

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2021-20876  
(P2021-20876A)

(43) 公開日 令和3年2月18日(2021.2.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/49 (2006.01)	A 6 1 K 38/49	4 C 0 7 6
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
A 6 1 K 47/32 (2006.01)	A 6 1 K 47/32	

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-139027 (P2019-139027)  
(22) 出願日 令和1年7月29日 (2019.7.29)

(71) 出願人 504171134  
国立大学法人 筑波大学  
茨城県つくば市天王台一丁目1番1

(74) 代理人 110000741  
特許業務法人小田島特許事務所

(72) 発明者 長崎 幸夫  
茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立  
大学法人筑波大学内

(72) 発明者 メイ テイン  
茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立  
大学法人筑波大学内

(72) 発明者 シャスニ バピータ  
茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立  
大学法人筑波大学内

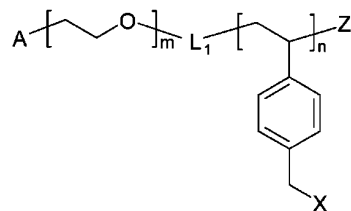
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 がん療法用の t-P A 含有ポリマー組成物

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 より効果的な抗がん及びがんの転移抑制のための手段を提供する。

【解決手段】 下記式 ( I ) で表されるブロック共重合体とポリアニオン性ポリマーと t - P A を含んでなるがん療法用組成物が開示される。



( I )

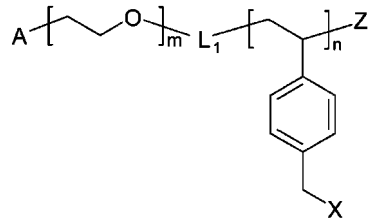
【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

有効成分として、下記式 (I) で表されるブロック共重合体とポリアニオン性ポリマーと t - P A を含んでなるがん療法用組成物。

## 【化 1】



(I)

10

上式中、各変動可能な基等の略号は次のとおり定義される。

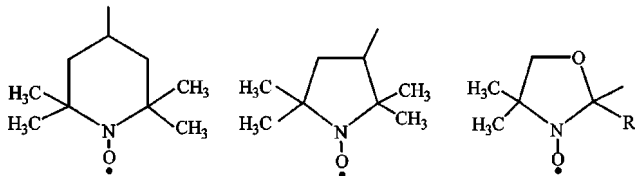
A は、非置換又は置換  $C_1 - C_{12}$  アルコキシを表し、置換されている場合の置換基は、ホルミル基、式  $R' R'' CH -$  基を表し、ここで、 $R'$  及び  $R''$  は独立して  $C_1 - C_4$  アルコキシ又は  $R'$  と  $R''$  は一緒になって  $-OCH_2CH_2O-$ 、 $-O(CH_2)_3O-$  もしくは  $-O(CH_2)_4O-$  を表す。

$L_1$  は、直接結合又は二価の連結基を表す。

20

X は、 $L_2 - R_1$  であるか又は水素原子若しくはハロゲン原子若しくはヒドロキシル基であり、かつ、 $L_2$  は  $-(CH_2)_p - NH - (CH_2)_p -$  であり、 $p$  は独立して、整数 0 又は 1 ~ 3 であり、 $R_1$  は、次式で表される環状ニトロキシドラジカル残基のいずれかであり、

## 【化 2】



30

(式中、 $R'$  はメチルである。)

$L_2 - R_1$  は  $n$  の付された反復単位の総数  $n$  の 50% 以上を占める。

Z は、H または  $S(C=S) - Ph$  であり、Ph は 1 または 2 個のメチルまたはメトキシで置換されていてもよいフェニルである。

$m$  は、5 ~ 10, 000 の数である。

$n$  は、2 ~ 500 数である。

ポリアニオン性ポリマーは、ポリ(メタ)アクリル酸、ポリスルホン酸、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸から選ばれる。

## 【請求項 2】

40

ナノ粒子の形態にある、請求項 1 に記載のがん療法用組成物。

## 【請求項 3】

がん療法において、予防又は治療対処のがんは、脳腫瘍、頭頸部がん、唾液腺がん、甲状腺がん、肺がん、小細胞肺がん、乳がん、肝臓・胆のうがん、膵臓がん、肝臓がん、胆道がん、食道がん、胃がん、小腸がん、大腸がん、腎臓がん、腎盂・尿管がん、膀胱がんから選ばれる、請求項 1 又は 2 に記載のがん療法用組成物。

## 【請求項 4】

がん療法において、他のがん又は腫瘍治療剤が併用される、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のがん療法用組成物。

## 【請求項 5】

50

t - P A を有効成分として含んでなるがん療法剤。

【請求項 6】

t - P A を有効成分とするがん療法剤

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、組織プラスミノゲンアクチベータ（t - P A）を含有するレドックス活性型ポリマー組成物及び t - P A それ自体のがん療法での使用又は用途に関し、より具体的には t - P A とカチオン荷電性ポリマー化環状ニトロキシドラジカルとポリアニオン性ポリマーを含む組成物、特に、当該組成物に由来するナノ粒子、並びに t - P A それ自体のがん療法での使用又は用途に関する。

10

【背景技術】

【0002】

がん性表現型に必須の持続的に高まる細胞内活性酸素種（R O S）は、生存、増殖及び転移過程で重要な役割を演ずることにより正のフィードバック様式でがんに影響を及ぼすことが知られている。それゆえ、R O S の除去は細胞生存シグナリング経路を抑制することから種々のがんの進行を緩和する可能性のある治療プログラムを提供する。本発明者らは、例えば、生体内 R O S を除去することのできるレドックス活性を有する、高分子化環状ニトロキシドラジカルのセグメントとポリ（エチレングリコール）のセグメントを含むブロック共重合体又はそれらのナノ粒子を提供し（特許文献 1、特許文献 2、参照。）、また、当該共重合体とドキシソルピシン等の抗がん剤との組み合わせ使用（特に、前者を投与した後に後者を投与する）は抗がん剤の活性を増強できることを開示した（非特許文献 1）。

20

【0003】

ところで、薬物キャリアーの低い腫瘍内分散性及び腫瘍への不十分な薬物送達性は、抗がん性ナノ医薬を成功裏に使用する上で意義深い挑戦事項である。腫瘍周辺の血管は、急速に分裂している細胞及び多量の細胞外マトリックス（E C M）によって奏される固体圧力（solid stress）の下で圧迫されている。これらの構成物及び構造は分子の移動を遅くし、かつ、充実性腫瘍の薬剤耐性の一因となる場合がある。一方、広範に使用されている血栓崩壊性薬物の組織プラスミノゲンアクチベーター（t - P A）は E C M 構成物を崩壊させ、血管の性質を改善し、腫瘍組織への血液の供給を高めることが予想されることから、抗がん剤（例えば、パクリタキセル）内包ナノ粒子を t - P A と共投与することにより腫瘍への前記ナノ粒子の送達性を向上させることが提案されている（非特許文献 2、非特許文献 3）。

30

【0004】

しかしながら、未だ、抗腫瘍及び転移抑制に有効な抗がん剤の開発に対するニーズは尽きることなく存在する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献 1】W O 2009 / 133647

【特許文献 2】W O 2016 / 052463

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献 1】Y o s h i t o m i , e t a l . , J o u r n a l o f c o n t r o l l e d R e l e a s e , V o . 172 , N o . 1 , p p . 137 - 143 (2013) (doi : 10.1016/j.jconrel.2013.08.011

40

【非特許文献 2】Z h a n g , e t a l . , B i o m a t e r i a l s 96 (2016) 64 - 71

【非特許文献 3】K i r t a n e e t a l . , C a n c e r R e s : 77 (6) M

50

arch 15, 2017

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の目的はより効果的な抗がん及びがんの転移抑制のための手段を提供することにある。本発明者らは、前記特許文献1～2、及び非特許文献1に記載されているようなレドックス活性型ブロック共重合体それ自体及び当該組成物と他の薬剤との組合せ使用等について研究し、かつ、それらの成果を公表してきた。このような研究の一端として、心臓発作の治療薬として承認されているt-PAを、それ固有の生物活性に悪影響を及ぼすことなくレドックス活性型ブロック共重合体に内包できる薬剤キャリアー系を開発し、公表した(T. Mei, A. Kim, L. B. Vong, A. Marushima, S. Puentes, Y. Matsumaru, A. Matsumura, Y. Nagasaki, Encapsulation of tissue plasminogen activator in pH-sensitive self-assemble antioxidant nanoparticles for ischemic stroke treatment - Synerugistic effect of thrombolysis and antioxidant -, Biomaterials. 215 (2019) 119209. doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.05.020.)。この論文は、ここに引用することによってその記載内容は本明細書の内容となる。

10

20

【0008】

驚くべきことに、このようなレドックス活性型ブロック共重合体とアニオン性ポリマーとt-PAとを含んでなる組成物又はこの組成物から水性媒体中で自己組織化されることにより形成されるナノ粒子を含むt-PA内包薬剤キャリアー系は、特に、ECMを崩壊させるとともに、腫瘍への血液灌流を改善して標的腫瘍組織へのレドックスナノ粒子のデリバリー及び免疫細胞浸透を向上させること等により、抗がん剤を共投与することなく抗がん作用を発揮することが確認された。

【0009】

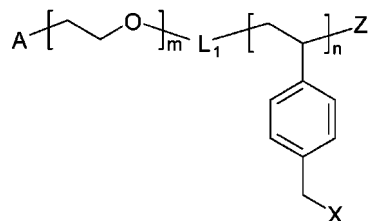
したがって、限定されるものではないが、本明細書により開示される主たる態様としては次のものが挙げられる。

30

態様1：有効成分として、下記式(I)で表されるブロック共重合体とポリアニオン性ポリマーと組織プラスミノゲンアクチベータ(t-PA)を含んでなるがん療法用組成物。

【0010】

【化1】



40

(I)

【0011】

上式中、各変動可能な基等の略号は次のとおり定義される。

Aは、非置換又は置換C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>アルコキシを表し、置換されている場合の置換基は、ホルミル基、式R'R''CH-基を表し、ここで、R'及びR''は独立してC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルコキシ又はR'とR''は一緒になって-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-、-O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>O-もしくは-O(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>O-を表す。

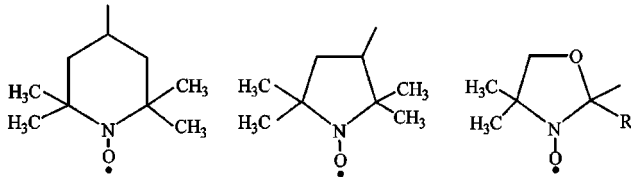
50

$L_1$ は、直接結合又は二価の連結基を表す。

$X$ は、 $L_2 - R_1$ であるか又は水素原子若しくはハロゲン原子若しくはヒドロキシル基であり、かつ、 $L_2$ は  $-(CH_2)_p - NH - (CH_2)_p -$  であり、 $p$ は独立して、整数0又は1～3であり、 $R_1$ は、次式で表される環状ニトロキシドラジカル残基のいずれかであり、

【0012】

【化2】



10

【0013】

(式中、 $R'$ はメチルである。)

$L_2 - R_1$ は $n$ の付された反復単位の総数 $n$ の50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、最も好ましくは100%を占める。

$Z$ は、 $H$ または $S(C=S) - Ph$ であり、 $Ph$ は1または2個のメチルまたはメトキシで置換されていてもよいフェニルである。

$m$ は、5～10,000、好ましくは、10～500、より好ましくは20～300の整数である。

20

$n$ は、2～500、好ましくは4～200、より好ましくは6～80の整数を表す。

ポリアニオン性ポリマーは、ポリ(メタ)アクリル酸、ポリスルホン酸、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸から選ばれる。

態様2：ナノ粒子の形態にある、態様1のがん療法用組成物。

態様3：がん療法において、予防又は治療対処のがんが、脳腫瘍、頭頸部がん、唾液腺がん、甲状腺がん、肺がん、小細胞肺がん、乳がん、肝臓・胆のうがん、膵臓がん、肝臓がん、胆道がん、食道がん、胃がん、小腸がん、大腸がん、腎臓がん、腎盂・尿管がん、膀胱がんから選ばれる、態様1又は2のがん療法用組成物。

態様4：がん療法において、他のがん又は腫瘍治療剤が併用される、態様1～3のいずれかに記載のがん療法用組成物。

30

態様5： $t - PA$ を有効成分として含んでなるがん療法剤。

態様6： $t - PA$ を有効成分とするがん療法剤

なお、本発明で用いるブロック共重合体の構造式中の $L_1$ 等の方向性を持ち得る結合の方向性は、特記しない限り表示されているままの方向性を有する(以下、同じ。)

【発明の効果】

【0014】

本発明の組成物、副作用が弱いか殆ど無視でき、一方で、特有の作用機序による抗がん又は抗腫瘍作用及び効果を奏する。したがって、当該組成物は、それ単独で効果的な抗がん剤又は抗腫瘍剤として有用であり、また、他のがん又は悪性腫瘍療法手段と組合せて都合よく使用できる。

40

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】製造例1に記載のPEG-b-CTAの $^1H$  NMRスペクトル

【図2】製造例1に記載のPEG-b-CTAのゲル透過クロマトグラフィーによる分離スペクトル

【図3】製造例2に記載のPEG-b-PCMSの $^1H$  NMRスペクトル

【図4】製造例2に記載のPEG-b-PCMSのゲル透過クロマトグラフィーによる分離スペクトル

【図5】製造例3に記載のPEG-b-PMNTの $^1H$  NMRスペクトル

50

【図 6】製造例 3 に記載の PEG - b - PMNT のゲル透過クロマトグラフィーによる分離スペクトル

【図 7】製造例 4 に記載の t - PA、t - PA@iRMP、iRMP (t - PA 不含ナノ粒子) の動的光散乱 (DLS) 測定結果の図表表示及び関連する物理的性質をまとめた表

【図 8】動物実験 1 における実験プロトコルの図表表示

【図 9】動物実験 1 におけるモデル動物の体重変化のグラフ表示

【図 10】動物実験 1 におけるモデル動物の腫瘍サイズ変動のグラフ表示

【図 11】動物実験 1 におけるモデル動物の腫瘍中の ROS のグラフ表示

【図 12】動物実験 1 におけるモデル動物の腫瘍組織切片の組織学的顕微鏡写真

【図 13】動物実験 1 におけるモデル動物の腫瘍組織中のフィブリンの免疫蛍光写真

【図 14】動物実験 1 におけるモデル動物の腫瘍組織中のフィブリン発現量のグラフ表示

【図 15】動物実験 1 におけるモデル動物の腫瘍組織切片の NF - B (緑) 及び DAPI (青) による蛍光染色像の写真

【図 16】図 15 の NF - B (緑) シグナルに基づいて決定された NF - B の発現量のグラフ表示

【図 17】動物実験 1 におけるモデル動物の腫瘍微環境下のフィブリン崩壊物に関するグラフ表示

【図 18】モデル動物の種々の器官の H & E 染色による病理学的データの反映する組織写真

【図 19】動物実験 2 における実験プロトコルの図表表示

【図 20】動物実験 2 における腫瘍モデル動物に t - PA を投与したときに腫瘍増殖プロファイルのグラフ表示

【図 21】動物実験 2 における各処置モデル動物の体重変化のグラフ表示

【図 22】動物実験 2 におけるモデル動物の腫瘍組織の免疫蛍光染色像の写真 (A) 及び蛍光強度のグラフ表示 (B)

【発明の詳細な説明】

【0016】

本明細書で開示されるがん療法用組成物又はそれから形成されるナノ粒子は、その抗がん作用について後述するモデル動物の実験例及び当該技術分野で周知の知見に照らすと、広範ながんの処理に有効であるものと理解できる。具体的には、理論に拘束されるものではないが、次の様な作用機序が有するものと思われる：レドックス活性型ブロック共重合体とアニオン性ポリマーと t - PA を含んでなる組成物又はその組成物から水性媒体中で自己組織化されることにより形成されるナノ粒子 (例えば t - PA@iRNP) は、iRNP のコアにおいて t - PA が遮蔽されることにより t - PA の酵素活性が著しく遮蔽され一方で、その活性は、酸により開始されるイオンコンプレックスの崩壊を通じて酸性環境下で回復する。細胞外 pH は正常な組織より腫瘍組織において低くなるのが当該技術分野で周知である。それ故、腫瘍組織の酸性領域において、t - PA@iRNP は、強いプロトネーションに起因してポリカチオン間の電荷の斥力により崩壊する傾向にある。こうして、腫瘍組織領域では内包された t - PA が迅速に放出され、ECM の崩壊を開始するとともに、より多くの環状ニトロキシドラジカルが腫瘍組織に浸透し、過剰な ROS を消去して細胞生存シグナリング経路を廃棄すると共に、免疫細胞も腫瘍組織に浸透することを可能にするものと理解できる。さらに、ナノサイズの構築物たる t - PA@iRNP は健常細胞中への非特異的な取り込みが防止されるので、腫瘍組織領域に蓄積される傾向がある。

【0017】

したがって、本明細書で開示される主題たる、がん療法用組成物又はそれから形成されるナノ粒子は、上記のような機序の関与する広範ながんの予防又は治療に利用できる。これらのがんとしては、限定されるものではないが、脳腫瘍、頭頸部がん、唾液腺がん、甲状腺がん、肺がん、小細胞肺がん、乳がん、肝臓・胆のうがん、膵臓がん、肝臓がん、胆道がん、食道がん、胃がん、小腸がん、大腸がん、腎臓がん、腎盂・尿管がん、膀胱がん

10

20

30

40

50

を挙げることができる。

【0018】

また、上記のような作用機序に悪影響を及ぼさない限り、それ自体公知の上記のがん又は悪性腫瘍の療法手段（治療薬物の使用に限定されない）と都合よく併用できる。

【0019】

式（I）で表されるブロック共重合体はポリアニオン性ポリマーと共に自己組織化してナノ粒子を形成することができ、また、このような自己組織化に際してt-PAをナノ粒子に内包若しくは搭載若しくは装着若しくは充填若しくは固定化できる。本明細書において、内包（encapsulated）、搭載若しくは充填（loaded）、装着（installed）、固定化（immobilized）は夫々互換可能な用語として使用されている。再度、理論に拘束されるものでないが、前記組成物は、水性媒体中での自己組織化を介して、高い可溶性及び高い可動性を有するポリ（エチレングリコール）（PEG）セグメントをシェルとし、t-PAを、主として、PMNTセグメントとポリアニオン性ポリマーとのポリイオンコンプレックス領域（コア）中に含有するコア-シェル型ナノ粒子を形成するものと理解できる。そのため、このようなナノ粒子は水性媒体中に均一に可溶化又は分散でき、血管内投与用等をはじめとする非経口用を本願する広範な剤型の製剤原薬として適する特性を有する。

10

【0020】

本発明に関して記述された用語等は、特に言及しない限り、当該技術分野で常用されている意味又は内容を有するものとして使用されている。一般的に、本発明について以下の追加の説明をすることができる。

20

【0021】

組織プラスミノゲンアクチベータ（t-PA）は、既に臨床上実用されているアルテプラゼ（alteplase）をはじめとするt-PAであれば、天然物由来の調製物、遺伝子組み換えにより作製された、所謂、t-PA又はt-PA活性物質と称されているものを包含し、また、本発明の課題解決（又は目的を達成するために）に使用できるものであれば、これらの改変体をも包含する概念である。

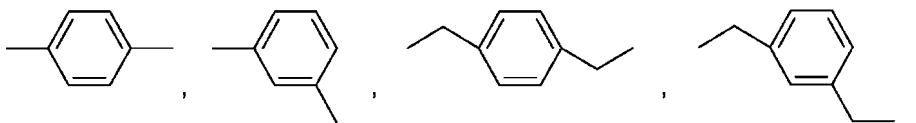
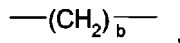
【0022】

式（I）で表されるブロック共重合体において、 $L_1$ を定義する二価の連結基は、ポリ（エチレングリコール）（以下、PEGと略記する場合あり。）セグメントと側鎖としての環状ニトロキシドラジカルが結合したポリ（メチルスチレン）（以下、PMNTと略記する場合あり。）セグメントの機能が本発明の目的に沿うものであれば、限定されるものでない。しかし、二価の連結基は、一般的には、最大34個、好ましくは18個、より好ましくは最大10個の炭素、並びに任意に酸素及び窒素原子を含有する基を意味する。かような連結基として、具体的には次の基を挙げることができる：

30

【0023】

【化3】



40

【0024】

で表される基から選ばれるか、又は $\text{---}(\text{CH}_2)_c\text{S---}$ 、 $\text{---CO}(\text{CH}_2)_c\text{S---}$ 、 $\text{---}(\text{CH}_2)_c\text{NH---}$ 、 $\text{---}(\text{CH}_2)_c\text{CO---}$ 、 $\text{---CO---}$ 、 $\text{---OCOO---}$ 、 $\text{---CONH---}$ からなる群より選ばれ、ここで、それぞれ独立してbは2~6の整数であり、cは1~5の整数である、ことができる。このような共重合体は、上記の特許文献1又は特許文献2に記載の方法

50

、また、必要により、これらの方法を改変した方法により製造できる。典型的な共重合体の製造方法については後述する製造例に示ように実施するのが便宜である。

#### 【0025】

ポリアニオン性ポリマーは、式(I)のブロック共重合体と一緒にあって、水性媒体中でナノ粒子を形成でき、かつ、t-PA及びブロック共重合体のレドックス活性に悪影響を及ぼさないものであれば、限定されるものでないが、一般的に、ポリ(メタ)アクリル酸、ポリスルホン酸、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸等を挙げることができる。これらの中、好ましく使用できるものは、ポリ(メタ)アクリル酸(ポリ(アクリル酸)若しくはポリ(メタクリル酸))であり、これらの数平均分子量(Mn)は500~1000000、好ましくは1000~100000、より好ましくは1000~10000であることができる。これらは、市販のものをそのまま、又は必要に応じて精製して使用することができる。

10

#### 【0026】

前記の組成物における各成分の含有割合は、本発明の目的に沿った組成物を提供できるものであれば限定されないが、一般的には、式(I)の共重合体対ポリアニオン性ポリマーの配合割合は、形成されるt-PA内包ナノ粒子の水性媒体中での安定性を考慮すれば、式(I)のポリマーのカチオン荷電性基(-NH-)の総電荷対後者のポリアニオン性基(例えば、-COOH)の総電荷が、1:10~10:1、好ましくは1:5~5:1、より好ましくは1:2~2:1、最も好ましくは1:1となるように選ばれる。こうして形成されるポリイオンコンプレックス(PIC)とt-PAとの配合割合は、t-PA内包ナノ粒子の水性媒体の分散溶液又は可溶化溶液中、室温(約20~約25)~37下で、t-PAが当該粒子から、少なくとも、1時間、実質的に溶離若しくは溶出しないことを基準に選ばれる。限定されるものでないが、アルテプラゼについて例示すると、式(I)の共重合体に対し、重量基準で、一般に0.01mg/kg~20mg/kg、好ましくは0.1mg/kg~10mg/kg、より好ましくは0.5mg/kg~5mg/kgとなるように選ばれる。共重合体は5mg/kg~500mg/kg、好ましくは10mg/kg~100mg/kg、より好ましくは20mg/kg~50mg/kgとなるように選ばれる。

20

#### 【0027】

こうして提供される組成物は、水性媒体中形成されるナノ粒子として存在することができる。本明細書にいう、水性媒体とは水(例えば、脱イオン水)、そのリン酸緩衝化溶液、必要により、エチルアルコール、ジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキシド(DMSO)等の水可溶性有機溶媒を含有する水等を挙げることができる。このようなナノ粒子の形成方法は、組成物の各成分を必要により、前記のような有機溶媒を用いて溶解し、所定の分子量(例えば、3.5kD~50kD)カットオフ能を有する透析膜を介して水に対して透析することにより各成分が一体に自己組織化したナノ粒子を提供できる。ナノ粒子とは、水性媒体中の粒子の動的光散乱(DLS)測定により平均粒径がナノオーダー、一般的に、10nm~500nm、好ましくは10nm~200nm、より好ましくは15nm~150nm、最も好ましくは15nm~50nmにある粒子を意味する。

30

40

#### 【0028】

このようナノ粒子は、水性媒体中から遠心、又はその水溶液を凍結乾燥することにより固形物として提供できる。凍結乾燥品又は上記の透析物を、前述の水性媒体や、生理食塩水、必要により、マクロゴール、L-アルギニン、L-ヒスチジン等のアミノ酸、緩衝剤リン酸緩衝液等を製薬学的賦形剤と混合して血管内投与用製剤とすることができる。当該ナノ粒子は、t-PAを内包した状態で被験動物(患者を含む)に効果的に静脈若しくは動脈からの投与又は血管内投与療法(例えば、動注療法)に使用でき、当該ナノ粒子からのニトロオキシドラジカルがROSを消去することによりニューロンの障害を防止すると同時に、t-PAの半減期を延長し、抗腫瘍又は抗がん作用及び効果を奏する。

#### 【0029】

50



当該製剤は、前述した各種のがん又は腫瘍の予防又は治療に際し、所期の効果を発揮する様な用量で患者に投与されるが、このような用量は、必要があれば動物実験及び/又は臨床試験を行い、専門医により製剤中に含有される t - P A の量や、投与方法等を考慮して決定することができる。

【発明を実施するための形態】

【0030】

以下、記載を簡潔にするため、本発明で使用するブロック共重合体の典型的な製造例、ポリオンコンプレックス ( P I C ) 組成物の調製例、ナノ粒子の調製例、さらには、ナノ粒子の作用、効果を例証するための具体的な試験例を開示するが、本発明はこれらの例に限定されるものでない。

10

【0031】

< 製造例 1 > ブロック共重合体 P E G - b - C T A の合成

5 g のポリ ( エチレングリコール ) モノメチルエーテル ( M e O - P E G - O H , M W = 5 , 0 0 0 , F l u k a , G e r m a n y ) を減圧下で水及び水分がなくなるまで、110 にて、2 ~ 12 時間攪拌した。安定化のため窒素雰囲気下、攪拌しながら 65 で1時間インキュベーションした。窒素流条件下で、脱水ポリマーにテトラヒドロフラン ( T H F ) 2 0 m L をゆっくり加え、次いで、1 . 2 5 m L のブチルリチウム ( B u L i ) を加えることによりポリマー末端ヒドロキシル基をリチウムオキシドへ転化した ( M e O - P E G - O H : B u L i = 1 : 2 ( モル比 ) ) 。得られた M e O - P E G - O L i 溶液に10倍過剰量の、ジクロロ - p - キシリレン ( D C P X , C <sub>8</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>2</sub> , 1 . 7 g ) を加え、攪拌しながら 65 で、24時間攪拌した。反応が完了した後、反応混合物を冷イソプロピルアルコール ( I P A ) へ投入し、D C P X 及び他の不純物を除去するためにポリマーを沈殿させ、遠心分離にて回収した ( 149 , 000 x g , 3 分間、- 4 ) 。冷 I P A を用いる再沈殿を3度繰り返した。こうして精製されたポリマー M e O - P E G - O C H <sub>2</sub> P h C H <sub>2</sub> C l を室温 ( 約 25 ) で24 ~ 48時間減圧下で乾燥させた ( 収量 = 4 . 9 g , 98% ) 。

20

【0032】

氷冷水浴中の丸底フラスコ中で窒素雰囲気下、溶媒として5mLのTHF中で0.4mLの二硫化硫黄 ( C S <sub>2</sub> ) と0.67mLの臭化フェニルマグネシウム ( P h M g B r , 3 . 0 M ) ジエチルエーテル溶液を混合することにより C <sub>6</sub>H<sub>5</sub>C S <sub>2</sub>M g B r を生成した。この溶液の色は数分中に黄色から暗赤色に変化した。次のステップで使用するためにこの溶液混合物を室温 ( 約 25 ) でさらに30分間攪拌した。別に、を窒素雰囲気下で純THF ( 20mL ) に4gの乾燥ポリマー M e O - P E G - O C H <sub>2</sub> P h C H <sub>2</sub> C l を溶解させた。続いて、上記の C <sub>6</sub>H<sub>5</sub>C S <sub>2</sub>M g B r の T H F 溶液を、直ちにポリマー M e O - P E G - O C H <sub>2</sub> P h C H <sub>2</sub> C l 溶液に加え、混合物を攪拌しながら40 で72時間反応させた。72時間の反応後、混合物を冷 I P A を用いて再沈殿させ、遠心した ( 149 , 000 x g , 3 分間、- 4 ) 。未反応化合物を完全に除去するためこの操作を6度繰り返し、完全に精製されたポリマー M e O - P E G - O C H <sub>2</sub> P h C H <sub>2</sub> S C ( = S ) P h ( M e O - P E G - C T A ) を得た。次いで、コポリマーを室温 ( 約 25 ) の減圧下で36時間乾燥した ( 収量 = 4 g , 100% ) 。

30

40

【0033】

M e O - P E G - C T A の <sup>1</sup>H N M R スペクトルを図1に、ゲル透過クロマトグラフィー ( G P C ) の結果を図2に示す。G P C は2mgのポリマーを0.5%のテトラエチルアンモニウムを含む T H P の1mLに溶解して行った。

【0034】

< 製造例 2 > P E G - b - P C M S ブロック共重合体の合成 :

連鎖移動剤 ( M e O - P E G - C T A ) とともにテロゲンとしてクロロメチルスチレン ( C M S ) のラジカルテロメリゼーションによりメトキシ - ポリ ( エチレングリコール ) - b - ポリ ( クロロメチルスチレン ) ( M e O - P E G - b - P C M S ) を合成した。

【0035】

50

この MeO - PEG - b - PCMS のポリマー主鎖は親水性セグメントとしての PEG と疎水性セグメントとしての反復単位 22 の PCMS から構成されていることが  $^1\text{H}$  NMR データから確認された。要約すると、MeO - PEG - b - CTA (36 g) をフリーラジカル開始剤、アゾビスイソブチロニトリル (AIBN) の 240 mg 及び CMS 56 mL と混合して高純度トルエン (200 mL) に溶解した。この混合物を窒素雰囲気下 24 時間 70 °C で攪拌した。反応後、得られたポリマーを、冷 IPA を用いる 3 度の沈殿 / 遠心 (-4 °C, 149,000 × g, 3 分) により完全に精製した後、室温 (約 25 °C) で減圧乾燥した (収量 = 4 g, 100%)。

【0036】

MeO - PEG - b - PCMS の  $^1\text{H}$  NMR スペクトルを図 3 に、ゲル透過クロマトグラフィー (GPC) の結果を図 4 に示す。

10

【0037】

GPC は、ポリマー 2 mg を 0.5% の TEA (テトラエチルアンモニウム) を含む テトラヒドロフラン (THF) 1 mL に溶解して行った。

【0038】

< 製造例 3 > PEG - b - PMNT ブロック共重合体の合成 :

MeO - PEG - b - PCMS ブロック共重合体のベンジルクロライドと 4 - アミノ - 2,2,6,6 - テトラメチルピペリジン - 1 - オキシド フリーラジカル ( $\text{NH}_2$  - TEMPO; 東京化学工業株式会社) とのアミノ化反応を介して、MeO - PEG - b - PCMS の CMS 基のクロロ原子をニトロキシドラジカルに転化した。要約すると、MeO - PEG - b - PCMS (4 g) 及び  $\text{NH}_2$  - TEMPO (9 g = 5 eq.) を別々に、N,N - ジメチルホルムアミド (DMF) の 50 mL に攪拌しながら 24 時間室温で溶解させた。2 つの溶液を混合し、24 時間室温で反応させた。反応終了後、反応混合物からポリマーを、冷 IPA を用いて沈殿させ、-4 °C で 3 分間 149,000 × g の遠心を各度行い、完全に精製された MeO - PEG - b - PMNT ポリマーを得た。得られたポリマーを室温 (約 25 °C) で 24 時間減圧乾燥した (収量 = 4 g, 100%)。

20

【0039】

4 - アミノ - TEMPO を含まない対照 MeO - PEG - b - nPMNT ポリマーは、ジメチルスルホキシド (DMSO) 中でのアミノ化反応を介して MeO - PEG - b - PCMS のクロロメチル基の 2 - ヒドロキシエチルアミノ部への転化によって得た。得られた、MeO - PEG - b - PMNT と MeO - PEG - b - nPMNT を、それぞれ、0.1 M HCl 溶液中でプロトン化して、12 時間凍結乾燥した。得られた各ポリマーを  $^1\text{H}$  NMR 及びサイズ排除クロマトグラフィーを用いて分析した。MeO - PEG - b - PMNT の  $^1\text{H}$  NMR スペクトルを図 5 に示す。このポリマー 2 mg を 0.5% の TEA (テトラエチルアンモニウム) を含む テトラヒドロフラン (THF) 1 mL に溶解したときの、ゲル透過クロマトグラフィーの結果を図 6 に示す。

30

【0040】

< 製造例 4 > t - PA @ iRNP の作製 :

tPA 内包レドックス活性型ナノ粒子は、側鎖として ROS 消去部分を保持するカチオン性ジブロック両親媒性共重合体 (PEG - b - PMNT)、アニオン性ポリ (アクリル酸) (PAAc)、及び t - PA (田辺三菱製薬株式会社から入手, ab92637) から構成されるポリオンコンプレックス (PIC) ミセルの形成を介して作製した。

40

【0041】

簡潔には、PEG - b - PMNT と PAAc (分子量 : 5,000) を、それぞれ 5 mg / mL の濃度でリン酸緩衝 (PB) 溶液 (50 mM, pH 6.2) に溶解した。t - PA 内包ニトロオキシドラジカル含有 RNPs は、3.5 mL の PEG - b - PMNT 溶液を、0.5 mL の PAAc 及び 1 mg (4 mg / mL, 0.25 mL) の t - PA の混合物に 1 : 1 のモル比 ( $r = \text{PEG - PMNT のカチオン性アミン基のモルユニット} : \text{PAAc のアニオン性カルボキシル基のモルユニット}$ ) にて滴下することにより調製した。

【0042】

50

t - P A @ R N P は D M F 溶液を 3 0 分間攪拌した後透析膜を介して水に対して透析することによって自己組織化することにより形成された。

【 0 0 4 3 】

・遊離 R N P 又は i R N P ( t - P A 不 含 ) 及 び t - P A @ i R N P ( 5 m g / m L ) の物理的性質：

平均粒径 ( n m ) 及び ( ゼータ ) 電位は、動的光散乱 ( D L S ) 技法を用いて測定した。平均粒径及び ( ゼータ ) 電位の測定結果を図 7 に示す。

【 0 0 4 4 】

< 動物実験 1 > t - P A @ i R N P の i n v i v o 抗腫瘍効果の確認

基本となる試験方法は、図 8 に示される実験プロトコールに従って実施した。

10

【 0 0 4 5 】

マウス結腸癌細胞株 C - 2 6 ( R C B 2 6 5 7 ) は理研バイオリソース研究センター ( 理化学研究所 筑波、茨城県 ) から入手した。C - 2 6 細胞株は、使用に供する前は供給元により推奨されるように保持した。すべての実験は、筑波大学ガイドライン ( 実験プラン承認 # 1 8 - 4 5 2 ) に厳密にしたがって実施した。

【 0 0 4 6 】

5 週齢の雄性 B A L B / c マウスを購入し、2 - 3 日間の馴化飼育の後に実験に用いた。B A L B / c マウスの右大腿に C - 2 6 細胞株の懸濁液 (  $1 \times 10^6$  c e l l s / マウス ( n = 7 ) ) を皮下投与することで作製した異種移植マウス ( C - 2 6 結腸癌モデルともいう。 ) を用いて t - P A @ i R N P の抗腫瘍効果及びその他の特性を決定した。

20

【 0 0 4 7 】

簡潔には、腫瘍の体積が一定のサイズ (  $100 \text{ mm}^3$  ) に達したとき、マウスを無作為に次の 6 群に分けた。健常対照 ( 健常 ) 、腫瘍担持対照 ( 生理食塩水 ) 、 t - P A (  $1 \text{ mg} / \text{kg}$  ) 、 i R N P ( T E M P O ;  $18 \text{ mg} / \text{kg}$  ) 、 t - P A @ n i R N P ( t - P A ;  $1 \text{ mg} / \text{kg}$  ) 及び t - P A @ i R N P ( t - P A ;  $1 \text{ mg} / \text{kg}$  , T E M P O ;  $18 \text{ mg} / \text{kg}$  )

t - P A @ i R N P は、上記製造例 4 で作製されたナノ粒子を、t - P A @ n i R N P は、t - P A @ i R N P において、T E M P O が 2 - ヒドロキシエチルに転化されたナノ粒子を ( 上記製造例 3 参照。 ) 、i R N P は t - P A 不 含 ナノ粒子 ( R N P ( T E M P O :  $18 \text{ mg} / \text{kg}$  ) ) を、それぞれ用いる例であり、t - P A は遊離 t - P A (  $1 \text{ mg} / \text{kg}$  ) を用いる例であり、これらのサンプルは図 8 に示される実験プロトコールの投与スケジュールに従いマウスの尾静脈を介して 2 日毎に静注 ( i . v . ) された。

30

【 0 0 4 8 】

上記実験をベースとする各種試験結果：

( 1 ) 動物の体重の変化

実験動物の体重は C - 2 6 細胞を接種した後 2 日毎に測定した。試験結果として試験中の動物の平均体重 ( n = 5 ) ( 平均  $\pm$  S D ) 変化を図 9 に示す。いずれの群も体重減少が見られず、強い毒性がないことが示された。

【 0 0 4 9 】

( 2 ) 腫瘍サイズの変化

上記試験にしたがい、生理食塩水、上記の t - P A 、 i R N P 、 t - P A @ n i R N P 、 t - P A @ i R N P を、それぞれ腫瘍担持マウス ( 各 n = 5 ) に投与後 2 日毎に腫瘍サイズを 1 7 日間測定した。マウスを 1 7 日目に安楽死させ、組織 / 器官を採取し、- 8 0 で保存した後分析した。腫瘍サイズは、次の等式を用いて算出した。

40

【 0 0 5 0 】

腫瘍サイズ (  $\text{cm}^3$  ) =  $0.5 \times L \times W^2$  ( ここで、L 及び W は、それぞれ、デジタルカリパスにより測定される腫瘍の長径及び短径である。 )

結果を図 1 0 に示す。データは平均  $\pm$  S D として表示されている。なお、図中、\* 及び # : \* P < 0 . 0 5 、 # P < 0 . 0 0 1 を意味する。

【 0 0 5 1 】

50

i R N P 処置は R O S 消去効果により腫瘍増殖が有意に抑制され、t - P A @ i R N P 処置は i R N P のものに比べより高い抗腫瘍効果を示し、これはそのより長い血液循環中での半減期に起因する可能性がある(上記の T . M e i e t a l . 参照。)。この延長された t - P A の半減期は、t - P A が腫瘍細胞の移動及び増殖の足場を提供するフィブリン崩壊を促進し、腫瘍の増殖を抑制したものと理解できる。

#### 【0052】

##### (3) 腫瘍中の R O S レベルの変化

腫瘍組織における i R N P 及び t - P A @ i R N P の R O S 消去効果を評価した。生理食塩水を用いた対照の結果を 100% と、各サンプル t - P A、i R N P、t - P A @ n i R N P、t - P A @ i R N P を投与した系についてジヒドロエチジウムを用いる R O S 測定キットを用い腫瘍組織中の R O S レベルを決定した。結果を図 11 に示す。データは平均 ± S D として表示されている。なお、図中、\* 及び \*\* : \* P < 0 . 0 5、\*\* P < 0 . 0 0 1 ( n = 3 ) を意味する。腫瘍中の R O S レベルは生理食塩水及び t - P A @ n i R N P に比べ、i R N P 及び t - P A @ i R N P において有意に低下している。

10

#### 【0053】

##### (4) 組織学的評価

マウスの組織/器官を採取し、採取後直ちに 4% パラホルムアルデヒドにより 1 日間固定した。次いで、70% エタノール中で 1 日インキュベートしてパラフィン切片標本作製した。5 μ m 厚の切片標本をヘマトキシリン及びエオシン ( H & E ) 染色に供した。器官の組織学は共焦点顕微鏡を用いて評価した。染色された代表的な組織学的切片標本の図に代わる写真を図 12 に示す。上部の写真は 4 倍拡大したものであり、下部の写真は 20 倍拡大したものである。矢印は腫瘍中のフィブリンマトリックスを示す。腫瘍組織中には高レベルのフィブリンが見られるものの、t - P A、t - P A @ n i R N P 及び t - P A @ i R N P 処理では腫瘍組織中のフィブリンが顕著に崩壊されていること判る。

20

#### 【0054】

##### (5) 免疫蛍光染色

5.1 フィブリンの分布を評価するため、腫瘍パラフィン切片標本を脱パラフィン処理し、ウサギポリクローナルフィブリ(ノーゲン)抗体 ( a b c a m ; a b 3 4 2 6 6 9 ; 1 : 1 0 0 ) ( 一次抗体 ) で染色し、次いで、A l e x a F l u o r 4 8 8 結合型ヤギ - ウサギ I g G ( I n v i t r o g e n ; 1 : 4 0 0 ) ( 二次抗体 ) で染色した。腫瘍切片標本中のフィブリ(ノーゲン)堆積を共焦点顕微鏡下で分析した。代表的な腫瘍組織中のフィブリンの免疫蛍光染色画像(写真)を図 13 に示す。フィブリン蛍光密度を、イメージJソフトウェアを用いてフィブリンシグナルの平均グリーン値を測定した。結果を図 14 に示す。図中、\* について: \* P < 0 . 0 5、\*\* P < 0 . 0 0 1 ( n = 3 ) を意味し、データは平均 ± S D として表示されている。定量化蛍光強度は腫瘍組織中に高レベルのフィブリンが観察される傾向が見られる。

30

#### 【0055】

これらの結果からも、t - P A、t - P A @ n i R N P 及び t - P A @ i R N P 処理では腫瘍組織中のフィブリンが顕著に崩壊されていること判る。

#### 【0056】

5.2 t - P A、i R N P 及び t - P A @ i R N P の抗腫瘍効果の機序を評価するため、N F - B ( R O S 調節の転写因子) 及び免疫細胞の浸透を、免疫蛍光試験によりそれぞれ決定した。

40

#### 【0057】

簡潔には、腫瘍パラフィン切片標本を脱パラフィン化し、それぞれ、N F - B p 6 5 ウサギ m A b ( X P ; D 1 4 E 1 2 ; 1 : 4 0 0 )、ラット抗 - マウス C D 1 6 / 3 2 抗体 ( 5 5 3 1 4 2 ; 1 : 5 0 0 ) 及びヤギ抗 - マウス M M R / C D 2 0 6 抗体 ( A F 2 5 3 5 ; 1 : 1 0 0 ) を用いて染色した。次いで、A l e x a F l u o r 4 8 8 - 結合型ヤギ抗 - ウサギ I g G ( I n v i t r o g e n ; 1 : 4 0 0 )、A l e x a F l u o r 4 8 8 - 結合型ヤギ抗 - ラット I g G ( I n v i t r o g e n ; 1 : 5 0 0 )、及

50

び Alexa Fluor 488 - 結合型ロバ抗 - ヤギ IgG (Invitrogen ; 1 : 500) で、それぞれ染色した。共焦点顕微鏡下の染色画像 (写真) を図 15 に示す。図中のスケールバーは 10  $\mu$ m を表す。このような顕微鏡下で腫瘍切片標本中の NF - B シグナル及び免疫細胞浸透の発現について分析した。

【0058】

NF - B レベルは、イメージJソフトウェアを用いてNF - B シグナル緑の平均値を測定することにより決定した。結果を図 16 に示す。図中、\*\*\* は  $P < 0.001$  を意味し、印の不存在は有意差がないことを意味する。データは平均  $\pm$  SD で表示されている。RNP s 及び t - PA @ iRNP の抗腫瘍効果の機序は、腫瘍中の腫瘍転写因子 (NF - B) により確認された。RNP s 及び t - PA @ iRNP は、C - 26 結腸癌 (又は腫瘍) の増殖を生理食塩水対照よりも有意に強く抑制した。これは、おそらく、ROS のモジュレーションされる NF - B のダウンレギュレーションによるのかも知れない。

10

【0059】

5.3 D - ダイマー (フィブリン崩壊産物) のレベルを腫瘍微環境に対する ELISA により表示する。

【0060】

結果を図 17 に示す。データは平均  $\pm$  S.E.M. で表示している。\* 印 :  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  (n = 5) t - PA 群、t - PA @ niRNP 群及び t - PA @ iRNP 群で有意に D - ダイマー量が上昇しており、フィブリンが効果的に切断されていることが確認される。

20

【0061】

5.4 マウスにおける薬剤の毒性

被験薬剤のマウスにおける毒性を評価するために、各種器官の H & E 染色を行い、顕微鏡下でモニターした。結果を図 18 に示す。これらの図から、本試験にも用いた各薬剤は明確な毒性を示さないことが判る。

【0062】

< 動物実験 2 > t - PA の抗腫瘍効果の確認

基本となる試験方法は、図 19 に示される実験プロトコールに従って実施した。

【0063】

t - PA それ自体の各腫瘍進行ステージでの抗腫瘍効果評価するために本試験方法は、図 19 に示される実験スキームに従って実施した。簡潔には、t - PA それ自体の各腫瘍進行ステージでの抗腫瘍効果評価するために、試験例 1 に記載した C - 26 結腸癌モデルの腫瘍サイズが 30 mm<sup>3</sup> に達したとき (初期ステージ) に、100 mm<sup>3</sup> に達したとき (中期ステージ) に、

30

処置グループ 1 : 対照 (非処置)、

処置グループ 2 : 初期ステージ、1 mg / kg 用量の t - PA の投与 (E t - PA (1 mg / kg))、

処置グループ 3 : 中期ステージ、0.15 mg / kg 用量の t - PA の投与 (M t - PA (0.15 mg / kg))、

40

処置グループ 4 : 中期ステージ、0.5 mg / kg 用量の t - PA の投与 (M t - PA (0.5 mg / kg))、

処置グループ 5 : 中期ステージ、1 mg / kg 用量の t - PA の投与 (M t - PA (1 mg / kg))、

処置グループ 6 : 中期ステージ、2 mg / kg 用量の t - PA の投与 (M t - PA (2 mg / kg))

が、それぞれ、動物の静脈内に行われた。

【0064】

(1) 腫瘍の体積 (又はサイズ) は、< 試験例 1 > の (2) に従って決定した。これらの処置による効果 (C - 26 結腸癌モデルへの各サンプルの投与による腫瘍増殖のプロファ

50

イル)を図20に示す。図中、データは平均±S.E.M.として表示する。各グループは1群5匹(n=5)である。\*は、\*P<0.05である。図20-Aは、用量1mg/kgのt-PAの投与は、初期及び中期ステージにおける腫瘍の増殖を抑制することを示す。図20-Bは、腫瘍抑制のためのt-PAの処置は用量依存的な効果を示し、1mg/kg以上で有意に優れた抗腫瘍効果を示す。

【0065】

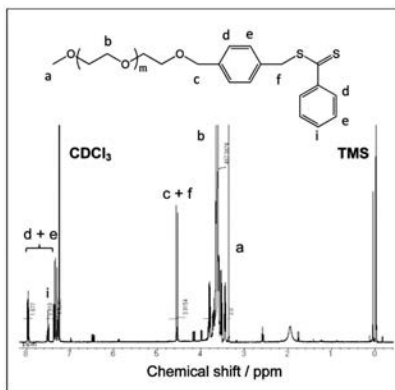
(2) C-26結腸癌モデルへサンプルの投与による体重変化のプロファイルを、図21に示す。データは平均±S.E.M.として表示する。各グループは1群5匹(n=5)である。図21-Aは、初期及び中期ステージにおける腫瘍の進行ステージにかかわらず、t-PA処置は、モデル動物の体重変化の差異を無視できることを示す。

10

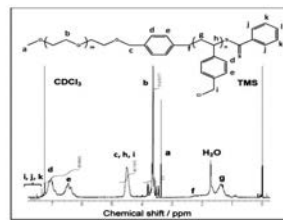
【0066】

(3) t-PAは、腫瘍組織中への免疫細胞M1マクロファージ(CD16/32)の浸透を高める。図22-Aは、前述のCD16/32(緑)及びDAPI(青)染色による染色図である。図中のスケールバーは、10µmを表す。CD16/32レベルをイメージJソフトウェアを用い緑の平均値を測定することにより決定した。結果を図22-Bに示す。各グループは、1群5匹(n=5)である。データは平均±S.E.M.として表示する。\*印:\*P<0.05を意味する。図から、t-PA処置は抗腫瘍効果のための免疫細胞(M1マクロファージ)の腫瘍組織への浸透を高めている。

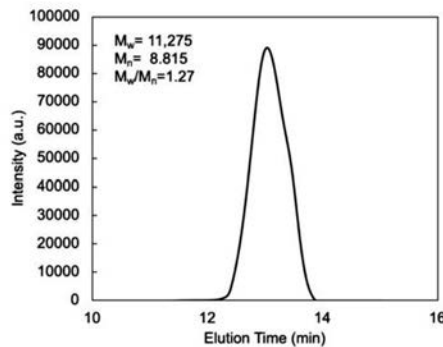
【図1】



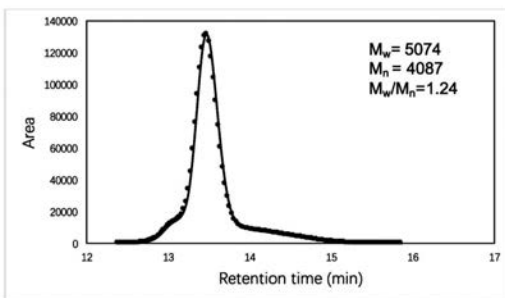
【図3】



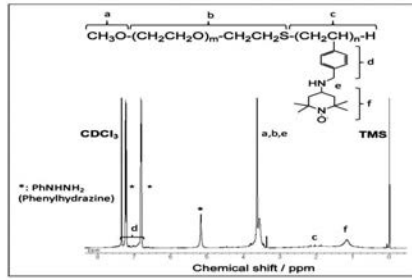
【図4】



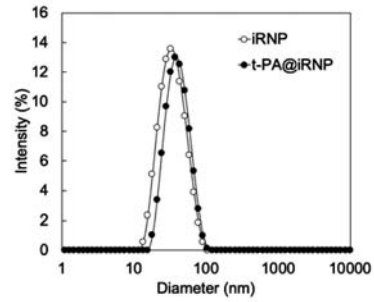
【図2】



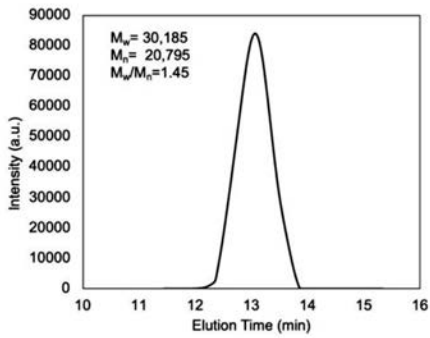
【 図 5 】



【 図 7 】

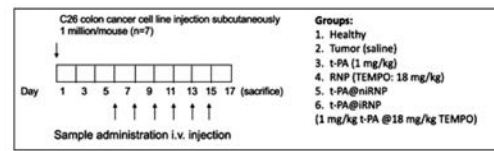


【 図 6 】

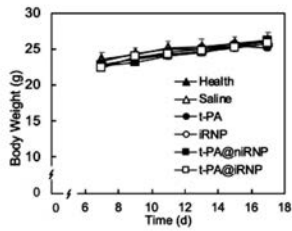


Samples	Size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)
t-PA	Nd	Nd	-1.61 ± 0.89
iRNP	33 ± 1	0.15 ± 0.01	-2.18 ± 0.47
t-PA@iRNP	48 ± 2	0.14 ± 0.03	-0.63 ± 0.69

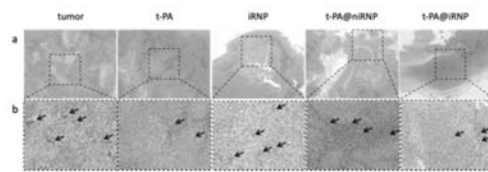
【 図 8 】



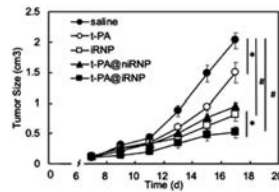
【 図 9 】



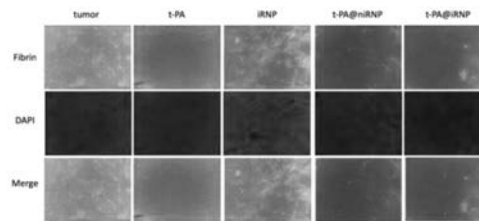
【 図 1 2 】



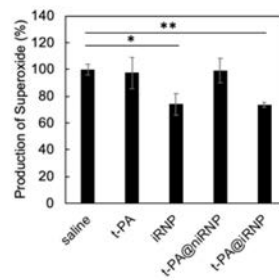
【 図 1 0 】



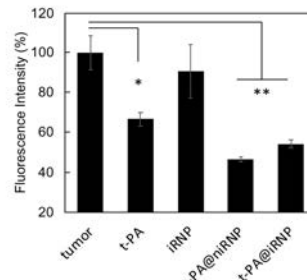
【 図 1 3 】



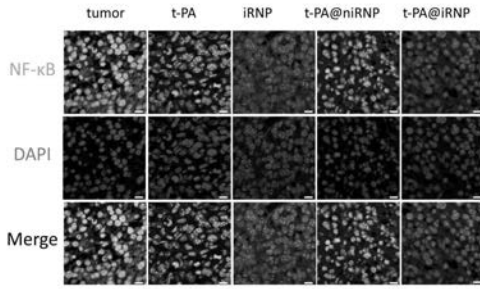
【 図 1 1 】



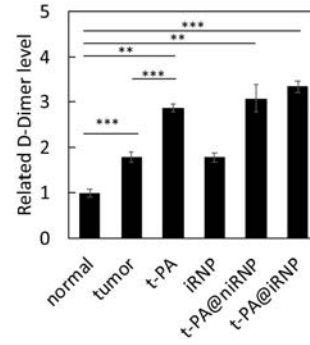
【 図 1 4 】



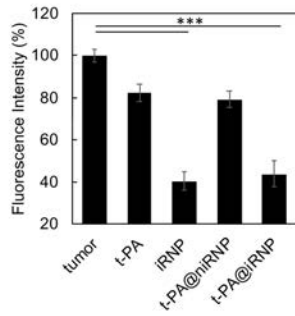
【 図 1 5 】



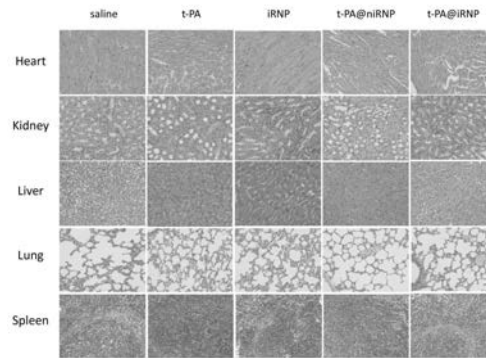
【 図 1 7 】



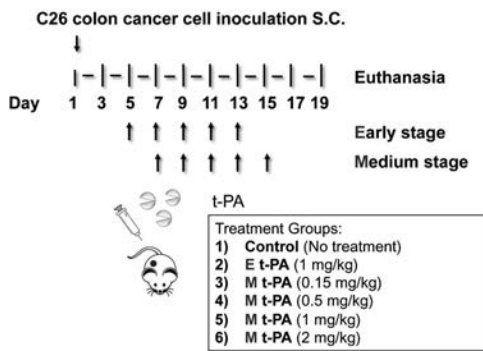
【 図 1 6 】



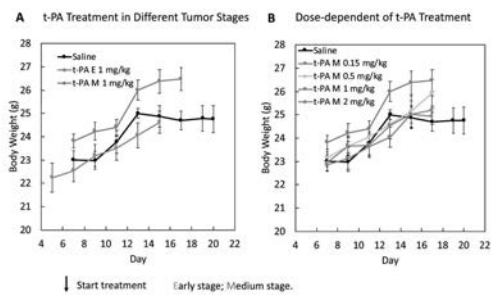
【 図 1 8 】



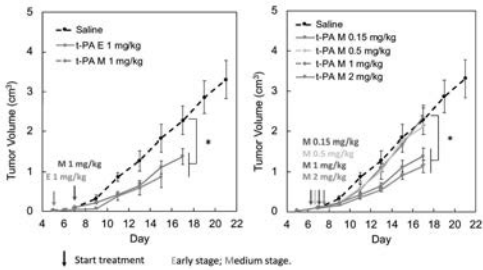
【 図 1 9 】



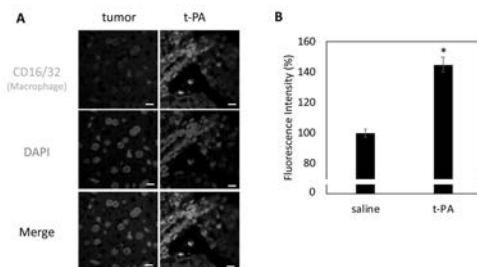
【 図 2 1 】



【 図 2 0 】



【 図 2 2 】





## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
<b>A 6 1 K 47/34</b>	<b>(2017.01)</b>	A 6 1 K	47/34	
<b>A 6 1 K 47/36</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K	47/36	
<b>A 6 1 K 9/51</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K	9/51	
Fターム(参考)	4C076 AA65 AA95 CC27 EE09 EE23 FF70			
	4C084 AA02 DC21 MA02 NA13 NA14 ZB26 ZC75			