～29のいずれか一項に記載の組成物。
- 【請求項 31】  
免疫抑制剤が、7重量%を超える安定な過飽和量で存在する、請求項1～30のいずれか一項に記載の組成物。 40
- 【請求項 32】  
疎水性担体材料が、1つ以上の疎水性ポリマーまたは脂質を含む、請求項1～31のいずれか一項に記載の組成物。
- 【請求項 33】  
疎水性担体材料が、1つ以上の疎水性ポリマーを含み、ここで1つ以上の疎水性ポリマーがポリエステルを含む、請求項32に記載の組成物。
- 【請求項 34】  
ポリエステルが、PLA、PLG、PLGAまたはポリカプロラクトンを含む、請求項33に記載の組成物。
- 【請求項 35】 50

疎水性担体材料が、PLA-PEG、PLGA-PEGまたはPCL-PEGを含むか、またはこれをさらに含む、請求項33または34に記載の組成物。

【請求項36】

合成ナノキャリア中の疎水性担体材料の量が、5～95重量%の疎水性担体材料/総固形分である、請求項1～35のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項37】

合成ナノキャリア中の疎水性担体材料の量が、60～95重量%の疎水性担体材料/総固形分である、請求項36に記載の組成物。

【請求項38】

免疫抑制剤の量が、疎水性担体材料の重量あたり、6重量%以上かつ50重量%以下の免疫抑制剤である、請求項1～37のいずれか一項に記載の組成物。 10

【請求項39】

免疫抑制剤の量が、疎水性担体材料の重量あたり、7重量%以上かつ30重量%以下の免疫抑制剤である、請求項38に記載の組成物。

【請求項40】

免疫抑制剤の量が、疎水性担体材料の重量あたり、8重量%以上かつ24重量%以下の免疫抑制剤である、請求項39に記載の組成物。

【請求項41】

合成ナノキャリアがさらに、HLB値が10以下の非イオン性界面活性剤を含む、請求項1～40のいずれか一項に記載の組成物。 20

【請求項42】

HLB値が10以下の非イオン性界面活性剤が、ソルビタンエステル、脂肪アルコール、脂肪酸エステル、エトキシ化脂肪アルコール、ポロキサマーまたは脂肪酸を含む、請求項41に記載の組成物。

【請求項43】

HLB値が10以下の非イオン性界面活性剤が、SPAN 40、SPAN 20、オレイルアルコール、ステアリルアルコール、イソプロピルパルミタート、グリセロールモノステアレート、BRIJ 52、BRIJ 93、Pluronic P-123、Pluronic L-31、パルミチン酸、ドデカン酸、グリセリルトリパルミタートまたはグリセリルトリリノレートを含有する、請求項41または42に記載の組成物。 30

【請求項44】

HLB値が10以下の非イオン性界面活性剤が、SPAN 40である、請求項43に記載の組成物。

【請求項45】

HLB値が10以下の非イオン性界面活性剤が、合成ナノキャリアに封入されるか、合成ナノキャリアの表面に存在するか、またはその両方である、請求項41～44のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項46】

HLB値が10以下の非イオン性界面活性剤の量が、疎水性担体材料の重量あたり、0.01重量%以上かつ20重量%以下の、HLB値10以下の非イオン性界面活性剤である、請求項41～45のいずれか一項に記載の組成物。 40

【請求項47】

HLB値が10以下の非イオン性界面活性剤の量が、疎水性担体材料の重量あたり、0.1重量%以上かつ15重量%以下の、HLB値10以下の非イオン性界面活性剤である、請求項46に記載の組成物。

【請求項48】

組成物が、例えば凍結乾燥前など溶液中にある場合、0.22 μmフィルターを通して初期滅菌濾過可能である、請求項1～47のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項49】

動的光散乱を用いて得られた、合成ナノキャリアの粒度分布の平均が、110 nmを超 50

える直径である、請求項 1 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5 0】

直径が、1 2 0 n m より大きい、請求項 4 9 に記載の組成物。

【請求項 5 1】

直径が、1 5 0 n m より大きい、請求項 5 0 に記載の組成物。

【請求項 5 2】

直径が、2 0 0 n m より大きい、請求項 5 1 に記載の組成物。

【請求項 5 3】

直径が、2 5 0 n m より大きい、請求項 5 2 に記載の組成物。

【請求項 5 4】

直径が、3 0 0 n m 未満である、請求項 4 9 ~ 5 3 のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 5 5】

直径が、2 5 0 n m 未満である、請求項 5 4 に記載の組成物。

【請求項 5 6】

直径が、2 0 0 n m 未満である、請求項 5 5 に記載の組成物。

【請求項 5 7】

組成物が、1 0 ~ 2 0 % の合成ナノキャリア、疎水性担体材料、および免疫抑制剤；8 0 ~ 9 0 % のスクロース、0 . 1 ~ 5 % のトロメタミン；および 0 . 1 ~ 5 % のトリス H C L を含む、請求項 1 ~ 5 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5 8】

組成物がさらに、抗原を含む、請求項 1 ~ 5 7 のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 5 9】

以下：請求項 1 ~ 5 8 のいずれか一項に記載の組成物を含む、キット。

【請求項 6 0】

キットが、本明細書で提供される方法のいずれか 1 つで使用するためのものである、請求項 5 9 に記載のキット。

【請求項 6 1】

指示をさらに含む、請求項 6 0 に記載のキット。

【請求項 6 2】

指示が、本明細書で提供される方法のいずれか 1 つの説明を含む、請求項 6 1 に記載のキット。

30

【請求項 6 3】

キットがさらに、抗原を含む、請求項 5 9 ~ 6 2 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 6 4】

請求項 1 ~ 5 8 に記載の組成物のいずれか 1 つの組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む、方法。

【請求項 6 5】

抗原を対象に投与することをさらに含む、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

合成ナノキャリアを含む組成物を生成する方法であって、以下：  
請求項 1 ~ 5 8 のいずれか一項に記載の合成ナノキャリアを溶液中で生成または取得すること、および  
緩衝液および凍結乾燥保護剤の少なくとも 1 つを、該溶液に添加することを含む、前記方法。

40

【請求項 6 7】

緩衝液が、非リン酸緩衝液である、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 6 8】

緩衝液が、トリス緩衝液（例えば、1 0 m M の濃度までの）である、請求項 6 7 に記載の方法。

50

## 【請求項 69】

トリス緩衝液が、トリスHClおよびトロメタミンを含む、請求項68に記載の方法。

## 【請求項 70】

凍結乾燥保護剤が、スクロースまたはマンニトール/スクロース混合物を含む、請求項66～69のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 71】

凍結乾燥保護剤が、スクロースを含む、請求項70に記載の方法。

## 【請求項 72】

緩衝液および凍結乾燥保護剤が添加される、請求項66～71のいずれか一項に記載の方法。

10

## 【請求項 73】

トロメタミン、トリスHCl、およびスクロースの少なくとも1つが、溶液に添加される、請求項66～72のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 74】

トロメタミン、トリスHCl、およびスクロースが添加される、請求項73に記載の方法。

## 【請求項 75】

トロメタミンが、1.3 mMの濃度で溶液に添加される、請求項66～74のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 76】

トリスHClが、8.7 mMの濃度で溶液に添加される、請求項66～75のいずれか一項に記載の方法。

20

## 【請求項 77】

スクロースが、4～9.6 wt%で添加される、請求項66～76のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 78】

溶液が、25 でpH7.3であるか、またはかかるpHに調整されている、請求項66～77のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 79】

合成ナノキャリアを溶液中で凍結乾燥することをさらに含む、請求項66～78のいずれか一項に記載の方法。

30

## 【請求項 80】

凍結乾燥することが、粉末形態にすることである、請求項79に記載の方法。

## 【請求項 81】

凍結乾燥された合成ナノキャリアを再構成することをさらに含む、請求項66～80のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 82】

合成ナノキャリアが、ガラス製バイアル（例えば、20 mLのガラス製バイアル）に保管される、請求項66～81のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 83】

合成ナノキャリアが、2～8 で保管される、請求項66～82のいずれか一項に記載の方法。

40

## 【請求項 84】

請求項66～83のいずれか一項に記載の方法によって生成される、組成物。

## 【請求項 85】

請求項84に記載の組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む、方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

関連出願

50

本出願は、35 U.S.C. § 119の下で、2020年3月11日に出願された米国仮出願第62/988,347号の優先権の利益を主張し、その全内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

発明の分野

本発明は、合成ナノキャリアに、ならびに関連する組成物および方法であって、ここで合成ナノキャリア組成物が凍結乾燥可能である、凍結乾燥形態である、またはその再構成組成物であることを含む前記組成物および方法に関する。いくつかの態様において、合成ナノキャリアは、疎水性ポリエステル担体材料などの疎水性担体材料、およびラパマイシン等のラパログなどの免疫抑制剤を含む。ラパマイシン等のラパログなどの免疫抑制剤は、安定した過飽和量であり得る。いくつかの態様において、合成ナノキャリアは、初期滅菌濾過可能である。いくつかの態様において、合成ナノキャリアは、親水性親油性バランス(HLB)値が10以下の非イオン性界面活性剤も含んでいる。

10

【発明の開示】

【0003】

発明の概要

本明細書で提供されるのは、好ましくは凍結乾燥可能な、凍結乾燥形態である、またはその再構成組成物である合成ナノキャリアを含む、組成物である。いくつかの態様において、再構成時に、合成ナノキャリア組成物を使用して、抗原などに対する免疫応答を阻害または低減し、および/または他の有益な*in vivo*効果をもたらすことができる。

20

一側面において、本明細書で提供されるのは、凍結乾燥可能な、凍結乾燥形態である、または凍結乾燥形態の再構成組成物である合成ナノキャリア(これは、本明細書に記載の合成ナノキャリアのいずれか1つであり得る)である。異なる成分が、凍結乾燥の促進、凝集の低減(例えば、再構成後など)、および/または2~8での長期保管(例えば、凍結乾燥後など)に役立つことが見出された。本明細書で提供される合成ナノキャリア組成物または方法のいずれか1つのいくつかの態様において、長期保管期間は36ヶ月以上である。したがって、本明細書で提供される合成ナノキャリア組成物または方法のいずれか1つのいくつかの態様において、合成ナノキャリア組成物は、かかる成分の1つ以上をさらに含むことができる。

30

【0004】

本明細書で提供される組成物のいずれか1つの一態様において、かかる成分の1つ以上は、凍結乾燥保護剤を含む。かかる組成物のいずれか1つの一態様において、凍結乾燥保護剤は、スクロース、トレハロース、マンニトール、またはスクロース/マンニトール混合物を含む。かかる組成物のいずれか1つの一態様において、凍結乾燥保護剤はスクロースを含む。かかる組成物のいずれか1つの一態様において、スクロースは、4~9.6wt%の範囲の濃度である。

さらに見出されたのは、界面活性剤の使用が、ラパマイシンなどの免疫抑制剤の可溶化、および/または合成ナノキャリアの破壊につながり得ることである。したがって一側面において、かかる界面活性剤を含まない合成ナノキャリア組成物(本明細書に記載の合成ナノキャリアのいずれかであり得る)もまた提供される。かかる合成ナノキャリア組成物のいずれか1つの一態様において、合成ナノキャリア組成物は、リン酸緩衝液またはリン酸界面活性剤を含まない。かかる合成ナノキャリア組成物のいずれか1つの別の態様において、合成ナノキャリア組成物は、非リン酸緩衝液または非リン酸界面活性剤を含む。

40

【0005】

さらに見出されたのは、いくつかの態様において、中性または中性に近いpHを維持するのに役立つ、緩衝成分の利点である。したがって、一側面において、緩衝液を含む、および/または中性または中性に近いpHである、合成ナノキャリア組成物(本明細書に記載の合成ナノキャリアのいずれか1つであり得る)も提供される。かかる合成ナノキャリア組成物のいずれか1つの一態様において、緩衝液は非リン酸緩衝液である。かかる合成

50

ナノキャリア組成物のいずれか1つの一態様において、緩衝液はトリス緩衝液である。かかる合成ナノキャリア組成物のいずれか1つの一態様において、トリス緩衝液は、10 mMの濃度である。かかる合成ナノキャリア組成物のいずれか1つの一態様において、トロメタミン(トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン)およびトリス塩酸塩(トリスHCl)は、トリス緩衝液の成分である。かかる合成ナノキャリア組成物のいずれか1つの一態様において、トリス緩衝液は、1.3 mMの濃度のトロメタミンおよび8.7 mMの濃度のトリスHClを含む。

**【0006】**

本明細書で提供される合成ナノキャリア組成物のいずれか1つの一態様において、合成ナノキャリア組成物はさらに、スクロースなどの凍結乾燥保護剤(例えば、4~9.6 wt%の濃度で)、および非リン酸緩衝液またはトリス緩衝液などの緩衝液(例えば、10 mMで)を含む。かかる組成物のいずれか1つの一態様において、トリス緩衝液は、トロメタミン(トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン)(例えば、1.3 mM)およびトリス塩酸塩(トリスHCl)(例えば、8.7 mM)を含む。凍結乾燥保護剤および緩衝液は、それぞれ、本明細書で提供される凍結乾燥保護剤または緩衝液のいずれかであり得る。

10

本明細書で提供される合成ナノキャリア組成物または方法のいずれか1つの一態様において、組成物は、10~20 wt%の合成ナノキャリア、疎水性担体材料、および免疫抑制剤; 80~90 wt%のスクロース、0.1~5 wt%のトロメタミン; および0.1~5 wt%のトリスHClを含む。

20

**【0007】**

本明細書で提供される合成ナノキャリア組成物のいずれか1つの一態様において、組成物は、pH 7.3(例えば、25 において)である。

本明細書で提供される合成ナノキャリア組成物のいずれか1つの一態様において、ラパマイシン等のラパログなどの免疫抑制剤は、2 mg/mLの免疫抑制剤の濃度である。

本明細書で提供される合成ナノキャリア組成物のいずれか1つの一態様において、組成物は、20 mLのバイアル内にある。

**【0008】**

本明細書で提供される組成物および方法のいずれか1つの一態様において、合成ナノキャリアの組成物は、凍結乾燥粉末形態などの凍結乾燥形態である。本明細書で提供される組成物および方法のいずれか1つの一態様において、合成ナノキャリアの組成物は、凍結乾燥粉末形態などに凍結乾燥される組成物である。本明細書で提供される組成物および方法のいずれか1つの一態様において、合成ナノキャリアの組成物は、凍結乾燥形態の再構成組成物である。本明細書で提供される組成物および方法のいずれか1つの一態様において、合成ナノキャリアの組成物は、ガラス製バイアルに保管される。本明細書で提供される組成物または方法のいずれか1つの一態様において、ガラス製バイアルは、20 mLのガラス製バイアルである。本明細書で提供される組成物および方法のいずれか1つの一態様において、合成ナノキャリアの組成物は、2~8 で保管される。

30

**【0009】**

本明細書で提供される組成物および方法のいずれか1つの一態様において、疎水性ポリエステル担体材料などの疎水性担体材料は、PLA、PLG、PLGAまたはポリカプロラクトンを含む。本明細書で提供される組成物および方法のいずれか1つの一態様において、疎水性ポリエステル担体材料などの疎水性担体材料はさらに、PLA-PEG、PLGA-PEGまたはPCL-PEGを含む。

40

本明細書で提供される組成物および方法のいずれか1つの一態様において、合成ナノキャリア中の疎水性ポリエステル担体材料などの疎水性担体材料の量は、5~95重量%の疎水性担体材料/総固形分である。本明細書で提供される組成物および方法のいずれか1つの一態様において、合成ナノキャリア中の疎水性ポリエステル担体材料などの疎水性担体材料の量は、60~95重量%疎水性担体材料/総固形分である。

**【0010】**

50



本明細書で提供される組成物または方法のいずれか1つの一態様において、ラパマイシン等のラパログは、疎水性ポリエステル担体材料などの疎水性担体材料の重量に対するラパマイシン等のラパログの重量に基づき、50重量%未満の安定な過飽和量である。本明細書で提供される組成物および方法のいずれか1つの一態様において、ラパマイシン等のラパログは、45重量%未満、40重量%未満、35重量%未満、30重量%未満、25重量%未満、20重量%未満、15重量%未満、または10重量%未満の、安定した過飽和量で存在する。本明細書で提供される組成物および方法のいずれか1つの一態様において、ラパマイシン等のラパログは、7重量%を超える安定した過飽和量で存在する。

**【0011】**

本明細書で提供される組成物または方法のいずれか1つの一態様において、ラパログの量は、6重量%以上かつ50重量%以下のラパログ/疎水性担体材料である。本明細書で提供される組成物または方法のいずれか1つの一態様において、ラパログの量は、7重量%以上かつ30重量%以下のラパログ/疎水性担体材料である。本明細書で提供される組成物または方法のいずれか1つの一態様において、ラパログの量は、8重量%以上かつ24重量%以下のラパログ/疎水性担体材料である。

10

本明細書で提供される組成物または方法のいずれか1つの一態様において、ラパログは、合成ナノキャリアにカプセル化される。

本明細書で提供される組成物または方法のいずれか1つの一態様において、ラパログは、ラパマイシンである。

**【0012】**

20

本明細書で提供される組成物および方法のいずれか1つの一態様において、組成物は、0.22  $\mu\text{m}$  フィルターを通して初期滅菌濾過可能である。

本明細書で提供される組成物および方法のいずれか1つの一態様において、合成ナノキャリアはさらに、HLB値が10以下の非イオン性界面活性剤を含む。本明細書で提供される組成物および方法のいずれか1つの一態様において、HLB値が10以下の非イオン性界面活性剤の量は、0.01重量%以上かつ20重量%以下の、HLB値が10以下の非イオン性界面活性剤/疎水性担体材料である。

**【0013】**

本明細書で提供される組成物および方法のいずれか1つの一態様において、HLB値が10以下の非イオン性界面活性剤は、合成ナノキャリアにカプセル化されるか、合成ナノキャリアの表面に存在するか、またはその両方である。本明細書で提供される組成物および方法のいずれか1つの一態様において、HLB値が10以下の非イオン性界面活性剤の量は、0.1重量%以上かつ15重量%以下の、HLB値が10以下の非イオン性界面活性剤/疎水性担体材料である。本明細書で提供される組成物および方法のいずれか1つの一態様において、HLB値が10以下の非イオン性界面活性剤の量は、1重量%以上かつ13重量%以下の、HLB値が10以下の非イオン性界面活性剤/疎水性担体材料である。本明細書で提供される組成物および方法のいずれか1つの一態様において、HLB値が10以下の非イオン性界面活性剤の量は、1重量%以上かつ9重量%以下の、HLB値が10以下の非イオン性界面活性剤/疎水性担体材料である。

30

**【0014】**

40

本明細書で提供される組成物および方法のいずれか1つの一態様において、HLB値が10以下の非イオン性界面活性剤は、ソルビタンエステル、脂肪アルコール、脂肪酸エステル、エトキシ化脂肪アルコール、ポロキサマー、脂肪酸、コレステロール、コレステロール誘導体、または胆汁酸もしくは塩を含む。本明細書で提供される組成物および方法のいずれか1つの一態様において、HLB値が10以下の非イオン性界面活性剤は、SPAN 40、SPAN 20、オレイルアルコール、ステアリルアルコール、イソプロピルパルミタート、グリセロールモノステアラート、BRIJ 52、BRIJ 93、Pluronic P-123、Pluronic L-31、パルミチン酸、ドデカン酸、グリセリルトリパルミタートまたはグリセリルトリリノレアートを含む。本明細書で提供される組成物および方法のいずれか1つの一態様において、HLB値が10以下の非イオン性界面活性剤は、SPAN 40である。

50

本明細書で提供される組成物または方法のいずれか1つの一態様において、重量は、合成ナノキャリアの製剤化の間に組み合わされる材料のレシピ重量である。本明細書で提供される組成物または方法のいずれか1つの一態様において、重量は、得られる合成ナノキャリア組成物中の材料の重量である。

#### 【0015】

本明細書で提供される組成物および方法のいずれか1つの一態様において、動的光散乱を使用して得られる合成ナノキャリアの粒度分布の平均は、110nmを超える直径である。本明細書で提供される組成物および方法のいずれか1つの一態様において、直径は120nmより大である。本明細書で提供される組成物および方法のいずれか1つの一態様において、直径は150nmより大である。本明細書で提供される組成物および方法のいずれか1つの一態様において、直径は200nmより大である。本明細書で提供される組成物および方法のいずれか1つの一態様において、直径は250nmより大である。本明細書で提供される組成物および方法のいずれか1つの一態様において、直径は300nm未満である。本明細書で提供される組成物および方法のいずれか1つの一態様において、直径は250nm未満である。本明細書で提供される組成物および方法のいずれか1つの一態様において、直径は200nm未満である。

10

#### 【0016】

別の側面において、本明細書で提供される組成物のいずれか1つを含むキットが提供される。提供されるキットのいずれか1つの一態様において、キットは、本明細書で提供される方法のいずれか1つで使用するためのものである。提供されるキットのいずれか1つの一態様において、キットはさらに、指示を含む。提供されるキットのいずれか1つの一態様において、指示には、本明細書で提供される方法のいずれか1つの説明が含まれる。

20

別の側面において、本明細書で提供される組成物のいずれか1つを対象に投与することを含む方法が提供される。本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、方法はさらに、対象に抗原を投与することを含む。本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、投与することは、皮内、筋肉内、静脈内、腹腔内または皮下投与による。

#### 【0017】

別の側面において、本明細書で提供される組成物またはキットのいずれか1つを製造する方法が提供される。これらの方法のいずれか1つの一態様において、製造方法は、本明細書で提供される方法のいずれか1つのステップを含む。

30

別の側面において、対象における免疫寛容を促進するための薬の製造のための、本明細書で提供される組成物またはキットのいずれか1つの使用が提供される。本明細書で提供される使用のいずれか1つの別の態様において、使用は、本明細書で提供される方法のいずれか1つを達成するためのものである。

別の側面において、本明細書で提供される組成物またはキットのいずれか1つは、本明細書で提供される方法のいずれか1つで使用するためのものであり得る。

別の側面において、免疫寛容を促進することを意図した薬の製造方法が提供される。一態様において、薬は、本明細書で提供される組成物のいずれか1つを含む。

#### 【図面の簡単な説明】

40

#### 【0018】

【図1】図1は、凍結乾燥製剤の安定性に対する粒径試験の効果を示すグラフである。

#### 【0019】

#### 発明の詳細な説明

本発明を詳細に説明する前に、本発明は特に例示された材料またはプロセスパラメータに限定されないことを理解されたい；なぜならば、これらは当然ながら変化し得るからである。本明細書で使用される用語は、本発明の特定の態様を説明することのみを目的としており、本発明を説明するための代替用語の使用の限定を意図しないことも理解されたい。

本明細書で引用されるすべての刊行物、特許、および特許出願は、上記または下記にか

50

かわらず、すべての目的のために参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a」、「an」および「the」は、内容が明確に別を指図しない限り、複数の指示対象を含む。例えば、「ポリマー」への言及は、2つ以上のかかる分子の混合物または単一ポリマー種の異なる分子量の混合物を含み、「合成ナノキャリア」への言及は、2つ以上のかかる合成ナノキャリアの混合物または複数のかかる合成ナノキャリアを含む、などである。

#### 【0020】

本明細書で使用される用語「含む (comprise)」、またはその変形、例えば「含む (comprises)」もしくは「含むこと」などは、任意の列挙された整数 (例えば、1つの特色、要素、特徴、特性、方法/プロセスステップまたは限定) または整数の群 (複数の特色、要素、特徴、特性、方法/プロセスステップまたは限定) の包含を指すと読み取れるが、任意の他の整数または整数の群を除外するものではない。したがって、本明細書で使用される場合、用語「含むこと」は包括的であり、追加の列挙されていない整数または方法/プロセスステップを除外するものではない。

10

本明細書で提供される組成物および方法のいずれか1つの態様において、「含む」は、「から本質的になる」または「からなる」に置き換えてもよい。「から本質的になる」という語句は、本明細書では、特定の整数またはステップを、ならびに特許請求される発明の特徴または機能に実質的に影響を及ぼさないものを要求するために、使用される。本明細書で使用される場合、用語「からなる」とは、列挙された整数 (例えば、1つの特色、要素、特徴、特性、方法/プロセスステップまたは限定) または整数のグループ (例えば、複数の特色、要素、特徴、特性、方法/プロセスのステップまたは限定) のみが存在することを示すために、使用される。

20

#### 【0021】

##### A. 緒言

驚くべきことに、本明細書に記載の合成ナノキャリア組成物のいずれか1つなどの合成ナノキャリアの組成物の、凍結乾燥を容易にし、保管安定性を維持し、凝集を低減するなどが可能な、特定の成分が見出された。したがって、本明細書で提供されるのは、かかる合成ナノキャリア組成物の凍結乾燥形態、ならびにその再構成組成物、および関連する方法である。

本発明を、以下により詳細に説明する。

30

#### 【0022】

##### B. 定義

「投与すること」または「投与」または「投与する」とは、材料を薬理学的に有用な様式で対象に提供することを意味する。この用語は、いくつかの態様において、投与を引き起こすことを含むことを意図している。「投与を引き起こすこと」とは、別の当事者に対して直接的または間接的に、材料の投与を引き起こすこと、促すこと、奨励すること、支援すること、誘導すること、または管理することを意味する。

対象への投与のための組成物または用量の文脈における「有効量」とは、対象において1つ以上の所望の応答、例えば寛容原性免疫応答の生成をもたらす組成物または用量の量を指す。いくつかの態様において、有効量は、薬力学的に有効な量である。したがっていくつかの態様において、有効量は、本明細書で提供される所望の治療効果および/または免疫応答のうちの1つ以上をもたらす、本明細書で提供される組成物または用量の任意の量である。この量は、in vitroまたはin vivo目的のためであり得る。in vivoの目的では、この量は、臨床医が、抗原特異的免疫寛容を必要とする対象などの対象に、臨床的利益をもたらし得ると信じるであろう量であることができる。本明細書で提供される組成物のいずれもが、有効量であることができる。

40

#### 【0023】

有効量は、望ましくない免疫応答のレベルを低下させることを含み得るが、ただしいくつかの態様においては、望ましくない免疫応答を完全に防止することを含む。有効量は、望ましくない免疫応答の発生を遅らせることも含み得る。有効量はまた、所望の治療エン

50

ドポイントまたは所望の治療結果をもたらす量であり得る。他の態様において、有効量は、治療のエンドポイントまたは結果などの所望の応答のレベルを高めることを含み得る。有効量は、いくつかの態様において、対象において抗原に対する寛容原性免疫応答をもたらす。前述のいずれかの達成は、通常の方法で監視することができる。

#### 【0024】

有効量は当然ながら、処置される特定の対象に依存する；状態、疾患または障害の重症度；年齢、体調、サイズおよび体重などの個々の患者パラメータ；処置期間；同時治療の性質（もしあれば）；医療従事者の知識および専門的意見の範囲内の特定の投与経路および同様の要因。これらの要因は当業者には周知であり、通常の実験のみで対処することができる。一般に、最大用量、すなわち健全な医学的判断による最高安全用量を使用することが好ましい。しかしながら当業者は、患者が、医学的理由、心理的理由、または事実上その他の任意の理由で、より低い用量または耐容用量を主張する可能性があることを理解するであろう。

一般に、本発明の組成物中の成分の用量は、成分の量を指す。代替的に、用量は、所望の量を提供する合成ナノキャリアの数に基づいて投与することができる。

#### 【0025】

「抗原特異的」とは、抗原またはその一部の存在に起因する任意の免疫応答、または抗原を特異的に認識もしくは結合する分子を生成する任意の免疫応答を指す。例えば、免疫応答が抗原特異的抗体産生である場合、抗原に特異的に結合する抗体が産生される。別の例として、免疫応答が抗原特異的B細胞またはCD4+T細胞の増殖および/または活性である場合、増殖および/または活性は、抗原またはその一部を単独で認識すること、またはMHC分子、B細胞などと複合して認識することに起因する。

本明細書で使用される「平均」とは、特に明記しない限り算術平均を指す。

「カプセル化」とは、物質の少なくとも一部を合成ナノキャリア内に封入することを意味する。いくつかの態様において、物質は合成ナノキャリア内に完全に封入される。他の態様において、カプセル化された物質のほとんどまたはすべては、合成ナノキャリアの外部の局所環境に曝露されない。他の態様において、50%、40%、30%、20%、10%、または5%（重量/重量）未満が、局所環境に曝露される。カプセル化は吸収とは異なり、吸収は、物質の大部分またはすべてを合成ナノキャリアの表面に配置し、物質を合成ナノキャリアの外部の局所環境に曝露したままにする。

#### 【0026】

「疎水性担体材料」とは、1つ以上のポリマーまたはそれらの単位（複数）を含みかつ疎水性の特徴を有する、1つ以上の分子を送達することができる、任意の薬学的に許容し得る担体を指す。いくつかの好ましい態様において、疎水性担体材料は「疎水性ポリエステル担体材料」であり、これは、1つ以上のポリエステルポリマーまたはその単位を含みかつ疎水性の特徴を有する、1つ以上の分子を送達することができる、任意の薬学的に許容し得る担体を指す。ポリエステルポリマーには、PLA、PLGA、PLGおよびポリカプロラクトンが含まれるが、これらに限定されない。疎水性担体材料には、合成ナノキャリアまたはその一部を形成することができ、1つ以上の分子（例えば、ラパログなどの免疫抑制剤、HLB値が10以下の非イオン性界面活性剤）を含めるかまたは負荷することができる材料が、含まれる。一般に、担体材料は、1つ以上の分子の標的部位または標的細胞への送達、1つ以上の分子の制御放出、および他の所望の活動を可能にすることができる。「疎水性」とは、水への水素結合に実質的に関与しない材料を指す。かかる材料は、一般に無極性、主に無極性、または電荷が中性である。本明細書に記載の組成物に適した担体材料は、あるレベルで疎水性を示すことに基づいて選択することができる。したがって、疎水性ポリエステル担体材料は、全体的に疎水性であるものであり、疎水性ポリエステルまたはその単位から完全に構成され得る。しかしながらいくつかの態様において、疎水性ポリエステル担体材料は、全体的に疎水性であり、疎水性ポリエステルまたはその単位を含むが、ただし他のポリマーまたはその単位とも組み合わせられている。これらの他のポリマーまたはその単位は、疎水性であってもよいが、必ずしもそうである必要はない

10

20

30

40

50

。疎水性担体材料は1つ以上の他のポリマーまたはその単位を含んでもよいが、ただしポリマーまたはその単位のマトリックスが疎水性であると考えられるという条件においてである。

#### 【0027】

「初期滅菌濾過可能」とは、以前には濾過されていないが、 $0.22\ \mu\text{m}$ フィルターなどのフィルターを通して、少なくとも50グラムのナノキャリア/ $1\ \text{m}^2$ のフィルター膜表面積のスループットで濾過することができる、合成ナノキャリアの組成物を指す。本明細書で提供される組成物または方法のいずれか1つのいくつかの態様において、スループットは、9 mL容量の合成ナノキャリア懸濁液を取り、本明細書で提供されるフィルターのいずれか1つを有する10 mLシリンジに入れることによって決定される。次いで、合成ナノキャリア懸濁液を、懸濁液材料がフィルターを通過しなくなるまでフィルターに押し入れる。スループットは、フィルターを通過した材料とシリンジ内に残っている懸濁液材料に基づいて計算することができる。本明細書で提供される組成物または方法のいずれか1つのいくつかの態様において、初期滅菌濾過可能な組成物は、非滅菌であり、および/またはin vivo投与に適していない(すなわち、実質的に純粋ではなく、in vivoでの投与にあまり望ましくない可溶性成分を含む)。本明細書で提供される組成物または方法のいずれか1つの他の態様において、初期滅菌濾過可能な組成物は、生成はされたが、臨床グレードの材料を生成するためにさらに処理されてはいない合成ナノキャリアを含む。本明細書で提供される組成物または方法のいずれか1つのいくつかの態様において、初期滅菌濾過可能な組成物は、事前に濾過されていないが、例えば $0.22\ \mu\text{m}$ フィルターなどのフィルターを通して、少なくとも60、70、80、90、100、120、130、140、160、200、250、300、350、500、750、1000、または1500グラムのナノキャリア/フィルター膜表面積 $1\ \text{m}^2$ あたりのスループットで、濾過することができる。 $0.22\ \mu\text{m}$ フィルターは、 $0.22\ \mu\text{m}$ の孔寸法の任意のフィルターである。かかるフィルターは、さまざまな材料で、例えばポリエチレンスルホン、ポリフッ化ビニリデン、混合セルロースエステル、無溶媒酢酸セルロース、再生セルロース、ナイロンなどで、作製可能である。フィルターの具体例としては、Millipore SLG PM33R、Millipore SLGVM33RS、Millipore SLGSM33SS、Sartorius 16534、Sartorius 17764、Sartorius 17845などが挙げられる。

#### 【0028】

本明細書で使用される「凍結乾燥された」とは、製剤を凍結し、次いで当技術分野で知られている任意の凍結乾燥法を使用して(例えば、市販の凍結乾燥装置を使用して)凍結した内容物から氷を昇華させることにより乾燥させた、合成ナノキャリア組成物を指す。いくつかの態様において、得られる凍結乾燥物は、 $0.1\%$ (w/w)~ $5\%$ (w/w)の残留水分レベルを有し、安定な粉末として存在する。凍結乾燥物は、再構成媒体で再構成することができる。「再構成合成ナノキャリア」とは、合成ナノキャリアを含む凍結乾燥組成物を希釈剤または再構成媒体に溶解して、合成ナノキャリアが希釈剤全体に分散するようにすることにより調製されたものである。いくつかの態様において、希釈剤または再構成媒体は、注射用滅菌水を含む。いくつかの態様において、再構成された合成ナノキャリアは、対象への投与に適している。凍結乾燥された、またはこれから凍結乾燥される、または再構成された組成物は、いくつかの態様において、本明細書で提供される緩衝液および/または凍結乾燥保護剤を含む。いくつかの態様において、緩衝液は非リン酸緩衝液である。いくつかの態様において、緩衝液は、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、クエン酸塩、ヒスチジン、トロメタミン(トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン)、トリス塩酸塩(トリスHCl)、またはそれらの組み合わせである。いくつかの態様において、凍結乾燥保護剤は、スクロース、トレハロース、マルトース、ラクトース、ソルビトール、デキストラン、またはそれらの組み合わせを含む。一態様において、凍結乾燥保護剤は、二糖類(例えば、スクロース)である。一態様において、組成物は、緩衝液および二糖類(例えば、スクロース)を含む。一態様において、組成物は、トリス緩衝液およびスクロースを含む。一態様において、組成物は、トロメタミン、トリスHCl、およびス

クローズを含む。これらの成分のいずれか1つまたはすべての量は、それぞれ、本明細書で提供される濃度のいずれか1つであり得る。

【0029】

いくつかの態様において、トロメタミンは、本明細書で提供される組成物のいずれか1つに、濃度として0.5 mM ~ 3 mM、0.5 mM ~ 2.5 mM、0.5 mM ~ 2.0 mM、0.5 mM ~ 1.5 mM、0.5 mM ~ 1 mM、1 mM ~ 3 mM、1 mM ~ 2.5 mM、1 mM ~ 2 mM、1 mM ~ 1.9 mM、1 mM ~ 1.8 mM、1 mM ~ 1.7 mM、1 mM ~ 1.6 mM、1 mM ~ 1.5 mM、1 mM ~ 1.4 mM、1 mM ~ 1.3 mM、1 mM ~ 1.2 mM、1 mM ~ 1.1 mM、1.2 mM ~ 3 mM、1.2 mM ~ 2.5 mM、1.2 mM ~ 2 mM、1.2 mM ~ 1.9 mM、1.2 mM ~ 1.8 mM、1.2 mM ~ 1.7 mM、1.2 mM ~ 1.6 mM、1.2 mM ~ 1.5 mM、1.2 mM ~ 1.4 mM、1.2 mM ~ 1.3 mM、1.4 mM ~ 3 mM、1.4 mM ~ 2.5 mM、1.4 mM ~ 2 mM、1.4 mM ~ 1.9 mM、1.4 mM ~ 1.8 mM、1.4 mM ~ 1.7 mM、1.4 mM ~ 1.6 mM、1.4 mM ~ 1.5 mM、1.5 mM ~ 3 mM、1.5 mM ~ 2.5 mM、1.5 mM ~ 2 mM、2 mM ~ 3 mM、または2 mM ~ 2.5 mMで存在する。いくつかの態様において、トロメタミンは、本明細書で提供される組成物のいずれか1つに、0.5 mM、0.6 mM、0.7 mM、0.8 mM、0.9 mM、1 mM、1.1 mM、1.2 mM、1.3 mM、1.4 mM、1.5 mM、1.6 mM、1.7 mM、1.8 mM、1.9 mM、2 mM、またはそれ以上の濃度で存在する。

【0030】

いくつかの態様において、トリスHClは、本明細書で提供される組成物のいずれか1つに、濃度として7.5 mM ~ 10 mM、7.5 mM ~ 9.5 mM、7.5 mM ~ 9 mM、7.5 mM ~ 8.5 mM、7.5 mM ~ 8 mM、8 mM ~ 10 mM、8 mM ~ 9.5 mM、8 mM ~ 9 mM、8 mM ~ 8.9 mM、8 mM ~ 8.8 mM、8 mM ~ 8.7 mM、8 mM ~ 8.6 mM、8 mM ~ 8.5 mM、8 mM ~ 8.4 mM、8 mM ~ 8.3 mM、8 mM ~ 8.2 mM、8 mM ~ 8.1 mM、8.2 mM ~ 10 mM、8.2 mM ~ 9.5 mM、8.2 mM ~ 9 mM、8.2 mM ~ 8.9 mM、8.2 mM ~ 8.8 mM、8.2 mM ~ 8.7 mM、8.2 mM ~ 8.6 mM、8.2 mM ~ 8.5 mM、8.2 mM ~ 8.4 mM、8.2 mM ~ 8.3 mM、8.4 mM ~ 10 mM、8.4 mM ~ 9.5 mM、8.4 mM ~ 9 mM、8.4 mM ~ 8.9 mM、8.4 mM ~ 8.8 mM、8.4 mM ~ 8.7 mM、8.4 mM ~ 8.6 mM、8.4 mM ~ 8.5 mM、8.6 mM ~ 10 mM、8.6 mM ~ 9.5 mM、8.6 mM ~ 9 mM、8.6 mM ~ 8.9 mM、8.6 mM ~ 8.8 mM、8.6 mM ~ 8.7 mM、8.8 mM ~ 10 mM、8.8 mM ~ 9.5 mM、8.8 mM ~ 9 mM、8.8 mM ~ 8.9 mM、8.8 mM ~ 10 mM、8.8 mM ~ 9.5 mM、8.8 mM ~ 9 mM、または8.8 mM ~ 8.9 mMで存在する。いくつかの態様において、トリスHClは、本明細書で提供される組成物のいずれか1つに、7.5 mM、7.6 mM、7.7 mM、7.8 mM、7.9 mM、8 mM、8.1 mM、8.2 mM、8.3 mM、8.4 mM、8.5 mM、8.6 mM、8.7 mM、8.8 mM、8.9 mM、9 mM、9.1 mM、9.2 mM、9.3 mM、9.4 mM、9.5 mM、9.6 mM、9.7 mM、9.8 mM、9.9 mM、10 mM、またはそれ以上の濃度で存在する。

【0031】

いくつかの態様において、スクロースは、本明細書で提供される組成物のいずれか1つに、8.5 wt% ~ 10.5 wt%、8.5 wt% ~ 10 wt%、8.5 wt% ~ 9.5 wt%、8.5 wt% ~ 9 wt%、9 wt% ~ 10.5 wt%、9 ~ 10 wt%、9 wt% ~ 9.9 wt%、9 wt% ~ 9.8 wt%、9 wt% ~ 9.7 wt%、9 wt% ~ 9.6 wt%、9 wt% ~ 9.5 wt%、9 wt% ~ 9.4 wt%、9 wt% ~ 9.3 wt%、9 wt% ~ 9.2 wt%、9 wt% ~ 9.1 wt%、9.2 wt% ~ 10.5 wt%、9.2 wt% ~ 10 wt%、9.2 wt% ~ 9.9 wt%、9.2 wt% ~ 9.8 wt%、9.2 wt% ~ 9.7 wt%、9.2 wt% ~ 9.6 wt%、9.2 wt% ~ 9.5 wt%

、 9 . 2 w t % ~ 9 . 4 w t %、 9 . 2 w t % ~ 9 . 3 w t %、 9 . 4 w t % ~ 1 0 . 5 w t %、 9 . 4 ~ 1 0 w t %、 9 . 4 w t % ~ 9 . 9 w t %、 9 . 4 w t % ~ 9 . 8 w t %、 9 . 4 w t % ~ 9 . 7 w t %、 9 . 4 w t % ~ 9 . 6 w t %、 9 . 4 w t % ~ 9 . 5 w t %、 9 . 6 w t % ~ 1 0 . 5 w t %、 9 . 6 % ~ 1 0 w t %、 9 . 6 w t % ~ 9 . 9 w t %、 9 . 6 w t % ~ 9 . 8 w t %、 9 . 6 w t % ~ 9 . 7 w t %、 9 . 8 w t % ~ 1 0 . 5 w t %、 9 . 8 ~ 1 0 w t %、 9 . 8 w t % ~ 9 . 9 w t %、 または 1 0 w t % ~ 1 0 . 5 w t % で存在する。いくつかの態様において、スクロースは、本明細書で提供される組成物のいずれか1つに、 8 . 5 w t %、 8 . 6 w t %、 8 . 7 w t %、 8 . 8 w t %、 8 . 9 w t %、 9 w t %、 9 . 1 w t %、 9 . 2 w t %、 9 . 3 w t %、 9 . 4 w t %、 9 . 5 w t %、 9 . 6 w t %、 9 . 7 w t %、 9 . 8 w t %、 9 . 9 w t %、 1 0 w t %、 1 0 . 1 w t %、 1 0 . 2 w t %、 1 0 . 3 w t %、 1 0 . 4 w t %、 1 0 . 5 w t % またはそれ以上で存在する。

10

【 0 0 3 2 】

いくつかの態様において、本明細書に記載の組成物は、 1 0 ~ 2 0 w t % の合成ナノキャリア、疎水性担体材料、および免疫抑制剤； 8 0 ~ 9 0 w t % のスクロース、 0 . 1 ~ 5 w t % のトロメタミン；および 0 . 1 ~ 5 w t % のトリス H C L を含む。いくつかの態様において、合成ナノキャリア、疎水性担体材料、および免疫抑制剤は、本明細書で提供される組成物のいずれか1つに、 5 ~ 1 0 w t %、 5 ~ 1 5 w t %、 5 ~ 2 0 w t %、 5 ~ 2 5 w t %、 1 0 ~ 1 5 w t %、 1 0 ~ 2 0 w t %、 1 0 ~ 2 5 w t %、 1 5 ~ 2 0 w t %、 1 5 ~ 2 5 w t %、 または 2 0 ~ 2 5 w t % で存在する。いくつかの態様において、組成物は、 5 w t %、 6 w t %、 7 w t %、 8 w t %、 9 w t %、 1 0 w t %、 1 1 w t %、 1 2 w t %、 1 3 w t %、 1 4 w t %、 1 5 w t %、 1 6 w t %、 1 7 w t %、 1 8 w t %、 1 9 w t %、 2 0 w t %、 2 1 w t %、 2 2 w t %、 2 3 w t %、 2 4 w t %、 または 2 5 w t % の合成ナノキャリア、疎水性担体材料、および免疫抑制剤を含んでもよい。いくつかの態様において、スクロースは、本明細書で提供される組成物のいずれか1つに、 7 5 ~ 9 5 w t %、例えば、 7 5 ~ 8 0 w t %、 7 5 ~ 8 5 w t %、 7 5 ~ 9 0 w t %、 8 0 ~ 8 5 w t %、 8 0 ~ 9 0 w t %、 8 0 ~ 9 5 w t %、 8 5 ~ 9 0 w t %、 8 5 ~ 9 5 w t %、 または 9 0 ~ 9 5 w t % で存在する。いくつかの態様において、組成物は、 7 5 w t %、 7 6 w t %、 7 7 w t %、 7 8 w t %、 7 9 w t %、 8 0 w t %、 8 1 w t %、 8 2 w t %、 8 3 w t %、 8 4 w t %、 8 5 w t %、 8 6 w t %、 8 7 w t %、 8 8 w t %、 8 9 w t %、 9 0 w t %、 9 1 w t %、 9 2 w t %、 9 3 w t %、 9 4 w t %、 または 9 5 w t % のスクロースを含んでもよい。いくつかの態様において、トロメタミンは、本明細書で提供される組成物のいずれか1つに、 0 . 1 ~ 5 w t %、例えば、 0 . 1 ~ 0 . 2 w t %、 0 . 1 ~ 0 . 3 w t %、 0 . 1 ~ 0 . 4 w t %、 0 . 1 ~ 0 . 5 w t %、 0 . 1 ~ 0 . 6 w t %、 0 . 1 ~ 0 . 7 w t %、 0 . 1 ~ 0 . 8 w t %、 0 . 1 ~ 0 . 9 w t %、 0 . 1 ~ 1 w t %、 0 . 1 ~ 1 . 5 w t %、 0 . 1 ~ 2 w t %、 0 . 1 ~ 2 . 5 w t %、 0 . 1 ~ 3 w t %、 0 . 1 ~ 3 . 5 w t %、 0 . 1 ~ 4 w t %、 0 . 1 ~ 4 . 5 w t %、 0 . 2 ~ 0 . 3 w t %、 0 . 2 ~ 0 . 4 w t %、 0 . 2 ~ 0 . 5 w t %、 0 . 2 ~ 0 . 6 w t %、 0 . 2 ~ 0 . 7 w t %、 0 . 2 ~ 0 . 8 w t %、 0 . 2 ~ 0 . 9 w t %、 0 . 3 ~ 0 . 4 w t %、 0 . 3 ~ 0 . 5 w t %、 0 . 3 ~ 0 . 6 w t %、 0 . 3 ~ 0 . 7 w t %、 0 . 3 ~ 0 . 8 w t %、 0 . 3 ~ 0 . 9 w t %、 0 . 4 ~ 0 . 5 w t %、 0 . 4 ~ 0 . 6 w t %、 0 . 4 ~ 0 . 7 w t %、 0 . 4 ~ 0 . 8 w t %、 0 . 4 ~ 0 . 9 w t %、 0 . 5 ~ 0 . 6 w t %、 0 . 5 ~ 0 . 7 w t %、 0 . 5 ~ 0 . 8 w t %、 0 . 5 ~ 0 . 9 w t %、 0 . 6 ~ 0 . 7 w t %、 0 . 6 ~ 0 . 8 w t %、 0 . 6 ~ 0 . 9 w t %、 0 . 7 ~ 0 . 8 w t %、 0 . 7 ~ 0 . 9 w t %、 0 . 8 ~ 0 . 9 w t %、 0 . 5 ~ 1 . 5 w t %、 0 . 5 ~ 2 w t %、 0 . 5 ~ 2 . 5 w t %、 0 . 5 ~ 3 w t %、 0 . 5 ~ 4 w t %、 0 . 5 ~ 5 w t %、 1 ~ 2 w t %、 1 ~ 3 w t %、 1 ~ 4 w t %、 または 1 ~ 5 w t % で存在する。いくつかの態様において、組成物は、 0 . 1 w t %、 0 . 2 w t %、 0 . 3 w t %、 0 . 4 w t %、 0 . 5 w t %、 0 . 6 w t %、 0 . 7 w t %、 0 . 8 w t %、 0 . 9 w t %、 1 w t %、 1 . 2 w t %、 1 . 4 w t %、 1 . 5 w t %、 1 . 6 w t

20

30

40

50

%、1.8 wt%、2 wt%、2.5 wt%、3 wt%、3.5 wt%、4 wt%、4.5 wt%、または5 wt%のトリメタミンを含んでもよい。いくつかの態様において、トリスHCLは、本明細書で提供される組成物のいずれか1つに、0.1~5 wt%、例えば、0.1~0.2 wt%、0.1~0.3 wt%、0.1~0.4 wt%、0.1~0.5 wt%、0.1~0.6 wt%、0.1~0.7 wt%、0.1~0.8 wt%、0.1~0.9 wt%、0.1~1 wt%、0.1~1.5 wt%、0.1~2 wt%、0.1~2.5 wt%、0.1~3 wt%、0.1~3.5 wt%、0.1~4 wt%、0.1~4.5 wt%、0.2~0.3 wt%、0.2~0.4 wt%、0.2~0.5 wt%、0.2~0.6 wt%、0.2~0.7 wt%、0.2~0.8 wt%、0.2~0.9 wt%、0.3~0.4 wt%、0.3~0.5 wt%、0.3~0.6 wt%、0.3~0.7 wt%、0.3~0.8 wt%、0.3~0.9 wt%、0.4~0.5 wt%、0.4~0.6 wt%、0.4~0.7 wt%、0.4~0.8 wt%、0.4~0.9 wt%、0.5~0.6 wt%、0.5~0.7 wt%、0.5~0.8 wt%、0.5~0.9 wt%、0.6~0.7 wt%、0.6~0.8 wt%、0.6~0.9 wt%、0.7~0.8 wt%、0.7~0.9 wt%、0.8~0.9 wt%、0.5~1.5 wt%、0.5~2 wt%、0.5~2.5 wt%、0.5~3 wt%、0.5~4 wt%、0.5~5 wt%、1~2 wt%、1~3 wt%、1~4 wt%、または1~5 wt%で存在する。いくつかの態様において、組成物は、0.1 wt%、0.2 wt%、0.3 wt%、0.4 wt%、0.5 wt%、0.6 wt%、0.7 wt%、0.8 wt%、0.9 wt%、1 wt%、1.2 wt%、1.4 wt%、1.5 wt%、1.6 wt%、1.8 wt%、2 wt%、2.5 wt%、3 wt%、3.5 wt%、4 wt%、4.5 wt%、または5 wt%のトリスHCLを含んでもよい。

#### 【0033】

いくつかの態様において、凍結乾燥組成物は、少なくとも1日、2日、3日、4日、5日、6日、1週間、1.5週間、2週間、2.5週間、3週間、3.5週間、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月、12ヶ月、13ヶ月、14ヶ月、15ヶ月、16ヶ月、17ヶ月、18ヶ月、19ヶ月、20ヶ月、21ヶ月、22ヶ月、23ヶ月、24ヶ月、25ヶ月、26ヶ月、27ヶ月、28ヶ月、29ヶ月、30ヶ月、31ヶ月、32ヶ月、33ヶ月、34ヶ月、35ヶ月、36ヶ月、またはそれ以上、安定である（例えば、免疫抑制剤含有量、純度、in vitro放出、粒径、外観、およびpHを維持している）。いくつかの態様において、凍結乾燥組成物は、少なくとも1~2週間、2~4週間、1~2ヶ月、2~4ヶ月、3~6ヶ月、3~9ヶ月、3~12ヶ月、6~12ヶ月、6~18ヶ月、6~24ヶ月、6~30ヶ月、6~36ヶ月、1~2年、1~3年、または2~3年、安定である。

いくつかの態様において、凍結乾燥組成物は、 $-20 \pm 5$ （例えば、 $-25$ 、 $-24$ 、 $-23$ 、 $-22$ 、 $-21$ 、 $-20$ 、 $-19$ 、 $-18$ 、 $-17$ 、 $-16$ 、または $-15$ ）で保管される。いくつかの態様において、凍結乾燥組成物は、 $5 \pm 3$ （例： $2$ 、 $3$ 、 $4$ 、 $5$ 、 $6$ 、 $7$ 、または $8$ ）、または $25 \pm 5$ （例： $20$ 、 $21$ 、 $22$ 、 $23$ 、 $24$ 、 $25$ 、 $26$ 、 $27$ 、 $28$ 、 $29$ 、または $30$ ）で保管される。

#### 【0034】

「合成ナノキャリアの最大寸法」とは、合成ナノキャリアの任意の軸に沿って測定したナノキャリアの最大寸法を意味する。「合成ナノキャリアの最小寸法」とは、合成ナノキャリアの任意の軸に沿って測定した合成ナノキャリアの最小寸法を意味する。例えば、球状の合成ナノキャリアの場合、合成ナノキャリアの最大および最小寸法は実質的に同一であり、その直径のサイズである。同様に、立方体の合成ナノキャリアの場合、合成ナノキャリアの最小寸法はその高さ、幅、または長さの最小値であり、一方合成ナノキャリアの最大寸法は、その高さ、幅、または長さの最大値である。一態様において、試料中の合成ナノキャリアの総数に基づき、試料中の合成ナノキャリアの少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%の最小寸法は、100 nm以上で



ある。一態様において、試料中の合成ナノキャリアの総数に基づき、試料中の合成ナノキャリアの少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%の最大寸法は、5 $\mu$ m未満である。好ましくは、試料中の合成ナノキャリアの総数に基づき、試料中の合成ナノキャリアの少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%の最小寸法は、110nmより大きく、より好ましくは120nmより大きく、より好ましくは130nmより大きく、さらにより好ましくは150nmより大きい。合成ナノキャリアの最大寸法と最小寸法のアスペクト比は、態様によって異なり得る。例えば、合成ナノキャリアの最大寸法と最小寸法のアスペクト比は、1:1~1,000,000:1まで、好ましくは1:1~100,000:1、より好ましくは1:1~10,000:1、より好ましくは1:1~1000:1、さらにより好ましくは1:1~10:1である。

#### 【0035】

好ましくは、試料中の合成ナノキャリアの総数に基づき、試料中の合成ナノキャリアの少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%の最大寸法は3 $\mu$ m以下であり、より好ましくは2 $\mu$ m以下、より好ましくは1 $\mu$ m以下、より好ましくは800nm以下、より好ましくは600nm以下、およびさらに好ましくは500nm以下である。好ましい態様において、試料中の合成ナノキャリアの総数に基づき、試料中の合成ナノキャリアの少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%の最小寸法は100nm以上、より好ましくは120nm以上、より好ましくは130nm以上、より好ましくは140nm以上、およびさらにより好ましくは150nm以上である。合成ナノキャリアの寸法（例えば、有効直径）の測定は、いくつかの態様において、合成ナノキャリアを液体（通常は水性）媒体に懸濁し、動的光散乱（DLS）を使用することによって（例えば、Brookhaven ZetaPALS装置を使用して）得ることができる。例えば、合成ナノキャリアの懸濁液を水性緩衝液から精製水に希釈して、約0.01~0.5mg/mLの最終合成ナノキャリア懸濁液濃度を達成することができる。希釈した懸濁液は、DLS分析に適したキュベット内で直接調製するか、これに移すことができる。次にキュベットをDLSに入れ、制御された温度に平衡させ、媒体の粘度と試料の屈折率の適切な入力に基づき安定した再現可能な分布を取得するのに十分な時間、スキャンする。次に、有効直径、または分布の平均が報告される。高アスペクト比または非球状の合成ナノキャリアの有効サイズを決定するには、より正確な測定値を得るために、電子顕微鏡などの拡張（augmentative）技術が必要となる場合がある。合成ナノキャリアの「寸法」または「サイズ」または「直径」とは、例えば、動的光散乱を使用して得られる粒度分布の平均を意味する。

#### 【0036】

「HLB値が10以下の非イオン性界面活性剤」または「低HLB界面活性剤」とは、本明細書で使用される場合、少なくとも1つの疎水性尾部および1つの親水性頭部を含む構造を有するか、または疎水基もしくは領域と親水基もしくは領域を有する、非イオン性両親媒性分子を指す。界面活性剤の尾部は、一般に炭化水素鎖からなる。界面活性剤は、親水性頭部または親水基もしくは領域の電荷特性に基づいて、分類することができる。本明細書で使用される場合、「HLB」は、界面活性剤の親水性-親油性（hydrophilic-lipophilic）バランスまたは親水性-親油性（hydrophile-lipophile）バランスを指し、界面活性剤の親水性または親油性の性質の尺度である。

#### 【0037】

本明細書で提供される界面活性剤のいずれか1つのHLBは、グリフィン法またはデイビス法を使用して計算され得る。例えば、グリフィン法を使用すると、界面活性剤のHLBは、界面活性剤の親水性部分の分子量を20倍し、界面活性剤全体の分子量で割った値である。HLB値は0~20のスケールで表され、0は完全に疎水性（親油性）分子に対応し、20は完全に親水性（疎油性）分子に対応する。いくつかの態様において、本明細書で提供される組成物または方法のいずれか1つの界面活性剤のHLBは、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10である（例えば、グリフィン法またはデイビス

法により決定した場合)。本明細書で提供される組成物および方法のいずれか1つで使用するのためのかかる界面活性剤の例には、限定はされないが以下が含まれる；ソルビタンエステル、例えばSPAN 40、SPAN 20；脂肪アルコール、例えばオレイルアルコール、ステアリルアルコール；脂肪酸エステル、例えばイソプロピルパルミタート、グリセロールモノステアラート；エトキシ化脂肪アルコール、例えばBRIJ 52、BRIJ 93；ポロキサマー、例えばPluronic P-123、Pluronic L-31；脂肪酸、例えばパルミチン酸、ドデカン酸；トリグリセリド、例えばグリセリルトリパルミタート、グリセリルトリノレアート；コレステロール；コレステロール誘導体、例えばコレステリル硫酸ナトリウム、ドデカン酸コレステリル；および胆汁塩または酸、例えばリトコール酸、リトコール酸ナトリウム。かかる界面活性剤のさらなる例としては、ソルビタンモノステアラート（SPAN 60）、ソルビタントリステアラート（SPAN 65）、ソルビタンモノオレアート（SPAN 80）、ソルビタンセスキオレアート（SPAN 83）、ソルビタントリオレアート（SPAN 85）、ソルビタンセスキオレアート（Arlacel 83）、ソルビタンジパルミタート、脂肪酸のモノおよびジグリセリド、ポリオキシエチレンソルビタントリオレアート（Tween 85）、ポリオキシエチレンソルビタンヘキサオレアート（G 1086）、ソルビタンモノイソステアラート（Montane 70）、ポリオキシエチレンアルコール、ポリオキシエチレングリコールアルキルエーテル、ポリオキシエチレン（2）オレイルエーテル（BRIJ 93）、ポリオキシエチレンセチルエーテル（BRIJ 52）、ポリエチレングリコールドデシルエーテル（BRIJ L4）；1-モノテトラデカノイル-*rac*-グリセロール；グリセリルモノステアラート；グリセロールモノパルミタート；エチレンジアミンテトラキステテロール（Tetronic 90R4、Tetronic 701）、ポリオキシエチレン（5）ノニルフェニルエーテル（IGEPAL CA-520）、MERPOL A界面活性剤、MERPOL SE界面活性剤、およびポリ（エチレングリコール）ソルビトールヘキサオレアートが挙げられる。さらなる例もまた、当業者には明らかであろう。

10

20

30

40

50

#### 【0038】

「薬学的に許容し得る賦形剤」または「薬学的に許容し得る担体」とは、組成物を製剤化するために薬理的に活性な物質と共に使用する、薬理的に不活性な物質を意味する。薬学的に許容し得る賦形剤は、糖類（グルコース、ラクトースなど）、抗菌剤などの保存剤、再構成補助剤、着色剤、生理食塩水（リン酸緩衝生理食塩水など）、および緩衝液を含むがこれらに限定されない、当技術分野で知られている様々な材料を含む。

「提供する」とは、本発明の実施のために必要なアイテムまたはアイテムのセットまたは方法を供給する、個人が実行するアクションまたはアクションのセットを意味する。アクションまたはアクションのセットは、直接または間接的に実行し得る。

#### 【0039】

「ラパログ」とは、ラパマイシンおよび、ラパマイシン（シロリムス）（の類似体）に構造的に関連する分子を指し、好ましくは疎水性である。ラパログの例としては、限定することなく、テムシロリムス（CCI-779）、デフォロリムス、エベロリムス（RAD001）、リダフォロリムス（AP-23573）、ゾタロリムス（ABT-578）が挙げられる。ラパログの追加の例は、例えば、WO公開WO1998/002441および米国特許第8,455,510号に見出すことができ、かかるラパログの開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

「対象」とは動物を意味し、これには以下が含まれる：人間および霊長類などの温血哺乳類；鳥類；家庭用動物または家畜、例えばネコ、イヌ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ウマ、およびブタなど；実験動物、例えばマウス、ラット、およびモルモットなど；魚；爬虫類；動物園の動物および野生動物；など。

#### 【0040】

「過飽和」とは、平衡条件下でその中に溶解可能なよりも多くの溶質（免疫抑制剤など）を含有する組成物（合成ナノキャリア組成物など）を指す。換言すれば、過飽和濃度を有する組成物は、飽和濃度を超える濃度を有する。いくつかの態様において、免疫抑制剤は、疎水性ポリエステル担体材料などの疎水性担体材料の飽和限界を超えることができる

(例えば、単独で、または製剤化プロセスの水相中の溶媒との組み合わせで)。組成物中の免疫抑制剤の量は、当技術分野で知られている任意の方法によって過飽和であると決定され得、これは例えば、組成物中の分子の濃度を決定し、その濃度を予測飽和濃度と比較することによる。

#### 【0041】

免疫抑制剤が過飽和量であるかどうかを判断する他の方法には、フィルムキャストイング、X線散乱、および電子顕微鏡法が含まれる。電子顕微鏡法の形態には、走査型電子顕微鏡法(SEM)、透過型電子顕微鏡法(TEM)、および極低温透過型電子顕微鏡法(cryo-TEM)が含まれるが、これらに限定されない。過飽和量の免疫抑制剤は、好ましくは「安定」である。いくつかの態様において、過飽和量の免疫抑制剤は、合成ナノキャリアが懸濁液中にかかる量を保持する場合、合成ナノキャリア中で安定である。好ましくは、安定した過飽和量の免疫抑制剤を有する合成ナノキャリアは、初期滅菌濾過可能であり、初期滅菌濾過性は、合成ナノキャリア中の過飽和量の免疫抑制剤の安定性の試験として役立つ。

「界面活性剤」とは、2つの液体の間または液体と固体の間の表面張力を低下可能な化合物を指す。界面活性剤は、洗浄剤、湿潤剤、乳化剤、発泡剤、および分散剤として作用することができ、本明細書で提供される合成ナノキャリアの形成に使用することができる。いくつかの態様において、界面活性剤は、HLB値が10以下の非イオン性界面活性剤である。

#### 【0042】

「合成ナノキャリア」とは、自然界には見られず、サイズが5ミクロン以下の少なくとも1つの寸法を有する、個別の物体を意味する。本明細書で提供される合成ナノキャリアは、疎水性ポリエステル担体材料などの疎水性担体材料を含む。合成ナノキャリアは、疎水性ポリエステルナノ粒子を含む合成ナノキャリアであり得るが、これに限定されない。合成ナノキャリアは様々な異なる形状であり得、これには限定なく、回転楕円体、立方体、錐体、楕円形、円筒形、トロイダルなどが含まれる。本発明による合成ナノキャリアは、1つ以上の表面を含む。態様において、合成ナノキャリアは、アスペクト比として1:1、1:1.2、1:1.5、1:2、1:3、1:5、1:7以上、または1:10を超える値を有し得る。

#### 【0043】

約100nm以下、好ましくは100nm以下の最小寸法を有する本発明による合成ナノキャリアは、補体を活性化するヒドロキシル基を有する表面を含まないか、または代替的に、補体を活性化するヒドロキシル基ではない部分から本質的になる表面を含む。好ましい態様において、約100nm以下、好ましくは100nm以下の最小寸法を有する本発明による合成ナノキャリアは、補体を実質的に活性化する表面を含まないか、または代替的に、補体を実質的に活性化しない部分から本質的になる表面を含む。より好ましい態様において、約100nm以下、好ましくは100nm以下の最小寸法を有する本発明による合成ナノキャリアは、補体を活性化する表面を含まないか、または代替的に、補体を活性化しない部分から本質的になる表面を含む。

#### 【0044】

「総固形分」とは、合成ナノキャリアの組成物または懸濁液に含有されるすべての成分の総重量を指す。本明細書で提供される組成物または方法のいずれか1つのいくつかの態様において、総固形分の量は、懸濁液1mL当たりの全乾燥ナノキャリア質量として決定される。これは、重量法によって決定可能である。

「重量%」は、1つの重量の別の重量に対する比率に100を掛けたものを指す。例えば重量%は、1つの成分の別のものに対する重量の比率に100を掛けたもの、または1つの成分の重量の、2つ以上の成分の総重量に対する比率であり得る。一般に重量%は、合成ナノキャリアの集団全体の平均、または組成物もしくは懸濁液中の合成ナノキャリア全体の平均として測定される。

#### 【0045】

### C. 組成物および関連する方法

本明細書で提供されるのは、凍結乾燥、保管などの特性が改善された合成ナノキャリアの組成物である。本明細書で提供されるのは、合成ナノキャリア組成物の凍結乾燥形態、その再構成組成物、および凍結乾燥される合成ナノキャリア組成物である。本明細書で提供される組成物のいずれか1つの一態様において、合成ナノキャリアの組成物は、中性または中性に近いpH（例えば、2.5などでpH 7.3）を有する。本明細書で提供される組成物のいずれか1つの一態様において、合成ナノキャリアの組成物は、凍結乾燥粉末形態などの凍結乾燥形態である。本明細書で提供される組成物のいずれか1つの一態様において、合成ナノキャリアの組成物は、凍結乾燥粉末形態などへと、凍結乾燥されるものである。本明細書で提供される組成物のいずれか1つの一態様において、合成ナノキャリアの組成物は、凍結乾燥形態の再構成組成物である。本明細書で提供される組成物のいずれか1つの一態様において、合成ナノキャリアの組成物は、ガラス製バイアルに保管される。本明細書で提供される組成物のいずれか1つの一態様において、ガラス製バイアルは20 mLのガラス製バイアルであり、任意に20 mmストッパーを含む。本明細書で提供される組成物のいずれか1つの一態様において、合成ナノキャリアの組成物は、2～8で保管される。

#### 【0046】

本明細書で提供される組成物は、例えば寛容原性免疫応答を促進するために、それを必要とする対象に投与することができる。

好ましくは、本明細書で提供される組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、合成ナノキャリア組成物中の疎水性ポリエステル担体材料などの疎水性担体材料の量は、5～95重量%疎水性担体材料/総固形分である。本明細書で提供される組成物のいずれか1つの他の態様において、合成ナノキャリア中の疎水性ポリエステル担体材料などの疎水性担体材料の量は、10～95、15～90、20～90、25～90、30～80、30～70、30～60、30～50などの重量%の疎水性担体材料/総固形分である。本明細書で提供される組成物のいずれか1つのさらに他の態様において、合成ナノキャリア中の疎水性ポリエステル担体材料などの疎水性担体材料の量は、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90または95重量%の疎水性担体材料/総固形分である。

#### 【0047】

本明細書で提供される組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、ラパマイシン等のラパログを安定した過飽和量で含む合成ナノキャリアは、ラパマイシン等のラパログを6重量%以上かつ50重量%以下/疎水性ポリエステル担体材料等の疎水性担体材料で含む。本明細書で提供される組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、合成ナノキャリアは、6以上かつ45以下、6以上かつ40以下、6以上かつ35以下、6以上かつ30以下、6以上かつ25以下、6以上かつ20以下、6以上かつ15以下の重量%のラパマイシン等のラパログ/疎水性ポリエステル担体材料等の疎水性担体材料を含む。本明細書で提供される組成物のいずれか1つの他の態様において、合成ナノキャリアは、7以上かつ45以下、7以上かつ40以下、7以上かつ35以下、7以上かつ30以下、7以上かつ25以下、7以上かつ20以下、7以上かつ15以下の重量%のラパマイシン等のラパログ/疎水性ポリエステル担体材料等の疎水性担体材料を含む。本明細書で提供される組成物のいずれか1つのさらに他の態様において、合成ナノキャリアは、8重量%以上かつ24重量%以下のラパマイシン等のラパログ/疎水性ポリエステル担体材料等の疎水性担体材料を含む。本明細書で提供される組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、合成ナノキャリアは、6、7、8、9、10、12、15、17、20、22、25、27、30、35、45またはそれ以上の重量%のラパマイシン等のラパログ/疎水性ポリエステル担体材料等の疎水性担体材料を含む。

#### 【0048】

本明細書で提供される組成物または方法のいずれか1つのいくつかの態様において、合成ナノキャリア中のHLB値が10以下の非イオン性界面活性剤の量は、0.01以上か

つ 20 重量% 以下の H L B 値 10 以下の非イオン性界面活性剤 / 疎水性ポリエステル担体材料等の疎水性担体材料である。本明細書で提供される組成物または方法のいずれか 1 つのいくつかの態様において、合成ナノキャリア中の H L B 値が 10 以下の非イオン性界面活性剤の量は、0.1 以上かつ 1.5 以下、0.5 以上かつ 1.3 以下、1 以上かつ 0.9 以下、または 10 重量% の、H L B 値 10 以下の非イオン性界面活性剤 / 疎水性ポリエステル担体材料等の疎水性担体材料である。本明細書で提供される組成物または方法のいずれか 1 つの他の態様において、合成ナノキャリア中の H L B 値が 10 以下の非イオン性界面活性剤の量は、0.01 以上かつ 1.7 以下、0.01 以上かつ 1.5 以下、0.01 以上かつ 1.3 以下、0.01 以上かつ 1.2 以下、0.01 以上かつ 1.1 以下、0.01 以上かつ 1.0 以上、0.01 以上かつ 0.9 以下、0.01 以上かつ 0.8 以下、0.01 以上かつ 0.7 以下、0.01 以上かつ 0.6 以下、0.01 以上かつ 0.5 以下などの重量% の、H L B 値 10 以下の非イオン性界面活性剤 / 疎水性ポリエステル担体材料等の疎水性担体材料である。本明細書で提供される組成物または方法のいずれか 1 つのさらに他の態様において、合成ナノキャリア中の H L B 値が 10 以下の非イオン性界面活性剤の量は、0.1 以上かつ 1.5 以下、0.1 以上かつ 1.4 以下、0.1 以上かつ 1.3 以下、0.1 以上かつ 1.2 以下、0.1 以上かつ 1.1 以下、0.1 以上かつ 1.0 以下、0.1 以上かつ 0.9 以下、0.1 以上かつ 0.8 以下、0.1 以上かつ 0.7 以下、0.1 以上かつ 0.6 以下、0.1 以上かつ 0.5 以下などの重量% の、H L B 値 10 以下の非イオン性界面活性剤 / 疎水性ポリエステル担体材料等の疎水性担体材料である。本明細書で提供される組成物または方法のいずれか 1 つのさらに他の態様において、合成ナノキャリア中の H L B 値が 10 以下の非イオン性界面活性剤の量は、0.5 以上かつ 1.5 以下、0.5 以上かつ 1.4 以下、0.5 以上かつ 1.3 以下、0.5 以上かつ 1.2 以下、0.5 以上かつ 1.1 以下、0.5 以上かつ 1.0 以下、0.5 以上かつ 0.9 以下、0.5 以上かつ 0.8 以下、0.5 以上かつ 0.7 以下、0.5 以上かつ 0.6 以下、0.5 以上かつ 0.5 以下などの重量% の、H L B 値 10 以下の非イオン性界面活性剤 / 疎水性ポリエステル担体材料等の疎水性担体材料である。本明細書で提供される組成物または方法のいずれか 1 つのさらに他の態様において、合成ナノキャリア中の H L B 値が 10 以下の非イオン性界面活性剤の量は、1 以上かつ 0.9 以下、1 以上かつ 0.8 以下、1 以上かつ 0.7 以下、1 以上かつ 0.6 以下、1 以上かつ 0.5 以下などの重量% の、H L B 値 10 以下の非イオン性界面活性剤 / 疎水性ポリエステル担体材料等の疎水性担体材料である。本明細書で提供される組成物または方法のいずれか 1 つのさらに他の態様において、合成ナノキャリア中の H L B 値が 10 以下の非イオン性界面活性剤の量は、5 以上かつ 1.5 以下、5 以上かつ 1.4 以下、5 以上かつ 1.3 以下、5 以上かつ 1.2 以下、5 以上かつ 1.1 以下、5 以上かつ 1.0 以下、5 以上かつ 0.9 以下、5 以上かつ 0.8 以下、5 以上かつ 0.7 以下、5 以上かつ 0.6 以下などの重量% の、H L B 値 10 以下の非イオン性界面活性剤 / 疎水性ポリエステル担体材料等の疎水性担体材料である。本明細書で提供される組成物または方法のいずれか 1 つのいくつかの態様において、合成ナノキャリア中の H L B 値が 10 以下の非イオン性界面活性剤の量は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 または 20 重量% の、H L B 値 10 以下の非イオン性界面活性剤 / 疎水性ポリエステル担体材料等の疎水性担体材料である。本明細書で提供される H L B 値のいずれも、グリフィン法またはデビス法を使用して決定することができる。

#### 【0049】

本明細書で提供される組成物のいずれか 1 つについて本明細書で列挙される成分または材料の量は、当業者に知られている方法または本明細書で提供される方法を使用して決定することができる。例えば、H L B 値が 10 以下の非イオン性界面活性剤の量は、抽出とそれに続く H P L C 法による定量によって測定することができる。疎水性ポリエステル担体材料などの疎水性担体材料の量は、H P L C を使用して決定することができる。かかる量の決定は、いくつかの態様において、プロトン N M R、または M A L D I - M S などの他の直交法を使用して、疎水性担体材料の同一性を決定することができる。同様の方法を使用して、本明細書で提供される組成物のいずれか 1 つにおける免疫抑制剤（例えば、ラパマイシン等のラパログ）の量を決定することができる。いくつかの態様において、免疫

抑制剤（例えば、ラバマイシン等のラパログ）の量は、HPLCを使用して決定される。本明細書で提供される組成物または方法のいずれか1つについて、成分または材料の量は、ナノキャリア製剤のレシビ重量に基づいて決定することもできる。したがって、本明細書で提供される組成物または方法のいずれか1つのいくつかの態様において、本明細書で提供される成分のいずれか1つの量は、合成ナノキャリアの製剤化の間の水相中の成分の量である。本明細書で提供される組成物または方法のいずれか1つのいくつかの態様において、成分のいずれか1つの量は、生成され製剤化プロセスの結果である合成ナノキャリア組成物中の、成分の量である。

#### 【0050】

本明細書で提供される合成ナノキャリアは、疎水性ポリマーまたは脂質などの疎水性担体材料を含む。したがって、いくつかの態様において、本明細書で提供される合成ナノキャリアは、1つ以上の脂質を含む。いくつかの態様において、合成ナノキャリアは脂質二重層を含み得る。いくつかの態様において、合成ナノキャリアは脂質単層を含み得る。いくつかの態様において、合成ナノキャリアは、脂質層（例えば、脂質二重層、脂質単層など）によって囲まれたポリマーマトリックスを含むコアを含み得る。さらなる疎水性担体材料には、脂質（合成および天然）、脂質-ポリマー複合体、脂質-タンパク質複合体、および架橋可能な油、ワックス、脂肪などが含まれる。本明細書で提供される疎水性担体材料として使用するための脂質材料のさらなる例は、例えば、PCT公開番号WO2000/006120およびWO2013/056132に見出すことができ、かかる資料の開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

#### 【0051】

したがって、いくつかの態様において、本明細書で提供される合成ナノキャリアはリポソームであり得る。リポソームは、以下に報告されたものなどの標準的な方法によって生成することができる：Kim et al. (1983, Biochim. Biophys. Acta 728, 339-348); Liu et al. (1992, Biochim. Biophys. Acta 1104, 95-101); Lee et al. (1992, Biochim. Biophys. Acta. 1103, 185-197)、Brey et al. (米国特許出願公開20020041861); Hass et al. (米国特許出願公開20050232984)、Kisak et al. (米国特許出願公開20050260260)およびSmyth-Templeton et al. (米国特許出願公開20060204566); かかるリポソームおよびそれらの生成方法の開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

30

本明細書で提供される疎水性担体材料は、1つ以上の疎水性ポリマーまたはその単位を含む。しかし、いくつかの態様において、疎水性担体材料は全体的に疎水性ではあるが、疎水性担体材料はまた、疎水性ではないポリマーまたはその単位も含んでよい。

#### 【0052】

本明細書で提供される疎水性担体材料は、乳酸およびグリコール酸単位を含むコポリマーを含むことができる、ポリエステルを含んでよく、その例としては以下である：ポリ(乳酸-co-グリコール酸)およびポリ(ラクチド-co-グリコリド)、本明細書ではまとめて「PLGA」と呼ぶ; およびグリコール酸単位を含むホモポリマー、本明細書では「PGA」と呼ぶ; および乳酸単位、例えばポリ-L-乳酸、ポリ-D-乳酸、ポリ-D, L-乳酸、ポリ-L-ラクチド、ポリ-D-ラクチド、およびポリ-D, L-ラクチドなど、本明細書ではまとめて「PLA」と呼ぶ。いくつかの態様において、例示的なポリエステルとしては、例えば、ポリ(カプロラクトン)、ポリ(カプロラクトン)-PEGコポリマー、ポリ(L-ラクチド-co-L-リジン)、ポリ(セリンエステル)、ポリ(4-ヒドロキシ-L-プロリンエステル)、ポリ[ - (4-アミノブチル)-L-グリコール酸]、およびその誘導体が含まれる。

40

#### 【0053】

いくつかの態様において、ポリエステルはPLGAであってもよい。PLGAは、乳酸

50

とグリコール酸の生体適合性および生分解性のコポリマーであり、PLGAのさまざまな形態は乳酸：グリコール酸の比率によって特徴付けられる。乳酸は、L-乳酸、D-乳酸、またはD, L-乳酸であり得る。PLGAの分解速度は、乳酸：グリコール酸の比率を変えることで調整可能である。いくつかの態様において、本発明に従って使用されるPLGAは、乳酸：グリコール酸の比率として約85：15、約75：25、約60：40、約50：50、約40：60、約25：75、または約15：85によって特徴付けられる。

本明細書で提供される疎水性ポリエステル担体材料は、疎水性ポリエステル担体材料全体が疎水性でありかつ1つ以上のポリエステルまたはその単位を含有するとの条件下で、1つ以上の非ポリエステル疎水性ポリマーもしくはその単位および/または疎水性ではないポリマーもしくはその単位を、含んでもよい。

10

#### 【0054】

本明細書で提供される疎水性担体材料は、非メトキシ末端、プルロニックポリマー、またはその単位である、1つ以上のポリマーを含み得る。「非メトキシ末端ポリマー」とは、メトキシ以外の部分で終わる少なくとも1つの末端を有するポリマーを意味する。いくつかの態様において、ポリマーは、メトキシ以外の部分で終わる少なくとも2つの末端を有する。他の態様において、ポリマーは、メトキシで終わる末端を有さない。「非メトキシ末端プルロニックポリマー」とは、両末端にメトキシを有する線状プルロニックポリマー以外のポリマーを意味する。

疎水性担体材料は、いくつかの態様において、ポリヒドロキシアリカノアート、ポリアミド、ポリエーテル、ポリオレフィン、ポリアクリレート、ポリカーボネート、ポリスチレン、シリコン、フルオロポリマー、またはそれらの単位を含み得る。本明細書で提供される疎水性担体材料に含まれ得るポリマーのさらなる例には、ポリカーボネート、ポリアミド、またはポリエーテル、またはそれらの単位が含まれる。他の態様において、疎水性担体材料のポリマーは、ポリ(エチレングリコール)(PEG)、ポリプロピレングリコール、またはそれらの単位を含み得る。

20

#### 【0055】

いくつかの態様において、疎水性担体材料が生分解性のポリマーを含むことが好ましい。したがってかかる態様において、疎水性担体材料のポリマーは、ポリ(エチレングリコール)またはポリプロピレングリコールまたはその単位などのポリエーテルを含み得る。さらにポリマーは、ポリマーが生分解性であるように、ポリエーテルと生分解性ポリマーとのブロックコポリマーを含んでもよい。他の態様において、ポリマーは、ポリエーテルまたはその単位のみを、例えばポリ(エチレングリコール)またはポリプロピレングリコールまたはその単位などのみを、含むわけではない。

30

#### 【0056】

本発明での使用に適したポリマーの他の例には、限定はされないが、以下が含まれる：ポリエチレン、ポリカーボネート(例：ポリ(1,3-ジオキサソラン-2オン))、ポリ無水物(例：ポリ(セバシン酸無水物))、フマル酸ポリプロピル、ポリアミド(例：ポリカプロラクタム)、ポリアセタール、ポリエーテル、ポリエステル(例：ポリラクチド、ポリグリコリド、ポリラクチド-co-グリコリド、ポリカプロラクトン、ポリヒドロキシ酸(例：ポリ(-ヒドロキシアリカノアート))、ポリ(オルトエステル)、ポリシアノアクリレート、ポリビニルアルコール、ポリウレタン、ポリホスファゼン、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリウレア、ポリスチレン、およびポリアミン、ポリリジン、ポリリジン-PEGコポリマー、およびポリ(エチレンイミン)、ポリ(エチレンイミン)-PEGコポリマー。

40

疎水性担体材料に含まれ得るポリマーのさらに他の例としては、アクリルポリマー、例えば、アクリル酸およびメタクリル酸コポリマー、メタクリル酸メチルコポリマー、メタクリル酸エトキシエチル、シアノエチルメタクリレート、アミノアルキルメタクリレートコポリマー、ポリ(アクリル酸)、ポリ(メタクリル酸)、メタクリル酸アルキルアミドコポリマー、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(メタクリル酸無水物)、メタクリル

50

酸メチル、ポリメタクリレート、ポリ(メタクリル酸メチル)コポリマー、ポリアクリルアミド、アミノアルキルメタクリレートコポリマー、グリシジルメタクリレートコポリマー、ポリシアノアクリレート、およびの前述のポリマーの1以上を含む組み合わせが挙げられる。

【0057】

いくつかの態様において、疎水性担体材料のポリマーは、会合してポリマーマトリックスを形成することができる。多種多様なポリマーおよびそれらからポリマーマトリックスを形成する方法が、従来から知られている。いくつかの態様において、疎水性ポリマーマトリックスを含む合成ナノキャリアは、合成ナノキャリア内に疎水性環境を生成する。

いくつかの態様において、ポリマーは、1つ以上の部分および/または官能基で修飾され得る。本発明に従って様々な部分または官能基を使用することができる。いくつかの態様において、ポリマーは、ポリエチレングリコール(PEG)、炭水化物、および/または多糖由来の非環式ポリアセタールで修飾され得る(Papisov, 2001, ACS Symposium Series, 786:301)。ある態様の実施は、Grefらへの米国特許第5543158号、またはVon AndrianらによるWO公開WO2009/051837の一般的な教示を使用して行うことができる。

【0058】

いくつかの態様において、ポリマーは、脂質または脂肪酸基で修飾され得る。いくつかの態様において、脂肪酸基は、酪酸、カプロン酸、カプリル酸、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキジン酸、ベヘン酸、またはリグノセリン酸のうちの一つ以上であり得る。いくつかの態様において、脂肪酸基は、パルミトレイン酸、オレイン酸、バクセン酸、リノール酸、 $\omega$ -リノール酸、 $\omega$ -リノール酸、アラキドン酸、ガドール酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、またはエルカ酸のうちの一つ以上であり得る。

いくつかの態様において、ポリマーが生分解性であることが好ましい。いくつかの態様において、本発明によるポリマーは、ヒトにおける使用について米国食品医薬品局(FDA)により21 C.F.R. § 177.2600の下で承認されている。

ポリマーは、天然または非天然(合成)ポリマーであり得る。ポリマーは、ホモポリマーであっても、2つ以上のモノマーを含むコポリマーであってもよい。配列に関して、コポリマーは、ランダムであるか、ブロックであるか、またはランダム配列とブロック配列の組み合わせを含むことができる。典型的には、本発明によるポリマーは有機ポリマーである。

【0059】

いくつかの態様において、ポリマーは直鎖または分岐ポリマーであることができる。いくつかの態様において、ポリマーはデンドリマーであり得る。いくつかの態様において、ポリマーは互いに実質的に架橋することができる。いくつかの態様において、ポリマーは実質的に架橋を含まなくてもよい。いくつかの態様において、ポリマーは、架橋工程を経ることなく、本発明に従って使用することができる。さらに、合成ナノキャリアは、ブロックコポリマー、グラフトコポリマー、ブレンド、混合物、および/または前述のポリマーおよび他のポリマーの付加物を含み得ることが理解されるべきである。当業者は、本明細書に挙げたポリマーが、所望の基準を満たす限り、本発明に従って使用できるポリマーの例示的であるが包括的ではないリストを表すことを認識するであろう。

【0060】

これらおよび他のポリマーの特性およびそれらを調製する方法は、当技術分野で周知である。(例えば以下を参照:米国特許6,123,727;5,804,178;5,770,417;5,736,372;5,716,404;6,095,148;5,837,752;5,902,599;5,696,175;5,514,378;5,512,600;5,399,665;5,019,379;5,010,167;4,806,621;4,638,045;および4,946,929;Wang et al., 2001, J. Am. Chem. Soc., 123:9480;Lim et al., 2001, J. Am. Chem. Soc., 123:2460;Langer, 2000, Acc. Chem. Res., 33:94;Langer, 1999, J. Control. Release, 62:7;およびUhrich

10

20

30

40

50



et al., 1999, Chem. Rev., 99:3181)。より一般的には、特定の適切なポリマーを合成するためのさまざまな方法が、以下に記載されている：Concise Encyclopedia of Polymer Science and Polymeric Amines and Ammonium Salts, Ed. by Goethals, Pergamon Press, 1980；Principles of Polymerization by Odian, John Wiley & Sons, Fourth Edition, 2004；Contemporary Polymer Chemistry by Allcock et al., Prentice-Hall, 1981；Deming et al., 1997, Nature, 390:386；および米国特許6,506,577、6,632,922、6,686,446、および6,818,732。

【0061】

本発明により、多種多様な合成ナノキャリアを使用することができる。いくつかの態様において、合成ナノキャリアは球体またはスフェロイドである。いくつかの態様において、合成ナノキャリアは、平らまたは板状である。いくつかの態様において、合成ナノキャリアは立方体または立方状(cubic)である。いくつかの態様において、合成ナノキャリアは卵形(oval)または楕円形である。いくつかの態様において、合成ナノキャリアは、円柱、円錐、または錐体である。

10

いくつかの態様において、サイズまたは形状に関して比較的均一な合成ナノキャリアの集団を使用して、各合成ナノキャリアが同様の特性を有するようにすることが望ましい。例えば、合成ナノキャリアの総数に基づき合成ナノキャリアの少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%が、合成ナノキャリアの平均直径または平均寸法の5%、10%、または20%以内の最小寸法または最大寸法を有することができる。

20

【0062】

本発明による組成物は、要素を、保存剤、緩衝液、生理食塩水、またはリン酸緩衝生理食塩水などの薬学的に許容し得る賦形剤と組み合わせることができる。組成物は、有用な剤形に到達するために、従来の医薬品製造および調合技術を使用して作製することができる。一態様において、合成ナノキャリアを含む組成物などの組成物は、注射用の滅菌生理食塩水に保存剤と共に懸濁される。

いくつかの態様において、本明細書で提供される合成ナノキャリアの任意の成分を、単離することができる。隔離するとは、要素がその本来の環境から分離され、その識別または使用を可能にするのに十分な量で存在することを指す。これは例えば、要素がクロマトグラフィーまたは電気泳動などによって精製され得ることを意味する。単離された要素は実質的に純粋であってよいが、必ずしもそうである必要はない。単離された要素は、薬学的調製物において薬学的に許容し得る賦形剤と混合され得るので、要素は、調製物のわずかな重量パーセンテージのみを構成し得る。それにもかかわらず、この要素は、生体系で関連している可能性のある物質から分離されている、すなわち、他の脂質またはタンパク質から単離されているという点で、単離されている。本明細書で提供される要素のいずれも、単離されて組成物に含められるか、または単離された形態で方法において使用され得る。

30

【0063】

D. 組成物を製造および使用する方法ならびに関連する方法

合成ナノキャリアは、当技術分野で知られている多種多様な方法を使用して調製することができる。例えば合成ナノキャリアは、以下の方法により形成することができる：ナノ沈殿、流体チャネルを使用したフローフォーカシング、噴霧乾燥、単一および二重エマルジョン溶媒蒸発、溶媒抽出、相分離、ミリング(凍結粉碎(cryomilling)を含む)、超臨界流体(超臨界二酸化炭素など)処理、マイクロエマルジョン手順、マイクロファブリケーション、ナノファブリケーション、犠牲層、単純および複雑なコアセルベーション、および当業者に周知の他の方法。代替的または追加的に、単分散半導体、導電性、磁性、有機、および他のナノ材料の、水性および有機溶媒合成が記載されている(Pellegrino et al., 2005, Small, 1:48；Murray et al., 2000, Ann. Rev. Mat. Sci., 30:545；およびTrindade et al., 2001, Chem. Mat., 13:3843)。追加の方法が文献に記載されている(例えば以下を参照：Doubrow, Ed., "Microcapsules and N

40

50

anoparticles in Medicine and Pharmacy,” CRC Press, Boca Raton, 1992 ; Mathiowitz et al., 1987, J. Control. Release, 5:13 ; Mathiowitz et al., 1987, Reactive Polymers, 6:275 ; および Mathiowitz et al., 1988, J. Appl. Polymer Sci., 35:755 ; 米国特許5578325および6007845 ; P. Paolicelli et al., “ Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles ” Nanomedicine. 5(6):843-853 (2010) ) 。

#### 【 0 0 6 4 】

様々な材料を、限定はされないが以下を含む様々な方法を用いて、所望のように合成ナノキャリアにカプセル化することができる : C. Astete et al., “ Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles ” J. Biomater. Sci. Polymer Edn, Vol. 17, No. 3, pp. 247-289 (2006) ; K. Avgoustakis “ Pegylated Poly(Lactide) and Poly(Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles: Preparation, Properties and Possible Applications in Drug Delivery ” Current Drug Delivery 1:321-333 (2004) ; C. Reis et al., “ Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles ” Nanomedicine 2:8- 21 (2006) ; P. Paolicelli et al., “ Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles ” Nanomedicine. 5(6):843-853 (2010)。材料を合成ナノキャリアにカプセル化するのに適した他の方法を使用することができ、これは、限定することなく、2003年10月14日に発行されたUngerへの米国特許第6,632,671号に開示されている方法を含む。

#### 【 0 0 6 5 】

ある態様において、合成ナノキャリアは、ナノ沈殿プロセスまたは噴霧乾燥によって調製される。合成ナノキャリアの調製に使用する条件は、所望のサイズまたは特性（例えば、疎水性、親水性、外部形態、「粘着性」、形状など）の粒子を生成するために変更することができる。合成ナノキャリアを調製する方法および使用する条件（例えば、溶媒、温度、濃度、空気流量など）は、合成ナノキャリアに含まれる材料および/または担体マトリックスの組成に依存し得る。

上記の方法のいずれかによって調製された合成ナノキャリアが、所望の範囲外のサイズ範囲を有する場合、かかる合成ナノキャリアは、例えばふるいを使用してサイズ調整することができる。

#### 【 0 0 6 6 】

態様において、合成ナノキャリアは、同じビヒクルまたは送達システム中で混合することにより、抗原または他の組成物と組み合わせることができる。

本明細書で提供される組成物は、以下を含み得る : 無機または有機緩衝液（例 : リン酸、炭酸、酢酸、またはクエン酸のナトリウム塩またはカリウム塩）および pH 調整剤（例 : 塩酸、水酸化ナトリウムまたは水酸化カリウム、クエン酸または酢酸の塩、アミノ酸およびそれらの塩）、酸化防止剤（例 : アスコルビン酸、 $\alpha$ -トコフェロール）、界面活性剤（例 : ポリソルベート 20、ポリソルベート 80、ポリオキシエチレン 9 - 10 ノニルフェノール、デオキシコール酸ナトリウム）、溶液および/または低温/凍結安定剤（例 : スクロース、ラクトース、マンニトール、トレハロース）、浸透圧調整剤（例 : 塩類または糖類）、抗菌剤（例 : 安息香酸、フェノール、ゲンタマイシン）、消泡剤（例 : ポリジメチルシロゾン）、保存剤（例 : チメロサル、2 - フェノキシエタノール、EDTA）、高分子安定剤および粘度調整剤（例 : ポリビニルピロリドン、ポロキサマー 488、カルボキシメチルセルロース）および共溶媒（例 : グリセロール、ポリエチレングリコール、エタノール）。

#### 【 0 0 6 7 】

本発明による組成物は、薬学的に許容し得る賦形剤を含み得る。組成物は、有用な剤形に到達するために、従来の医薬品製造および調合技術を使用して作製することができる。本発明の実施への使用に適した技術は、Handbook of Industrial Mixing: Science 50

and Practice, Edited by Edward L. Paul, Victor A. Atiemo-Obeng, and Suzanne M. Kresta, 2004 John Wiley & Sons, Inc.; および Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design, 2nd Ed. Edited by M. E. Auten, 2001, Churchill Livingstone に記載されている。一態様において、組成物は、注射用の滅菌生理食塩水中に保存剤と共に懸濁される。

本発明の組成物は、任意の適切な様式で製造することができ、本発明が、本明細書に記載の方法を使用して生成可能な組成物には限定されないことが理解されるべきである。適切な製造方法を選択するには、関連する特定の要素の特性に注意する必要がある。

#### 【0068】

いくつかの態様において、組成物は滅菌条件下で製造されるか、または初期もしくは最後に滅菌化される。これにより、得られる組成物が滅菌で非感染性であることを保証でき、したがって非滅菌組成物と比較して安全性が向上する。これは、特に組成物を受け取る対象が免疫不全を有する場合、感染症に罹患している場合、および/または感染しやすい場合に、価値ある安全対策を提供する。いくつかの態様において、組成物を凍結乾燥し、製剤化戦略に応じて懸濁液中にまたは凍結乾燥粉末として、活性を失うことなく長期間保管することができる。

10

本発明による投与は、皮内、筋肉内、皮下、静脈内、および腹腔内経路を含むがこれらに限定されない、様々な経路によるものであり得る。本明細書で言及される組成物は、従来の方法を用いて投与のために製造および調製され得る。

#### 【0069】

本発明の組成物は、本明細書の他の箇所に記載の有効量等の有効量で、投与することができる。剤形の用量は、本発明に従って要素を様々な量で含有することができる。本発明の剤形に存在する要素の量は、それらの性質、達成されるべき治療的利益、および他のかかるパラメータに従って変化し得る。態様において、用量範囲研究を実施して、剤形に存在する最適な治療量を確立することができる。態様において、要素は、対象への投与時に所望の効果および/または免疫応答の低下を生じさせるのに有効な量で、剤形中に存在する。対象において従来の用量範囲研究および技術を使用して、所望の結果を達成するための量を決定することが可能であり得る。本発明の剤形は、様々な頻度で投与することができる。一態様において、本明細書で提供される組成物の少なくとも1回の投与が、薬理的に関連する応答を生成するのに十分である。

20

30

#### 【0070】

本開示の別の側面は、キットに関する。提供されるキットのいずれか1つのいくつかの態様において、キットは、本明細書で提供される合成ナノキャリア組成物のいずれか1つを含む。提供されるキットのいずれか1つのいくつかの態様において、キットはさらに抗原を含む。提供されるキットのいずれか1つのいくつかの態様において、本明細書で提供される合成ナノキャリア組成物のいずれか1つを含む容器は、バイアルまたはアンプルである。提供されるキットのいずれか1つのいくつかの態様において、組成物は凍結乾燥形態であり、後で再構成することができる。提供されるキットのいずれか1つのいくつかの態様において、キットはさらに、再構成、混合、投与などのための説明書を含む。提供されるキットのいずれか1つのいくつかの態様において、説明書は、本明細書に記載の方法の説明を含む。説明書は、例えば印刷された挿入物またはラベルなどの、任意の適切な形式であり得る。本明細書で提供されるキットのいずれか1つのいくつかの態様において、キットはさらに、合成ナノキャリアを *in vivo* で対象に送達できる、1つ以上のシリンジまたは他の装置を含む。

40

#### 【0071】

例

##### 例1 - 凍結乾燥合成ナノキャリア

凍結乾燥組成物の異なる成分が、凍結乾燥の促進、凝集の低減（例えば、再構成後）、および/または2～8での長期保管（例えば、凍結乾燥後）を可能にするのに役立つことが見出された。また、界面活性剤の使用が、ラパマイシンなどの免疫抑制剤の可溶化、

50

および/または合成ナノキャリアの破壊につながる可能性があることも見出された。また、いくつかの態様において、中性 pH の維持を助ける緩衝成分の利点も見出されている。

一例として、トリス緩衝液は、凍結時にリン酸緩衝液で発生し得る pH の低下を回避するのに役立つことが見出された。トリス緩衝液を作るために、トロメタミン（トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン）およびトリス塩酸塩（トリス HCl）を混合し、好ましくはいくつかの態様において、中性付近の pH を維持した。トリス緩衝液はいくつかの態様において、10 mM の濃度および/または pH 7.3（25 で）であった。トリス緩衝液はいくつかの態様において、濃度 1.3 mM のトロメタミンおよび濃度 8.7 mM のトリス HCl を含んでいた。

【0072】

10

実験製剤も、凍結乾燥後および保管中のナノ粒子の凝集を防ぐそれらの能力に基づいて評価した。スクロース、トレハロース、マンニトール、およびスクロース/マンニトール混合物を含む様々な製剤を試験した。スクロースを含有するものなどの製剤は、一貫して適切な生成物を生成し、再構成が迅速で、再構成時に目に見える凝集物がなく、凍結乾燥後の粒子サイズの増加がほとんどまたはまったくなかった。スクロースを含む製剤も、これらの特性を12ヶ月の安定性試験を通じて示し続けた。4~9.6 wt% の範囲等の多くのスクロース濃度が、凝集に対して同様の保護を示すことが見出された（図1）。

これらの研究に基づいて、凍結乾燥のために選択された例示的な製剤は、本明細書で提供される合成ナノキャリアを、2 mg/mL のラパマイシン濃度、9.6 wt% のスクロース濃度、および 10 mM の pH 7.3 トリス緩衝液を含むものであることが見出された。

20

【0073】

例2 - 過飽和量のラパマイシンを有する合成ナノキャリア

ポリマー PLGA（3:1のラクチド:グリコリド、固有粘度 0.39 dL/g）および PLA-PEG（5 kDa の PEG ブロック、固有粘度 0.36 dL/g）、ならびに薬剤ラパマイシン（RAPA）を含有するナノキャリア組成物は、水中油型エマルジョン蒸発法を用いて合成した。有機相は、ポリマーおよび RAPA をジクロロメタンに溶解することにより形成した。エマルジョンは、有機相を、界面活性剤ポリビニルアルコール（PVA）を含有する水相中で均質化することにより形成した。次いで、エマルジョンを多量の水性緩衝液と組み合わせ、混合して溶媒を蒸発させた。異なる組成物中の RAPA 含有量は、RAPA 含有量が増加するにつれて組成物が系の RAPA 飽和限界を超えるように変化させた。組成物の飽和限界での RAPA 含有量は、水相および分散ナノキャリア相における RAPA の溶解度を用いて計算した。PVA を水相中の一次溶質として含有する組成物の場合、水相中の RAPA の溶解度は PVA 濃度に比例し、RAPA は溶解した PVA に対して 1:125 の質量比で溶解することが見出された。記載の PLGA および PLA-PEG をナノキャリアポリマーとして含有する組成物について、分散ナノキャリア相中の RAPA 溶解度は 7.2% wt/wt であることが見出された。次の式を使用して、組成物の飽和限界での RAPA 含有量を算出することができる：

30

$$\text{RAPA 含有量} = V(0.008c_{\text{PVA}} + 0.072c_{\text{pol}})$$

ここで、 $c_{\text{PVA}}$  は PVA の質量濃度、 $c_{\text{pol}}$  はポリマーの複合質量濃度（combined mass concentration）、 $V$  は蒸発終了時のナノキャリア懸濁液の体積である。

40

【0074】

【表 1】

試料ID	過飽和の 計算値 (%)	RAPA 負荷 (%)	直径 (nm)
1	-50	2.5	143
2	-25	3.8	146
3	1	4.9	147
4	23	4.9	130
5	48	8.1	160
6	73	9.8	189
7	98	12.4	203

10

20

1、2、および3については、一貫して60%のRAPAが回収されず、水相と有機相の間の準飽和平衡レジームが示される。より多量のRAPAを含有する残りのナノキャリアの場合、一貫して6.8mgのRAPAは回収されない。この一貫した絶対質量損失は、系が過飽和状態にあることを示す（すなわち、1以上の相において過飽和状態である）。

## 【0075】

例3 - 過飽和量のラバマイシンを有する合成ナノキャリア

ポリマーPLA（固有粘度0.41dL/g）およびPLA-PEG（5kDaのPEGブロック、固有粘度0.50dL/g）、ならびに薬剤RAPAを含有するナノキャリア組成物を、例2に記載の水中油型エマルジョン蒸発法を使用して合成した。異なる組成物中のRAPA含有量は、RAPA含有量が増加するにつれて、組成物が系のRAPA飽和限界を超えるように変化させた。組成物の飽和限界でのRAPA含有量は、例2に記載の方法を用いて算出した。記載のPLAおよびPLA-PEGをナノキャリアポリマーとして含有する組成物について、分散ナノキャリア相中のRAPA溶解度は8.4%w/wであることが見出された。次の式を使用して、組成物の飽和限界でのRAPA含有量を算出することができる：

$$RAPA \text{ 含有量} = V ( 0.008 c_{PVA} + 0.084 c_{pol} )$$

ここで、 $c_{PVA}$ はPVAの質量濃度、 $c_{pol}$ はポリマーの複合質量濃度、およびVは蒸発終了時のナノキャリア懸濁液の体積である。すべてのナノキャリアロットを、形成の最後に0.22μmフィルターで濾過した。

## 【0076】

30

40

50

【表 2】

試料ID	過飽和の 計算値 (%)	RAPA 負荷 (%)	未洗浄 直径 (nm)	最終 直径 (nm)	フィルター スループット (g/m <sup>2</sup> )
10	-10	5.4	145	149	>171
11	0	6.2	150	155	>180
12	10	6.1	151	154	>170
13	20	6.1	148	148	80
14	30	6.2	171	151	28
15	40	5.8	202	154	16

10

増加量の R A P A をナノキャリア 1 2 ~ 1 5 に加えたにも関わらず、ナノキャリア中の最終 R A P A 含有量は増加せず、一方フィルターのスループットは低下した。これは、組成物において R A P A が過飽和であり、過剰の R A P A が洗浄および / または濾過中に除去されたことを示す。

## 【 0 0 7 7 】

例 4 - より迅速な溶媒蒸発と低 H L B 界面活性剤により、初期滅菌濾過可能な過飽和量のラパマイシンを有する合成ナノキャリアがもたらされる材料および方法

20

固有粘度が 0 . 4 1 d L / g の P L A は、Evonik Industries AG ( Rellinghauser Strase 1-11, Essen Germany ) から製品コード 100 DL 4A を購入した。約 5 , 0 0 0 D a のメチルエーテル末端 P E G ブロックおよび 0 . 5 0 D L / g の全体の固有粘度を有する P L A - P E G - O M e ブロックコポリマーは、Evonik Industries AG ( Rellinghauser Strase 1-11, Essen Germany ) から製品コード 100 DL mPEG 500 0 5CE を購入した。ラパマイシンは、Concord Biotech Limited, 1482-1486 Trasad Road, Dholka 382225, Ahmedabad India から購入した。製品コードは SIRO LIMUS。EMPROVE ( 登録商標 ) Pollyvinyl Alcohol 4-88 ( P V A )、USP ( 8 5 ~ 8 9 % 加水分解、粘度 3 . 4 ~ 4 . 6 m P a · s ) は、EMD Chemicals Inc. ( 480 South Democrat Road Gibbstown, NJ 08027 ) から製品コード 1.41350 を購入した。Cellgro PBS 1X ( P B S ) は、Corning Incorporated ( One Riverfront Plaza Corning, NY 14831 USA ) から部品番号 21-040-CV を購入した。ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水 1X ( D P B S ) は、Lonza ( Muenchensteinerstrasse 38, CH-4002 Basel, Switzerland ) から製品コード 17-512Q を購入した。ソルビタンモノパルミタートは、Croda International ( 300-A Columbus Circle, Edison, NJ 08837 ) から製品コード SPAN 40 を購入した。

30

## 【 0 0 7 8 】

試料 1 について、溶液は次のように調製した：

40

溶液 1 : ポリマーとラパマイシンの混合物を、P L A を 1 8 . 7 5 m g / m L で、P L A - P E G - O m e を 6 . 2 5 m g / m L で、およびラパマイシンを 4 . 7 m g / m L でジクロロメタン中に溶解することにより、調製した。溶液 2 : P V A を、5 0 m g / m L で、1 0 0 m M の p H 8 リン酸緩衝液中に調製した。

O / W エマルジョンは、溶液 1 ( 1 . 0 m L ) と溶液 2 ( 3 . 0 m L ) を小さなガラス製圧力管で組み合わせることにより調製し、1 0 秒間ボルテックス混合した後、圧力管を Branson Digital Sonifier 250 を使用して氷水浴に浸しながら、3 0 % の振幅で 1 分間超音波処理して乳化させた。次にエマルジョンを、D P B S ( 3 0 m L ) を含有する 5 0 0 m L の開放ビーカーに加えた。第 2 の O / W エマルジョンを、上記と同じ材料および方法を用いて調製し、次いで、第 1 のエマルジョンと D P B S を含有する同じ容器に加え

50

た。これを次に室温で2時間攪拌して、ジクロロメタンを蒸発させ、ナノキャリアを形成させた。ナノキャリアの一部を、ナノキャリア懸濁液を遠心管に移し75,600×g、4で50分間遠心分離することにより洗浄し、上清を除去し、ペレットを0.25%w/vのPVAを含有するDPBSに再懸濁した。洗浄手順を繰り返した後、ペレットを0.25%w/vのPVAを含有するDPBSに再懸濁して、ポリマーベースで公称濃度10mg/mLのナノキャリア懸濁液を達成した。同一の製剤を別の500mLビーカーに調製し、同様に処理し、滅菌濾過の直前に最初の製剤と共にプールした。次にナノキャリア懸濁液を、直径33mmの0.22µmPESメンブレンシリンジフィルター(Millipore部品番号SLGP033RB)を使用して濾過した。濾過したナノキャリア懸濁液は、次に-20で保管した。

10

## 【0079】

試料2について、溶液を次のように調製した：

溶液1：ポリマーとラパマイシンの混合物を、PLAを75mg/mLで、PLA-PEG-Omeを25mg/mLで、およびラパマイシンを16mg/mLでジクロロメタン中に溶解して調製した。溶液2：ソルビタンモノパルミタート混合物を、SPAN40を20mg/mLでジクロロメタン中に溶解して調製した。溶液3：ポリビニルアルコールを、50mg/mLで100mMのpH8リン酸緩衝液中に調製した。溶液4：ジクロロメタンを、0.20µmのPTFEメンブレンシリンジフィルター(VWR部品番号28145-491)を用いて濾過した。

O/Wエマルジョンは、溶液1(0.5mL)、溶液2(0.125mL)、および溶液4(0.375mL)、および溶液3(3.0mL)を小さなガラス製圧力管内で組み合わせて調製し、10秒間ボルテックス混合した後、Branson Digital Sonifier 250を使用して圧力管を氷水浴に浸しながら、30%の振幅で1分間超音波処理することにより乳化した。次にエマルジョンを、DPBS(30mL)を含有する50mLビーカーに加えた。第2のO/Wエマルジョンを、上記と同じ材料および方法を用いて調製し、次いで第1のエマルジョンとDPBSを含有する同じビーカーに添加した。ナノキャリア懸濁液を次に、試料1と同じ方法で処理した。

20

## 【0080】

試料3について、溶液は次のように調製した：

溶液1：ポリマーとラパマイシンの混合物は、PLAを37.5mg/mLで、PLA-PEG-Omeを12.5mg/mLで、およびラパマイシンを8mg/mLでジクロロメタン中に溶解して調製した。溶液2：ポリビニルアルコールは、75mg/mLで100mMのpH8リン酸緩衝液中に調製した。

30

O/Wエマルジョンは、溶液1(1mL)と溶液2(3.0mL)を小さなガラス製圧力管で組み合わせて調製し、10秒ボルテックス混合した後、Branson Digital Sonifier 250を使用して圧力管を氷水浴に浸しながら、30%の振幅で1分間超音波処理することにより乳化した。O/Wエマルジョンは、試料1についての上記と同じ方法で形成した。超音波処理による乳化の後、エマルジョンをDPBS(30mL)を含有する50mLビーカーに加えた。第2のO/Wエマルジョンを、上記と同じ材料および方法を使用して調製し、次いで同じ溶媒蒸発容器に添加した。エマルジョンを2時間攪拌して、有機溶媒を蒸発させ、ナノキャリアを形成させた。次いでナノキャリアの一部を、ナノキャリア懸濁液を遠心管に移し75,600×gで50分間遠心分離することにより洗浄し、上清を除去し、ペレットをPBSに再懸濁した。洗浄手順を繰り返し、次いでペレットをPBSに再懸濁して、ポリマーベースで公称濃度10mg/mLを有するナノキャリア懸濁液を達成した。次にナノキャリア懸濁液を、直径33mmの0.22µmPESメンブレンシリンジフィルター(Millipore部品番号SLGP033RB)を使用して濾過した。濾過したナノキャリア懸濁液は、次に-20で保管した。

40

## 【0081】

ナノキャリアのサイズは、動的光散乱法により決定した。ナノキャリア中のラパマイシンの量は、HPLC分析により決定した。懸濁液1mLあたりの乾燥ナノキャリアの総質

50

量は、重量法により決定した。

【表 3】

ロット番号	SE 容器	低HLB 界面活性剤	容器の 表面積 (cm <sup>2</sup> )	フィルター スループット 計算値 (g NP/m <sup>2</sup> )	ラパマイシン 負荷 (%)	サイズ (nm)	収率 (%)
1	500 mL ビーカー	なし	64	>133	9.84	148	81
2	50 mL ビーカー	SPAN 40	14	>178	9.32	165	93
3	50 mL ビーカー	なし	14	47	7.38	119	73

10

【表 4】

グループ	ロット ID	SE 容器	低HLB 界面活性剤	DLS 直径 (nm)	RAPA 負荷 (%)	濾過性 (g NP/m <sup>2</sup> )
1	PBS	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
6	試料1	500 mL ビーカー	なし	148	9.8	>133
12	試料2	50 mL ビーカー	SPAN 40	165	9.3	>178
すべて	KLH, Sigma #H7017					

20

【 0 0 8 2 】

例 5 - 過飽和の決定方法

材料および方法

固有粘度が 0.41 dL/g の PLA は、Evonik Industries AG (Rellinghauser Strasse 1-11, Essen Germany) から製品コード 100 DL 4A を購入した。ラパマイシンは、Concord Biotech Limited, 1482-1486 Trasad Road, Dholka 382225, Ahmedabad India から購入した。製品コードは SIROLIMUS。

30

溶液は次のように調製した：

溶液 1：ポリマー溶液は、PLA を 100 mg/mL でジクロロメタンに溶解することにより調製した。溶液 2：ラパマイシン溶液は、ラパマイシンを 100 mg/mL でジクロロメタンに溶解することにより調製した。

ガラス製の顕微鏡スライドを 70% イソプロパノールで洗浄し、化学ドラフトチャンバー内の清浄で平らな面上で乾燥させた。混合物 1 は、100 μL の溶液 1 と 100 μL のジクロロメタンを、耐溶剤性のスクリュキャップ付きガラス製バイアル内で混合して調製し、ボルテックス混合により混合した。混合物 2 は、混合物 1 と同じ方法により、100 μL の溶液 1、33.3 μL の溶液 2、および 66.7 μL のジクロロメタンを用いて調製した。混合物 3 は、混合物 1 と同じ方法により、100 μL の溶液 1 および 66.7 μL の溶液 2、および 33.3 μL のジクロロメタンを用いて調製した。次に、50 μL の各混合物を清浄なガラス製スライド上の別々の場所に塗布し、ドラフトチャンバー内で室温で一晩乾燥させた。各乾燥フィルムのデジタル画像を撮影し、画像解析ソフトウェアを使用して解析した。正規化された平均強度の増加は、フィルムが飽和点を超えると不透明になることを示し得る。

40

50



【表 5】

Mix.	フィルム					Bgrd					
	Area	平均強度	標準偏差	Min	Max	Area	平均強度	標準偏差	Min	Max	正規化平均強度
1	45153	39.9	7.3	18	174	45588	38.6	6	18	123	1.3
2	43444	47.6	7.7	16	148	49698	40.5	5.7	19	95	7.1
3	63995	57.1	35.9	12	232	64441	23.4	4.4	8	85	33.7

## 【0083】

例 6 - 低 H L B 界面活性剤 S M は、R A P A 負荷および合成ナノキャリアの濾過性を向上する

ポリマー P L A ( 固有粘度 0 . 4 1 d L / g ) および P L A - P E G ( 5 k D a の P E G ブロック、固有粘度 0 . 5 0 d L / g )、ならびに疎水性薬剤ラパマイシン ( R A P A ) を含有するナノキャリア組成物を、低 H L B 界面活性剤ソルビタンモノパルミタート ( S M ) 有りまたは無しで、水中油型エマルジョン蒸発法を使用して合成した。有機相は、ポリマーおよび R A P A をジクロロメタンに溶解することにより形成した。エマルジョンは、プローブチップソニケーターを使用し、界面活性剤 P V A を含有する水相中の有機相を均質化することにより、形成した。次いでエマルジョンを多量の水性緩衝液と組み合わせ、これを混合して溶媒の溶解および蒸発を可能にした。得られたナノキャリアを洗浄し、0 . 2 2 μ m フィルターで濾過した。すべての組成物は、1 0 0 m g のポリマーを含有していた。異なる組成物中の R A P A 含有量は変化させた。

【表 6】

試料ID	組成物に添加された RAPA (mg)	組成物に添加された SM (mg)	未洗浄直径 (nm)	最終直径 (nm)	RAPA 負荷 (%)	フィルタースループット (g/m <sup>2</sup> )
1	12.2	0	148	148	6.1	80
2	13.3	0	171	151	6.2	28
3	14.3	0	202	154	5.8	16
4	13.6	5	156	161	9.2	>174
5	17	5	168	170	11.8	>184
6	20.4	5	181	179	14.9	77

## 【0084】

界面活性剤 S M を含有しない組成物 ( 試料 1、2、および 3 ) では、R A P A の添加量が増加するにつれて、ナノキャリア組成物に R A P A を完全に組み込む能力が制限されるという、いくつかの兆候が観察された。S M の非存在下でより高い R A P A 製剤レベルでの、濾過前と濾過後のナノキャリアサイズの差の増加は、洗浄および / または濾過プロセス中に除去されるより大きな粒子 ( 個々の粒子または凝集体 ) の存在を示していた。これは、目詰まり前のフィルターのスループットの減少によっても示された。最後に、S M を含まないナノキャリア組成物への R A P A の追加量を増やしても、R A P A 負荷は増加せず ( 例えば、試料 3 と比較した試料 1 )、これは、追加の R A P A がナノキャリアの大部分から分離可能であり、洗浄および / または濾過工程中に除去されたことを示す。

対照的に、界面活性剤 S M を含有する組成物は、増大する量の R A P A を容易に組み込んだ。ナノキャリアのサイズは濾過の影響を受けず、組成物に加える R A P A の量を増やすと、ナノキャリアの R A P A 負荷が増加した。最高の負荷レベル ( 試料 6 ) ではフィルタースループットのいくらかの低下が見られたが、これは、ナノキャリアのサイズが本質的に大きいためである可能性がある。まとめると、S M の組み込みは、合成ナノキャリア組成物の R A P A 負荷と濾過性を高めるのに役立った。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 8 5 】

例 7 - S M および コレステロール は R A P A 負荷 と 濾過 性 を 高めた

ナノキャリア組成物を、実施例 6 に記載の材料および方法を使用して生成した。ポリマーおよび R A P A を含有するナノキャリアは、R A P A 負荷レベルを変えて生成した。さらに、R A P A を高度に負荷したナノキャリアも、賦形剤、界面活性剤 S M またはコレステロールを、賦形剤：R A P A の質量比 3 . 2 : 1 で使用して生成した。

## 【表 7】

試料ID	賦形剤	直径 (nm)	RAPA負荷 (%)	フィルタースループット (g/m <sup>2</sup> )
7	-	131	5.6	>148
8	-	138	7.9	37
9	SM	165	9.3	>178
10	コレステロール	166	14.3	>180

10

賦形剤の非存在下で生成したナノキャリアの試料（試料 7 および 8）は、明らかなナノキャリア飽和点を越えた R A P A 負荷の増加が、フィルタースループットの低下につながる傾向があることを実証した。S M またはコレステロールのいずれかを添加すると、安定性を維持しつつ R A P A 負荷が増加した（試料 9 および 10）。

20

## 【 0 0 8 6 】

例 8 - 低 H L B 界面活性剤の R A P A 負荷 および 濾過 性 に対する 効果  
材料および方法

固有粘度が 0 . 4 1 d L / g の P L A は、Lakeshore Biomaterials (756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211) から製品コード 100 DL 4A を購入した。約 5 , 0 0 0 D a のメチルエーテル末端 P E G ブロックおよび 0 . 5 0 D L / g の全体固有粘度を有する P L A - P E G - O M e ブロックコポリマーは、Lakeshore Biomaterials (756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211) から製品コード 100 D L m P E G 5000 5CE を購入した。ラパマイシンは、Concord Biotech Limited (14 82-1486 Trasad Road, Dholka 382225, Ahmedabad India) から製品コード S I R O L I M U S を購入した。EMPROVE (登録商標) Pollyvinyl Alcohol 4-88, USP (85 ~ 89 % 加水分解、粘度 3 . 4 ~ 4 . 6 m P a · s) は、EMD Chemicals Inc. (480 South Democrat Road Gibbstown, NJ 08027) から製品コード 1.41350 を購入した。ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水 1X (D P B S) は、Lonza (Muenchen steinerstrasse 38, CH-4002 Basel, Switzerland) から製品コード 17-512Q を購入した。ソルビタンモノパルミタートは、Croda International (300-A Columbus Circle, Edison, NJ 08837) から製品コード SPAN 40 を購入した。ポリソルベート 80 は、NOF America Corporation (One North Broadway, Suite 912 White Plains, NY 10601) から製品コード Polysorbate 80 (HX2) を購入した。ソルビタンモノラウレート (SPAN 20) は、Alfa Aesar (26 Parkridge Rd Ward Hill, MA 01835) から製品コード L12099 を購入した。ソルビタンステアレート (SPAN 60) は、Sigma-Aldrich (3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103) から製品コード S7010 を購入した。ソルビタンモノオレアート (SPAN 80) は、Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (9211 North Harborgate Street Portland, OR 97203) から製品コード S0060 を購入した。オクチル - D - グルコピラノシドは、Sigma-Aldrich (3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103) から製品コード O8001 を購入した。オレイルアルコールは、Alfa Aesar (26 Parkridge Rd Ward Hill, MA 0183

30

40

50

5) から製品コードA18018を購入した。イソプロピルパルミタートは、Sigma-Aldrich (3050 Spruce St. Louis, MO 63103) から製品コードW515604を購入した。ポリエチレングリコールヘキサデシルエーテル (BRIJ 52) はSigma-Aldrich (3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103) から製品コード388831を購入した。ポリエチレングリコールオレイルエーテル (BRIJ 93) は、Sigma-Aldrich (3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103) から製品コード388866を購入した。ポリ(エチレングリコール) - ブロック - ポリ(プロピレングリコール) - ブロック - ポリ(エチレングリコール) (Pluronic L-31) は、Sigma-Aldrich (3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103) から製品コード435406を購入した。ポリ(エチレングリコール) - ブロック - ポリ(プロピレングリコール) - ブロック - ポリ(エチレングリコール) (Pluronic P-123) は、Sigma-Aldrich (3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103) から製品コード435465を購入した。パルミチン酸は、Sigma-Aldrich (3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103) から製品コードP0500を購入した。DL - - パルミチンは、Sigma-Aldrich(3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103) から製品コードM1640を購入した。グリセリルトリパルミタートは、Sigma-Aldrich (3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103) から製品コードT5888を購入した。

10

#### 【0087】

試料11について、溶液は次のように調製した：

溶液1：ポリマーとラパマイシンの混合物は、PLAを75 mg/mLで、PLA-PEG-Omeを25 mg/mLで、ラパマイシンを16 mg/mLでジクロロメタン中に溶解して調製した。溶液2：ポリソルベート80混合物は、ポリソルベート80を80 mg/mLでジクロロメタン中に溶解して調製した。溶液3：ポリビニルアルコールは、50 mg/mLで、100 mMのpH8リン酸緩衝液中に調製した。

20

O/Wエマルジョンは、溶液1(0.5 mL)、溶液2(0.1 mL)、ジクロロメタン(0.4 mL)、および溶液3(3.0 mL)を小さなガラス製圧力管内で組み合わせ、10秒間ボルテックス混合して調製した後、Branson Digital Sonifier 250を使用して圧力管を氷水浴に浸しながら、30%の振幅で1分間超音波処理した。次にエマルジョンを、DPBS(30 mL)を含有する50 mLビーカーに加えた。第2のO/Wエマルジョンを、上記と同じ材料および方法を用いて調製し、次いで、第1のエマルジョンとDPBSを含有する同じ容器に加えた。次いでこれを室温で2時間攪拌して、ジクロロメタンを蒸発させ、ナノキャリアを形成させた。ナノキャリアの一部を、ナノキャリア懸濁液を遠心管に移し75,600 × g、4 で50分間遠心分離することにより洗浄し、上清を除去し、ペレットを0.25% w/vのPVAを含有するDPBSに再懸濁した。洗浄手順を繰り返した後、ペレットを0.25% w/vのPVAを含有するDPBSに再懸濁して、ポリマーベースで公称濃度10 mg/mLのナノキャリア懸濁液を達成した。次にナノキャリア懸濁液を、0.22 μmのPESEMメンブレンシリンジフィルター(Millipore部品番号SLGP033RB)を使用して濾過した。濾過したナノキャリア懸濁液は、次に-20 で保管した。

30

#### 【0088】

試料12～25については、溶液を次のように調製した：

40

溶液1：ポリマーとラパマイシンの混合物は、PLAを75 mg/mLで、PLA-PEG-Omeを25 mg/mLで、ラパマイシンを16 mg/mLでジクロロメタン中に溶解して調製した。溶液2：HLB混合物は、HLB界面活性剤を5.0 mg/mLでジクロロメタン中に溶解することにより調製した。HLB界面活性剤には、SPAN 20、SPAN 40、SPAN 60、SPAN 80、オクチル - D - グルコピラノシド、オレイル酸、イソプロピルパルミタート、BRIJ 52、BRIJ 93、Pluronic L-31、Pluronic P-123、パルミチン酸、DL - - パルミチン、およびグリセリルトリパルミタートが含まれる。溶液3：ポリビニルアルコールは、62.5 mg/mLで、100 mMのpH8リン酸緩衝液中に調製した。

O/Wエマルジョンは、溶液1(0.5 mL)、溶液2(0.5 mL)、および溶液3

50

( 3 . 0 m L ) を小さなガラス製圧力管内で組み合わせて調製し、 1 0 秒間ボルテックス混合した後、Branson Digital Sonifier 250を使用して圧力管を氷水浴に浸しながら、 3 0 % の増幅で 1 分間超音波処理した。次に、エマルジョンを D P B S ( 3 0 m L ) を含有する 5 0 m L ビーカーに加えた。第 2 の O / W エマルジョンを、上記と同じ材料および方法を用いて調製し、次いで、第 1 のエマルジョンと D P B S を含有する同じビーカーに添加した。これを次に室温で 2 時間攪拌して、ジクロロメタンを蒸発させ、ナノキャリアを形成させた。ナノキャリアの一部を、ナノキャリア懸濁液を遠心管に移し 7 5 , 6 0 0 × g 、 4 で 5 0 分間遠心分離することにより洗浄し、上清を除去し、ペレットを 0 . 2 5 % w / v の P V A を含有する D P B S に再懸濁した。洗浄手順を繰り返した後、ペレットを 0 . 2 5 % w / v の P V A を含有する D P B S に再懸濁して、ポリマーベースで公称濃度 1 0 m g / m L のナノキャリア懸濁液を達成した。次にナノキャリア懸濁液を、 0 . 2 2 μ m P E S メンブレンシリンジフィルター ( Millipore 部品番号 SLGP033RB ) を使用して濾過した。濾過したナノキャリア懸濁液は、次に - 2 0 で保管した。

10

【 0 0 8 9 】

【 表 8 】

試料	有機相 界面活性剤	界面 活性剤 のHLB	サイズ (nm)	濾過	フィルター 数	算出 された NP g/m <sup>2</sup>	収率 (%)	ラパマイシ ン負荷 (%)
11	ポリソルベート80	15	184	Millex 0.22 μm	>1	22	91	9.7
12	SPAN 20	8.6	148	Millex 0.22 μm	1	>144	71	11.2
13	SPAN 40	6.7	149	Millex 0.22 μm	1	>154	77	11.2
14	SPAN 60	4.7	151	Millex 0.22 μm	1	>154	77	11.0
15	SPAN 80	4.3	144	Millex 0.22 μm	1	>169	85	11.1
16	オクチルβ-D- グルコピラノシド	12	127	Millex 0.22 μm	3	47	64	6.7
17	オレイルアルコール	1.3	165	Millex 0.22 μm	1	>157	78	12.5
18	イソプロピル パルミタート	2.9	171	Millex 0.22 μm	1	>144	71	10.9
19	Brij 52	5	182	Millex 0.22 μm	1	>138	77	11.2
20	Brij 93	4	174	Millex 0.22 μm	1	>158	79	11.9
21	Pluronic L-31	1~7	169	Millex 0.22 μm	4	31	70	8.5
22	Pluronic P- 123	7~9	162	Millex 0.22 μm	1	>145	72	10.7
23	パルミチン酸	3.2	132	Millex 0.22 μm	1	>141	71	1.0
24	DL-α-パルミチン	7.2	153	Millex 0.22 μm	3	51	68	7.4
25	グリセリル トリパルミタート	4.3	168	Millex 0.22 μm	1	>146	73	10.0

20

30

40

【 0 0 9 0 】

ほとんどの低 H L B 界面活性剤の H L B は、公開されている情報を使用して決定した。DL - - パルミチンについて、H L B は次の式を用いて算出した：Mw = 330 . 5 g / m o l 、親水性部分 = 119 . 0 g / m o l ; H L B = 119 . 0 / 330 . 5 \* 100 / 5 = 7 . 2 。グリセリルパルミタートについては、H L B は次の式を用いて算出した：Mw = 807 . 3 g / m o l 、親水性部分 = 173 . 0 g / m o l ; H L B = 173 . 0 / 807 . 3 \* 100 / 5 = 4 . 3 。イソプロピルパルミタートについて、H L B は次

50

の式を用いて算出した： $Mw = 298.5 \text{ g/mol}$ 、親水性部分 =  $44.0 \text{ g/mol}$ ； $HLB = 44.0 / 298.5 * 100 / 5 = 2.9$ 。オレイルアルコールについては、 $HLB$ は次の式を用いて算出した： $Mw = 268.5 \text{ g/mol}$ 、親水性部分 =  $17.0 \text{ g/mol}$ ； $HLB = 17.0 / 268.5 * 100 / 5 = 1.3$ 。さらに、低 $HLB$ 界面活性剤の負荷は、抽出とそれに続く $HPLC$ 法による定量により測定した。

#### 【0091】

例9 - 低 $HLB$ 界面活性剤の合成ナノキャリアの濾過性に対する効果

材料および方法

約5,000Daのメチルエーテル末端PEGブロックおよび0.50DL/gの全体固有粘度を有するPLA-PEG-OMeブロックコポリマーは、Evonik Industries (Rellinghauser Strasse 1-11 45128 Essen, Germany)から製品コード100 DL mPEG 5000 5CEを購入した。固有粘度が0.41dL/gのPLAは、Evonik Industries (Rellinghauser Strasse 1-11 45128 Essen Germany)から製品コード100 DL 4Aを購入した。ラパマイシンは、Concord Biotech Limited, 1482-1486 Trasad Road, Dholka 382225, Ahmedabad Indiaから購入した。製品コードはSIROLIMUS。ソルビタンモノパルミタートは、Croda (315 Cherry Lane New Castle Delaware 19720)から製品コードSPAN 40を購入した。ジクロロメタンは、Spectrum (14422 S San Pedro Gardena CA, 90248-2027)から購入した。部品番号はM1266。EMPROVE (登録商標) Pollyvinyl Alcohol 4-88, USP (85~89%加水分解、粘度3.4~4.6mPa·s)は、EMD Chemicals Inc. (480 South Democrat Road Gibbstown, NJ 08027)から製品コード1.41350を購入した。ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水、1X, 0.0095 M (PO4)、カルシウムおよびマグネシウム非含有は、BioWhittaker (8316 West Route 24 Mapleton, IL 61547)から部品番号#12001、製品コードLonza DPBSを購入した。乳化は、Branson Digital Sonifier 250および1/8インチのテーパチップチッププローブを用いて実施した。

#### 【0092】

溶液は次のように調製した：

溶液1：ポリマー混合物は、PLA-PEG-OMe (100 DL mPEG 5000 5CE)を50mg/mLで、およびPLA (100 DL 4A)を150mg/mLでジクロロメタン中に溶解することにより調製した。溶液2：ラパマイシンは、160mg/mLでジクロロメタンに溶解した。溶液5：ソルビタンモノパルミタート (SPAN 40)は、50mg/mLでジクロロメタンに溶解した。溶液6：ジクロロメタンは、0.2μm PTFEメンブレンシリンジフィルター (VWR部品番号28145-491)を使用して滅菌濾過した。溶液7：ポリビニルアルコール溶液は、ポリビニルアルコール (EMPROVE (登録商標) Pollyvinyl Alcohol 4-88)を75mg/mLで、100mMのpH 8リン酸緩衝液に溶解することにより調製した。溶液8：ポリビニルアルコールとダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水、1X、0.0095 M (PO4)の混合物は、ポリビニルアルコール (EMPROVE (登録商標) Pollyvinyl Alcohol 4-88)を2.5mg/mLで、ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水、1X、0.0095 M (PO4) (Lonza DPBS)に溶解することにより調製した。

#### 【0093】

試料26については、O/Wエマルジョンを、溶液1 (0.5mL)、溶液2 (0.1mL)、溶液5 (0.1mL)、および溶液6 (0.30mL)を小さなガラス製圧力管内で組み合わせることにより、調製した。溶液を、ピペティングを繰り返して混合した。次に、溶液7 (3.0mL)を添加し、製剤を10秒間ボルテックス混合した。次いで製剤を、圧力管を氷浴に浸しながら、振幅30%で1分間超音波処理した。次いでエマルジョンを、Lonza DPBS (30mL)を含有する50mLの開放ビーカーに加えた。次いで、これを室温で2時間攪拌して、ジクロロメタンを蒸発させ、ナノキャリアを形成させた。ナノキャリアの一部を、ナノキャリア懸濁液を遠心管に移し75,600xg、4

で50分間遠心分離することにより洗浄し、上清を除去し、ペレットを溶液8に再懸濁した。洗浄手順を繰り返し、次いで、ペレットを溶液8に再懸濁して、ポリマーベースで10mg/mLの公称濃度を有するナノキャリア懸濁液を達成した。ナノキャリア製剤は、0.22µm PESメンブレンシリンジフィルター(Millex部品番号SLGP033RS)を使用して濾過した。ナノキャリア溶液フィルタースルーポットの質量を測定した。次いで、濾過したナノキャリア溶液を-20℃で保管した。

【0094】

試料27については、O/Wエマルジョンを、溶液1(0.5mL)、溶液2(0.1mL)、および溶液6(0.40mL)を小さなガラス製圧力管内で組み合わせることにより調製した。溶液を、ピペティングを繰り返して混合した。次に溶液7(3.0mL)を添加し、製剤を10秒間ボルテックス混合した。次いで製剤を、圧力管を氷浴に浸しながら、振幅30%で1分間超音波処理した。次にエマルジョンを、Lonza DPBS(30mL)を含有する50mLの開放ビーカーに加えた。次いで、これを室温で2時間攪拌して、ジクロロメタンを蒸発させ、ナノキャリアを形成させた。ナノキャリアの一部を、ナノキャリア懸濁液を遠心管に移し75,600×g、4℃で50分間遠心分離することにより洗浄し、上清を除去し、ペレットを溶液8に再懸濁した。洗浄手順を繰り返し、次いでペレットを溶液8に再懸濁して、ポリマーベースで10mg/mLの公称濃度を有するナノキャリア懸濁液を達成した。ナノキャリア製剤は、0.22µm PESメンブレンシリンジフィルター(Millex部品番号SLGP033RS)を使用して濾過した。ナノキャリア溶液フィルタースルーポットの質量を測定した。次いで、濾過したナノキャリア溶液を-20℃で保管した。

【0095】

ナノキャリアのサイズを、動的光散乱により決定した。ナノキャリア中のラパマイシンの量は、HPLC分析により決定した。懸濁液1mLあたりの乾燥ナノキャリアの総質量は、重量法により決定した。濾過性は、第1フィルターを通過した濾液の量で評価した。

データは、ラパマイシンの場合、合成ナノキャリアへのSPAN 40の組み込みが、合成ナノキャリア組成物の濾過性の増加をもたらしたことを示す。

【表9】

ナノキャリアID	ラパマイシン	低HLB界面活性剤	有効直径(nm)	ラパマイシン含量(% w/w)	ナノキャリア収率(%)	0.22µmフィルタースルーポット(g/m <sup>2</sup> )
26	ラパマイシン	SPAN 40	179	17.19	80	98
27	ラパマイシン	なし	226	17.56	75	10

【0096】

例10 - SPAN 40はポリエステルポリマーを含む合成ナノキャリアの濾過性を大幅に高める

材料および方法

固有粘度が0.41dL/gのPLA(100DL4A)は、Evonik Industries AG(Rellinghauser Strasse 1-11, Essen Germany)から製品コード100DL4Aを購入した。約5,000Daのメチルエーテル末端PEGブロックおよび0.50DL/gの全体固有粘度を有するPLA-PEG-OMeブロックコポリマーは、Evonik Industries AG(Rellinghauser Strasse 1-11, Essen Germany)から製品コード100DL mPEG 5000 5CEを購入した。ラパマイシンは、Concord Biotech Limited(1482-1486 Trasad Road, Dholka 382225, Ahmedabad India)から製品コードSIROLIMUSを購入した。EMPROVE(登録商標)Pollyvinyl Alcohol 4-88(PVA), USP(85~89%加水分解、粘度3.4~4.6mPa·s)は、EMD Chemicals Inc.(480 South Democrat Road Gibbstown, NJ 08027)から製品コード

1.41350を購入した。ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水1X (DPBS) は、Lonza (Muenchensteinerstrasse 38, CH-4002 Basel, Switzerland) から製品コード17-512Qを購入した。ソルピタンモノパルミタート (SPAN 40) は、Croda International (300-A Columbus Circle, Edison, NJ 08837) から製品コードSpan 40を購入した。約54重量%のラクチドおよび46重量%のグリコリド、および固有粘度0.24 dL/gを有するPLGA (5050 DLG 2.5A) は、Evonik Industries AG (Rellinghauser Strasse 1-11, Essen Germany) から製品コード5050 DLG 2.5Aを購入した。約73重量%のラクチドおよび27重量%のグリコリド、および0.39 dL/gの固有粘度を有するPLGA (7525 DLG 4A) は、Evonik Industries AG (Rellinghauser Strasse 1-11, Essen Germany) から製品コード7525 DLG 4Aを購入した。平均Mwが14,000 Da、Mnが10,000 Daのポリカプロラクトン (PCL) は、Sigma-Aldrich (3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103) から製品コード440752を購入した。

10

20

30

40

50

#### 【0097】

試料1、3、5および7については、次のように溶液を調製した：

溶液1：PLA-PEG-Omeを50 mg/mL、Span 40を10 mg/mL、およびラパマイシンを32 mg/mLでジクロロメタンに溶解した。溶液2：100 DL 4Aを150 mg/mLでジクロロメタンに溶解した。溶液3：5050 DLG 2.5Aを150 mg/mLでジクロロメタンに溶解した。溶液4：7525 DLG 4Aを150 mg/mLでジクロロメタンに溶解した。溶液5：PCLを150 mg/mLでジクロロメタンに溶解した。溶液6：PVAを75 mg/mLで、100 mMのpH 8リン酸緩衝液中に調製した。

#### 【0098】

O/Wエマルジョンを、溶液1 (0.5 mL)を肉厚ガラス製圧力管に移すことにより調製した。これに、ロット1では溶液2 (0.5 mL)を、ロット3では溶液3 (0.5 mL)を、ロット5では溶液4 (0.5 mL)を、ロット7では溶液5 (0.5 mL)を加えた。次いで2つの溶液を、ピPETTINGを繰り返すことにより混合した。次に溶液6 (3.0 mL)を加え、管を10秒間ボルテックス混合した後、Branson Digital Sonifier 250を使用して圧力管を氷水浴に浸しながら、振幅30%で1分間超音波処理して乳化した。次いでエマルジョンをDPBS (30 mL)を含有する50 mLビーカーに添加した。次いで、これを室温で2時間攪拌して、ジクロロメタンを蒸発させ、ナノキャリアを形成させた。ナノキャリアの一部を、ナノキャリア懸濁液を遠心管に移し75,600 × gで50分間遠心分離することにより洗浄し、上清を除去し、ペレットをDPBSに再懸濁した。洗浄手順を繰り返し、次いでペレットをDPBSに再懸濁して、ポリマーベースで10 mg/mLの公称濃度を有するナノキャリア懸濁液を達成した。次に、ナノキャリア懸濁液の濾過を、0.22 μm PESメンブレンシリンジフィルター (Millipore部品番号SLGP033RB)を使用し、および必要に応じて0.45 μmのPESメンブレンシリンジフィルター (PALL部品番号4614)、および/または1.2 μmのPESメンブレンシリンジフィルター (PALL部品番号4656)を使用して実施した。次いで、濾過されたナノキャリア懸濁液を-20 °Cで保管した。

#### 【0099】

ナノキャリアのサイズは、動的光散乱により決定した。ナノキャリア中のラパマイシンの量は、HPLC分析により決定した。濾過性は、最初の滅菌0.22 μmフィルターのフロースルーの重量を収率と比較して、フィルターをブロックする前に通過したナノキャリアの実際の質量、または最初で唯一のフィルターを通過した合計量を決定することにより、決定した。懸濁液1 mLあたりの乾燥ナノキャリアの総質量は、重量法により決定した。

試料2、4、6、および8について、溶液は次のように調製した：

溶液1：ポリマーとラパマイシンの混合物は、PLA-PEG-Omeを50 mg/mLで、ラパマイシンを32 mg/mLでジクロロメタンに溶解することにより調製した。

溶液 2 : 100 DL 4A を 150 mg / mL でジクロロメタンに溶解した。溶液 3 : 5050 DLG 2.5A を 150 mg / mL でジクロロメタンに溶解した。溶液 4 : 7525 DLG 4A を 150 mg / mL でジクロロメタンに溶解した。溶液 5 : PCL を 150 mg / mL でジクロロメタンに溶解した。溶液 6 : ポリビニルアルコールを 75 mg / mL で、100 mM の pH 8 リン酸緩衝液中に調製した。

【 0 1 0 0 】

O / W エマルジョンは、溶液 1 ( 0 . 5 mL ) を肉厚ガラス製圧力管に移すことにより調製した。これに、ロット 2 では溶液 2 ( 0 . 5 mL ) を、ロット 4 では溶液 3 ( 0 . 5 mL ) を、ロット 6 では溶液 4 ( 0 . 5 mL ) を、ロット 8 では溶液 5 ( 0 . 5 mL ) を加えた。次いで 2 つの溶液を、ピペティングを繰り返すことにより混合した。PVA 溶液の添加、洗浄、濾過、および保管は、上記の通りである。

ナノキャリアのサイズは、上記と同じように評価した。

結果は、ポリエステルポリマーを含む合成ナノキャリアの濾過性が、合成ナノキャリアに SPAN 40 を含めることにより、有意に増加することを示す。

【 表 1 0 】

ロット番号	コアポリマー	賦形剤	サイズ (nm)	フィルタースループット (g NP/m <sup>2</sup> )	Rapa 負荷 (%)	NP 収率 (%)
1	100 DL 4A	SPAN 40	160	>148	12.65	75
2	100 DL 4A	なし	197	17	10.88	71
3	5050 DLG 2.5A	SPAN 40	153	>139	13.09	70
4	5050 DLG 2.5A	なし	188	59	13.40	64
5	7525 DLG 4A	SPAN 40	164	>158	11.81	78
6	7525 DLG 4A	なし	196	28	11.64	73
7	ポリカプロラクトン	SPAN 40	164	112	10.62	75
8	ポリカプロラクトン	なし	173	52	10.29	78

【 0 1 0 1 】

例 1 1 - SPAN 40 はラパマイシンの濾過性を高める

材料および方法

固有粘度が 0 . 4 1 d L / g の PLA は、Evonik Industries AG ( Rellinghauser Strasse 1-11, Essen Germany ) から製品コード 100 DL 4A を購入した。約 5 , 0 0 0 Da のメチルエーテル末端 PEG ブロックおよび 0 . 5 0 D L / g の全体固有粘度を有する PLA - PEG - OMe ブロックコポリマーは、Evonik Industries AG ( Rellinghauser Strasse 1-11, Essen Germany ) から製品コード 100 DL mPEG 5000 5CE を購入した。ラパマイシンは、Concord Biotech Limited ( 1482-1486 Trasad Road, Dholka 382225, Ahmedabad India ) から製品コード SIROLIMUS を購入した。EMPROVE ( 登録商標 ) Polyvinyl Alcohol 4-88, USP ( 85 ~ 89 % 加水分解、粘度 3 . 4 ~ 4 . 6 m P a · s ) は、EMD Chemicals Inc. ( 480 South Democrat Road Gibbstown, NJ 08027 ) から製品コード 1.41350 を購入した。ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水 1X ( DPBS ) は、Lonza ( Muenchensteinerstrasse 38, CH-4002 Basel, Switzerland ) から製品コード 17-512Q を購入した。ソルビタンモノパルミタートは、Croda International ( 300-A Columbus Circle, Edison, NJ 08837 ) から製品コード SPAN 40 を購入した。

【 0 1 0 2 】

溶液は次のように調製した。溶液 1 : ポリマーとラパマイシンの混合物は、PLA を 1



50 mg/mLで、PLA-PEG-Omeを50 mg/mLで溶解することにより調製した。溶液2：ラパマイシン溶液は、100 mg/mLでジクロロメタン中に調製した。溶液6：ソルビタンモノパルミタート溶液は、SPAN 40を50 mg/mLでジクロロメタン中に溶解することにより調製した。溶液7：ポリビニルアルコールは、75 mg/mLで、100 mMのpH 8リン酸緩衝液中に調製した。

#### 【0103】

O/Wエマルジョンは、溶液1(0.5 mL)を肉厚圧力管に加えることにより調製した。ロット1では、これに溶液6(0.1 mL)およびジクロロメタン(0.28 mL)を組み合わせた。次いで、ロット1を溶液2(0.12 mL)と組み合わせた。同様にロット2をジクロロメタン(0.38 mL)と組み合わせ、次にロット2を溶液2(0.12 mL)と組み合わせた。したがって、各ロットの有機相の総量は1 mLであった。合わせた有機相溶液を、ピペティングを繰り返すことにより混合した。次に、溶液7(3.0 mL)を加え、圧力管を10秒間ポルテックス混合し、Branson Digital Sonifier 250を使用して圧力管を氷水浴に浸しながら、30%の振幅で1分間超音波処理した。次いでエマルジョンを、DPBS(30 mL)を含有する50 mLビーカーに添加した。次いで、これを室温で2時間攪拌して、ジクロロメタンを急速に蒸発させてナノキャリアを形成させた。ナノキャリアの一部を、ナノキャリア懸濁液を遠心管に移し75,600 × g、4で50分間遠心分離することにより洗浄し、上清を除去し、ペレットを0.25% w/vのPVAを含有するDPBSに再懸濁した。洗浄手順を繰り返した後、ペレットを0.25% w/vのPVAを含有するDPBSに再懸濁して、ポリマーベースで公称濃度10 mg/mLのナノキャリア懸濁液を達成した。次にナノキャリア懸濁液を、0.22 μm PESメンブレンシリンジフィルター(Millipore部品番号SLGP033RB)を使用して濾過した。次いで、濾過したナノキャリア懸濁液を-20で保管した。

10

20

#### 【0104】

この結果は、合成ナノキャリアにSPAN 40を組み込むと、ラパマイシンの濾過性が向上したことを示す。

#### 【表11】

ロット番号	ラパマイシン	低HLB界面活性剤	フィルタースループット計算値(g NP/m <sup>2</sup> )	サイズ(nm)	収率(%)	ラパマイシン負荷(%)
1	ラパマイシン	SPAN 40	>117	163	60	10.41
2	ラパマイシン	なし	21	189	58	11.38

30

#### 【0105】

例12 - ラパマイシン負荷および合成ナノキャリアの濾過性に対する成分の量の効果を示す

#### 材料および方法

約5,000 Daのメチルエーテル末端PEGブロックおよび0.50 DL/gの全体固有粘度を有するPLA-PEG-Omeブロックコポリマーは、Evonik Industries (Rellinghauser Strasse 1-11 45128 Essen, Germany)から製品コード100 DL mPEG 5000 5CEを購入した。固有粘度が0.41 dL/gのPLAは、Evonik Industries (Rellinghauser Strasse 1-11 45128 Essen Germany)から製品コード100 DL 4Aを購入した。ラパマイシンは、Concord Biotech Limited, 1482-1486 Trasad Road, Dholka 382225, Ahmedabad Indiaから購入した。製品コードはSIROLIMUS。ソルビタンモノパルミタートは、Croda (315 Cherry Lane New Castle Delaware 19720)から製品コードSPAN 40を購入した。ジクロロメタンは、Spectrum (14422 S San Pedro Gardena CA, 90248-2027)から購入した。部品

40

50

番号はM1266。EMPROVE（登録商標）Pollyvinyl Alcohol 4-88, (PVA), USP（85～89%加水分解、粘度3.4～4.6 mPa・s）は、EMD Chemicals Inc.（480 South Democrat Road Gibbstown, NJ 08027）から製品コード1.41350を購入した。カルシウムとマグネシウムを含まないダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水（DPBS）1X、0.0095 M（PO4）は、BioWhittaker（8316 West Route 24 Mapleton, IL 61547）から部品番号#12001、製品コードLonza DPBSを購入した。乳化は、Branson Digital Sonifier 250および1/8インチのテーパチップタンプローブを使用して実施した。

#### 【0106】

溶液は次のように調製した：

ポリマー溶液：ポリマー混合物は、PLA-PEG-OMe（100DL mPEG 5000 5CE）およびPLA（100DL 4A）を、PLA-PEG対PLAの比率1：3で、ジクロロメタン中に示されたmg/mLで溶解することにより調製した。ラパマイシン溶液：ラパマイシンは、示されたmg/mLでジクロロメタンに溶解した。SPAN 40溶液：ソルビタンモノパルミタート（SPAN 40）を、示されたmg/mLでジクロロメタンに溶解した。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>溶液：ジクロロメタン（CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>）は、0.2 μm PTFEメンブレンシリンジフィルター（VWR部品番号28145-491）を使用して滅菌濾過した。PVA溶液：ポリビニルアルコール溶液は、ポリビニルアルコール（EMPROVE（登録商標）Pollyvinyl Alcohol 4-88）を、示されたmg/mLで100 mMのpH 8リン酸塩緩衝液中に溶解することにより調製した。DPBS PVA溶液：ポリビニルアルコールとダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水、1X、0.0095 M（PO4）の混合物は、ポリビニルアルコール（EMPROVE（登録商標）Pollyvinyl Alcohol 4-88）を、2.5 mg/mLでダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水1X、0.0095 M（PO4）（Lonza DPBS）に溶解することにより調製した。

#### 【0107】

O/Wエマルジョンを、ポリマー溶液、ラパマイシン溶液、SPAN 40溶液および/またはCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>溶液（総量1～2 mL）を肉厚ガラス製圧力管内で組み合わせることにより調製した。溶液は、ピペティングを繰り返して混合した。次に、PVA溶液（3～6 mL）を添加した（1 mLの有機相と3 mLの水性PVA溶液との単一エマルジョンとして、または次々に調製された2つの単一エマルジョンとしてのいずれか）。調合物を10秒間ボルテックス混合し、次いで圧力管を氷浴に浸しながら、30%の振幅で1分間超音波処理した。次いでエマルジョンを、Lonza DPBS（30 mL）を含有する50 mLの開放ビーカーに加えた。次いで、これを室温で2時間攪拌して、ジクロロメタンを蒸発させ、ナノキャリアを形成させた。ナノキャリアの一部を、ナノキャリア懸濁液を遠心管に移し75,600 × g、4 で50分間遠心分離することにより洗浄し、上清を除去し、ペレットをDPBS PVA溶液に再懸濁した。洗浄手順を繰り返し、次いでペレットをDPBS PVA溶液に再懸濁して、ポリマーベースで10 mg/mLの公称濃度を有するナノキャリア懸濁液を達成した。ナノキャリア製剤は、0.22 μm PESメンブレンシリンジフィルター（Millex部品番号SLGP033RS）を使用して濾過した。ナノキャリア溶液フィルタースルーポットの質量を測定した。次いで、濾過したナノキャリア溶液を-20 で保管した。

#### 【0108】

濾過性は、Milliporeの部品番号SLGP033RBの33 mm PESメンブレン0.22 μmシリンジフィルター1つを通過する測定ナノキャリアのg/フィルターメンブレン表面積m<sup>2</sup>、として与えられる。

結果は、in vivoで有効であると予想されるラパマイシン量を有する初期滅菌濾過可能な合成ナノキャリアをもたらすことができる、多数の合成ナノキャリア中の様々な成分の量を示す。

10

20

30

40

50

【表 1 2】

ロット#	ポリマー (mg/mL)	SPAN 40 (mg/mL)	ラパ マイシン (mg/mL)	PVA (mg/mL)	サイズ (nm)	濾過性 (g NP/m <sup>2</sup> )	収率	wt% HLB/Rapa	wt% HLB/ポリマ ー
1 <sup>a</sup>	50	0	8	62.5	135	52	70.7	0.00	0.00
2 <sup>a</sup>	50	0.1	8	62.5	135	26	68.6	1.23	0.20
3 <sup>a</sup>	50	0.25	8	62.5	148	27	70.9	3.03	0.50
4 <sup>a</sup>	50	0.5	8	62.5	166	146	73.2	5.88	0.99
5 <sup>a</sup>	50	1	8	62.5	147	151	75.7	11.11	1.96
6 <sup>a</sup>	50	1.5	8	62.5	161	146	72.2	15.79	2.91
7 <sup>a</sup>	50	2.5	8	62.5	149	176	85.0	23.81	4.76
8 <sup>a</sup>	50	2.5	8	50	182	209	103.5	23.81	4.76
9 <sup>a</sup>	50	2.5	8	75	132	155	76.7	23.81	4.76
10 <sup>a</sup>	50	3	8	62.5	143	140	69.4	27.27	5.66
11 <sup>a</sup>	62.5	3	8	62.5	151	205	80.9	27.27	4.58
12 <sup>a</sup>	37.5	3	8	62.5	139	203	60.9	27.27	7.41
13 <sup>a</sup>	50	4.5	8	62.5	149	149	73.6	36.00	8.26
14 <sup>a</sup>	50	5	6.66	50	148	193	94.4	42.88	9.09
15 <sup>a</sup>	50	5	8.33	50	176	176	86.2	37.48	9.09
16 <sup>a</sup>	50	10	8	50	173	38	66.1	55.56	16.67
17	100	10	11.32	75	153	178	88.2	46.90	9.09
18	100	10	14.16	75	160	200	98.9	41.39	9.09
19	100	10	17	75	177	182	101.0	37.04	9.09
20	100	7.5	24	75	188	125	70.4	23.81	6.98
21	75	11.25	30	75	197	17	82.5	27.27	13.04
22	100	15	32	75	201	17	108.1	31.91	13.04
23	100	15	40	75	217	9	82.6	27.27	13.04
24	100	15	40	75	193	14	116.5	27.27	13.04

<sup>a</sup>これらの製剤は、2mLの有機相と6mLのPVA溶液で調製した。

## 【図面】

## 【図 1】

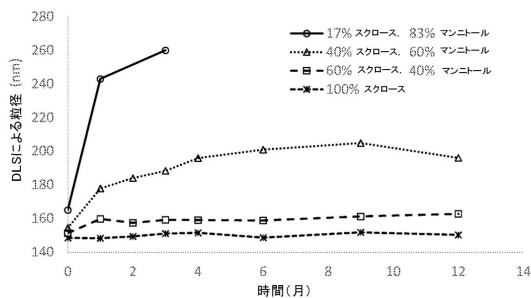


図 1

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2021/021939

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. A61K9/08      A61K9/19      A61K47/34      A61K31/436 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2016/073798 A1 (SELECTA BIOSCIENCES INC [US]) 12 May 2016 (2016-05-12) the whole document claims 1,9,16-18,37,43,75 -----	1-85
X	US 2015/359865 A1 (KISHIMOTO TAKASHI KEI [US]) 17 December 2015 (2015-12-17) paragraph [0003]; examples 1,4 -----	1-85
X	WO 2019/162951 A1 (YISSUM RES DEV CO OF HEBREW UNIV JERUSALEM LTD [IL]) 29 August 2019 (2019-08-29) the whole document claims 1,7,19,44,49,51 -----	1-85
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search  <p style="text-align: center;">21 June 2021</p>		Date of mailing of the international search report  <p style="text-align: center;">30/06/2021</p>
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  <p style="text-align: center;">Giese, Hans-Hermann</p>

10

20

30

40

2

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2021/021939

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TAKASHI K. KISHIMOTO ET AL: "Improving the efficacy and safety of biologic drugs with tolerogenic nanoparticles", NATURE NANOTECHNOLOGY, vol. 11, no. 10, 1 August 2016 (2016-08-01), pages 890-899, XP055371105, London ISSN: 1748-3387, DOI: 10.1038/nnano.2016.135 abstract	1-85
X	EP 2 522 338 A2 (SAMYANG BIOPHARMACEUTICALS [KR]) 14 November 2012 (2012-11-14) claims	1-85
A	US 2017/224620 A1 (ZALE STEPHEN E [US] ET AL) 10 August 2017 (2017-08-10) claims	1-85

10

20

30

40

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2021/021939

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2016073798 A1	12-05-2016	AU 2015342968 A1	27-04-2017
		AU 2015342969 A1	27-04-2017
		BR 112017008499 A2	26-12-2017
		BR 112017008720 A2	19-12-2017
		CA 2966850 A1	12-05-2016
		CA 2966852 A1	12-05-2016
		CN 107072964 A	18-08-2017
		CN 107072965 A	18-08-2017
		DK 3215133 T3	01-02-2021
		DK 3215192 T3	03-05-2021
		EA 201790977 A1	31-10-2017
		EA 201790978 A1	29-09-2017
		EP 3215133 A1	13-09-2017
		EP 3215192 A1	13-09-2017
		EP 3834823 A1	16-06-2021
		HR P20210098 T1	05-03-2021
		IL 251620 A	28-02-2021
		JP 2017533243 A	09-11-2017
		JP 2017537081 A	14-12-2017
		KR 20170081659 A	12-07-2017
KR 20170081660 A	12-07-2017		
LT 3215133 T	25-02-2021		
PT 3215133 T	29-01-2021		
US 2016128986 A1	12-05-2016		
US 2016128987 A1	12-05-2016		
WO 2016073798 A1	12-05-2016		
WO 2016073799 A1	12-05-2016		
-----	-----	-----	-----
US 2015359865 A1	17-12-2015	NONE	
-----	-----	-----	-----
WO 2019162951 A1	29-08-2019	AU 2019226051 A1	10-09-2020
		CA 3092016 A1	21-08-2020
		CN 112004524 A	27-11-2020
		EP 3758677 A1	06-01-2021
		JP 2021514948 A	17-06-2021
		KR 20200130704 A	19-11-2020
		US 2021128534 A1	06-05-2021
		WO 2019162951 A1	29-08-2019
-----	-----	-----	-----
EP 2522338 A2	14-11-2012	CN 102740834 A	17-10-2012
		EP 2522338 A2	14-11-2012
		JP 2013516407 A	13-05-2013
		JP 2015078247 A	23-04-2015
		KR 20110079518 A	07-07-2011
		US 2012276169 A1	01-11-2012
		US 2014212462 A1	31-07-2014
WO 2011081430 A2	07-07-2011		
-----	-----	-----	-----
US 2017224620 A1	10-08-2017	AU 2016392719 A1	02-08-2018
		CA 3013896 A1	17-08-2017
		CN 108697815 A	23-10-2018
		EP 3413917 A1	19-12-2018
		JP 2019512006 A	09-05-2019
		US 2017224620 A1	10-08-2017
		US 2019029960 A1	31-01-2019
WO 2017138983 A1	17-08-2017		
-----	-----	-----	-----

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/34 (2017.01)	A 6 1 K 47/34	
A 6 1 K 47/14 (2017.01)	A 6 1 K 47/14	
A 6 1 K 47/10 (2017.01)	A 6 1 K 47/10	
A 6 1 K 47/12 (2006.01)	A 6 1 K 47/12	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 K 47/44 (2017.01)	A 6 1 K 47/44	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N  
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,  
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K  
E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N  
G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,  
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

2 . S P A N

3 . B R I J

4 . P L U R O N I C

5 . プルロニック

アメリカ合衆国、マサチューセッツ州 0 2 4 7 8、ベルモント、オークリー ロード 2 4

Fターム (参考) 4C076 AA29 AA30 AA65 CC07 DD38Q DD50Z DD67Q EE24 EE51 FF63  
4C085 AA03 BB11 EE03  
4C086 AA01 AA10 CB22 MA02 MA05 MA38 MA43 MA44 NA03 ZB08